

論文の内容の要旨

論文題目 ミトコンドリア DNA 分析によるキンメダイの集団遺伝構造
 および卵仔魚の分布様式の解析

氏 名 秋元 清治

日本周辺漁場におけるキンメダイ資源は、主に千葉県、東京都、神奈川県、静岡県、高知県の一都四県の立縄釣り、樽流し釣りおよび底立延縄漁業者により漁獲されている。その漁獲量は、1984年から1990年初頭までは8,600 - 10,000 トンの高水準で続いていたが、1991年の11,041 トンをピークに減少傾向にあり、2003年には6,116 トンと最盛期の約6割にまで減少した。キンメダイは日本周辺海域において重要水産資源であり、早急に資源回復するための方策を講ずることが望まれている。伊豆諸島周辺海域におけるキンメダイ資源については、これまで成熟、成長、分布、移動等に関する研究が行われてきたが、資源管理の根幹となる集団構造および卵、仔稚魚の分布、移送様式、稚魚の着底時期などの初期生態に関してはほとんど知見が得られていない。さらに、キンメダイ属のフウセンキンメはキンメダイに形態的に酷似し、また、ナンヨウキンメを含めたキンメダイ属3種の卵仔稚魚期における判別は困難で、キンメダイの適正な資源管理を推進する上で大きな障害となっている。

本研究は以上の背景の下、ミトコンドリア DNA 分析によりキンメダイ属3種の種判別法を確立し、日本周辺海域におけるキンメダイの集団構造の解析を試みるとともに、卵仔魚の分布様式を明らかにすることを目的として行われたもので、結果の概要は以下

の通りである。

1. キンメダイ属 3 種の分子生物学的同定と近縁性

魚類資源を適正に評価するためには、対象となる魚類を正確に同定することが必須である。そこでまず、分子系統学的研究において種間あるいは属間の系統類縁関係を検討するためによく使われる 16S rRNA 遺伝子の 3' 端側一部領域 577 bp を PCR 増幅し、500 bp 程度の塩基配列を決定して、その種間変異からキンメダイ属 3 種を判別する方法を検討した。すなわち、伊豆諸島および小笠原諸島周辺海域で採集し、中坊 (2000) の方法に従い形態的特徴から同定したキンメダイ (n=6)、フウセンキンメ (n=4)、ナンヨウキンメ (n=6) 成魚筋肉(エタノール溶液中 4°C 保存, 以下同様)から全 DNA を調製し、上記の遺伝子領域を PCR で増幅した。その結果、3 種間で 11 座位に塩基置換がみられ、この中、種内変異はキンメダイの 1 座位だけで、10 座位は種間変異であった。すなわち、キンメダイとフウセンキンメでは 3 座位、キンメダイとナンヨウキンメでは 9 座位、ナンヨウキンメとフウセンキンメでは 8 座位の種間変異がみられ、これら種間変異を利用することで 3 種の判別は可能であった。以上のように、本結果は供試尾数は少ないものの、中坊 (2000) の形態的特徴を用いた同定法の有効性を明白に支持した。また、近隣結合法により作成された分子系統樹上で、フウセンキンメはナンヨウキンメに比べてキンメダイにより近縁であることが示された。さらに、オーストラリア産の標本で GenBank にキンメダイとして登録されている塩基配列データ (AF221886) は本研究のフウセンキンメのデータと一致した。このような相違は、日本以外ではフウセンキンメの認知度が低いか、あるいは有効種として取り扱われていないことに起因することが考えられた。

2. キンメダイの集団遺伝構造

新たに房総半島沖、鳥島西方沖、伊豆諸島海域で採集した 40 試料と前節の 5 試料を合わせた日本産キンメダイ計 45 試料、フウセンキンメについては鳥島西方沖の新たな 3 試料と前節の 4 試料を合わせた計 7 試料の成魚筋肉から全 DNA を調製し、シトクロム *b* 遺伝子の 5' 端側一部領域 307 bp の塩基配列を決定したところ、キンメダイおよびフウセンキンメで、それぞれ 11 および 3 ハプロタイプが得られた。これら日本産の試料の塩基配列データを GenBank に登録されているニューカレドニア産キンメダイ A および W 種のデータと比較したところ、A 種は日本産キンメダイのハプロタイプと、一方、W 種は日本産フウセンキンメのハプロタイプとほぼ一致し、ニューカレドニア産キンメダイ A 種および W 種はそれぞれ、キンメダイおよびフウセンキンメと同定され

た。なお、日本産およびニューカレドニア産試料集団間における遺伝的分化程度の指標の固定指数 (F_{st}) は、キンメダイおよびフウセンキンメでそれぞれ 0.003 および -0.044 と著しく小さかった。また、両種とも最も頻度の高いハプロタイプが日本産とニューカレドニア産の試料集団で一致し、太平洋の南北両半球にわたる広範囲な海域における遺伝子流動の可能性を示した。

次に、日本周辺の房総半島沖、トカラ列島沖、鳥島西方沖の漁場で採集したキンメダイ 31 試料の成魚筋肉から全 DNA を調製し、制御領域全長の約 90% の中央領域 823 bp の塩基配列を決定した。欠失の変異 1 箇所を加えた計 824 bp 中、塩基置換は 54 箇所 (塩基置換率 6.6%) にみられ、31 試料間で同一のハプロタイプは認められなかった。また、平均塩基置換率は漁場内、漁場間でほとんど差が見られなかった。さらに、純塩基置換係数は異なる漁場試料間で -0.02~0.07% と低かった。 F_{st} は房総半島沖と鳥島西方沖の漁場間で 0.0583 とやや高かったが、房総半島沖とトカラ列島沖の漁場間およびトカラ列島沖と鳥島西方沖の漁場間は -0.0166~0.0213 ときわめて低く、明白な遺伝的分化は認められなかった。分子系統樹でも、外群としたナンヨウキンメおよびフウセンキンメからの遺伝的距離に比べてキンメダイ種内間のそれは著しく小さく、キンメダイ試料のハプロタイプは漁場別にクラスターを形成することはなかった。

3. キンメダイ卵仔魚の同定と伊豆諸島周辺海域における分布様式

キンメダイの卵仔魚の分布様式を明らかにすることを目的に、現場海域で採集したキンメダイ属の形態的特徴をもつ試料につき 16S rRNA 遺伝子分析から種同定を試みた。まず、2000 年 8 月に伊豆諸島海域で採集しキンメダイ属の形態的特徴をもつ浮遊卵 30 個を現場で 5% ホルマリン溶液中に固定し、神奈川県水産技術センターに持ち帰った後、1 ヶ月以内に 99.5% エタノール溶液に置換した。その中、20 個を前述の 16S rRNA 遺伝子一部領域を対象とする PCR に供したが増幅 DNA 断片は得られなかった。そこで対象領域を短くして再度 PCR したところ、残りの 10 個中 6 個で増幅 DNA 断片が得られ、決定した塩基配列はすべて前述のキンメダイのそれと一致した。

次に、2002 年 8 月に八丈島北方の黒瀬海穴付近の 9 地点においてノルパックネットの表層曳きおよび鉛直曳き (水深 0 - 200m) によりキンメダイ属の形態的特徴をもつ卵 3,394 個、仔魚 17 尾を採集し、現場でエタノール溶液中 (採集直後 50%, 2 週間以内に 99.5% に置換) に保存した。まず、前述のキンメダイ属 3 種の成魚筋肉を用いて 16S rRNA 遺伝子の一部領域 577 bp (プライマー領域を加えて 619 bp) を PCR 増幅し、制限酵素 *Hinf*I で消化したところ、キンメダイは 276, 203 および 140 bp からなる 3 断片、ナンヨウキンメは 276, 226 および 117 bp の 3 断片、フウセンキンメは 343 および 276 bp の

2断片を生成した。次に、採集試料から無作為に抽出した卵 55 個、仔魚 16 尾を同様の分析に供したところ、DNA の調製ができなかった試料を除き、卵 45 個、仔魚 10 尾で対照のキンメダイ遺伝子と同じパターンを示した。さらに、塩基配列分析に供した卵 8 個、仔魚 1 尾もすべてキンメダイ 16SrRNA 遺伝子のそれに一致した。

以上の分析から採集試料が全てキンメダイの卵と推定されたので、採集された卵仔魚の分布様式を検討した。濾水量 100 m³ 当たりの平均採卵数は、表層水平曳きで 223.1 個、鉛直曳きで 9.0 個と、表層水平曳きは鉛直曳きに比べて約 25 倍の分布密度を示した。また、卵は採集地点により分布密度が大きく異なり、パッチ状に存在するものと考えられた。一方、表層水平曳きで採集されたキンメダイ卵は鉛直曳きで採集されたものに比べて、発生段階が進んでいるものが多かった。調査海域では湧昇流の影響も考えられなかったことから、キンメダイ卵は海底付近で産卵された後、発生が進むにつれて表層付近まで上昇するものと考えられた。前述のように採集仔魚数は 17 尾と少なかったが、濾水量 100m³ 当たりの平均採集数は表層水平曳きで 0.9 尾、鉛直曳きで 1.0 尾とほとんど差はなかった。

以上、本研究は、ミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子一部領域の塩基配列の種間変異からキンメダイ属 3 種の種判別を行った。また、シトクロム *b* 遺伝子の解析からキンメダイおよびフウセンキンメが太平洋の南北両半球にまたがる広範囲の海域で遺伝子流動をもたらしていることを示唆し、一方、制御領域の解析から日本周辺のキンメダイは漁場間で遺伝的差異はほとんどないことが示された。さらに、これら分子生物学的成果を応用して、キンメダイ卵は発生が進むにつれて表層付近まで上昇し、表層付近にパッチ状に分布することを明らかにしたもので、魚類の生態的特徴に基礎的知見を与えるのみならず、キンメダイ資源の適正な資源管理を推進する上で貢献するところが大きいと考えられる。