

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05698

研究課題名(和文)伊茶仁カリカリウス遺跡から出土した焼骨片を用いたサケの太古からの遺伝的履歴の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the ancient genetic history of salmon using burnt bone fragments excavated from the Ichani Karikarius site

研究代表者

柳本 卓 (YANAGIMOTO, TAKASHI)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水研機構(横浜)・主任研究員

研究者番号：30443386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：約500年前の焼骨片について、既報の方法でDNA分析をすることができた。その焼骨片の種判別を行ったところ、サケとカラフトマスであることが分かった。しかし、より古い年代のものはDNA分析ができなかった。損傷が激しいと推測された。そのため、2008年、2019年、2020年のサケのD-Loop領域の塩基配列のコアレセントシミュレーション解析を行い、遺伝的多様性の変化を調べた。サケ系統樹はXi-コアレセントと呼ばれる樹形に大きく歪められ、人工種苗放流によりサケ集団内の対立遺伝子頻度が短期間のうちに大きく変化したことを示している。また、伊茶仁川の環境ゲノム分析を行い、魚種組成を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

焼骨片の分析はDNAの損傷が激しく、うまく分析できなかった。しかし、2008年、2019-2020年のサケの遺伝的多様性をコアレセントシミュレーション解析し、集団内の対立遺伝子頻度が短期間のうちに大きく変化していることが分かった。このことにより、人工種苗放流が大きく影響していることが明らかになった。このことが、サケの漁獲量の減少と何らかの関係がある可能性がある。また、伊茶仁川の環境ゲノム分析を行い、魚種組成が明らかになった。今後、焼骨片の種判別に利用できるデータベースとなる。また、魚類調査が難しい伊茶仁川の有効なモニタリング手法になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We could conduct molecular species identification of burnt bones and teeth about 500 years ago using the previously reported method. It was found that these of burnt bones and teeth were salmon and pink salmon. Therefore, we performed coalescent simulation analysis of the nucleotide sequence of the D-Loop region of salmon in 2008, 2019, and 2020 to investigate changes in genetic diversity. The salmon phylogenetic tree is greatly distorted into a tree shape called Xi-coalecent, indicating that the frequency of alleles in the salmon population changed significantly in a short period of time due to the release of artificial seedlings. We also analyzed the environmental genome of the Po River to clarify the composition of fish species.

研究分野：漁業水産学

キーワード：サケ 伊茶仁カリカリウス遺跡 焼骨片 遺伝的多様性 コアレセントシミュレーション解析 環境ゲノム分析

1. 研究開始当初の背景

サケ(シロザケ)は日本人にとって最も重要な魚種の一つであり、その資源を増大させるためにふ化放流事業による稚魚の放流が行われてきた¹⁾。その結果、1980年以降河川や沿岸への来遊数が増加し、サケは増殖事業で最も成功した魚種の一つとなっている。1990年以降は、漁獲量の増減は大きく、近年は減少傾向にあるが、要因は不明である。そのため、遺伝的に偏ったふ化放流魚の回帰に伴って遺伝的多様性が失われていないか、その影響により資源へ悪影響を引き起こさないか問題になっている。その解明の一環として、現在、野生魚とふ化放流魚の遺伝的多様性の比較が行われている。しかしながら、野生魚といってもすでにふ化放流が開始されて100年以上が経過しており、純粋な野生魚はほぼ存在しないと考えられる。ふ化放流が行われていない時代のサケと比較を行う必要があるが、そのような時代のサンプルを保存管理している研究機関はない。

標津町伊茶仁カリカリウス遺跡の焼土の中からサケ科魚類と考えられる歯や脊椎骨の焼骨片が見つかり、これらは、標津町にあるポー川史跡博物館で適切に保管管理されている。米国では、サケ類の脊椎骨の焼骨片からDNA分析を行い、どのような種類のサケ類が分布していたか調べられているが^{2,4)}、サケの現在と過去の遺伝的多様性が比較されていない。本研究では、現在問題になっている遺伝的多様性の低下の有無について調べるために、ポー川史跡自然公園に保存されているサケ科魚類の歯や脊椎骨などの焼骨片からDNA抽出し、種判別を行う。その後、同水系のサケについて過去と現在の遺伝的多様性の比較検討を行う。

2. 研究の目的

近年のサケの漁獲量減少の原因と考えられている遺伝的な多様性の変化を明らかにするため、現在と漁業が行われていない時代の遺伝的な多様性を比較することを目的とする。本研究では、漁業が行われていない時代のサンプルとして、伊茶仁カリカリウス遺跡から出土した焼骨片と現在のサンプルとして、標津川のサケを用いる。しかし、焼骨片からのDNA分析が難しい場合、2008年と2019-2020年に標津川で採集されるサケを用いて遺伝的多様性を比較し、人工魚の放流による天然資源への遺伝的な影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) 焼骨片からのDNA分析

脊椎骨からのDNA抽出法は既に米国などの研究者によって開発されているが²⁻⁴⁾本研究で用いる歯や損傷のある焼骨片からのDNA抽出技術はない。そこで、歯や損傷のある焼骨片からDNA抽出技術を確立させる。うまく行かない場合、既報の方法を使った。既報のmtDNAの4つの領域と一般的に種判別などで用いられるCOI領域をPCR法により増幅し、塩基配列を決定した。その塩基配列についてDNAデータベース中の類似する塩基配列を持つ種を調べた。また、焼骨片からのDNA分析がうまく行かなかった場合、2008年と2019-2020年のサケを用いて、遺伝的な多様性変化を調べた。既報に従い⁵⁾、mtDNAのD-Loop領域の塩基配列分析を行った。

(2) 伊茶仁カリカリウス遺跡周辺の魚類層

伊茶仁カリカリウス遺跡近くを流れるポー川から採水を行い、環境ゲノム分析を行った。焼骨片のDNAが何種であるのか、種判別が行えるようにデータベースを作成した。

(3) 現在と過去のサケの遺伝的多様性の比較

サケの現在と過去の遺伝的多様性を比較し、現在の遺伝的な健全性について検討した。また、コアレセントシミュレーションを行い、系統樹を再構築することにより、遺伝的浮動および繁殖生態を推測した。

4. 研究成果

(1) 焼骨片からのDNA分析

焼骨片を既報の方法で約500年前の焼骨片20個についてDNA抽出を行い、mtDNAの5領域についてPCR増幅を行った。ユニバーサルプライマーを用いたCOI領域のPCRで増幅産物を得ることはできなかった。増幅すれば約600bpのPCR産物が得られる予定であったが、焼骨片から得られたDNAが断片化しているためと考えられた。しかし、他の4つ領域のPCR産物が得られた(図2, 表1)。これらのPCRで得られた増幅産物について、塩基配列を決定することができた。そのフェログラム例を図4に示す。113-249bpの塩基配列を決定することができた(表1)。短い配列であれば、分析が可能であることが分かった。これらの塩基配列を用いて、Blast分析した所、PCR産物が得られた17個体のうち、16個体がサケ(*Oncorhynchus keta*)の塩基配列と相同性が高く、1個体がカラフトマス(*O. gorbuscha*)の塩基配列と相同性が高かった。これらの結果、今回、調べる事が出来た17個体のうち、16個体がサケで、1個体がカラフトマスだったと推測された⁶⁾。しかしながら、約1200年前と約4000年前の焼骨片60個体について、DNA分析ができなかった。これらの焼骨片から抽出したDNAは損傷が激しいと推測された。

(2) 伊茶仁カリカリウス遺跡周辺の魚類層

焼骨片が何種であるか調べるために、遺跡近くを流れるポー川にはどのような魚が生息して

いるか調べるため、環境ゲノム分析を行った（図 3）。ポー川から河口付近までの 7 箇所から採水し、それらを濾紙で濾して、環境中の生物の DNA 断片を調べた。その結果、過去に採集調査による魚類と同様な種が検出され、魚類相が明らかになった。今後、焼骨片の種判別を行う際、参考データとなる。また、自然が豊かで生物調査が難しい川での魚類層調査として、環境ゲノムが役立つことが明らかになった。

（3）コアレセントシミュレーション解析

人工種苗の放流がサケ集団の遺伝的多様性に与える影響を調べるため、2008 年、2019 年、および 2020 年に採集された標津川サケの mtDNA の D-Loop 領域の塩基配列のコアレセントシミュレーション解析を行い、系統樹を再構築することにより、遺伝的浮動の実態を明らかにした。サケ系統樹は Xi-コアレセントと呼ばれる樹形に大きく歪められており、これは人工種苗放流によりサケ集団内の対立遺伝子頻度が不連続的に変化していることを示唆している。実際、標津川サケ資源では対立遺伝子頻度の短期間での変化を見出した（図 4）。Xi-コアレセントが人工種苗放流により引き起こされた可能性を見るため、種苗放流を行っていない知床ルシャ川のカラフトマス mtDNA 配列データのコアレセント解析を行ったところ、このカラフトマス系統樹は標準形をしていることが分かった。この結果は、2つの集団の繁殖生態が全く異なったものであることを物語っており、サケ系統樹の Xi-コアレセントは人工種苗放流に起因するという妥当な根拠を与える。さらに、人工種苗放流の行われているサケ資源の遺伝的多様性の失われる確率（固定確率）をシミュレーションにより計算した。計算結果は意外なものであった。種苗の大量放流にもかかわらず、対立遺伝子は消失しないことが示された。これは、サケ資源の減少に遺伝的多様性の低下が伴わないことを意味する。

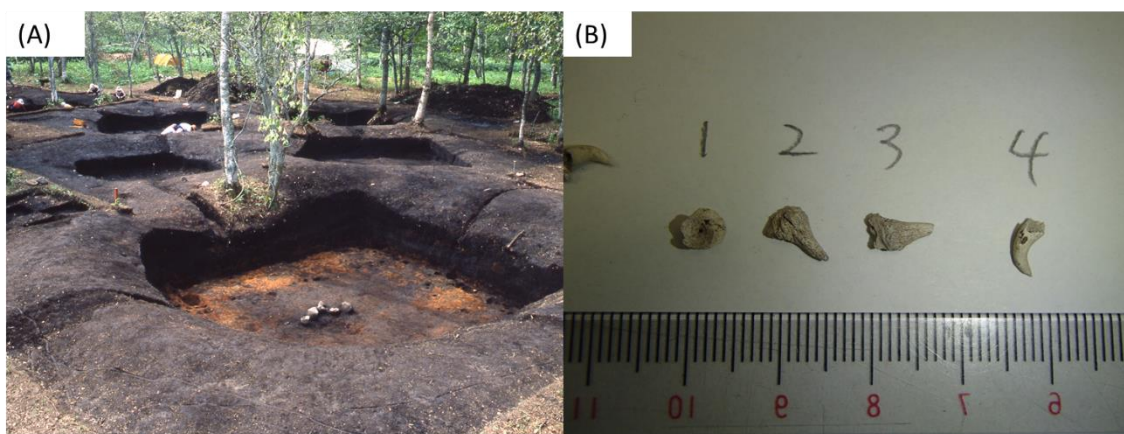
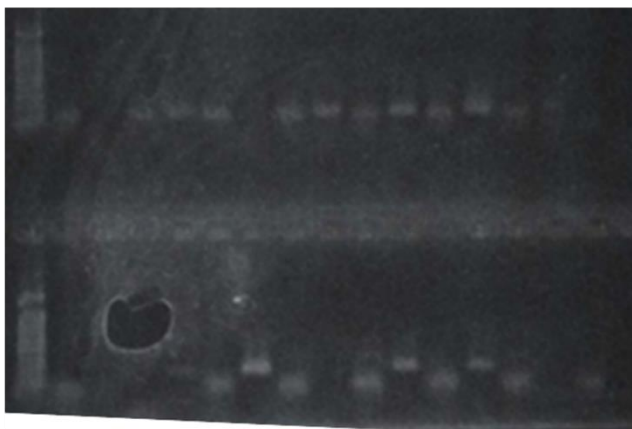


図 1. 伊茶仁仮カリウス遺跡 (A) とそこから出土した焼骨片 (B)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

図 2. 焼骨片から得られた PCR 産物の電気泳動像 (M: サイズマーカー、数値は個体番号をしめす)



図3. 図2. ポー川支流カリカリウス川 (B) とポー川三日月湖 (B) における環境ゲノム分析のための採水風景

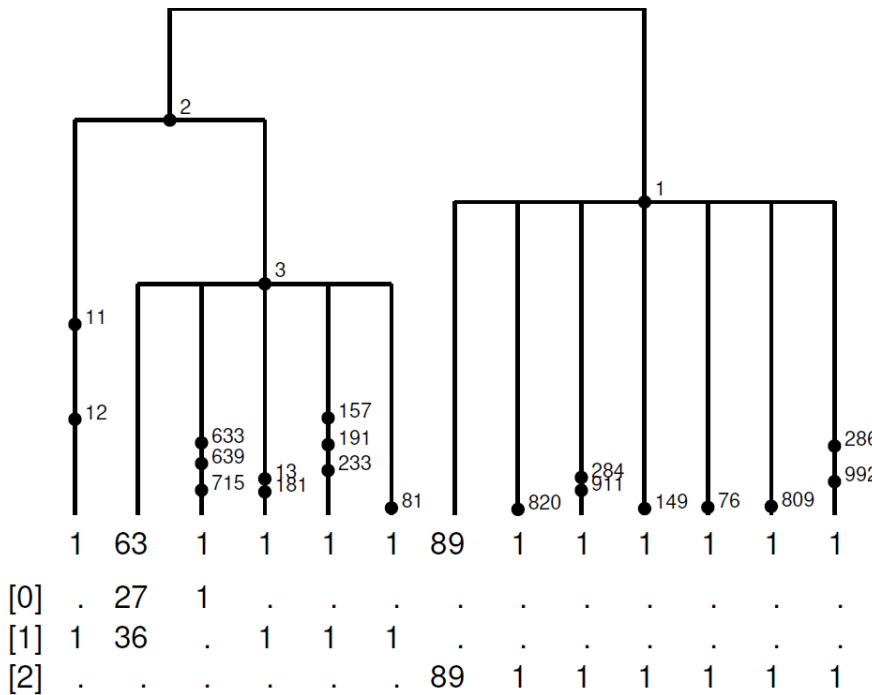


図4. mtDNA 配列 (D-Loop, 1050bp) のコアレセント解析より最尤推定したサケの系統樹。黒丸は変異、数字はその部位。木梢下方に記した数字列 (上段) は標本中のハプロタイプ数、その下三列はサンプル採集年毎のハプロタイプ数 ([0]: 2008年、[1]: 2019年、[2]: 2020年)。

<引用文献>

- ① 斎藤寿彦・平林幸弘・渡邊久二・鈴木健吾. サケ (シロザケ) 日本系. 平成 26 年度国際漁業資源の現況, 水産庁. 2015. (http://kokushi.job.affrc.go.jp/H26/H26_58S.pdf)
- ② Yanag DY, Eng B, Wayne J. Technical note: Improved DNA extraction from ancient bones using Silica-based spin columns. *Ame J Phy Anthr* 1998; 105: 539-543.
- ③ YangDY, anon A, Saunders S. DNA species identification of archaeological salmon bone from the Pacific Northwest coast of North America. *J Arch Sci* 2004; 31: 619-631.
- ④ Cannon A, Yang DY. Early storage and sedentism on the pacific northwest coast: ancient DNA analysis of salmon remains from NAMU, British Columbia. *Amer Antiq* 2006; 71: 123-140.
- ⑤ Sato S, 他 4 名. Genetic structure and diversity of Japanese chum salmon populations inferred from single-nucleotide polymorphism markers. *Transactions of the American Fisheries Society*. 2014; 143: 1231-1246.
- ⑥ 柳本 卓・丹羽洋智・市村政樹・小野哲也. DNA 分析による北海道標津町の伊茶仁カリカリウス遺跡から出土した 500 年前の焼骨片の種判別. 2019; DNA 多型 27: 1-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 柳本 卓、丹羽洋智、市村政樹、小野哲也	4. 巻 27
2. 論文標題 DNA分析による北海道標津町の伊茶仁仮カリウス遺跡から出土した500年前の焼骨片の種判別	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 95-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柳本 卓
2. 発表標題 伊茶仁カリカリウス遺跡から出土した500年前のサケ科魚類の焼骨片のDNA分析による種判別
3. 学会等名 日本DNA多型学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	丹羽 洋智 (NIWA HIROSATO) (60372083)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水研機構(横浜)・主幹研究員 (82708)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------