

学 位 論 文 題 名

Molecular population genetics of chum salmon based
on mitochondrial and nuclear DNA analyses

（ミトコンドリアおよび核DNA分析に基づくシロザケの
分子集団遺伝学的研究）

学位論文内容の要旨

水産生物の遺伝的多様性や集団構造を把握することは、その資源保護と持続的な利用を図る上で不可欠である。北半球の冷水域に分布するサケ・マスの資源保護は、日本を含む環太平洋諸国に共通の課題である。シロザケ (*Oncorhynchus keta*) は、極東アジアから北米まで広い分布域を持ち、漁業資源としても重要であるが、その環太平洋集団における遺伝的多様性や集団構造に関する知見は依然として乏しい。それらの遺伝的知見は、沖合シロザケ混合集団における系群識別にも役立つが、基盤となる基準データはまだ確立されていない。そこで本研究では、系群識別をはじめ天然集団の多様性の保全や養殖集団による天然集団の遺伝的な攪乱を防ぎ、シロザケ資源の再生産と持続的な利用に資するため、環太平洋シロザケ集団の遺伝的多様性と遺伝構造を解析するミトコンドリアDNA (mtDNA) および核のマイクロサテライト DNA (msDNA) マーカーの開発を試みた。次いで、得られた集団の遺伝情報を統合して基準データとし、これをもとにベリング海および北太平洋におけるシロザケ集団の系群構成解析を試み、両 DNA マーカーの遺伝的系群識別における有用性を評価した。

主論文は英文で書かれ、GENERAL INTRODUCTION のほか、5 章からなる。まず、第1章では、シロザケ mtDNA 調節領域における塩基配列を解読し、観察された変異をもとに環太平洋集団の遺伝的多様性と遺伝構造を解析した。この領域は mtDNA の複製を司り、遺伝子を含まず配列の変異が蓄積しやすいため多型性が高く、種以下の系統や集団の解析に適している。シロザケでは、本研究で分析した mtDNA 調節領域の 5'側前半部の約 500 塩基対に変異が集中していることが分かっている。

日本、韓国、ロシア、アメリカ、カナダの母川に回帰したシロザケ 96 集団、4,200 以

上の個体の mtDNA 調節領域の塩基配列解読から 22 箇所の変異サイトが明らかになり、A、B、C 3 つの系統的クレードに含まれる 32 個のハプロタイプが認められた。しかし、クレード間における純塩基多様度が 0.00193 から 0.00351 と低いこと、さらにコアハプロタイプを中心とした星形のハプロタイプ系統関係などから、シロザケ集団が過去に急速に増大し環太平洋地域に分布を広げたことが示唆された。観察されたハプロタイプは地域と密接に結びついており、クレード A、C のハプロタイプは日本、ロシアなどアジアの集団を、クレード B のハプロタイプは北米の集団を特徴づけていた。ハプロタイプ多様度の比較から、遺伝的変異は日本集団で最も高いことが示唆された。mtDNA データに基づく分子分散分析 (AMOVA)、 F_{ST} 値計測などによる集団遺伝学的解析から、日本、ロシアおよび北米の集団間における明瞭な遺伝的分化のほか各地域内の集団の分化が認められ、日本では 3 つ、ロシアでは 5 つ、北米では 6 つの地域グループの存在が示唆された。さらに、 F_{ST} 値に基づく遺伝的分化レベルからみた場合、環日本海、環オホーツク海、環ベーリング海、環アラスカ湾がそれぞれ緩やかな地域集団グループを作ることが分かり、ロシアでは沿海州とその他の地域、北米では北西アラスカとその他の地域が遺伝的に分化していることが示唆された。

第 2 章では、mtDNA 分析を行った前述の 96 集団のうち、日本、ロシア、北米の 76 集団、3,300 個体以上を用いて 4 座の msDNA (OKM4、5、7、8) の対立遺伝子頻度に基づき、環太平洋シロザケ集団の遺伝的多様性と遺伝構造を分析した。これらの集団で観察された対立遺伝子数は、OKM7 における 19 から OKM8 における 31 と幅があったが、4 座で合計 90 であった。ヘテロ接合度の観察値は、OKM7 の 0.209 から OKM8 の 0.689 で、期待値はそれぞれの座で 0.171 と 0.689 であった。分析した集団において OKM5 または OKM8 で時にヘテロ接合性過剰が認められたが、4 座をとおして概ね Hardy-Weinberg 平衡にあることが示された。ヘテロ接合度不足による同平衡からの逸脱はわずかにロシアの 1 集団と北米の 3 集団のみであった。これらの結果は、分析したほとんどのシロザケ集団において任意交配が行われていることを示している。

msDNA 分析により、日本、ロシア、北米の集団間と集団内の対立遺伝子頻度に有意な異質性が示され、遺伝的変異は日本集団において最も高いことが示唆された。さらに AMOVA および F_{ST} 値から日本、ロシア、北米の集団間とそれぞれの地域内集団間における遺伝的分化が明らかになったが、日本の地域内集団間の分化は比較的弱く、緩やかであることが示唆された。msDNA 分析から得られたこれら 3 地域における遺伝的分化と遺伝構造のパターンは、前述の mtDNA 分析により得られた結果と概ね一致した。

第3章では、mtDNA と msDNA による環太平洋シロザケ集団の分析の結果を比較し、両者の集団遺伝学的分析における有効性を評価した。mtDNA のハプロタイプ多様度と msDNA の遺伝子多様度の間には明瞭な相関が見られ、このことは1章と2章で mtDNA と msDNA によってそれぞれ推定されたシロザケ集団の遺伝的多様性や遺伝構造のパターンが日本、ロシア、北米において概ね一致したものと矛盾しない。一方、これら3地域における集団間の遺伝的距離と地理的距離との相関は、北米では mtDNA と msDNA の両方で認められたが、日本とロシアでは mtDNA によってのみ認められた。このような3地域における違いから、地理的距離の増大による遺伝的交流の制限のほか、異なる人口統計学的要因が環太平洋の各地域集団の形成に関与したことが示唆された。また、このような違いは、母系遺伝の mtDNA と両性遺伝の msDNA の特性の違いを反映している可能性もあり、両者を合わせて分析することで集団形成における雌雄の貢献の違いを評価できることも示唆された。

第4章では、沖合のシロザケ混合集団における系群構成を2章から得られた msDNA の情報を基準データとして分析し、既報の mtDNA 分析による結果と比較した。2003年8月から9月にかけてベーリング海と北太平洋の14定点において採捕された800個体余りの分析から、アジアと北米の系群がこれらの海域でノンランダムに分布していることが分かった。ベーリング海の中央部から北側と北西側では日本とロシアの系群が優占し、アリューシャン列島付近とベーリング海の東側では北米の系群が優占していた。これらの結果は、mtDNA 分析による結果とよく一致した。精密な分析にはより多くの msDNA の遺伝子座が必要であるが、本研究の結果は mtDNA と並び msDNA も沖合のシロザケ混合集団の系群を識別するための高い能力をもつことが示唆された。

第5章では、GENERAL CONCLUSIONS として1章から4章で得られた結果について総合的考察を加えた。まず、mtDNA 調節領域の配列解読から明らかになった変異は、日本、ロシア、北米のシロザケ集団の遺伝的多様性と遺伝構造の解析のための十分な多型を与え、環太平洋における地域間および地域内集団の間の遺伝的分化のほか、従来明らかではなかった環日本海、環オホーツク海、環ベーリング海などの地域グループのまとまりを示唆した。これらの知見は、従来、国別に立てられているシロザケ資源の保護管理対策に新たな視点を与えるものとして注目される。また、用いた4座の msDNA も環太平洋シロザケ集団の遺伝的多様性と遺伝構造解析に十分な多型を示し、得られた分析結果も沖合混合集団における系群判別を含め mtDNA 分析による結果とよく一致した。本研究から明らかになった mtDNA と msDNA の多型は、酵素タンパク多型や

mtDNA 制限酵素断片長多型などに比べ遺伝的変異検出の感度が高く、両者はシロザケ資源の遺伝的管理のための有用な分子遺伝マーカーになることが分かった。

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 埴 山 雅 秀
副 査 教 授 都 木 靖 彰

学 位 論 文 題 名

Molecular population genetics of chum salmon based on mitochondrial and nuclear DNA analyses

(ミトコンドリアおよび核DNA分析に基づくシロザケの
分子集団遺伝学的研究)

水産生物の遺伝的多様性や集団構造を把握することは、その資源保護と持続的な利用を図る上で不可欠である。北半球の冷水域に分布するサケ・マスの中でもシロザケ (*Oncorhynchus keta*) は漁業資源として重要であるが、その環太平洋集団における遺伝的多様性や集団構造に関する知見は依然として乏しい。そこで本研究では、シロザケ資源の再生産と持続的な利用に資するため、環太平洋シロザケ集団の遺伝的多様性と遺伝構造を解析するミトコンドリア DNA (mtDNA) および核のマイクロサテライト DNA (msDNA) マーカーの開発を試みた。次いで、得られた集団の遺伝情報を統合して基準データとし、これをもとにベーリング海および北太平洋におけるシロザケ集団の系群構成解析を試み、両 DNA マーカーの遺伝的系群識別における有用性を評価した。

主論文は英文で書かれ、GENERAL INTRODUCTION のほか、5 章からなる。第 1 章では、日本、韓国、ロシア、アメリカ、カナダの母川に回帰したシロザケ 96 標本集団、4,200 以上の個体の mtDNA 調節領域の 5'側前半部の高変異部位約 500 塩基対塩基配列の解読から 22 箇所の変異サイトを明らかにし、A、B、C 3 つの系統的クレードに含まれる 32 個のハプロタイプを同定した。観察されたハプロタイプは地域と密接に結びついており、クレード A、C のハプロタイプは日本、ロシアなどアジアの集団を、クレード B のハプロタイプは北米の集団を特徴づけていた。ハプロタイプ多様度の比較から、遺伝的変異は日本集団で最も高いことが示唆された。分子分散分析 (AMOVA) や F_{ST} 値などによる

集団遺伝学的解析から、日本、ロシアおよび北米の集団間における明瞭な遺伝的分化のほか日本では3つ、ロシアでは5つ、北米では6つの地域グループの存在を明らかにした。さらに、環日本海、環オホーツク海、環ベーリング海、環アラスカ湾がそれぞれ地域集団グループを作ることが分かり、ロシアでは沿海州とその他の地域、北米では北西アラスカとその他の地域が遺伝的に分化していることを明らかにした。

第2章では、mtDNA分析を行った前述の96集団のうち、日本、ロシア、北米の76集団、3,300個体以上を用いた4座の多型msDNAの分析から、遺伝的変異が日本集団において最も高いこと、日本、ロシア、北米の3地域間とそれぞれの地域内の集団グループ間における遺伝的分化を明らかにした。msDNA分析から得られたこれら3地域における遺伝的分化と遺伝構造のパターンは、前述のmtDNA分析により得られた結果と概ね一致した。

第3章では、mtDNAとmsDNAによる環太平洋シロザケ集団の分析の結果を比較し、mtDNAのハプロタイプ多様度とmsDNAの遺伝子多様度の間には明瞭な相関が見られることを明らかにした。一方、集団間の遺伝的距離と地理的距離との相関は、北米ではmtDNAとmsDNAの両方で認められたが、日本とロシアではmtDNAによってのみ認められた。このような3地域における違いから、地理的距離の増大による遺伝的交流の制限のほか、異なる人口統計学的要因が環太平洋の各地域集団の形成に関与したことが示唆された。

第4章では、沖合のシロザケ混合集団における系群構成を2章から得られたmsDNAの情報を基準データとして分析し、既報のmtDNA分析による結果と比較した。2003年8月から9月にかけてベーリング海と北太平洋の14定点において採捕された800個体余りの分析から、アジアと北米の系群がこれらの海域でノンランダムに分布していることが分かった。ベーリング海の中央部から北側と北西側では日本とロシアの系群が優占し、アリューシャン列島付近とベーリング海の東側では北米の系群が優占していた。これらの結果は、mtDNA分析による結果とよく一致しており、msDNAはmtDNAと並び沖合のシロザケ混合集団の系群を識別するための高い能力をもつことが示唆された。

第5章では、1章から4章で得られた結果について総合的考察を加えた。まず、mtDNA調節領域の配列解読から明らかになった変異は、環太平洋における地域間および地域内における集団の遺伝的分化のほか、従来明らかではなかった環日本海、環オホーツク海、環ベーリング海などの地域グループのまとまりを示唆した。これらの知見は、従来、国別に立てられているシロザケ資源の保護管理対策に新たな視点を与えるものとして注目され

る。また、用いた4座の msDNA も環太平洋シロザケ集団の遺伝的多様性と遺伝構造解析に十分な多型を示し、得られた分析結果も沖合混合集団における系群判別を含め mtDNA 分析による結果とよく一致した。本研究から明らかになった mtDNA と msDNA の多型は、酵素タンパク多型や mtDNA 制限酵素断片長多型などに比べ遺伝的変異検出の感度が高く、両者はシロザケ資源の遺伝的管理のための有用な分子遺伝マーカーになることが分かった。

申請者による以上の成果は、シロザケの遺伝的多様性の現状と遺伝構造を DNA マーカーにより体系的に明らかにしたもので、我国を含む環太平洋地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、申請者が博士（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。