

稗貫川遡上天然アユと同河川放流人工種苗の遺伝特性

照井 沙友里 ・ 奥村 大志 ・ 塚越 英晴
梶原 昌五 ・ 阿部 周一

岩手大学教育学部研究年報 第74巻 別刷
平成27年3月

Reprinted from the Annual Report of
the Faculty of Education, Iwate University, Vol.74
March 2015

稗貫川遡上天然アユと同河川放流人工種苗の遺伝特性

照井沙友里*・奥村大志*・塚越英晴*・梶原昌五*, **・阿部周一*

(2014年9月30日受付, 2014年12月22日受理)

1. はじめに

アユ (*Plecoglossus altivelis*) はサケ科の魚類であり、秋から冬に川で孵化して海へ流下し、海で成長した稚アユが翌年4月～7月に川を遡上し成熟・産卵するという淡水両側回遊型の生活史を送る (谷口・池田, 2009)。アユは、特に河川において渓流釣りの対象種として大変需要があり全国的に最重要内水面漁業種である。同様に岩手県の内水面漁業においても最重要種であり、県内で昭和20年代から遊漁を主な目的とした種苗放流が行われてきた (煙山, 2007)。近年では、県内の河川で計20～30トンのアユが4月上旬～8月上旬に放流されており、その内約9トンが北上川水系で放流されている。北上川水系のほとんどの支流では主に県内産の種苗のみを放流しているが、稗貫川および砂鉄川では県内産だけでなく県外産の種苗放流 (稗貫川では静岡県産・徳島県産、砂鉄川では宮城県産・秋田県産) も行われている (千葉・煙山, 2007; 天下谷・大友, 2008; 石川・大友, 2009; 藤本・石川, 2010; 山ノ目・石川, 2011; 菊池, 2012)。

アユ産業には種苗放流が必須である一方で、生息地を無視した人為的な移植が繰り返されてきたことから、移植放流は人為的な分布域の拡大、過剰放流による天然魚の駆逐、遺伝子汚染等、生態的かく乱のリスクを伴うことが危惧されている (内田, 1997; 井口・武島, 2006)。そのため、在来集団の遺伝的多様性の保全や資源の持続的利用を図る上で、在来集団と人工種苗集団の遺伝特性の把握は重要課題とされてきた。

先行研究 (井口・武島, 2006) から、マイクロサテライト DNA (msDNA) でみた場合、アユは西と東で (太平洋側では阿武隈川河口付近を、日本海側では能登半島付近を各々境界に) 大きな遺伝グループを形成していることが知られている。また、岩手県内の人工種苗集団と沿岸8河川の遡上集団のアイソザイムやミトコンドリア DNA (mtDNA) を用いた遺伝組成調査の結果では、人工種苗集団の遺伝的多様性は著しく低下しているが、河川遡上集団の遺伝的多様性はある程度維持されている事が分かっている (遠藤・泉, 2000; 遠藤・宇部, 2001; 遠藤・宇部, 2002; 遠藤・支倉, 2003; 遠藤・支倉, 2004)。さらに、人工種苗集団と河川遡上集団は遺伝的に異なる性質を有しており、人工種苗集団からの再生産による大規模な資源の添加は起こっていないと推察されている (遠藤・支倉, 2004)。しかし、これらの研究で用いられたアイソザイムや mtDNA マーカーの多型性がそれほど高くないことが指摘され、msDNA のような多型

* 岩手大学三陸水産研究センター, ** 岩手大学教育学部

性に富んだ遺伝マーカーを使用した詳細な検討が必要とされている。加えて、上記の調査では沿岸河川を中心に分析されており、北上川水系は未調査となっていること、さらに県外種苗を持ち込んでいる稗貫川漁協などは他地域由来の種苗を持ち込むことに対する懸念がある事から当水系の遺伝特性の把握が求められている。

そこで、本研究では宮城県の北上川河口域で採集された、同河川に遡上すると考えられる集団（以下北上川遡上集団）、および同河川支流の稗貫川で放流されている種苗集団について、msDNA マーカーを用いて遺伝分析を行った。そして同年7月と10月に稗貫川で採集されたアユについても同様に遺伝分析を行い、同河川で採集された集団と、北上川遡上集団や放流された種苗集団を比較した。

2. 材料と方法

まず、2013年の北上川遡上集団のサンプルおよび同年に北上川水系稗貫川で放流された種苗サンプルを採集した（表1）。次に、稗貫川の5地点から、同年7月と10月の2回釣獲により採集を行い、サンプルを得た（図1、表1）。

集 団 名	個体数(尾)	
・種苗サンプル		
A; 岩手県北上川(北上川河口由来の幼魚)	38	
B; 岩手県金田一(秋田県由来の幼魚)	120	
C; 静岡県沼津(静岡県海産の幼魚)	85	
D; 岩手県盛(静岡県由来の幼魚)	96	
E; 岩手県盛(徳島県由来の幼魚)	69	
・河川採集サンプル		
	7月採集	10月採集
St.1; 亀ヶ森地区	28	52
St.2; 石鳥谷地区	50	50
St.3; 内川目地区	39	25
St.4; 外川目地区	35	36
St.5; 大迫地区	60	40

表1 本研究に用いたアユの採集地点と個体数(2013年採集)。

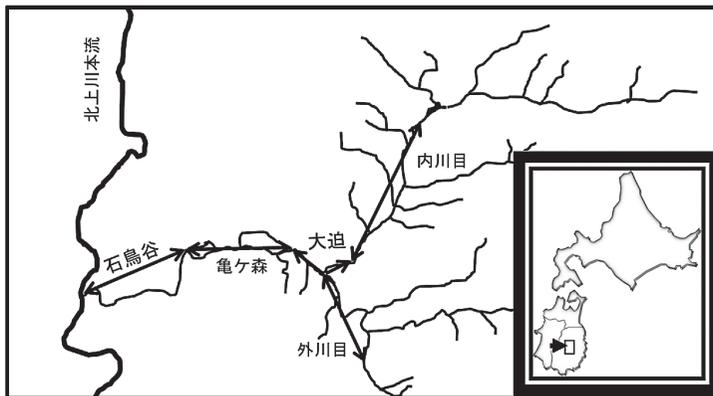


図1 本研究で用いたサンプルの採集区間(←→)。

稗貫川遡上天然アユと同河川放流人工種苗の遺伝特性

採集した魚体は -30°C で冷凍保存した後、99.5%エタノールに保存した。DNA抽出はエタノール保存された魚体から胸鱗もしくは筋肉の一部を採取し、Gentra Puregene Cell Kit (QIAGEN)を用いて添付のプロトコルに従って抽出した。

msDNA マーカーの最適化は、検出される対立遺伝子型の種類が多いことが見込まれる既報のマーカー54座(Hara et al., 2006; Iwata et al., 2006; Ha et al., 2007)を対象に行った。KAPA2G™Fast Multiplex PCR Kit (日本ジェネティクス)を用いて、同キットのプロトコルに従ってポリマーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) により標的領域を増幅し、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。その結果から、各座における標的領域の増幅の有無と増幅パターンの検討、および最適なアニーリング温度を探した。その際、増幅が見られない座、および増幅バンドが3つ以上みられる座を不合格と判定した。合格した座について、ジェネティックアナライザ 3130xl (Applied Biosystems: ABI) により電気泳動を行い、Peak Scanner (ABI) を用いて泳動ピークの形や数を確認した。このとき、サイズマーカーはLIZ500 (ABI) を用いた。以上の最適化により、4座 (Ple100, Ple39, Ple27, pag040) を本研究の遺伝マーカーとして選定した (表2)。

Locas	Repeat	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature(°C)
Ple100	(GACA) _n	F:GAAATCTCCCAGGACCATC R:TTCCAGCCTGTTGATAAGACG	57
Ple39	(GT) _n	F:ACGCTGGACTGAAACGATTGG R:ACGCTTAACCCAGTGGGCTGAA	57
Ple27	(GT) _n	F:TGCTATGGTGTGAATGCGTGAG R:TGGATGTTTGAATGGAGCGAG	57
pag040	(TG) _n	F:CCAAAGAAGAAAATCACCCACT R:CACGCAAACCAATTCTCT	57

表2 本研究で使用した各msDNA マーカーの繰り返し配列のモチーフ、プライマー配列とアニーリング温度

採集された各標本集団サンプルの対立遺伝子型は、最適化されたmsDNA 4座を用いて、上記の条件によりPCRを行い、ジェネティックアナライザ 3130xl (ABI) と Peak Scanner (ABI) により決定した。4座により得られた対立遺伝子型をもとに以下の解析を行った。まず、各集団が任意交配集団であるかを判定する Hardy-Weinberg 平衡検定のために、解析ソフト ARLEQUIN v3.1 (Excoffier et al., 2005) を用いてヘテロ接合度の観察値 (H_o) の平均および期待値 (H_e) の平均を算出した。また、遺伝的多様性の指標として各座の対立遺伝子数の豊富さを表すアليلリッチネス (A_r) を FSTAT 2.3.9 (Goudet, 1995) により計算した。次に、集団間の遺伝的分化を捉えるために解析ソフト PCAGEN (Goudet, 2005) により主成分分析を行った。また、解析ソフト ARLEQUIN v3.1 (Excoffier et al., 2005) を用いて遺伝分化係数 (F_{ST}) を算出した (10,000回試行)。有意水準は Sequential Bonferroni 法 (Rice, 1989) によって補正した。

3. 結果と考察

各標本集団の、各座におけるヘテロ接合度の観察値の平均と期待値の平均を表3に示す。北上川遡上集団についてみてみると、4座全てにおいてずれがみられなかった ($P>0.05$) ことから、集団内で任意交配していることが示された。対して岩手県金田一産 (秋田県由来)、静岡県沼津産、岩手県盛産 (静岡県由来) の種苗集団において、期待値と観察値のずれがみられた ($P<0.05$) ことから、人為的な種苗生産により任意交配していないことが予想された。アリルリッチネス (A_r) をみると、どの座においても北上川遡上集団の A_r は高い傾向にあるのに対し、各種苗集団の A_r は低い傾向にあった。これらの結果は県内沿岸河川を対象に行われた先行研究と同様の傾向を示した (遠藤・泉, 2000)。アユの人工種苗について、継代飼育により近親交配が進み遺伝的多様性が低下することが報告されている (Iguchi et al., 1999)。そのため、ヘテロ接合度の期待値と観察値のずれがみられ、かつ A_r の低い種苗集団は、継代飼育と人為的交配により遺伝的多様性が低下していると考えられる。

Locus	Population	A	B	C	D	E
	<i>n</i>	37	104	76	86	54
Ple100	A_r	22.1	15.4	16.5	16.7	13.0
	H_o	0.8378	0.6346*	0.7237*	0.6861*	0.8148
	H_e	0.9230	0.8331	0.8690	0.8852	0.8455
Ple39	A_r	9.2	7.5	8.5	8.7	9.0
	H_o	0.8378	0.5385*	0.6842	0.7558	0.8333
	H_e	0.7753	0.7052	0.7022	0.7794	0.8569
pag040	A_r	14.3	11.7	12.7	11.8	11.3
	H_o	0.6757	0.6539*	0.6842	0.8372	0.7407
	H_e	0.8249	0.8315	0.7712	0.8680	0.8519
Ple27	A_r	11.5	11.3	12.1	12.9	10.2
	H_o	0.7568	0.7019	0.7632	0.8140	0.8519
	H_e	0.8660	0.8090	0.8927	0.8649	0.8569

Locus	Population	7月					10月				
		St.1	St.2	St.3	St.4	St.5	St.1	St.2	St.3	St.4	St.5
	<i>n</i>	27	47	36	34	59	41	42	24	34	38
Ple100	A_r	15.0	12.5	17.9	14.2	14.2	17.4	15.3	15.0	18.2	16.7
	H_o	0.7407	0.8298	0.6944	0.8235	0.7627	0.7561	0.6905	0.5833*	0.7647	0.8421
	H_e	0.7736	0.7346	0.8063	0.7625	0.8223	0.8729	0.8660	0.8715	0.8718	0.9067
Ple39	A_r	9.0	6.9	6.9	4.9	7.3	8.6	8.9	7.0	9.0	9.0
	H_o	0.8519	0.7234	0.7778	0.7647	0.4915*	0.6098	0.7381	0.5833	0.6765	0.5790
	H_e	0.7547	0.7344	0.6937	0.6194	0.5524	0.6209	0.6974	0.5426	0.6782	0.7088
pag040	A_r	11.0	13.0	11.6	13.0	9.8	16.8	17.0	15.8	16.9	13.0
	H_o	0.6667	0.5532*	0.6111*	0.8824*	0.6610	0.8537	0.7857	0.7500	0.9412	0.6842
	H_e	0.8050	0.7815	0.7621	0.7691	0.7705	0.8576	0.8207	0.8254	0.8784	0.8193
Ple27	A_r	11.0	11.2	10.7	10.3	11.1	12.0	11.9	12.0	12.4	11.6
	H_o	0.6296	0.7660	0.7500	0.7647	0.7119	0.6585*	0.7381	0.8750	0.7941	0.8421
	H_e	0.7820	0.8691	0.8337	0.8284	0.7789	0.8488	0.8732	0.9131	0.8815	0.8849

*Hardy-Weinberg 平衡から有意な逸脱があると判断 (Bonferroni 補正後: $P<0.05$)

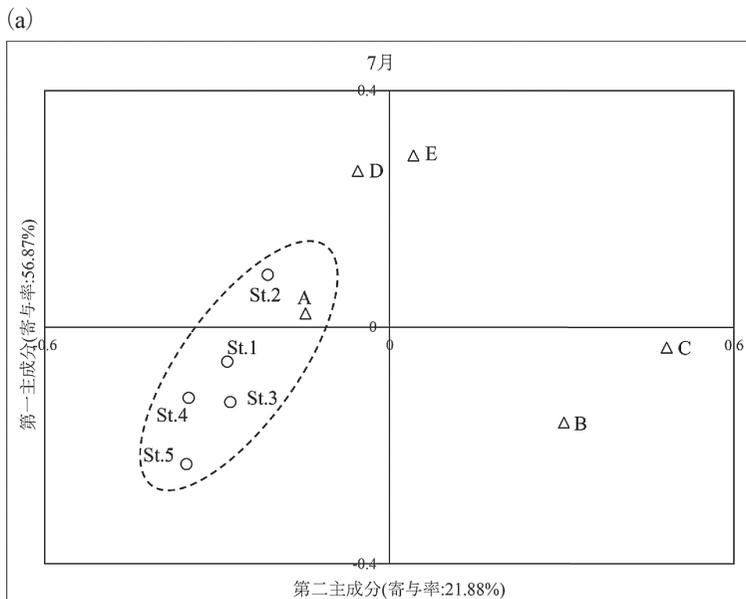
表3 各msDNA マーカーに基づく、各集団における解析個体数(*n*)、アレルリッチネス (A_r)、ヘテロ接合度の観察値 (H_o) と期待値 (H_e)。集団の記号は表1に対応。

稗貫川遡上天然アユと同河川放流人工種苗の遺伝特性

F_{ST} の結果についてみると、北上川遡上集団と各種苗集団では、北上川遡上集団とすべての種苗集団において遺伝的分化が認められた。各種苗集団間では、岩手県盛産の静岡県由来と徳島県由来の種苗集団間を除く全ての組み合わせで遺伝的分化が認められた。これらのことから、北上川遡上集団と各種苗集団、また各種苗集団間で遺伝的に異なることが示された(表4a)。

7月に採集された5地点の集団についてみると、 F_{ST} の結果から5地点全ての集団間で遺伝的分化は認められなかった(表4a)。一方、7月に採集された5地点の集団と種苗集団の全ての組み合わせにおいて遺伝的分化が認められた(表4a)。主成分分析の結果についてみると、7月に採集された5地点の集団は、いずれも北上川遡上集団と遺伝的に近かった(図2a)。よって、7月の稗貫川集団には北上川遡上個体が多く貢献していたと考えられる。

10月に採集された集団では、 F_{ST} の結果から、亀ヶ森地区と石鳥谷地区の間で遺伝的分化がなく、北上川遡上集団と遺伝的差異がなかった(表4b)。また大迫地区、内川目地区、および外川目地区の集団も三者間で遺伝的差異がなく、静岡県沼津産種苗集団と遺伝的分化が認められなかった(表4b)。次に主成分分析の結果についてみてみると、稗貫川下流域にあたる亀ヶ森地区および石鳥谷地区の集団は北上川遡上集団と近い関係にあるのに対し、同河川中流域の内川目、外川目、および大迫地区の集団では静岡県沼津産種苗集団と近い傾向にあった(図2b)。これらのことから、10月期の稗貫川集団には北上川遡上個体と静岡県沼津産種苗個体が各々貢献していたと考えられる。



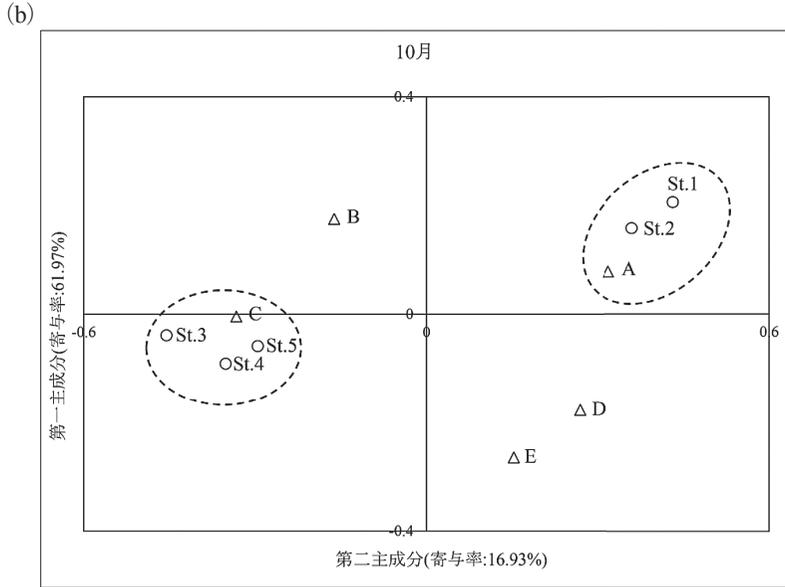


図2 稗貴川アユの主成分分析の結果。a:2013年7月に採集されたサンプル(○)と種苗サンプル(△)、b:2013年10月に採集されたサンプル(○)と種苗サンプル(△)。図中の集団の記号は表1に対応。

(a)

Population	A	B	C	D	E	St.1	St.2	St.3	St.4	St.5
A	—									
B	0.0388*	—								
C	0.0593*	0.0128*	—							
D	0.0104*	0.0431*	0.0554*	—						
E	0.0214*	0.0397*	0.0445*	0.0041	—					
St.1	0.0066	0.0516*	0.0832*	0.0249*	0.0304*	—				
St.2	0.0148*	0.0554*	0.0743*	0.0176*	0.0254*	0.0046	—			
St.3	0.0092	0.0514*	0.0810*	0.0274*	0.0386*	0.0020	0.0129	—		
St.4	0.0167*	0.0648*	0.0992*	0.0373*	0.0466*	-0.0067	0.0109	0.0055	—	
St.5	0.0202*	0.0668*	0.1065*	0.0467*	0.0614*	0.0116	0.0347*	0.0012	0.0098	—

(b)

Population	A	B	C	D	E	St.1	St.2	St.3	St.4	St.5
A	—									
B	0.0388*	—								
C	0.0593*	0.0128*	—							
D	0.0104*	0.0431*	0.0554*	—						
E	0.0214*	0.0397*	0.0445*	0.0041	—					
St.1	0.0077	0.0538*	0.0898*	0.0234*	0.0406*	—				
St.2	0.0040	0.0456*	0.0737*	0.0180*	0.0325*	-0.0002	—			
St.3	0.0856*	0.0238	0.0042	0.0732*	0.0585*	0.1099*	0.0936*	—		
St.4	0.0732*	0.0248*	0.0115*	0.0571*	0.0465*	0.0936*	0.0766*	-0.0028	—	
St.5	0.0570*	0.0144	0.0092	0.0484*	0.0358*	0.0838*	0.0657*	0.0047	0.0028	—

*統計的に集団間で分化していると判断 (Bonferroni 補正後:P<0.05)

表4 msDNA マーカー4座に基づく各集団間の遺伝的分化の度合い(F_{ST})。a; 種苗集団と7月採集集団、b; 種苗集団と10月採集集団。表中の集団の記号・番号は表1に対応。

稗貫川遡上天然アユと同河川放流人工種苗の遺伝特性

比較対照として用いた北上川遡上集団は、北上川河口で採集された集団であることから、自然再生産している天然遡上集団と言える。このことから、2013年度の稗貫川アユ資源は、7月期には主に天然遡上個体が、10月期にも天然遡上個体が多く貢献していたと考えられる。先行研究によると、岩手県アユについて在来集団に対する過去の種苗放流の影響はほとんどないことが示されている（遠藤・支倉, 2004）。そのため、本研究で天然遡上集団と遺伝的に同等であると判断された集団について、過去の移植放流の影響をどのくらい受けているか（つまり純粋な在来個体であるか否か）は不明であるものの、その影響は少ないものと思われる。

谷口・池田（2009）は他河川のアユ種苗を用いて放流する場合、在来集団の遺伝的多様性に配慮し、なるべく近縁の種苗を用いる事が望ましいとしている。この事をふまえると、地理的に最も離れた徳島県由来の岩手県盛産種苗よりも、同じ東日本のグループ（今回放流しているものでは秋田県由来のもの）に属する種苗、あるいは、北上川産もしくは北上川と近縁な種苗を入手可能であるならば、その種苗を用いることが、稗貫川のアユの遺伝的多様性を維持して行く上で望ましいと考えられる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、試験検体の採集にご協力を頂きました岩手県稗貫川漁業協同組合の組合員の皆さまに深く感謝申し上げます。また、本研究の一部は、SANRIKU（三陸）水産研究教育拠点形成事業の予算により実施されました。

引用文献

- 天下谷昭文・大友俊武「アユ種苗放流状況等アンケート調査」（『岩手県内水面水産技術センター年報』, 2008）, 13-18.
- 千葉一郎・煙山彰「アユ種苗放流状況等アンケート調査」（『岩手県内水面水産技術センター年報』, 2007）, 12-16.
- 遠藤良徳・泉英弘「アユ放流種苗の遺伝的組成調査」（『岩手県内水面水産技術センター年報』, 2000）, 39-43.
- 遠藤良徳・宇部稔「そ上海産アユおよび放流種苗の遺伝的組成調査- II」（『岩手県内水面水産技術センター年報』, 2001）, 10-14.
- 遠藤良徳・宇部稔「そ上海産アユおよび放流種苗の遺伝的組成調査- III」（『岩手県内水面水産技術センター年報』, 2002）, 6-12.
- 遠藤良徳・支倉理「そ上海産アユおよび放流種苗の遺伝的組成調査- IV」（『岩手県内水面水産技術センター年報』, 2003）, 4-10.
- 遠藤良徳・支倉理「そ上海産アユおよび放流種苗の遺伝的組成調査- V」（『岩手県内水面水産技術センター年報』, 2004）, 6-10.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S., "Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis.", *Evol. Bioinform. Online*, 1 (2005) · 47-50.
- 藤本勝彦・石川豊「アユ種苗放流状況等アンケート調査」（『岩手県内水面水産技術センター年報』, 2010）, 6-9.
- Goudet, J., "FSTAT(version 1.2): A computer program to calculate F-statistics.", *J. Heredity*, 86 (1995) · 485-486.

Goudet, J. (2005). PCAGEN. Website last modified on August 23, 2005.

Download from : <<http://www2.unil.ch/popgen/software/pcagen.htm>>(Download 2014-09-30)

Ha, T., Okabe, M., Morishima, K., Nakayama, I., Nagasawa, K., and Umino, T., "Development and multiplex PCR amplification of new microsatellite markers for the freshwater fish, ayu (*Plecoglossus altivelis*)"., *Mol. Ecol. Notes*, 7 (2007)・635-637.

Hara, M., Sakamoto, T., Sekino, M., Ohara, K., Matsuda, H., Kobayashi, M. and Taniguchi, N. , "Characterization of novel microsatellite DNA markers in ayu (*Plecoglossus altivelis*).", *Fish. Sci.*, 72 (2006)・208-210.

Iguchi, K., Watanabe, K., Nishida, M., "Reduced mitochondrial DNA variation in hatchery populations of ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultured for multiple generations.". *Aquaculture*, 178 (1999)・235-243.

井口恵一郎, 武島弘彦「アユ個体群の構造解析における進展と今日的意義」(『独立行政法人水産総合研究センター研究報告』別冊5号, 2006), 187-195.

石川豊・大友俊武「アユ種苗放流状況等アンケート調査」(『岩手県内水面水産技術センター年報』, 2009), 14-19.

Iwata, H., Watanabe, K., Takeshima, H., Iguchi, K., and Nishida, M., "Isolation and characterization of 49 polymorphic microsatellite loci in the ayu, *Plecoglossus altivelis*.". *Mol. Ecol. Notes*, 6 (2006)・1076-1079.

煙山彰「岩手県におけるアユ増殖の現状と問題点」(『H.19年度岩手県水産試験研究成果等報告会』, 2007)(オンライン)

入手先 <<http://www2.pref.iwate.jp/~hp5507/report/seika-h19/ayu-kemuyama.pdf>> (入手2014-09-30)

菊池 経章「アユ種苗放流状況等アンケート調査」(『岩手県内水面水産技術センター年報』, 2012), 5-11.

Rice, W.R., "Analysisng table of statistical tests.", *Evolution*, 43 (1989)・223-225.

谷口順彦, 池田実『アユ学; アユの遺伝的多様性の利用と保全.』(築地書館, 2009)

内田和男「アユの種苗放流が河川の生物の多様性に与える影響」(『中央水研ニュース』18号, 1997)(オンライン)

入手先 <<https://www.fra.affrc.go.jp/bulletin/bull/bull-b5/30.pdf>> (入手2014-09-30)

山ノ目健・石川豊「アユ種苗放流状況等アンケート調査」(『岩手県内水面水産技術センター年報』, 2011), 5-11.