

氏 名	水 野 米 利 子
学位 (専攻分野の名称)	博 士 (生物産業学)
学位記番号	甲 第 780 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 17 日
学位論文題目	Phylogeny and population genetics of Japanese harbour seals(<i>Phoca vitulina</i>),the southernmost population in west Pacific.
論文審査委員	主査 教 授・博士 (獣医学) 小 林 万 里 教 授・水産学博士 塩 本 明 弘 教 授・水産学博士 白 井 滋 教 授・博士 (理学) 佐々木 剛

論文内容の要旨

序 章

ハーバーシール (*Phoca vitulina*) は採餌および交尾は水中で行うが、休息、出産・子育て (繁殖)、換毛を上陸場で行う半水生の哺乳類であり、北半球に広く生息する。分布域は鳍脚類の中で最大であり、亜種の数も、研究者により見解は異なるが、少なくとも太平洋および大西洋にそれぞれ 2 亜種ずつの計 4 亜種 (西太平洋: *P. v. stejnegeri*, 東太平洋: *P. v. richardii*, 西大西洋: *P. v. concolor*, 東大西洋: *P. v. vitulina*) が知られている。北海道は西太平洋亜種 (*P. v. stejnegeri*) の生息域の最南端であり、上陸場はえりもに 1 ヲ所、厚岸に 4 ヲ所、浜中に 4 ヲ所、根室に 2 ヲ所の計 11 ヲ所が知られている。最も離れた上陸場間の距離は、えりもと厚岸の 150km で、その他の上陸場は北海道東部地域 (以下 道東) の 75km 範囲に 10 ヲ所が点在する。

一般にハーバーシールは、干潟、砂州、岩、岩礁、流氷などの自然物から、ブイや丸太などの人工物など様々な場所に上陸することが知られているが、日本では岩礁のみを上陸場として利用し、そこで休息、繁殖、換毛を行う。太平洋の中でも、西太平洋亜種は、オスとメスで体長が異なり、比較的大型であることが知られているが、日本のハーバーシールの成獣はさらに体長が大きく、千島列島に生息する同亜種を上回ることが示唆されている。また、日本のハーバーシールの毛色は暗色型 (黒もしくは黒っぽい背景に明るい点か輪状の模様) のほうが、明色型 (明るい背景に暗い色の点や輪の模様) よりも割合が高く、暗色型の比率は太平洋で最大である。

ハーバーシールは毎年繁殖期に同じ上陸場を利用し、オスメスともに生まれた上陸場、もしくは生まれた上陸場に近い上陸場を繁殖期に利用することが示されている。また、遺伝子研究でも、母系遺伝するミトコンドリア DNA (mtDNA) と両親から遺伝するマイクロサテライト (MS) DNA 両方で、飛び石状の遺伝子流動を示し、地理的に近いグループは遺伝的に

より近い関係にある。

MtDNA は哺乳類で母系遺伝し、減数分裂の際に遺伝子同士の組み換えが起こらないため系統学の研究に適している。過去の mtDNA の調節領域を使用した系統学の研究では、ハーバーシールがベーリング海峡を通り太平洋に移入後、どのように分布を広げたかで異なる仮説が混在しており、太平洋における日本産ハーバーシールの分岐背景は明確にされていない。一方、日本のサンプルのみを使用した系統解析では、日本には2つの系統があることを示していたが、mtDNA の異なる領域を使用していたため、他地域との比較が出来ていない。

MS は、両親から遺伝し、置換速度が速く、多様性も高いため近年の集団遺伝研究に頻繁に使われてきた。また、哺乳類では一般的にオスがメスよりも広く分散し、遺伝子流動もオスで高いため、MS と mtDNA の2つの遺伝子マーカーを比較することで、遺伝子流動におけるオスとメスの違いを見ることができる。ハーバーシールでもオスで高い遺伝子流動を示す地域がある一方、最終氷期に集団が孤立したと考えられる集団（東太平洋ハーバーシール）では、mtDNA と MS で同様の集団分けが示され、歴史的背景が現代の集団遺伝に影響することが示唆されている。さらに、日本のハーバーシールは1970年代に個体数が減少し、1998年に環境省の絶滅危惧種に指定され保護が始まると個体数は徐々に増加し、2015年には準絶滅危惧種にダウンリストされている。このことから日本に生息するハーバーシールは個体数の増減の影響が遺伝的多様性に影響している可能性もある。しかしながら、現在まで日本の集団においてMSを使用した研究はされておらず、mtDNA との比較ができず、集団遺伝や近年の個体数減少の影響も不明のままである。

ハーバーシールは毎年自らが出生した上陸場を繁殖上陸場として利用する傾向があり、繁殖期に、繁殖上陸場を利用する集団ごとで、それぞれ異なる遺伝的特徴を持つことが考えられる。そのため、mtDNA と MS で繁殖期の繁殖上陸場ごとの遺伝的特徴を把握することで、ハーバーシールの繁殖期の繁殖上陸場に対する依存性の高さが分かり、さらに、非繁殖期と比較することで季節移動を推定できる可能性がある。しかし、ハーバーシールの生態情報を加味し、遺伝的特徴を季節で比較した研究報告はない。

そこで本研究では、日本の主要繁殖上陸場からサンプルを収集し、地域ごとのサンプル数をそろえた上で、(1) mtDNA の調節領域を使用して、他地域に生息するハーバーシールとの系統比較を行い日本産ハーバーシールの歴史的な分岐背景を明らかにし (2) MS で、近年の集団遺伝および個体数変動の影響を検証、さらに (3) mtDNA および MS により、繁殖期の繁殖上陸場ごとの遺伝的特徴を把握し、非繁殖期と比較することで季節的な個体の移入を検証した。

第1章 mtDNA による日本産ハーバーシールの分子系統

これまでの mtDNA の調節領域を使用した系統学の研究では、ハーバーシールが太平洋に

移入後どのように分布を広げたかについて、日本を太平洋における初期定着集団として西から東へ分布を広げた説、日本とワシントンの集団両方を初期定着集団として西と東両方に同時に移入した説、もしくは日本を後期定着集団として東から西へ分布を広げた説の3つの異なる説があった。これらの研究では、日本のハーバーシールを太平洋で祖先的、もしくは派生的のいずれか1つの系統として扱っており、サンプル数も少なかった ($n < 14$)。一方、日本のサンプルのみで、mtDNAのシトクロムb領域を使用した系統解析では、日本には2つの系統があることを示していたが、調節領域を使用した他地域との比較はできていない。

そこで第1章では他地域の研究と比較できるように、mtDNAの調節領域(454bp)を使用して、日本のハーバーシール(*P. v. stejnegeri*)の分岐の歴史および、他地域に生息するハーバーシールとの系統関係を明らかにすることを目的として解析を行った。系統樹およびハプロタイプネットワーク図ともに、日本のハーバーシールには少なくとも2つの系統が存在することを示し、これらの系統は長期間の孤立を経験した後、別々の時期に日本に移入してきたことがミスマッチ分析で示唆された。さらに、その1つの系統は日本個体のみで構成されており(P1: 日本固有型)、日本の最南端に位置するえりもでその個体の割合が最も高く、根室に向かうにつれ徐々に減少し、もう1つのグループのハプロタイプはアラスカのブリストルベイやコマンドル島などの北太平洋の集団と系統的に近い関係を示した(Other: 北部由来型)。ハーバーシールの化石が下北半島の最終氷期前の地層から出土したこと、また最終氷期は季節的海氷がえりも付近まで南下していたと考えられることから、日本固有型は初期に日本に定着した後、最終氷期に季節的海氷により孤立し(初期定着集団)、その後海氷が消失するともう1つの系統が北部から日本に移入してきたと考えられた(後期定着集団)。遺伝的分化係数でも、えりもと道東は2つの集団に分かれることを示し、遺伝的多様度も2地域で異なる傾向を示したことから、過去の孤立が現代でも強く影響していると考えられた。

第2章 日本に生息するハーバーシールの近年の集団遺伝

第1章では、mtDNAから、日本のハーバーシールには2つの系統があり、えりもと道東は遺伝的に分化していることが示された。一方、MSはmtDNAと比較して多様性が高く、近年の集団遺伝を示すのに適しているが日本のハーバーシールではMSを用いた研究は行われていない。日本のハーバーシールは1940年代にはえりもで300頭および道東で少なくとも600頭ほどいた個体数が1970年代に激減(128頭以下と216頭以下)したと言われているため、MSを使用することで、個体数減少の遺伝的多様性への影響の評価が行える可能性がある。

そこで第2章では、MS10遺伝子座(Pvc19, Pvc78, Pvc30, SGPV16, SGPV11, SGPV10, Hg3.7, Aa4, SGPV9, M11A)を使用し、日本に生息するハーバーシールの近年の集団遺伝を把握することを目的とした。結果、遺伝的多様度は両地域で同程度だったが、遺伝的分化

係数および STRUCTURE 解析による集団数の推定では、日本のハーバーシールは、mtDNA を使用した場合と同様、えりもと道東の2地域で遺伝的に異なることが示された。しかしながらえりもと道東は150 kmしか離れておらず、これらの地域間に地理的分断を起こすような障害物はない。このような2地域で強い遺伝的分化を示したことは、日本におけるハーバーシールの上陸場の数および個体数は他地域と比較して少ないこと、上陸場は岩礁のみであることが要因であると考えられた。また、えりもでは、上陸場はいくつかの細かい岩礁が1.3 kmにわたって連続して沖に向かって伸びているのに対し、道東では75 km範囲の沿岸に10の上陸場が点在していることも、日本に生息しているハーバーシールをえりもと道東で遺伝的に強く分化させたと考えられた。さらにボトルネック解析により近年の個体数減少は、遺伝的ボトルネックを起していないと判断されたことから、1970年代のえりもおよび道東の個体数減少は、遺伝的多様性に影響するほど大きくなかった可能性が示された。

第3章 繁殖期および非繁殖期における北海道道部のハーバーシールの遺伝的特徴

第1章、第2章では、mtDNA および MS で、日本のハーバーシールはえりもと道東の2集団に分けられることが明らかになった。道東の主要繁殖上陸場は、厚岸、浜中、根室それぞれで約30km ずつ離れた場所にある。ハーバーシールは毎年繁殖期に同じ繁殖上陸場を利用することが知られているため、繁殖期に繁殖上陸場を利用する集団ごとに、それぞれで遺伝的特徴があると推察される。

そこで、第3章では、繁殖期に道東の主要繁殖上陸場からサンプルを集め、MS および mtDNA 両マーカーを使用して、繁殖期・繁殖上陸場ごとに遺伝的特徴を把握し、ハーバーシールの繁殖上陸場への依存性の高さを検証した。さらに、繁殖期と非繁殖期でそれらの遺伝的特徴を比較することにより、季節移動の有無も検証した。結果、繁殖期で見られた mtDNA ハプロタイプの系統（初期定着集団および後期定着集団）の割合は地域間であまり変化はなかったが、MS をクラスター解析した結果、厚岸、浜中、根室はそれぞれ上位2つのクラスターの組み合わせが異なり、また、隣り合う地域同士で遺伝的特徴が類似しており、飛び石状の遺伝子流動を示した。このことから、歴史的には道東にアザランが移入してから繁殖集団間で mtDNA の遺伝的特徴に違いが生じるような長い時間が経過していないが、mtDNA と比較して変異が起りやすい MS で地域毎に遺伝的特徴が見られたことから、日本のハーバーシールは繁殖期に自分が出生した繁殖上陸場への依存度が高いことを示した。非繁殖期には、mtDNA で繁殖期には見られなかった、後期定着集団の特異的ハプロタイプを持つ個体が根室・浜中の順で多く見られ、さらに MS で、厚岸で、非繁殖期に根室に多かったクラスターが増加し、浜中と根室では繁殖期にはどの地域でも優勢でなかったクラスターの増加が見られたことから、他地域からの季節移動が示された。根室のすぐ東に位置する歯舞群島には、比較的大規模の繁殖上陸場 (>900 頭) があり、過去に歯舞群島から道東への

個体の移入が示唆されていることから、浜中と根室で非繁殖期にのみに見られた mtDNA の後期定着集団のハプロタイプおよび、MS で非繁殖期のみで割合が増加したクラスターは歯舞群島の遺伝的特徴を示している可能性が考えられた。

総合考察

本研究で初めて遺伝的データを元に日本のハーバーシールの分岐背景、現代の集団遺伝、繁殖期の繁殖上陸場ごとの遺伝的特徴を、多面的に理解することが出来た。

MtDNA データから、日本には最終氷期に海氷が南下してきた際に分断を受けたと考えられる初期定着集団と、海氷が消失後、北から移入してきた後期定着集団が存在し、それらの割合はえりもと道東で大きく異なっていることが示された。さらに MS を用いた解析でも、えりもと道東は遺伝的に大きく分化していることが示され、現代でも 2 地域間ではほとんど移動がないことが示された。ハーバーシールにとって、えりもと道東間の 150km は容易に移動できる距離であり、障害物がないにもかかわらず、これら地域間で遺伝子流動がほとんどないことは、日本のハーバーシール特有の生態的特徴が考えられた。日本でハーバーシールは、岩礁のみを上陸場として利用し、上陸場の数と個体数は他地域に比べて少なく、えりもと道東で上陸場の広がる方向が異なることもより定着性を強めている要因と考えられた。さらに、両地域とも 1970 年代に個体数の減少を経験したと言われているが、MS からはその影響は見られなかった。また、mtDNA および MS を用いて繁殖期に繁殖上陸場ごとに遺伝的特徴を比較してみると、mtDNA では繁殖集団ごとに 2 つの系統の割合に違いが見られなかったが、MS では、傾向は明白でないものの、遺伝的特徴は異なる傾向を示し、近い地域間で飛び石状の遺伝子流動が見られたことから、道東にハーバーシールが移入してから、繁殖集団ごとに mtDNA に系統的な違いが出るほど歴史的には時間が経過していないこと、日本のハーバーシールは繁殖期に出生した上陸場を利用する依存度が高いことが示唆された。また、非繁殖期には、mtDNA および MS 両方で繁殖場を利用している個体とは異なる遺伝的特徴を持つ個体が各海域を利用していることが示され、それらは歯舞群島の個体である可能性を示した。

本研究では初めて日本のハーバーシールの太平洋における系統的な立位置を示し、特にえりも個体は太平洋の中でも特異的であることを示した。さらに、ハーバーシールの生態情報を加味し、季節を分けて遺伝子解析することにより、繁殖集団の遺伝的特徴の把握をし、繁殖上陸場への依存度の高さや、非繁殖期における他地域からの移入を示すことができた。このことは、ハーバーシールの個体数管理を行っていく上で重要な知見となると考えられた。

審査報告概要

本論文は、北海道のハーバーシールに着目し、(1) mtDNA の調節領域を使用して、他地域に生息するハーバーシールとの系統比較を行い日本産ハーバーシールの歴史的分岐背景を明らかにし (2) マイクロサテライト核 DNA で、近年の集団遺伝および個体数変動の影響を検証、さらに (3) mtDNA およびマイクロサテライト核 DNA により、繁殖期の繁殖上陸場ごとの遺伝的特徴を把握し、非繁殖期と比較することで季節的な個体の移入を検証した。本研究では初めて日本のハーバーシールの太平洋における系統的な立位置を示し、特にえりも個体は太平洋の中でも特異的であることを示した。さらに、ハーバーシールの生態情報を加味し、季節を分けて遺伝子解析することにより、繁殖集団の遺伝的特徴の把握をし、繁殖上陸場への依存度の高さや、非繁殖期における他地域からの移入を示すことができた。このことは、ハーバーシールの個体数管理を行っていく上で重要な知見となると考えられた。よって、審査員一同は博士（生物産業学）の学位を授与する価値があると判断した。