

1. 1. 13 ホタテガイの遺伝子解析

担当者 資源増殖部 栗原康裕・多田匡秀

(1) 目的

サハリン州におけるホタテガイ自然個体群のミトコンドリアDNA多型を解明し、北海道における放流ホタテガイ集団の遺伝的多様性を評価する。さらにオホーツク海域ホタテガイ天然種苗の起源を分子生物学的手法で同定、判別し、オホーツク海沿岸のホタテガイ採苗稚貝の親元判別を行う。

(2) 経過の概要

ア 北海道及びサハリン海域のホタテガイ集団のDNA多型比較

2003年から2006年に入手したサハリン、北海道、青森県の3海域のホタテガイ標本を使用した。

サハリン産3海域(図1:1-3)、オホーツク海4海域、日本海1海域(図1:4-8)、青森県陸奥湾1海域(図1:9)の合計9海域のDNA標本から、PCR法による増幅およびシーケンス作業を実施した。

PCR (polymerase chain reaction) 法によるDNA増幅用サーマルサイクラーはエッペンドルフ社製マスターサイクラー・パーソナル、DNAポリメラーゼはTakara SpeedStarを用いた。

ミトコンドリアDNA上の非コード領域(NcR2) (Sato et al., 2001) をターゲットとして以下のプライマー、
Pysol6SBF (5' -CGGCGAAGCCAGGTCAGTTTCTATC-3'),
Pysol2SAR (5' -AGGTAACCAGAACCAACTACC-3')
により429塩基を増幅した。

PCR反応条件は以下の通り。

1. 熱変性: 96°C, 5秒
2. アニーリング: 55°C, 15秒
3. 伸長: 72°C, 30秒
4. 1から3を30サイクル反復する。

増幅したPCR産物をアガロースゲル電気泳動法で確認し、BigDyeTerminator法によるシーケンス反応後、ABI Prism3100(北海道立栽培水産試験場)により塩基配列を決定した。

シーケンス反応にはPysol6SBFと本研究で作成したプライマー、

Miye16R (5' -CAACTCATACTCATTCTGCG-3')を使用した。

各集団に関して以下の多様度を計算した。

遺伝子多型性 S (岸野・浅井 2003)

$$S = \sum (1 - \delta(X))$$

X: 集団内のハプロタイプ頻度ベクトル

δ : ディラックのデルタ関数

遺伝子多様度 h (小池・松井, 2003)

$$h = n(1 - (X \cdot X)) / (n-1)$$

X: 集団内のハプロタイプ頻度ベクトル

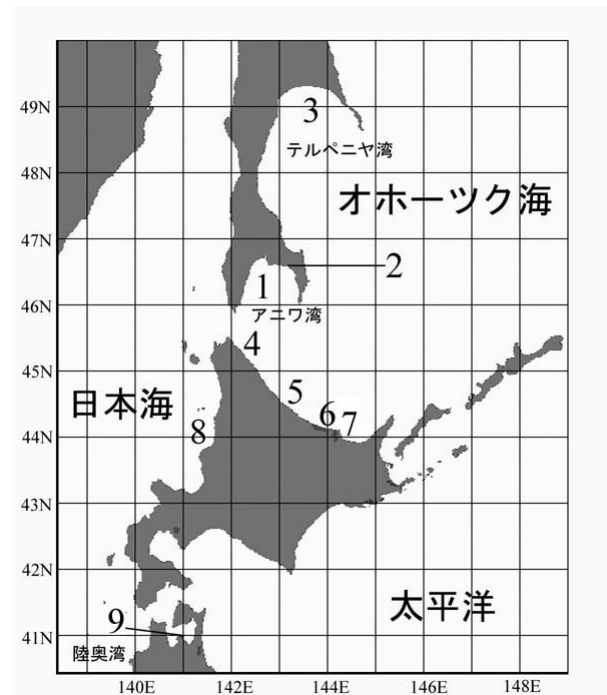


図1 ホタテガイ標本の採集海域

- 1: アニワ湾, 2: ブッセ湖, 3: テルペニヤ湾,
4: 猿払, 5: 紋別, 6: 常呂, 7: 網走, 8: 小平,
9: 陸奥湾

表2 北海道およびサハリンにおけるミトコンドリア DNA 非コード領域 NcR2 ハプロタイプの出現頻度

ハプロタイプ	サハリン				合計	猿払	紋別	北海道			合計	青森県	全海域
	テルベニヤ湾	ブッセ湖	アニコ湾					常呂	網走	小平		陸奥湾	合計
1	24	8	15	47		10	7	1	1	5	24	2	73
2	1	1		2									2
3	1			1									1
4	2		1	3	1				2	1	4		7
5	7	39	41	87	21	29	3	17	16	86	8	181	
6	1			1									1
7	1	1		2			1				1		3
8	7	10	18	35	9	2			2	4	17		52
9	1			1									1
10	1			1									1
11	1			1									1
12	1			1									1
13	1			1									1
14	2			2									2
15	1			1									1
16	1			1									1
17	1			1									1
18			1	1									1
19			2	2									2
20		1	1	2					1		1		3
21		3	2	5	2	2			1	3	8	1	14
22		1		1									1
23		1		1					1		1		2
24		3		3									3
25		1		1									1
26		1		1									1
27		1		1									1
28					1						1		1
29			1	1	17	11	1	7	5	41	15		57
30					1						1		1
31					1						1		1
32					1						1		1
33					1						1		1
34					1						1		1
35					1						1		1
36					1						1		1
37												1	1
38												1	1
39									2		2		3
40												1	1
41												1	1
42												1	1
43												1	1
44										1	1		2
45												1	1
46		2		2						2	2	1	5
47												1	1
48												1	1
49												1	1
50										1	1	1	2
51												1	1
52										1	1		1
53							1			1	2		2
54					2	2			3	2	9		9
55									2	1	3		3
56										1	1		1
57								1	1	1	3		3
58										1	1		1
59					2	4			2	1	9		9
60										1	1		1
61							1				1		1
62		1	1	2	2	1			1		4		6
63						1					1		1
64						1					1		1
65						1					1		1
66						1					1		1
67						1					1		1
68						1			1		2		2
69						1					1		1
70						1					1		1
71						1					1		1
72						1					1		1
73									1		1		1
74										1	1		1
75							1		1		2		2

表2 続き

ハプロタイプ	サハリン			合計	猿払	紋別	北海道			合計	青森県	全海域
	テルベニヤ湾	ブッセ湖	アニコ湾				常呂	網走	小平		陸奥湾	合計
76									1		1	1
77									1		1	1
78									1		1	1
79									1		1	1
80									1		1	1
81									1		1	1
82						2			3		5	5
83									1		1	1
84									1		1	1
85									1		1	1
86						1					1	1
87						1					1	1
88			1	1		1					1	2
89						1					1	1
90						1					1	1
91						1					1	1
92						1					1	1
93						1					1	1
94						1					1	1
95									1		1	1
96									1		1	1
97									1		1	1
98									1		1	1
99									1		1	1
100									1		1	1
101									1		1	1
102						1					1	1
103						1					1	1
104			1	1		1					1	2
105						1					1	1
106						1					1	1
107						1					1	1
108						1					1	1
109						1					1	1
110						1					1	1
111						1					1	1
112						1					1	1
113						1					1	1
114						1					1	1
115							1				1	1
116							1				1	1
117							1				1	1
118							1				1	1
119							1				1	1
120							1				1	1
121							1				1	1
122							1				1	1
123								1			1	1
124								1			1	1
125								1			1	1
126								1			1	1
127								1			1	1
128								1			1	1
129								1			1	1
130								1			1	1
131			1	1	2							2
132				1	1							1
133	1			3	4							4
134				1	1							1
135				1	1							1
136			1		1							1
137			1		1							1
138			1		1							1
139			1		1							1
140				1	1							1
141				1	1							1
142				1	1							1
143				1	1							1
144				1	1							1
145	1				1							1
標本数	56	79	97	232	98	80	14	66	48	306	41	579
ハプロイド数	19	20	22	47	40	30	12	35	18	100	19	145

塩基多様度 π (小池・松井, 2003; 岸野・浅井, 2003)

$$\pi = n(\sum x_i x_j d_{ij}) / (n-1) \\ = 2 \sum \sum (1 - \delta(x_{ih}, x_{jh})) / n(n-1) / m$$

x_i, x_j : ハプロイド i, j の各頻度

d_{ij} : ハプロイド i, j 間の塩基置換数/塩基座数

m : ハプロイドの塩基長

x_{ih}, x_{jh} : 塩基座 h におけるハプロイド $i, j (i < j)$ の塩基

δ : ディラックのデルタ関数

イ ホタテガイ稚貝のDNA多型と親元調査
前項の分析結果を利用し、解析を実施した。

(3) 得られた結果

ア 北海道及びサハリン海域のホタテガイ集団のDNA多型比較

ミトコンドリアDNA上のNcR2を含む領域429塩基をPCR法により増幅し、塩基配列を決定した。

NcR2領域は全海域で、95の塩基置換部位が確認され(表1)、145種類のハプロタイプに分類された(表2)。サンプル数はサハリン232個体、北海道306個体、青森県41個体の合計579個体である。

各採集海域の多様度係数を表3に示した。全体の遺伝子多様度 h は0.867、塩基多様度 π は0.010。全集団内の遺伝子多様度 h は最小0.734、最大0.967、塩基多様度 π は最小値0.007、最大値0.014である。

以下、全集団をサハリン、北海道、青森県の3集団に分割して比較する。

サハリン集団の遺伝子多様度 h は0.797、塩基多様度 π は0.008である。サハリン集団内の遺伝子多様度 h は最小で0.734、最大で0.792、塩基多様度 π は最小で0.007、最大で0.010である。

北海道集団の遺伝子多様度 h は0.892、塩基多様度 π は0.011である。北海道集団内の遺伝子多様度 h は最小で0.845、最大で0.967、塩基多様度 π は最小で0.008、最大で0.014である。

青森県陸奥湾集団の遺伝子多様度 h は0.837、塩基多様度 π は0.008である。

3集団では遺伝子多様度 h では北海道 > 青森県 > サハリン、塩基多様度 π は北海道 > 青森 = サハリンとなっており、サハリン集団の多様性が低い。

全集団内の遺伝子多様度 h を比較すると北海道・青森 > サハリン、サハリン集団の多様性が低い。塩基多様度 π はサハリンのブッセ湖、アニワ湾は最も低く、陸奥湾および北海道日本海側の小平がそれに次ぎ、サハリン集団が低い傾向にあった。この傾向はサハリン産標本数の少ない過去の調査結果より明瞭である。

以上の結果、サハリン集団は北海道・青森県集団に対し、両多様度が低い傾向が見られる。

少なくとも現存するホタテガイ自然集団モデルとしてサハリン集団に着目する場合、北海道・青森県集団のように、天然採苗、種苗移送、放流または垂下養殖のような人為的操作の影響を原因とした遺伝的多様性の増大が引き起こされている可能性が高い。

イ ホタテガイ稚貝のDNA多型と親元調査

前項の分析結果から、ハプロタイプの地理分布をサハリン型固有(S—), サハリン北海道型(SH—), 共通型(SHA), 北海道固有型(—H—), 北海道青森型(—HA), 青森固有型(—A)の6型に分類した。

海域ごとのハプロタイプ頻度は表4、比率は表5に示した。黒枠は海域ごとの最大値を示す。

海域固有型(S—, —H—, —A)の頻度が全海域で高く(0.50~0.84)、3海域とも固有のハプロタイプが高頻度で存在することを示している。

海域ごとのハプロタイプ出現頻度は表6、出現

表3 各採集海域の多様度係数

	サハリン			合計	猿払	紋別	北海道			合計	青森県	
	テルベニヤ湾	ブッセ湖	アニワ湾				常呂	網走	小平		陸奥湾	全体
標本数	56	79	97	232	98	80	14	66	48	306	41	579
ハプロタイプ	19	20	22	47	40	30	12	35	18	100	19	145
塩基数	219	219	219	219	219	219	219	219	219	219	219	219
多型性s	19	20	22	47	40	30	12	35	18	100	19	145
多様性h	0.792	0.734	0.767	0.797	0.909	0.845	0.967	0.922	0.866	0.892	0.837	0.867
塩基多様度π	0.010	0.007	0.007	0.008	0.012	0.010	0.014	0.011	0.008	0.011	0.008	0.010

率は表7に示した。黒枠は海域ごとの最大値を示す。

ハプロタイプ出現率は常呂，網走では北海道固有（-H-）が高く（0.47～0.64），残りの海域では共通型（SHA）の頻度が高い（0.51～0.66）。

以上の結果から，サハリン・北海道・青森では，3海域の固有型のハプロタイプが存在し，これらをマーカーとした分子生物学的手法による海域判別の可能性が示唆される。また3海域共通型は全体に高頻度（0.36～0.66）で存在する。

次年度以降，残りサンプルの分析作業を継続し，ハプロタイプ・ネットワーク，AMOVA等の詳細な分析を実施する予定である。

（4）参考文献

岸野洋久・浅井潔，2003. 生物配列の統計. 核酸・タンパクから情報を読む. 統計科学のフロンティア 9. 264pp.

小池裕子・松井正文（編），2003. 保全遺伝学. 302pp.

Sato, M., and Nagashima, K., 2001. Molecular Characterization of Mitochondrial DNA Segment from the Japanese Scallop (*Patinopecten yessoensis*): Demonstration of a Region Showing Sequence Polymorphism in the Population. Marine Biotechnology, 3: 370-379.