

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660157

研究課題名(和文)エコゲノミクスで創るヒラメ資源の管理と放流システム

研究課題名(英文) Kinship-based population genetic study for the future stock enhancement program of Japanese flounder

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

研究成果の概要(和文)：ヒラメ天然集団における自然選択の検出を目指し、血縁関係を正確に把握することのできるDNAマーカーセットを構築した。自然選択の痕跡を検出することはできなかったが、構築したDNAマーカーセットは高精度で個体間の血縁関係を把握できた。これらのマーカーセットを用いて血縁関係からみたヒラメ天然集団の集団構造について検討したところ、血縁関係を持った個体の割合は海域間で差異がなく、日本沿岸で広範な遺伝子流動を伴った均質な集団構造であることがあらためて確かめられた。また、人工種苗の遺伝的多様性についても血縁関係により捉え直すことによって新たな知見が得られ、将来の種苗生産や放流方策に貢献できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sibship reconstruction using DNA markers is useful for monitoring the reproductive success of the captive broodstock in hatchery and the offspring stocked into the wild. We prepared highly polymorphic DNA marker sets of 12 microsatellites (ms) DNA and 1,873 nucleotides in mitochondrial (mt) DNA of Japanese flounder. Although the footprint of natural selection in the wild populations could not be detected by genome scanning methods, these marker sets were extremely helpful to reconstruct sibship in the artificial and wild populations without the parental information. Negative genetic effects to wild population, such as decreasing genetic diversity, promoted by improper stock enhancement program should be detected as increasing of closely related individuals within populations. We preliminary simulated the genetic effect to wild population after the stocking of artificial seeds produced from a captive wild broodstock using the sibship reconstruction system.

研究分野：水産遺伝学

 キーワード：ヒラメ 栽培漁業 人工種苗 遺伝的多様性 マイクロサテライトDNA ミトコンドリアDNA 親子鑑定
血縁鑑定

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天然集団や飼育集団（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。天然集団においては、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性を最初から仮定しており、自然選択を介した集団の地域適応について着目されることは少ない。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、集団の生存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。したがって、天然集団や放流される人工種苗の遺伝的多様性についてモニタリングを行う際には、できるだけ多くの DNA マーカーを用いてその中立性を検証し、自然選択や人為選択の痕跡をゲノムワイドに探っておくことが望ましい。また、そのような痕跡を探ることが上手く行かなくとも厳選された中立マーカーを用いることで、天然集団の集団構造に関する蓋然性や放流された人工種苗の天然海域における繁殖成功率についてモニターすることが可能となる。

2. 研究の目的

本研究は、日本における栽培漁業の対象種であるヒラメを対象とし、数多くの既報の DNA マーカーの中からジェノタイピングエラーを極力排したマーカーセットを構築し、天然集団の集団構造ならびに自然選択の痕跡を探った。また、集団内の個体間の血縁関係を調べることは、近親交配を介した遺伝的劣化を防ぐために重要なモニタリング項目である。構築したマーカーセットを適用してヒラメ集団の血縁関係を正確に捉えることができるかどうか検討を行い、血縁関係からみた天然集団の集団構造や人工種苗の遺伝的多様性について調べた。さらに、現在推奨されている天然個体を親魚として用いる人工種苗の生産方法が、天然集団の遺伝的多様性に与える影響について考察するため、得られたデータを用いて解析的なシミュレーションを行った。

3. 研究の方法

(1) DNA マーカーの選択

ミトコンドリア DNA

ヒラメの集団構造ならびに血縁関係（母親または母系の関係）を調べる上で、ミトコンドリア DNA の調節領域上流部がその変異性の高さを理由として、よく用いられてきた。一方、変異性が高すぎる場合には復帰突然変異によってハプロタイプ鑑定の過誤が生じることが懸念される。従来調節領域上流部をさらに拡張した前半部と調節領域よりもやや変異性の低い遺伝子領域の塩基配列を調べ、ハプロタイプの鑑定精度をさらに向上させることができるかどうかについて検討した。

マイクロサテライト DNA

ヒラメにおいては、集団構造解析あるいは連鎖地図作成を目的として多数のマイクロサテライト DNA マーカーが報告されている。一方、親子鑑定、野生集団の血縁関係を含んだ集団構造、さらに自然選択の有無を正確に捉えるためには、ヌルアリル、スタッター、ラージアリルドロップアウトなどに起因するジェノタイピングエラーを極力排する必要がある。既報のヒラメのマイクロサテライト DNA マーカー 60 ローカスについて、上記のエラー要因を詳細に検討し、スクリーニングを行った。

血縁鑑定能の検証

構築した DNA マーカーセットが天然集団や人工種苗の遺伝的多様性を詳細に捉えることができるかどうかは、用いた DNA マーカーが個体間の血縁関係を正確に予測することができるかどうか依存している。そこで、野生魚を親魚として生産された人工種苗の一部について、構築した DNA マーカーセットを用いて親子鑑定を行い、親子関係を正確に捉えることができるかどうか、さらに同胞・半同胞といった血縁関係を親魚の DNA データなしに正確に予測できるかどうかについて検証を行った。

(2) 天然集団の遺伝的多様性と集団構造

構築したマイクロサテライト DNA およびミトコンドリア DNA のマーカーセットを用いて、北海道から九州にいたる 6 標本集団（各標本集団は 20~50 個体）を調べた。標準的な遺伝的多様性解析を行ったのち、自然選択を受けたと考えられるアウトリヤー座の検出を試み、さらに個体間の血縁度という側面からの集団構造解析も行った。

(3) 人工種苗の遺伝的多様性

2 箇所の栽培漁業センターで天然魚（各 200 個体前後）を用いて生産された人工種苗について、生産されたロットの中から 200~300 個体をサンプルとして、マイクロサテライト DNA ならびにミトコンドリア DNA 分析を行った。親魚のすべての個体についても同様に分析を行い、親魚集団と人工種苗の遺伝的多様性を求め、親子鑑定による親魚の再生産に関わる貢献度を雌雄別に求めた。

(4) 人工種苗放流が天然集団に及ぼす遺伝

的影響評価に関するシミュレーション

天然集団の遺伝的多様性に配慮した天然魚を用いた人工種苗生産と放流が推奨されている。上記の人工種苗はそのような目的で生産されているが、これらが放流された後に天然集団の再生産に寄与した場合、遺伝的多様性がどの程度変化するのかについては不明のままである。そこで、予備的ではあるが天然集団ならびに人工種苗の DNA データを用いた解析的シミュレーションを行った。

4. 研究成果

(1) DNA マーカーの選択

ミトコンドリア DNA

調節領域前半部と ND2 遺伝子を連結した 1872 塩基の配列情報を用いてハプロタイプングを行うことで、標本集団中のハプロタイプ数やハプロタイプ多様度が増加することが示された。また、従来の調節領域上流部のみで標本集団内および標本集団間の遺伝的多様性評価を行った場合と比較したところ、調節領域上流部のみでは同一と鑑定されたハプロタイプが実際には異なったハプロタイプであることが明らかとなり、多様性評価における過誤を防ぐためには、2 領域を連結することが有効と考えられた。

マイクロサテライト DNA

一部の天然標本集団を用いてスクリーニングを行った結果、多くのローカスでヌルアリルやラージアリルドロップアウトの存在が示唆され、正確な集団遺伝学的解析に使用するには困難な事が判明した。ヌルアリルやラージアリルドロップアウトのない(もしくは頻度のごく低い)12 ローカスを最終的に選定した。これらのローカスはこれまでに報告されているヒラメの連鎖地図のうち、異なる 12 の連鎖群に配置されており、ヒラメ集団の遺伝的多様性について偏りの少ない情報が得られることが期待された。また、全ローカスを含めた個体鑑定精度(集団中から任意の 2 個体を抽出した時に、個体間のジェノタイプが一致する確率)は、 10^{-17} となり、親子やその他の血縁関係について精度良く判定できることが示唆された。

血縁鑑定能の検証

構築したマイクロサテライト DNA とミトコンドリア DNA マーカーセットを用いて、親魚集団と人工種苗の親子鑑定を行った結果、人工種苗のすべての個体について親を決定できた。母系遺伝をするミトコンドリア DNA のハプロタイプングにより、母方と父方の両親もすべて特定できた。また、血縁鑑定ソフトウェアにより、人工種苗のマイクロサテライト DNA データのみで、血縁関係を再構築したところ、実際に得られた同胞・半同胞の関係と 100%一致した。これらの結果から、構築した DNA マーカーセットは、ヒラメ集団中の血縁関係を捉える上で非常に有効であり、人工種苗のみならず、天然集団中の個体間の血縁関係についても正確に推定できるものと考

えられた。

(2) 天然集団の遺伝的多様性と集団構造

選定したマイクロサテライト DNA マーカー 12 座を用いて天然集団 6 標本集団について LOSITAN ならびに BayScan によるアウトライアー探索を行った結果、いずれの座も中立性を棄却できなかった。このことから、自然選択の痕跡を探るという当初の目的は果たせないことになった。他方、中立マーカーとして扱えることで、集団の遺伝的多様性のモニタリングにおいて単純な確率論的取り扱いができることも意味しており、以後の解析やシミュレーションを行う上で有用な情報となった。標本集団内の遺伝的多様性について検討した結果、どの標本集団においても平均ヘテロ接合度は 0.78、アリルリッチネスは 10 前後と高い多様性を示した。標本集団間の遺伝的分化の程度はどちらの分析においても $F_{ST}=0.01$ と有意だが微弱な分化を示した。ペイジアンアサインメントテストにより、クラスター構成を検討したところ、明瞭な分集団構造を検出することはできなかった。さらに個体間の血縁関係を推定し、第一・第二度近親が含まれる割合を標本集団間で比較した結果、有意な差異は認められなかった。このことから、日本沿岸におけるヒラメの集団構造は、従来提唱されてきたように大きな遺伝子流動を伴ったほぼ均質な集団構造を有していることがあらためて示唆された。

(3) 人工種苗の遺伝的多様性

2 箇所の栽培漁業センターで天然魚を親魚として生産された人工種苗の遺伝的多様性について調べた結果、実際に再生産に寄与した親の数は準備された雌雄ともに親魚集団の 30%程度であった。遺伝的多様性のレベルは、いずれの人工種苗においてもこれまでに報告されている継代魚を用いた場合よりも高くなっており、天然集団と比較しても 10%程度の低下に過ぎなかった。また、マイクロサテライト DNA のアリル数の減少は 1 個程度であった。しかし、第一・第二度近親の関係にある個体間の組み合わせは天然集団あるいは親魚集団で 1%に満たないのに対し、人工種苗では 10%を越えていた。このことから、天然魚を用いた人工種苗生産方法は、人工種苗の遺伝的多様性を高くすることに大きく貢献しているが、血縁関係という観点で見ただけでは、多くの血縁個体が依然として多く含まれていることが示された。

(4) 人工種苗放流が天然集団に及ぼす遺伝的影響評価に関するシミュレーション

人工種苗の遺伝的多様性評価により、依然として血縁関係にある個体の含まれる割合が天然集団に比べて高いことが示された。一方で、種苗の生産現場では人工種苗の遺伝的多様性をさらに高めるためには、人員・コストの両面で厳しい状況にある。そこで、今回得られた人工種苗および天然集団の DNA データを用いて、予備的な放流・再生産シミュレーションを行った。条件は、天然集団では每

世代 1 万個体が再生産に参加しており ($N_e=10^4$)、そこに調べた人工種苗と同じ遺伝的多様性を持った種苗が 5%程度の割合で再生産に参加すると仮定し、1回の放流によって天然集団の遺伝的多様性がどの程度変化するかについて、平均ヘテロ接合度、アレル数、第一・第二度近親の割合といった遺伝的多様性の尺度に着目して 100 世代目まで追跡した。その結果、天然集団の平均ヘテロ接合度やアレル数は 100 世代経過しても最初の値と変化はないが、第一・第二近親の割合は 1%未滿と低いものの 100 世代経過しても 0 にはならないことが示された。これまでのヒラメの生態学的知見や本研究における集団遺伝学的な知見を併せて考えてみると、シミュレーションで示されたような血縁関係を持った個体が交配して子供を残すことは極めて稀な事象と考えられ、今回調べたようなヒラメ人工種苗の放流が、近親交配を介した集団の遺伝的劣化をもたらすとは考え難い。しかし、血縁関係にある個体の割合が、1回の放流であったにも関わらず、100 世代経過しても 0 にならなかった点は着目すべきである。天然魚を用いた場合であっても、遺伝的に同質な特性を持った人工種苗を繰り返し放流すれば、天然集団の遺伝的劣化のリスクは高まることが予想される。

以上の結果は天然魚を用いた放流用人工種苗の生産と天然集団に遺伝的影響を与えない放流方策の構築に貢献するものと考えられた。

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)

安藤大樹・池田 実・菅谷琢磨・片町太輔・與世田兼三・木島明博・ミトコンドリア DNA の調節領域と ND2 遺伝子のタイピングによるヒラメ集団のハプロタイプ鑑定精度の向上・日本水産学会誌 (印刷中)。

[学会発表](計 4 件)

Ando D., Ikeda M., Sugaya T., Katamachi D., Fujii T., Kijima A. An impact of stocking of wild population with Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* on “stocking and reproductive simulation”. The 5th International Symposium on Stock Enhancement and Sea Ranching, Sydney (Australia), Oct. 2015. (ポスター発表)
Ando D., Ikeda M., Sugaya T., Katamachi D., Fujii T., Kijima A. Development of the system to determine parentage and sibship in hatchery population for stock enhancement program of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. ISGA XII - The international symposium on

genetics in aquaculture XII, Santiago de Compostela (Spain), June 2015. (ポスター発表)

安藤大樹・池田 実・木島明博・菅谷琢磨・片町太輔・藤井徹生・ヒラメにおける血縁鑑定システムの評価・平成 27 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学, 2015 年 3 月。(口頭発表)

安藤大樹・池田 実・菅谷琢磨・片町太輔・藤井徹生・木島明博・漁獲されたヒラメの血縁関係を DNA 分析によって推定することは可能か? 平成 26 年度日本水産学会東北支部大会, 秋田市, 2014 年 11 月。(口頭発表)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[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