

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380115

研究課題名（和文） 分子マーカーによるサケの系群識別と海洋生活史の究明

研究課題名（英文） Genetic stock identification and estimation of ocean life history in chum salmon using molecular genetic markers

研究代表者

阿部 周一（ABE SHUICHI）

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：80125278

研究成果の概要（和文）：サケのミトコンドリア DNA およびマイクロサテライト DNA マーカーのほか、一塩基多型 (SNP) マーカーを新規に多数開発した。環太平洋サケ集団の遺伝構造解析や海洋のサケの系群識別において、SNP マーカーは従来の DNA マーカーより高い精度を示した。その結果、日本集団を含む環太平洋サケ集団の詳細な遺伝構造が明らかになり、またベーリング海の日本系サケは北緯 60 度以北にも分布することなどが新たに示唆された。

研究成果の概要（英文）：Nearly 100 polymorphic loci of single nucleotide polymorphism (SNP) markers have been developed besides mitochondrial (mt) and microsatellite (ms) DNA markers in chum salmon. Estimation of genetic structure in Pacific Rim chum populations and stock identification of ocean salmon were better using SNP markers than mtDNA and msDNA markers. The present study thus detailed the genetic structure of Pacific Rim chum populations, and also suggested a novel ocean distribution of Japanese chum salmon, in that they may migrate beyond 60° north in the Bering Sea.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2009 年度 | 7,900,000 | 2,370,000 | 10,270,000 |
| 2010 年度 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |
| 2011 年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,300,000 | 3,990,000 | 17,290,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：生態・行動

1. 研究開始当初の背景

人工増殖により高度に維持されている日本産シロサケ(サケ)は北海道・東北など北日本の沿岸漁業にとって極めて重要な資源であるが、近年、回帰魚の小型化や高齢化が起きている。また、この数年来、北太平洋全域のサケを含むサケ類の漁獲量は減少傾向にある。このような質的・量的変動の要因としてレジームシフトなど地球レベルの気候変

動が推定されているが、サケ資源の維持管理と持続的利用をはかるには、物理・化学的な海洋環境要因の把握のほか、集団遺伝学的アプローチにより日本系サケを識別し、未解明のままであるその海洋における生活史を知ることが必要と考える。サケ類の集団遺伝学的研究は、従来アロザイム多型分析が主流であったが、近年DNA多型分析が主流となった。しかし、国内外を通じこれまでは、サケを含

め対象種の広範な分布域全体をカバーする集団遺伝学的分析は極めて少なく、高精度に系群識別に応用できる分子マーカーも確立されていない。

そこで本研究では、高感度な分子マーカーを探索・開発し、サケ系群識別におけるその実用性を確立するとともに、回遊経路の解明へ応用しサケの全海洋生活史の究明に資することを旨とした。

2. 研究の目的

本研究では、(1)高い多型性が期待されるサケのミトコンドリア DNA や核 DNA 高変異領域の塩基配列解読ならびに多型部位の同定、(2)同定した多型部位およびデータベース登録各種サケ類の DNA 配列変異サイトを標的に一塩基多型 (SNP) マーカーを開発、(3)集団遺伝構造の解明と系群識別における各マーカーの遺伝的変異検出能力の評価、(4)アジアから北米までの主要な地域集団を網羅し各 DNA マーカーによる基準データを構築して系群識別精度を比較、(5)最も高感度な基準データに基づき海洋における幼魚から成魚の系群を日本系および外国系に識別し海域や季節毎の詳細な系群の分布と豊度を解明、(6)解明された系群の分布と豊度から日本系および外国系サケの回遊経路の究明、を目的とする。

3. 研究の方法

(1)各種DNAマーカーの開発

サケの全ゲノムDNAを抽出し、ミトコンドリア (mt) DNA 高多型領域の塩基配列解読、マイクロサテライト (ms) DNA による多型解析、さらに SNP マーカーの開発と解析を行う。まず、これまでに収集した 96 の環太平洋サケ集団に加え新たに収集するロシアと北米由来の産卵回帰サケにおいて塩基配列を解読し、ハプロタイプを決定する。また、ND5 遺伝子など他の mtDNA 領域の配列を解読し、新規の高多型部位の検索を並行して進め、各領域における変異を比較して最も高多型な領域を決定する。次いで既報の msDNA マーカーのうち高多型性のものを選び、遺伝子多様度などから上記の対象集団における遺伝的変異を推定する。

研究協力者の Seeb 教授により開発された 50 種類以上のサケの SNP マーカーに加えて、新規同定および DNA データバンクにあるサケ類遺伝子 DNA 配列情報をスクリーニングしてより多くの SNPs を同定する。Taqman 法により SNP 遺伝子型を決定した後、集団毎の遺伝的変異を推定する。得られた結果を mtDNA や msDNA 解析による結果と比較することにより、3 マーカーの遺伝的変異検出感度の違いを比較する。

(2)各種DNAマーカーによる集団の遺伝構造解

明と系群識別基準データの構築

これまでに収集した環太平洋集団と新規の集団について、開発した DNA マーカーを用いて各種の集団遺伝学的解析により地域間や地域内の遺伝的分化などの遺伝構造を明らかにし、海洋混合集団の系群構成解明のための基準データとする。得られた結果をもとに、遺伝構造の形成に係わった要因も併せて推定する。次いで、各 DNA マーカーにより得られた基準データについて最尤法を用いた SPAM プログラムなどによるシミュレーションを行い、各地域集団の識別精度を海洋混合サケ集団において予備的に比較・評価する。並行して、地理的に偏らず空白のない網羅的な集団の収集に努め、基準データの系群識別精度を上げる努力をする。

(3)海洋に分布するサケ混合集団の系群分析
オホーツク海、ベーリング海、北太平洋、アラスカ湾などにおいて夏季から秋季、および冬季に収集されたサケ試料を、上述の 3 つの DNA マーカーを用いて分析する。同時に、これらの海洋サケ試料の年齢査定を鱗相解析と耳石分析により行い、分析個体の海洋生活期間を決定する。また、研究期間中の各年度において、研究分担者が調査船などに乗船して新規の海洋定点において試料収集をする。系群の豊度は CPUE (単位時間当たり漁獲数) により推定する。

4. 研究成果

(1) DNAマーカーの開発

サケの mtDNA 調節領域および msDNA 5 座のほか、これまでに 200 座近いサケの一塩基多型 (SNP) マーカーを研究協力者とともに開発し、このうち 96 座が十分な多型を示したため遺伝分析に応用できることが分かった。それらは、大部分が核遺伝子 DNA における SNPs であり、少数の mtDNA 由来の SNPs も含んでいた。

(2) 環太平洋サケ集団の遺伝構造解析

上記の SNP マーカーのうち 53 座を用いた環太平洋サケ 114 集団 (日本・韓国 17、ロシア 10、北米 87) の分析から、mtDNA や msDNA マーカーを用いた分析よりも詳細な遺伝構造がとくに北米において示唆された。すなわち、アラスカ西部・ユーコン川上流などの集団は遺伝的に近く、アラスカ湾/ブリティッシュ・コロンビア/ワシントンの各集団はアラスカ半島およびコディアック島の集団と遺伝的に近いことが示唆された。一方で、アラスカ半島の一部の集団は、アラスカ南中部の集団と遺伝的に近いことが示唆された。これらの結果は、アラスカ沿岸における分集団の存在を示唆している。その他、SNP マーカーによる日本、ロシア、北米の 3 地域間や各地域内の集団の解析結果は、mtDNA や msDNA マーカーによる結果を支持した。ただ、SNP マーカーで示された環太平洋サケ集団の遺伝的多様性は、

mtDNA や msDNA マーカーを用いた結果と異なり、アジアおよび北米最南部地域（ワシントン州など）で小さく、他の北米地域で大きいという結果になった。その原因は不明であるが、アジア地域（特にロシア）の分析集団数が少ないことが一因かも知れない。今後、ロシアを中心としたアジア地域の解析集団数の増加が必要である。

(3) 日本系サケ集団の遺伝構造解析

これまで集団数が不足していた日本のサケについて新たな集団を追加し、既に分析済みの集団と合わせた合計 41 集団について、上記 (2) とは別に集団遺伝学的解析を行った。その結果、mtDNA や msDNA マーカーよりも詳細な遺伝構造の知見が SNP マーカーにより得られた。すなわち、日本系サケ集団は大きく北海道 5 地域（オホーツク海・根室海峡・日本海・太平洋東部・太平洋西部）、本州太平洋地域および本州日本海地域に分かれ、遺伝的に異なる 7 つの地域集団が存在することが示唆された。また、一部の河川では、前期群と後期群など産卵遡上時期により遺伝的に異なる集団も認められた。これらの結果は、日本系サケの遺伝的集団構造が、地理的な要因だけでなく時間的な影響も受けている可能性を示している。

(4) サケの遺伝的系群識別

上記 (2) の環太平洋集団に (3) の新規収集日本集団を加えた合計 146 集団を用いて、SNP マーカーによる系群（日本系・ロシア系・北米系）識別精度を mtDNA や msDNA マーカー（96 集団）と比較した。その結果、SNP 基準群の系群識別精度はいずれの系群も 96% 以上となり、mtDNA や msDNA 基準群よりも高い識別精度を示した。この SNP 基準群により 2009 年 7-8 月にベーリング海 25 定点から採取したサケ未成魚を分析した結果、北部ベーリング海では日本系サケが割合・豊度とも優占し、中部ベーリング海では日本系とロシア系サケがほぼ同程度、南部および西部ベーリング海ではロシア系サケが優占することが分かった。一方、北米系サケは調査海域全体で割合・豊度ともに低かった。この結果は、従来の mtDNA マーカーなどによる結果を大筋で支持するとともに、北緯 60 度以北にも日本系サケ未成魚が回遊している可能性を示している。また、冬季アラスカ湾で越冬するサケ未成魚は、湾北部に北米系が優占し、湾南部には日本やロシアなどアジア系が多く分布することが示唆された。

(5) サケの海洋分布

高い系群識別精度を示す SNP マーカーを用いた本研究の結果から、日本、ロシア、北米に由来するサケの海洋分布はノンランダムであることが分かってきた。海流、水温のほか種々の物理化学的環境が海洋生物の分布に影響することが知られているが、サケのノ

ンランダムな分布に係わる要因の究明は今後の研究を俟たなければならない。本研究から、日本系サケの未成魚がその海洋生活史において、夏季～秋季はベーリング海そして冬季はアラスカ湾と季節に応じて分布域を変えて成熟を待つことが分かってきた。日本系サケの回遊経路全体を知るには、今後、冬季の海洋分布に加えて降海後の幼魚の海洋分布を調べる必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

① Seeb, L. W., Sato, S., Abe, S. (他 4 名、3 番目と 4 番目). Single nucleotide polymorphisms across a species' range: implication for conservation studies of Pacific salmon. *Molecular Ecology Resources*, Vol. 11 (Suppl. 1), pp. 195-217, 2011, 査読有

DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02966.x

② Beacham, T. D., J. R. Candy, E. Porszt, S. Sato, and S. Urawa. Microsatellite identification of Canadian sockeye salmon rearing in the Bering Sea. *Transactions of the American Fisheries Society*, Vol. 140, pp. 296-306, 2011, 査読有

DOI: 10.1080/00028487.2011.567843

③ Zheng, L., Tanaka, H. and Abe, S. Proteomic analysis of inviable salmonid hybrids between masu salmon *Oncorhynchus masou* female and rainbow trout *O. mykiss* male during the early embryogenesis. *Journal of Fish Biology*, Vol. 78, pp. 1508-1528, 2011, 査読有

DOI: 10.1111/j.1095-8649.2011.02958.x

④ Yu, J.-N., Azuma, N., Abe, S. (他 5 名、8 番目). Genetic population structure and phylogeography of masu salmon (*Oncorhynchus masou masou*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Zoological Science*, Vol. 27, pp. 375-385, 2010, 査読有

DOI: 10.2108/zsj.27.375

⑤ Yu, J.-N., Azuma, N., Brykov, V., Urawa, S., Ohkuma, K., and Abe, S. Genetic relationships between anadromous and non-anadromous masu salmon (*Oncorhynchus masou*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA variation. *Fish Genetics and Breeding Science*, Vol. 39, pp. 75-85, 2010, 査読有

⑥ Yokotani, R., Azuma, N., Kudo, H., Abe, S., and Kaeriyama, M. Genetic differentiation between early- and late-run populations of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) naturally spawned in the Yurappu River inferred from

mitochondrial DNA analysis. Fish Genetics and Breeding Science, Vol. 39, pp. 9-16, 2009, 査読有

⑦Moriya, S., Sato, S., Abe, S. (他4名、7番目). Nonrandom distribution of chum salmon stocks in the Bering Sea and the North Pacific Ocean estimated using mitochondrial DNA microarray. Fisheries Science, Vol. 75, pp. 359-367, 2009, 査読有

DOI: 10.1007/s12562-009-0062-8

⑧ Yoon, M., Jin, D.-H. and Abe, S. Preliminary estimation of chum salmon stock composition in the Bering Sea and North Pacific Ocean using polymorphic microsatellite DNA markers. Ichthyological Research, Vol. 56, pp. 37-42, 2009, 査読有

DOI: 10.1007/s10228-008-0065-y

⑨ Sato, S., S. Moriya, T. Azumaya, H. Nagoya, S. Abe, and S. Urawa. Stock distribution patterns of chum salmon in the Bering Sea and North Pacific Ocean during the summer and fall of 2002-2004. North Pacific Anadromous Fish Commission Bulletin, Vol. 5, pp. 29-31, 2009, 査読有
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.183.1475>

⑩Beacham, T. D., J. R. Candy, S. Sato, S. Urawa, K. D. Le, and M. Wetklo. Stock origins of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in the Gulf of Alaska during winter as estimated with microsatellites. North Pacific Anadromous Fish Commission Bulletin 5: 15-23, 2009, 査読有
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.182.9185>

[学会発表] (計 28 件)

①阿部周一. サケ類のゲノム生物学—育種と資源管理へ向けて—, 第 5 回サケ学研究会, 2011 年 12 月 18 日, 北海道大学学術交流会館 (札幌市) (特別講演)

②佐藤俊平. 日本系サケ個体群の遺伝的評価: 現状と今後の課題. 第 5 回サケ学研究会. 2011 年 12 月 17 日, 北海道大学学術交流会館 (札幌市) (招待講演)

③Templin, W., C. Habicht, L. W. Seeb, S. Sato, S. Abe, K. Warheit, J. Y. Park, and J. E. Seeb. Improved genetic stock identification of chum salmon through the PacSNP collaboration, NPAFC International Workshop on Explanations for the High Abundance of Pink and Chum Salmon Future Trends, 2011 年 10 月 30 日, カナダブリテイッシュコロンビア州ナナイモ市

④Sato, S., M. Kato, K. Morita, and S. Urawa. Stock-specific ocean distribution of immature chum salmon in the summer Bering Sea inferred from SNP markers. NPAFC International Workshop on explanations for the high abundance of pink and chum salmon and future trends, 2011 年 10 月 30 日, カナダブリテイッシュコロンビア州ナナイモ市

⑤Abe S. Aquaculture Genetics and Genomics in Marine Animals: An Overview of Fisheries Biotechnology in Japan, 37th NAS International Symposium: Biotechnology in Agriculture and Fisheries, National Academy of Science, Republic of Korea, 2010 年 10 月 22 日, 韓国学士院 (ソウル市) (招待講演)

⑥阿部周一. 野生サケ類の遺伝的特性把握とその課題, 第 4 回サケ学研究会, 北海道大学水産学部 (函館市), 2010 年 12 月 18 日 (招待講演)

⑦Abe S. Genetic diversity, population structure and phylogeography of Pacific salmon inferred from molecular genetic analyses, Ecological Interaction between Wild and Hatchery Salmon, Spring Meeting of the 2010 State of the Salmon, 2010 年 5 月 6 日, 米国オレゴン州ポートランド市 (招待講演)

⑧佐藤俊平, L. W. Seeb, J. E. See, W. D. Templin, 名古屋博之, 浦和茂彦. SNP マーカーを用いた日本系サケ集団の遺伝構造解析. 平成 22 年度日本水産学会春季大会, 2010 年 3 月 26 日~30 日, 日本大学生物資源学部 (藤沢市)

⑨Sato, S., W. D. Templin, L. W. Seeb, J. E. Seeb, H. Nagoya, and S. Urawa. An application of SNP markers to stock identification of chum salmon in the Bering Sea during the summer of 2007. SNP Workshop III, 2010 年 3 月 23 日, 米国ワシントン州ブレイン市

⑩Seeb, L. W., W. D. Templin, S. Sato, S. Abe, K. Warheit, and J. E. Seeb. Single nucleotide polymorphisms across a species' range: implications for conservation studies of Pacific salmon. SNP Workshop III, 2010 年 3 月 22 日, 米国ワシントン州ブレイン市

[図書] (計 2 件)

①佐藤俊平, 山本祥一郎. 北海道大学出版会. サケ科魚類の遺伝構造とその成立過程—陸封化と大規模回遊 (渡辺勝敏・高橋洋編. 淡水魚地理の自然史—多様性と分化をめぐって—), 2010 年, pp. 71-85

②阿部周一, 佐藤俊平. 北海道大学出版会.

サケ類のゲノム生物学と資源の遺伝的管理
(阿部周一編著. サケ学入門 自然史・水産・
文化), 2009年, pp. 101-117

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 周一 (ABE SHUICHI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教
授

研究者番号: 8 0 1 2 5 2 7 8

(2) 研究分担者

佐藤 俊平 (SATO SHUNPEI)

(独) 水産総合研究センター・北海道区
水産研究所・研究員

研究者番号: 7 0 4 2 5 4 6 1