ヒラメ人工種苗で見られた重度の脊椎骨癒合個体の遺伝的解析

澤山英太郎,¹ 高木基裕^{2*}

(2011年10月21日受付, 2012年2月14日受理)

¹有限会社まる阿水産開発課, ²愛媛大学南予水産研究センター農学部分室

Genetic investigation of artificially raised Japanese flounder with extremely fused vertebrae

EITARO SAWAYAMA¹ AND MOTOHIRO TAKAGI^{2*}¹R & D Division, Marua Suisan Co., Ltd., Kamijima, Ehime 794-2410, ²South Ehime Fisheries Research Center, Tarumi Branch, Ehime University, Matsuyama, Ehime 790-8566, Japan

Artificially raised Japanese flounder exhibiting short body length were morphologically characterized and genetic investigations were conducted using microsatellite DNA. Individuals exhibiting short and normal body lengths were collected 60 days after hatching. Flounder with short bodies were morphologically analyzed by soft X-ray and divided into three groups, A, B and C, based upon body shapes and the positions of fused vertebrae. All short bodied individuals exhibited highly fused vertebrae. Main vertebrae fusion points were determined as follows: type A: all positions upon the vertebrae, type B: vertebra numbers 1 to 4 and 17 to 30, and type C: vertebra numbers 1 to 4 and 19 to 36. The frequency of these short body individuals observed in this study was 1.7%. Four microsatellite markers (*Pol-1**, *-3**, *-4**, *-5**) were deployed for parentage analysis and 99.3% of specimens were successfully assigned. One each of dam and sire were significantly associated with type B short body individuals. Furthermore, we identified that the same sire was also significantly associated with type C short body individuals. These results suggest that genetic factors are probably one of the underlying factors of short body individuals identified in juvenile Japanese flounder.

キーワード：遺伝, 親子鑑定, 短軀, ヒラメ, 癒合

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の種苗生産および養殖は西日本を中心に行われ, 近年ではマダイに次ぐ大量生産がなされている。¹⁾ しかし, 様々な疾病による歩留まりの低下や,²⁻⁴⁾ 近年の景気の低迷や消費者の魚離れ, さらに外国産ヒラメ輸入量の増加による需給構造の変化といった種々の要因により, わが国の養殖ヒラメの生産量および生産額は年々減少傾向にあり,⁵⁾ より一層のコスト削減および生産効率の改善が求められている。そのため, 種苗生産業者はより高品質の種苗を生産し, 養殖業者のニーズにあった高付加価値の種苗を提供する必要がある。

これまでに, 種苗生産業者は成長や耐病性形質に着目した選抜飼育を行っており, 有用形質を有した種苗が市販されるに至っている。⁶⁻⁸⁾ しかし, 養殖親魚集団では選抜飼育の過程において近親交配が進んでおり, アリル数の減少や Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱が確認さ

れている場合がある。⁹⁻¹¹⁾ また, 一部の形態異常は遺伝的な要因により発現することが示唆されており,¹²⁻¹⁴⁾ 近親交配による劣性遺伝子の顕在化が疑われる。そのため, 形態異常に対する遺伝的要因を明らかにし, 遺伝的な形態異常に関与している親魚を排除することは, 優良種苗を安定的に生産するうえで重要である。しかしながら, 海産魚の種苗生産においては同一水槽に複数の雌雄親魚を収容し自然産卵により大量の受精卵を得ることが多く, 生産に関与した親魚や形態異常個体に高い割合で関与した親魚などを特定することは困難である。加えて, 海産魚は飼育や交配に多くの設備や労力を必要とし 1 対 1 交配による交配試験を行うことが難しいため, 形態異常の遺伝的要因を特定した例は少ない。¹⁵⁻¹⁷⁾

近年, マイクロサテライト DNA マーカーを用いた形態異常個体の家系解析や集団遺伝解析が行われており,^{12-14,18,19)} 短時間で形態異常の遺伝的要因を推定できる

ことが示されている。²⁰⁾ そのため、特定の親魚の関与が確認された場合には、該当する親魚を迅速に排除することが可能となった。また、マイクロサテライト DNA 解析から得られるアリル数やアリル頻度、ヘテロ接合体率等の集団遺伝学的指標は、DNA 親子鑑定の結果の裏付けとなり、異常形質に与える近親交配の影響を推定するのに役立つと考えられる。

魚類の短軀症は椎体の癒合を主とする骨格異常で、躯幹部が短縮する体形異常である。養殖魚においては、ニジマス *Oncorhynchus mykiss*、マダイ *Pagrus major*、シマアジ *Seriola dumerili*、およびヒラメといった魚種で報告されており、飼育水温、^{21,22)} 飼育水中の各種溶存ガス濃度、²³⁻²⁵⁾ および仔魚期に与える生物餌料の栄養価の多寡²⁶⁾ 等の環境要因によって引き起こされることが明らかになっている。また、近年ではニジマス *Oncorhynchus mykiss* やマスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* において脊椎の湾曲や椎体の癒合といった脊椎骨に関連する様々な異常が突然変異や非相加的な遺伝的支配によって引き起こされることが示唆されている。^{27,28)} 我々は2009年に生産した種苗群において、通常よりも高い割合で短軀個体を確認した。そこで本研究では、発生した短軀個体について X 線写真を撮影して体形異常を示す箇所を調べ、その特徴を明らかにすることを目的とした。また、短軀個体の親子関係をマイクロサテライト DNA の多型により調べ、親魚個体間での発生頻度を比較した。加えて、マイクロサテライト DNA 解析から得られるアリル数、アリル頻度、およびヘテロ接合体率といった各種遺伝指標についても比較し、親子鑑定の結果を評価した。

材料および方法

供試魚 種苗生産には PIT タグ (BIOMARK, 8 × 2 mm) によりあらかじめ個体識別された有限会社まる阿水産の4歳齢のメス親魚8個体とオス親魚9個体を用いた。種苗生産は、親魚集団から自然産卵により1日間で得られた受精卵を用い、20 kL の水槽2基により行った。餌料系列はふ化後4日目からシオミズツボウムシ *Brachionus plicatilis* sp. complex (S 型)、14日目からアルテミア *Artemia salina* のノープリウス幼生、20日目からは初期配合飼料 (ラブ・ラアバ、林兼産業)、50日齢からは育成用配合飼料 (Jr., 林兼産業) とした。飼育密度を低くさせる目的で、23日齢に50 kL 水槽2基へそれぞれ移槽した。水温は23日目まで19.0~20.0℃の範囲で加温して、以降は17.5℃~19.5℃の自然水温下で管理した。換水は0.1~8回転/日とした。60日齢に選別を行い、無作為に抽出した300個体から短軀個体の出現率を求めた。また、選別の過程で短軀症状を示す個体をサンプリングして後の実験に用いた。

各短軀個体と正常個体は全長 (L , cm) および魚体重 (W , g) を測定し、肥満度 (CF) を次式で算出した。

$$CF = W/L_{cm}^3 \times 10^3$$

なお、目視によって正常と判断された個体については後述の方法で X 線写真を撮影し、骨格に異常が無いかを判断して、異常が確認されなかった56個体を正常個体として以後の実験に用いた。

正常個体と短軀個体の全長、魚体重、肥満度については、統計解析ソフトの GraphPad Prism 5 (GraphPad software) を用いて、Bonferroni の多重比較により検定を行った ($p < 0.05$)。

X 線写真による観察 短軀個体の X 線写真を撮影し、椎体の癒合が起こっている箇所を調べた。X 線写真は、超軟 X 線実験装置 B-5 (SOFTEX) を用いて、18.5 kV の電圧で30秒間の X 線照射により撮影し、常法に従い現像した。椎体数は X 線フィルム上で計数し、尾部棒状骨までを含めて示した。また、癒合は前後の椎体が接着している状態で判断し、癒合箇所の椎体数は神経棘数から求めた。

マイクロサテライト DNA 解析 雌雄両親魚、正常個体、および短軀個体の尾鰭から、High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) を用いてプロトコルに従ってゲノム DNA を抽出した。

解析には4つのマイクロサテライト DNA マーカー座、*Pol-1**、-3*, -4*, -5* を用いた。²⁹⁾ PCR 反応はフォワードにそれぞれ6-FAM, NED, VIC, PET の蛍光ラベル、リバーズに7塩基の tail 配列を付加したプライマー組 (Applied Biosystems) を用い、前報に従っておこなった。¹⁴⁾ PCR 産物は泳動する前に95℃で2分間加熱し、ABI 310 (Applied Biosystems) により電気泳動を行った。アリルサイズは600 LIZ™ Size Standard (Applied Biosystems) をもとに、GeneMapper v 4.0 (Applied Biosystems) でアリル型を決定した。

親子鑑定はマイクロサテライト DNA のアリル型をもとに CERVUS 3.0³⁰⁾ を用いて実施し、親子鑑定の解析結果をもとに正常個体と短軀個体を親魚毎に振り分けた。また、親子関係の結果から得られた親魚毎の正常個体と短軀個体の出現頻度の偏りについては χ^2 検定をおこない、正常個体と比較して各短軀個体の出現頻度が有意に高い場合 ($p < 0.05$) には遺伝要因の関与が疑われると判断した。統計処理は統計解析ソフトの GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) を用いた。

正常個体および短軀個体ごとに4マーカー座のアリル数とヘテロ接合体率の観察値 (ho) と期待値 (he) を親子解析ソフト CERVUS 3.0 を用いて算出した。個体数に依存しないアリル数 (Allelic richness) については集団遺伝解析ソフトの FSTAT 2.9.3.2,³¹⁾ 正常個体と短軀個体間の遺伝的異質性の検定 (F_{ST} 値) については

ARLEQUIN version 3.0³²⁾により求めた。また、今回の種苗生産に用いた親魚の各遺伝子座において、仔のアリルの由来を判別できる確率を示す多型情報含有値 (PIC) を CERVUS 3.0 によって求めた。

結 果

異常個体の特徴 サンプルングした短軀個体は体形的な特徴が異なってみられたため、見た目の形態から軀幹の前部が詰まっているものを短軀 A ($n=18$)、全体が詰まっているものを短軀 B ($n=60$)、尾部が詰まっているものを短軀 C ($n=15$) として後の実験に用いた。なお、これらの短軀個体の出現頻度は合わせて 1.7% であった。

正常個体と短軀 A, B, C の全長、魚体重、および肥満度を Table 1 に示した。解析に用いた短軀個体 A, B, C の平均全長はいずれも正常個体と比べて有意に小さかった ($p<0.05$)。同魚体重については正常個体と比べて有意差は確認されなかった ($p>0.05$)。また、全長と魚体重から肥満度 (CF) を求めたところ、短軀個体 A, B, C はいずれも正常個体と比べて有意に大きな値となった ($p<0.05$)。

短軀 A, B, C の代表的な個体の写真と、その X 線写真を Fig. 1 に示した。また、対照として正常個体の写真と X 線写真も同様に示した。短軀 A は外見的に軀幹前部が詰まっており、特に頭部から背部にかけてと肛門から臀鰭にかけての急激な隆起により体形が菱形状となり (Fig. 1a)、X 線写真からも腹椎と尾椎前半に癒合が確認された (Fig. 1e)。短軀 B は外見的に軀幹が全体的に詰まっているようにみられ (Fig. 1b)、X 線写真からも腹椎前半と尾椎の中心部に癒合が確認された (Fig. 1f)。短軀 C は外見的に軀幹後方が詰まっており、特に尾柄部を欠いて軀幹から尾鰭が生じているように見えることでスパー型となり (Fig. 1c)、X 線写真からも腹椎前半と尾椎中後半に多くの個体で癒合が確認された (Fig. 1g)。

脊椎骨の癒合箇所を X 線写真からさらに詳しく調べたところ、短軀 A は脊椎骨の前半から後半にかけての

多くの椎体で癒合が見られた (Fig. 2a)。短軀 B では椎体の 1~4 番 (腹椎 1~4 番) と 17~30 番 (尾椎 5~17 番) にかけて癒合が見られた (Fig. 2b)。短軀 C では短軀 B と同様に椎体の 1~4 番 (腹椎 1~4 番) に癒合が見られ、また、19~36 番 (尾椎 7~21 番) においても癒合が確認された (Fig. 2c)。

親子鑑定 種苗生産に用いた親魚の各遺伝子座のジェノタイプ、アリル数、および PIC 値を Table 2 に示した。メス親魚の 4 個体において *Pol-1**, *-3**, *-4** 遺伝子座の 7 アリルで当該親魚固有のアリルが確認された。また、オス親魚では 3 個体において *Pol-1**, *-3**, *-4** 遺伝子座のそれぞれ 1 アリルで当該親魚固有のアリルが確認された。*Pol-5** 遺伝子座においては親魚個体で固有のアリルは確認されなかった。PIC 値についてはオス親魚の *Pol-1** 遺伝子座が 0.678 と最も低かったが、他の遺伝子座においては 0.745~0.853 の比較的高い値を示した。

マイクロサテライト DNA の多型から親子鑑定を行ったところ、*Pol-1**, *-3**, *-4**, *-5** の 4 マーカー座により、解析に用いた 99.3% の親子関係が明らかになり、正常個体の 1 個体を除いて両親を特定することができた。親子鑑定の結果から、今回の種苗生産には産卵水槽に収容したメス親魚 8 個体のうちの全てが、オス親魚 9 個体のうちの 8 個体が関与していた。また、27 組の親魚組合せが確認され、そのうち 14 組 (51.9%) が正常個体と短軀個体の両方に、8 組 (29.6%) が正常個体のみに、3 組 (11.1%) が短軀 A のみに、1 組 (3.7%) が短軀 A と B および B と C にそれぞれ関与していた (Table 3)。

正常個体には、8 個体のメス親魚と 7 個体のオス親魚が関与しており、21 個の組合せが確認された。メス親魚では No. 3 と No. 6 が正常個体の生産に大きく関わっており、それぞれ 25.5% と 34.5% の割合で関与していた (Table 3a)。また、他のメス親魚は 1.8~12.7% の割合であった。一方、オス親魚では No. 5 と No. 6 がそれぞれ正常魚の 23.6% と 43.6% の割合で関与しており、他のオス親魚は 3.6~10.9% の割合であった (Table 3a)。

短軀 A には 6 個体のメス親魚と 6 個体のオス親魚が関与しており、12 個の組合せが確認された。メス親魚では No. 3 および No. 5 が短軀 A の生産に大きく関わっており、それぞれ 27.8% と 44.4% の割合で関与していた (Table 3b)。また、他のメス親魚は 5.6~11.1% の割合であった。一方、オス親魚は No. 6 が 55.6% と高い割合で関与していたが、他のオス親魚は 5.6~11.1% の割合であった (Table 3b)。メス親魚間の正常個体と短軀 A の組成比を検討したところ、有意差は確認されなかった ($p>0.05$)。また、オス親魚間についても

Table 1 Biological data of normal and short body individuals

	TL (cm)	BW (g)	CF
Normal	3.81±0.38 a	0.44±0.11 a	7.81±1.11 b
Short body A	2.89±0.36 b	0.39±0.10 a	16.39±3.41 a
Short body B	3.04±0.32 b	0.46±0.12 a	16.16±2.49 a
Short body C	3.10±0.33 b	0.50±0.13 a	16.78±2.34 a

Mean ± SD

Subscripts specimens indicate Bonferroni's multiple comparison test for groups ($p<0.05$, a>b).

Fig. 1 Types of short body individual used in this study: (a) short body A, (b) short body B, (c) short body C, (d) normal individual, (e) soft X-ray of the short body A, (f) soft X-ray of the short body B, (g) soft X-ray of the short body C, (h) soft X-ray of the normal individual. Scale bars indicate 10 mm. White lines on X-ray photographs indicate contours of each individual.

同様に検定を行ったが、いずれの親魚においても有意差が確認されなかった ($p > 0.05$)。

短軀 B には 6 個体のメス親魚と 6 個体のオス親魚が関与しており、15 個の組合せが確認された。メス親魚では No. 8 が短軀 B の生産に大きく関わっており、

38.3% の割合で関与していた (Table 3c)。また、他のメス親魚は 3.3~18.3% の割合であった。一方、オス親魚は No. 6 と No. 7 がそれぞれ 43.3% と 30.0% と高い割合で関与しており、他のオス親魚は 5.0~15.0% の割合で関与していた (Table 3c)。メス親魚間の正常個体

Fig. 2 Occurrence frequency of vertebral bone deformity in Japanese flounder of 50 day-post-hatch. Letters a, b and c represent each type of short body.

と短軀Bの組成比を検討したところ、短軀BはNo. 8において多く、その差は有意であった ($p < 0.05$)。また、オス親魚間についても同様に検定を行ったところ、短軀BはNo. 7において多く、その差は有意であった ($p < 0.05$)。

短軀Cには5個体のメス親魚と3個体のオス親魚が関与しており、6個の組合せが確認された。メス親魚ではNo. 3, No. 5, およびNo. 8が短軀Cの生産に大きく関わっており、それぞれ26.7%, 20.0%, 33.3%の割合で関与していた (Table 3d)。また、メス親魚No. 4とNo. 6は13.3%と6.7%の割合であった。一方、オス親魚はNo. 6とNo. 7がどちらも46.7%と高い割合で関与していた (Table 3d)。メス親魚間の正常個体と短軀Cの組成比を検討したところ、有意差は確認されなかった ($p > 0.05$)。一方で、オス親魚間についても同様に検定を行ったところ、No. 7において短軀個体が多く、その差は有意であった ($p < 0.05$)。

遺伝的多様性 解析に用いた正常個体、および短軀A, B, Cの遺伝的多様性をTable 4に示す。正常個体の

allelic richnessの平均値は5.3であり、また、全ての遺伝子座においてホモおよびヘテロ接合体過剰の傾向は確認されなかった。短軀Aのallelic richnessの平均値は5.2であり、また、*Pol-1**のヘテロ接合体率の観察値と期待値の比 (ho/he) は0.881となりホモ接合体過剰、*Pol-4**および*Pol-5**ではそれぞれ1.187と1.205となりヘテロ接合体過剰の傾向が見られた。短軀Bのallelic richnessの平均値は5.7となり、また、*Pol-4**における ho/he は1.123となりヘテロ接合体過剰の傾向が見られた。短軀Cのallelic richnessの平均値は5.4となり、また、*Pol-1**の ho/he は0.826でホモ接合体過剰の傾向が、*Pol-5**の ho/he は1.170とヘテロ接合体過剰の傾向が見られた。

今回解析に用いた正常個体、および短軀A, B, C間の F_{ST} 値をTable 5に示した。正常個体と短軀A間においては F_{ST} 値に有意差は確認されず ($p > 0.05$)、遺伝的に同質であったが、正常個体と短軀B, C間においては有意差が確認され ($p < 0.05$)、遺伝的異質性が確認された。また、短軀AとB, C間および短軀BとCに

Table 2 Genotypes and polymorphic information of four microsatellite loci of candidate broodstocks used in this study

Candidate broodstock	Genotypes			
	<i>Pol-1*</i>	<i>Pol-3*</i>	<i>Pol-4*</i>	<i>Pol-5*</i>
Dam 1	215/215	177/148	158/126	123/121
Dam 2	154/144	150/133	166/166	147/133
Dam 3	168/154	145/135	166/166	131/121
Dam 4	215/152	177/148	168/158	123/121
Dam 5	223/154	150/ 143	158/126	133/121
Dam 6	175/168	156/148	174/152	123/121
Dam 7	201/168	135/133	166/160	131/121
Dam 8	175/173	150/145	178/150	121/117
No. of alleles	9	8	9	6
PIC ^{*1}	0.844	0.853	0.810	0.755
Sire 1	173/144	148/133	149/126	133/121
Sire 2	215/152	150/148	158/126	123/121
Sire 3	215/168	148/148	166/126	133/131
Sire 4	215/168	150/133	158/150	131/121
Sire 5	215/ 150	145/145	166/166	133/121
Sire 6	215/215	171/152	166/166	133/133
Sire 7	215/168	152/148	166/160	147/117
Sire 8	215/168	148/148	166/155	147/123
Sire 9	152/152	177/133	168/126	131/123
No. of alleles	6	7	7	6
PIC	0.678	0.753	0.745	0.813

Boldface denotes unique alleles that are expressed in only one individual among 17 broodstocks.

^{*1} Polymorphic information content

における F_{ST} 値においては、いずれも有意差は確認されず ($p > 0.05$)、遺伝的異質性は確認されなかった。

考 察

今回の解析に用いた短軀個体について、まず、その体形的特徴から A, B, C の 3 種類に分類した。各短軀個体の脊椎骨の癒合箇所を調べたところ、それぞれの短軀個体は癒合箇所に異なる特徴を示したことから、各短軀個体の体形の違いは癒合箇所と関連があると思われた。すなわち、短軀 A は腹椎から尾椎前半にかけて癒合することにより背と腹側がせり出した体形、短軀 B は腹椎前半部と尾椎の中心部が癒合することで正常個体を短縮させた体形、短軀 C は腹椎前半と尾椎中後半での重篤な癒合により尾側に掛けて背と腹側がせり出した体形になったと考えられる。また、3 種類の短軀全てに共通して、腹椎の前半部において癒合が確認された。菅らは長崎県内の種苗生産会社において発生したヒラメの形態異常について外観と骨格から判別を行い、腹椎前半に癒合が生じる形態異常を報告していることから、³³⁾ 種苗生産に用いる親魚や飼育環境が異なっていたとしてもヒラメにおいて腹椎前半部は癒合が生じやすい箇所なのかも知

れない。

短軀 A, B, C の全長を正常個体と比較したところ、各短軀個体は正常個体と比べて有意に小さかった。しかしながら、正常個体と各短軀個体の魚体重を比較しても有意差は確認されず、肥満度については各短軀個体は正常個体と比べ有意に大きな値となった。餌料環境の充実した人工環境において飼育したことを考慮する必要があるが、増重という点から見た成長は同等であったといえる。

本種苗生産における 60 日齢での短軀個体出現頻度は 1.7% であった。X 線写真からも明らかなように、解析に用いた全ての短軀個体は椎体の重篤な癒合が確認され、特に短軀 A については肋骨が腹腔を圧迫していた。腹腔が圧迫されることにより、内臓機能に負の影響を受けることが予想されるが、本研究では 60 日齢以前の短軀個体出現頻度については検討していないため、実際にはより多くの短軀個体が出現し歩留まりを低下させている可能性がある。

親子鑑定の結果から、メス親魚 1 個体とオス親魚 1 個体が短軀 B と C の一部に有意に高い割合で関与していることが明らかとなったため、短軀 B と C の一部の個体では遺伝要因の関与が示唆された。今回の種苗生産に用いた雌雄親魚は兄弟関係にあり、近親交配の影響から劣性遺伝子の顕在化が起こった可能性もある。一方で、近年、マスノスケやニジマスにおける脊椎骨の癒合について近親交配以外の遺伝要因の関与が報告され、突然変異の影響が疑われている。^{27,28)} ヒラメを含む海産魚における短軀についてはそのような報告は未だ無いが、今後、より大規模な調査を行い突然変異性の遺伝についても検討する必要もあろう。なお、今回有意差が確認されたメス親魚 No. 8 とオス親魚 No. 7 は、正常個体と短軀 A においては低い割合で関与しており、このことは、短軀 A と短軀 B および C が異なる機構によって生じていることを示唆している。

いくつかの魚類では、脊椎骨の癒合には環境要因が大きく関与することが知られている。例えば、マダイやシマアジの短軀症においては、体節形成期の低酸素環境^{23,24)} や高二酸化炭素環境²⁵⁾ によって、また、ヒラメにおいてはビタミン A 過剰によって脊椎骨の癒合が起こることが報告されている。²⁶⁾ また、本研究においても、短軀個体と正常個体は同じ親魚の組合せから生じている場合が確認され、遺伝要因に加えて後天的要因の関与も示唆される。そのため、本短軀症に及ぼしうる物理化学的な条件や栄養条件についても検討する必要がある。谷口らはマダイにおいて親魚間における短軀個体発生率について検討を行っており、環境要因に加えて親魚の遺伝的素養が関わっていることを示している。³⁴⁾ また、Lein *et al.* はニジマスにおいて発生する短軀症について飼育水温と遺伝の関係を検討し、特定の卵管理水温によ

Table 3 Number of juveniles with (a) normal body, (b) short body A, (c) short body B, (d) short body C assigned to the full and half-sibling families using four microsatellite loci: number of every short body individual is compared to normal individuals by χ^2 test

Sire	Dam								Total (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
(a) Normal									
1	1	0	0	0	0	1	0	0	2(3.6)
2	1	0	0	2	0	3	0	0	6(10.9)
3	0	0	1	0	0	1	0	0	2(3.6)
4	0	0	0	0	4	0	0	0	4(7.3)
5	2	0	6	0	1	3	1	0	13(23.6)
6	0	1	7	3	2	10	0	1	24(43.6)
7	0	1	0	0	0	1	0	2	4(7.3)
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)
Total(%)	4(7.3)	2(3.6)	14(25.5)	5(9.1)	7(12.7)	19(34.5)	1(1.8)	3(5.5)	55(100)
(b) Short body A									
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)
2	0	0	0	0	0	1	0	1	2(11.1)
3	0	0	1	0	0	0	0	0	1(5.6)
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)
5	0	0	1	0	1	0	0	0	2(11.1)
6	1	0	2	1	6	0	0	0	10(55.6)
7	0	0	0	0	1	0	0	1	2(11.1)
8	0	0	1	0	0	0	0	0	1(5.6)
Total(%)	1(5.6)	0(0.0)	5(27.8)	1(5.6)	8(44.4)	1(5.6)	0(0.0)	2(11.1)	18(100)
(c) Short body B									
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)
2	0	0	0	1	0	3	0	5	9(15.0)
3	0	0	1	0	0	0	0	0	1(1.7)
4	0	0	0	0	3	0	0	0	3(5.0)
5	2	0	0	0	0	1	0	0	3(5.0)
6	0	0	9	2	6	6	0	3	26(43.3)
7	0	0	0	2	0	1	0	15	18(30.0)*
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)
Total(%)	2(3.3)	0(0.0)	10(16.7)	5(8.3)	9(15.0)	11(18.3)	0(0.0)	23(38.3)*	60(100)
(d) Short body C									
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)
4	0	0	0	0	1	0	0	0	1(6.7)
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)
6	0	0	4	0	2	1	0	0	7(46.7)
7	0	0	0	2	0	0	0	5	7(46.7)*
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)
Total(%)	0(0.0)	0(0.0)	4(26.7)	2(13.3)	3(20.0)	1(6.7)	0(0.0)	5(33.3)	15(100)

Full-siblings only associated with normal individuals are shown in bold.

* significant difference by χ^2 test ($p < 0.05$).

り短軀が発生するものの、地理的な系統によって出現頻度が異なることを明らかにしており、脊椎骨異常の発現に対して遺伝的な感受性の存在を示唆している。²⁴⁾ そのため、本短軀症の発生要因についても、後天的な要因と遺伝的な感受性を合わせて検討する必要がある。

正常個体と短軀 A は F_{ST} 値に有意な差がみられなかったが、正常個体と短軀 B, C 間については有意差がみられた。この結果は、短軀 B と C が特定の親魚から多く生じており、短軀に遺伝的要因が関与しているとする親子鑑定の結果を支持するものと考えられる。また、短

Table 4 Genetic variabilities of 4 microsatellite loci used for this study

Sample		<i>Pol-1*</i>	<i>Pol-3*</i>	<i>Pol-4*</i>	<i>Pol-5*</i>	Mean
Normal	No. of samples	56	56	56	56	
	No. of alleles	10	9	8	6	8.3
	Allelic richness	5.3	6.0	4.3	5.6	5.3
	<i>ho</i> ^{*1}	0.804	0.714	0.643	0.839	0.750
	<i>he</i> ^{*2}	0.787	0.748	0.611	0.785	0.733
	<i>ho/he</i>	1.022	0.955	1.052	1.069	1.024
Short body A	No. of samples	18	18	18	18	
	No. of alleles	7	8	5	6	6.5
	Allelic richness	5.0	5.6	4.4	5.9	5.2
	<i>ho</i>	0.667	0.833	0.833	1.000	0.833
	<i>he</i>	0.757	0.771	0.702	0.830	0.765
	<i>ho/he</i>	0.881	1.080	1.187	1.205	1.088
Short body B	No. of samples	60	60	60	60	
	No. of alleles	7	9	7	6	7.3
	Allelic richness	6.0	6.2	5.1	5.6	5.7
	<i>ho</i>	0.717	0.783	0.783	0.833	0.779
	<i>he</i>	0.760	0.761	0.697	0.833	0.763
	<i>ho/he</i>	0.943	1.029	1.123	1.000	1.024
Short body C	No. of samples	15	15	15	15	
	No. of alleles	6	7	6	6	6.3
	Allelic richness	5.3	5.9	4.7	5.7	5.4
	<i>ho</i>	0.600	0.733	0.667	1.000	0.750
	<i>he</i>	0.726	0.782	0.639	0.855	0.751
	<i>ho/he</i>	0.826	0.937	1.044	1.170	0.994

*1 Heterozygosity observed.

*2 Heterozygosity expected.

Table 5 Results of population pairwise F_{ST} values of normal and each short body individual

		Normal	Short body		
			A	B	C
Normal			NS	+	+
Short body	A	0.013		NS	NS
	B	0.017	0.007		NS
	C	0.026	0.004	-0.009	

+ : $p < 0.05$

軀 B と C は遺伝的に同質であることが示されたが、その体形は大きく異なっていた。加えて、短軀 B と C の出現頻度を χ^2 検定により比較しても有意な偏りは見られておらず（未記載）、短軀 B と C は出現家系が同一であると考えられる。これらのことから、脊椎の癒合には同じ遺伝要因が関与しているが、体形的な違いは後天的要因による影響を受ける可能性が示唆された。

本研究で用いた親魚家系は主に成長を指標とした選択飼育を行っており、創始集団からは数世代を経ているため（世代数は不明）、天然集団と比較して遺伝的多様性は低下していると考えられる。しかし、本選抜家系では

複数の親魚個体で個体固有のアリルが確認された。このことは、創始集団の規模が大きかったことを示唆しており、選抜飼育を経ても一定の多様性が保たれていると推測される。一方で、遺伝的な多様度が高い場合は種苗の品質がばらつく可能性があり、また、養殖業においてはより遺伝的に均質な種苗を求められるため、今後も成長や耐病性等といった経済形質に着目した選択飼育を行うことが必要であろう。

われわれは前報においてヒラメの逆位個体について遺伝要因の抽出を試み、メス親魚 1 個体が有意に関与していたことを報告している。¹³⁾ 本研究に用いた親魚群は逆位個体の解析に用いた群と同じであり、本研究で短軀個体に有意に関与していたメス親魚 No. 8 は逆位個体においても同じく有意に関与していた。逆位は変態期の眼位異常であり、³⁵⁾ 短軀症とは異なる作用機序によって生じると考えられる。この 2 種類の異なる形態異常が同一の親魚から高い割合で出現していたことについては、遺伝要因の類似性に加えて初期餌料の栄養価や水温といった環境要因との関連についても検討する必要がある。

本結果から、一部の親魚個体が短軀個体に有意に関与していることが明らかとなり、短軀症が遺伝的な要因に

よって生じていることが示唆された。そのため今後は、短軀個体に有意に関与している親魚を排除し、遺伝的に生じる短軀個体が効率的に排除されるか確かめる必要がある。

謝 辞

本論文をとりまとめるにあたり、研究の機会を頂いた(株)まる阿水産松浦昭典代表取締役社長に深謝する。本研究の一部は愛媛大学産学連携加速化事業の助成を受けて行われた。

文 献

- 1) 村田 修. ヒラメ. 水産増養殖システム1 海水魚 (熊井英水編), 恒星社厚生閣, 東京. 2005; 83-106.
- 2) Isshiki T, Nishizawa T, Kobayashi T, Nagano T, Miyazaki T. An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.* 2009; **47**: 87-99.
- 3) Hyung K, Dennis G, Wook BG, Wook SG, Joon HG, Sung JT, Chang PS. Pathogenicity of *Streptococcus parauberis* to olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.* 2006; **41**: 171-173.
- 4) Song JY, Kitamura SI, Oh MJ, Kang HS, Lee J, Tanaka S, Jung SJ. Pathogenicity of *Miamiensis avidus* (syn. *Philasterides dicentrarchi*), *Pseudocohnilembus persalinus*, *Pseudocohnilembus hargisi* and *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Dis. Aquat. Org.* 2009; **83**: 133-143.
- 5) 平成 20 年漁業・養殖生産統計 (併載漁業生産額). 農林水産省大臣官房統計部, 東京. 2011; 138.
- 6) Fuji K, Hasegawa O, Honda K, Kumasaka K, Sakamoto T, Okamoto N. Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 2007; **272**: 291-295.
- 7) Liu Y, Chen S, Li B. Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers. *Aquaculture* 2005; **243**: 103-111.
- 8) Murata O, Harada T, Miyashita S, Izumi K, Mada S, Kato K, Kumai H. Selective breeding for growth in red sea bream. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 845-849.
- 9) 高木基裕, 幹田和彦, 関 伸吾, 谷口順彦. DNA フィンガープリントによる養殖マダイ5系統の遺伝変異保有量. 水産増殖 1995; **43**: 491-497.
- 10) 高木基裕, 幹田和彦, 谷口順彦. マイクロサテライトマーカーによる養殖および放流用マダイの遺伝的変異保有量の比較. 動物遺伝研究会誌 1996; **24**: 53-58.
- 11) 吉田一範, 高木基裕, 田中 克, 谷口順彦. マイクロサテライト DNA 多型によるヒラメ天然集団と放流用人工種苗の遺伝的変異性と差異. 水産育種 2000; **29**: 93-102.
- 12) 澤山英太郎, 高木基裕. ヒラメ体色変異個体の特徴と同胞関係の推定. 水産増殖 2010; **58**: 345-350.
- 13) 澤山英太郎, 高木基裕. DNA 親子鑑定技術を用いたヒラメ逆位個体の発生要因の推定. 水産増殖 2010; **58**: 441-446.
- 14) 澤山英太郎, 高木基裕. マダイ稚魚期における体色透明化個体出現への遺伝的要因の関与. 日水誌 2011; **77**: 630-638.
- 15) 田畑和男. ヒラメの白化現象の遺伝的要因の一考察. 水産増殖 1991; **39**: 29-35.
- 16) 魚住香織, 田畑和男. ヒラメ仔稚魚の量的形質に関する遺伝率の推定. 水産増殖 1999; **47**: 49-54.
- 17) Hashimoto H, Mizuta A, Okada N, Suzuki T, Tagawa M, Tabata K, Yokoyama Y, Sakaguchi M, Tanaka M, Toyohara H. Isolation and characterization of a Japanese flounder clonal line, *reversed*, which exhibits reversal of metamorphic left-right asymmetry. *Mech. Dev.* 2002; **111**: 17-24.
- 18) Shikano T. Marker-based estimation of heritability for body color variation in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 2005; **249**: 95-105.
- 19) Peruzzi S, Westgaard JI, Chatain B. Genetic investigation of swimbladder inflation anomalies in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture* 2007; **265**: 102-108.
- 20) 高木基裕. DNA 反復配列数多型による魚類の遺伝・育種に関する研究. 水大校研報 1999; **47**: 154-252.
- 21) 川下正己, 渡邊郁夫, 小林 元. ヒラメ種苗生産事業. 北海道栽培漁業振興公社平成 8 年度種苗生産事業報告書 1999; 41-56.
- 22) Lein I, Helland S, Hjelde K, Baverfjord G. Temperature effects on malformations in trout (*O. mykiss*). In: Baverfjord G, Helland S, Hough C (eds). *Control of malformations in fish aquaculture. Science and practice*. Rapid Press, Luxembourg. 2009; 33-38.
- 23) Hattori M, Sawada Y, Kurata M, Yamamoto S, Kato K, Kumai H. Oxygen deficiency during somitogenesis causes centrum defects in red sea bream, *Pagrus major* (Temminck et Schlegel). *Aquacul. Res.* 2004; **35**: 850-858.
- 24) Sawada Y, Hattori M, Iteya M, Takagi Y, Ura K, Seoka M, Kato K, Kurata M, Miyatake H, Katayama S, Kumai H. Induction of centrum defects in amberjack *Seriola dumerili* by exposure of embryos to hypoxia. *Fish. Sci.* 2006; **72**: 364-372.
- 25) 澤田好史, 樋口和宏, 芳賀 稷, 浦 和寛, 石橋泰典, 倉田道雄, 宮武弘史, 片山茂和, 瀬岡 学. シマアジ胚発生に及ぼす低酸素と高二酸化炭素の影響. 日水誌 2008; **74**: 144-151.
- 26) Haga Y, Suzuki T, Takeuchi T. Retinoic acid isomers reduce malformations in postembryonic development of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zool. Sci.* 2002; **19**: 1106-1112.
- 27) Evans ML, Neff BD. Non-additive genetic effects contribute to larval spinal deformity in two populations of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 2009; **296**: 169-173.
- 28) Gislason H, Karstensen H, Christiansen D, Hjelde K, Helland S, Baverfjord G. Rid and vertebral deformities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) explained by a dominant-mutation mechanism. *Aquaculture* 2010; **309**: 86-95.
- 29) Takagi M, Yoshida K, Taniguchi N. Isolation of microsatellite loci from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and detection of PCR fragments with simple Non-RI methods. *Fish. Sci.* 1999; **65**: 486-487.
- 30) Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 2007; **16**: 1099-1106.
- 31) Goudet J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate *F*-statistics. *J. Hered.* 1995; **86**: 485-486.

- 32) Excoffier L, Larval G, Schneider S. ARLEQUIN (version 3.0): An integrated software package for population genetic data analysis. *Evol. Biol.* 2005; **1**: 47–50.
- 33) 菅向志郎, 中川敏寛, 中川英敏, 板倉良孝, 萩原篤志. 外観と骨格標本によるヒラメ稚魚の形態異常判別. 長崎大水産学部研報 2010; **91**: 13–16.
- 34) 谷口順彦, 東 健作, 楳田 晋. マダイ人工種苗の脊椎骨異常発生率にみられた親間差. 日水誌 1984; **50**: 787–792.
- 35) Suzuki T, Washio Y, Aritaki M, Fujinami Y, Shimizu D, Uji S, Hashimoto M. Metamorphic pitx2 expression in the left habenula correlated with lateralization of eye-sidedness in flounder. *Dev. Growth Differ.* 2009; **9**: 797–808.