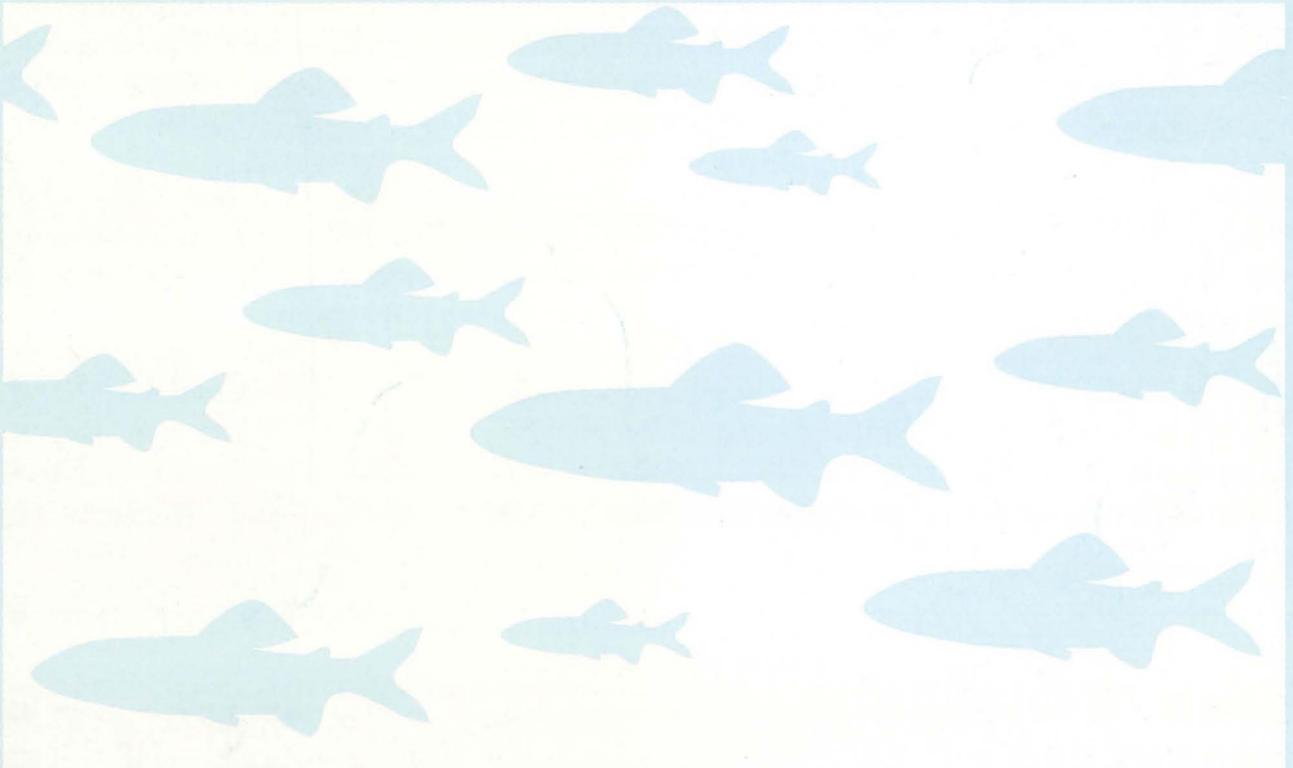


ISSN 1343-7917

水産育種

FISH GENETICS
AND
BREEDING SCIENCE

Volume 38
Number 2
December 2008



水産育種研究会

The Japanese Society of Fish Genetics and Breeding Science

水産育種

第38巻 2号

目次

研究会報告

- ムラサキイガイのミトコンドリア両性遺伝 (DUI) ～精子ミトコンドリアと生殖細胞の密接な関係～
..... 小幡麻友・佐野菜採・古丸 明 61

報文

- 17 α -メチルテストステロンの単一浸漬及び短期間内での複数回浸漬処理によるサクラマス雄性化
..... 安藤大成・寺西哲夫・水野伸也・内藤一明・小出展久・新谷康二 73
- アユの天然遡上集団と遺伝的背景を共有する人工池中養成および河川放流集団の血液性状の比較研究
..... 中嶋正道・高木秀蔵・細川秀毅・谷口順彦 81
- 父親内母子回帰法と半兄弟分析法によるサクラマスの鰹肥数と脊椎骨数の遺伝率推定
..... 安藤大成・真野修一・下田和孝・神力義仁・小出展久・中嶋正道 87
- ミトコンドリア DNA D-loop 領域からみたキンギョの起源
木島 隆・二見邦彦・方波見弥穂・山根允文・王 志勇・黄 金田・尾崎照遵・坂本 崇・岡本信明 97
- 成長ホルモン遺伝子を導入した遺伝子組換えアマゴ *Oncorhynchus masou ishikawae* の作出
..... 名古屋博之・岡本裕之・正岡哲治・太田博巳・佐藤俊平・荒木和男 105
- 日本産シタビラメ科 (カレイ目) 魚類7種の遺伝構造と系統..... 横川浩治 113
- イワナ *Salvelinus leucomaenis* におけるマイクロサテライトDNAマーカーの開発と近縁種への転用
..... 山口光太郎・中嶋正道・谷口順彦 123
- 会員通信 131
- 水産育種研究会会則 133
- 水産育種投稿要領 134

平成20年12月28日

水産育種研究会

ムラサキイガイのミトコンドリア両性遺伝 (DUI) ～精子ミトコンドリアと生殖細胞の密接な関係～

小幡麻友・佐野菜採・古丸 明 (三重大院・生資)

Doubly Uniparental Inheritance of Mitochondrial DNA in the Blue Mussel, *Mytilus galloprovincialis*: The Possibility of the Correlation Between Sperm Mitochondria and Germ Cell Formation

Mayu OBATA, Natsumi SANO and Akira KOMARU

Graduate School of Bioresources, Mie University

Abstract

In most animal species, mitochondrial DNA (mtDNA) is maternally transmitted to offspring. However, in some bivalve species such as Mitilidae, mtDNA in the offspring is transmitted from father and mother. This phenomenon is called doubly uniparental inheritance (DUI). In DUI, two types of mtDNA are transmitted to an offspring: F type derived from the egg and M type from sperm. It is reported that only F type is transmitted to females. In males, F type predominates in the somatic tissue but M type is transmitted to the testis. In this review, using *Mytilus galloprovincialis*, we report new data related to the DUI mechanism. Three aspects of the DUI mechanism were focused on. 1. Detection of M and F types by PCR amplification and electrophoresis in adductor muscle, gonad and gametes from females and males. In all females, adductor muscle and ovary contained M type and F type. M type, which is transmitted from sperm and unfertilized eggs to offspring, was also detected in unfertilized eggs. 2. Quantitation of M and F types by real-time PCR assay in adductor muscle, gonad and gametes from males and females. F type predominated in female and male adductor muscle. Especially, the amounts of M type in females and unfertilized eggs were few. However, M type predominated in testis and sperm. From these results, we suggested that M type is exclusively transmitted from sperm, although a few M types from unfertilized eggs are also transmitted. 3. Observation of MitoTracker-stained sperm mitochondria in zygotes. Sperm mitochondrial distribution was divided into two patterns: Pattern A and Pattern B. In Pattern A, sperm mitochondria distributed in the boundary region of A, B and D blastomeres at the 4-cell stage. It was suggested that sperm mitochondria are specifically distributed at the region differentiating into primordial germ cells in Pattern A. On the other hand, sperm mitochondrial distribution was random in Pattern B. We suggest that Pattern A zygotes may mature into males and the Pattern B zygotes into females. We propose that sperm mitochondrial distribution during early development may influence germ cell formation and thus the sex of zygotes.

(accepted December 26, 2008)

1. はじめに

多くの動物種ではミトコンドリア DNA (以下 mtDNA) は母系遺伝である^{1,2)}。受精時に卵内に侵入した精子ミトコンドリアは初期発生中に削除される。ウシでは受精時に精子核と共に卵内に侵入した精子ミトコンドリアが発生初期にユビキチンによって認識さ

れ、選択的に削除されることが報告されている³⁾。マウスではミトコンドリアを生体染色した精子を用いて人工受精を行い、初期胚内の精子ミトコンドリアの分布を調べた報告例がある。その結果、初期胚内の精子ミトコンドリアは受精後 5、6 時間、即ち二細胞期前後で削除される事が報告されている^{4,5)}。

一方、本稿で紹介するムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* や、アサリ、ドブガイなどの一部の二枚貝において、mtDNA は母親だけではなく父親からも子供に伝達される⁶⁻¹²。この mtDNA 伝達様式を Doubly uniparental inheritance (DUI) という。DUI では、卵 mtDNA と精子 mtDNA の、2種類の mtDNA が子供へ伝達される^{13,14}。卵 mtDNA、精子 mtDNA はそれぞれ独自の塩基配列を持っており、卵の mtDNA を F type、精子の mtDNA を M type という (図1)。DUI のもう一つの特徴は、mtDNA の伝達様式が子供の性別によって異なっている点である。子供が雌の場合は、F type が優占して存在する。つまり子供が雌の場合、mtDNA は基本的に母系遺伝する。一方、子供が雄の場合は M type と F type、両方の mtDNA が子供に伝達される。体細胞には F type が、精巣には M type が優占して存在する。従って雄個体の mtDNA はヘテロプラスミーの状態である。

以上が二枚貝におけるミトコンドリア両性遺伝、DUI の概要であるが、DUI には、まだ明らかにされていない点がいくつか挙げられる。まず DUI では、雌では F type のみが伝達されると考えられてきた。しかしムラサキイガイにおけるいくつかの報告では、精子 mtDNA (M type) を持つ雌の存在も報告されている^{9,14-19}。これまで M type を持つ雌は例外的な存在と考えられており、M type が存在している雌の頻度を詳細に調べた研究はこれまで行われていなかった。

M type を持つ雌の頻度を明らかにすることは、雌においてどのように F type が優占するのかを推測する上で重要である。しかしこれまでの研究では、雌において F type が優占するメカニズムについてはあまり考察されていない。もし多くの雌において M type が全く存在せず F type のみが検出されるのであれば、雌における M type は mtDNA が母系遺伝する種と同様、初期発生時に選択的に削除されている可能性が高い。一方、もし全ての雌において微量の M type が存

在しているなら、DUI の mtDNA 様式をもつ種では、雌でも精子ミトコンドリアは削除されていないはずである。M type を持つ雌の頻度や、そのような雌を持つ M type が次世代の子供へ伝達されるのか、といった点から DUI の伝達様式を検討することは、DUI がどのように維持されるのかを明らかにするための重要な知見となると筆者らは考えた。

次に、通常は削除されるはずの精子 mtDNA が、次世代の雄の精巣のみで優占する仕組みを明らかにする必要がある。DUI のようなミトコンドリア伝達様式が維持されるには、精子ミトコンドリア由来の M type が次世代の雄の生殖細胞系列へ受け継がれる仕組みが存在すると考えられる。しかし、未受精卵に含まれる mtDNA と受精時に精子によって持ち込まれる mtDNA では、量的に未受精卵の mtDNA の方が多い。例えば哺乳類では未受精卵 1 細胞には約10万コピーの mtDNA があると報告されている²⁰。一方精子が卵内に持ち込む mtDNA コピー数は約100コピーと言われており²¹、受精直後の卵に含まれる精子 mtDNA は卵 mtDNA のわずか1/1000と見積もられている。この数値はそのままムラサキイガイに適用出来るものではないが、ムラサキイガイにおいて受精時に持ち込まれる精子ミトコンドリアの数は5個のみであり、ムラサキイガイにおいても受精直後の卵内には精子由来 M type よりも未受精卵由来の F type の方が相当多いと考えられる。

卵内に侵入した精子ミトコンドリアに由来する M type が雄の生殖細胞系列で優占するには、以下の二つの過程が必要であると筆者らは考えた。第一に受精によって卵内に侵入した精子ミトコンドリアが将来生殖細胞系列に分化する割球、つまり始原生殖細胞 (Primordial germ cell, PGC) 内に局在する必要がある。さらに初期胚内の mtDNA ハプロタイプは M type より F type の方が圧倒的に多いので、生殖細胞系列に精子ミトコンドリアが受け継がれるだけでは全ての生殖細胞で M type が優占することはない。そこで第二に、PGC に受け継がれた M type は生殖細胞形成過程で選択的に増幅され、生殖細胞内で優占する必要がある。しかし、二枚貝の生殖細胞系列に関する知見は乏しく、ショウジョウバエや両生類のように PGC のマーカーとなる内因性物質や PGC の形態的特徴に関する報告もない。近年、マガキ *Crassostrea gigas* や mud snail *Ilyanassa obsoleta* では、初期発生における PGC の位置を特定した研究が報告されている^{22,23}。しかし、ムラサキイガイ初期胚の PGC の位置はまだ明らかにされていない。また、卵内へ持ち込まれた精子ミトコンドリアが初期胚においてどこに分布している

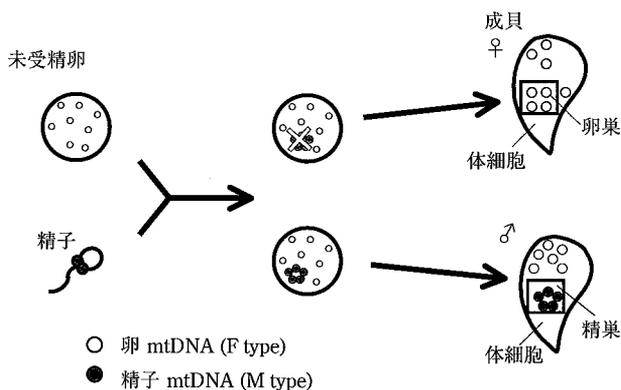


図1 DUIにおけるミトコンドリアDNA伝達様式

のかも調べられていなかった。

そこで本稿では、DUIに関する以下の3点について、著者らの研究内容を中心に紹介する。まず、「2. 精子、未受精卵からの次世代への M type 伝達」において、著者らが DUI の伝達様式をより詳細に調査した結果を報告する²⁴⁾。M type、F type 間の変異が最も顕著な D-loop 領域の配列の違いを利用して M type、F type を特異的に増幅するプライマーをそれぞれ設計し、PCR と電気泳動によって各組織の mtDNA を判定した。雄、雌個体から閉殻筋と生殖巣を採取し、M type、F type がどの組織に存在しているかを調べた。また産卵誘発によって未受精卵、精子をそれぞれ採取し、配偶子に伝達される mtDNA が M type、F type どちらなのかを調べた。さらに子供に伝達される M type が父親、母親どちら由来であるかを明らかにするために、放精、放卵誘発によって得られた精子、未受精卵を用いて人工受精を行った。そして精子、未受精卵、受精によって得られた幼生から DNA を抽出し、一塩基置換分析 (single nucleotide polymorphisms analysis; SNPs 分析) によって mtDNA の D-loop 領域における配列の比較を行った²⁵⁾。D-loop の中でも特に変異性が高く、個体間変異の多く見られる領域のうち、M type mtDNA complete sequence (AY363687) の103番目、123番目の塩基を比較した。

次に、「3. リアルタイム PCR を用いた M type、F type 量の定量」では、リアルタイム PCR を用いて各組織の M type、F type のコピー数の比を推定した結果を報告する²⁶⁾。D-loop 領域を用いて M type、F type のリアルタイム PCR を行い、雌雄生殖巣、体細胞、

精子、未受精卵に含まれている M type、F type のコピー数を調べ、得られた値から F type と M type コピー数の比 (F/M 比) を推定した。

最後に、「4. 初期胚における精子ミトコンドリア分布と生殖細胞の関連」において、M type が精巣に優占して存在する仕組みを明らかにするために、初期胚における精子ミトコンドリア分布を観察した結果を報告する²⁷⁾。水温上昇によってムラサキガイの放卵、放精誘発を行い、複数個体の雄から放精された精子を MitoTracker で生体染色した。18個体の雌を個別のビーカーに収容し、放卵を誘発した。各母親から得られた未受精卵と染色した精子を用いて人工受精を行い、受精卵における精子ミトコンドリアの分布パターンを調べた。

2. 精子、未受精卵からの次世代への M type 伝達

雄個体における M type、F type の検出

各組織から抽出した DNA を鋳型として PCR を行い、M type 613bp、F type 519bp の D-loop 領域の一部を増幅した。雄全15個体において、精巣、閉殻筋から濃い M type PCR 産物のバンドが検出された (図 2a)。また、F type も精巣、閉殻筋において検出された (図 2b)。精子からは非常に濃い M type のバンドが確認された (図 2c)。精子サンプルにおける F type はほとんど検出されなかった。

放精によって得たほとんどの精子サンプルから M type しか検出されなかったことから、精子には M type が優占して伝達されていると考えられる。精巣

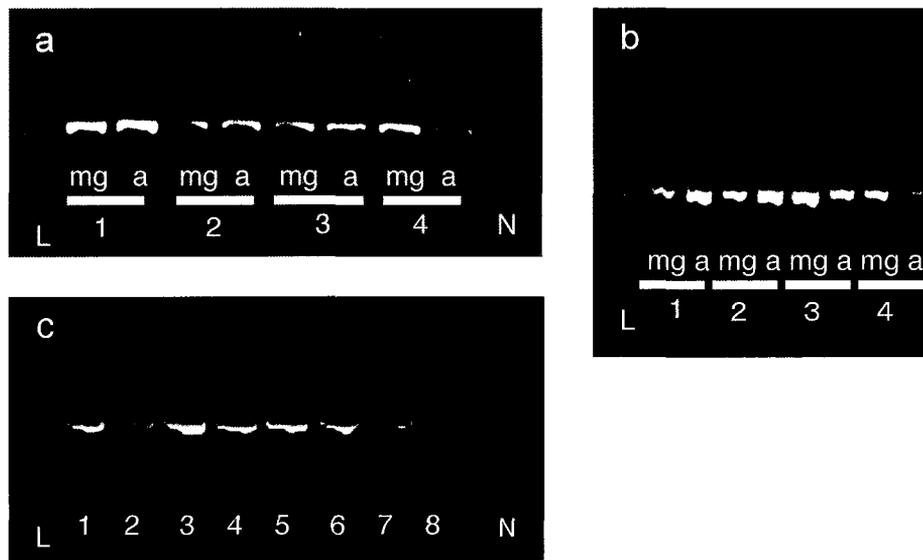


図2 雄閉殻筋、精巣、精子における M type、F type mtDNA の検出

a 精巣、閉殻筋における M type、b 精巣、閉殻筋における F type、c 精子における M type、L: 100bp DNA ラダー、mg: 精巣、a: 閉殻筋、N: ネガティブコントロール、1-8: サンプル No.

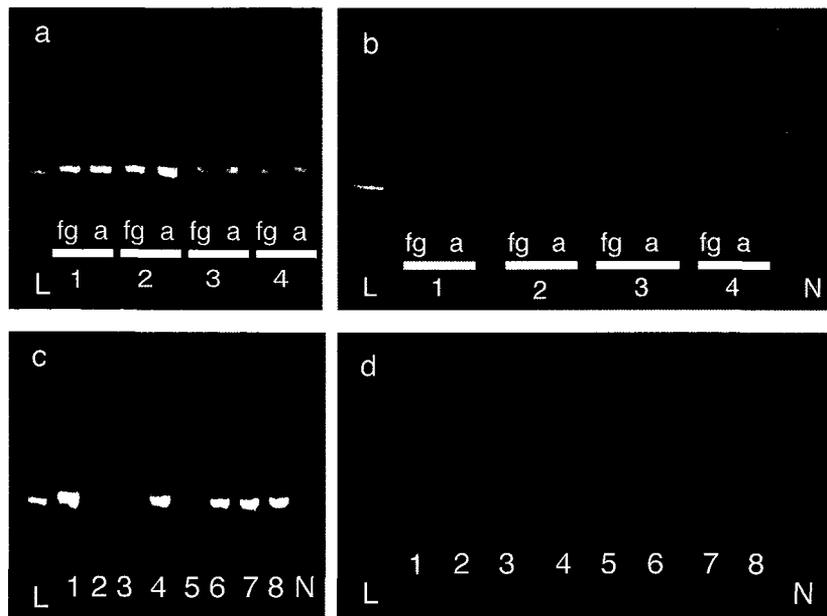


図3 雌閉殻筋、卵巣、未受精卵における M type、F type の検出
 a 卵巣、閉殻筋における F type、b 卵巣、閉殻筋における M type、c 未受精卵における F type、d 未受精卵における M type、fg: 卵巣、a: 閉殻筋、L: 100bp DNA ラダー、N: ネガティブコントロール、1-8: サンプルNo.

から検出された F type は、配偶子に含まれているものではなく、血球やセルトリ細胞など、生殖巣内の体細胞だと推測できる。また、閉殻筋からも M type が検出されたことから、M type は精巣だけでなく、体細胞にも伝達している可能性が明らかになった。しかし、閉殻筋サンプルからは F type、M type とともに濃いバンドが観察されたので、雄の閉殻筋で M type、F type どちらが優占しているのかは、この手法では確認できなかった。

雌個体における M type の検出

分析した全15個体の雌卵巣、閉殻筋から F type PCR 産物が濃いバンドとして検出された (図 3a)。さらに薄いバンドではあったが M type も全15個体の雌卵巣、閉殻筋から検出された (図 3b)。また、放卵誘発を行った全26個体の雌の未受精卵からは、濃い F type のバンドが検出された (図 3c)。一方、M type は26個体中、22個体の雌が放卵した未受精卵から検出された (図 3d)。

全雌個体の閉殻筋、卵巣から M type が検出されたことから、ムラサキガイの DUI では、雌でも M type が伝達されていることが明らかになった。従って精子ミトコンドリアの選択的削除は、雌でも起こっていないと考えられる。電気泳動によって検出されたバンドは、閉殻筋、卵巣共に F type の方が M type よりもずっと濃かったことから、雌個体では F type が優占して存在していると考えられる。雌個体では精子

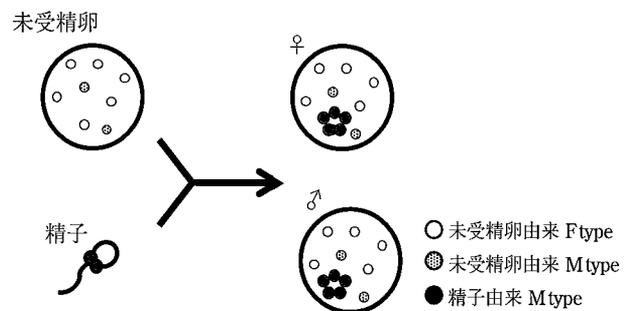


図4 筆者らの研究結果に基づいたムラサキガイにおける新しいミトコンドリア伝達様式

ミトコンドリアの選択的削除は起こらないが、M type が選択的に増やされることもなく、結果として受精時に優占している F type が成体になっても優占していると考えられる。

母から伝達する M type

ほとんどの未受精卵から微量の M type が検出されたことから、雌に伝達された M type は未受精卵を経てさらに子供へも伝達される可能性が示唆された。これまで報告されていた DUI 伝達様式では、M type が精子から1種類、F type が未受精卵から1種類伝達されると考えられてきた。しかし本研究の結果から、未受精卵からは少なくとも F type 1種類と、微量ながら M type も1種類伝達される事が分かった。このような未受精卵と精子が受精すれば、子供には F type 1種類と父、母由来の M type 2種類が伝達されることに

なる (図4)。

この仮説を検証するために筆者らは人工受精を行い、SNPs 分析によって両親と子供の M type のハプロタイプ比較を行った。その結果、精子、未受精卵からは1種類の塩基のピークのみが検出され、配偶子には単一の M type が伝達されていることが明らかになった。一方、全12交配中5交配の幼生からは2種類の塩基のピークが確認された (図5, 表1)。さらに幼生で得られた M type を両親の M type と比較すると、全交配において幼生で確認されたハプロタイプは、精子、未受精卵のハプロタイプと一致していた (表1)。以上の結果から、子供には父親だけでなく母親からも

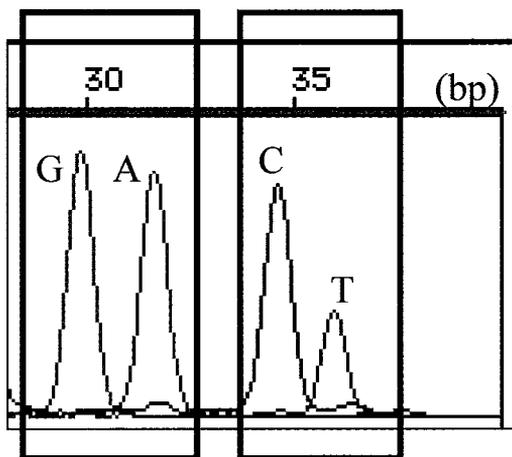


図5 SNPs 分析によって検出された交配実験における精子、未受精卵、幼生の M type の塩基波形
今回実験に用いた交配 E の幼生における M type 塩基波形。青色と赤色の四角で囲まれた波形はそれぞれ103番目、123番目の M type の塩基を示している。青、緑、黒、赤の波形はそれぞれ G、A、C、T を示しているが、今回の SNPs はリバースプライマーを用いて検出しているため、実際の塩基は相補的な塩基となる。例えば、青い G の波形が検出された場合、サンプルに含まれる実際の波形は C である。

表1 M type D-loop 領域の103、123番目における両親、子供の SNPs 比較

交配 No.	103番目			123番目		
	精子	未受精卵	幼生	精子	未受精卵	幼生
A	T	T	T	A	A	A
B	T	T	T	A	A	A
C	T	T	T	A	A	A
D	T	T	T	A	A	A
E	C	T	C,T	G	A	A,G
F	T	T	T	A	A	A
G	C	T	C,T	G	A	A,G
H	T	C	C,T	A	G	A,G
I	C	C	C	G	G	G
J	T	T	T	A	A	A
K	T	C	C,T	A	A	A
L	T	C	C,T	A	G	A,G

M type が伝達されていることが強く示唆された²⁵⁾。しかし、今回用いた精子、未受精卵サンプルは複数の親が放精、放卵した多くの配偶子から DNA を抽出し、分析した結果であり、各個体が成貝になったときに両親の M type を受け継いでいるかどうかは分からない。今後、人工受精で得られた F1 世代を飼育し、性成熟した際に体細胞、配偶子に伝達されている M type が両親由来かどうかを調べる必要がある。

3. リアルタイム PCR を用いた M type、F type 量の定量

雄閉殻筋、精巣における F/M 比

精子からの M type 混入を避けるために、非繁殖期の雄個体から採取した閉殻筋サンプルで DNA 抽出を行い、リアルタイム PCR の鋳型に用いた。10個体から得た閉殻筋において、F type は M type より $1 \sim 10^3$ 倍多かった (表2)。体細胞には M type が混在しているが、F type の方が多いことが明らかになった。一方、産卵期の精巣では15個体中12個体の雄において

表2 リアルタイム PCR を用いた非産卵期における雄閉殻筋の F/M 比

個体No.	F/M比
0623	3
0613	4
0625	6
0624	20
0607	30
0617	58
0622	59
0609	1342
0606	1562
0611	4177

表3 リアルタイム PCR による産卵期雄の精巣における F/M 比

個体No.	F/M比
1109	0.00007
0108	0.00053
0103	0.00087
1108	0.00286
0105	0.00288
0102	0.00366
1112	0.00562
1113	0.00554
1106	0.00956
1111	0.02640
1105	0.01215
1121	0.13862
1120	28
1125	231
1124	3607

M type が F type より $10 \sim 10^5$ 倍多かった (表 3)。多くの雄において、精巣では M type が優占していることが再確認された。一方残り 3 個体の精巣では、F type が M type より $10 \sim 10^3$ 倍多かった。3 個体の雄において、F type が優占していた理由として、以下の 2 点が考えられる。分析に用いた精巣の発達が悪く、多くの体細胞が混入していた可能性、F type が優占していたこの 3 個体の雄が SMI (Standard maternal inheritance) male であった可能性である。SMI male とは、M type ではなく F type を持つ精子を作る雄のことである。本研究で用いた *M. galloprovincialis* の亜種、*M. edulis* では、約 10% の雄が SMI male であるという報告もされている^{14,17)}。*M. galloprovincialis* においても、SMI male が一定の確率で存在している可能性がある。

表 4 産卵期における雌閉殻筋、卵巣の F/M 比

個体 No.	F/M 比	
	卵 巣	閉殻筋
0110	819	69
1123	967	6556
1109	1069	332
1122	1075	6718
0107	5102	233
0101	6287	694
1102	7174	37155
1101	15669	9554
0108	19903	178
0106	23932	496
1117	35879	0.97
0113	38602	1631
1104	60082	5568
1114	71487	11527
1116	150507	12351

雌閉殻筋、卵巣における F/M 比

雌では 15 個体中 14 個体の卵巣、閉殻筋において F type が M type より優占していた (表 4)。1 個体の閉殻筋では、逆に M type が F type より優占していた。卵巣では、F type が M type より $10^2 \sim 10^5$ 倍多かった。一方閉殻筋では、F type が M type より $10 \sim 10^4$ 倍多かった。雌では閉殻筋、卵巣共に F type の方が M type よりも約 10000 倍多いことが明らかになった。雌にも M type が伝達されるが、その量は閉殻筋、卵巣共にごく微量であることがリアルタイム PCR の結果から確認された。

未受精卵、精子における F/M 比

未受精卵では、全 40 個体の雌が産卵した未受精卵において F type が M type より優占していた (図 6)。未受精卵の F/M 比には産卵した雌によってばらつきがあった。F type が M type に比べて 10^6 倍多い未受精卵が観察された一方、F type が M type の 10^2 倍である未受精卵も確認された。多くの未受精卵の F/M 比は $10^3 \sim 10^4$ の値を示しており、未受精卵において F type は、M type の約 10000 倍多いことが明らかになった。一方、20 個体の雄から放精された精子では、M type が F type より $10 \sim 10^6$ 倍多かった。精子でも個体間の F/M 比は、ばらつきが大きかった。

子供へ主に伝達される M type は父由来か母由来か?

リアルタイム PCR による F/M 比の計測結果から、未受精卵には M type が含まれるが、ごく微量であること、精子には M type が優占的に伝達されることが明らかになった。従って受精卵内に存在する M type の多くは、精子によってもたらされた父親由来の M type であると推測される。しかし今回の実験では各個

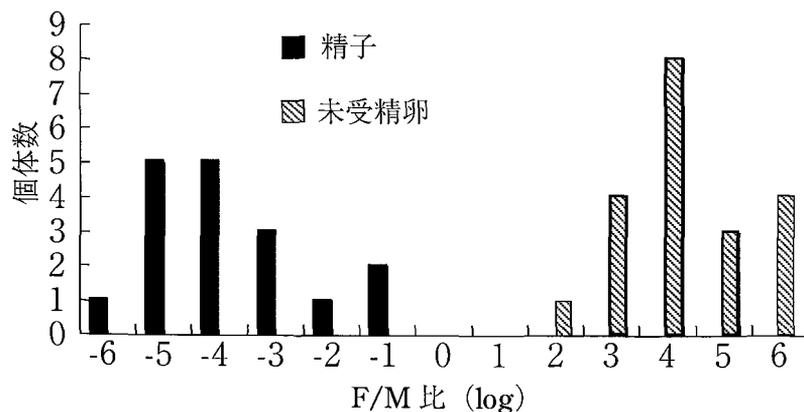


図 6 リアルタイム PCR による精子、未受精卵サンプルにおける F/M 比の定量結果
黒: 精子における F/M 比、斜線: 未受精卵における F/M 比、横軸に log 変換した F/M 比を示してある。横軸の値が負のときは M type が F type よりも多いことを示している。一方横軸の値が正の時は F type が M type よりも多い。

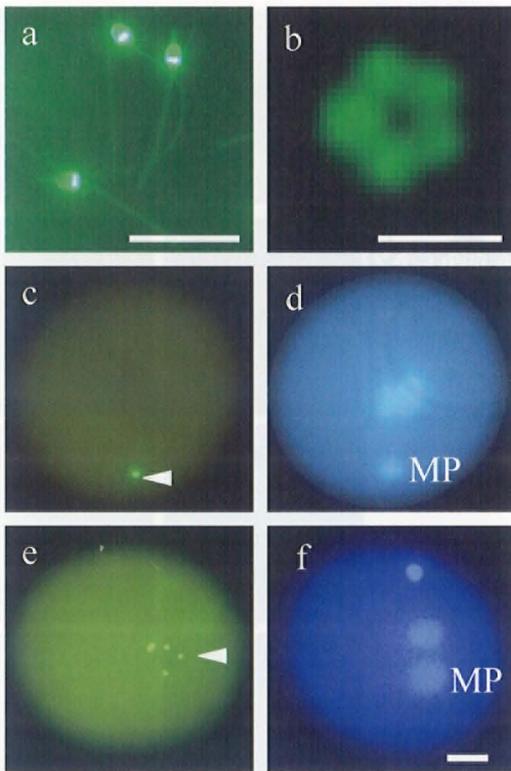


図7 MitoTracker によって染色された受精直後から雄性前核膨潤期における卵内の精子ミトコンドリア分布
 a, b, c, e: MitoTracker による精子ミトコンドリア染色、d, f: Hoechst33342 による核染色、a, b: MitoTracker によって染色した精子、a: 側面から観察した精子、b: 尾部から観察した精子、c, d: MitoTracker で染色した精子によって受精した受精直後の初期胚、e, f: 雄性前核膨潤直後、矢印: 精子ミトコンドリア、MP: 雄性前核、Scale bar: a, f; 10 μ m, b; 1 μ m

体が放精、放卵した複数の配偶子をまとめて DNA 抽出を行い、PCR 反応に用いた。従って、1 個の受精卵にどれ位のコピー数の未受精卵由来 F type、M type、精子由来 M type が持ち込まれるのかは不明である。各受精卵に供給される F type、M type の量をより正確に把握するためには、未受精卵、精子 1 細胞あたりの F type、M type のコピー数を明らかにする必要がある。

4. 初期胚における精子ミトコンドリア分布と生殖細胞の関連

受精直後から第一卵割中期における精子ミトコンドリア分布

水温上昇によって放精誘発を行って精子を採取し、MitoTracker によってミトコンドリアを生体染色した。精子尾部の 5 個のミトコンドリアが特異的に染色されているのを確認した後(図 7a,b)、人工受精を行った。受精直後、卵は第一減数分裂中期であり、凝集した雄性前核が観察された(図 7c,d)。精子ミトコンドリアは雄性前核と同じ場所にあり、5 個のミトコンドリアは集合して 1 個のかたまりとして観察された。受精 20 分後には第一極体、受精 30 分後には第二極体が形成された。雄性前核は減数分裂が完了するまで、凝縮した状態で受精直後と同じ位置で観察された。精子ミ

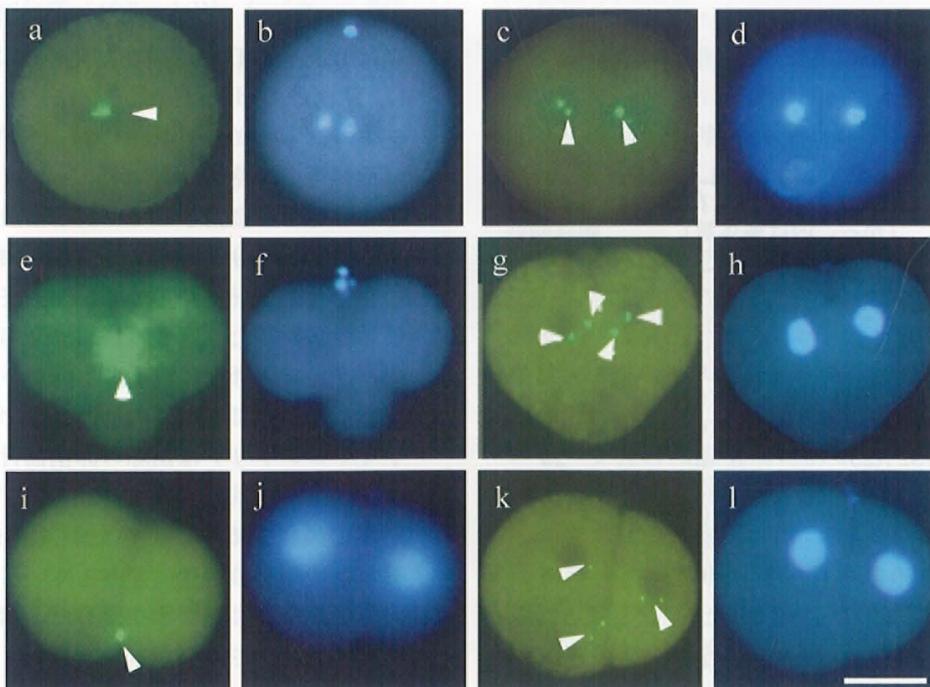


図8 第一卵割後期から二細胞期における卵内の精子ミトコンドリア分布
 a, c, e, g, i, k: MitoTracker による精子ミトコンドリア染色、b, d, f, h, j, l: Hoechst33342 による核染色、第一卵割後期以降、精子ミトコンドリアはパターンA、パターンBの二種類の分布パターンを示した。a, b: 第一卵割後期(パターンA)、c, d: 第一卵割後期(パターンB)、e, f: 極葉形成(パターンA)、g, h: 極葉形成(パターンB)、i, j: 二細胞期(パターンA)、k, l: 二細胞期(パターンB)、矢印: 精子ミトコンドリア、scale bar: 25 μ m

トコンドリアは減数分裂完了まで雄性前核と同じ場所で観察された。

受精40分後には、多くの卵で減数分裂が完了し、雄性、雌性前核が膨潤した (図 7e,f)。精子ミトコンドリアは膨潤した雄性前核と同じ場所で観察された。減数分裂が完了するまで1個のかたまりとして観察されていた精子ミトコンドリアは、雄性前核の膨潤と共にやや分散し、5個のミトコンドリアが個々に確認できるようになった。雄性前核膨潤直後は、雄性前核、精子ミトコンドリアともに受精直後と同じ場所に分布していたが、膨潤が起こってしばらくすると雄性前核が卵中央部へ移動を開始した。精子ミトコンドリアも雄性前核に伴って、卵中央部へ移動した。受精60分後には雄性前核と雌性前核が融合し、第一卵割中期の染色体を形成した。染色体は第一卵割中期の赤道板上に並んだ。精子ミトコンドリアも卵中央部に位置していた。

第一卵割後期から二細胞期の精子ミトコンドリア分布

第一卵割後期になると、精子ミトコンドリアの分布パターンは大きく2つに分かれた。ここではパターンA、パターンBと呼ぶ。パターンAでは、精子ミトコンドリアは第一卵割の染色体が両極へ移動した後も卵中央部にとどまっていた (図 8a,b)。それに対してパターンBでは、第一卵割後期に染色体が卵の両極へ移動すると、精子ミトコンドリアも核と共に両極へ移動した (図 8c,d)。

精子ミトコンドリアが示す分布パターンは放卵した母親によって明らかに異なっていた (表 5)。今回用

表 5 交配に用いた母親と初期胚内の精子ミトコンドリア分布

母親 No.	精子ミトコンドリア分布 (%) (かっこ内は個体数)		観察卵数
	パターン A	パターン B	
1	97 (28)	3 (1)	29
2	94 (16)	6 (1)	17
3	100 (20)	0 (0)	20
4	100 (24)	0 (0)	24
5	100 (25)	0 (0)	25
6	92 (23)	8 (2)	25
7	93 (28)	7 (2)	30
8	89 (25)	11 (3)	28
9	97 (35)	3 (1)	36
10	100 (16)	0 (0)	16
11	96 (26)	4 (1)	27
12	95 (20)	5 (1)	21
13	100 (19)	0 (0)	19
14	94 (17)	6 (1)	18
15	4 (1)	96 (15)	16
16	0 (0)	100 (21)	21
17	0 (0)	100 (25)	25
18	4 (1)	96 (24)	25

いた18個体の母親のうち、14個体の母親が産んだ卵では、8割以上がパターンAの精子ミトコンドリア分布を示し (89~100%)、パターンBはほとんど観察されなかった。一方、残り4個体の母親が産んだ卵では、9割以上がパターンBの精子ミトコンドリア分布であった (96~100%)。

受精60分後になると極葉が形成され始めた。パターンA卵では、5個の精子ミトコンドリアが植物極側の卵割溝と極葉の境界付近に分布していた (図 8e,f)。一方、パターンBの卵では、5個の精子ミトコンドリアは分散し、両方の割球に分散していた (図 8g,h)。パターンA、B共に精子ミトコンドリアは極葉中には分布していなかった。受精75分後には二細胞期の卵が観察された。パターンAでは5個の精子ミトコンドリアは植物極側の卵割面付近に分布していた (図 8i,j)。一方、パターンB卵では、5個の精子ミトコンドリアが2個の割球に分散しており、一定の傾向は見られなかった (図 8k,l)。

四細胞期以降の精子ミトコンドリア分布

四細胞期におけるパターンA、B卵における精子ミトコンドリアの分布を観察した。各割球を、サイズと核の位置によって特定した。パターンA卵において精子ミトコンドリアは1個のかたまりとして観察された (図 9a,b)。33%のパターンA卵において、精子ミトコンドリアはA割球とD割球の卵割面付近に局在していた (図 9c)。31%の卵において、精子ミトコンドリアはB割球とD割球の卵割面付近に、21%の卵ではA、B、D割球の卵割面付近に局在していた。精子ミトコンドリアは85%の初期胚においてA、B、D割球の卵割面付近の細胞質に分布していた。一方、パターンB卵では、5個の精子ミトコンドリアが各割球に分散していた (図 9d,e)。四細胞期におけるパターンB卵の精子ミトコンドリア分布において、特定の傾向は観察されなかった (図 9f)。

パターンA卵では、5個の精子ミトコンドリアは8細胞期においても1個のかたまりとして観察され、精子ミトコンドリアは割球の卵割面付近に分布していた (図 9g,h)。精子ミトコンドリアのシグナルは、胚期まで確認する事ができたが (図 9i,j)、精子ミトコンドリアがどの割球に分布しているかは各割球の判別が困難なため決定できなかった。精子ミトコンドリアの分裂は観察されなかった。

母親の違いによる精子ミトコンドリア分布パターンの相違

過去のムラサキイガイ交配実験の報告において、ム

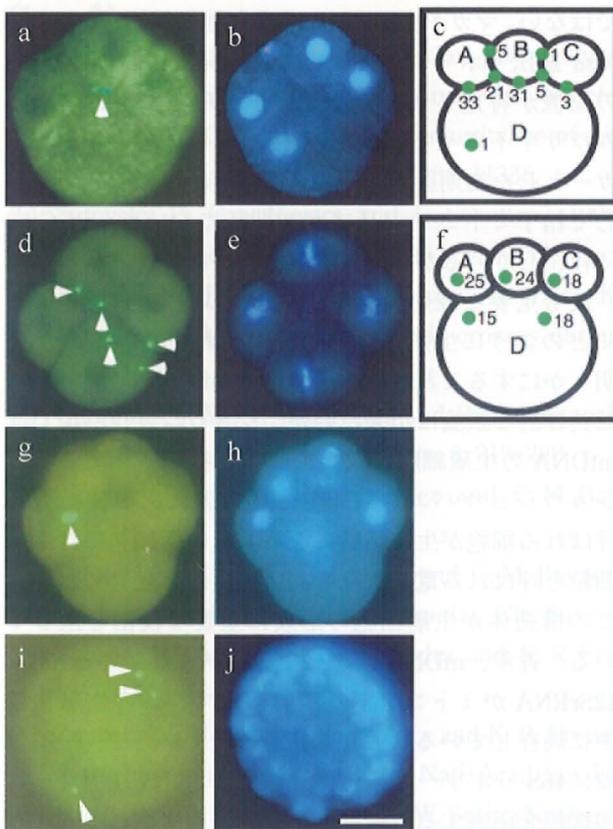


図9 四細胞期から胞胚期における卵内の精子ミトコンドリア分布

a, d, g, i: MitoTracker による精子ミトコンドリア染色、b, e, h, j: Hoechst33342 による核染色、a, b: 四細胞期 (パターンA)、c: 四細胞期におけるパターンA卵の精子ミトコンドリア分布 (% , n=76)、A,B,C,Dはそれぞれ各割球を示している。d, e: 四細胞期 (パターンB)、f: パターンB卵の精子ミトコンドリア分布 (% , n=20)、g, h: 八細胞期 (パターンA)、i, j: 胞胚期 (パターンA)、矢印: 精子ミトコンドリア、Scale bar: 25 μ m

ラサキイガイの性比は母親によって決定されている可能性が示唆されている^{17,28)}。同じ雌を用いた交配では子供の性比はほぼ一定であるが、同じ雄を用いた交配では、子供の性比は交配毎に異なる。これらの結果から、ムラサキイガイの性比の決定要因の1つとして、母親の産出する卵細胞質に存在する要因が考えられる。

本研究において受精卵内における精子ミトコンドリア分布は、パターンAとパターンBの2つの分布パターンに分類された。パターンAの分布を示す卵は18個体中14個体 (78%) の母親の卵で確認された。5個の精子ミトコンドリアは非常に近接し1個のかたまりになり、四細胞期にはA、B、D割球の卵割面付近に分布していた (表5, 図9c)。一方、パターンBの卵は18個体中4個体 (22%) の卵で観察された。5個の精子ミトコンドリアは各割球に分散し、その分布はラ

ンダムであった (図9f)。これらの結果は、精子ミトコンドリアの分布が母系によって異なる可能性を示している。

Cao *et al.*²⁹⁾ は、*M. edulis* の受精卵における精子ミトコンドリアの分布を観察し、本研究と同様に一定の部位へ局在するパターンと5個の精子ミトコンドリアが分散してランダムな分布を示すパターンの2パターンを報告している。さらに、精子ミトコンドリアが一定の部位に局在する卵が多く見られた交配からは高頻度で雄が、精子ミトコンドリア分布がランダムに分布する卵が多く見られた交配からは高頻度で雌が得られたと報告している。著者らのグループでも雌を高頻度に産出する系統の卵を用いて人工受精を行い、精子ミトコンドリア分布を観察した。その結果ほとんどの初期胚で、精子ミトコンドリアが分散するパターンBの分布が確認されている。このことは、初期胚における精子ミトコンドリアの分布と母親の要因に依存したムラサキイガイの性決定には、何らかの関係がある事を示している。

精子ミトコンドリアが特定の部位へ集中する初期胚を産出する家系では雄が多く産出される理由を筆者らは以下のように推測する。子供が雄の場合、精子ミトコンドリアは最終的には精巣で優占して存在する。従って精子ミトコンドリアは初期発生過程において、PGCに分化する部位に分布していなければならない。雄になる個体のみにおいて、精子ミトコンドリアが特定の部位、つまり生殖細胞系へ分布するような仕組みが存在する可能性が考えられる²⁷⁾。一方子供が雌の場合、卵に伝達されるmtDNAの殆どは未受精卵由来のF typeなので、精子ミトコンドリアが将来生殖細胞へ分化する部位、PGCに分布する必要はない。従って精子ミトコンドリア分布がランダムな初期胚を産出する家系では雌が多くなる可能性が高いと考えられる。

受精卵内の精子ミトコンドリア分布と始原生殖細胞の位置の推定

パターンAの二細胞期において、精子ミトコンドリアは植物極側の卵割面付近に位置していた (図8i, j)。さらに四細胞期には、85%の初期胚において精子ミトコンドリアはA、B、D割球の卵割面付近の細胞質に位置していた (図9c)。二細胞期、四細胞期において卵割面で観察された精子ミトコンドリアが、どちらの割球に位置しているのかを顕微鏡下で確認する事は出来なかった。しかし8細胞期の精子ミトコンドリア分布がD割球とその他の割球の卵割面付近に分布していたことから、二細胞期、四細胞期におい

て卵割面付近で観察された精子ミトコンドリアは、常にD割球の細胞質中に分布していると考えられた。*M. edulis*の初期胚においても、精子ミトコンドリアは四細胞期になるとD割球に局在する²⁹⁾。著者らは、精子ミトコンドリアが初期発生中に生殖細胞系列へ分化する割球に分布すると推測しているが、もし著者らの仮説が正しければ本研究の結果から推測できる将来PGCに分化する部位は四細胞期のA、B、D割球の卵割面付近に位置するD割球側の細胞質であると考えられる。

PGCの位置を特定するマーカーとして、*vasa* 遺伝子のホモログが挙げられる。*vasa* 遺伝子とはショウジョウバエで発見された遺伝子で、生殖細胞特異的に発現する。その他幅広い動物種においても、*vasa* 遺伝子ホモログが単離されており、生殖細胞に特異的なマーカーとしてPGCの同定に用いられている。貝においても、マガキ、*mud snail*で*vasa* 遺伝子ホモログの発現部位を観察することによるPGCの特定が報告されている^{22,23)}。これらの種の初期胚で*vasa-like* mRNAのwhole mount in situ hybridization染色を行ったところ、四細胞期における*vasa* 遺伝子ホモログの発現は、D割球で観察された。また、マガキ、*mud snail*共にPGCの前駆細胞は8細胞期においてD割球から派生する1d割球であると報告されている。以上の報告例から、ムラサキイガイでも将来PGCになる割球は、D割球から生じることが推測される。

5. おわりに

著者らのPCR、リアルタイムPCRを用いた結果から、雌にもM typeが伝達されていること、伝達された雌のM typeは未受精卵を介して次世代へ伝達されることが明らかになった。また初期胚内の精子ミトコンドリア分布を観察した結果、精子ミトコンドリアが特定の部位へ分布する胚と、精子ミトコンドリア分布がランダムな胚が存在することが明らかになった。精子ミトコンドリアが特定の部位に分布する胚は雄になる傾向が強く、精子ミトコンドリア分布がランダムな胚は雌になる傾向が強いことが示唆された。精子mtDNAと生殖細胞の形成の間には密接な関係があることが示唆される。しかし、DUIの仕組みを解明するにはまだ多くの課題が残されている。

筆者らは精子ミトコンドリアが初期胚内で将来生殖細胞に分化する割球に特異的に分布するという仮説を立て、精子ミトコンドリアが初期胚において特定の部位に分布することを明らかにした。しかし、その特定の部位が将来PGCに分化することを確認している訳

ではない。マガキや*mud snail*など他の貝類において、*vasa* 遺伝子ホモログによって初期発生におけるPGCの位置が特定されているが、それらの報告と同様にムラサキイガイでも*vasa* 遺伝子ホモログを分子マーカーとした初期胚内のPGCの特定が必要である。そして精子ミトコンドリアが初期胚において、PGC内に存在しているかを確認する必要がある。

最も重要な課題は、精子ミトコンドリアが具体的にどのように生殖細胞の形成に関わっているのかを明らかにすることである。現段階の筆者らのデータでは具体的な議論は出来ないが、ショウジョウバエではmtDNAの生殖細胞形成への関与が推測されている。ショウジョウバエ初期胚では胚後方にある極細胞と呼ばれる細胞が生殖細胞になる。この極細胞には生殖顆粒と呼ばれる電子密度の高い物質が存在しており、この構造体が生殖細胞の形成に重要な役割を担っている。近年、mDNAによってコードされている16S、12SrRNAがミトコンドリア外に出て、この生殖顆粒中に局在していることが報告された³⁰⁾。更に、生殖顆粒に16Sリボソームの抗体を注入し、16Sリボソームの機能を阻害すると極細胞の形成が阻害されること、UV照射処理によって極細胞形成能を失った細胞に16SrRNAを注入すると、極細胞形成能が回復することも報告されている^{31,32)}。以上の報告から判断すると、ショウジョウバエでは生殖細胞の形成にmtDNA由来の16SrRNAが必要不可欠である。また、16SrRNAの生殖細胞系列における局在はショウジョウバエだけでなくカエル、ヒト、マウス等、幅広い動物種で報告されている³³⁻³⁵⁾。ムラサキイガイでもM typeの16SrRNAが将来雄になる初期胚の生殖顆粒中に分布し、精子形成過程に影響を及ぼしている可能性がある。もしこのような現象が明らかになれば、初期胚における精子ミトコンドリア分布と生殖細胞の形成という、一見何の関連もなさそうな2つの現象の関係をより具体的に明らかにすることができると考えられる。

謝 辞

ムラサキイガイのmtDNA伝達様式における著者らの研究は、日本学術振興会特別研究員制度の支援の下に行われました。ここに関係各位に感謝いたします。また、上記の研究は多くの方々のご協力を得て実施されました。本研究を行うにあたりご助言をいただいた、東京海洋大学准教授 吉崎悟朗博士に厚く御礼申し上げます。また、共著者の皆様にも感謝申し上げます。

文 献

- 1) Avise, J. C. (1991) Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Genet.*, 25: 45-69.
- 2) Birky, C. W. (1995) Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanism and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 11331-11338.
- 3) Sutovsky, P., C. S. Navara and G. Schatten (1996) Fate of the sperm mitochondria, and the incorporation, conversion and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization. *Biol. Reprod.*, 55: 1195-1205.
- 4) Kaneda, H., J. Hayashi, S. Takahama, C. Taya, K. F. Lindahl and H. Yonekawa (1995) Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4542-4546.
- 5) Cummins, J. M., T. Wakayama and R. Yanagimachi (1998) Fate of microinjected spermatid mitochondria in the mouse oocyte and embryo. *Zygote*, 6: 213-222.
- 6) Skibinski, D. O. F., C. Gallagher and C. M. Baynon (1994a) Mitochondrial DNA inheritance. *Nature*, 368: 817-818.
- 7) Skibinski, D. O. F., C. Gallagher and C. M. Baynon (1994b) Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics*, 138: 801-809.
- 8) Zouros, E., A. O. Ball, C. Saavedra and K. R. Freeman (1994a) Mitochondrial DNA inheritance. *Nature*, 368: 817-818.
- 9) Zouros, E., A. O. Ball, C. Saavedra and K. R. Freeman (1994b) An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7463-7467.
- 10) Hoeh, W. R., D. T. Stewart, B. W. Sutherland and E. Zouros (1996) Multiple origins of gender-associated mitochondrial DNA lineages in bivalves (Mollusca: Bivalvia). *Evolution*, 50: 2276-2286.
- 11) Liu, H. P., J. B. Mitton and S. K. Wu (1996) Paternal mitochondrial DNA differentiation far exceeds maternal DNA and allozyme differentiation in the freshwater mussel, *Anodonta grandis grandis*. *Evolution*, 50: 952-957.
- 12) Passamonti, M. and V. Scali (2001) Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca Bivalvia). *Curr. Genet.*, 39: 117-124.
- 13) Rawson, P. D. and T. J. Hilbish (1995) Evolutionary relationships among male and female mitochondrial DNA lineages in *Mytilus edulis* species complex. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 893-901.
- 14) Stewart, D. T., C. Saavedra, R. R. Stanwood, A. O. Ball and E. Zouros (1995) Male and female mitochondrial DNA lineages in the blue mussel (*Mytilus edulis*) species group. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 735-747.
- 15) Fisher, C. and D. O. F. Skibinski (1990) Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus*. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 242: 149-156.
- 16) Quesada, H., D. A. G. Skibinski and D. O. F. Skibinski (1996) Sex-biased heteroplasmy and mitochondrial DNA inheritance in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Curr. Genet.*, 29: 423-426.
- 17) Saavedra, C., M. I. Reyero and E. Zouros (1997) Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics*, 145: 1073-1082.
- 18) Garrido-Ramos, M. A., D. T. Stewart, B. W. Sutherland and E. Zouros (1998) The distribution of male-transmitted and female-transmitted mitochondrial DNA types in somatic tissues of blue mussels: implications for the operation of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome*, 41: 818-824.
- 19) Wood, A. R., G. Turner, D. O. F. Skibinski and A. R. Beaumont (2003) Disruption of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA in hybrid mussels (*Mytilus edulis* × *M. galloprovincialis*). *Heredity*, 91: 354-360.
- 20) Reynier, P., P. May-Panloup, M-F. Chretien, C. J. Morgan, M. Jean, F. Savagner, P. Barriere and Y. Malthiery (2001) Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 7: 425-429.
- 21) Diez-Sanchez, C., E. Ruiz-Pesini, A. C. Lapena, J. Montoya, A. Perez-Martos, J. A. Enriquez and M. J. Lopez-Perez (2003) Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 68: 180-185.
- 22) Fabioux, C., A. Huvet, C. Lelong, R. Robert, S. Pouvreau, J. Y. Daniel, C. Minguant and M. L. Pennec (2004) Oyster *vasa*-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun., 320: 592–598.
- 23) Swartz S. Z., X. Y. Chan and J. D. Lambert (2008) Localization of *Vasa* mRNA during early cleavage of the snail *Ilyanassa*. *Dev. Genes Evol.*, 218: 107–113.
 - 24) Obata, M., C. Kamiya, K. Kawamura and A. Komaru (2006) Sperm mitochondrial DNA transmission to both male and female offspring in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Develop. Growth Differ.*, 48: 253–261.
 - 25) Obata, M., N. Sano, K. Kawamura and A. Komaru (2007) Inheritance of two M type mitochondrial DNA from sperm and unfertilized eggs to offspring in *Mytilus galloprovincialis*. *Develop. Growth Differ.*, 49: 335–344.
 - 26) Sano, N., M. Obata and A. Komaru (2007) Quantitation of the male and female types of mitochondrial DNA in blue mussel, *M. galloprovincialis*, using real-time PCR assay. *Develop. Growth Differ.*, 49: 67–72.
 - 27) Obata, M. and A. Komaru (2005) Specific location of sperm mitochondria in mussel, *Mytilus galloprovincialis* zygotes stained by MitoTracker. *Develop. Growth Differ.*, 47: 255–263.
 - 28) Sutherland, B., D. Stewart, E. R. Kenchington and E. Zouros (1998) The fate of paternal mitochondrial DNA in developing female mussels, *Mytilus edulis* : Implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics*, 148: 341–348.
 - 29) Cao, L., E. Kenchington and E. Zouros (2004) Differential segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Genetics*, 166: 883–894.
 - 30) Amikura, R., M. Kashikawa, A. Nakamura and S. Kobayashi (2001) Presence of mitochondria-type ribosome outside mitochondria in germ plasm of *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 9133–9138.
 - 31) Kobayashi, S. and M. Okada (1989) Restoration of pole-cell-forming ability to u.v.-irradiated *Drosophila* embryos by injection of mitochondrial lrRNA. *Development*, 107: 733–742.
 - 32) Iida, T. and S. Kobayashi (1998) Essential role of mitochondrially encoded large rRNA for germ-line formation in *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 11274–11278.
 - 33) Kobayashi, S., R. Amikura and M. Mukai (1998) Localization of mitochondrial large ribosomal RNA in germ plasm of *Xenopus* embryos. *Curr. Biol.*, 8: 1117–1120.
 - 34) Villegas, J., A. M. Zarraga, I. Muller, L. Montecinos, E. Werner, M. Brito, A. M. Meneses and L. O. Burzio (2000) A novel chimeric mitochondrial RNA localized in the nucleus of mouse sperm. *DNA Cell Biol.*, 19: 579–588.
 - 35) Villegas, J., P. Araya, E. Bustos-Obregon and L. O. Burzio (2002) Localization of the 16S mitochondrial rRNA in the nucleus of mammalian spermatogenic cells. *Mor. Hum. Reprod.*, 8: 977–983.

17 α -メチルテストステロンの単一浸漬及び短期間内での 複数回浸漬処理によるサクラマス雄性化

安藤大成・寺西哲夫・水野伸也・内藤一明・小出展久・新谷康二 (北海道立水産孵化場)

Effects of Single and Several-time Treatment with 17 α -methyltestosterone on Masculinization in Masu Salmon

Daisei ANDO, Tetsuo TERANISHI, Shinya MIZUNO, Kazuaki NAITO,
Nobuhisa KOIDE and Kouji ARAYA

Hokkaido Fish Hatchery, Kitakashiwagi 3-373, Eniwa, Hokkaido 061-1433, Japan

Abstract

This study is aimed to improve the rate of masculinization by 17 α -methyltestosterone (MT) in masu salmon *Oncorhynchus masou masou*. Single and several-time treatment with MT solution were performed to eyed eggs and newly hatched alvein of all-female population induced by fertilization between normal female and sex-reversed XX male. Single immersion for 2 hours were conducted at 15, 9, 3 days before hatching and 3 days after hatching at 1, 10, 100, and 1000 $\mu\text{g/l}$ with MT solution. Several-time treatment, three or six immersions for each 2 hours, were conducted during 10–22 days after hatching at 10, 100, and 1000 $\mu\text{g/l}$ with MT solution.

In the single immersion at the time of 15 and 9 days before hatching, no phenotypic males were observed. The rate of masculinization was 3.3 % in the immersion of 100 or 1000 $\mu\text{g/l}$ with MT solution around the time of hatching. However, histological samples showed the occurrence of intersex and sterile gonads by the treatments of higher doses. In the several-time treatment, masculinization rate in the six immersions (2.6 %) was lower than that of three immersions (11.9 %) at 1000 $\mu\text{g/l}$, although masculinization rate did not depend on number of immersion times. The highest rate of masculinization was 14.1 %, when repeating the MT immersions with 100 $\mu\text{g/l}$ three times.

These results indicate that masculinization of masu salmon is difficult by a single immersion treatment and it is necessary to repeat the immersion with MT solution for producing sex reversed genetic females. Moreover, treatment at high MT-dosage resulted in low rate of masculinization and brought about increase of the intersex or sterile gonads. In masu salmon, it is thought that the period of sexual undifferentiation lasts for a long term and susceptible period for MT depends on individuals.

(accepted July 21, 2007)

サクラマス *Oncorhynchus masou masou* の全雌生産には性転換雄 (偽雄) が必要とされる。この偽雄の作出には、合成ステロイドホルモンである17 α -メチルテストステロン (MT) が用いられてきた¹⁾。このホルモンは生体内に存在する雄性ホルモンよりも強い性転換効果を有し、サケ科魚類の雄性化に最も頻繁に使用されている^{2,3)}。本種においては、孵化直後から浮上

までの定期的な MT 溶液への浸漬と、その後60日間、添加飼料の経口投与が必要とされている¹⁾。この方法により、75–92%の高い雄性化率が得られる反面、処理期間が3ヶ月間以上もの長期にわたり、その処理過程は煩雑である。また、合成ステロイドホルモンの使用は最小限にするのが望ましく、環境へ与える負荷を最小限にするためにも、処理液が回収可能な浸漬だけ

連絡先：〒061-1433 北海道恵庭市北柏木町3丁目373 北海道立水産孵化場 安藤大成

Tel: 0123-32-2136 Fax: 0123-34-7233 E-mail: mydcb192@ybb.ne.jp

で性転換雄を作出する技術が望まれる。

同じサケ科魚類であるマスノスケ *O. tshawytscha*、ギンザケ *O. kisutch* では、MT 浸漬処理を孵化前後の時期に 1 回（単一浸漬）、もしくは 2 回だけ行うことにより高い雄性化率が報告されている^{4,5)}。サクラマスでも孵化後に MT 単一浸漬を行うことで性転換雄の出現が確認されているものの、雄性化率は最高でも 12.5% と他のサケ科魚類に比べて低い値となっている^{6,7)}。また、近年、ヒメマス *O. nerka* では発眼卵もしくは孵化時に MT 単一浸漬を行うことで 100% の雄性化率が報告されており⁸⁾、サクラマスでも発眼卵に MT 浸漬処理を 2 回反復して行うことで、対照区 (50.7%) よりも有意に高い雄性化率 (71.9–100%) が報告されている⁹⁾。このことは発眼卵での MT 浸漬処理は、孵化後の処理よりも簡便で効果的である可能性を示している。一方で、ギンザケでは卵期の MT 浸漬では雄性化が起こらなかったとの報告もあり⁵⁾、その効果は同じサケ属においても魚種によって異なっている。また、過去にサクラマスで行われた偽雄作出試験では、ほぼ同一の処理条件下においても安定した結果が得られておらず^{6,7,10)}、このような雄性化率の異なる原因として、用いた系群の違いや水質、水温といった飼育環境の違いによる可能性が指摘されている^{11,12)}。したがって、サクラマスの MT 単一浸漬もしくは短期間内の複数回の浸漬を反復する処理による雄性化率を把握するには、偽雄を必要とするそれぞれの系群を用い、過去に行われた試験と同一環境下で性転換率を確認する必要がある。

本報告は簡便なサクラマスの性転換手法を開発することを目的に、全雌サクラマスの発眼卵及び孵化直後の仔魚を用い、MT 単一浸漬と短期間内の複数回浸漬処理を行いその有効性を検討した。

材料と方法

単一浸漬処理

北海道立水産孵化場で養成した偽雄 3 尾から採精し、同孵化場で継代飼育されている池産系サクラマス（森在来系）¹³⁾ 29 尾から得た卵に媒精させることで全雌生産を行った。得られた卵の一部をアトキンス式孵化槽に収容し、積算水温 300°C（発眼時期）まで流水中で飼育した後、プラスチック製のバスケットに卵を収容し、計 20 群 (No.1–20) の試験区を作成した。以後、飼育には 30 l 円形水槽を用い、94–101 粒を各水槽に収容して試験終了まで個別に飼育した。また、試験区とは別に 300 粒を取り出し、同じ用水を用いて飼育を行い、孵化日 (50% 孵化) を推定するため孵化した尾数の計数を毎日行った。

MT (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 浸漬処理は、Goetzら¹⁴⁾ の手法を一部改変して行った。すなわち、あらかじめ MT を 99.5% のエタノールに溶解して希釈しておき、目的とする濃度となるように 5 l の水を入れたアクリル水槽に加えて攪拌した。全ての試験区でエタノールの濃度が 0.04% となるように調整し、対照区にはエタノールのみを同濃度になるように加えた。処理は発眼後から孵化直後にかけて、成長段階ごとに MT に対する感受性の変化を調べることを目的に、積算水温 344°C（受精 39 日後）、396°C（受精 45 日後）、447°C（受精 51 日後）、499°C（受精 57 日後）と 6 日間隔で計 4 回行った。MT の浸漬濃度は 1、10、100、1000 $\mu\text{g/l}$ の 4 濃度と対照区を設定し、1 回の処理で 5 群ずつを使用した。処理は弱い通気をしながら行い、浸漬時間は 2 時間とし、浸漬終了後は再度流水中に戻して飼育を継続した。飼育期間中の水温は 7.0–9.2°C（平均 8.1°C）であった。

MT 浸漬処理の翌日から剖検を行う前日まで、斃死した尾数を毎日記録した。また、浮上後（積算水温 850°C）より餌付けを開始し、餌付け前に体躯が湾曲している奇形魚を取り上げて計数し、以降の解析からは除外した。孵化後 166 日目に各群より 30 尾を取り上げ尾叉長、体重の測定をそれぞれ 0.1 cm、0.1 g 単位で行った後、剖検して生殖腺の形態から性比の確認を行った。

剖検で雄もしくは不明魚と判定された個体はブアン液で固定後、常法により生殖腺を 7 μm の組織切片とし、Delafield のヘマトキシリン及びエオシンでの二重染色を施し¹⁵⁾、組織学的に性を確認した。卵および精巢の発育段階は中村ら¹⁶⁾ 及び太田ら¹⁷⁾ に従った。

単一浸漬における生存率の差は Kaplan-Meier 法で浸漬処理の翌日から剖検時までの生存率を計算した後、ログランク検定で差の検出 ($p=0.05$) を行い、同じ積算水温で処理した 5 群内で、対照区と MT 処理区の生残率の比較をそれぞれ行った。

短期間内の複数回浸漬処理

北海道立水産孵化場で養成した偽雄から採精し、北海道立水産孵化場道南支場森試験池で継代飼育されている池産系サクラマス（森在来系）¹³⁾ から得られた卵に媒精させることで全雌生産を行った。得られた卵は流水中で飼育し、発眼後（積算水温約 300°C）にプラスチック製のバスケットに 300 粒ずつ収容し、計 7 群 (No.21–27) の試験区を作成した。以後、飼育には 60 l 水槽を用い、成長に伴い魚の飼育密度を低下させながら、いくつかの水槽に分散して一部が成熟するまで約 3 年間飼育した。飼育期間中の水温は 7.0–10.7°C

であった。

MT 浸漬は単一浸漬処理の場合と同様に行い、試験群は孵化後10、12、15日（積算水温573–618℃）に計3回浸漬する3回浸漬群（試験区No.22–24）と、孵化後10、12、15、17、19、22日（積算水温573–678℃）に計6回浸漬する6回浸漬群（試験区No.25–27）の2通りを設定した。MTの浸漬濃度は3回浸漬群、6回浸漬群ともに10、100、1000 $\mu\text{g/l}$ の3濃度とし、また、エタノールのみを添加する対照区（試験区No.21）を設定した。一回の浸漬時間は2時間とし、浸漬終了後、再度流水中に戻して飼育を継続した。

性比の判定は受精後1092日後に生残した個体を全て取り上げて剖検することにより行った。この際、一つの生殖腺内の一部に卵が見られ、他の一部分が精巣様構造になっている個体¹⁸⁾は間性とし、生殖腺の一方が卵巣で、他方が精巣様構造を示す個体も間性に含めて扱った。また、各群20尾について尾叉長と体重をそれぞれ0.1 cm、0.1 g単位で測定した。

MT 処理群で出現した雄の尾数について、浸漬処理濃度による違いを比較するため、同じ浸漬回数（No.22–24とNo.25–27）の処理群で出現した雌雄の尾数を

2×3のFisherの直接確率法で検定した（ $p=0.05$ ）。また、雄の出現率を比較するため、雄の出現率を逆正弦変換した後、2群間の差を多重比較法（Tukey type multiple comparison testing for probability）¹⁹⁾で検定した（ $p=0.05$ ）。

結 果

単一浸漬処理

単一浸漬処理で用いた卵は受精後54日目、積算水温473℃で50%以上が孵化した。したがって、MT 浸漬処理は孵化日の15日前、9日前、3日前、3日後に行われたことになる。剖検時における各群の平均体サイズは尾叉長5.2–6.2 cm、体重7.9–8.4 gの範囲であった（Table 1）。MT 処理後の生残率は80.2–98.0%で、おおむね良好であったが、孵化15日前に行われたMT 浸漬区（No.2–5）ではいずれの処理濃度でも、対照区より有意に生残率が低くなっていた。また、孵化3日前の1 $\mu\text{g/l}$ （No.12）、孵化3日後の1000 $\mu\text{g/l}$ 処理区（No.20）でも対照区に比べ有意に生残率が低かった（Table 1）。

生殖腺の組織学的観察から、対照区の雌では周辺

Table 1. Effects of a single 2-hour immersion with 17 α -methyltestosterone on survival and gonadal differentiation of masu salmon

Group	Days before (B), or after (A) hatching	Hormonal treatment ¹ Dosage ($\mu\text{g/l}$)	Number of individuals in initial treatment	Number of died fish after treatment until sampling (survival rate) ²	Mean \pm SE ³		Gonadal morphology (%) ⁴			
					Fork length (cm)	Body weight (g)	Female	Male	Intersex	Sterile
No. 1	15 B	Control (ethanol)	98	6 (93.9)	5.4 \pm 0.18	8.0 \pm 0.09	100			
No. 2	15 B	1	94	14 (85.1) ^a	5.7 \pm 0.17	8.2 \pm 0.08	100			
No. 3	15 B	10	100	16 (84.0) ^a	5.4 \pm 0.17	8.0 \pm 0.09	100			
No. 4	15 B	100	99	15 (84.9) ^a	5.7 \pm 0.22	8.2 \pm 0.09	100			
No. 5	15 B	1000	101	20 (80.2) ^b	5.4 \pm 0.16	8.0 \pm 0.08	86.7		3.3	10.0
No. 6	9 B	Control (ethanol)	99	11 (88.9)	5.2 \pm 0.16	8.0 \pm 0.08	100			
No. 7	9 B	1	101	16 (84.2)	5.8 \pm 0.21	8.2 \pm 0.10	100			
No. 8	9 B	10	99	8 (91.9)	5.2 \pm 0.23	8.0 \pm 0.11	100			
No. 9	9 B	100	98	10 (89.8)	5.6 \pm 0.17	8.2 \pm 0.07	96.7		3.3	
No.10	9 B	1000	95	11 (88.4)	5.9 \pm 0.21	8.3 \pm 0.09	93.3		6.7	
No.11	3 B	Control (ethanol)	99	2 (98.0)	5.8 \pm 0.21	8.3 \pm 0.10	100			
No.12	3 B	1	99	9 (90.9) ^a	5.8 \pm 0.20	8.2 \pm 0.10	100			
No.13	3 B	10	101	7 (93.1)	5.3 \pm 0.16	8.1 \pm 0.07	100			
No.14	3 B	100	100	6 (94.0)	5.3 \pm 0.18	8.0 \pm 0.09	96.7		3.3	
No.15	3 B	1000	100	4 (96.0)	5.6 \pm 0.16	8.2 \pm 0.08	80.1	3.3	13.3	3.3
No.16	3 A	Control (ethanol)	98	2 (98.0)	5.3 \pm 0.13	8.1 \pm 0.08	100			
No.17	3 A	1	99	6 (93.9)	5.9 \pm 0.22	8.3 \pm 0.10	100			
No.18	3 A	10	98	6 (93.9)	5.6 \pm 0.19	8.1 \pm 0.10	100			
No.19	3 A	100	100	5 (95.0)	6.2 \pm 0.20	8.4 \pm 0.09	96.7	3.3		
No.20	3 A	1000	99	11 (88.9) ^a	5.6 \pm 0.24	7.9 \pm 0.12	50.0	3.3	30.0	16.7

¹Each immersion was 2-hour in duration.

²Significance in difference from survival rate of control (log rank test). Deformed fish judged from the appearance at the time of emergence were excluded from analysis.

a, $p < 0.05$

b, $p < 0.01$

³Fork length and body weight were measured on the 166th day after hatching.

⁴Thirty fish were randomly sampled and dissected in each group.

仁期の卵母細胞が多数確認された (Fig. 1-1)。これに対し、MT処理区では、卵母細胞がごくわずかにしか存在しないか、もしくは全く存在しない個体が見られた。これら生殖腺を外部形態及び生殖細胞の発達状態から、以下の4タイプに分類した。すなわち、1) 雌；周辺仁期の卵母細胞をもつもの (Fig. 1-1)、2) 雄；精原細胞が集合して多数の包囊を形成すると共に、血管を取り巻く輸精管原基の存在が見られるもの (Fig. 1-2)、3) 間性；1つの生殖腺内に卵母細胞と包囊も

しくは卵母細胞と血管を取り巻く輸精管原基の両方が存在しているもの (Fig. 1-3、-4、-5)、4) 不妊；生殖腺が著しく小さく、明瞭な生殖細胞が認められないもの (Fig. 1-6) である。

この基準に従い、生殖腺を分類したところ、孵化3日前の1000 μ g/l処理区 (No.15)、孵化3日後の100 μ g/l処理区 (No.19) 及び1000 μ g/l処理区 (No.20) で1尾 (3.3%) ずつ雄の出現が確認されたものの、孵化前にMT処理した群では雄の出現は見られなかつ

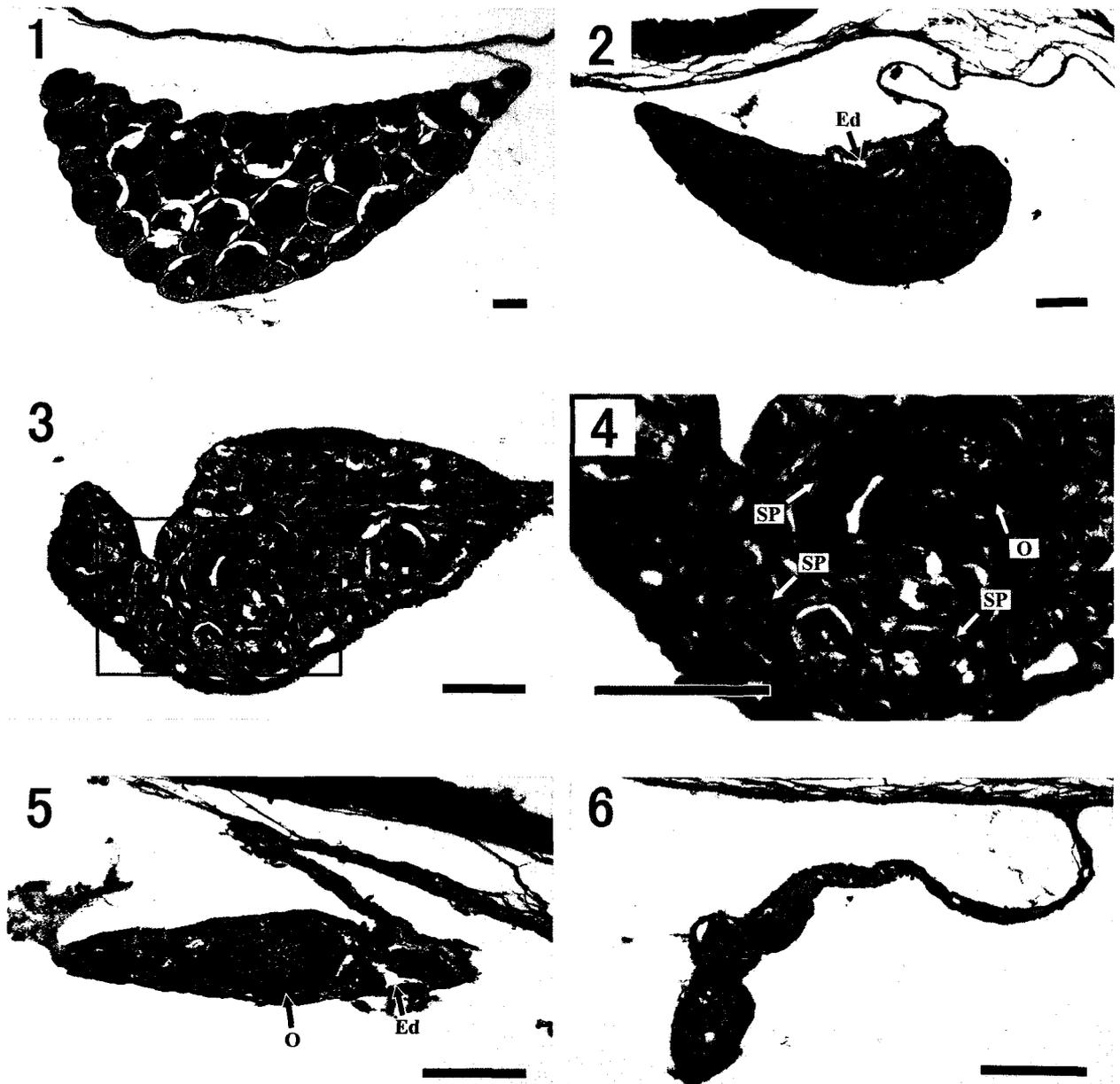


Fig. 1. Sections of gonads in masu salmon juveniles at 166 days after hatching. 1, Ovary, consisted of perinuclear oocytes, in control female. 2, Testis of 17α -methyltestosterone treated fish. Efferent duct (Ed) is observed. 3 and 4, Intersex of 17α -methyltestosterone treated fish. Oocyte (O) and spermatogonia (SP) in the cyst are observed in a gonad. 5, Intersex. Oocyte (O) and efferent duct (Ed) are observed in a gonad. 6, Sterile gonad. Gonads are generally small and consisted of the connective tissue. Scale bars indicate 50 μ m.

た。また、高濃度の1000 $\mu\text{g/l}$ 処理区ではどの発生段階の処理区でも間性が3.3–30.0%出現していたが、1 $\mu\text{g/l}$ 、10 $\mu\text{g/l}$ の処理区では間性の出現は見られなかった。生殖細胞が見られない不妊個体は孵化15日前の1000 $\mu\text{g/l}$ 処理区で10%、孵化3日後の1000 $\mu\text{g/l}$ 処理区で16.7%と高い出現率であったが、100 $\mu\text{g/l}$ 以下の処理濃度では出現しなかった (Table 1)。

短期間内での複数回浸漬処理

短期間内での複数回浸漬処理では3年間の飼育の後、生残した個体35–77尾を剖検した。この時の平均体サイズは尾叉長で20.1–23.8 cm、体重で74.4–143.4 gであった。10 $\mu\text{g/l}$ 処理では3回浸漬で5.6% (No.22)、6回浸漬で5.7% (No.25)、100 $\mu\text{g/l}$ 処理では3回浸漬で14.1% (No.23)、6回浸漬で11.4% (No.26) の雄が出現しており、同濃度の浸漬処理では浸漬回数の違いに関わらず、ほぼ同様の雄性化率が観察された。しかし、1000 $\mu\text{g/l}$ 処理では3回浸漬で11.9% (No.24) の雄性化率が得られたのに対し、6回浸漬では2.6% (No.27) の雄性化率を示し、6回浸漬の方が雄性化率は低かった。しかし、処理群間どうしの比較では、雄性化率が有意に高かった群は見られず、また、同じ浸漬回数ではMT処理濃度が10–1000 $\mu\text{g/l}$ と異なっても、雄性化率に有意差は見られなかった (3回浸漬区のNo.22–24; $p=0.20$ 、6回浸漬区の

No.25–27; $p=0.17$)。雄の出現率を対照区と比較すると100 $\mu\text{g/l}$ 及び1000 $\mu\text{g/l}$ の3回処理、100 $\mu\text{g/l}$ の6回処理区においてのみ有意に雄の出現率が高かったと判断された。また、同じ浸漬回数では有意差は見られなかったものの、3回浸漬及び6回浸漬ともに100 $\mu\text{g/l}$ 処理区が最も高い雄性化率を示す傾向にあった (Fig. 2)。間性の出現率は0–3.4%であり、単一浸漬処理に比べると低い割合であった。

考 察

本試験ではサクラマスが発眼時期から孵化直後の異なる発育段階においてMT単一浸漬処理を行ったが、得られた雄性化率は最高値でも100 $\mu\text{g/l}$ 及び1000 $\mu\text{g/l}$ の3.3%と低い値であった。また、孵化9–15日前の発眼期におけるMT浸漬処理では間性や不妊個体の出現は認められたが、雄の出現は確認できなかった。過去に行われた単一浸漬処理によるサクラマスの雄性化試験では、孵化直後及び孵化1週間後までのMT浸漬処理で1.8–12.3%の雄性化率が確認されているものの、孵化2週間目以降には雄性化は確認されておらず⁷⁾、本試験から得られた結果と併せると、サクラマスのMT単一浸漬による雄性化の感受期は孵化直後から孵化1週間までの間にあると考えられる。また、過去の単一浸漬試験では孵化直後における1000 $\mu\text{g/l}$ の処理において、生殖腺の外部形態からの

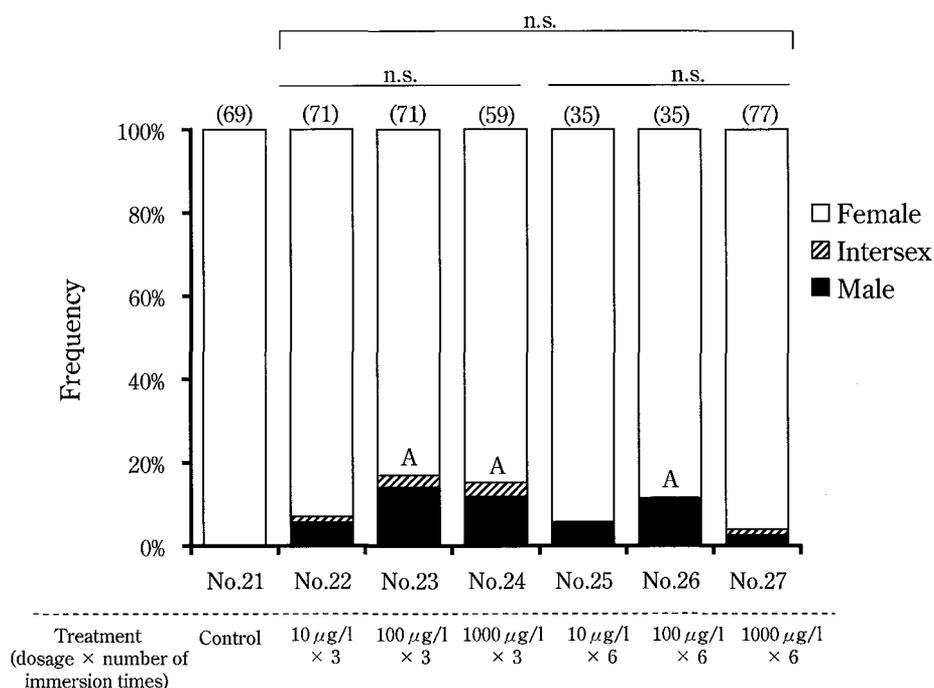


Fig. 2. Effect of several-time treatment with 17 α -methyltestosterone solution on the gonadal differentiation in masu salmon based on autopsy at 3 years olds. Gonads were classified into three types, female, male, and intersex. The figures in the parentheses on the bar denote the number of dissected fish. Alphabetical "A" in the bar shows the significance in difference from masculinization rate from control group ($p < 0.05$).

判定で12.3%の雄性化率が確認されているが⁷⁾、本試験では3.3%の出現率に留まり、過去の報告よりも低い値であった。

中村ら¹⁶⁾はサクラマス¹⁶⁾の生殖腺の組織学的観察を詳細に行い、生殖腺の卵巣および精巣への形態的分化は孵化後4-5週目から起こることを報告し、合成ステロイドホルモン投与による機能的性転換を図るには、孵化後5週目を中心に行うことが適当であると推定している。しかし、本試験で得られた結果と過去に行われた試験結果より、サクラマスのMT単一浸漬処理による雄性化は孵化直後のきわめて限られた時期にのみ可能であり、形態的に性分化が認められる前に生理的な性分化が起こっている可能性が示唆された。

MT浸漬による生残率は、孵化15日前の試験群で対照区より有意に低くなっていた (Table 1)。一般に合成ステロイドホルモンで処理した魚の生残率は低くなり、雄ヘテロ型の種において遺伝的雌 (XX 雌) の雄性化を行った場合には性転換させた雄 (XX 雄) の死亡率が高くなることが報告されている³⁾。また、過去に行われたサクラマスのMT浸漬でも高濃度処理区ほど生残率が低かったことが報告されている²⁰⁾。本試験では孵化15日前のMT浸漬で全体的に高い斃死率が見られ、孵化15日前及び孵化3日後の1000 μ g/l処理区で特に高い斃死率が認められた。孵化15日前の積算水温は344 $^{\circ}$ C (発眼卵) であり、移動等による物理的な衝撃による死亡とは考えにくく、MTによる影響が考えられた。また、1000 μ g/lの浸漬処理で斃死率が高く、間性や不妊個体が多く出現していることから高濃度MT処理の悪影響と考えられた。

一方、短期間内に複数回の浸漬を反復した区では、孵化10日目からの処理開始でも3回浸漬区で5.6-14.1%、6回浸漬区でも2.6-11.4%の雄性化率が得られた。このことは、サクラマスのMTによる性転換は、単一浸漬処理では限られた時期にしか起こらないものの、処理を反復することで、孵化10日目以降でも雄性化が可能であることを示している。しかし、有意差はなかったものの1000 μ g/lの高濃度処理では3回浸漬で11.9%、6回浸漬では2.6%の雄性化率が得られ、6回浸漬の方が低い雄性化率を示した。土屋²¹⁾はサクラマスの雌性発生魚を用いて孵化直後からMT溶解液への定期的浸漬とMTの経口投与による雄性化試験を行い、10 μ g/lの低濃度の場合は22.9%の雄性化率が得られたものの、1000 μ g/lの高濃度では雄が出現しなかったことを報告している。高濃度もしくは長期間のMT浸漬処理もしくは経口投与により、雌の比率が逆に高くなることは多くの魚種で知られており²²⁻²⁸⁾、この原因として高濃度の雄性ホルモンが生

体内で芳香化されて雌性ホルモンへ転換するためと考えられている^{24,28)}。また、10 μ g/l、100 μ g/lの濃度では3回浸漬、6回浸漬ともに雄性化率に大きな差がなかったことから、今回、使用した1000 μ g/lの6回浸漬は過度の処理であった可能性が考えられた。

サケ科魚類に属するマスノスケやヒメマスの全雌魚では発眼卵や孵化直後の仔魚へMT単一浸漬もしくは2回の反復浸漬処理を行うことで、82-100%の高い雄性化率が得られることが報告されている^{4,8)}。一方、サクラマスの場合、本試験で得られた雄性化率は最高でも14%、他機関で行われたMT単一浸漬処理でも雄性化率は12%程度であり、他のサケ科魚類と比較して低い値に留まっている⁶⁾。しかし、浸漬処理を継続し、MTの経口投与を併用することで100%の雄性化も可能である⁶⁾。したがって、サクラマスの場合、単一浸漬や短期間内での複数回浸漬処理のみで高い雄性化率を得ることは難しいと考えられた。同様な現象はアマゴ *O. masou ishikawae* でも観察されており、単一浸漬では10-55%であった雄性化率が、浸漬処理を継続しMT経口投与を併用することで100%に達することが報告されている^{29,30)}。これらのことから、アマゴではMTに対する感受期が個体によって少しずつ異なっており、全ての個体の感受期をカバーできる長期処理によってのみ高い雄性化率が得られたと考えられている³⁰⁾。サクラマスでもMTに対する感受期は個体もしくは系群によって異なることが考えられ、卵期におけるMTの反復浸漬処理による高い雄性化率や孵化21-25日後におけるMT単一浸漬処理でも性転換が起こる例も報告されている^{6,9)}。

性転換を行うためには合成ステロイドホルモンの投与を性的未分化期から開始し、性分化が終了するまで継続する必要がある²⁾。サクラマスの性的未分化期は卵黄吸収時期にあると考えられているが²⁸⁾、MTに対する感受期は系群差の他に個体差も大きいことが考えられ、単一浸漬処理のみで高い雄性化率を導くのは難しく、浸漬処理の反復が必要であろう。サクラマスの全雌魚を用いて、孵化直後から浮上2ヶ月後まで週1回の頻度で100 μ g/lのMT浸漬処理を行った場合 (15回の反復浸漬)、44.7%の雄性化率が得られたことが報告されているが⁷⁾、より簡便な性転換技術を確立するためには浸漬処理回数を3回程度に抑えるのが妥当と考えられる⁶⁾。本試験で得られた短期浸漬処理の結果より、100 μ g/lの3回浸漬で14%の雄性化率が得られているものの、さらに高い雄性化率を得るには浸漬濃度や処理間隔の検討が必要と考えられた。

要 約

全雌サクラマスが発眼卵と孵化後の仔魚を 17α -メチルテストステロン (MT) 溶解液へ浸漬することで性転換 (雄性化) 率を調べた。処理は1回の浸漬のみを行う単一浸漬処理と短期間内での複数回浸漬処理を行い、両者の有効性を検討した。単一浸漬処理は孵化15日前、9日前、3日前と孵化3日後の4時期にかけて1、10、100、1000 $\mu\text{g/l}$ の濃度の MT 溶解液に2時間の浸漬をすることで行った。また、短期間内での複数回浸漬処理は孵化10日から22日後にかけて10、100、1000 $\mu\text{g/l}$ の MT 溶解液に3回もしくは6回の浸漬をすることでを行い、1回あたりの浸漬時間は2時間とした。

単一浸漬処理では孵化15日前及び9日前の処理では雄の出現は見られず、孵化3日前と3日後の100 $\mu\text{g/l}$ もしくは1000 $\mu\text{g/l}$ 処理で3.3%の雄性化率が見られた。また、1000 $\mu\text{g/l}$ 処理では間性や不妊個体が高い率で出現した。短期間内での複数回浸漬処理では

10 $\mu\text{g/l}$ と100 $\mu\text{g/l}$ では3回浸漬と6回浸漬で雄性化率は大きく変わらなかったが、1000 $\mu\text{g/l}$ 処理では3回浸漬の雄性化率が11.9%なのに対し、6回浸漬の雄性化率は2.6%であり低くなっていた。最も高い雄性化率は100 $\mu\text{g/l}$ の3回浸漬で14.1%であった。

以上のことより、サクラマスの雄性化は単一浸漬処理では難しく、浸漬処理を定期的に継続する必要があると考えられ、他のサケ科魚類に比べて煩雑な生産過程を要することが明らかとなった。また、孵化前後の MT 処理で雄性化が認められる一方、孵化10日目以降の浸漬処理でも雄性化が認められたことは、サクラマスの性的未分化時期は個体差が大きく長期間にわたることが示唆された。

謝 辞

本研究を取りまとめるにあたり、北海道立水産孵化場の佐々木典子氏、真野修一氏に貴重なご助言を頂くとともに、文献の貸与を賜りました。また、川村義信氏、西村典幸氏には試験魚の飼育管理にご尽力頂きました。各氏に深く感謝するとともに心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) 北海道立水産孵化場 (1985) サケ科魚類の生物工学応用試験. 昭和58年度北海道立水産孵化場事業成績書, pp.190-193.
- 2) Yamamoto, T. (1969) Sex differentiation, pp. 117-175, in "Fish Physiology III", eds. by W. S. Hoar and D. J. Randall, Academic Press, New York.
- 3) Pandian, T. J. and S. G. Sheela (1995) Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, 138: 1-22.
- 4) Baker, I. J., I. I. Solar and E. M. Donaldson (1988) Masculinization of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion treatments using 17α -methyltestosterone around the time of hatching. *Aquaculture*, 72: 359-367.
- 5) Piferrer, F. and E. M. Donaldson (1989) Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture*, 77: 251-262.
- 6) 小池利通・中村 将 (1992) ヤマメ性転換試験-Ⅲ, メチルテストステロンの一回浸漬処理による雄化. 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, 18: 31-37.
- 7) 北海道立水産孵化場 (2005) 新しい性誘導方法の開発. 平成15年度北海道立水産孵化場事業成績書, pp.157.
- 8) Kudo, H. and M. Oomori (2004) Effect of a single treatment of 17α -methyltestosterone for masculinization in kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Suisanzoshoku*, 52: 301-302.
- 9) Park, I. S., H. B. Kim, H. T. Huh and S. C. Kim (1993) Masculinization of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) by treatments of 17α -methyltestosterone. *Ocean Research*, 15: 29-36. (in Korean with English abstract)
- 10) 小池利通 (1990) ヤマメ性転換試験-Ⅱ. 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, 16: 89-92.
- 11) Nagy, A., M. Bercsényi and V. Csányi (1981) Sex reversal in carp (*Cyprinus carpio*) by oral administration of methyltestosterone. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 725-728.
- 12) 宮崎統五・大津 順 (1990) 全雌サクラマスのメチルテストステロン投与による機能的性転換雄作出について. 富山県水産試験場研究報告, 2: 19-26.
- 13) 新谷康二 (1982) 池中養殖サクラマスによる種卵生産事業の現況. *魚と水*, 20: 1-7.

- 14) Goetz, F. W., E. M. Donaldson, G. A. Hunter and H. M. Dye (1979) Effects of estradiol-17 β - and 17 α -methyltestosterone on gonadal differentiation in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, 17: 267-278.
- 15) Humason, G. L. (1962) "Animal tissue techniques" W. H. Freeman and Company, San Francisco, pp. 468.
- 16) 中村 将・高橋裕哉・広井 修 (1974) サクラマス (*Oncorhynchus masou*) の生殖腺の性分化過程. 北海道さけ・ます孵化場研究報告, 28: 1-8.
- 17) 太田 勲・山本喜一郎・高野和則・坂口任一 (1965) ニジマスの成熟に関する研究-Ⅱ, 1年魚の精巢の発達について. 日水誌, 31: 597-605.
- 18) Johnstone, R., T. H. Simpson and A. F. Walker (1979) Sex reversal in salmonid culture part III. The production and performance of all-female populations of brook trout. *Aquaculture*, 18: 241-252.
- 19) Zar, J. H. (1999) "Biostatistical analysis", 4th edn, Prentice Hall, New Jersey, pp.663.
- 20) 金澤宏重・原子 保 (1985) 雌性化によるスモルトの生産率の向上. 昭和58年度「近海漁業資源の家魚化システムの開発に関する総合研究」(マリーナランディング計画) プロGRESS・レポート サクラマス, 4: 44-47.
- 21) 土屋文人 (1986) ヤマメ性転換試験. 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, 13: 29-36.
- 22) 岡田鳳二 (1985) ニジマスの人為的性統御に関する研究. 北海道立水産孵化場研究報告, 40: 1-49.
- 23) Piferrer, F., I. J. Baker and E. M. Donaldson (1993) Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 91: 59-65.
- 24) 山本栄一 (1995) ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究. 鳥取県水産試験場報告, 34: 1-145.
- 25) Fujioka, Y. (2002) Effects of hormone treatments and temperature on sex-reversal of Nigorobuna *Carassius carassius grandoculis*. *Fish. Sci.*, 68: 889-893.
- 26) 須藤篤史・長谷川新・千田康司・佐伯光広・藤原 健 (2002) 宮城県におけるギンザケのバイオテク研究の歩み. 宮城県水産研究報告, 2: 45-58.
- 27) Nakamura, M. (1975) Dosage-dependent changes in the effect of oral administration of methyltestosterone on gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 26: 99-108.
- 28) 山崎文雄 (1989) 性の分化とその制御. pp. 141-165. 「水族繁殖学」, 高島史夫・羽生功編, 緑書房, 東京.
- 29) 白田 博 (1989) アマゴの全雌生産とその特性. 水産育種, 14: 11-22.
- 30) Nakamura, M. (1994) A study of susceptibility of sex reversal after a single 2-hour treatment of androgen in amago salmon. *Fish. Sci.*, 60: 483-484.

アユの天然遡上集団と遺伝的背景を共有する人工池中養成および 河川放流集団の血液性状の比較研究

中嶋正道・高木秀蔵（東北大・院農）・細川秀毅（高知大・農）・
谷口順彦（福山大学・内生資研）

The Comparison of Blood Characters in Ayu growing in Different Environmental Conditions

Masamichi NAKAJIMA^{*1}, Shyuzou TAKAGI^{*1}, Hidetsuyo HOSOKAWA^{*2}
and Nobuhiko TANIGUCHI^{*3}

^{*1} Laboratory of Population Genetic Informatics, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

^{*2} Fish Nutrition Laboratory, Faculty of Agriculture, Kochi University

^{*3} The Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University

Abstract

Blood characteristics, such as the number of red blood cells and hemoglobin concentration, were examined and compared in three genetically related Ayu populations living in natural (wild), cultured, and released conditions, respectively. The study aimed to identify the effect of living conditions between cultured and natural populations. Four of the seven characteristics examined, RBC, HGB, MCH and MCHC, indicated significant differences among the populations. In the released population, which had spent more than three months under natural conditions, there was a wide range of blood characteristics. Some individuals had characteristics that were similar to cultured Ayu and others were similar to wild Ayu. These results suggest that some individuals do not adapt to wild conditions even though they had spent more than three months under natural (released) conditions. Some blood characteristics probably influence the behavior of Ayu released in natural rivers. To obtain individuals that will show behavior similar to wild Ayu after release, a technological method that will improve blood characteristics is required.

(accepted July 8, 2008)

アユは河川漁業や淡水養殖における重要対象種であり、日本各地で放流および養殖用として種苗生産が実施されている。河川放流事業においては、長年にわたり琵琶湖産種苗が全国の河川に放流されてきたが、このアユは一代限りの生産に寄与するものの、次世代の増殖に寄与しないことが解明されている¹⁻³⁾。このため、近年、遺伝資源の保全を考慮して、天然遡上の海産系アユを養成し、十分な数量の親魚を使用して、地場産アユと遺伝的に同質の人工種苗を生産することが試みられるようになってきている。これらの海産系人工種苗は遺伝的多様性においては地場産アユと同質である

ことが確認されていても、習性面では放流後群れを形成する傾向が強く、縄張り形成能が天然アユと比べてやや弱いと言われている^{4,5)}。このような性質は遊漁用種苗としては望ましくないため、このような性質を有する原因を明らかにすると共に、より天然に近い人工種苗技術の開発手法の確立が求められている。

アユの行動特性に生息環境、飼育条件がどのような影響を与えるか明らかにすることは、より天然に近い人工種苗生産技術の開発のために重要な問題である。この問題に関してはクローンギンブナの個体やシステムを利用した研究が進められ、様々なストレスや生息環境

条件が血液性状に影響を及ぼすことが、実験条件下で確認されている⁶⁾。赤血球数やヘモグロビン濃度等の血液性状は、魚類の運動能力と密接に関連した形質である。したがって、アユ等の人工種苗においても飼育や生育環境が血液性状に影響を与え、ひいては行動特性が変化することが予想される。

天然アユ群、人工種苗群、人工種苗群を河川に放流した群は遺伝的背景を同一にした生息環境の異なるタイプの集団である。すなわち、これらのアユ集団は、生息環境が血液性状に与える影響を比較する上で都合の良い実験材料となりうる。そこで本研究では天然アユと放流アユとの間で見られる行動特性の差異の要因を明らかにすることを目的とし、遺伝的背景を共有する三つの集団として高知県の物部川天然遡上集団、土佐湾親魚由来の人工種苗養成集団、人工種苗河川放流再捕集団のアユ標本を採集し、それらの血液性状の比較を行った。

材料と方法

それぞれのサンプルの由来を示す関係を図1に示す。材料として、(1)天然遡上のアユ成魚（以下「天然遡上」と表記）、(2)人工採苗アユの成魚（以下「人工池中」と表記）、(3)同人工種苗の放流地点での再捕魚（以下「人工放流」と表記）を用いた。(1)の天然魚は、高知県の物部川の下流域で友釣りにより採捕された天然遡上魚である。(2)の人工採苗成魚は高知県の内水面漁業センターで土佐湾（物部川河口域）を起源とし、天然魚を養成した親魚から採苗し、育成された成魚である。(3)の人工種苗の再捕魚は、種苗が放流された物部川上流域で友釣りにより再捕された。この人工放流は4月に物部川上流域へ放流されている。

サンプルの採集地点である物部川上流と天然遡上魚採捕地点との間にはダムがあり、天然遡上の個体が人工放流と混合することはない。したがって、(3)のサンプルは自然環境化で約3ヶ月経過した後、再捕された個体と考えられる。これらの標本の採捕日は、いずれも2004年7月である。

高知県内水面漁業センターの人工池中については、土佐湾域を起源とする天然種苗を養成した親魚から採苗したものである。また、本研究で用いた3種類のアユ成魚は、生育環境や生育履歴の差異はあるが物部川とその河口域を起源としているので、遺伝的には差は無いと考えられる。

採集後それぞれの個体の尾部静脈よりヘパリン処理したシリンジを用い採血し、採血後直ちに血液性状を測定した。血液性状の測定にはニコン・コーデン社のセルタクス α を用いた。血液性状として赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HTC)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数(PLT)の7形質を用いた。各採集水域間での血液性状の差異は分散分析法を用いて検定した。また、分散が水域間で等しくない場合はクラスカル・ワーリス検定を用いた。多重比較にはボンフェローニの方法を用いた⁷⁾。採集水域におけるそれぞれの個体の特性を比較するために因子分析を行った。

結 果

各採集地における血液性状の測定値を表1に示す。血液性状を示す7形質のうちRBC、HGB、MCH、MCHCの4形質において採集水域間で有意差が観察された。RBCでは天然遡上最も高い値(465.2×

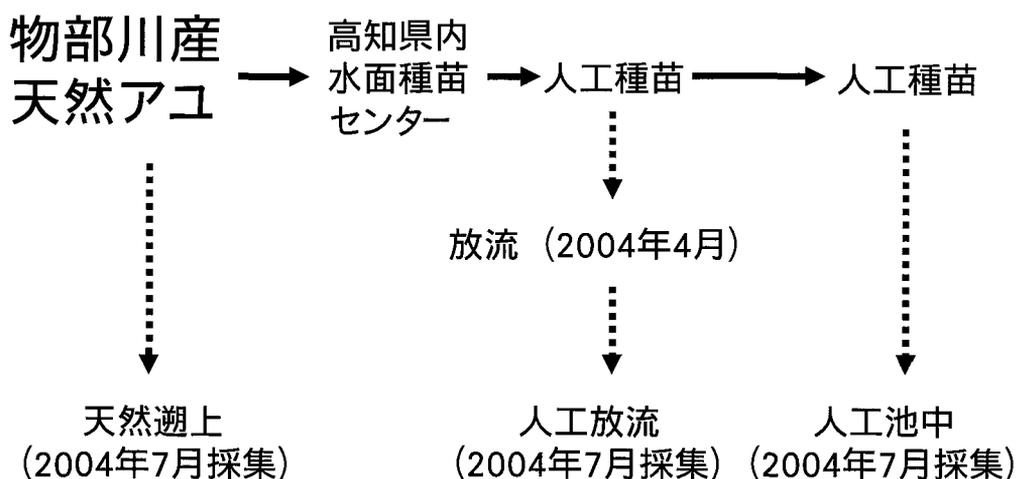


図1 サンプルとして用いたアユの相互関係

$10^6 \text{ cells}/\mu\text{L}$) を示し、人工放流 ($412.7 \times 10^6 \text{ cells}/\mu\text{L}$) や人工池中 ($425.1 \times 10^6 \text{ cells}/\mu\text{L}$) と比較し有意に高い値を示した (図2)。人工放流と人工池中間では有意な差は観察されなかった。HGB では人工放流、天然遡上、人工池中のそれぞれの間で有意差が観察された。天然遡上が最も高い値 (18.1 g/dL) を示し、次いで人工放流 (16.4 g/dL)、人工池中 (14.7 g/dL) であった (図2)。MCH では人工池中が最も低い値 (34.6 pg) を示し、人工放流 (39.8 pg) と天然遡上 (39.1 pg) との間に有意差を示した。人工放流と天然遡上との間に有意差は観察されなかった。MCHC では MCH と同様に人工池中が最も低い値 ($37.3 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{L}$) を示し、人工放流 ($43.0 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{L}$) と天然遡上 ($44.6 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{L}$) との間に有意差を示した。人工放流と天然遡上との間に有意差は観察されなかった。全体的に、人工池中が低い値を示し、天

然遡上が高い値を示す傾向を示した。人工放流は天然遡上に対して近い値を示す場合 (MCH、MCHC) と人工池中に近い値を示す場合 (RBC)、両者の中間の値を示す場合 (HGB) とに分かれた。

血液性状を示す7形質 (RBC、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC、PLT) を用いて因子分析を行いそれぞれの採集地域の個体がどのような特性を示しているかをそれぞれの個体の因子得点を因子 No.1 と因子 No.2 の散布図上に表した (図3)。因子 No.1 は主に MCH と MCHC で構成され因子負荷量は39.7%であった。因子 No.2 は主に RBC と HGB で構成され、因子負荷量は31.3%であった。これら因子 No.1 と No.2 で因子負荷量の71.0%を占めた。採集水域ごとの個体の分布を見ると、天然遡上と人工池中が明確に区別されるのに対して、人工放流では天然遡上と同様の特性を示す個体から人工池中と同様の特性を示す個体まで両

表1 物部川産アユにおける採集水域間での血液性状の比較

採集水域	個体数	RBC $\times 10^6 \text{ cells}/\mu\text{L}$	HGB g/dL	HCT %	MCV μm^3	MCH pg	MCHC %	PLT $\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{L}$
人工放流	12	$412.7 \pm 36.3a$	$16.4 \pm 1.5b$	38.2 ± 3.1	92.7 ± 3.8	$39.8 \pm 2.1b$	$43.0 \pm 2.1b$	5.6 ± 3.8
天然遡上	13	$465.2 \pm 44.3b$	$18.1 \pm 1.4c$	40.7 ± 3.4	87.7 ± 4.1	$39.1 \pm 2.0b$	$44.6 \pm 1.8b$	7.4 ± 3.4
人工池中	14	$425.1 \pm 32.4a$	$14.7 \pm 1.3a$	39.9 ± 5.4	93.6 ± 10.1	$34.6 \pm 1.4a$	$37.3 \pm 3.9a$	5.9 ± 2.6
		*	*			*	*	

* 集団間で危険率5%で有意差が観察された形質。

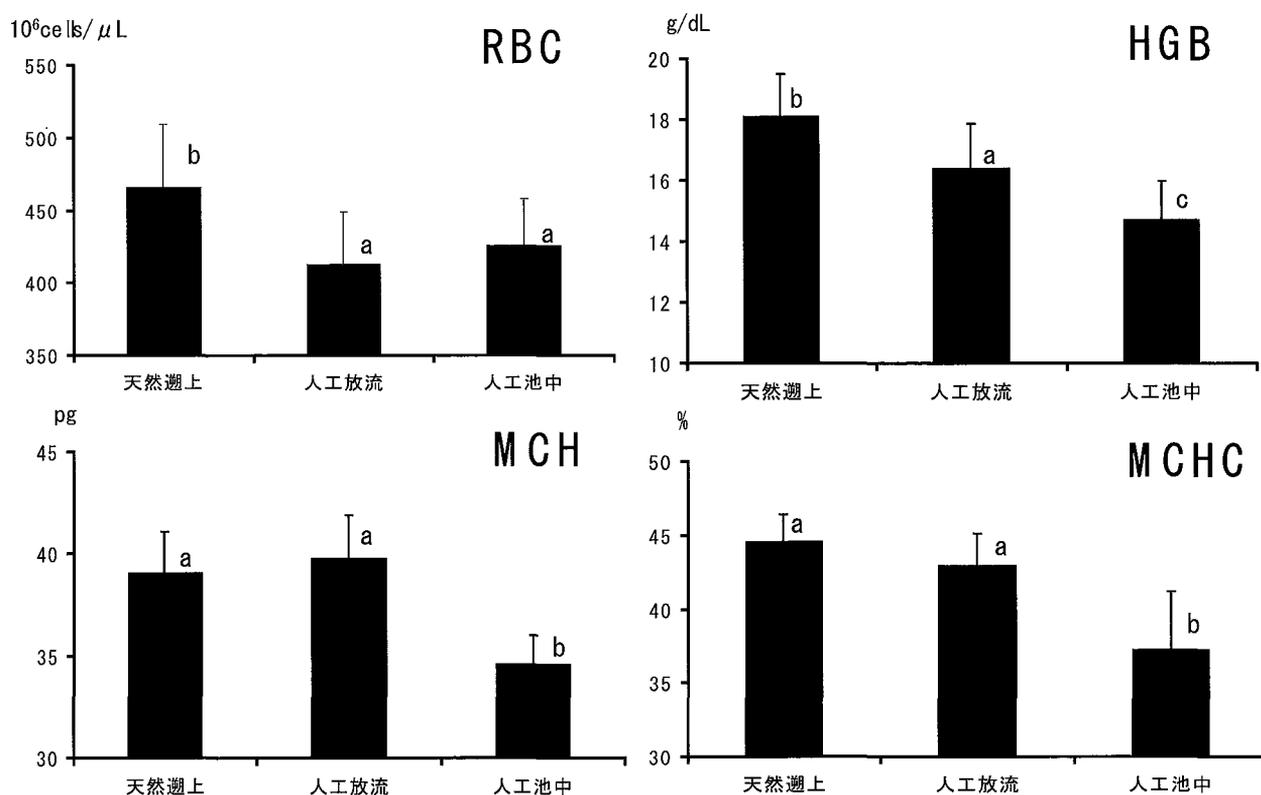


図2 各形質の異なる生息環境間での血液性状比較 a、b、cは危険率5%での有意差を示す

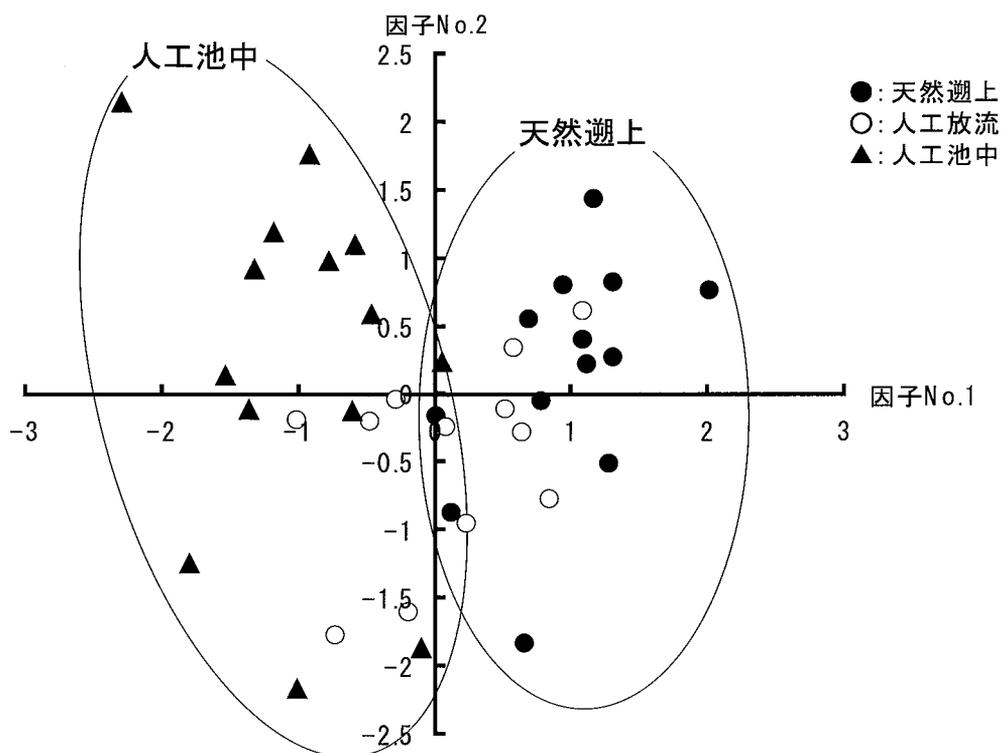


図3 因子得点による各個体の分布

方に広く分布していた。

以上の結果は、天然水域で3ヶ月の生活により天然と同様の血液性状になる個体と、人工池中の特性を維持している個体が放流された個体に混在していることを示している。

考 察

天然遡上と人工池中との間に明確な血液性状の差異が観察された。一部の魚種では赤血球数などに雌雄差が報告されているが⁹⁾、アユにおいて雌雄差の報告は無いことからこれらの差は雌雄差に基づくものではないと考えられる。一方、これらの血液性状に関して環境要因による増減に関する報告がなされている⁹⁻¹¹⁾。本研究では天然遡上個体のRBC、HGB、MCH、MCHCなどヘモグロビン量やその比率に関する形質が人工池中と比較し、有意に高く酸素運搬能力が高いことが推定され、運動能力的に人工池中より優れていることが示唆された。このことは天然個体が養殖個体と比べ運動量を必要とされる環境に曝されている状況と一致している。一方、自然環境に3ヶ月間曝された人工池中、すなわち人工放流における血液性状は形質により天然遡上に近い値、中間値、人工池中に近い値をそれぞれ示した。個体ごとに見ると、天然遡上に近い特性を示す個体から人工池中に近い特性を示す個体まで、特性はばらついていた。血液性状は環境や個体

の生理的状態の影響を受け変化することが知られていることから、可変的であると考えられる¹²⁾。遺伝的背景を同一にする天然遡上と人工池中が異なった血液性状を示すのは環境要因の差によると考えられ、環境要因が血液性状に影響することを示している。一方、人工放流の個体における各個体の血液性状がばらついていることは環境に適應するまでの時間が形質や個体によって異なっていることと、3ヶ月では全ての個体が環境に適應しきれていないことを示している。特に人工放流におけるRBCやHGBで人工池中に近い個体が多いことからこれらの形質の適應に時間がかかるものと考えられる。RBCやHGBは遊泳性が大きい活発な魚種で高い値を示し、あまり活発に動き回らない魚種では少ない傾向が見られている¹²⁾。したがって、このこれらの値は運動能力に影響する要因の一つと考えられる。

一方、天然遡上アユと池中生産アユとの間で筋肉性状に差異があることが報告されている¹³⁾。これによれば天然遡上アユの筋肉では赤筋の割合が低く、白筋の割合が高いことや脂肪の蓄積量が低い。また、筋繊維の太さを比較すると考えられる。今回材料として用いた3集団において運動に関わる形質と環境との関連も検討する必要があるであろう。

本研究において、天然環境に戻したアユの人工池中が放流後の時間経過に伴って本来の形質を取り戻すこ

とが予想された。しかしながら、釣獲期に全ての放流個体が天然と同様の血液性状に戻っているわけではないことが示された。今後、7月の時点で天然と同様の特性を示す放流種苗を育成する場合、これらの形質を天然に近づける工夫が必要になると考えられる。

要 約

放流アユと天然遡上アユとの間での行動生態における差異の要因を明らかにすることを目的とし、遺伝的起源が同一で、生息環境、履歴の異なる3種類のアユ集団(天然遡上、人工放流、人工池中)の血液性状を比較した。天然遡上アユと人工池中アユとの間で血液性状に差が観察され、天然遡上アユの血液が濃かった。人工放流は放流後3ヶ月が経過していたが、赤血

球数が人工池中とほぼ同じレベルで天然アユ化していなかった。このような血液性状の差異が放流種苗の行動生態に影響を与えているものと考えられる。今後、天然と同様の血液性状を示す放流種苗を育成する工夫が必要になると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり人工池中アユのサンプルをご提供いただいた高知県内水面種苗センターの職員の方々、天然遡上アユおよび人工放流アユのサンプルを御提供いただいた高知県物部川漁業協同組合の皆様、御礼申し上げます。また、本研究の一部は高知県海洋局水産振興課の支援によった。

文 献

- 1) 東 幹夫 (1980) アユ—一代限りの侵略者?, 「日本の淡水生物 侵略と攪乱の生態学」, 川合禎次・川那部浩哉・水野信彦編, 東海大学出版会, 東京, pp.154-161.
- 2) 谷口順彦・関 伸吾・稲田善和 (1983) 両側回遊型, 陸封型および人工採苗アユ集団の遺伝的変異性保有量と集団間の分化について. 日水誌, 49: 1655-1663.
- 3) Takagi, M., S. Shoji and N. Taniguchi (1999) Microsatellite DNA polymorphism to reveal genetic divergence in ayu, *Plecoglossus altivelis*, Fish. Sci., 65: 507-512.
- 4) 松浦秀俊 (1989) すすむ調査・研究, 「土佐のアユ—資源問題を考える」, 谷口順彦・依光良三・西島敏隆・松浦秀俊著, 高知県内水面漁業協同組合連合会, 高知, pp.179-207.
- 5) 池田 実・高木秀蔵・谷口順彦 (2005) マイクロサテライト DNA 分析によるアユ人工種苗の継代数と遺伝的変異性の関係. 日水誌, 71: 768-774.
- 6) Koedprang, W., M. Nakajima, M. Maita and N. Taniguchi (2002) Correlation of hematology and plasma chemistry levels in silver crucian carp, *Carassius langsdorffii*. Fish. Sci., 68: 721-728.
- 7) Rice, W. R. (1989) Analyzing tables of statistical test. Evolution. 43: 223-225.
- 8) Ezzat, A. A., M. B. Shabana and A. M. Farghally (1974) Studies on the blood characteristics of *Telapia zilli* (Gervais). I. Blood cells. J. Fish Biol., 6: 1-12.
- 9) Mahajan, C. L. and T. R. Dheer (1982) Regenerative capacity of the spleen in a splenectomized fish, *Channa punctatus* Bloch, with related investigations into changes in peripheral blood and haematopoiesis. J. Fish Biol., 20: 657-666.
- 10) Mahajan, C. L. and T. R. Dheer (1983) Haematological and haematopoietic responses to starvation in an air-breathing fish *Channa punctatus* Bloch. J. Fish Biol., 22: 111-123.
- 11) Weinberg, S. R., C. D. Siegel, R. F. Nigrelli and A. S. Gordon (1972) The hematological parameters and blood cell morphology of the brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* (Le Sueur). Zoologica, 57: 71-78.
- 12) 池田彌生・尾崎久雄・瀬崎啓次郎 (1986) 血液性状による診断法, 魚類血液図鑑, 緑書房, 東京, pp.286.
- 13) 谷口順彦・中嶋正道・池田 実・谷口道子・高木秀蔵 (2005) アユの健苗性の促進に関する研究—人工池中の遺伝的多様性と生態的特性の保全を目指して—, 西村膳写堂, 高知, pp.17.

Heritability Estimates by Intra-sire Regression of Offspring on Dam and Half-sib Analysis of the Number of Gill Rakers and Vertebrae in Masu Salmon, *Oncorhynchus masou masou*

Daisei ANDO^{*1}, Shu-ichi MANO^{*2}, Kazutaka SHIMODA^{*1}, Yoshihito SHINRIKI^{*1},
Nobuhisa KOIDE^{*1} and Masamichi NAKAJIMA^{*3}

^{*1} Hokkaido Fish Hatchery

^{*2} Eastern Hokkaido Inland Water Fisheries Section of the Hokkaido Fish Hatchery

^{*3} Laboratory of Population Genetic Informatics, Graduate School of Agriculture, Tohoku University

Abstract

Heritabilities of four quantitative traits, number of gill rakers (GR), abdominal vertebrae (AV), caudal vertebrae (CV), and vertebral number (VN) were estimated in masu salmon *Oncorhynchus masou masou* families produced by artificial fertilization. Heritability was calculated using intra-sire regression of offspring on dam (h_{IR}^2) and half-sib analysis from sire- and dam-components (h_s^2, h_d^2). Heritability ranged from 0 (null) to 1.38, with some values exceeding the theoretical upper limit of 1.0. There was a significant correlation between h_{IR}^2 from intra-sire regression and h_d^2 in half-sib analysis. The three heritabilities in AV and VN were similar; however, estimates from GR and CV were markedly different between h_s^2 and h_d^2 . It was believed that these differences were not caused by maternal effects but were actually a result of the bias due to use of few sires, because standard errors of h_s^2 is very large. If it is known beforehand that maternal effects do not exist in target traits, intra-sire regression can be a useful tool for estimation of heritability.

(accepted November 6, 2008)

Introduction

Heritability has often been utilized to understand the genetic components, which bring about phenotypic variations¹⁾. It indicates the degree of resemblance between relatives and is defined as the ratio of additive genetic variance to total phenotypic variance ($h^2 = V_A/V_P, 0 \leq h^2 \leq 1$), and is an important index in breeding programs²⁾. There are several techniques for estimation of heritability, such as parent-offspring regression, sib analysis, and response-selection relationship per generation, *i.e.*, realized heritability²⁾. Each of these techniques has its advantages and disadvantages, for example, parent-offspring regression is simple, but requires a similar environment for two generations¹⁾. In sib analysis, it is unnecessary to consider the parental environments; however, many crossbreeding lots must be produced to improve the precision of the estimates¹⁾. In fish, sib analysis has

often been used for estimation of heritability because it is comparatively easy to maintain a constant offspring environment¹⁾. If heritability can be estimated by several techniques, it is valid to compare the precision of the various estimates³⁾.

Meristic characters, such as the number of gill rakers (GR), fin rays, pyloric caeca, and vertebrae (VN) in fish, have been utilized to detect genetic differences among populations and to delineate local stocks^{4,5)}. In particular, it is thought that GR and VN are important characters for detection of local stocks⁶⁾. However, Beacham⁷⁾ reported that differences in VN and GR frequencies are only useful for stock identification of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* on a broad regional basis. These traits in the *Oncorhynchus* genus have high heritabilities, for example, h^2 is estimated to be 0.37–0.67 for GR in pink salmon *O. gorbuscha* and rainbow trout *O. mykiss*, and 0.52–0.84

for VN in coho salmon *O. kisutch* and rainbow trout⁸⁻¹⁰. In general, characters with high heritabilities can be deemed least important as determinants of natural fitness^{11,12}. It has also been reported that geographical (latitudinal) clines exist in the mean VN of some species^{13,14}. This phenomenon suggests that morphological trait variation may reflect the most suitable value for an area, as a result of adaptation and selection under genetic control^{15,16}. Moreover, Goin *et al.*¹⁷ found that the mean VN of juvenile rainbow trout decreased with increasing distance from the ocean and suggested that such variation may be related to anadromous or non-anadromous forms. These reports indicate that variation in morphological traits may be related to adaptation to environments, life-history forms, and natural fitness. Therefore, heritability is a useful tool to clarify the influence of genetic factors in the determination of morphological traits.

Masu salmon *Oncorhynchus masou masou* are mainly distributed in northern Japan, including Hokkaido Island, and support commercial fisheries¹⁸. Hatchery-reared masu salmon juveniles are released in several locations for stock enhancement. In addition, juvenile stream-resident-type masu salmon (in Japanese, "Yamame"), are reared and released for recreational fishing in Japan. A geographical cline in mean VN of masu salmon on Hokkaido Island has been reported^{19,20}; however, genetic parameters of these morphological phenotypes have not been sufficiently investigated.

The mechanism for determination of VN remains unknown because of a lack of discrimination between environmental and inherited causes of variation²¹. In masu salmon, heritability has been estimated for the number of abdominal (AV) and caudal vertebrae (CV), *i.e.* the anterior and posterior portions of the vertebral column²²; however, heritabilities of GR and total VN have not yet been reported.

In this study, heritabilities of GR, AV, CV, and VN in masu salmon were estimated by two techniques and their estimates compared.

Materials and Methods

Production of families and culture conditions

Masu salmon from the Shiribetsu River, Hokkaido Island, northern Japan were used for crossbreeding.

Parental fish were bred at the Mori Research Branch of the Hokkaido Fish Hatchery, Mori, Japan. Fifteen families were produced, each consisting of one sire mated with three dams. This crossbreeding produced five family sets. After fertilization, eggs in each family were incubated at 13°C until the eye-pigmented stage (282 degree-days), and transported to the Hokkaido Fish Hatchery, Eniwa. From each family, 100 eggs were placed in mesh baskets and incubation continued. Average water temperature was 8.2 (7.5–9.1)°C until the swim-up stage (861 degree-days). At swim-up, food was provided *ad libitum*. Rearing continued using aerated running water (8–11 °C). Ten months after fertilization, all fish were fixed with 10% formalin.

Meristic character analysis

Number of GR and vertebrae of the preserved masu salmon juveniles were determined. Fork length was measured to the nearest 0.1 cm. Sex was determined, following dissection, from observation of the gonadal tissue. GR were extracted from the anterior position of the left gill arch. The number of AV and CV were counted individually as described previously²². AV, CV, and VN were treated as independent traits. All four traits were stained with 0.01% Alizarin red S diluted with 1% KOH, and observed under a binocular microscope. Individuals with fork length less than 7 cm were excluded, because GR did not reach a fixed number, until fork length was greater than 7–8 cm²³. The same four traits (GR, AV, CV, and VN) were enumerated in all parents and dam's records were regressed on the offspring means. The significance of the regression coefficients was assessed using *F*-tests.

Estimation of heritability

Sexual dimorphism in progeny was detected using a two-factor (sex × family) analysis of variance in the four meristic traits.

Heritability (h^2) was estimated by intra-sire regression of offspring on dam and three-way analysis of variance (ANOVA)²⁴. When a normal parent-offspring regression is used to estimate h^2 , the sire's record must be used thrice. This reuse of data may result in bias. Therefore, we estimated heritability using dam records only (intra-sire regression; h_{IR}^2). This technique involved the regression of offspring on

dams, calculated individually for each set of dams mated to one sire. The regressions from each set were then pooled to determine a weighted average^{2,24}. Intra-sire regression is preferable compared to overall regression using all dams because it eliminates unwanted variation regarding the regression line due to sires². Moreover, intra-sire regression can avoid problems related to random mating variation because heritability is calculated as a fraction of variance among dams mated to the same sire²⁵.

The statistical model used (hereafter, Z is used to designate the offspring mean and X is used to designate the dam's record) was

$$Z_{ij} - \alpha_i = \mu + \beta (X_{ij} - \bar{x}_{pm}) + e_{ij} \quad 1)$$

where,

Z_{ij} ; the mean obtained from the offspring records by mating of the i th sire to the j th dam

μ ; common mean

α_i ; effect of the i th sire

β ; regression coefficient of Z on X

X_{ij} ; record on the j th dam mated to the i th sire

\bar{x}_{pm} ; phenotypic mean of all dams

e_{ij} ; deviation of the means of the progeny

The regressions from the sire families were pooled to obtain the common regression coefficient, β ²⁴. The regression parameter b was obtained by division sum of cross-products, $SCP_{D(XZ)}$ by sum of squares, $SS_{D(XX)}$. Each component was calculated as

$$b = \frac{SCP_{D(XZ)}}{SS_{D(XX)}} \quad 2)$$

$$SS_{D(XX)} = \sum_i \sum_j X_{ij}^2 - \sum_i \frac{(\sum_j X_{ij})^2}{n_i} \quad 3)$$

$$SCP_{D(XZ)} = \sum_i \sum_j X_{ij} Z_{ij} - \sum_i \frac{\sum_j X_{ij} \sum_j Z_{ij}}{n_i} \quad 4)$$

where, n_i is the number of dams mated to the i th sire. Heritability was adjusted by twice the regression parameter b ($h_{IR}^2 = 2b$). Standard error (SE) of b was calculated as

$$SE(b) = \sqrt{\frac{S_b^2}{SS_{D(XX)}}} \quad 5)$$

$$S_b^2 = \frac{SS_{D(ZZ)} - \frac{(SCP_{D(XZ)})^2}{SS_{D(XX)}}}{D - S - 1} \quad 6)$$

where D and S are numbers of dams and sires, respectively. The sum of squares, $SS_{D(ZZ)}$ was obtained in the same way as equation 3), using the mean of each dam's progeny, Z . Standard error of h^2 was also doubled ($2 \times SE(b)$)²⁴.

Heritability was also calculated by half-sib analysis using ANOVA. The statistical model is,

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + e_{ijk} \quad 7)$$

Where,

Y_{ijk} ; record of the k th progeny of the j th dam mated to the i th sire

μ ; common mean

α_i ; effect of the i th sire

β_{ij} ; effect of the j th dam mated to the i th sire

e_{ijk} ; uncontrolled environmental and genetic deviations attributable to the individuals

Half-sib analysis heritabilities were estimated using sire- and dam-components. ANOVA was performed to divide the phenotypic variance into observational components attributable to differences between the progeny of different sires (between sire components, σ_s^2), to differences between the progeny of dams mated to the same sire (between dam, within sire components, σ_d^2), and to differences between individual progeny of the same dam (within progeny components, σ_e^2)². The heritability for half-sib analysis was estimated following Becker²⁴ using

$$h_s^2 = \frac{4 \sigma_s^2}{\sigma_s^2 + \sigma_d^2 + \sigma_e^2} \text{ (sire components)} \quad 8)$$

$$h_d^2 = \frac{4 \sigma_d^2}{\sigma_s^2 + \sigma_d^2 + \sigma_e^2} \text{ (dam components)} \quad 9)$$

Standard errors of each estimate were calculated following Becker²⁴.

Statistical significance of the heritability estimates (h_{IR}^2 , h_s^2 , and h_d^2) greater than 0.2²⁶) and 0 was set at the 0.05 level using a one-tailed test²⁷. The relationships between h_{IR}^2 and the two half-sib analysis estimates (h_s^2 and h_d^2) were assessed using the F -test.

Results

In total, 831 individuals in 15 masu salmon families were sampled. The number of individuals sampled in each family ranged from 18 to 76, and mean fork lengths among families ranged from 8.0 to 10.9 cm (Table 1). Within the four investigated traits, no significant sexual dimorphism was detected ($p = 0.06$

Table 1. Mean and range of the four meristic characters in 15 families of masu salmon

Family	Parents	Number of individuals in progeny			Mean fork length \pm SE (cm)	Morphological traits							
		Female	Male	Total		GR		AV		CV		VN	
						Mean \pm SE	Range	Mean \pm SE	Range	Mean \pm SE	Range	Mean \pm SE	Range
1	Sire 1 \times Dam 1	26	36	62	8.2 \pm 0.09	17.8 \pm 0.10	16–19	31.3 \pm 0.11	30–34	32.7 \pm 0.12	29–35	64.0 \pm 0.09	62–66
2	Sire 1 \times Dam 2	38	33	71	8.5 \pm 0.08	17.8 \pm 0.12	15–20	31.8 \pm 0.08	30–33	33.5 \pm 0.08	32–35	65.2 \pm 0.06	64–66
3	Sire 1 \times Dam 3	26	28	54	9.2 \pm 0.08	17.4 \pm 0.12	16–21	31.1 \pm 0.11	30–33	33.6 \pm 0.10	32–35	64.8 \pm 0.07	64–66
4	Sire 2 \times Dam 4	33	31	64	8.1 \pm 0.07	19.0 \pm 0.10	17–21	31.8 \pm 0.08	31–34	32.9 \pm 0.09	31–34	64.6 \pm 0.08	63–66
5	Sire 2 \times Dam 5	17	36	53	9.5 \pm 0.14	19.4 \pm 0.12	18–21	32.6 \pm 0.08	32–34	32.6 \pm 0.10	31–34	65.2 \pm 0.07	64–66
6	Sire 2 \times Dam 6	35	41	76	8.7 \pm 0.07	19.1 \pm 0.09	17–21	31.5 \pm 0.08	30–33	33.3 \pm 0.08	32–35	64.9 \pm 0.06	64–66
7	Sire 3 \times Dam 7	8	18	26	10.9 \pm 0.16	17.4 \pm 0.19	16–19	31.7 \pm 0.14	31–33	32.2 \pm 0.18	30–34	64.0 \pm 0.09	63–65
8	Sire 3 \times Dam 8	43	33	76	8.5 \pm 0.08	18.3 \pm 0.11	16–21	31.4 \pm 0.07	30–33	32.2 \pm 0.08	31–33	63.6 \pm 0.08	62–65
9	Sire 3 \times Dam 9	24	34	58	8.0 \pm 0.08	18.3 \pm 0.11	16–20	31.1 \pm 0.11	29–33	33.3 \pm 0.11	32–35	64.3 \pm 0.09	63–66
10	Sire 4 \times Dam 10	15	23	38	9.1 \pm 0.11	18.9 \pm 0.15	17–21	32.7 \pm 0.09	31–34	33.7 \pm 0.11	32–35	66.4 \pm 0.11	65–68
11	Sire 4 \times Dam 11	8	10	18	8.9 \pm 0.24	19.1 \pm 0.21	18–21	32.1 \pm 0.11	31–33	32.7 \pm 0.20	31–34	64.8 \pm 0.17	63–66
12	Sire 4 \times Dam 12	36	33	69	8.8 \pm 0.09	19.4 \pm 0.10	18–21	32.8 \pm 0.08	31–34	33.4 \pm 0.09	31–35	66.2 \pm 0.08	65–68
13	Sire 5 \times Dam 13	17	11	28	10.2 \pm 0.17	18.6 \pm 0.21	17–21	31.4 \pm 0.12	30–33	32.4 \pm 0.16	30–34	63.8 \pm 0.13	63–65
14	Sire 5 \times Dam 14	40	30	70	8.8 \pm 0.09	18.8 \pm 0.11	16–21	31.8 \pm 0.07	31–33	33.2 \pm 0.08	32–35	65.1 \pm 0.06	64–66
15	Sire 5 \times Dam 15	39	29	68	8.3 \pm 0.07	19.4 \pm 0.11	17–21	32.2 \pm 0.08	31–33	33.4 \pm 0.09	32–35	65.5 \pm 0.08	64–67
	Total	405	426	831	8.7 \pm 0.03	18.6 \pm 0.04	15–21	31.8 \pm 0.03	29–34	33.1 \pm 0.03	29–35	64.7 \pm 0.04	62–68

GR; gill rakers, AV; abdominal vertebrae, CV; caudal vertebrae, VN; vertebral number

Table 2. Two-factor analysis of variance in four traits of masu salmon (sex \times family)

Traits	Source of variation	Sum of square	DF	Mean Square	<i>F</i>	<i>p</i>
GR	Factor A (sex)	1.53	1	1.53	1.98	0.16
	Factor B (family)	369.65	14	26.40	3.13	$p < 0.001$
	A \times B	16.54	14	1.18	1.53	0.10
	Remainder	619.60	801	0.77		
	Total	1006.54	830	1.21		
AV	Factor A (sex)	1.61	1	1.61	3.57	0.06
	Factor B (family)	232.84	14	16.63	36.81	$p < 0.001$
	A \times B	6.80	14	0.49	1.07	0.38
	Remainder	361.86	801	0.45		
	Total	603.63	830	0.73		
CV	Factor A (sex)	1.06	1	1.06	1.92	0.17
	Factor B (family)	176.64	14	12.62	22.72	$p < 0.001$
	A \times B	8.07	14	0.58	1.04	0.41
	Remainder	444.85	801	0.56		
	Total	631.23	830	0.76		
VN	Factor A (sex)	0.06	1	0.06	0.16	0.69
	Factor B (family)	494.85	14	35.35	97.57	$p < 0.001$
	A \times B	8.75	14	0.63	1.73	0.05
	Remainder	290.18	801	0.36		
	Total	793.81	830	0.96		

GR; gill rakers, AV; abdominal vertebrae, CV; caudal vertebrae, VN; vertebral number

–0.69); therefore, sex-pooled family data were used for further analysis. Differences among 15 families in each trait were significant ($p < 0.001$) (Table 2). Fork length and parental morphological trait data were also recorded, and trait ranges were 17–20 in GR, 30–34 in AV, 32–35 in CV, and 64–67 in VN, as well as 37.2–50.0 cm in fork length. Intra-sex variations were observed in all traits, except for CV number (33) in sires (Table 3).

In the four traits, there were significant correlations between dam's record and offspring means ($r = 0.53–0.80$; Figure 1). In AV and CV, the regression

parameters were similar (0.46 in AV and 0.42 in CV), while the regression parameter in VN (sum of AV and CV) was larger, 0.74 (Figure 1).

Components for sum of squares (SS) and sum of cross-products (SCP) between dams and within sires used to calculate heritabilities were denoted in Table 4. Heritabilities calculated by intra-sire regression ranged from 0.60–1.17. Heritabilities of AV, CV, and VN produced high estimates, 0.83, 1.17, and 1.09 respectively. The highest heritability values, in CV and VN, exceeded the theoretical upper limit of 1.0.

Heritability estimates using half-sib analysis with

components and variances for sires, dams, and progeny are presented in Table 5. Heritabilities calculated by half-sib analysis ranged from 0 to 1.38. In the paternal half-sib design, heritability for CV was estimated to be null, and the three other traits showed high estimates with large standard errors (SE), $h_s^2 = 0.95 - 1.38$ (SE; 0.71 - 1.06). Heritabilities from dam-components, h_d^2 , ranged from 0.28 to 1.23 and the associated SE were smaller compared to those derived from sire-components. In AV and VN, the two estimates (h_s^2 and h_d^2) showed similar values of 0.71 - 0.95 and 1.23 - 1.38, respectively. However, the two estimates in GR and CV were noticeably different. In particular, the h_s^2 estimate was null in CV, while the h_d^2 estimate (1.15)

exceeded the theoretical upper limit (Table 5).

The estimates for h_{IR}^2 , h_s^2 , and h_d^2 ranged from 0 (null) in CV to 1.38 in VN (Figure 2). In the analysis of AV and VN, the three estimates showed similar tendencies, 0.71 - 0.95 in AV and 1.09 - 1.38 in VN. In the other two traits, there were large differences between h_s^2 and h_{IR}^2 ($h_s^2 = 1.33$ and $h_{IR}^2 = 0.60$ in GR; $h_s^2 = 0$ and $h_{IR}^2 = 1.17$ in CV), however, the estimates from h_d^2 and h_{IR}^2 in CV were approximated. The estimates of h_{IR}^2 in GR, AV, and VN, and h_d^2 in AV, CV, and VN were significantly greater than 0.2, however, h_{IR}^2 in CV and h_d^2 in GR were not significantly greater than 0.2 but were significantly greater than 0. None of the h_s^2 estimates were significantly greater than 0 because of the large SE (Figure 2).

Table 3. Fork length and morphological traits of parents in nested-design

Sire (No.)	Fork length (cm)	Morphological traits				Dam (No.)	Fork length (cm)	Morphological traits			
		GR	AV	CV	VN			GR	AV	CV	VN
1	43.5	17	31	33	64	1	47.0	18	30	34	64
						2	50.0	19	32	34	66
						3	43.5	18	31	34	65
2	37.2	19	31	33	64	4	40.3	19	32	33	65
						5	42.5	18	33	33	66
						6	44.5	18	31	34	65
3	44.5	18	31	33	64	7	38.5	17	32	32	64
						8	41.0	20	32	33	65
						9	44.5	19	31	33	64
4	37.5	19	34	33	67	10	47.5	19	32	35	67
						11	44.5	20	32	34	66
						12	44.0	20	32	34	66
5	46.8	19	32	33	65	13	38.0	18	32	33	65
						14	41.3	19	32	33	65
						15	42.4	20	33	33	66
Mean	41.9	18.4	31.8	33.0	64.8		43.3	18.8	31.8	33.5	65.3

GR; gill rakers, AV; abdominal vertebrae, CV; caudal vertebrae, VN; vertebral number

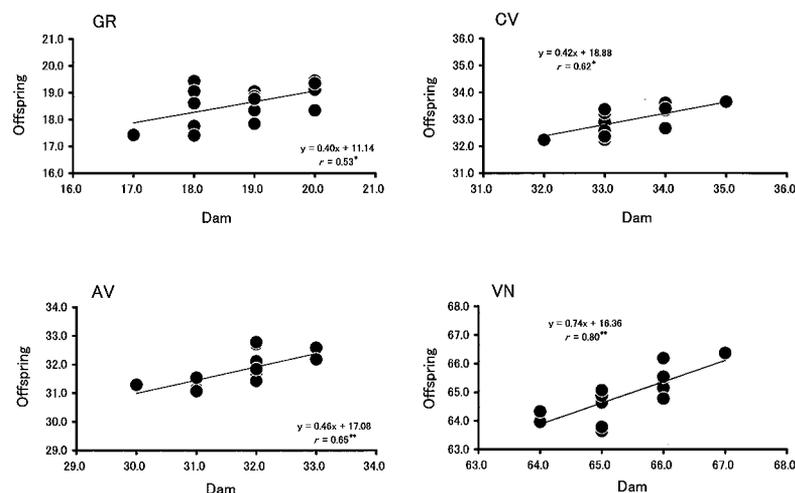


Fig. 1. Dam-offspring regression analysis with sire ignored in four meristic characters of masu salmon, *Oncorhynchus masou masou*. Significance of the relationships determined by F -tests (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Trait abbreviations: GR, gill rakers; AV, abdominal vertebrae; CV, caudal vertebrae; and VN, vertebral number (AV + CV).

There was no significant relationship between h_{IR}^2 and h_s^2 ($p = 0.43$); however, a significant correlation was observed between h_{IR}^2 and h_d^2 ($p = 0.02$) (Figure 3).

Discussion

In this study, heritabilities of four meristic characters were estimated by intra-sire regression and sib-analysis. It is known that heritabilities cannot easily be estimated with any great precision, and that most estimates have large standard errors^{2,28}). Moreover, estimates of heritability can differ markedly in different populations even though the same trait is measured^{2,28,29}). Therefore, estimating heritability by several techniques and discussing the results from different viewpoints maybe useful. Heritability estimates are reported to be inflated by common environmental (V_{EC}), dominance (V_D), and epistatic variance components²). Parent-offspring regression does not allow the estimation of these components of phenotypic variance³⁰). However, intra-sire regression excludes sire effects and includes maternal effects²⁴). In general, this regression

technique deals with sex-linked traits and is used to separate the contribution of the sexes to the target traits, as in dam-daughter and dam-son regressions²⁴). Moreover, parent-offspring regression presupposes that parents and their offspring are raised in the same environment. In our study, sexual dimorphism was not observed; however, the environments experienced by parents and offspring in their early life-history will be different. Therefore, intra-sire regression used in our analysis meets some, but not all, assumptions which form the basis for the accurate determination of heritability.

On the other hand, sib analysis requires a constant breeding environment for the offspring. The paternal half-sib design (h_s^2) is reported to provide best estimates since it is not inflated by dominance and/or maternal effects in its numerator (*i.e.*, $\sigma_s^2 = (1/4)V_A$; equation 8)²⁹). However, heritability estimates from dam-components (h_d^2) contain four times the maternal effects and all of the dominance variance in the numerator (*i.e.*, $\sigma_d^2 = (1/4)V_A + (1/4)V_D + V_{EC}$; equation 9)²⁴). In our analysis, there was a significant

Table 4. Heritability estimates, components of sum of squares, and sum of cross products between dams within sires for intra-sire regression

Traits	Sum of suares (SS)	Sum of cross products (SCP)	Sum of squares (SS)	Regression parameter	Standard error (SE)	Heritability (SE)
	Dams XX	Dam × Progeny XZ	Progeny ZZ			
	$SS_{D(XX)}$	$SCP_{D(XZ)}$	$SS_{D(ZZ)}$	b	$SE(b)$	h_{IR}^2
GR	8.67	2.60	1.25	0.30	0.08	0.60 (0.16)
AV	5.33	2.22	1.60	0.42	0.12	0.83 (0.24)
CV	2.00	1.17	2.66	0.59	0.33	1.17 (0.66)
VN	4.67	2.55	4.38	0.55	0.27	1.09 (0.53)

X; dam's record

Z; progeny mean

GR; gill rakers, AV; abdominal vertebrae, CV; caudal vertebrae, VN; vertebral number

Table 5. Estimation of heritability and each components in sire, dam, and progeny within dams in half-sib analysis

Traits	Components									Heritability (SE)	
	Sum of squares (SS)			Mean squares (MS)			Variance			h_s^2	h_d^2
	SS_s	SS_d	SS_e	MS_s	MS_d	MS_e	σ_e^2	σ_d^2	σ_s^2		
	Sire	Between dams within sires	Between progeny within dams	Sire	Between dams within sires	Between progeny within dams	Progeny	Dams	Sires	Sire components ^a	Dam components ^a
GR	313.53	55.35	637.67	78.38	5.53	0.78	0.78	0.09	0.44	1.33 (0.84)	0.28 (0.13)
AV	156.48	76.88	370.27	39.12	7.69	0.45	0.45	0.14	0.18	0.95 (0.71)	0.71 (0.31)
CV	53.80	123.44	453.98	13.45	12.34	0.56	0.56	0.22	0 ^b	0 ^c	1.15 (0.49)
VN	320.78	174.04	298.99	80.20	17.40	0.37	0.37	0.32	0.36	1.38 (1.06)	1.23 (0.51)

GR; gill rakers, AV; abdominal vertebrae, CV; caudal vertebrae, VN; vertebral number

^aSire and dam components denote the estimate in half-sib analysis (ANOVA), respectively

^bNegative estimate (-0.004) was supposed to be as 0

^cNegative estimate (-0.021) was supposed to be as 0

Where,

$$MS_s = SS_s / DF_s = \sigma_e^2 + k_2 \sigma_d^2 + k_3 \sigma_s^2$$

$$MS_d = SS_d / DF_d = \sigma_e^2 + k_1 \sigma_d^2$$

$$MS_e = SS_e / DF_e = \sigma_e^2$$

$$DF_s = 4, DF_d = 10, DF_e = 816$$

$$k_1 = 52.65, k_2 = 60.74, k_3 = 165.33$$

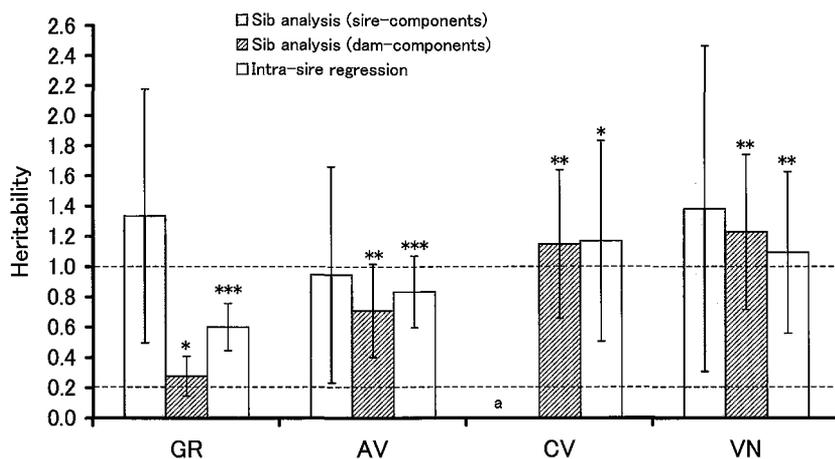


Fig. 2. Heritability estimated by intra-sire regression of offspring on dam and by half-sib analysis of sire- and dam-components in four traits. Bars denote adjusted standard error of heritability. Asterisks indicate heritability significance greater than 0.2 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) and 0 (* $p < 0.05$) by one-tailed test. Character "a" denote the negative estimate. Trait abbreviations: GR, gill rakers; AV, abdominal vertebrae; CV, caudal vertebrae; and VN, vertebral number (AV + CV).

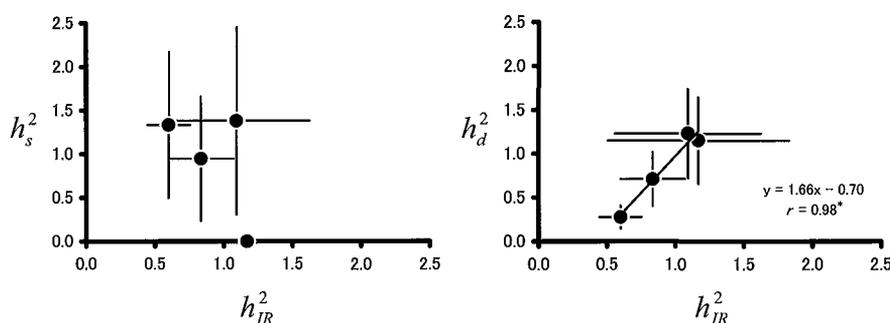


Fig. 3. Relationships between estimates from intra-sire regression of offspring on dam (h_{IR}^2 see) and half-sib analysis from sire-components (h_s^2) and dam-components (h_d^2). Bars denote adjusted standard error of heritability. Significance of the relationship determined by F -tests (* $p < 0.05$).

correlation between h_{IR}^2 and h_d^2 , and both estimates include the maternal effect. Therefore, estimates from h_{IR}^2 and h_d^2 appear to be mainly influenced by the dam's characteristics. It may be possible to guess the influence of maternal effects and environmental factors when comparing estimates of σ_s^2 and σ_d^2 ; however, the standard errors of h_s^2 were very large and all estimates were not significantly different from 0. Estimates of h_s^2 based on GR and CV were noticeably different from h_d^2 and the difference between the two CV based estimates was remarkable. In this study, only 5 sires were used for half-sib analysis, and the large SE of h_s^2 may be related to the small number of sires used. For example, h_s^2 for CV is null, however, the sire's records exhibited no variance (Table 3). If maternal effects are truly contained in h_d^2 , the estimate of h_d^2 should be higher than that of h_s^2 . However, the estimate of h_s^2 was larger than that of h_d^2 in GR (Figure 2). The estimate of h_s^2 is thought to indicate reliable

values²⁹⁾, but we suggest that this hypothesis will only apply in cases when many sires are used.

In masu salmon, heritabilities (h^2) have been reported for life-history traits, including mortality rate during egg and fry stage (0–0.08); growth related traits, such as body weight and length (0.07–0.68); smoltification rate and timing (0.40–0.68); and morphological traits, such as numbers of parr marks, AV, and CV (0.40–0.84)^{3,22,31–34)}. In general, it has been reported that heritability of morphological traits, including meristic characters, is greater than that of life history, behavioral, and physiological traits^{2,11,12)}. In this study, estimates for AV and VN are thought to be reliable because all estimate values were similar and high (0.71–0.95 in AV and 1.09–1.38 in VN). If the true value of heritability is high, it has been suggested that the heritability estimate will exceed the theoretical upper limit of 1.0³⁵⁾. In this study, VN appears to have an inherently high heritability as all

three estimates exceeded the upper limit of heritability. Recently, Yamahira *et al.*³⁶⁾ suggested that a geographic cline in mean VN was most likely explained by natural selection and adaptation. In masu salmon, there were significant relationships between latitude and mean VN in data from the 1960s and 1990s, (our calculation from their original data) and these clines are similar^{19,20)}. Therefore, variation of mean VN in masu salmon may be also related to natural fitness.

In the AV and CV of another masu salmon group, it was reported that heritabilities (\pm SE) from parent-offspring regression were high and significant, 0.65 ± 0.20 in AV and 0.84 ± 0.23 in CV²²⁾. These results suggest that AV and CV are inheritable characters, and that the significance of CV should be reconsidered in this study. Tave³⁷⁾ calculated the heritability of half-vertebrae (HV) that form the caudal region and whole-vertebrae (WV) in the trunk of the velvet belly shark *Etmopterus spinax*. Heritability ranged from 0.05 to 0.39 in HV and 0.22 to 0.23 in WV; however, estimates for the sum of the vertebrae (HV + WV) were higher, 0.59–0.62. Therefore, it is possible to calculate the high estimates heritability, if there are two characters within a trait.

In other *Oncorhynchus* species, heritability of VN is reported to be high, for example, VN in coho salmon, including clones, was reported to range from 0.52 to 0.76¹⁰⁾ and was 0.84 in rainbow trout⁹⁾. Kirpichnikov³⁸⁾ noted that heredity of VN is complicated by a distinct maternal effect because maternal effect may be associated with the early formation of the anterior part of the vertebral column during the gastrulation stage of embryogenesis. However, in this study, the influence of dams and sires in the determination of AV and VN is thought to be similar, because h_s^2 and h_d^2 were similar.

Heritability of GR also showed high estimates (0.28

– 1.33), which were significantly greater than 0 in h_{IR}^2 and h_d^2 . The high h_s^2 with a large SE may be the result of the small number of sires used in this study. It has been reported that variation in GR is additive and that heritability is close to the theoretical upper limit in common carp *Cyprinus carpio*³⁸⁾. Similar to the comments on two traits within VN, GR consists of two parts, namely, upper gill rakers (UGR) and lower gill rakers (LGR). Separation of, and interaction between, UGR and LGR was not a part of the current study; however, higher heritabilities have been reported in other *Oncorhynchus* species: 0.63–0.67 for UGR and 0.37–0.45 for LGR in rainbow trout and pink salmon^{8,9)}. Hagen³⁹⁾ reported that heritability of GR in threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* was 0.58 and that maternal effects were not present because heritabilities in each sex did not differ. Based on these results, the existence of maternal effects may be different between VN and GR^{38,39)}.

In our present study, it is thought that the maternal effect does not influence GR, AV, VN; however, heritability of CV should be estimated again using another population. If it is known beforehand that maternal effects do not exist in target traits, intra-sire regression can be a useful tool for estimation of heritability. Sato *et al.*⁴⁰⁾ noted that it is possible to indicate the range of estimates for specific traits when large amounts of data are accumulated, even though strain and breeding conditions may be different. To understand the significance of variation in morphological traits, future studies should estimate genetic parameters in many populations under different environmental conditions.

Acknowledgement

We would like to thank the two anonymous reviewers for their constructive comments on this manuscript.

References

- 1) Sato, R. (1995) Estimation of heritability for quantitative traits in fish. *Fish Genet. Breed. Sci.*, 21: 27–43. (in Japanese with English abstract)
- 2) Falconer, D. S. and T. F. C. Mackay (1996) "Introduction to Quantitative Genetics", 4th edn. Longman Group Ltd, Harlow, pp. 464.
- 3) Kanno, Y. and H. Kawamura. (1993) Comparison of heritabilities estimated by two techniques of variance analysis for fry mortality rate of masu salmon in Hokkaido. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59: 1111–1116.

- 4) Fukuhara, F. M., S. Murai, J. J. LaLanne, and A. Sribhibhadh (1962) Continental origin of red salmon as determined from morphological characters. *Int. North Pac. Fish. Comm. Bull.*, 8: 15-109.
- 5) Kasugai, K. and K. B. Seong (2003) Comparison of morphometric and meristic characters of masu salmon from the coasts of the Korean Peninsula and Hokkaido Island, Japan in the Sea of Japan. *Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery*, 57: 29-35. (in Japanese with English abstract)
- 6) Vernon, E. H. (1957) Morphometric comparison of three races of kokanee (*Oncorhynchus nerka*) within a large British Columbia lake. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 14: 573-598.
- 7) Beacham, T. D. (1985) Variation in number of vertebrae and gill rakers of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, in North America. *Environ. Biol. Fish.*, 14: 97-105.
- 8) Funk, W. C., J. A. Tyburczy, K. L. Knudsen, K. R. Lindner, and F. W. Allendorf (2005) Genetic basis of variation in morphological and life-history traits of a wild population of pink salmon. *J. Hered.*, 96: 24-31.
- 9) Leary, R. F., F. W. Allendorf, and K. L. Knudsen (1985) Inheritance of meristic variation and the evolution of developmental stability in rainbow trout. *Evolution*, 39: 308-314.
- 10) Nakajima, M., D. Ando, A. Kijima, and Y. Fujio (1996) Heritability of vertebral number in the coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Tohoku J. Agric. Res.*, 47: 29-36.
- 11) Gustafsson, L. (1986) Lifetime reproductive success and heritability: empirical support for Fisher's fundamental theorem. *Am. Nat.*, 128: 761-764.
- 12) Mousseau, T. A. and D. A. Roff (1987) Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity*, 59: 181-197.
- 13) Jordan, D. S. (1892) Relations of temperature to vertebrae among fishes. *Proc. US Nat. Mus.*, 14: 107-120.
- 14) Billerbeck, J. M., G. Ortí, and D. O. Conover (1997) Latitudinal variation in vertebral number has a genetic basis in the Atlantic silverside, *Menidia menidia*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54: 1796-1801.
- 15) McDowall, R. M. (2003) Variation in vertebral number in galaxiid fishes (Teleostei: Galaxiidae): a legacy of life history, latitude and length. *Environ. Biol. Fish.*, 66: 361-381.
- 16) McDowall, R. M. (2003) Variation in vertebral number in galaxiid fishes, how fishes swim and a possible reason for pleomerism. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 13: 247-263.
- 17) Goin, J. J., T. H. Williams, and C. J. Donohoe (2008) Variation of vertebral number in juvenile *Oncorhynchus mykiss* in relation to upstream distance from the ocean. *Environ. Biol. Fish.*, 82: 207-213.
- 18) Ando, D., M. Miyamoto, K. Kasugai, Y. Miyakoshi, and M. Nagata (2005) Seasonal distribution of yearling masu salmon released from the Sea of Japan side of southwestern Hokkaido, Japan. *N. Am. J. Fish. Manage.*, 25: 22-37.
- 19) Mano, S-I., Y. Kanno, T. Kinoshita, T. Maeda, and K. Kyushin (1991) Ecological characteristics and variations in numerical characters of masu salmon, *Oncorhynchus masou* populations in rivers of Japan Sea coast of Hokkaido. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, 42: 147-159. (in Japanese with English abstract)
- 20) Osanai, M. and M. Otsuka (1967) Ecological studies on the masu salmon, *Oncorhynchus masou* (Brevoort), of Hokkaido. 1. Morphology and spawning habit of the masu salmon which ascends the river. *Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery*, 22: 17-32. (in Japanese)
- 21) McDowall, R. M. (2008) Jordan's and other ecogeographical rules, and the vertebral number in fishes. *J. Biogeogr.*, 35: 501-508.
- 22) Ando, D., S-I. Mano, N. Koide, and M. Nakajima (2008) Estimation of heritability and genetic correlation of number of abdominal and caudal vertebrae in masu salmon. *Fish. Sci.*, 74: 293-298.
- 23) Mayama, H. (1992) Studies on the freshwater life and propagation technology of masu salmon, *Oncorhynchus masou* (Brevoort). *Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery*, 46: 1-156. (in Japanese with English abstract)
- 24) Becker, W. A. (1985) "Manual of Quantitative Genetics", Academic Enterprises, Pullman, pp. 190.
- 25) Lush, J. L. (1940) Intra-sire correlations or regressions of offspring on dam as a method of estimating heritability of characteristics. *J. Anim. Sci.*, 1940: 293-301.
- 26) Fujio, Y. and A. Kijima (1987) "Genetic Bases of Fish Breeding", Japan Fisheries Resource Conservation Ass., Tokyo, pp. 100. (in Japanese)

- 27) Zar, J. H. (1999) "Biostatistical Analysis" Prentice-Hall, Upper Saddle River, pp. 663.
- 28) Roff, D. A. (1997) "Evolutionary Quantitative Genetics". International Thomson Publishing, Tokyo, pp. 493.
- 29) Lynch, M. and B. Walsh (1998) "Genetics and Analysis of Quantitative Traits", Sinauer Associates, Inc., Sunderland, pp. 980.
- 30) Tave, D. (1984) Genetics of dorsal fin ray number in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Copeia*, 1984: 140-144.
- 31) Kanno, Y. and H. Kawamura (1993) Estimations of heritability and inbreeding coefficient for early mortality rate in two strains of masu salmon in Hokkaido. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59: 1117-1120.
- 32) Choe, M-K. and F. Yamazaki (1998) Estimation of heritabilities of growth traits, and phenotypic and genetic correlations in juvenile masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Fish. Sci.*, 64: 903-908.
- 33) Koyama, T., Y. Sasaki, H. Ohmori, and N. Koide (1998) Estimates of heritability in rates and timing of smoltification for underyearling masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery*, 52: 55-63. (in Japanese with English abstract)
- 34) Kudo, H., N. Inoguchi, and A. Kijima (2002) Estimation of the heritability of parr mark numbers by correlation between masou trout (*Oncorhynchus masou*) parents and offspring. *Fish Genet. Breed. Sci.*, 32: 11-18. (in Japanese with English abstract)
- 35) Prabhakaran, V. T. and J. P. Jain (1987) Probability of inadmissible estimates of heritability from regression and half-sib analyses. *Biom. J.*, 29: 219-230.
- 36) Yamahira, K., T. E. Lankford, and D. O. Conover (2006) Intra- and interspecific latitudinal variation in vertebral number of *Menidia* spp. (Teleostei: Atherinopsidae). *Copeia*, 2006: 431-436.
- 37) Tave, D. (1984) Quantitative genetics of vertebrae number and position of dorsal fin spines in the velvet belly shark, *Etmopterus spinax*. *Copeia*, 1984: 794-797.
- 38) Kirpichnikov, V. S. (1981) "Genetic Bases of Fish Selection" (translated by G. G. Gause) Springer-Verlag, New York, pp. 410.
- 39) Hagen, D. W. (1973) Inheritance of numbers of lateral plates and gill rakers in *Gasterosteus aculeatus*. *Heredity*, 30: 303-312.
- 40) Sato, R., T. Azuma, and K. Muto (2006) Estimation of the heritability for growth rate in the Nikko strain rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using the individual identifying method with passive integrated transponder (PIT) tags. *Bull. Fish. Res. Agen.*, 16: 1-7. (in Japanese with English abstract)

父親内母子回帰法と半兄弟分析法によるサクラマスの 鰓耙数と脊椎骨数の遺伝率推定

安藤大成・真野修一・下田和孝・神力義仁・小出展久・中嶋正道

サクラマスの枝分かれ交配を行うことにより15家系を作出し、4計数形質(鰓耙数、腹椎骨数、尾椎骨数、脊椎骨数)の遺伝率の推定を行った。遺伝率の推定は、子の母親への父親内回帰法と半兄弟分析法によって計算した。また、半兄弟分析法は父親成分と雌親成分からそれぞれ遺伝率の算出を行った。その結果、遺伝率は0~1.38の範囲で推定された。子の母親への父親内回帰法による遺伝率と半兄弟分析法のうち母親成分から求めた遺伝率の推定値には有意な相関が見られた。腹椎骨数および脊椎骨数はいずれの遺伝率の推定値もほぼ同様の値を示したが、鰓耙数と尾椎骨数の遺伝率は推定方法により異なっていた。また、半兄弟分析法のうち父親成分から推定した遺伝率の標準誤差は大きく、推定方法による遺伝率の相違は母性効果ではなく、少数の雄親を用いたことによる偏りが原因と考えられた。母性効果が影響しないことが事前に判明している場合、子の母親への父親内回帰法は遺伝率推定の有効な手法となることが示唆された。

ミトコンドリア DNA D-loop 領域からみたキンギョの起源

木島 隆・二見邦彦・方波見弥穂・山根允文 (海洋大)・王 志勇 (集美大)
 黄 金田 (塩城工学院)・尾崎照道 (水総研セ)・坂本 崇・岡本信明 (海洋大)

Mitochondrial D-loop DNA Analysis of Chinese Crucian Carp Reveals the Maternal Origin of Goldfish

Takashi KIJIMA^{*1}, Kunihiro FUTAMI^{*1}, Miho KATABAMI^{*1}, Masafumi YAMANE^{*1},
 Zhi Yong WANG^{*2}, Jintian HUANG^{*3}, Akiyuki OZAKI^{*1,4}, Takashi SAKAMOTO^{*1}
 and Nobuaki OKAMOTO^{*1}

^{*1} Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology

^{*2} Fisheries College, Jimei University

^{*3} School of Chemical and Biological Engineering, Yancheng Institute of Technology

^{*4} National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency

Abstract

Goldfish was first domesticated in China and various morphological types have been produced by selective breeding over centuries. However, the genetic background including the origin of goldfish is still unclear. Here, we analyzed a part of the D-loop region of mtDNA sequences of 103 goldfish (15 breeds) and 319 Chinese crucian carp. All goldfish except shubunkin (hybrid between goldfish and Japanese crucian carp) possessed a single haplotype of mtDNA and were classified into *Carassius auratus auratus*. Chinese crucian carp collected from 11 locations around China showed 20 haplotypes and were classified into 2 groups (*C. a. auratus* and *C. a. gibelio*). The sequences of 6 Chinese crucian carp collected from the watershed of Yantze in Jiangsu, Zhejiang and Hunan were identical to that of goldfish. These results suggest that the goldfish originated from *C. a. auratus* in China and imply that goldfish appeared recently because no variation was observed in the mtDNA sequences of the goldfish breeds examined.

(accepted November 18, 2008)

キンギョの出現については、中国の古文献『本草綱目』に晋の時代の記述として赤鱗魚があり、少なくとも約1700年前には中国にキンギョが存在していたことが記されている¹⁾。日本へは、室町時代(文亀2年:1502)に渡来したとされている。キンギョには多くの品種が存在し、水産上最も育種に成功した魚の一つといえる。形態学的に他魚種には類を見ないほど多様性があり、それらは突然変異個体の選抜と品種間交雑によって作出・系統維持されてきたという特徴がある。

キンギョの起源に関しては、飼育品種からフナ様の個体が生じることや¹⁾、染色体のC-band染色およびアイソザイム分析から、中国産フナのダイ(鯽)

(*Carassius auratus auratus*)がキンギョの起源と考えられているが²⁻⁴⁾、キンギョの起源を遺伝情報に基づいて明らかにする目的で、キンギョの品種内やキンギョの起源種と考えられている中国産フナのDNA多型解析はなされていない。

近年、家畜の起源を探る研究が盛んに行われており⁵⁻⁷⁾、主にミトコンドリアDNA(mtDNA)のD-loop領域を用いて原産地を特定している⁵⁾。mtDNAは組換えが無く、母系遺伝する事が知られており、また、進化速度が核ゲノムDNAに比べて4~10倍程度速いことから^{8,9)}、分子系統学分野では広く解析に用いられている。日本産フナ属魚類については、D-loop中

連絡先: 〒108-8477 東京都港区港南4-5-7 東京海洋大学 海洋科学部 海洋生物資源学科 岡本信明

Tel: 03-5463-0547 Fax: 03-5463-0552 E-mail: nokamoto@kaiyodai.ac.jp

の超可変領域の配列解析により、35のハプロタイプが得られているが、それらの配列はキンギョとは明らかに異なり^{10, 11)}、日本産フナがキンギョの起源とは考えられない。

中国産フナの mtDNA については、RFLP を利用したもの¹²⁾以外で塩基配列の解析はされていないが、日本産フナと同様、同領域の解析で相当数の多型が検出されることが予想される。逆に、キンギョは古文獻に登場してから1700年程度しか経っておらず、DNA レベルの変異の蓄積が少ないと考えられる。したがって、中国産フナの mtDNA の多型を解析し、キンギョと相同性の高い個体を見出すことにより、キンギョの

起源ならびに原産地を特定できる可能性がある。

そこで本研究では、15品種103個体のキンギョと2亜種319個体の中国産フナの mtDNA D-loop 領域の塩基配列を決定し、系統類縁関係を調べた。

材料と方法

供試魚 東京海洋大学水圏科学フィールド教育研究センター吉田ステーションより供与された日本産キンギョ 15品種58個体、および民間の金魚輸入業者より購入した中国産ワキン45個体を使用した。中国産フナ319個体は Table 1 に示した地域から収集した。キンブナ5個体およびオオキンブナ1個体はペットショップよ

Table 1. Sampling locations of Chinese crucian carp

Place*	Administrative division	Haplotype	Accession No.	Number of analyzed samples	Morphological classification**
Beijing	DCM#	HT-201	AB466315	3	<i>C. a. gibelio</i>
Shanghai	DCM	HT-201	AB466315	120	-
Dongguan	Guangdong	HT-201	AB466315	105	-
Guangzhou	Guangdong	HT-201	AB466315	20	-
Wuhan	Hubei	HT-201	AB466315	2	<i>C. a. gibelio</i>
Dongting Lake●	Hunan	HT-101	AB466297	2	-
		HT-115	AB466311	14	-
Sheyang●	Jiangsu	HT-101	AB466297	2	<i>C. a. auratus</i>
		HT-104	AB466300	1	-
		HT-105	AB466301	8	-
		HT-108	AB466304	1	-
		HT-109	AB466305	1	-
		HT-113	AB466309	1	-
		HT-201	AB466315	3	-
Yancheng●	Jiangsu	HT-101	AB466297	1	-
		HT-103	AB466299	1	-
		HT-104	AB466300	1	-
		HT-105	AB466301	2	-
		HT-110	AB466306	2	-
		HT-112	AB466308	1	-
		HT-114	AB466310	3	-
		HT-201	AB466315	2	<i>C. a. gibelio</i>
Hangzhou	Zhejiang	HT-102	AB466298	1	-
		HT-105	AB466301	1	-
		HT-116	AB466312	1	-
		HT-201	AB466315	1	-
Jiaxing●	Zhejiang	HT-101	AB466297	1	-
		HT-110	AB466306	1	-
		HT-118	AB466314	1	-
		HT-301	AB466316	1	-
Quzhou	Zhejiang	HT-105	AB466301	2	-
		HT-106	AB466302	1	-
		HT-107	AB466303	1	-
		HT-111	AB466307	6	-
		HT-115	AB466311	1	-
		HT-116	AB466312	1	-
		HT-117	AB466313	1	-
		HT-118	AB466314	1	-
		HT-201	AB466315	1	-
Total				319	

* Places (●) where individuals with identical mtDNA sequences to goldfish (HT34) were detected.

** Morphological classification was performed by Dr. Jian-Fang Gui, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences; Symbols (-) indicate individuals that were not classified.

DCM, Direct-controlled municipality.

り購入し、その形態や背鰭の軟条数からキンブナおよびオオキンブナであると確認した。また、これらの個体はデータベース上の日本産フナの配列とも比較・確認した。

DNA の抽出と PCR サンプルの鱗または筋肉よりフェノール、クロロホルム法、または Puregene Core Kit A (QIAGEN 社) で DNA を抽出し、Murakami ら¹⁰⁾により設計されたプライマー (5'-TAA AAG CAT CGG TCT TGT AA-3'および5'-CCT GAA ATA GGA ACC AGA TG-3') を用いて PCR を行い、mtDNA D-loop 領域の前半部 316~319 bp を増幅した。PCR の条件は Murakami ら¹⁰⁾に従った。

シーケンス分析 得られた PCR 産物をポリエチレングリコール沈殿、または ExoSAP-IT (GE ヘルスケア社) 処理をし、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社) によりサイクルシーケンスを行った。シーケンス産物をキットの説明書に従って Ethanol/EDTA 法で精製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer または ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (いずれも Applied Biosystems 社) で解析した。配列は、MEGA4¹³⁾を用いてマルチプルアラインメントをおこない、近隣結合法により分子系統樹を作成した。遺伝的距離は Maximum Composite Likelihood model により計算した。

結 果

キンギョとフナの mtDNA の比較 15品種103個体のキンギョについて、mtDNA の D-loop 領域中の超可変領域 (nt 1-320) の塩基配列を解析したところ、2つのハプロタイプが得られた (Fig. 1)。BLASTN¹⁴⁾を用いて、EMBL/GenBank/DDBJ に登録されている配列と同一性検索を行ったところ、14品種100個体のハプロタイプが既報のキンギョのハプロタイプ HT34 (DDBJ accession No. AB052332) と100%の同一性を示した。また、中国産のフナであるダイ (鯽) crucian carp とその体色変異体であるゲンダイ (金鯽) gold crucian carp (DQ984962など) とは97~100%と高い同一性を示し、インダイ (銀鯽、ギベリオブナ) silver crucian carp (EF633639など) とも96~99%の同一性を示した。また、1品種3個体 (シュブンキン) から得られたハプロタイプ HT-b (AB429300) は、データベース上のキンブナ (*Carassius auratus* subsp.2) の複数の配列 (AB079934など) と99%の同一性を示した。

これら2つのハプロタイプ (HT34、HT-b) を、データベース上で同一性の高かった配列と合わせてマルチプルアラインメントをおこない、近隣接合法による分子系統樹を作成したところ、キンギョの HT34 はデータベース上のキンギョおよび中国産フナと同一のク

レードに含まれ、シュブンキン (HT-b) はキンブナと同じクレードに含まれた (Fig 2)。なお、今回用いた mtDNA の D-loop 領域では、キンブナ (*Carassius auratus langsdorfi*)、ニゴロブナ (*Carassius auratus grandoculis*)、ナガブナ (*Carassius auratus* subsp.1)、オオキンブナ (*Carassius auratus buergeri*) を区別することはできなかった。

中国産フナの mtDNA を用いたキンギョの原産地の探索 mtDNA のシーケンス解析の結果、319個体の中国産フナから20のハプロタイプが得られた (AB466297~AB466316)。ハプロタイプ間の同一性は、94.7~99.4%であった。これに今回得たキンギョの配列データを加えて分子系統樹を作成したところ、中国産フナは大きく2つのクレード、ダイ (*Carassius auratus auratus*) とインダイ (*Carassius auratus gibelio*) に分かれた (Fig 3)。ダイとインダイの間の同一性は94.7~96.2%であった。また、浙江省嘉興から得られた1個体 (HT-301) は、データベースの DQ984983 (ゲンダイ, *Carassius auratus auratus*) と EF633640 (インダイ, *Carassius auratus gibelio*) の両方に100%の同一性を示したため、本研究では unclear subsp. として扱った。キンギョは2亜種の中国産フナのうち、ダイと同じクレードに含まれ、キンギョの祖先種がダイであることが示された。なお、江蘇省、浙江省および湖南省から得られた6個体のダイ (HT-101) は、キンギョと100%の同一性を示した。

考 察

解析した15品種のキンギョ mtDNA のうち14品種がまったく同一のハプロタイプ (HT34) を示したことから、キンギョは多系統起源ではなく、少なくとも母系祖先は1つであり、mtDNA レベルにおいて品種間で遺伝的分化が生じていないことが判った。また、系統解析の結果、HT34が中国産フナのダイのクレード上に含まれたこと、およびダイの中にキンギョと100%の同一性を示す個体が存在したことから、キンギョはダイとインダイの共通祖先から生じたものではなく、中国産フナがダイとインダイに分化した後のダイから生じたものと考えられた。また、mtDNA の D-loop 領域は全ゲノム中でも最も進化速度が速い部位の1つとされているにもかかわらず、本研究で解析した配列に変異が見られなかったということは、キンギョがダイから生じた後、比較的短い時間しか経過していないことが推測される。ダイの mtDNA の進化速度が不明であるので断定することはできないが、キンギョの出現が1700年前という古文書の記述を大きく遡るものではないと考えられた。

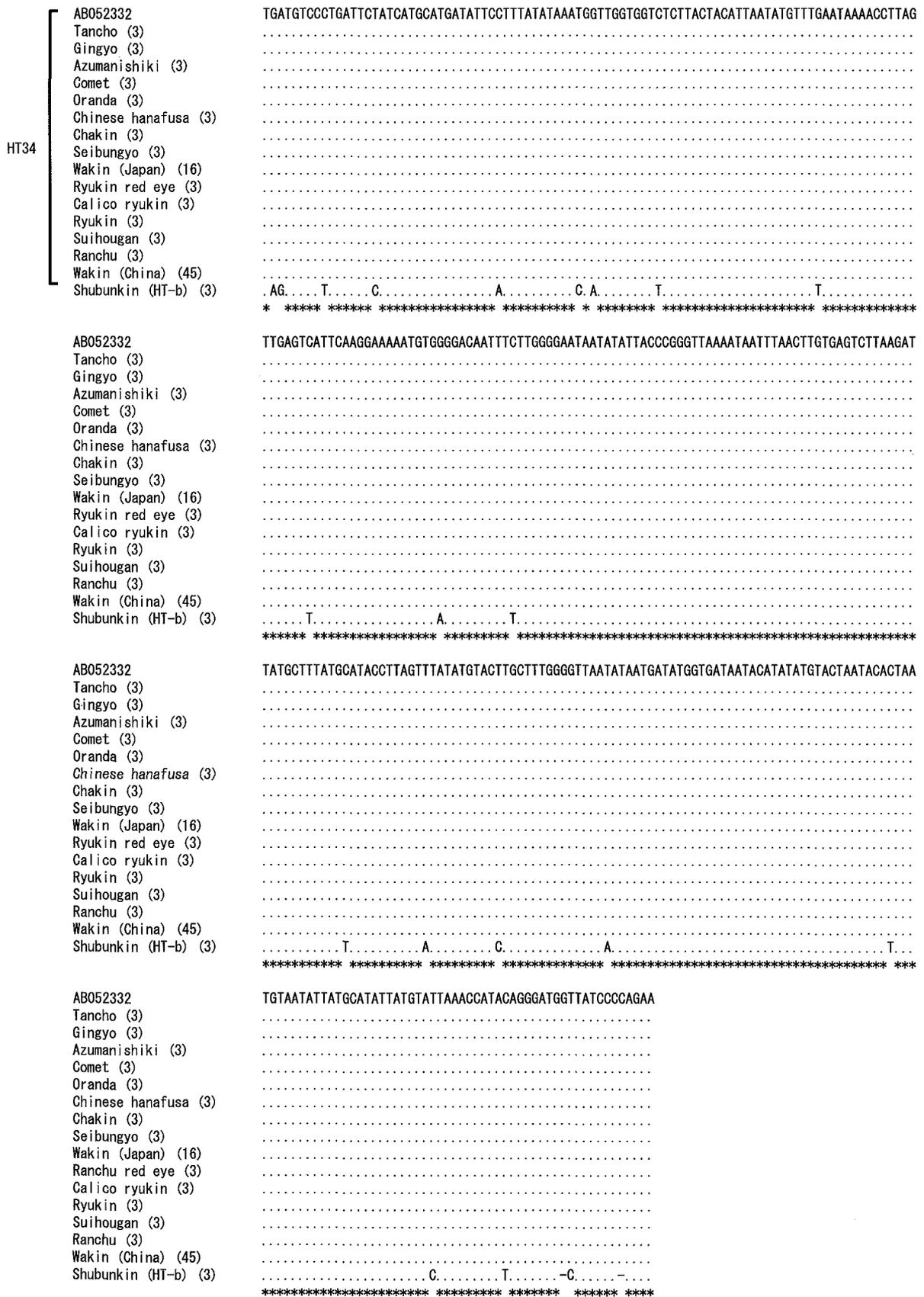


Fig. 1. Multiple alignment of mtDNA sequences of 15 breeds of goldfish. The forward and reverse primers of the D-loop region of mtDNA used in this study were reported previously¹⁰. The names of breeds are shown as the current name in Japan. Nucleotides identical to those of the reported sequence of goldfish (AB052332) are indicated by dots (.). Asterisks (*) represent identity among the 15 breeds. Gaps (-) are introduced to optimize identity. Numbers in parentheses indicate the number of analyzed samples.

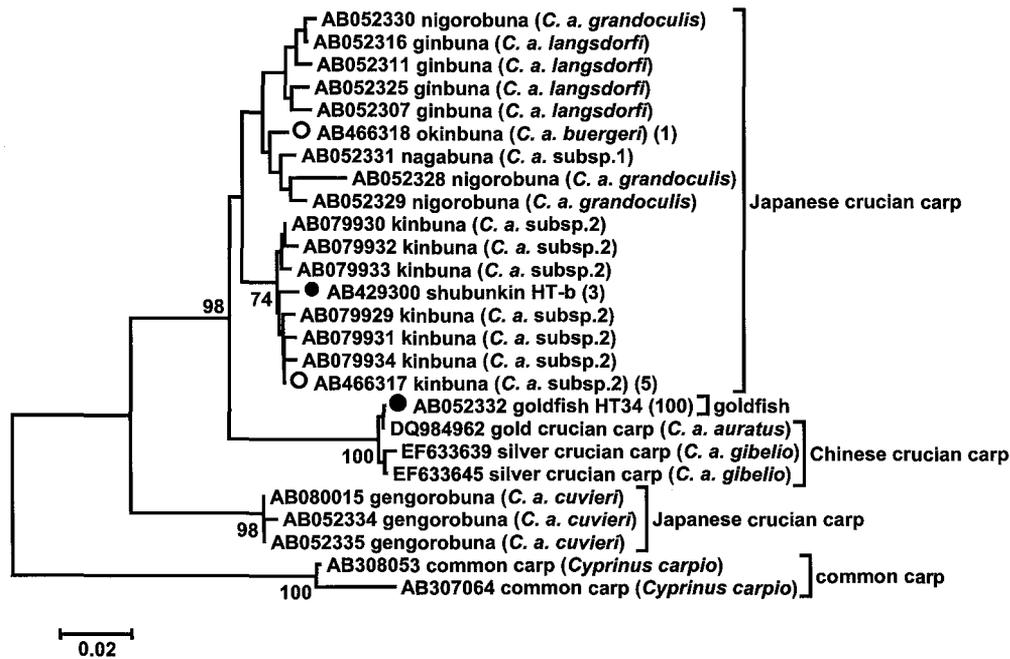


Fig. 2. A neighbor-joining tree of goldfish and Japanese crucian carp based on the D-loop region of mtDNA sequences. Scale bar is calibrated in nucleotide replacements per site. Regions including a gap were deleted. Reliability of the tree-topology was evaluated by a bootstrap analysis with 500 replicates, using MEGA4 software. Only the values >70% are shown. Common carp were used as out-groups. Okinbuna and kinbuna which were indicated by opened circles were purchased from an aqua-pet shop. Shubunkin produced by hybridization between goldfish and Japanese crucian carp is a breed of goldfish. Haplotypes HT34 and HT-b were indicated by closed circles. Numbers in parentheses indicate the number of analyzed samples.

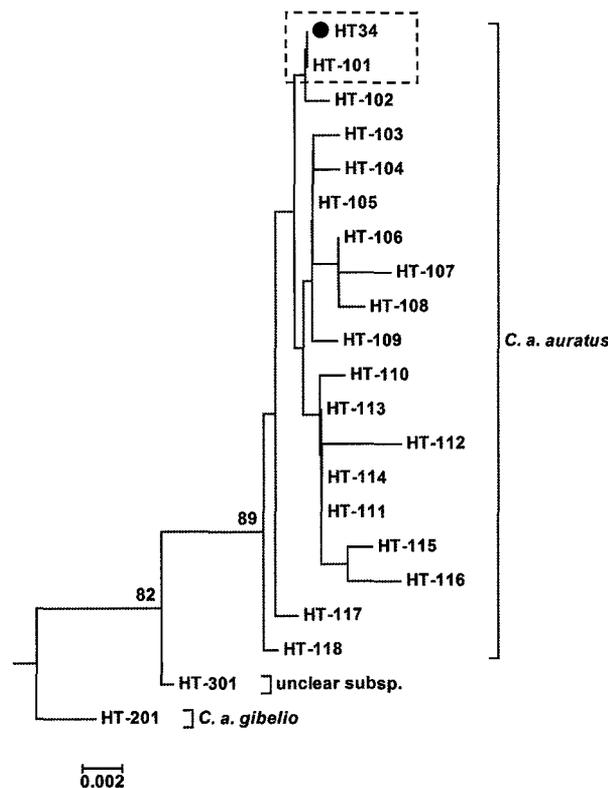


Fig. 3. A neighbor-joining tree of goldfish and Chinese crucian carp (*C. a. auratus* and *C. a. gibelio*) based on the D-loop region of mtDNA sequences.

Scale bar is calibrated in nucleotide replacements per site. Regions including a gap were deleted. Reliability of the tree-topology was evaluated by a bootstrap analysis with 500 replicates, using MEGA4 software. Only the values >70% are shown. Names indicate the haplotypes of samples. Common carp and Japanese crucian carp, gengorobuna (*Carassius cuvieri*) were used as out-groups. Box indicates fish whose sequences are identical to sequence of goldfish (closed circle). Numbers in parentheses indicate the number of analyzed samples.

一方、シュブンキンにおいては別のハプロタイプ (HT-b) が検出され、系統解析の結果では、それはキンブナのクレードに含まれた。シュブンキンは日本でキンギョとフナの交雑により作出された品種であるとされており¹⁾、シュブンキンの母系起源にキンブナが関与していることがDNAの配列からも明らかとなった。

319個体の中国産フナについても同様に解析したところ、キンギョのHT34とまったく同じハプロタイプ (HT-101) を示すザイが6個体得られた。これらはキンギョと共通の母系祖先を持つ可能性がある。さらにこれらのザイは、江蘇省、浙江省および湖南省からサンプリングした個体であり、中国の地図と照らし合わせると、キンギョの起源となった個体群は長江流域に分布していると思われる。中国の古典文献の書誌学的研究では、キンギョの発祥の地は長江下流域の浙江省近辺とされており、本研究の結果はこれと一致する。しかし、本研究で解析に用いたmtDNAは、完全母系遺伝をするという性質上、父性がわからないため、純粋な種と雑種またはその子孫を必ずしも区別することができない¹⁵⁻¹⁷⁾。中国では、キンギョを含むフナを天然水系に放す習慣があり¹⁾、本研究で得たキンギョと同一のmtDNAのハプロタイプを持つザイは、キンギョとの交雑によりキンギョと同一のmtDNAのハプロタイプを持つに至った可能性が残されている。原産地のより正確な特定には、地域ごと（特に江蘇省、浙江省および湖南省）の検査個体数を増やし、ハプロタイプの分布様式（系統地理解析）によりmtDNAの起

源を推定することや、核DNAマーカーを利用することなどが課題として残された。

要 約

キンギョは中国産フナの改良種として知られ、多くの品種が存在するが、遺伝情報などを基に、キンギョの祖先・原産地を特定した報告はない。本研究では、15品種103個体のキンギョについて、ミトコンドリアDNAのD-loop領域を解析した。その結果、日本産フナとキンギョの交雑によって作出されたシュブンキンを除く100個体すべての配列がまったく同一であり、データベース上のキンギョの配列とも100%一致した。さらに、中国の11地点から2亜種319個体のフナを採集して解析したところ、20のハプロタイプが存在し、それらは大きく2つのクレード、ザイ (*Carassius auratus auratus*) とインザイ (*Carassius auratus gibelio*) に分類された。そのうち長江流域の江蘇省、浙江省および湖南省から採集されたザイに見られたハプロタイプの1つ（6個体）がキンギョの配列と100%一致した。これらの結果から、キンギョの起源は中国産フナのザイに由来しており、その出現はキンギョについて最初に記述した1700年前の中国古文獻の年代を大きく遡るものではないと考えられた。

謝 辞

本研究の一部は株式会社神畑の援助を受けて行ったものであり、ここに記して御礼申し上げる。

文 献

- 1) 松井佳一 (1935) 科学と趣味から見た金魚の研究, 弘道閣, 東京, 448 p.
- 2) Ojima, Y., S. Hitotumachi and S. Makino (1978) Cytogenetic studies in lower vertebrate. Transactions of the Japan Academy, 42: 62-66.
- 3) 小島吉雄 (1983) 「金魚の起源と遺伝」魚類細胞遺伝学, 緑書房, 東京, pp. 14-20.
- 4) 小島吉雄 (1988) 「日本のフナのはなし」魚のはなし, 技報堂出版, 東京, pp. 24-38.
- 5) Savolainen, P., Y. P. Zhang, J. Luo, J. Lundeberg and T. Leitner (2002) Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. Science, 298: 1610-1613.
- 6) Joshi, M. B., P. K. Rout, A. K. Mandal, C. Tyler-Smith, L. Singh and K. Thangaraj (2004) Phylogeography and origin of Indian domestic goats. Molecular Biology and Evolution, 21: 454-462.
- 7) Jansen, T., P. Forster, M. A. Levine, H. Oelke, M. Hurler, C. Renfrew, J. Weber and K. Olek (2002) Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. Proceedings of the National Academy of Science U S A., 99: 10905-10910.
- 8) Greenburg, B. D., J. E. Newbold and A. Sugino (1983) Intra specific nucleotide sequence variety surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. Gene, 21: 33-49.
- 9) Aquadro, C. F. and B. D. Greenberg (1983) Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequence from seven individuals. Genetics, 103: 287-312.
- 10) Murakami, M., C. Matsuba, and H. Fujitani. (2001) The maternal origin of triploid ginbuna (*Carassius auratus*

-
- langsdorfi*): phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing. *Genes and Genetic Systems*, 76: 25-32.
- 11) Iguchi, K., G. Yamamoto, N. Matsubara and M. Nishida (2003) Morphological and genetic analysis of fish of a *Carassius* complex (*Cyprinidae*) in lake kasumigaura with reference to taxonomic status of two all-female triploid morphs. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 351-357.
 - 12) Luo, J., Y. P. Zhang, C. L. Zhu, W. H. Xiao and S. Y. Huang (1999) Genetic diversity in crucian carp (*Carassius auratus*). *Biochemical Genetics* 37(9-10): 267-79.
 - 13) Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
 - 14) Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
 - 15) Bensch, S., A. Helbig, M. Salomon and I. Seibold (2002) Amplified fragment length polymorphism analysis identifies hybrids between two subspecies of warblers. *Molecular Ecology*, 11: 473-481.
 - 16) Glemet, H., P. Blier and L. Bernatchez (1998) Geographical extent of arctic char (*Salvelinus alpinus*) mtDNA introgression in brook char populations (*S. fontinalis*) from eastern Quebec, Canada. *Molecular Ecology*, 7: 1665-1662.
 - 17) Young, W., C. Ostberg, P. Keim and G. Thorgaard (2001) Genetic characterization of hybridization and introgression between anadromous rainbow trout (*Onchorinchus mykiss*) and coastal cutthroat trout (*O. clarki clarki*). *Molecular Ecology*, 10: 921-930.

成長ホルモン遺伝子を導入した遺伝子組換えアマゴ
Oncorhynchus masou ishikawae の作出

名古屋博之 (水研セ・さけますセ、近大・院農)・岡本裕之 (水研セ・養殖研)
正岡哲治 (水研セ・養殖研)・太田博巳 (近大・院農)
佐藤俊平 (水研セ・さけますセ)・荒木和男 (水研セ・養殖研)

Transgenic Amago Salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* Produced by
Microinjection of a Growth Hormone Gene

Hiroyuki NAGOYA^{*1,3}, Hiroyuki OKAMOTO^{*2}, Tetsuji MASAOKA^{*2},
Hiromi OHTA^{*3}, Shunpei SATO^{*1} and Kazuo ARAKI^{*2}

^{*1} National Salmon Resources Center, Fisheries Research Agency

^{*2} National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency

^{*3} Graduate School of Agriculture, Kinki University

Abstract

We microinjected a construct containing a full length growth hormone gene driven by metallothionein-B promoter derived from the sockeye salmon into amago salmon inseminated eggs to enhance the growth performance. The hatching rates of microinjected eggs ($60.8 \pm 11.9\%$) were significantly lower than those of the non-injected controls ($81.1 \pm 15.8\%$). Seven months after fertilization, 13 transgenic fish were identified. Of these, 2 males and 2 females survived and matured 2 years after fertilization. The 4 fish were crossed to produce a first generation family line (F1), and 40 transgenic fish were then obtained. Of these, 3 males matured 1 year after fertilization, and the growth hormone gene from sockeye salmon was detected in the spermatozoa of all three. One of the 3 males was crossed with a non-transgenic female to produce a second generation (F2). The exogenous growth hormone gene was detected in six of ten F2 fish. These transgenic amago salmon will be useful as experimental animals for assessing the risks associated with rearing transgenic fish and for examining the safety of transgenic fish as a food source.

(accepted November 26, 2008)

魚類の遺伝子導入技術の研究は1971年に最初の試みがなされ¹⁾、1980年代中頃からはいろいろな魚種を用いて研究が始められた (キンギョ²⁾、ニジマス³⁾、ドジョウ⁴⁾、アメリカナマズ⁵⁾、大西洋サケ⁶⁾)。Devlin *et al.*⁷⁾はベニザケのメタロチオネインBプロモーターの下流に成長ホルモン遺伝子を結合したプラスミドをギンザケに導入し、非遺伝子導入対照群に比べ成長が40倍以上になったことを報告している。成長ホルモン遺伝子を導入した遺伝子組換え魚は成長促進による生産効率の向上が期待できるため、多くの養殖対象

魚種でその技術開発が行われている (大西洋サケ⁶⁾、ティラピア⁸⁾、コイ⁹⁾)。また、近年は食品としての安全性について調査をした論文も報告されている^{10,11)}。このような背景から、海外で生産された遺伝子組換え魚が国内に導入される可能性も考えられるようになってきた。このため、遺伝子組換え魚が日本国内の自然水域へ逃避した場合、どのような影響を環境に及ぼすのか、そのリスクを評価するとともに、そのリスクを避けるための適切な管理方法を構築していく必要がある¹²⁻¹⁵⁾。しかし、このような時間を要する研究をする

ために、対象魚が輸入される前に各企業から実験材料としてそれぞれの魚の提供を受けることは極めて困難であることが予想される。そのため、日本における遺伝子組換え魚の環境へのリスク評価を行うためには、独自に日本に生息する魚種を用いて組換え魚を作出する必要がある。

本報告では、サケ科の在来種であるアマゴ (*Oncorhynchus masou ishikawae*) を用い、Devlin *et al.*⁷⁾ が開発したベニザケメタロチオネイン B プロモーターの下流に同種の成長ホルモン遺伝子を結合したプラスミドを遺伝子導入することを試み、その成功率を検討するとともに、遺伝子導入魚の成長率や生物学的特性について検討した。

材料と方法

受精 実験には養殖研究所玉城庁舎で継代飼育されているアマゴを用いた。排卵した雌の腹部を押して卵を絞り、プラスチック容器に収容した。卵を収容後すぐにプラスチック容器にふたをして、使用するまで冷蔵庫 (4℃) に保管した。雄から精液を絞り、運動活性が高いことを顕微鏡下で確認後、同様にプラスチック容器に収容し、冷蔵庫 (4℃) に保管した。乾導法により卵に精液を加えて攪拌後、洗卵用溶液 (114.6mM NaCl, 3.4mM KCl, 2.7mM CaCl₂·2H₂O, 2.4mM NaHCO₃) を加えて1分間静置した後、この洗卵液を数回取り換え、余分な精液を洗い流した。卵膜の硬化と発生の進行を抑制するため、媒精した卵は洗卵液に浸漬したまま容器を氷上に置き、マイクロインジェクションに供した。

導入遺伝子 Devlin *et al.*⁷⁾ が開発したベニザケメタロチオネイン B プロモーター¹⁶⁾ の下流にベニザケ成長ホルモン遺伝子¹⁷⁾ を連結したプラスミドを使用した。このプラスミドを制限酵素 Sac II (TaKaRa, Tokyo) で切断し、直鎖状にした。このプラスミドをブリリアントブルー FCF (Brilliant Blue FCF, 東京化成) を0.04%含むReverse PBS (NaCl 0.16 g, KCl 10.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g, KH₂PO₄ 0.2 g/liter) で最終濃度200 ng/ μ lになるように調整した。

マイクロインジェクション 90 mm のシャーレに3%寒天を厚さ4~6 mm になるように入れて固め、卵の大きさに合わせて4~6 mm のポンチで穴を開けた。このシャーレの中に冷やしておいた洗卵液を加え、穴の中に受精した卵を1粒ずつ置いた。実体顕微鏡下で、卵門が上を向くようにピンセットで卵を回転させ、マイクロインジェクション法¹⁸⁾ によって、卵門管を通して卵細胞質に遺伝子溶液を0.2~0.3 μ l ずつ注入した。これらの操作は媒精後2~3時間以内に

行った。その後、インジェクションした卵は水温15℃に設定した完全循環水槽内の孵化槽に移した。また、マイクロインジェクションを行わなかった残りの卵を一般の孵化槽に収容し、対照群とした。

飼育 マイクロインジェクションを行った個体の飼育は、飼育水が水槽 (約23 L × 10個、2基)、濾過槽、紫外線滅菌装置及び調温装置 (15℃設定) を通って循環する飼育システムを用いた。日照時間は調整せず、自然光下で飼育を行った。受精5~7ヶ月後に次項で示す方法により外来遺伝子の導入の有無を判定し、導入されていない個体はすべて廃棄した。外来遺伝子が確認された個体は8ヶ月以降、各水槽に1尾ずつ収容して飼育した。一方、インジェクションを行わなかった対照群の魚は受精後7ヶ月までは屋内飼育施設に設置した飼育水槽を用い、自然光および流水 (水温15℃) により飼育した。その後、屋外池 (水温14~19℃) に移して飼育を継続し飽食給餌を行った。

遺伝子組換えアマゴの選別 受精後5~7ヶ月の個体の中から、体重の重い個体 (平均体重28.7±0.41 g, n=563) を選んで脂鱗を切除し、フェノール・クロロホルム法¹⁹⁾ を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA は TE バッファー 500 μ l を加え、DNA が均一に溶けるまで攪拌した後 DNA 濃度を測定し、サンプル試料とした。

ベニザケメタロチオネイン B プロモーターと成長ホルモンゲノム遺伝子第3イントロンの配列からプライマー MtBPro (5'-CCTTAATTAATCGATGATCAACGTGGTAAT-3') と OnInC (5'-AGCAGAGTGGAACTGTCACGATTTGACACT-3') を設計し、PCRを行った。PCR反応は94℃, 5分の熱変性後、94℃, 30秒の熱変性、57℃, 30秒のアニーリング、72℃, 1分の伸長反応を35サイクル行い、最後に72℃, 5分の伸長反応を行った。PCR産物はアガロース電気泳動を行い、増幅 DNA 断片を検出した。

F1の作出 遺伝子組換えアマゴと判断した個体13尾の内、受精2年後で成熟した個体4尾 (雌2尾、雄2尾) と非遺伝子組換えアマゴを用いて通常の方法によって人工授精を行い、F1を作出した。

F2の作出 F1個体の内、1年で成熟し、遺伝子組換え個体であることを確認したアマゴ雄と非遺伝子組換えアマゴ雌を用いて人工授精を行い、F2を作出した。

統計的処理 測定値は平均値±標準偏差で示した。マイクロインジェクションの有無による孵化率の比較は、対応のあるt検定により行った。

Table 1. Fertilization rate and hatching rate of microinjected amago salmon (M) and uninjected amago salmon (C) eggs. Survival rate and detected rate of transgene of the amago salmon fish were also shown in the table

Trial No.		Fertilization rate (%)	Hatched No.	Hatching rate (%)	Survival No.	Survival rate (%)*	Examined No.	Detected No.	%
1	M	97.5	60	60.6	53	53.5	53	1	1.9
	C		275	96.5					
2	M	97.7	314	75.1	264	63.2	48	0	0
	C		162	94.2					
3	M	98.2	235	76.3	221	71.8	48	0	0
	C		110	98.2					
4	M	92.7	273	65.8	164	39.0	48	0	0
	C		227	74.9					
5	M	99.0	73	58.4	43	34.4	43	2	4.7
	C		286	96.9					
6	M	92.5	421	71.1	284	48.0	48	1	2.1
	C		336	81.0					
7	M	81.4	413	60.4	330	48.2	48	3	6.3
	C		261	77.2					
8	M	89.2	186	45.1	155	37.6	48	2	4.2
	C		415	79.8					
9	M	76.1	247	42.3	100	17.1	48	2	4.2
	C		143	64.4					
10	M	95.5	402	65.0	204	33.0	48	2	4.2
	C		395	94.3					

* Survival rate were judged with No. of survival from 3 to 5 months after fertilization.

** ND means no data.

結 果

マイクロインジェクションの生存率への影響 異なるアマゴの雌雄10組の交配による媒精卵を用い、マイクロインジェクションを行った。また、各組み合わせの媒精卵に対し、マイクロインジェクションを行わず、そのまま通常の孵化槽に収容して飼育したものを対照群とした。各組み合わせの受精成績を Table 1 に示した。

マイクロインジェクションを行った卵の孵化率は42.0%~75.6%を示し、その平均値は $60.8 \pm 11.9\%$ であった。また、対照群の孵化率は平均 $81.1 \pm 15.8\%$ (44.3%~98.3%)を示したが、両者には統計的に有為な差が認められた。

PCR 反応による遺伝子導入アマゴの検出 受精5~7ヶ月後に各魚体の脂鱗から抽出したDNAを鋳型としたPCRにより、遺伝子導入の有無を調べた。インジェクションを行わなかったアマゴのPCR反応では特異的な増幅は認められなかった (Fig. 1)。マイクロインジェクションを行った10組の組み合わせから各43~53尾を選びPCR反応を行ったところ、長さ約1Kbの特異的なバンドが得られるサンプルが全10組のうち7組に出現し、その合計尾数は13尾であった。導入遺伝子を確認した7組の内、検出率は最大で6.3%

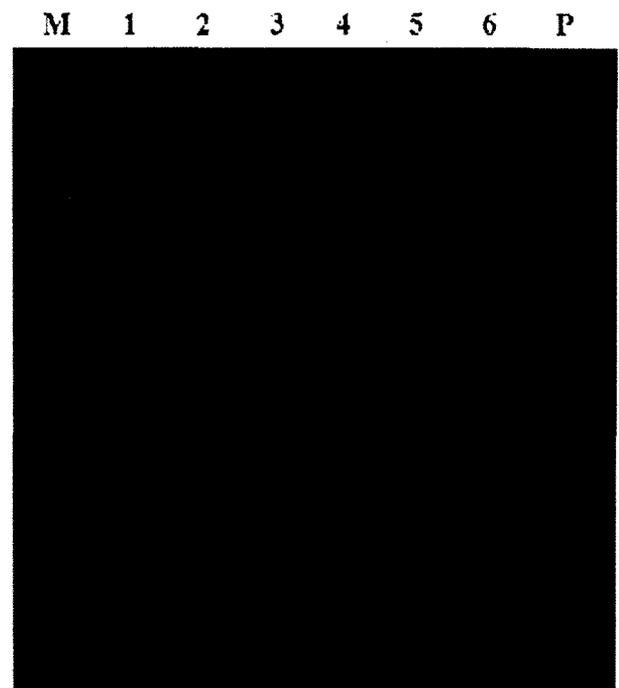


Fig. 1. PCR product amplified from genomic DNA extracted from adipose fin tissue of transgenic (No. 6) and non-transgenic amago salmon (No. 1-5) using a primer set: MtBPro and OnInC. M indicates DNA size marker (λ -Hind III digest). P shows that PCR product amplified from plasmid vector pOnMtGH1 used as transgene to amago salmon.

を示した (Table 1)。また、導入遺伝子が確認された個体は、各実験区の中で特に体長や体重が大きいという傾向は認められなかった。

遺伝子組換えアマゴの飼育結果 導入遺伝子が検出された13尾のみを残し、PCRで検出されなかった個体および調査をしなかった個体は全て殺処分後、滅菌・廃棄した。

飼育を続けた13尾のうち、受精後13ヶ月までに4尾が死亡した。生存した9個体の受精後13ヶ月時の体重と同時期に受精した非遺伝子組換えアマゴから、ランダムに選んだ20尾の体重分布を Fig. 2 に示した。導入を確認した個体9尾中5尾の体重は対照群で最大の個体の体重を上回った。残り4尾の内、3尾は対照群の平均と同程度、1尾は平均以下であった。このときの平均体重は遺伝子組換えアマゴが318.1 g ±

150.1 g (n=9)、コントロールは188.5 g ± 50.9 g (n=20) であった。これらの遺伝子組換えアマゴは受精1年後には成熟しなかった。

さらに翌年の秋まで飼育を続けた結果 (24ヶ月齢)、雄2尾 (Transgenic 1: 体重463 g、Transgenic 2: 体重664 g)、雌2尾 (Transgenic 3: 体重320 g、Transgenic 4: 体重366 g) の合計4尾が生存し、成熟した。残りの5個体は成熟期までに斃死した。成熟した2個体の雄の精子からDNAを抽出し、MtBProとOnInCプライマーを用いてPCRを行った結果、1尾 (Transgenic 1) から導入遺伝子が検出された (Fig. 3)。

F1の作出結果 成熟した雌雄4尾と非遺伝子導入魚の雌2尾 (Non-transgenic 1: 体重492 g、Non-transgenic 2: 体重555 g) を用いて Table 2 に示す組み合わせで交配を行った。

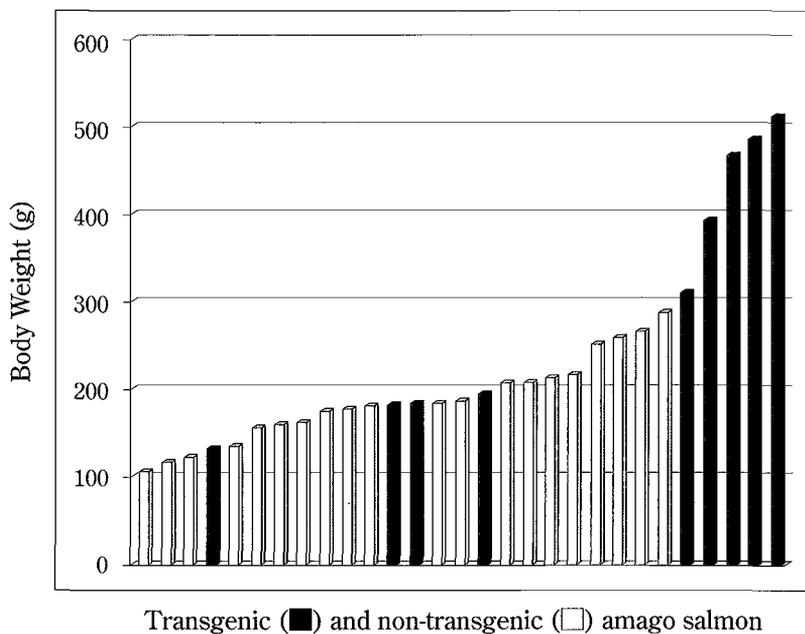


Fig. 2. Distribution of body weight of amago salmon 13 months after fertilization. Transgenic fish were identified by analyzing the DNA from adipose fin tissue by PCR. Non-transgenic control fish were reared in the different aquarium system.

Table 2. Crossings for the production of F1 between transgenic males (Transgenic 1 and 2), and non-transgenic females (Non-transgenic 1 and 2) or transgenic females (Transgenic 3 and 4)

Cross No.	male	female	Fertilization Rate (%)	1st selection (Just hatching)			2nd selection (for 6 months after hatching)			
				Examined No.	Detected No.		Examined final No.	Detected No.		Detected rate %
					+	-		+	-	
1	Transgenic 1	Non-transgenic 1	100	24	0	24	ND*			
2	Transgenic 1	Non-transgenic 2	100	24	0	24	815	1	814	0.1
3	Transgenic 1	Transgenic 3	100	24	0	24	ND			
4	Transgenic 1	Transgenic 4	83.3	24	1	23	549	39	510	7.1
5	Transgenic 2	Transgenic 3	90	24	0	24	ND			

*ND means no data.

これらの受精卵が孵化した直後に各交配区から24尾を取り上げ、DNAを抽出し、PCRによって導入遺伝子の有無を調べた。その結果、Transgenic 1 (♂)とTransgenic 4 (♀)との交配区でのみ815個体調べのうち、1尾の遺伝子組換えアマゴが検出された (Table 2、Fig. 3)。

次に、精子から導入遺伝子が確認された Transgenic 1 を用いた交配実験のうち、雌親魚に非遺伝子導入個体雌 (Non-transgenic 2) を用いた組み合わせで孵化6ヶ月後まで生き残ったすべての個体 (n=815) と、雌親魚に遺伝子導入個体 (Transgenic 4) を用いた組み合わせで同様に孵化6ヶ月後まで生き残ったすべての個体 (n=549) の脂鱗からDNAを抽出し、PCRによる導入遺伝子の検出を行った。その結果、Non-transgenic 2の雌との組み合わせからは1個体 (検出率0.1%)、Transgenic 4の雌との組み合わせからは39個体 (検出率7.1%) の遺伝子導入個体が検出された。

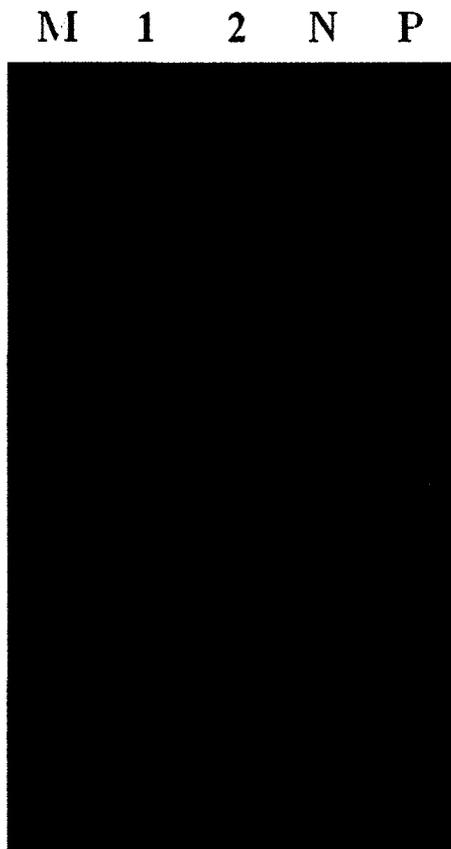


Fig. 3. PCR amplification of DNA extracted from spermatozoa DNA of matured amago salmon using a primer set: MtBPro and OnInC. Genomic DNA of No. 1 and No. 2 were extracted from spermatozoa of individuals that matured 2 years after fertilization. The amplified fragment represents a part of promoter and exogenous growth hormone DNA fragment. M indicates DNA size marker (λ -Hind III digest). P shows that PCR product amplified from plasmid vector pOn-MtGH1 used as transgene to amago salmon.

F1で遺伝子導入を確認した40個体を完全循環水槽で飼育を続けたところ、3尾の雄が1年で成熟した。この3尾の雄の精子のいずれからも導入遺伝子が確認された (Fig. 4)。

F2の作出結果 精子から導入遺伝子が確認された F1雄3尾のうちの1尾 (体重809 g) と非遺伝子組換えアマゴ雌の交配によって F2を作出したところ、孵化した稚魚の10尾中6尾から導入遺伝子が検出された (Fig. 5)。

考 察

本研究では、受精後の卵膜の硬化を防ぐため、媒精後、やや低張な洗卵液中に卵を保持し、マイクロインジェクションを行った後、通常の飼育水に戻した。マイクロインジェクションを行った10組の実験区の孵化率は、1組を除き、対照群より低い結果が得られた。対照群では孵化率が90%を超えた実験区もあったことから、接水前の洗卵液での保持が卵の発生率を低下させる可能性は低いと考えられた。したがって、マイクロインジェクション操作あるいは導入遺伝子によって孵化率が低下したと考えられた。

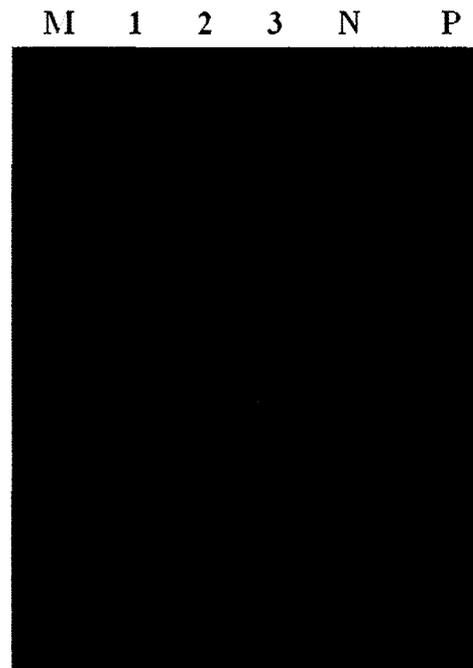


Fig. 4. PCR amplification of DNA extracted from spermatozoa of F1 transgenic amago salmon using a primer set: MtBPro and OnInC. The amplified fragment represents a part of promoter and exogenous growth hormone DNA fragment. These transgenic male amago salmon matured at one year of age. M indicates DNA size marker (λ -Hind III digest). P shows that PCR product amplified from plasmid vector pOn-MtGH1 used as transgene to amago salmon.

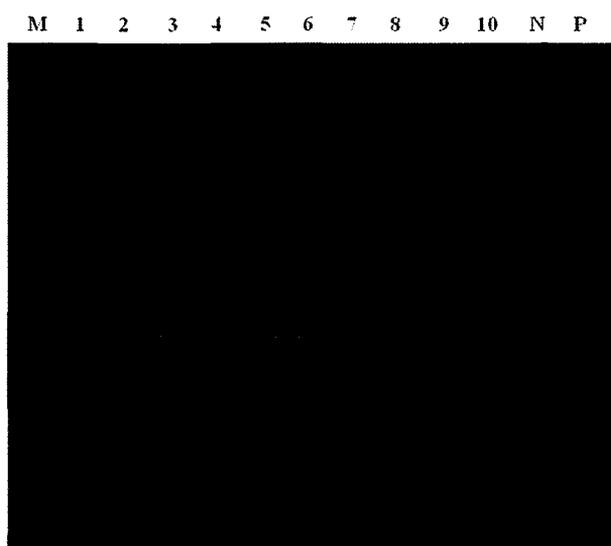


Fig. 5. PCR amplification of DNA extracted from whole body of F2 individuals using a primer set: MtBPro and OnInC. Amplified fragment represents a part of promoter and exogenous growth hormone DNA fragment. M indicates DNA size marker (λ -Hind III digest). P shows that PCR product amplified from plasmid vector pOnMtGH1 used as transgene to amago salmon.

受精時にマイクロインジェクションを行い、5～7ヶ月後に脂鱗から抽出したDNAの解析により導入遺伝子を確認した雌雄2尾ずつから配偶子が得られた。このうち精子DNAから導入遺伝子が検出されたTransgenic 1の精子を用いて交配した4組96尾のF1のうち、孵化直後のDNA解析で遺伝子導入が確認されたのは1尾のみであった。このことから、Transgenic 1ではモザイク状に導入遺伝子が組み込まれ、導入遺伝子が挿入された精子の率は少ないものと考えられた。また、Transgenic 1の精子を使った交配実験で作出した全個体の脂鱗からDNAを抽出して調べたところ、Non-transgenic 2 (♀)との交配からは1個体 (n=815)、Transgenic 4 (♀)との交配では39個体 (n=549) の遺伝子組換えアマゴが検出された。これらの結果から、Transgenic 1 (♂)とTransgenic 4 (♀)との交配で生まれた組換え魚39尾は、導入遺伝子が組み込まれた卵と非組換え精子とが受精した個体である可能性が高いと考えられた。

媒精卵にマイクロインジェクションを行って生まれた稚魚の中で、脂鱗からDNA断片が確認された個体は必ずしも成長が良い個体ではなかった。このことは、上述のモザイク状の組換えで説明できる。すなわち、これらの個体では全ての細胞に導入遺伝子が挿入されず、そのため成長が促進されなかったと想定される。また、一方で脂鱗のサンプル中には導入遺伝子が

検出されなかったものの、他の組織の細胞に導入遺伝子が存在し、成長が早まった個体が存在した可能性も否定できない。同様の外来遺伝子のモザイク状の組み込みはGuyomard *et al.*²⁰⁾によっても報告されており、遺伝子導入を行った世代では一般的に認められる現象と考えられる。

Transgenic 1 (♂)とTransgenic 4 (♀)との交配では、卵あるいは精子由来の1セットのゲノム上に外来遺伝子が挿入されて受精が起これば、それ以降分裂する全ての細胞に外来遺伝子が挿入されると考えられる。実際にこれらの受精卵から1年後に成熟した3尾の雄から精子を採取し、ゲノム遺伝子を抽出して外来遺伝子を検出した結果、いずれからも外来遺伝子が検出された。この内の1尾の精子と非遺伝子組換えアマゴ雌の卵を交配して得た稚魚で、導入遺伝子を確認した結果、10尾中6尾から導入遺伝子が検出され、遺伝子組換えアマゴと非遺伝子組換えアマゴの比はほぼ1:1であった。遺伝子の組換えと非組換えが1:1で出現したという事実は、外来遺伝子がメンデルの法則に則って1遺伝子座として振舞ったことを意味している。一方、導入遺伝子が複数の染色体上に挿入された場合は、次世代では遺伝子組換え魚と非遺伝子組換え魚の比は1:1になる確率は低くなると思われる。今回の交配結果は、外来遺伝子が染色体上の1ヶ所に挿入されたか、もしくは減数分裂時に組換えが生じないような染色体上の近い位置に複数の遺伝子が挿入されたことを示唆している²¹⁾。

本研究で導入した遺伝子がどのように染色体上に挿入されたかは不明である。しかし、導入された遺伝子のコピー数やどのように挿入されているかの情報は、遺伝子組換えアマゴの生物学的特性を評価する上で重要である。今後サザンハイブリダイゼーション等による解析によって、挿入されたコピー数等を検討したいと考えている。

以上、日本在来のサケ科魚類であるアマゴにベニザケ成長ホルモン遺伝子を導入し、遺伝子組換えアマゴの作出に成功した。今後は、本研究で得られた遺伝子組換えアマゴをモデルとして、食品としての安全性や、自然界へ逃避した場合の遺伝学的、生理・生態学的な影響について研究を進める予定である。

謝 辞

遺伝子組換え魚を作出するためのプラスミドを提供して頂いたカナダ海洋漁業省のR. H. Devlin博士に感謝します。また、本研究の一部は農林水産技術会議の補助による水産生物育種の効率化基礎技術の開発事業により行われた。

文 献

- 1) Vielkind, J., U. Vielkind, E. von Grotthus and F. Anders (1971) Uptake of bacterial H³-DNA into fish embryos. *Experientia*, 27: 347-348.
- 2) Zhu, Z., G. Li, L. He and S. Chen (1985) Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758). *Z. Angew. Ichthyol.*, 1: 31-34.
- 3) Chourrout, D., R. Guyomard and L. M. Houdebine (1986) High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture*, 51: 143-150.
- 4) Zhu, Z., K. Xu, G. Li, Y. Xie and L. He (1986) Biological effects of human growth hormone gene microinjected into the fertilized eggs of loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor). *Chinese Sci. Bull.* 31: 988-990.
- 5) Dunham, R. A., J. Eash, J. Askins and T. M. Townes (1987) Transfer of the metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116: 87-91.
- 6) Fletcher, G. L., M. A. Shears, M. J. King, P. L. Davies and C. L. Hew (1988) Evidence of antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 352-357.
- 7) Devlin, R. H., T. Y. Yesaki, C. A. Biagi, E. M. Donaldson, P. Swanson and W. Chan (1994) Extraordinary salmon growth. *Nature*, 371: 209-210.
- 8) Rahman, M. A. and N. Maclean (1999) Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene. *Aquaculture*, 173: 333-346.
- 9) Wang, Y., W. Hu, G. Wu, Y. Sun, S. Chen, F. Zhang, Z. Zhu, J. Feng and X. Zhang (2001) Genetic analysis of "all-fish" growth hormone gene transferred carp (*Cyprinus carpio* L.) and its F1 generation. *Chinese Sci. Bull.*, 46: 1174-1178.
- 10) Guillén, I., J. Berlanga, C. M. Valenzuela, A. Morales, J. Toledo, M. P. Estrada, P. Puentes, O. Hayes and J. de la Fuente (1999) Safety evaluation of transgenic tilapia with accelerated growth. *Mar. Biotechnol.*, 1: 2-14.
- 11) Fu, C., W. Hu, Y. Wang and Z. Zhu (2005) Developments in transgenic fish in the People's Republic of China. *Rev. Sci. Tech.*, 24: 299-307.
- 12) Muir, W. M. and R. D. Howard (2002) Assessment of possible ecological risks and hazards of transgenic fish with implications for other sexually reproducing organisms. *Transgenic Res.*, 11: 101-114.
- 13) Aerni, P. (2004) Risk, regulation and innovation: The case of aquaculture and transgenic fish. *Aquat. Sci.*, 66: 327-341.
- 14) Kapuscinski, A. R. (2005) Current scientific understanding of the environmental biosafety of transgenic fish and shellfish. *Rev. Sci. Tech.*, 24: 309-322.
- 15) Devlin, R. H., L. F. Sundström and W. M. Muir (2006) Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. *Trends Biotechnol.*, 24: 89-97.
- 16) Chan, W. K. and R. H. Devlin (1993) Polymerase chain reaction amplification and functional characterization of sockeye salmon histone H3, metallothionein-B, and protamine promoters. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2: 308-318.
- 17) Devlin, R. H. (1993) Sequence of sockeye salmon type 1 and 2 growth hormone genes and the relationship of rainbow trout with Atlantic and Pacific salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 1738-1748.
- 18) Shears, M. A., M. J. King, S. V. Goddard and C. L. Fletcher (1992) Gene transfer in salmonids by injection through the micropyle, pp. 44-60, in "Transgenic Fish", eds. by C. L. Hew and G. L. Fletcher, World Scientific, Singapore.
- 19) Nagoya, H., H. Okamoto, I. Nakayama, K. Araki and H. Onozato (1996) Production of androgenetic diploids in amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*. *Fisheries Science*, 62: 380-383.
- 20) Guyomard, R., D. Chourrout, C. Leroux, L. M. Houdebine and F. Pourrain (1989) Integration and germ line transmission of foreign genes microinjected into fertilized trout eggs. *Biochimie*, 71: 857-863.
- 21) Wu, B., Y. Sun, Y. Wang, Y. Wang and Z. Zhu (2005) Characterization of transgene integration pattern in F4 hGH-transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cell Research*, 15: 447-454.

Genetic Structure and Phylogeny in Seven Japanese Species of Cynoglossidae (Pisces: Pleuronectiformes)

Kōji YOKOGAWA

Tadotsu, Kagawa, Japan

Abstract

Genetic structure of seven Japanese species of cynoglossid fish (*Cynoglossus abbreviatus*, *C. interruptus*, *C. itinus*, *C. joyneri*, *C. nigropinnatus*, *C. ochiaii*, *C. robustus*) were examined by using horizontal starch gel electrophoresis, and phylogeny was considered from their genetic relationships. The cynoglossid species generally exhibited high genetic variability, in particular average heterozygosity values of *C. interruptus* and *C. robustus* exceeded 0.2. These values were greater than the maximum value previously recorded for fish. The genetic distances (D values) between the species were calculated and a dendrogram based on the distances was created. In the dendrogram, *C. interruptus*, *C. ochiaii*, *C. joyneri* and *C. itinus* (the *kopsii* group) formed a monophyletic clade, which is consistent with the morphological similarity among these species. *Cynoglossus nigropinnatus*, which is placed within the *kopsii* group based on morphological characteristics, belonged to another cluster. *Cynoglossus abbreviatus* differed considerably from the other species in genetic distance.

(accepted December 11, 2008)

Introduction

The cynoglossid fish (Cynoglossidae: Pleuronectiformes) are bottom-dwellers and are commonly known as soles or tonguefish. They include many valuable species for fisheries, which are commercially exploited worldwide. About 20 Japanese cynoglossid species, which also includes some valuable species, are known¹⁾.

Ecological information is available for some species of Japanese cynoglossid fish²⁾. However, their genetic information is largely unknown. For fisheries science and breeding, it is important to understand the genetic structure of valuable species. In addition, it is important to evaluate the genetic structure of species systematically, and such systematic evaluations using isozymic genetic variability have been undertaken for many marine fish^{3, 4)}. For such systematic studies, genetic information of the cynoglossid fish can enrich the data accumulation. Genetic information could be used to examine the phylogeny of the Japanese cynoglossid fish, which is

deeply related to their taxonomy and evolution. This in turn would provide basic information for fisheries and breeding science.

The present study therefore examined the genetic characteristics of seven common species of the Japanese cynoglossid fish by using isozymes, and revealed their genetic structure and phylogeny.

Materials and Methods

The seven species studied (Table 1) were collected from the Seto Inland Sea or Tosa Bay by trawling, and were stored at either -30°C or -80°C prior to analysis. Species were identified using the morphological characteristics described by Ochiai⁵⁾. *Cynoglossus ochiaii* was identified following the description of Yokogawa *et al.*⁶⁾.

Electrophoresis to examine isozymes was performed using the methodologies of previous studies^{7, 8)}. In addition to the 33 loci identified in these publications, the following 2 loci were detected in the present study; malic enzyme (NADP⁺), E. C.

Corresponding author: Kōji Yokogawa, 13-5 Higashihama, Tadotsu, Nakatado, Kagawa 764-0016, Japan.

Tel: +81-70-5683-0681 Email: gargariscus@ybb.ne.jp

Table 1. Data of Japanese cynoglossid fish

Scientific name	Japanese name	Locality of collection	<i>n</i>
<i>Cynoglossus abbreviatus</i>	Korai-aka-shita-birame	Off Kagawa, Seto Inland Sea	12
<i>Cynoglossus interruptus</i>	Genko	Off Kagawa, Seto Inland Sea	54
<i>Cynoglossus itinus</i>	Minami-aka-shita-birame	Off Kochi, Tosa Bay	4
<i>Cynoglossus joyneri</i>	Aka-shita-birame	Off Kagawa, Seto Inland Sea	12
<i>Cynoglossus nigropinnatus</i>	Hire-guro-genko	Off Kochi, Tosa Bay	12
<i>Cynoglossus ochiaii</i>	Oki-genko	Off Kochi, Tosa Bay	53
<i>Cynoglossus robustus</i>	Inu-no-shita	Off Kagawa, Seto Inland Sea	12

Table 2. Genetic features of Japanese cynoglossid fish

		<i>C. abbreviatus</i>	<i>C. interruptus</i>	<i>C. itinus</i>	<i>C. joyneri</i>	<i>C. nigropinnatus</i>	<i>C. ochiaii</i>	<i>C. robustus</i>	Average
Allelic richness		1.303	1.672	1.235	1.523	1.239	1.545	1.680	1.457
Percentage of polymorphic loci	P*	0.229	0.543	0.182	0.455	0.273	0.400	0.471	0.364
	P	0.171	0.171	0.000	0.121	0.061	0.229	0.118	0.124
	P+P*	0.400	0.714	0.182	0.576	0.333	0.629	0.588	0.489
Average heterozygosity	<i>Ho</i>	0.081	0.226	0.086	0.179	0.089	0.171	0.219	0.150
	<i>He</i>	0.092	0.230	0.094	0.163	0.083	0.178	0.222	0.152
	ASE	0.003	0.001	0.005	0.006	0.004	0.001	0.004	0.003
	<i>Ho/He</i>	0.881	0.985	1.925	1.099	1.077	0.957	0.983	1.130

P* : Polymorphism less than 0.95.

Ho : Observed heterozygosity.

ASE : Average standard error for *He*.

P : Polymorphism greater than 0.95.

He : Expected heterozygosity (unbiased value).

1. 1. 1. 40 (*MEP-2**, from muscle tissue), phosphoglucomutase, E. C. 5. 4. 2. 2 (*PGM**, from muscle tissue). The *AH-2** locus used in previous studies^{7,8)} was omitted from the genetic analysis, because it was not detected, or its electrophoretic bands were too thin to read in some species. Consequently, 34 loci were used in the present study.

The observed heterozygosity (*Ho*) per locus was given from the proportion of heterozygotes to individual number examined, and average values of *Ho* were calculated per species. The expected heterozygosity (*He*) (unbiased value) per locus and its standard error value were calculated after Nei⁹⁾, and they were averaged per species. For polymorphic loci, correspondence to the Hardy-Weinberg equilibrium was tested with GENEPOP software (ver. 4.0.7)¹⁰⁾. Allelic richness per locus was calculated with FSTAT software (ver. 2.9.3.2)¹¹⁾, and it was averaged per species.

Genetic distances (*D* values) following Nei¹²⁾, were calculated using the allelic frequencies of the seven species. A dendrogram of genetic relationships between the seven species was constructed from the genetic distances by using the Neighbor-joining (NJ) method with MEGA software (ver. 4.0)¹³⁾, and bootstrap estimates to test reliability of the dendrogram were performed with the Populations genetic software (ver. 1.2.30)¹⁴⁾.

Results

Concerning the correspondence to Hardy-Weinberg equilibrium, because no significance was recognized at any loci of any species, all were regarded to correspond to the equilibrium.

Average allele numbers per locus, rate of polymorphic loci and average heterozygosity (*Ho*, *He*), of the seven species are summarized in Table 2. Because the cynoglossid species exhibited higher values in the genetic indices, they could be regarded as having high genetic variability. In particular, the observed heterozygosity (*Ho*) exceeded 0.2 in *Cynoglossus interruptus* and *C. robustus*, showing considerable high genetic polymorphism in these species. Also, *Ho* approached 0.2 in *C. joyneri* and *C. ochiaii*. While *Ho* was less than 0.1 in *C. abbreviatus*, *C. itinus*, and *C. nigropinnatus*, there was comparatively less polymorphism in this family.

Allelic frequencies at the 34 loci of the seven species are shown in Table 3. Allelic compositions at any loci were unique to each species and alleles were different between species at many loci (Table 3).

The genetic distances (*D* values) between the seven species are shown in Table 4, and a dendrogram based on the genetic distances is presented in Fig. 1. The distance between *C. interruptus* and *C. ochiaii* was the closest (*D*=0.4143) (Table 4).

Table 3. Allelic frequencies of Japanese cynoglossid fish

Locus	Allele	<i>C. abbreviatus</i>	<i>C. interruptus</i>	<i>C. itinus</i>	<i>C. joyneri</i>	<i>C. nigropinnatus</i>	<i>C. ochiaii</i>	<i>C. robustus</i>
AAT-3*	*-20	0	0.173	0	0	0	0	0
	*-100	1.000	0.337	0	0	0	0.019	0
	*-150	0	0.288	0	0	0	0.028	0
	*-160	0	0	0	0	0	0	0.042
	*-170	0	0.135	0	0	1.000	0.925	0.958
	*-175	0	0	0	1.000	0	0	0
	*-200	0	0.067	0	0	0	0.028	0
	*-230	0	0	1.000	0	0	0	0
ACP*	*145	0	0.010	0	0.042	0	0.009	0
	*120	0	0.154	0	0.125	0	0.198	0
	*100	0.917	0.519	1.000	0.833	0	0.755	0
	*80	0.083	0.250	0	0	0	0.038	0
	*70	0	0.058	0	0	0.042	0	0
	*50	0	0.010	0	0	0.958	0	0.250
	*25	0	0	0	0	0	0	0.375
	*0	0	0	0	0	0	0	0.333
	*-20	0	0	0	0	0	0	0.042
	*120	0	0	0	0.083	0	0	0
AH-1*	*115	0	0	0	0.583	0	0	0
	*110	0.333	0.040	0	0.333	0	0.980	0
	*100	0.542	0.930	0.625	0	1.000	0.020	0
	*90	0.083	0.030	0.375	0	0	0	0
	*80	0.042	0	0	0	0	0	0.500
	*75	0	0	0	0	0	0	0.292
	*70	0	0	0	0	0	0	0.208
	*125	0	0	0	0	1.000	0	0
CAT-1*	*100	0	1.000	0	0.083	0	1.000	0.917
	*90	0	0	0	0	0	0	0.083
	*80	1.000	0	0	0	0	0	0
	*75	0	0	1.000	0.917	0	0	0
CAT-2*	*-50	1.000	0	0	0	0	0	0
	*-90	0	0	0	0	0	0	1.000
	*-100	0	0.991	1.000	0.063	1.000	1.000	0
	*-110	0	0	0	0.938	0	0	0
CK*	*-70	0	0.075	0	0	0	0.019	0
	*-100	0.083	0.783	0	1.000	1.000	0.981	1.000
	*-155	0.917	0.132	0	0	0	0	0
	*-165	0	0.009	1.000	0	0	0	0
EST-3*	*100	0	0.830	1.000	0.958	0	0.028	0
	*90	0	0.113	0	0.042	0.125	0.123	0
	*80	1.000	0.057	0	0	0.250	0.736	1.000
	*65	0	0	0	0	0.625	0.113	0
FBALD-1*	*0	0	0	1.000	0	0	0	0
	*-60	0	0	0	0	0	0	0.182
	*-100	0	1.000	0	0.083	1.000	1.000	0.773
	*-150	1.000	0	0	0.917	0	0	0
	*-175	0	0	0	0	0	0	0.045
FBALD-2*	*-55	0	0	0	0	0	0.906	0
	*-65	0	0	0	0	0	0.094	0
	*-80	0	0	1.000	0	0	0	0
	*-100	0	0.704	0	0.136	0	0	0
	*-135	0	0	0	0.773	1.000	0	0
	*-140	0	0.296	0	0.091	0	0	0
	*-200	1.000	0	0	0	0	0	1.000
FH-2*	*250	0	0.010	1.000	0	0	0	0
	*200	0	0	0	0	0	0	1.000
	*100	1.000	0.981	0	1.000	1.000	1.000	0
	*50	0	0.010	0	0	0	0	0
G3PDH-1*	*140	0	0	0	0	0	0.013	0
	*110	0.042	0	0	0.042	0.125	0	0.958
	*105	0.958	0	0	0.875	0	0	0
	*100	0	1.000	0	0.083	0.875	0.987	0.042
G3PDH-2*	*55	0	0	1.000	0	0	0	0
	*120	0	0	0	0.909	0	0	0.875
	*100	0	0.991	0	0.091	1.000	1.000	0
	*70	0.042	0	0	0	0	0	0.042
	*50	0.917	0	0	0	0	0	0
	*40	0.042	0.009	0	0	0	0	0.083
	*10	0	0	1.000	0	0	0	0

Table 3. continued

Locus	Allele	<i>C. abbreviatus</i>	<i>C. interruptus</i>	<i>C. itinus</i>	<i>C. joyneri</i>	<i>C. nigropinnatus</i>	<i>C. ochiaii</i>	<i>C. robustus</i>
<i>G3PDH-3*</i>	*125	0	0.009	0	0.792	0	0	0
	*90	1.000	0	0	0	0.818	0	0.875
	*0	0	0	0	0	0	0	0.125
	*-75	0	0.037	0	0	0.182	0.962	0
	*-100	0	0.898	1.000	0.208	0	0.028	0
<i>GPI-1*</i>	*-220	0	0.056	0	0	0	0.009	0
	*110	0	0	0	0	0.833	0	0
	*100	0	0.546	1.000	0.042	0	0.160	0.917
	*90	0.125	0	0	0.958	0	0.604	0.083
	*80	0.667	0.306	0	0	0.167	0.189	0
	*75	0.000	0.083	0	0	0	0.019	0
	*65	0.167	0.065	0	0	0	0.019	0
<i>GPI-2*</i>	*50	0.042	0	0	0	0	0.009	0
	*-25	0	0	0	0	0	0.038	0
	*-60	0.042	0.028	0	1.000	0	0.887	0
	*-100	0	0.954	1.000	0	0	0.066	0
	*-145	0.958	0	0	0	1.000	0	0.958
<i>IDDH*</i>	*-160	0	0.019	0	0	0	0.009	0.042
	*215	0	0.061	0	0	0.136	0.031	0
	*160	0	0.207	0	0.208	0.864	0.031	0.500
	*100	0	0.732	0	0.750	0	0.719	0.375
	*85	0	0	1.000	0	0	0	0
<i>IDHP-1*</i>	*30	0.042	0	0	0	0	0	0
	*0	0.958	0	0	0.042	0	0.219	0.125
	*140	0	0.010	0	0	0.042	0	0
	*135	0	0.196	0	0	0.083	0	0
	*105	0	0	0	0	0.875	0	0
	*100	0	0.745	0	0.958	0	0.010	0.833
	*95	0	0	0.125	0	0	0	0
	*90	0	0.049	0	0.042	0	0	0.083
	*80	0	0	0	0	0	0	0.083
	*65	1.000	0	0.875	0	0	0.990	0
<i>IDHP-2*</i>	*300	1.000	0	0	0	0	0	0
	*100	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>LDH-1*</i>	*200	0	0	0	0.875	0	0	0
	*100	0	0	0	0	1.000	0	1.000
	*0	0	0	0	0.125	0	0	0
	*-100	0	1.000	1.000	0	0	0.811	0
	*-170	1.000	0	0	0	0	0	0
	*-220	0	0	0	0	0	0.113	0
	*-300	0	0	0	0	0	0.028	0
<i>LDH-2*</i>	*-400	0	0	0	0	0	0.047	0
	*-10	0	0	1.000	0	1.000	0	1.000
	*-100	0	1.000	0	1.000	0	1.000	0
	*-130	1.000	0	0	0	0	0	0
<i>MDH-1*</i>	*130	0	0	0	0.125	0	0	0
	*120	0	0.009	0	0.750	0	0	0
	*110	0	0	0	0.125	0	0	0.833
	*100	0	0.962	0	0	1.000	0.019	0.167
	*70	1.000	0	1.000	0	0	0.981	0
<i>MDH-2*</i>	*60	0	0.028	0	0	0	0	0
	*200	0	0	0	0	0	0	1.000
	*150	1.000	0	0	0	0	0	0
	*130	0	0.019	0	0	0	0.020	0
	*100	0	0.896	1.000	0	0	0.980	0
	*80	0	0.085	0	0	0	0	0
<i>MDH-3*</i>	*70	0	0	0	0	1.000	0	0
	*35	0	0	0	1.000	0	0	0
	*0	0	0	0	1.000	0	0	0
	*-30	0	0	1.000	0	0	0	0
	*-70	0	0.009	0	0	0	0	0
	*-100	0	0.972	0	0	0	0	0
	*-135	0.958	0	0	0	1.000	0	0
	*-140	0	0	0	0	0	0	0.958
*-160	0.042	0.019	0	0	0	1.000	0.042	

Table 3. continued

Locus	Allele	<i>C. abbreviatus</i>	<i>C. interruptus</i>	<i>C. itinus</i>	<i>C. joyneri</i>	<i>C. nigropinnatus</i>	<i>C. ochiaii</i>	<i>C. robustus</i>
<i>MEP-1*</i>	*145	0	0	0	0	0	0	1.000
	*130	0.958	0	0	0	1.000	0	0
	*120	0	0.019	0	0	0	0.019	0
	*110	0.042	0.167	0	0	0	0.094	0
	*100	0	0.704	0	0.083	0	0.642	0
	*90	0	0	0	0.750	0	0	0
	*80	0	0.093	0	0.125	0	0.198	0
	*65	0	0.019	0	0.042	0	0.047	0
	*50	0	0	0.750	0	0	0	0
	*40	0	0	0.250	0	0	0	0
	<i>MEP-2*</i>	*240	0	0	0.333	0	0	0
*140		0	0	0.667	0	0	0	0
*125		0	0.029	0	0	0	0	0
*100		0.958	0.519	0	0.125	0	0.010	0
*70		0	0.452	0	0.333	0	0	0
*40		0.042	0	0	0	0.833	0.220	0.042
*25		0	0	0	0	0.125	0.490	0.500
<i>MPI*</i>	*0	0	0	0	0.542	0.042	0.280	0.458
	*120	0	0	0	0	1.000	0	0
	*110	1.000	0	0	0	0	0	0.625
	*100	0	1.000	1.000	0.955	0	1.000	0.042
	*90	0	0	0	0.045	0	0	0.250
<i>ODH*</i>	*75	0	0	0	0	0	0	0.083
	*165	0	0	0	0	0.167	0	1.000
	*155	0	0	0	0	0.833	0	0
	*130	0	0.108	0	0	0	0.010	0
	*100	0	0.882	0.625	1.000	0	0.990	0
	*85	1.000	0	0	0	0	0	0
	*70	0	0	0.375	0	0	0	0
<i>PGDH*</i>	*55	0	0.010	0	0	0	0	0
	*200	0	0	0	0	1.000	0	0
	*160	0.042	0.009	0	0	0	0.375	0
	*150	0.250	0.333	0.875	0.083	0	0.106	0.708
	*100	0.417	0.630	0.125	0.167	0	0.385	0.167
	*80	0.292	0.028	0	0.750	0	0.135	0.042
<i>PGM*</i>	*700	0	0	0	0.875	0	0	0
	*520	0	0	0	0.042	0	0	0
	*250	0	0.048	0.375	0	0.875	0.048	0
	*100	0.833	0.567	0.500	0.083	0	0.538	0.042
	*-100	0.167	0.385	0	0	0.125	0.375	0.583
	*-250	0	0	0.125	0	0	0.038	0.375
<i>PROT-1*</i>	*200	0	0	0	1.000	1.000	0	0
	*160	0	0	0	0	0	1.000	0
	*150	0	0	0	0	0	0	1.000
	*140	0	0	1.000	0	0	0	0
	*100	0	1.000	0	0	0	0	0
	*40	1.000	0	0	0	0	0	0
<i>PROT-2*</i>	*120	0	0	0	1.000	0	0	0
	*105	0	0	0	0	0	0	1.000
	*100	0	1.000	1.000	0	1.000	1.000	0
<i>PROT-3*</i>	*25	1.000	0	0	0	0	0	0
	*120	0	0	0	0	1.000	0	0
	*100	0	0.944	0	0	0	1.000	0.542
	*95	0	0	0	0	0	0	0.458
	*85	1.000	0.056	0	0	0	0	0
<i>SOD-1*</i>	*70	0	0	1.000	1.000	0	0	0
	*140	0	0	0	1.000	0	0.563	0.292
	*130	0	0	0	0	1.000	0.438	0.208
	*115	0	0.286	0	0	0	0	0.125
	*100	0	0.663	0	0	0	0	0.167
	*80	1.000	0.051	0	0	0	0	0.208
<i>SOD-2*</i>	*60	0	0	1.000	0	0	0	0
	*100	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	*-100	1.000	0	0	0	0	0	0

Table 4. Genetic distances (D values) between Japanese cynoglossid fish

	<i>C. abbreviatus</i>	<i>C. interruptus</i>	<i>C. itinus</i>	<i>C. joyneri</i>	<i>C. nigropinnatus</i>	<i>C. ochiaii</i>
<i>C. abbreviatus</i>						
<i>C. interruptus</i>	1.8983					
<i>C. itinus</i>	2.0897	0.8358				
<i>C. joyneri</i>	1.9103	0.9714	1.3527			
<i>C. nigropinnatus</i>	1.6922	0.9599	1.6591	1.5610		
<i>C. ochiaii</i>	1.5758	0.4143	1.0147	0.9131	0.9841	
<i>C. robustus</i>	1.6926	1.2448	1.8232	1.5120	1.0421	1.1693

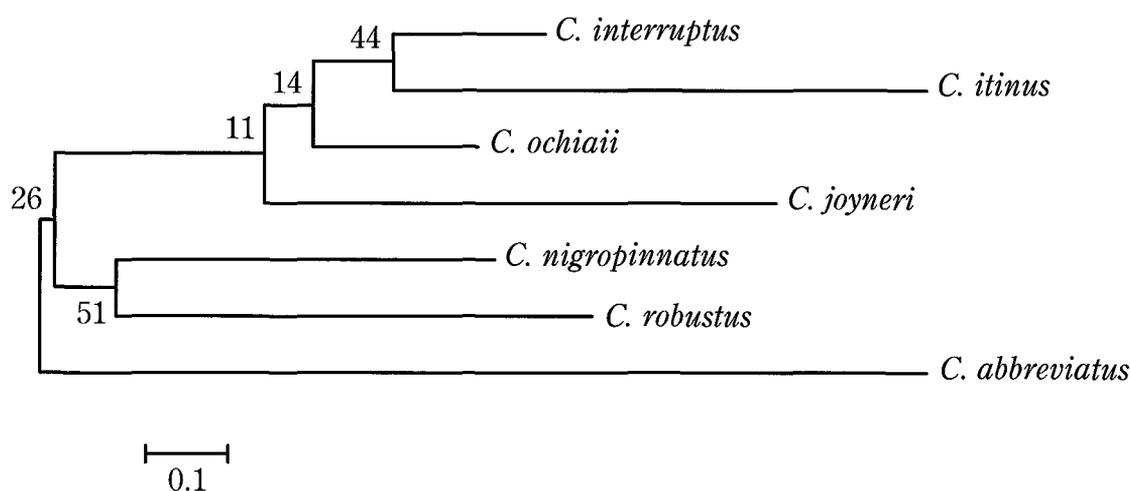


Fig. 1. A dendrogram for seven species of Japanese cynoglossid fish using the Neighbor-joining (NJ) method based on genetic distances (D values). Numbers in the dendrogram represent bootstrap probability values based on 1000 replicates.

Cynoglossus abbreviatus was most distant from the other six species ($D=1.6922-2.0897$; average 1.8098) (Table 4).

In the dendrogram, *C. interruptus*, *C. itinus*, *C. ochiaii* and *C. joyneri* formed a single cluster (Fig. 1). Although the distance between *C. nigropinnatus* and *C. robustus* was further, they formed another single cluster, which was connected with the former cluster (Fig. 1).

Discussion

Fujio and Kato³⁾ examined and summarized genetic variation in fish from Japan (8 orders with 41 species, including 15 in the Order Pleuronectiformes [heterosomate species]) using isozyme analysis. They gave average values of 0.194 and 0.059 for the proportion of polymorphic loci ($P+P^*$) and heterozygosity (H_o), respectively. For the 15 heterosomate species, the $P+P^*$ and H_o values were 0.294 and 0.082, respectively. For the seven cynoglossid species examined in the present study, these values were 0.454 and 0.153, respectively (Table 2), and therefore higher than those

of the 41 and 15 heterosomate species.

Smith and Fujio⁴⁾ reviewed genetic variation in many marine fish worldwide (9 orders with 106 species, including 29 heterosomate ones). They gave average H_o values of 0.055 for all species, and 0.071 for heterosomates, values that are similar to those given by Fujio and Kato³⁾. According to their summary, the H_o values ranged from 0.000 to 0.180. In contrast, the H_o values of the seven cynoglossid species ranged from 0.081 to 0.226, and those of some species (*Cynoglossus interruptus* and *C. robustus*) exceeded the maximum given by Smith and Fujio⁴⁾ (Table 2). This also indicates how high the genetic variability of the cynoglossid species is. No species to date have been shown to have a heterozygosity exceeding that of the two species.

Smith and Fujio⁴⁾ hypothesized that habitat specialists, including the heterosomate species, tend to have higher H_o values. The cynoglossid species may support their hypothesis, as they may be so specialized ecologically that this accounts for their high

genetic variability.

Kijima *et al.*¹⁵⁾ examined and analyzed genetic structures of 31 heterosomate species (including four in the Cynoglossidae) by using isozymic markers. Their results showed that the average *He* values were between 0 and 0.2, and the average *He* was 0.082, being similar to the values given in the former two reports. Although their study included *C. interruptus*, the *He* value did not exceed 0.2. This might be due to differences in the number of loci examined, they examined 15 loci and the present study examined 34. In a species with high genetic polymorphism, the heterozygosity may be higher in proportion to the examined locus number.

The genetic polymorphism of *C. interruptus* was high, i.e. *Ho* resulted in the highest value (0.226) of all (Table 2). In this species, the presence of some local populations, which are genetically divergent from one another, has been revealed⁸⁾. In the case of a species with high genetic polymorphism, such variation may occur. As such, intraspecific variation may be detected from the other cynoglossid species, and further studies are now required.

In terms of genetic distance, that between *C. interruptus* and *C. ochiaii* was the least of all ($D=0.4143$) (Table 4). It shows genetic "similarity" of the two species, although the distance between the two species was great enough for the specific level⁹⁾. These two species are morphologically so similar that until recently they were regarded as the same species^{5, 16, 17)}. Therefore, the genetic "similarity" between the two species is consistent with the morphology.

In the dendrogram, *C. interruptus*, *C. itinus*, *C. ochiaii* and *C. joyneri* formed a single cluster (Fig. 1), suggesting monophyly of these four species. Menon¹⁷⁾, who reviewed the taxonomy of the Genus *Cynoglossus* worldwide, designated several groups and complexes in the genus based on morphology. One of his designations of the *kopsii* group included the *kopsii* complex, which consisted of *C. kopsii*, *C. interruptus* and *C. joyneri*. The *kopsii* group also included the *itinus* complex, which consisted of *C. itinus* only. As he regarded *C. ochiaii* as just a "form" of *C. interruptus*, *C. ochiaii* obviously belongs to the *kopsii* complex according to his criteria. Therefore, the fact that *C. interruptus*, *C. ochiaii*, *C. joyneri* and *C. itinus* formed a single cluster (Fig. 1), corresponds

well with Menon's opinion.

On the other hand, Menon regarded *C. nigropinnatus* as a synonym of *C. interruptus*. However, these two species are so genetically different from each other (Fig. 1, Table 4), they are predictably distinct species. A recent morphological revision by Yokogawa *et al.*⁶⁾ also supported independency of the two species. Although *C. nigropinnatus* may also be categorized into the *kopsii* complex according to Menon's criteria, it was placed far from members of the *kopsii* complex in the dendrogram (Fig. 1). In fact, *C. nigropinnatus* was somewhat closer to *C. interruptus* and *C. ochiaii* in genetic distance (D values less than 1) (Table 4). However, as it is far from *C. joyneri* and *C. itinus* (D values more than 1.5) (Table 4), it is divergent from the cluster of the *kopsii* group members (Fig. 1). More genetic information based on DNA analysis is now needed to help reveal the phylogeny of *C. nigropinnatus*.

In Menon's revision¹⁷⁾, *C. abbreviatus* and *C. robustus* were categorized into the *arel* group (the *arel* complex) and the *heterolepis* group (the *heterolepis* complex), respectively, i.e. the two groups were phylogenetically placed far from the *kopsii* group. In the present study, they were placed separately from the cluster of the *kopsii* group members (Fig. 1), implying phylogenetic independency. This is consistent with Menon's view.

Of the seven cynoglossid species examined, although most have three lateral (dorsolateral, midlateral and ventrolateral) lines on the trunk, *C. interruptus* and *C. robustus* lack the ventrolateral line. Because *C. interruptus* and *C. robustus* are not closely related (Fig. 1), this suggests that loss of the ventrolateral line has occurred more than once during the evolution of the cynoglossids. Furthermore, loss of the ventrolateral line has occurred in species that are phylogenetically close to each other, e.g. *C. interruptus* and *C. ochiaii*. Thus the loss of the ventrolateral line may not be a very significant change for the cynoglossids. Because they usually have many lateral line systems, which are cutaneous sensory organs²⁾, it may not matter when some systems disappear.

The genetic information of the cynoglossids given by the present study and their morphological similarity were mostly congruent. However, there are still some incongruencies. In order to reveal the

phylogeny of this taxon, further studies will require the use of another genetic marker such as DNA. In addition it will be important to genetically examine additional cynoglossid species, which are distributed worldwide.

Acknowledgments

The author is grateful to Mr. Chomatsu Nishikawa, Marugame, Kagawa Pref., who assisted in collecting specimens of *Cynoglossus interruptus*. Dr. Hiromitsu Endo, Faculty of Science, Kochi University, and

Mr. Hideo Sakaji, National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, provided some specimens of *Cynoglossus ochiaii*. Dr. Nobuhiko Taniguchi, Faculty of Life Science and Biotechnology, Fukuyama University, gave available information on tools of statistical computation. Dr. Shingo Seki, Faculty of Agriculture, Kochi University, provided some literature. Finally, I wish to thank Ms. Dawn L. McKendry, Middleburg, Florida, US, for checking the manuscript.

References

- 1) Yamada, U. (2000) Cynoglossidae, pp. 1388-1392, 1639, in "Fishes of Japan with Pictorial Keys to the Species, 2nd ed", eds. by T. Nakabo, Tokai Univ. Press, Tokyo. (in Japanese).
- 2) Ochiai, A. and M. Tanaka (1986) Tonguefishes, pp. 1119-1123, in "Ichthyology (New version) Part 2", Koseisha-koseikaku, Tokyo. (in Japanese).
- 3) Fujio Y. and Y. Kato (1979) Genetic variation in fish population. Bull. Japan. Sci. Fish., 45: 1169-1178.
- 4) Smith, P. J. and Fujio, Y. (1982) Genetic variation in marine teleosts: High variability in habitat specialists and low variability in habitat generalists. Mar. Biol., 69: 7-20.
- 5) Ochiai, A. (1963) Fauna Japonica Soleina (Pisces). Biogeographical Society of Japan, Tokyo, 115 pp., 24 pls.
- 6) Yokogawa, K., H. Endo and S. Sakaji (2008) *Cynoglossus ochiaii*, a new tongue sole from Japan (Pleuronectiformes: Cynoglossidae). Bull. Natn. Mus. Nat. Sci., Ser. A (Zool.) Suppl. 2: 115-127.
- 7) Yokogawa, K., S. Sakaji, H. Endo and A. Yamaguchi (2008) Genetic divergence between two forms of a tongue sole, *Cynoglossus interruptus*. Ichthyol. Res., 55: 78-81.
- 8) Yokogawa, K., A. Yamaguchi, H. Endo and S. Sakaji (2008) Morphological and genetic variations among local individuals of genko sole, *Cynoglossus interruptus*. Biogeography, 10: 107-116.
- 9) Nei, M. (1990) Molecular Evolutionary Genetics (Translated from English by Gojobori, T. and Saito, N.). Baifukan, Tokyo, vii+433 (in Japanese).
- 10) Rousset, F. (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. Mol. Ecol. Res., 8: 103-106.
- 11) Goudet, J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Institut d'Ecologie, Batiment de Biologie. Universite de Lausanne, Lausanne. Available from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- 12) Nei, M. (1972) Genetic distance between populations. Amer. Natur., 106: 283-292.
- 13) Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.
- 14) Langella, O. (2002) Populations, 1.2.28 Copyright (C) 1999, CNRS UPR9034. Available from <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>
- 15) Kijima, A., S. Liu, N. Taniguchi and Y. Fujio (1996) Sustentation of isozymic polymorphism in flatfish species. Fish Genet. Breed. Sci., (23): 85-93. (in Japanese with English abstract)
- 16) Jordan, D. S. and E. C. Starks (1906) A review of the flounders and soles of Japan. Proc. U. S. Natn. Mus., 31 (1484): 161-246.
- 17) Menon, A. G. K. (1977) A systematic monograph of the tongue soles of the Genus *Cynoglossus* Hamilton-Buchanan (Pisces: Cynoglossidae). Smithson. Contr. Zool., (238): i-iv+1-129.

日本産シタビラメ科（カレイ目）魚類7種の遺伝構造と系統

横川浩治（香川県多度津町）

日本産シタビラメ科魚類7種、コウライアカシタビラメ *Cynoglossus abbreviatus*、ゲンコ *C. interruptus*、ミナミアカシタビラメ *C. itinus*、アカシタビラメ *C. joyneri*、ヒレグロゲンコ *C. nigropinnatus*、オキゲンコ *C. ochiaii*、イヌノシタ *C. robustus* のアイソザイム分析により遺伝構造を調べ、またこれらの系統類縁関係について考察した。本科魚類は全般に高い遺伝的多様性を示したが、特にゲンコとイヌノシタでは平均ヘテロ接合体率の値が0.2を超え、魚類でこれまでに知られている最高値を上回った。各種の遺伝子頻度から種間の遺伝的距離（ D 値）を計算し、それに基づいて分岐図を作成した。分岐図では、ゲンコ、オキゲンコ、アカシタビラメ、ミナミアカシタビラメがひとつのクラスターを形成し、形態による類縁関係とよく一致した。一方、形態的特徴からこのグループに含まれるヒレグロゲンコはこれらの種とは別のクラスターに含まれた。また、コウライアカシタビラメと他種との遺伝的距離がかなり大きかった。

Development of Microsatellite Markers in the Japanese Char *Salvelinus leucomaenis* and its Application to Closely Related Species

Kohtaroh YAMAGUCHI^{*1,*2}, Masamichi NAKAJIMA^{*2}
and Nobuhiko TANIGUCHI^{*3}

^{*1} Saitama Prefecture Agriculture and Forestry Research Center, Fisheries Laboratory, Kitakohama 1060-1, Kazo, Saitama 347-0011, Japan

^{*2} Laboratory of Population Genetics Informatics, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, 1-1 Amamiya-machi, Tsutsumi-dori, Aoba-ku, Sendai 981-8555, Japan

^{*3} The Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Onomichi, Hiroshima 722-2101, Japan

Abstract

In recent years, the population of the Japanese char (*Salvelinus leucomaenis*) has decreased owing to environmental changes and fishing pressure. For the formulation of appropriate conservation strategies, we developed 4 microsatellite markers in this species. The markers were polymorphic. Moreover, linkage disequilibrium and deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was not observed. We found that all the markers could be applied to the Amemasu (*S. leucomaenis leucomaenis*) and Yamato-iwana (*S. leucomaenis japonicus*), which are subspecies of *S. leucomaenis*. Further, 2 of these markers could be applied to the Dolly Varden (*S. malma malma*), which is a closely related species. We analyzed samples from 4 populations using 5 markers, 1 of which was a marker for *Salvelinus fontinalis* and the remaining 4 markers were developed in this study. The result revealed large genetic differentiation among populations. Moreover, the genetic variability in 2 southern populations from central Honshu was lower than that in the population from Hokkaido. We suggest that this phenomenon may be related to the life history characteristics and/or region of distribution. Therefore, the 4 new markers will be useful for detecting genetic variability and determining the population structure of the Japanese char.

(accepted December 28, 2008)

Introduction

The Japanese char *Salvelinus leucomaenis*, which is a salmonid, is an important species in the inland water fisheries of Japan; it is found from Kamchatka in the Russian Federation to the Chugoku district in Japan¹. This species exhibits complex patterns of variability in morphologies and life history traits^{2,3}, and exhibits geographic variations in the hemoglobin, isozyme, and mitochondrial DNA patterns⁴⁻⁶. Hosoya¹ classified this species into the following 4 subspecies on the basis of the coloration and distribution of spots: *S. leucomaenis leucomaenis* (Japanese name: Amemasu or Ezo-iwana), *S. leucomaenis pluvius* (Nikko-iwana),

S. leucomaenis japonicus (Yamato-iwana), and *S. leucomaenis imbrius* (Gogi). However, on the basis of isozyme variation, Nakajima and Fujio⁵ considered these 4 subspecies to be local races.

In recent years, the population of this species has decreased owing to factors such as environmental change and fishing pressure^{2,7}. Genetic factors are closely related to the fitness and adaptability of populations⁸, and genetic variability in populations is required to conserve natural populations and provide sustainable fisheries. In addition, the conservation of biodiversity requires the exact identification of the unit to be conserved⁹. Hence, the precise evaluation of the

Corresponding author: Kohtaroh Yamaguchi, Kitakohama 1060-1, Kazo, Saitama 347-0011, Japan.

Saitama Prefecture Agriculture and Forestry Research Center Fisheries Laboratory

E-mail: g610458@pref.saitama.lg.jp

genetic variability of char populations is required.

The variability and ease of allele scoring makes microsatellite markers powerful genetic tools^{8, 10, 11}. In previous genetic analyses of Japanese char populations, microsatellite markers of closely related species have been used^{12, 13}. Thus, microsatellite markers developed in a particular organism may be useful for the genetic analysis of a closely related species. However, the success rate decreases proportionally as the genetic distance between the target and source species increases¹⁴⁻¹⁶. One of the well-known problems in genetic analysis is the presence of a null allele, which fails to amplify during polymerase chain reaction (PCR) owing to mutations in the primer-binding region¹⁴. If null alleles are more common in populations distant from the source population, a deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) may be observed because of increased homozygosity in these populations¹⁶. Therefore, the development of microsatellite markers from the target species is desirable.

In this paper, we describe the isolation and characterization of 4 polymorphic microsatellite markers that were useful for the detection of genetic variability and determination of the population structure of the Japanese char. As stated above, Japanese char is classified into 4 subspecies. In this study, we developed microsatellite markers from Nikko-iwana. If the comparison between closely related species and between subspecies can be analyzed with the same microsatellite markers, more useful information can be obtained. However, as mentioned above, microsatellite markers may not be amplified in other species. Moreover, microsatellite markers may also not be amplified in subspecies. For example, microsatellite markers developed in the Ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) may not be amplified in the subspecies Ryukyu-ayu (*P. altivelis ryukyuensis*)¹¹. Therefore, the microsatellite markers developed in this study were screened to determine if they are amplified in the Dolly Varden (*Salvelinus malma malma*), a closely related species, and 2 other subspecies of the Japanese char.

Materials and methods

Fish samples

In this study, we collected specimens from 1 population of the Dolly Varden and 3 populations of the Japanese char. The samples were collected by

electrofishing, angling, or the use of hand net. Allelic variations were examined using 117 individuals collected from the Kamoiunbe River, Hokkaido (n = 32, Dolly Varden); the Nuibetsu River, which is a tributary of the Charo River, Hokkaido (n = 35, Amemasu); the Owakasawa River, which is a tributary of the Ara River, Saitama Prefecture (n = 30, Nikko-iwana); and a tributary of the Fuji River, Yamanashi Prefecture (n = 20, Yamato-iwana), Japan (Fig 1).

The Kamoiunbe River is located in the Shiretoko Peninsula in eastern Hokkaido. In the Dolly Varden population of this district, a few smolts and adult migrants have been reported in some rivers^{17, 18}. Moreover, it is thought that some individuals do usually exhibit an anadromous life history pattern in this district because they physiologically preserve the potential ability to smolt¹⁹.

Anadromous Japanese chars inhabit almost all parts of Hokkaido³. Thus, many individuals of the Nuibetsu population may be anadromous. On the other hand, the Owakasawa and Fuji populations are landlocked.

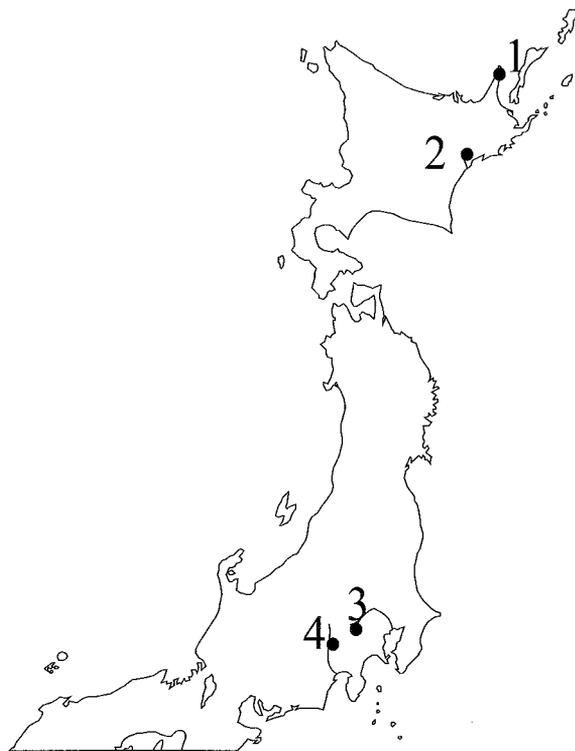


Fig. 1. A map showing the location of the sampling sites for the Dolly Varden and Japanese char populations.

1. Kamoiunbe River (*S. malma malma*, n = 32, collected in June and August 2007), 2. Nuibetsu River (*S. leucomaenis leucomaenis*, n = 35, April 2008), 3. Owakasawa River (*S. leucomaenis pluivius*, n = 30, August and October 2005), 4. a tributary of the Fuji River (*S. leucomaenis japonicus*, n = 20, August 2004)

Isolation of microsatellite markers

Samples were collected by electrofishing from a tributary of the Ara River, Saitama Prefecture, Japan, in March 2006. Genomic DNA was extracted from 5 individuals using the standard SDS-phenol-chloroform procedure²⁰. A small-insert genomic library was constructed by digesting 3 μ g of high-molecular-weight DNA with *Hae*III, *Hinc*II, and *Rsa*I restriction enzymes. The digested DNA was electrophoresed on a 1% agarose gel. Fragments containing 500–1000 bp were purified using QIAquickTM spin columns (Qiagen, Hilden, Germany) and subsequently ligated with the *Sma*I-digested and dephosphorylated plasmid vector pUC 18. The ligation products were transformed into competent *Escherichia coli* cells, followed by recombinant screening using selective agar plates containing X-Gal, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), and ampicillin.

The *E. coli* colonies were blotted onto nylon membranes, and hybridized with di- and tetra-nucleotide [(GT)₁₀, (GA)₁₀, (GC)₁₀, (AT)₁₀, and (TAGA)₁₀] chemiluminescent probes. After screening, 12 positive clones were obtained. These positive clones were sequenced using an ABI dGTP Big Dye Terminator Cycle sequence kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an ABI 377 automated sequencer (Applied Biosystems); then, the primer sets were designed using the program Primer 3²¹ and the PCR conditions were optimized.

Genetic analysis

We analyzed samples from 4 populations using 5 markers, of which 1 was a marker for *Salvelinus fontinalis* (*Sfo-12*)²²; the remaining 4 markers were developed in this study. PCR with microsatellite markers was performed as follows. An M13-tailed primer (5'-AGTCACGACGTTGTA-3') was attached to the 5' end of the forward primer. PCR was performed in a 10- μ L reaction mixture containing 0.2 pmol of the forward primer, 2 pmol of the reverse primer, 2 pmol of an M13 (5'-GCCAGTCACGACGTTGTA-3') primer labeled with a fluorescent dye, 0.2 mM dNTP, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 U rTaq polymerase (Takara Bio, Otsu, Japan), and 20–30 ng of template DNA. The loci were amplified using the following cycling profile: initial denaturation at 93°C for 1 min followed by 40 cycles of denatur-

ation at 93°C for 15 s, annealing at specific annealing temperatures for 15 s, and extension at 72°C for 30 s. The thermal profile ended with an additional extension for 60 min at 72°C. The annealing temperatures of the microsatellite markers developed in this study are shown in Table 1; the annealing temperature of *Sfo-12* was 55°C. All products were run on an ABI 377 automated sequencer (Applied Biosystems) using the GS-400HD size standard (Applied Biosystems) and analyzed using GENESCAN and GENOTYPER software programs (Applied Biosystems).

The data obtained were statistically analyzed for the differences between expected and observed heterozygosities, deviation from HWE, linkage disequilibrium, molecular variance (analysis of molecular variance [AMOVA]), and pairwise fixation index (F_{ST}). All analyses were performed using Arlequin version 3.11²³.

Results

Isolation of microsatellite markers and cross-species amplification

Of the 12 positive clones sequenced, 6 clones contained microsatellite sequences. Sequence analysis revealed 5 clones that were preferable for designing primers. In the remaining clone, very little flanking sequence was available for primer design on 1 side of the microsatellite motif. In the 3 Japanese char populations, of the 5 primer pairs examined, 4 primer pairs yielded bands that could be scored and were polymorphic. These 4 markers were designated as *Sle-1*, *Sle-4*, *Sle-5*, and *Sle-6*. Table 1 shows the primer sequences and genetic characteristics of the 4 microsatellite markers that detected polymorphic products. The annealing temperature of *Sle-4* was 62°C, while the annealing temperature of the other markers was 59°C. In addition, *Sfo-12* allowed scoring and was polymorphic in the samples.

The genetic variables examined in the 4 populations are presented in Table 2. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium were not observed in the 4 populations. Among the microsatellite markers developed in this study, the most variable marker was *Sle-1*, in which the maximum number of alleles was 20 (mean, 8.0) and the maximum heterozygosity was 0.928 (mean, 0.568). The least variable marker was *Sle-6*, which had a

maximum of 4 alleles (mean, 2.3) and a maximum heterozygosity of 0.407 (mean, 0.245; Table 2). *Sle-1* and *Sle-4* in the Nuibetsu population and *Sle-5* in the Kamoiunbe population had many unique alleles, while *Sle-6* had relatively few unique alleles. *Sle-6* had only 6 alleles in the 4 populations; of these alleles, only 3 alleles were unique (Table 3).

On performing PCR, these 5 markers were amplified in all Japanese char individuals. In 3 Japanese char populations, the average number of alleles per locus ranged from 10.6 in the Nuibetsu population to 1.4 in the Fuji population, and the average expected heterozygosities ranged from 0.731 to 0.156. Only a single allele was present at the *Sle-4* and *Sle-6* loci in the Owakasawa

Table 1. Microsatellite primers for *S. leucomaenis* developed in this study. F: forward primer, R: reverse primer.

Locus	Primer sequence (5' to 3')	Repeat motif	Anneling temperature	GenBank Accession no.
<i>Sle-1</i>	F : ACCCAGTGTGTCCACTCCT R : GTCCGCTGGAAAAACACATT	(CT) _n (CTCA) _n	59°C	AB440286
<i>Sle-4</i>	F : CGGAACCTACTAGGGGCTGT R : GAAGCATCATGCAGAGCAGA	(CA) _n	62°C	AB440289
<i>Sle-5</i>	F : GGCACACAGAACCTGTCTCA R : CACGCGAAACACAAAAAGAA	(GCGT) _n (GT) _n	59°C	AB440290
<i>Sle-6</i>	F : CCCAGTTTCTGGGTGAAAAA R : GACATCATGAGAGCCCTGTG	(CA) _n	59°C	AB440291

Table 2. Number of alleles, allele size range (bp), observed heterozygosity (H_{obs}), expected heterozygosity (H_{exp}), number of individuals (n), and p values for HWE exact tests for 5 microsatellite loci in samples from 1 Dolly Varden char population and 3 Japanese char populations. KM: Kamoiunbe population, NB: Nuibetsu population, WK: Owakasawa population, FJ: Fuji population.

Locus		KM	NB	WK	FJ	Mean (KM was excluded)
		n = 32 <i>S. malma malma</i>	n = 35 <i>S. l. leucomaenis</i>	n = 30 <i>S. l. pluvius</i>	n = 20 <i>S. l. japonicus</i>	
<i>Sle-1</i>	No. of alleles	–	20	2	2	8.0
	Range (bp)	–	237 – 321	261 – 265	307 – 311	
	H_{obs}	–	0.943	0.333	0.550	0.609
	H_{exp}	–	0.928	0.325	0.450	0.568
	n	–	35	30	20	
	p value	–	0.492	1.000	0.609	
<i>Sle-4</i>	No. of alleles	–	14	1	1	5.3
	Range (bp)	–	168 – 266	170	186	
	H_{obs}	–	0.829	0.000	0.000	0.276
	H_{exp}	–	0.895	0.000	0.000	0.298
	n	–	35	30	20	
	p value	–	0.332	–	–	
<i>Sle-5</i>	No. of alleles	12	11	2	1	4.7
	Range (bp)	197 – 359	187 – 241	197 – 203	197	
	H_{obs}	0.813	0.829	0.467	0.000	0.432
	H_{exp}	0.683	0.853	0.508	0.000	0.454
	n	32	35	30	20	
	p value	0.919	0.137	0.738	–	
<i>Sle-6</i>	No. of alleles	4	4	1	2	2.3
	Range (bp)	294 – 304	300 – 306	302	298 – 302	
	H_{obs}	0.313	0.371	0.000	0.300	0.224
	H_{exp}	0.375	0.407	0.000	0.328	0.245
	n	32	35	30	20	
	p value	0.318	0.253	–	1.000	
<i>Sfo-12</i>	No. of alleles	3	4	3	1	2.7
	Range (bp)	239 – 245	241 – 253	251 – 255	251	
	H_{obs}	0.563	0.543	0.467	0.000	0.337
	H_{exp}	0.493	0.573	0.514	0.000	0.362
	n	32	35	30	20	
	p value	0.808	0.906	0.827	–	
Mean	No. of alleles	6.3	10.6	1.8	1.4	4.6
	H_{obs}	0.563	0.703	0.253	0.170	0.375
	H_{exp}	0.517	0.731	0.269	0.156	0.385

Table 3. The number of common alleles within the samples from each river for each microsatellite marker. The number on the diagonal indicates the number of alleles in each sample. KM: Kamoiunbe population, NB: Nuibetsu population, WK: Owakasawa population, FJ: Fuji population.

<i>Sle-1</i>	KM	NB	WK	FJ	<i>Sle-4</i>	KM	NB	WK	FJ
KM	–				KM	–			
NB	–	20			NB	–	14		
WK	–	2	2		WK	–	1	1	
FJ	–	0	0	2	FJ	–	0	0	1

<i>Sle-5</i>	KM	NB	WK	FJ	<i>Sle-6</i>	KM	NB	WK	FJ
KM	12				KM	4			
NB	1	11			NB	2	4		
WK	1	2	2		WK	1	1	1	
FJ	1	1	1	1	FJ	2	1	1	2

<i>Sfo-12</i>	KM	NB	WK	FJ
KM	3			
NB	1	4		
WK	0	2	3	
FJ	0	1	1	1

population and at the *Sle-4*, *Sle-5*, and *Sfo-12* loci in the Fuji population. However, in the Nuibetsu population, all the loci contained multiple alleles (Table 2).

In the Kamoiunbe population, which comprised Dolly Varden individuals, *Sle-5*, *Sle-6*, and *Sfo-12* yielded bands that could be scored and these loci were found to be polymorphic. When we performed PCR, these 3 markers were amplified in all Dolly Varden individuals. The number of alleles per locus ranged from 12 in *Sle-5* to 3 in *Sfo-12* and the expected heterozygosities ranged from 0.683 in *Sle-5* to 0.375 in *Sle-6*. Since *Sle-1* and *Sle-4* yielded complex banding patterns for this population, we could not score the allelic bands of these 2 markers (Table 2).

Population differentiation

Subsequently, we analyzed 3 Japanese char populations that contained all the 5 markers. Significant ($p < 0.001$) genetic differentiation was observed among the populations with an overall F_{ST} value of 0.507. Moreover, pairwise F_{ST} values ranged from 0.441 to 0.700, indicating significant differences between these samples (Table 4).

Table 4. Pairwise F_{ST} values (above the diagonal) and their statistical significance (below the diagonal). NB: Nuibetsu population, WK: Owakasawa population, FJ: Fuji population.

	NB	WK	FJ
NB			
WK	*	0.441	0.455
FJ	*	*	0.700

* Indicates $p < 0.0167$ after Bonferroni correction, $k = 3$

Discussion

Microsatellite markers developed in this study

In this study, 4 microsatellite markers were developed in the Japanese char. These markers could be satisfactorily used for the analysis of the populations of not only Nikko-iwana, which was the source species, but also Amemasu and Yamato-iwana, which were subspecies. Moreover, *Sle-5* and *Sle-6* could be used for the analysis of the Dolly Varden population. Deviation from HWE and linkage disequilibrium were not observed. Thus, we thought that these markers were mutually independent and that the possibility of the existence of null alleles was low.

In the Kamoiunbe population, which comprised Dolly Varden individuals, *Sle-1* and *Sle-4* exhibited complex banding patterns. Such complex patterns were attributed to the absence of sequence specificity in the genomic DNA samples²⁴. Thus, these complex banding patterns, which are obtained by using microsatellite markers from non-target species, hinder the genetic analysis of the target species. These results indicated that these 4 markers were applied to the Amemasu and Yamato-iwana, which are subspecies of *S. leucomaenis*, and *Sle-5* and *Sle-6* were applied to the Dolly Varden, which is a closely related species. Moreover, *Sfo-12* was applied to both the Japanese char and Dolly Varden. Thus, these markers will be useful in further investigations on the Japanese char and Dolly Varden.

Although the isozyme analysis of Nakajima and Fujio⁵ indicated that the maximum number of alleles

per locus in the Japanese char was 4, analysis using the microsatellite markers developed in this study indicated that the maximum number of alleles was 20. Furthermore, the mean number of alleles per locus was 10.6 in the Nuibetsu population, which was similar to the mean number of alleles (10.8) reported in other anadromous fish species²⁵. In addition, the heterozygosity of the Nuibetsu population was 0.731, which is relatively higher than the heterozygosity (0.68) observed in other anadromous fish²⁵. Thus, we suggest that the 4 markers will be useful in the analysis of the Japanese char population. Of these markers, *Sle-1*, *Sle-4*, and *Sle-5*, which have a relatively high number of alleles, will be particularly useful. Moreover, in each population, a relatively high number of unique alleles was observed in these markers. Thus, these markers are very effective for the population analysis of this species. However, the mean number of alleles per locus and the mean expected heterozygosity in the Owakasawa and Fuji populations were lower than those reported in other freshwater fish species²⁵. This matter is discussed in the following section.

Analysis of the Japanese char population

The genetic variabilities of the Owakasawa and Fuji populations were lower than that of the Nuibetsu population. If an outbred population decreases in size, the risk of extinction increases owing to genetic drift and inbreeding depression^{26, 27}. In such a population, artificial gene flow, which involves the introduction of individuals from other populations, enables the recovery of the population²⁸. Such contraction and subdivision of populations may be one of the causes of deviation from HWE and the occurrence of linkage disequilibrium²⁹. However, in the Owakasawa and Fuji populations, deviation from HWE and linkage disequilibrium were not observed. Thus, no evidence was available to prove that genetic bottlenecks occurred recently in these populations.

Genetic variability is not always related to population size, and historical factors may be more important in determining the patterns of genetic variability^{30, 31}. As stated above, many individuals in the Nuibetsu population may be anadromous, whereas the Owakasawa and Fuji populations are landlocked. Generally, genetic variability in freshwater fish population is lower than that in marine and anadromous

fish populations^{25, 32}. A reason for this low variability may be that freshwater fish populations are restricted to specific areas over a relatively short to moderate evolutionary time²⁵. Moreover, the Owakasawa and Fuji populations are closer than the Nuibetsu population to the southern limit of the region where Japanese chars are distributed. Populations in peripheral areas are often smaller than and more isolated from central populations owing to their occupancy of less suitable environments; this may reduce gene flow³³. Thus, peripheral populations may exhibit historical loss of genetic variability. Contrary to the effects of genetic bottlenecks on populations, artificial gene flow and subsequent loss of genetic distinctiveness in peripheral populations may seriously damage the evolutionary legacy of a species²⁷. Thus, a different conservation strategy should be adopted to counter the effects caused by recent genetic bottlenecks or the historically low genetic variability. For the formulation of appropriate strategies for the conservation of the Japanese char populations, detailed genetic investigations using these markers are required.

A large amount of genetic differentiation was observed among the Japanese char populations. This result supported the observations in the study of Nakajima and Fujio⁵, which revealed genetic differentiation among char populations using isozyme analysis.

Therefore, this set of microsatellite markers will be an effective tool for the detection of genetic variability and for the determination of the population structure of this species.

Acknowledgements

We are grateful to the Chichibu Fishermen's Cooperative Association for their assistance with the sampling. Additionally, we thank Daisei Ando (Hokkaido Fish Hatchery), Tadashi Okura, Yoshinari Otomo, Masashi Mizuochi, and Shigeru Kibe (Saitama Prefecture Agriculture and Forestry Research Center Fisheries Laboratory) for their cooperation during sampling; Jun-ichi Tsuboi (Yamanashi Prefectural Fisheries Technology Center) and Jun Nagura (Flower, Cereal Cultivation and Fisheries Division, Yamanashi Prefectural Government) for providing Yamato-iwana samples from the Fuji River; and Mariko Miyazaki, Yumi Urushibara, and Yoko Tanaka for their technical assistance during our study.

References

- 1) Hosoya, K. (1993) Salmonidae, In "Fishes of Japan." eds. by T. Nakabo, Tokai University PRESS, Tokyo, pp256-261 (in Japanese).
- 2) Oshima, M. (1961) Study on the Japanese chars. Chojushuho, 18: 3-70 (in Japanese).
- 3) Inamura, A. and M. Nakamura (1962) Distribution and differentiation of Japanese char. Rep. Res. Inst. Nat. Resources, 58/59: 64-78 (in Japanese).
- 4) Yoshiyasu, K. and Y. Humoto (1972) Starch-gel electrophoresis of hemoglobin of freshwater salmonid fishes in southwest Japan-I. Genus *Salvelinus* (char). Bulletin of Japanese society of scientific fisheries, 38: 779-788.
- 5) Nakajima, M. and Y. Fujio (1995) Genetic differentiation among local populations of Japanese char *Salvelinus leucomaenis*. Fisheries Science, 61: 11-15.
- 6) Yamamoto, S., K. Morita, S. Kitano, K. Watanabe, I. Koizumi, K. Maekawa and K. Takamura (2004) Phylogeography of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) inferred from mitochondrial DNA sequences. Zoological Science, 21: 229-240.
- 7) Nakamura, T. (1999) Comparison of physical characteristics of spawning redds between the fluvial Japanese charr *Salvelinus leucomaenis* and the masu salmon *Oncorhynchus masou masou* in headwaters of the Kinu river, central Japan. Nippon Suisan Gakkaishi, 65: 427-433 (in Japanese with English abstract).
- 8) Taniguchi, N. (2003) Genetic factor in broodstock management for seed production. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 13: 177-185.
- 9) Ferguson, A. (2004) The importance of identifying conservation units: Brown trout and pollan biodiversity in Ireland. Proceedings of The Royal Irish Academy, 104B: 33-41.
- 10) Goldstein, D. B. and D. D. Pollock (1997) Launching microsatellites: A review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. Journal of Heredity, 88: 335-342.
- 11) Takagi, M., E. Shoji and N. Taniguchi (1999) Microsatellite DNA polymorphism to reveal genetic divergence in Ayu, *Plecoglossus altivelis*. Fisheries Science, 65: 507-512.
- 12) Yamamoto, S., K. Morita, I. Koizumi and K. Maekawa (2004) Genetic differentiation of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) populations after habitat fragmentation: Spatial-temporal changes in gene frequencies. Conservation Genetics, 5: 529-538.
- 13) Kubota, H., T. Doi, S. Yamamoto and S. Watanabe (2007) Genetic identification of native populations of fluvial white-spotted charr *Salvelinus leucomaenis* in the upper Tone river drainage. Fisheries Science, 73: 270-284.
- 14) Primmer, C. R., A. P. Møller and H. Ellegren (1996) A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. Molecular Ecology, 5: 365-378.
- 15) Roa, A. C., P. Chavarriaga-Aguirre, M. C. Duque, M. M. Maya, M. W. Bonierbale and C. Iglesias (2000) Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. American Journal of Botany, 87: 1647-1655.
- 16) Wright, T. F., P. M. Johns, J. R. Walters, A. D. Lerner, J. G. Swallow and G. S. Wilkinson (2004) Microsatellite variation among divergent populations of stalk-eyed flies, genus *Cyrtodiopsis*. Genetical Research, 84: 27-40.
- 17) Maekawa, K. (1973) On a silvery smolt of the Dolly Varden *Salvelinus malma*, collected from the Shiretoko Peninsula, Hokkaido. Japan Journal of Ichthyology, 20: 245-247 (in Japanese with English abstract).
- 18) Komiyama, E., N. Ohtaishi and K. Maekawa (1982) Occurrence of sea-run type of the Dolly Varden in the Shiretoko peninsula, Hokkaido. Japan Journal of Ichthyology, 29: 298-302.
- 19) Kishi, D. and K., Maekawa (2003) Potential smolting ability of stream-dwelling Dolly Varden *Salvelinus malma*. Fisheries Science, 69: 1301-1302.
- 20) Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh and I. Nakayama (1996) Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. Fisheries Science, 62: 727-730.

- 21) Rozen, S. and H. J. Skaletsky (1998) Primer 3. Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html.
- 22) Angers, B., L. Bernatchez, A. Angers and L. Desgroseillers (1995) Specific microsatellite loci for brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell) reveals strong population subdivision on microgeographic scale. *Journal of Fish Biology*, 47: 177-185.
- 23) Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- 24) Zhang, Z., D. J. Tan, S. Hu, J. Yu and Q. Xue (2007) A Genome-wide Microsatellite Polymorphism Database for the Indica and Japonica Rice. *DNA Research*, 14: 37-45.
- 25) DeWoody, J. A. and J. C. Avise (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56: 461-473.
- 26) Keller, L. F. and D. M. Waller (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 17: 230-241.
- 27) Hoffman, E. A. and M. S. Blouin (2004) Historical data refute recent range contraction as cause of low genetic diversity in isolated frog populations. *Molecular Ecology*, 13: 271-276.
- 28) Madsen, T, R. Shine, M. Olsson and H. Wittzell (1999) Restoration of an inbred adder population. *Nature*, 402: 34-35.
- 29) Flankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe (2002) Characterizing genetic diversity: single loci. Pp72-95, in "Introduction to conservation genetics", Cambridge University press, Cambridge, United Kingdom.
- 30) Coates, D. J. (1988) Genetic diversity and population genetic structure in the rare chattering grass wattle, *Acacia anomala* Court. *Australian Journal of Botany*, 36: 273-286.
- 31) Ellstrand, N. C. and D. R. Elam (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 217-242.
- 32) Ward, R. D., M. Woodwark and D. O. F. Skibinski (1994) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, 44: 213-232.
- 33) Lesica, P. and F. W. Allendorf (1995) When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology*, 9: 753-760.

イワナ *Salvelinus leucomaenis* におけるマイクロサテライト DNAマーカーの開発と近縁種への転用

山口光太郎 (埼玉農総研水研、東北大・院農)・中嶋正道 (東北大・院農)

谷口順彦 (福山大・内生資研)

イワナの持続的な資源活用および天然集団の保全についての的確に検討するために、4つのマイクロサテライトマーカーを開発した。これらのマーカーは、多型が検出され、連鎖関係が見られなかった。また、近縁種のオシロコマには2マーカーが、2亜種には全てのマーカーが転用可能と考えられた。これらのマーカーに近縁種で開発された1マーカーを加えてイワナ集団の分析を実施したところ、標本集団間で遺伝的異質性が観察された。また、本州中央部の2集団は、北海道の1集団と比べて遺伝的変異性が低い傾向にあり、生態的特性や分布域などが関係している可能性が考えられた。以上のように、これらのマーカーは、本種の詳細な集団分析に有効であると考えられた。

水産育種研究会組織

会 長	岡本信明
庶務幹事	坂本 崇、藤加菜子
会計幹事	吉崎悟朗
編集幹事	古丸 明(主任)、河村功一、荒井克俊、阿部周一、池田 実、 木島明博、関 伸吾、中嶋正道、中山一郎、西田 睦、 山羽悦郎
国際学会担当幹事	谷口順彦、和田克彦
総括幹事	藤尾芳久、山崎文雄
会計監査	青木 宙

水産育種 第38巻2号

2008年(平成20年)12月28日印刷

2008年(平成20年)12月28日発行

編集者 古丸 明
代表者兼発行者 岡本信明
発行所及び著作権者 水産育種研究会
〒514-8507 津市栗真町屋町1577
三重大学生物資源学研究科
TEL 059-231-9527 FAX 059-231-9540
印刷所：(有)西村謄写堂
〒780-0901 高知市上町1丁目6-4
TEL(088)822-0492 FAX(088)825-1888

FISH GENETICS AND BREEDING SCIENCE

Volume 38 Number 2, December 2008

CONTENTS

Review

- Doubly Uniparental Inheritance of Mitochondrial DNA in the Blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*: The Possibility of the Correlation Between Sperm Mitochondria and Germ Cell Formation M. OBATA, N. SANO and A. KOMARU 61

Originals

- Effects of Single and Several-time Treatment with 17 α -methyltestosterone on Masculinization in Masu Salmon D. ANDO, T. TERANISHI, S. MIZUNO, K. NAITO, N. KOIDE and K. ARAYA 73
- The Comparison of Blood Characters in Ayu Growing in Different Environmental Conditions M. NAKAJIMA, S. TAKAGI, H. HOSOKAWA and N. TANIGUCHI 81
- Heritability Estimates by Intra-sire Regression of Offspring on Dam and Half-sib Analysis of the Number of Gill Rakers and Vertebrae in Masu Salmon, *Oncorhynchus masou masou* D. ANDO, S. MANO, K. SHIMODA, Y. SHINRIKI, N. KOIDE and M. NAKAJIMA 87
- Mitochondrial D-loop DNA Analysis of Chinese Crucian Carp Reveals the Maternal Origin of Goldfish T. KIJIMA, K. FUTAMI, M. KATABAMI, M. YAMANE, Z. Y. WANG, J. HUANG, A. OZAKI, T. SAKAMOTO and N. OKAMOTO 97
- Transgenic Amago Salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* Produced by Microinjection of a Growth Hormone Gene H. NAGOYA, H. OKAMOTO, T. MASAOKA, H. OHTA, S. SATO and K. ARAKI 105
- Genetic Structure and Phylogeny in Seven Japanese Species of Cynoglossidae (Pisces: Pleuronectiformes) K. YOKOGAWA 113
- Development of Microsatellite Markers in the Japanese Char *Salvelinus leucomaenis* and its Application to Closely Related Species K. YAMAGUCHI, M. NAKAJIMA and N. TANIGUCHI 123

Information 131

The Regulations 133

Instructions for Authors 134