

学 位 論 文 題 名

Genetic diversity of chum salmon inferred from the
sequence variation of mitochondrial DNA and
neurohypophysial hormone genes

（ミトコンドリア DNA および神経葉ホルモン遺伝子の
塩基変異から推測したシロザケの遺伝的多様性）

学位論文内容の要旨

シロザケは北太平洋とその隣接海域に広く分布しており、成熟すると繁殖のために母川回帰する。そのため、それぞれの河川で遺伝的に分化した地域集団（系統群）が生じており、大きな遺伝的多様性が生じていると考えられる。事実、アイソザイムやミトコンドリア（mt）DNA の制限酵素断片長多型などにより、系統群間で一定の遺伝的分化が生じていることがこれまで示されてきた。このような系統群ごとの遺伝的な違いは、それぞれのシロザケ集団が長さや水温などの環境が異なる河川に適応した結果、生じている可能性がある。生物の生息環境に対する適応は、個々の遺伝子発現の調節、さらにはその調節をつかさどる転写調節領域を変化させることで起こると考えられる。実際にシロザケでは、淡水適応に関与する神経葉ホルモン遺伝子のバソトシン（VT）Ⅱ型遺伝子のニューロフィジン中間部において、カナダと日本の系統群間で多型があることが報告されている。このことは、シロザケの構造遺伝子にも遺伝的多様性が存在し、それが環境への適応に重要な役割を果たしている可能性を示している。

そこで本研究では、まずミトコンドリア（mt）DNA を用いて環太平洋地域に生息するシロザケ集団の遺伝構造を集団遺伝学的に解析した。ついでそのシロザケ集団の遺伝構造がどのような歴史的な形成過程を経て成立したのかを統計的に推定した。さらに神経葉ホルモンである VT およびイソトシン（IT）遺伝子の構造を決定し、上流転写調節領域・イントロン・3'-非翻訳領域などについて多型解析を行い構造遺伝子にどの程度の遺伝的多様性があるのかを調べた。また異なる集団間で比較をおこない、地域間における違いがあるのかを調べた。

シロザケ集団の遺伝構造を明らかにするために、まず北海道 6 集団・本州 6 集団の計 12 集団由来の 537 個体について mtDNA 調節領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法で解析した。その結果、5'側前半部分約 500bp に高変異部位があり、12 種類のハプロタイプが見つかった。この 12 種類のハプロタイプの関係を調べるためネットワーク分析を行ったところ、大きく 3 つのグループに分かれた。ハプロタイプの種類は北海道集団で多く、遺伝子多様度は北海道集団が本州集団に比べて高い傾向を示した。12 河川集団の地理的関係を調べるために近隣結合法によるグループ化を行ったところ、大きく北海道・本州太平洋岸・本州日本海岸の 3 地域に分かれた。そこでこれら 3 地域間で遺伝的分化が生じているのかを調べるために AMOVA 解析および χ^2 テストを行ったところ、3 地域間において有意な遺伝的分化が認められ、特に北海道集団と本州太平洋岸集団で大きいことが示された（第 1 章）。

次に、新たに得られた日本 4 集団・韓国 1 集団・ロシア 10 集団・北米（アラスカとカナダ）21 集団の計 36 集団由来の 1617 個体について上記研究と同様の実験を行い、すでに得られている日本地域の結果とあわせて集団遺伝学的な解析を行った。その結果、18 種類のハプロタイプが新たに見つかり、調べた 48 集団で計 30 種類のハプロタイプが認められた。ハプロタイプのネットワーク分析の結果、大きく 3 つのグループ（A・B・C）に分かれ、日本地域にはすべてのグループが、ロシア地域には主にグループ B と C が分布していた。それに対し、北米地域に分布するハプロタイプは、そのほぼすべてがグループ B に属するものであった。ハプロタイプ多様度は日本で最も大きく、ロシア、北米の順で小さかった。AMOVA 解析および χ^2 テストを行ったところ、日本・ロシア・北米の 3 地域間で強い遺伝的分化が生じていることが分かった。また日本地域と同様に北米地域でも 5 つの地域内集団が存在し、一定の遺伝的分化があることが明らかとなった（第 2 章）。

上記研究から明らかとなったシロザケ集団の遺伝構造は、過去に起こった様々な歴史的なイベントの結果を反映したものと考えられる。そこで、これまでの研究で明らかとなった結果をもとに、環太平洋シロザケ集団の歴史的な形成過程を Nested Clade Analysis (NCA) を使って推定した。その結果、シロザケ mtDNA ハプロタイプの分散の主要なプロセスとして、連続的な分布域の拡大が関わっていたことが推定された。ここからシロザケは日本海周辺地域を起源とし、ロシアを経て北米地域に分布域を広げていき、それぞれの地域に定着した後、遺伝的分化をしていったものと考えられる（第 3 章）。

これまでの結果から、シロザケは地域間あるいは集団間で遺伝的分化をしており、大きな遺伝的多様性を持っていることが明らかとなった。このような遺伝的多様性が実際の構造遺伝子にも存在するのかどうかを、神経葉ホルモン遺伝子について調べた。シロザケは 4 倍体であるので、同一の分子種に対して I 型と II 型の 2 本の遺伝子を持つ。まず、神経葉ホルモン遺伝子の遺伝子構造を解析したところ、VT 遺伝子は I 型・II 型ともに 3 エクソン・2 インترون構造をしており、哺乳類 VP 遺伝子・OT 遺伝子と同じであった。これに対し、IT 遺伝子は I 型・II 型ともに 4 エクソン・3 インترون構造であり、これは円口類のヌタウナギ VT 遺伝子と同じ構造であった。このことから、シロザケ IT 遺伝子は神経葉ホルモン遺伝子の祖先型を保持していると考えられる。ハープロット法による解析から、シロザケ VT-I 遺伝子と VT-II 遺伝子および IT-I 遺伝子と IT-II 遺伝子はともにコーディング領域は相同性が高いものの、上流転写調節領域とイントロンは相同性がほとんど無いことが分かった。これは他の動物種と比較しても同じであった。日本の津軽石川で得られた集団について VT-I 遺伝子の上流転写調節領域・エクソン A・第 1 インترون、VT-II 遺伝子の 3'-非翻訳領域、そして IT-I の第 2 インترونの多型解析をしたところ、エクソン A を除くすべての領域で、mtDNA 調節領域よりも高い多型性があることが明らかになった。また、VT-I 遺伝子の上流転写調節領域・エクソン A・第 1 インترونまでの領域の塩基配列を日本の津軽石川の集団とアラスカの Salmon River で比較したところ、両集団の間で高い塩基変異性があることが明らかとなった（第 4 章）。

以上の一連の研究から、環太平洋シロザケ集団には一定の遺伝的分化が生じており、遺伝的多様性が保持されていることが明らかになった。神経葉ホルモン遺伝子に mtDNA 調節領域よりも高い多型性が存在すること、集団間においても高い塩基変異性があることが分かった。このことはシロザケ神経葉ホルモン遺伝子に遺伝的多様性があり、それがそれぞれの集団の環境への適応に関わっている可能性を意味する。また神経葉ホルモン遺伝子に生じていた遺伝的多様性は、シロザケが日本海周辺域から環太平洋一帯に分散した後、個体がそれぞれの地域に入り込んで定着・適応していく過程で生じたのではないかと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浦 野 明 央

副 査 教 授 小 池 達 郎

副 査 教 授 高 畑 雅 一

副 査 教 授 片 倉 晴 雄

副 査 教 授 阿 部 周 一 (大学院水産科学研究科)

学 位 論 文 題 名

Genetic diversity of chum salmon inferred from the sequence variation of mitochondrial DNA and neurohypophysial hormone genes

(ミトコンドリア DNA および神経葉ホルモン遺伝子の
塩基変異から推測したシロザケの遺伝的多様性)

シロザケは成熟すると繁殖のために母川回帰するため、それぞれの河川で遺伝的に分化した地域集団(系統群)が生じている。このような系統群ごとの遺伝的な違いは、それぞれのシロザケ集団が長さや水温などの環境が異なる河川に適応した結果、生じている可能性がある。生物の生息環境に対する適応は、個々の遺伝子発現の調節、さらにはその調節をつかさどる転写調節領域を変化させることで起こると考えられる。そこで本学位論文では、まずミトコンドリア (mt) DNA を用いて環太平洋地域に生息するシロザケ集団の遺伝構造を集団遺伝学的に解析した。ついでそのシロザケ集団の遺伝構造がどのような歴史的な形成過程を経て成立したのかを統計的に推定した。さらに神経葉ホルモンである VT およびイソトシン (IT) 遺伝子の構造を決定し、上流転写調節領域・イントロン・3'-非翻訳領域などについて多型解析を行い構造遺伝子にどの程度の遺伝的多様性があるのかを調べた。

シロザケ集団の遺伝構造を明らかにするために、mtDNA 調節領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法で解析した結果、調べた環北太平洋 48 集団で計 30 種類のハプロタイプが認められた。ハプロタイプは、ネットワーク分析の結果、大きく 3 つのグループ (A・B・C) に分かれ、日本地域にはすべてのグループが、ロシア地域には主にグループ B と C が分布していた。それに対し、北米地域に分布するハプロタイプは、そのほぼすべてがグループ B に属するものであった。

上記研究から明らかとなったシロザケ集団の遺伝構造は、過去に起こった様々な歴史的なイベントの結果を反映したものと考えられる。そこで、環太平洋シロザケ集団の歴史的な形成過程を Nested Clade Analysis (NCA) を使って推定した。その結果、シロザケ mtDNA ハプロタイプの分散の主要なプロセスとして、連続的な分布域の拡大が関わっていたことが推定された。ここからシロザケは日本海周辺地域を起源とし、ロシアを経て北米地域に分布域を広げていき、定着した後、遺伝的に分化したと考えられる。

このような遺伝的多様性が実際の構造遺伝子にも存在するかどうかを、神経葉ホルモン遺伝子について調べた。日本の津軽石川で得られた集団について上流転写調節領域・エクソンおよびイントロンの多

型解析をしたところ、エクソン以外の領域で、mtDNA 調節領域よりも高い多型性が認められた。また、上流転写調節領域から第 1 イントロンまでの領域の塩基配列を日本の津軽石川の集団とアラスカの Salmon River の集団間で比較したところ、両集団の間で高い塩基変異性があることが明らかとなった。

以上の一連の研究から、環太平洋シロザケ集団には一定の遺伝的分化が生じており、遺伝的多様性が保持されていることが明らかになった。神経葉ホルモン遺伝子に mtDNA 調節領域よりも高い多型性が存在すること、また集団間においても高い塩基変異性があることが分かった。これは構造遺伝子に遺伝的多様性があり、それがそれぞれの集団の環境への適応に関わっている可能性を意味する重要な結果である。

よって、申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格を有するものと認める。