

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450290

研究課題名(和文) 長期遺伝的モニタリングに基づくイワナの繁殖成功率および放流効果の推定

研究課題名(英文) Reproductive success of wild and hatchery-reared white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) based on long-term monitoring

研究代表者

山本 祥一郎 (Yamamoto, Shoichiro)

国立研究開発法人水産総合研究センター・増養殖研究所・主任研究員

研究者番号：20392897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用いて、イワナの親子判別推定に用いる3塩基および4塩基繰り返し配列の多型的マイクロサテライトDNA(msDNA)を8遺伝子座探索した。イワナの自然集団を対象とした野外調査を実施し、2005年から2013年までに採集された親個体と当歳魚のmsDNAデータをもとに親子判別推定を行った。また、継代飼育魚の次世代資源への貢献度を評価するために人工河川への移殖放流実験をおこなった。その結果、天然魚・養殖魚ともに、繁殖成功率に大きな個体差が確認され、親魚の体サイズと繁殖成功率との間に明瞭な関係は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Tri- and tetra-motif repeat microsatellite marker loci were developed for the white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*). The 454 pyrosequencing was used to discover repeat arrays, and eight microsatellite-primer sets, available for the estimation of polymorphisms, were identified. To evaluate individual reproductive success of white-spotted charr, I collected nine consecutive years DNA samples of white-spotted charr in a wild population. Both males and females exhibited greater variances in reproductive success among individuals, 0-29% (min.-max. during 2005-2013) of the mature males were assigned fatherhood of the offspring, and 9-100% of the mature females were assigned motherhood of the offspring (full-pedigree likelihood method). I also examined reproductive success of hatchery-reared white-spotted charr in a semi-natural artificial stream. Hatchery-reared fish also exhibited a large individual variation in reproductive success in both males and females.

研究分野：魚類生態遺伝学

キーワード：イワナ マイクロサテライトDNA 繁殖成功率 親子判別

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) これまで渓流性サケ科魚類の繁殖生態に関しては、産卵行動の観察にもとづく繁殖成功度の記述がおこなわれ、一連の研究によって配偶者選択や配偶相手を巡る競争が個体の繁殖成功に関わる主要な要因であることが示されている。しかしながら、従来の限られた調査期間内での「受精に成功するか否か」というバイナリーの指標では個体レベルの繁殖成功度を定量的に把握することは困難である。

(2) 日本や北米・ヨーロッパをはじめとする世界各地の多くの河川で、サケ科魚類の資源維持や保全を目的とする人工孵化由来の養殖魚(種苗)放流がおこなわれている。日本の渓流域においても種苗放流は最も一般的な増殖手法とされ、環境悪化や漁獲圧増大により減少した資源の一時的回復に有効な手段と考えられている。一方、放流された養殖魚が資源の長期的維持にどの程度貢献しているのかは、未だ科学的に明らかとされていない。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が蓄積している長期野外生態データと遺伝子データを併用し、イワナの繁殖成功度を推定するとともに、放流魚と天然魚双方の次世代への貢献度を把握することを目的とする。このためにマイクロサテライト DNA 分析を実施し、2005 年から 2013 年にかけての 9 繁殖シーズンの親子関係を推定するとともに、移殖放流実験をおこない放流魚と天然魚の繁殖成功度を比較する。

3. 研究の方法

栃木県中禅寺湖流入河川に設置した約 520m の区間において(自然区)、電気漁具を用いたイワナの採集調査をおこない、個体毎に遺伝子分析用サンプルを収集する。この野外調査は、申請者が 2005 年度より継続しているものである。

遺伝子実験に先立って、次世代シーケンサーを用いて、イワナの親子判別に適したマイクロサテライト DNA を新規に探索し、さらに複数の遺伝子座を同時に増幅するマルチプレックス PCR 法を確立させる。各年度の繁殖期(10 月)に採捕された親魚サンプルと翌年に採捕された当歳魚サンプルを用いて、開発されたマイクロサテライト DNA マーカーを指標とした遺伝子分析を実施し、集団遺伝学用統計ソフト COLONY (Jones and Wang 2010)を用いて各個体について親子関係を調べる。

養殖魚の繁殖成功度を評価する実験については、水産研究・教育機構日光庁舎に設置した人工河川(約 120m)に天然魚と養殖魚 10 尾(オス 5 尾、メス 5 尾)ずつを放流し、彼らの DNA と翌年回収した子どもの DNA 情報をもとに親子判別をおこなう。

表 1 イワナの親子判別に用いたマイクロサテライト DNA 8 遺伝子座 (Yamamoto and Sekino 2015 を改変)

Locus ID	GenBank accession number	Primer sequence (5'-3')*	Repeat motif
Saleu-2	AB932862	F-P: aggtatccccactcctcttc R: gactagcaocccagacggtttaa	(GTGC)14
Saleu-5	AB932863	F-P: atgcctcctcaagtaagaca R: aatatagcctctggggcatgt	(GTAT)15
Saleu-8	AB932864	F-V: catagaacaacaacatcctgcca R: actagttccaggtcagctccac	(TACC)10
Saleu-9	AB932865	F-F: tgtattcagcatcaacccttg R: ttcattgagatttgcctccct	(ATTG)17
Saleu-19	AB932866	F-F: aatggagtgccttgcctacaat R: gtcttaactgtccatgctcttg	(AAC)10
Saleu-22	AB932867	F-V: aagtgcctgttgcattctttt R: ttcactggccttaccactgttg	(TGCC)15
Saleu-24	AB932868	F-N: gttaatcaaggsggattttcc R: tttaatgagttctgtgagccga	(TAA)8
Saleu-25	AB932869	F-N: tgatgcaacaagaataccat R: acgagatcgaacatgcatatacac	(GTC)11

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーを用いて、イワナの3塩基または4塩基繰り返し配列のマイクロサテライト DNA8 遺伝子座を新規に開発した(表 1)。これらの遺伝子座は、いずれも多型的であり、またマルチプレックス PCR により8遺伝子座すべてを一度の PCR で増幅できることを確認した(Yamamoto and Sekino 2015)。本研究によって新規に開発されたイワナのマイクロサテライト DNA 遺伝子座は、親子判別のみならず、系群判別、遺伝的多様性の評価、個体識別マーカーなど、今後幅広い調査研究に利活用されると期待される。

(2) 2005年~2012年の繁殖期に採集された成熟個体、2006年~2013年に採集された当歳魚について、新規に開発したマイクロサテライト DNA8 遺伝子座を用いて親子判別をおこなった。親子判別には最尤法を用い、確率 95%以上を親候補個体とした。野外調査によって確認された成熟個体のうち、次世代に子を残した個体の割合は、各年度でオスが0~29%、メスが9~100%と推定され、繁殖成功率に大きな個体差および年による違いが確認された(図 1)。また、両性ともに、親魚の体サイズと繁殖成功率との間に明瞭な関係を見出すことができなかった。このことは、競争能力が高く、かつより多くの卵や精子をもつ大型個体が必ずしも高い繁殖成功を遂げるわけではないことを示す。

(3) 継代飼育魚(養殖魚)の繁殖成功率を評価する移殖放流実験については、自然集団の調査結果と同様、天然魚・養殖魚ともに残した子の数に大きな個体差が認められ、親魚の体サイズと繁殖成功率との間にも明瞭な関係は認められなかった(図 2)。確認された全ての当歳魚のうち、約 35%の個体が養殖魚のオスマたはメス由来の子であり、また天然魚と養殖魚間で交配し子を残しているペアも確認された。

本課題は、長期間にわたり自然河川に生息する淡水魚類集団の繁殖成功率を推定した、日本では先例の少ない研究である。本研究で

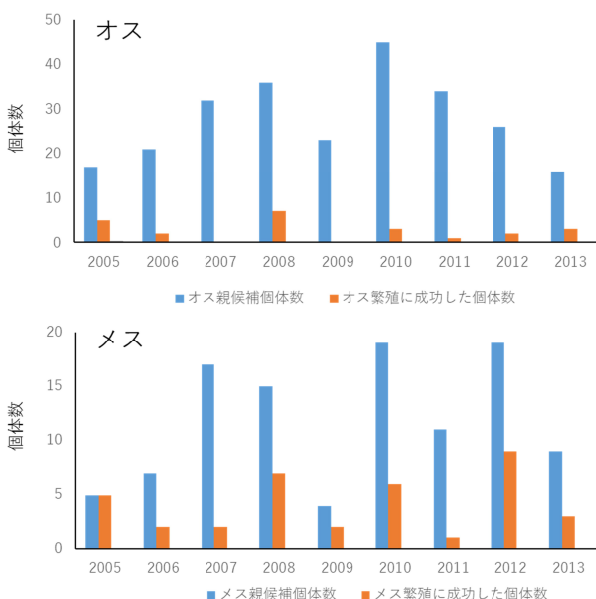
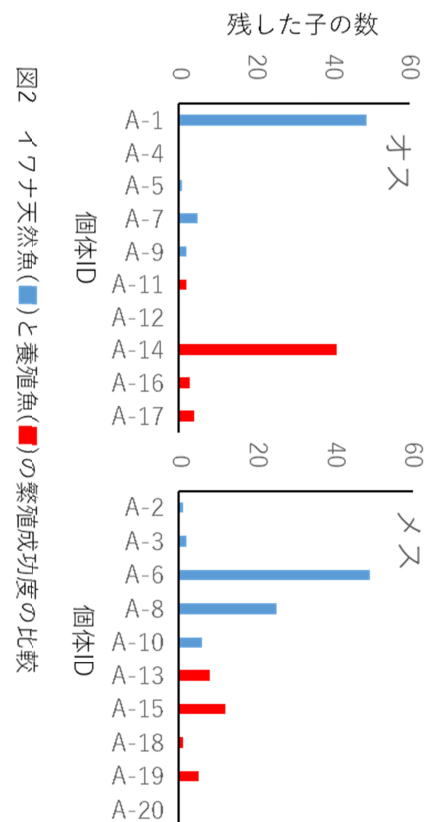


図1 各年度(2005-2013年)に採捕されたイワナの成熟個体数、およびそれらのうちDNA分析によって繁殖に成功したと推定された個体数



見出された新たな知見として、「次世代に子を残すことができなかった親個体が高い比率で存在すること」、「天然魚・養殖魚ともに、必ずしも大型個体が次世代に多くの子を残すわけではないこと」が挙げられる。これらの結果は、従来の「大型個体が高い繁殖成功率をもつ」という考え方を支持しない。今回、繁殖成功率に個体変異をもたらす要因については明らかにすることができなかった

が、今後は体サイズなど親個体の競争能力に関わる要因だけでなく、卵や稚魚の育つ環境や生息密度など次世代の個体を取り巻く外的要因なども考慮に入れた詳細な調査が必要である。

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5件)

1. Yamamoto S. Sekino M. (2015) Isolation and characterization of tri- and tetra-repeat microsatellite loci in the white-spotted charr *Salvelinus leucomaenis* (Salmonidae). Journal of Fish Biology 86: 1199-1202. 査読有, doi: 10.1111/jfb.12628
2. Yamamoto S. Maekawa K. Morita K. Crane P. Oleinik A. (2014) Phylogeography of the salmonid fish, Dolly Varden (*Salvelinus malma*): multiple glacial refugia in the North Pacific rim. Zoological Science 31: 660-670. 査読有, doi: 10.2108/zs130266
3. Yamamoto S. Morita K. Yokoyama R. Miyamoto K. Sato M. Maekawa K. (2013) Incidence of a skeletal deformity (truncated upper jaw) in an isolated population of white-spotted charr *Salvelinus leucomaenis*. Journal of Ichthyology 53: 889-893. 査読有, doi:10.1134/S0032945213100159
4. Tsuboi J. Yamamoto S. Morita K. Mitsui K. Ashizawa A. Hirose K. (2013) Life history traits of white-spotted charr in an alpine environment: implications for local adaptation along an altitude gradient. Journal of Ichthyology 53: 884-888. 査読有, doi: 10.1134/S0032945213100147

5. Yamamoto S. Kurokawa T. Sekino M. Yasuike M. Saitoh K. (2013) Tetra-repeat microsatellite markers for the masu salmon (*Oncorhynchus masou masou*) and its application in cross-subspecies amplification. International Journal of Molecular Sciences 14: 23153-23159. 査読有, doi: 10.3390/ijms141123153

[その他]

1. 山本祥一郎 (2015) ヒメマス - 複雑な移殖の歴史をもつ水産重要種. 魚類学雑誌 62 (2): 195-198. 査読有.
2. 山本祥一郎 (2013) オシヨロコマの DNA を調べる-世界のオシヨロコマ、その中の北海道のオシヨロコマ. FAURA 41 号: 22-24.

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 祥一郎 (YAMAMOTO, Shoichiro)
国立研究開発法人・水産総合研究センター・増養殖研究所・主任研究員
研究者番号：20392897