

氏 名(本籍) の 野 ぐち 口 だい 大 き 毅

学位の種類 博 士 ( 農 学 )

学位記番号 農 博 第 8 7 0 号

学位授与年月日 平 成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科専攻 農学研究科環境修復生物学専攻  
(博士課程)

学位論文題目 サクラマス野生集団の遺伝的多様性の評価とコンピューターシミュレーションによる親魚集団の管理手法に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 谷 口 順 彦  
(副 査) 教 授 西 田 朗  
教 授 南 卓 志  
助教授 中 嶋 正 道

# 論文内容要旨

## 序論

サケ科サケ属の一種サクラマス(*Oncorhynchus masou masou*)は、食味に優れており、日本の食文化の一端を担っており、また、遊魚の対象としても人気が高い。しかし、乱獲や河川環境の悪化により資源量が著しく低下しており、富山県においては希少種に指定されている。このような産業的、および、資源保護の観点から、養殖事業や放流事業が長年にわたり行われている。

種苗放流は資源増大のための一つの有効な手法であるが、無秩序な放流は在来集団の遺伝的多様性と地域特異性を消失させ、在来集団の適応度を低下させる恐れがあると言われている。これを防ぐためには、在来集団の多様性と分化の現状を把握し、種苗放流のリスクを管理する必要がある。これまで、在来集団の多様性と集団分化に関する研究は、アイソザイム分析、および、ミトコンドリア DNA の D-LOOP 領域の分析によって実施されているが、マーカー座の感度が低いため、統一的な見解を得るには至っていない。そこで、本研究では、高感度マーカーであるマイクロサテライト DNA マーカーを開発し、そのマーカー座の性能を検討した後、在来集団の多様性と集団分化を検討した。種苗放流のリスクを管理するためには、在来集団における放流個体の追跡調査と、多様性低下防止手法の開発が必要である。放流個体の追跡調査には、Assignment Test を利用して個体の産地を推定することを試みた。多様性の低下を防止する手法としては、遠縁の個体を選び交配を行う、Minimal Kinship 法(MK法)が有効と考え、継代シミュレーションを 30 世代にわたって行い、多様性レベル維持に関する効果を評価検討した。

## 第一章 マイクロサテライト DNA マーカーの開発

マイクロサテライト DNA マーカーを、以下の 3 種の方法で開発した。

### 1) サクラマス DNA からのマイクロサテライト部位の同定

サクラマス DNA のゲノムライブラリーを作成しその中からマイクロサテライト領域を単離し、21 種のプライマーセットが設計した。21 種のプライマーセットで増幅を試みたところ、全てのプライマーセットにおいて増幅が確認できた。これらのうち、変異が検出され、アレル型の識別が可能である 2 セットに *Oma01* および *Oma02* と名づけた。

### 2) サケ属の他魚種のマイクロサテライトプライマーの転用

マスノスケ、カラフトマス、ベニサケで開発された 5 つの既知のプライマーセットを用いて、サクラマスのマイクロサテライト領域の増幅を試みたところ、全てのプライマーにおいてサクラマスにおいて増幅が確認された。このうち、マスノスケのマイクロサテライト領域の一つであり、GA リピートを持つ *Ots 520*(Accession NO. AY042710)は、変異が検出され、アレル型を明確に識別することが可能であった

### 3) サケ属他魚種の遺伝子のイントロン領域からマイクロサテライト領域を探索、同定

国際塩基配列データベースに登録されている *Oncorhynchus* 属魚種のイントロン領域中からマイクロサテライト部位を探索したところ、シロサケの somatolactin 遺伝子(Accession NO.:D10638)とニジマスの IgM heavy chain 遺伝子(Accession NO.:X83372)のイントロン部分に、それぞれ CT と TA を単位としたマイクロサテライト領域が存在することが判明したので、プライマーを設計し増幅を試みたところ

ろ、それぞれ変異が検出されアレル型を明確に識別することが可能であった。以上の5マーカー座のプロフィールを表1-1に示す。

表1-1 開発されたマイクロサテライトDNAマーカーのプロフィール

マーカー座	リピートモチーフ	Primer 配列(5'→3')	アニーリング温度	出典
<i>Ots520</i>	(GA) <sub>n</sub>	F: AGAGTGCAAGCGAGTATTC R: CTTGACAGCAGGTAACCATG	50°C	Naish and Park (Acc.No:AY042710)
<i>Oma01</i>	(CA) <sub>n</sub> (CT) <sub>n</sub>	F: GTGTGGATGGCGATTGGTGT R: TCCCCTGAGATCATTGTA AAA	56°C	本研究
<i>Oma02</i>	(CA) <sub>n</sub>	F: AATGCCTGTTGGGAAAGAGA R: TAGGGGTTTGTAAATGTAGAA	56°C	本研究
<i>Oma3ke</i>	(CT) <sub>n</sub>	F: TTTCTCCTTTAGCCCAATG R: CAGAGTAGACAGGGGGATG	56°C	Takayama et al. (Acc.No:D10638)
<i>Oma4my</i>	(TA) <sub>n</sub>	F: CTGCGCATGTGTAGCCTATG R: TCTTTAGAGGGGTCATTAC	56°C	Andersson et al. (Acc.No:X83372)

これらの5マーカー座が多様性解析に使用可能であることを検討するために2001年に富山県神通川へ遡上した44個体のサンプルと新潟県荒川へ遡上した25個体を用いて多様性を評価した。多様性の指標として、アレル数(NA)、アレルのサイズ幅、ヘテロ接合度の期待値(*he*)と観察値(*ho*)を求めた。また、これらのマーカーがハーディーワインベルグ平衡から逸脱しているかを検定した。以上の結果を表1-2に示す。

表1-2 開発されたマイクロサテライトDNAマーカーの変異量

採集地点	変異量の指標	マーカー座				
		<i>Ots520</i>	<i>Oma01</i>	<i>Oma02</i>	<i>Oma03ke</i>	<i>Oma04my</i>
神通川 2001年度 (N=44)	NA	14	16	17	9	6
	Size Range(bp)	173-209	121-173	124-190	108-130	150-164
	<i>h o</i>	0.841	0.750	0.818	0.909	0.636
	<i>h e</i>	0.859	0.917	0.897	0.881	0.630
	<i>P-value</i>	0.459	0.033*	0.206	0.552	0.944
荒川 2001年度 (N=25)	NA	12	24	15	10	6
	Size Range(bp)	171-199	119-199	128-182	108-130	150-164
	<i>h o</i>	0.880	0.920	0.880	0.920	0.680
	<i>h e</i>	0.917	0.958	0.916	0.819	0.759
	<i>P-value</i>	0.646	0.407	0.788	0.861	0.054

\*は、ハーディーワインベルグ平衡からの逸脱

アレル数は、6から24個までの範囲を示し、ヘテロ接合度の期待値(*He*)は、0.630から0.958までの範囲を示し、ヘテロ接合体率の観察値(*ho*)は0.636~0.920を示した。ハーディーワインベルグ平衡からの逸脱は、神通川の*Oma01*でのみ観察され、それ以外のマーカー座では逸脱は観察されなかった。*Oma01*に関しては、荒川の*Oma01*では逸脱が観察されないことから、神通川集団の構造に起因していると考えられ、マーカー座に起因しているものではないと考えられる。

以上の結果から、本章で開発された5マーカー座はサクラムスの集団解析を行うのに有効な変異量があると考えられた。

## 第二章 マイクロサテライト DNA マーカーの遺伝様式の検証と個体間距離の推定

マイクロサテライト DNA マーカーは、高変異性であるためプライマーサイトも変異しやすく、低感度マーカーに比べ塩基配列における特異性は必ずしも高いとはいえない。従って、目的としないマイクロサテライト座が増幅されたり、目的とするマーカーアレルが増幅されない可能性があるため、マーカー座毎にそれらの遺伝様式の確認を行う必要がある。そこで、本章では、両親のアレル型が明らかでない2交配区を用いて、第一章で開発したマーカー座がメンデル遺伝するか否かを調べた。両親のアレル型から予想される仔魚のアレル型頻度の期待値と仔魚のアレル型頻度の観察値を比較し、 $X^2$ 検定を行ったところ、メンデルの分離比からの逸脱は観察されず、メンデル遺伝していることが分かった(表2-1)。

表2-1 マイクロサテライトDNAマーカーのアレル型の遺伝様式  
およびメンデル式分離に関する $X^2$ 検定

交配区	遺伝子座	両親の遺伝型	仔魚の 遺伝子型	観察値	期待値	P-value	
A	Ots520	雄	195/195	177/195	25	23	0.555
		雌	177/199	195/199	21	23	
	Oma01	雄	123/123	123/123	28	23.5	0.189
		雌	123/135	123/135	19	23.5	
	Oma02	雄	124/128	124/128	30	24	0.083
		雌	128/128	128/128	18	24	
	Oma03ke	雄	122/122	122/118	48	48	N.S.
		雌	118/118				
	Oma04my	雄	152/154	152/152	10	12	0.721
				152/154	14	12	
雌		152/158	152/158	10	12		
			154/158	14	12		
B	Ots520	雄	195/195	195/195	23	21	0.537
		雌	195/197	195/197	19	21	
	Oma01	雄	123/123	123/123	42	42	N.S.
		雌	123/123				
	Oma02	雄	124/128	124/124	6	10.25	0.161
				124/128	16	10.25	
		雌	124/130	124/130	10	10.25	
				128/130	9	10.25	
	Oma03ke	雄	122/122	116/122	27	21	0.064
		雌	116/118	118/122	15	21	
Oma04my	雄	152/154	152/154	21	20.5	0.876	
	雌	154/154	154/154	20	20.5		

また、マーカー間に連鎖関係があるか否かを、2001年に富山県神通川へ遡上した44個体のサンプルと新潟県荒川へ遡上した25個体を用いて連鎖不平衡の検定を行ったところ、2集団間を通して連鎖不平衡が観察されたマーカー対はなかった。メンデル遺伝および染色体上での連鎖関係がないことから、中立なマーカー座として集団解析に利用可能であることがわかった。

これら5プライマーが家系解析に利用可能であるかを検討するために、同胞集団内および半同胞集団間における、 $P_{sa}$ (アレル共有度)の分布を求めたところ、単峰型の分布を描き、家系を反映した結果を示した(図2-1および図2-2)。

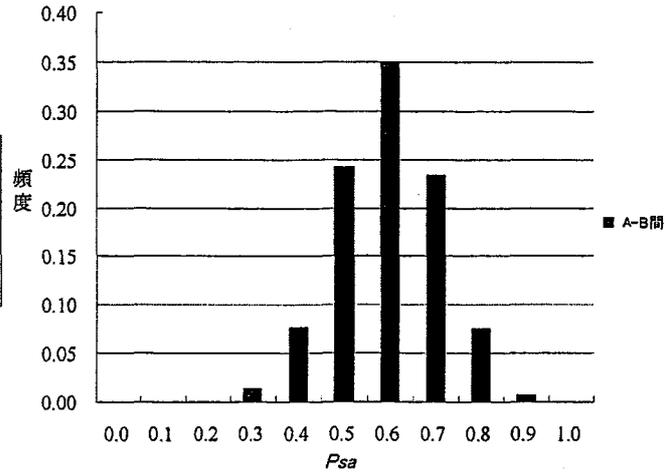
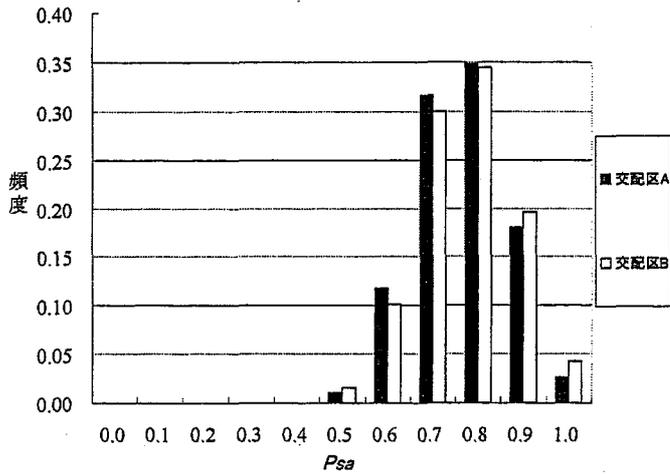


図 2-1 同胞集団内における  $Psa$  の頻度分布 図 2-2 半同胞集団間(交配区 1-2 間)における  $Psa$  の頻度分布

そして、2 交配区の全個体間の  $1-Psa$  を求め、UPGMA 法によってクラスター解析を行ったところ、家系に対応した明確な二つのクラスターを形成した(図 2-3)。

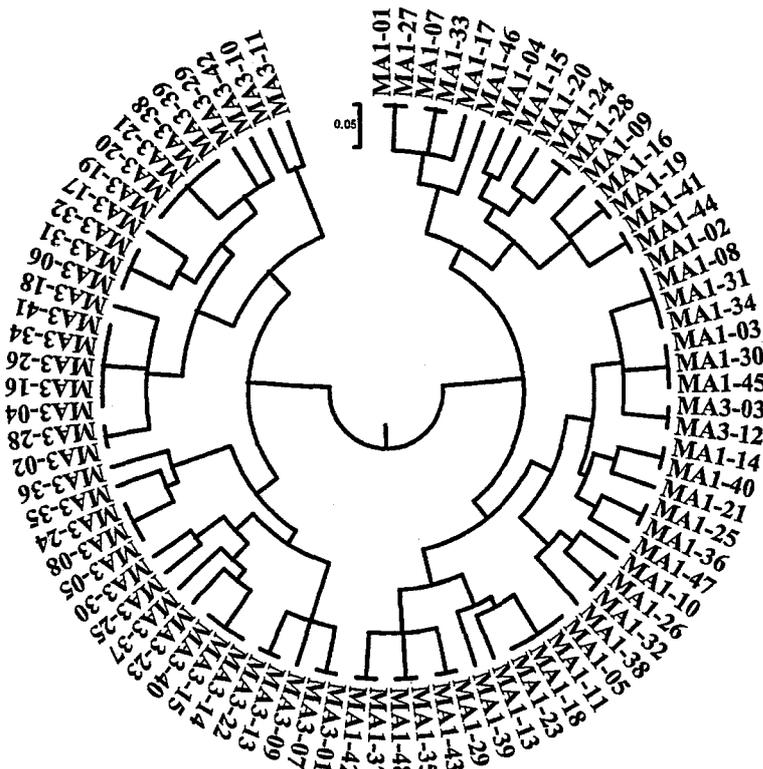


図 2-3 2 交配区(MA1 と MA2)に属する個体の個体間距離に基づく UPGMA デンドログラム

このことから、5 マーカー座を使って半同胞集団を識別できる可能性があると考えられる。

以上の 2 点から、開発した 5 マーカー座は、家系解析に有効と考えられた。

### 第三章 マイクロサテライト DNA マーカーによるサクラマス<sup>1</sup>の遺伝的多様性と 集団分化

富山県神通川(2001年、2002年)、新潟県魚野川、荒川、三面川、北海道尻別川、暑寒別川、標津川、岩手県安家川(以上2001年)、宮城県気仙沼沖(2003年)の9水域(10標本集団)でそれぞれ17~48個体を採集し、計333個体をサンプルとして供した。遺伝的多様性 アリル数(NA)、アリルリッチネス(AR)、ヘテロ接合度の期待値(*he*)と観察値(*ho*)、ハーディーワインベルグ平衡からの逸脱に関する *P*-value を求めたところ、表3-1の結果を示した。

表3-1 天然サクラマス10標本集団の遺伝的多様性

マーカー座	Sample Size	神通川	神通川	三面川	魚野川	荒川	尻別川	標津川	暑寒別川	安家川	気仙沼沖
		2001	2002								
<i>Oma01</i>	NA	16	19	15	19	24	19	13	19	15	14
	AR	13.1	13.3	15.0	17.3	19.7	13.5	9.5	16.4	13.4	9.0
	<i>ho</i>	0.750	0.705	0.824	0.952	0.920	0.583	0.558	0.846	0.714	0.659
	<i>he</i>	0.917	0.880	0.938	0.948	0.958	0.915	0.800	0.947	0.908	0.764
	<i>P</i> -value	0.033*	0.000*	0.202	0.174	0.407	0.000*	0.000*	0.023*	0.003*	0.339
<i>Oma02</i>	NA	17	17	13	12	15	18	18	15	13	23
	AR	12.6	12.5	13.0	10.9	13.2	14.0	13.6	12.5	11.9	14.4
	<i>ho</i>	0.818	0.864	0.882	0.714	0.880	0.875	0.860	0.731	0.905	0.773
	<i>he</i>	0.897	0.895	0.889	0.868	0.916	0.926	0.918	0.892	0.894	0.893
	<i>P</i> -value	0.206	0.509	0.868	0.166	0.788	0.048*	0.051	0.308	0.965	0.002*
<i>Oma03ke</i>	NA	9	10	8	9	10	11	12	9	8	15
	AR	8.8	9.5	8.0	8.7	8.8	7.1	9.9	7.3	7.9	11.4
	<i>ho</i>	0.909	0.773	0.824	0.667	0.920	0.917	0.860	0.769	0.762	0.795
	<i>he</i>	0.881	0.885	0.800	0.847	0.819	0.819	0.860	0.796	0.829	0.898
	<i>P</i> -value	0.552	0.109	0.382	0.028*	0.861	0.645	0.849	0.787	0.036*	0.002*
<i>Oma04my</i>	NA	6	5	5	5	6	5	6	7	5	7
	AR	4.9	4.6	5.0	4.7	5.6	4.8	5.4	6.5	4.8	5.5
	<i>ho</i>	0.636	0.636	0.765	0.667	0.680	0.667	0.791	0.654	0.762	0.636
	<i>he</i>	0.630	0.661	0.729	0.642	0.759	0.702	0.811	0.793	0.682	0.701
	<i>P</i> -value	0.944	0.108	0.484	0.810	0.054	0.234	0.775	0.156	0.543	0.148
<i>Ots520</i>	NA	14	12	11	12	12	16	15	15	11	16
	AR	10.6	9.8	11.0	11.1	11.3	12.1	11.8	12.7	10.7	11.2
	<i>ho</i>	0.841	0.795	0.706	0.714	0.880	0.875	0.860	0.885	0.952	0.886
	<i>he</i>	0.859	0.854	0.834	0.879	0.917	0.884	0.888	0.902	0.883	0.865
	<i>P</i> -value	0.459	0.013*	0.020*	0.070	0.646	0.214	0.746	0.118	0.652	0.826
5座の 平均値	NA	12.40	12.60	10.40	11.40	13.40	13.80	12.80	13.00	10.40	15.00
	AR	10.00	9.95	10.40	10.57	11.72	10.30	10.04	11.08	9.74	10.29
	<i>Ho</i>	0.791	0.755	0.800	0.743	0.856	0.783	0.786	0.777	0.819	0.750
	<i>He</i>	0.837	0.835	0.838	0.837	0.874	0.849	0.856	0.866	0.839	0.824

\*印は、ハーディーワインベルグ平衡からの逸脱(5%水準)を示す

各地点における、ヘテロ接合度の期待値の平均値(*He*:5 マーカー座)は気仙沼沖の0.824から荒川の0.874、アリルリッチネスの平均値(5 マーカー座)は安家川の9.74から荒川の11.72までの値を示した。荒川は、全てのマーカー座においてハーディーワインベルグ平衡からの逸脱が確認されず、それ以外の標本集団では、1~2 マーカー座でハーディーワインベルグ平衡からの逸脱が観察されたが、全てのマーカー座で逸脱している集団はなかった。

マイクロサテライト DNA マーカーによるヘテロ接合度の期待値の平均値(*He*:5 マーカー座)は、絶滅危惧種のリュウキュウアユでは0.364から0.348、もしくは0.176から0.226程度であり、多様性に

富んでいると言われているマダイとヒラメにおいては、0.694 から 0.924、0.74 から 0.76 程度の値を示す。本研究におけるサクラマスは 0.824 から 0.874 という値は、多様性に富んでいるマダイおよびヒラメと比べても大差なく、十分な多様性を保持していると考えられる。

次に、サクラマスの異なる遡上年の標本集団間において異質性が存在するか否かを判定するため、富山県神通川の 2001 年標本群、2002 年標本群を用いて  $F_{st}$  分析を行ったところ、両標本集団間に異質性は認められなかった。次に水域間に異質性が存在するか否かを調べるために、9 水域間での  $F_{st}$  分析および Amova 分析を行ったところ、全ての水域間で異質性が観察され、全標本集団の変異量のうち、集団間の変異は 3.18% を占めていることがわかった。以上から、サクラマスの在来集団では、同一水域の異なる漁獲年の標本群は同一とみなせるが、水域間は異なる分集団を形成していることがわかった。この現象は、サクラマスが、サケ科魚類の中でも特に強い母川回帰性を有しているため水域毎に強い遺伝的独立性を備えたことを示唆している。

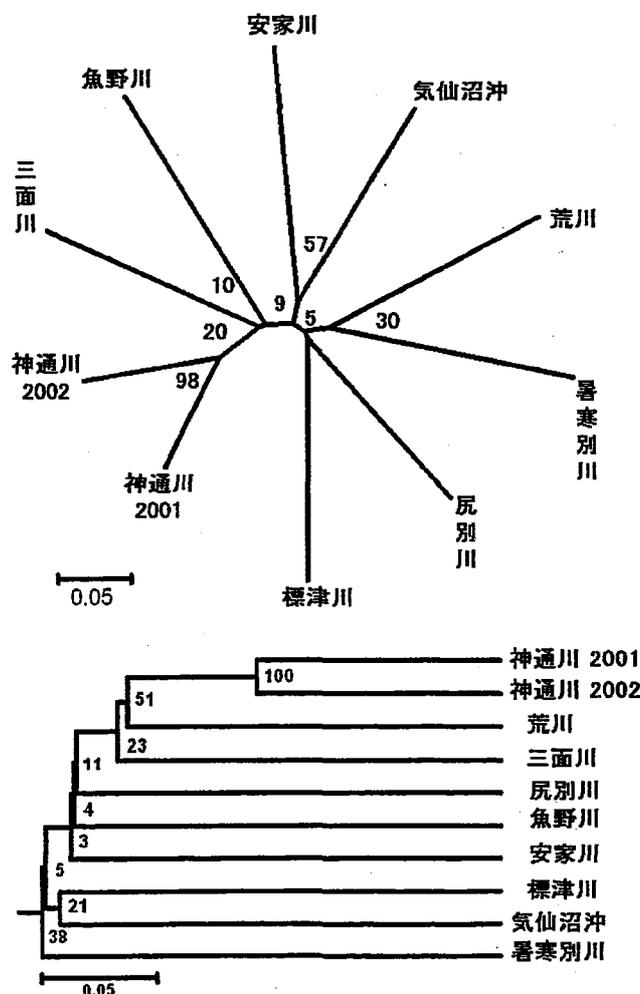


図 3-1 Cavalli-sforza の距離による Neighbor-Jointing (NJ) デンドログラム(上側)と UPGMA デンドログラム(下側)

Cavalli-Sforza and Edwards の遺伝距離を求め、UPGMA 法と NJ 法とによってデンドログラムを作成したところ、図 3-1 の樹形を示した。

異質性が観察されなかった神通川の2001年度と2002年度の標本群は、UPGMA法とNJ法で共にクラスターを形成し、ブートストラップ値も極めて大きく、信頼性が高かったが、それ以外の地点では、UPGMA法とNJ法で共通のクラスターはなく、また、クラスター間の枝長が長いという傾向も観察され、それぞれのクラスターのブートストラップ値も小さかった。従って、それぞれのグループ性に関しては系統的意味を見出すことは出来ないと判断された。

地理的な距離とクラスターに正の相関がない原因として、以下の三点が考えられた。一つ目は、異なる河川に由来する種苗が放流され、遺伝的攪乱がおきている可能性があること。二つ目は、近年集団サイズが急激に減少して小集団化し、遺伝的浮動による無方向への分化が加速している可能性があること。三つ目は、現在でも一定の遺伝子交流がおきており、分集団間の遺伝的分化が中断したため分化の程度が小さくなった可能性があること。クラスター間の枝長が長かったことは、二点目と三点目の仮説を示唆していると考えられる。

#### 第四章 個体レベルの家系および集団識別解析法の検討

サクラマス半同胞集団において、家系が推定できるか否かを調べるために、半同胞関係にある2交配区に属する全ての個体に対して Assignment Test を行ったところ、交配区1に属する全45個体、交配区2に属する全40個体が、それぞれの家系に正しく再配置され、サクラマスの家系判別が可能であることがわかった。これを利用すれば、サクラマスの親魚および仔魚集団の遺伝的管理に応用できると考えられる。

次に、野生集団に対する Assignment Test を試みた。初めに、集団間の遺伝的分化が明確なアユ (*Plecoglossus altivelis*) をモデルケースとして個体の識別を試み、Assignment Test の有効性について確認することとした。アユには、琵琶湖に陸封された集団と両側回遊する集団があり、両者は生殖隔離していることが知られている。標本群としては、1998年に吉野川の第十堰下流域から採集した両側回遊型アユ稚魚(A1)と勝浦川から採集した両側回遊型アユ稚魚(A2)および、琵琶湖から採集された1997年の陸封型アユ種苗(L1)と1998年の陸封型アユ種苗(L2)を利用した。5マーカー座による Assignment Test を行ったところ再配置率は0.88~0.94、9マーカー座による Assignment Test を行ったところ再配置率は0.97~0.99を示した(表4-1)。

表4-1 アユの型判別結果

マーカー座数		サンプル地点			
		A1	A2	L1	L2
5座	両側回遊型	68	51	3	7
	陸封型	9	3	36	70
	再配置率	0.88	0.94	0.92	0.91
9座	両側回遊型	71			1
	陸封型	2			67
	再配置率	0.97			0.99

アユの各標本個体を両側回遊型と陸封型に判別することは、5マーカー座でも可能であるが、さらに増やせば詳細なデータが得られる事が期待できると考えられる。

さて、これまで陸封型と両側回遊型の混合率は、両集団を特徴付けるマーカー座のアリル頻度に基づいて推定してきた。これに対し、それぞれの個体が陸封型と両側回遊型が判明すれば、より正確な混合率の推定が期待できる。そこで、従来法および、陸封型と両側回遊型を個体判別することによって推定する方法で、混合率を推定したところ、表 4-2 および図 4-1 の結果を示した。

表4-2 各標本群におけるアユの型判別および混合率の推定

標本群名	サンプル数	両側回遊型	陸封型	陸封型の混合率	
				個体判別法	頻度法
Q1	39	33	6	0.154	-0.013
Q2	80	59	21	0.263	0.241
Q3	40	22	18	0.450	0.476
Q4	39	18	21	0.538	0.577
Q5	40	32	8	0.200	0.025

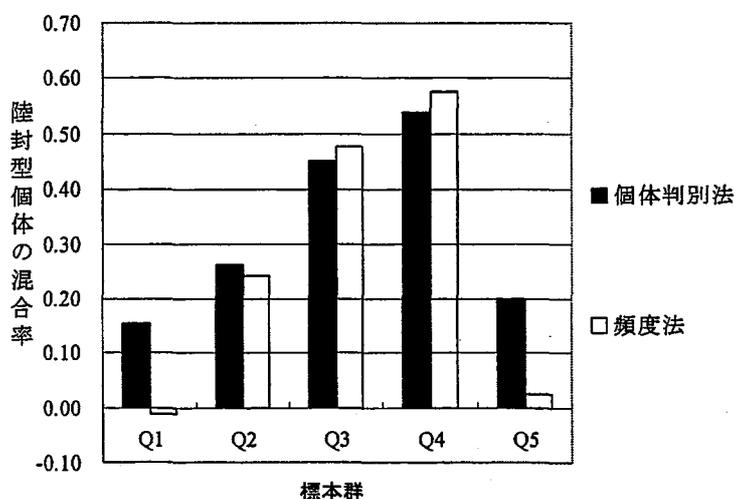


図 4-1 アユの陸封型-両側回遊型混合集団における混合率

両側回遊型と陸封型の混合率を、個体の型判別によって推定した場合と従来の方法で推定した場合を比較すると、混合率がやや高い状態では両者はよく一致したが、陸封型の混合率が低い標本群においては、両方法の結果は大きく異なっていた。両側回遊型と陸封型の混合率を、個体の型判別によって推定した場合は、頻度の影響を受けることがなく、より正確に推定できたものと考えられる。

サクラマス天然個体を、9 地点に割当てて Assignment Test を行ったところ、LOD 値が 0 以上の時には、全体での再配置率が 0.463 と、著しく低かった。LOD 値を 1 以上の個体に限定すると、全体では 0.750 に上がった(表 4-3)。

表4-3 天然サクラマスのAssignment test結果

標本集団	神通川 2001	神通川 2002	三面川	魚野川	荒川	尻別川	標津川	暑寒別川	気仙沼沖	全体	
Lod0	再配置率	0.432	0.477	0.588	0.524	0.160	0.438	0.628	0.481	0.432	0.463
以上	再配置数	19	21	10	11	4	21	27	13	19	145
	誤認識	25	23	7	10	21	27	16	14	25	168
	合計	44	44	17	21	25	48	43	27	44	313
Lod 1	再配置率	0.750	0.667	1.000	0.714	0.333	0.625	0.938	0.889	0.500	0.750
以上	再配置数	3	6	4	5	1	5	15	8	4	51
	誤認識	1	3	0	2	2	3	1	1	4	17
	合計	4	9	4	7	3	8	16	9	8	68

LOD 値が、0 以上、1 以上どちらの場合も、個体の再配置率は低かったが、まったく分化がおきていない分集団間で同様のことを行った場合には、均等に 9 水域に割当てられるため理論的には 0.11 の再配置率になることを想定すれば、それぞれの水域に再配置される傾向が比較的高いと評価できる。再配置率が低い理由として、サンプル数およびマーカーの数が少ないこと、および、集団間の遺伝的分化が小さいことなどが考えられる。今後、マーカーの数とサンプル数を増やすことにより遺伝的分化状態と集団構造をより明確にできれば、個体レベルの集団判別ができる可能性がある。

## 第五章 コンピューターシミュレーションによるサクラマス集団の遺伝的多様性の喪失防止法の検討

### 第一節 遺伝子型発生シミュレーション法の検討

プログラム言語 Perl によって、遺伝子型発生シミュレーションを作成した。アルゴリズムは以下の通りとする。遺伝子座 *Oma01* が、雄親では *P1/P2*、雌親では *M1/M2* だった仮定すると、子供の遺伝子座 *Oma01* では、二つのアレルのうちの片側が、雄親のアレル *P1* と *P2* のいずれかが 1/2 の確率で選ばれる。もう片側のアレルは、雌親のアレル *M1* と *M2* のどちらかが 1/2 の確率で選ばれる。従って、子供の遺伝子座 *Oma01* は、*P1/M1*、*P1/M2*、*P2/M1*、*P2/M2* の 4 種類のいずれかの型になる。このようにして、1 遺伝子座のアレル型がきまり、この操作を、5 マーカー座全てで順次実行し、子供の遺伝子型を決定した。

シミュレートされた集団が、現実のサクラマスの遺伝様式を反映しているかどうかを、第二章で用いた 2 家系をモデルとして用い検討した。それぞれの交配区の親魚データから、上記のコンピューターシミュレーションによって 100 個体の子を作出し、それぞれの交配区のシミュレーションデータセットとした。こうして得られた仮想交配区と実在交配区の違いが調べるため、仮想交配区を trial1 から trial10 まで 10 集団作成し、実在交配区と併せた計 11 集団で *Fst* 分析を行い異質性を検定した。その結果、1 対の仮想集団間でわずかな異質性が観察された以外は、両集団間に異質性は観察されなかった。このことから、仮想集団は実在集団を反映していると考えられた。

次に、仮想同胞集団の *Psa* の分布を求め、実在同胞集団の *Psa* の頻度分布と併せて表示したところ、図 5-1-1 のように極めて類似したグラフを示した。

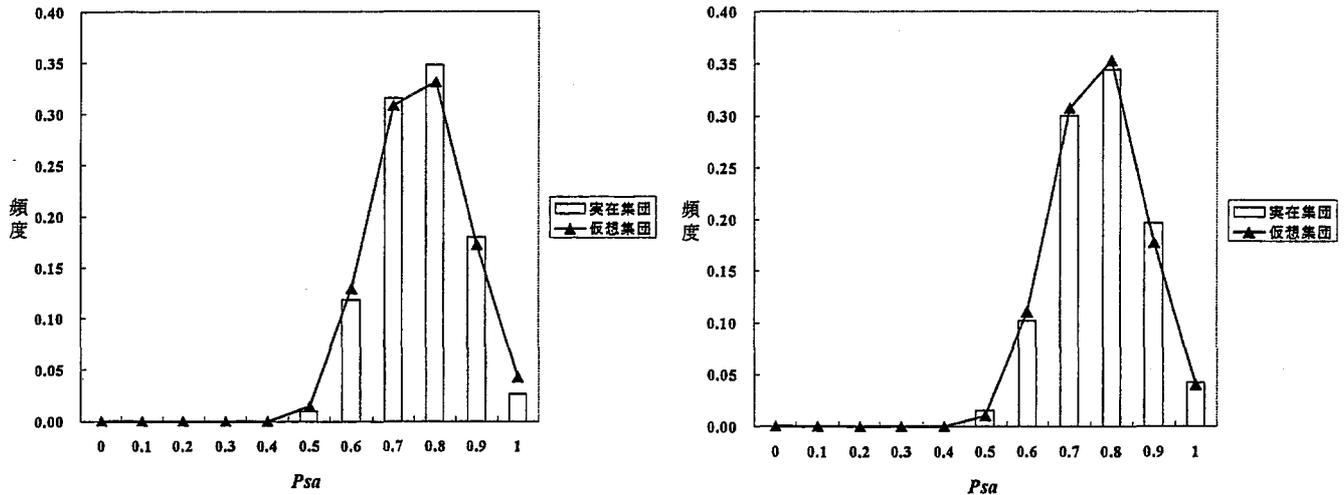


図 5-1-1 サクラマス同胞集団 2 集団とそれぞれの仮想集団における *Psa* の分布の比較

仮想半同胞集団の *Psa* の分布を求め、実在半同胞集団の *Psa* の頻度分布と併せて表示したところ、図 5-1-2 のように極めて類似したグラフを示した。

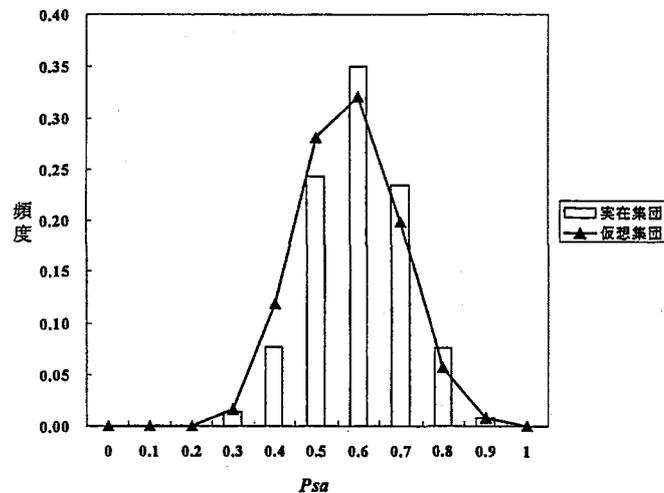


図 5-1-2 サクラマス人工交配区 2 集団と仮想集団における *Psa* の分布の比較

以上の 3 集団において、仮想集団の頻度分布と実在集団の頻度分布を  $X^2$  検定によって調べたところ、仮想集団-実在集団間に有意差は認められず、仮想集団の *Psa* の分布は現実集団の *Psa* の分布とよく一致していると考えられた。

親の遺伝子型のみが知られている 18 集団をシミュレートして仮想集団を作成し、Assignment Test を行ったところ、1 集団を除いた 17 集団では、95~100%と概ね高い識別率を示した(表 5-1-1)。1 集団においては、84%と他の集団に比べると比較的低い値にとどまったが、誤判別された個体のうちの 87.5%は、元の集団の半同胞集団に割り当てられた。このことから、親のデータの性質によって精度は変わるが、家系を概ね識別できると考えられた。

表5-1-1 ヤマメ人工交配区シミュレーションによるAssignment Testの結果

		家系																	
		MA1	MA2	MA3	MA4	MA5	MA6	MA7	MA8	MA9	MA10	MA11	MA12	MA13	MA14	MA15	MA16	MA17	MA18
判定 結果	MA1	95			4		4												2
	MA2		100										2						
	MA3			100															
	MA4				95					1					1				
	MA5					100								1					
	MA6						96				3								
	MA7							99											
	MA8								100										
	MA9									100									
	MA10										95	2							
	MA11											98							
	MA12	5											98						
	MA13										1			98					
	MA14				1										99				
	MA15							1								100			
	MA16													1				96	14
	MA17																	4	84
	MA18																		

## 第二節 遺伝的多様性の維持に関する研究

富山県神通川、新潟県荒川、北海道暑寒別川、岩手県安家川(以上 2001 年)の遺伝子型データから無作為に 100 個体を非復元抽出し、これをコンピューターシミュレーションの創始者集団とした。世代交代は、図 5-2-1 に示すモデルに基づいて設計し、プログラム言語 Perl によって実装した。交配は、父親集団、母親集団からランダムに 1 個体ずつ親魚を復元抽出して子供を 1 個体作成する。これを、子供が 500 個体になるまで繰り返した。

**親魚の選択方法** 各世代の親魚は、以下の 3 種類の選択方法で選ばれた。

- 1) オス集団、メス集団から、任意に 1 個体ずつ非復元抽出し、任意の親魚数になるまで父親集団、母親集団に加えていく。(以下、ランダム抽出と表記)
- 2) オス集団に属する全ての個体と、メス集団に属する全ての個体間の  $P_{sa}$  を算出し、 $P_{sa}$  が最小のペアを非復元抽出し、任意の親魚数になるまで父親集団、母親集団に加えていく。(以下、MK-Pair 抽出と表記)
- 3) オス集団に属するある 1 個体と、メス集団に属する全ての個体との間の  $P_{sa}$  の平均値を算出する。 $P_{sa}$  の平均値は、そのオスとメス集団との間の距離と考え、 $P_{sa}$  の平均値が小さい個体から順に、任意の親魚数になるまで父親集団に加えていく。メスに関しても、同様の方法で任意の親魚数になるまで母親集団に加えていく。(以下、MK-Ave.抽出と表記)

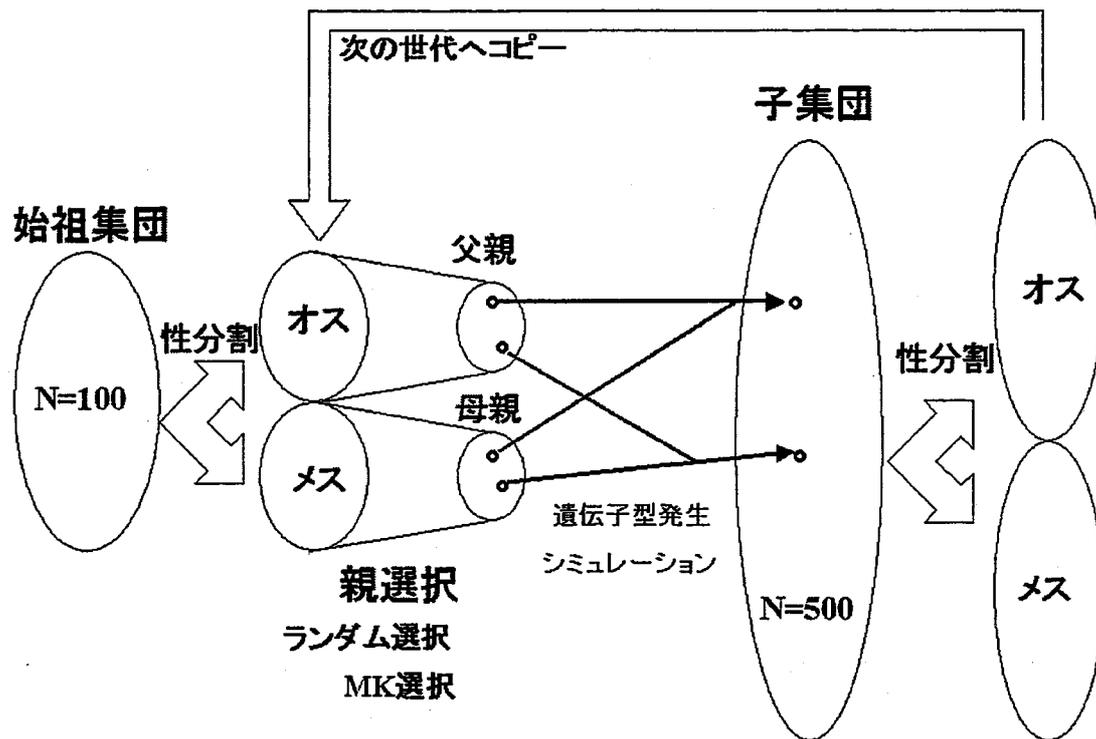


図 5-2-1 世代交代シミュレーションの流れ

**多様性の評価** 各世代における子供の数は 500 個体作出し、30 世代継代した。各世代において、子集団のアリル数( $NA$ )、ヘテロ接合度の期待値( $He$ )を求めた。親魚の数による多様性の変化を調べるために、親魚数を 20 個体(オス、メス、10 個体ずつ、以下の親魚数は、オス、メス同数ずつの和とする)、30 個体、40 個体、50 個体、60 個体、70 個体、80 個体、90 個体、100 個体、200 個体において、ランダム抽出、MK-Pair 抽出、MK-Ave.抽出の親魚選択法によってシミュレーションを行ったところ、アリル数は表 5-2-1、ヘテロ接合度の期待値は、表 5-2-2 の結果を示した。親魚数が 50 個体の時は、ランダム抽出の際はアリル数( $NA$ )が 99 個から 26.8 個、ヘテロ接合度の期待値( $He$ )は 0.89 から 0.71 に減少した。これに対し、MK-Ave.抽出では、アリル数( $NA$ )は 99 個から 47.4 個への減少にとどまり、ヘテロ接合度の期待値( $He$ )は 0.89 を維持した。MK-Pair 抽出では、アリル数( $NA$ )は 99 個から 43.6 個への減少にとどまり、ヘテロ接合度の期待値( $He$ )は 0.89 から 0.88 と殆ど変わらず、多様性維持に関して効果を示した。MK-Ave.抽出と MK-Pair 抽出の効果を検討するために、それぞれのアリル数( $NA$ )およびヘテロ接合度の期待値( $He$ )とランダム抽出における値との比をとったところ、図 5-2-2 の結果を示した。MK-Ave.抽出では、親魚数が多いときは最も高い効果を示したが、親魚数が 70~40 の時点で効果が落ち、親魚数が 30 ではランダム抽出と同程度の効果になり、20 ではランダム抽出の半分の効果にまで落ち込んだ。親魚数が少なくなるにつれ効果が上がり、常にランダム交配より高い効果を示した。また、親魚数が少なくなるにつれ効果が上がったが、親魚数が 20 においては、若干効果が低下した。アリル数( $NA$ )は、親魚数が少なくなるにつれ効果が上がり続けた。

表5-2-1 選択方法と親魚数の違いによる1, 5, 15, 30世代目におけるアリル数の変化

Ne	Genelation 1			Genelation 5			Genelation 15			Genelation 30		
	Ave.	Pair	Rand.	Ave.	Pair	Rand.	Ave.	Pair	Rand.	Ave.	Pair	Rand.
20	71.4	63.9	60.8	32.3	43.8	36.5	14.0	27.9	20.0	6.1	16.5	12.5
30	80.5	73.7	70.5	49.8	53.4	44.8	28.3	39.7	26.1	16.0	30.1	16.3
40	86.5	80.8	78.7	62.9	59.2	51.3	43.7	45.9	31.1	33.3	38.5	20.8
50	89.7	86.0	83.4	71.8	64.1	56.1	57.1	50.9	35.8	47.4	43.6	24.0
60	92.4	90.0	86.7	77.5	68.5	60.0	66.4	55.3	38.4	59.2	48.1	26.8
70	94.0	92.8	90.9	81.5	71.3	64.1	74.5	57.8	41.9	68.6	50.7	29.2
80	95.9	94.6	94.0	84.3	73.7	67.4	78.7	61.5	45.0	73.9	54.1	31.6
90	97.3	96.7	96.4	85.8	77.8	70.4	81.7	64.5	47.7	78.5	56.9	33.8
100	98.5	97.5	98.0	87.7	78.7	72.5	84.8	65.6	50.3	82.3	58.3	36.1
200	98.9	97.5	98.8	93.9	88.3	84.5	92.6	77.9	64.7	92.5	71.8	50.0

表5-2-2 選択方法と親魚数の違いによる1, 5, 15, 30世代目におけるヘテロ接合度の期待値の変化

Ne	Genelation 1			Genelation 5			Genelation 15			Genelation 30		
	Ave.	Pair	Rand.	Ave.	Pair	Rand.	Ave.	Pair	Rand.	Ave.	Pair	Rand.
20	0.90	0.89	0.87	0.80	0.87	0.80	0.56	0.78	0.67	0.24	0.67	0.51
30	0.91	0.89	0.88	0.87	0.89	0.83	0.78	0.87	0.74	0.62	0.80	0.60
40	0.90	0.89	0.88	0.90	0.90	0.85	0.86	0.89	0.77	0.83	0.87	0.67
50	0.90	0.89	0.88	0.91	0.90	0.85	0.90	0.90	0.79	0.89	0.88	0.71
60	0.90	0.89	0.88	0.92	0.91	0.86	0.91	0.90	0.81	0.91	0.90	0.73
70	0.90	0.89	0.88	0.93	0.91	0.86	0.93	0.91	0.82	0.92	0.90	0.75
80	0.89	0.89	0.88	0.93	0.91	0.86	0.93	0.91	0.82	0.93	0.90	0.76
90	0.89	0.89	0.88	0.93	0.91	0.87	0.93	0.92	0.83	0.93	0.91	0.78
100	0.89	0.89	0.88	0.93	0.91	0.87	0.94	0.92	0.84	0.93	0.91	0.79
200	0.88	0.89	0.88	0.94	0.91	0.88	0.94	0.93	0.86	0.94	0.93	0.83

親魚数が少ない際に、MK-Ave.抽出では効果が落ち、MK-Pair 抽出では効果が安定していることについては、以下のように解釈した。今回実験に用いた標本は、異質性が検定された4集団のサンプルを混合している。仮に、2つの分集団が存在し、2つの分集団間でサンプルサイズに差があったと仮定する。その際には、MK-Ave.抽出では、小集団の個体は、大集団に属する個体との個体間距離が不当に高く加算されるため平均値が高くなる。そのため、親魚数が極端に小さくなったときは、小集団に属する個体のみが選ばれるので、むしろ多様性が低下するものと思われる。一方、MK-Pair 抽出では、個体間距離が遠いペアが確実に選ばれるので、親魚数が少ない場合においても安定した成果を残せるだろう。

以上から、本節において、Minimal Kinship 選択は、多様性維持に効果があることが示された。しかし、対象集団の特性や、親魚の数によっては逆効果を引き起こす危険性も明らかになった。今後、Minimal Kinship 選択を実施する際には、継代シミュレーションを行いリスクをはかることが必要であろう。

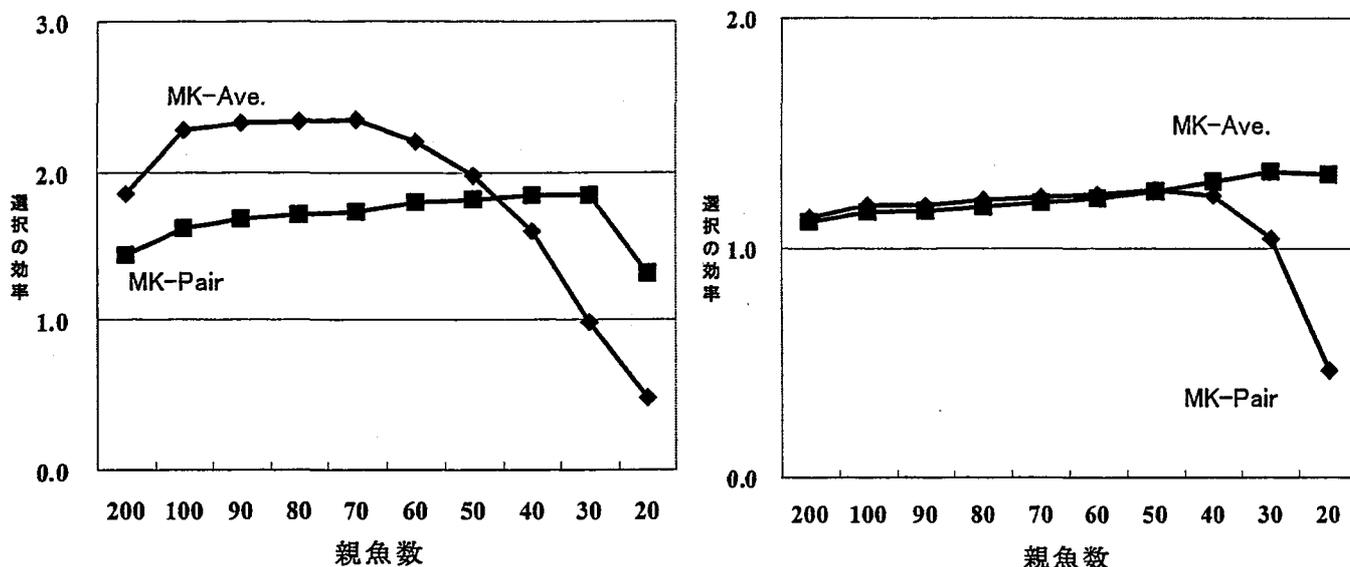


図 5-2-2 MK 選択の 2 方法 (Ave. と Pair) の多様性維持に関する効率 (ランダム抽出時の  $H_e$  (左側) および  $NA$  (右側) の値との比)

## 第六章 サクラマス種苗放流における遺伝的管理方法の提案

現在、サクラマスの種苗生産は、それぞれの雌から搾出された卵に、数尾の雄の混合精子を媒精するケースが多い。この方法は簡便であるが、人工種苗集団における有効な親魚数が、少なくなりやすく、遺伝的多様性が低下する危険性がある。種苗生産は、産卵孵化、育成の 2 つの過程からなる。上記の方法では、産卵孵化の簡便化は可能であるが、多様性の低い種苗を育成していることになり、総合的に考えると遺伝資源の保全の観点から無視できない重要な問題があると考えられる。この問題を解決する一つの方法が Minimal Kinship 法である。Minimal Kinship 法では、産卵、孵化の段階で遺伝的多様性を維持するため非血縁親魚を選別するコストがかかるが、無作為に作られた種苗に比べて少数の種苗でも高い多様性を維持できるだろう。このことにより、育成のコストが軽減でき、遺伝資源を保持することができるものと考えられる。現状では、遺伝解析によって親魚を選び出すには高いコストが必要であるが、持続的に栽培漁業を存続させていくための未来への投資と考えれば、その価値は大きい。

そこで、漁業団体、種苗生産団体、試験研究機関の三者が連携して、サクラマス資源を維持するための種苗管理方式を考案した。その方式を図 6 に示した。これは、まず、漁業団体および種苗生産団体は、サクラマスの一部組織を、試験研究機関を提供する。試験研究機関では、漁業団体から提供を受けた組織を用いて DNA マーカー解析を行い、遺伝的多様性の評価や、昨年度放流した個体のモニタリングなど、産地推定などを行い、サクラマス情報を集約化する。種苗生産団体から提供を受けた

親魚候補の遺伝的データからは、Minimal Kinship 法によって親魚データを選定し、シミュレーションを行うことによってリスクを評価した後、種苗生産団体へ親魚として最適と判断された個体の情報を提供する。種苗生産団体は、種苗生産および放流を行い、サクラマス資源の増大に寄与する。

## 漁獲、生産業務

## 試験研究業務

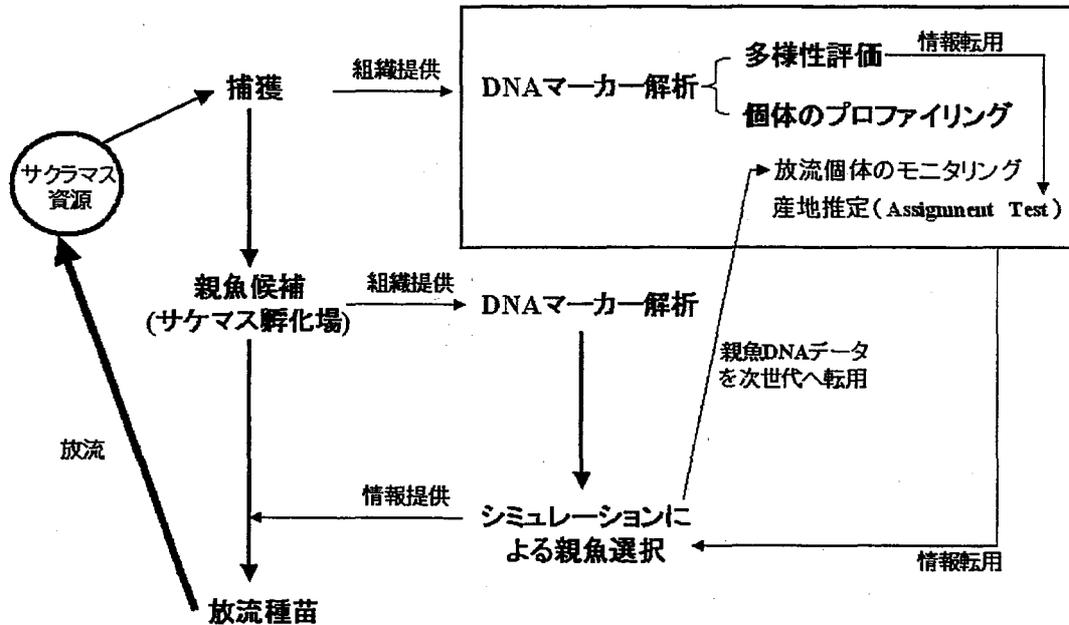


図 6 サクラマス種苗放流における遺伝的管理方法

以上の連携関係を以下にまとめる。漁業団体は試験研究機関へ組織を提供し、試験研究機関は、種苗生産団体との連携によってサクラマス資源の増大に寄与し漁業団体の利益を増大させる。種苗生産団体は、試験研究団体へ組織を提供し、試験研究機関は種苗生産団体へ情報を還元する。この方式は、各組織間が互いに協力することによる、漁業資源の継続的な利用に有効であると考えられる。

## 論文審査結果要旨

サケ科サケ属の一種サクラマス (*Oncorhynchus masou masou*) は、日本の食文化の一端を担う重要魚種の一つであるが、乱獲や河川環境の悪化により資源量が著しく低下し、富山県では希少種に指定されている。本研究は、本種の絶滅リスクを査定・評価し、集団の遺伝的管理手法の開発を目指したものである。

最初に、集団遺伝学的分析に必要な高感度マーカーであるマイクロサテライト DNA マーカーの開発を試み、多数のプライマーセットを作製し、多型性を備える5つのプライマーセットの開発に成功し、それらのマーカー座の特性評価を行っている。次に、日本における天然サクラマスの遺伝的集団構造の分析を試み、漁獲年級群間に異質性はないが、河川間では異質性が存在することを解明している。さらに、種苗放流のリスクを管理するためには、在来集団における放流個体の識別と追跡調査手法の開発を目的として、遺伝マーカーを利用した Assignment Test を実施し、個体の産地判定を試みている。集団構造がアユのように明確な場合には、個体判別にに基づき、異なる集団の混合状況を推定することが可能であったが、サクラマスのように、集団構造が不明瞭な魚種では、分集団の判別率はやや低くなることを明らかにした。今後、マーカー数を増やすなどして集団間の分化程度をより明確に捉えることを試みる必要が有る。また、遺伝的分化の状態によっては、個体判別が困難な場合が想定され、履歴マーカーの併用も視野に入れる必要性が示唆された。

多様性の低下を防止手法としては、遠縁の個体を選び交配を行う、Minimal Kinship 法 (MK 法) が有効と考え、継代シミュレーションを30世代にわたって行い、遺伝的多様性レベル維持に関する効果を評価・検討し、本シミュレーション法が遺伝的多様性レベル維持のための情報を得る上で効果的であることを明らかにした。しかし、対象集団の特性や、親魚の数によっては逆効果を引き起こす危険性も示唆され、今後、種苗生産の現場において Minimal Kinship 選択交配を実施する際には、継代シミュレーションに基づくリスク予測を実施し、リスク防止条件を解明した後に、種苗生産とその放流を実施すべきとする管理マニュアルを提案した。

以上のように、本研究は現存のサクラマス集団の多様性を DNA マーカーによって評価し、これらのデータを用いたシミュレーションにより、野生集団の遺伝的保全に配慮したサクラマス放流事業のあり方について価値ある提言を行っている。よって、審査委員一同は本論文の著者を博士 (農学) の学位を授与するに値するものと判定した。