

マイクロサテライトDNAマーカーによる徳島県における海産アユと放流アユの遺伝的特性の比較

谷本 剛*¹, 渡辺 健一*²

Comparison of genetic characteristics of native amphidromous and released Ayu, *Plecoglossus altivelis* in Tokushima Prefecture by using microsatellite DNA markers

Tsuyoshi TANIMOTO*¹ and Ken-ichi WATANABE*²

Using microsatellite DNA, we compared the genetic characteristics of three forms of juvenile ayu *Plecoglossus altivelis* of native amphidromous ayu going upstream in the Yoshino, Kaihu and Hiwasa rivers, and two forms of amphidromous ayu artificially raised and landlocked ayu derived from released Lake Biwa ayu. Because the average allele sizes of three native amphidromous ayu were from 13.9 to 14.7 and the average heterozygosity were from 0.769 to 0.796, these forms have retained a high genetic variability. On the other hand, the genetic variability of the landlocked ayu derived from Lake Biwa was slightly lower in comparison with native amphidromous juvenile ayu because the average allele size and the average heterozygosity was 12.4 and 0.757, respectively. The genetic variability of the two forms of amphidromous ayu artificially raised was remarkably lower in comparison with native amphidromous juvenile ayu and landlocked ayu derived from Lake Biwa because the average allele size and the average heterozygosity was 4.6, 5.1 and 0.606, 0.571 respectively. Genetic differentiation between three forms of native amphidromous ayu was not found. But the landlocked ayu derived from Lake Biwa and the two forms of amphidromous ayu artificially raised were found to show genetic differentiation compared to all the other forms. The genetic differentiation between native amphidromous ayu and released ayu (amphidromous juvenile ayu artificially raised and landlocked juvenile ayu derived from Lake Biwa) was clearly different.

Key words: Genetic characteristics 遺伝的特性; Microsatellite DNA マイクロサテライト DNA; *Plecoglossus altivelis* アユ

アユ *Plecoglossus altivelis* は我国において重要な水産対象魚種であり、釣りの対象種としても人気が高いことから、資源の維持・増大のために様々な由来を持つ種苗が全国の河川に放流されている。本県の各河川においても、毎年大量の琵琶湖産・人工産の稚アユが放流されており、今後この様な大量放流により遺伝的にも生理・生態的にも異なる可能性をもつ集団が、移植された先で在来集団と交雑することによる遺伝的影響が懸念される。

この様な背景のもと、放流アユが在来集団にどのような遺伝的影響を及ぼすか検討することは、遺伝的保全の観点から見て極めて重要な課題であり、そのためにはまず在来の海産アユとそこに放流されるアユの遺伝的特性について把握しておく必要がある。そこで本研究では変異性が高く、高感度の核ゲノムマーカーであるマイクロサテライトDNA(MS-DNA)マーカーを用いた分析をおこない、徳島県におけるこれら集団の遺伝的特性に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

材料と方法

標本 本研究で調べたアユ標本の採集地と採集データを Fig. 1 および Table 1 に示した。海産アユは主に琵琶湖産アユが放流されている吉野川と、人工産アユのみ放流されている日和佐川および海部川の3河川で採集した。放流アユは吉野川に放流用として導入された琵琶湖産アユと、徳島県栽培漁業センターで継代飼育されている人工種苗(日和佐川系継代10代目・吉野川系継代12代目)を用いた。なお、海産アユは放流アユとの混獲を避けるため、放流がおこなわれる以前に遡上してきたアユをたも網を用いて採集した。採集後の標本はDNAの抽出をおこなうまで、-80℃で保存した。

マイクロサテライトDNA分析 全DNAは供試魚の尾鱗片からTNE5-Urea緩衝液を用いたフェノール・クロロホルム法(Ashida *et al.* 1996)により抽出し、PCRをおこなうまで、4℃で保存した。抽出したDNAを鋳型として、Takagi *et al.* (1999)により開発されたPal-1~7の7ローカ

*¹ 徳島県立農林水産総合技術センター水産研究所 (Fisheries Research Institute, Tokushima Agriculture, Forestry, and Fisheries Technology Center, Hiwasa, Kaifu, Tokushima 779 - 2304, Japan)

*² 徳島県立農林水産総合技術センター水産研究所 鳴門分場 (Fisheries Research Institute Naruto Branch, Tokushima Agriculture, Forestry, and Fisheries Technology Center, Seto, Naruto, Tokushima 771 - 0361, Japan)

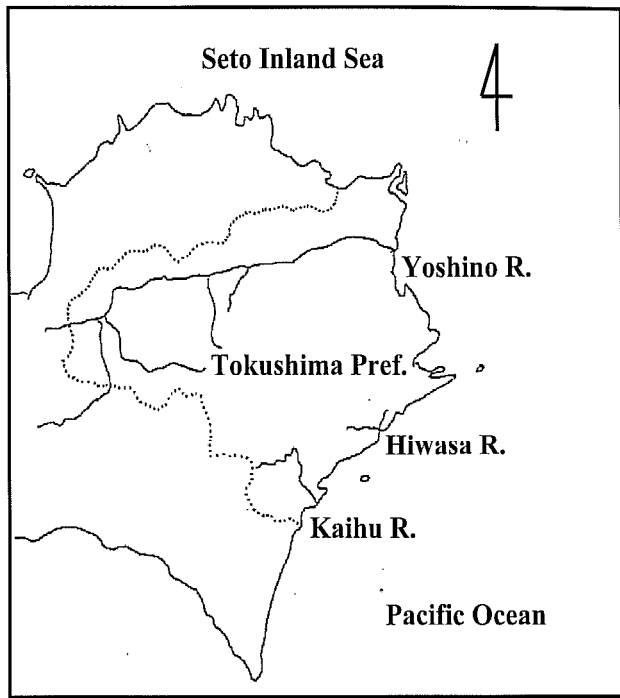


Fig. 1 Sampling locations of ayu examined in this study.

Table 1 Collection date of ayu examined in this study.

Location	Date of collection	Sample size	Mean body length (mm ± SD)
Yoshino R.	2002.3.25	50	81.0 ± 5.7
Hiwasa R.	2002.4.30	50	83.0 ± 10.2
Kaihu R.	2002.4.2, 4.9	50	110.2 ± 11.3
Lake Biwa	2002.4.20	50	107.0 ± 8.5
Artificially raised (Hiwasa R. strain) ^{*1}	2002.2.20	50	52.5 ± 4.9
Artificially raised (Yoshino R. strain) ^{*2}	2002.5.1	50	70.9 ± 8.5

*1 The 10th generation.

*2 The 12th generation.

スの領域増幅用プライマーを用いてPCRをおこなった。なお、プライマーにはリバースプライマーの5'末端にビオチンをラベルしたのものを用いた。PCR反応液は、1検体あたりDNA溶液1μl(10ng/μl)、10×PCRバッファー(TaKaRa社)0.55μl、dNTPMixture(2.5mM each, TaKaRa社)0.44μl、ホルムアミド0.05μl、フォワードおよびリバースプライマー(10pmol/μl)各0.05μl、rTaqポリメラーゼ(5units/μl, TaKaRa社)0.025μl、超純水3.1μlとした。PCRの温度条件は94℃1分、53℃30秒、72℃30秒のサイクルを7回おこなった後、90℃30分、53℃30秒、72℃30秒のサイクルを33回おこなった。PCR産物を95℃でヒートショックを加えて一本鎖とした後、マニュアルDNAシーケンサーSQ3(Hoeffer社)を用いて、8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動をおこなった。通電は50Wの定電圧で3時間30分とした。泳動終了後、DNAをPhototope-Star Detection Kit(New England Biolabs社)

を用いたケミルミネッセンス法(Perez-Enriquezら1998)により検出した。アリルのサイズはシークエンサーSequencing High-Plus-反応パーツセット(TOYOBO社)と比較して決定した。

解析 各標本の遺伝的変異性について検討するため、検出されたアリルの頻度をもとに、GENEPOP(Raymond and Rousset 1995)ソフトウェアを用いてアリル数、ヘテロ接合体率(観察値および期待値)などの遺伝的変異性に関する指数を算出するとともに、マルコフ連鎖法によるExact testによりハーディ・ワインベルグ平衡からのずれの有無について検討した。また、ARLEQUIN ver. 2.000(Schneider et al. 2000)ソフトウェアを用いて、Pairwise-FSTによる各集団間の遺伝的分化指数の検定をおこなった。

結果

マイクロサテライト7ローカスにおける各標本群の遺伝的変異性をTable 2に示した。海産アユである吉野川、日和佐川および海部川の標本群は、平均アリル数がそれぞれ14.0、14.7、13.9、平均ヘテロ接合体率(期待値)はそれぞれ0.796、0.769、0.790となり、各標本群とも高い遺伝的変異性を有していた。

一方、放流アユである琵琶湖産標本群は、平均アリル数が12.4、平均ヘテロ接合体率(期待値)は0.757となり、高い遺伝的変異性を有していたものの、海産標本群と比較して若干低い値を示した。また、人工産の日和佐川系継代10代目および吉野川系継代12代目の標本群は、平均アリル数が4.6、5.1、平均ヘテロ接合体率(期待値)は0.606、0.571となり、両系統の標本群とも海産、琵琶湖産標本群と比較して極めて低い値を示した。

各標本群がハーディ・ワインベルグの平衡化にあるかどうか検定をおこなった結果、海部川標本群のPal-2およびPal-3、人工産の日和佐川系標本群のPal-2、吉野川系標本群のPal-2において有意なずれが認められた。また、全てのローカスをまとめた検定については、海部川標本群と人工産の日和佐川系標本群において有意なずれが認められた。

各標本群間の遺伝的分化指数(FST)の検定をおこなった結果をTable 3に示した。海産アユの吉野川、日和佐川および海部川の標本群においては、各標本群間に有意差は認められなかった(P=0.404~0.594)。一方、琵琶湖産および人工産の日和佐川、吉野川両系統の標本群においては、各々全ての標本群に対して有意な差が認められた(全てP=0.000)。

考察

MS-DNA分析によりアユ標本群の遺伝的変異性を調べた結果、3河川(海産)の標本群は平均アリル数、平均ヘテロ接合体率ともに同程度の値を示し、これら河川におけるアユの遺伝的変異性はほぼ同じ水準であることが明らかとなった。これらの値は既報のMS-DNA分析による結果

Table 2 Genetic variability at 7 microsatellite DNA loci in the ayu specimen groups.

Location		Loci							Mean	
		<i>Pal-1</i>	<i>Pal-2</i>	<i>Pal-3</i>	<i>Pal-4</i>	<i>Pal-5</i>	<i>Pal-6</i>	<i>Pal-7</i>		
Yoshino R.	No. of samples	50	50	50	50	50	50	50		
	No. of allele	20	15	18	28	3	7	7	14.0	
	Range of allele size (bp)	100-144	160-196	216-252	127-187	211-217	213-225	137-149		
	Heterozygosity	(Ho)	0.920	0.760	1.000	0.900	0.480	0.720	0.780	0.794
		(He)	0.933	0.894	0.930	0.925	0.424	0.749	0.719	0.796
(Ho/He)		0.986	0.850	1.075	0.973	1.132	0.961	1.085	1.009	
Hiwasa R.	No. of samples	50	50	50	50	50	50	50		
	No. of allele	21	19	18	27	3	8	7	14.7	
	Range of allele size (bp)	94-140	160-204	216-252	126-200	211-217	213-227	137-149		
	Heterozygosity	(Ho)	0.960	0.940	0.920	0.980	0.340	0.740	0.820	0.814
		(He)	0.916	0.893	0.935	0.929	0.321	0.672	0.714	0.769
(Ho/He)		1.048	1.053	0.984	1.055	1.059	1.101	1.148	1.064	
Kaihu R.	No. of samples	50	50	50	50	50	50	50		
	No. of allele	16	17	17	28	3	8	8	13.9	
	Range of allele size (bp)	96-130	160-198	216-252	135-183	211-217	213-227	139-155		
	Heterozygosity	(Ho)	0.880	0.800	0.900	0.920	0.380	0.780	0.740	0.771
		(He)	0.910	0.878*	0.929*	0.946	0.346	0.779	0.745	0.790*
(Ho/He)		0.967	0.911*	0.969*	0.973	1.098	1.001	0.993	0.987*	
Lake Biwa	No. of samples	50	48	50	50	50	50	50		
	No. of allele	17	15	14	27	3	5	6	12.4	
	Range of allele size (bp)	94-138	160-206	220-248	136-200	211-223	215-223	139-149		
	Heterozygosity	(Ho)	0.880	0.833	0.860	0.880	0.480	0.540	0.740	0.745
		(He)	0.907	0.879	0.855	0.917	0.530	0.523	0.687	0.757
(Ho/He)		0.970	0.948	1.006	0.960	0.906	1.033	1.077	0.986	
Artificially raised (Hiwasa R. strain)	No. of samples	50	50	50	49	50	50	50		
	No. of allele	6	5	7	4	3	3	4	4.6	
	Range of allele size (bp)	102-130	166-182	220-250	141-180	211-217	217-221	141-149		
	Heterozygosity	(Ho)	0.620	0.520	0.880	0.592	0.480	0.600	0.280	0.567
		(He)	0.723	0.649**	0.820	0.690	0.465	0.614	0.283	0.606**
(Ho/He)		0.858	0.801**	1.073	0.858	1.032	0.977	0.989	0.941	
Artificially raised (Yoshino R. strain)	No. of samples	50	48	49	50	50	50	50		
	No. of allele	4	5	7	9	3	3	5	5.1	
	Range of allele size (bp)	112-126	166-188	220-250	140-192	211-217	217-221	139-149		
	Heterozygosity	(Ho)	0.700	0.375	0.735	0.640	0.200	0.480	0.580	0.530
		(He)	0.675	0.514**	0.804	0.695	0.184	0.509	0.616	0.571
(Ho/He)		1.037	0.730**	0.914	0.921	1.087	0.943	0.942	0.939	

* Departure from Hardy-Weinberg equilibrium * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Fisher Exact Test)

Table 3 Pairwise comparison of F_{ST} among ayu specimen groups.

	Yoshino R.	Hiwasa R.	Kaihu R.	Lake Biwa	Artificially raised (Hiwasa R. strain)	Artificially raised (Yoshino R. strain)
Yoshino R.	—					
Hiwasa R.	0.0000	—				
Kaihu R.	0.0005	0.0000	—			
Lake Biwa	*	*	*	—		
Artificially raised (Hiwasa R. strain)	0.0964	0.0939	0.0953	0.1752	—	
Artificially raised (Yoshino R. strain)	0.0988	0.0844	0.0838	0.2081	0.1127	—

* Significant difference ($P < 0.01$)

(Takagi *et al.* 1999) と同様の値を示しており、他地域の海産アユ集団と比較しても遜色ない充分な遺伝的変異性を保有しているものと考えられた。

琵琶湖産標本群については、平均アレル数、平均ヘテロ接合体率ともに海産標本群と比較して若干低い値を示したことから、海産アユと同じ野性集団であるにも関わらず、琵琶湖産アユは遺伝的変異性がやや低下していることが示唆された。人工産標本群においては、両系統とも海産および琵琶湖産アユの野性集団と比較して、遺伝的変異性が著しく低下していることが明らかになった。このような遺伝的変異性の低下が認められたことは、種苗生産過程における少数の親魚による継代交配の繰り返しに起因するものと考えられる。

ハーディ・ワインベルグ平衡からの有意なずれは、吉野川、日和佐川および琵琶湖産の標本群では認められず、任意交配をおこなっている集団から採集した標本と考えられた。一方、海部川および人工産両系統の標本群では、有意なずれが認められた。ハーディ・ワインベルグ平衡からの著しいずれが認められる場合には、異集団の混合や近親交配、さらには異集団間の交雑を想定する必要があるとされるが、海部川標本群においてはごく僅かなずれ ($P = 0.042$) であったため、このような可能性は低いものと思われる。また、人工産標本群は両系統とも遺伝的変異性の著しい低下とともに、一部または全てをまとめたローカスにおいて、ヘテロ接合体率の観測値がハーディ・ワインベルグ平衡下における期待値から大きくずれていたことから、近親交配が進行している可能性が示唆された。

各標本群間の遺伝的分化指数の検定をおこなったところ、海産アユの標本群に遺伝的な分化はみられなかった。このことは、本県の河川に遡上してくる同一年級群の海産アユの遺伝子組成はほぼ均質であったことを示している。一方、琵琶湖産および人工産両系統の各標本群は全ての標本群との間に遺伝的な分化がみられた。この結果は、海産アユと琵琶湖産アユとは遺伝的形質に差異がある

とする既報の結果 (谷口ら 1983, Takagi *et al.* 1999) を支持するものであり、本県における海産アユと琵琶湖産アユにも大きな遺伝的分化が生じていることを強く示唆している。また、人工産両系統の標本群は、海産の各標本群間との F_{ST} 値が琵琶湖産と海産の各標本群間のそれと比較して大きな値を示したことから、海産標本群との遺伝的分化が琵琶湖産標本群よりさらに拡大していることが明らかになった。これは、人工産アユが吉野川と日和佐川の海産アユを由来として生産されたにも関わらず、種苗生産過程における遺伝的変異性の著しい低下により、本来の海産アユとは大きくかけ離れた遺伝子組成を形成したためと考えられる。さらに、両系統で大きな遺伝的分化がみられた結果は、本来同質の遺伝子組成を持つと考えられる海産アユを親魚に用いて生産したロット間でも、短期間のうちに遺伝的組成に大きな差異が生じる可能性があることを示唆している。種苗生産の現場では、特定の形質や性質をもつ少数の親を人為的に選択することが多い。そこで生産されるアユ人工種苗は、近親交配や遺伝的浮動により、偏った遺伝子を持つ個体となる可能性が高いと考えられる。

以上のように、海産アユと放流アユである琵琶湖産および人工産アユでは、遺伝的特性が大きく異なっていることが明らかとなった。今後、このような放流アユと在来アユとの交雑によって、固有の遺伝形質の消失や遺伝的変異性の低下にともなう環境適応性の低下などの遺伝的攪乱を引き起こす可能性が危惧される。このような遺伝的影響を検討するには、本研究で得られた結果をもとに、今後も高感度 DNA マーカーである MS-DNA を用いて、これら集団の遺伝的特性を経時的にモニタリングしていく必要がある。

謝 辞

MS-DNA の分析と取りまとめに際して、多大な指導と協力を賜った東北大学大学院農学研究所集団遺伝情報システム学研究室の谷口 順彦博士および池田 実博士を始めとする研究室の皆様にご心から感謝申し上げます。また、

アユ採集に際して、理解と協力をいただいた海部川漁業協同組合および吉野川中央漁業協同組合にお礼申し上げます。なお、本研究は独立行政法人水産総合研究センターの委託事業である健全な内水面生態系復元等推進委託事業「アユの遺伝的多様性保全指針作成調査」に基づいて実施した。

文 献

- Asahida T., T.Kobayashi, K.Saitou and I. Nakayama: Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *fish. sci.*, **62**, 727 - 730 (1996)
- Takagi M., E.Shoji and N. Taniguchi: Microsatellite DNA polymorphism to reveal genetic divergence in ayu, *Plecoglossus altivelis*. *fish. sci.*, **65** (4), 507 - 512 (1999).
- Perez-Enriquez R, 竹村 昌樹, 谷口 順彦: マダイにおけるケミルミネッセンスを用いたマイクロサテライト DNA の検出: 実践マニュアル. 水産育種, **26**, 73 - 79 (1998)
- Raymond M and F. Rousset: GENEPOP (version 1.2) population genetics software for exact test and ecumenism. *J. Hered.*, **86**, 248 - 249 (1995).
- Schneider S., D. Roessli and L.Excoffier: ARLEQUIN, version 2.000. A software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.* (2000).
- 谷口 順彦, 関 信吾, 稲田 善和: 両側回遊型, 陸封型および人工採苗アユ集団の遺伝変異保有量と集団間の分化について. 日本水産学会誌, **49** (11), 1655 - 1663 (1983).