

## まぐろ・かじき類の系群判別

張 成年（遠洋水産研究所）

はじめに

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ふ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ある場合や、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。また、魚の水中での挙動を把握していなければ、資源評価に大きな誤りをおかしてしまうこともある。すなわち、ある魚種は深いところに生息しているにもかかわらず、浅いところに餌をたらしめてもその魚は釣れないわけであるから、そのデータを用いて解析すればある海域にはその魚が生息しないあるいは非常に分布密度が低いという結果になってしまうこともある。電子機器をこのような魚の分布挙動を知るために応用できるようになってきた。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。

### 1) ピンガー（超音波発信機）

超音波発信機はかなり昔からいろんな動物の追跡に応用されており水中の魚（イカも含めて）の短期間の追跡にも使われている（図1）。かつては発信源と受信者という2次元の関係しかわからなかったが、水中という3次元空間での位置を知る必要があるため近年では水深や水温も超音波の波長を工夫することによって得られるようになった。また、1本ごとの波長に異なるコー



図1. ピンガー

ドを与えることによって数10本のピンガーから同時に発信される信号を区別できるシステムも開発された。これにより、大きな魚群の中の特定個体を同時に追跡することが可能となった。

## 2) アーカイバルタグ

プラスチック製のスパ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(図2)。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。日出一日没間隔から緯度、日出と日没の時刻から経度が推定できる。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回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沖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。

## 3) 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3)。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。

#### 5) 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。

#### 6) 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年代にはアイソ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つてよく、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だくようである。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為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 4)。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 (*CaM*) 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ー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ー太平洋間の差異が示されている (図 5)。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 個体ず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 で明らかなる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、異なる系群がタイプピングでき、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」というのがファジーであるが、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ァジーではあるが。とにかく、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と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., Polacheck, 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2. アーカイバルタグ(全長約 25cm)



図3. ポップアップタグ (全長約 25cm)

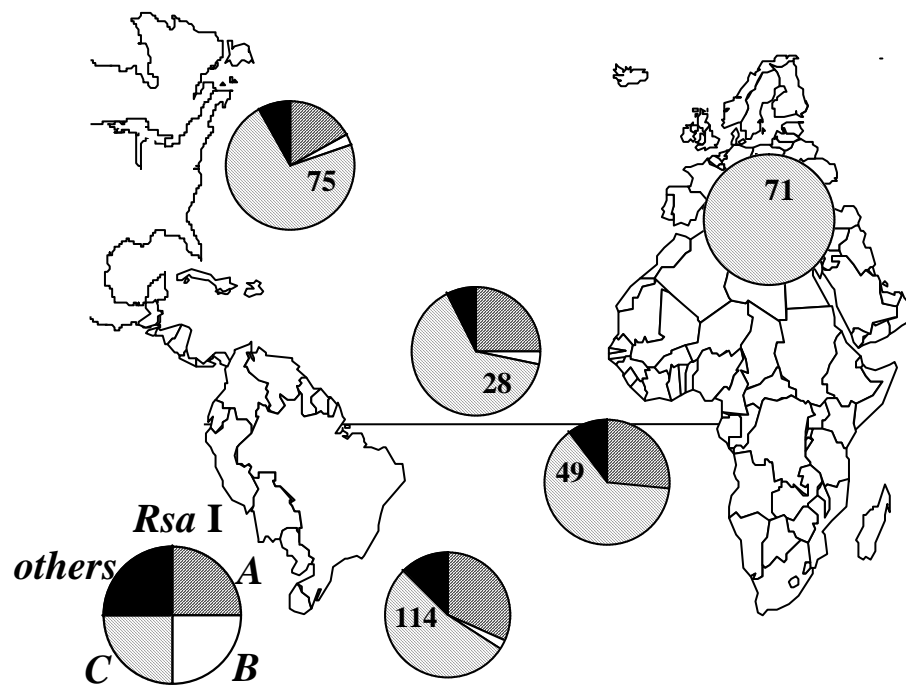


図4. メカジキ mtDNA *Dloop* 領域増幅断片を制限酵素 *Rsa I* で消化した場合に見られる遺伝子型の分布。地中海標本では *C* タイプしか見られないが大西洋標本では他のタイプが比較的高頻度で出現する。このことは大西洋起源のメカジキ個体は地中海に侵入してこないことを明瞭に示している。

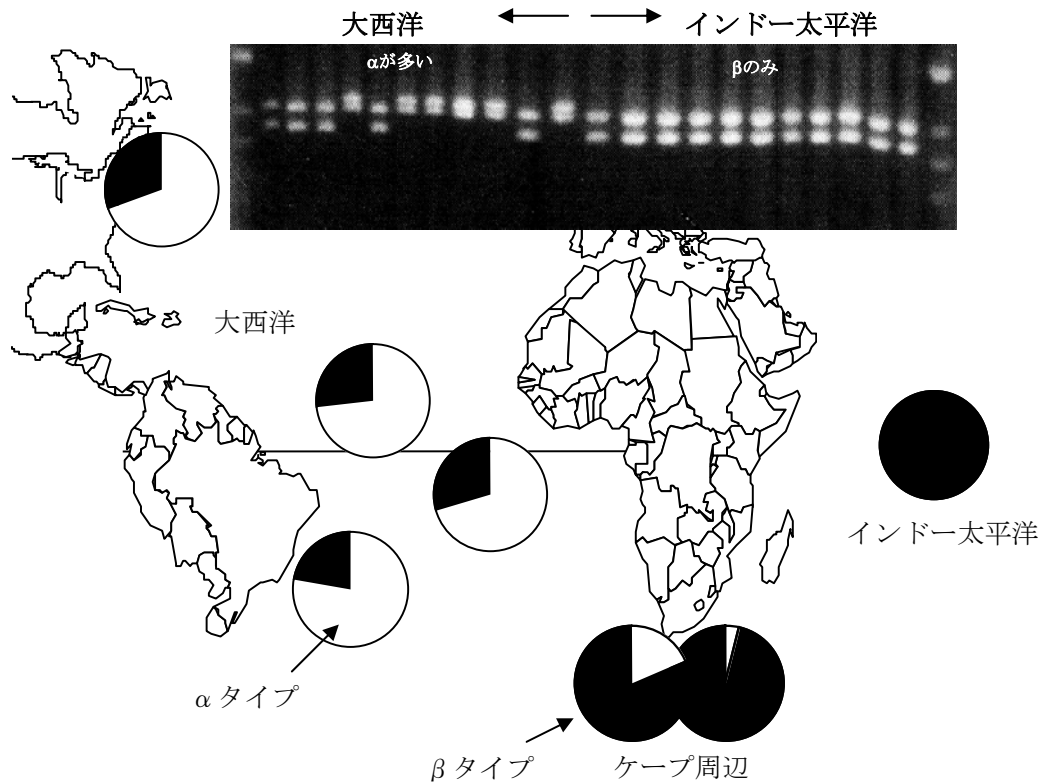


図5. メバチの mtDNA ATPase 遺伝子断片を制限酵素 *Rsa I* 処理した場合検出される 2 遺伝子型 ( $\alpha$  タイプと  $\beta$  タイプ) 頻度。大西洋では高頻度で出現する  $\alpha$  タイプはインドー太平洋ではほとんど出現せず、明らかに異なる系群であると考えられる。ケープ周辺海域では、これら 2 系群からの個体が混合しているものと考えられる。

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	