

## 第4章 マイクロサテライトによる母性解析

### 第1節 背景と目的

#### 第1項 背景

第2章では102日間にも及ぶ産卵調査を実施したものの、調査期間中に個体識別できたのはわずかに10個体のみで、17回の産卵のうち8回は既に本研究で個体識別済みの個体が再度回帰しておこなったものであった。

ウミガメは1シーズンに複数回産卵するため、正確な産卵個体数を知るには午後19時ごろから翌朝5時ころまで夜通し砂浜を歩き続けて産卵雌への標識装着を行わねばならない。さらに、上陸し産卵をおこなった全ての個体を見逃すことなく標識装着するには常時複数人で調査せねばならず、例えば和歌山県南部町千里浜では1日当たり最低6人が必要とされている(佐藤1994)。そのため献身的なボランティアの協力なくして夜間調査は成立しえないが、十分なボランティアを確保できる産卵浜はごく限られている。特に、蒲生田を始めとする中規模以下の産卵浜や琉球列島のように小砂浜が無数に点在する地域では産卵雌に遭遇できる頻度が少ないため、調査者のモチベーション維持が難しい。

現在までに、屋久島や宮崎、南部など国内の主要産卵場のいくつかでは調査体制が整備され、質の高い夜間調査が継続されるようになった。しかし、日本のアカウミガメ産卵場の多くは年間の産卵回数が100回に満たない産卵浜である。この中には蒲生田のようかつては産卵回数が多く、日本の個体群回復をはかっていくうえで重要な位置付けにあるものも少なくない。特に急激な個体群の縮小を経験した産卵浜は遺伝的な劣化が生じている可能性も懸念されるので、個体群内の遺伝子流動などの遺伝的な情報をと

り入れて効果的な保全をおこなっていく必要がある。また、日本産アカウミガメの集団構造を明らかにするためにも、調査対象にできる産卵浜が増えることは意義が大きい。産卵頻度の少ない産卵浜からも効率的に産卵雌の識別、DNA サンプルの採取が行える手法の開発が求められている。

そこで本章では、比較的採取が容易な孵化幼体や産卵巣中に残されて死亡した個体および死亡卵から DNA 標本を採取し、未知の産卵雌の遺伝型を推定し識別する手法を開発することを目的とした。まず、本章および後の章でも用いていくマイクロサテライト領域の特性について詳細な検討をおこない、次に孵化幼体の遺伝的情報をもとに未知の産卵雌を識別する手法を開発する。母親と子供の遺伝情報をもとに父親を推定する手法が「父性解析 (Paternity Analysis)」と呼ばれているので、ここでは孵化幼体の遺伝情報から産卵雌の識別をおこなうことを「母性解析」と呼ぶことにする。

## 第2項 マイクロサテライトマーカーの利用

近年、野生生物の集団解析や父性判別に核 DNA マイクロサテライトマーカーが盛んに利用されるようになってきた。マイクロサテライトとは DNA の中で 1 塩基から 5 塩基までの長さのモチーフ (例えば CA、TGG など) が連続して繰返されている部分を指し、この繰返し数に多型性が高いことから現在最も有用な遺伝マーカーとされている。

マイクロサテライトの解析法としては、PCR (Polymerase Chain Reaction) によりマイクロサテライトを含む部位を DNA の中から特異的に増幅させた後、増幅された DNA 断片 (フラグメント) をゲル中で電気泳動をさせ、その移動度をもとに繰返し数の長さを推定する「フラグメント解析」が一般的である。この手法はマイクロサテライトに限らず、AFLP や PCR-RFLP など様々な解析でも用いられているように、非常に簡便で迅速かつ低コストでの解析が可能な点が大きな利点である。しかし、得られるデータは増幅断片のサイズだけであるので、これを信頼できるデータとして用いる際には次の 3 つの前提条件が満たされた場合に限られる。すなわち、(1) マイクロサテライト領域を確実に増幅できている、(2) 増幅断片のサイズとモチーフの繰返し数が対応している。(3) 増幅断片サイズの再現性が高い、である。本研究では以降でこの核 DNA マイクロサテライトマーカーを用いていくことになるが、使用するマイクロサテライトはいずれも南太平洋のアカウミガメ (Cc7、Cc117、Cc141; FitzSimmons et al. 1995, FitzSimmons 1998, FitzSimmons et al. 1999) もしくは他種のウミガメ (Cm72、

Cm84、Ei8; FitzSimmons et al. 1995) で開発されたものであり、日本産アカウミガメでも有効であるという保証はない。

そこで第2節では以降の解析に先立ち、既報のマイクロサテライトマーカーの特性を詳細に調べることで日本の個体群でも使用可能かどうかを検討することを目的とした。まず、マイクロサテライト増幅用の既報のプライマーによって増幅される DNA 断片の塩基配列を決定して配列および増幅断片サイズとモチーフ繰り返し数の対応を確認する。次に同じサンプルを複数回解析して再現性を確認することで上述した3つの前提が日本産アカウミガメでも成り立つか否かの確認を行った。

### 第3項 母性解析

通常の親子解析では、子供以外に片親の遺伝情報も使用して推定をおこなうのに対して、本研究でおこなう母性解析では基本的に子供（孵化幼体）の情報しか利用できない。両親の情報が得られない場合、子供の血縁度をもとに数理モデルに基づいて親の異同を判定する血縁解析法も存在するものの（Blouin 2003 に総説）、それらは主にヒトを対象とした研究をもとに作られたものである。ウミガメの場合、一つの産卵巣から複数の孵化幼体もしくは死亡卵を採取することで、母親を推定するための試料を複数得ることができるという特徴がある。この利点を活用することができれば、ヒトで使われている手法よりも簡便に高い精度で母親を推定可能となる。本研究では父性解析のプログラム GERUDE2.0（Jones 2005）で用いられているように、孵化幼体の遺伝子型から各産卵巣の母親の遺伝子型を推定し、その遺伝子型をもとに母親の異同を判定することにする。ただし、GERUDE2.0（Jones 2005）の方法は使用する子供のデータにエラーが存在してはいけない、全ての遺伝子座で遺伝子型の情報が揃っていないといけないなど、制約も多い。

そこで第3節では、エラーや解析されない遺伝子座があっても利用できる新たな母性解析法を確立することを目的とする。まず、孵化幼体の mtDNA を解析し、mtDNA だけでどれだけ母親の識別が可能かを検討する。次に産卵雌既知の産卵巣について GERUDE2.0（Jones 2005）の方法および本研究で新たに考案した方法を用いて孵化幼体のマイクロサテライトの遺伝子型から産卵雌の遺伝子型を推定し、その妥当性を検討する。最後に新たに考案した方法を用いて母親不明の産卵巣の母性解析をおこない、産卵調査では遭遇できなかった産卵雌の mtDNA の情報を得る。

## 第2節 材料と方法

### 第1項 マイクロサテライトマーカーの特性

#### 解析の手順

まず第2章の野外調査で採取された標本のうち、産卵雌10個体と産卵巣35クラッチ由来の孵化幼体・死亡卵463個体から粗全DNAを抽出した。次に、これらに Hatase et al. (2002a) が mtDNA の解析に用いた南部、宮崎、屋久島、吹上の産卵雌計273個体を加えた計746個体について既報のプライマーを用いて核DNAマイクロサテライトのフラグメント解析をおこなった。この中から対立遺伝子をホモでもつサンプルを抜き出し、同じプライマーを用いてマイクロサテライトの塩基配列を決定した。得られた塩基配列とフラグメント解析の結果を比較し、DNA増幅断片サイズと繰り返し数の対応を確認した。次に同じDNAサンプルを同一機器で再度解析し、結果を比較することで再現性を確認した。また、研究期間中に使用機器のバージョンアップがおこなわれたため、バージョンによる結果の違いも検討した。

#### 粗全DNAの抽出

TNES-Urea Buffer 中に保存された血液および99%エタノール中に保存された組織片から、フェノール/クロロホルム法(Hillis et al.,1996)により粗全DNAを抽出した。血液標本の場合は10~30 $\mu$ lをTNES-Urea Buffer 500 $\mu$ lに再溶解し、組織片の場合は約50mm<sup>3</sup>を切り出してTNES-Urea Buffer 500 $\mu$ l中で細断して溶解させ、10 $\mu$ lのProteinase K (10mg/ml)を加え、50°Cで2~3時間溶解した。次に、タンパク質を変性させるために等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、15分間静かに転倒混和した後、4°C10000rpmで10分間遠心・成層させた。DNAを含む水層部を、滅菌した新しい1.5mlチューブに移した後、同じ操作をもう一度繰り返した。残留したフェノールを除くため、ジエチルエーテルを等量加え、10分間静かに転倒混和した後、10,000rpmで10分間遠心・成層させ、上層のエーテル層を除去する。この操作を再度繰り返した後、核酸水溶液の1/10倍量の3M酢酸ナトリウム(ph 5.2)と99%エタノール1mlを加えて静かに攪拌し10分間室温に静置後、15,000rpmで15分間、4°Cで遠心しDNAを沈殿させた。上澄を除去し、70%エタノールでリンスした後、12,000rpmで5分間、4°Cで遠心し、再び上澄を除去した。40°Cで乾燥させた後、50 $\mu$ lのTE Buffer (10mM Tris-HCl, ph 8; 1mM EDTA, ph 8)を加えて溶解し

た。この一部 (2~3  $\mu$ l) を Perfect DNA Markers, 0.5-12kb (Novagen 社製) とともに 1.0ng/ml の臭化エチジウムを含有させた 1%のアガロースゲル (LO3, TaKaRa 社製) による電気泳動を行った。その後、UV 照射下でバンドの有無とサイズの確認をし、粗全 DNA の抽出を確認した。抽出が確認された標本は、その後 PCR の鋳型とした。

### マイクロサテライトのフラグメント解析

粗全 DNA を鋳型に PCR 反応を行い、増幅された産物を ABI PRISM™3100Genetic Analyzer(Applied Biosystems)および 3130xl Genetic Analyzer(Applied Biosystems) 上で GeneScan™500LIZ®サイズスタンダード(Applied Biosystems)とともに電気泳動した。増幅断片の移動度を GENESCAN 3.1 software(Applied Biosystems)および GeneMapper®ソフトウェア v3.5(Applied Biosystems)を用いて既に断片サイズに分かっているサイズスタンダードの移動度と比較することで DNA 増幅断片のサイズを得た (Fig.4.1.)。マイクロサテライトマーカーには Cc7、Cc117、Cc141、Cm72、Cm84、Ei8 (Table 4.1.) の 6 つを使用し、94°Cで 5 分間の熱変性の後、94°C、55°C (Cc141 のみ 59°C)、72°Cをそれぞれ 30 秒間ずつ 30 回繰り返し、最後に 72°Cで 7 分間再伸長する温度プロファイルによっておこなった。PCR 反応液の組成は、10×*Ex Taq*™ Buffer (Mg<sup>2+</sup> 20mM) 1.5  $\mu$ l、dNTP Mixture (2.0mM) 1.2  $\mu$ l、各プライマー (0.5  $\mu$ M) 1.5  $\mu$ l、TaKaRa *Ex Taq*™ (5 unit/ $\mu$ l) 0.08  $\mu$ l、鋳型となる粗全 DNA 1.0  $\mu$ l に滅菌蒸留水を加えて全量を 15  $\mu$ l とした。使用したプライマーのうちフォワードのプライマーは、蛍光色素でラベリングされたものを用いた。増幅断片のサイズは整数値に換算せずに小数点以下 2 ケタの生データのまま取得した。

### マイクロサテライトの塩基配列の決定

フラグメント解析で泳動波形のピークが一つしか確認されず、2 つの対立遺伝子が同一 (ホモ) と判断されたサンプルについてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。ここでクローニングを行わずに直接 PCR 産物の塩基配列を決定するダイレクトシーケンス法を採用したのは、マイクロサテライト領域の PCR 産物をクローニングした場合、同一産物由来のクローン間でも繰り返し数に違いが生じてしまうことが報告されており (Liepelt et al. 2001)、ダイレクトシーケンスの方が正確な塩基配列を得られるとされているからである (Adams et al. 2004)。

まず、蛍光標識されていないプライマーセットを用いて、フラグメント解析の時と全く同じ方法で PCR 反応をおこなった。得られた DNA 断片の増幅の確認は、反応液の一部 (2~3  $\mu$ l) を  $\phi$  174 *Hinc* II digest marker とともに 1.0ng/ml の臭化エチジウム

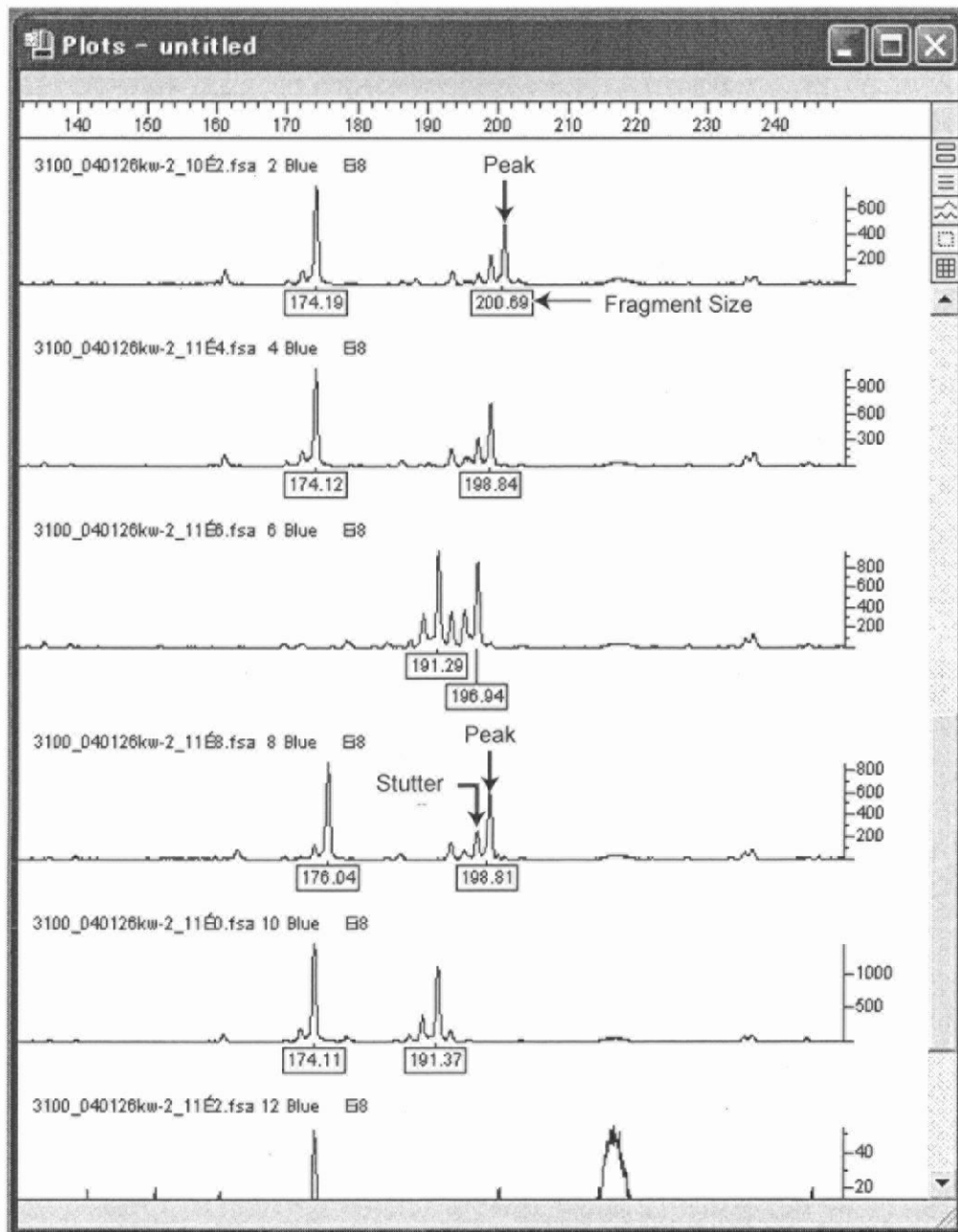


Fig.4.1. Electropherogram of microsatellite locus Ei8

Table 4.1. Microsatellite loci and primers used in this study.

Locus		5' to 3'	Reference
Cc7	F	TGCATTGCTTGACCAATTAGTGAG	1
	R	ACATGTATAGTTGAGGAGCAAGTG	
Cc117	F	TCTTTAACGTATCTCCTGTAGCTC	2
	R	CAGTAGTGTCAGTTCATTGTTTCA	
Cc141	F	CAGCAGGCTGTCAGTTCTCCA	3
	R	TAGTACGTCTGGCCTGACTTTC	
Cm72	F	CTATAAGGAGAAAGCGTTAAGACA	2
	R	CCAAATTAGGATTACACAGCCAAC	
Cm84	F	TGTTTTGACATTAGTCCAGGATTG	2
	R	ATTGTTATAGCCTATTGTTTCAGGA	
Ei8	F	ATATGATTAGGCAAGGCTCTCAAC	2
	R	AATCTTGAGATTGGCTTAGAAATC	

F: Forward primer, R: Reverse primer

1: FitzSimmons (1998), 2: FitzSimmons et al.(1995), 3: FitzSimmons et al.(1999)

を含有させた 2%のアガロースゲル (LO3、TaKaRa 社製) による電気泳動を行い、UV 照射下でバンドの有無と増幅断片の長さを確認することによって行った。アガロースゲル電気泳動によって DNA 断片の増幅が確認されたものについては、残りの PCR 産物を ExoSAP-IT(USB)を用いて精製し、余剰の dNTP、塩、およびプライマーを除去したのち、BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用いて Dye Terminator 反応を行った。Dye Terminator 反応は PCR 反応で用いた Forward と Reverse の双方のプライマーについてそれぞれ、96°C で 2 分の熱変性に続いて、96°C で 10 秒、50°C で 5 秒、60°C で 4 分の過程を 25 回繰返す温度プロファイルで実施した。その後、ABI PRISM™3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)もしくは ABI PRISM™3130xl Genetic Analyzer(Applied Biosystems)により泳動し、使用した双方のプライマー部位から塩基配列を読み、重複部分の塩基配列が相補的であることを GENETYX-WIN ver.5.1.0.(ソフトウェア開発株式会社)上で確認することで最終的に塩基配列を決定した。塩基配列のうち相補的でない部分が発見された時には、Chromas ver.1.45 (Conor McCarthy; <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) を用いて泳動波形を比較し、波形の信頼性が高い方の配列を採用した。

### **塩基配列とフラグメント解析結果の照合**

決定された塩基配列をフラグメント解析の結果と比較して増幅断片サイズとモチーフの繰り返し数の対応を確認した。この照合結果をもとに小数点 2 ケタの生データを整数長の対立遺伝子に変換する際の規則を決め、最終的な対立遺伝子長を得た。

### **再現性の確認**

1994 年に南部で採取された産卵雌 62 個体を用いて再現性の確認とエラー率の推定をおこなった。このサンプルは最初に ABI PRISM™3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いてフラグメント解析がおこなわれたが、その後他のサンプルを解析中に機器が ABI PRISM™3130xl Genetic Analyzer(Applied Biosystems)にバージョンアップされたため、1994 年の南部のサンプルを新しいバージョンで再解析し、バージョン間の補正值を得た。次に、新バージョンで 3 回目の解析をおこない 2 回目と結果を比較することで、再現性を確認し、エラー率を算出した。この同じサンプルを 2 回解析するという手法は Bonin et al.(2004)が提唱した blind samples 法というエラー率の推定法に相当する。エラー率の推定法としてはこの他にも例えば Taberlet et al.(1999)は 1 つのサンプルについて繰り返し PCR をやり直すことを提唱しているが、



99%の信頼性を得るためには各サンプルについて 7 回以上の実験の反復が求められ (Taberlet et al. 1996)、コストが高すぎる。また、実験の繰り返しを防ぐためのいくつかの方法 (例えば Broquet and Petit 2004 に総説) も開発されてはいるが、作業の自動化が制限される、仮定が極端すぎるなどの問題点もあるため (Bonin et al. 2004)、ここでは blind samples 法を採用することにした。

## 第2項 母性解析

### mtDNA の塩基配列決定

産卵雌 10 個体と産卵雌不明の産卵巣 20 クラッチから採取した孵化幼体・死亡卵 28 個体、計 38 個体についてダイレクトシーケンシング法 (第 1 項) により mtDNA の cytochrome *b* 領域中央部から調節領域中央部までの約 650bp の塩基配列を決定した。ここでは、第 2 節と異なる点のみを記す。

プライマーには既報の AKACB1 (5'-CACAgCgggCATAATCgAAAACAAAAT-3' ; Hatase et al., 2002a) と TCR6 (5'-gTACgTACAAgTAAACTACCgTATgCC-3' ; Norman et al., 1994) のセットを用い、増幅状況によっては LTCM1 (5'-CCCAAACCGgAATCCTAT-3' ; Allard et al., 1994) および HDCM1 (5'-ACTACCgTATgCCAggTTA-3' ; Allard et al., 1994) も補助的に用いた。

PCR 法による DNA 断片の増幅に用いた温度変化プロファイルは、94°C で 2 分間の熱変性に続き、熱変性、アニーリング、伸長反応をそれぞれ 94°C で 15 秒、52°C で 15 秒、72°C を 45 秒で 30 サイクルおこなった後、72°C で 7 分間再伸長を行うものである。ここで扱う mtDNA は第 1 項で扱った核ゲノムに比べてゲノムサイズが小さいので、各過程の時間を短縮してある。PCR 反応液の組成は、10× *Ex* Taq™ Buffer (Mg<sup>2+</sup> 20mM) 1.5 μl、dNTP Mixture (2.0mM) 1.5 μl、各プライマー (0.5 μM) 1.5 μl、TaKaRa *Ex* Taq™ (5 unit/μl) 0.06 μl、鋳型となる粗全 DNA 0.6 μl に滅菌蒸留水 8.64 μl を加えて全量を 15 μl とした。

増幅させた DNA 断片の塩基配列をダイレクトシーケンス法 (第 1 章を参照) により決定したのち、Hatase et al. (2002a) により GeneBank に登録されている mtDNA の tRNA<sup>Thr</sup> から調節領域末端までに至る約 1300bp の塩基配列をもとにアライメントをおこない、最終的な塩基配列を決定した。

## マイクロサテライトの解析

### マーカーの選定

既に第4章で解析した南部の産卵個体 115 個体の 5 マイクロサテライト領域における対立遺伝子出現状況をもとに、マーカーごとの検出力 ( $q$ ) を次式により推定した (Hanotte et al. 1991)。

$$q = \sum (p_i^2)^2 + \sum (2p_i p_j)^2$$

ここで  $q$  は血縁関係にない 2 個体が 1 つの遺伝子座において同じ遺伝子型をもつ確率で、 $p_i$ 、 $p_j$  は各対立遺伝子の集団中の出現頻度である。算出された検出力は Cc141 で最も高く (共有率 0.049)、Cc7 で最も低かった (0.162) (Table 4.2.)。この結果を元に Cc117、Cc141、Cm84 を使用することにした。Ei8 よりも検出力の劣る Cc117 を選択したのは、エラーや変異様式の点でなるべく同種から開発されたマーカーを使用したいと考えたからである。この 3 マーカー全てが共有される確率は  $\prod q_i$  より、0.000358 と計算され、2795 個体中 1 個体という確率であった。南部は本研究で扱った産卵浜のうちで最も蒲生田に近く、遺伝的な違いが存在したとしても少ないと予想されるので、この数字は蒲生田にも適用可能と考える。蒲生田の年間の産卵回数が 20~30 回で 3 年間では最大でも 90 個体程度を判別できればいいことを考えると十分な検出力である。

### 遺伝子型の決定

第2章で採取された DNA 標本のうち、35 クラッチから得た計 463 個体の孵化幼体・死亡卵と 10 個体の産卵雌について Cc117、Cc141、Cm84 のマイクロサテライト 3 領域の遺伝子型をフラグメント解析 (本節第1節を参照) により決定した。

このうち既知の産卵雌 7 個体によって産卵された産卵巣 7 クラッチから得た計 181 個体の孵化幼体・死亡卵とその産卵雌 7 個体の結果を手法の妥当性の検証に、残りの産卵雌不明の 28 クラッチ 282 個体を母親未知の母性解析に用いた。

## 産卵雌の遺伝子型推定

### 既存の手法による推定

父性解析のためのプログラム GERUD2.0 (Jones, 2005) で使われている方法により、孵化幼体のマイクロサテライトの遺伝子型から産卵雌の遺伝子型を推定した。すなわち、まず孵化幼体の遺伝子型 (genotype) から全ての対立遺伝子 (allele) を抜き出し (Fig. 4.2. : 1)、抜き出したうちの対立遺伝子 2 個の組み合わせでできる遺伝子型を全て作り出す (Fig. 4.2. : 2)。孵化幼体に観察された対立遺伝子の種数を  $A$  とすると、

Table. 4.2. Probability that two random individuals share the same genotype

Locus	n	Observed Allele Length(bp)	q*
Cc7	105	175-189	0.162
Cc117	111	222-252	0.100
Cc141	110	189-213	0.049
Cm84	109	312-337	0.072
Ei8	112	175-205	0.073

Each parameter was estimated using the genotypes of nesting female on Manabe in 1994 and 1995

\* q = probability that two random individuals share the same genotype at one locus (Hanotte et al. 1991)

Example of hatchlings' genotypes	
Hatchling_1	314/314
Hatchling_2	314/326
Hatchling_3	324/326

1. List up all alleles in the hatchlings.

⇒ Observed Alleles: 314, 324, 326

2. Create all pairwise combination of the alleles.

⇒ Created Genotypes:

314/314, 314/324, 314/326, 324/324, 324/326, 326/326 (6 types)

3. Check the created genotypes for accounting all genotypes of the hatchlings

Created Genotypes	Explain all hatchlings?
314/314	x
314/324	○
314/326	○
324/324	x
324/326	x
326/326	x

⇒ Candidate for mother's genotype: 314/324, 314/326

Fig. 4.2. Algorithm for estimating the maternal genotype.

$A_2C_2 + A$  種類の遺伝子型がこの段階で作られる。次に、作り出された遺伝子型のうち孵化幼体の遺伝子型全てを説明できるものだけを母親の遺伝子型候補として残す (Fig. 4.2. : 3) という手順である。GERUD2.0 (Jones, 2005) では全ての領域について遺伝子型の情報が得られている孵化幼体しか解析の対象とされないため、本研究ではこの手法を実行する Excel マクロを作成して用いた。なお、この推定法は母親が持つ2つの対立遺伝子が孵化幼体のサンプル中に必ず存在することを前提としているので、5個体以上の解析データを取得できた産卵巣、マイクロサテライト領域のみに適用することにした。この5個体という数字は、N個体の孵化幼体を解析したとき、その中に母親の片方の対立遺伝子しか含まれていない確率はメンデル遺伝の法則から  $(1/2)^N$  であり、N = 5 のときに 3.1% と非常にまれになることが根拠となっている。

#### 新たに考案した手法による推定

Jones(2005)の方法に以下に記すエラー対策のための作業 (Fig. 4.3.) を加えることで、データの欠損やエラーや変異に対して頑強な推定法にした。

まず上記の Jones(2005)の方法で遺伝子型を推定して候補 1 (Candidate\_1) とする (Fig. 4.3. B)。続いて孵化幼体の対立遺伝子中に互いに 2bp 違いのものが存在するかどうかを確認し (Fig. 4.3. C)、存在した場合にはフラグメント解析の電気泳動像をチェックする (Fig. 4.3. D)。ここで、2塩基長の違いが対立遺伝子の決定ミス、シャドウバンドもしくは、移動度の一律なズレ(base shift)であると明確にわかったときには孵化幼体のデータを修正する。この修正により変更される対立遺伝子が候補 1 (Candidate\_1) の中に含まれていれば、その遺伝子型を候補から外して残りを新たに候補 1' (Candidate\_1') とする (Fig. 4.3. E)。泳動像の波形が非特異的で判断しにくい時には、その領域のデータは信頼性が低いとみなし、遺伝子型の推定を中止する。ここまでの作業で、電気泳動結果の波形から遺伝子型を決定する段階で生じるエラーに対処できる。

次に、変異に対処するため、N が 10 個体以上の場合には 1 回しか出現しない遺伝子型をもつ個体、N が 10 より小さい時には 1 回しか出現しない対立遺伝子をもつ個体をもとの孵化幼体のデータから除外する (Fig. 4.3. G & H)。そしてこのような手順を経て修正された孵化幼体のデータから母親の遺伝子型を再度推定し、ここで推定された遺伝子型を候補 2 (Candidate\_2) とする (Fig. 4.3. I)。このようにして得られた候補 1' と候補 2 を合わせて母親遺伝子型の候補とする。変異の可能性のある個体を除外する際 (Fig. 4.3. G & H) に、変異でない正常な対立遺伝子を除外してしまう可能性があるため、最終的に候補 1' も合わせて候補とすることで対処している。なお、母親遺伝

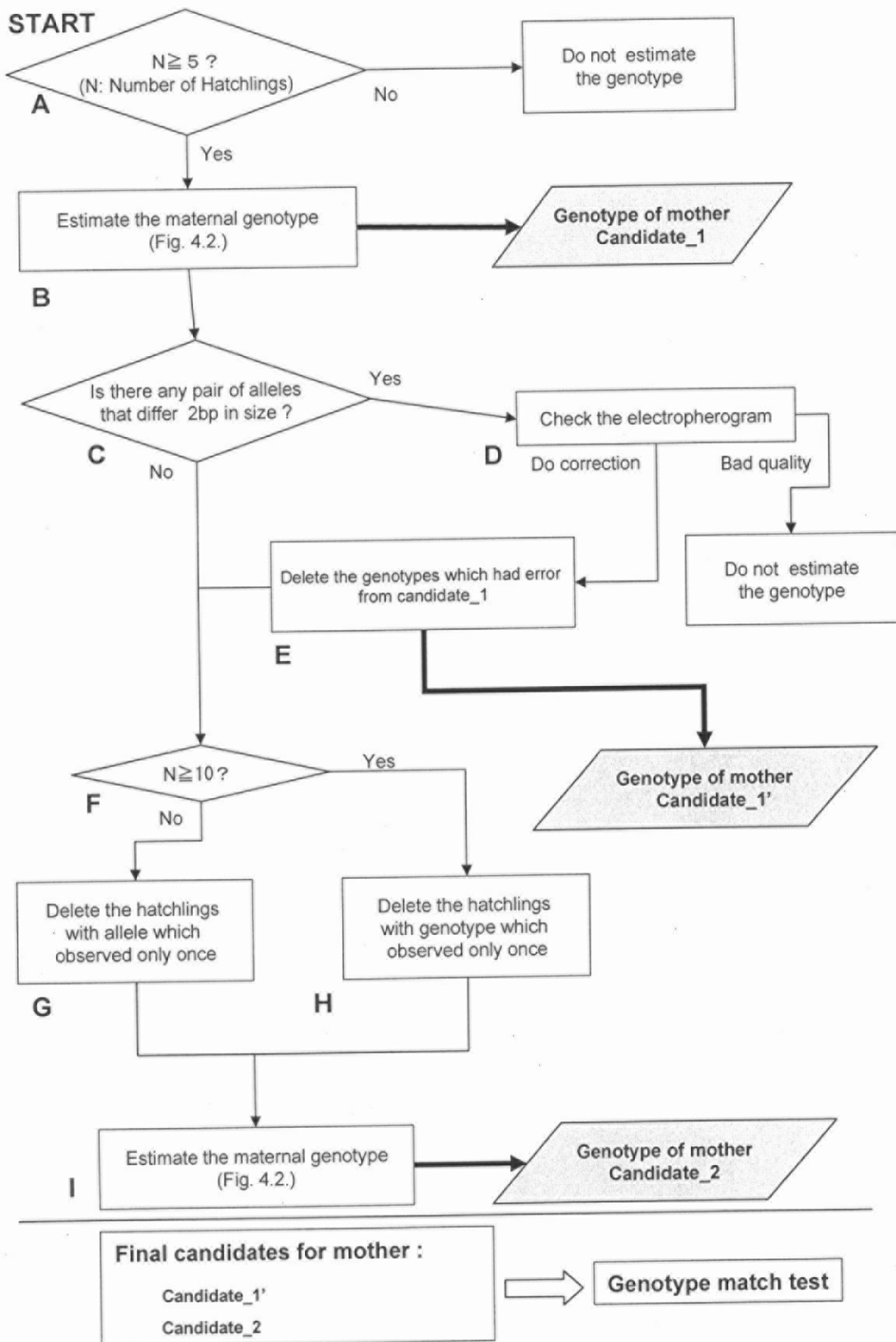


Fig. 4.3. Algorithm for estimating the maternal genotype under genotyping error.

子型推定 (Fig. 4.2., Fig. 4.3. B & I) の部分は非常に多くの組み合わせが生成され、1 つ 1 つチェックされていくので、大量のデータを用いた場合に単純作業ゆえの人為的ミス (Bonin et al. 2004) が発生する可能性も高いと予想される。そのために自動的にサンプルシートからデータを読み込んで遺伝子型候補を書き出す Excel マクロを作成して実行させることで人為的ミスの発生を抑えた。

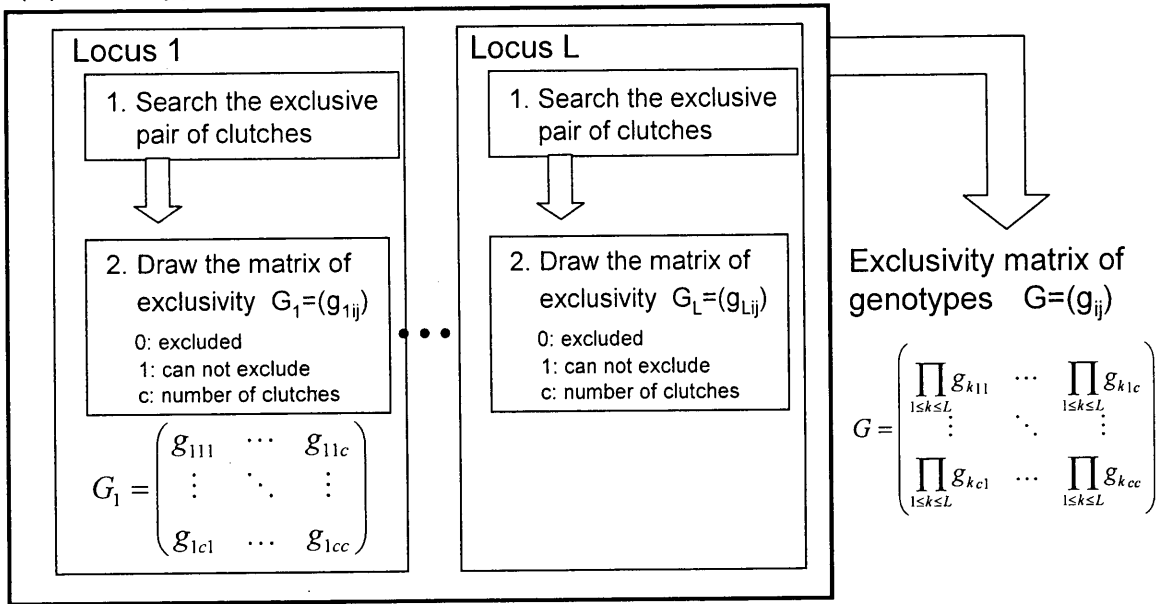
### 遺伝子型をもとにした母親の判別

推定された遺伝子型を比較し、異同を判別した。判別は同一の産卵雌を別個体と誤判断するのを避けるため、「遺伝子型が一致したものを同じとする」のではなく、「同一となりえない個体 (クラッチ) を排除していく」という排除原則のもと実施することにした。ここでは複数のマイクロサテライト領域による結果を簡単に統合できるようにするために、以下に示す行列を用いた独自の方法を用いた。具体的には、各産卵巣について推定された産卵雌の遺伝子型を 1 対 1 で比較していき、2 つの産卵巣間で共通な遺伝子型の候補が 1 つも無く、確実に産卵雌が異なると断定できる組み合わせをマイクロサテライトの各領域ごとに求めて産卵巣対産卵巣の行列 ( $G_k$ ) を作成した (Fig. 4.4. (1): Genotype matching)。この行列では異なると判断された関係 (要素  $g_{nij}$ ) を 0 に、それ以外を 1 とした。次に、各領域について求められた行列の各要素を掛け合わせることで、複数の領域の情報を反映した判別行列  $G$  (要素  $g_{ij} = \prod g_{kij}$ ) を得た。標本数不足などにより産卵雌の遺伝子型を推定できなかった産卵巣も対象にできるように孵化幼体・死亡卵に出現した対立遺伝子を用いて同様の作業を行い、対立遺伝子をもとにした判別行列  $A$  (要素  $a_{ij} = \prod a_{kij}$ ) を作成した (Fig. 4.4. (2): Allele matching)。ただし、この場合は比較するどちらかのクラッチに母親が持つ対立遺伝子 2 つが含まれていなければならないので、比較する 2 クラッチの解析個体数が両者とも 5 個体以下のときにはこの判別を行わず、そのペアは“排除できない”とした。最後に判別行列  $G$  と  $A$  の結果を要素の掛け合わせにより統合して、最終的な判別行列  $E$  ( $e_{ij} = g_{ij} \times a_{ij}$ ) とした (Fig. 4.4.)。

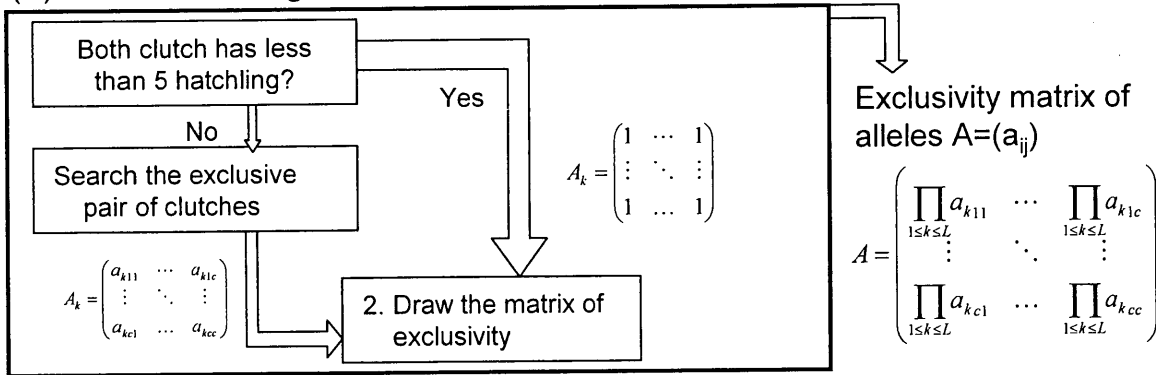
### 母親不明産卵巣の母性解析

まず、母親不明の 28 クラッチ 482 個体の孵化幼体・死亡卵、マイクロサテライト 3 領域の遺伝子型を決定し、本研究で新たに開発した上述の遺伝子型推定法を用いて産卵雌の遺伝子型を推定した。次に産卵雌の遺伝子型を推定できた産卵巣と標識調査により識別された産卵雌 10 個体について遺伝子型と対立遺伝子の双方をもとに産卵雌の異同

### (1) Genotype matching



### (2) Allele matching



### (3) Matrix of maternal exclusivity $E=(e_{ij})$

$$E = \begin{pmatrix} g_{11} \times a_{11} & \cdots & g_{1c} \times a_{1c} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ g_{c1} \times a_{c1} & \cdots & g_{cc} \times a_{cc} \end{pmatrix}$$

$$e_{ij} = \begin{cases} 0 : \text{excluded} \\ 1 : \text{can not exclude} \end{cases}$$

Fig.4.4. Procedure for making the matrix of maternal exclusivity.  $g_{ij}$ : element of exclusivity matrix by genotypes,  $a_{ij}$ : element of exclusivity matrix by alleles



を判別した。遺伝子型を推定できなかった産卵巣は対立遺伝子をもとにした判別のみを含めた。

### 第3節 結果

#### 第1項 マイクロサテライトマーカ－の特性

##### マイクロサテライトのフラグメント解析

南部、蒲生田、宮崎、屋久島、吹上の産卵雌および孵化幼体、死亡卵の計 746 個体をフラグメント解析したところ、6 領域で延べ 118 サンプルが対立遺伝子をホモで持つことがわかった (Table 4.3.)。

##### マイクロサテライトの塩基配列決定

対立遺伝子をホモで持つことがわかった 6 領域延べ 118 サンプルについて塩基配列を決定したところ、得られた泳動波形の質は mtDNA を解析した場合 (第 2 項) に比べて全体的に低く、塩基配列の決定に耐えうるだけ良質な泳動波形が得られたのは 49 サンプルのみであった。Cc7、Cc117、Ei8 では CA の繰り返し数の違いによる変異が確認された (Fig.4.5.1, 2, 6.)。Cc141 では CA の後に GA の繰り返し配列も確認され、CA のみならず GA の繰り返し数にも多型が見られた (Fig.4.5.3.)。Cm72 は GT の繰り返し配列の中に GC の繰り返し配列が 2 箇所にもわたり存在し、繰り返し部位が 5 つの部分によって形成されているという、さらに複雑な様相を呈していた (Fig.4.5.4.)。また、Cm84 は CA の繰り返し部位は規則正しく配列しているものの、繰り返し部以外の部位 (flanking region) で 2 箇所に挿入・欠失が、1 箇所で置換が確認された (Fig.4.5.5. 中の矢印)。

##### 塩基配列とフラグメント解析結果の照合

フラグメント解析によって得られた DNA 断片長が実際の塩基配列長と完全に一致したのは、生データを偶数長に整数化したときの Cc117 のみであった (Table 4.4.)。Cc7 は全てのサンプルで、Cc141 は CCKN-525 を除く全てのサンプルでいずれも生データを奇数長に変換したときにフラグメント解析結果と塩基配列とが 1 対 1 対応となった

Table 4.3. Specimens used for sequencing the microsatellite loci.

loci	Cc7	Cc117	Cc141	Cm72	Cm84	Ei8
	CCKN-089	CCKN-087	CCKN-038	CCKN-070	CCKN-010	CCKN-086
	CCKN-397	CCKN-388	CCKN-389	CCKN-072	CCKN-019	CCKN-088
	CCKN-425	CCKN-521	CCKN-525	CCKN-074	CCKN-086	CCKN-094
	F9901	CCKN-540	CCKN-540	CCKN-091	CCKN-087	CCKN-389
	F9906	CCKN-547	CCKN-540	CCKN-397	CCKN-388	CCKN-425
	m9506	F9903	CCKN-547	CCKN-526	CCKN-425	F9901
	m9513	kg9709	m9409	CCKN-612	CCKN-451	m9426
	m9522	kg9710	m9429	CCKN-616	CCKN-452	m9504
	m9537	kg9714	m9444	CCKN-617	CCKN-521	m9541
	m9541	m9520	m9505	CCKN-621	CCKN-608	m9543
	m9548	m9524	m9514	CCKN-622	CCKN-612	m9544
	my9923	my9901	m9522	CCKN-623	CCKN-617	m9547
	my9927	y9902	y9509	CCKN-624	CCKN-622	m9548
	y9913	y9923	y9904	m9419	m9530	my9914
	y9915		y9928	m9420	m9546	my9927
	y9924		y9946	m9421	my9925	y9505
	y9960		y9952	m9517	y9530	y9905
	y9961		y9957	m9521	y9925	y9909
			y9959	my9926	y9938	y9942
				y9908	y9944	
				y9922	y9954	
				y9938	y9957	
				y9947	y9959	
				y9950	y9960	
n	18	14	19	24	24	19

	10	20	30	40	50	60
CCKN-89	TTCATTGCTT	GACCAATTAG	TGAGTTGTTT	TCAATGANNG	ACCTTCAAAA	CATATTTTAA
CCKN-397	TTCATTGCTT	GACCAATTAG	TGAGTTGTTT	TCNNNNNNAG	CCCTTCAAAA	CATATTTTAA
m9541	TGCATTGCTT	GACCAATTAG	TGAGTTGTTT	TCNNNGAAAG	CCCTTCAAAA	CATATTTTAA
m9548	TGCATTGCTT	GACCAATTAG	TGAGTTGTTT	TCNNAGAAAG	CCCTTCAAAA	CATATTTTAA
y9913	TGCATTGCTT	GACCAATTAG	TGAGTTGTTT	TCNNNNAAAG	CCCTTCAAAA	CATATTTTAA
y9915	TGCATTGCTT	GACCAATTAG	TGAGTTGTTT	TCANNNNNNN	NCCTTCAAAA	CATATTTTAA
y9924	TGCATTGCTT	GACCAATTAG	TGAGTTGTTT	TCNNNNAAAG	CCCTTCAAAA	CATATTTTAA
	primer forward					
	70	80	90	100	110	120
CCKN-89	CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CAGAGCTTTC	TCCATAGGAC	AGCACAGAGC
CCKN-397	CACACACACA	CACACACACA	CACACACA--	--GAGCTTTC	TCCATAGGAC	AGCACAGAGC
m9541	CACACACACA	CACACACACA	CACACACA--	--GAGCTTTC	TCCATAGGAC	AGCACAGAGC
m9548	CACACACACA	CACACACACA	CACACACA--	--GAGCTTTC	TCCATAGGAC	AGCACAGAGC
y9913	CACACACACA	CACACACACA	CACACACA--	--GAGCTTTC	TCCATAGGAC	AGCACAGAGC
y9915	CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CAGAGCTTTC	TCCATAGGAC	AGCACAGAGC
y9924	CACACACACA	CACACACACA	CACACACA--	--GAGCTTTC	TCCATAGGAC	AGCACAGAGC
	CA repeat					
	130	140	150	160	170	180
CCKN-89	TGGANCTGAA	TCTGTGTGCT	AGNNNNNNNN	NNNNCAATCA	CNTGCTCCTC	AACTATACAT
CCKN-397	TGGAGCTGAA	TGTTTGTGCT	AGTCCNNNNN	NNNNNNNNCA	CTTGCTCCTC	AACTATACAT
m9541	TGGAGCTGAA	TGTTTGTGCT	AGTCCATGGA	AAAACAATCA	CTTGCTCCTC	AACTATACAT
m9548	TGGAGCTGAA	TGTTTGTGCT	AGTCCATGGA	AAAACAATCA	CTTGCTCCTC	AACTATACAT
y9913	TGGAGCTGAA	TGTTTGTGCT	AGTCCATGGA	AAAACAATCA	CTTGCTCCTC	AACTATACAT
y9915	TGGAGCTGAA	TGTTTGTGCT	AGTCCATGGA	AAAACAATCA	CTTGCTCCTC	AACTATACAT
y9924	TGGAGCTGAA	TGTNTGTGCT	AGTCCATGGA	AAAACAATCA	CTTGCTCCTC	AACTATAC
	primer reverse					
	182					
CCKN-89	GT					
CCKN-397	GT					
m9541	GT					
m9548	GT					
y9913	GT					
y9915	GT					

Fig.4.5.1. DNA sequences of the microsatellite Cc7 locus

	10	20	30	40	50	60
CCKN-388	TCTTTAACGT	ATCTCCTGTA	TNNNNNTGCA	GCACATGGTA	TTAAAATACT	GCGTGATTTA
CCKN-87	TCTTTAACGT	ATCTCCTGTA	GCTCTTTGCA	GCACATGGTA	TTAAAATACT	GCGTGATTTA
y9902	TCTTTAACGT	ATCTCCTGTA	GCTCTTTGCA	GCACATGGTA	TTAAAATACT	GCGTGATTTA
Cc FitzSimmons	-----			GCACATGGTA	TTAAAATACT	GCGTGATTTA
	primer forward					
	70	80	90	100	110	120
CCKN-388	ATTATTAACC	AATCTAACTT	ATTAACCAAA	TCAGGTTAAT	TTGTTAATAA	CCAATTGCAG
CCKN-87	ATTATTAACC	AATCTAACTT	ATTAACCAAA	TCAGGTTAAT	TTGTTAATAA	CCAATTGCAG
y9902	ATTATTAACC	AATCTAACTT	ATTAACCAAA	TCAGGTTAAT	TTGTTAATAA	CCAATTGCAG
Cc FitzSimmons	ATTATTAACC	AATCTAACTT	ATTAACCAAA	TCAGGTTAAT	TTGTTAATAA	CCAATTGCAG
	130	140	150	160	170	180
CCKN-388	GAGATAAAAT	AATAACTGGT	N-TATTATAT	TATATATTTA	CACACACACA	CACACACACA
CCKN-87	GAGATAAAAT	AATATCTGGT	C-TATTATAT	TATATATTTA	CACACACACA	CACACACACA
y9902	GAGATAAAAT	AATATCTGGT	C-NATTATAT	TATATATTTA	CACACACACA	CACACACACA
Cc FitzSimmons	GAGATAAAAT	AATATCTGGT	CATATTATAT	TACATATTTA	CACACACACA	
	CA repeat					
	190	200	210	220	230	240
CCKN-388	CACA----GA	AAGAGAAAAT	GAGATTTATA	TATAGTAAAT	NNNNNNATGA	ACTGACACTA
CCKN-87	CACA----GA	AAGAGAAAAT	GAGATTTATA	TATAGTAAAT	GAAACAATGA	ACTGACACTA
y9902	CACACACAGA	AAGAGAAAAT	GAGATTTATA	CATAGTAAAT	NNNNCAATGA	ACTGACACTA
				primer reverse		
	243					
CCKN-388	CTG					
CCKN-87	CTG					
y9902	CTG					
Cc117R primer	CTG					

Fig.4.5.2. DNA sequences of the microsatellite Cc117 locus.  
 Cc FitzSimmons: Sequence obtained from loggerhead turtle of Australia  
 (after FitzSimmons et al. 1995)

	10	20	30	40	50	60
CCKN-389	---CAGGCTG	TCAGTTCTCC	ACCTGGCTGA	CGANCACGCC	NNNNNTAGC	TGGGCACATT
CCKN-525	CAGCAGGCTG	TCAGTTCTCC	ACCTGGCTGA	CGATGACGCC	ATCAAATATC	TGGGCACATT
CCKN-547	CAGCAGGCTG	TCAGTTCTCC	ACCTGGCTGA	CGATGACGCC	ATCANNNTC	TGGGCACATT
m9409	CANCAGGCTG	TCAGTTCTCC	ACCTGGCTGA	CGATGACGCC	ATCAAATATC	TGGGCACATT
y9904	-AGCAGGCTG	TCAGTTCTCC	ACCTGGCTGA	TGATGATGCC	NNNNNTAGC	TGGGCACATT
y9946	CANCAGGCTG	TCAGTTCTCC	ACCTGGCTGA	CGATGACGCC	ATCAAATAGC	TGGGCACATT
y9957	CANCAGGNTG	TCAGTTCTCC	ACCTGGCTGA	CGATGACGCC	ATCAAATATC	TGGGCACATA
y9959	CTGCAGGCTG	TCAGTTCTCC	ACCTGGCTGA	CGATGACGCC	CTCAAATATC	TGGGCACATT

primer forward

	70	80	90	100	110	120
CCKN-389	TGCACACACA	CACACACACA	CACACACA--	----GAGAGA	GTGTGGCTGG	AGTTTTTGTA
CCKN-525	TGCACACACA	CACACACACA	CACA-----	----GAGAGA	GTGTGGCTGG	AGTTTTTGTA
CCKN-547	TGCACACACA	CACACACACA	CA-----	----GAGAGA	GTGTGGCTGG	AGTTTTTGTA
m9409	TGCACACACA	CACACACACA	CACACACACA	----GAGA	GTGTGGCTGG	AGTTTTTGTA
y9904	TGCACGCACA	CACACACACA	-----	----GAGAGA	GTGTGGCTGG	AGTTTTTGTA
y9946	TGCACACACA	CACACACACA	CACACACACA	----GAGA	GTGTGGCTGG	AGTTTTTGTA
y9957	TGCACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CACA--GAGA	GTGTGGCTGG	AGTTTTTGTA
y9959	TGCACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CA--GAGA	GTGTGGCTGG	AGTTTTTGTA

CA repeat

GA repeat

	130	140	150	160	170	180
CCKN-389	AGTTCTAAGC	ACCCACAAC	TCAGTGACTT	CAATGGGAGC	TAGNNGATGC	AACCACTTTT
CCKN-525	AGTTCTAAGC	ACCCACAAC	TCAGTGACTT	CAATNNNNNN	NNGATGATGC	AACCACTTTT
CCKN-547	AGTTCTAAGC	ACCCACAAC	TCAGTGACTT	CAATNNNNNN	NNNNGATGC	AACCACTTTT
m9409	AGTTCTAAGC	ACCCACAAC	TCAGTGACTT	CAATNNGAGC	TAGGGGATGC	AACCACTTTT
y9904	AGTTCTAAGC	ACCCACAAC	TCAGTGACTT	CAATGGGAGN	NAGGGGATGC	AACCACTTTT
y9946	AGTTCTAAGC	ACCCACAAC	TCAGTGACTT	CAATGGGAGC	TAGTGGATGC	AACCACTTTT
y9957	AGTTCTAAGC	ACCCACAAC	TCAGTGACTT	CAATGGGAGC	TAGTGGATGC	AACCACTTTT
y9959	AGTTCTAAGC	ACCCACAAC	TCAGTGACTT	CAANNNAGC	TAGTGANTGC	AACCACTTTT

	190	200	204
CCKN-389	GAAAGTCAGG	CCAGACGTA	
CCKN-525	GAAAGTCAGG		
CCKN-547	GAAAGTCAGG	CCAGAC	
m9409	GAAAGTCAGG	CCAGACGTAC	TAA
y9904	GAAAGTCAGG	CCAGACGTAC	TAA
y9946	GAAAGTCAGG	CCAGACGTAN	NAA
y9957	GAAAGTCAGG	CCANACNTAN	
y9959	GAAAGTCAGG	CCA	

primer reverse

Fig.4.5.3. DNA sequences of the microsatellite Cc141 locus.

	10	20	30	40	50	60	70
Cc FitzSimmons	-----	-----	-----	ACGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
Cm FitzSimmons	-----	-----	-----	ATGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCG	AAGGAATACC
CCKN-526	CTATAAGGAG	AAAGCGTTAA	GACAAAGTAT	ACGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
CCKN-612	CTATAAGGAG	AAAGCGTTAA	GACAAAGTAT	AGGAGAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
CCKN-616	CTATAAGGAG	AAAGCGTTAA	GACAAAGTAT	ANGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
CCKN-621	CTATAAGGAG	AAAGCGTTAA	GACAAAGTAT	ACGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
CCKN-622	CTATAAGGAG	AAAGCGTTAA	GACAAAGTAT	ACGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
CCKN-623	CTATAAGGAG	AAAGCGTTAA	GACAAAGTAT	ACGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
CCKN-624	CTATAAGGAG	AAAGCGTTAA	GACAAAGTAT	ACGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
m9419	-----	-----	-----	-----	ATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
m9421	CTATAAGGAN	NNAGCGTTAN	GACAAAGTAT	ANGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
m9426	-----	-----	-----	-----	AAATA	AA-GAAG-C	ATTNN-GCN
y9908	CTATAAGGAG	AAAGCGTTAA	GACAAAGTAT	ACGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
y9922	CTATAAGGAG	AAAGCGTTAA	NNNAAAGTAT	ACGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
y9938	CTATAAGGAG	AAAGCGTTAA	GNNNAAGTAT	ACGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
y9947	CTATAAGGAG	AAAGCGTTAA	GACAAAGTAT	ACGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
y9950	CTNTAAGGAG	AAAGCGTTAA	GACAAAGTAT	ACGAAAAATA	AATGAATGTC	ATTTAGGGCA	AAGGAATACC
	primer forward						
	80	90	100	110	120	130	140
Cc FitzSimmons	AACAGTTTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	-GTGTGT---	-GCGCGCGCG	CGTNTATATA	CATGT-----
Cm FitzSimmons	AACAGTTT-G	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG
CCKN-526	AACAGTTTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	CGTGTGTGT-	-GCGCGCGCG	CGTGTGTATA	CATGT-----
CCKN-612	AACAGTTTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	NGTGTGTGT-	-GCGCGCGCG	CGTGTGTATA	CATGT-----
CCKN-616	AACAGTTTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	CGTGTGTGT-	-GCGCGCGCG	CGTGTGTATA	CATGT-----
CCKN-621	AACAGTTTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	CGTGTGTGT-	-GCGCGCGCG	CGTGTGTATA	CATGT-----
CCKN-622	AACAGTTTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	CGTGTGTGT-	-GCGCGCGCG	CGTGTGTATA	CATGT-----
CCKN-623	AACAGTTTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	CGTGTGTGT-	-GCGCGCGCG	CGTGTGTATA	CATGT-----
CCKN-624	AACAGTTTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	CGTGTGTNN-	-NCGCGCGCG	CGTGTGTATA	CATGT-----
m9419	AACAGTTTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	-----	-----	-----	-----
m9421	AACAGTTTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	CGTGTGTGT-	-GCGCGCGCG	CGTGTGTATA	CATGT-----
m9426	AACAGTTTNN	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	-GTGTGTGT-	-----	-GTGTGTATA	CATGT-----
y9908	ACCACITTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	-GTGTGT---	-----	-GTGTGTATA	CATGT-----
y9922	AACAGTTTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	-NNGTGTGT-	T-----	-GTGTGTATA	CATGT-----
y9938	AACAGTTTAG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	-GTGTGTGT-	T-----	-GTGTGTATA	CATGT-----
y9947	ANCACITTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	-GTGTGT---	-----	-GTGTGTATA	CATGT-----
y9950	AACACITTTAG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	-GTGTGT---	-----	-GTGTGTATA	CATGT-----
	GT repeat		GT repeat		GC repeat		
	150	160	170	180	190	200	210
Cc FitzSimmons	-----	-NNHACTATA	SACACAAATT	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACA	-----
Cm FitzSimmons	TGTGTGTGTG	TGGTACTATA	GACACAAATT	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACA	-----
CCKN-526	-----	-GGTACTATA	GACNNNNNTT	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGTTGCAA
CCKN-612	-----	-GGTACTANN	NNNNNNNNNN	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGTTGCAA
CCKN-616	-----	-GGTACTATA	GACNNNNNTT	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGTTGCAA
CCKN-621	-----	-GGTACTATA	GACNNNNNTT	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGTTGCAA
CCKN-622	-----	-GGTACTATA	GACNNNNNTT	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGTTGCAA
CCKN-623	-----	-GGTACTATA	GACACAAATT	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGTTGCAA
CCKN-624	-----	-GGTACTATA	GACNNNNNTT	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGTTGCAA
m9421	-----	-GGTACTANN	NNNNNNNNNT	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGTTGCAA
m9426	-----	-GGTACTATA	GACACAAATN	NCATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGNTGCAA
y9908	-----	-GGTACTATA	GACACAAATT	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGTTGCAA
y9922	-----	-GGTANNNNN	NNNNNNNNNN	NCATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGTTGCAA
y9938	-----	-GGTACTATA	GACACACATT	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGTTGCAA
y9947	-----	-GGTACTATA	GACACAAATT	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGTTGCAA
y9950	-----	-GGTACTATA	GACACAAATT	ACATATAGAA	ACTATATTAA	AAAGAACATT	AAGGTTGCAA
	220	230	240	250	260		
CCKN-526	AGNNAAGTAC	TCCAAGTTAA	GTNNNNNNNN	NNNNNTGGC	TGTGTAATCC	TAATTTGG	
CCKN-612	AGTCAAGTAC	TCCAAGTTAA	GTNNNNNNNN	TGAGGTTGGC	TGTGTAATCC	TAATTTGG	
CCKN-616	AGTCAAGTAC	TCCAAGTTAA	GTNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	TGTGTAATCA	TAATTTGG	
CCKN-621	AGTCAAGTAC	TCCAAGTTAA	GTGCNNNNAT	TAAGGTTGGC	TGTGTAATCC	TAATTTGG	
CCKN-622	AGTCAAGTAC	TCCAAGTTAA	GTGCNNNNNN	NNNNNTGTC	TGTGTAATCC	TAATTTGG	
CCKN-623	AGTCAAGTAC	TCCAAGTTAA	GTGCNNNCAT	TAAGGTTGGC	TGTGTAATCC	TAATTTGG	
m9421	AGTCAAGTAC	TCCAAGTTAA	GTGCNNNNNT	T--GTTGGC	TGTNTNNCC	TAATTTGG	
m9426	AGTCAAGTAC	TCCAAGTTAA	GTGNNAGNAT	TAA--NNNNN	NNNNNNNCC	TAATTTGG	
y9908	AGTCAAGTAC	TCCAAGTTAA	GTGCCAGCAT	TAAGNNNNN	NGTGAATCC	TAATTTGG	
y9922	AGTCAAGTAC	TCCAAGTTAA	GTGCCAGCAT	T---NNNNN	TGTGTAATCC	TAATTTGG	
y9938	AGTCAAGTAC	TCCAAGTTAA	GNGCCAGCAT	TA--NNNNN	TGTGTAANCC	TAATTTGG	
y9947	AGTCAAGTA						
y9950	AGTCAAGTAC	TCCAAGTTAA	GTGCCAGCAT	TAAGGTTNNN	NNNNTAATCC	TAATTTGG	
	primer reverse						

Fig.4.5.4. DNA sequences of the microsatellite Cm72 locus. Cc FitzSimmons: Sequence obtained from loggerhead turtle of Australia, Cm FitzSimmons: Sequence obtained from green turtle of Australia (after FitzSimmons et al. 1995)

	10	20	30	40	50	60	70
CCKN-86	TGTTTTGACA	TTAGTCCAGG	ATTGAACACA	GCAAGTTTCA	CAACAGTGTA	ATTTTGAACC	TTACTATACA
CCKN-87	TGTTTTGACA	TTAGTCCAGG	ATTGAACACA	GCAAGTTTCA	CAACAGTGTA	ATTTTGAACC	TTACTATACA
CCKN-388	TGTTTTGACA	TTAGTCCAGG	ATTGAACACA	GCAAGTTTCA	CAACAGTGTA	ATTTTGAACC	TTACTATACA
CCKN-451	TGTTTTGACA	TTAGTCCAGG	ATTGAACACA	GCAAGTTTCA	CAACAGTGTA	ATTTTGAACC	TTACTATACA
CCKN-452	TGTTTTGACA	TTAGTCCAGG	ATTGAACACA	GCAAGTTTCA	CAACAGTGTA	ATTTTGAACC	TTACTATACA
CCKN-612	TGTTTTGACA	TTAGTCCAGG	ATTGAACACA	GCAAGTTTCA	CAACAGTGTA	ATTTTGAACC	TTACTATACA
m9530	TGTTTTGACA	TTAGTCCAGG	ATTGAACACA	GCAAGTTTCA	CAACAGTGTA	ATTTTGAACC	TTACTATACA
my9925	TGTTTTGACA	TTAGTCCAGG	ATTGAACACA	GCAAGTTTCA	CAACAGTGTA	ATTTTGAACC	TTACTATACA
y9925							---CTATACA
y9938	TGTTTTNNCN	TNNNNCCNGG	ATNGANNNNA	NNAAGTTTCN	NACCNGGGNA	ATTTNGANCC	TNACTATACA
y9944	TGTTTTGACA	TTAGTCCAGG	ATTGAACACA	GCAAGTTTCA	CAACAGTGTA	ATTTTGAACC	TTACTATACA
y9954	TGTTTTGACA	TTAGTCCAGG	ATNNANNNNA	GCAAGTTTCN	NANNNNNNNA	ATTTTGAACC	TTACTATACA

primer forward

	80	90	100	110	120	130	140
CCKN-86	AATATGGTGC	ATAAAGAGCT	CTTCTAGCAA	TATGAAGGTT	TGGGGGGGTT	TTTTGCTTTT	ATTAATCCTT
CCKN-87	AATATGGTGC	ATAAAGAGCT	CTTCTAGCAA	TATGAAGGTT	TGGGGGGGTT	TTTTGCTTTT	ATTAATCCTT
CCKN-388	AATATGGTGC	ATAAAGAGCT	CTTCTAGCAA	TATGAAGGTT	TGGGGGGGTT	TTTTGCTTTT	ATTAATCCTT
CCKN-451	AATATGGTGC	ATAAAGAGCT	CTTCTAGCAA	TATGAAGGTT	TGGGGGGGTT	TTTTGCTTTT	ATTAATCCTT
CCKN-452	AATATGGTGC	ATAAAGAGCT	CTTCTAGCAA	TATGAAGGTT	TGGGGGGGTT	TTTTGCTTTT	ATTAATCCTT
CCKN-612	AATATGGTGC	ATAAAGAGCT	CTTCTAGCAA	TATGAAGGTT	TGGGGGGGTT	TTTTGCTTTT	ATTAATCCTT
m9530	AATATGGTGC	ATAAAGAGCT	CTTCTAGCAA	TATGAAGGTT	TGGGGGGGTT	TTTTGCTTTT	ATTAATCCTT
my9925	AATATGGTGC	ATAAAGAGCT	CTTCTAGCAA	TATGAAGGTT	TGGGGGGGTT	TTTTGCTTTT	ATTAATCCTT
y9925	AATATGNNNN	ATAAAGAGCT	CTTCTAGCNN	NNNNNNNNNN	NNNGGGGTTT	TTT-GCTTTT	ATTAATCCTT
y9938	AATATGGTGC	ATAAAGAGCT	CTTCTAGCAA	NNNNNANGNTT	NGGGGGGTTT	TTTTGCTTTT	ATTAATCCTT
y9944	AATATGGTGC	ATAAAGAGCT	CTTCTAGCAA	TATGAAGGTT	TGGGGGGGTT	TTTTGCTTTT	ATTAATCCTT
y9954	AATATGGTGC	ATAAAGAGCT	CTTCTAGCAA	TATGAAGGTT	TGGGGGGGTT	TTTTGCTTTT	ATTAATCCTT

	150	160	170	180	190	200	210
CCKN-86	CCAGTCTCC	CACCTTCAAAC	AGGTCATAAT	TTAAAAAA-T	TGACACCCCC	CCCCTTTTTT	TTT-AAAAAC
CCKN-87	CCAGTCTCC	CACCTTCAAAC	AGGTCATAAT	TTAAAAAA-T	TGACACCCCC	CCCCTTTTTT	TTT-AAAAAC
CCKN-388	CCAGTCTCC	CACCTTCAAAC	AGGTCATAAT	TTAAAAAAAT	TGACACCCCC	CCCCTTTTTT	TTT-AAAAAC
CCKN-451	CCAGTCTCC	CACCTTCAAAC	AGGTCATAAT	TTAAAAAA-T	TGACACCCCC	CCCCTTTTTT	TTT-AAAAAC
CCKN-452	CCAGTCTCC	CACCTTCAAAC	AGGTCATAAT	TTAAAAAA-T	TGACACCCCC	CCCCTTTTTT	TTT-AAAAAC
CCKN-612	CCAGTCTCC	CACCTTCAAAC	AGGTCATAAT	TTAAAAAAAT	TGACACCCCC	CCCCTTTTTT	TTT-AAAAAC
m9530	CCAGTCTCC	CACCTTCAAAC	AGGTCATAAT	TTAAAAAAAT	TGACACCCCC	CCCCTTTTTT	TTT-AAAAAC
my9925	CCAGTCTCC	CACCTTCAAAC	AGGTCATAAT	TTAAAAAA-T	TGACACCCCC	CCCCTTTTTT	TTT-AAAAAC
y9925	CCAGTCTCC	CACCTTCAAAC	ACGTCATAAT	TTAAAAAAAT	TGACACCCCC	CCCCTTTTTT	TTT-AAAAAC
y9938	CCAGTCTCC	CACCTTCAAAC	AGGTCATAAT	TTAAAAAA-T	TGACACCCCC	CCCCTTTTTT	TTT-AAAAAC
y9944	CCAGTCTCC	CACCTTCAAAC	AGGTCATAAT	TTAAAAAA-T	TGACACCCCC	CCCCTTTTTT	TTT-AAAAAC
y9954	CCAGTCTCC	CACCTTCAAAC	AGGTCATAAT	TTAAAAAA-T	TGACACCCCC	CCCCTTTTTT	TTT-AAAAAC

↑ ↑ ↑

	220	230	240	250	260	270	280
CCKN-86	TAAACCAAA	ATTTCTTGGT	ACAATTTTAC	ACACACACAC	A-----	-----GTT	TAGTGCTCAT
CCKN-87	TAAACCAAA	ATTTCTTGGT	ACAATTTTAC	ACACACACAC	A-----	-----GTT	TAGTGCTCAT
CCKN-388	TAAACCAAA	ATTTCTTGGT	ACAATTTTAC	ACACACACAC	ACA-----	-----GTT	TAGTGCTCAT
CCKN-451	TAAACCAAA	ATTTCTTGGT	ACAATTTTAC	ACACACACAC	ACA-----	-----GTT	TAGTGCTCAT
CCKN-452	TAAACCAAA	ATTTCTTGGT	ACAATTTTAC	ACACACACAC	ACA-----	-----GTT	TAGTGCTCAT
CCKN-612	TAAACCAAT	ATTTCTTGGT	ACAATTTTAC	ACACACACAC	ACA-----	-----GTT	TAGTGCTCAT
m9530	TAAACCAAA	ATTTCTTGGT	ACAATTTTAC	ACACACACAC	ACA-----	-----GTT	TAGTGCTCAT
my9925	TAAACCAAA	ATTTCTTGGT	ACAATTTTAC	ACACACACAC	ACA-----	-----GTT	TAGTGCTCAT
y9925	TAAACCAAA	ANTTCTTGGT	ACAATTTTAC	ACACACACAC	ACACACGCAC	ACACACAGT	TAGTGCTCAT
y9938	TAAACCAAA	ATTTCTTGGT	ACAATTTTAC	ACACACACAC	ACA-----	-----GTT	TAGNNNNNNN
y9944	TAAACCAAA	ATTTCTTGGT	ACAATTTTAC	ACACACACAC	ACA-----	-----GTT	TAGTGCTCAT
y9954	TAAACCAAA	ATTTCTTGGT	ACAATTTTAC	ACACACACAC	ACA-----	-----GTT	TAAGGGCCAT

CA repeat

	290	300	310	320	330
CCKN-86	GGTGCCCATG	AAAAGCTTCC	TCATAGTCCT	GAACAATAGG	CTATAACAAT
CCKN-87	GGTGCCCATG	AAAAGCTTCC	TCATAGTCCT	GAACAATAGG	CTATAACAAT
CCKN-388	GGTGCCCATG	AAAAGCTTCC	TCATAGTCCT	GAACAATAGG	CTATAACAAT
CCKN-451	GGTGCCCATG	AAAAGCTTCC	TCATAGTNCT	GAACAATAGG	CTATAACAAT
CCKN-452	GGTGCCCATG	AAAAGCTTCC	TCATAGTCCT	GAACAATAGG	CTATAACAAN
CCKN-612	GGTGCCCATG	AAAAGCTTCC	TCATAGTCCT	GAACAATAGG	CTATAACAAT
m9530	GGTGCCCATG	AAAAGCTTCC	TCATAGTCCT	GAACAATAGG	CTATAACAAT
my9925	GGTGCCCATG	AAAAGCTTCC	TCATAGTCCT	GAACAATAGG	CTATAACAAT
y9925	GGTGCCCATG	AAAAGCTTCC	TCATAGTCCT	GAACAATAGG	ATATAACAAT
y9938	GGGGCCCATG	AAAAACTTNC	NNNNNNNCCT	GAA	
y9944	GGTGCCCATG	AAAAGCTTCC	TCATAGNCCT	AAACAATAGG	CTATAAAAAAT
y9954	GGGGCCCATG	AAAAACTTCC	NCATANTCCT		

primer reverse

Fig.4.5.5. DNA sequences of the microsatellite Cm84 locus.

	10	20	30	40	50	60
CCKN-86	ATATGATTAG	GCAAGGCTCT	CAACNNNNNN	NNNNNCCCTA	TTAAAGTACG	GTTCTCACGT
CCKN-88	ATATGATTAG	GCAAGGCTCT	CAACTCATT	ANNNNCCCTA	TTAAAGTACG	GTTCTCACGT
CCKN-94	ATATNNNTAG	GCAAGGNTCT	CAACTCANTT	AAACACCCTN	TTAAAGTACG	GNNNNNACGT
CCKN-389	ATATGATTAG	GCAAGGCTCT	CAACTCATT	NNNNNCCCTA	TTAAAGTACG	GTTCTCACGT
m9426	ATATGTGTAG	GCAAGGNTCT	CAANTCANTT	AAACACCCTA	TTAAAGTACG	GNNCTCACGT
m9548	ATATGATTAG	GCAAGGCTCT	CAACTCATT	AANNNNNNTA	TTAAAGTACG	GTTCTCACGT
Ei FitzSimmons	-----	-----	-----	AAACACCCTA	TTAAAGTACG	GTTCTCACGT
Cc FitzSimmons	-----	-----	-----	AAACACCCTA	TTAAAGTACG	GTTCTCACGT

primer forward

	70	80	90	100	110	120
CCKN-86	TGCTAGCTAT	GGAAAAAAGC	TTGTAAATGT	GTGTCACACA	CACACACACA	CACA-----
CCKN-88	TGCTAGCTAT	GGAAAAAAGC	TTGTAAATGT	GTGTCACACA	CACACACACA	CACA-----
CCKN-94	TGCTAGCTAT	GGAAAAAAGC	TTGTAAATGT	GTGTCACACA	CACACACACA	CACACACACA
CCKN-389	TGCTAGCTAT	GGAAAAAAGC	TTGTAAATGT	GTGTCACACA	CACACACACA	CACA-----
m9426	TGCTAGCTAT	GGAAAAAAGC	TTGTAAATGT	GTGTCACACA	CACACACACA	CACACACACA
m9548	TGCTAGCTAT	GGNNNNNNNN	TNGTAAATGT	GTGTCACACA	CACACACACA	CACACA-----
Ei FitzSimmons	TGCTAGCTAT	GGAAAAAAGC	TTGTAAATGT	GTCTCTCTCT	CTCACTCACA	CTCACACTCA
Cc FitzSimmons	TGCTAGCTAT	GGAAAAAAGC	TTGTAAATGT	GTGTC-----	-----ACA	C--ACACA-A

CA repeat

	130	140	150	160	170	180
CCKN-86	-----	-----	----CTGAAA	AAAGAACCTA	ATAGTTGTTA	CTNNNNNNNN
CCKN-88	-----	-----	----CTGAAA	AAAGAACCTA	ATAGTTGTTA	CTTANNNNTT
CCKN-94	CACACACACA	CACACACACA	CA--CTGAAA	AAAGAACAAA	ATAGGTGTTA	CTTNNNNNTT
CCKN-389	-----	-----	----CTGAAA	AAAGAACCTA	ATAGTTGTTA	CTTCAAAAANN
m9426	CACACACACA	CACACACACA	----CTGAAA	AAAGANNNNN	NNNGGTGTTA	CTTCAANNTT
m9548	-----	-----	----CTGAAA	AAAGAACCTA	ATAGTTGTTA	CNNNNNNNNN
Ei FitzSimmons	CACTCACACA	CACACACACA	CACACACACA	CACGAACCTA		
Cc FitzSimmons	CAT-CACACT	CACACTCACA	CTC----ACA	-CCTACACAC		

CA repeat

	190	200	
CCKN-86	TCATGATTC	TAAGCCAATC	TCAAGATT
CCKN-88	TCATGATTC	TAAGCCAATC	TCAAGATT
CCKN-94	TNNTGATTC	TAAGCCNNTC	T
CCKN-389	TCATGATTC	TAAGCCAATC	TCAAGATT
m9426	TCGTGATTC	TAANCC	
m9548	NNNGATTC	TAAGCNAATC	TCAAGATT
Ei8R	----GATTC	TAAGCCAATC	TCAAGATT

primer reverse

Fig.4.5.6. DNA sequences of the microsatellite Ei8 locus. Ei FitzSimmons: Sequence obtained from hawksbill turtle of Australia, Cc FitzSimmons: Sequence obtained from loggerhead turtle of Australia (after FitzSimmons et al. 1995)



Table 4.4. Differences in estimated allele size between sequencing and fragment analysis (Cc7, Cc117, Cc141, Cm72)

Locus	Sample ID	Allele length(bp)				Motif	Repeat			Deletion/ Insertion
		Sequence		Fragment analysis			n	m	l	
		Raw data	Odd	Difference	Even					
Cc7	CCKN-89	182	183	-1	184	-2	16			
	y9915	182	183	-1	184	-2	16			
	CCKN-397	178	179	-1	180	-2	14			
	y9913	178	179	-1	180	-2	14			
	y9924	178	179	-1	180	-2	14			
	m9541	178	179	-1	178	0	14			
	m9548	178	179	-1	178	0	14			
	CCKN-388	238	239	-1	238	0	12			
	CCKN-87	238	237	1	238	0	12			
Cc117	y9902	242	241	1	242	0	14			
	y9957	202	201	1	200	2	16		2	
	y9959	200	199	1	198	2	15		2	
	CCKN-525	192	193	-1	192	0	14		3	
	m9409	198	197	1	198	0	14		2	
	y9946	198	197	1	196	2	14		2	
	CCKN-389	198	197	1	196	2	13		3	
	CCKN-547	192	193	-1	192	0	10		3	
	y9904	190	189	1	190	0	9		3	
Cm72	CCKN-616	250	249	1	248	2	1		4	5
	CCKN-622	250	249	1	248	2	1		4	5
	CCKN-624	250	249	1	248	2	1		4	5
	CCKN-526	250	249	1	248	2	1		4	5
	CCKN-612	250	247	3	248	2	1		4	5
	CCKN-621	250	247	3	248	2	1		4	5
	CCKN-623	250	247	3	248	2	1		4	5
	m9421	250	237	13	236	14	1		4	5
	y9922	240	239	1	238	2	0		5	0
	y9938	240	239	1	238	2	0		5	0
	m9426	238	237	1	236	2	0		4	0
	y9908	236	235	1	234	2	0		3	0
	y9947	236	235	1	234	2	0		3	0
	y9950	236	235	1	234	2	0		3	0

Table 4.4 (continued). Differences in estimated allele size between sequencing and fragment analysis (Cm84, Ei8)

Locus	Sample ID	Sequence		Allele length(bp)		Fragment analysis		Motif	Repeat	n	m	l	Deletion/ Insertion	
		Raw data	Even	Difference	Odd	Even	Difference							
Cm84	y9925	329	328.16	0	329	328	1	(CA) <sub>n</sub>	14			179/194/204	A / C / -	
	CCKN-388	325	325.12	0	325	326	-1		12				A / C / -	
	CCKN-612	325	324.66	0	325	324	1		12				A / C / -	
	m9530	325	323.55	2	323	324	1		12				A / C / -	
	CCKN-451	315	314.92	0	315	314	1		7				- / T / T	
	CCKN-452	315	314.75	0	315	314	1		7				- / T / T	
	my9925	315	315.21	0	315	316	-1		7				- / T / T	
	y9944	315	315.17	0	315	316	-1		7				- / T / T	
	y9938	314	313.85	1	313	314	0		7				- / T / -	
	y9954	314	314.42	-1	315	314	0		7				- / T / -	
	CCKN-86	312	312.37	-1	313	312	0		6				- / C / -	
	CCKN-87	312	312.16	-1	313	312	0		6				- / C / -	
	Ei8	CCKN-94	206	202.62	3	203	202	4	(CA) <sub>n</sub>	24				
		m9426	204	200.78	3	201	200	4		23				
m9548		180	178.13	1	179	178	2		11					
CCKN-86		178	176.17	1	177	176	2		10					
CCKN-389		178	176.07	1	177	176	2		10					

ものの、サイズは 1bp ズレていた。Cm72 は極端にサイズの異なる m9421 を除けば、偶数長としたときに 1 対 1 で対応していたが、フラグメント解析結果は実際の長さよりも 2bp 短くなっていた。Cm84 は塩基配列に見られた欠失の有無を反映させて、315bp と 321bp 以上のフラグメントを奇数長、314bp 以下を偶数長とすれば 1 サンプル (m9530) を除く全てで塩基配列長とフラグメントとが一致する。Ei8 は奇数長と偶数長のどちらでも 1 対 1 の対応が得られるものの、例えば奇数長の場合 180bp 以下では塩基配列とフラグメント解析の差が 1bp であるのに対して、204bp 以上では差が 3bp と対立遺伝子のサイズによってズレの程度が異なっていた (Table 4.4.)。

なお、Cc141 で m9409 と y9946、CCKN-389 はともに塩基配列長が 198bp であったが、繰り返し配列の内容は m9409 と y9946 は CA が 14 回と GA が 2 回で構成されているのに対して、CCKN-389 は CA が 13 回と GA が 3 回で構成されており、異なる対立遺伝子どうしでありながらサイズの等しいサイズホモプラシー (size homoplasy) であった。

## **再現性の確認**

### **機器のバージョン間の差異**

ABI3130xl と ABI3100 による解析結果を比較したところ、いずれの領域についても新バージョン (ABI3130xl) の方が一律に大きな増幅断片サイズを示し、実際の塩基配列長により近い値であった。サイズのずれの平均は Cm72 で最小の 0.79bp、Ei8 で最大の 2.08bp を示し、解析領域によりズレかたが異なっていた。そのため、バージョン間の結果の補正には領域ごとに異なる補正值を用いて新バージョンの結果にあわせることにした (Table 4.5.)。

### **解析結果の再現性**

ABI PRISM™3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で 2 回フラグメント解析をおこない、2 回とも DNA 断片が増幅されたのは 62 個体中 38・44 個体であった。1 回目に DNA 断片が増幅されたもののうち、2 回目には増幅されなかったのは各領域につき 3・8 個体 (6.8・18.6%) であった。2 回とも増幅された個体のうち、解析間で結果が異なったのは 1・5 個体 (2.4・13.2%) であった。結果が異なる原因のうち、最も多かったのが一様に対立遺伝子のサイズがズレる現象 (size sift) であった (Table 4.6.)。

Table 4.5. Size correction values of 6 loci.

Locus	N	Size Difference(bp) (ABI3130xl-ABI3100)	
		Mean	S.D.
Cc7	58	1.14	0.16
Cc117	72	1.66	0.26
Cc141	76	0.90	0.23
Cm72	76	0.79	0.44
Cm84	52	1.36	0.41
Ei8	65	2.08	0.14

Table 4.6. Summary of genotyping errors on 6 microsatellite loci

Locus	N	Not amplified*	%	Error				
				Size Shift	Dropout	False Alleles	Total	%
Cc7	43	8	18.6	0	0	0	0	0.0
Cc117	41	7	17.1	1	0	0	1	2.4
Cc141	43	4	9.3	3	1	0	4	9.3
Cm72	42	4	9.5	2	2	1	5	11.9
Cm84	38	5	13.2	4	1	0	5	13.2
Ei8	44	3	6.8	1	1	2	4	9.1

\*DNA fragments were amplified on only one trial.

## 第2項 母性解析

### mtDNA 調節領域の塩基配列

解析した 38 個体中 37 個体が全く同じ塩基配列を示し、これは Bowen et al. (1995) が日本のアカウミガメの mtDNA を解析して得られた 2 タイプの遺伝子型 (ハプロタイプ haplotype) の B に相当するものだった。また、残りの 1 個体 (クラッチ 0403, CCKN-448) は同じく Bowen et al. (1995) の C に相当するものだった (Fig. 4.6., Table 4.7.)。

### 産卵雌の遺伝子型

Cm84 と Cc141 では全ての個体で遺伝子型が異なっていた。Cc117 のみで遺伝子型の重複する産卵雌が存在し、238/248、238/238 の遺伝子型をもつ個体がそれぞれ 2 個体ずつであった (Table 4.8.)。

### 産卵雌の遺伝子型推定

#### 既存の手法による推定

産卵巣 7 クラッチ 21 領域 (7 クラッチ×3 領域) 中、遺伝子型を推定することができたのは 14 領域であった。各産卵巣に対応する産卵雌 7 個体についてもマイクロサテライト 3 領域の遺伝子型を決定し、孵化幼体・死亡卵から推定された遺伝子型と比較すると、推定された 14 領域の内、実際の産卵雌の遺伝子型が候補の中に含まれていたのはわずかに 8 領域のみであった (Table 4.9.)。

#### 新たに考案した手法による推定

この新たに開発した手法では 7 クラッチ 21 領域中の 16 領域で遺伝子型が推定され、16 領域全てが候補の中に正しい産卵雌の遺伝子型を含んでいた (Table 4.10.)。

### 母親不明産卵巣の母性解析

#### 産卵雌の遺伝子型推定

解析した母親不明の産卵巣 28 クラッチのうち孵化幼体 5 個体以上を解析したのべ 18 クラッチ 51 領域全てで遺伝子型が推定できた (Table 4.11.)。

#### 産卵雌の判別

比較する産卵巣どうしのデータの揃い具合によって十分に他の産卵巣を排除しきれない産卵巣が 11 クラッチ存在した。これらを除外すると、17 クラッチと 10 産卵個体

B type ACTAAAATA AAATATTCTA GTAGCTTAAC CCCAAAGCAT TGGTCTTGTA AACCAAAGAT 60  
 C type ..... 60

B type TGAAAACCTAC AACTTTCCTA GAATAATCAA AAGAGAAGGG TTCAAACCTT CATCTCCGGT 120  
 C type ..... 120  
 tRNA-Thr ← | ..... | → tRNA-Pro

B type CCCAAAACC GGAATCTTCC AATTAATACTA CCCTTTGACG CAAAAGAAGC GCCAACATGT 180  
 C type ..... 180  
 | ..... | → Control Region

B type AAATTTACCT ATATTCTCTG CCGTGCCCAA CAGAATAATA TCCATAATAC CTATCTATGT 240  
 C type ..... 240

B type ATTATTGTAC ATCAACTTAT TTACCACTAG CATATGATCA GTAATGTTGT CGATTAATTT 300  
 C type ..... G. .... 300  
 | ..... | → Bowen et al. (1995)

B type GGCTTTAAAC ATAAAAATTA TTAATTTTAC ATAAACTGTT TTAGCTACAT GACTATTATA 360  
 C type .A. .... 360  
 ▲

B type CAGGTAATAA TAATGAAATG ATATAGGACA TAAATTTAAA CCATTATTCT CAACCATGAA 420  
 C type ..... G. .... 420  
 ▲

B type TATCGTCACA GTAATAGGTT ATTTCTTAGT TCAGCTCATC ACGAGAAATA AGCAACCCTT 480  
 C type ..... A. .... 480  
 ▲

B type GTTAGTAAGA TACAACATTA CCAGTTTCAG GCCCATTAAG TCATATCGTA CATAACTGAT 540  
 C type ..... A. .... 540  
 ▲

B type CTATTCTGGC CTCTGGTTGT TTTTTCAGGC ACATTAAGGT AGTAAAGTTC ATTCGTTTCCT 600  
 C type ..... C. .... 600  
 ▲

B type CTTTAAAAGG CCTCTGGTTA AATGAGTTCT ATACATTTAA TTTATAACCT 650  
 C type ..... T. .... 650  
 | ..... | ← Bowen et al. (1995)

Fig.4.6. Two mtDNA haplotypes and its sequences of loggerhead turtles nested on the Kamoda beach. ▲ represent the polymorphic site have recognized by Bowen et al. (1995)

Table 4.7. mtDNA haplotype of mothers and hatchlings.

	ID	Tag Number	Sample ID	Haplotype
Mothers	A	29701	CCKN-001	B
	B	29702	CCKN-126	B
	C	29703	CCKN-388	B
	D	29704	CCKN-389	B
	E	29705	CCKN-390	B
	F	29706	CCKN-129	B
	G	29707	CCKN-391	B
	H	29708	CCKN-392	B
	I	29713	CCKN-127	B
	J	29715	CCKN-128	B
Hatchlings & Dead eggs	0201		CCKN-002	B
	0203		CCKN-044	B
	0208		CCKN-068	B
	0210		CCKN-071	B
	0215		CCKN-069	B
	0221		CCKN-086	B
	0221		CCKN-089	B
	0222		CCKN-095	B
	0223		CCKN-122	B
	0223		CCKN-123	B
	0302		CCKN-133	B
	0303		CCKN-130	B
	0303		CCKN-132	B
	0305		CCKN-134	B
	0305		CCKN-136	B
	0306		CCKN-168	B
	0307		CCKN-155	B
	0310		CCKN-170	B
	0310		CCKN-172	B
	0311		CCKN-242	B
	0403		CCKN-448	C
	0404		CCKN-505	B
0404		CCKN-507	B	
0405		CCKN-396	B	
0406		CCKN-422	B	
0422		CCKN-630	B	



Table 4.8. Genotype of the mothers directly identified by night patrol at Kamoda beach on 2002-2004.

Mother ID	Tag number	Sample ID	Genotypes		
			Cm84	Cc117	Cc141
A	JPN29701	CCKN-001	316/325	236/238	193/205
B	JPN29702	CCKN-126	315/327	238/248	199/201
C	JPN29703	CCKN-388	325/325	238/238	193/201
D	JPN29704	CCKN-389	312/314	238/248	197/197
E	JPN29705	CCKN-390	-	-	191/191
F	JPN29706	CCKN-129	315/325	238/254	201/203
G	JPN29707	CCKN-391	312/315	238/246	195/205
H	JPN29708	CCKN-392	314/335	238/238	-
I	JPN29713	CCKN-127	312/335	-	193/203
J	JPN29715	CCKN-128	312/315	238/242	193/199

Table 4.9. Estimated maternal genotypes using Jones(2005)'s algorithm on clutches laid by known mothers.

Clutch ID	Mother ID	N (Total)		Estimated mother's genotypes					
		Hatchling	egg	Cm84	n	Cc117	n	Cc141	n
0313	29701	20	0		19		20		7
				316/325*		236/236		191/205*	
				325/327		236/238*		197/205	
						236/250			
						238/250			
0315	29706	24	18		41		41		30
				323/325		×		199/209	
0317	29702	25	0		23		25		22
				315/325		×		191/199*	
				315/327*				199/201	
0319	29706	25	1		25		26		25
				315/325*		×		199/209	
				323/325					
0413	29703	5	0		2		4		5
				not estimate (n < 5)		not estimate (n < 5)		191/193	
								193/199	
								199/201	
0414	29704	0	28		10		6		20
				312/314*		×			
				314/325				193/197	
								197/199	
0417	29703	35	0		6		6		28
				312/312		238/238*		×	
				312/325		238/246			

n: Number of hatchlings analyzed. \* indicates the genotype coincided with mother, × represents no reasonable genotype was estimated

Table 4.10. Estimated maternal genotypes using newly developed algorithm in this study on clutches laid by known mother.

Clutch No.	Mother ID	N (Total)		Estimated mother's genotypes					
		Hatchling	egg	Cm84	n	Cc117	n	Cc141	n
0313	29701	20	0		19		20		7
				316/325*		236/236		191/205*	
				325/327		236/238*		197/205	
						236/250			
						238/250			
0315	29706	24	18		41		41		30
				315/325*		238/244		199/209	
				323/325		238/254*		201/203*	
				325/325				201/209	
0317	29702	25	0		23		25		22
				315/325		238/248*		191/199*	
				315/327*				199/199	
								199/201	
0319	29706	25	1		25		26		25
				315/325*		238/244		199/209	
				323/325		238/254*		201/203*	
				325/325					
0413	29703	5	0		2		4		5
				not estimate		not estimate		not estimate	
				(n < 5)		(n < 5)		(low quality)	
0414	29704	0	28		10		6		20
				312/314*		x		191/197	
				314/325				193/197	
								195/197	
								197/197*	
0417	29703	35	0		6		6		28
				312/312		238/238*		x	
				312/325		238/246			
				325/325*					

n: Number of hatchlings analyzed. \* indicates the genotypes coincided with mother, x represents no reasonable genotype was estimated

Table 4.11. Estimated maternal genotypes on clutches laid by unknown nesting female.

Year	Clutch ID	Nest date (Mon./Day)	Estimated maternal genotypes			Year	Clutch ID	Nest date (Mon./Day)	Estimated maternal genotypes		
			Cm84	Cc117	Cc141				Cm84	Cc117	Cc141
2002	0201	no data	312/315	234/238	201/205	2003	0310	6/24	315/325	242/246	199/205
	0203	no data	312/315	238/240	193/193				315/334	242/248	199/209
	0210	no data	312/312	238/248	191/193			7/2	325/337	246/248	205/205
	0214	no data	312/325	230/252	191/203						205/209
	0220	no data	312/312	238/238	193/203	2004	0403	6/9	315/325	238/244	199/209
	0221	no data	312/333	238/248	199/201				325/325	238/254	201/203
	0222	no data	310/312	238/242	191/211			6/12	312/315	230/238	191/203
	0223	no data	312/312	238/248	199/201				315/315	238/248	191/205
	0302	6/3	312/325	236/252	197/205				315/325	238/248	193/195
	0303	6/5	325/327	236/252	201/205				310/312	238/248	195/199
2003	0304	6/6	312/312	238/240	191/203			6/14	325/325	238/248	193/199
	0305	6/14	312/315	238/248	201/205				310/312	238/248	195/199
	0404	no data	312/325	240/240	197/201				315/315	238/248	193/195
	0410	7/3	315/325	240/248	199/201			7/3	315/325	238/248	193/195
	0411	7/5	312/312	238/248	199/201				325/325	238/248	195/199
	0418	7/29	325/327	236/252	201/205			7/5	310/312	238/248	193/195
	0420	8/2	312/312	238/240	191/203				315/315	238/248	193/195
	0421	8/2	315/325	240/248	191/195			8/2	315/325	238/248	195/199
	0422	8月9日	312/327	238/246	191/201				312/316	238/246	193/197
	0423	8月9日	312/329	238/248	201/203				312/327	246/248	197/205

の計 27 セット分について計 351 の組み合わせの判別結果が得られた (Table 4.12.)。17 クラッチ中 10 クラッチは他のどのクラッチおよび産卵個体とも異なり、それぞれ別々の母親によって産卵されたものと分かった。互いに判別できなかつたクラッチ 0201、0303、0403 の組み合わせは 0201 と 0403 の関係性が否定されていることと、mtDNA の解析で 0303 が B タイプ、0403 が C タイプと異なるハプロタイプを示したことから (0201-0303, 0403) の組み合わせが正しいことが判明した。これらの結果から最終的に産卵巣 28 クラッチ中の母親の中に少なくとも 13 個体分の未知の母親が含まれていることが明らかとなった (Table 4.13.)。

## 第4節 考察

### 第1項 マイクロサテライトマーカーの特性

#### マイクロサテライトの塩基配列

塩基配列決定の際に泳動像の質が低かつたのは、PCR による増幅で 30 回程度くり返された変性、アニーリング、伸長の過程に複製ミスが生じ、増幅断片中にそれらが混在していたためであろう。マイクロサテライトはズレ (slippage) の起きやすい繰り返し配列を持つために、mtDNA に比べて複製ミスが生じやすい。さらに、正常な細胞中ならば DNA の複製中に発生した反復数の変化はミスマッチ修復系によって直されるが (Fig.4.7.; Eisen 1999)、PCR を行っているチューブ内には修復機構が存在しないために (井鷲裕司,2001)1 世代あたり  $10^{-2}$ ~ $10^{-5}$  (Hancock 1999) とされるマイクロサテライト領域の突然変異率をはるかに上回る率でミスが発生するものと考えられる。

Cc7、Cc117、Ei8 は単純な 2 塩基の繰り返しで構成されており、日本のアカウミガメにおいても純粋なマイクロサテライト領域として扱えることがわかった (Fig.4.5.1, 2, 6)。特に Ei8 は開発原種 (source species) であるオーストラリアのタイマイ (FitzSimmons et al. 1995) よりも規則正しい繰り返し配列を呈しており、このマイクロサテライト領域はむしろ日本のアカウミガメ起源なのではないかとも考えられる (Fig.4.5.6.)。

Table 4.12. Result of mother matching test

Clutch ID	0201	0303	0403	0203	0409	0210	0220	0221	0222	0305	M-E	M-H	0307	0310	0311	M-F	0404	0410	0418	0421	M-A	M-B	M-C	M-D	M-G	M-H	M-J	
Cl.0201	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cl.0303	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0403	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0203	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0409	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0210	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0220	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0221	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0222	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0305	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mother E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mother H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mother I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0307	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0310	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0311	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mother F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0404	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0410	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0418	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl.0421	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Mother A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Mother B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Mother C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mother D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Mother G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Mother I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Mother J	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

"0" represent that mothers of each clutch were distinguished as different nesting female turtles. "1" represent that mothers of each clutch were not distinguished. Mother ID were shown in Table 4.8.

Table 4.13. Unknown mothers estimated from hatchlings

Mother	Clutch	Maternal Genotype			mtDNA	
		Cm84	Cc117	Cc141	Type	source
un-01	0201	312/315	234/238	201/205	B	CCKN-002
			238/240			
	0303	312/312	238/240	191/203	B	CCKN-130
		312/315	238/248	201/205		
312/325		240/240				
un-02	0203	315/325	240/248		B	CCKN-044
		312/315	236/238	193/193		
		312/325	238/238	193/195		
	0409	no data	no data	no data		
un-03	0210	312/312	230/240	191/193	B	CCKN-071
		312/325	230/252	191/203		
		325/325		193/193		
				193/203		
un-04	0220	312/312	234/238	191/211	B	CCKN-017
		312/315	236/238			
		312/333	238/238			
un-05	0221	310/312	238/242	197/201	B	CCKN-086
		312/312	238/248	199/201		
		312/323				
		312/325				
un-06	0222	325/327	236/252	197/205	B	CCKN-095
		325/335		201/205		
un-07	0307	312/327	238/246	191/201	B	CCKN-155
		312/329	238/248	195/203		
				201/203		
un-08	0310	315/325	242/246	199/205	B	CCKN-170
		315/334	242/248	199/209		
		325/337	246/248	205/205		
				205/209		
un-09	0403	312/315	230/238	191/203	C	CCKN-448
		315/315	238/248	191/205		
		315/325				
un-10	0404	315/315	238/242	191/199	B	CCKN-505
		315/325	238/248	193/195		
		325/325		195/199		
un-11	0410	312/312	230/238	193/199		
		312/314	230/246	199/205		
		312/337	234/238			
		314/337				
un-12	0418	314/314	230/240	191/195		
		314/325	230/248	191/197		
				195/197		
				197/197		
un-13	0421	312/316	238/246	193/197		
		312/327	246/248	197/205		

For clutch pairs which were not distinguished, shared genotypes were shown in shadow.

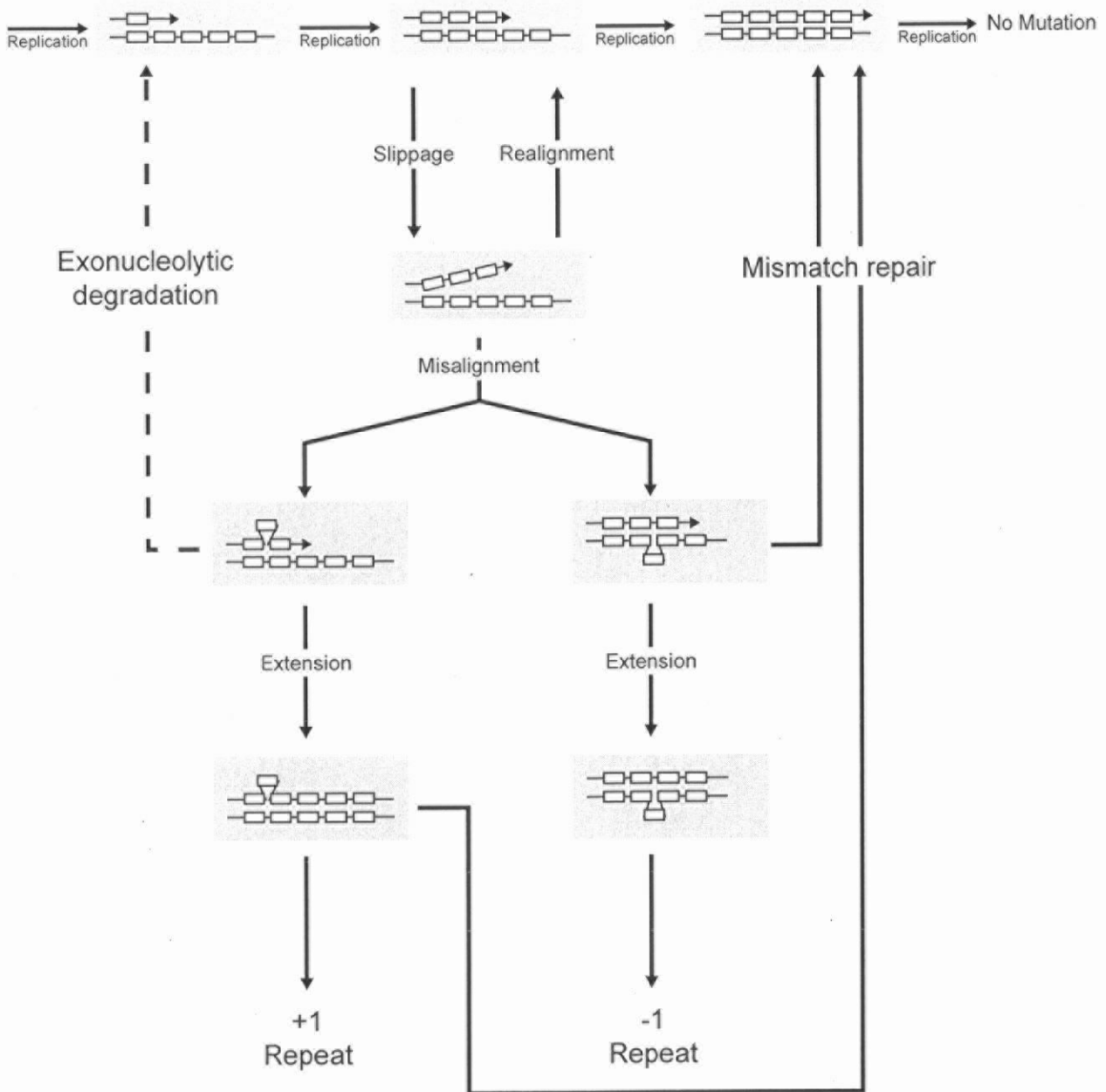


Fig.4.7. Model of the mutation process at microsatellite loci. DNA strands are represented by thin lines, microsatellite repeats by small boxes, and ongoing replication by small arrows. Flow arrows point down for steps that lead to mutations, up for steps that prevent mutations from occurring, and to the right for steps in the DNA replication process. (after Eisen 1999)



Cm84 は非常に規則正しい繰り返し部位を持っていたが、それ以外の部位(flanking region)に挿入・欠失を持ち、その様相はサイズによって異なっていた (Fig.4.5.5.)。特に 312bp もしくは 314bp の塩基配列を示した y9938、y9954、CCKN-86、CCKN-87 は 179 番目と 204 番目の 2 箇所欠損を有しているのに対し、325bp もしくは 329bp の塩基配列長を有する m9530、CCKN-388、CCKN-612、y9925 は 204 番目の 1 箇所のみが欠損となっていた。314bp 以下と 325bp 以上とでは対立遺伝子間に系統的に大きな隔りがある可能性がある。このことは産卵個体の対立遺伝子の出現頻度分布が短いサイズと長いサイズとで多峰型を示していたことからもうかがえる (Fig.4.8.)。おそらく、多くの対立遺伝子が生じる以前は大幅に繰り返し数の異なる 2 種の対立遺伝子のみが存在しており (たとえば 6 回反復の 312bp と 12 回反復の 325bp)、後に 312bp 周辺と 325bp 周辺にそれぞれ少しずつ 1 回もしくは 2 回繰り返し単位の変異が蓄積されていくことで現在のような頻度分布が形成されたのではなかろうか。このような不連続な繰り返し数の存在はチンパンジーのマイクロサテライト領域 Mfd59 でも報告されており、TPM(two phase mutation model)に合致する分布だとされている (Garza and Freimer 1996)。

Cc141、Cm72 は異なる複数のモチーフにより構成された compound microsatellite (Goldstein and Schlötterer 1999)であったが、Cc141 ではもともと CA だけの繰り返し配列だったものに、C→G の置換が、Cm72 では GT の繰り返し配列に T→C の置換がそれぞれ生じて固定されたものと考えられる (Fig.4.5.3, 4)。

このように、マーカー開発に用いたもの種 (source species) や集団とは異なるサンプルに対してマイクロサテライトマーカーを使用した場合、変異や挿入・欠失によって同じサイズのフラグメントであっても、繰り返しの様式が異なる場合もあることが確認された。特に、Cc141、Cm72、Cm84 の 3 領域は集団構造解析など変異モデルの仮定が必要となる場合には変異を単純な繰り返し数の増減だけで表現する SMM(Stepwise Mutation Model)よりも IAM (Infinite Allele Model) のほうが妥当と考えられた。

### サイズホモプラシー

Cc141 では塩基配列の異なる対立遺伝子どうしが同じ塩基配列長を示すサイズホモプラシー (size homoplasy) が確認された。また、Cm72 も本研究でこそ検出されなかったがアオウミガメを対象とした解析ではサイズホモプラシーが報告されている (Roberts et al. 2004)。このようなサイズホモプラシーはこれまであまり注目されてこなかったものの、構造が単純で突然変異率の高いマイクロサテライトでは珍しくない現

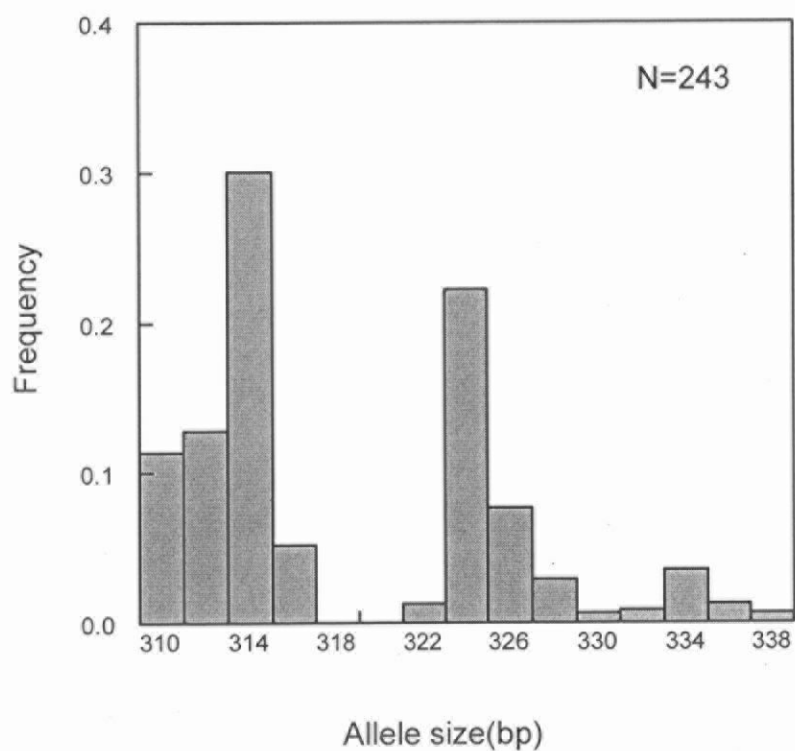


Fig.4.8. Allele frequency histogram at Cm84 locus. Allele sizes were tentatively determined as even length. DNA samples from Minabe, Miyazaki, Yakushima, Fukiage were analyzed

象であることが最近になってわかってきた。例えば Viard et al.(1998)は、ミツバチ (*Apis mellifera*)、bumble bee(*Bombus terrestris*)、淡水性の巻貝 freshwater snail (*Bulinus truncatus*)について 15 種 120 個の DNA 増幅断片の塩基配列を決定したところ、実に 31 個もの対立遺伝子が隠蔽されていたと報告している。また、マイクロサテライトの繰り返し配列部分以外に生じた点変異(SNPs)によってもサイズホモプラシーが生じることが報告されている (Blankenship et al. 2002)。

では、このようなマーカーの使用は各種の解析にどのような影響を与えるのであろうか。 Viard et al. (1998) は、サイズホモプラシーを考慮せずにサイズ情報をそのまま解析に使用すると、集団構造が隠蔽されてしまう場合のあることを bumble bee(*Bombus terrestris*)と淡水性巻貝 freshwater snail (*Bulinus truncatus*)で示した。また、淡水性巻貝 freshwater snail (*Bulinus truncatus*)のマイクロサテライトを SSCP 解析とフラグメント解析で比較した研究でも、サイズホモプラシーを考慮しないで解析した場合は集団構造が不明瞭となったとの報告がある (Angers et al. 2000)。一方で、集団遺伝学的パラメータについては、Angers et al.(2000)の研究で全体の  $F_{st}$  にサイズホモプラシーによる影響がみられなかった。Adams et al.(2004)の研究でも、サイズホモプラシーによる影響で  $R_{st}$  値のばらつきが若干大きくはなっていたものの、その影響はミスラベリングなどの事務的なミスに起因したものよりもわずかに大きいにだけだった。サイズホモプラシーは集団差異の正確確率検定(exact test of population differentiation; Raymond and Rousset 1995b) においては集団構造を隠蔽化することが多いが、 $F_{st}$  や  $R_{st}$  の集団遺伝学的パラメータにはあまり影響をあたえない傾向があるようである。

また、1つ1つの対立遺伝子の異同が大きく結果に影響する父性解析や血縁解析においてもホモプラシーが結果に与える影響はそれほど大きくなく、むしろ解析に使用するマーカーの数とその多型性のほうがはるかに決定的な影響をもつという報告もある (Estoup et al. 2002)。親子解析などでは候補となりえない個体を”排除していく”ことが解析の原則であるので、遺伝的な違いを隠蔽するサイズホモプラシーは解析の検出力を弱める(父親でないとは断定できない)ことはあっても、誤った結果(本当は父親なのに父親でないと判断してしまう)に結びつくことはない。これらのことから、サイズホモプラシーの存在は本研究でも解析結果を大きく揺るがすものではないと判断された。

### フラグメント解析結果と塩基配列長の相異

フラグメント解析により推定された対立遺伝子長が実際の塩基配列長と完全に一致したのは Cc117 のみで、その他の領域では両者の間に差が見られた。両解析で長さが

一致しない原因は(1)生データから対立遺伝子サイズを決定する方法が適当でなかった。(2)電気泳動による移動度が一律にズレた。(3)PCR反応による増幅の際にエラーが生じた。の大きく3点に分けられる。

#### 生データからの対立遺伝子サイズ決定

シーケンサーを用いたフラグメント解析では、サイズデータとして得られるのは小数点以下2桁までの値であり、これを整数に直すことで最終的な対立遺伝子のサイズが決定される (Fig.4.1.)。本研究で使用したマイクロサテライトマーカーはCAやGC、GTといったいずれも2塩基の繰り返し数の違いによって変異が構成されているので、対立遺伝子サイズは理論上2塩基おきの値、つまり奇数長か偶数長となるように決定する必要がある。マイクロサテライトの塩基配列は既に述べたように必ずしも文献値と同じとは限らないので、この偶奇の選択がまず結果に大きく影響している可能性がある。例えば、Fig.4.9. に示すような2つのデータ (191.62と192.35) の場合、偶数として見るならばこの二つのデータは同じ192bpの対立遺伝子となるが、奇数として見た場合には191bpと193bpの2つの異なる対立遺伝子となってしまう。

このような違いは集団解析ではあまり最終的な結果に影響を与えないものの、たった1個体の結果が大きく影響する父性解析では無視できない。そのため本研究ではまず偶数長と奇数長の2通りで対立遺伝子サイズを決定し、実際の塩基配列と1対1対応が得られる方を採用することにした (Table 4.4.)。例えばCc7は対立遺伝子を奇数長と仮定した場合には実際の塩基配列長と1対1でフラグメント解析の結果が対応するが、偶数長の場合は178bpの同じ塩基配列をもつ4個体がフラグメント解析で178bp (m9541, m9548) と180bp (y9913, y9924) の2タイプに分割されてしまう。このことからCc7は小数点以下2ケタの生データを奇数長の対立遺伝子に変換するのが妥当と判断された。他のマイクロサテライト領域についても同様にして、Cc141、Ei8を奇数長、Cc117、Cm72を偶数長、Cm84は偶数長と奇数長混在として対立遺伝子サイズを決定することにした。

#### 電気泳動における移動度のバイアス

Cc7、Cm72はある一定の長さだけ一律に長さがズレていた。これは増幅断片が2次構造、3次構造やラベリングに使用した蛍光などの影響で微妙にサイズマーカーと移動度が異なったことが原因と考えられる (Harbel and Tautz 1999, Delmotte et al. 2001, Applied Biosystems 2004)。同一機器であるにも関わらず、新バージョン (ABI3130xl) と旧バージョン (ABI3100) との間で一律なサイズのズレが観察されたのもこれに相当する (Table 4.5.)。このように同じ型番、同じバージョンの泳動機器で

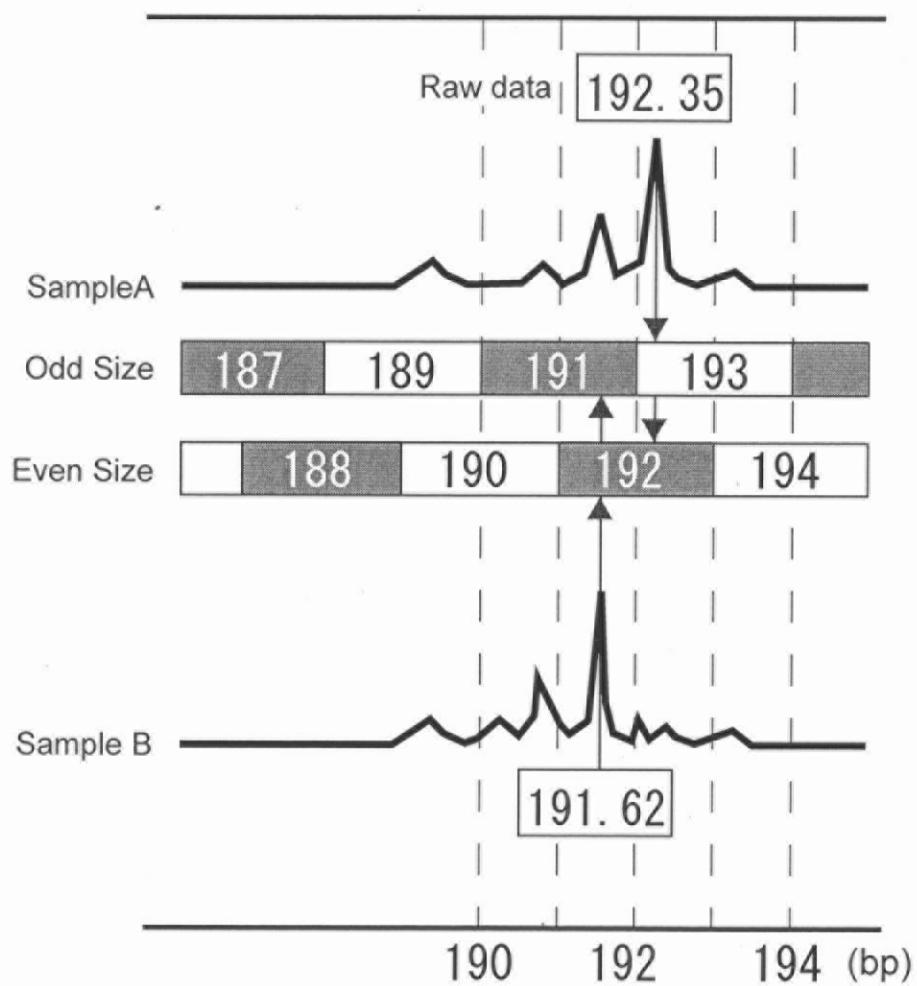


Fig.4.9. Genotyping of the microsatellite locus on fragment analysis.  
 Odd size: two samples have different alleles.  
 Even size: two samples have the same allele.

あっても結果がズレることはフラグメント解析で良く知られており、複数の研究者で解析を分配して別々の機器で行うときなどに必ずリファレンスとなるサンプルを共有することが推奨されている (Delmotte et al. 2001)。この問題は全てのサンプルの結果が一律にズレるだけなので本研究では旧バージョンによって得られたデータは別途算出した補正值を用いて補正することで新バージョンのデータに合わせることにした。

### PCR 反応の際に生じたエラー

上述した生データから対立遺伝子サイズへの変換、電気泳動による移動度のバイアスのどちらでも説明できない結果の相違は PCR 反応の際に生じるエラーである可能性が高い。これは Genotyping error と呼ばれることが多く、(1)ヌル対立遺伝子(null alleles)の存在。(2)対立遺伝子の抜け落ち(allelic dropout)。(3)対立遺伝子の間違い(false alleles: Taberlet et al. 1999)。の3点が挙げられる。

(1)ヌル対立遺伝子(null alleles)の存在は PCR でマイクロサテライト領域を増幅する際に、プライマーの接続部位に変異があるために実在する対立遺伝子を増幅できないことによる(Paetkau and Strobeck 1995; Ishibashi et al. 1996; Callen et al. 1993; Ede and Crawford 1995)。 これまでに報告されているヌル対立遺伝子の頻度は多いものでは24%にまでのぼる(Pemberton et al. 1995)。

(2)対立遺伝子の抜け落ち(allelic dropout)は非常に低濃度の DNA 抽出物を鋳型 DNA とするとき生じるとされており、動物の糞や体毛(Gagneux et al. 1997)、博物館の古い標本など質の悪い試料を扱う際に起こりやすい(Taberlet et al. 1999)。これに加え、各個体が有する 2 対立遺伝子のうち長サイズのほうが増幅しにくく抜け落ちやすい傾向があること(short allele dominance)も指摘されている (Wattier et al. 1998)。ヌル対立遺伝子が存在したり、対立遺伝子の抜け落ちが生じると、本当は対立遺伝子をヘテロで持つ個体をホモと誤判断してしまうことになる。実際に野生チンパンジー (*Pan troglodytes verus*)が落とした体毛を解析した際には、増幅産物のうち実に31%も産物が allelic dropout によって見かけ上ホモ接合となっていた (Gagneux et al. 1997)。ハマダラカ(*Anopheles gambiae*)でもホモ接合と判定された個体の2/3がヌル対立遺伝子の影響による誤判定であった (Lehman et al. 1996)。解析したサンプルにホモの個体が極端に多く出現した場合には、これらのエラーが生じている可能性が大いにある。

(3)対立遺伝子の間違い(false alleles)は PCR による増幅の際に生じた人工的な変異 (artefacts)を本物の対立遺伝子と判断してしまうことである。PCR 中に生じた変異は本物の対立遺伝子に比べればはるかに存在量が少なく、フラグメント解析の泳動像では

本物の対立遺伝子の近傍に小さなピークとして現われるため、スタッター-stutter (シャドウ shadow) バンドとして区別されることが多い (Fig.4.1.)。しかし、PCR サイクルのごく初期 1～3 回目に変異が生じた場合には PCR 産物中に占める変異産物の割合が多くなることで、誤って対立遺伝子として判断され、結果として真の対立遺伝子サイズよりも数塩基ずれた値をデータとして取得してしまうことになる。2 塩基繰り返しのマイクロサテライト領域で発生しやすいことが知られており、3 塩基もしくは 4 塩基繰り返しの領域であれば影響が少ないとされている。

このような技術的な問題の他にも、サンプルの取り違いやピペット操作のミス、対立遺伝子決定後のデータ取り違いなど初歩的なミスも無視できないとされ、ミスの程度を見積もり提示したり、ミスの発生を想定して組み込めるような統計モデルを使用することが提唱されている (Bonin et al. 2004)。

解析におけるエラーを想定した取り扱い、これまで非侵襲的サンプリング (noninvasive sampling) や古 DNA の解析、あるいは SNPs を用いた解析などごく限られた分野でしか慣例化されておらず、分子生態学の多くの分野ではほとんど関心が払われてこなかった (Bonin et al. 2004)。しかし、今後は使用できるマイクロサテライト領域の種類が増え、その素性も明らかになってくるに従い、エラー率などの情報がマーカーの選択の上で重要な判断材料となってくるものと思われる。

## 第2項 母性解析

### mtDNA による産卵雌の識別

mtDNA 調節領域前半では産卵雌 10 個体と産卵巣 20 クラッチからの計 38 個体中 37 個体が全く同じ塩基配列を示した。今回解析した範囲は Bowen et al. (1995) の 350bp より約 290bp 広いものの、新たに見つかった変異箇所は 2 箇所に残り、2 ハプロタイプ間に見られた変異箇所は 640bp のうちわずか 7 箇所であった (Fig. 4.6.)。最も変異性が高いとされる調節領域前半でこれだけ個体間に変異がなかったことから、mtDNA の他の領域を解析したとしても個体間変異が見つかる見込みは薄い。mtDNA の塩基配列では母親を識別できないことがわかった。

## 産卵雌の遺伝子型推定

### 既存の手法による推定

Jones (2005) の方法では、21 領域中 14 領域で産卵雌の遺伝子型が推定されたが、そのうち正しい遺伝子型が含まれているのはわずか 8 領域だけであった。

遺伝子型が推定されない領域がある分には、本当は産卵雌が異なる産卵巣どうしを見分ける能力が落ちて集団解析に使用できる標本数が減少するだけなので問題とならない。しかし、遺伝子型が誤推定されてしまった場合には、本当は同じ産卵雌に由来する産卵巣がそれぞれ別々の産卵雌によって産卵されたものと誤判断され、同じ産卵雌が集団解析で二重に使用されてしまう。推定された遺伝子型の候補が必ず本当の産卵雌の遺伝子型を含んでいなければ本研究では使用できない。

遺伝子型が誤推定される原因は解析エラーもしくは変異により、実際よりも多くの種類の対立遺伝子が孵化幼体・死亡卵の中に検出されることであった。第 4 章でも述べたとおり、マイクロサテライトのフラグメント解析では少なからずエラーが発生する。エラーや変異は低頻度でしか起こらないため、集団解析では全体の結果に与える影響は小さいが、父性解析などではたった 1 個体の変異が生じただけで結果は変わってしまう。GERUD2.0 の方法は作成者の Jones (2005) も注意を呼びかけているように、遺伝子型決定エラー (genotyping error) や変異があった場合に正しく推定できない点が欠点である。本研究では、死亡卵など質の悪いサンプルも扱うため、第 4 章で示したような解析エラーが発生する可能性も高く、既存の方法では正しく遺伝子型を推定できなかったと考えられた。

### 新たに考案した手法による推定

本研究で新たに考案した手法では、遺伝子型を推定できた延べ 16 領域全てが産卵雌の正しい遺伝子型を含んでおり、Jones (2005) の方法よりも有効な手法であることが確認できた。

本手法の長所は Jones (2005) の方法に比べてエラーや変異に対して頑強な点にあるが、この手法にもまだ改善すべき余地が 2 つある。まず 1 つ目は遺伝子型を全く推定できない場合が起こる点である。今回の検討では 19 領域中 2 領域で遺伝子型が全く推定されなかった。いずれの場合も孵化幼体で観察された対立遺伝子の数が多すぎたことが原因である。特にクラッチ 0414 ではわずか 6 個体について最初の段階で 8 種類もの対立遺伝子が出現してしまっている。このうちいくつかは波形チェックにより修正されたが、やはり遺伝子型を推定できなかった。2 つ目は多くの遺伝子型候補が出てしまう点である。遺伝子型が推定された 16 領域のうち実に 15 領域において 2~4 の複数の



候補が得られた。この推定された遺伝子型をもとに実施する母親判別で“排除原則”を採用しているため、真の遺伝子型が含まれてさえいればその後の集団解析で使用するのに問題はないが、候補数を減らすことができれば、検出力をさらに向上させることができる。これらの二つの問題は、いずれも出現した対立遺伝子の中でどの対立遺伝子の変異やエラーによるものかを客観的に判断できなかつたことが原因である。

本章で既に述べたように、マイクロサテライトのフラグメント解析には必ず幾分かのエラー・変異がついてまわる。エラーへの対処の仕方が今回のような母親推定では大きな鍵となる。まず、1番の対策としてエラーの出にくいマーカーを使用することは言うまでもない。解析に先立ってのエラー率の評価はこれまでほとんど実施されて来なかったが、試料、時間、予算の節約のためにも今後重要となる。その次の段階として本手法のようなエラーを排除するためのアルゴリズムの力が必要になる。本手法では、1回しか出現しなかつた稀な対立遺伝子や遺伝子型をエラー・変異の可能性が最も高いとして排除するようにしたが、クラッチ 0417 の Cc141 のように解析個体数が多い場合にはこの1回という出現頻度の基準は妥当ではない。解析サンプル数とマーカーのエラー率に応じてエラー・変異と判断する出現頻度を調整するなどの改善策が考えられる。

### **母親不明産卵巣の母性解析**

28 クラッチ中に最低でも 13 個体の未知の母親が含まれていることがこの手法により明らかになった。この個体判別された未知の母親を mtDNA による集団解析（第 6 章）のサンプルに加えることで、蒲生田の標本数を大幅に増やすことができる。蒲生田における夜間の産卵調査では 102 日間でわずか 10 個体しか産卵雌の DNA 標本を採取できなかったことを考えると、その倍以上の数の標本が新たに加わることの意義は大きい。

このように 13 個体の未知の母親を新たに個体判別できた一方で、母親が異なるかどうか判別できなかったクラッチの組み合わせも多い。その中には本当に母親が同一である場合とそうでない場合とが含まれている。例えばクラッチ 0311 は産卵個体 F (Table 4.8.) と判別できなかったが、両者とも 3 領域全てのデータが揃っていた。さらに、クラッチ 0311 が産卵されたのが 2003 年の 7 月 2 日で、産卵個体 F によって産卵されたクラッチ 0315、0319、0322 が産卵されたのがそれぞれ同年の 7 月 15 日、29 日、8 月 13 日と互いにほぼ 2 週間間隔であったことから (Table 2.2.)、クラッチ 0311 は産卵個体 F によって産卵されたものである可能性が高い。一方で、同じく判別できなかったクラッチ 0203 と 0409 では前者が 3 領域全てで遺伝子型が推定されているのに対して、後者は孵化幼体が 1 個体しか解析されておらず、明らかに情報が少ないために

判別できなかったことがわかる。今回判別できなかったクラッチは、解析した孵化幼体が 5 個体未満で遺伝子型を算出できなかったか、対立遺伝子が出現しすぎて遺伝子型を推定できない領域が存在したことによる。このような場合には、判別できなかったクラッチに限定してあと 1~2 のマーカーによる第 2 段目の解析を追加して検出力を高めるほうが、最初から多くのマーカーで解析するよりもコストを抑えられるだろう。

今後、継続的なモニタリングに利用されるには、いかにコストを抑えるかが重要となる。Jones (2005) のように全個体で全マーカーの解析結果が揃っているのが理想ではあるが、実際の解析では 1 回のフラグメント解析で全ての領域の正確なデータを取得できることは稀である。特に本研究で用いた死亡卵のような質の悪いサンプルでは DNA が PCR により増幅できない場合も多い。少ない情報を最大限に利用して母親判別を行おうとした本研究で開発した判別法はそのような状況でこそ威力を発揮する。今回は判別に遺伝的情報のみを用いたが、例えばウミガメでは同じ個体が 2 日連続して産卵することが無いように、産卵日によってもクラッチの判別に関する情報が得られる。本手法で用いた排他原則による“0”か“1”をもとにした母性判別法は、産卵日のような生態的な情報も“0”か“1”で表現することで数多く組み込んでいくことができる点で、遺伝的情報しか活用できない従来の父性解析法に比べて格段に応用性が高いといえる。