

学 位 論 文 題 名

Genetic stock identification of chum salmon in the
Bering Sea and the North Pacific Ocean on the
basis of mitochondrial DNA haplotypes

(ミトコンドリア DNA ハプロタイプを基にしたベーリング海および
北太平洋におけるシロザケの系群識別)

学位論文内容の要旨

シロザケ (*Oncorhynchus keta*) は太平洋サケ属の中でもっとも広く分布しているサケであり、環太平洋地域においては重要な水産資源である。そのため海洋中の混合集団における系群識別は漁獲資源の管理、シロザケの回遊経路の探索にとって重要である。近年、塩基配列解析により、ミトコンドリア (mt) DNA コントロール領域上の多型を用いると系群識別が可能であることが示されている。しかしながら、シーケンス法による配列解析では専用の設備が必要であること、また、系群解析に必要な大量のサンプル処理を行うには時間がかかる等の問題があり、別の迅速且つ高精度な検出法が求められている。本研究では DNA マイクロアレイを用いたシロザケ mtDNA ハプロタイプ判別法の開発、およびそれを用いた 2002 年、2003 年のベーリング海及び北太平洋における系群解析、を目的として検討を行った。

既知の多型 20 箇所それぞれについて多型部位をほぼ中央に、かつ、鎖長 17mer ~ 20mer となるように固定化 DNA オリゴマーの配列を設計した。設計したオリゴマーはポリカルボジイミド樹脂をコートしたスライドガラス (Carbostation®) 上にスポット、紫外線照射により固定し、DNA マクロアレイを作製した。次に 5' 末端にビオチン修飾したプライマーを用いて PCR 法により多型部位を増幅し、DNA マイクロアレイ上でハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、Avidin Biotin Complex 法により発色操作を行い、発色の有無で多型を判定した。開発した DNA マイクロアレイは知られている 20 の多型箇所を全て検出することができ、30 ハプロタイプを全て正確に判別出来た。また、ハイブリダイゼーションからハプロタイプの決定まで 4 時間以内に完了することから迅速な多型判別法であることが示された。

次に開発した DNA マイクロアレイを用いて 2002 年 9 月、2003 年 7 月、9 月のベーリング海及び北太平洋におけるシロザケの混合集団の系群解析を試みた。開洋丸でサンプリングされたシロザケ合計約 3, 000 検体のハプロタイプ

を開発した DNA マイクロアレイを用いて決定した。その結果、既知のハプロタイプを持つシロザケは全て検出できた。特に 2002 年 9 月においては開洋丸上で血液の採取から DNA マイクロアレイによるハプロタイプ決定までを試みた。その結果、約 3 週間の航海の間に採捕した約 1, 000 検体全てのハプロタイプが船上において決定された。

2002 年 9 月、2003 年 7 月、9 月のベーリング海及び北太平洋におけるハプロタイプの分布は、ベースラインにおいて主要なハプロタイプ(A-1, B-3, C-1)が本検討においても高頻度に検出されていたが、ベースラインにおいて稀なハプロタイプは本検討においても低頻度の検出であった。一方、地域特異的なハプロタイプはさまざまな傾向がみられた。例えば北米系特異的なハプロタイプ B-14 は 2003 年 9 月のアリューシャン列島近海で高頻度に検出されているが、2002 年 9 月では検出されず、2003 年 7 月においては 1 個体のみの検出であった。また、ロシア系特異的なハプロタイプ B-6 は 2002 年 9 月では高頻度に検出されているが、2003 年 7 月および 9 月においては頻度が激減していた。

更なる解析のため、最尤法を用いた系群解析を試みた。先に調べられている 48 定点から得られたベースラインデータと 96 定点で得られたベースラインデータを日本、ロシア、北米の 3 領域で評価した。共に 80%以上の正確さであることが確認された。この結果は同一検体のアロザイム解析によって得られる解析方法と比較しても同等以上の結果であることから、次に開洋丸の航海で得られた検体を用いた系群解析を行った。2002 年 9 月、2003 年 7 月、9 月におけるベーリング海および北太平洋上の各系群の分布は一樣ではなく、ベーリング海西部ではロシア系が有意に多く、中央北部においては日本系が多かった。また、アリューシャン列島近海においては北米系が多かった。このことは調査の範囲で年次変化はなく、また、2003 年においては 7 月から 9 月にかけては系群の移動はおこっていないことが示唆された。

次に成熟魚の割合の多い 2003 年 7 月のベーリング海のデータを用いて成熟魚と未成熟魚で系群解析を行ったところ、成熟魚と未成熟魚で差はなかった。また、魚齢による系群の分布に偏りもなかった。このことからシロザケは海洋上で魚齢に関係なく、同じ系群がかたまっていることが示唆された。

以上のように、当初目的であるシロザケの mtDNA ハプロタイプを迅速かつ高精度に検出できる DNA マクロアレイを開発し、この DNA マイクロアレイを用いて 2002 年および 2003 年のベーリング海と北太平洋における系群識別を行って、母川国を異にする系群が特有の海域に分布することを明らかにした。

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 松 島 俊 也
副 査 教 授 阿 部 周 一 (大学院水産科学研究院)

学 位 論 文 題 名

Genetic stock identification of chum salmon in the Bering Sea and the North Pacific Ocean on the basis of mitochondrial DNA haplotypes

(ミトコンドリア DNA ハプロタイプを基にしたベーリング海および
北太平洋におけるシロザケの系群識別)

北太平洋を囲むいわゆる環太平洋地域には7種類の太平洋サケ (*Oncorhynchus* 属) が分布する。この7種の太平洋サケは、スケールに違いはあっても、稚魚ないしは幼魚の時に河川を降って海洋を回遊し、成熟すると母川に回帰して子孫を残す。しかしながら、現状は、このような回遊行動の実態が科学的に記述されているとは言い難い。洋上で採捕したサケの母川を同定することが極めて困難であったためである。一方、太平洋サケの中では、シロザケ (*O. keta*) は最も広く分布している種であり、環太平洋地域においては重要な水産資源である。そのため海洋中の混合集団における系群識別は北洋におけるシロザケの分布と回遊経路の探索および漁獲資源の管理に欠くことができない。

系群識別の有力な手段は遺伝子をもつ配列情報、例えばミトコンドリア (mt) DNA コントロール領域上の多型など、を用いる方法である。しかしながら、シーケンス法による配列解析では専用の設備が必要であり、系群解析に必要な大量のサンプル処理を行うには時間がかかる等の難点がある。申請者は、この難点を克服する迅速且つ高精度なゲノムの多型検出法として、DNA マイクロアレイを用いたシロザケ mtDNA ハプロタイプ判別法を開発し、さらにそれを用いて 2002 年および 2003 年のベーリング海と北太平洋のシロザケ混合集団について系群解析を行った。

申請者は DNA マイクロアレイの開発にあたり、シロザケ mtDNA のコントロール領域に存在する既知の多型 20 箇所それぞれについて、多型部位がほぼ中央になるように固定化 DNA オリゴマーの配列を設計した。設計したオリゴマーは、ポリカルボジイミド樹脂をコートしたスライドガラス上にスポットし、紫外線照射により固定して DNA マイクロアレイを作製した。ハプロタイプは、5' 末端をビオチン修飾したプライマーを用いて PCR 法により多型部位を増幅、DNA マイクロアレイ上でハイブリダイゼーションを行った後、Avidin Biotin Complex 法により発色操作を行うことで検出した。開発した DNA マイクロアレイは知られている 20 の多型箇所を全て検出し、既知の 30 ハプロタイプの全てを 4 時間以内に正確に判別することが出来た。

次いで、開発した DNA マイクロアレイを用いて 2002 年 9 月、2003 年 7 月、9 月のベーリング海および北太平洋のシロザケ混合集団の系群解析が試みられ、水産庁の調査船、開洋丸で採捕したシロザケ約 3,000 検体のハプロタイプが決定された。その結果、既知のハプロタイプを持つシロザケが全て検出できた。特に 2002 年 9 月には、開洋丸上で血液の採取から DNA マイクロアレイによるハプロタイプ決定までが試みられ、約 3 週間の航海の間に採捕した約 1,000 検体全てのハプロタイプが船上において決定された。

ベーリング海および北太平洋の各調査点におけるハプロタイプの分布は、ベースラインで主要なハプロタイプが海洋でも高頻度であること、ベースラインで稀なハプロタイプは海洋でも低頻度であることを示していた。また、北洋におけるハプロタイプの分布と既存のベースラインを用いて最尤法による系群解析を試み、ベーリング海西部ではロシア系が有意に多く、中央北部においては日本系が多いこと、かつアリューシャン列島近海においては北米系が多いことを示した。これらのことから、調査の範囲で年次変化はなく、季節による系群の分布に変動が起きていないことが示唆された。さらに試料を成熟魚と未成熟魚に分けて系群解析を行った結果でも、成熟魚と未成熟魚の系群分布に差はなかった。魚齢による系群の分布にも偏りが無いので、シロザケは海洋上で魚齢に関係なく、同じ系群がまとまって回遊していることが示唆された。

以上のように、申請者は、理論的にしか論じられていなかった DNA マイクロアレイによるゲノム多型検出を、動植物をとおして初めて実用化し、シロザケ系群の海洋分布がノンランダムであることを明らかにした。これは学術的に高く評価される。また、成果の一部は国際誌に掲載されるとともに、特許の対象ともなっていることから、第三者による本研究の客観的な評価も高いといえる。特に、オリゴマーのサイズや塩基配列による基板への固定化の制限や高価な検出機器に頼らざるを得なかったシグナル分析などの従来の DNA マイクロアレイ使用上の問題点を克服して、船上など生産の現場でも用いることができる実用的で安価なシロザケの系群識別法と遺伝的資源管理に応用できる有効な手法を開発したことで、本研究は学術的のみならず産業的にも高い価値をもつといえる。

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。