The Japanese Society of Fisheries Science

Nippon Suisan Gakkaishi 66(2), 269–274 (2000)

ミトコンドリアDNAの制限酵素切断型多型解析から見たシシャモの遺伝的変異性

鈴木研一，小林敬典，松石　隆，沼知健一

(1999年7月6日受付)

Genetic Variability of Japanese Longfin Smelt by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Mitochondrial DNA*1

Ken-ichi T. Suzuki,*2 Takanori Kobayashi,*3
Takashi Matsuishi,*4 and Ken-ichi Numachi*5

Mitochondrial DNA (mtDNA) of Japanese Longfin Smelt *Spirinchus lanceolatus* among four river populations were examined to clarify their genetic feature and population structure. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using 9 kinds of 6-base recognized restriction endonucleases (*Apa* I, *Ava* I, *Bam*H I, *Bgl* II, *Bst*E II, *Eco*R I, *Pst* I, *Pvu* II, *Xba* I) revealed considerable variaton. We found 17 haplotypes in 91 specimens. Restriction fragment patterns were polymorphic for 7 enzymes examined. Nucleotide divergence between haplotypes ranged from 0.27 to 2.33%. Nucleotide divergence between populations ranged from 0.37 to 0.54%. A dendrogram constructed by UPGMA among 17 haplotypes showed no clustering groups of localities. Nucleotide diversity and nucleon diversity of each locality ranged from 0.0028 to 0.0052, and from 0.7758 to 0.9074, respectively. Distinguishable two stocks by morphological analysis showed significant difference in their haplotype freqencies.

キーワード：シシャモ，*Spirinchus lanceolatus*, mtDNA, RFLP，遺伝的変異，遺伝子資源

シシャモは北海道の太平洋沿岸にのみ生息する日本固有種であり，その干物は北海道の特産として全国的に珍重され，北海道における沿岸漁業の重要な対象種の一つとなっている。しかし近年，本種の資源状態は低い水準で推移しており，禁漁措置を伴う積極的な資源管理や人工孵化放流など資源の増産を目指した努力が試みられている。こうした努力を行うための基礎的な情報として本種の集団構造の解明が求められている。

シシャモの集団構造の解析はまず形態形質の検討から行われた。伊藤[1,2]は沿岸漁獲物や産卵遡上親魚の体長と孕卵数の関係，脊椎骨数，鰓耙数および幽門垂数などを調べ，シシャモには日高，十勝・釧路，厚岸の3系群が存在すると推定した。しかし，これらの形質は環境に影響され易く，この3系群が遺伝的に異なるものなのか，あるいは生息環境により生じた差異によるものなのかは明かではない。

一方，大久保[3]は伊藤[1,2]の唱えた3系群のうち2系群4河川のシシャモ集団をアイソザイム分析で検討し，それぞれの集団間で遺伝子頻度に差異が認められないことから，本種は遺伝的に均質で混合が起こっているとした。

本研究ではシシャモの集団構造についてより詳細な知見を得ることを目的に，アイソザイム分析より解析能が優れているとされ，遺伝様式も異なるミトコンドリアDNA (mtDNA) の制限酵素切断型多型 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析を試みた。

材料と方法

本研究に用いた材料および採集河川はTable 1およびFig. 1に示した。伊藤[1,2]の指摘した3系群のうち日高系から鵡川 (n=23)，沙流川 (n=23) の2河川集団，十勝・釧路系から十勝川 (n=22)，釧路川 (n=23) の

*1 本論文の大要は平成9年度日本水産学会春季大会で発表した.
*2 北海道立水産孵化場 (Hokkaido Fish Hatchery, Kitakashiwagi, Eniwa, Hokkaido 061-1433, Japan).
*3 養殖研究所 (National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-0108, Japan).
*4 北海道大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan).
*5 東海大学海洋学部 (School of Marine Science and Technology, Tokai University, Orido, Shimizu, Shizuoka 424-0902, Japan).

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

2河川集団，計2系群4河川集団91個体を分析した。この4河川は大久保[3]がアイソザイム分析を行った採集河川と同じである。

それぞれの河川において1991年10～11月に産卵遡上したシシャモの雌親魚を採集し，実験室まで活魚あるいは氷蔵で輸送して試料とした。卵巣および肝臓よりWada *et al.*[4]の方法で粗mtDNAを得て，RNase処理後さらにフェノール抽出とエタノール沈殿を繰り返して精製しサンプルDNAを得た。[5] 9種の6塩基認識酵素（Table 2）を用いて消化しアガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド（EtBr）染色で切断断片長の変異を検出した。[5]

各集団間のハプロタイプ頻度組成の差異はRoff and Bentzen[6]に基づくモンテカルロシミュレーションを用い100000回試行して検討した。なお，帰無仮説は“比較する2集団が同一の母集団より抽出され，遺伝的組成が同じである”と設定した。

ハプロタイプ間，集団間の塩基置換率および純塩基置換率，集団内の塩基多様度の算出には断片法[7]を用いた。nucleon diversity（h）の算出にはNei and Tajima[8]

Table 1. Sampling sites, collected date, and number of specimens examind in this study

Sampling sites	Collected date	Number of specimens (Average of folk length, body weight)
Mu River	Oct. 31, 1991	23(13.4 cm, 30.7 g)
Saru R.	Nov. 1, 1991	23(12.7 cm, 25.8 g)
Tokachi R.	Oct. 22, 1991	22(11.3 cm, 16.4 g)
Kushiro R.	Nov. 19, 1991	23(13.2 cm, 27.2 g)
total		91

* All specimens are spawning run females.

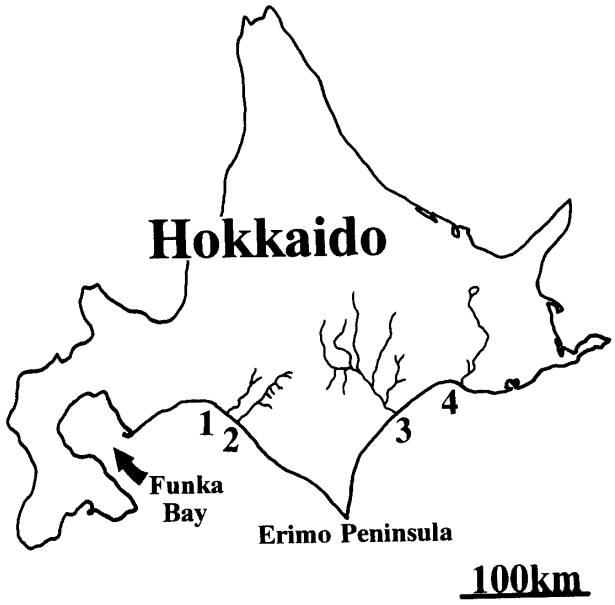

Fig. 1. Map of Hokkaido Island showing the rivers where Japanese longfin smelt were collected.
1. Mu River, 2. Saru R., 3. Tokachi R., 4. Kushiro R.

Table 2. Restriction fragment patterns of Japanese longfin smelt

Endonucleases	*Apa* I			*Ava* I							*Bam* H I
Type	A	B	C	A	B	C	D	E	F	G	
Fragment size (kbp)	—	—	12.0	—	—	4.9	—	—	—	—	17.6
	10.0	10.0	—	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	—	
	4.5	4.5	4.5	3.1	3.1	3.1	—	—	—	3.1	
	—	2.2	—	—	—	—	—	—	—	2.8	
	1.7	—	—	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	
				2.5	2.5	—	2.5	2.5	2.5	2.5	
				2.4	2.4	—	2.4	2.4	2.4	2.4	
				—	—	—	—	—	—	2.4	
				—	2.1	2.1	2.1	—	—	2.1	
				—	—	—	—	2.0	—	—	
				1.9	—	—	1.9	1.9	1.9	—	
				—	—	—	—	—	1.9	—	
				—	—	—	0.9	—	—	—	
Total length(kbp)	16.2	16.7	16.5	16.3	16.5	16.5	16.2	15.2	15.1	17.8	17.6
Number of fragments	3	3	2	6	6	5	7	6	6	7	1

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

の方法を用いた。ハプロタイプ間および集団間の遺伝的類縁関係はPhylip ver. 3.5[9]を用い塩基置換率に基づいてUPGMA法およびNJ法により検討した。

結　果

用いた9種の制限酵素のうち7種すなわち*Apa* I（3型），*Ava* I（7型），*Bgl* II（2型），*Bst*E II（2型），*Eco*R I（2型），*Pvu* II（2型），*Xba* I（3型）で消化した場合に，mtDNAの切断断片長に変異が認められた（Table 2）。これを整理すると分析した91個体は17のハプロタイプに分類された（Table 3）。

各ハプロタイプ間の塩基置換率は0.27～2.33%であった（Table 4）。各ハプロタイプのうち1型と2型が検討した4河川集団共通に認められ，両タイプの出現頻度の合計は，どの集団内でも半数以上を占めていた（52.1%～78.3%）。一方，各集団は他集団には見られないタイプを低頻度ながら含んでいた（4.3%～26.1%，Table 3）。

伊藤[1,2]の提唱した日高系（鵡川＋沙流川）と十勝・釧路系（十勝川＋釧路川）の間でハプロタイプ頻度組成をRoff and Bentzen[5]に基づくモンテカルロシミュレーションを用い100000回試行して比較したところ有意差が認められた（p=0.046, Table 5）。なお，個々の河川集団間では有意差は認められなかった（p=0.144～0.525, Table 5）。各集団間の塩基置換率は0.0037～0.0054，純塩基置換率は0.0002～0.0004であった（Table 6）。

各集団間のUPGMA法およびNJ法に基づく遺伝的類縁関係をFig. 2に示した。UPGMA法とNJ法を用いた場合，系統樹の形が若干異なったが，各分岐間の遺伝的距離は僅差であった。

各集団内の遺伝的多型性を表すnucleon diversity（h）は0.7758～0.9074，塩基多様度は0.0028～0.0052であった（Table 7）。

考　察

形態形質の解析から伊藤[1,2]がとなえた日高，十勝・釧路，厚岸の3系群のうち本研究で検討した2系群，すなわち日高系（鵡川，沙流川）と十勝・釧路系（十勝川，釧路川）についてハプロタイプ頻度組成に有意差が認められた（Table 5）ことから，両系群は遺伝的に分化していることが明らかとなった。大久保[3]はアイソザイム分析の結果からシシャモ集団が遺伝的に均一で，各河川集団間に混合が起こっていると報告しているが，本研究の結果から本種は遺伝的分化のある分集団を有することが明らかとなった。

遺伝的距離を表す塩基置換率を求めた結果，比較的高い値が鵡川—十勝川（0.0054），鵡川—釧路川（0.0050），釧路川—十勝川（0.0047）で観察された（Table 6）。このことからさらに複雑な集団構造を有する可能性も考えられ，今後mtDNAのDループなど超可変領域を分析するなどさらに詳細な検討が必要と思われる。

またこのほか，過去一度も集団解析が成されていない北海道南部の遊楽部川や長万部川など噴火湾流入河川の

mtDNA obtained by nine endonucreases digestion

Bgl II		*Bst* E II		*Eco* R I		*Pst* I	*Pvu* II		*Xba* I		
A	B	A	B	A	B		A	B	A	B	C
—	8.8	11.0	—	17.8	—	6.5	8.5	—	13.6	—	—
7.8	7.8	—	8.0	—	13.1	5.2	7.5	7.5	—	9.3	—
7.7	—	5.6	5.6	—	3.9	4.9	—	6.0	—	—	8.4
1.0	—	—	3.1				—	3.1	—	—	4.7
									—	4.0	—
									2.3	2.3	2.3
									0.9	0.9	0.9
16.5	16.6	16.6	16.7	17.8	17.0	16.6	16.0	16.6	16.8	16.5	16.3
3	2	2	3	1	2	3	2	3	3	4	4

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

Table 3. Mitochondrial DNA haplotypes and their frequencies

haplo-type	*Apa* I	*Ava* I	*Bam* H II	*Bgl* II	*Bst* E II	*Eco* R I	*Pst* I	*Pvu* II	*Xba* I
1	A	A	N	A	A	A	N	A	A
2	A	B	N	A	A	A	N	A	A
3	A	B	N	B	A	A	N	A	A
4	A	C	N	A	A	A	N	A	A
5	A	A	N	B	A	A	N	A	A
6	A	A	N	A	A	B	N	A	A
7	A	C	N	B	A	A	N	A	A
8	A	C	N	A	A	A	N	B	A
9	A	D	N	A	A	A	N	A	A
10	B	B	N	A	A	A	N	A	A
11	A	E	N	A	A	A	N	A	A
12	C	A	N	A	A	A	N	A	B
13	A	B	N	A	A	A	N	A	C
14	A	B	N	B	A	A	N	A	C
15	A	B	N	A	B	A	N	A	A
16	A	F	N	A	A	A	N	A	A
17	A	G	N	A	A	A	N	A	A
Total									

* Numerals indicate frequencies (number of individuals) composing each haprotype. N; No variation.

Table 4. Nucleotide divergence between 17 haplotypes of Japanese longfin smelt

Haplotype	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	0.0027	0.0071	0.0071	0.0041	0.0040	0.0121	0.0116	0.0040	0.0055	0.0027	0.0084	0.0068	0.0116	0.0068	0.0027	0.0068
2		0.0041	0.0041	0.0071	0.0068	0.0088	0.0084	0.0040	0.0027	0.0055	0.0116	0.0040	0.0084	0.0040	0.0055	0.0040
3			0.0088	0.0028	0.0116	0.0043	0.0135	0.0084	0.0071	0.0102	0.0170	0.0084	0.0041	0.0084	0.0102	0.0084
4				0.0121	0.0116	0.0043	0.0041	0.0084	0.0071	0.0102	0.0170	0.0084	0.0135	0.0084	0.0102	0.0084
5					0.0084	0.0074	0.0170	0.0084	0.0102	0.0071	0.0135	0.0116	0.0071	0.0116	0.0071	0.0116
6						0.0170	0.0162	0.0081	0.0098	0.0068	0.0129	0.0110	0.0162	0.0110	0.0068	0.0110
7							0.0088	0.0135	0.0121	0.0156	0.0233	0.0135	0.0088	0.0135	0.0156	0.0135
8								0.0129	0.0116	0.0149	0.0221	0.0129	0.0184	0.0129	0.0149	0.0129
9									0.0068	0.0040	0.0129	0.0081	0.0129	0.0081	0.0040	0.0081
10										0.0084	0.0116	0.0068	0.0116	0.0068	0.0084	0.0068
11											0.0116	0.0098	0.0149	0.0098	0.0027	0.0098
12												0.0129	0.0184	0.0162	0.0116	0.0162
13													0.0040	0.0081	0.0098	0.0081
14														0.0129	0.0149	0.0129
15															0.0098	0.0081
16																0.0098

Table 5. Result of homogeneity test between populations of Japanese longfin smelt

	Hidaka			Tokachi·Kushiro		
	Mu River	Saru R.	total	Tokachi R.	Kushiro R.	total
Mu River		−<0.525		−<0.144	−<0.161	
Saru R.				−<0.216	−<0.522	
Hidaka total						+<0.046
Tokachi R.					−<0.226	

Probabilities calculated using the Monte Carlo approach of Roff and Bentzen (1989)
−, not significant; +, significant

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

observed in Japanese longfin smelt

Hidaka			Tokachi•Kushiro			Total
Mu River	Saru R.	total	Tokachi R.	Kushiro R.	total	
0.304(7)*	0.522(12)	0.413(19)	0.273(6)	0.348(8)	0.311(14)	0.363(33)
0.217(5)	0.261(6)	0.239(11)	0.409(9)	0.304(7)	0.356(16)	0.297(27)
0.174(4)	0.043(1)	0.109(5)	0.045(1)	—	0.022(1)	0.066(6)
0.043(1)	0.087(2)	0.065(3)	0.136(3)	0.087(2)	0.111(5)	0.088(8)
0.043(1)	—	0.022(1)	—	—	—	0.011(1)
0.043(1)	—	0.022(1)	—	—	—	0.011(1)
0.043(1)	—	0.022(1)	—	—	—	0.011(1)
0.043(1)	—	0.022(1)	—	—	—	0.011(1)
0.043(1)	0.043(1)	0.043(2)	—	—	—	0.022(2)
0.043(1)	—	0.022(1)	—	—	-	0.011(1)
—	0.043(1)	0.022(1)	—	—	—	0.011(1)
—	—	—	0.136(3)	—	0.067(3)	0.033(3)
—	—	—	—	0.087(2)	0.044(2)	0.022(2)
—	—	—	—	0.043(1)	0.022(1)	0.011(1)
—	—	—	—	0.043(1)	0.022(1)	0.011(1)
—	—	—	—	0.043(1)	0.022(1)	0.011(1)
—	—	—	—	0.043(1)	0.022(1)	0.011(1)
1.000(23)	1.000(23)	1.000(46)	1.000(22)	1.000(23)	1.000(45)	1.000(91)

Table 6. Nucleotide divergence (above diagonal) and net nucleotide divergence (below diagonal) between populations of Japanese longfin smelt

	Mu River	Saru R.	Tokachi R.	Kushiro R.
Mu River		0.0043	0.0054	0.0050
Saru R.	0.0003		0.0040	0.0037
Tokachi R.	0.0004	0.0003		0.0047
Kushiro R.	0.0003	0.0002	0.0002	

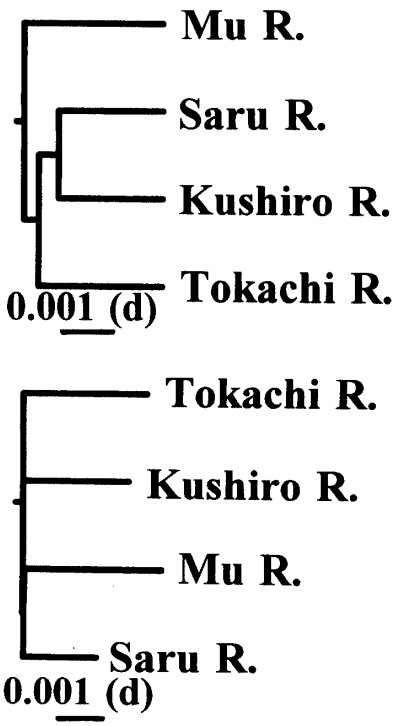

Fig. 2. A dendrogram constructed by the UPGMA (upper) and the NJ (lower) of nucleotide divergence among 4 populations of Japanese longfin smelt.

シシャモ集団も伊藤[1,2]の唱えた3系群とは，産卵河川の分布が地理的に不連続になっていることから，遺伝的に独立した集団を形成している可能性もあり，今回未検討の厚岸系を含めて今後検討していく必要がある。

対象地域の在来集団とは遺伝的に異なる系統由来の種苗を放流した場合，種苗の持つ種々の形質が放流された環境に適さないことが起こり得る。その結果，種苗が放流された環境に適応出来ないため，放流効果が上がらないという疑いのある事例が報告されている。[10,11] また少しでも放流種苗が生き残り再生産に加わった場合，放流地域には元来存在しない遺伝子が在来集団に浸透することにより在来集団の遺伝的特徴がくずれ，その生残を脅かすという遺伝的汚染も懸念される。[10,12,13] 本研究よりシシャモ集団は遺伝的に異なる分集団を有することが明

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

Table 7. Estimates of genetic variability in populations of Japanese longfin smelt

	Hidaka			Tokachi•Kushiro			Total
	Mu River	Saru R.	total	Tokachi R.	Kushiro R.	total	
Number of haplotypes	10	6	11	5	8	9	17
Nucleon diversity	0.9074	0.7758	0.8266	0.8988	0.8728	0.8395	0.8129
Nucleotide divergence	0.0052	0.0028	0.0041	0.0048	0.0042	0.0046	0.0044

らかとなり，またさらに，複雑な集団構造を有する可能性も示唆された。このことから，本種の種苗放流を行う場合，各集団の遺伝的特異性を維持するため，各河川における在来集団由来の種苗を用いることが望ましい。

集団間の系統樹はUPGMA法とNJ法で異なる樹型を成したが，どちらも各分岐から次の分岐までの遺伝的距離は一様に小さかった（Fig. 2)。これはこの集団間の系統樹の信頼性が低いことを表している。

集団内の遺伝的多型性についてnucleon diversity (h) を求めた結果，0.7758～0.9074であった。塩基多様度は0.0028～0.0052であった（Table 7)。集団間で若干，数値の違いは認められたが，本研究ではその原因を明らかにすることはできなかった。

個々の河川集団間でのハプロタイプ頻度組成に有意差は観察されず，分析個体数の少なさも指摘された。mtDNA解析は分析手法が煩雑であることから，慣例的に1集団20個体前後で分析が行われることが多かったが，集団研究の場合これでは少なく，より多くの個体を分析する必要があることが示唆された。

謝　辞

本研究を行うに当たり，北海道立中央水産試験場の吉田英雄博士，北海道立水産孵化場の笠原昇氏ならびに大久保進一氏には有益な助言を頂いた。試料の採集には鵡川漁業協同組合，門別漁業協同組合，釧路市漁業協同組合，豊頃町役場には多大なるご協力を頂いた。また試料の輸送，測定には北海道立水産孵化場職員諸兄にご協力いただいた。ここに記して感謝の意を表したい。

文　献

1) 伊藤小四郎：シシャモの生態調査Ⅰ　孕卵数の計測方法の比較並びに体長，年齢と孕卵数の関係について．北海道立水産孵化場研報，**14**, 47–54 (1959).
2) 伊藤小四郎：シシャモの生態調査Ⅱ　地域性について．北海道立水産孵化場研報，**18**, 27–40 (1963).
3) 大久保進一：シシャモの遺伝的変異と集団構造．北海道立水産孵化場研報，**44**, 63–68 (1989).
4) S. Wada, T. Kobayashi, and K. Numachi: Genetic variability and differentiation of mitochondrial DNA in mink whale. *Rep. Int. Whal. Commn.* (Special Issue **13**), 203–214 (1991).
5) 鈴木研一：ミトコンドリアDNA (mtDNA) 解析の北海道産サクラマス集団への応用可能性に関する研究．魚と水，**31**, 273–283 (1994).
6) D. A. Roff and P. Bentzen: The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples. *Mol. Biol. Evol.*, **6**, 539–545 (1989).
7) 根井正利：分子進化遺伝学，初版，培風館，東京，1990, 433pp.
8) M. Nei and F. Tajima: DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, **97**, 145–163 (1981).
9) J. Felsenstein: PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5, Univ. of Washington (1993).
10) 真山　紘：サクラマス *Oncorhynchus masou* (Brevoot) の淡水域の生活および資源培養に関する研究．北海道さけ・ますふ化場研報，**46**, 1–156 (1992).
11) R. R. Reisenbichler: Relation between distance transferred from natal stream and recovery rate of hatchery coho salmon. *N. Am. J. Fish. Mgmt*, **8**, 172–174 (1988).
12) G. L. Thomas and Ole A. Mathisen: Biological interactions of natural and enhanced stocks of salmon in Alaska. *Fish. Res.*, **18**, 1–17 (1993).
13) 杉若圭一，鈴木研一，竹内勝巳，大久保進一，河村　博，永田光博：0＋稚魚春放流における森在来系と熊石池産系の形質発現の相違．魚と水，**31**, 55–60 (1994).

NII-Electronic Library Service