

# 紀伊水道海域のメイタガレイ2型(ホンメイタとバケメイタ)のmtDNA切断型における遺伝的分化

誌名	日本水産学会誌
ISSN	00215392
著者名	渡辺,健一 沼知,健一 後藤,睦夫 和田,志郎 小林,敬典 釜石,隆
発行元	日本水産学会
巻/号	60巻4号
掲載ページ	p. 515-520
発行年月	1994年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



紀伊水道海域のメイタガレイ 2 型 (ホンメイタとバケメイタ) の  
mtDNA 切断型における遺伝的分化

渡辺健一, 沼知健一, 後藤睦夫, 和田志郎, 小林敬典, 釜石 隆

(1993 年 12 月 1 日受付)

Genetic Differentiation of Two Forms of Flatfishes, Genus *Pleuronichthys* in Kiisuido  
Channel Waters off the Pacific Coast of Central Japan, by Restriction  
Analysis of Mitochondrial DNAKen-ichi Watanabe,\*<sup>1</sup> Ken-ichi Numachi,\*<sup>2</sup> Mutuo Goto,\*<sup>3</sup> Shiro Wada,\*<sup>4</sup>  
Takanori Kobayashi,\*<sup>5</sup> and Takashi Kamaishi\*<sup>3</sup>

Genetic differentiation between two forms of flatfish, differentially called *Honmeita* and *Bakemeita* found in the Kiisuido Channel waters off the Pacific Coast of Central Japan, was investigated by restriction fragment analysis of mitochondrial DNA (mtDNA). 36 specimens of *Honmeita* and 32 specimens of *Bakemeita* were analyzed. We demonstrated 17 restriction fragment types using five 6-base recognized restriction endonucleases (*Bam*HI, *Bgl*II, *Hind*III, *Pst*I, *Xho*I). Five haplotypes in *Honmeita* and 3 types in *Bakemeita* were recognized, and there were no common types between the two forms. Nucleotide divergences among haplotypes of flatfishes were estimated to be 0.0074-0.0159, 0.0055-0.0115, 0.0684-0.0948, in the *Honmeita* form, in the *Bakemeita* form and between the two forms respectively. Interformal mtDNA nucleotide divergence was estimated to be 0.081. This value suggests that these two forms differentiate so highly from each other at the interspecific level. Intraformal mtDNA nucleotide divergence was estimated to be 0.0016 and 0.0012 in the *Honmeita* and *Bakemeita* forms respectively.

キーワード: メイタガレイ 2 型, ミトコンドリア DNA, 遺伝的分化, 塩基置換率

日本沿岸のメイタガレイは *Pleuronichthys cornutus* 1 種類と考えられていたが, 最近の研究により 2 種類の型が生息していることが明らかになった。加藤, 藤尾<sup>1)</sup>は仙台湾のメイタガレイについてアイソザイム分析を行い, リンゴ酸脱水素酵素などの変異から 2 型の生息を明らかにし, 渡辺, 沼知<sup>2)</sup>は紀伊水道の 2 型がリンゴ酸脱水素酵素に加えてイソクエン酸脱水素酵素と  $\alpha$ -グリセロリン酸脱水素酵素に関与する遺伝子座で別種と考えられることを示した。また, 松岡ら<sup>3)</sup>は東シナ海の 2 型についてアイソザイム分析からその Nei の遺伝的距離  $D$  を 0.9243, 藤尾<sup>4)</sup>は仙台湾のものについて同じく 0.58 と計算し, この 2 型が種レベルに分化していると指摘した。

最近, DNA を直接研究する方法が開発され, さまざ

まな遺伝学的研究が行われているが集団研究でも極めて優れた方法であることが認められている。しかし, メイタガレイ 2 型について DNA を分析した報告はない。本研究では, DNA を直接分析することによって両型の遺伝的分化の程度をより明確にしようとした。DNA の中で進化速度が早いことが知られ, また, 分析手法も確立しているミトコンドリア DNA (mtDNA) を選び, 2 型の型内および型間の変異がどの程度あるか, また, 2 型の遺伝的分化がどの程度進んでいるかを把握しようとした。

この 2 型は種として未記載であるので, 野沢, 加藤<sup>5)</sup>が用いたホンメイタとバケメイタの通称を用いることとする。

\*<sup>1</sup> 徳島県水産試験場 (Tokushima Prefectural Fisheries Experimental Station, Hiwasa, Kaihu, Tokushima 779-23, Japan).\*<sup>2</sup> 東海大学海洋学部 (The Faculty of Marine Science and Technology, Tokai University, Shimizu 424, Japan).\*<sup>3</sup> 東京大学海洋研究所 (Ocean Research Institute, University of Tokyo, Minamidai, Nakano, Tokyo 164, Japan).\*<sup>4</sup> 中央水産研究所 (National Research Institute of Fisheries Science, Fukuura, Kanazawa, Yokohama 236, Japan).\*<sup>5</sup> 養殖研究所 (National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-01, Japan).\*<sup>6</sup> 藤尾芳久: アイソザイム分析手法による魚介類の遺伝的特性の解明に関する研究。昭和 60 年度農林水産業特別試験研究費による研究報告書, 1986, pp. 3-8.

## 材料と方法

mtDNA の遺伝的分化の分析に使用したメイタガレイ 2 型の標本は Table 1 のとおりである。いずれも Fig. 1 に示した徳島県沿岸の紀伊水道とその外海域で底びき網漁船により漁獲された。標本は採集後直ちにポリスチロール氷冷箱に入れ、氷冷状態で徳島県水産試験場から東京大学海洋研究所へ送付した。採集から東大海洋研までおよそ 30 時間を要した。東大海洋研では、受け取ったその日のうちに標本の肝臓から mtDNA を分離し、実験に供するまで  $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

mtDNA の分離・精製法は、沼知, 小林<sup>\*7,8)</sup>に、制限酵素による切断法は沼知, 小林<sup>\*9)</sup>に、電気泳動法および染

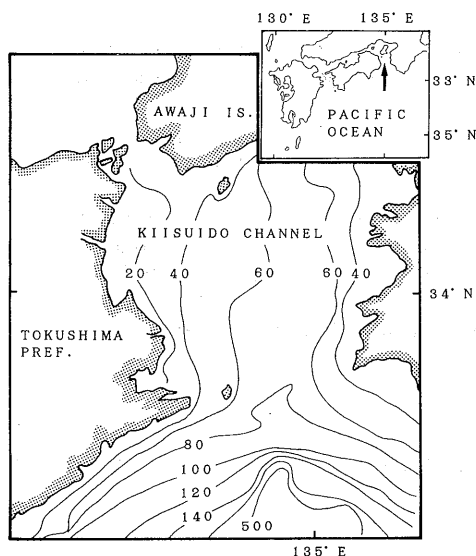


Fig. 1. Sampling localities.

Kiisuido Channel and adjacent Pacific waters of central Japan with contours of depth (m).

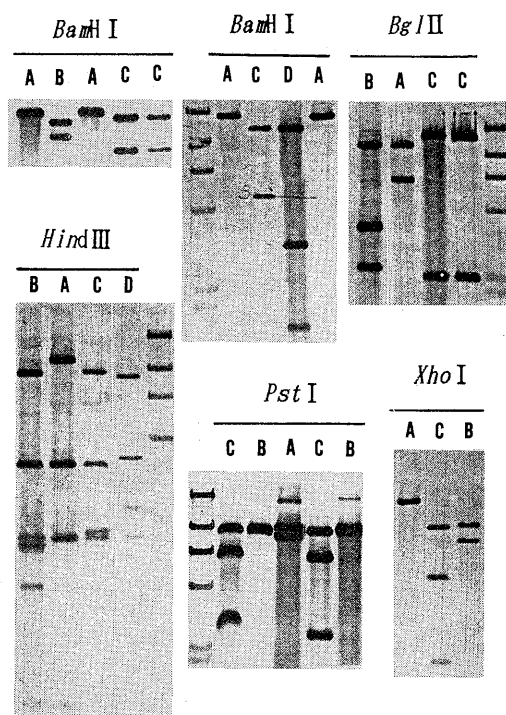


Fig. 2. Restriction fragment morphs of mtDNA of the two forms of *Pleuronichthys* observed after digestion with 5 restriction endonucleases.

At the top of the pattern, the name of morph (A–D) is shown. The rightmost or leftmost lane without a name is the  $\lambda$ DNA marker.

Restriction patterns of the two forms with 5 restriction endonucleases were as follows. *Bam*HI: Honmeita; A, B, Bakemeita; C, D, *Bg*II: Honmeita; A, B, Bakemeita; C, *Hin* dIII: Honmeita; A, B, C, bakemeita; D, *Pst*I: Honmeita; A, B, Bakemeita; C, *Xho*I: Honmeita; A, Bakemeita; B, C.

Table 1. Flatfish samples examined for mtDNA variation

Sample code	Form of <i>Pleuronichthys</i>	Sampling station	Sampling date	No. of samples examined
TM-1	Bakemeita	The Pacific coast of Tokushima Pref.	Nov. 1990	17
TM-2	Honmeita	Kiisuido Channel	Nov. 1990	4
TM-3	Honmeita	Kiisuido Channel	Dec. 1990	11
TM-4	Bakemeita	Kiisuido Channel	Dec. 1990	15
TM-5	Honmeita	Kiisuido Channel	Dec. 1990	21

\*7) 沼知健一, 小林敬典: 制限酵素による有用海産動物のミトコンドリア DNA の遺伝学的分析, 昭和 61 年度科学研究費補助金 (一般研究 B) 研究成果報告書, 東京大学海洋研究所, 東京, 1987, pp. 1–46.

\*8) 沼知健一, 小林敬典: mtDNA の変異を標識としたサケ科魚類の遺伝資源学的研究. 平成元年度科学研究費補助金 (一般研究 A) 研究成果報告書, 東京大学海洋研究所, 東京, 1990, pp. 1–72.

\*9) 沼知健一, 小林敬典: ミトコンドリア DNA による系統群分離手法の開発. ベーリング公海漁業対策調査報告, 水産庁, 東京, 1991, pp. 79–97.



**Table 4.** Nucleotide divergence between pairs of haplotypes

Haplotype	2	3	4	5	6	7	8
1	0.0081	0.0074	0.0074	0.0074	0.0821	0.0753	0.0885
2		0.0159	0.0159	0.0159	0.0753	0.0684	0.0821
3			0.0145	0.0145	0.0885	0.0821	0.0948
4				0.0145	0.0885	0.0821	0.0948
5					0.0885	0.0821	0.0948
6						0.0059	0.0055
7							0.0115

**Table 5.** Nucleotide divergence between the two forms of *Pleuronichthys*

Haplotype	1	2	3	4	5
6	0.0475	0.0069	0.0027	0.0027	0.0027
7	0.0109	0.0016	0.0006	0.0006	0.0006
8	0.0032	0.0005	0.0002	0.0002	0.0002

**Table 6.** Nucleotide divergence in Honmeita

Haplotype	2	3	4	5
1	0.007	0.0002	0.0002	0.0002
2		0.0001	0.0001	0.0001
3			<0.0001	<0.0001
4				<0.0001

**Table 7.** Nucleotide divergence in Bakemeita

Haplotype	7	8
6	0.0009	0.0002
7		0.0001

**Table 8.** Comparison of intra- and interspecific nucleotide divergence ( $\pi$ ) of the two forms of *Pleuronichthys* and the reported values

(Intrapopulation)	Japanese dace	0.07–0.23%	N. Hanzawa <i>et al.</i> (1987)
	Masu salmon	0.026–0.144%	T. Kobayashi (1988)
	Cham salmon	0.0–0.621%	T. Kobayashi (1988)
	Masu salmon (cultured stocks)	0.170–0.253%	A. Kijima and D. Matsunami (1992)
(Interpopulation)	Japanese dace	0.77–0.94%	N. Hanzawa <i>et al.</i> (1987)
	Masu salmon	0.068–0.261%	T. Kobayashi (1988)
	Cham salmon	0.089–1.531%	T. Kobayashi (1988)
	Formosan salmon and Okutama population of <i>O. masou masou</i>	0.529%	K. Numachi <i>et al.</i> (1990)
Interspecific	Honmeita of <i>Pleuronichthys</i>	0.16%	Present study
	Bakemeita of <i>Pleuronichthys</i>	0.12%	Present study
	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	<1%	G. M. Wilson <i>et al.</i> (1987)
	American shad	0.2%	P. Bentzen <i>et al.</i> (1989)
	European eel	0.8%	J. C. Avise <i>et al.</i> (1986)
	American eel	0.1%	J. C. Avise <i>et al.</i> (1986)
	Horseshoe crab	2%	N. C. Saunders <i>et al.</i> (1986)
Interspecific	Honmeita and Bakemeita	8.1%	Present study
	<i>Pan</i>	3.7%	S. D. Ferris and W. J. Berg (1987)
	<i>Mus</i>	7.6%	S. D. Ferris and W. J. Berg (1987)
	<i>Salmo</i>	3.4–10.0%	S. D. Ferris and W. J. Berg (1987)
	American eel and European eel	3.7%	J. C. Avise <i>et al.</i> (1986)
	North Pacific form and Southern hemisphere form of minke whales	3.9%	S. Wada, T. Kobayashi and K. Numachi (1991)

ホンメイトとバケメイトの mtDNA ゲノムの変異の保有状態および両型間の遺伝的差異

(1) ホンメイトとバケメイトの mtDNA ゲノム型と頻度 ホンメイトの mtDNA ゲノム型は Table 2 に示したように 1~5 で、1 型が最も多く、76% の個体が 1 型であった。ついで 2 型が 12%、3, 4, 5 型はどれも 4% に程度に過ぎなかった。一方、バケメイトのゲノム型はホンメイトと共通するゲノム型はなく、ゲノム型 6, 7, 8 を示し、このうち 6 型が最も多く 76%、ついで 7 型が 19%、8 型が 5% であった。

(2) ゲノム型間の塩基置換 メイトガレイの mtDNA 間に塩基配列の違いがどれくらいあるかを推定するため二つのゲノム型間の総切断部位数と共通切断部位数を集計した (Table 3)。この二つの値から Nei and Li<sup>5)</sup> のゲノム型間の塩基置換率  $\pi$  を求めた (Table 4)。この結果、ゲノム型間の  $\pi$  は、ホンメイトでは 0.0074~0.0159、バケメイトでは 0.0055~0.0115、ホンメイトとバケメイト間では 0.0684~0.0948 であった。

(3) ホンメイトとバケメイトの変異量と型間の分化 二つのゲノム型  $i$  と  $j$  の頻度を  $X_i, X_j$ 、両者間の塩基置換率を  $\pi_{ij}$  とすれば集団内または集団間の塩基置換率  $\pi$  は次の式で表される。<sup>9)</sup>

$$\pi = \sum_{ij} X_i \cdot X_j \cdot \pi_{ij}$$

この結果 Table 5 が得られ、集計の結果ホンメイトとバケメイト間の  $\pi$  は 0.081 となった。

型内の変異量を見るためそれぞれの  $\pi$  を求めると、ホンメイトの  $\pi$  は 0.0016、バケメイトは 0.0012 であった (Table 6, Table 7)。

## 考 察

mtDNA の分析による  $\pi$  は、Ferris and Berg<sup>6)</sup> が種内の値として霊長類を含め魚類のサケ属までの 22 種類について求めているが、その値は <0.01~4.13% である。また、そのほかにも Table 8 に示したようにさまざまな分類段階における  $\pi$  が求められている。<sup>7-15)</sup> 種内の  $\pi$  は 1% 未満が多いが、日本で研究されたウグイやサクラマスの河川集団間のように比較的高い値を示す場合もある。また、カブトガニでは 2% の高い値が報告されている。一方、種間の  $\pi$  値としては、チンパンジーの種間が 3.7%、ハツカネズミ類の各種間が平均 7.6%、コイワシクジラの北太平洋型と南半球型間が 3.9%、魚類では *Salmo* 属の種間が 3.4~10%、ヨーロッパウナギとアメリカウナギ間で 3.7% などが得られている。

この研究で得られたホンメイトとバケメイト間の  $\pi$  は 8.1% で、以上の種内と種間の分化の大きさと比較するとホンメイトとバケメイトの遺伝的分化は種の水準で

もむしろ高い水準に達していることを示し、両者の分化は極めて大きく、共通の mtDNA ゲノム型がない明らかに別種であることが重ねて示されたことになる。

## 謝 辞

本研究の機会を与えられた徳島県水産試験場の田福正治前場長、中村和夫現場長、および秋月友治元場長、ならびにサンプル収集などに協力をいただいた現徳島県水産課上田幸男技術主任に対し心から感謝します。

## 文 献

- 1) 加藤康成, 藤尾芳久: メイトガレイの同胞種について. 水産育種, **4**, 10-12 (1979).
- 2) 渡辺健一, 沼知健一: 瀬戸内海東部海域のメイトガレイ同胞種の遺伝生化学的検出と形態学的検討. 日水誌, **54**, 765-772 (1988).
- 3) 松岡正信, 谷口順彦, 藤田 轟, 北島忠広, 時村宗春: 東シナ海・黄海産メイトガレイの比較研究-I. 分布, 形態及び遺伝的差異. 西水研報, **67**, 23-36 (1989).
- 4) 野沢正俊, 加藤史彦: 鳥取県沖日本海産メイトガレイの 2 型, ホンメイトとバケメイトの形態比較. 日水研報, **32**, 1-8 (1981).
- 5) M. Nei and W. Li: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5269-5273 (1979).
- 6) S. D. Ferris and W. J. Berg: The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery management, in "Population Genetics and Fishery Management" (ed. by N. Ryman and F. Utter), University of Washington Press, Seattle and London, 1987, pp. 277-300.
- 7) G. M. Wilson, W. K. Thomas, and A. T. Beckenbach: Mitochondrial DNA analysis of a Pacific northwest population of *Oncorhynchus tshawytscha*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **44**, 1-5 (1987).
- 8) P. Bentzen, G. C. Brown, and W. C. Leggett: Mitochondrial DNA polymorphism, population structure, and life history variation in American shad (*Alosa sapidissima*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **46**, 1446-1454 (1989).
- 9) J. C. Avise, G. S. Helfman, N. C. Saunders, and L. S. Hales: Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4350-4354 (1986).
- 10) N. C. Saunders, L. G. Kessler, and J. C. Avise: Genetic variation and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Genetics*, **112**, 613-627 (1986).
- 11) N. Hanzawa, H. Yonekawa, and K. Numachi: Variability of mitochondrial DNA in Japanese dace, *Tribolodon hakonensis* (Cyprinidae). *Jpn. J. Genet.*, **62**, 27-38 (1987).
- 12) 小林敬典: サクラマスとシロサケの mtDNA の遺伝生化学的研究: 集団分析のための分離抽出法と遺伝的変異性. 博士学位論文, 東京大学, 東京, 1988, 48-134.
- 13) K. Numachi, T. Kobayashi, K. H. Chang, and Y. S. Lin: Genetic identification and differentiation of the Formosan landlocked salmon, *Oncorhynchus masou formosus*, by restriction analysis of mitochondrial DNA. *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica*, **29**, 61-72 (1990).
- 14) A. Kijima and D. Matsunami: Haplotypic differences and variability of mitochondrial DNA among cultured stocks of the masu salmon complex. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**,

- 1431-1436 (1992).
- 15) S. Wada, T. Kobayashi, and K. Numachi: Genetic variability and differentiation of mitochondrial DNA in minke whales. *Rep. int. Whal. Commn.* (Special Issue 13), 203-215 (1991).