

## ミトコンドリア制御領域の塩基配列分析による 日本周辺漁場におけるキンメダイの集団遺伝構造の解析

秋元 清治・瀬崎 啓次郎・三谷 勇・渡部 終五

The population genetic structure of the alfoncino *Beryx splendens* around Japan as examined by DNA nucleotide sequencing for the mitochondrial control region

Seiji AKIMOTO\*, Keijiro SEZAKI\*\*, Isamu MITANI\* and Shugo WATABE\*\*

### ABSTRACT

The population structure of the alfoncino *Beryx splendens* was analyzed by mitochondrial DNA sequence. Totally 29 samples were collected from three fishing grounds around Japan, off Boso Peninsula, Tokara islands and Torishima. The mitochondrial DNA nucleotide sequences analyzed were those of the full-length control region of 824bp. Although this region contained individual variations and no identical sequence, the nucleotide diversity among samples collected at the same fishing ground was not large (1.15~1.19). While the nucleotide diversity in samples between any of the two from the three fishing grounds (1.15~1.24) was again not large and rather comparable to those within samples from the same fishing grounds, the pairwise fixation index (Fst) was very low between any of the two fishing ground groups (-0.016~0.058), suggesting no genetic heterogeneity. The phylogenetic tree based on the sequences determined also demonstrated that our sample consist of no geographical population structure.

### 緒 言

ミトコンドリア16SrRNA塩基配列は種内変異が小さいことから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<sup>1)</sup>。Akimoto et al<sup>2)</sup>はキンメダイ属3種、キンメダイ*Beryx splendens*、ナンヨウキンメ*B. decadactylus*、フウセンキンメ*B. mollis*について16SrRNAを分析し、その塩基配列の違いから種同定が可能であることを報告するとともに、種間の塩基置換率および分子系統樹から3種の近縁関係を明らかにしている。

キンメダイ属3種の中でも、キンメダイは世界中の熱帯から温帯域の水深200~800mの海山および大陸棚縁部に広く分布している<sup>3)</sup>。日本では茨城県以南の太平洋側の海山および大陸棚縁部に広く分布しているが<sup>4)</sup>、とくに、相模灘、房総沖から三宅島、御蔵島、八丈島、鳥島、小笠原列島に到る海域に散在する海山がキンメダイの良好な漁場となっており、一都三県(千葉県、東京都、神奈川県、静岡県)の立縄釣りおよび底建延縄漁業者にとって、最も重要な漁業対象種となっている。<sup>5,6)</sup>

上述の相模灘から小笠原列島にかけての対象海域にお

けるキンメダイ資源の再生産機構は十分に解明されていないが、これまでの標識放流による成魚の移動様式<sup>7,8,9)</sup>から、キンメダイ稚魚の再生産は本海域内だけで行われるのではなく、黒潮上流域からの資源加入の可能性が高いことが報告されている<sup>7,8)</sup>。

集団遺伝学では同種内の地理的集団(系群)間の遺伝的な差異は対立遺伝子の頻度の違いによって捉えられ、その程度は集団の隔離後の経過時間に比例すると考えられている。一般にミトコンドリア遺伝子は核ゲノムにコードされている遺伝子に比べて進化速度が大きい。ミトコンドリア遺伝子の中でも制御領域はとくに進化速度が大きく、多くの個体変異を蓄積していることから集団遺伝構造解析で頻繁に分析対象とされている<sup>1)</sup>。魚類においても近年この領域を対象に、メバル属(*Sebastes*)<sup>10)</sup>、マアナゴ(*Conger myriaster*)<sup>11)</sup>、ヒラメ(*Paralichthys olivaceus*)<sup>12,13)</sup>、マダイ(*Pagrus major*)<sup>14)</sup>、アユ(*Plecoglossus altivelis*)<sup>15)</sup>、ウナギ(*Anguilla japonica*)<sup>16)</sup>などの集団遺伝構造が解析されている。

日本周辺海域に生息するキンメダイの集団遺伝構造解

析の試みについては、久保島ら<sup>17)</sup>、瀬崎ら<sup>18)</sup>が、房総半島沖、南西諸島沖、八丈島沖などからの採集試料を用いて、それぞれ鱗のタンパク質の電気泳動分析およびミトコンドリアの制御領域とcytochrome *b*遺伝子の塩基配列分析を実施している。しかし、久保島らが沿岸域と沖合域の2グループに分かれることを示唆したのに対し、瀬崎らは地域的な遺伝的差異を示すまでには至らなかった。

本研究は、黒潮上流域の鹿児島県トカラ列島沖漁場、房総半島沖漁場、鳥島沖漁場で採集したキンメダイ試料を対象に、ミトコンドリア制御領域の塩基配列を用いて、上述した研究結果を再検討し、従来の稚魚加入説に若干の考察を加えた。さらに、ミトコンドリア制御領域の塩基置換率および塩基配列を基に作成した分子系統樹からキンメダイ属3種の近縁関係についても再度検討を加えたのでその結果も合わせ報告する。

### 材料および方法

#### 1) 試料

キンメダイ試料の詳細および採集位置をTable 1、Fig. 1に示す。房総半島沖、鹿児島県南方トカラ列島沖、鳥島沖、熊野灘および紀南礁の各漁場において採集した成魚を、それぞれ13、11、5、1および1個体ずつ用いた。尾叉長、体重、生殖腺重量、形態的諸元を測定後、試料よりDNA分析用筋肉組織を約3g摘出し、エタノール(99.5%)中に4℃で保存した。さらに、分子系統樹を作成する上で外群としたナンヨウキンメおよびフウセンキンメは、それぞれ志摩半島沖および小笠原列島沖で

採集した成魚を1個体ずつ用いた。種同定は中坊<sup>19)</sup>に従った。

Table 1 Details of fish specimens used

No	Species	Fork length (cm)	Body weight (g)	Location of collection	Date of collection
1	<i>B. splendens</i>	30.0	610	Off Boso Pen.	11 Dec. 1998
2	<i>B. splendens</i>	17.8	130	Off Boso Pen.	24 Dec. 2000
3	<i>B. splendens</i>	19.2	147	Off Boso Pen.	24 Dec. 2000
4	<i>B. splendens</i>	18.4	128	Off Boso Pen.	24 Dec. 2000
5	<i>B. splendens</i>	26.7	416	Off Boso Pen.	12 May 2001
6	<i>B. splendens</i>	25.6	375	Off Boso Pen.	12 May 2001
7	<i>B. splendens</i>	24.1	332	Off Boso Pen.	12 May 2001
8	<i>B. splendens</i>	18.9	140	Off Boso Pen.	24 Dec. 2000
9	<i>B. splendens</i>	18.4	133	Off Boso Pen.	24 Dec. 2000
10	<i>B. splendens</i>	17.9	135	Off Boso Pen.	24 Dec. 2000
11	<i>B. splendens</i>	25.3	366	Off Boso Pen.	12 May 2001
12	<i>B. splendens</i>	19.1	152	Off Boso Pen.	24 Dec. 2000
13	<i>B. splendens</i>	19.2	166	Off Boso Pen.	24 Dec. 2000
14	<i>B. splendens</i>	36.0	1065	Off Tokara Is.	27 Aug. 2001
15	<i>B. splendens</i>	35.0	883	Off Tokara Is.	27 Aug. 2001
16	<i>B. splendens</i>	36.1	997	Off Tokara Is.	27 Aug. 2001
17	<i>B. splendens</i>	40.2	1377	Off Tokara Is.	27 Aug. 2001
18	<i>B. splendens</i>	39.0	1208	Off Tokara Is.	27 Aug. 2001
19	<i>B. splendens</i>	40.4	1310	Off Tokara Is.	27 Aug. 2001
20	<i>B. splendens</i>	38.0	1187	Off Tokara Is.	27 Aug. 2001
21	<i>B. splendens</i>	33.8	861	Off Tokara Is.	27 Aug. 2001
22	<i>B. splendens</i>	41.0	1417	Off Tokara Is.	27 Aug. 2001
23	<i>B. splendens</i>	32.5	763	Off Tokara Is.	27 Aug. 2001
24	<i>B. splendens</i>	36.4	1035	Off Tokara Is.	27 Aug. 2001
25	<i>B. splendens</i>	38.1	1167	Off Torishima	26 Apr. 2000
26	<i>B. splendens</i>	38.0	1035	Off Torishima	26 Apr. 2000
27	<i>B. splendens</i>	36.5	984	Off Torishima	26 Apr. 2000
28	<i>B. splendens</i>	40.2	1357	Off Torishima	26 Apr. 2000
29	<i>B. splendens</i>	34.4	886	Off Torishima	26 Apr. 2000
30	<i>B. splendens</i>	18.0	140	Kumanonada	2 Oct. 1998
31	<i>B. splendens</i>	44.2	1781	Kinan Seamount	17 Dec. 1998
32	<i>B. decadactylus</i>	24.2	330	Off Shima Pen.	13 Oct. 1998
33	<i>B. mollis</i>	32.5	769	Off Ogasawara Is.	14 Feb. 2000

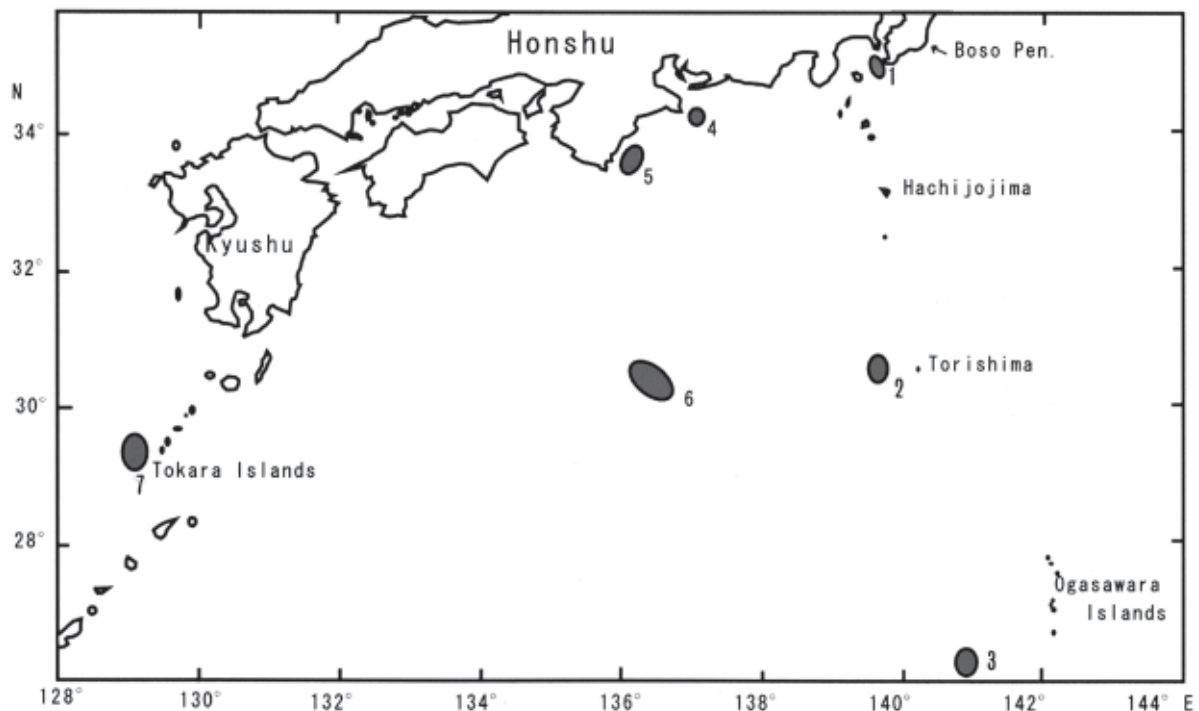


Fig. 1 Sampling locations for *Beryx* species in the Pacific Ocean around Japan. 1, Boso Peninsula; 2, Thorisima; 3, Ogasawara Islands; 4, Shima Peninsula; 5, Kumanonada; 6, Kinan Seamount; 7, Tokara Islands.

## 2) DNA抽出およびPCR

上述の筋肉試料から約40mgを分取し、DNA抽出キット (Genomic Prep™ Cells and DNA Isolatin Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) を用いて全DNAを抽出した。さらに、フェノール・クロロホルム処理後のエタノール処理によって得られたペレットを同キット中のDNA Hydration Solution 100  $\mu$ Lに溶解した<sup>2)</sup>。この全DNAを鋳型として、プライマーにKI-PR1-LおよびKI-PH1-Hを用い制御領域の全領域をPCRで増幅した (Table 2, Fig. 2)。ラベリングは前述のプライマーを用いて行い、5'および3'側から塩基配列を決定するとともに、内部配列からプライマー-KI-D1-LおよびKI-D4-Hを設計し (Table 2, Fig. 2) 順次残りの塩基配列を決定した。

Table 2 Nucleotide sequences of primers for PCR amplification of the mitochondrial DNA control region

Primer	Sequence
KI-PR1-L	5'-ACCCTAACTCCCAAAGCTA-3'
KI-PH1-H	5'-GCCCATCTTAAACATCTTCAG-3'
KI-D1-L	5'-GTGTAGTAAGAAACCACCAT-3'
KI-D4-H	5'-TGTCTGGCAAATTCATTGA-3'

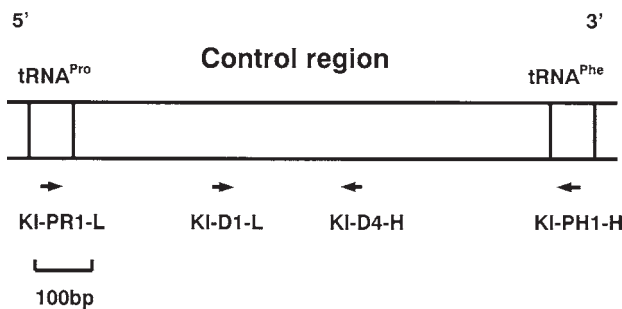


Fig.2 Schematic diagram of the mitochondrial DNA control region and locations of oligonucleotides used as primers for PCR and DNA nucleotide sequencing. See Table 2 for DNA nucleotide sequences of primers.

PCRは、dNTPs 2.5nmol, フォワードおよびリバースプライマー各20pmol, *Tth* DNAポリメラーゼ1unitおよび全DNA溶液5  $\mu$ Lを含む反応液25  $\mu$ Lを用いて行った。GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い、反応液を94  $^{\circ}$ Cで2分間保った後に、変性94  $^{\circ}$ Cで30秒、アニーリング58  $^{\circ}$ Cで30秒、伸長72  $^{\circ}$ Cで70秒の反応を30サイクル行った。最後の伸長反応は1分を行った。

## 3) 塩基配列分析

フェノール・クロロホルム法でPCR産物を精製後、Dye Terminator Cycle Sequencing AmpliTaq Polymerase FS

Kits (Applied Biosystems)により蛍光標識し、Applied Biosystems 373型 DNA Sequencerまたは310型 Genetic Analyzerにより、LおよびH両鎖の塩基配列分析を行った。

## 4) データ分析

キンメダイ試料の塩基配列データについては塩基の挿入および欠失が少なかったため、GenBankに登録されているキンメダイの同領域の配列 (#AP002939<sup>20)</sup>)と比較しつつ目視でアライメントを行った。また、ナンヨウキンメ、フウセンキンメおよびキンメダイの各種間では変異が多かったため、Clustal W<sup>21)</sup>を用いてアライメントを行った。

種々の海域から採集したキンメダイ試料については、決定した塩基配列をもとに Phylip<sup>22)</sup>のKimura's two parameter methodにより遺伝的距離を求め、近隣結合法<sup>23)</sup>により分子系統樹を作成した。なお、外群にはキンメダイ属のナンヨウキンメおよびフウセンキンメを用いた。また、100回のブートストラップ解析を行った際の分岐の再現性をパーセント表示した。

キンメダイ試料についてはさらに、漁場別個体群間の遺伝的類似性を検討するため、Arlequin ver.2.000<sup>24)</sup>により房総半島沖、トカラ列島沖、鳥島沖の各試料を対象に漁場内、漁場間の平均塩基置換率と漁場間の純塩基置換係数を算出するとともに、漁場別集団間の固定指数 (Fst) を求めた。

## 結 果

## 1) キンメダイ属3種間における変異

GenBank#AP002939<sup>20)</sup>によればキンメダイの制御領域は865塩基から構成されている。本研究では、解読できなかった5'および3'側のそれぞれ19および22塩基を除く824塩基について配列を決定した。ナンヨウキンメ、フウセンキンメおよびキンメダイ (#AP002939<sup>20)</sup>)の塩基配列をFig.3に示す。種間の比較で塩基の挿入・欠失が6箇所みられ、3種全体の配列のアライメントでは830塩基となった。3種間においては830塩基中、129箇所塩基置換がみられた (塩基置換率15.5%)。Table 3に示すように、種間別の塩基置換数および塩基置換率をみるとキンメダイとナンヨウキンメ間で105箇所、12.7%と最も塩基置換率が高く、これにナンヨウキンメとフウセンキンメ間の94箇所、11.3%、キンメダイとフウセンキンメ間の68箇所、8.2%が続いた。各種間の塩基置換におけるトランスバージョン、トランジション型変異数および挿入・欠失数をTable 3に示す。キンメダイおよびナンヨウキンメ間、ナンヨウキンメおよびフウセンキンメ間ではトランジションがトランスバージョンを上回ったが、キンメダイおよびフウセンキンメ間は逆の傾向を示した。

Table 3 Sequence variability in the control region between three *Beryx* species

	Length of sequence (bp)	Variable site (bp)	Frequency of variable site (%)	Transversion	Transition	Insertion / deletion
<i>B.splendens</i> and <i>B.decadactylus</i>	830	105	12.7	47	50	8
<i>B.splendens</i> and <i>B.mollis</i>	830	68	8.2	31	29	8
<i>B.decadactylus</i> and <i>B.mollis</i>	830	94	11.3	42	48	4

	10	20	30	40	50
<i>B.splendens</i>	TATATGTCCT	AGAAAAGCTAG	TATAGACATA	TATGTATTAT	CACCATGAAT
<i>B.decadactylus</i>	.....	.....A	.....	.....A	.....
<i>B.mollis</i>	.....	.....	..T.....	.....	.....
<i>B.splendens</i>	60	70	80	90	100
<i>B.decadactylus</i>	CGAATTTAAC	CATTTTCAAT	GGTGCCTCGG	TACATAAATG	TAGTCCCATT
<i>B.mollis</i>	.....	.....CT..	A.....CT..	G..TG..CC..	A..TCAT..AC
<i>B.splendens</i>	110	120	130	140	150
<i>B.decadactylus</i>	GTTTGTGCAA	TTTAAACACT	CACACATCAA	TACAAATACA	AAGGTGTACA
<i>B.mollis</i>	ACA.....G	A.....T	..T.....	C.....	.....G..
<i>B.splendens</i>	160	170	180	190	200
<i>B.decadactylus</i>	TAAAGCAATA	CTGGAATAAC	CAACAAAT-T	AACATAATTCA	CGTGACAGCC
<i>B.mollis</i>	.....	.....A..T	T.....G..	G..TG..C..	T..A..T..T..
<i>B.splendens</i>	210	220	230	240	250
<i>B.decadactylus</i>	GACATTTAAG	ACCGAACACA	ACTCGCATCG	GTTGAGTTAT	ACCATGCACT
<i>B.mollis</i>	.....	.....	.....	..A.....	.....C..A..T..C
<i>B.splendens</i>	260	270	280	290	300
<i>B.decadactylus</i>	CAACACCTCG	TCAACTCTCA	GATTCTCAAG	TGTAGTAAGA	AACCACCATC
<i>B.mollis</i>	.....T.....	.....C.....	..C.....	.....G.....	.....
<i>B.splendens</i>	310	320	330	340	350
<i>B.decadactylus</i>	AGTTGATTCC	TTAATGCATA	TCATGCTTGA	TGGTCAGGGA	CAAAACTCGT
<i>B.mollis</i>	.....	.....T..	C.....	.....C.....	.....GG.....
<i>B.splendens</i>	360	370	380	390	400
<i>B.decadactylus</i>	GGGGGTTTCA	CTTAGTGATC	TATTTCTTGC	ATTTGGTTCC	TATTTTCAGGA
<i>B.mollis</i>	.....	.....A	.....G..	.....	.....
<i>B.splendens</i>	410	420	430	440	450
<i>B.decadactylus</i>	ACATATATCG	ATAACTATCC	CTCCCCTCAA	TGAATTTTGC	CAGACATAAG
<i>B.mollis</i>	.....C.....	.....T	.....	.....	.....TT
<i>B.splendens</i>	460	470	480	490	500
<i>B.decadactylus</i>	-TTATTGGTG	GAGTACATAT	TACCCTTTAC	CCCACAT--C	GCGT--TAAA
<i>B.mollis</i>	A..GA.....	..AC.....C	G..T..G..	..C..GC..	..G..CAC..CTT
<i>B.splendens</i>	510	520	530	540	550
<i>B.decadactylus</i>	ACTAAAGGGC	ATTTGGTTCT	TTTTTTTTTG	TTTCCTTTCA	ACTTGCATTT
<i>B.mollis</i>	T.....T.....	.....	.....	.....	T.....
<i>B.splendens</i>	560	570	580	590	600
<i>B.decadactylus</i>	CACAGTGCAT	ACAGAAATGA	CATCTTAAGG	TTGTACATTT	CCTTGCGCGC
<i>B.mollis</i>	.....	.....	..GAC-	G.....	.....C.....
<i>B.splendens</i>	610	620	630	640	650
<i>B.decadactylus</i>	AAGGAAATAG	TATCCATGGT	GAAAAGTCAT	TCTATAAAGA	ATTGCATACT
<i>B.mollis</i>	.....	.....C	G.....	.....	C.....T..
<i>B.splendens</i>	660	670	680	690	700
<i>B.decadactylus</i>	TGGATATCAA	GAGCATAAAG	TATTAGTATT	ACTCCCTATA	TATCTAAGAT
<i>B.mollis</i>	A.....C.....	.....	G.....C	.....AA..G	.....
<i>B.splendens</i>	710	720	730	740	750
<i>B.decadactylus</i>	TACCCCCCGG	TTTACGCGCG	TAAACCCCC	TACCCCCCAA	CACCCCTGAG
<i>B.mollis</i>	..G.....	.....	.....	.....T	.....
<i>B.splendens</i>	760	770	780	790	800
<i>B.decadactylus</i>	ATCGCTATTA	TTCTGAAAA	CCCCCGGAA	ACAGGAAAAC	CTCTAGTGGT
<i>B.mollis</i>	..A.....	.....	.....	.....	.....
<i>B.splendens</i>	810	820	830		
<i>B.decadactylus</i>	GTTTTTACCA	TCCAAATTGT	GTTTATTTAC		
<i>B.mollis</i>	.....T..	C.....	.....		

Fig.3 Partial nucleotide sequences of the mitochondrial DNA control region for the three *Beryx* species. Samples listed are for *B. splendens* from the GenBank database #AP002939<sup>20)</sup>, and *B. decadactylus* (No.32) and *B. mollis* (No.33) cited in Table 1. Dots indicate nucleotides identical to those of *B. splendens*.

2) キンメダイ遺伝的相違度

上記830塩基中、異なる漁場から採集されたキンメダイの全31試料を対象に塩基置換がみられた箇所をFig. 4に示した。なお、解読した823塩基に欠失の変異1箇所を加えた計824塩基中、塩基置換は54箇所、塩基置換

率6.6%、トランスバージョン型変異7箇所、トランジション型変異46箇所、トランスバージョン型+トランジション型変異1箇所であった。また、分析したキンメダイ全31試料の全ては、それぞれ独自のハプロタイプを示し、共通の配列を示すものはみられなかった。

No. Sampling Location	Site																											
	7	13	20	26	48	93	95	101	104	111	112	113	116	123	138	159	173	174	183	191	212	216	228	229	261	266	271	
GenBank #AP002939	T	A	G	A	A	G	C	G	T	T	T	A	C	A	T	A	C	C	C	C	C	A	T	C	T	T	G	
1 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	
2 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	
3 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
4 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	
5 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	
6 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
7 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	
8 Off Boso Pen.	.	G	.	G	G	.	A	.	C	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	
9 Off Boso Pen.	C	.	.	.	G	.	A	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
10 Off Boso Pen.	.	G	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
11 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	
12 Off Boso Pen.	C	G	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
13 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
14 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
15 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
16 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	
17 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
18 Off Tokara Is.	.	G	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	C	.	
19 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
20 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
21 Off Tokara Is.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	
22 Off Tokara Is.	.	G	.	G	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	
23 Off Tokara Is.	.	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
24 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	G	.	.	.	C	T	.	.	.	
25 Off Torishima	.	.	.	.	.	A	T	A	A	.	C	.	.	.	.	C	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
26 Off Torishima	C	.	.	.	.	.	A	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
27 Off Torishima	.	G	.	G	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
28 Off Torishima	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	
29 Off Torishima	.	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
30 Kumanonada	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
31 Kinan Seamount	.	.	T	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

No. Sampling Location	Site																											
	274	317	321	336	414	415	419	426	445	449	462	468	472	500	501	566	576	610	622	641	643	680	682	692	708	751	819	
GenBank #AP002939	T	C	T	A	A	C	C	C	C	A	A	T	A	A	A	A	T	G	A	A	T	T	C	A	C	A	G	
1 Off Boso Pen.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	
2 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
3 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
4 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	
5 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	G	G	G	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	
6 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
7 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	G	C	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
8 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	
9 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
10 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	
11 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
12 Off Boso Pen.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	
13 Off Boso Pen.	.	.	.	C	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	
14 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
15 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	
16 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
17 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
18 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	
19 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	G	A
20 Off Tokara Is.	C	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
21 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
22 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	A	
23 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	T	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	
24 Off Tokara Is.	.	.	.	.	.	T	T	.	G	C	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	
25 Off Torishima	.	.	.	.	.	T	T	.	G	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
26 Off Torishima	.	.	.	.	.	T	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	
27 Off Torishima	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	
28 Off Torishima	.	.	.	.	.	T	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
29 Off Torishima	.	.	.	.	.	T	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
30 Kumanonada	.	T	C	C	.	T	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	C	.	.	.	.	
31 Kinan Seamount	.	T	C	C	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	.	

Fig.4 Nucleotide variations among 31 specimens of *B. splendens* in the mitochondrial DNA control region. Refer to Fig. 3 for the sites of variation. The reference sequence at the top was cited from the GenBank database #AP002939<sup>20</sup>). Dots indicate nucleotides identical to those of the reference sequence.

分子系統樹では、外群となるナンヨウキンメおよびフウセンキンメ2種に比べてキンメダイ種内間の遺伝距離は著しく小さかった (Fig. 5)。また、キンメダイ試料のハプロタイプは漁場別にクラスタ - を形成することはなかった。さらに、ブートストラップ値もほとんどが60以下の低い値を示した。

房総半島沖、トカラ列島沖および鳥島沖の漁場で採集したキンメダイの同一漁場集団内の平均塩基置換率は1.15~1.19%であった (Table 4)。異なる漁場間の比較でも1.15~1.24%と、同一漁場集団内の平均塩基置換率と比較してほとんど差がなかった。さらに、純塩基置換率は異なる漁場集団間で-0.02~0.07%と低い値を示した。

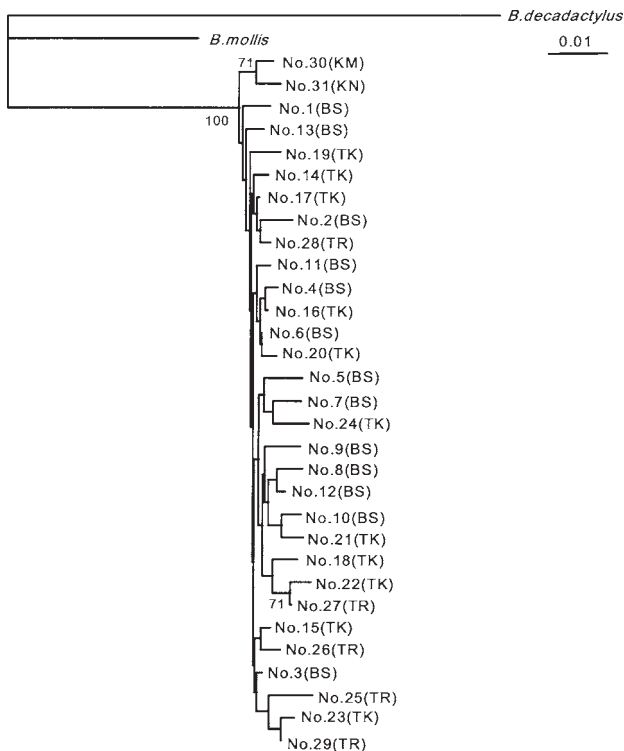


Fig.5 Molecular phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method for *Beryx splendens* specimens collected from different fishing grounds based on DNA nucleotide sequences the mitochondrial control region. Numbers in the tree indicate bootstrap resampling values from 100 replicates. The bar indicates genetic distance. See Table 1 for sample numbers. Sampling locations are indicated with abbreviations: KM, Kumanonada; KN, Kinan seamount; BS, off Boso Peninsula; TK, Tokara islands; TR, Torishima.

Table 4 Nucleotide diversity (%) and net sequence divergence within samples from the same locations and between samples from different locations

	Off Boso Pen.	Off Tokara Is.	Off Torishima
Off Boso Pen.	1.15	1.18	1.24
Off Tokara Is.	0.03	1.15	1.15
Off Torishima	0.07	-0.02	1.19

Above the diagonal: nucleotide diversity between samples from different locations.

On the diagonal: nucleotide diversity within samples from the same location.

Below the diagonal: net sequence divergence between samples from different locations.

異なる漁場集団間の固定指数 $F_{st}$ をTable 5に示す。房総半島沖と鳥島沖の集団間では0.0583とやや高かったが、房総半島沖とトカラ列島沖の集団間およびトカラ列島沖と鳥島沖の集団間では-0.0166~0.0213と非常に低かった。また、いずれの漁場集団の組合わせにおいても固定指数のP値は0.05を下回ることはなく、明白な遺伝的分化は認められなかった。

Table 5 Pairwise fixation index  $F_{st}$  between samples from different locations

	Off Boso Pen.	Off Tokara Is.	Off Torishima
Off Boso Pen.	-		
Off Tokara Is.	0.0213	-	
Off Torishima	0.0583	-0.0166	-

## 考 察

### 1) キンメダイ属3種の近縁性について

Akimoto *et al*<sup>1)</sup>はキンメダイ属3種のmtDNA 16S rRNA 492塩基を分析し、種間の塩基置換率がキンメダイとフウセンキンメ間で0.6%、ナンヨウキンメとフウセンキンメ間で1.6%、キンメダイとナンヨウキンメ間で1.8%であることを報告している。これに比べて、今回分析した制御領域の塩基置換率はキンメダイとフウセンキンメ間で8.2%、ナンヨウキンメとフウセンキンメ間で11.3%、キンメダイとナンヨウキンメ間で12.7%と著しく大きかった (Table 3)。しかしながら、種間別の塩基置換率の大小の傾向は16S rRNAおよび制御領域でよく類似し、キンメダイとナンヨウキンメ間で最も大きかった。さらに、制御配列の塩基配列を基に作成した分子系統樹も、16S rRNA 492塩基を用いて作成したものとよく傾向が一致した。以上の諸結果は、キンメダイ属3種の中、キンメダイとフウセンキンメが最も近縁であることを示唆する。

Higuchi *et al*<sup>10)</sup>は、日本周辺海域のメバル属 (*Sebastes*) 5種間の制御領域324塩基の塩基置換率が3.59~18.32%であったと報告している。キンメダイ属3種間の塩基置換率は全てこの範囲内であった。なお、形態的に酷似しているキンメダイとフウセンキンメ間の塩基置換率は8.2%であり、側線鱗門数と体側上部斑紋形から<sup>19)</sup>より同定が容易な近縁種のウスメバル (*Sebastes thompsoni*) とトゴットメバル (*S. joyneri*) の3.59%よりも大きな値を示した。このことは魚種間の形態的類似度と塩基置換率の関係を考える上で興味深いものである。

### 2) キンメダイ漁場別集団間の遺伝的差異

日本近海の種々の漁場から採集したキンメダイ31試料の塩基置換率は6.6%であった。この値はウナギ (17%,  $n=55$ )<sup>6)</sup>、マアナゴ (16.9%,  $n=73$ )<sup>1)</sup>、ウスメバル (17.3%,  $n=20$ )<sup>0)</sup>、アユ (22%,  $n=60$ )<sup>5)</sup>、ヒラメ (36%,  $n=55$ )<sup>3)</sup> およびマダイ (24%,  $n=20$ )<sup>4)</sup> に比べて低かったが、トゴットメバル (5.2%,  $n=10$ )<sup>0)</sup> およびメバル (*Sebastes inermis*) (5.9%,  $n=18$ )<sup>0)</sup> とは近かった。キンメダイがウナギなどと比べて塩基置換率が低

かった原因としては、種の違いのほか、本研究のサンプル数が少ないことが原因となっている可能性もある。

本研究の試料は、分子系統樹において漁場別にクラスターを形成することはなかった。また、分岐の信頼度を表すブートストラップ値も低く、漁場間における明白な遺伝的分化を見出すことはできなかった。

同一漁場内のキンメダイ試料間および異なる漁場から採集したキンメダイ試料集団間の平均塩基置換率はいずれも1.15~1.24%と同程度であった (Table 4)。これはウスメバル (3.2~3.67%)<sup>10)</sup>、ヒラメ (4.3%)<sup>13)</sup>、マダイ (2.7~2.8%)<sup>14)</sup> およびアユ (2.2~3.2%)<sup>15)</sup> に比べると低いが、ウナギ (1.1~1.6%)<sup>16)</sup> およびマアナゴ (1.6~2.2%)<sup>11)</sup> と類似した。さらに、キンメダイ漁場集団間の純塩基置換係数 (-0.02~0.07) および固定指数 (-0.0166~0.0583) も低い値を示した (Table 5)。固定指数は日本沿岸のアナゴ集団間の-0.0365~0.0013<sup>11)</sup> に比べてやや高く、新潟と香川のメバル集団間の0.02<sup>10)</sup> と同程度であった。以上、キンメダイ3漁場の集団間では遺伝的分化は認められず<sup>25, 26)</sup>、本研究の結論は、瀬崎ら<sup>18)</sup>の結果を支持した。

### 3) 幼魚の浮遊生活と遺伝子流動

スズメダイ科 *Acanthochromis polycanthus*、ウミタナゴ科 *Embiotocidae jacksoni*、ヘビキンボ科 *Axoclinus nigricaudus* など、幼生段階での浮遊生活期が全く認められない、あるいはごく短い種については地域間の遺伝的分化が明確にみられる<sup>27)</sup>。一方、長い浮遊生活期をもつ魚種の稚仔魚は、この期間、海流の影響で拡散しやすいことから、遺伝子流動 (gene flow) が起こりやすい。このような魚種では親魚が広大に分布していても地域間の遺伝的差異は認められない<sup>28)</sup>。キンメダイがどの程度の浮遊期間をもつのかその詳細は不明である。これまでわずかに採集された稚魚の採取水深は比較的浅く、<sup>29, 30)</sup> さらに、キンメダイ漁場において海底近くを曳網するトローリングでは10cm未満の魚が採集されていない<sup>31, 32, 33, 34)</sup>。したがって、キンメダイは少なくとも10cm未満の大きさまでは漁場に着底せずに浮遊生活をしている可能性が高い。この場合、キンメダイは広大な分布域を示す魚種であっても潮流の影響で遺伝的差異を示さなくなると考えられる。柳本ら<sup>35)</sup> は日本周辺海域の三宅島沖漁場、中部太平洋海山海域の天皇海山、さらにはニュージーランド海域のキンメダイ試料を用い、制御領域のRFLP分析によってこれらの漁場集団間において遺伝的な差異がないことを明らかにした。また、日本近海の下底山脈に起源をもつ卵稚仔が黒潮によって運ばれて加入混入し、太平洋全体で混合していることを示唆している。キンメダイは熱帯から温帯にかけての太平洋西海域に広く分布しているが、黒潮の上流域のフィリピン沖にも生息していることから<sup>3)</sup>、そこで産卵された卵・稚仔が黒潮によって日本周辺海域に運ばれている可能性も考えられる。一方、Hoara *et al.*<sup>36)</sup> は南西太平洋のニューカレドニア周辺海域、ニュージーランド沖、北東大西洋の Galicia Bank の各キンメダイ試料につきチトクローム *b* 遺

伝子の塩基配列を分析しその集団内のハプロタイプの分布様式を解析した。その結果からキンメダイは世界的な規模で遺伝子の拡散が行われてきたことが示唆された。本研究の結果からも、日本周辺の3漁場間で遺伝的分化がみられなかった。キンメダイにつきより詳細な地域集団間の遺伝的変異の有無を検討するためには、マイクロサテライトなどの核ゲノムDNAマーカーを用いる解析が必要と思われる。

伊豆諸島周辺海域に生息するキンメダイの産卵期は6~10月であることが報告されている<sup>37, 38, 39)</sup>。上部<sup>40)</sup> は伊豆諸島海域で採集したキンメダイにつき、耳石日周輪数と採集日から、6~10月以外の誕生日をもつ群がいることを報じている。このことは、当該海域以外から卵稚仔の補給があることを示唆している。残念ながら、伊豆諸島周辺海域以外で産卵された可能性のある卵稚仔がどこで生まれ、どのように移送され、どの程度伊豆諸島周辺海域漁場に加入しているかは不明であるが、今後、遺伝子を用いた集団構造解析にあわせ、黒潮上流域および日本周辺海域の試料を用いて耳石日周輪の成長履歴を解析する必要がある。さらに、耳石の酸素同位体元素を用いて生息水温履歴を解析することで、キンメダイの再生産機構が明らかになることが期待される。

### 謝 辞

本研究の試料採集にあたって、鹿児島県水産試験場漁業部久保満氏、みうら漁業協同組合所属の大井哲治氏 (大徳丸)、石渡美根和氏 (亀吉丸) および本研究所調査船江ノ島丸の乗組員には大変お世話になった。また、東京大学海洋研究所の木村呼郎博士には集団解析ソフト Arelequin.ver 2.000の使用法につきご助言頂いた。ここに記して心から感謝申し上げる。

### 引用文献

- 1) 西田睦・大河俊之・磐田祐士 (1998) : ミトコンドリアDNA分析による集団構造解析法, 水産育種, 26, 81-100.
- 2) Akimoto S, Kinoshita S, Sezaki K, Mitani I, Watabe S (2002) : Identification of alfonso and related fish species belonging to the genus *Beryx* with mitochondrial 16S rRNA gene and its application on their pelagic eggs, *Fish. Sci.*, 68, 1242-1249.
- 3) Busakhin SV (1982) : Systematic and distribution of the family Berycidae (Osteichthyes) in the world ocean, *J. Ichthyol.*, 22, 1-21.
- 4) 池田郁夫 (1980) : 底魚資源 (青山恒雄編), 恒星社厚生閣, 東京 PP331-342.
- 5) 増沢寿・倉田洋二・大西慶一 (1975) : キンメダイその他底魚類の資源生態. 水産研究叢書(28), (社)水産資源保護協会, 東京.
- 6) 平成2・9年度 (1990・2002年度) 神奈川県広域資源培養管理推進事業報告書および平成10・13年度複合的資源管理型漁業対策事業報告書.

- 7) 木幡孜・今井正昭・杉浦暁裕・戸井田伸一・久保島康子・田島良博(1992): 標識放流・海域別年齢別漁獲尾数・漁獲試験によるキンメダイの分布生態, 水試研報, 13, 41-51.
- 8) 中島敏男(1998): 芸東海域におけるキンメダイ未成魚の標識放流, 高知県水産試験場事業報告書, 94, 25-30.
- 9) 田中種雄・清水利厚・中村文夫(1995): 標識放流魚の再捕結果からみたキンメダイの移動, 千葉水試研報, 53, 5-10.
- 10) Higuchi M, Kato K (2002): Sequence variability in the mitochondrial DNA control region of five *Sebastes* species, *Fish. Sci.*, 68, 643-650.
- 11) 木村呼郎(2000): 日本沿岸のマアナゴの集団構造に関する研究, 東京大学農学生命科学研究科平成11年度修士学位論文.
- 12) 朝日田卓・斉藤憲治・山下洋・青沼佳方・小林敬典(1998): ミトコンドリアDNAの制限酵素切断型分析によるヒラメ天然集団の遺伝的変異, 日水誌, 64, 377-383.
- 13) Fujii T, Nishida M (1997): High sequence variability in the mitochondrial DNA control region of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, 63, 906-910.
- 14) Tabata K, Taniguchi N (2000): Difference between *Pagrus major* and *Pagrus auratus* through mainly mtDNA control region analysis. *Fish. Sci.*, 66, 9-18.
- 15) Iguchi K, Tanimura Y, Nishida M (1997): Sequence divergence in the mtDNA control region of amphidromous and land locked forms of ayu. *Fish. Sci.*, 63, 901-905.
- 16) Ishikawa S, Aoyama J, Tsukamoto K, Nishida M (2001): Population structure of the Japanese eel *Anguilla japonica* as examined by mitochondrial DNA sequencing, *Fish. Sci.*, 67, 246-253.
- 17) 久保島康子・瀬崎啓次郎・三谷勇・渡部終五(1993): 鱸の電気泳動分析によるキンメダイ資源の系統群判別, 平成5年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p.56.
- 18) 瀬崎啓次郎・北村徹・吉田泰・渡部終五・伏谷伸宏・久保島康子・三谷勇(1995): キンメダイのDNA分析による系統解析の試み, 平成7年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p.187.
- 19) 中坊徹次編(1993): 日本産魚類検索, 東海大学出版会, 東京.
- 20) Miya M, Kawaguchi A, Nishida M (2001): Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences, *Mol. Biol. Evol.*, 18, 1993-2009.
- 21) Thompson JD, Higgins DG., Gibson TJ (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680.
- 22) Felsenstein J (1995): Phylip, ver.3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- 23) Saitou N, Nei M (1987): The neighbor-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 460-425.
- 24) Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000): Arlequin: a software for population genetics data analysis 2.000, University of Geneva, Geneva.
- 25) Wright S (1978): Evolution and The Genetics of Population, Vol.4. Variability Within and Among Natural Populations, University of Chicago Press, Chicago.
- 26) Hartl DL, Clark AG (1997): Principles of Population Genetics, 3rd edn. Sinauer Associates, Inc, Sunderland.
- 27) Riginos C, Nachman MW (2001): Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Mol. Ecol.*, 10, 1439-1453.
- 28) Kitaura J, Yamamoto G, Nishida M (1998): Genetic variation in populations of the diamond-shaped squid *Thysanoteuthis rhombus* as examined by mitochondrial DNA sequence analysis. *Fish. Sci.*, 64, 538-542.
- 29) Mundy BC (1990): Development of larvae and juveniles of the alfoncinos, *Beryx splendens* and *B. decadactylus* (Berycidae, Beryciformes). *Bull. Mar. Sci.*, 46, 257-273.
- 30) Ivanin N A (1987): On the discovery of a juvenile *Beryx-Alfonsino*, *Beryx splendens*, in the region of the north Australian trough of the Indian Ocean, *J. Ichthyol.*, 27, 171-172.
- 31) 清水利厚(1991): キンメダイ *Beryx splendens* 若魚の形態と成長, 千葉水試研報, 49, 17-23.
- 32) Lehodey P, Grandperrin R (1996): Age and growth of the alfoncino *Beryx splendens* over the seamounts off New Caledonia. *Mar. Biol.*, 125, 249-258.
- 33) Sherstyukov A I, Nostov A S (1986): Collections of juvenile alfoncino, *Beryx splendens* (Berycidae), in the region of the Ugluvoye Submarine Rise. *J. Ichthyol.*, 26, 123-124.
- 34) Lehodey P, Grandperrin R, Marchal P (1997): Reproductive biology and ecology of a deep-demersal fish, alfoncino *Beryx splendens*, over the seamounts off New Caledonia. *Mar. Biol.*, 128, 17-27.
- 35) 柳本卓・久保島康子・菊池康司(1996): PCR-RFLP分析によるキンメダイのmtDNAの地理的変異性について. 1996年北洋底魚資源調査研究報告集, 遠洋水産研究所, pp.273-291.



- 36) Hoarau G, Borsa P (2000) : Extensive gene flow within sibling species in the deep-sea fish *Beryx splendens*, C. R. Acad. Sci. Paris de la vie / Life Sci., 323, 315-325.
- 37) 芝田健二(1985) : 房総海域におけるキンメダイについて - . 成熟と性比, 千葉水試研報, 43, 3-9.
- 38) 大西慶一(1985) : キンメダイの資源補給に関する研究(2)-産卵生態について, 伊豆分場だより, 静岡県水産試験場伊豆分場, 219, 6-7.
- 39) 久保島康子(1999) : 伊豆諸島海域における資源減少期のキンメダイ *Beryx splendens* の成熟 - , 神水研報, 4, 37-41.
- 40) 上部修一(2000) : キンメダイ耳石の微細輪紋に基づく年齢と成長の研究, 日本大学大学院農学研究科水産学専攻博士前期課程論文.