

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奇数年級群の集団構造

虎尾 充^{*1}, 柳本 卓²

¹北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場道東センター,

²水産研究・教育機構中央水産研究所

Mitochondrial DNA analysis of population structure in odd-year pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) from the Nemuro Strait, Hokkaido, Japan

MITSURU TORAO^{*1} and TAKASHI YANAGIMOTO²

¹ Doto Research Branch, Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, Nakashibetsu, Hokkaido 086-1164, Japan

² National Research Institute of Fisheries Science, Japan Fisheries Research and Education Agency, 2-12-4 Fukuura, Kanazawa, Yokohama, Kanagawa 236-8648, Japan

In this study, we evaluated the genetic structure of the odd-year brood line of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* populations sampled from the eight rivers in the Nemuro Strait, eastern Hokkaido, in 2015. Pink salmon sampled from the Sashirui, Rausu, Shunkari-kotan, Kunbetsu, Ichani, Shibetsu, Touhoro, and Nishibetsu rivers were examined using the three mitochondrial DNA (mtDNA) regions (COI, ND5, and D-Loop). We observed no significant genetic differences in the three mtDNA regions among the pink salmon populations from the eight rivers. However, genetic differences were observed between the odd- and even-year lineages of the pink salmon populations that returned in 2014. Moreover, when comparing COI and ND5 regions with the previously reported data of the Rusha River facing the Okhotsk Sea in 2008 and 2009, significant differences were observed only between different lineage groups. These results suggest that the genetic structure of the pink salmon populations in the Nemuro Strait region have similarities within the even- or odd-year lineages. Moreover, the two-year life cycle of pink salmon has resulted in the odd- and even-year lineages being genetically isolated in eastern Hokkaido. In addition, the haplotype and nucleotide diversities indicated greater differentiation within the even-year than within the odd-year lineage in the Nemuro Strait population.

キーワード：ミトコンドリアDNA, *Oncorhynchus gorbuscha*, 集団構造, 年級群

カラフトマス *Oncorhynchus gorbuscha* は、北太平洋、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.* の遡河回遊魚である (Heard, 1991)。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、オホーツク海を経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、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)。また、サケ科魚類は繁殖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)、カラフトマスは母川以外で繁殖する迷入の割合が高い傾向がある (Quinn, 1993; Hendry *et al.*, 2004)。北海道においては、カラフトマスの人工孵化放流が継続的に行われており、近年は年間およそ1億4千万尾が放流されている (Nagata *et al.*, 2012)。一方で、カラフトマス資源では野生魚由来資源の割合が高いことも明らかになりつつある (Morita *et al.*, 2006; Ohnuki *et al.*, 2015)。

報文番号 A 541 (2017年1月31日受理)

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

このようにカラフトマスは、年級群間の生殖的隔離、母川回帰時の迷入率の高さ、孵化場魚と野生魚の存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。著者らは2014年に根室海峡沿岸河川に回帰した偶数年級群のカラフトマスについて、mtDNA分析によって河川集団間での遺伝的な差を調べた(虎尾・柳本, 2015)。その結果、河川集団間では有意な差は認められず、山田ら(2012)が報告した2009年回帰の奇数年級群のオホーツク海側ルシヤ川との比較では遺伝的な差が見られた。

本研究では、根室海峡沿岸河川のカラフトマスの集団構造を検討するため、2015年に根室海峡沿岸河川に回帰した奇数年級群カラフトマスのmtDNA分析を行い、河川集団間および2014年回帰の偶数年級群との遺伝的差異を検討した。

材料と方法

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。根室海峡沿岸の8河川(サシルイ川, 羅白川, 春苺古丹川, 薫別川, 伊茶仁川, 標津川, 当幌川および西別川)において、一般社団法人根室管内さけ・ます増殖事業協会が捕獲し2015年9月8, 9, 17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を標本として用いた。採集した標本数は、雌雄それぞれ30個体であった。

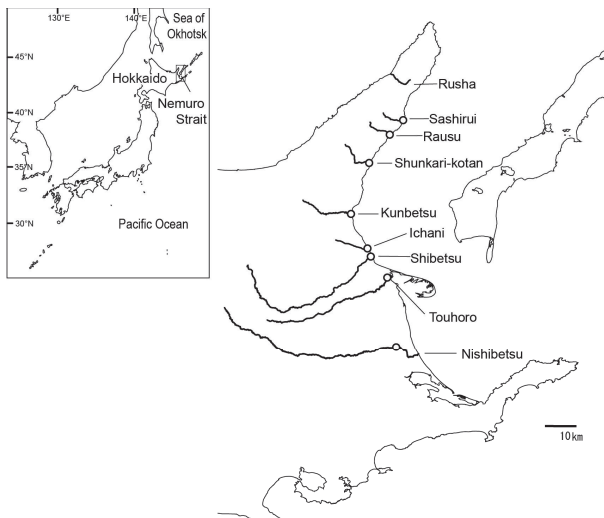


Fig.1 Location (open circles) of eight sampling rivers in this study from the Nemuro Strait and the Rurua River (Yamada et al., 2012).

DNA抽出とPCR

採集された胸鱗の一部約10 mgを切り取り、核酸抽出システム 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 μ L, 2.5 mM dNTP溶液2.5 μ L, 10 \times Buffer (TaKaRa) 2.5 μ L, 50 μ Mの各プライマー0.5 μ L, TaKaRa Ex Taq Polymerase 0.125 Uに、総量が25 μ 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 $^{\circ}$ C2分で熱変性させ、熱変性94 $^{\circ}$ C30秒, アニーリング57 $^{\circ}$ C30秒, 伸長反応72 $^{\circ}$ C2分を30サイクル行い、最後に72 $^{\circ}$ C7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 (NuSieve3:1, 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 Ver3.1 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 OGCRH (5'-GTGGGTAACGGCAATAAGA-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 3730 XL 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カテゴリ分けを行った。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。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。

本研究で得られた塩基配列データと2014年の根室海峡沿岸河川集団で得られたデータ (虎尾・柳本, 2015), 2008年と2009年のルシャ川の結果 (山田ら, 2010)を合わせて、偶数年と奇数年級群間に遺伝的な差があるか調べた。ただし、D-Loop領域については、2014年と2015年の根室海峡沿岸河川集団について検討した。

本研究で得られたカラフトマスの塩基配列について、山田ら (2012) と虎尾・柳本 (2015) で登録されていないものをDNAデータベースに登録した。COIのMからXまでのハプロタイプをアクセス番号LC145744–145755で、ND5の17から24までのハプロタイプをアクセス番号LC145756–145763で登録した。また、D-Loop領域については、2015年に得られた塩基配列すべてをアクセス番号LC147661–148001で登録した。

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431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データベースに登録されているカラフトマスのCOI領域の塩基配列と同一性が高く、目的領域の塩基配列が得られたことが分かった。得られたすべての塩基配列を雌雄に分けてAMOVA分析を行った結果、雌雄間の変異は0.55%となり、0より有意に高い値とはならなかった。雌雄では差がないものと考えられたため、以下の解析では集団間の比較には雌雄を合わせたデータを用いた。河川集団あたり5–9個のハプロタイプが出現した。ハプロタイプ多様度は0.439–0.626, 平均塩基置換数は0.638–0.983, 塩基多様度は0.002–0.013であった (Table 1)。ハプロタイプの出現頻度を見ると、ハプロタイプAとBが多く主要なタイプであり、他のハプロタイプは1集団に1–2個しか出現しないマイナーなハプロタイプであった (Table 1)。ペアワイズ F_{ST} 分析を行った結果、河川集団には差がなかった (Table 2)。また、AMOVA分析を行った結果、集団間の変異の割合は0.58%で、0より有意に高い値とはならなかった ($p < 0.01$)。

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

| Haplotype | Sampling sites | | | | | | | |
|-----------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | SAS | RAU | SHK | KUN | ICH | SHI | TOH | NIS |
| A | 18 | 17 | 7 | 3 | 16 | 15 | 10 | 18 |
| B | 33 | 37 | 35 | 28 | 28 | 35 | 43 | 30 |
| C | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| D | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 4 |
| F | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| M | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 3 |
| N | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| O | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| Q | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| R | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| S | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| U | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| V | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| W | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| X | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Total | 60 | 57 | 49 | 41 | 50 | 58 | 59 | 57 |
| Parameter | | | | | | | | |
| H | 9 | 5 | 7 | 9 | 7 | 6 | 5 | 6 |
| HD | 0.601 | 0.497 | 0.474 | 0.529 | 0.593 | 0.572 | 0.439 | 0.626 |
| K | 0.866 | 0.638 | 0.951 | 0.983 | 0.882 | 0.932 | 0.755 | 0.930 |
| π | 0.002 | 0.013 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 |

Sampling sites: SAS, RAU, SHK, KUN, ICH, SHI, TOH, and NIS indicates rivers Sashirui, Rausu, Shunkari-kotan, Kumbetsu, Shibetsu, Touhoro, and Nishibetsu. Haplotypes of A–N referred to Yamada *et al.* (2013) and Torao and Yanagimoto (2015). Haplotypes O–W appeared in this study. Parameter: H, HD, K, and π indicate number of haplotypes, haplotype diversity, average number of nucleotide differences, and nucleotide diversity, respectively.

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

| | Sampling sites | | | | | | | |
|-----|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------|
| | SAS | RAU | SHK | KUN | ICH | SHI | TOH | NIS |
| SAS | | -0.002 | 0.021 | 0.027 | -0.016 | -0.010 | 0.035 | -0.011 |
| RAU | 0.369±0.058 | | -0.002 | 0.000 | -0.007 | -0.004 | 0.002 | 0.015 |
| SHK | 0.072±0.026 | 0.279±0.046 | | -0.020 | 0.009 | 0.000 | -0.016 | 0.033 |
| KUN | 0.072±0.030 | 0.360±0.056 | 0.991±0.003 | | 0.016 | 0.007 | -0.017 | 0.040 |
| ICH | 0.937±0.028 | 0.423±0.043 | 0.198±0.038 | 0.126±0.024 | | -0.016 | 0.022 | -0.012 |
| SHI | 0.649±0.052 | 0.505±0.043 | 0.297±0.041 | 0.261±0.048 | 0.874±0.027 | | 0.013 | -0.008 |
| TOH | 0.054±0.031 | 0.288±0.038 | 0.829±0.018 | 0.910±0.029 | 0.099±0.039 | 0.171±0.025 | | 0.052 |
| NIS | 0.757±0.028 | 0.126±0.024 | 0.090±0.030 | 0.009±0.009 | 0.721±0.038 | 0.621±0.031 | 0.036±0.015 | |

No significant differences were found after applying sequential Bonferroni correction. Sampling sites: SAS, RAU, SHK, KUN, ICH, SHI, TOH, and NIS indicates the rivers Sashirui, Rausu, Shunkari-kotan, Kumbetsu, Shibetsu, Touhoro, and Nishibetsu, respectively.

ND5領域

根室海峡沿岸河川で採集されたカラフトマス434個体について、ND5領域の431塩基配列を決定した (Table 3)。Blast分析の結果、DNAデータベース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。得られたすべての塩基配列を雌雄に分けてAMOVA分析を行った結果、集団内の変異は0.88%となり、0より有意に大きな値ではなかった。このことから、雌雄では差がないものとして、集団間の比較には雌雄を合わせた結果を用いた。河川集団あたり、3~7個のハプロタイプが出現した。ハプロタイプ多様度は0.425~0.663であった (Table 3)。平均塩基置換数は0.435~0.848、塩基多様度は0.001~0.002であった (Table 3)。ハプロタイプの出現頻度をみると、ハプロタイプ1と2が多く主要なタイプであり、他のハプロタイプは1~3個しか出現しないマイナーなタイプであった (Table 3)。ペアワイズ F_{ST} 分析を行った結果、河川集団間には差がなかった (Table 4)。また、AMOVA分析を行った結果、集団間の変異の割合は1.32%で、0より有意

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

| Haplotype | Sampling sites | | | | | | | |
|-----------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | SAS | RAU | SHK | KUN | ICH | SHI | TOH | NIS |
| 1 | 19 | 21 | 12 | 22 | 22 | 17 | 15 | 27 |
| 2 | 34 | 36 | 37 | 25 | 25 | 25 | 40 | 29 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 17 | 4 | 2 | 1 | 1 | 2 | 5 | 0 | 3 |
| 18 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 23 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 59 | 59 | 51 | 48 | 49 | 52 | 56 | 60 |
| Parameter | | | | | | | | |
| H | 5 | 3 | 4 | 3 | 3 | 7 | 3 | 4 |
| HD | 0.569 | 0.508 | 0.426 | 0.529 | 0.548 | 0.663 | 0.425 | 0.571 |
| K | 0.663 | 0.533 | 0.445 | 0.549 | 0.585 | 0.848 | 0.435 | 0.637 |
| π | 0.002 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.002 | 0.001 | 0.001 |

Sampling sites: SAS, RAU, SHK, KUN, ICH, SHI, TOH, and NIS indicates the pink salmon populations from the rivers Sashirui, Rausu, Shunkari-kotan, Kunbetsu, Shibetsu, Touhoro, and Nishibetsu, respectively. Haplotypes 1-14 referred to Yamada et al.(2012) and Torao and Yanagimoto(2015). Haplotypes 17-24 appeared in this study. The parameters H , HD , K , and π indicate number of haplotypes, haplotype diversity, average number of nucleotide differences, and nucleotide diversity, respectively.

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

| | Sampling sites | | | | | | | |
|-----|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| | SAS | RAU | SHK | KUN | ICH | SHI | TOH | NIS |
| SAS | | | | | | | | |
| RAU | 0.955±0.020 | | | | | | | |
| SHK | 0.063±0.019 | 0.207±0.031 | | | | | | |
| KUN | 0.252±0.056 | 0.333±0.033 | 0.045±0.020 | | | | | |
| ICH | 0.414±0.047 | 0.477±0.049 | 0.009±0.009 | 0.991±0.003 | | | | |
| SHI | 0.423±0.051 | 0.324±0.049 | 0.027±0.014 | 0.279±0.044 | 0.441±0.034 | | | |
| TOH | 0.225±0.046 | 0.216±0.034 | 0.775±0.024 | 0.090±0.024 | 0.072±0.030 | 0.081±0.032 | | |
| NIS | 0.243±0.047 | 0.243±0.024 | 0.018±0.012 | 0.892±0.021 | 0.991±0.003 | 0.333±0.019 | 0.045±0.020 | |

No significant differences were observed after applying sequential Bonferroni correction. Sampling sites: SAS, RAU, SHK, KUN, ICH, SHI, TOH, and NIS indicates the rivers Sashirui, Rausu, Shunkari-kotan, Kunbetsu, Shibetsu, Touhoro, and Nishibetsu, respectively.

に高い値とならなかった ($p < 0.01$)。

D-Loop領域

根室海峡沿岸河川で採集されたカラフトマス341個体について、D-Loop領域の431塩基配列を決定した。Blast分析の結果、DNAデータベース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が得られたことが分かった。得られたすべての塩基配列を雌雄に分けてAMOVA分析を行った結果、集団内の変異は1.47%となり、0より有意に大きな値ではなかったことから雌雄では差がないものとして、集団間の比較には雌雄を合わせた結果を用いた。河川集団あたり、3~7個のハプロタイプが出現した。ハプロタイプ多様度は0.425~0.663であった (Table 5)。平均塩基置換数は0.435~0.848、塩基多様度は0.001~0.002であった

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

| Haplotype | Sampling sites | | | | | | | |
|-----------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | SAS | RAU | SHK | KUN | ICH | SHI | TOH | NIS |
| CR15-1 | 9 | 9 | 2 | 8 | 14 | 7 | 7 | 8 |
| CR15-2 | 5 | 1 | 2 | 5 | 4 | 7 | 6 | 3 |
| CR15-3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CR15-4 | 14 | 17 | 6 | 8 | 14 | 25 | 22 | 10 |
| CR15-5 | 9 | 10 | 7 | 2 | 2 | 5 | 13 | 2 |
| CR15-6 | 3 | 2 | 0 | 0 | 2 | 4 | 0 | 1 |
| CR15-7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CR15-8 | 3 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 2 |
| CR15-9 | 4 | 0 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | 0 |
| CR15-10 | 2 | 5 | 1 | 2 | 2 | 1 | 5 | 0 |
| CR15-11 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CR15-12 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CR15-13 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CR15-14 | 1 | 2 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| CR15-15 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| CR15-16 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| CR15-17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| CR15-18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| CR15-19 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 55 | 51 | 21 | 28 | 47 | 55 | 56 | 28 |
| Parameter | | | | | | | | |
| H | 12 | 10 | 7 | 7 | 10 | 9 | 6 | 6 |
| HD | 0.835 | 0.818 | 0.790 | 0.799 | 0.794 | 0.740 | 0.768 | 0.738 |
| K | 1.604 | 1.658 | 1.276 | 1.439 | 1.630 | 1.274 | 1.251 | 1.339 |
| π | 0.003 | 0.003 | 0.002 | 0.003 | 0.003 | 0.002 | 0.003 | 0.002 |

Sampling sites: SAS, RAU, SHK, KUN, ICH, SHI, TOH, and NIS indicates the rivers Sashirui, Rausu, Shunkari-kotan, Kunbetsu, Shibetsu, Touhoro, and Nishibetsu, respectively. Haplotypes appear in this study. Parameter: H , HD , K , and π indicate number of haplotypes, haplotype diversity, average number of nucleotide differences, and nucleotide diversity, respectively.

Table 6 Estimates of pairwise differentiation for mitochondrial D-Loop haplotypes in the collections of pink salmon from the rivers of the Nemuro Strait, eastern Hokkaido. F_{ST} values are shown above diagonal and $F_{ST} p$ values below diagonal.

| | Sampling sites | | | | | | | |
|-----|----------------|-------------|---------------|--------------|-------------|-------------|---------------|--------|
| | SAS | RAU | SHK | KUN | ICH | SHI | TOH | NIS |
| SAS | | -0.008 | -0.004 | 0.024 | 0.017 | -0.007 | -0.006 | 0.037 |
| RAU | 0.694±0.053 | | 0.001 | 0.032 | 0.014 | 0.002 | 0.000 | 0.039 |
| SHK | 0.586±0.060 | 0.297±0.056 | | 0.102 | 0.077 | 0.025 | -0.019 | 0.122 |
| KUN | 0.108±0.023 | 0.063±0.019 | 0.000±0.000** | | -0.022 | 0.033 | 0.076 | -0.023 |
| ICH | 0.099±0.032 | 0.126±0.034 | 0.027±0.014 | 0.964±0.014 | | 0.022 | 0.061 | -0.020 |
| SHI | 0.721±0.041 | 0.351±0.037 | 0.144±0.034 | 0.036±0.015 | 0.072±0.026 | | 0.009 | 0.040 |
| TOH | 0.568±0.058 | 0.369±0.034 | 0.721±0.038 | 0.000±0.000* | 0.009±0.009 | 0.225±0.037 | | 0.102 |
| NIS | 0.063±0.031 | 0.036±0.015 | 0.009±0.009 | 0.928±0.027 | 0.901±0.019 | 0.054±0.020 | 0.000±0.000** | |

**indicate significant differences after sequential Bonferroni correction. Sampling sites: SAS, RAU, SHK, KUN, ICH, SHI, TOH, and NIS indicates Sashirui, Rausu, Shunkari-kotan, Kunbetsu, Shibetsu, Touhoro, and Nishibetsu, respectively.

(Table 5)。ハプロタイプの出現頻度をみると、CR15-1, 2, 4, 5, 10の出現頻度が高く主要なハプロタイプであり、他のハプロタイプは数個しか出現しないマイナーなタイプであった (Table 5)。ペアワイズ F_{ST} 分析を行った結果、薫別川-当幌川, 薫別川-春苺古丹川, 西別川-当幌川の3集団に5%で有意差があったが、他の集団間には差がなかった (Table 6)。また、AMOVA分析を行った結果、集団間の変異の割合は1.54%で、0より有意に高い値とならなかった ($p<0.01$)。

偶数年級群と奇数年級群の比較

2014年と2015年に採集された根室海峡沿岸河川集団、およびルシャ川の2008年と2009年の4集団について、COI領域およびND5領域の塩基配列によるペアワイズ F_{ST} 分析を行った結果、いずれの領域でも差が認められたのは、根室海峡沿岸河川の2014年と2015年、根室海峡沿岸河川の2014年とルシャ川の2009年、根室海峡沿岸河川の2015年とルシャ川2008年、およびルシャ川2008年と2009年の4つの組み合わせであった (Table 7, 8)。また、根室海峡沿岸河川の2014年と2015年について、D-Loop領域の塩基配列によるペアワイズ F_{ST} 分析を行った結果、有意な差が認められた ($p<0.01$)。

Table 7 Estimates of pairwise differentiation for mitochondrial COI haplotypes among the year-classes of pink salmon. F_{ST} values are shown above diagonal and $F_{ST} p$ values below diagonal.

| | Sampling sites | | | |
|-------|----------------|-------------|-------------|--------|
| | RU08 | RU09 | NMS14 | NMS15 |
| RU08 | | 0.487 | -0.007 | 0.446 |
| RU09 | 0.000±0.000 | | 0.510 | -0.001 |
| NMS14 | 0.811±0.038 | 0.000±0.000 | | 0.460 |
| NMS15 | 0.000±0.000 | 0.333±0.039 | 0.000±0.000 | |

The populations RA08, RU09, NMS14, and NMS15 indicate the Rusha River in 2008, the Rusha River in 2009 (Yamada et al., 2010), the rivers facing the Nemuro Strait in 2014 (Torao and Yanagimoto 2015), and the rivers facing the Nemuro Strait in 2015 (In this study), respectively.

考 察

2015年に回帰した根室海峡沿岸の河川のカラフトマス奇数年級群について、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、遺伝的には1つの集団と考えられた。遡河回遊魚であるサケ科魚類において、河川集団間で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な隔離や母川回帰による地理的な隔離など、生殖隔離が生じる機構が必要である。しかし、カラフトマスは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)。近年の調査では、北海道においてもカラフトマスの迷入率の高さを示唆するデータが得られており (藤原, 2011; 虎尾, 2012), これ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。また、カラフトマスの人工孵化放流で、捕獲河川以外への移植放流が頻繁に行われていることも影響しているかも知れない。本研究では河川集団間で遺伝的な差異は見られなかったが、北海道におけるカラフトマスは漁獲動向の類似性や形態的特徴から、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; 下田ら, 2010;

Table 8 Estimates of pairwise differentiation for mitochondrial ND5 haplotypes among the year-classes of pink salmon. F_{ST} values are shown above diagonal and $F_{ST} p$ values below diagonal.

| | Sampling sites | | | |
|--------|----------------|-------------|-------------|--------|
| | RU08 | RU09 | doto14 | doto15 |
| RU08 | | 0.345 | 0.002 | 0.399 |
| RU09 | 0.000±0.000 | | 0.287 | 0.002 |
| doto14 | 0.189±0.034 | 0.000±0.000 | | 0.381 |
| doto15 | 0.000±0.000 | 0.297±0.047 | 0.000±0.000 | |

The populations RA08, RU09, doto14, and doto15 indicate the Rusha River in 2008, the Rusha River in 2009 (Yamada et al., 2010), the eastern area of Hokkaido in 2014 (Torao and Yanagimoto 2015), and the eastern area of

Ando *et al.*, 2010)。野生魚資源が多いとされる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、自然産卵が行われている河川や異なる遡上時期のカラフトマス集団についても、今後の検証が必要である。

根室海峡沿岸河川に回帰したカラフトマスの偶数年級群（2014年回帰）と奇数年級群（2015年回帰）の遺伝的な差異を検討したところ、年級群間では遺伝的な差異が認められた。また、山田ら（2012）の2008年と2009年のルシャ川のデータを用いて、根室海峡沿岸河川集団と比較したところ、同様に同じ偶数・奇数年級群内では有意差は認められず、異なる年級群間のみで遺伝的な差異が認められた。偶数年と奇数年級群間で遺伝的な差が認められるという結果は、北米やロシアのカラフトマスでも多くの報告があり（岡崎, 1991; Aspinwall, 1974; Beacham *et al.*, 1985; 2012; Olsen *et al.*, 1998; Hawkins *et al.*, 2002）、カラフトマスの集団構造として一般的なものと考えられる。一方で、北米のカラフトマスでは、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がある（Beacham *et al.*, 2012; Seeb *et al.*, 2014）。根室海峡沿岸河川集団の偶数年級群（虎尾・柳本, 2015）と奇数年級群（本研究）におけるmtDNAのハプロタイプ多様度と塩基多様度はむしろ偶数年級群において高い傾向がみられ、北米のカラフトマス集団の結果とは異なる。多様性についてはデータが十分ではないものの、1つの可能性としては、回帰資源量の影響を受ける可能性がある。根室海区における沿岸漁獲数は2014年が約63,000尾、2015年は322,000尾であり、サンプリングを行った2年間では、遺伝的変異性が高いと考えられた偶数年級の回帰資源量が少なかった。また、根室海区におけるカラフトマスの標識放流試験からは、偶数年級群で母川回帰性が高い傾向が見られており（虎尾・宮本, 2015; 2016）、遺伝的多様性に関連しているかも知れない。今後、北海道におけるカラフトマスの分布域で広くサンプリングを行い集団構造や遺伝的多様度を検証するとともに、カラフトマスの母川回帰性や迷入程度など生態との関連性を含めて研究を進める必要がある。

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感謝いたします。

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.

Beacham TD, McIntosh B, MacConnachie C, Spilsted B, White BA. Population structure of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) in British Columbia and Washington, determined with microsatellites. *Fish. Bull.* 2012; **110**: 242–256.

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 ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* 2005; **1**: 47–50.

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.
- Morita K, Morita SH, Fukuwaka M. Population dynamics of Japanese pink salmon (*Oncorhynchus gorbusha*): 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.
- Ohnuki T, Morita K, Tokuda H, Okamoto Y, Ohkuma K. Numerical and economic contributions of wild and hatchery pink salmon to commercial catches in Japan estimated from mass otolith markings. *N. Am. J. Fish. Manag.* 2015; **35**: 598–604.
- 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 gorbusha* (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 gorbusha*) 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.
- 虎尾 充, 柳本 卓. 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. 北海道立水産試験場研究報告 2015; **88**: 17–24.
- 虎尾充・宮本真人. 根室海区におけるカラフトマスの回帰特性に関する研究. 「平成25年度道総研さけます・内水面水産試験場事業報告書」, 恵庭. 2015; 20–21.
- 虎尾充, 宮本真人. 根室海区におけるカラフトマスの回帰特性に関する研究. 「平成26年度道総研さけます・内水面水産試験場事業報告書」, 恵庭. 2016; 21–23.
- 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, 梶山雅秀. ミトコンドリアDNA分析によるカラフトマス *Oncorhynchus gorbusha* 集団構造の年級群比較. 日本水産学会誌 2012; **78**: 973–975.