

# ヒラメの遺伝的集団構造と地域的生理生態特性に関する研究

中山耕至<sup>\*1</sup>・大河俊之<sup>\*2</sup>・丸川祐理子<sup>\*3</sup>・田結庄義博<sup>\*1</sup>・田中 克<sup>\*1</sup>

## Studies on genetic population structure and ecological-physiological characteristics of local populations of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Kouji NAKAYAMA<sup>\*1</sup>, Toshiyuki OHKAWA<sup>\*2</sup>, Yuriko MARUKAWA<sup>\*3</sup>,  
Yoshihiro TAINOSHO<sup>\*1</sup> and Masaru TANAKA<sup>\*1</sup>

**Abstract** Genetic population structure and difference of growth rate and sex ratio between local populations in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* were discussed. From mtDNA and microsatellite analyses, it was suggested that Japanese flounder from Japan Sea is not a single panmictic population. Mean growth rate of juveniles was higher in Niigata among five localities along East China Sea and Japan Sea. Sex ratios of juveniles from three localities along Japan Sea did not significantly deviated from 1:1.

**Key words:** Japanese flounder, population structure, microsatellite, growth rate, sex ratio

栽培漁業では大量の人工生産種苗を自然海域に放流するが、種苗の資質がその海域に生育する天然魚と大きく異なっていた場合、放流効果の低減のみならず天然資源への悪影響も懸念される。そのため、対象種野生集団の集団構造および各集団の生理生態特性は栽培漁業実施に不可欠な基本的情報となる。

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* は海産魚類を対象とした栽培漁業のモデル種であり、全国的に人工種苗の生産と放流が行われている。本種は北海道から九州、朝鮮半島、中国沿岸まで広域に分布する沿岸性底魚であり、各地の環境に適応的な生理生態的特徴をもつ地域集団が分化している可能性が強く推測される。Kinoshita *et al.* (2000) は日本海沿岸において計数形質の差異から南北2集団の存在を示唆しており、これは本種の地域的分化の一端を示していると考えられ

る。しかし、本種においては種苗生産技術および放流技術の見蓄積が先行し、集団構造に関しては Fujii and Nishida (1997) や Sekino and Hara (2001) において検討されているものの未だ解明されていないところが多い。そこで、栽培プロ研第1期課題「ヒラメの遺伝的集団構造と地域的生理生態特性に関する研究」では、中立的分子マーカーを用いて日本周辺のヒラメ集団構造の推定を試み、同時に生理生態的特性の地域間比較を行った。中立的分子マーカーには集団構造分析に多用されるミトコンドリアDNAおよびマイクロサテライトDNAを、生理生態的形質としては成長率と性比をとりあげた。

2005年11月8日受理 (Received: November 8, 2005)

\*1 京都大学フィールド科学教育研究センター 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町 (Field Science Education and Research Center, Kyoto University, Kitashirakawa-Oiwakecho, Sakyo, Kyoto 606-8502, Japan)

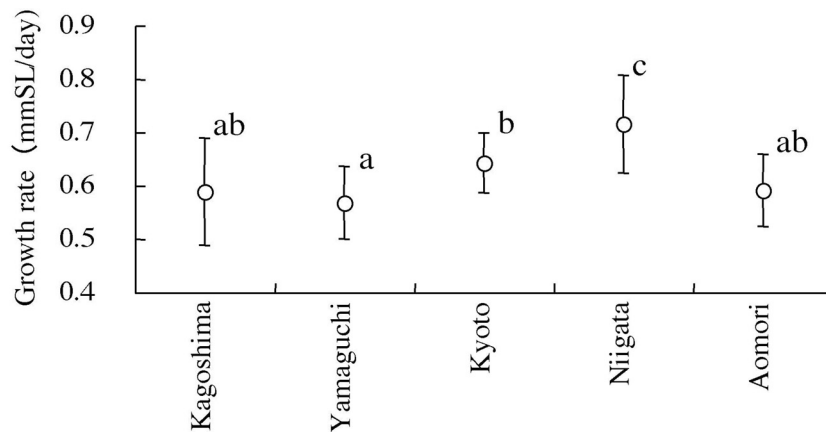
\*2 高知県水産試験場 〒785-0167 高知県須崎市浦ノ内灰方1153-23 (Kochi Prefectural Fisheries Experimental Station, Uranouchi-Haigata 1153-23, Susaki, Kochi 785-0167, Japan)

\*3 味の素株式会社 〒530-0005 大阪府北区中之島6-2-57 (Ajinomoto Co. Ltd., Nakanoshima 6-2-57, Kita, Osaka 530-0005, Japan)

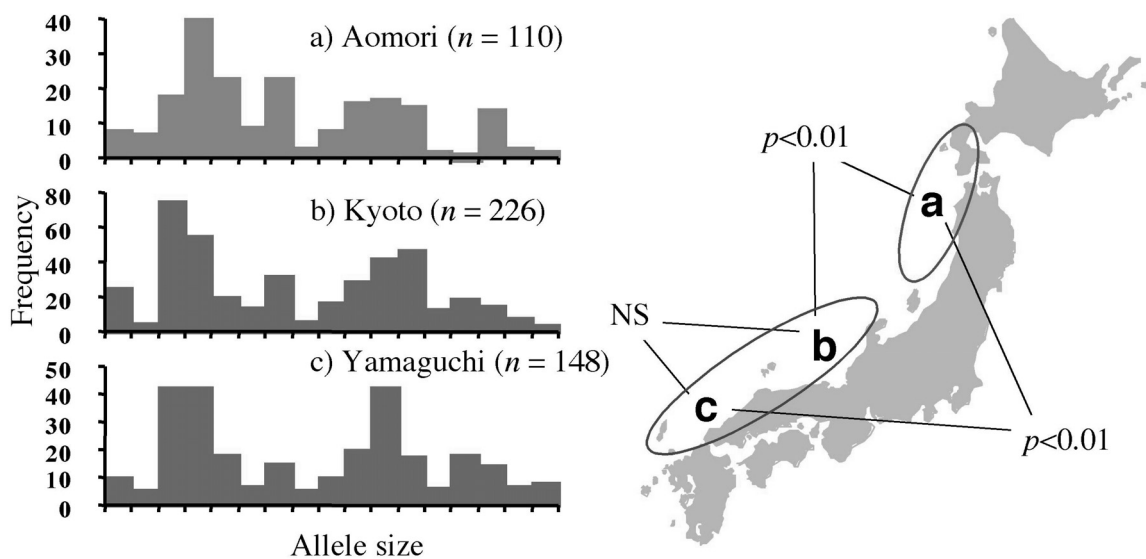
## 中立マーカーによる集団構造分析

ヒラメの遺伝的集団構造を概観するため、最初に日本各地の10地点から採集された稚魚206個体について、ミトコンドリアDNA調節領域前半約310塩基対の配列を決定した。その結果、ハプロタイプ多様度からみた本種の遺伝的多様性は高いが、固定指数 $F_{st}$ 等で示される地域集団間の異質性は一部を除いて有意ではなく、全体に遺伝的分化の度合いは大きくないことが示された。次いで、より小さいレベルでの分化を検出するため、

対象を日本海沿岸の3地点に絞り、多くの個体数を用いた分析を試みた。手法は複数の遺伝子座を調べることができるマイクロサテライトDNA分析とした。まずヒラメゲノミックライブラリーを用いてマイクロサテライト座の探索を行い、良好なPCR増幅を示す6座のプライマーを開発した。これら6座のアリル数は2-44個、ヘテロ接合度は0.222-0.876であり、変異性の程度は多様であった。2000年に日本海南部から山口産 ( $n=148$ )、中部から京都産 ( $n=226$ )、北部から青森産 ( $n=110$ ) のそれぞれ着底稚魚を採集し、上記6座



**Fig. 2.** Mean growth rate of juvenile Japanese flounder from five localities along East China Sea and Japan Sea. Vertical bars represent standard deviation. Groups with the same letter were not significantly different (ANOVA).



**Fig. 1.** Allelic frequencies of microsatellite locus PoGT17 of juvenile Japanese flounder from three localities along Japan Sea (Modified from Ohkawa *et al.*, submitted).

の分析を行ったところ、PoGT17座においてアリル頻度の異質性が認められ、山口・京都群と青森群との間での遺伝的分化が示された (Fig. 1)。京都では早期に着底するグループと後期に着底するグループの2群が存在することが知られており、前者は浮遊期に西方から輸送されてくるもの、後者は地先産卵群に由来するものと考えられている (前田, 2002)。本研究で用いた2000年の京都産サンプルは体長組成から大部分が早期着底群に属すると推定され、このため山口サンプルと京都サンプルの間では異質性が認められなかったと考えられる。

### 成長速度の地域間変異

中立マーカーによる集団構造分析と平行して、各地域のヒラメ野生集団間に生理生態的特性の違いが認められるかどうかを調べた。地域間で選択圧が大きく異なるような場合、適応的形質は中立マーカーよりも鋭敏に集団分化をあらわす可能性がある。また、個々の地域集団の特性を把握することは放流効果の高い人工種苗の生産に大きく貢献すると考えられる。

1997年に鹿児島から青森までの東シナ海-日本海沿岸の5地点で採集されたヒラメ稚魚を用い、耳石 (扁平石、礫石) 輪紋より日齢を推定し、孵化から採集時までの平均日間成長率を求めた。その結果、新潟産サンプルにおいては、他地点よりも良好な成長が認められた (Fig. 2)。さらに、耳石上に生じる着底マークを手がかりとし、浮遊期と着底後のそれぞれの期間に分けて日間成長率を求めたところ、着底後だけではなく浮遊期においても成長速度に地域差があらわれていることが確認された。

### 性 比

ヒラメは基本的には雄XY-雌XX型の性決定様式をもつが、着底期の水温によっては遺伝的に雌の個体が機能的には雄となる、性分化転換を起こすことが飼育実験によって確かめられている (Tabata, 1991; Yamamoto, 1999)。本種の産卵期は九州南部では早春、北海道では初夏であり (南, 1997)、地域間で性分化期に経験する水温に大きな違いがある。したがって、もし野生集団においても水温による性分化転換が生じるのであれば、地域間で異なる性比を示す可能性が考えられる。

2000年ないし2003年に日本海側の3地点 (長崎、鳥取、青森) で採集された稚魚を対象とし、機能的性の判別を行った。全長50mm以上の個体では、生殖腺の組織切片を作成し、卵巣腔が観察されるものを雌とした。全長50mm未満の個体では卵巣腔が明瞭でない場合が多いため、北野ら (2000) の方法にしたがい、RT-PCR法によって生殖腺にアロマターゼmRNAの発現が認められる個体を雌とした (Fig. 3)。

その結果、各地点で採集された稚魚の性比は1対1から有意にずれておらず、また地点間での性比の差も認められなかった。しかし、各地点のサンプルを全長組成から大サイズ群と小サイズ群に2分したところ、各地点とも小サイズ群で雌が少ない傾向が確認された。小サイズ群は大サイズ群より着底時期が遅く、性分化期の経験水温もより高いと推定されるため、この結果は野生集団における性分化転換の可能性を示唆すると考えられる。地域により性分化時期の水温が異なるにもかかわらず性比に大きな差異が認められなかったことについては、性分化転換を引き起こす水温が地域集団間で異なるなど、何らかの適応的機構が関わっているのかもしれない。

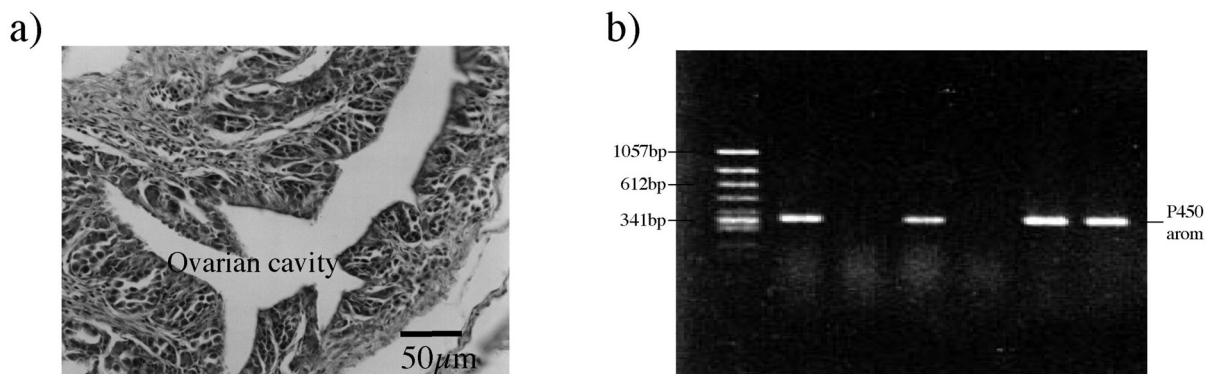


Fig. 3. a) A picture of section of juvenile Japanese flounder gonad. b) An example of RT-PCR for aromatase mRNA on juvenile Japanese flounder gonad. PCR positives were judged females.

## まとめ、今後の課題

中立的分子マーカーを用いた分析からは、日本周辺の各地点間では全体的に遺伝的分化の度合いが小さいことが示されたが、適切なマーカーを探索することで日本海沿岸に少なくとも2つの集団が存在することを確認できた。さらに、成長率および性比の地域間比較からは、適応に関わる形質については中立マーカーから認識されるよりも細かい地理的レベルでの分化が生じている可能性が示された。しかし、それら適応に関わる形質での地域間差異が遺伝的な基盤を持つものであるかどうかは確認されておらず、今後、共通の環境条件下での飼育実験を行うなどして検証する必要がある。また、ヒラメの分布域のなかで日本の太平洋岸、朝鮮半島・中国沿岸などについては稚魚サンプルの採集が困難なため未だ分析が十分ではなく、これからの課題として残っている。

## 文 献

- Fujii T. and Nishida M., 1997: High sequence variability in the mitochondrial DNA control region of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, **63**, 906-910.
- Kinoshita I., Seikai T., Tanaka M., and Kuwamura K., 2000: Geographic variations in dorsal and anal ray counts of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, in the Japan Sea. *Environ. Biol. Fish.*, **57**, 307-315.
- 北野 健, 山本栄一, 高宗和史, 安部眞一, 2000: アロマターゼmRNAの検出によるヒラメ人工種苗の早期性判別について. 日水誌, **66**, 300-301.
- 前田経雄, 2002: 若狭湾西部海域におけるヒラメ仔稚魚の加入機構に関する研究. 学位論文, 京都大学農学研究科.
- 南 卓志, 1997: 生活史特性, 「ヒラメの生物学と資源培養」(南 卓志, 田中 克編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.9-24.
- Ohkawa T., Tanaka Y., Nakayama K., Nishida M., and Tanaka M., submitted: Genetic heterogeneity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in the Sea of Japan using microsatellite analysis.
- Sekino M. and Hara M., 2001: Application of microsatellite markers to population genetic studies of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Mar. Biotechnol.*, **3**, 572-589.
- Tabata K., 1991: Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in the hirame *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **57**, 845-850.
- Yamamoto E., 1999: Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **173**, 235-246.