

鯨類の生態学及び集団遺伝学に関する研究に 用いられるゲノム DNA の解析手法 (総説)

景 崇洋*・中山 一郎**・河村 章人*

*三重大学生物資源学部 **水産庁養殖研究所

A Comparative Study of the Techniques of Genomic DNA Analysis Used in Ecological and Population Genetics Research in Cetaceans (Review)

Takahiro KAGE*, Ichiro NAKAYAMA** and Akito KAWAMURA*

*Faculty of Bioresources, Mie University

**National Research Institute of Aquaculture

Abstract

This paper reviews analyses of cetacean DNA, including polymorphisms of mitochondrial DNA, conventional multi-locus DNA fingerprinting techniques, and SSLP (Simple Sequence Length Polymorphisms) DNA fingerprinting. It also describes the possible application of other techniques, e. g., RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), CAP-PCR (CA-repeat Primed Polymerase Chain Reaction) and SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms) to cetaceans.

Key words : Cetacean・DNA fingerprinting・SSLP・mitochondrial DNA・PCR

は じ め に

DNA 解析を用いた動・植物の生態学的及び集団遺伝学的研究は、近年多くの研究者によって行われている。鯨類においても、ミトコンドリア DNA の変異を観察する手法を用いた、種判別、系群判別、集団遺伝学的解析等の研究、DNAフィンガープリント法を用いた群の社会構造や、水族館等で飼育されている個体の親子鑑定等の研究、さらに、ヒトで開発された PCR 等の新しい技術を導入した研究等が行われている。これらの技術は、

継続的な観察が極めて困難な、水圏という環境に生息している鯨類の生態学的及び集団遺伝学的研究に新しい道を与えた。本総説では、DNA 解析を用いた鯨類の研究に焦点を置き、手法の概要とともに現在の研究状況を俯瞰し、今後の展望について述べる。

1. ミトコンドリア DNA を用いた解析手法

DNA を用いた鯨類の研究手法は、他の生物同様その研究目的によって幾つかに分けられる。その1つに、ミトコンドリアの中に存在する環状のミトコンドリア DNA の塩基配列の多型を観察する方法がある。ミトコンドリア DNA は母系遺伝することが知られており、これを調べることによって種判別、系群判別、集団遺伝学的解析等を行うことができる (Table 1)。この手法

平成7年6月20日 受理

*三重県津市上浜町 1515

**三重県度会郡玉城町昼田 224-1

Table 1 List of works using DNA fingerprinting and molecular techniques.
These researches describe in order of year.

Author	Species	Technique	Probe
Arnason <i>et al.</i> (1984) ⁸⁾	Many species	Southern blotting	#
Hoelzel and Amos (1988) ²¹⁾	Many species	DNA fingerprinting	33. 15
Spilliaert <i>et al.</i> (1989) ⁴⁶⁾	<i>Balaenoptera physalus</i> <i>Balaenoptera borealis</i>	Southern blotting DNA fingerprinting	mt DNA alpha-globin3'HVR
Stevens <i>et al.</i> (1989) ⁴⁷⁾	<i>Orcinus orca</i>	Southern blotting	mt DNA
Trowsdale <i>et al.</i> (1989) ⁴⁹⁾	<i>Balaenoptera physalus</i>	Southern blotting	DRB, DPA, PGDZ1 DQA, DNA, DRA DQB, HLA, Class I
Amos and Hoelzel (1990) ²¹⁾	<i>Globicephala melas</i>	DNA fingerprinting	33. 15, 33. 6
Amos and Dover (1990) ³⁾	<i>Globicephala melas</i>	DNA fingerprinting	33. 15
Amos <i>et al.</i> (1991) ⁴⁾	<i>Globicephala melas</i>	DNA fingerprinting	33. 15, 33. 6
Amos <i>et al.</i> (1991) ⁵⁾	<i>Globicephala melas</i>	DNA fingerprinting	33. 15, 33. 6
Amos and Dover (1991) ⁶⁾	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Southern blotting	cloning DNA
Baker <i>et al.</i> (1991) ⁹⁾	<i>Megaptera novaeangliae</i>	Southern blotting	pDP 1007
Danielsdottir <i>et al.</i> (1991) ¹²⁾	<i>Balaenoptera physalus</i> <i>Balaenoptera borealis</i>	Isozyme analysis	
Dizon <i>et al.</i> (1991) ¹⁴⁾	<i>Stenella longirostris</i>	RFLP of mt DNA Southern blotting	mt DNA
Duffield and Wells (1991) ¹⁵⁾	<i>Tursiops truncatus</i>	DNA fingerprinting Southern blotting Isozyme analysis Chromosome analysis	M 13, pV47-2 mt DNA
Hoelzel and Dover (1991) ²²⁾	<i>Orcinus orca</i>	DNA fingerprinting PCR (mt DNA)	33. 15
Hoelzel <i>et al.</i> (1991) ²³⁾	<i>Orcinus orca</i>	DNA fingerprinting	33. 15, 33. 6
Numachi and Kobayashi (1991) ³⁷⁾	Many species	RFLP of mt DNA Southern blotting	mt DNA
van Pijlen <i>et al.</i> (1991) ⁴²⁾	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	DNA fingerprinting	33. 15, 33. 6
Schaeff <i>et al.</i> (1991) ⁴⁴⁾	<i>Eubalaena glacialis</i> <i>Eubalaena australis</i>	Southern blotting	mt DNA
Wada (1991) ⁵¹⁾	<i>Balaenoptera physalus</i> <i>Balaenoptera borealis</i> <i>Balaenoptera edeni</i> <i>Balaenoptera acutorostrata</i>	RFLP of mt DNA Isozyme analysis	
Wada <i>et al.</i> (1991) ⁵²⁾	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	RFLP of mt DNA	
Wada and Numachi (1991) ⁵³⁾	<i>Balaenoptera</i> genus	Isozyme analysis	
Pastene <i>et al.</i> (1993) ⁴¹⁾	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	RFLP of mt DNA	
Escorza <i>et al.</i> (1994) ¹⁹⁾	<i>Globicephala macrorhynchus</i> <i>Grampus griseus</i>	DNA fingerprinting	Oligonucleotide
Hoelzel (1994) ²⁶⁾	Many species	RFLP of mt DNA DNA fingerprinting	Not mentioned
Kamiyama <i>et al.</i> (1994) ³¹⁾	<i>Tursiops truncatus</i> <i>Cephalorhynchus commersonii</i> <i>Neophocaena phocaenoides</i>	DNA fingerprinting	33. 15, 33. 6
Kamiya and Kamiyama (1995) ³²⁾	<i>Tursiops truncatus</i> <i>Cephalorhynchus commersonii</i> <i>Neophocaena phocaenoides</i>	DNA fingerprinting	33. 15, 33. 6

: The probe was cloned himself.

は、従来のアイソザイムの分析に代わるものとして 1980 年代後半から用いられるようになった。ミトコンドリア DNA を使った研究は、鯨類の中でも主に鬚クジラ類を対象として行われている。手法の種類としては、大きく分けて次の 3 つが挙げられる。(1)ミトコンドリア DNA を抽出し、制限酵素で切断し、ゲル電気泳動で DNA 断片を分離することによって制限酵素断片長変異 (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms) を観察する、(2)ゲノム DNA を抽出し、制限酵素で切断し、ゲル電気泳動で DNA 断片を分離した後、ミトコンドリア DNA のプローブ (放射線または化学標識した特定の配列を持つ短い DNA の断片) を用いてサザンブロット法によって制限酵素断片長変異を検出する、(3) PCR (Polymerase Chain Reaction) を用いてミトコンドリア DNA の例えば D-loop 領域のような高変異な領域だけを増幅し、増幅された DNA 断片を制限酵素で切断し、ゲル電気泳動で DNA 断片を分離することによって制限酵素断片長変異を観察する。現在主流になっている手法は、(3)の PCR を用いたものである (Table 2)。従来の種判別、系群判別、集団遺伝学的解析等の応用として、この手法を用いて、市場に出ている鯨肉がどこで捕獲された鯨であるのか、さらには鯨種の特定を試みた報告¹¹⁾もある。

2. マルチローカス DNA フィンガープリント法を用いた解析手法

DNA フィンガープリント法は、その名の通り DNA の塩基配列の個体差を視覚的に表す技術であり、最初はヒトを対象として発展してきた。この技術は、犯罪捜査や親子鑑定、出生前の遺伝病の早期発見等に用いられてきた。タンパク質をコードしている遺伝子領域の DNA

塩基配列は、同種内ではほとんど個体差が見られないが、非遺伝子領域の DNA 塩基配列には大きな個体差が生じる。例えば、ヒトにおいてはゲノム DNA 中に存在する遺伝子領域は数%しかなく、残りの 90%を越すほとんどの領域はタンパク質をコードしていない DNA で占められ、JUNK (がらくた) 配列と呼ばれている。機能が未だ不明瞭なこの領域の約 25%は反復配列で、変異に富んでいることが知られている¹⁾。この反復配列は、動物の DNA に多数含まれることが知られており、特に繰り返し数の多いものを高度反復配列と呼ぶ。ヒトのゲノム DNA 中に存在する高度反復配列に、個体間での高度な変異が存在することが明らかになり、これをプローブとして用いることで、ゲノム DNA 中の高度反復配列の存在形態の違いを観る方法が 1985 年に Jeffreys *et al.*²⁸⁾ によって確立された。彼らの発見したプローブの中でも、33.15 及び 33.6 というミオグロビンのイントロン部分から発見された高度反復配列のプローブは、個体間での変異が非常に大きいことから、DNA フィンガープリント法を用いた種々の生物の研究に使用されている。この手法は、組織もしくは血液から DNA を抽出し、制限酵素で切断し、ゲル電気泳動で DNA 断片を分離した後、プローブを用いてサザンハイブリダイゼーション法によって制限酵素断片長変異を検出するか、もしくは、メンブレンに DNA を吸着させずにゲル中に DNA を閉じこめたまま乾燥し、乾燥したゲルに直接プローブをハイブリダイゼーションさせて制限酵素断片長変異を検出するものである³⁶⁾。どちらの場合も、この手法は、プローブをアルカリ処理で一本鎖にしたゲノム DNA の相補的な配列とハイブリダイゼーションさせて二重鎖を形成させる。その後、メンブレンもしくは乾燥したゲルを、放射線フィルムと重ねて露光させ、

Table 2 List of works analyzing mitochondrial DNA of whale by PCR.

Author	Species
Hoelzel (1991) ²⁴⁾	<i>Orcinus orca</i>
Hoelzel and Dover (1991) ²⁵⁾	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>
Baker <i>et al.</i> (1993) ¹⁰⁾	<i>Megaptera novaeangliae</i>
Milinkovitch <i>et al.</i> (1993) ³⁴⁾	Many species
Baker and Palumbi (1994) ¹¹⁾	Many species
Milinkovitch <i>et al.</i> (1994) ³⁵⁾	Many species
Palumbi and Baker (1994) ⁴⁰⁾	<i>Megaptera novaeangliae</i>

得られたバーコード状のバンドのパターンを比較する。ミトコンドリア DNA の断片の比較と違い、DNA フィンガープリント法でのバンドの比較は、ゲノム DNA の断片の多型を観ているため情報量が多い。このため DNA フィンガープリント法では、個体の識別を行うことが可能である。この手法を用いて、鯨類の群内の血縁構造を解明し、その社会構造について新しい知見が得られている (Table 1)。また、この手法は、水族館等で飼育されている歯鯨類の親子鑑定にも使用されている^{31, 32)}。この DNA フィンガープリント法で重要な鍵となってくるのがプローブの選択であるが、鯨類を含め水産生物専用のプローブは今のところほとんど無く、先に述べたヒトをはじめとする他の動物由来のミニサテライト配列が用いられている。しかし、これらのプローブ以外に、Epplen *et al.*¹⁶⁻¹⁸⁾ によって開発された合成オリゴヌクレオチドプローブも DNA フィンガープリント法に用いられるようになってきた¹⁹⁾。この手法は、動物に多く存在する、4 塩基程度の配列が 4~5 回繰り返された (GGAT)_n のような反復配列をプローブとするものである。他の動物のミニサテライト配列を使う方法と違って、自由に配列を設計して合成できるため多数のプローブを使用でき、制限酵素との組み合わせを変えることによって DNA フィンガープリントの鑑定の精度を高めることができる。また、プローブのサイズが小さいため、ハイブリダイゼーションの時間が短縮できる。しかし、同時に、ハイブリダイゼーションの洗浄の条件設定が難しく、安定したバンドパターンを得にくいという欠点もある。

このようなマルチローカス DNA フィンガープリントは検出バンド数が多く、ゲノム上のランダムな位置を同時に観察できるため、魚類におけるクローン判定等には有効である³⁰⁾。しかし、(1) 同一ゲル上で電気泳動を行い、同一の条件でハイブリダイゼーションを行う必要があること、(2) バンド数が多すぎてバンドの相同性を見極めることが困難であること等から、多数の個体が存在する鯨類の群の血縁関係を調べるような研究には、特定のローカスを狙ったシングルローカスミニサテライト法が必要になってくる。このため、プローブを鯨類自身の配列から作成する必要があるが、今後の技術の発展が望まれる。また、このプローブを親子鑑定に使用する場合、ゲノム DNA を切断する制限酵素とプローブの組み合

わせによって得られる DNA フィンガープリントを、親のものと次世代のもので比較し、メンデルの法則に従って分離することを確認することは絶対条件となる。この際、自然界に存在する個体で確認を行うのは困難であるため、水族館等で飼育されているもので、DNA フィンガープリントの比較を行うことが望ましいと考えられる。

3. PCR (Polymerase Chain Reaction) による di-nucleotide repeat の増幅を用いた解析手法

現在ヒトでは、マルチローカス DNA フィンガープリント法の問題点を改善する手法として、PCR を用いた手法が開発された。この技術は、少量のサンプルから特定の DNA 配列を PCR によって増幅するもので、ミイラや化石生物から抽出した DNA で増幅に成功した例もある^{13, 33, 39, 55)}。動物のゲノム DNA 中の非遺伝子領域には、(GT)_n や (AG)_n の様な 2 つのヌクレオチドが複数回繰り返した配列 (di-nucleotide repeat) が存在し、その反復回数は個体ごとに異なることが知られている。この手法は、その繰り返しの回数を見るもので、PCR によって di-nucleotide repeat を含む領域だけを増幅し、ゲル電気泳動で増幅された DNA 断片を分離し、その長さを比較する。この手法は、ダイヌクレオチドの繰り返しの回数を比較するため、データベースとして数値をとっておくことができる。このため、同一ゲル上でのバンドの比較を行わなくても数値のみを比較すればよく、数十~数百の個体を同時に比較することができる。Rassmann *et al.*⁴³⁾ や Schlotterer *et al.*⁴⁵⁾ では、この手法を SSLP (Simple Sequence Length Polymorphisms) と称しており、本文でもそれにならうことにする。SSLP の鍵となってくるのは、PCR によってダイヌクレオチドリピートを増幅するためのプライマーであり、これを設計する必要がある。先にも述べたように、反復配列の反復回数には個体差が生じるが、反復配列をはさむ両側の領域では個体間で高い相同性をみせる。このことを考慮に入れ、プライマーの設計はこの領域から行う。設計は、まず、対象生物のゲノム DNA を制限酵素で消化して適当な長さの断片 (2 kb 前後が最適) にし、プラスミド等の適当なベクターに組み込ませ、大腸菌に形質転換し、ゲノミック・ライブラリーを作成する。そこに (GT)₁₀ や (GA)₁₀ のような di-nucleotide repeat をプローブとしてコロニーハイ

ブリダイゼーションを行い、ライブラリーから対象となる配列を含んだクローンを拾い出した後、シーケンスを行い、di-nucleotide repeat をはさむ両側の領域の各々から PCR プライマーを設計する。Rassmann *et al.*⁴³⁾ では、このプライマーの設計方法について述べられている。設計したプライマーを用いて PCR を行い、ゲル電気泳動によって得られたバンドが個体変異を見せ、なおかつ、次世代にメンデルの法則に従って分離するものを

DNA 解析に使用する。鯨類で現在までに発表されている SSLP による研究及びそのプライマーを Table 3 にあげる。Schlotterer *et al.*⁴⁵⁾ では、バンドの変異率を歯クジラ及び髯クジラの種間で調べている。さらに、Amos *et al.*⁷⁾ によってヒレナガゴンドウ (*Globicephala melas*) の群の社会構造についての報告がされている。このようにして得られる DNA 断片は、シングルローカスであるため解析が容易で、群の血縁関係

Table 3 List of works using SSLP and sequence of primer flanking a di-nucleotide repeats.

Author	Species	Primer (5' to 3')
Tautz (1989) ⁴⁶⁾	<i>Globicephala melas</i>	#
Schlotterer <i>et al.</i> (1991) ⁴⁵⁾	Many species	#
Rassman <i>et al.</i> (1991) ⁴³⁾	Many species	#
Amos <i>et al.</i> (1993) ⁷⁾	<i>Globicephala melas</i>	TGAAATTCTTCATCAGT GTTAATGTAGGCAGACT GTTTTGGTTGCTTGA TAAAAGACAGTGGCA GTTCCCTTTCCTTACA ATCAATGTTTGTCAA GTGATATCATACAGTA ATCTGTTTGTCACATA GGGGTTTCTCCTCTA TGATCTGCCAATAAGA ACCCAGAGAAAACA CAAGGTATTTTCAGAA
Kage (1995) ³⁰⁾	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	TGAGTACATGGATTT TGAGGGCTGAAGTCT GCAAACAACAGTAAC GATGGAAACAGAAGC CCCACAGACATACAC TGGAAGTGGCACACC TTTGGCAGGAACCTGAG GTAGCCGCTGCCACACG

: Sequences including di-nucleotide were mentioned, but the region of primer was not mentioned.

や水族館で飼育されている歯クジラ類の親子鑑定等には有効である。しかし、欠点としては、近縁種でもこのはさむ領域が異なるため^{29,30)}、それぞれの種に対してプライマーの設計を行う必要があり、今後の技術の発展が望まれる。

4. 鯨類のゲノム DNA 解析の新たな活路

4-1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法

RAPD 法は 1990 年に Williams *et al.*⁵⁰⁾ によって試みられたのを初めに、近年様々な動・植物の DNA 解析に用いられるようになってきた手法である。この手法は、無作為に合成したプライマーを用いて、ゲノム DNA をテンプレートにして PCR を行い、増幅された DNA 断片に変異があるかどうかを検討するものである。この手法は、無作為にプライマーを合成しているため、PCR によって増幅される DNA 断片はランダムで、何が増幅されているか全く解らないといった不安がある。しかし、SSLP を行う時のような DNA のクローニング等の作業を必要としないため、PCR 産物に多型が生じるかどうかを簡単に見られるといった利点を持っている。また、どんな種でも使えるため、とにかく遺伝子多型マーカーを手に入れたい場合には、手軽に着手できる手法である。鯨類においても、ゲノム DNA の解析を用いた生態学的及び集団遺伝学的研究を行っていく上で、遺伝子多型マーカーを増やしていくことは重要であり、この手法をその手段の一つとして、今後取り入れていく必要がある。

4-2. CAP-PCR (CA-repeat Primed Polymerase Chain Reaction) 法

CAP-PCR 法は、1995 年に Ishibashi *et al.*²⁷⁾ によって試みられた新しい手法である。この手法は、SSLP とは逆に (CA) の dinucleotide repeat をプライマーとして設計して PCR を行い、dinucleotide repeat にはさまれた領域を増幅し、その DNA 断片の長さの変異を検討するものである。Ishibashi *et al.*²⁷⁾ では、(CA) の dinucleotide repeat をプライマーにしているが、応用として (CT) や (CG) といったヌクレオチドの dinucleotide repeat をプライマーに用いることも可能である。この手法は、dinucleotide repeat にはさまれ

た領域が増幅されてくることが解っているため、RAPD 法よりは限定された断片が得られる。この手法も RAPD 法と同様、鯨類の遺伝子多型マーカーを増やしていく手段の一つとして、今後重要なものになると考えられる。

4-3. SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms) 法

SSCP 法は、1990 年に Lin³⁰⁾ によって報告され、現在、多くの動・植物で検討されている手法である。この手法は、二重鎖 DNA を一本鎖にし、部分的に二重鎖に戻るような条件にしていき、一本の DNA それ自体が立体構造をとり、ゲル電気泳動した際に、DNA 断片の泳動の速度に違いが生じることを利用したものである。これにより、SSCP 法は、1 塩基違うような DNA 塩基配列でも変異を見ることができ、観察位置に偶然使用した制限酵素認識部位が存在しない限り検出し得ない、制限酵素断片長変異を検出する、従来のマルチローカス DNA フィンガープリント法に比べ高感度である。この手法は、現在水産分野では、大原ら³⁰⁾ によってミトコンドリア DNA で良い結果が出ており、今後ゲノム DNA への応用が期待される。鯨類の DNA 解析を用いた研究にも、今後この方法が取り入れられることが期待される。

5. 鯨類におけるゲノム DNA 解析の今後の課題

冒頭でも述べたが、DNA 解析を用いた研究方法は、これまで多く行われてきた目視観察から得られている知見に、分子遺伝学的解析から得られる多くの情報を結びつけることにより、未知の部分が多い鯨類集団の社会構造研究に新しい活路を見出せるものと考えられる。

しかしながら、同時に、DNA 解析を用いた研究方法は、その得られたデータの解析の仕方次第で、全く違った結果、時には間違った結果を導き出す危険性も持っている。さらに、これらの技術はヒトを対象として開発されたため、時にはそのままでは使用できず、部分的な改良を必要とする場合も生じる。

このようなことから DNA の解析を鯨類研究の一つの手段として用いるにあたっては、鯨類でもそのまま使用できるものと、そうでないものがあることを念頭に、できないものについては技術の改良を行い、鯨類さらに

は種独自の実験及び解析方法を確立する必要がある。

また、現在、鯨類の DNA 解析を用いた研究は、基礎研究の段階では欧米の方が著しく進んでおり、日本国内での基礎研究の推進が今後不可欠になってくる。さらに、南極海の聖域化及びミンククジラの全面捕獲禁止等の国際捕鯨委員会 (International Whaling Commission) での決議や、沿岸の歯クジラ類を対象とした漁業の縮小等によって、こうした目的のための鯨類のサンプルが得にくくなっているといった問題がある。この問題の解決方法の一つとして、バイオプシーを用いたサンプル採集方法が開発されたが、現在の方法では、捕獲によって得られるものに比べ、サンプルの量、その他の情報量共に劣る。これらの問題をどう解決していくかも、今後の鯨類研究の発展の重要な課題になってくるであろう。

引用文献

- 1) Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson. *Molecular Biology of the Cell*, 2nd. ed., Garland Pub., New York., 1219 pp. (1989).
- 2) Amos, W. and A. R. Hoelzel. DNA Fingerprinting cetacean biopsy samples for individual identification. *Rep. Int. Whal. Commn.*, (Special Issue 12): 79–85 (1990)
- 3) Amos, W. and G. A. Dover. DNA Fingerprinting and uniqueness of whales. *Mammal Rev*, 20: 23–30 (1990).
- 4) Amos, W., J. A. Barrett and G. A. Dover. Breeding system and social structure in the Faroese pilot whale as revealed by DNA fingerprinting. *Rep. Int. Whal. Commn.*, (Special Issue 13): 255–268 (1991)
- 5) Amos, W., J. A. Barrett and G. A. Dover. Breeding behaviour of pilot whales revealed by DNA fingerprinting. *Heredity*, 67: 49–55 (1991).
- 6) Amos, W. and G. A. Dover. The use of satellite DNA sequences in determining population differentiation in the minke whale. *Rep. Int. Whal. Commn.*, (Special Issue 13): 235–244 (1991).
- 7) Amos, W., C. Schlotterer and D. Tautz. Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science*, 260: 670–672 (1993).
- 8) Arnason, U., M. Hoglund and B. Widegren. Conservation of highly repetitive DNA in cetaceans. *Chromosoma* (Berl), 89: 238–242 (1984).
- 9) Baker, C. S., R. H. Lambertsen, M. T. Weinrich, J. Calambokidis, G. Early and S. J. O' Brien. Molecular genetic identification of the sex of humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). *Rep. Int. Whal. Commn.*, (Special Issue 13): 105–111 (1991).
- 10) Baker, C. S., A. Perry, J. L. Bannister, M. T. Weinrich, R. B. Abernethy, J. Calambokidis, J. Line, R. H. Lambertsen, J. U. Ramirez, O. Vasquez, P. J. Clapham, A. Alling, S. J. O' Brien and S. R. Palumbi. Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8239–8243 (1993).
- 11) Baker, C. S. and S. R. Palumbi. Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science*, 265: 1538–1539 (1994).
- 12) Danielsdottir, A. K., E. J. Duke, P. Joyce and A. Arnason. Preliminary studies on genetic variation at enzyme loci in fin whales (*Balaenoptera physalus*) and sei whales (*Balaenoptera borealis*) from the North Atlantic. *Rep. Int. Whal. Commn.*, (Special Issue 13): 115–124 (1991).
- 13) Desalle, R., J. Gatesy, W. Wheeler and D. Grimaldi. DNA sequences from a fossil termite in oligomiocene amber and their phylogenetic implications. *Science*, 257: 1933–1936 (1992).
- 14) Dizon, A. E., S. O. Southern and W. F. Perrin. Molecular analysis of mtDNA types in exploited populations of spinner dolphins (*Stenella longirostris*). *Rep. Int. Whal. Commn.*, (Special Issue 13): 183–202 (1991).
- 15) Duffield, D. A. and R. S. Wells. The combined application of chromosome, protein and molecular data for the investigation of social unit structure and dynamics in

- Tursiops truncatus*. *Rep. Int. Whal. Commn.*, (Special Issue 13): 155–169 (1991).
- 16) Epplen, J. T. On simple repeated GACA/GATA sequence: a critical reappraisal. *J. Hered.*, 79: 409–417 (1988).
 - 17) Epplen, J. T., C. Kammerbauer, V. Steimle, H. Zischler, E. Albert, A. Andreas, K. Hala, I. Nanda, M. Schmid, O. Riess and K. Weising. Methodology and application of oligonucleotide fingerprinting including characterization of individual hypervariable loci. In: Rodola, B. J. (ed.) *Electrophoresis Forum '89*, Bode-Verlag, Munchen, p. 175–186 (1989).
 - 18) Epplen, J. T., H. Ammer, C. Epplen, C. Kammerbauer, R. Mitreiter, L. Roewer, W. Schwaiger, V. Steimle, H. Zischler, E. Albert, A. Andreas, B. Beyermann, W. Meyer, J. Buitkamp, I. Nanda, M. Schmid, P. Nurnberg, S. D. J. Pena, H. Poche, W. Sprecher, M. Scharthl, K. Weising and A. Yassouridis. Oligonucleotide fingerprinting using simple repeat motifs: A convenient, ubiquitously applicable method to detect hypervariability for multiple purposes. In: Burke, T., Dolf, G., Jeffreys, A. J. and W. R. Birkhauser. (eds.) *DNA fingerprinting: Approaches and Applications*, verlag basel/Switzerland, p. 50–69 (1991).
 - 19) Escorza, S., I. Nakayama and A. Kawamura. Cetacean DNA fingerprinting using the oligonucleotide (GGAT)_n as a probe. *Marine Biology*, 120: 339–342 (1994).
 - 20) 林 健志. PCR 法を用いた DNA 多型の新しい検出法. 蛋白質 核酸 酵素, 35: 3085–3090 (1990).
 - 21) Hoelzel, A. R. and W. Amos. DNA fingerprinting and 'scientific' whaling. *Nature*, 333: 305 (1988).
 - 22) Hoelzel, A. R. and G. A. Dover. Genetic differentiation between sympatric killer whale populations. *Heredity*, 66: 191–195 (1991).
 - 23) Hoelzel, A. R., J. K. B. Ford and G. A. Dover. A paternity test case for the killer whale (*Orcinus orca*) by DNA fingerprinting. *Mar. Mammal Sci.*, 7: 35–43 (1991).
 - 24) Hoelzel, A. R. Analysis of Regional mitochondrial DNA variation in the killer whale; implications for cetacean conservation. *Rep. Int. Whal. Commn.*, (Special Issue 13): 225–233 (1991).
 - 25) Hoelzel, A. R. and G. A. Dover. Mitochondrial D-loop DNA variation within and between populations of the minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Rep. Int. Whal. Commn.*, (Special Issue 13): 171–181 (1991).
 - 26) Hoelzel, A. R. Genetics and ecology of whales and dolphins. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 25: 377–399 (1994).
 - 27) Ishibashi, Y., S. Abe and M. C. Yoshida. DNA fingerprinting of animal genomes by CA-repeat primed polymerase chain reaction. *Jpn. J. Genet.*, 70: 75–78 (1995).
 - 28) Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314: 67–73 (1985).
 - 29) 景 崇洋, 中山一郎, 河村章人. マゴンドウの DNA フィンガープリント法による親子鑑定法の検討. 日本水産学会春季講演要旨集, p. 89 (1994).
 - 30) 景 崇洋. DNA フィンガープリント法によるマゴンドウの群構造解析手法に関する研究. 三重大学大学院修士論文, 44pp. (1995). (未刊)
 - 31) 神山清文, 横田真一, 近藤由佳, 保里昌彦, 神谷敏郎. イルカの父子解析への DNA フィンガープリント法の応用. DNA 多型, 2: 185–188 (1994).
 - 32) 神谷敏郎, 神山清文. 水生哺乳類の父子解析への DNA フィンガープリント法の応用. 国際海洋生物研究所報告, 5: 79–82 (1995).
 - 33) 黒崎久仁彦. DNA で探る古人骨の親子関係. 遺伝, 48: 47–51 (1994).
 - 34) Milinkovitch, M. C., G. Orti and A. Meyer. Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Nature*, 361: 346–348 (1993).
 - 35) Milinkovitch, M. C., A. Meyer and J. R. Powell. Phylogeny of all major groups of cetaceans based on DNA sequences from three mitochondrial genes. *Mol. Biol. Evol.*, 11: 939–948 (1994).
 - 36) 中山一郎. ゲノム DNA 解析の水産分野への応用. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, 24: 1–15 (1995).
 - 37) 沼知健一, 小林敬典. 海産哺乳類混獲対策調査委託事業研究結果報告書, p. 1–10 (1991).
 - 38) 大原一郎, 岡崎登志夫, 高橋秀彰, 安江 博. サケマス類ミトコンドリア DNA の SSCP (一本鎖

- DNA コンフォーメーション多型) の検出. 日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 178 (1992).
- 39) Pabbo, S. Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 1939–1943 (1989).
- 40) Palumbi, S. R. and C. S. Baker. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Mol. Biol. Evol.*, 11: 426–435 (1994).
- 41) Pastene, L. A., T. Kobayashi, Y. Fujise and K. Numachi. Mitochondrial DNA differentiation in Antarctic minke whales. *Rep. Int. Whal. Commn.*, 43: 349–355 (1993).
- 42) van Pijlen, I. A., W. Amos and G. A. Dover. Multilocus DNA fingerprinting applied to population studies of the minke whale *Balaenoptera acutorostrata*. *Rep. Int. Whal. Commn.*, (Special Issue 13): 245–254 (1991).
- 43) Rassmann, K., C. Schlotterer and D. Tautz. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12: 113–118 (1991).
- 44) Schaeff, C., S. Kraus, M. Brown, J. Perkins, R. Payne, D. Gaskin, P. Boag and B. White. Preliminary analysis of mitochondrial DNA variation within and between the right whale species *Eubalaena glacialis* and *Eubalaena australis*. *Rep. Int. Whal. Commn.*, (Special Issue 13): 217–223 (1991).
- 45) Schlotterer, C., W. Amos and D. Tautz. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, 354: 63–65 (1991).
- 46) Spilliaert, R., A. Palsdottir and A. Arnason. DNA fingerprinting in two species of baleen whales: fin (*Balaenoptera physalus*) and sei whales (*Balaenoptera borealis*) using a human hypervariable region probe, Globin 3'HVR. *Rep. Int. Whal. Commn.*, SC/41/Ba5 (1989).
- 47) Stevens, T. A., D. A. Duffield, E. D. Asper, K. G. Hewlett, A. Bolz, L. J. Gage and G. D. Bossart. Preliminary findings of restriction fragment differences in mitochondrial DNA among killer whales (*Orcinus orca*). *Can. J. Zool.*, 67: 2592–2595 (1989).
- 48) Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.*, 17: 6463–6471 (1989).
- 49) Trowsdale, J., V. Groves and A. Arnason. Limited MHC polymorphism in whales. *Immunogenetics*, 29: 19–24 (1989).
- 50) Turner, B. J., J. F. Elder, Jr., T. F. Laughlin and W. P. Davis. Genetic variation in clonal vertebrates detected by simple-sequence DNA fingerprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 5653–5657 (1990).
- 51) 和田志郎. アイソザイムおよびミトコンドリア DNA によるヒゲクジラ集団の遺伝的分化. 漁業資源研究会議報, 27: 1–16 (1991).
- 52) Wada, S., T. Kobayashi and K. Numachi. Genetic variability and differentiation of mitochondrial DNA in minke whales. *Rep. Int. Whal. Commn.*, (Special Issue 13): 203–215 (1991).
- 53) Wada, S. and K. Numachi. Allozyme analyses of genetic differentiation among the populations and species of the *Balaenoptera*. *Rep. Int. Whal. Commn.*, (Special Issue 13): 125–154 (1991).
- 54) Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6531–6535 (1990).
- 55) Woodward, S., M. J. King, N. M. Chiu, M. J. Kuchar and C. W. Griggs. Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *PCR*, 3: 244–247 (1994).