

## ミトコンドリアDNA分析による根室海峡沿岸河川に遡上したカラフトマス偶数年級群の集団構造

虎尾 充<sup>\*1</sup>, 柳本 卓<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場道東支場, <sup>2</sup>水産総合研究センター中央水産研究所

Population structure of even-year pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) from the Nemuro Strait, Hokkaido determined with mitochondrial DNA analysis

MITSURU TORAO<sup>\*1</sup> and TAKASHI YANAGIMOTO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Doto Research Branch, Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, Nakashibetsu, Hokkaido 086–1164

<sup>2</sup> National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, 2–12–4 Fukuura, Kanazawa, Yokohama, Kanagawa 236–8648, Japan

Pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* populations in the Nemuro Strait, eastern Hokkaido were examined using mitochondrial (mt) DNA to evaluate their genetic structure. In 2014, even-year populations of pink salmon sampled from Rausu, Shunkari-kotan, Kunbetsu, Shibetsu, Nishibetsu, and Sakura (a tributary of the Tohoro River) rivers of the Nemuro Strait were examined in COI/ND5/D-Loop regions. We observed no significant genetic differences between these six rivers' populations of the Nemuro Strait in these three regions of mtDNA. Also, we compared them with previously reported COI/ND5 regions of pink salmon from Rusya River in 2008 and 2009, flowing into the Sea of Okhotsk. The Rusya population in 2008 and the populations from rivers of the Nemuro Strait in 2014 did not differ, except vs. Sakura River in the ND5 region. All the populations from the Nemuro Strait in 2014, in contrast, significantly differed from Rusya in 2009 both for COI and ND5 regions. These results suggest the genetic structure of pink salmon populations in the Nemuro Strait region have similarities within the even-year lineage. This similarity may reflect their frequent occurrence of straying in this region. On the other hand, the two-year life cycle of pink salmon has resulted in odd- and even-lineage being genetically isolated also in eastern Hokkaido.

キーワード：ミトコンドリアDNA, カラフトマス, 集団構造

カラフトマス *Oncorhynchus gorbuscha* は、北緯36°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に分布するサケ属魚類 *Oncorhynchus* spp. の1種である (Heard, 1991)。本種は、北太平洋に分布するサケ属魚類の中で最も資源量が多く、年間1.8~4.4億尾 (2000~2013年) が漁獲される主要な漁業資源の1つである (North Pacific Anadromous Fish Commission Pacific salmonid catch statistics, updated 19 December 2014; North Pacific Anadromous Fish Commission, Vancouver. 2015年, 6月1日, www.npafc.org.)。北海道沿岸でも、主にオホーツク海や根室海峡、道東太平洋において7~8月に小型定置網によって年間500~1,500万尾が漁獲されている。カラフト

マスは河川で孵化・浮上後、直ちに降海し (小林・原田, 1966; 虎尾ら, 2010), 沿岸域で数ヶ月を過ごした後、オホーツク海を經由して北西太平洋に回遊し成長する (高木ら, 1982)。約1年半の海洋生活を経て北海道沿岸に回帰したカラフトマスは、8~10月にかけて、主に根室海峡を含むオホーツク海沿岸の河川に遡上し繁殖する。ほぼ全ての個体が2年で成熟し繁殖後に死亡するため、偶数年級群と奇数年級群には生殖的隔離が生じる (Heard, 1991)。カラフトマスでも、サケ *O. keta* と同様に、人工孵化放流事業が行われており、北海道では1980年代以降およそ1億4千万尾が安定的に放流されている (Nagata et al., 2012)。しかし、それにもかかわらず資源変動は大きく、この要

報文番号 A 522 (2015年8月10日受理)

\*Tel: 0153-72-6141. Fax: 0153-72-5188. E-mail: torao-mitsuru@hro.or.jp

因の1つとしてカラフトマスでは野生魚の割合が比較的高い (Morita *et al.*, 2006) ためと考えられている。

サケ科魚類は産卵のために生まれた川に戻ってくる性質 (母川回帰性) をもっているが (例えば Hasler and Scholz, 1983), カラフトマスはサケ科魚類の中でも比較的母川回帰性が弱く, 母川以外で産卵する迷入の割合が高い傾向がある (Quinn, 1993; Hendry *et al.*, 2004)。一方で, 根室海峡南部の当幌川では, 特定の支流に選択的に遡上・産卵する小型のカラフトマス集団が確認されており, これらは孵化放流事業とは独立して再生産を繰り返している可能性がある (Torao *et al.*, 2011)。

このように, カラフトマスは2年周期の特異な生活史, 母川回帰時の迷入, 孵化場魚と野生魚の混在など, 集団構造の構成に関わる複雑な要因を持っている。カラフトマスの資源管理のためには, 集団構造の把握は重要な課題であるが, 日本系カラフトマスの遺伝的な集団構造に関する研究例は極めて少ない。そこで, 本研究では根室海峡沿岸河川に遡上したカラフトマスの遺伝的差異を mtDNA 分析によって検討した。

## 試料と方法

### 標本採集

Fig.1 に分析に用いたカラフトマス親魚を採集した河川の位置を示した。根室海峡北部地区の羅臼川, 春荊古丹川, 薫別川, 標津川において (一社) 根室管内さけ・ます増殖事業協会が捕獲し, 2014年9月27日に採卵に用いた親魚から胸鱗を採集し, 100% エタノールで固定したもの

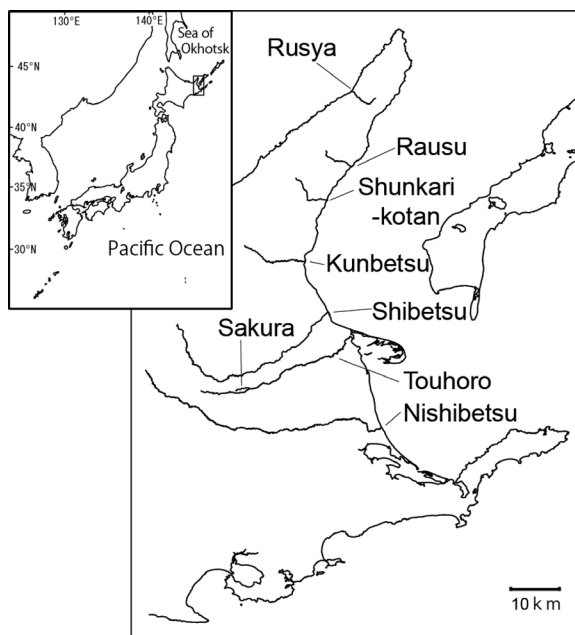


Fig.1 Map showing the locations of six sampling rivers of the Nemuro Strait.

を標本として用いた。採集した標本数は, それぞれ23ないし25個体であった。根室海峡の南部地区にある西別川捕獲施設で9月29日から10月22日に捕獲されたカラフトマス親魚6個体からも同様に標本を採集した。また, 小型のカラフトマスの産卵遡上が確認されている当幌川の支流サクラ川では, 2014年9月26日と29日にたも網を用いて親魚を採集し, 標本を得た。採集した標本はそれぞれ21個体, 10個体であった。

### DNA抽出とPCR

採集された胸鱗の一部約10 mgを切り取り, Quick Gene (Fuji film 社) を用いて全DNAを抽出した。抽出された全DNAを鋳型として, PCR法により, mtDNAのCytochrome c oxidase subunit I (COI) 領域, NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) 領域, D-Loop 領域を増幅した。ND5 領域用に ND5-F (5'-TACCCCAATTGCCCTGTACG-3') と ND-R (5'-TAGACTCCCCGATTGTAAGGC-3') を, COI 領域用に COI-F (5'-TAAACCAACCACAAGACATTGGCAC-3') と COI-R (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAA-3') を, D-Loop 領域用に tRNA-Thr (5'-TCTTGTAATCCGGAAGTCGGA-3') と tRNA-Phe (5'-AACAGCTTCAGTGTATGCT-3') をプライマーとして用いた (Ward *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2001)。サーマルサイクラーには ABI9700 (Applied Biosystems 社) を用いた。DNA 溶液 1  $\mu$ L, 2.5 mM dNTP 溶液 2.5  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer (TaKaRa) 2.5  $\mu$ L, 50  $\mu$ M の各プライマー 0.5  $\mu$ L, TaKaRa Ex Taq Polymerase 0.125 U に, 総量が 25  $\mu$ L になるように超純水を加え PCR 反応溶液とした。最初に 94 $^{\circ}$ C 2 分で熱変性させ, 熱変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒, アニーリング 57 $^{\circ}$ C 30 秒, 伸長反応 72 $^{\circ}$ C 2 分を 30 サイクル行い, 最後に 72 $^{\circ}$ C 7 分の伸長反応をして, PCR 反応を行った。PCR 産物を 1.5% アガロースゲル (NuSieve 3:1, TaKaRa) で電気泳動し, エチジウムブロマイド染色によって増幅産物の確認をした。

### シーケンス分析

得られた増幅産物から, 未反応のプライマーと余分な塩類を除去するため, Quick PCR Purification Kit (Qiagen 社) を用いて精製した。精製した増幅産物をテンプレートとして, PCR で用いたプライマーと BigDye Terminator Ver.3.1 Cycle sequencing kit を用いて, 同製品のプロトコルに従い, シーケンス反応を行った。なお D-Loop 領域については, PCR で用いたプライマーで塩基配列データがあまり得られなかったため, 得られた一部の塩基配列と既存のカラフトマスの D-Loop 領域の塩基配列 (EF455489) から, 新たにシーケンス用のプライマー OGRH (5'-GTGGTAACGCAATAAGA-3') を設計した。シーケンス

反応産物を DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen 社) で精製し, ABI PRISM 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) にて電気泳動して塩基配列を決定した。

### データ解析

得られた塩基配列を Blast 分析 (Altschul *et al.*, 1990) によって, カラフトマスの mtDNA の調節領域であるかを調べた。塩基配列から CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) によりアライメント分析を行った後, DnaSPVer4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003) を用いてハプロタイプの分類を行った。その際に, 山田ら (2012) が報告しているハプロタイプにあわせて名前を付け, 新たに出現したハプロタイプには別途名前を付けた。河川間の遺伝的分化を検討するため, ペアワイズの  $F_{ST}$  分析 (Slatkin, 1995) を行った。また, 遺伝的集団構造を AMOVA (analysis of molecular variance) 分析 (Excoffier *et al.*, 1992) により検討した。集団間の差異の指標として,  $\phi_{CT}$  を用いた。遺伝的変異性の指標としてハプロタイプ多様度 (Nei, 1987), 塩基多様度 (Tajima, 1983), 平均塩基置換数 (Tajima, 1983) を求めた。これらの分析には, Arlequin Ver. 3.1 program (Excoffier and Lischer, 2005) を用いた。なお, COI 領域と ND5 領域の分析には山田ら (2012) のデータも合わせて, 検討した。また, D-Loop 領域の塩基配列を用いて, TCS ver 1.2.1 (Clement *et al.*, 2000) によって, 信頼限界 95% でハプロタイプネットワーク図を作成した。

決定した塩基配列のうち, 山田ら (2012) が登録している以外の COI 領域の塩基配列を LC050854, LC050855 で, また ND5 領域の塩基配列を LC050856~LC050861 で, D-Loop 領域の塩基配列のハプロタイプを LC050830~LC050853 で DNA Data Bank of Japan に登録した。

## 結果

### COI 領域

根室海峡沿岸河川で採集されたカラフトマス 136 個体に

ついて, COI 領域の 486 塩基配列を決定した (Table 1)。Blast 分析の結果, DNA データバンクに登録されているカラフトマスの COI 領域の塩基配列と相同性が高く, 目的の領域の塩基配列が得られたと分かった。河川集団あたり 3~5 個のハプロタイプが出現した。本研究と山田ら (2012) で得られたハプロタイプの出現頻度を見ると, ルシヤ川で出現したハプロタイプ A から J と同じものが出現した (Table 1)。また, ルシヤ川で出現していない二つのハプロタイプ K (LC050854) と L (LC050855) が出現した (Table 1)。ハプロタイプ多様度は 0.547~0.733, 平均塩基置換数は 0.600~0.867, 塩基多様度は 0.00123~0.00178 であった (Table 1)。これらの値は, 既報のルシヤ川のカラフトマスの値とほぼ同様であった (山田ら, 2012)。今回, 得られた塩基配列とルシヤ川 2008 年と 2009 年のカラフトマスの塩基配列を用いてペアワイズ  $F_{ST}$  分析を行った結果 (Table 2), 2014 年と 2008 年に採集されたカラフトマス集団間に遺伝的な違いはなかった。一方で 2009 年にルシヤ川で採集された集団と他の集団には遺伝的な差異が認められた (Table 2)。2014 年に採集した集団とルシヤ川の

Table 1 Haplotype frequencies based on the sequences of mitochondrial COI region by sampling site.

Haplotype	Sampling sites							
	RAU	SHN	KUN	SHI	SAK	NIS	RUS08	RUS09
A	13	16	12	11	18	2	51	17
B	0	0	0	0	0	0	0	58
C	8	6	12	11	8	3	32	0
D	0	0	0	0	0	0	0	11
E	1	2	1	1	4	1	5	0
F	0	0	0	0	0	0	0	3
G	0	0	0	0	0	0	1	0
H	0	0	0	0	0	0	1	0
I	0	0	0	1	1	0	1	0
J	0	0	0	0	0	0	0	1
K	2	0	0	0	0	0	0	0
L	0	1	0	1	0	0	0	0
Total	24	25	25	25	31	6	91	90
Parameter								
$H$	4	4	3	5	4	3	6	5
$HD$	0.612	0.547	0.560	0.633	0.598	0.733	0.565	0.539
$K$	0.732	0.687	0.600	0.753	0.800	0.867	0.704	1.463
$\pi$	0.002	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.001	0.003

Sampling sites: RAU, SHN, KUN, SHI, SAK, NIS, RUS08, and RUS09 indicates Rausu, Shunkari-kotan, Kunbetsu, Shibetsu, Sakura, Nishibetsu, Rusya in 2008, and Rusya in 2009, respectively. Data of RUS08 and RUS09 referred to Yamada *et al.* (2012). Parameter:  $H$ ,  $HD$ ,  $K$ , and  $\pi$  indicate number of haplotypes, haplotype diversity, average number of nucleotide differences, and nucleotide diversity, respectively.

Table 2 Pairwise estimates of differentiation for mitochondrial COI haplotypes in collections of pink salmon from rivers of the Nemuro Strait, eastern Hokkaido.  $F_{ST}$  values above diagonal and  $F_{ST} p$  values below diagonal.

	Sampling sites							
	RAU	SHN	KUN	SHI	SAK	NIS	RUS08	RUS09
RAU		-0.023	0.001	0.005	-0.014	0.037	-0.013	0.427
SHN	0.802±0.037		0.026	0.020	-0.020	0.071	-0.010	0.421
KUN	0.360±0.043	0.252±0.030		-0.032	-0.009	-0.047	-0.009	0.463
SHI	0.252±0.042	0.243±0.041	0.937±0.028		-0.010	-0.049	-0.003	0.458
SAK	0.496±0.028	0.723±0.029	0.387±0.049	0.459±0.053		-0.021	-0.015	0.443
NIS	0.243±0.031	0.153±0.033	0.432±0.054	0.550±0.046	0.514±0.036		0.013	0.458
RUS08	0.595±0.045	0.496±0.034	0.432±0.047	0.405±0.037	0.757±0.043	0.369±0.044		0.487
RUS09	0.000±0.000**	0.000±0.000**	0.000±0.000**	0.000±0.000**	0.000±0.000**	0.000±0.000**	0.000±0.000**	

\*\*indicate significant differences after sequential Bonferroni correction. Sampling sites: RAU, SHN, KUN, SHI, SAK, NIS, RUS08, and RUS09 indicates Rausu, Shunkari-kotan, Kunbetsu, Shibetsu, Sakura, Nishibetsu, Rusya in 2008, and Rusya in 2009, respectively.

2008年と2009年の集団を一つの集団としてAMOVA分析を行った結果, 集団間の変異の割合は35.9%で,  $\phi_{CT}$ は0.359となり0より有意に大きな値となった ( $p < 0.01$ )。また, 2014年に採集した集団とルシャ川の2008年の偶数年と, ルシャ川2009年の奇数年の年集団としてAMOVA分析を行った結果, 集団間の変異の割合は53.9%で,  $\phi_{CT}$ は0.535となり0より有意に大きな値となった ( $p < 0.01$ )。さらに, 2014年に採集した集団のみでAMOVA分析を行った結果, 集団間の変異の割合は-0.57%で, 固定指数は-0.00568となり, 0より有意な値にならなかった。

### ND5領域

134個体について, ND5領域の431塩基配列を決定した。Blast分析の結果, DNAデータバンクに登録されているカラフトマスのND5領域の塩基配列と相同性が高く, 目的の領域の塩基配列が得られたことが分かった。河川集団あたり, 4~9個のハプロタイプが出現した (Table 3)。本研究と山田ら (2012) で得られたハプロタイプの出現頻

Table 3 Haplotype frequencies based on the sequences of mitochondrial ND5 region by sampling site.

Haplotype	Sampling sites								
	RAU	SHN	KUN	SHI	SAK	NIS	RUS08	RUS09	
1	17	17	15	13	15	2	68	29	
2	0	0	0	0	0	0	0	39	
3	3	2	5	2	2	0	6	0	
4	1	2	1	4	0	2	6	0	
5	0	1	1	1	8	0	5	0	
6	1	2	1	1	4	1	3	0	
7	1	0	0	1	0	1	2	0	
8	0	0	0	0	0	0	1	0	
9	0	0	0	0	0	0	1	0	
10	0	0	0	0	0	0	0	1	
11	0	0	1	0	0	0	0	0	
12	0	0	0	0	2	0	0	0	
13	0	1	0	0	0	0	0	0	
14	0	0	0	1	0	0	0	0	
15	0	0	0	1	0	0	0	0	
16	0	0	0	1	0	0	0	0	
Total	23	25	24	25	31	6	92	69	
<i>H</i>	5	6	6	9	5	4	8	3	
<i>HD</i>	0.451	0.537	0.583	0.717	0.697	0.867	0.445	0.511	
<i>K</i>	0.885	0.967	1.167	0.967	1.449	1.200	0.748	0.528	
$\pi$	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002	0.001	

Sampling sites: RAU, SHN, KUN, SHI, SAK, NIS, RUS08, and RUS09 indicates Rausu, Shunkari-kotan, Kumbetsu, Shibetsu, Sakura, Nishibetsu, Rusya in 2008, and Rusya in 2009, respectively. Data of RUS08 and RUS09 referred to Yamada et al.(2012). Parameter: *H*, *HD*, *K*, and  $\pi$  indicate number of haplotypes, haplotype diversity, average number of nucleotide differences, and nucleotide diversity, respectively.

度を見ると, ルシャ川で出現したハプロタイプ1~10と同じものが出現した (Table 3)。また, ルシャ川で出現していない6個のハプロタイプ11~16 (LC050856~LC050861) が出現した (Table 3)。ハプロタイプ多様度は0.451~0.867であった (Table 3)。平均塩基置換数は0.885~1.449, 塩基多様度は0.00205~0.00336であった (Table 3)。これらの値は, 既報のルシャ川のカラフトマスの値とほぼ同様であった (山田ら, 2012)。今回, 得られた塩基配列とルシャ川2008年と2009年のカラフトマスの塩基配列を用いてペアワイズ $F_{ST}$ 分析を行った結果, 2014年のサクラ川とルシャ川2008年に採集されたカラフトマス集団間で遺伝的な差異が認められたが ( $p < 0.01$ ), 他の組み合わせに差はなかった (Table 4)。一方, 2009年にルシャ川で採集された集団と他の集団には遺伝的な差異があった (Table 4)。2014年に採集した集団とルシャ川の2008年と2009年の集団を一つの集団としてAMOVA分析を行った結果, 集団間の変異の割合は17.3%で, 固定指数は0.173となり0より有意に大きな値となった ( $p < 0.01$ )。また, 2014年に採集した集団とルシャ川の2008年の偶数年と, ルシャ川2009年の奇数年の年集団としてAMOVA分析を行った結果, 集団間の変異の割合は27.86%で,  $\phi_{CT}$ は0.279となり0より有意に大きな値となった ( $p < 0.01$ )。さらに, 2014年に根室海峡沿岸河川で採集した集団のみでAMOVA分析を行った結果, 集団間の変異の割合は2.52%で, 固定指数は0.0252となり, 0より有意な値にならなかった。

### D-Loop領域

129個体について, D-Loop領域の約1300bpをPCR増幅した。電気泳動したところ, 長さの異なる2つ増幅産物があった。D-Loop領域に長さの違いによるレンジスヘテロプラズミーがあると考えられた。そこで, 長いものと短いものについて集団間の頻度を比較したが, 差はなかった (Fig. 2)。次に, これらの増幅産物のうち106個体について558塩基配列を決定した。Blast分析の結果, DNAデータバンクに登録されているカラフトマスのD-Loop領域の塩基配列と相同性が高く, 目的の領域の塩基配列

Table 4 Pairwise estimates of differentiation for mitochondrial ND5 haplotypes in collections of pink salmon from rivers of the Nemuro Strait, eastern Hokkaido.  $F_{ST}$  values above diagonal and  $F_{ST} p$  values below diagonal.

	Sampling sites							
	RAU	SHN	KUN	SHI	SAK	NIS	RUS08	RUS09
RAU		-0.024	-0.026	-0.019	0.040	0.211	-0.014	0.367
SHN	0.811±0.027		0.000	-0.024	0.008	0.165	-0.011	0.358
KUN	0.793±0.047	0.378±0.050		0.006	0.044	0.206	0.023	0.372
SHI	0.694±0.049	0.928±0.020	0.297±0.033		0.015	0.087	-0.005	0.354
SAK	0.099±0.032	0.234±0.043	0.081±0.029	0.189±0.034		0.122	0.046	0.351
NIS	0.009±0.009	0.027±0.014	0.027±0.014	0.144±0.039	0.072±0.023		0.258	0.572
RUS08	0.730±0.050	0.658±0.033	0.189±0.032	0.432±0.038	0.000±0.000**	0.009±0.009		0.345
RUS09	0.000±0.000**	0.000±0.000**	0.000±0.000**	0.000±0.000**	0.000±0.000**	0.000±0.000**	0.000±0.000**	

\*\*indicate significant differences after sequential Bonferroni correction. Sampling sites: RAU, SHN, KUN, SHI, SAK, NIS, RUS08, and RUS09 indicates Rausu, Shunkari-kotan, Kumbetsu, Shibetsu, Sakura, Nishibetsu, Rusya in 2008, and Rusya in 2009, respectively.

が得られたことが分かった。3~12個のハプロタイプが出現し (LC050830~LCO050853), ハプロタイプ3と6の出現数が多く, 次いで9, 11, 1の出現数が多かった (Table 5)。ハプロタイプネットワーク図をFig.3に示した。ハプロタイプ3と6で大きく二つに分かれ, それぞれから1~数塩基の塩基置換のあるハプロタイプが存在していた。河川集団間のハプロタイプ出現頻度に差はなかった (Table 5)。ハプロタイプ多様度は0.757~1.000であった。平均塩基置換数は1.876~4.667, 塩基多様度は0.00325~0.00841であった (Table 5)。本研究で得られたハプロタイプの出現頻度を見ると, 大きく二つの主要なハプロタイプと出現頻度が1~2個のマイナーなハプロタイプで構成されていた (Table 5)。今回, 得られたカラフトマスの塩基配列

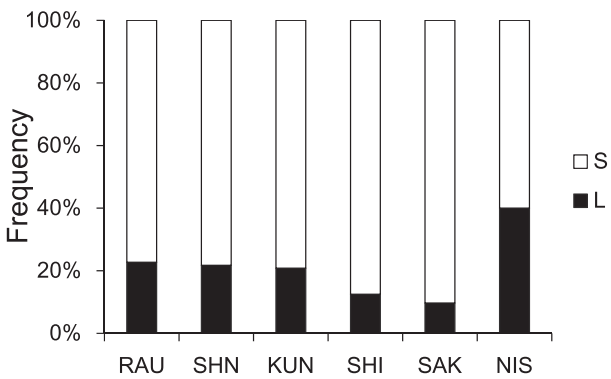


Fig.2 Size compositions of control region on pink salmon amplified by the PCR method. S:short; L: long

Table 5 Haplotype frequencies based on the sequences of mitochondrial D-Loop region by sampling site.

Haplotype	Sampling sites					
	RAU	SHN	KUN	SHI	SAK	NIS
1	2	1	1	1	1	0
2	0	1	0	0	0	0
3	3	3	3	5	5	0
4	0	1	0	1	0	0
5	0	1	0	0	0	0
6	6	6	4	3	13	1
7	0	1	0	0	0	0
8	0	1	0	2	0	0
9	1	2	1	1	3	0
10	1	1	0	1	0	0
11	3	0	3	0	1	0
12	0	0	1	0	0	0
13	0	0	1	3	0	0
14	1	0	1	0	0	0
15	0	0	1	1	0	0
16	0	0	1	0	0	0
17	0	0	1	0	1	0
18	0	0	1	0	0	0
19	0	0	0	1	0	1
20	0	0	0	0	0	1
21	0	0	0	1	0	0
22	0	0	0	1	1	0
23	0	0	0	0	1	0
24	0	0	0	0	2	0
Total	17	18	19	21	28	3
Parameter						
<i>H</i>	7	10	12	12	9	3
<i>HD</i>	0.838	0.876	0.930	0.919	0.757	1.000
<i>K</i>	2.250	2.471	4.667	2.600	1.876	2.250
$\pi$	0.004	0.004	0.004	0.005	0.003	0.008

Sampling sites: RAU, SHN, KUN, SHI, SAK, NIS, RUS08, and RUS09 indicates Rausu, Shunkari-kotan, Kunbetsu, Shibetsu, Sakura, Nishibetsu, Rusya in 2008, and Rusya in 2009, respectively. Parameter: *H*, *HD*, *K*, and  $\pi$  indicate number of haplotypes, haplotype diversity, average number of nucleotide differences, and nucleotide diversity, respectively.

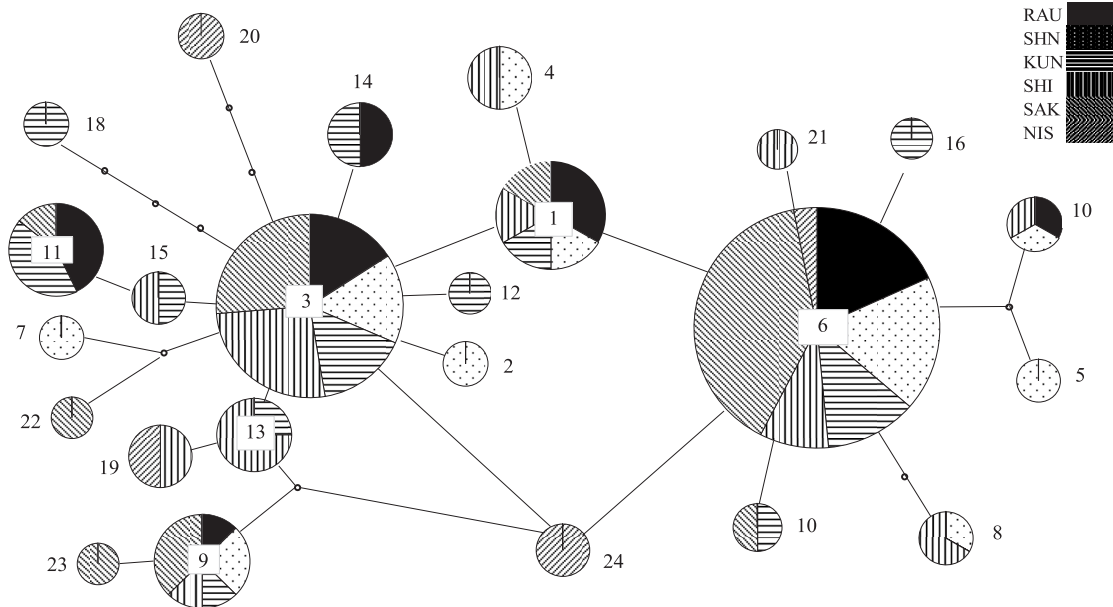


Fig.3 Haplotype network constructed by the TCS program among 24 haplotypes for the D-Loop region of pink salmon. Numerals in the graph indicate haplotype (see Table 5). The relative size of each circle presenting the number of individuals. Each population is indicated black, dot, horizontal line, vertical line, right shadow, left shadow. RAU, SHN, KUN, SHI, SAK, and NIS indicate Rausu, Shunkari-kotan, Kunbetsu, Shibetsu, and Nishibetsu, respectively.



Table 6 Pairwise estimates of differentiation for mitochondrial D-Loop haplotypes in collections of pink salmon from rivers of the Nemuro Strait, eastern Hokkaido.

	Sampling sites					
	RAU	SHN	KUN	SHI	SAK	NIS
RAU		-0.00328	-0.03017	0.00064	0.0095	0.06194
HAR	0.369±0.042		0.04629	0.00359	-0.02138	0.06792
KUN	0.829±0.027	0.108±0.026		0.00011	0.05507	0.0105
SHI	0.396±0.024	0.414±0.047	0.342±0.026		0.03294	-0.02006
TOU	0.297±0.041	0.748±0.047	0.063±0.027	0.090±0.030		0.13154
NIS	0.252±0.035	0.144±0.034	0.532±0.029	0.586±0.049	0.126±0.031	

No significant differences were found after sequential Bonferroni correction. Sampling sites: RAU, SHN, KUN, SHI, SAK, and NIS indicates Rausu, Shunkari-kotan, Kunbetsu, Shibetsu, Sakura, Nishibetsu.

を用いてペアワイズ  $F_{ST}$  分析を行った結果、2014年のカラフトマス集団間に遺伝的差はなかった (Table 6)。2014年に採集した集団を一つの集団として AMOVA 分析を行ったところ、集団間の変異の割合は 1.10% で、 $\phi_{CT}$  は 0.011 となり 0 より有意に大きな値ではなかった ( $p > 0.05$ )。

### 考 察

2014年の秋に根室海峡沿岸の河川で採集されたカラフトマス偶数年級群について、mtDNAの3つの領域の塩基配列を用いて河川集団間の遺伝的分化を調べたところ有意差は認められず、河川集団間では遺伝的な差はないことが明らかになった。また、当幌川支流サクラ川を選択的に利用し自然再生産を繰り返していると考えられている支流の集団 (Torao *et al.*, 2011) も、他の根室海峡沿岸の河川に遡上する河川集団と遺伝的な差は認められなかった。しかし、サクラ川に遡上する個体は遡上時期や形態が他の河川に遡上する個体と明らかに異なるため、今後、より解像度の高い共有性の遺伝マーカー (例えば、マイクロサテライト DNA や SNP's) を用いてさらに検討する必要がある。

岡崎 (1991) は、北海道道北の斜里川、幌内川、湧別川で 1983 年と 1984 年に採集したカラフトマスのアイソザイム分析の結果、同一年級群内では 3 河川間に遺伝的な近似性が見られると報告している。このような知見に基づいて、カラフトマスの人工ふ化放流事業では異なる河川への放流が頻繁に行われている。このことが河川集団の遺伝的な差異をさらに低下させている可能性もある。サケ科魚類において、異なる河川に遡上する集団に遺伝的な差異が生じるためには、遡上時期の違いによる時間的隔離、母川回帰による地理的な隔離が必要と考えられる。カラフトマスは母川回帰性を示すサケ属魚類の中では比較的迷入率が高いことが知られ (Quinn, 1993; Hendry *et al.*, 2004)、北米のカラフトマスでは頻繁な迷入により近隣河川集団間で遺伝的交流が生じている (Gharrett *et al.*,

1988; Shaklee *et al.*, 1991; Hendry *et al.*, 2004)。北海道全体でのカラフトマスの迷入に関する知見は少ないが、オホーツク海側の網走川から放流されたカラフトマスでは、迷入率が非常に高かったことが報告されている (藤原, 2011)。また、根室海峡沿岸河川でも広範囲の迷入が確認されており (虎尾, 2012)、このことが根室海峡沿岸河川に回帰する集団間の遺伝的な均一性の要因となっている可能性がある。一方で、北海道におけるカラフトマスの漁獲動向には地域的な類似性が見られ (星野ら, 2008)、河川によって形態差も認められている (星野ら, 2008; 下田ら, 2010; Ando *et al.*, 2010) ことから、緩やかな地域集団を形成している可能性もある (星野ら, 2008)。北米では、迷入があるにもかかわらず近隣河川間でカラフトマスの遺伝的差異が認められた事例もあり (Gharrett and Smoker, 1993; McGregor *et al.*, 1998)、固有の河川環境への適応度との関連性が議論されている (Gharrett and Smoker, 1993)。本研究で対照とした河川集団間では遺伝的な差異は認められなかったが、北海道のカラフトマスの集団構造を明らかにするためには、更にサンプル数を増やして検討するなど、より詳細な検証が必要である。

山田ら (2012) は 2008 年と 2009 年のルシャ川で採集されたカラフトマスの COI 領域と ND5 領域の塩基配列分析を行い、同一河川でも奇数年と偶数年で遺伝的に異なっていると報告している。この結果と本研究で用いた 2014 年の結果と比較したところ、ND5 領域においてルシャ川 2008 年とサクラ川で差があったが、その他の組み合わせでは差がなかった。一方、本研究で得られた 2014 年の集団とルシャ川 2009 年のすべての組み合わせでは差が認められた (Tables 2&4)。岡崎 (1991) は、奇数年と偶数年で採集されるカラフトマス集団は大きく遺伝的に分化していると報告しており、このような年級群間の遺伝的な分化は北米、ロシア産のカラフトマスでも報告されている (Aspinwall, 1974; Beacham *et al.*, 1985; Olsen *et al.*, 1998; Hawkins *et al.*, 2002)。本研究の結果は、北海道道東の広い地域でカラフトマスの偶数年級群と奇数年級群に

よる遺伝的差異が存在することを示している。このことから、北海道道東域においても、近隣河川間における分化の度合いより、遡上年級間による分化（隔離）の度合いの方が強いことが考えられる。最近の研究では、偶数年級群よりも奇数年級群内での遺伝的変異性が大きいとの報告（Seeb *et al.*, 2014）もあり、今後、北海道道東域の奇数年のサンプルを集めて、本研究と同様な解析を行うことによりさらに検証する必要がある。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、カラフトマスの標本採集にご協力いただいた一般社団法人根室管内さけ・ます増殖事業協会および職員の方々に深く感謝する。本報告の原稿に有益なご助言を賜った岩手大学三陸水産研究センター助教の塚越英晴博士に心より感謝申し上げる。

## 引用文献

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; **215**: 403–410.
- Ando D, Fujiwara M, Miyakoshi Y, Shinriki Y, Hayano H. Evaluation of population differences using gill raker count in pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*, in three rivers on Hokkaido Island. *Fish Genetics and Breeding Science* 2010; **40**: 19–28.
- Aspinwall N. Genetic analysis of North American populations of the pink salmon. *Evolution* 1974; **28**: 295–305.
- Beacham TD, Withler RE, Gould AP. 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.
- Clement MD, Posada D, Crandall KA. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Evol.* 2000; **9**: 1657–1659.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes; application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 1992; **131**: 479–491.
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* 2005; **1**: 47–50.
- Gharrett AJ, Smoker WW. A perspective on the adaptive importance of genetic infrastructure in salmon populations to ocean ranching in Alaska. *Fish. Res.* 1993; **18**: 45–58.
- Gharrett AJ, Smoot C, McGregor AJ. Genetic relationship of even-year northwestern Alaskan pink salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 1988; **117**: 536–545.
- Hasler AD, Scholz AT. *Olfactory Imprinting and Homing in Salmon*. Springer-Verlag, Berlin. 1983.
- Hawkins SL, Varnavskaya NV, Matzak EA, Efremov VV, Guthrie III CM, Wilmot RL, Mayama H, Yamazaki F, Gharrett AJ. Population structure of odd-broodline Asian pink salmon and its contrast to the even-broodline structure. *J. Fish Biol.* 2002; **60**: 370–388.
- Heard WR. Life history of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). In: Groot C, Margolis L (eds). *Pacific Salmon Life Histories* The University of British Columbia Press, Vancouver, Canada. 1991; 119–230.
- Hendry AP, Castric V, Kinnison MT, Quinn TP. The evolution of philopatry and dispersal: homing versus straying in salmonids. In: Hendry AP, Stearns SC (eds), *Evolution Illuminated*. Oxford University Press, New York. 2004; 52–91.
- 星野 昇, 藤原 真, 春日井潔, 宮腰靖之, 竹内勝巳. 北海道におけるカラフトマスの集団構造：奇数年回帰群にみられる漁獲動向および形態的特徴の地域変異. 北海道立水産孵化場研究報告 2008; **62**: 1–14.
- 藤原 真. カラフトマスの放流効果は？. 北水試だより 2011; **82**: 17–19.
- 小林哲夫, 原田 滋. 西別川におけるサケ・マスの生態調査II. カラフトマス稚魚の降海移動, 成長, 食性. 北海道さけ・ますふ化場研究報告 1966; **20**: 1–10.
- McGregor AJ, Lane S, Thomason MA, Zhivotovsky LA, Smoker WW, Gharrett AJ. Migration timing, a life history trait important in the genetic structure of pink salmon. *North Pacific Anadromous Fish Commission Bulletin* 1998; **1**: 262–273
- Morita K, Morita SH, Fukuwaka M. Population dynamics of Japanese pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*): are recent increases explained by hatchery programs or climatic variations? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2006; **63**: 55–62.
- Nagata M, Miyakoshi Y, Urabe H, Fujiwara M, Sasaki Y, Kasugai K, Torao M, Ando D, Kaeriyama M. An overview of salmon enhancement and the need to manage and monitor natural spawning in Hokkaido, Japan. *Environ. Biol. Fish.* 2012; **92**: 311–323.
- Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 1987.

- 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**: 1744–1749.
- Olsen JB, Seeb LW, Bentzen P, Seeb JE. Genetic interpretation of broad-scale microsatellite polymorphism in odd-year pink salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 1998; **127**: 535–550.
- Quinn TP. A review of homing and straying of wild and hatchery-produced salmon. *Fish. Res.* 1993; **18**: 29–44.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 2003; **19**: 2496–2497.
- Sato S, Ando J, Ando H, Urawa S, Urano A, Abe S. Genetic variation among Japanese populations of chum salmon inferred from the nucleotide sequences of the mitochondrial DNA control region. *Zool. Sci.* 2001; **18**: 99–106.
- Seeb LW, Waples RK, Limborg MT, Warheit KI, Pascal CE, Seeb JE. Parallel signatures of selection in temporally isolated lineages of pink salmon. *Mol. Ecol.* 2014; **23**: 2473–2485.
- Shaklee JB, Klaybor DC, Young S, White BA. Genetic stock structure of odd-year pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum), from Washington and British Columbia and potential mixed-stock fisheries applications. *J. Fish Biol.* 1991; **39** (Suppl. A): 21–34.
- Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 1995; **139**: 457–462.
- 下田和孝, 神力義仁, 春日井潔, 星野 昇. 北海道産カラフトマスの形態変異. 日本水産学会誌 2010; **76**: 20–25.
- Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 1983; **105**: 437–460.
- 高木健治, K.V.アロー, A.C.ハート, M.D.デル. 北太平洋の沖合水域におけるカラフトマス (*Oncorhynchus gorbuscha*) の分布及び起源. 北太平洋漁業国際委員会研究報告 1982; **40**: 1–78.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; **22**: 4673–4680.
- 虎尾 充. カラフトマスの生物学と資源. 育てる漁業 (社団法人北海道栽培漁業振興公社) 2012; **458**: 2–7.
- 虎尾 充, 竹内勝巳, 佐々木義隆, 春日井潔, 村上 豊, 永田光博. 当幌川におけるカラフトマス放流魚と野生魚の降河生態. 北海道立水産孵化場研究報告 2010; **64**: 7–15.
- Torao M, Nagata M, Sasaki Y, Takeuchi K, Kasugai K. Evidence for existence of wild population of pink salmon in the Tohoro River system flowing into Nemuro Strait, eastern Hokkaido, Japan. *Sci. Rep. Hokkaido Fish. Res. Inst.* 2011; **80**: 45–49.
- Ward RD, Zelmak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN, DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2005; **360**: 1847–1857.
- 山田 綾, 越野陽介, 工藤秀明, 阿部周一, 荒井克俊, 婦山雅秀. ミトコンドリアDNA分析によるカラフトマス *Oncorhynchus gorbuscha* 集団構造の年級群比較. 日本水産学会誌 2012; **78**: 973–975.