

## 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

樋口 正仁, 佐藤 雍彦, 野上 泰宏, 兵藤 則行

Genetic population structure of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) in rivers  
where reared-fish introduced, inferred from mitochondrial DNA sequences

Masahito HIGUCHI, Yasuhiko SATO, Yasuhiro NOGAMI and Noriyuki HYODO

キーワード：イワナ, ミトコンドリア DNA

イワナ (*Salvelinus leucomaenis*) は、河川漁業や遊漁にとって重要な魚種であり、資源の維持・増大を目的とした様々な活動が行われている。特に、種苗の放流が各地で盛んに行われている。

種苗放流には自然集団に対して遺伝的攪乱を生じさせる問題が、近年の遺伝学的な研究の進展によって指摘されている。イワナにも、遺伝的な分化を遂げた集団が日本各地に存在することが明らかになり<sup>1-4)</sup>、遺伝的攪乱を生じさせない資源の維持・増殖が求められている<sup>5)</sup>。一方、漁場の管理・利用については、在来集団の保護や遊漁利用などの目的に応じて生息域をいくつかの区域に分けて、増殖や保全、利用を図るゾーニング管理の考え方が提唱されている<sup>6)</sup>。

在来集団の保護を目的としたゾーニング管理の対象範囲の決定には、他の地域から持ち込まれた移入遺伝子の存在を確認することも重要である。新潟県では、放流が行われていない生息地での遺伝的特徴に関する研究が行われているが<sup>1, 7)</sup>、放流が行われている生息地のイワナ集団を対象とした遺伝学的な研究はごく一部に過ぎない<sup>8)</sup>。そこで、本研究は、イワナの漁場管理を考えるため、放流が行われている生息地でのイワナ集団の遺伝的特徴を明らかにすることを目的に行った。

### 材料と方法

分析には、早川、三面川、阿賀野川および姫川の6地点 (HA1, ML1, ML2, ML3, A2, HI1) から

採集された個体を供した (図1)。これらの地点については、関係する漁業協同組合および遊漁者団体からの聞き取りにより、採集地点近くにおいてイワナの放流が行われたとの情報を得ている。

採集されたイワナについては、鱭もしくは個体全てを100%エタノールで固定・保存し、試験場に持ち帰った。粗DNAの抽出は、フェノール・クロロホルム法<sup>9)</sup>もしくはPuregene (QIAGEN社製)を用いて行った。mtDNA分析は、シトクロームb領域の557bpの塩基配列を指標として行った。分析は、Yamamoto *et al.*<sup>1)</sup>に準拠し、直接塩基配列決定法によってPCR産物の塩基配列を決

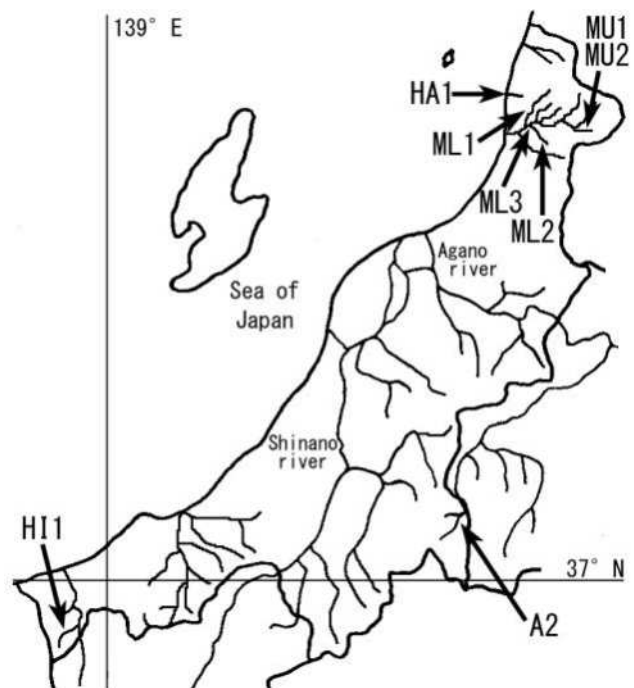


図1 分析に供したイワナ集団の位置図

定した。観察された配列は、Yamamoto *et al.*<sup>1)</sup>、Kubota *et al.*<sup>2)</sup>、Kikko *et al.*<sup>3)</sup>、山本ら<sup>4)</sup>および樋口ら<sup>7)</sup>で報告されている配列と照合し、ハプロタイプを判別した。集団内の塩基多様度はMEGA4.1<sup>10)</sup>を使用して算出し、ハプロタイプ間の塩基置換数の推定には木村の2変数法<sup>11)</sup>を用いた。

ハプロタイプ間の遺伝的類縁関係の推定には、Yamamoto *et al.*<sup>1)</sup>、Kubota *et al.*<sup>2)</sup>、山本ら<sup>4)</sup>、樋口ら<sup>7)</sup>で報告されているハプロタイプと、本研究で観察されたハプロタイプを用いた。最節約ネットワークの作成には、TCS ver.1.13<sup>11)</sup>を使用した。

三面川については、上流域に在来集団が存在すると考えられ、そのハプロタイプ組成は樋口ら<sup>7)</sup>によって報告されている。そこで、樋口ら<sup>7)</sup>のデータを用いて、放流集団との遺伝的組成の比較を

行った。遺伝的分散分析 (AMOVA)、集団間の  $F_{ST}$  値の算出、および Raymond and Rousset<sup>13)</sup> の方法によるハプロタイプ頻度の異質性の検定は Arlequin ver.3.5<sup>14)</sup> を用いて行った。

## 結 果

分析した 79 個体から 14 種類のハプロタイプが観察された (表 1)。それらのハプロタイプのうち、Hap-41 (Accession number : AB685730) および Hap-42 (AB685731) は、本研究によって初めて見出されたハプロタイプであった。これらの 2 つのハプロタイプには、1 箇所の塩基置換が観察された。Hap-41, Hap-42 以外のハプロタイプは、いずれも Yamamoto *et al.*<sup>1)</sup> および樋口ら<sup>7)</sup> で既に報告されたハプロタイプであった。

表 1 mtDNA シトクローム b 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

	HA1	ML1	ML2	ML3	A2	HI1
	N=16	N=16	N=16	N=5	N=20	N=6
Hap-1	-	0.125	-	0.200	-	0.167
Hap-5	0.188	0.125	0.375	-	0.050	0.167
Hap-7	0.125	0.063	0.063	-	0.150	-
Hap-8	-	-	-	-	0.100	-
Hap-9	-	-	-	-	-	0.667
Hap-10	0.188	0.063	0.438	0.400	0.100	-
Hap-14	-	-	-	-	0.050	-
Hap-16	-	-	0.125	-	0.400	-
Hap-19	-	-	-	-	0.100	-
Hap-22	-	-	-	-	0.050	-
Hap-39	-	0.063	-	0.400	-	-
Hap-40	0.438	0.375	-	-	-	-
Hap-41	0.063	0.063	-	-	-	-
Hap-42	-	0.125	-	-	-	-
$h$	0.767	0.850	0.692	0.800	0.821	0.600
$\pi \times 100$	0.610	0.794	0.323	0.833	0.368	0.398

$h$  : ハプロタイプ多様度、 $\pi$  : 塩基多様度

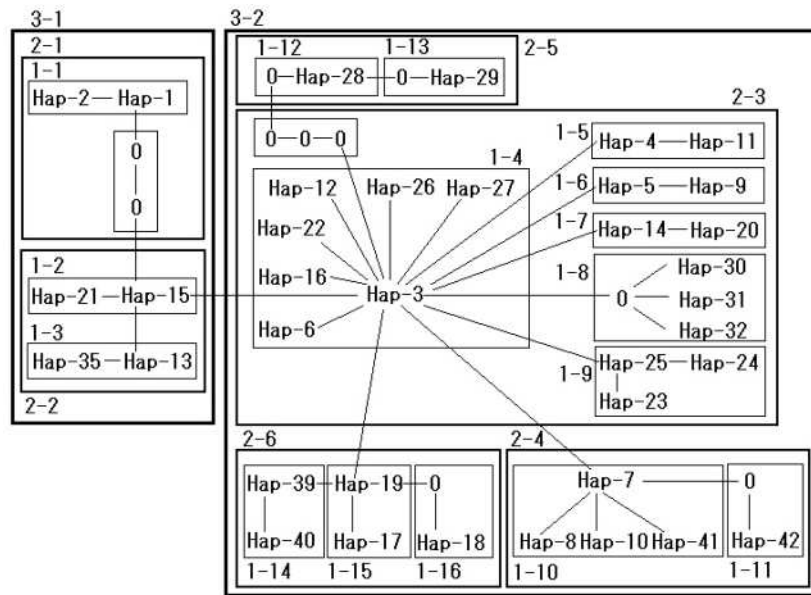


図2 ハプロタイプの95%最節約ネットワーク

各結合単位は1つの変異を、ゼロは観察されていないネットワーク内の仮想分岐節を表す。黒四角は、クレードを示す。

本研究で新たに確認された2つのハプロタイプと全国各地のイワナ集団から報告されているハプロタイプを用いて最節約ネットワークを作成した結果、Hap-41はクレード1-10に区分され、Hap-7より分岐したと推定された(図2)。また、Hap-42はクレード1-11に区分されたが、Hap-42もHap-7から生じたハプロタイプと推定された。Hap-41および42のいずれもクレード2-4に区分され、Hap-41はHA1やML1集団、Hap-42はML1集団で観察された(表1)。

各集団におけるハプロタイプの出現状況を見ると、HA1およびML1集団ではHap-40の出現頻度がそれぞれ0.438、0.375と比較的高い値であった(表1)。ML2およびML3集団では、Hap-10のハプロタイプ頻度が0.438と0.400であり、比較的高かった。また、A2集団ではHap-16の頻度が0.400と最も高く、琵琶湖周辺の在来集団で観察されるHap-19が確認された。HI1ではHap-9の頻度が高かった(0.667)。三面川上流の在来集団で確認されたHap-39は、ML1とML3集団で観察され、Hap-40はHA1とML1集団で認められた(表1)。

集団内の遺伝的変異の程度を表すハプロタイプ多様度( $h$ )は、0.69～0.85の範囲であり(表1)、

ML1集団のハプロタイプ多様度が最も高かった。集団内の塩基多様度( $\pi \times 100$ )は、0.323～0.833の範囲であった(表1)。集団内の遺伝的変異性を在来集団と比較するため、樋口ら<sup>7)</sup>の在来集団のデータを用いて分析した結果、ハプロタイプ多様度および塩基多様度のいずれにおいても、非在来集団の中央値が在来集団の値より高かった(表2)。

表2 集団内の遺伝的変異の中央値の比較

	非在来集団	在来集団*
集団数	6	8
$h$	0.784	0.544
$\pi \times 100$	0.504	0.260

\*: 樋口ら<sup>7)</sup>のデータを基に算出

三面川水系の5つの集団を対象に遺伝的分散分析(AMOVA)を行った結果、 $F_{ST}$ 値が0.103であり、上流域(MU1, MU2)と下流域(ML1, ML2, ML3)では遺伝的組成が異なると推定された(表3)。また、上流の2つの集団間では(MU1, MU2)、ハプロタイプ組成に異質性は認められなかったが(表4)、下流側にはML2集団のように他の集団と異質性が認められる集団が存在した(表4)。

表3 三面川のイワナ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			$F_{ST}$	$p < 0.001$
	流域間 変異	流域内 集団間変異	集団内 変異		
上流域 対 下流域	0.98	9.32	89.70	0.103	

表4 三面川におけるイワナ集団間の異質性検定の  $P$  値 (左下段) および  $F_{ST}$  値 (右上段)

集団名	MU1	MU2	ML1	ML2	ML3
MU1	-	0.018	0.113	0.147	0.133
MU2	0.159 ± 0.005	-	0.020	0.124	0.023
ML1	0.003 ± 0.001	0.161 ± 0.007	-	0.164	0.103
ML2	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.001	-	0.109
ML3	0.009 ± 0.001	0.218 ± 0.008	0.142 ± 0.005	0.036 ± 0.002	-

異質性検定におけるマルコフ連鎖長 : 30,000 step

## 考 察

在来集団の保護には、放流や個体の移動に伴う遺伝的攪乱を避けなければならない。遺伝的攪乱からの回避方策の構築には、生息地ごとの外来遺伝子の出現範囲の把握が重要であると考えられる。これまでのイワナの在来集団の mtDNA 分析により<sup>1-4,7)</sup>、生息地特有のハプロタイプの存在が明らかになっていることから、これらのハプロタイプを指標とした分析が遺伝的攪乱の有無の推定の1つの方法となり得る。

本調査で検出されたハプロタイプのうち、Hap-19 は琵琶湖周辺で<sup>1,3)</sup>、Hap-22 は関東南部の河川で<sup>4)</sup> 特有に観察されるハプロタイプであると推定されている。これらのことから、A2 集団では、遺伝的攪乱が生じていると推測された。

また、本研究で初めて確認された2つのうち、Hap-41 は他の生息地での出現情報は確認されていない。それに対し、Hap-42 については、(独)水産総合研究センターの山本祥一郎博士によると、本州中部の複数の河川で観察されている(私信)。従って、Hap-41、42 の2つのハプロタイプが在来遺伝子なのか、外来遺伝子なのかを判別するには、放流種苗も対象にした詳細な調査が必要であると考えられた。

三面川の上流には、独自の遺伝的組成を有した

在来集団の存在が報告されている<sup>7)</sup>。その一方、本研究によって、在来集団とはハプロタイプ組成が異なる集団が下流に生息することが明らかになった。下流側では、養殖イワナの放流が行われおり、外来遺伝子の移入の可能性も考えられる。在来集団の生息地と下流域の間には、大型のダムが存在している。ダムにより、下流域から上流域への個体の移動は困難であることから、移動によって在来集団の遺伝子攪乱が生じる可能性は小さいと考えられる。しかし、下流域のイワナ集団の遺伝的組成が異なったことや、養殖イワナの放流が行われていることから、在来集団を遺伝子攪乱から回避するには、上流域への移植・放流を制限する取り組みが必要であると考えられた。さらに、遺伝子攪乱が生じているイワナ集団も新潟県内で確認されたことから、在来集団の保護と共存する漁場管理を進めるには、漁業協同組合や遊漁者、関係機関への啓発などの取り組みが今後必要であろう。

## 要 約

イワナの漁場管理のあり方を考えるため、mtDNA シトクローム b 領域の塩基配列を指標に、放流が行われている生息地でのイワナ集団の遺伝的特徴を調査した。

本研究で新たに Hap-41 と 42 の 2 つのハプロタイプが確認され、これらのハプロタイプは、いずれも Hap-7 より分岐したと推定された。

放流が行われている集団のハプロタイプ多様度 ( $h$ ) は 0.69 ~ 0.85、塩基多様度 ( $\pi \times 100$ ) は、0.323 ~ 0.833 の範囲であり、集団内の遺伝的変異性は、在来集団と比べて高い値を示す傾向が認められた。

放流が行われている集団の中には、生息地以外の場所から持ちこまれたと推定されるハプロタイプが確認され、遺伝的攪乱が生じている集団が新潟県内に存在することが明らかになった。

## 謝 辞

本研究は、水産庁の健全な内水面生態系復元等推進委託事業によって実施された。(独)水産総合研究センターの山本祥一郎博士には貴重なご助言をいただいた。また、三面川鮭産漁業協同組合、魚沼漁業協同組合および糸魚川内水面漁業協同組合の方々には標本の採集にご協力いただき、新潟県水産海洋研究所には機器の借用をご許可いただいた。ここに厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Yamamoto S, Morita K, Kitano S, Watanabe K, Koizumi I, Maekawa K, Takamura K. Phylogeography of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Zool. Sci.* 2004; **21**: 229-240.
- 2) Kubota H, Doi T, Yamamoto S, Watanabe S. Genetic identification of native populations of fluvial white-spotted charr *Salvelinus leucomaenis* in the upper Tone river drain-age. *Fish. Sci.* 2007; **73**: 270-284.
- 3) Kikko T, Kuwahara M, Iguchi K, Kurumi S, Yamamoto S, Kai Y, Nakayama K. Mitochondrial DNA population structure of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) in the Lake Biwa water

system. *Zool. Sci.* 2008; **25**: 146-153.

- 4) 山本祥一郎, 中村智幸, 久保田仁志, 土井隆秀, 北野 聡, 長谷川 功. ミトコンドリアDNA分析に基づく関東地方産イワナの遺伝的集団構造. *日水誌.* 2008; **74**: 861-863.
- 5) 中村智幸. 遺伝子解析によるイワナの原種探し. *広報ないすいめん* 2005; **41**: 46-49.
- 6) 中村智幸. イワナをもっと増やしたい! 「幻の魚を守り、育て、利用する新しい方法」, フライの雑誌社, 東京, 2007.
- 7) 樋口正仁, 兵藤則行, 佐藤雍彦, 野上泰宏, 河野成実. ミトコンドリア DNA 分析による信越地方産イワナの遺伝的集団構造. *日水誌.* 2011; **77**: 1098-1100.
- 8) 樋口正仁, 野上泰宏, 兵藤則行. 登川におけるイワナ (*Salvelinus leucomaenis*) の遺伝的集団構造. *新潟県内水面水産試験場研究報告.* 2011; **35**: 1-8.
- 9) 日本エヌ・ユー・エス (株). 平成7年度広域栽培資源放流管理手法開発調査に関わる業務 (ミトコンドリア DNA 分析に関わる業務) 報告書, 日本エヌ・ユー・エス (株), 東京, 1996.
- 10) Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 2007; **24**: 1596-1599.
- 11) Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; **16**: 111-120.
- 12) Clement M, Posada D, Crandall KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 2000; **9**: 1657-1660.
- 13) Raymond M, Rousset F. An exact test for population differentiation. *Evolution* 1995; **49**: 1280-1283.
- 14) Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resources.* 2010; **10**: 564-567.