

マイクロサテライトDNA多型によるアユ人工種苗の遺伝的多様性の比較 - II

藤井久之

一般に、継代を繰返した人工種苗は再生産に関わった親魚数が天然種苗に比べて少なくなるため、遺伝的多様性が低くなり、元の天然集団とは異なった遺伝子構成になることや近交退化が懸念される。^{1) 2)} マイクロサテライトDNA多型解析は核DNAの非遺伝的領域(イントロン)の2~5 bpの短い塩基配列数の違いを検出する方法であり、この領域は個体変異が多量に蓄積されており、高感度DNAマーカーとして注目されている。そこで、前年度に引き続き³⁾、マイクロサテライトDNA多型解析を用いて当所で継代しているアユ人工種苗と本県地先海面で採捕された海産種苗の遺伝的多様性の比較を行った。また、マイクロサテライトDNA多型解析によりダム上流域で採捕されたアユの系統判別を試みたので、併せて結果を報告する。

材料および方法

供試魚 人工種苗と海産種苗の遺伝的多様性の比較に用いた供試魚は、当所で選抜育種した6代目大方向群、11代目大方向群、5代目×10代目(F1)、6代目無選抜群、及び平成15年に本県地先海面で採捕された海産の5系統である。6代目、11代目大方向群は本県地先海面で採捕された海産アユを養成し、体重による上位20%の切断型選抜により親魚を選抜し、人工授精により次世代を作出し、毎年同様の切断型選抜で6代及び11代継代したものである。6代目無選抜群は同様の海産アユを切断型選抜を行わず無作為に親魚を選抜し、人工授精により次世代を作出し、6代継代したものである。ダム上流域で採捕されたアユの系統判別に用いた供試魚は、東牟婁郡古座川町の七川ダム湖で再生産したと考えられるアユであり、これとの比較のためダム上流域に放流された種苗、琵琶湖で採捕された湖産アユ及び当所で継代飼育した海産系人工の3系統を用いた。これらの供試魚の尾びれの一部を切り取り、DNA抽出まで100%エタノールで保存した。

マイクロサテライトDNA多型解析 全体の手順を図1に示した。手順の詳細は昨年度と同様である。³⁾ DNAの抽出精製は、供試魚の尾びれを用い、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿により行った。これを高木ら⁴⁾により設計されたプライマーセットのうち、人工種苗と海産種苗の遺伝的多様性の比較にはPal 1、Pal 4を用い、またダム上流域で採捕されたアユの系統判別には海産と湖産で遺伝子頻度が顕著に異なることが報告されている⁴⁾ Pal 5を用いてPCR法により増幅した。得られたPCR産物は8%ポリアクリ

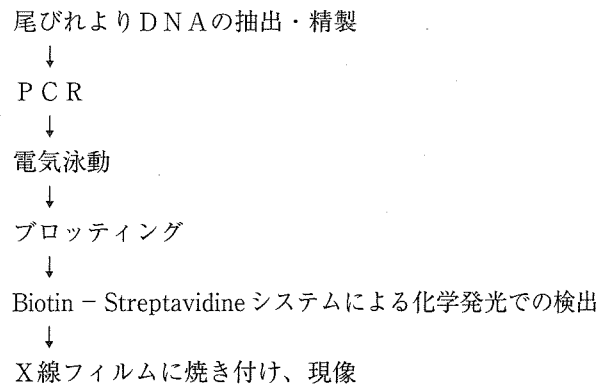


図1 マイクロサテライトDNA多型解析手順

ルアミドゲルにより分画し、ナイロンメンブランに転写後、Biotin-Streptavidin システムによる化学発光法により X 線フィルムに転写後、可視化した。5) 得られたバンドはサンプルと同時に泳動した M13mp18ssDNA のシーケンスラダー (Sequencing high chemilumi、TOYOBO) との比較により分子量を決定し、遺伝的変異性を示す各指標を解析ソフト Arlequin ver. 2000 で解析した。

表 1 解析に用いたプライマーペア

Locus	Primer Sequence
Pal - 1	F: 5'-TGTTTGGGAAGTGGGTGCGGG- 3'
	R: 5'-AGAAATCCACATCAACATCC- 3'
Pal - 4	F: 5'-GTCCAGGAAGGGCTTGT- 3'
	R: 5'-GTCTGGTAAAAGCAAGGCGT- 3'
Pal - 5	F: 5'-TGGCTGTGCTTTATGTGGTC- 3'
	R: 5'-GGTGGTAGTATGTGGTGTC- 3'

結果および考察

人工種苗と海産の遺伝的多様性の比較 各系統の供試魚のマイクロサテライトマーカー座における遺伝的多様度を表 2 に示した。また、系統別に 10%未満の頻度の対立遺伝子をその他として対立遺伝子頻度を図 2 に示した。ヘテロ接合体率 (観察値) は Pal 1 で 0.657~0.778 で系統による明確な違いはみられなかった。Pal 4 では 0.4828~0.879 であり、選抜の進んだ系統で低く、海産で高い傾向がみられた。対立遺伝子数は Pal 1 で 8~22、Pal 4 で 9~29 であり、選抜の進んだ系統ほど少なく、海産で多い傾向がみられた。対立遺伝子頻度をみると、選抜の進んだ系統ほど特定の対立遺伝子が占める割合が高く、海産では逆の傾向がみられた。以上より、昨年度と同様³⁾、野生集団である海産は遺伝的多用性が高いのに対し、特定の形質を持つ親魚だけを選抜し継代した大方向群は遺伝的多用性が低く、また無作為に親魚を抽出して継代した無選抜群はその中間の傾向であることが明らかになった。

表 2 各系統の遺伝的多用度の比較

遺伝子座 (ローカス)	項 目	6 代目 大方向群	11 代目 大方向群	5 代目×11 代目 (F1)	無選抜群	海 産
Pal 1	サンプル数	36	38	37	38	35
	対立遺伝子 (アレル) 数	12	8	16	18	22
	範 囲 (bp)	99 - 124	102 - 123	99 - 124	102 - 127	102 - 132
	ヘテロ接合対率 (観察値)	0.778	0.763	0.757	0.658	0.657
	ヘテロ接合対率 (期待値)	0.884	0.828	0.886	0.898	0.946
	観察値/期待値	0.880	0.922	0.854	0.733	0.695
Pal 4	サンプル数	29	36	26	19	33
	対立遺伝子 (アレル) 数	10	9	13	15	29
	範 囲 (bp)	136 - 155	131 - 159	136 - 179	132 - 162	131 - 177
	ヘテロ接合対率 (観察値)	0.483	0.667	0.808	0.684	0.879
	ヘテロ接合対率 (期待値)	0.881	0.755	0.838	0.929	0.966
	観察値/期待値	0.548	0.882	0.964	0.737	0.909

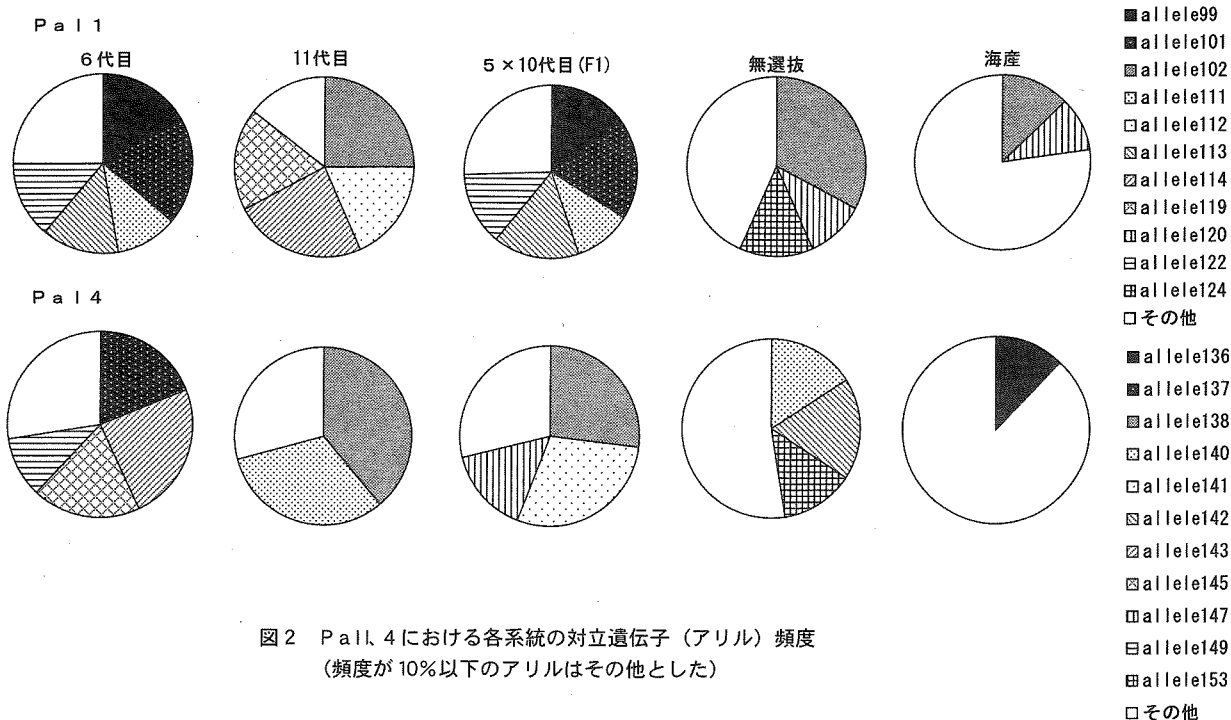


図2 Pal 1, 4における各系統の対立遺伝子 (アレル) 頻度 (頻度が10%以下のアレルはその他とした)

系統の違う大方向群どうしの交雑である5代目×11代目 (F1) は近交を防ぐ目的で作出したものであるが、対立遺伝子数がPal 1、Pal 4の両方で大方向群よりも若干多い傾向がみられた。ヘテロ接合体率 (観察値) はPal 1では他の系統と差はみられなかったが、Pal 4で海産と同程度の値となった。これより、人工種苗どうしの交雑は、遺伝的多様性の低下を防ぐのに目立った効果のないことが判った。

6代目、11代目大方向群のヘテロ接合体率、対立遺伝子頻度についてみると、明確な差はみられず、大方向群の継代数の違いによる遺伝的多様性の差はみられなかった。大方向群は他の人工に比べて成長のよい系統であり、遺伝的多様性の低い大方向群で高成長という形質が発現してくるといふことは、高成長は特定の少数の遺伝子により支配される形質である可能性が考えられる。

次に各群のPairwise F_{st} による異質性検定の結果を表3に示した。昨年度の結果³⁾と異なり、6代目大方向群と5代目×10代目 (F1)の間では有意差はみられなかったが、それ以外の全ての系統間で有意差がみられた。これより、継代を繰返した人工種苗は遺伝的多様性が低下し、元の集団とは異なった遺伝子組成を持つようになることが明らかになった。以上より、継代を繰返した人工種苗を再生産する可能性のある河川へ放流するのは生態系に及ぼす影響を考慮すると避けるべきである。

表3 各系統間の分化指数 (F_{st} 指数)

	6代目大方向群	11代目大方向群	5代目×11代目 (F1)	無選抜群	海産
6代目大方向群					
11代目大方向群	0.14310 *				
5代目×11代目 (F1)	-0.01342	0.14100 *			
無選抜群	0.10657 *	0.05977 *	0.01052 *		
海産	0.06853 *	0.06404 *	0.06847 *	0.03080 *	

* 集団間に有意差 ($P < 0.05$) あり

ダム上流域で採捕されたアユの系統判別 各系統のマイクロサテライトマーカー座Pal 5における遺伝的多様度を表4に、また、系統別に対立遺伝子頻度を図3に示した。高木らは海産と湖産でPal 5対立遺伝子208と214の頻度が大きく異なると報告している。4) 今回用いたサンプルでも208と214の頻度は、湖産では0.642と0.343、海産系人工では0.162と0.732であり、大きく異なっていた。古座川ダム上流域では海産系人工の他に一部由来の不明な人工種苗が放流されている。この種苗は、Pal 5対立遺伝子208と214の頻度が0.536と0.457であり、湖産に近い値であることから湖産系人工種苗であると考えられる。ダム湖産はPal 5対立遺伝子208と214の頻度が0.433と0.567であり、海産と湖産の間のような値であった。このアユの由来であるが、湖産は漁獲されやすく、さらに海産と湖産は産卵時期が異なるので交雑が起きにくいこと⁶⁾、また海産系人工はダム湖のような低水温の環境条件では生存がむずかしいことを考えると、放流された湖産系人工種苗が再生産したのではないかと考えられる。今回用いたサンプル数が15尾と少なかったため、対立遺伝子頻度が偏った可能性があるため、今後はこのような分析を行う時は、サンプル数を増やして検討する必要がある。このようにマイクロサテライトDNA多型解析は海産、湖産の系統判別にも有効であると考えられる。

表4 Pal 5における各系統の遺伝的多様性の比較

項目	ダム湖産	放流種苗	琵琶湖産	海産系人工
サンプル数	15	69	67	71
対立遺伝子(アレル)数	2	3	3	3
範囲(bp)	208 - 214	208 - 230	208 - 220	208 - 214
ヘテロ接合対率(観察値)	0.4667	0.5217	0.5821	0.3944
ヘテロ接合対率(期待値)	0.5081	0.5077	0.4736	0.4318
観察値/期待値	0.9186	1.0277	1.2292	0.9133

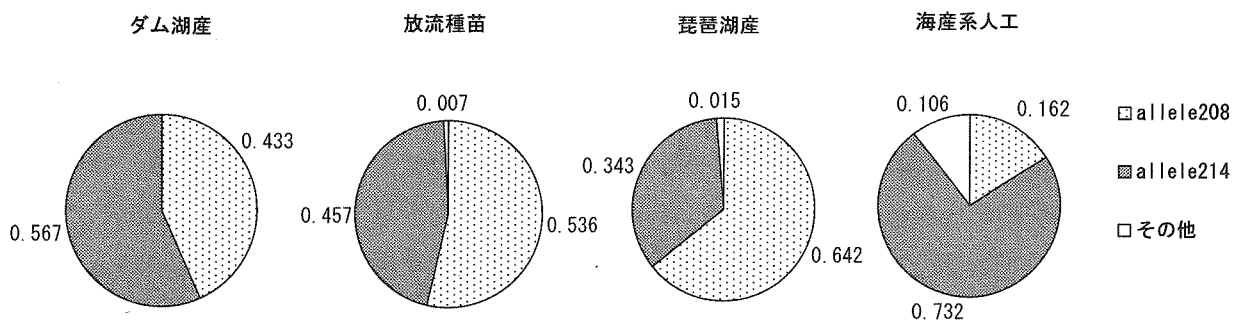


図3 Pal 5における各系統の対立遺伝子(アレル)頻度

文 献

- 1) Iguchi K, Tanimura Y, Nishida M: Sequence divergence in the mtDNA control region of amphidromous and landlocked forms of ayu. *Fisheries Science*, **63**, 901-905 (1997).
- 2) 谷口順彦: 魚類の遺伝的多様性とDNAマーカー. 「次世代の水産バイオテクノロジー (隆島史夫編)、成山堂書店、18 - 41 (2000).
- 3) 藤井久之: マイクロサテライトDNA多型解析によるアユ人工種苗の遺伝的多様性の比較—I. 平成15年度和歌山県農林水産総合技術センター水産試験場内水面研究所事業報告、**29**、32 - 35 (2003).
- 4) Motohiro Takagi, Eijiro shoji and Nobuhiko Taniguchi: Microsatellite DNA Polymorphism to Reveal Genetic Divergence in Ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fisheries Science*, **65**, 507-512 (1999).
- 5) Perez-Enriquez, Ricardo, 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).
- 6) 関伸吾, 谷口順彦: 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), 745 - 749, (1988).

付表1 各系統のアリル頻度

ローカス	アリル	6代目	11代目	5×10代目	無選抜	海産
Pal-1	99	0.167	-	0.149	-	-
	100	-	-	-	-	-
	101	0.194	-	0.189	-	-
	102	-	0.250	-	0.329	0.129
	103	-	-	-	-	-
	104	-	-	-	0.013	0.014
	105	-	-	-	-	-
	106	-	-	-	-	-
	107	-	-	-	-	0.029
	108	-	-	-	0.013	0.086
	109	-	0.026	-	0.053	-
	110	0.014	-	0.014	0.053	0.086
	111	0.111	-	0.108	-	0.014
	112	-	0.184	-	0.066	0.086
	113	0.139	-	0.162	0.039	0.029
	114	-	0.237	-	0.026	0.043
	115	0.014	-	0.014	0.026	0.043
	116	0.028	-	0.027	-	0.014
	117	-	0.039	-	-	0.014
	118	0.042	-	0.041	-	0.029
	119	0.042	0.184	0.054	0.039	-
	120	0.083	-	0.081	0.105	0.100
	121	-	0.066	-	-	0.043
	122	0.139	-	0.135	0.039	0.014
	123	-	0.013	-	0.026	0.043
	124	0.028	-	0.027	0.132	-
	125	-	-	-	0.013	0.043
	126	-	-	-	-	-
	127	-	-	-	0.026	0.086
	128	-	-	-	-	-
	129	-	-	-	-	0.014
	130	-	-	-	-	-
	131	-	-	-	-	0.014
	132	-	-	-	-	0.029

付表2 各系統のアリル頻度

ローカス	アリル	6代目	11代目	5×10代目	無選抜	海産
Pal-4	131	-	0.014	-	-	0.030
	132	-	-	-	0.026	-
	133	-	-	-	-	-
	134	-	-	-	-	0.030
	135	-	-	-	-	0.030
	136	0.017	0.014	0.019	0.053	0.121
	137	0.190	-	-	0.026	0.015
	138	0.069	0.389	0.269	0.053	0.045
	139	-	-	-	-	0.091
	140	-	0.319	0.019	0.158	0.030
	141	0.034	-	0.288	-	0.030
	142	-	0.028	-	0.184	0.045
	143	0.241	-	0.019	0.026	0.045
	144	-	0.042	-	0.026	0.030
	145	0.190	0.028	0.058	-	0.030
	146	-	-	-	0.026	0.015
	147	0.086	-	0.154	0.053	0.015
	148	-	-	0.019	-	-
	149	0.103	0.097	0.038	0.079	0.076
	150	-	-	-	-	0.030
	151	-	-	0.038	0.079	0.015
	152	-	-	-	-	0.030
	153	0.052	-	-	0.132	0.030
	154	-	-	-	-	0.015
	155	0.017	-	-	0.026	0.045
	156	-	-	-	-	0.030
	157	-	-	0.038	-	0.030
	158	-	-	-	-	-
	159	-	0.069	-	-	0.015
	160	-	-	-	-	-
	161	-	-	-	-	-
	162	-	-	-	0.053	-
	163	-	-	-	-	0.015
	164	-	-	-	-	-
	165	-	-	-	-	-
	166	-	-	-	-	-
	167	-	-	-	-	-
	168	-	-	-	-	-
	169	-	-	-	-	-
	170	-	-	-	-	0.015
	171	-	-	-	-	-
	172	-	-	-	-	-
	173	-	-	-	-	-
	174	-	-	-	-	-
	175	-	-	-	-	-
	176	-	-	-	-	0.030
	177	-	-	-	-	0.015
	178	-	-	0.019	-	-
	179	-	-	0.019	-	-