

# ミトコンドリアDNAによって識別される相模湾産タツノオトシゴの二型

向井貴彦\*・対比地孝亘・佐藤寅夫・森沢正昭

〒238-0225 神奈川県三浦市三崎町小網代1024 東京大学大学院理学系研究科附属臨海実験所

\*現住所：〒164-8639 東京都中野区南台1-15-1 東京大学海洋研究所 海洋生命科学部門

(電子メール: tmukai@ori.u-tokyo.ac.jp)

(1999年9月19日受付；2000年1月14日改訂；2000年3月30日受理)

キーワード：タツノオトシゴ、相模湾、ミトコンドリアDNA、12S rRNA遺伝子、分子系統

魚類学雑誌  
*Japanese Journal of Ichthyology*

© The Ichthyological Society of Japan 2000

Takahiko Mukai\*, Takanobu Tsuihiji, Torao Sato and Masaaki Morisawa. 2000. Mitochondrial DNA divergence in the seahorse, *Hippocampus coronatus* (Syngnathiformes: Syngnathidae), collected from Sagami Bay, Japan. J. Ichthyol., 47(2): 139–143

**Abstract** Intraspecific genetic differences in the seahorse, *Hippocampus coronatus* (Syngnathiformes: Syngnathidae), collected from Sagami Bay (Shizuoka and Kanagawa Prefectures, Japan), were surveyed by molecular phylogenetic analyses using a portion of the mitochondrially-encoded 12S ribosomal RNA (12S rRNA) gene. The results indicated that the species comprised two genetically-divergent clades, one characterized by a low coronet and short snout and the other by a tall coronet and long snout. Although the sequence divergences within each clade were very low (0–0.1%), that between the two clades was relatively high (4.4–4.6%), close to values recorded for interspecific genetic divergences in this genus (5.5–7.5%). This suggests that *H. coronatus* includes at least two taxonomic units.

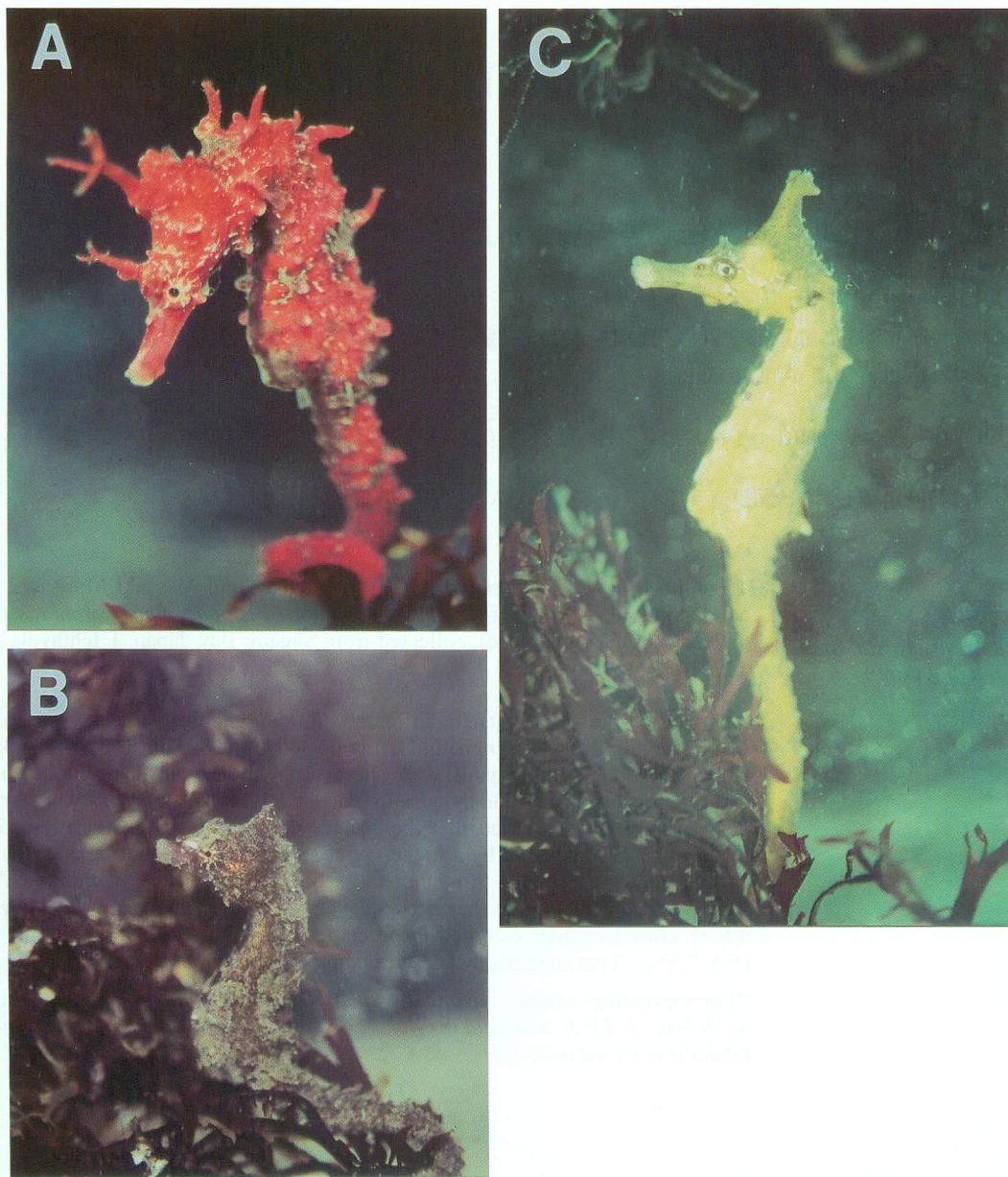
\*Corresponding author: Takahiko Mukai, Ocean Research Institute, University of Tokyo, 1-15-1 Minamidai, Nakano-ku, Tokyo 164-8639, Japan (e-mail: tmukai@ori.u-tokyo.ac.jp)

タツノオトシゴ (*Hippocampus coronatus*) は形態および色彩に豊富な変異を有する日本沿岸の固有種として知られている（三谷, 1956; 渋川, 1997）。その体色は鮮赤色、暗褐色、橙色、白色など様々であり、さらに個体によっては暗褐色の紋が加わる。また、頂冠と口吻の長さや頭部の皮質突起の発達の程度も様々である。そのため、分類学的にもタツノオトシゴを変異の多い1種とする見解（三谷, 1956; 荒賀, 1984; 瀬能, 1993）と、頂冠が低く吻の短い個体を別種とする見解（Jordan and Snyder, 1901; 岡田・松原, 1938; 松原, 1955; Lourie et al., 1999）が存在する。こうした色彩や形態の多様なタツノオトシゴの遺伝的集団構造と形態変異の対応を明らかにする遺伝的解析は

極めて興味深い課題であり、形態形質とは独立に進化するミトコンドリアDNAなどの分子マーカーを用いることで非常に有効な情報が得られるものと考えられる（Avise, 1994; Lourie et al., 1999）。そこで、本研究ではミトコンドリアDNAの12S rRNA遺伝子の部分塩基配列を色彩および形態の異なる相模湾産のタツノオトシゴについて決定した。その結果、相模湾にはミトコンドリアDNAの系統から明確に認識できるタツノオトシゴの二型が分布することが示されたのでここに報告する。

## 材料と方法

相模湾沿岸産タツノオトシゴ *Hippocampus coronatus* の供試魚は、伊豆海洋公園（静岡県伊東市）



**Fig. 1.** *Hippocampus coronatus* collected from Izu Ocean Park (Ito, Shizuoka Prefecture) (A), Mo-roiso (Miura, Kanagawa Pref.) (B), and Koajiro (Miura, Kanagawa Pref.) (C).

産1個体 (Fig. 1A), 諸磯（神奈川県三浦市）産1個体 (Fig. 1B), および小網代湾（神奈川県三浦市）産 (Fig. 1C) 4個体の合計6個体を用いた。いずれも瀬能(1993)に従って種を同定した。ただし、伊豆産と諸磯産は頂冠と吻が短く体表面がざらざらしており (Fig. 1A, B), 小網代湾産は頂冠と吻が著しく伸びており、体表面が滑らか (Fig. 1C) という点で明瞭に異なっていた。採集地点である諸磯と小網代湾は三浦半島先端の地理的に近接した位

置にあり（直線距離で約1km）、伊豆海洋公園とは直線距離で約50km離れた相模湾の対岸に位置する。

また、比較のために小網代湾産のサンゴタツ *H. japonicus* 2個体と横須賀市内の観賞魚店において購入したオオウミウマ *H. kuda* 1個体を用いた。なお、本研究ではサンゴタツとオオウミウマの和名と学名は瀬能(1993)に従ったが、Lourie et al. (1999)に従った場合はそれぞれ *H. mohnikei* と *H.*

*kuda*に相当する。以上に加えて、系統樹作成時の外群として油壺湾（神奈川県三浦市）産ヨウジウオ *Syngnathus schlegeli* 1個体を解析に用いた。DNA抽出のための解剖後、原形をとどめている標本は国立科学博物館に登録した (NSMT-P 58874-58877)。

DNAの抽出には、氷上で麻酔した供試魚から取り出した肝臓を用いた。取り出した肝臓を99%エタノールで数ヶ月から数年保存した後に、その一部をプロテナーゼKで消化し、中性平衡化したフェノールとクロロホルムを用いてDNAを抽出した。抽出したDNAはエタノール沈殿によって精製し、TE緩衝液 [10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA] 中に保存してPCR增幅 (Saiki et al., 1988) の鋳型として用いた。12S rRNA遺伝子の部分領域約710塩基対 (tRNA-Val領域を一部含む) の増幅には、OMT16SF (5'-TGC CAG CCA CCG CGG TTA TAC CT-3') と tRNA02 (5'-GGA TGT CTT CTC GGT GTA AG -3') もしくは trval (5'-TCT TCT CGG TGT AAG TGA GAT GCT T -3') のプライマーセットを使用した。PCR増幅には AmpliTaq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer, U.S.A.) を用いて、95°C1分、55°C1分、70°C2分の温度サイクルを30回繰り返した。PCR産物はミリポアジャパンのスピンドラム (UFCLTK00) によって精製した。タツノオトシゴ6個体の塩基配列は、後述するプライマーを<sup>32</sup>Pでラベルすることによる直接塩基配列決定法により決定したが、他のサンプルの塩基配列は ABI PRISM 310 Genetic Analyzerを用いてダイ・ターミネーター法により決定した。小網代湾産のタツノオトシゴ1個体については両法によって結果に違いがないことを確認した。塩基配列の決定には増幅に用いたプライマー以外に、OMT16SINTF (5'-CTG GGA TTA GAT ACC CCA C-3'), OMT16SR (5'-ACG TCA GGT CGA GGT GTA GCA TAT-3'), valINTF (5'-AAT GTA GCC CAT TTC TTC C -3'), MT12SLR (5'-AGG TTT AAC GGG GGT TAT CGG TTC TAG AAC AGG CTC-3'), OMT16SINTR (5'-GTC CTT TGG GTT TTA AGC T-3'), tRNA01 (5'-TGT TAC GAC TTG CCT CCC C-3') の6種類のプライマーを全てのサンプルに対して用いた。tRNA01とtRNA02は著者の一人(向井)による設計であり、残り6種類のプライマーは東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻の成瀬清博士の設計によるものである。得られた塩基配列は DDBJ/EMBL/GENBANKに登録した (アクセスナンバー AB032026-AB032030)。

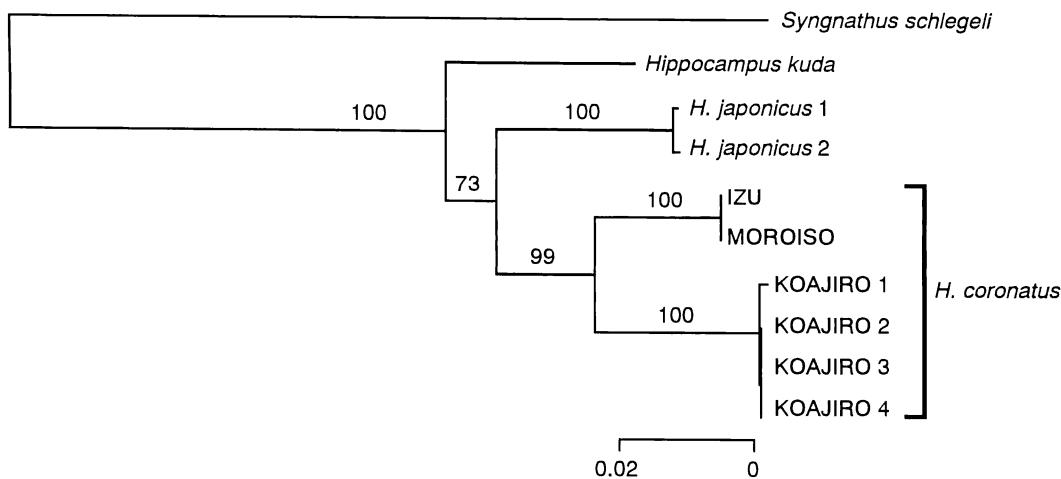
塩基配列の多重アライメントにはCLUSTAL W (Thompson et al., 1994) を用いた。アライメントは、以下のパラメーターでおこなった：Gap Opening Penalty=10.00, Gap Extension Penalty=0.20, Delay divergent sequences=30%, DNA Transitions Weight=0.50。塩基置換の計数と塩基置換率 (p-distance) の推定は、PAUP\* 4.0b2a (Swofford, 1999) によっておこなった。系統解析はPHYLIP ver. 3.572 プログラムパッケージ (Felsenstein, 1996) を用いて、近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) による系統樹の推定をおこなった。系統樹の各枝における信頼性は、疑似データセットを1000回作出することによるブーストランプ確率として計算した。

### 結果および考察

本研究で得られた相同と考えられる塩基配列は、頂冠の低い伊豆産と諸磯産のタツノオトシゴ (Fig. 1A, B) が709塩基対、頂冠の高い小網代湾産タツノオトシゴ (Fig. 1C) 4個体は710塩基対、サンゴタツは712塩基対、オオウミウマは713塩基対、ヨウジウオは708塩基対であった。これらの塩基配列に、CLUSTAL Wによる多重アライメントをおこなった結果、714塩基対の配列として明瞭に整列することができた。

ヨウジウオの塩基配列はタツノオトシゴ属魚類とは大きく異なっており、塩基置換率 (p-distance) にして17.9–19.1%の違いがあった。また、タツノオトシゴ属の種間で塩基配列を比較すると、タツノオトシゴとサンゴタツの間でトランジション型塩基置換 (TS) が31–35カ所、トランスバージョン型塩基置換 (TV) が9–11カ所と1塩基座位のギャップ (挿入もしくは欠失) が2カ所存在し、塩基置換率にして5.5–6.5%の違いがあった。同様に、タツノオトシゴとオオウミウマの間でTSが29–35カ所、TVが17–19カ所と1塩基座位のギャップが3カ所存在し、塩基置換率にして6.9–7.5%の違いがあった。サンゴタツとオオウミウマの間では、TSが24–25カ所、TVが15カ所と1塩基座位のギャップが1カ所存在し、塩基置換率にして5.5–5.6%の違いがあった。

タツノオトシゴ属の種内においては、サンゴタツ2個体の間で1カ所のTSが存在し、伊豆と諸磯産のタツノオトシゴ (Fig. 1A, B) は全く同じ塩基配列、小網代湾産 (Fig. 1C) 4個体の中では3個体が同じ配列 (1個体のみ1カ所のTS) であった。ところが、頂冠の低い伊豆・諸磯産と頂冠の高い小網代湾産の個体の塩基配列は大きく異なっており、



**Fig. 2.** A neighbor-joining tree based on the genetic distances estimated from the partial mitochondrial 12S rRNA gene sequences (714bp) of nine seahorse and a pipefish specimens. Distances were estimated based on Kimura's two parameter model ( $TS/TV=2.0$ ). Scale indicates a 2% genetic distance. Numbers beside internal branches indicate bootstrap probabilities based on 1,000 pseudoreplicates. We tentatively used scientific name *Hippocampus japonicus* for “sango-tatsu”, but it may be a junior synonym of *H. mohnikei* (Lourie et al. 1999).

TS が 20–21 カ所、TV が 10 カ所と 1 塩基座位のギャップが 1 カ所存在し、全体で 4.2–4.4% の違いが認められた。

こうした塩基配列間の違いを元にして、木村の 2 変数モデル (Kimura, 1980) によって遺伝距離を計算し、それに基づいて近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) による系統樹の推定をおこなった (Fig. 2)。タツノオトシゴ属の種間における TS/TV 比は 1.5–3.4 の間であったことから、遺伝距離の計算における TS/TV 比は 2 と仮定した。その結果、ミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子領域におけるタツノオトシゴの単系統性は強く支持されたが (ブーストラップ確率 99%)、伊豆・諸磯産と小網代湾産の個体から得たハプロタイプは 2 つの明瞭なクレードに分けられた。したがって、頂冠が低く吻の短い伊豆産と諸磯産の個体と、著しく伸びた頂冠と吻を持つ小網代湾産の個体は、ミトコンドリア DNA の塩基配列によっても明確に識別されることが示された。

一般に、12S rRNA 遺伝子はミトコンドリア DNA の中で最も分子進化速度の遅い領域として知られている (Meyer, 1994)。それにもかかわらずタツノオトシゴの種内で明瞭な遺伝的分化が認められたことは興味深い。同じ遺伝子領域において、ハゼ科アベハゼ属 (*Mugilogobius*) の種間では塩基置換率にして 1.6–9.1% の相違が存在したが、静岡

県と和歌山県産のアベハゼ *M. abei* および沖縄島と西表島産のナミハゼ *M. chulae* の各種内比較では 0–0.1% の違いしかなかった (Mukai et al., 2000)。また、ミトコンドリアの 12S と 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列（両領域を合わせて約 850 塩基対）の比較では、ヨコエソ科オニハダカ属 (*Cyclothone*) の種間で 1.9–12.2% (Miya and Nishida, 1996)、ムネエソ科ムネエソ属 (*Sternoptyx*) の種間で 2.0–10.4% (Miya and Nishida, 1998) の違いが存在する。オニハダカ属とムネエソ属においても、大西洋・南太平洋・地中海の *C. braueri*、中部太平洋とカリフォルニア沖の *S. obscura* の各種内における塩基置換率は 0% であった。相模湾産タツノオトシゴの場合も、各ミトコンドリア DNA のクレード内における変異はほとんどなく (0–0.1%)、クレード間で大きく分化 (4.2–4.4%) していた。ここで観察された塩基配列の違いは他のタツノオトシゴ属種間 (5.5–7.5%) に近似している。したがって、タツノオトシゴ二型間における遺伝的分化の程度は、種間の相違に近いと言えるだろう。伊豆海洋公園 (伊豆半島) と諸磯 (三浦半島) で採集された頂冠の低いタツノオトシゴが全く同じ塩基配列を持ち、諸磯と近接した小網代湾で採集された頂冠の高いタツノオトシゴが遺伝的に分化していたことも、相模湾産タツノオトシゴが複数の遺伝的集団からなることを支持している。したがって、今後は相模湾

も含めたより多くの海域におけるタツノオトシゴの集団遺伝学的な解析と、それに基づく詳細な形態的・生態学的比較が必要であろう。

### 謝 辞

本研究をおこなうにあたり、塩基配列決定の際に多くの便宜をはかっていただいた東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻の成瀬清博士、東京大学海洋研究所海洋生命科学部門の西田睦教授と窪川かおる博士に厚く御礼申し上げる。また、標本の採集に助力いただいた伊豆海洋公園の益田一、瓜生知史の両氏、東京大学臨海実験所の鈴木英夫氏、関本実氏、関藤守氏、文献の収集に協力していただいた国立科学博物館の篠原現人博士と北海道大学水産学部の武藤文人博士、原稿に関する貴重なご助言をいただいた東京大学海洋研究所海洋生命科学部門の渡辺勝敏博士、山崎裕治博士と海洋生物資源部門の山口素臣博士に厚く御礼申し上げる。

### 引 用 文 献

- 荒賀忠一. 1984. タツノオトシゴ. 益田一・尼岡邦夫・荒賀忠一・上野輝彌・吉野哲夫(編), p. 88, pl. 77. 日本産魚類大図鑑. 東海大学出版会, 東京.
- Avise, J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, New York. 511pp.
- Felsenstein, J. 1996. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) ver. 3.572. University of Washington, Seattle.
- Jordan, D. S., and J. O. Snyder. 1901. A review of the hypostomide and lophobranchiate fishes of Japan. Proc. U. S. Natn. Mus., 24: 1–20, pls. 1–12.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16: 111–120.
- Lourie, S. A., A. C. J. Vincent, and H. J. Hall. 1999. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation. Project Seahorse, London. x+214pp.
- 松原喜代松. 1955. 魚類の形態と検索I. 石崎書店, 東京. xi+789pp.
- Meyer, A. 1994. DNA technology and phylogeny of fish. Pages 219–249 in A. R. Beaumont, ed. Genetics and evolution of aquatic organisms. Chapman & Hall, London.
- 三谷文夫. 1956. タツノオトシゴ (*Hippocampus coronatus* T. & S.) に見られる形状及び色彩の個体変異. 動物学雑誌, 65: 66–73.
- Miya, M., and M. Nishida. 1996. Molecular phylogenetic perspective on the evolution of the deep-sea fish genus *Cyclothona* (Stomiiformes: Gonostomatidae). Ichthyol. Res., 43: 375–398.
- Miya, M., and M. Nishida. 1998. Molecular phylogeny and evolution of the deep-sea fish genus *Sternopyx*. Mol. Phyl. Evol., 10: 11–22.
- Mukai, T., M. Kajimura, and K. Iwata. 2000. Evolution of a ureagenic ability of Japanese *Mugilogobius* species (Pisces: Gobiidae). Zool. Sci., 17: 549–557.
- 岡田彌一郎・松原喜代松. 1938. 日本産魚類検索. 三省堂, 東京, xl+584 pp., 113 pls.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, R. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Frlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. Science, 239: 487–491.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. Mol. Biol. Evol., 4: 406–425.
- 瀬能 宏. 1993. ヨウジウオ科. 中坊徹次(編), pp. 478–489, 1293–1295. 日本産魚類検索. 東海大学出版会, 東京.
- 渋川浩一. 1997. タツノオトシゴ. 岡村 収・尼岡邦夫(編), pp. 174–175. 山溪カラーネ名鑑日本の海水魚. 山と渓谷社, 東京.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (beta test version). Washington, Smithsonian Institute.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nuc. Acids Res., 22: 4673–4680.