マガキのミトコンドリア DNA 推定調節領域における比較遺伝学的解析

生産科学研究科　　沖本 宜音

我が国のマガキ生産量は，平成 15 年における海面養殖業生産量 124.5 万トン中 22 万トン（約 2 割）を占め，古くから全国各地で養殖が行われている重要な水産二枚貝資源である．しかし近年，病害対策や増産などを目的として天然産地から養殖産地，或いは養殖産地間で種苗や稚貝の交流が行われた結果，我が国におけるマガキの集団遺伝構造の撹乱が危惧されている．そこで将来にわたってマガキ資源を確保し，その再生産を安定的に持続させるためには，その潜在的な遺伝的多様性に基づく適正な資源管理手法の確立が望まれる．

真核生物のみが有するミトコンドリア DNA（mtDNA）は，核 DNA と比較して小型であり，かつ変異率が高いことから，集団遺伝学研究に広く用いられている．特に「調節領域」または「D ループ」と称される mtDNA で最も変異しやすい領域は，種内における集団や個体群の遺伝構造の解析に最適であるとされている．二枚貝の mtDNA の全構造は，マガキ（*Crassostrea gigas*），ムラサキイガイ（*Mytilus edulis*），アサリ（*Venerupis philippinarum*）及び淡水イシガイ（*Lampsilis ornata*）の 4 種についてしか報告されておらず（平成 16 年 10 月 1 日現在），脊椎動物等の mtDNA に比べ著しく知見が乏しい．特に調節領域に関しては，チレニアイガイ（*M. galloprovincial*），カリフォルニアイガイ（*M. californianus*），キタノムラサキイガイ（*M. trossulus*）及びムラサキイガイ（*M. edulis*）の 4 種しか報告されておらず，その変異特性や構造特性などの知見は少ない．さらにマガキを初めとした我が国における水産資源二枚貝の調節領域は，未だ同定されていない．

本研究では，マガキの mtDNA 調節領域を同定するとともに，それを指標として我が国固有の天然集団及び主要産地の養殖集団における遺伝的多様性の解析を目的とした．宮城県水産研究開発センター他から提供された宮城産及び広島産（ともに養殖集団），長崎産及び宮崎産（ともに天然集団）の各産地 30 個体を対象として，mtDNA 推定調節領域における塩基配列多型解析を行った．マガキ mtDNA の $tRNA^{Cys}$ と $tRNA^{Asn}$ 間の 770 bp（CR1），$tRNA^{Gly}$ と $tRNA^{Val}$ 間の 645 bp（CR2）の 2 非翻訳領域を調節領域と推定し，各領域を特異的に PCR 増幅できるプライマーセットを開発した．マガキ組織から調製した全ゲノム DNA を PCR 反応に供して各領域を増幅し，PCR 産物を本研究用に開発したクローニングベクターにサブクローニングした後，蛍光自動シークエンサーにて塩基配列を解読した．得られた塩基配列から，①塩基変異出現解析，②ハプロタイプ解析，③各ハプロタイプ間における塩基転位及び塩基転換の 2 パラメーター解析を行い，近隣接合法等を用いて分子系統樹を作成した．さらに，既知の mtDNA 調節領域において高い保存性が報告されている TAS や CSB 等の構造特性を各領域で比較解析した．

その結果，塩基変異率はCR1では平均2.5 %（2.2~2.8 %），CR2では平均5.3 %（4.3~6.2 %）であり，ともにムラサキイガイのmtDNA調節領域の塩基変異率2.0 %より高かった．さらに塩基変異の種類はCR1では塩基転位数が平均10箇所（8~14箇所），塩基転換数が平均5箇所（3~7箇所），CR2ではそれぞれ22.8箇所（19~26箇所）と11箇所（7~14箇所）であり，両領域ともに塩基転位数が塩基転換数より 2 倍以上多かった．本結果は，ムラサキイガイのmtDNA調節領域において塩基転位数が塩基転換数の2倍以上という特徴とよく一致していた．塩基変異の分布はCR1では領域全般に亘って変異の種類に関わらず出現頻度に差がなかったのに対し，CR2 では 5'末端と 3'末端部で高く，特に塩基転換にその傾向が強く認められた．以上の結果から，塩基変異率が高く，かつムラサキイガイのmtDNA調節領域と類似した特徴を持つCR2が，マガキのmtDNA調節領域であると同定した．

そこでCR2を指標として国内4集団における集団内及び集団間の遺伝構造を解析した結果，塩基変異率は養殖集団の宮城4.4 %，広島4.4 %，天然集団の長崎6.1 %，宮崎6.2 %であり，天然集団は養殖集団の約 1.5 倍高かった．これは養殖により，マガキ固有の遺伝的多様性が縮小傾向にあることを示唆している．また塩基変異の種類は全集団において塩基転換数より塩基転位数が多く，塩基転位数÷塩基転換数で表した転位転換率は，養殖集団が2.1 %（宮城）と3.0 %（広島），天然集団が1.8 %（長崎と宮崎とも）であった．本結果から，天然集団では地理的隔離に関わらず分子進化速度に有為な差が認められないことが明らかとなった．塩基変異の分布は全集団ともに5'末端部＞3'末端部＞中間部の順に高く，既知のmtDNA調節領域と同様に変異の出現しない保存領域は中間部に多く認められた．以上の結果から，マガキのmtDNA調節領域であるCR2は集団遺伝解析マーカーとして有効であることを確認した．

本研究においてマガキのmtDNA調節領域を同定できたことにより，今後は同領域を指標としたマガキの集団遺伝解析の展開が望まれる．それらの科学的知見を踏まえ遺伝的多様性に基づく適正な資源管理手法を確立することで，将来に亘り我が国におけるマガキ資源の確保並びに安定的な持続的再生産が期待される．