

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19580200

研究課題名 (和文) 分子生態学的アプローチによるワカサギにおける生活史分岐の実態解明

研究課題名 (英文) Molecular ecological study on divergence of the life history of Japanese pond smelt

研究代表者

池田 実 (IKEDA MINORU)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：70232204

研究成果の概要 (和文)：

青森県小川原湖におけるワカサギの生活史分岐 (遡河回遊型と滞留型) の実態を解明するため、他の地域個体群との比較の上で、DNA 分析を行った結果、

- 1) 各地域個体群は固有の遺伝子型を持ち、高い遺伝的分化を示した。この結果は、移殖に頼ることなく各個体群を保全・管理する必要があることを示している。
- 2) 耳石の微量元素で分けた小川原湖の 2 型の間には、遺伝的な違いはなかった。したがって、これらは同じジーンプール内で生じていると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

To elucidate whether genetic differentiation has occurred between the two life history forms (anadromous and resident) of Japanese pond smelt (*Hypomesus nipponensis*) in the Ogawara Lake (Aomori Prefecture, Japan), we examined nuclear microsatellite and mitochondrial DNA analyses for the two form samples classified by Sr:Ca ratio in the otolith, based on comparison with another natural populations inhabit Japanese coastal lagoons.

- 1) Remarkable genetic differentiation was detected among the natural populations and diagnostic genotypes were observed in each population, suggesting that the natural populations of Japanese pond smelt have been differentiated geographically (probably since last glacial period) and should be regarded as the evolutionary significant units (ESUs).
- 2) Significant genetic differentiation was not observed between the two life history forms in Ogawara Lake for neither mitochondrial nor microsatellite DNA analyses. This result implicates that two life history forms occur in single gene pool of pond smelt in the lake.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：ワカサギ, 生活史分岐, DNA 多型, 耳石, 微量元素, ミトコンドリア DNA, マイクロサテライト DNA

1. 研究開始当初の背景

生まれた場所を離れて海へ回遊の旅に出るのか、それとも生まれた場所にとどまるのか。サケ科やキュウリウオ科魚類にみられる降海回遊型と淡水残留型の生活史の二型は、利用する生育環境の違いや、その結果生じる生物学的特徴の差異の点で、個体群が持つ生活史変異の最たる例の一つである。このような生活史分岐は、繁殖戦略、適応、多型維持機構、種分化などの生物学の中心的な課題と深く関わっており、多くの研究者を魅了してやまない。

生活史分岐に関する進化的、生理的メカニズムの解明を目指して、多くの実験的、理論的研究がなされてきた。しかし、この現象を解明する上で最も重要な点は、生活史分岐を示す各群が相互に隔離されたジーンプールの複合であるのか、それとも同一のジーンプール内で生じているのかを集団遺伝学的観点から検討することである。また、別々のジーンプールであった場合、各地で観察される生活史型が相互に独立して進化してきたのか、それとも、異なる生活様式に分化した系統が分布を拡げ各地で同所的に生息しているのかといった生活史型の進化プロセスについて、分布域全体にわたる詳細な系統地理学的検討から明らかにしておくことも将来の研究指針に大きな影響を及ぼす。

本研究は、生活史分岐の遺伝的基盤を解明するための「モデル生物」としてワカサギを取り上げる。本種の分布域は、北海道のオホーツク海沿岸と日本海沿岸、本州の日本海沿岸および東北太平洋沿岸であり、海と連結した海跡湖が主要な生息地である。これらの生息地の一部では、大型の降海回遊産卵群と小型の湖内残留型産卵群との生活史分岐が観察されている。また、年魚で世代交代が速いことや人工受精が容易であることは生活史分岐をゲノムレベルで解明していくためのモデル生物としての条件に適っており、生活史分岐現象の“エコゲノミクス”を実践するためのマイルストーンになり得る可能性がある。これまでにワカサギに関して分子マーカーを用いたこれまでに我々は、ミトコンドリア DNA 分析による予備的研究から、一部には人為的移殖の影響がみられるものの各地の集団が特徴的なハプロタイプ (mtDNA の型) を保有しており、集団間に大きな遺伝的分化

が生じている可能性を示してきた。このことは、ワカサギ集団が日本沿岸の地史と深く関連して形成されてきたことを示唆しており、生活史型間の系統関係を分布域すべてにわたる詳細な系統地理学的枠組の中で検討可能であることを意味している。

さらに、ワカサギは重要な内水面漁業の対象種としての側面も有しており、各地で卵移殖による種苗放流も行われている。放流は、もともとワカサギが生息していない山上湖やダム湖にもおよび、地場産業の一翼を担っているケースも多い。全国各地のワカサギ個体群の遺伝的な分化の様相や生活史分岐の遺伝的背景が明らかにされることで、保全単位の設定ならびに遺伝的多様性に配慮した移殖の地理的許容範囲を提案できるであろう。また、もともとワカサギが生息しなかった山上湖やダム湖で人為的に創生された個体群の資源を支えるための種苗を効率良く選択できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の4項目である。

(1) ワカサギ自然個体群の地理的分化

ワカサギが本来生息する日本沿岸の海跡湖の個体群を対象にして DNA 分析を行い、集団遺伝学的ならびに分子系統学的解析により、遺伝的分化の様相を明らかにし、系統地理学を検討する。

(2) 回遊パターンと耳石微量元素の関係解析

調査対象としたワカサギが遡河回遊型としての履歴を持つのか、それとも滞留型としての履歴を持つのかは、耳石の微量元素 (Sr:Ca 比) から推定できると考えられる。飼育実験も併せて微量元素からの判定手法を確立する。

(3) 青森県小川原湖における遡河回遊型と滞留型の遺伝的評価

これまでの生態学的研究により、青森県小川原湖の遡河回遊型と滞留型は、体サイズが明瞭に異なっており、さらに産卵場も異なっていることが示唆されている。異なる産卵場に集まったワカサギを採集し、前もって確立した微量元素による判別方法によって、遡河回遊型と滞留型を分類し、各個体の DNA 分析 (マイクロサテライト DNA ならびにミトコン

ドリア DNA) を行い、型間の遺伝的差異や系統関係について検討を行う。(4) 創生個体群の起源の解明

内陸の天然湖沼やダム湖に人為的に移殖され、定着に成功したワカサギ個体群も少なからず存在する。移殖記録が残されている場合もあるが、不明なままで資源として活用されていることもある。また、一部の起源不明な創生集団が在来の生態系を攪乱している可能性も指摘されている。創生個体群の起源を明らかにすることは、資源が枯渇した際の効率の良い追加種苗の選択ならびに生態系攪乱防止に役立つことが期待される。起源の不明な青森県十和田湖、滋賀県余呉湖、同県琵琶湖のワカサギ個体群について、自然個体群の DNA データを基盤として明らかにする。

3. 研究の方法

(1) DNA 分析

各地のワカサギを採集後、各個体の尾鰭の一部を切り取って試料とし、TNEs-Urea 緩衝液を用いたフェノール・クロロホルム法により粗全 DNA を抽出した。本研究では、抽出した DNA をテンプレートとして、ミトコンドリア (mt) DNA およびマイクロサテライト分析を主に用いた。

① mtDNA 分析

mtDNA 分析は、シトクローム *b* (Cyt*b*) 遺伝子領域の前半部 (約 480bp) を増幅した。プライマーは、L14724 (GATATGAAAAACCATCGTTG) と H15149 (CTCAGAATGATATTTGTCCTCA) を用い、PCR の温度条件は 94°C1 分の熱変成後、94°C1 分-48°C1 分-72°C1 分のサイクルを 35 回繰り返す、最後に 72°C5 分の伸長反応を行った。得られた増幅産物は Exo-SAP IT またはポリエチレングリコールにより精製し、サイクルシーケンスのテンプレートとした。サイクルシーケンスは L14724 プライマーを用いて行い、ABI377 または 3100 シーケンサーにより、*cyt b* 遺伝子の最初から 402 番目までの塩基配列を決定した。ClustalW によるアラインメントを行って置換サイトを特定し、ハプロタイプを分類した。

② マイクロサテライト DNA 分析

マイクロサテライト DNA 分析は、近縁種 (デルタスメルト) で開発された 24 のマイクロサテライトプライマー (Fisch et al., 2009) 中、ワカサギで明確なゲノタイピングができ、変異の検出された 12 ローカスを PCR 増幅し、ABI3130 シーケンサーおよび Genemapper ソフトウェアによりアليلを検出した。

(2) 耳石の微量元素分析

ワカサギの回遊パターンを明らかにするために、まず飼育実験によって飼育水の塩分と耳石 Sr : Ca 比の直線回帰式を求めた。次の

で日本各地のワカサギ耳石の中心核から縁辺に至る Sr : Ca プロファイルを基に、個体の塩分履歴を推定した。

4. 研究成果

(1) ワカサギ自然個体群の地理的分化

① 全国レベルの遺伝的分化

網走湖、小川原湖 (残留型と遡河回遊型)、霞ヶ浦、北浦、および宍道湖から 2004 年に漁獲された 17-32 個体 (計 182 個体) を対象としてミトコンドリア (mt) DNA 分析を行った結果、ハプロタイプ多様度および塩基多様度は、それぞれ 0.312-0.794 と 0.083-0.410 の値を示し、個体群間で異なっていた。

ハプロタイプの組成を比較した結果、小川原湖の遡河回遊型と滞留型、霞ヶ浦と北浦の場合を除いて、最も高頻度のハプロタイプが標本集団間で全く異なっていた。また、個体群間の遺伝的分化の程度を AMOVA 分析により定量化した結果、58.5% と非常に大きな値となった。さらに、それぞれの個体群間におけるハプロタイプ頻度の異質性の有無について、MCMC (マルコフ連鎖モンテカルロ) を用いた Exact-test により検討した結果、全ての個体群間で有意な異質性が検出された。また、霞ヶ浦と北浦の間においても、両湖が利根川の下流で連結されているにもかかわらず、有意差が検出された。これらの結果は、ワカサギの自然個体群間の遺伝子流動は限定的であることを示唆している。

検出されたハプロタイプの系統関係をネットワーク法により検討した結果、それぞれの個体群に特有のハプロタイプクラスターが形成され、それぞれのクラスター内の塩基置換数は 1-3 個であった。また、ネットワークの中心は宍道湖において高い頻度で観察されたハプロタイプで、全体の祖先に近いハプロタイプと考えられた。これらの結果から、日本沿岸のワカサギ個体群は最終氷期以後にそれぞれの海跡湖に隔離され、独自の系統を形成したことが示唆された。したがって、各海跡湖の個体群は保全上、遺伝的に異なった進化的重要単位として捉えることができ、個々の個体群に対して資源管理の-effort を傾ける必要があることを意味している。

② 北海道沿岸におけるワカサギ個体群の遺伝的分化

日本海側の石狩川、オホーツク海側の網走

湖、太平洋側は風蓮湖と別寒辺牛川の個体群を調べた。DNA分析は、mtDNAの *cyt b402* 塩基を対象とし、AFLP分析(189座)も併せて行った。検出されたmtDNAハプロタイプの系統ネットワークを作成した結果、風蓮湖を除いた他の個体群も同一の高頻度ハプロタイプを共有していた。しかし、別寒辺牛川では他の個体群にはみられない独自のハプロタイプクラスターが形成された。このことは、別寒辺牛川の個体群が他の個体群から長期間隔離されて形成されてきたことを意味しており、独自の遺伝的組成を保有していることが示された。また、石狩川においてもユニークなハプロタイプクラスターが観察され、網走湖からの移殖が盛んに行われていても、本来の遺伝的特徴が未だに残されていることが示唆された。AFLP情報を用いて分集団構造解析を行ったところ、 $K=4$ で最大の尤度が得られ、石狩川、網走湖、風蓮湖、別寒辺牛川に相当する分集団が見いだされ、核ゲノムのレベルにおいてもそれぞれ独自の遺伝的組成を持った個体群として位置付けることができた。したがって、石狩川、網走湖、風蓮湖、別寒牛川の集団は、別々の遺伝的管理単位として設定することが望ましく、他所からの移殖によって資源量の増大または維持を図ることは不適當と考えられた。

(2) 回遊パターンと耳石微量元素の関係解析

網走湖、小川原湖の一部の個体、および鷹架沼、宍道湖の全個体のSr:Ca比は常に低い値を示し、一生を湖内に滞留していたことが示唆された。これに対して、海水域で生活したと判断される高いSr:Ca比を有していたのは、八戸沖、三沢沖、閉伊川、追波湾のワカサギと網走湖および小川原湖の一部の個体であった。しかし、閉伊川と小川原湖以外では、海水域の利用は一時的であり、主に汽水域に生息しているものと考えられた。これらの結果から、ワカサギの回遊パターンは個体群によって様々であるが、汽水域における生息期間の生活史に占める割合が大きいことが示された。小川原湖における遡河回遊型と滞留型のSr:Ca比はそれぞれ8.0以上と8.0未満で、この値を基準にすることで各個体がどちらの型なのかを判別し、回遊履歴と併せたDNA分析が可能であることが示された。

(3) 青森県小川原湖における遡河回遊型と滞留型の遺伝的評価

小川原湖におけるワカサギの遡河回遊型84個体(2008年2月に高瀬川に遡上した0+個体)

と滞留型48個体(湖内南部の産卵場所に2008年3月に蝟集した0+個体)について、各個体の耳石のSr:Ca比から生活史型の確認を行った上で、そのハプロタイプ組成ならびにアレル頻度を比較した。その結果、遡河回遊型と滞留型間にはmtDNAのハプロタイプ頻度に有意差はみられなかった。この結果は、少なくとも小川原湖におけるワカサギの生活史2型は、同一のミトコンドリアDNA系統を共有しており、2型間に系統分岐が生じているわけではないことを意味している。一方、マイクロサテライトDNAでは有意な差異がみられた。しかし、その程度は $F_{ST}=0.01$ と微弱なものであった。STRUCTUREソフトウェアを用いたベイズ法によるクラスター解析の結果、小川原湖の個体群全体が2つの集団($K=2$)に由来する遺伝子型から構成されていることが示された。しかし、これらの遺伝子型と生活史型の区分とは一致せず、いずれの生活史型にも2つの集団(AとB)に由来する遺伝子型がほぼ同程度で含まれていた。この結果から、小川原湖のワカサギ個体群全体は、過去に存在した2つの集団の混合によって形成されているが、生活史型分岐とは関連しておらず、生活史型間に明確な遺伝的差異は生じていないことが示唆された。

(4) 創生個体群の起源の解明

個体群間のmtDNAの純塩基置換率を算出し、近隣結合法により類縁図を作成した結果、十和田湖は小川原湖と最も近縁となり、琵琶湖と余呉湖はいずれも霞ヶ浦と近縁となった。ハプロタイプの系統ネットワークにおいても、十和田湖のハプロタイプは小川原湖と同一または近縁で、十和田湖の個体群は小川原湖を起源としていることが示された。また、琵琶湖と余呉湖は殆どのハプロタイプが霞ヶ浦および近傍の北浦と同一または近縁で、霞ヶ浦(または霞ヶ浦を起源とする創生個体群)を起源とすることが示唆された。しかし、網走湖と同一または近縁なハプロタイプも検出され、網走湖からのワカサギも定着していることが示唆された。小川原湖における2つの生活史型をプールしてアレル頻度を算出し、十和田湖および他の自然個体群との類縁関係を検討した結果、十和田湖は小川原湖と最も近縁となり、msDNA分析によっても小川原湖を起源とすることが再確認できた。小川原湖で混合していたA集団とB集団の遺伝子型のうち、十和田湖で卓越していたのはA集団に属する遺伝子型であった。この遺伝子組成の偏りが適応とドリフトのどちらの結果によるものかを説明することは現在のところできないが、移

殖と適応の関係を考える上で興味深いと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

(1) Katayama S., Saruwatari T., Kimura K., Yamaguchi M., Sasaki T., Torao M., Fujioka T. and Okada N. (2007) Variation in migration patterns of pond smelt, *Hypomesus nipponensis*, in Japan determined by otolith microchemical analysis. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography*, **71**: 175-182. (査読あり)

[学会発表] (計6件)

(1) 川島祐一・池田 実・木村和彦・片山知史. マイクロサテライトDNA分析から検討した十和田湖のワカサギ個体群の起源. 平成22年度日本水産学会春季大会, 平成22年3月27日, 日本大学(藤沢市).

(2) 川島祐一・池田 実・榊 昌文・片山知史. DNA分析により検討したワカサギ移殖個体群の起源. 平成21年度日本水産学会春季大会, 平成21年3月28日, 東京海洋大学(品川区).

(3) 川島祐一・池田 実・榊 昌文・片山知史. DNA分析より検討した十和田湖のワカサギ個体群の起源. 平成20年度日本水産学会東北支部会, 平成20年11月8日, 湯野浜温泉(鶴岡市).

(4) 橋本昭彦・片山知史・池田 実. 北海道太平洋沿岸におけるワカサギは移殖由来か? -AFLP分析による検討-. 平成20年度日本水産学会春季大会, 平成20年3月28日, 東海大学(清水市).

(5) 橋本昭彦・池田 実・隼野寛史・片山知史・谷口順彦. 異なる年級群を含めた北海道太平洋沿岸におけるワカサギの集団構造の検討. 平成19年度日本水産学会秋季大会, 平成19年9月26日, 北海道大学(函館).

(6) 池田 実. DNAの系統情報で探る移殖の実態. 日本水産増殖学会第6回大会サテライトシンポジウム. 平成19年7月19日, 東京海洋大学(品川区)

[図書] (計1件)

(1) 池田 実 (2008) DNA分析で見えてきた内水面移殖の新たな問題, 「水産資源の増殖と保全」(北田修一・帰山雅秀・浜崎活幸・谷口順彦 編著), 成山堂書店, 東

京, pp. 105-127.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 実 (IKEDA MINORU)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 70232204

(2) 研究分担者

片山 知史 (KATAYAMA SATOSHI)

独立行政法人水産総合研究センター・中央水

産研究所浅海増殖部・主任研究員

研究者番号: 30224455

(3) 連携研究者

()

研究者番号: