

氏 名 (本籍) き 木 じ ま 島 あ き 明 ひ ろ 博

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 博 第 2 7 1 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 5 6 年 3 月 2 5 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 農 学 研 究 科  
( 博 士 課 程 ) 水 産 学 専 攻

学 位 論 文 題 目 シ ロ サ ケ の 集 団 構 造 に 関 す る 遺 伝 学 的  
解 析

論 文 審 査 委 員 ( 主 査 )

助 教 授 藤 尾 芳 久 教 授 秦 満 夫

教 授 川 崎 健

## 論文内容要旨

シロサケは北日本の多くの河川に産卵のために溯上することが知られている。本種は母川回帰の性質が強いとされており、この性質を利用して古くから人工フ化放流が行なわれている。現在では他の河川からの移殖放流も盛んに行なわれるようになり、生産が向上してきた。しかし、人工フ化放流や移殖放流の効果についての育種学的調査、研究はなされておらず、質的改良についての育種的方法も確立されていない。

シロサケは生涯のうち一時期を人為管理下におかれている半野性集団であると考えられることから、育種的方法として集団を対象とした育種管理が考えられる。そのために集団遺伝学的手法を用いた集団構造の解析が必要となる。

近年、電気泳動法が進歩して容易に酵素多型が検出できるようになり、アイソザイム遺伝子を標識として集団の遺伝的組成の解析ができるようになった。しかし、シロサケではアイソザイム遺伝子の分析や、それを標識とした集団の遺伝的組成の解析は二、三なされているにすぎない。

本研究はアイソザイム遺伝子を標識として、集団遺伝学的手法によりシロサケの集団構造を解析し、河川集団の維持について考察を行なった。第1章ではアイソザイムの検出を行ない、第2章でアイソザイム遺伝子の重複と遺伝支配を明らかにした。第3章では河川集団の遺伝的組成を調べ、第4章では河川集団間の地理的距離と遺伝的距離の関係を明らかにした。第5章では移殖の遺伝的組成におよぼす効果について検討し、第6章では遺伝的変異の保有量と集団の有効な大きさの関係から河川集団の維持について考察を行なった。

### 第1章 アイソザイムの組織特異的分布

河川に産卵溯上したシロサケの筋肉、肝臓、心臓、腎臓、眼などの組織を用いて lactate dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH),  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase ( $\alpha$ -GPD), isocitrate dehydrogenase (IDH), sorbitol dehydrogenase (SDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD), malic enzyme (ME), phosphoglucomutase (PGM), aspartate aminotransferase (AAT), superoxide dismutase (SOD), alcohol dehydrogenase (ADH), glutamate dehydrogenase (GDH), xanthine dehydrogenase (XDH), alkaline phosphatase (ALP), glucosephosphate isomerase (GPI), esterase (ES), catalase (CAT), acid phosphatase (ACP) の18酵素についてデンブソゲル電気泳動を行ない、アイソザイムを検出した。その結果、表1に示したようにLDH, MDH,  $\alpha$ -GPD, IDH, SDH, 6-PGD, ME, PGM, AAT, SOD の10酵素で20アイソザイムの検出ができた。これらは眼特異的なLDH-Eアイソザイムを除いてすべて筋肉と肝臓で検出できた。

## 第2章 アイソザイム遺伝子の重複と遺伝様式

検出できた20アイソザイムを支配する遺伝子の重複の有無を調べ、その遺伝様式について検討した結果、20アイソザイムのうちLDH-A, LDH-B, LDH-E,  $\alpha$ -GPD-A,  $\alpha$ -GPD-B, s-IDH, SDH-A, ME-A, ME-B, PGM-A, s-AAT, m-AAT, SOD-Aの13アイソザイムでは固定した複数のバンドがみられたことから遺伝子が重複していることが示された。s-MDH-B, m-IDH, PGM-Bの3アイソザイムでは遺伝的変異の存在とその表現型におけるバンドの活性比から、遺伝子が重複していることが示された。これらのアイソザイムの遺伝様式はすべて2染色体性遺伝であった。s-MDH-A, m-MDH, PGM-C, 6-PGDの4アイソザイムでは重複の証拠は得られなかった。従って、20アイソザイムのうち16アイソザイムで遺伝子の重複がみられたことから、シロサケの遺伝子の重複率は80.0%と推定された。このことは、シロサケが染色体倍化によって4倍体となった種から2倍体化した種と考えられる。

一方、LDH-Eアイソザイムを除く19アイソザイムを支配する34遺伝子座のうち、*Ldh-A1*, *Mdh-B2*, *Idh-A2*<sup>*Idh-B2*</sup>, *Pgm-B2*, *Aat-A1*の6遺伝子座において遺伝的変異がみられ、多型遺伝子座の割合は17.6%と推定された(表1)。これらの6遺伝子は集団構造の遺伝学的解析のための標識遺伝子として使えることがわかった。

## 第3章 アイソザイム遺伝子頻度による河川集団の遺伝的特徴

遺伝的変異がみられた6アイソザイム遺伝子を標識として、北海道、本州太平洋側、および本州日本海側の3地域における37河川を対象に、河川集団の遺伝的組成を調べた。その結果、同一河川では雌雄、溯上時期、溯上年度の違いによる差異はみられなかった。遺伝子頻度で表わされる各河川の遺伝的組成は表2に示したように、一般に地理的に近い河川間では類似した傾向を示した。各河川間で遺伝子頻度の差の検定を行なったところ、多くの河川間で少なくとも1遺伝子座以上に差異がみられたことから、シロサケは母川回帰によって河川毎に繁殖集団を形成していることが示された。北海道、本州太平洋側、本州日本海側の3地域に分けて比較してみると、表3に示したように地域毎で遺伝子頻度の特徴がみられ、遺伝的距離をもとにして作成した枝分かれ図から3つの系統が存在していると想像される(図1)。

## 第4章 河川集団の分化と地理的勾配

河川集団間の地理的距離と遺伝的距離の関係を調べたところ、表4に示したように日本全体、およ

び根室海区の別当賀川を起点としてオホーツク海側，北海道日本海側，津軽海峡を西から東へ通って本州太平洋側に至る範囲（Ⅳ）では地理的距離と遺伝的距離に相関はみられなかったが，根室海区の別当賀川を起点としてオホーツク海側，北海道日本海側，本州日本海側に至る範囲（Ⅱ），根室海区のラウス川を起点として北海道太平洋側，本州太平洋側に至る範囲（Ⅲ），および根室海区のラウス川を起点として北海道太平洋側，津軽海峡を東から西へ通って本州日本海側へ至る範囲（Ⅴ）において高い正の相関がみられた。この3つの範囲はシロサケの産卵回遊経路に沿っていることから，シロサケの迷い込みによる混り込みが産卵回遊経路に沿って起ると考えられた。また，地理的距離に対する遺伝的距離の平均をプロットした図2から，混り込みの起る距離は約600km以内と推定された。

## 第5章 河川集団の遺伝的組成におよぼす移殖の影響

移殖したシロサケが帰ってくる移殖の1次効果を新規開発河川で調べた結果，回帰率は受給河川の違い，および供給河川の違いによって異なっていた。移殖した集団の遺伝的組成は供給河川集団のそれとよく類似するが，若干の変化がみられた。移殖する場合，供給河川を選ぶ必要があると考えられる。

一方，帰ってきたものが在来河川集団と共に再生産に加わって質的に影響をおよぼす移殖の2次効果について，北海道13河川集団における十勝川集団からの過去12年間の平均移入率と十勝川集団との遺伝的距離の関係を調べたところ，一般に平均移入率が高い河川では十勝川との遺伝的距離は小さく，平均移入率が低い河川では遺伝的距離は大きかった（表5）。平均移入率と遺伝的距離との間に負の相関がみられた（図3）。多く移入をすればするほど遺伝的組成が供給河川と類似してくることが定量的に示された。平均移入率と遺伝的距離の関係を調べれば移殖の2次効果の判定ができることを示唆している。

## 第6章 ヘテロザイゴシティーと集団の有効な大きさ

集団における遺伝的変異の保有量は平均ヘテロザイゴシティー（ $\bar{H}_e$ ）で示される。アイソザイム遺伝子が中立であるならばアイソザイム遺伝子を標識として求めた平均ヘテロザイゴシティーは集団の有効な大きさ（次代に子を残しうる有効な親の数； $N_e$ ）によって規定される。そこで平均ヘテロザイゴシティーと集団の有効な大きさの推定を行ない，両者の関係を調べた結果，表6に示したように一般に平均ヘテロザイゴシティーの高い河川集団は集団の有効な大きさも大きく，両者の関係は突然変異率を $10^{-5}$ としたときのKimura and Crow（1964）による理論式とよく一致した。しかし，集団の有効な大きさに対して平均ヘテロザイゴシティーが高いためにははずれた河川と，低いためには

ずれた河川がみられた。これは多くの移入をしても集団の有効な大きさが大きくならない河川と、移出を多量にしたために集団の有効な大きさを小さくしている河川であると考えられる(表7)。

多くの溯上が期待できる河川は平均ヘテロザイゴシティーと集団の有効な大きさが共に大きい河川と考えられ、人工フ化放流や移殖の効果はこれらの関係を調べることによって判定できる可能性が示された。

表1 アイソザイムの組織特異的分布、遺伝子支配および遺伝的変異

酵素	アイソザイム	アイソザイムの活性					遺伝子座
		筋肉	肝臓	心臓	シン臓	眼	
LDH	LDH-A	+++	-	-	-	-	<i>Ldh-A1*</i> , <i>Ldh-A2</i>
	LDH-B	+	++	+++	++	++	<i>Ldh-B1</i> , <i>Ldh-B2</i>
	LDH-E	-	-	-	-	+++	<i>Ldh-E1</i> , <i>Ldh-E2</i>
MDH	s-MDH-A	+	+++	+++	++	++	<i>Mdh-A</i>
	s-MDH-B	+++	+	++	++	+	<i>Mdh-B1</i> , <i>Mdh-B2*</i>
	m-MDH	+++	+++	+++	++	++	<i>m-Mdh</i>
α-GPD	α-GPD-A	+++	+	+	+	-	<i>α-Gpd-A1</i> , <i>α-Gpd-A2</i>
	α-GPD-B	+	+++	++	+	±	<i>α-Gpd-B1</i> , <i>α-Gpd-B2</i>
IDH	s-IDH	-	+++	+	++	-	<i>Idh-A1</i> , <i>Idh-A2*</i>
	m-IDH	+++	-	+++	++	±	<i>Idh-B1</i> , <i>Idh-B2*</i>
SDH	SDH-A	-	+++	-	++	-	<i>Sdh-A1</i> , <i>Sdh-A2</i>
6-PGD	6-PGD	++	+++	++	-	-	<i>6-Pgd</i>
ME	ME-A	++	+++	++	++	+	<i>Me-A1</i> , <i>Me-A2</i>
	ME-B	+++	+	+++	+	±	<i>Me-B1</i> , <i>Me-B2</i>
PGM	PGM-A	+++	-	+	-	-	<i>Pgm-A1</i> , <i>Pgm-A2</i>
	PGM-B	++	+	+++	+	-	<i>Pgm-B1</i> , <i>Pgm-B2*</i>
	PGM-C	-	+++	-	++	-	<i>Pgm-C</i>
AAT	s-AAT	-	+++	+	+	+	<i>Aat-B1</i> , <i>Aat-B2</i>
	m-AAT	+++	-	+++	-	+	<i>Aat-A1*</i> , <i>Aat-A2</i>
SOD	SOD-A	++	+++	+++	+	+	<i>Sod-A1</i> , <i>Sod-A2</i>

+ : 活性の強さを示す (+++ > ++ > +)

- : 活性がみられなかったことを示す

± : わずかな活性を示す

\* : 多型遺伝子座

表2 河川における *Idh-B2* 遺伝子座の遺伝子頻度

地域	河川	遡上 年度	個体数	遺伝子頻度	
				<i>Idh-B2</i> <sup>A</sup>	<i>Idh-B2</i> <sup>B</sup>
北海道	別当賀川	1978	62	0.726±0.040*	0.274±0.040
	西別川	1978	62	0.798±0.036	0.202±0.036
	標津川	1978	62	0.774±0.038	0.226±0.038
	ラウス川	1978	47	0.862±0.036	0.138±0.036
	斜里川	1978	62	0.806±0.036	0.194±0.036
	幌内川	1978	49	0.776±0.042	0.224±0.042
	徳志別川	1978	76	0.789±0.033	0.211±0.033
	天塩川	1978	54	0.898±0.029	0.102±0.029
	千歳川	1978	78	0.968±0.014	0.032±0.014
	利別川	1978	30	0.917±0.036	0.083±0.036
	厚沢部川	1978	63	0.929±0.023	0.071±0.023
	別寒辺牛川	1978	59	0.873±0.031	0.127±0.031
	釧路川	1978	63	0.794±0.036	0.206±0.036
	十勝川	1978	63	0.905±0.026	0.095±0.026
静内川	1978	51	0.873±0.033	0.127±0.033	
遊楽部川	1978	46	0.880±0.034	0.120±0.034	
本州 太平洋側	奥入瀬川	1977	50	0.970±0.017	0.030±0.017
	馬淵川	1977	25	0.947±0.026	0.053±0.026
	新井田川	1977	38	0.980±0.020	0.020±0.020
	閉伊川	1977	22	0.955±0.031	0.045±0.031
	津軽石川	1977	60	0.983±0.012	0.017±0.012
	織笠川	1977	100	0.995±0.005	0.005±0.005
	大村追川	1977	81	0.981±0.011	0.019±0.011
	片岸川	1977	91	0.995±0.005	0.005±0.005
	盛川	1977	33	0.924±0.033	0.076±0.033
	大川	1977	54	1.000	0
	請戸川	1977	100	0.970±0.012	0.030±0.012
木戸川	1977	20	0.950±0.034	0.050±0.034	
鬼怒川	1977	19	0.921±0.044	0.079±0.044	
本州 日本海側	牛渡川	1977	50	0.900±0.030	0.100±0.030
	滝淵川	1977	50	0.880±0.032	0.120±0.032
	高瀬川	1978	20	0.925±0.042	0.075±0.042
	月光川	1978	20	0.975±0.025	0.025±0.025
	三面川	1978	42	0.976±0.017	0.024±0.017
	黒部川	1977	23	1.000	0
	神通川	1977	30	0.967±0.023	0.033±0.023
	庄川	1977	89	0.955±0.016	0.045±0.016

\* 標準誤差

表3 地域による平均遺伝子頻度

遺伝子座	対立遺伝子	北海道	本州太平洋側	本州日本海側
<i>Idh-A2</i>	<i>Idh-A2<sup>A</sup></i>	0.535	0.612	0.518
	<i>Idh-A2<sup>B</sup></i>	0.390	0.364	0.422
	<i>Idh-A2<sup>C</sup></i>	0.017	0.012	0.045
	<i>Idh-A2<sup>D</sup></i>	0.056	0.004	0.013
	<i>Idh-A2<sup>E</sup></i>	0.002	0.008	0.002
<i>Idh-B2</i>	<i>Idh-B2<sup>A</sup></i>	0.848	0.967	0.947
	<i>Idh-B2<sup>B</sup></i>	0.152	0.033	0.053
<i>Ldh-A1</i>	<i>Ldh-A1<sup>A</sup></i>	0.833	0.851	0.827
	<i>Ldh-A1<sup>B</sup></i>	0.167	0.149	0.173
<i>Mdh-B1</i>	<i>Mdh-B1<sup>A</sup></i>	0.972	0.972	0.984
	<i>Mdh-B1<sup>B</sup></i>	0.028	0.026	0.015
	<i>Mdh-B1<sup>C</sup></i>	0.000	0.002	0.001
<i>Pgm-B2</i>	<i>Pgm-B2<sup>A</sup></i>	0.446	0.372	0.387
	<i>Pgm-B2<sup>B</sup></i>	0.554	0.628	0.613
<i>Aat-A1</i>	<i>Aat-A1<sup>A</sup></i>	0.926	0.957	0.954
	<i>Aat-A1<sup>B</sup></i>	0.012	0.011	0.030
	<i>Aat-A1<sup>C</sup></i>	0.062	0.032	0.016

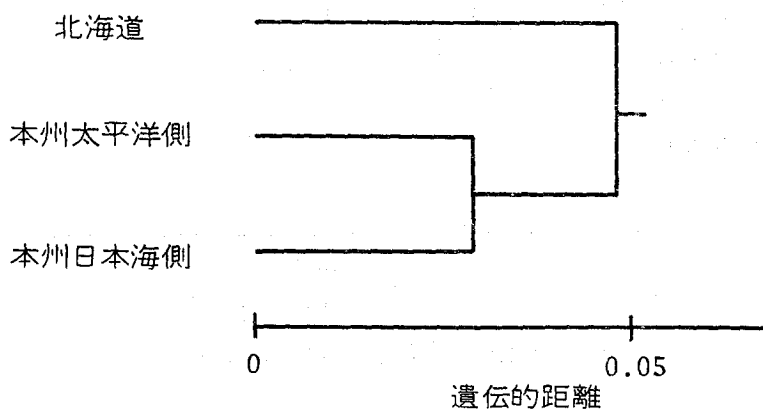


図1 3地域間における枝分かれ図

表4 河川集団間の地理的距離 (Km) と遺伝的距離の間の相関係数 (r)

範囲	最大距離	組合せ数	相関係数	有意水準
	Km	N	r	P
I 日本全体	3251	561	0.0575	> 0.100
II 別当賀川—ラウス川—厚沢部川 —月光川水系—庄川	1758	120	0.4635	< 0.010
III ラウス川—別当賀川—遊楽部川 —奥入瀬川—鬼怒川	1599	231	0.4368	< 0.010
IV 別当賀川—ラウス川—厚沢部川 —奥入瀬川—鬼怒川	1996	276	0.0456	> 0.400
V ラウス川—別当賀川—遊楽部川 —月光川水系—庄川	1485	91	0.4255	< 0.010

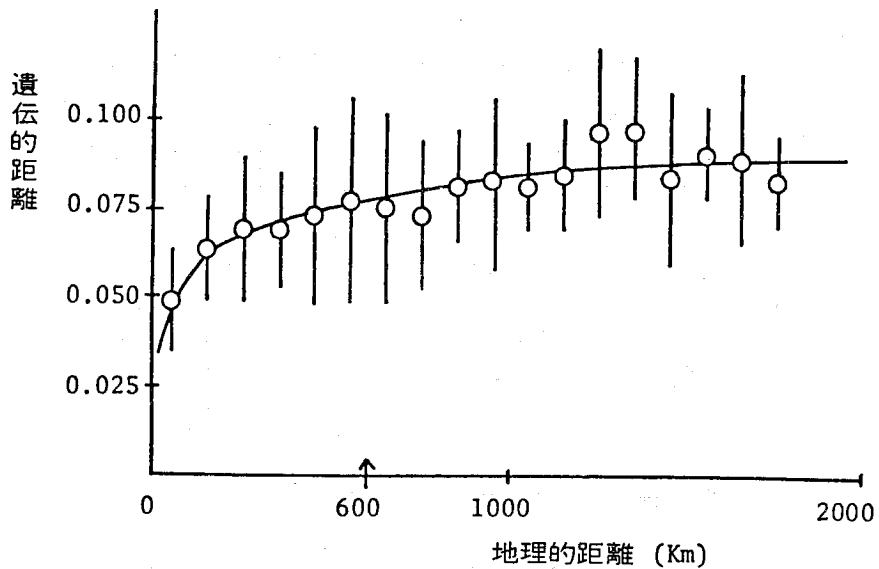


図2 地理的距離と平均遺伝的距離の関係



表5 北海道13河川における十勝川産卵の  
平均移入率と十勝川集団との遺伝的距離

河川	十勝川産卵 平均移入率 %	遺伝的距離
静内川	28.2	0.054
天塩川	25.5	0.053
遊楽部川	25.1	0.056
千歳川	23.5	0.078
徳志別川	21.3	0.047
厚沢部川	15.5	0.061
利別川	11.6	0.036
斜里川	6.8	0.076
西別川	4.6	0.088
幌内川	2.4	0.096
ラウス川	1.5	0.069
標津川	0.4	0.065
別当賀川	0	0.104

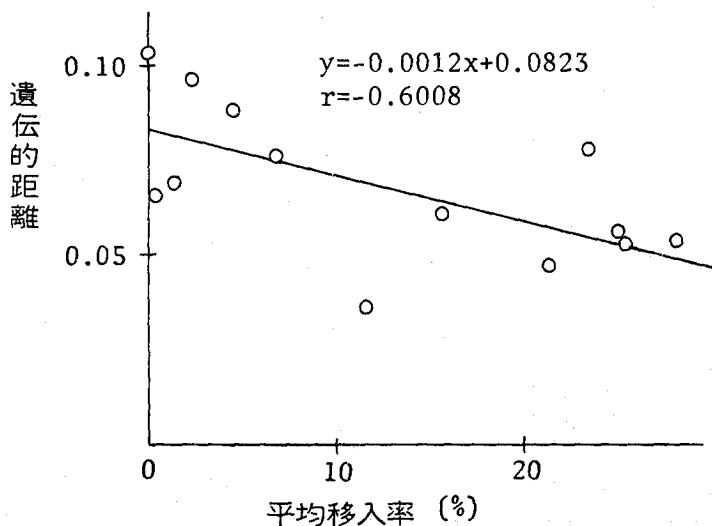


図3 北海道13河川における十勝川産卵の平均移入率と  
十勝川集団との遺伝的距離の関係

表6 集団の有効な大きさと平均ヘテロサイゴシティー

地 域	河 川	個体数	ヘテロ の数	$\bar{H}_e$	$\bar{N}_e$
北海道	別当賀川	62	114	0.115	1639
	西別川	62	114	0.115	19756
	標津川	62	114	0.115	26977
	ラウス川	47	79	0.105	5446
	斜里川	63	120	0.119	22470
	幌内川	49	94	0.120	1315
	徳志別川	76	138	0.114	1302
	天塩川	54	83	0.096	685
	千歳川	78	127	0.102	3591
	利別川	30	49	0.102	1267
	厚沢部川	63	114	0.113	1786
	別寒辺牛川	59	90	0.095	3078
	釧路川	63	117	0.116	34340
	十勝川	63	93	0.093	38601
	静内川	51	87	0.107	1143
	遊楽部川	46	78	0.106	1677
本州 太平洋側	奥入瀬川	30	38	0.079	4214
	馬淵川	30	43	0.090	503
	新井田川	25	24	0.060	486
	閉伊川	22	35	0.099	420
	津軽石川	64	96	0.094	30172
	織笠川	30	36	0.075	2484
	大村追川	30	38	0.079	5359
	片岸川	31	49	0.099	4120
	盛 川	29	41	0.088	1291
	大 川	30	33	0.069	2893
	請戸川	72	101	0.088	1717
	木戸川	20	30	0.094	249
鬼怒川	19	34	0.112	120	
本州 日本海側	牛渡川	30	52	0.108	10693
	滝淵川	50	73	0.091	9504
	高瀬川	20	31	0.097	2393
	月光川	20	22	0.069	2607
	三面川	42	70	0.104	1061
	黒部川	22	38	0.108	193
	神通川	30	43	0.090	587
	庄 川	30	50	0.104	848

$\bar{H}_e$  : 平均ヘテロサイゴシティー

$\bar{N}_e$  : 集団の有効な大きさ

表7 シロサケ集団における移出入の影響

移出	移出入の割合	遡上数	He と Ne の関係	例	備考
小	小	中	He = Ne	千歳川 奥入瀬川 請戸川	量的に多くの移出入がなく 集団の有効な大きさと平均 へテロサイゴシテイの關係 は理論値と近似。 移出入の影響 小。
小	大	中	He = Ne	遊樂部川 静内川 庄川	量的に多くの移入がなされ 集団の有効な大きさと平均 へテロサイゴシテイの關係 は理論値に近似。 移入が成功している。
無	大	少	He > Ne	天塩川 鬼怒川 黒部川	量的に多くの移入がなされ ているが、集団の有効な大 きさが理論値よりも低くな っている。 移入の割合に対して効果が 小さい。
大	小	多	He < Ne	十勝川 斜里川 津軽石川	量的に多くの移出が卵(稚 魚)のランダム抽出によっ てなされておらず、集団の 有効な大きさを小さくして いる。 移出の影響 大

## 審 査 結 果 の 要 旨

シロサケは母川回帰の性質が強く、溯上河川で人工孵化放流および移殖放流が行なわれ、生産が向上してきた。しかし、孵化放流や移殖の効果についての育種学的研究がなされておらず、質的改良のための育種学的方法も確立されていない現状である。

本研究は遺伝子重複のためアイソザイム・パターンが複雑になっているシロサケでアイソザイムの遺伝子支配を明らかにし、集団構造を解析するための標識として用いることができる多くの遺伝子を明らかにした。

アイソザイムの遺伝子頻度からシロサケは溯上する河川ごとに繁殖集団を形成していることを明らかにし、北海道、本州太平洋側、本州日本海側の3つの系統が存在していることを示唆した。

河川集団間の地理的距離とアイソザイム遺伝子頻度から求めた遺伝的距離との関係から、産卵回遊経路に沿ってシロサケの迷い込みが600 Km 以内の範囲で起ることを明らかにし、産卵回遊経路が従来云われていることによく一致した客観的データを提示した。

移殖したシロサケが帰ってくる移殖の1次効果が供給河川によって異なることを明らかにし、さらに再生産に加わって集団構造に影響を及ぼす移殖の2次効果を平均移入率と遺伝的距離を用いて定量的に判定できることを示した。

アイソザイム遺伝子を標識として求めた平均ヘテロザイゴシティー（集団中の遺伝的変異の保有量）と集団の有効な大きさ（次代に子を残しうる有効な親の数）との関係から、人工孵化放流や移殖の効果を判定することができる可能性を示唆し、育種管理面での改良の判断規準が得られることが期待される。

本研究は生涯のうち一時期を人為管理下におかれるシロサケの河川集団の構造解明に遺伝学的手法を導入することを可能にし、孵化放流や移殖の効果を定量的に判断する道を開き、育種研究の展開に大きく役立つ可能性を示したことは農学博士を授与するに十分な価値があるものと判定する。