

水産資源管理談話会報

第 31 号

日本鯨類研究所 資源管理研究センター

2003年 6月

翻訳・公表希望者は以下の手続きとり、著者の許可を得た上で翻訳・公表する。

1. 翻訳・公表希望者は文章（FAX、手紙）で著者、表題および会報の号を明記し、資源管理談話会事務局を通じて要請し、著者の許可を得て翻訳・公表する。
2. 翻訳公表物を資源管理談話会事務局に送付する。

目次

お知らせ	2
系統群あれこれ	中坊 徹次 3
遺伝距離と系統推定	斉藤 憲治 23
まぐろ・かじき類の系群判別	張 成年 29

財団法人 日本鯨類研究所
資源管理研究センター

〒104-0055 東京都中央区豊海町 4-5 豊海振興ビル

TEL 03-3536-6521

FAX 03-3536-6522

はじめに

まぐろ・かじき類のような高度回遊性魚種では系統群あるいは系群とよばれる遺伝学的に異なる分集団というものが存在しにくいものと考えられている。しかし、資源管理や評価を行うにあたっては何らかの区分が必要であるため、便宜上、各大洋や各大洋の南北半球ごとあるいは東西海域で区切って別資源あるいは系群と想定することが多い。地理的な区分という意味では、大洋で分けるという操作は妥当であろう。また、生物学的情報を活用することもある。例えば大西洋クロマグロはメキシコ湾と地中海に 2 大産卵場が見られることにより、西経 45 度で区切った東西で資源の管理と評価が行われてきた。また、ビンナガの漁獲量は赤道付近の海域ではかなり低いこと、また産卵場も熱帯域よりやや高緯度になされた海域にあり南北半球で産卵ピークの季節が逆転していることから、インド洋以外では各大洋ごとに赤道で分けた南北系群として別々に管理や評価が行われている。一方、熱帯域の東西に幅広く産卵場を持つキハダ、メバチではあえて赤道で系群を分ける根拠が薄いため大洋ごとで資源の評価と管理が行われているが、太平洋では西部と東部で分けて資源評価を行う場合も見られる。大洋という区分は理解しやすい概念であるものの地理的枠組み以外に根拠はない。管理や評価の単位を真に生物学的根拠に基づいた本質的なものとして理解するために、形態的変異や寄生虫相の分析、標識放流そして近年では遺伝的多型解析手法が応用されてきた。

ここでは、まぐろ・かじき類についての標識放流や遺伝子マーカーを用いた研究の現状を簡単に紹介する。

1. 標識放流

個体群間になんらかの隔離が働き、遺伝子型頻度が違ってくるといったシナリオにはある程度の時間が必要である、個体群サイズが極端に小さくなった場合にはかなり短い期間でも遺伝子型頻度に大きな変化が起こりうるが、多くの場合数百年とか数千年のオーダーあるいはそれ以上かも知れない。突然変異による新規対立遺伝子の導入はあるかもしれないが、非常に近い過去に隔離が起こり、我々が目の当たりにしている種という集団がゆっくりと分集団に分化する過程のまっただ中にいる場合や、系群間に少しでも遺伝子の“漏れ”がある場合にはそれが一時的あるいは断続的であったとしても、ある研究者が生きているうちに異なる系群を識別しうる遺伝子マーカーを発見できるチャンスは少ないであろう。生態や形態等の情報から明らかに異なる個体群と考えられる場合でもそれら個体群間に何ら有意

義な遺伝的差異が見出せないケースはよくある (Kornfield et al., 1982)。これらが、技術的に遺伝的差異を検出できないためなのか、生態や形態の変異がかなり可塑性のあるものであるからなのかはよくわからない。このようなことから、現時点での個体の移動がわかるという点で、標識放流はすぐれている。ここでは、近年発展してきたハイテクタグについて解説する。

I-1) アーカイバルタグタグ

プラスチック製のスバゲティタグに代表される通常標識は安価で手軽であり、かなり昔から使われてきた。しかし、放流と再捕地点しかわからずその途中は一体どこでどのような行動をとっていたのかはわからない。これを解決するために、マイクロプロセッサを基盤にしたデータ蓄積機能を持つアーカイバルタグが近年開発され利用されている。これは、温度、圧力、照度に対するセンサーを持ち、水温、水深、照度を一定時間間隔で記録してゆく。日出—日没間隔から緯度、日出と日没の時刻から経度が推定できる (図1)。緯度については誤差が比較的大きいので表面水温データを用いてチューニングする。長所は、設定した時間間隔での魚が遊泳していた水深、水温情報が得られること、約2メガ程度の情報が蓄積できること、電池寿命が7年程度と比較的長いことである。このタグは再捕されないと同収されないことが欠点である。まぐろ類では、豪州南西沿岸で標識放流されたミナミマグロ1個体が1年後にほぼ同じ海域で再捕されたが、蓄積されたデータによってケープ神近くまで回遊していたことが明らかにされた (Gunn et al., 1996)。また、太平洋クロマグロでは、1995、1996年に放流したクロマグロ幼魚105個体のうち放流後1年以上を太平洋で過ごしたと思われる5個体の標識からデータが回収され、渡洋回遊の実態や回遊生態が明らかにされている (Inagake et al., 2001)。このタグの需要は年々増加傾向にあり1本あたり10万円程度と価格も安くなってきつつある。

I-2) ポップアップタグ

アーカイバルタグの短所は、装着個体が再捕されないかぎり情報が得られないことである。そこで、ポップアップタグ (正確には pop-up satellite tag) が考案された (図2)。これは魚体外に装着する情報記録発信装置で、設定した時間になると自動的に魚体から切り離されて浮上し衛星にデータを送信する。装着個体を再捕する必要がないことが最大の長所である。1997年に Block et al. (1998)は離脱期間をいくつか設定したタグをノースカロライナ沖 (北緯約 35 度) で漁獲した大型のクロマグロ 37 個体に試験的に装着し放流した。また、Lutcavage et al. (1999)は Gulf of Maine で 20 個体のクロマグロ成魚 (体長 1.9 から 2.6m) にタグをつけ 9-10 月に放流した。切り離されたタグから送信されてきたデータによると、

メキシコ湾及び地中海での産卵期であったものの、予想に反して多くの個体が中部大西洋（西経 40-60 度、北緯 32-42 度）に滞留しており、魚の体長から考えてこのような海域でも産卵している可能性があることを指摘している。このように、ポップアップタグは再捕する必要が無い点で優れているが、タグの浮上位置と限られた期間の水温データのみ記録発信することと電池寿命が 1 年程度と短いことそして高価なこと（1 本 40 万円程度）が短所である。

I-3) ポップアップアーカイバルタグ

アーカイバルとポップアップ両方の長所を併せたポップアップアーカイバルタグが開発されている。これは、アーカイバルタグのように水温、水深、照度をメモリーに記録し、設定された時間が経過した時点で魚体から切り離され浮上後、アルゴス衛星にこれらのデータを送信するものであり今後主流になってゆくであろう。さらに、送信データサイズを小さくするために、タグ内のマイクロコンピューターで位置を計算させて照度記録は送信せず位置情報のみを送信するもの、また水深と温度についても時系列データそのものを送信するのではなく、時間を横軸にとった水温と水深についての 1 日当たりのヒストグラムを送信するというものが考案され、実際に販売されている。かなり高価ではあるが、確実に大量のデータが得られるのであれば費用対効果を充足させるものかもしれない。

I-4) タグの今後

これらのハイテク IC 標識は装置自体が大きく、比較的大きな魚種でしか使えないことや、電池寿命やメモリー容量に限界があること、位置の推定は照度に依存しているため、昼間は太陽光が届かない深度まで潜り、夜間に浅いところに浮上するような魚種や砂泥中に潜るような種では位置がわからないこと等、改良すべき点は多くある。しかし、これらは遅かれ早かれ確実に克服されよう。これらのタグの使用目的は、系群識別の問題というよりは行動、回遊生態の解明がメインテーマである。大西洋クロマグロのように東西系群の存在とその境界についての問題にチャレンジする目的で利用されたケースもあるが、それとて過去の通常標識の域を大きく凌駕しているわけではない。しかし、今後、さらに需要が増すとともに単価が下がれば、放流個体数も飛躍的に増加するであろうし、そうなれば、系群の問題にも十分対処できるようになるであろう。

II. 遺伝子マーカーを応用した系群解析

II-1) 遺伝的多型の検出

別系群と想定した個体群からの標本間に遺伝的差異があるかどうかを知るためにはまず

遺伝的多型の検出が必要である。1970年代にはアインザイムが主流であり、1980年代後半からはDNA多型の応用が主流となってきている。現在のDNA多型検出のほとんどはPCR法に基礎をおくものであり、制限酵素によるRFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析、塩基配列の直接決定、あるいはゲノム中の多くの多型マーカーを同時に検出できる AFLP (amplified fragment length polymorphism) や RAPD (random amplified polymorphic DNA) 法、特定塩基配列間に差異があるかどうかを知る方法としての SSCP (single strand conformation polymorphism) 法等、様々な多型検出技術が開発されている。分析手法としては簡便化と多型検出感度の高さに重きが置かれ、分析対象としてはより高いレベルの多型が検出できる領域の探索という傾向が見られる。しかし、実用という面から考えると出来る限り単純なマーカーのほうが扱いやすい。系群識別という分野に関する限り新しい手法、より高度な多型を検出できる方法や領域が常に良いとは限らない。すなわち、系群間の差異が検出できるか否かは基本的には手法によるのではなく、population dynamics の歴史そのものに依存している。

II-2) 標本

この分野の研究はほぼ標本依存であるといっておく、異系群と想定される個体群からの基準標本があることが重要な基礎となる。例えば産卵場が地理的あるいは季節的に異なっているとか地理的障壁があるという情報があるならば、そこからの個体群が良い基準となり、いかにその場所あるいは季節出身の標本を得ることができるかが重要である。標本数とそれを構成する個体数は多ければ多い程良いのは当然であるが、無駄な努力を省くためには最低限どれぐらいの標本サイズがあればよいのであろうか、多くの研究者達は経験的に1標本あたり50個体程度を最低ラインと考えているようであるが、これは遺伝子や遺伝子型の数や頻度に大きく左右されるため結構難しい問題である。マイクロサテライトのような高度に多型的なマーカーではさらに多くの標本を必要とするであろう。世代や年級で分けられるならそれでスライスしても比較検討に耐えうる個体数が確保できなくてはならない。また、基準標本は、任意交配している個体群からのサブサンプルであるべきだが、それをどうやって裏付ければよいのであろうか、ミトコンドリアDNA分析からはそれを知るすべはない。遺伝子型頻度分布が Hardy-Weinberg 平衡 (H-W 平衡) にある、というのがひとつあるいは唯一の目安であるが、この平衡からははずれなければ任意交配集団からのサブサンプルとみなして良いわけではない。例えば、遺伝子頻度もしくは遺伝子型頻度が有意に異なる2標本を混合しても H-W 平衡からははずれないことがよくある。すなわち H-W 平衡に合うか合わないかの検定は結構ラフなものであり、標本サイズや対立遺伝子の数、異なる系群が混ざっているのならその混合の割合と遺伝子頻度の差異の程度、に大きく左右

される。この点に関しては常に留意しておくべきであるが今のところ標本サイズを大きくするしか手立てはない。

II-3) 遺伝子マーカーと分析手法

小さい標本サイズでも系群間の差異が歴然とわかるマーカーや手法が当然ながら実用面では優れたものということになる。しかし、最近の傾向として、高度な多型を示す領域や多型検出手法のほうに研究者は興味をいやくようである。次に述べるいくつかの単純な例はこのような傾向が間違いないであることを示すものである。

Kotoulas et al. (1995)は mtDNA-RFLP 分析という初期のオーソドックスなアプローチによって、地中海と大西洋のメカジキ(*Xiphias gladius*)標本間で遺伝子型頻度分布が顕著に異なることを発見し、遺伝的交流がほとんど無いものと結論している。この研究が発端となって、米国の研究者達が mtDNA のコントロール領域 (*D-loop*)の高度多型部位約 300bp から 500bp について、地中海、大西洋、太平洋から採集した多くの個体について塩基配列分析を始めた(Albarado-Bremer et al., 1995, 1996; Rosel and Block, 1995; Reeb et al., 2000) 分析個体数はすでに 500 を超えるが、検出される遺伝子型数が非常に多く、標本間の遺伝子型頻度の有意差検定にかなり無理が生じている。また、標本特異的な塩基置換などは検出できなかった。これなどは、変異性が高すぎてすでに飽和しているとともに、存在していた差異がすでに消滅している疑いすらあるように思える。一方、この高度多型部位を含む長い断片(約 2,000bp)の PCR-RFLP 分析では検出される多型レベルはかなり落ちるものの地中海個体群がかなり孤立した系群であり外部からのメカジキ個体の侵入がないことが明瞭に示されている (Chow et al., 1997; Chow and Takeyama, 2000) (図 3)。また、南北大西洋のメカジキ標本間の mtDNA 遺伝子型頻度にも有意差があることが報告されているが(Albarado-Bremer et al., 1996; Chow et al., 1997; Chow and Takeyama, 2000)、カルモデュリン遺伝子(*CuM*)のイントロンにおける単純な一塩基多型 (SNP) を用いた分析のほうが南北大西洋のメカジキ標本間の差異をよりいっそう明瞭に浮き彫りにしている(Chow and Takeyama, 2000) (表 1)。クロマグロ(*Thunnus thynnus*)でも似たような結果が得られている。大西洋と太平洋クロマグロ間の差異については mtDNA のコーディング領域 (cytochrome *b* と *ATPase*) の簡便な PCR-RFLP 分析によって 1 個体でもどちら産なのか判別できるくらいの分化が報告されている (Chow and Inoue, 1993; Chow and Kishino, 1995)。一方、クロマグロでは 9 つのマイクロサテライト遺伝子座が単離されているが、大西洋と太平洋クロマグロ標本は遺伝子頻度に有意差はみられるものの多くの対立遺伝子を共有しているだけでなく頻度分布もよく似ている (Broughton and Gold, 1997; Takagi et al., 1999)。また、メバチの大西洋とインド-太平洋標本間には大きな遺伝的差異が見られ、明らかに別系群であると考えられている

(Alvarado-Bremer et al., 1998; Chow et al., 2000)。しかし、mtDNA 高度多型領域 (*D-loop*) の塩基配列解析を用いた前者よりも、コーディング領域 (*ATPase* 遺伝子) の単純な 2 遺伝子型のみが検出される後者のほうでより明瞭に大西洋とインド-太平洋間の差異が示されている (図 4)。これらの例は、高度に多型的な領域の塩基配列まで調べても分からないものはわからないという好例である。分析戦略としては、基準群と考えられる標本からの個体をいくらか分析した時点で、分析対象とした遺伝子領域や用いた分析手法が良いかどうかの判断を下すべきであろう。

ところで、mtDNA はハプロイドであるため核遺伝子に比べ集団サイズの変動の影響を受けやすく集団分化の良い指標になるものと考えられている。例えば、極端に考えると雄と雌が 1 個体づつしか残らなかった場合には mtDNA は最大 2 種類のタイプしか保持できずしかも子孫にはそのうち雌の 1 タイプしか残せない。一方、2 倍体核遺伝子の遺伝子座は最大 4 種類の遺伝子が保持できしかも全て子孫に残せる可能性がある、ということである。しかしながら、メカジキでの研究で示されたように、単純な多型を示す核遺伝子座のほうが mtDNA 分析よりも標本間で明瞭な差異を検出している例も多いことも事実である。このことは、集団が分化した後にゲノム中のどの部位で遺伝子型の偏った再配列すなわち遺伝的浮動が起こるかは予測できない、ということを示している。また、集団が分化した後に遺伝子流動が一時的にでも起こった場合には、mtDNA でのほうが早く遺伝子型頻度のホモジナイズがおこる可能性もある。

核ゲノムに対しては今の段階で手軽に使えるような手法は AFLP や RAPD であるが、これらの手法は、最終的には SNP のような比較的単純なマーカーを検出するうえでの中間的手法とみなすべきであろう。すなわち、もし標本間で AFLP や RAPD で明らかな差異が見出されても、その時点で系群識別が終わったわけではなく、その差異の根源を明らかにしなくてはならないし、そのような差異は必ず存在するはずである。標本間に差異が見出され、異なる系群がタイピングでき、その結果を資源管理なり実用面で応用する必要性あるいは何らかのメリットがあれば、その後の分析システムの簡便迅速化はなんとでもできよう。そして、マーカーが単純であればあるほど、簡便迅速化はより容易となる。

III. 最後に

今回の資源管理談話会では、系群という定義付けあるいは概念についての論議にかなり時間がさかれた。私としては系群というのは漠然と「遺伝的交流が全く無いかあるいはかなり少ない同種内分集団」と理解している。この「かなり少ない」というのがフuzzyであるが、要するに異なる資源として区別しなければならない程度に交流が少ない、というのでいいのかな、とも思う。これもまたよく考えればかなりフuzzyではあるが、とにかく

く、資源評価、管理、あるいは生物学的興味から、分けて考えなければならない可能性があるからその根拠が必要だ、という要望がある（特に遠洋水産研究所でのまぐろ・かじき類）ためにこのような解析を行ってきたわけであり、特に系群という意味や実態に定義付けする必要性は今のところあまり感じていない。

アイソザイムからミトコンドリアDNAそしてマイクロサテライト等の歴史をみてみると、前にも述べたように高度多型マーカーの応用に多くの方々が興味を持っておられるようだし、中には高度に多型的でない駄目であると考えている人も少なくないようである。しかしながら例えば、種間差を見る場合には種内変異がなるべく少なく、種間差が安定している形質が重要であるように、系群を識別するマーカーもそうであるべきだと私は思う。経験的に種の判別と系群の判別は異なる次元の事象ととらえている人が多い。これはとりもなおさず、たいていの場合、種間には明らかなギャップが存在するが、種内系群間にはある程度の繋がりがあって、不連続な形質など存在しないという先入観があるからであろう。しかし、基本的にはこれらは程度の違いにすぎない。種（系群）を識別するためには、用いるマーカーの分散は種（系群）内では限り無くゼロに近い方が良く、種（系群）間では大きい方が良いという基本を忘れてはならない。

参考文献

- Albarado-Bremer, J. R., Baker, A. J. and Mejuto, J. (1995). Mitochondrial DNA control region sequences indicate extensive mixing of swordfish (*Xiphias gladius*) populations in the Atlantic Ocean. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 1720-1732.
- Albarado-Bremer, J. R., Mejuto, J., Greig, T. W., and Ely, B. (1996). Global population structure of the swordfish (*Xiphias gladius* L.) as revealed by analysis of the mitochondrial DNA control region. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 197: 295-310.
- Alvarado-Bremer, JR, Stequert B, Robertson NW, Ely B (1998) Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna (*Thunnus obesus* Lowe) populations. *Mar. Biol.* 132: 547-557.
- Block, B. A., Dewar, H., Farwell, C. and Prince, E. D. (1998). A new satellite technology for tracking the movements of Atlantic bluefin tuna. *PNAS* 95: 9384-9389.
- Broughton, R. and Gold, J. R. (1997). Microsatellite development and survey of variation in northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6: 308-314.
- Chow, S. and Inoue, S. (1993). Intra-and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus* tuna species. *Bull. Natl. Res. Inst. Far Seas Fish.* 30: 207-225.
- Chow, S. and Kishino, H. (1995). Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): Inconsistent implications from morphology, nuclear and

- mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.* 41: 741-748.
- Chow, S., Okamoto, H., Uozumi, Y., Takeuchi, Y. and Takeyama, H. (1997). Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Mar. Biol.* 127: 359-367.
- Chow, S. and Takeyama, H. (2000). Nuclear and mitochondrial DNA analyses reveal four genetically separated breeding units of the swordfish. *J. Fish Biol.* 56: 1087-1098.
- Gunn, J., Polachek, T., Davis, T. and Wotherspoon, S. (1996). Update on CSIRO's studies of southern bluefin tuna using archival tags. Proceeding of the 47th Annual Tuna Conference. Lake Arrowhead, CA. p. 56.
- Inagake, D., Yamada, H., Segawa, K., Okazaki, M., Nitta, A. and Itou, T. (2001). Migration of Young Bluefin Tuna, Temminck et Schlegel, through Archival Tagging Experiments and Its Relation with Oceanographic Conditions in the Western North Pacific. *Bull. Natl. Res. Inst. Far Seas Fish.* 38: 53-81.
- Kornfield, I., Smith, D. C., Gagnon, P. S. and Taylor, J. N. (1982). The cichlid fish of Cuatro Ciénegas, Mexico: direct evidence of conspecificity among distinct trophic morphs. *Evolution* 36: 658-664.
- Kotoulas, G., Magoulas, A., Tsimenides, N. and Zouros, E. (1995). Marked mitochondrial DNA differences between Mediterranean and Atlantic populations of the swordfish, *Xiphias gladius*. *Mol. Ecol.* 4: 473-481.
- Lutcavage, M. E., Brill, R. W., Skomal, G. B., Chase, B. C. and Howey, P. W. (1999). Results of pop-up satellite tagging of spawning size class fish in the Gulf of Maine: do North Atlantic bluefin tuna spawn in the mid-Atlantic? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56: 173-177.
- Reeb, C. A., Arcangeli, L. and Block, B. A. (2000). Structure and migration corridors in Pacific populations of the Swordfish *Xiphias gladius*, as inferred through analyses of mitochondrial DNA. *Mar. Biol.* 136: 1123-1131.
- Rosel, P. E. and Block, B. A. (1995). Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish, *Xiphias gladius*. *Mar. Biol.* 125: 11-22.
- Takagi, M., Okamura, T., Chow, S. and Taniguchi, N. (1999). PCR primers for microsatellite loci in tuna species of the genus *Thunnus* and its application for population genetic study. *Fish. Sci.* 65: 571-576.



図1. アークイバルタグ (全長約 25cm)

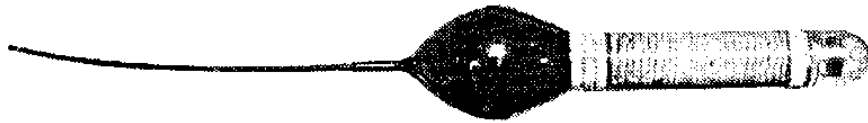


図2. ポップアップタグ (全長約 25cm)

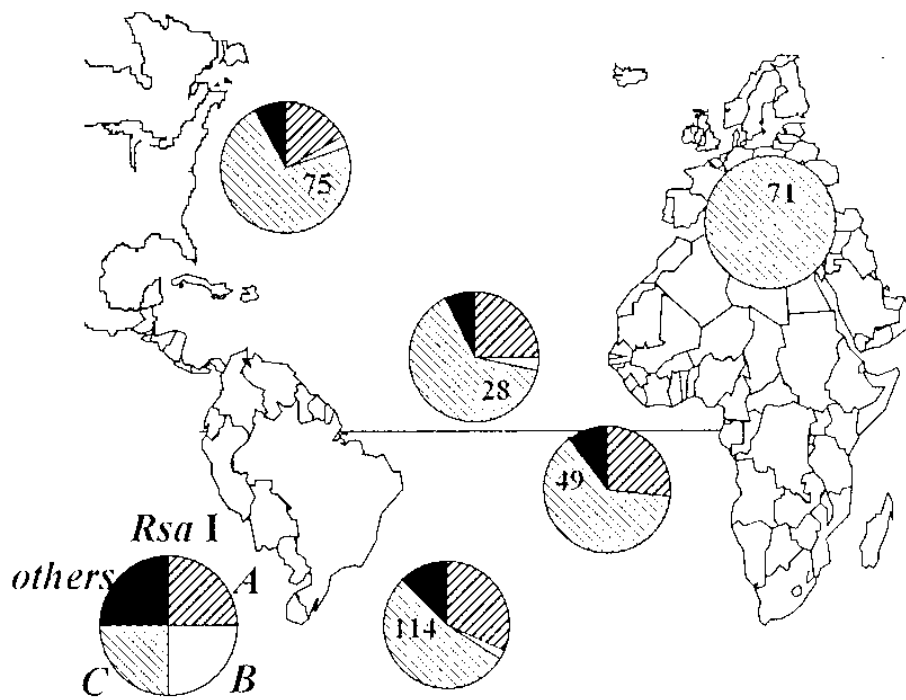


図3. メカジキ mtDNA *Dloop* 領域増幅断片を制限酵素 *Rsa* I で消化した場合に見られる遺伝子型の分布。地中海標本では C タイプしか見られないが大西洋標本では他のタイプが比較的高頻度で出現する。このことは大西洋起源のメカジキ個体は地中海に侵入してこないことを明瞭に示している。

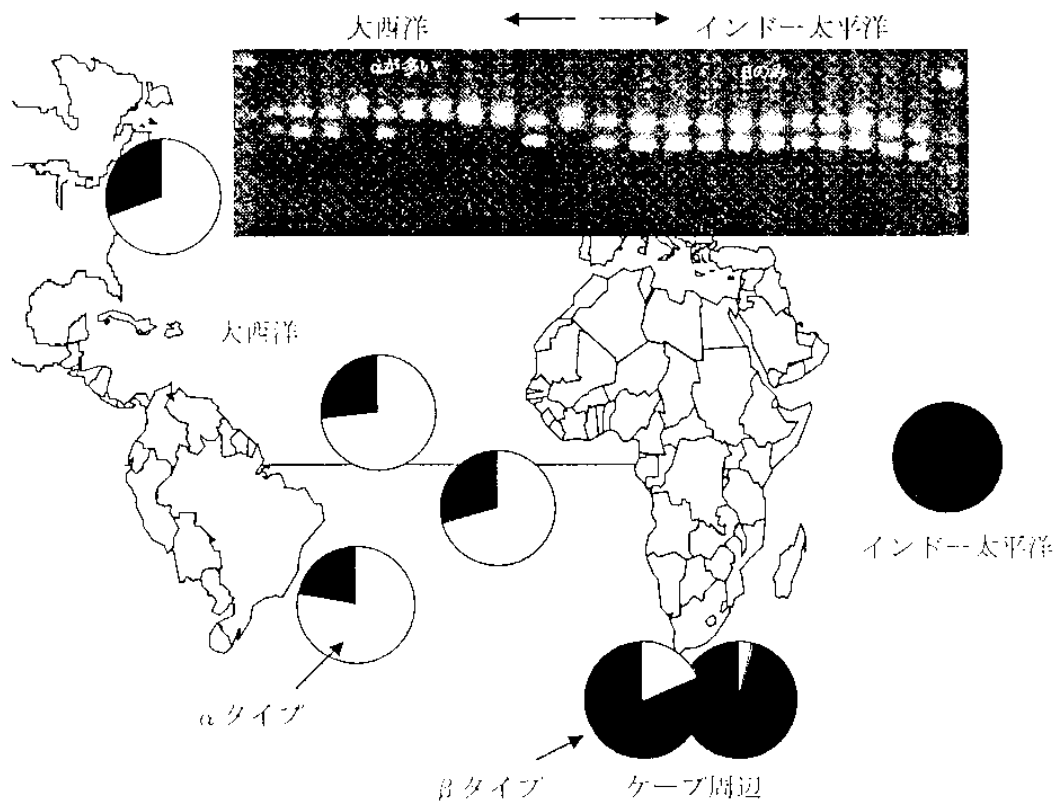


図4. メバチの mtDNA ATPase 遺伝子断片を制限酵素 *Rsa* I 処理した場合検出される 2 遺伝子型 (α タイプと β タイプ) 頻度。大西洋では高頻度で出現する α タイプはインド-太平洋ではほとんど出現せず、明らかに異なる系群であると考えられる。ケープ周辺海域では、これら 2 系群からの個体が混合しているものと考えられる。

表 1. メカジキのカルモデュリン(CaM) 遺伝子座における遺伝子型と対立遺伝子頻度

遺伝子型	北西大西洋			中南部大西洋			インド洋	太平洋
	1997 37-41N 48-67W	1993 20-30N 57-90W	1990 38-40N 59-72W	1997 5-8N 8-21W	1997 5-11S 2E-8W	1994-96 20-33S 28-50W	1992-97 16-17S 118-119E	1991-95 北半球 南半球
AA	5	8	5	25	34	101	83	95
AB	6	14	16	5	11	25	1	0
BB	5	7	7	0	2	2	0	0
n	16	29	28	30	47	128	84	95
A	0.50	0.517	0.464	0.917	0.840	0.887	1.00	1.00
B	0.50	0.483	0.536	0.083	0.160	0.113	0.00	0.00
F_{IS}	0.250	0.033	-0.149	-0.091	0.127	0.028	-0.006	