

ミトコンドリアDNAの塩基配列分析による 養殖ニジマス系統の遺伝的集団構造

中村永介*

養殖ニジマスの系統ごとの遺伝的特徴を把握することを目的として、ミトコンドリアDNA D-loop領域付近の部分塩基配列によるハプロタイプ型から遺伝的集団構造を解析した。国内外34集団331個体のニジマスから、14のハプロタイプが確認され、これらはⅠ～Ⅲの3つのグループに分けられた。34集団のうち大部分を占める27集団がグループⅠに属していたことから、グループⅠに属するニジマスが広く養殖されているものと推察された。静岡県水産技術研究所富士養鱒場が保有するニジマス4系統のうち、標準的なニジマスとして飼育しているN系はグループⅠに属し、導入由来が異なる他の3系統は共通したハプロタイプを持たず、属するグループも異なっていたことから、これらの系統は遺伝的に離れているものと考えられた。

キーワード：ニジマス，ミトコンドリアDNA，系統，養殖，遺伝的集団構造

ニジマス *Oncorhynchus mykiss* は、北米原産のサケ科魚類であり、1877年に初めて日本に移入された。その後、全国各地で養殖され、育種研究が行われている。静岡県富士養鱒場(現静岡県水産技術研究所富士養鱒場，以下富士養鱒場とする)では、1933年に滋賀県醒井養鱒場から初めてニジマスを導入して以来、その継代と育種を続けている¹⁾。ニジマスの育種研究では、優良品種の開発を目的として、これまでに様々な系統の作出が試みられているが、それらについて遺伝的な特徴を明らかにした報告事例は少ない。

生物種の遺伝的集団構造を明らかにすることは、系統進化の過程を把握し、品種改良を行っていく際の重要な情報となり得る。ミトコンドリア(mt)DNAは、核DNAと比べて進化速度が速く変異に富むこと、DNA間の相同組換えを起こさない母系遺伝をすること等の特徴を持つ。そのため、mtDNAの解析は、集団間の遺伝的変異を評価し、集団構造の解析を行う手法として有効^{2,3)}であり、放流河川におけるイワナの遺伝的集団構造⁴⁾やカラフトマス年級群の比較⁵⁾などに用いられた。ニジマスにおいては、mtDNAの塩基配列が公開されており⁶⁾、北米の河川間における集団構造の解析が行われている⁷⁾。一方、国内の

ニジマス養殖集団に対する遺伝的集団構造解析の報告はない。

そこで、本研究では、養殖ニジマス系統の遺伝的特徴を把握することを目的として、mtDNAの部分塩基配列によるハプロタイプ型から遺伝的集団構造を解析した。

材料及び方法

1 サンプル

富士養鱒場で標準的なニジマスとして保有している魚群(N系)5集団⁸⁾と、これとは導入由来が異なり、系統内で継代飼育を続けてきた3系統(ドナルドソン系(D系)、スチールヘッド系(S系)、カナダ系(C系)：株式会社林養魚場提供)5集団及び国内外の各地で養殖されている24集団の計34集団を収集した(表1)。富士養鱒場産以外の国内産20集団は、産地の水産試験場等から譲り受けた。また、国外産集団については、小売店で原産国が表記されている切身を購入した。年級が異なる集団、同一年級であっても飼育管理している池が異なる集団は別の集団とした。また、他のサケ科魚類5種(シロザケ *Oncorhynchus keta* , ギンザケ *Oncorhynchus kisutch* , アマゴ

2016年1月28日受理

静岡県水産技術研究所(本所)業績第1159号

本論文の概要は平成27年度日本水産学会春季大会において発表した。

*静岡県水産技術研究所深層水科

Oncorhynchus masou ishikawae, サクラマス *Oncorhynchus masou masou*, ヒメマス *Oncorhynchus nerka*)を解析比較用のサンプルとした。収集した魚体又は鱭の一部を99.5%エタノールで固定したのち、分析まで常温で保存した。

表1 解析ニジマス集団及び比較用サケ科魚類一覧

集団名	産地	備考
FTH-N12	静岡県(富士養鱒場)	標準魚(N系)・2012年産
FTH-N13	静岡県(富士養鱒場)	標準魚(N系)・2013年産
FTH-N14	静岡県(富士養鱒場)	標準魚(N系)・2014年産
FTH-NA1012	静岡県(富士養鱒場)	標準魚(N系)・アルビノ
FTH-NH10	静岡県(富士養鱒場)	標準魚(N系)
FTH-D10	静岡県(富士養鱒場)	ドナルドソン系(D系)・2010年産
FTH-D11	静岡県(富士養鱒場)	ドナルドソン系(D系)・2011年産
FTH-D12	静岡県(富士養鱒場)	ドナルドソン系(D系)・2012年産
FTH-S12	静岡県(富士養鱒場)	スチールヘッド系(S系)・2012年産
FTH-C12	静岡県(富士養鱒場)	カナダ系(C系)・2012年産
So-K11	静岡県	-
So-K12M	静岡県	-
So-K13	静岡県	-
So-KK01	静岡県	-
So-T01	静岡県	-
Ac-H1	愛知県	-
Ac-H2	愛知県	-
Mz-N	宮崎県	-
Ng-N	長野県	-
Ng-C25	長野県	-
Ng-S92	長野県	-
Ng-S95	長野県	-
Ng-AA4	長野県	-
Ng-AB7	長野県	-
Sg-N	滋賀県	-
Yn-OD	山梨県	-
Yn-BD	山梨県	-
TUF-K	他県産(非公開)	-
TUF-N	他県産(非公開)	-
TUF-M	他県産(非公開)	-
Can-13	カナダ	-
Chi-13	チリ	-
Nor-13	ノルウェー	-
Aus-13	オーストラリア	-
Oke	不明	シロザケ
Oki	チリ	ギンザケ
Omi	静岡県(富士養鱒場)	アマゴ
Omm	静岡県	サツキマス
One	静岡県(富士養鱒場)	ヒメマス

2 分析

粗DNAの抽出にはWizard Genomic DNA Purification Kit(PROMEGA社)を用い、定法に従って実施した。

mtDNAの増幅については、displacement loop(D-loop)領域の塩基配列を指標とした2種類のプライマーDL1F(5'-CACCCCTTAACCTCCCAAAGCT-3')とDL4R(5'-GTCCGCTTAACAGCTTCAGTG-3')⁷⁾を用い、約1kbpの領域を対象とした。PCR反応にはPrimeSTARTM HS DNA polymerase(タカラバイオ株式会社)を用いた。PCRにはGeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems)を用い、反応条件は、98℃10秒間の熱変性後、98℃10秒間、55℃15秒間、72℃2分間を30サイクル、その後72℃5分間とした。PCR産物6μLに5μLの40% PEG6000及び5μLの5M NaClを加え、未反応のdNTP及びプライマーを除去した。電気泳動サンプルについては、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用い、定法により調整した。

電気泳動及び塩基配列の決定にはABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyser(Applied Biosystems)を使用した。決定した各塩基配列にはハプロタイプ名を付け、日本DNAデータバンク(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)に登録した(Accession number : LC113971~LC113984)。

3 データ解析

塩基配列のアライメントにはMEGA 6.069)を用い、ハプロタイプ間の系統解析は最尤法により行った。ハプロタイプ多様度(h), 塩基多様度(π)の計算にはArlequin ver.3.5¹⁰⁾を用いた。また、富士養鱒場が保有するニジマス4系統について、遺伝的分散分析(AMOVA)¹¹⁾を行った。

結果

本研究で得られた塩基配列から、D-loop領域付近の1,095~1,096塩基対を相同領域として解析に用いたところ、13か所の塩基の置換及び1か所の欠損が観察され、14のハプロタイプが確認された(表2)。また、ハプロタイプ間の塩基置換数は最大7か所であった。

表2 mtDNA D-loop領域におけるハプロタイプごとの塩基配列の置換・欠損サイト

Type	1	2	3	3	6	6	6	7	9	9	0	0	0	0	0	0	0	4	References
Hap1	A	T	T	T	G	C	T	T	A	T	T	A	A	G					AF044145
Hap2	C	
Hap3	G	
Hap4	G	.	.	.	G	
Hap5	A	AF044149
Hap6	.	A	.	C	A	
Hap7	.	A	.	C	G	AF044165	
Hap8	.	A	.	C	G	A	AF044133	
Hap9	.	A	.	C	.	.	.	C	.	.	.	G	AF044130	
Hap10	.	A	A	C	.	.	.	C	.	.	.	G		
Hap11	.	A	.	C	.	T	.	.	.	C	C	G		
Hap12	.	A	.	C	.	T	.	C	.	.	.	G		
Hap13	.	G	.	C	.	T	.	C	.	.	.	G		
Hap14	G	G	.	C	.	T	G		

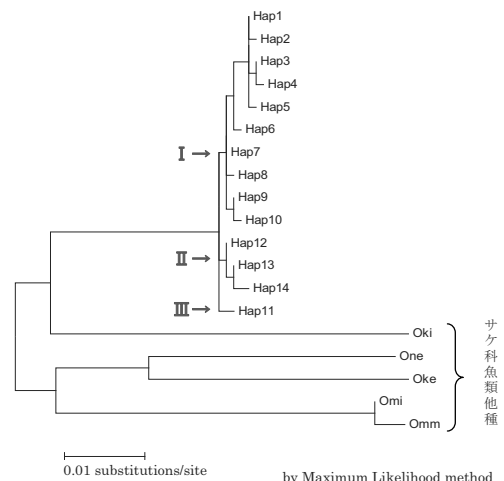


図1 mtDNA D-loop領域のハプロタイプ型による系統樹

ハプロタイプの塩基配列に基づいた系統樹を作成したところ、Hap1~10(グループ I)とHap12~14(グループ II)、Hap11(グループ III)の3グループに大きく分けられた(図1)。

各集団におけるハプロタイプの出現頻度をみると、D系の3集団は、グループ II に属するHap12と13のみが出現した(表3)。また、長野県産の2集団及びチリ産において同じグループ II のHap14が出現した。N系5集団ではHap1, 4, 5, 7, 9が出現し、いずれもグループ I に属していた。このうちFTH-N12と13ではHap5の出現割合が高かったが、FTH-N14ではHap7のみが出現した。また、他産地の集団においても大部分がグループ I に属するハプロタイプ型が出現し、今回用いた集団の4分の3以上を占める27集団がグループ I に属していた。C系もHap10が出現し、グループ I に属したが、グループ I に属する他の集団ではHap10は出現しなかった。S系にはHap11が出現し、今回用いた集団では唯一グループ III に属した。

解析したサンプル数が2以上である24集団のうち、複数のハプロタイプが出現した11集団のハプロタイプ多様度は

0.295~0.810であり、塩基多様度($\pi \times 100$)は、0.039~0.256であった。

富士養鱒場のニジマス4系統を対象にした集団全体のFst値は0.923であり、AMOVAにより検出された遺伝的変異のうち35.7%が系統間、56.7%が系統内の変異であった(表4)。

考 察

本研究では、mtDNAの分析塩基配列として、D-loop領域を対象とした解析を行った。D-loopは遺伝的機能を持たない調節領域の配列であることから、その進化速度は核DNAと比べて速く、0.98~2.71%/100万年¹²⁾とされ、種内変異標識としてよく用いられている。ニジマスが国内で養殖され始めてから100年以上が経過しているが、D-loop領域の進化速度を考えると、組換えにより移入当初のハプロタイプが大きく変化することは考えにくい。

富士養鱒場において標準的なニジマスとして飼育され

表3 mtDNA D-loop領域におけるハプロタイプ頻度および集団内の遺伝的変異性

集団名	N	ハプロタイプ														h	$\pi \times 100$	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
FTH-N12	6					0.83		0.17									0.333	0.122
FTH-N13	13	0.08				0.85		0.08									0.295	0.068
FTH-N14	90							1.00									0.000	0.000
FTH-NA1012	14	0.07				0.29				0.64							0.539	0.221
FTH-NH10	1				1.00												-	-
FTH-D10	8														1.00		0.000	0.000
FTH-D11	4														1.00		0.000	0.000
FTH-D12	92												0.30	0.70			0.428	0.039
FTH-S12	6												1.00				0.000	0.000
FTH-C12	8									1.00							0.000	0.000
So-K11	5									1.00							0.000	0.000
So-K12M	5	0.20				0.60				0.20							0.700	0.201
So-K13	3					0.33				0.67							0.667	0.244
So-KK01	5	0.20											0.80				0.400	0.146
So-T01	1									1.00							-	-
Ac-H1	7				1.00												0.000	0.000
Ac-H2	7			0.29		0.43	0.14			0.14							0.810	0.235
Sg-N	5	0.40				0.20				0.40							0.800	0.256
Ng-N	3									1.00							0.000	0.000
Ng-C25	1	1.00															-	-
Ng-S92	1									1.00							-	-
Ng-S95	1	1.00															-	-
Ng-AA4	1															1.00	-	-
Ng-AB7	1														1.00		-	-
Yn-OD	6									1.00							0.000	0.000
Yn-BD	4	0.25								0.75							0.500	0.137
Mz-N	7				0.29								0.71				0.476	0.217
TUF-K	4									1.00							0.000	0.000
TUF-N	7									1.00							0.000	0.000
TUF-M	8									1.00							0.000	0.000
Can-13	4									1.00							0.000	0.000
Chi-13	1															1.00	-	-
Nor-13	1		1.00														-	-
Aus-13	1									1.00							-	-

N : サンプル数 h : ハプロタイプ多様度 π : 塩基多様度

表4 富士養鱒場の保有する養殖ニジマス集団における遺伝的分散分析 (AMOVA) の結果

分析区分	変異の割合 (%)			Fst	P < 0.001
	系統間変異	系統内集団間変異	集団内変異		
ニジマス4系統 (N系, D系, S系, C系)	35.7	56.6	7.7	0.923	

ているN系及び本研究に用いたニジマス集団の大部分がグループ I に属するハプロタイプ型であった。さらに、原産地であるカリフォルニア周辺の河川のニジマスからも Hap1, 5, 7, 8 及び9が出現している⁷⁾(表2)。このように、グループ I は国内外を問わず、広域に分布していることが推察される。これに対し、グループ II と III をみると、D系からHap12と13、長野県産の2集団とチリ産の1集団からHap14, S系からHap11が出現しているのみであることから、同じ系統内で継代が行われてきたものと考えられる(表3)。富士養鱒場のニジマス4系統に共通したハプロタイプは存在せず、AMOVAにより検出された系統間の遺伝的変異も35.7%と大きかった(表4)。また、同一系統内における集団間の遺伝的変異も56.6%と大きかった。これに対し、集団内の遺伝的変異は7.7%と小さく、確認されたハプロタイプは1集団当たり1~3タイプであった(表3)。特に系統内で継代飼育を続けてきたD系、C系、S系の3系統はFTH-D12を除き、単一のハプロタイプであった。ニジマスは、天然海域への放流を目的として遺伝的多様性が配慮されているマダイやヒラメと異なり、好まれる形質を持った数個体の雌を親魚として継代されることが多いため、その過程においてハプロタイプが単一化しているものと考えられる。ハプロタイプの変異の程度を示す塩基多様度($\pi \times 100$)は、遺伝的多様性保有量の尺度となるが、今回得られた値0.039~0.256は、サクラマスとヤマメの養殖系統で得られた値0.170~0.253¹³⁾に近く、養殖されたサケ科魚類としては一般的であるものと考えられた。

今回、Hap1, 5, 7, 9のような、各地の集団で広く存在するハプロタイプが確認された。これは、同じハプロタイプを持つ魚がそれぞれ別に導入された結果とも考えられるが、ニジマス養殖では発眼卵や種苗を他所から導入して養殖することが多いことから、今回の結果は、魚の交流が広く行われてきたことを示していると考えられる。一方、選抜育種による形質の固定を目的として継代を進めてきた系統は、D系のように独立した少数のハプロタイプから構成されるものと考えられる。一般に、系統・品種の作出のために選抜育種を行う場合は、特定少数の母系を起源として行うが、今回示されたハプロタイプの構成は、このことをよく示しているといえる。

本研究により、富士養鱒場において養殖されているニジマス系統の遺伝的集団構造は概ね明らかとなった。また、他県産魚、輸入魚との類縁関係についても一定の知見が得られた。ニジマスの育種研究が始まってから様々な特性を持つ系統が作出されているが、今後は、それらの遺伝的情報を活用して、固定された各系統の有益な形

質を残しつつ、改良を進めることが必要と考えられる。

本研究を実施するに当たり、サンプルの収集及び提供に御協力いただいた愛知県水産試験場内水面漁業研究所三河一宮指導所、滋賀県水産試験場醒井養鱒場、長野県水産試験場、宮崎県水産試験場小林分場、山梨県水産技術センター忍野支所及び富士養鱒場の職員一同に御礼申し上げる。

文 献

- 1) 鈴木克宏・花田博・五十嵐保正・渡井健之(1993): 富士養鱒場六十年のあゆみ, 静岡県水産試験場富士養鱒場, 100pp.
- 2) Brykov V. A., Polykov N., Skurikhina L. A., Kukieysky A. D. (1996): Geographical and temporal mitochondrial DNA variability in populations of pink salmon, *J. Fish Biol.*, **48**, 899~909.
- 3) Brown W. M., George M. Jr., Wilson A. C. (1979): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1967~1971.
- 4) 樋口正仁・佐藤雍彦・野上泰宏・兵藤則行(2012): ミトコンドリアDNA分析による放流河川におけるイワナ (*Salvelinus leucomaenis*) の遺伝的集団構造, 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, **36**, 1~5.
- 5) 山田綾・越野陽介・工藤秀明・阿部周一・荒井克俊・帰山雅秀(2012): ミトコンドリアDNA分析によるカラフトマス *Oncorhynchus gorbuscha* 集団構造の年級群比較, *日本水産学会誌*, **78**(5), 973~975.
- 6) Digby TJ, Gray MW, Lazier CB (1992): Rainbow trout mitochondrial DNA: sequence and structural characteristics of the noncoding control region and flanking tRNA genes, *Gene.*, **113**, 197~204.
- 7) M.J. Bagley and G.A.E. Gall (1998): Mitochondrial and nuclear DNA sequence variability among populations of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Molecular Ecology.*, **7**, 945~961.
- 8) 望月万美子・阿久津哲也・鴻上繁・岡本信明・吉水守(2007): 染色体操作により得られたニジマス2系統の耐病性ならびに再生産形質に見られた差異, *日本水産学会誌*, **73**(5), 844~850.
- 9) Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A. and Kumar S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.

Molecular Biology and Evolution,**30**,2725~2729.

- 10) Excoffier L.,Lischer HEL(2010): Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows,Mol. Ecol. Resources.,**10**,564~567.
- 11) Excoffier L.,P. E. Smouse and J. M. Quattro(1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data,Genetics,**131**,479~491.
- 12) Takahashi H. and Goto A.(2001): Evolution of East Asian ninespine sticklebacks as shown by mitochondrial DNA control region sequences,Mol. Phylogenet. Evol.,**21**,135~155.
- 13) 木島明博(1991): ミトコンドリアDNAによる魚介類の集団解析および育種への応用,水産育種,**16**,9~17.

Genetic population structure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strain in aquaculture from mitochondrial DNA sequences

Eisuke Nakamura

Abstract We examined the genetic population structure of a strain of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using direct DNA sequencing of the mitochondrial DNA control region. Fourteen mtDNA haplotypes were obtained from 34 populations (331 samples) of trout farms and clustered into 3 groups I-III. As 27 of the 34 populations belonged to group I, we suggest that the 34 populations of cultured rainbow trout belong to group I.

As group I does not share common haplotypes with the rainbow trout from Shizuoka Prefectural Research Institute of Fishery, N ancestry, the N ancestry, which is the average of 3 different strains of rainbow trout, was also different. These results suggest the occurrence of genetic differentiation between the 4 rainbow trout strains leading to their genetic divergence.

Key words: Rainbow trout, mitochondrial DNA, strain, aquaculture, population structure