

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658167

研究課題名(和文)アユの地域適応遺伝子と飼育適応遺伝子の探索：集団ゲノミクスで拓く水産保全遺伝学

研究課題名(英文) Trial to detect genomic footprints of local and domestic adaptation in Ayu populations

研究代表者

池田 実 (IKEDA, MINORU)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70232204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：アユの野生集団の保全単位の設定と、地域適応および飼育適応について調べるため、海外も含む分布域全体から採集した野生集団と継代された人工種苗集団のDNA分析を行った。野生集団の分岐年代を求めたところ、アユと亜種リュウキュウアユ間で100万年、地域集団間で7万～15.1万年となり、アユの保全を図る上で重要な保全単位を提唱できた。また、飼育集団では、継代数が増加すれば遺伝的多様性は減少し、遺伝的分化は増大することが明瞭に示された。野生集団と飼育集団のゲノムスキャンを試みた結果、地域適応や飼育適応を示すシグナルを検出することはできなかったが、多くのDNAマーカーを使用することで検出可能と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To set conservation units and to detect genomic footprints of local and domestic adaptation in Ayu populations, wild and hatchery populations collected from Japan, China, and Korean Peninsula were investigated by a multitude DNA markers. Inferred from mitochondrial DNA sequence data, estimating divergence times between subspecies was 1 million years ago and those among local populations were 70000-150000 years ago. Based on this results and other DNA data, we proposed significant units to conserve genetic diversity of Ayu populations. The relationships between genetic diversities and number of successive generation in the hatchery populations showed apparently negative correlation. This results would be attributed to genetic drift and/or adaptation of the captive stocks to the culture condition. Unfortunately, genome scan could not detect outlier locus indicating adaptation in wild and hatchery populations.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：アユ マイクロサテライトDNA ミトコンドリアDNA 保全単位 地域適応 飼育適応

1. 研究開始当初の背景

近年の DNA 技術の発展によって、様々な水産業の重要種について野生集団や飼育集団（放流用人工種苗も含む）の遺伝的特徴を DNA マーカーによって捉えることができるようになった。野生集団においては、系統的あるいは人口学的に独立した進化的重要単位 (ESU) や管理単位 (MU) の特定がなされ、保全管理における重要な集団遺伝学的情報の入手が可能となっている。しかし、使用するマーカーは中立であるため、自然選択を介した集団の地域適応については殆ど情報が得られない。また、中立マーカーで分化が検出されなかったからといって、地域集団が適応的分化を遂げていないとは言い切れない。大きな遺伝子流動がありながら、生活史形質に地理的分化が観察される例もあり、中立マーカーの結果のみに依存した場合には、管理単位の設定を誤る可能性がある。

一方、飼育集団においては、少ない親魚数に基づく遺伝的変異性の低下や集団間の遺伝的分化の増大が検出されている。これらの事実は、飼育環境に適応した種苗の遺伝子が再生産を通じて天然集団に拡散することにより、集団の生残率や繁殖成功率などの適応度の低下を引き起こすのではないかという懸念につながっている。しかし、実際にどのような遺伝子が飼育環境下での適応に関与しているのかは未だに不明のままである。

野生集団と飼育集団における適応遺伝子の実態を把握することで、野生集団においては自然選択の遺伝的基盤の提示のみならず、集団固有の遺伝的変異をふまえた保全方策の検討が可能となる。また、飼育集団においては“家魚化”の遺伝的基盤を提示し、その防除（望ましい放流用人工種苗作り）または促進（効率良い育種）につながることを期待される。

2. 研究の目的

野生集団における地域適応あるいは飼育集団における飼育適応をゲノムレベルで検討し、適応に関与する遺伝子（群）を解明することは、自然選択や人為選択といった進化に対する理解のみならず、資源の保全管理方策を立案する上での明確な指針や効率良い育種戦略に関するアイデアを与える。しかし、ゲノム情報が整備されたゼブラフィッシュやメダカのようなモデル生物はともかく、そうでない非モデル生物において適応遺伝子を捉えることは難しい。本研究は、水産業上の重要種であるアユを材料として、野生集団（絶滅危惧集団を含む）と飼育集団（放流用人工種苗を含む）の地域適応あるいは飼育適応に関与する遺伝子（群）について、野生集団や飼育集団それぞれのグループ内での遺伝的分化の程度や遺伝的類縁関係も明らかにしながら、近年注目を浴びつつある集団ゲノミクス的手法によって検出することに挑む。

3. 研究の方法

(1) 野生集団のミトコンドリア DNA 分析
まず、アユ野生集団における保全単位のフレームワークを検討することに主眼をおいた。基亜種は、日本列島の広瀬川と琵琶湖、朝鮮半島のソムジン川とワンピ川、中国北部の鴨緑江（遼寧省）と南部の八都溪（福建省）で採集された標本集団を対象とした。亜種リュウキュウアユは、奄美大島の河内川と役勝川から採集された標本集団を対象とした。各標本集団 24 個体のミトコンドリア DNA 調節領域 (858 塩基)、Cyt b (1141 塩基)、ND4 (1381 塩基) の配列を決定し、ハプロタイプ系統樹ならびに純塩基置換率に基づく遺伝的類縁図を作成した。

(2) 野生集団のマイクロサテライト DNA 分析

基亜種は、日本列島の 7 標本集団（関川、江の川、吉野川、土佐湾、天降川、筑後川、琵琶湖）、朝鮮半島は 3 標本集団（ソムジン川、ミョンパ川、ワンピ川）、中国北部の鴨緑江（遼寧省）と南部の八都溪（福建省）の標本集団を用いた。また、亜種リュウキュウアユは奄美大島の河内川と役勝川から採集された標本集団を対象とした。いずれの標本集団についても 24 から 30 個体について 60 マイクロサテライト DNA 座のタイピングを行い、遺伝的距離を算出して遺伝的類縁関係を検討した。

(3) 飼育集団のミトコンドリア DNA およびマイクロサテライト DNA 分析

全国各地のアユの人工種苗生産施設から供与を受けた継代第 1 世代 (F1) ~ 第 31 世代 (F31) の人工種苗 10 標本集団を対象として、ミトコンドリア DNA 分析（調節領域のシーケンス）とマイクロサテライト DNA 分析（60 ローカス）を行った。継代数と遺伝的変異性との関係を検討するため、得られた遺伝的変異量（平均ヘテロ接合体率やアレル数など）と継代数との相関の有無を求めた。また、標本集団間の遺伝的距離を算出して遺伝的類縁関係を検討した。

(4) 野生集団と飼育集団のゲノムスキャン
各集団間の遺伝的多様性の比較に基づき、正の選択圧を受けている遺伝子またはその近傍のマイクロサテライト DNA 座を探索した。本研究では 2 種類のゲノムスキャンアプローチを用いた。一つは、集団間の遺伝的分化量 (F_{ST} 値) をベースとするものである。ゲノムワイドな F_{ST} の分布パターンから外れ値を示す DNA マーカー（アウト라이어遺伝子座）をシミュレーションによって検出するもので、集団特異的な適応進化に関与した遺伝子およびその近傍領域は、ゲノムワイドに分布する中立的マーカーよりも遺伝的分化のレベルが高くなるという考えに基づいている。この方法を用いるこ

とで、正の選択を受けた候補遺伝子座は、そのF_{ST}値が他の中立マーカーよりも高い方向に外れ値となる。また平衡選択を受けた遺伝子座は、そのF_{ST}値が他の中立マーカーよりも低い方向に外れ値を示す。もう一つの方法は、特定のゲノム領域（必ずしも遺伝子ではない）に正の選択が働いた際に生じる、その領域周辺の遺伝的多様性の一次的な減少 (Selective Sweep) を検出するものである。この方法はヒッチハイキングマップと呼ばれ、ゲノム上に多数配置したそれぞれのマーカーの集団内の遺伝的多様性を推定する。次に異なる2集団間で同じマーカーの遺伝的多様性を比較し、その違いの程度を求める（遺伝的分化の定量化）。複数のマーカーから求めた集団間の差異に基づく遺伝的多様性の割合（F_{ST} 値）のゲノム平均（分布）をもとに、そこから有意に外れた値を示すマーカーを特定する。これらの方法では、集団サイズの動態や集団構造に影響を受け、あたかも選択を受けたかのように見える擬陽性の遺伝子座も検出される可能性があるため、それぞれの方法での検出基準は厳しいものとし、結果の頑健性を高めることとした。視点の異なる2つの方法で共通に検出されるアウト라이어遺伝子が存在すれば、それらの遺伝子座（あるいは近傍の遺伝子座）が直接選択の対象となっている可能性が高いと考えられる。

4. 研究成果

(1) 野生集団のミトコンドリア DNA 分析

調節領域、Cyt *b* および ND4 の配列を連結し、TN93+G+I モデルと最尤法によるハプロタイプ系統樹を作成したところ、リュウキュウアユ集団と他のアユ集団の mtDNA は相互に単系統となった。また、日本列島、朝鮮半島および中国のアユ集団のうち、中国南部の八都溪のハプロタイプのみが単系統を示し、少数の創始者が起源となって形成されたユニークな集団であることが示された（図1）。集団間の純塩基置換率に基づいて近隣結合法による類縁図を作成した結果、基亜種の集団とリュウキュウアユ集団の関係は、これまでにアロザイム分析で示されてきた関係とよく一致した。アロザイム分析によって琵琶湖の陸封アユ集団が他の集団から分岐した年代が10万年前と推定されているが、この年代を外挿してミトコンドリア DNA からみた亜種間の分岐年代を求めたところ、100万年となり、これまでにアロザイム分析で示されてきた分岐年代と良く整合した。また、基亜種内の集団の分岐年代は7万~15.1万年、リュウキュウアユ2集団の分岐年代は7.3万年となり、いずれもリス-ウルム氷期の環境変動が集団の分化に大きな影響を及ぼしていると考えられた（図2）。これらの結果から、調べた集団はいずれもアユの分布域全体において保全すべき ESU または MU としてみな

すことが妥当であることがあらためて示された

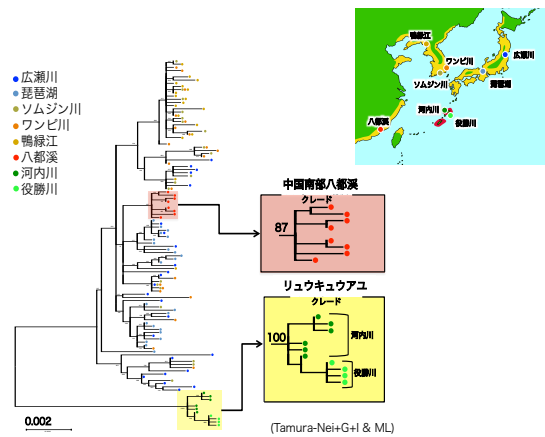


図1. 本研究で調べたアユ集団の mtDNA 系統樹

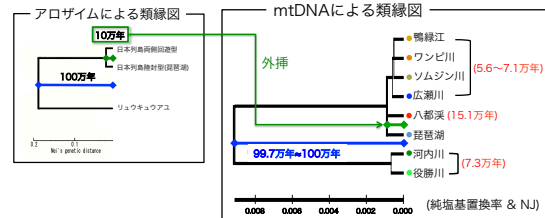


図2. 本研究で調べたアユ集団の分岐年代

(2) 野生集団のマイクロサテライト DNA 分析

マイクロサテライト DNA 分析を行い、標本集団間の遺伝的類縁図を作成した結果、ミトコンドリア DNA 分析で求めた類縁関係とほぼ同様の関係が得られた（図3）。

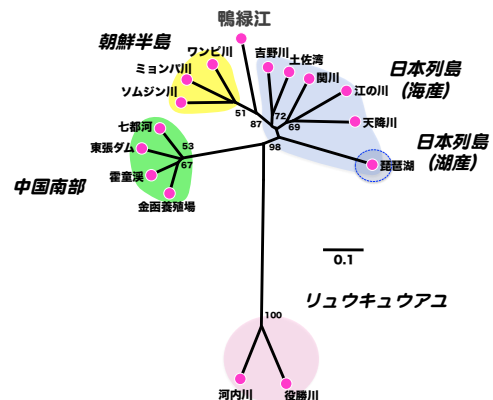


図3. マイクロサテライト DNA 分析によるアユ集団の遺伝的類縁関係

以上の結果から、核 DNA においても核外 DNA においてもアユ野生集団の保全単位は整合しており、基亜種における日本列島の両側回遊型と陸封型（琵琶湖）、朝鮮半島、中国北部、中国南部、リュウキュウアユにおける西集団（河内川）と東集団（役勝川）がそれぞれ重要な保全単位であることが再確認できた。

(3) 飼育集団のミトコンドリア DNA およびマイクロサテライト DNA 分析

マイクロサテライト DNA 分析によって求めたヘテロ接合体率ならびに平均アリル数と継代数との関係を調べた結果、どちらの変異性の指標も強い負の相関を示し、アリル数の方が継代開始後に急激に減少することが示された。また、調べた標本集団の中には、遺伝的変異性を回復させる目的で天然集団が添加された集団もあったが、変異性のレベルは上昇していないことが示された (図4)。ミトコンドリア DNA の場合も同様の傾向を示した。

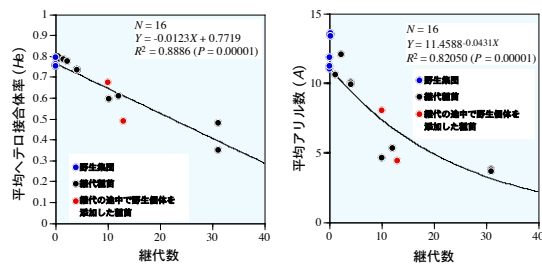


図4. アユ飼育集団の遺伝的変異性と継代数の関係

また、標本集団間の遺伝的分化について AMOVA 分析によって定量化し、野生集団 (日本列島の両側回遊型と陸封型) と比較した結果、マイクロサテライト DNA では 4~10 倍、ミトコンドリア DNA では 4~20 倍程度、野生集団よりも飼育集団の方が大きな分化を示した。ペアワイズの F_{ST} 値と継代数との間の関係を検討した結果、有意な正の相関が得られ、継代が進むにつれて遺伝的分化が増大することが示された。

マイクロサテライト DNA 分析による類縁図によって遺伝的類縁関係を調べた結果、両側回遊型を起源とする飼育集団のクラスターは野生の両側回遊型から派生し、両側回遊型と陸封型の交雑により育成された飼育集団は野生の両側回遊型と陸封型の中間から派生した (図5)。ミトコンドリア DNA 分析においても同様の結果が得られた。

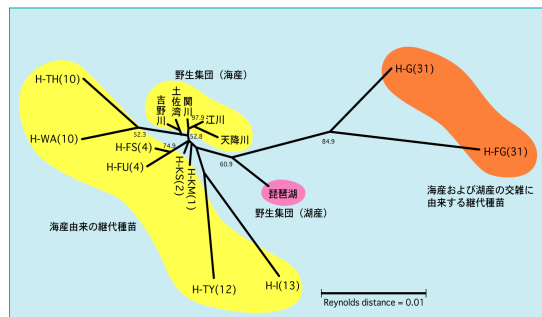


図5. アユ飼育集団の遺伝的類縁関係 (マイクロサテライト DNA 分析)

(4) 野生集団と飼育集団のゲノムスキャンマイクロサテライト DNA のデータを用いて野生集団と飼育集団のそれぞれについて 2 種類の方法でゲノムスキャンを試みたが、いずれの方法においてもアウトライアーと考えられる座を検出することができなかった。今後、マイクロサテライト DNA 座をさらに増やし、また次世代シーケンサーを活用した RAD-Seq 等もマーカーに加えて詳細に検討を行っていく必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

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