

博士（水産科学） リザリタ ロサレホス エドパリナ

学 位 論 文 題 名

Molecular population genetics of masu salmon based on mitochondrial DNA sequence analysis

（ミトコンドリア DNA 塩基配列解析による
サクラマス分子集団遺伝学的研究）

学位論文内容の要旨

サクラマスはシロザケやカラフトマスとならび我国における重要な水産対象種であり、その資源増大をはかるため河川間の移入や孵化放流を中心とした増殖事業が行われてきた。しかし、移入や放流が天然のサクラマス集団の多様性や遺伝構造にどのような効果をもたらすかは未だ不明である。遺伝的多様性や集団構造を把握することは、水産生物の資源保護と持続的な利用を図る上で不可欠である。そこで本研究は、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 塩基配列の変異を指標にサクラマスの分子集団遺伝学的解析を行い、国内外の集団における遺伝的変異と多様性の現状および遺伝構造を明らかにすることを目的とした。さらに、それらの知見をもとにサクラマス放流種苗集団の遺伝的多様性を検討し、サクラマス資源の遺伝的管理について考察を加えた。

サクラマスにおいてはこれまで酵素タンパク多型や制限酵素断片長多型 (RFLP) を用いた断片的な集団遺伝学的解析結果が散在するのみである。そのため第一章では、新たな DNA マーカーを開発するため、多くの脊椎動物 mtDNA において高変異領域とされている調節領域の構造を、国内の複数集団由来の個体において Polymerase Chain Reaction (PCR) により増幅した DNA 断片を用いて決定した。用いた PCR プライマーはシロザケ mtDNA 配列をもとに作製したものであるが、サクラマスとシロザケのほかニジマス、カラフトマス、ベニザケの mtDNA 調節領域の増幅に有効であり、広くサケ属の mtDNA 塩基配列解析に応用できることが分かった。

第二章では上記の PCR プライマーを用い、北海道 8 集団（オホーツク海側；徳志別川、斜里川、伊茶仁川、日本海側；手塩川、千歳川、尻別川、太平洋側；静内川）と本州 3 集団（太平洋側；老部川、日本海側；阿仁川、神通川）に由来する遡上サクラマスの mtDNA

調節領域の配列を解読し、集団遺伝学的解析結果をまとめた。配列解読の結果、調節領域の3'側後半部に約80塩基対を単位とする反復配列が集団ごとに約3%から16%の個体にみつき、しかも個体により反復が1から4回と異なっていた。このため、5'側前半約500塩基対を解析したところ、11集団由来の計472個体において塩基置換、欠失、挿入などの塩基変異が108箇所のみつき、36種類のハプロタイプが確認された。それらのハプロタイプは、配列の類縁度から7つのグループに分けられた。この結果から、サクラマスのmtDNA調節領域5'側前半部はマーカーとなる配列多型を含むことが分かった。

対象とした11集団のハプロタイプ多様度や塩基多様度からサクラマス集団内の遺伝的変異は高いこと、さらにハプロタイプの頻度分布に関する χ^2 テストや F_{ST} 値から集団間の遺伝的分化が同一地域内でも大きいことが示唆された。しかし、近隣結合法に基づくクラスター分析やAMOVAによる遺伝構造の地理的階層性の分析から、国内のサクラマスでは日本海側とオホーツク海―太平洋側の地域集団間に明らかな遺伝的分化がみられたが、北海道と本州の間や各地域内における地方集団の間の遺伝的分化は明瞭ではなかった。

第三章ではロシア（カムチャッカ半島西南部；Utka川、サハリン島南部；Belaya川、Sukhopletka川、Galuboe川、Lutga川、プリモリエ；Barbashevskaya川）と韓国（Namdae川）由来の遡上サクラマスまたは幼魚の合計7集団233個体について上記のmtDNA調節領域を分析した。その結果、日本集団と共通するハプロタイプのほかロシア集団に9種類と韓国集団に6種類の地域特有なハプロタイプが認められた。各集団におけるハプロタイプ多様度は日本集団とほぼ同程度であり、外国集団の遺伝的変異は日本集団と同程度に高いことが示唆された。一方、塩基多様度は日本集団の約1/10であったが、これは観察された外国集団のハプロタイプが限られた数のグループに属するためと考えられた。

日本集団と同様に種々の集団遺伝学的解析を行ったところ、ロシア国内ではカムチャッカ、サハリン、プリモリエの地域集団間に明瞭な遺伝的分化が生じていることが分かった。また、サハリンの4集団の間にも一定の遺伝的分化があることが分かった。韓国集団は今回1集団しか分析できなかったが、明らかな遺伝的分化がロシア集団との間に認められた。さらに、サハリンの2河川（Galuboe、Sukhopletka）において幼魚と混獲された河川残留型の成熟雄では、河川間の明瞭な遺伝的分化が認められたものの同一河川内の幼魚集団との間では分化は認められなかった。

第四章では、北海道立水産孵化場森支場において維持されている3グループのサクラマス放流種苗集団186個体のmtDNA調節領域を前章までと同様に解析した。分析した材料は1980年代後半の異なる年度に尻別川から導入した天然サクラマスを起源とするもので、第一グループは大型の卵を生む雌を選抜交配した4世代目、第二グループは選抜なしのランダム交配5世代目、第3グループは大型個体の選抜継代2世代目を標識放流し産卵遡上魚を再捕後に体サイズにより選抜交配した2世代目である。比較のため、1998年から2000年の3年間に尻別川に遡上したサクラマス178個体および2001年と2003年に斜里川に遡上した102個体も分析した。

その結果、尻別と斜里の両集団間では明らかな遺伝的分化が認められたが、河川内における異年度遡上集団の間には分化は認められなかった。一方、尻別集団とそれに由来する孵化場の3グループの放流種苗集団を比較した結果、後者のいずれにおいても遺伝的変異は低下しており、由来した野生集団とは遺伝的に異なる集団へと分化しつつあるものと考えられた。

第五章では夏季から秋季に北海道オホーツク海沿岸に現れる未成熟なサクラマス、地方名“クチグロマス”、の系群構成を主に分析した。そのため、枝幸、雄武、羅臼沿岸の定置網で捕獲されたクチグロマス95個体を前章までと同様にmtDNA解析を行った。その結果、これら3地域のうち枝幸と雄武においてサハリンに特有な複数のハプロタイプが一定の頻度で観察された。遺伝的変異のレベルは3地域で同程度であったが、AMOVA、 χ^2 テストおよび F_{ST} 分析から羅臼と他の2地域のクチグロマス集団は遺伝的に異なることが示唆された。これらの結果から、日本系のほかロシア系の未成熟なサクラマスが北海道のオホーツク沿岸域でも混在しており、混在の程度は地域により異なるものと考えられた。

本研究の成果について総合的な考察を第六章において行った。サクラマスのmtDNA調節領域の構造は、3'側後半の反復配列の存在と5'側の塩基変異が約500塩基対中108箇所ときわめて多いことでシロザケ(Sato et al., 2004)の調節領域と明らかに異なる。この知見はサケ属ひいては硬骨魚類のmtDNA分子系統を考える上で重要な基礎的資料になると考えられる。

また、本研究から得られた国内外あわせて51種類のmtDNAハプロタイプ情報および18集団の遺伝的変異と遺伝構造に関する知見は、我国のみならずロシアなどを含む極東域におけるサクラマスの保全と資源の維持管理に役立つものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 周 一
副 査 教 授 荒 井 克 俊
副 査 教 授 都 木 靖 彰
副 査 教 授 浦 野 明 央 (理学研究科)
副 査 教 授 埴 山 雅 秀 (北海道東海大学)

学 位 論 文 題 名

Molecular population genetics of masu salmon based on mitochondrial DNA sequence analysis

(ミトコンドリア DNA 塩基配列解析による
サクラマス分子集団遺伝学的研究)

サクラマスはシロザケやカラフトマスとならび我国における重要な水産対象種であり、その資源増大をはかるため河川間の移入や孵化放流を中心とした増殖事業が行われてきた。しかし、移入や放流が天然のサクラマス集団の多様性や遺伝構造にどのような効果をもたらすかは未だ不明である。遺伝的多様性や集団構造を把握することは、水産生物の資源保護と持続的な利用を図る上で不可欠である。そこで申請者は、サクラマスの国内外の集団における遺伝的変異と多様性の現状および遺伝構造を明らかにすることを目的として、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 塩基配列の変異を解析し分子集団遺伝学的研究を行った。

申請者はまず、多くの脊椎動物 mtDNA において高変異領域とされている調節領域の構造を、国内の複数集団由来の個体において Polymerase Chain Reaction (PCR) により増幅した DNA 断片を用いて決定した。用いた PCR プライマーはシロザケ mtDNA 配列をもとに作製したものであるが、サクラマスとシロザケのほかニジマス、カラフトマス、ベニザケの mtDNA 調節領域の増幅に有効であり、広くサケ属の mtDNA 塩基配列解析に応用できることが分かった。上記の PCR プライマーを用い、日本の 11 集団 (北海道 8 集団と本州 3 集団) に由来する 500 個体近くの遡上サクラマスにおいて mtDNA 調節領域の配列を解読した結果、調節領域の 3' 側後半部に約 80 塩基対を単位とする反復配列が各集団の一部の個体にみつき、しかも個体により反復数が異なっていた。このため、5' 側前半部 500 塩基対を解析したところ、塩基置換、欠失、挿入などの塩基変異がみつか

り計 36 種類のハプロタイプが確認された。この結果から、サクラマス mtDNA 調節領域 5'側前半部はマーカーとなる配列多型を含むことが分かった。対象とした 11 集団のハプロタイプ多様度や塩基多様度からサクラマス集団内の遺伝的変異は高いこと、さらにハプロタイプの頻度分布に関する χ^2 テストや F_{ST} 値から集団間の遺伝的分化が同一地域内でも大きいことが示唆された。しかし、近隣結合法に基づくクラスター分析や AMOVA による遺伝構造の地理的階層性の分析から、国内のサクラマスでは日本海側とオホーツク海—太平洋側の地域集団間に明らかな遺伝的分化がみられたが、北海道と本州の間や各地域内における地方集団の間の遺伝的分化は明瞭ではなかった。

次いで上記の mtDNA 調節領域を対象に国外 7 集団（ロシア 6 集団と韓国 1 集団）に由来する 230 個体余りのサクラマスについて分析したところ、日本集団と共通するハプロタイプのほかロシア集団に 9 種類と韓国集団に 6 種類の地域特有なハプロタイプが認められた。各集団におけるハプロタイプ多様度は日本集団とほぼ同程度であり、外国集団の遺伝的変異は日本集団と同程度に高いことが示唆された。観察された計 51 種類のハプロタイプに基づく分析から、ロシア、韓国、日本の集団間には高い遺伝的分化が生じていることが分かった。また、ロシア国内ではカムチャッカ、サハリン、プリモリエ（沿海州）の地域集団間に明瞭な遺伝的分化が生じていることが分かった。さらに、サハリンの河川において幼魚と混獲された河川残留型の成熟雄では、河川間の明瞭な遺伝的分化が認められたものの同一河川内の幼魚集団との間では分化は認められなかった。

国内外のサクラマス 18 集団から得られた mtDNA データを基に、北海道内の孵化場において維持されている放流種苗集団の遺伝的変異とオホーツク海沿岸に來遊する未成魚集団の系群構成の分析を試みた。その結果、調べた 3 グループの孵化場放流種苗集団の遺伝的多様性は野生集団に比べ明らかに低下しており、それらの放流種苗集団は由来した集団とは遺伝的に異なる集団へと分化しつつあるものと考えられた。また、枝幸、雄武、羅臼沿岸で捕獲された未成魚集団の一部には、サハリンに特有な複数のハプロタイプが観察された。遺伝的変異のレベルは 3 地域で同程度であったが、集団遺伝学的分析から羅臼と他の 2 地域の未成魚集団は遺伝的に異なることが示唆された。これらの結果から、オホーツク沿岸に來遊するサクラマス未成魚には日本系のほかロシア系が混在しており、混在の程度は地域により異なるものと考えられた。

申請者による以上の成果は、サクラマスの遺伝的多様性の現状と遺伝構造を初めて体系的に明らかにしたもので、我国のみならずロシアなどを含む極東域における本種の保全と資源の維持管理に大きく寄与するものである。よって審査員一同は、本論文が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。