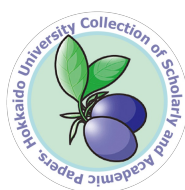




HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ミトコンドリア DNA 分析によるカラフトマス <i>Oncorhynchus gorboscha</i> 集団構造の年級群間比較
Author(s)	山田, 綾; 越野, 陽介; 工藤, 秀明 他
Citation	日本水産学会誌, 78(5), 973-975 https://doi.org/10.2331/suisan.78.973
Issue Date	2012-09-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/50326
Rights	© 2012 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	nissuishi78-973.pdf



短 報

ミトコンドリア DNA 分析による
カラフトマス *Oncorhynchus gorbuscha*
集団構造の年級群間比較山田 綾,¹ 越野陽介,¹ 工藤秀明,²
阿部周一,² 荒井克俊,² 帰山雅秀^{2*}

(2012 年 2 月 1 日受付, 2012 年 5 月 31 日受理)

¹北海道大学大学院水産科学院,²北海道大学大学院水産科学研究院Genetic comparison between odd- and even-year populations of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* based on mitochondrial DNA analysisAYA YAMADA,¹ YOSUKE KOSHINO,¹HIDEAKI KUDO,² SYUICHI ABE,² KATSUTOSHI ARAI²
AND MASAHIRO KAERIYAMA^{2*}¹Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, ²Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

キーワード: カラフトマス, サケ属魚類, 集団構造, 知床半島, 年級群, ミトコンドリア DNA

カラフトマス *Oncorhynchus gorbuscha* は、北緯 36 度以北の太平洋、ベーリング海、オホーツク海、日本海および北極海の一部に分布するサケ属魚類 *Oncorhynchus* spp. の一種である。¹⁾ わが国では、カラフトマスは北海道東部および北部沿岸の河川に産卵遡上する。²⁾ カラフトマスは浮上直後に降海し、およそ 18 ヶ月の海洋生活を経て母川へ産卵遡上し死亡するという一回産卵型の生活史をとる。¹⁾ そのため、カラフトマスは奇数年級群 (O 群) と偶数年級群 (E 群) 間で同系交配が行われる機会が極めて少なく、年級群間で遺伝的隔離が起こると考えられている。¹⁾ また、E 群の冷凍保存精子と O 群の卵の受精実験³⁾ では、年級群間の交配は不可能ではないが、同一河川内の年級群間における雑種第二代の生残率は極めて低いことが明らかとなっている。

これまで、カラフトマス集団における遺伝的差異に関する研究は様々な方法で行われてきた。アイソザイム分析結果⁴⁾ や制限酵素を用いたミトコンドリア (mt) DNA 分析結果では、カラフトマスの O 群と E 群との間に遺伝的分化が認められている。^{5,6)} mtDNA は進化速度が速く、母系遺伝であり、組み換えを起こさないという特徴を持つため、集団間の遺伝的差異を評価するのに

適していることから、^{7,8)} 集団構造分析を行う上で有用であると考えられている。⁵⁾ mtDNA の NADH dehydrogenase subunit 5 gene (ND5) 領域は遺伝的多様性に富み、過去の研究では北海道におけるサクラマス集団の遺伝的構造を解析するのに用いられている。⁹⁾ 一方 cytochrome c oxidase subunit I gene (COI) 領域は種内での保存性が高いため種同定に用いられているが、¹⁰⁾ Cox and Paul¹¹⁾ の研究では種内間比較でも有用であることが明らかになっている。これらの領域の塩基配列を用いたカラフトマスの年級群間比較に関する研究はまだ行われていない。また、日本系カラフトマス集団の遺伝的構造を明らかにした研究例は極めて少ない。⁴⁾

本研究では、日本系カラフトマスの年級群間比較を目的とし、知床半島ルシャ川に産卵遡上するカラフトマスの O 群と E 群の集団構造における遺伝的差異を mtDNA (ND5 および COI 領域) 分析により明らかにした。

2008 年 9 月 16 日～10 月 15 日 (E 群) および 2009 年 9 月 12 日～10 月 8 日 (O 群) に知床半島ルシャ川 (Fig. 1) に産卵遡上したカラフトマス親魚 (2008 年: 92 個体, 2009 年: 69 個体) 背鰭後部を採集し、100% エタノールで固定したものを標本として用いた。Qia-gen 社の Gentra Puregene Cell Kit により、DNA を抽出した。PCR 反応液は、DNA 1 μ L, 10 $\times$ ExTaq buffer (TaKaRa) 2 μ L, dNTP (TaKaRa) 0.4 μ L, 各 10 μ M プライマー 0.5 μ L, ExTaq ポリメラーゼ (TaKaRa) 0.2 μ L, DDW 16.4 μ L とした。PCR 反応条件は、95 $^{\circ}$ C 10 分、次に熱変性 95 $^{\circ}$ C 45 秒、アニーリング 56 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 2 分を 1 サイクルとして 40 サイクル、さらに 70 $^{\circ}$ C で伸長反応を 10 分行った。プライマーは ND5-F (5'-TACCCCAATTGCCCTGTACG-3'), ND5-R (5'-TAGACTCCCGATTGTAAGGC-3'), COI-F (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') および COI-R (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAA-TCA-3': Ward *et al.*¹²⁾) を用いた。ND5 領域部分の PCR に用いたプライマーには、既知のカラフトマス ND5 領域の配列 (U55056) をもとに、サクラマスの同領域部分配列増幅に用いられているプライマー配列⁹⁾ に対応する部位を選択した。得られた PCR 産物を Agencourt AMPure (Beckman Coulter 社) を用いて精製した後、ABI Big Dye Terminator v. 3.1 cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) および ND5-F または COI-F プライマーを用いて定法によりサイクルシーケンシング反

* Tel/Fax : 81-138-40-5605. Email : salmon@fish.hokudai.ac.jp

応を行った。その後 CleanSEQ Kit (Beckman Coulter) を用いて精製を行い, ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。Clustal X で塩基配列のアライメントを行った後, ハプロタイプを決

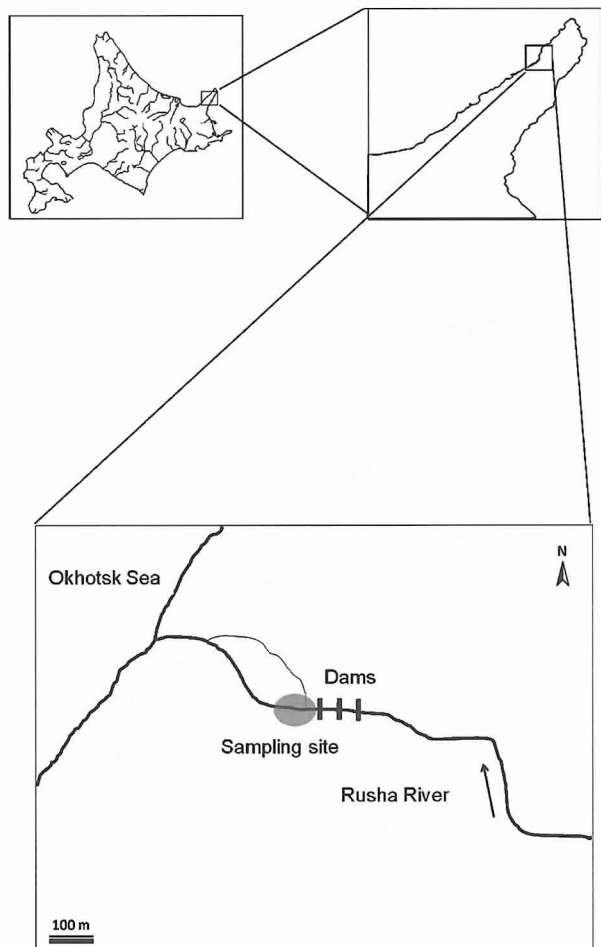


Fig. 1 Sampling location of pink salmon in the Rurua River, eastern Hokkaido, Japan. Bars indicate three dams.

定した。年級群内のハプロタイプ多様度, 塩基多様度および年級群間の Pairwise F_{st}^{13} はハプロタイプ頻度分布を基に Alrequin ver. 3.11 により算出した。年級群間の遺伝的距離は P-distance 法¹⁴ により MEGA ver. 5 を用いて算出し, ハプロタイプネットワークは最節約法を用いて Alrequin ver. 3.11 により作成した。

mtDNA ND5 領域部分配列 431 bp において, 9 サイトの塩基置換がみられ, 10 種類のハプロタイプ (Ht A-J, accession numbers: AB712402-AB712411) が検出された (Table 1a)。10 ハプロタイプ中, 両年級群に共通に観察されたハプロタイプは Ht 1 のみであった。またその保有頻度には違いがみられ, 2008 年級群では, 74% と最も高頻度に出現したのに対し, 2009 年級群では 42% であり, 代わりに Ht 9 が最も高い頻度で出現した (24.2%)。ハプロタイプネットワークでは, 共通のハプロタイプ (Ht 1) を中心に各年級群のハプロタイプが認められた (Fig. 2)。ハプロタイプ多様度および塩基多様度は, 各集団間で顕著な相違はみられなかった (Table 1a)。Pairwise F_{st} は年級群間において有意な値を示し ($F_{st}=0.3274 : P<0.001$), 年級群間において遺伝的差異が認められた。

mtDNA COI 領域部分配列 486 bp において, 9 サイトの塩基置換がみられ, 10 種類のハプロタイプ (Ht 1-10, accession numbers: AB712412-AB712421) が検出された (Table 1b)。2008 年級群では年級群間に共通するハプロタイプ (Ht A) が 56% と高い頻度でみられたのに対し, 2009 年級群では独自のハプロタイプ (Ht I) が 64% と高い頻度でみられた (Fig. 3)。共通のハプロタイプ (Ht A) を中心に各年級群の主なハプロタイプが認められた。ルシヤ川カラフトマス集団の年級群間では, ハプロタイプ多様度および塩基多様度に顕著な相違はみられなかったが, Pairwise F_{st} が有意な値 ($F_{st}=0.4870 : P<0.001$) を示したことから遺伝的差異が認められた。

Table 1 Haplotype distribution and haplotype (H) and nucleotide (π) diversities in the mtDNA ND5 (a) and COI (b) regions of Rurua River pink salmon

(a)

Broodline	Ht 1	Ht 2	Ht 3	Ht 4	Ht 5	Ht 6	Ht 7	Ht 8	Ht 9	Ht 10	Total	H	π
2008	68	0	6	6	5	3	2	1	1	0	92	0.445 ± 0.063	0.0020 ± 0.0016
2009	29	39	0	0	0	0	0	0	0	1	69	0.511 ± 0.024	0.0012 ± 0.0011
Total	29	39	6	6	5	3	2	1	1	1	161		

(b)

Broodline	Ht A	Ht B	Ht C	Ht D	Ht E	Ht F	Ht G	Ht H	Ht I	Ht J	Total	H	π
2008	51	0	32	0	5	0	1	1	1	0	91	0.565 ± 0.034	0.0014 ± 0.0012
2009	17	58	0	11	0	3	0	0	0	1	90	0.539 ± 0.051	0.0030 ± 0.0020
Total	68	58	32	11	5	3	1	1	1	1	181		

H and π : mean $\pm$ SD.

ルシャ川カラフトマス集団の mtDNA の ND5 領域のハプロタイプ多様度および塩基多様度は、サクラマス集団におけるそれらと類似した値を示した。⁹⁾ ルシャ川カラフトマスの年級群間の P_{st} において、遺伝的分化が認められたことは、これまでの研究を支持する結果となった。^{5,6)} mtDNA の進化速度は 0.01~0.02/百万年であり、^{5,10)} 年級群間の遺伝距離 (ND5: 0.08, COI: 0.21) であることから分岐年代を推定したところ、奇数年級群と偶数年級群は 4 万年~21 万年前の更新世に分岐したと推定される。このことは、サケ属魚類は更新世に日本海付近で分岐したという仮説、¹⁵⁾ および奇数年級群と偶数年級群は 1 万年前の最終氷期以前に異なる避寒地から分岐した^{16,17)} という先行研究を支持している。

今回の研究結果、ルシャ川カラフトマスには年級群間では遺伝的分化が認められ、遺伝的多様度は高かった。今後、わが国のカラフトマス集団の遺伝的多様性の保全のためには、遺伝的集団構造の継続的なモニタリングによる各集団の遺伝的多様性と独自性を維持していくことが必要である。

謝 辞

本研究の調査を行うにあたり、多大なるご協力を頂い

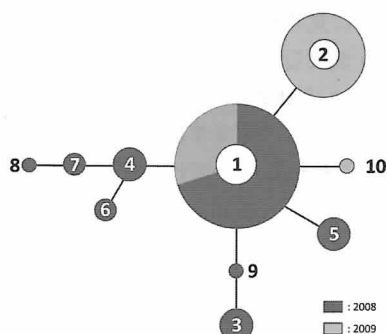


Fig. 2 Haplotype network in mtDNA ND5 region of Rurua River pink salmon populations.

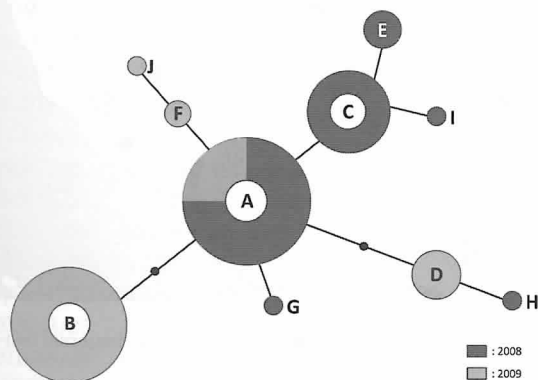


Fig. 3 Haplotype network in mtDNA COI region of Rurua River pink salmon populations.

た公益財団法人知床財団の職員の皆様に深く感謝する。本研究は科学研究費補助金 (課題番号 21380113) の支援を受け行われた。

文 献

- 1) Heard WR. Life history of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). In: Groot C, Marglis L (eds). *Pacific salmon life histories*. University of British Columbia Press, Vancouver. 1991; 121-230.
- 2) 宮本真人. カラフトマス. 「新 北のさかなたち」(上田吉幸, 前田圭司, 嶋田 宏, 鷹見達也 編) 北海道新聞社, 札幌. 2003; 142-145.
- 3) Gharrett AJ, Smoker WW. Two generations of hybrids between even- and odd-year pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*): A test for outbreeding depression?. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1991; **48**: 1744-1749.
- 4) 岡崎登志夫. サケ属魚類の遺伝的構造と資源変動. 漁業資源研究会議報 1991; **27**: 17-30.
- 5) Brykov VA, Polyakova N, Skurikhina LA, Kukleysky AD. Geographical and temporal mitochondrial DNA variability in populations of pink salmon. *J. Fish Biol.* 1996; **48**: 899-909.
- 6) Churikov D, Gharrett AJ. Comparative phylogeography of the two pink salmon broodlines: an analysis based on a mitochondrial DNA genealogy. *Mol. Ecol.* 2002; **11**: 1077-1101.
- 7) Brown WM, George M Jr, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; **76**: 1967-1971.
- 8) Lansman R, Shade RO, Shapira F, Avise JC. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. *J. Mol. Evol.* 1981; **17**: 214-226.
- 9) Kitanishi S, Edo K, Yamamoto T, Azuma N, Hasegawa O, Higashi S. Genetic structure of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) populations in Hokkaido, northernmost Japan, inferred from mitochondrial DNA variation. *J. Fish Biol.* 2007; **71**: 437-452.
- 10) Rasmussen RS, Morrissey MT, Hebert PDN. DNA barcoding of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) from North America. *J. Agric. Food Chem.* 2009; **57**: 8379-8385.
- 11) Cox AJ, Hebert PDN. Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Mol. Ecol.* 2001; **10**: 371-386.
- 12) Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last P R, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2005; **360**: 1847-1857.
- 13) Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 1995; **139**: 457-462.
- 14) Nei M, Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York. 2000.
- 15) Neave F. The origin and speciation of *Oncorhynchus*. *Trans. Roy. Soc. Can.* 1958; **52**: 25-39.
- 16) Aspinwall N. Genetic analysis of North American populations of the pink salmon. *Evolution* 1974; **28**: 295-305.
- 17) Beacham TD. Biochemical genetic stock identification of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) in Southern British Columbia and Puget Sound. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1985; **42**: 1474-1483.