

興津川に遡上する天然アユと鶴田ダム湖由来人工種苗の遺伝的特徴とその識別

川嶋尚正^{*1}・鈴木邦弘^{*2}

興津川に遡上する天然アユと鶴田ダム湖由来で継代数の異なる3系統(F2, F4, F12)の人工種苗について、それらの遺伝的特徴を明らかにし、DNAマーカーによる識別の可否を検討した。その結果、興津川に遡上した天然アユのアレル出現頻度は、3系統の人工種苗よりも多く、既報と類似していた。天然魚と3系統の人工種苗の平均ヘテロ接合体率はH-W平衡から逸脱しておらず、正常な交配集団と判断された。Pairwise Fst値から、天然魚と3系統の人工種苗はそれぞれ独立した集団と判断された。帰属性解析により、天然魚と人工種苗は、明確に区別することができた。静岡県に生息するアユの遺伝的特徴は既知の報告に類似していた。

キーワード アユ, 遺伝的特徴, マイクロサテライトDNA, 遺伝的集団構造

アユは河川漁業の最重要種であり、資源維持のため積極的な種苗の放流が行われている。静岡県内で2011年には約463万尾が放流され、そのうち、海産種苗は約221万尾(47%)、人工種苗は約239万尾(52%)、琵琶湖産種苗は約3万尾(1%)で、近年は琵琶湖産が冷水病などにより敬遠され、遺伝的な観点から海産種苗が望まれる傾向にある¹⁾。海産種苗は年変動が大きく、その変動を人工種苗が吸収するという形をとっている。しかし、ダム等により、天然魚が遡上しない河川では、釣味の良い種苗という基準で人工種苗の放流を考えることが多い。本県の人工種苗は、ほとんどが静岡県内水面漁業協同組合連合会あゆ種苗センター(以下あゆセンター)で生産され、親魚として鹿児島県の鶴田ダム湖に陸封された海産魚を由来とした系統が使われている。さらに、ここでは異なる継代数の親魚を数系統持っており、需要により使い分けている。

一方、放流効果を知るうえで、アユの放流魚の識別はさまざまな標識により行われているが、DNAを使った放流群の識別については、佐藤ら²⁾が、シミュレーションしたことに始まり、近年ではミトコンドリアやマイクロサテライトなどさまざまな手法が開発されている。

本研究では、興津川に遡上する天然アユと本県で生産された海産由来で継代数の異なる3系統の鶴田ダム湖由来人

工種苗について、それらの遺伝的特徴を明らかにし、DNAマーカーによる識別の可否を検討した。

材料および方法

1 分析に使用したサンプル

天然魚は、興津川で、人工種苗が放流される前の2009年4月20日までに遡上した稚魚(以下Na)を使った。人工種苗は、継代数が2代目(以下F2)、4代目(以下F4)、12代目(以下F12)を用いた。採集した魚体または鱗の一部を、99.5%エチルアルコールで固定したのち、数回アルコールを取替え、十分に脱水した後、常温で保存した。

2 分析方法

粗DNAは抽出キットのWizard Genomic DNA Purification Kit(PROMEGA社)を使い定法に従い抽出し、濃度を100ng/ μ Lに調整した。マイクロサテライトDNAの分析はアユで開発された以下の4つのプライマー³⁾について行った。

Pal2: DDBJ Accession NoAB042994

Pal3: DDBJ Accession NoAB042995

Pal4: DDBJ Accession NoAB042996

Pal5: DDBJ Accession NoAB042997

2013年3月27日受理

静岡県水産技術研究所富士養鱒場業績第43号

^{*1} 水産技術研究所富士養鱒場、現水産振興課

^{*2} 水産技術研究所富士養鱒場

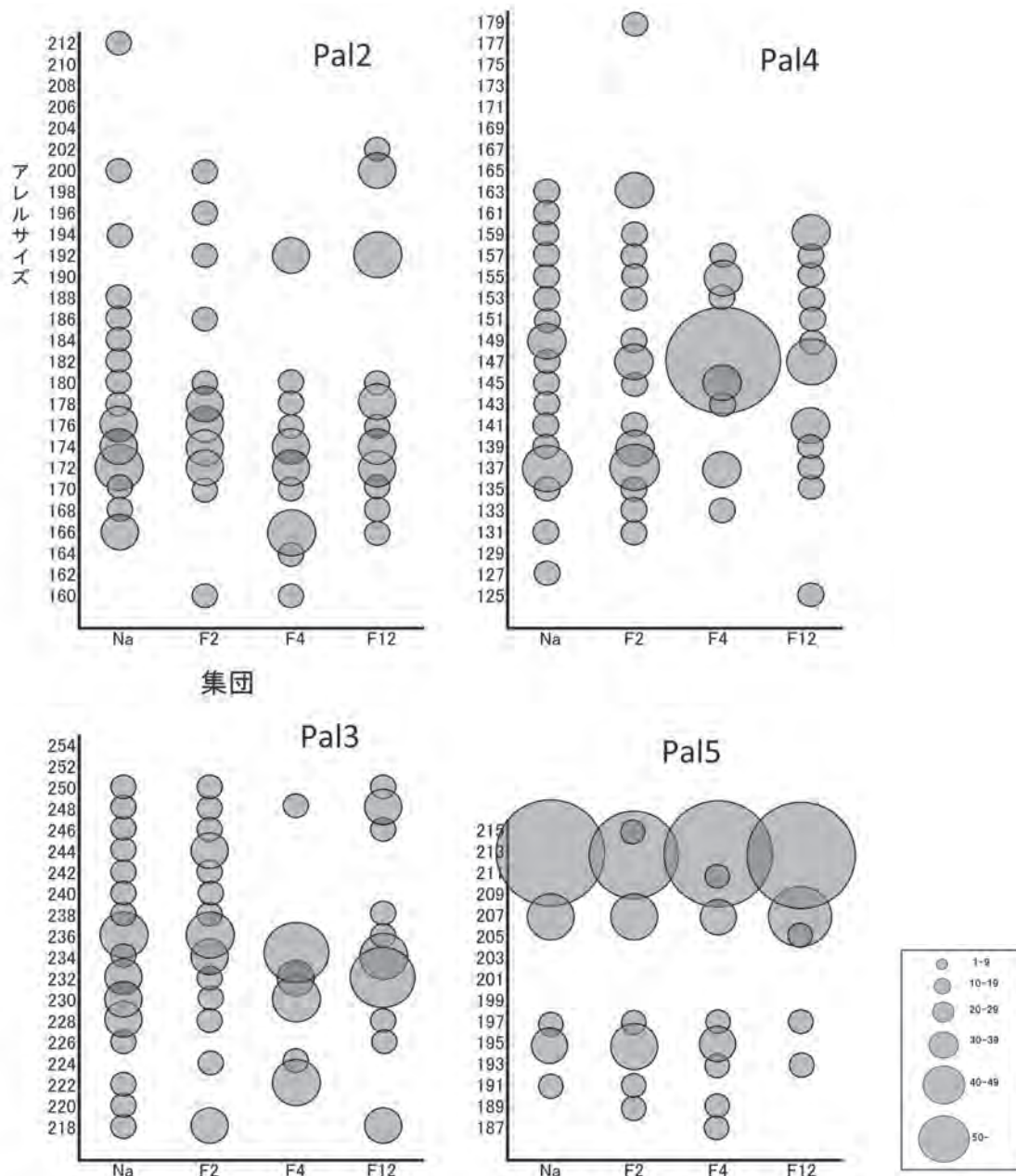


図1 集団毎に出現するアレルサイズの割合

遺伝子の増幅には、試薬を10 μ L系で調整し、各プライマーの一方に蛍光標識を施しPCRに供した。PCRのプロトコールは以下のとおりであった。

Step1 あらかじめ各プライマー同士の相性を調べ、マルチプレックス化した

Step2 増幅用の酵素はSpeedSTAR(Takara社)を使った

Step3 サーマルサイクラーはGradient ThermalCycler (Hybaid社)を使った

Step4 PCRサイクルは、変性が95℃で60秒、アニーリングが65℃で5秒、伸長が72℃で15秒とし、これを30サイクル繰り返した

PCR産物はGenetic Analyzer 3130(Applied Biosystems

社)を使い、フラグメント分析を行った。なお、サイズスタンダードとしてSizeStandard LIZ 600(Applied Biosystems社)を用いた。得られた各アレルはGeneMapper ver4.0でサイジング処理した。

3 データ解析

解析した集団毎にアレル頻度、Pairwise F_{st} 値、平均ヘテロ接合体率の実測値(H_o)、期待値(H_e)、Hardy-Weinberg平衡(以下H-W平衡という)からの逸脱、遺伝的分散分析(AMOVA)についてはArlequin ver3.0を用いて計算した⁴⁾。Allelic richnessについてはFSTAT⁵⁾を、帰属性解析にはSTRUCTURE 2.3.3⁶⁾を使った。

表1 興津川産天然魚と人工生産魚の遺伝特性値

	F2	F4	F12	Na
	n=46	n=35	n=39	n=47
出現アレル数	14	11	11	15
アレルサイズ	166-202	156-208	160-192	166-212
Allelic richness	11.000	12.964	10.785	15.010
Ho	0.73913	0.88571	0.92308	0.76596
He	0.88796	0.85963	0.84815	0.88424
P値	0*	0.55891	0.9195	0*
出現アレル数	14	7	10	15
アレルサイズ	218-248	218-250	223-248	218-250
Allelic richness	7.000	12.970	9.775	16.199
Ho	0.8913	0.91429	0.87179	0.91489
He	0.87052	0.78551	0.8022	0.90826
P値	0.63218	0.26386	0.52644	0.68257
出現アレル数	15	8	12	15
アレルサイズ	125-159	131-179	143-157	127-163
Allelic richness	8.000	13.981	11.785	16.805
Ho	0.86957	0.6	0.84615	0.89362
He	0.89154	0.67495	0.86147	0.90963
P値	0.36238	0.27436	0.0096*	0.89248
出現アレル数	7	6	8	5
アレルサイズ	193-213	189-214	187-213	191-213
Allelic richness	8.000	6.454	5.692	4.682
Ho	1	0.77143	0.76923	0.85106
He	0.68801	0.66998	0.57143	0.60604
P値	0*	0.02851*	0.02149*	0.00129*
出現アレル数	12.5	8	10.25	12.5
Allelic richness	8.500	11.592	9.509	13.174
平均 Ho	0.875	0.792858	0.852563	0.856383
He	0.834508	0.747518	0.770813	0.827043
P値	0.49728	0.36571	0.72297	0.787525

* : H-W平衡からの逸脱がある(有意水準5%)

表2 ロット間の遺伝的変異性の評価

	F2	F4	F12	Na
F2	—	0.000*	0.000*	0.000*
F4	0.06638	—	0.000*	0.000*
F12	0.06119	0.06431	—	0.000*
Na	0.0169	0.08027	0.05633	—

上段:P値

下段:Fst値

*: 5%

表3 天然魚と人工魚での AMOVA 検定結果

変動要因	自由度	平方和	変動成分	変動割合	Fst	P
集団間	3	28.227	0.09398	5.55		
集団内	330	527.572	1.5987	94.445		
合計	333	555.799	1.69268	100	0.0555	0

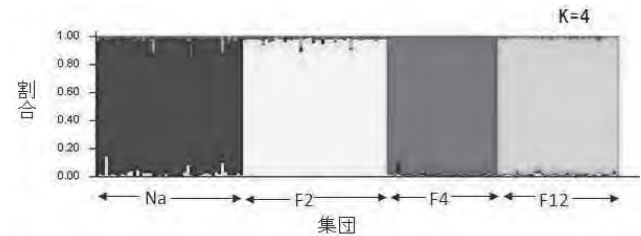


図2 帰属性解析結果

結 果

4種のマイクロサテライトマーカーにより検出されたアレルの分布を図1に示した。Pal5では213を中心にかたまっており、集団ごとの特徴はほとんど見られなかった。それ以外のマーカーでは、Naは中心になるサイズはあるものの全体にばらついていて、F2はNaに類似した分布だったが、Pal2では中心がややずれていた。F4は他に比べ、偏りが見られ、特にPal4では大きく偏っていた。F12はF4よりはNaに近く分布していたが、Na、F2に比べ偏りが見られ、Pal2、3でNaと異なるアレルが中心になっていた。

各集団に出現したアレル数はPal2、Pal3、Pal4では天然魚が人工種苗に比べ多い傾向が見られたが、Pal5では全体的に少なかった(表1)。人工種苗は各マーカーともに継代数と出現アレル数に関係は認められなかった。出現するアレル数は分析個体数により影響されるので、Allelic richnessで評価すると、すべてのマーカーを通した比較では、天然魚では13.174と高く、人工種苗はそれ以下であった。この傾向は各マーカーについても同様であったが、Pal5のみは全体として低く、このマーカーがそれ自体多様性が低いためと考えられた。また、F4を除いた人工種苗間を見ると、F2、12に差はなかった。

すべてのマーカーで、Naの平均ヘテロ接合体率は85.6%であった。人工種苗でもF4で80%を下回ったが、

わずかであり、他の系統ではいずれも80%を超えて高かった。対象群の交配がランダムに行われているか否かを調べるため、ヘテロ接合体率の実測値(Ho)と期待値(He)の比から逸脱の有無(H-W平衡)を調べた結果、Pal2でF2とNa、Pal4でF12、そしてPal5ではすべての集団で逸脱していたが、Pal3はすべての系統で逸脱していなかった(表1)。しかし、全体を通して見ると、すべての集団で逸脱しておらず、正常な交配様式を持っている集団と判断された。

各集団間の遺伝的な異質性を見るために求めたPairwise Fst値(表2)は、NaとF2が最も近く、NaとF4が最も離れていると見られた。各集団間に有意の差があり独立した集団とみなされた。さらに遺伝的な独立性を見るために天然魚対人工種苗という区分けで遺伝的分散分析を行った(表3)。その結果、両者に有意の差があり、人工種苗の各集団間の距離以上に天然魚が離れた集団であると判断された。

集団間の帰属性解析では、 ΔK を最小にするK値は4と推定され、K=4として解析すると、個体ごとにほぼ単一のクラスターを示し、天然魚と人工種苗の各群がすべて異なる集団に類分けされた(図2)。

考 察

遺伝子によるアユ放流群の識別の事例はいくつか見られ、はじめに佐藤ら²⁾が群馬県産の人工アユの *mdh* アイソザイム遺伝子の出現頻度が琵琶湖産アユに比べ有意に高いことを使って琵琶湖への放流効果をシミュレーションした。その後もアイソザイムでの検出が試みられているが⁷⁾、その他にはミニサテライトのアロザイム⁸⁾、ミトコンドリアの変異^{9,10)}やSNP¹¹⁾などを用いた事例がある。近年は変異の豊富なマイクロサテライトを使って行われることが多くなっている^{3,12)}。この変化は分析手法の進歩だけではなく、より微細な違いを求めるためと考えられる。それは、アユという種が遺伝的に細分化された流れと同じであり、より小さな変化の検出が必要となったためであろう。アユはリュウキュウアユが亜種として区分され¹³⁾、琵琶湖産は海産のアユに比べ大きく分化していることもわかってきた³⁾。両者の遺伝的距離は、日本国内の群は韓国の沿岸に生息する群のほうが琵琶湖産よりも近い⁹⁾ということからもわかる。

琵琶湖産のように遺伝的に離れた群の検出のためであれば、大まかな違いの検出だけで可能だが、近年は、本報告のように海産由来のダム陸封型を区別する必要が出てきた。海産アユは、日本で1つ³⁾または2つ¹⁴⁾に区分けされる程度で、地域変異を検出することは非常に難しい。そのため、より小さな違いを見つける必要があった。現在は地域変異が対象ではなく、種苗生産時に起こる人為的な遺伝的偏りをよりどこに区別する手法が使われている。

本研究で使用した Pal2 でのアレルの出現頻度を観察している谷口ら¹⁵⁾では、吉野川の天然魚で18～20なのに対し、人工種苗では4～15と明らかに少ない。本研究の興津川の天然魚(Na)では15と人工種苗の11～14よりも大きく、天然魚の方が多いということで既報と類似していた。興津川に遡上するアユは、1つのマーカーではあるが同じ太平洋沿岸の天然魚と類似した遺伝子型を持っていると推定される。また、他のマーカーの結果から見て、各アレルが適度に分散されている状況から、本県の天然アユの遺伝子型はボトルネック等の圧力はかかっているものと考えられた。

人工種苗では、本県産の種苗もアレルの出現頻度は天然魚ほどではなかったが高かった。これは継代中に使用した親魚の尾数で変化するため、変異が保たれていたものと考えられる。しかし、統計的には、人工種苗は天然魚に近いと思われたが、アレルの出現や、Allelic Richness など詳細なところで天然魚との違いがあると思われる。

集団の識別を視点に考えると、F4については、4回行われた継代中に何らかのボトルネックが起こり、遺伝的な特

徴が偏ったものになったにもかかわらず、本研究で使ったサンプルは人工種苗でも H-W 平衡から逸脱しておらず、今までのように種苗生産時に起きた偏りを利用した区別はできない。

ただ、Pairwise Fst 値は有意に異なるので、地域変異と同じような使い方により、区別できることが分かった。これは、海産アユがダム湖に陸封された時に起こった創始者効果による遺伝子浮動で生じた差をそのまま残したためと考えられた。

本研究で用いた帰属性解析は群ごとを可視化できるところにメリットがあり、その結果から、個体ごとにほぼ単一のクラスターに属し、各集団が明確に区別できた。このような場合には由来の異なる群が混合しているような事例でも、個体識別により、混合率が計算できると思われ、今後は、これからの数値化のための処理方法の開発が必要と考えられた。

サンプルの提供と有意義な情報をいただいた静岡県内水面漁業協同組合連合会あゆ種苗センター飯田泰場長を始め職員の皆様に深く感謝します。また、天然遡上アユの採捕にご協力いただいた興津川非出資漁業協同組合の方々に感謝します。

文 献

- 1) 鈴木邦弘 (2012): 静岡県下におけるアユの天然遡上と種苗放流の現状, 富士養鱒場だより, 214 号.
- 2) 佐藤良三・中 賢治・石田力三 (1982): アイソザイムの魚類放流試験への適用の可能性, 養殖研究所研究報告, 3, 1～19.
- 3) Takagi M, Shoji E and Taniguchi N (1999): Microsatellite DNA polymorphism to reveal divergence in Ayu, *Plecoglossus altivelis*, *Fisheries Science*, 65(4), 507～512.
- 4) Excoffier L, Laval G and Schneider S (2005): ARLEQUIN (version 3.0), An integrated software package for population genetics data analysis, *Evol. Bio. Online*, 1, 47～50.
- 5) Goudet J (1995): FSTAT (version 1.2) A computer program to calculate F-statistics, *J. Hered*, 86, 485～486.
- 6) Pritchard J K, M Stephens and P Donnelly (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*, 155, 945～959.
- 7) 関 伸吾・谷口順彦 (1988): アイソザイム遺伝標識による放流湖産アユの追跡, 日本水産学会誌, 54(5), 754～

749.

- 8) 関 伸吾・高木基裕・谷口順彦 (1995): DNA フィンガープリントとアロザイム遺伝子標識による野村ダム湖産アユの遺伝的変異保有量の推定, 水産増殖, 43(1), 97 ~ 102.
- 9) 関 伸吾・谷口順彦・田 祥麟 (1988): 日本および韓国の天然アユ集団間の遺伝的文化, 日本水産学会誌, 54(4), 559 ~ 568.
- 10) 谷口順彦・関 伸吾・稲田善和 (1983): 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.
- 11) 岩田祐士・武島弘彦・田子泰彦・渡辺勝敏・井口恵一郎・西田睦 (2007): ミトコンドリア SNP 標識で追跡した放流琵琶湖産アユの行方, 日本水産学会誌, 73, 278 ~ 283.
- 12) 久保田仁志・手塚清・福富則夫 (2008): マイクロサテライト DNA マーカーによる釣獲されたアユの由来判別と種苗放流効果の評価, 日本水産学会誌, 74(6), 1052 ~ 1059.
- 13) Nishida M (1988): New subspecies of the ayu, *Plecoglossus altivelis* (Plecoglossidae) from the Ryukyu Island, *J. Journal Ichthyol.*, 35(3), 236 ~ 242.
- 14) 井口恵一郎・竹嶋弘彦 (2005): アユ個体群の構造解析における進展とその今日的意義, 水産総合研究センター研究報告, suppl. 5, 187 ~ 195.
- 15) 谷口順彦・薫 仕・近藤桂太・今井貞美 (2002): 遺伝マーカーによる吉野川における陸封型放流アユの混合率および両側回遊型アユの分布の推定, 水産増殖, 50(1), 17 ~ 24.

Genetic distinction of wild ayu, *Plecoglossus altivelis*, in the Okitsu River and the artificial strain originating from Lake Tsuruta

Naomasa Kawashima and Kunihiro Suzuki

Abstract Wild ayu, *Plecoglossus altivelis*, in the Okitsu River and artificially produced ayu were classified using multilocus microsatellite DNA marker analysis. Three artificially produced ayu populations that originated from the landlocked Tsuruta Dam Lake can be found. The three populations differ with respect to the number of crossed generations. The allelic frequency of wild ayu is higher than that of the three artificial populations. The three artificial populations did not deviate from H-W equilibrium with respect to average heterozygosity. On the basis of the generic analysis, the three populations of artificially produced fish were judged as independent populations. Using Structure ver3.1.1, we could distinguish between the wild and artificially produced fish groups.

Key words: *Plecoglossus altivelis*, genetic discrimination, assignment test