

## PCR-RFLP法に基づく常浪川に放流された群馬県産人工アユ種苗の再捕確認

樋口正仁・野上泰宏・森 直也

Identification of recaptured hatchery population of ayu, *Plecoglossus altivelis*, produced in Gunma prefecture from Tokonami river based on PCR-RFLP method

Masahito Higuchi, Yasuhiro Nogami and Naoya Mori

キーワード：アユ，ミトコンドリアDNA，調節領域，種苗放流

アユは、サケと並んで新潟県の河川漁業にとっての重要魚種であり、県内各地で種苗放流が行われている。県内で放流される種苗には、天然種苗だけではなく、人工採卵によって生産された人工種苗も含まれる。

これまでの人工種苗に関する研究により、人工種苗は天然アユ稚魚とは異なる特徴を有することが知られている<sup>1) - 3)</sup>。そのため、人工種苗の放流には、天然アユの生息や再生産に影響を及ぼす生態的攪乱のリスクが存在することが指摘されている<sup>4) - 5)</sup>。一方、漁業者は、種苗放流の経費を負担し、経費の軽減を求めている。経費負担の軽減を図る方法の一つには、種苗放流の効率向上が考えられ、天然水域における人工種苗の生態的特性の把握や放流効果調査などの調査が必要となる。しかし、天然水域から採捕されたアユの種苗の由来を形態学的手法により、正確かつ簡便に判別するのは困難である。このような状況の中、近年の遺伝学的研究の進展により、DNAマーカーを利用した種苗放流効果の研究がいくつかの漁業対象種で行われている<sup>6) - 9)</sup>。

そこで、本研究では、天然水域から採捕されたアユから放流された人工種苗を判別することが可能か否かを明らかにすることを目的として、遺伝学的手法を用いた群馬県産人工種苗の判別技術の開発を行った。

## 材料と方法

供試魚 ミトコンドリアDNA (mtDNA) の塩基配

列分析には、2003年秋に群馬県水産試験場と新潟県水産振興協会生産され、2004年春に阿賀野川水系常浪川に放流された人工アユ種苗を6個体ずつ計12個体を供した。さらに、2004年7月に阿賀野川水系常浪川から採捕されたアユ3個体も分析に供した。

PCR-RFLP解析には、塩基配列分析を行った個体含む群馬県水産試験場および新潟県水産振興協会産の人工アユ種苗10個体ずつ計20個体を供した。

放流された群馬県水産試験場産人工アユ種苗の再捕確認には、阿賀野川水系常浪川から採捕されたアユ個体を用いた。常浪川への天然アユの遡上は、下流側の揚川ダムによって妨げられ、常浪川に生息するアユは全て放流アユである。アユの採捕は、2004年7月から8月にかけて釣りおよび投網によって行われた。なお、東蒲原漁業協同組合の聞き取りから、2004年に常浪川に放流されたアユ種苗203,718個体のうち13,333個体が群馬県水産試験場産の種苗であると推定されている(表1)。

表1 2004年における常浪川のアユ種苗の放流実績

	放流日	放流量	放流サイズ	推定放流
		(kg)	(g/個体)	個体数
群馬	5/20	200	15	13,333
水振協	5/24~27	875	5	175,000
滋賀	6/14	200	13	15,385

DNA分析 DNA分析には、各個体から採取した胸びれを供した。供試魚から切除された胸びれは、

99.5%エタノール溶液で固定・保存した。粗DNAの抽出はフェノール・クロロフォルム方法<sup>10)</sup>により行い、抽出された粗DNAを鋳型にPCR法でmtDNA調節領域前半部を含むDNA断片を増幅した。PCR反応には、L15924<sup>11)</sup>とH16498<sup>11)</sup>のプライマー対を用い、反応は94℃30秒を1サイクル、94℃30秒、50℃30秒、72℃30秒を30サイクル、72℃5分を1サイクル行った。

増幅断片の塩基配列の解読には、直接塩基配列法を用いた。ダイ・ターミネーター反応には、L15924およびH16498の2種類のプライマーを使用し、377DNAシーケンサー (Applied Biosystem社製) を用いて解読を行った。各個体の塩基配列は、アユのmtDNAの全塩基配列<sup>12)</sup> (Accession number: AB047553) と照合し、個体間で比較した。塩基置換率の推定には、木村の2変数法<sup>13)</sup>を用い、MEGA 3.1<sup>14)</sup>により塩基多様度を算出した。

RFLP分析における増幅断片の消化には、制限酵素 *Xho*Iを用い、消化反応は37℃で4時間行った。反応後、1.8%アガロースゲルで電気泳動を行い、増幅断片の切断の有無を確認した。

### 結果

直接塩基配列法により、mtDNAのtRNAプロリン

領域を70、および調節領域前半部の310の計380bpの塩基配列を決定した。解析した15個体から7つのハプロタイプが確認された (表2)。そのうち、新潟県水産振興協会産の人工種苗および常浪川から採捕された標本には、塩基配列の変異が観察され (表3)、6つのハプロタイプ (Hap-3~8)に分けられた。それに対し、群馬県水産試験場産の6個体の塩基配列に変異は存在しなかった (Hap-2)。

表3 塩基配列分析に基づくtRNA-Pro領域から調節領域前半部におけるハプロタイプ出現度数および塩基多様度

	ハプロタイプ番号								π*
	N	2	3	4	5	6	7	8	
群馬	6	6	0	0	0	0	0	0	0.00%
水振協	6	0	2	2	1	1	0	0	1.96%
常浪川	3	0	0	0	1	0	1	1	2.15%

\* : 塩基多様度

群馬県水産試験場の人工種苗だけで観察されたハプロタイプ (Hap-2) に特異的な塩基配列パターンが存在するかを確認するため、配列パタンの比較を行った。その結果、塩基番号123、307、311の3サイトでハプロタイプ固有の塩基置換が認め

表2 アユ15個体のmtDNAのtRNAプロリン領域から調節領域前半部にかけて観察された塩基配列変異

ハプロタイプ	Pro*	塩基番号																								
		調節領域																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20					
Hap-1	G	C	A	A	C	T	A	G	G	C	A	T	A	C	G	C	A	C	G	G	A	C	A	G	A	A
Hap-2	.	.	.	G	.	C	.	A	.	.	C	.	G	A	.	.	T	A	A	.	A	G	A	.	.	
Hap-3	.	.	G	.	.	C	G	A	.	.	C	.	G	.	T	G	.	A	.	G	.	.	.	.	.	
Hap-4	.	.	.	.	T	C	.	A	.	.	C	C	.	A	A	T	.	T	A	A	.	.	.	A	.	
Hap-5	.	T	.	.	.	C	.	A	.	.	C	C	G	G	.	.	G	.	A	A	.	.	.	.	.	
Hap-6	.	.	.	.	T	C	.	A	.	.	C	C	.	G	A	.	G	T	A	A	.	.	.	.	.	
Hap-7	.	.	.	.	.	C	.	A	A	.	C	C	.	G	A	.	G	T	A	A	.	.	.	.	.	
Hap-8	A	.	.	.	T	C	.	A	.	A	.	C	G	G	.	.	T	A	A	.	.	.	.	G	G	

Hap-1 : DDBJ, EMBLおよびGene Bankにおけるaccession number AB047553の塩基配列

Pro\* : tRNAプロリン領域

られた(表2)。そこで、Hap-2固有の塩基置換サイトで切断が生じる制限酵素を探索した。その結果、Hap-2の塩基番号118から123までの塩基配列がCTCGAGであったことから、制限酵素*Xho*IによってHap-2のDNA断片は切断されると予測された。

このような予測に基づき、群馬県水産試験場および新潟県水産振興協会産の人工種苗のmtDNA調節領域前半部を含むDNA断片を材料に、*Xho*Iによる制限酵素処理を行い、電気泳動像を観察した。

その結果、新潟県水産振興協会産の人工種苗では断片長500bp付近に1つのバンドが観察され、群馬県水産試験場産では、200bpおよび300bp近くに2本のバンドが存在した(図1)。そして、群馬県水産試験場産人工種苗では、全ての個体で2本バンドが観察されたが、新潟県水産振興協会産では1本バンドしか観察されなかった(表4)。

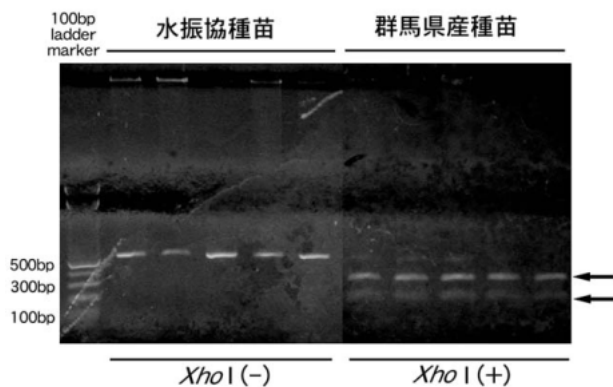


図1 制限酵素処理後の泳動像の比較

表4 人工産アユ種苗のPCR-RFLP解析結果

	<i>Xho</i> I	
	切断(+)	非切断(-)
群馬県水産試験場	10	0
新潟県水産振興協会	0	10

常浪川から採捕されたアユ80個体を対象に*Xho*Iを用いたPCR-RFLP解析を行った結果、21個体で2本バンドが観察された(表5)。2本バンド観察された個体うち3個体の塩基配列を解読したところ、3個体全ての配列がHap-2の配列と一致した。

PCR-RFLP解析により切断パターンを示した個体数を割合を算出した結果、7月が32.0%、8月が16.7%であった。これらの出現頻度の違いが統計学的

に有意であるかを明らかにするため、Fisherの正確確率検定を行った結果、2群間の出現度数に異質性は認められなかった( $p=0.190$ )

表5 常浪川から採捕されたアユのPCR-RFLP解析結果

採集月	採捕方法	<i>Xho</i> I	
		切断(+)	非切断(-)
7月	投網	16	34
8月	釣り	5	25
計		21	59

## 考察

Iguchi *et al.* (1999)<sup>15)</sup>は、日本周辺の両測回遊型アユを対象にmtDNA調節領域前半部の遺伝的特徴を調べた。その結果、変異サイト率が22%、各地域集団の塩基多様度が2.16~3.17%の値を示し、著しい遺伝変異が調節領域に存在することを明らかにした。それに対し、本研究の塩基配列分析の結果、群馬県水産試験場産人工種苗では遺伝的変異は観察されなかった。

群馬県水産試験場の人工種苗は、1970年から長期間継代飼育され、調節領域のPCR-RFLP解析においても遺伝的変異は認められなかった<sup>16)</sup>。これらのことから、群馬県水産試験場の人工種苗では、mtDNAの遺伝的変異が著しく低下し、ほとんどの個体が同一の配列を有していると推定される。

以上のことから、群馬県水産試験場の人工種苗が放流された常浪川から採捕されたアユのうち、Hap-2の配列パターンを示した個体を群馬県水産試験場産アユと判別することは妥当であると考えられた。

塩基配列分析によって、群馬県水産試験場産アユを判別できることが明らかになった。しかし、数多くの個体を対象に塩基配列分析を行うには、多くの作業と費用が必要となる。そこで、作業時間と費用を低減するため、塩基配列分析より簡便なPCR-RFLP法で群馬県水産試験場産人工種苗が判別できるか検討した。その結果、*Xho*Iを用いたPCR-RFLP法により、本研究で観察されたハプロタ

イブ、およびIshiguro *et al.* (2001)<sup>12)</sup> のハプロタイプの中から群馬県水産試験場産人工種苗で観察されたハプロタイプ (Hap-2) を識別できることが明らかになった。

この結果に基づき、常浪川から採捕されたアユのうち、PCR-RFLP法で群馬県水産試験場産アユと推定された3個体について塩基配列分析を行った結果、全ての個体が群馬県水産試験場産人工種苗と同じ塩基配列パターンを示した。これらのことから、常浪川から採捕されたアユのうち*XhoI*を用いたPCR-RFLP法により切断型の泳動パターン (図1) を示した個体は、群馬県水産試験場産アユであると推定された。

2004年夏に常浪川から採捕されたアユのうち、群馬県水産試験場産アユと推定される個体の割合は、26.3%と算出された。7月と8月の個体数割合に異質性は認められなかったことから、2004年7月から8月の期間、ほぼ一定の割合で常浪川に生息していたと推測される。

一方、2004年に常浪川へ放流された放流尾数のうち、群馬県水産試験場産種苗の個体数割合は、6.5%と推定され (表1)、再捕アユにおける個体数割合との間に異質性が認められた (Fisherの正確確率検定:  $P < 0.0001$ )。このことから、2004年の常浪川における群馬県水産試験場産種苗の再捕率は、他の種苗よりも高かった可能性が推測される。

一般に、人工種苗の放流後の生残には、放流時期、放流サイズ、種苗特性、環境収容力、捕食生物の有無など数多くの要因が影響していると考えられる。2004年の常浪川における放流状況をみると、群馬県水産試験場産人工種苗の放流時の体サイズが最も大きく、さらに放流日も最も早いなど (表1)、種苗の放流条件が異なっていた。また、アユの人工種苗では、遡上性やなわばり獲得能などの特性が種苗によって異なることが知られている<sup>1)</sup>。群馬県水産試験場の継代人工種苗は、他のアユ集団と異なる遺伝的特徴を有し<sup>18), 19)</sup>、攻撃行動が活発になる水温が琵琶湖産種苗と異なると考えられる<sup>20)</sup> など、種苗独自の特性を有していると考えられる。これらのように、2004年の常浪川では、特性が異なると考えられる種苗を異なった条件で

放流していた。再捕アユにおける群馬県水産試験場産の人工アユの個体数割合が放流時の個体数割合より大きかった要因としては、放流時の体サイズが大きかったことが、放流後の生残率を高めた可能性が考えられたが、厳密な放流試験を行っていないことから、要因の特定には至らなかった。今後、遺伝的指標を含めた標識放流試験を行うことによって、効果の高い放流技術が確立されると考えられる。

2004年に常浪川に放流されたアユの種苗には、群馬県水産試験場産人工種苗の他に、新潟県水産振興協会産や滋賀県産の人工種苗が含まれている (表1)。これまでの遺伝学的研究により、両測回遊型アユや琵琶湖に生息する陸封型アユの調節領域には、著しい遺伝的変異が存在することが明らかになっている<sup>15), 17), 21)</sup>。これらのことから、群馬県水産試験場産人工アユ以外の個体でも、*XhoI*を用いたPCR-RFLP法において切断型の泳動パターンを示す個体が存在し、分析標本に含まれていた可能性も考えられる。よって、河川内における群馬県水産試験場産人工種苗の混合率の推定と誤差評価を行うには、今後、放流種苗の全体における切断型の出現頻度を求める必要がある。

## 要約

mtDNAのtRNAプロリン領域および調節領域前半部の380bpの塩基配列を解読した結果、群馬県水産試験場の人工種苗アユには塩基配列の変異が観察されず、固有の塩基配列を有していると推測された。

mtDNAのtRNAプロリン領域および調節領域前半部の塩基配列を遺伝的指標に用いることにより、群馬県水産試験場産の人工継代アユを判別できると考えられた。

mtDNA調節領域前半部を含むDNA断片を増幅し、*XhoI*を用いて制限酵素処理を行うPCR-RFLP法により、塩基配列分析より簡便に群馬県水産試験場産の人工継代アユを判別できる可能性が示された。

PCR-RFLP法により、2004年に群馬県水産試験場産の人工種苗が放流された常浪川から採捕された

アユの中に、群馬県水産試験場産の人工種苗由来のアユが存在したと推定された。

## 謝 辞

本研究に心良くご協力いただいた東蒲原郡漁業協同組合、ならびに新潟県水産振興協会の方々に深謝いたします。また、DNAシーケンサーの使用を許可していただいた新潟県水産海洋研究所に謝意を表します。

## 文 献

- 1) 内田和男：アユの健苗性評価方法。放流魚の健苗性と育成技術（北島 力編），東京，恒星社厚生閣，1993，51-62.
- 2) 吉沢和俱：アユの種苗生産と遺伝的多様性の保持。海洋。30，229-232(1998)
- 3) 井口恵一郎：アユ地域個体群の遺伝的生物地理。水産育種。30，17-21(2001)
- 4) 原田泰志：放流と遺伝的多様性。魚から見た水環境-復元生態学に向けて/河川編-（森 誠一監修・編集），東京，信山社サイテック，1998，41-47.
- 5) 内田和男：アユの種苗放流が生物の多様性に与える影響。アクアネット。8(1)，42-45(2005)
- 6) 近藤桂太，今井貞美，高橋信夫，野口大毅，谷口順彦：耳石ストロンチウムマーカーおよび遺伝マーカーに基づく吉野川上流域に放流された海系人工採苗アユの再捕確認。水産育種。36，25-32(2006)
- 7) 岩田裕士，武島弘彦，田子泰彦，渡辺勝敏，井口恵一郎，西田 陸：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。日水誌。73，278-283(2007)
- 8) 藤井徹生：DNA分析で調べるヒラメの秘密。養殖。40(13)，84-87(2003)
- 9) Obata, Y., Imai, H. Kitakado, T. Hamasaki, K. and Kitada, S.: The contribution of stocked mud crabs *Scylla paramamosain* to commercial catches, estimated using a genetic stock identification technique in Japan. Fisheries Res. 80, 113-121(2006)
- 10) 日本エヌ・ユー・エス（株）。平成7年度広域資源管理放流管理手法開発に関わる業務（ミトコンドリアDNA分析に関わる業務）報告書，東京，日本エヌ・ユー・エス（株），1996，103p
- 11) Shields, G. S., and Kocher, T. D.: Phylogenetic relationship of North American Ursids based on analysis of mitochondrial DNA. Evolution. 45, 218-221(1991)
- 12) Ishiguro, N., Miya, M. and Nishida, M.: Complete Mitochondrial DNA Sequence of ayu *Plecoglossus altivelis*. Fish. Sci. 67, 474-481(2001)
- 13) Kimura, M.: A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111-120(1980)
- 14) Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M.: MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5, 150-163(2004)
- 15) Iguchi, K., Tanimura, Y. Takeshima, H. and Nishida, M.: Genetic variation and geographic population structure of amphidromous ayu *Plecoglossus altivelis* as examined by mitochondrial DNA sequencing. Fish. Sci. 65, 63-67(1999)
- 16) 鈴木究真，久下敏宏，新井 肇，泉庄太郎：人工継代アユの遺伝的・形態的特性および冷水病耐性。群馬県水産試験場研究報告。11，41-43(2005)
- 17) Iguchi, K., Tanimura, Y. and Nishida, M.: Sequence divergence in the mtDNA control region of amphidromous and landlocked forms ayu. Fish. Sci. 63, 901-905(1997)
- 18) 谷口順彦，関 伸吾，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。日水誌。49，1655-

1663(1983)

19) 吉沢和俱：継代飼育アユのアイソザイム分析による遺伝的近交度の把握. 群馬県水産試験場研究報告. 9, 67-78(2003)

20) 田中英樹, 吉沢和俱：アユの攻撃行動に及ぼす水温の影響. 群馬農業研究E水産. 10, 53-58(1994)

21) Takeshima, H., Iguchi, K., and Nishida, M.: Unexpected ceiling of genetic differentiation in the control region of the mitochondrial DNA between different subspecies of the Ayu *Plecoglossus altivelis*. Zool. Sci. 22, 401-410(2005)