

## 水産資源研究の最新動向

### (4) まぐろ資源研究への生化学、遺伝学的技術の応用

#### 張 成年\*

#### 1. はじめに

近年、動物の種、系群、品種さらには個体や親子を識別するためにゲノムやミトコンドリアDNAの塩基配列における遺伝的多型をマーカーに用いることが盛んになってきた。最近よく耳にするようになったDNAフィンガープリントにより、人間や家畜における個体識別や親子関係を明らかにすることについては技術的な問題はほとんどない。そのため、いかに少量の標本でも分析可能か、いかに正確、迅速、かつ、簡便にできるかが主な課題となっている。

水産動物の場合、人為的管理下におかれている増養殖対象魚種では品種の同定、遺伝子操作を施した個体や遺伝標識を持つ放流個体の識別等にこのような手法が応用できるかも知れない。一方、資源管理を目的とした資源生態学的研究では親魚数、自然死亡数、漁獲死亡数、加入量等のパラメータを推定する必要があり、対象種の生活史を通しての資源動態の把握が重要である。しかし、種としての生息範囲が広く、年齢組成や個体としての行動経路が複雑になればなるほどこれらのパラメータ推定は難しくなる。まぐろのような長寿命であり、かつ、広い海域を回遊する魚類はその典型であり、このような氏素性のよくわからない個体で構成されている自然集団を対象にする段階では、個体レベルでの判別はあまり意味を持たず、地域

\*Chow Seinen 遠洋水産研究所浮魚資源部

的、季節的標本や繁殖群といった単位ごとの標本から得られる集団遺伝学的情報を解析することが先決である。さらに、発生初期には近縁種であるほど形態的に酷似しており、判別が困難な場合がよくある。そしてこのことが往々にして加入量の推定を困難にすることが多い。そのため、個体よりも種の識別がより重要になってくる。また、成魚、未成魚や幼魚だけでなく産卵海域における卵稚仔をも含めた生活段階ごとの遺伝学的情報は高度回遊性魚類集団の資源動態の把握になくてはならないものであろう。卵稚仔期での遺伝学的解析はいままでほとんど試みられたことがなかったが、いまではこのような微小標本でも成体と同じペースで分析、比較ができるようになった。さらには、以上のような資源生態研究面だけでなく漁業規制や輸出入規制等の行政指導にも生化学的な分析技術から得られる情報が参考、あるいは証拠となる場合もこれから増加するであろう。

本稿では、これらの課題を解決するにあたって利用されてきた生化学的分析手法とその成果、そして将来応用される可能性の高い技術について述べる。

#### 2. まぐろ類集団についての生化学的手法による遺伝学的分析

##### 2-1. 系群に関する研究：歴史、現状、成果

まぐろ類の系群判別に生化学的手法の導入を試みた例は古く、Fujino<sup>1)</sup>がまとめた文献リストに

よるとすでに1950年代後半から1960年代にかけて多くの研究がみられる。特に1958年から1963年にわたって南海区水産研究所の研究グループは核酸塩基の構成率と抗原抗体反応さらに血液型を用いた先駆的研究を行っている<sup>2, 3)</sup>。DNAを用いた抗原抗体反応と塩基構成率では思わしい結果が得られなかったが、キハダ、メバチ、ビンナガでは血液型を検出することができ、さらにビンナガでは海域標本間で各血液型の出現頻度に差があると述べている。少し詳しく説明すると、例えば人間のABO式血液型では、A型の人の血清にはB型とAB型の血球を凝集させる物質があり、B型の血清にはAとAB型血球を凝集させる物質がある。このような免疫反応を利用した血液凝集原を指標にして彼らはまぐろ類においていくつかの血液型を定めた。ビンナガではTg<sub>1</sub>凝集原を有する個体の頻度が北太平洋よりインド洋で著しく高いこと、Tg<sub>3</sub>凝集原を有する個体の頻度が北太平洋とインド洋より大西洋で非常に高いことから、これら3つの海域標本が遺伝的に隔離されていることを示唆する一方、北太平洋東西両海域標本間には頻度差がみられないことから、これら海域間に遺伝的隔離がないことを示唆している(表1)<sup>2)</sup>。しかし、この免疫学的手法には血液標本が必要であり、かつ凍結前に遠心及び凝固防止剤の添加が必要であることや、全く同じ血清を使わない限り再現性を得ることが非常に難しいこと等の難点があったため、発展がないまま現在に至っている。また、ほとんどの場合、血液型とされるこれらの表現型の遺伝子支配が明確にされていないこともその後の発展を困難にしたひとつの原因であったろう。

1960年後半から比較的手軽に酵素や蛋白の多型を検出できるゲル電気泳動がこのような免疫学的手法にかわって普及するようになった。Fujino and Kang<sup>4)</sup>はでんぶんゲル電気泳動で検出した

表1 ビンナガ標本間での血液型頻度の比較

	各血液型個体数 (頻度%)						計
	Tg <sub>1</sub>	Tg <sub>2</sub>	Tg <sub>3</sub>	Tg <sub>4</sub>	Tg <sub>5</sub>	0	
日本近海	6 (11)	1 (2)	2 (4)	2 (4)	30 (55)	13 (24)	54
アメリカ西海岸	2 (4)	1 (2)	3 (6)	0 (0)	37 (69)	10 (19)	53
インド洋	7 (9)	4 (5)	30 (39)	7 (9)	26 (34)	3 (4)	77
大西洋	3 (3)	31 (31)	8 (8)	54 (55)	2 (2)	1 (1)	99

鈴木<sup>2)</sup>より改変

表2 カツオ血清エステラーゼアイソザイムの表現型と遺伝子頻度

標本	表現型			計	遺伝子頻度	
	1	1-2	2		E1	E2
大西洋	69	41	6	116	0.77	0.23
東部太平洋	96	193	88	377	0.52	0.48
日本	175	159	60	394	0.65	0.35
パラオ	154	112	27	293	0.72	0.28
ハワイ	185	413	243	841	0.47	0.53

Fujino and Kang<sup>4)</sup>より改変

まぐろ類の血清エステラーゼアイソザイムの多型を用いて、標本間での対立遺伝子頻度の比較を行った。その結果、多型性の低かったビンナガでは太平洋と大西洋標本間で遺伝子頻度における差異がみられなかったが、カツオでは大西洋、日本、東部太平洋、パラオ、ハワイの標本間の多くの組合わせで有意差がみられた(表2)。このことから彼らはカツオにはいくつかの遺伝的に異なる系群があると結論している。ところが、この研究を最後に蛋白多型を用いたまぐろ類の集団遺伝学的研究報告がしばらくみられなくなった。おそらく、研究は行われたのであるが集団調査に用いることができるだけのアイソザイム多型が検出されなかったのかも知れない。あるいは、より地理的隔離がありそうな他魚種に研究者の努力が偏ったせいもあるであろう。1970年代になってミトコンドリアDNA(mtDNA)の制限酵素による多型検出法が一般的になるにつれて、まぐろ類も再び研究対象

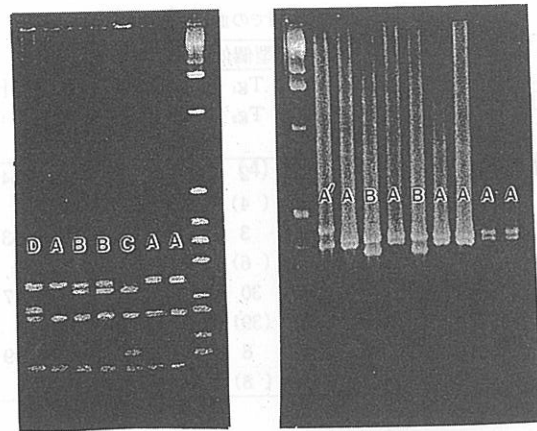


図1 ピンナガのミトコンドリアATPase遺伝子DNA断片でみられた制限酵素切断片長多型

群の存在を示唆する結果が得られなかった。さらに、カツオ、ビンナガにおいては東部太平洋と南大西洋(ケープ沖)間ですら差異を検出できなかった。彼らはこの理由として、大洋間個体群の遺伝的隔離がごく最近に起こったか、あるいは大洋間での個体の移出入の可能性を挙げているが、おそらくは多型検出と分析手法によるものが大きいものと考えられる。すなわち、DNA標本の量に限りがあるため使用した制限酵素の種類が少なく、個体ごとの遺伝子型分析を行っていないということからみて明らかに多型検出感度が劣っている。また、mtDNA全ゲノムに対して6塩基配列認識の制限酵素の使用は平均にして約4個の切断箇所を持つが、これでは実際に存在する差異を検出できないのかもしれない。対照的に、血液型やアイソザイムを用いたカツオやビンナガの集団分析では前述したように大洋間あるいは海域間で差異がみられている。

我々はビンナガmtDNAの一部(ATPase遺伝子の一部)を遺伝子増幅法(PCR法)<sup>8, 9)</sup>で増幅し、これをより多くの切断箇所を持つと考えられる4

群の存在を示唆する結果が得られなかった。さらに、カツオ、ビンナガにおいては東部太平洋と南大西洋(ケープ沖)間ですら差異を検出できなかった。彼らはこの理由として、大洋間個体群の遺伝的隔離がごく最近に起こったか、あるいは大洋間での個体の移出入の可能性を挙げているが、おそらくは多型検出と分析手法によるものが大きいものと考えられる。すなわち、DNA標本の量に限りがあるため使用した制限酵素の種類が少なく、個体ごとの遺伝子型分析を行っていないということからみて明らかに多型検出感度が劣っている。また、mtDNA全ゲノムに対して6塩基配列認識の制限酵素の使用は平均にして約4個の切断箇所を持つが、これでは実際に存在する差異を検出できないのかもしれない。対照的に、血液型やアイソザイムを用いたカツオやビンナガの集団分析では前述したように大洋間あるいは海域間で差異がみられている。

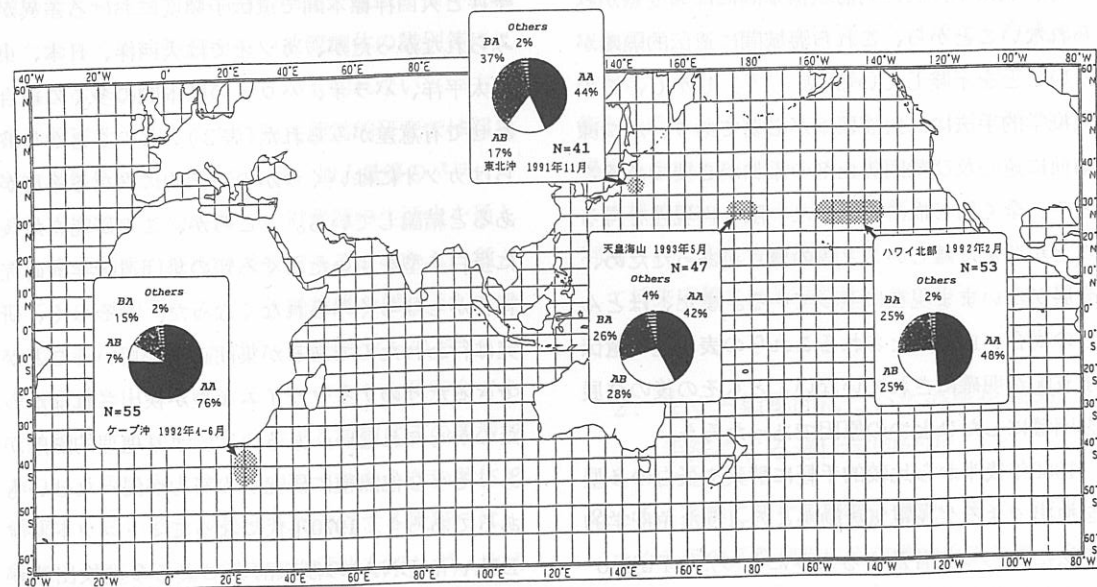


図2 Mse I と Rsa I による mtDNA ハプロタイプ頻度のビンナガ4海域標本間での比較

塩基配列認識の制限酵素を用いて分析(RFLP分析)している。その結果、北太平洋内標本間では差異を検出できなかったが、これら太平洋標本とケープ沖標本間で大きな差を見出している(図1、2)<sup>10)</sup>。キハダでは太平洋内で遺伝的に異なる系群の存在がアイソザイム分析から示唆されている(P. Grewe私信)。興味深いことに、このキハダの例では同じ標本を用いてmtDNA分析も行われたが前述のGravesらの結果と同様に系群の存在を示す証拠は得られなかった。これが事実であるなら非常に珍しい現象であるが、単にmtDNA標本間に存在している差異を検出できなかったことが原因である可能性が高い。彼らもmtDNA全ゲノムを6塩基配列認識の制限酵素で処理する方法を採用している。4塩基配列認識の制限酵素を使用すれば切断箇所数は十数倍に増えるが、切断される断片が短くなりすぎてかえって分析が困難になるためmtDNA全ゲノムを対象にする場合にはほとんど使用されない。標本DNAの量に限りがあるために使用できる制限酵素の種類数にも限界があることも一因であろう。また、ほとんどの研究は成体標本だけを用いているという根本的な問題も考えられる。すなわち、もし、複数の遺伝的に異なる系群が固有の産卵海域に時期的にある種のホーミングをしており、回遊分散しながら時空間的に他系群と混合しているならば、そのような異系群の混合標本を知らずに比較検討することにほとんど意味はないからである。CSIRO(豪州科学産業研究機構)の研究グループも同じ問題点を指摘しており、標本採集の努力を産卵海域からそれほど遠ざかっていないと考えられる幼魚に集中することを計画している(P. Grewe私信)。

我々の研究室では、抽出した粗DNA標本から特定の遺伝子部位をPCR法によって増幅している。この方法をベースにすると使用するDNAはごく微量でよいため元の粗抽出したDNA標本が

不足することはまずない。しかもほぼどんな組織でもかまわないという利点があり、卵稚仔でも充分分析可能である。検出感度はともあれ最も簡単な多型検出法である制限酵素分析を、PCR法で増幅したmtDNA遺伝子の一部断片に用いて、どの遺伝子部位が系群判別や種判別に有効な遺伝的多型を保有しているのかを現在調査している。ビンナガで得た我々のデータからは今のところ北太平洋内標本である日本近海、天皇海山、ハワイ標本間に異質性は認められていないが、現在、いろいろな制限酵素を使用してさらなる多型検出を行うと同時に、別のmtDNA遺伝子部位についても多型の程度を検討しているところである。遠洋水産研究所ではこのような手法を用いてビンナガにかぎらず、次に挙げた項目について現在、遺伝学的調査を行っている。

- ・太平洋クロマグロ個体群内に系群はあるか。
- ・ミナミマグロでみられる2つの幼魚出現ピーク間に遺伝的差異があるか。
- ・時期的、地理的に異なる地中海、メキシコ湾という大西洋クロマグロの2大産卵場生れの個体群間に遺伝的差異はあるか。
- ・汎世界的に分布するキハダ、メバチ、メカジキ標本の太平洋、大洋内海域間での遺伝学的比較。

## 2-2. 種判別とその応用

まぐろ類の産卵量や加入量のモニタリングを行うにあたってまず問題になるのは、外部形態が酷似している卵稚仔期での種判別が非常に困難であることである。黒色素胞を中心にした形態学的指標によってまぐろ類種判別の試みが多数行われ、ある体長範囲の仔魚期で判別が可能になった<sup>11)</sup>が、種内変異の存在が問題視されている<sup>12)</sup>。また、卵はもちろんふ化してから体表に色素が出てくるまでは事実上形態による種の判別はできないとされている。さらに体長数cmから十数cm程度の幼魚では採集された標本自体が少ないこともあって分

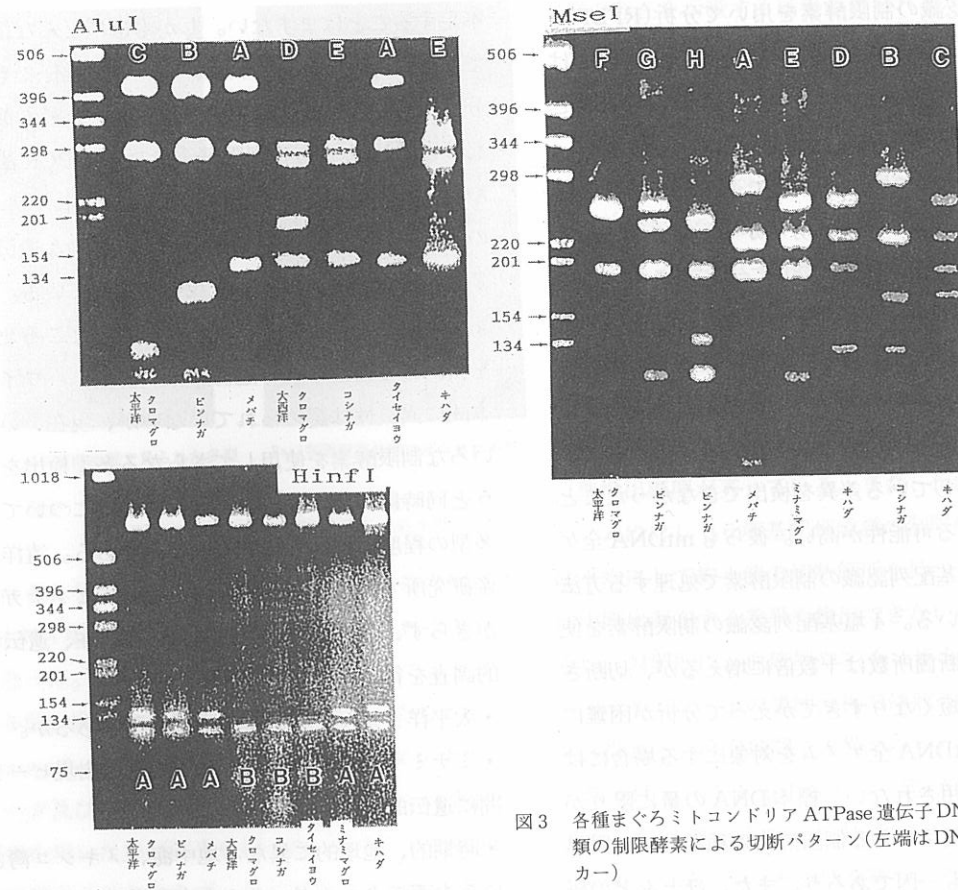


図3 各種まぐろミトコンドリアATPase遺伝子DNA断片の3種類の制限酵素による切断パターン(左端はDNA分子量マーカー)

類のための外部形態的指標がほとんどみつかっていない。サバ型魚類の多くは熱帯、亜熱帯海域に産卵場を持つため、複数の種類の卵稚仔が同じ海域に出現する可能性が高い。このような理由から、遺伝子レベルでの種間差を利用したより確実な種判別法の開発を行った。これによって、形態学に見出されてきた分類基準の裏付けや、新しい形態的指標を見出すことができるかも知れない。

系群判別とは対照的に、種判別のためには種内での多型がないことが望ましい。また、種間での多型が種内でのそれと重複しないことが原則である。アイソザイム電気泳動は種を判別することにおいてすぐれているが、卵稚仔のような微小標本には適さないし酵素活性を失わない

表3 PCR法で増幅したATP合成酵素遺伝子DNA断片を3種類の制限酵素によって消化した場合にみられた切断パターンの種間差

タイプ	種	個体数	3酵素による切断パターン		
			Alu I	Hinf I	Mse I
1	ビンナガ	11	B	A	F
2	ビンナガ	9	B	A	G
3	ビンナガ	1	B	A	H
4	メバチ	16	A	A	A
5	タイセイヨウマグロ	3	A	B	D
6	コシナガ	6	E	B	B
7	太平洋クロマグロ	17	C	A	F
8	太平洋クロマグロ	1	D	B	E
9	大西洋クロマグロ	15	D	B	E
10	ミナミマグロ	43	E	A	E
11	ミナミマグロ	1	E	A	B
12	キハダ	25	E	A	D
13	キハダ	2	E	A	C
13	キハダ	1	A	A	D

張・井上<sup>8)</sup>より改変

ように保存しなければならない等の欠点がある。そこで我々は系群判別のためにPCR法で増幅し分析したmtDNAのATPase遺伝子の一部をいろんな制限酵素で処理し、種間での多型検索を行った。その結果、3種類の制限酵素を使用すればまぐろ属全種を判別できることがわかった<sup>8)</sup>。これら3種類の制限酵素(AluI, HinfI, MseI)による切断片の電気泳動パターンを図3に示し、異なるパターンをアルファベットでタイプ分けした。また、各種をタイプ別に分類したものを表3に示した。ビンナガ、ミナミマグロ、キハダではいくつかの酵素による切断パターンに種内変異がみられるが、2あるいは3種の酵素による切断パターンの組み合わせによって他種からの識別が可能である。このようにPCR法によってごく微量のDNAでも増幅できるので、アルコール保存した卵や仔魚でも問題なく分析できる<sup>13, 14)</sup>。海域によっては生息しない種類もあるので、3種類の制限酵素全てを使用する必要はないものと考えられる。現在、この手法を卵稚仔標本に応用し成果を挙げている。余談であるが、我々の結果をみる限り太平洋クロマグロは大西洋クロマグロやミナミマグロよりもむしろビンナガに似ており、ミナミマグロはキハダにより近いようである。太平洋クロマグロは大西洋クロマグロとは全く異なったパターンを示し別種と考えられるが、1個体だけ大西洋型のものがみついている。さらに塩基配列決定によっても同様の結果を得ることができた。現在、核遺伝子を分析中であり、近いうちにmtDNAと核DNAで得られた遺伝学的情報にもついたまぐろ類の進化系統分類について報告する予定である。

生態学研究に資すると考えられる卵稚仔期での種判別とは別に、輸出入の規制という点において種判別が重要になりつつある。漁獲割りあて量以上の漁獲や魚種をいつわっての輸出入は、国際的な資源管理を無効にする大きな要因となっている

が、魚体を丸ごとではなくフィレやブロックにした状態で輸出入してしまえば、今のところ種判別を手軽に行える指針がないことが問題である。単価が高い特定の魚種では今後このようなケースが増えるであろう。具体的には、例えば、まぐろを出荷あるいは水揚げしている現場で迅速かつ正確に種判別を行い、またその証拠を提示する必要がある。カナダ研究者の塩基配列直接決定法<sup>15)</sup>や我々のPCR-RFLP法<sup>8, 9)</sup>によって見出されたDNAレベルにおけるまぐろ種間の差異を用いれば確実な種判別ができるが、分析結果を出すまでに少なくとも前者では3ないし4日、後者では7-8時間は必要である。実際の現場では短時間に検査を行わなければならない。そこで、尿をかければすぐわかる妊娠検査キットのように、抗原抗体反応を利用して魚を種判別する試みがなされている。アメリカ合衆国では魚種ごとに漁獲尾数と体長制限がもうけられているが、漁獲した魚をフィレの状態にしてしまえば形態から種を判別することが非常に難しくなる。かじき類の魚種を迅速に判別することを目的として、フロリダ海洋大学のDr. Hartmannのグループ<sup>16)</sup>はかじき類数種の血漿蛋白を精製することから出発し、いろいろな蛋白を抗原としたモノクローナル抗体を作った。こうしてできた抗体を実際に試した結果、殆どの抗体は種特異性を示さず、かじき類全種を判別するという当初の目的を達成できなかったが、パシフィックウカジキを他種から分けることのできる抗体がひとつ得られた。このモノクローナル抗体ひとつ、しかもパシフィックウカジキだけを見分けることのできるものを作るために実に3年余りを要したという。遺伝子組み換えの技術を使ってより短期間にモノクローナル抗体の作出が可能かも知れない。まぐろに应用するには盲滅法に蛋白の精製を行うよりも、まずアミノ酸組成が種によっていくらか異なる蛋白を選んでいくほうが近道であろう。そのた

めには遺伝子DNAの塩基配列の情報からアミノ酸へとたどることができる。アミノ酸配列が種間である程度異なる遺伝子を見つけることができれば、その遺伝子DNAを増幅し発現ベクターに組み換えることによってバクテリアにその蛋白を大量に作らせることができる。こうして得られた純粋な蛋白を抗原として抗体を作成するにはそれほど年月を要しないであろうし、やっとなら抗体が使い物にならない確率も低いであろう。こうしてモノクローナル抗体の作成がうまくいけば、次の段階であるキット化は比較的たやすい。我々は現在、まぐろ類のmtDNA遺伝子のいくつかについてその全塩基配列を決定しつつあり、これから得られる情報が種判別にとどまらずいろんな方面に応用できることを期待している。

### 3. 種苗放流と遺伝的多様性

増養殖技術の進歩によって、クロマグロの種苗放流が行われることも夢ではなくなりつつある。クロマグロに限らず、資源量を人為的なインプットで増加させようというこのような努力の一方では、遺伝的多様性の低下をもたらすのではないかという懸念もある。標識した種苗の再捕が増えて放流効果があったと喜んでいたら、遺伝的多様性を低下させていると文句を言われたわけである。しかし、文句を言う方も言われる方も、遺伝的多様性という、ある意味では漠然とした問題に関してはほとんど判断材料がないのが現状といって差し支えない。環境保護の潮流の中で、従来のように産めよ増やせよだけでは風当たりが強くなる一方であろうし、量的なモニタリングと同時に質的なものも求められるようになってきた。放流種苗の生残は物理的標識によっても、ある程度推定できる。しかし、繁殖に関しては、次世代へと受け継がれる遺伝子をマーカーにしなければ把握するすべはない。適切なマーカーによって遺伝的多様

性の問題に関する情報を得ることができるかも知れない。遠洋水産研究所では、日本周辺クロマグロ水揚げ量調査委託事業として、その漁獲実体を知るために、年級別の漁獲統計の整備を行っている。その一部として、本種個体群の遺伝学的特性を研究すると同時にDNA標本の採集保存を行っている。将来、種苗放流が実際に始まった時に、この研究と標本が基礎的情報を提供できることを期待している。

### 謝辞

本稿をまとめるにあたり御校閲いただいた、遠洋水産研究所、畑中寛氏及び鈴木治郎氏に対し感謝いたします。

### 引用文献

- 1) Fujino, K., 1970. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 1: 152-178.
- 2) 鈴木秋果, 1962. 南海区水産研究所報告. 16: 67-70.
- 3) 藤井豊, 1963. 南海区水産研究所報告. 19: 69-78.
- 4) Fujino, K., and T. Kang, 1968. *Copeia*, 1968: 56-63.
- 5) Graves, J.E., S.D. Ferris, and A.E. Dizon, 1984. *Mar Biol.*, 79: 315-319.
- 6) Graves, J.E., and A.E. Dizon, 1989. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 870-873.
- 7) Graves, J.E., and J.R. McDowell, 1992. ICCAT Working Document SCRS/92/50.
- 8) 張成年, 井上信吾, 1993. 遠洋水産研究所報告, 30(印刷中).
- 9) 張成年, 1993. 遠洋水研ニュース.
- 10) 張成年, 牛尼英仁, 魚住雄二, 中野英樹, 魚崎浩司, 1993. 日本水産学会平成5年度 秋期大会講演要旨.
- 11) 西川康男, 1985. 遠洋水産研究所報告, 22: 119-129.
- 12) Richards, W.J., T. Potthoff, and J.M. Kim, 1990. *Fish. Bull.*, 88: 607-609.

- 13) 張成年, P.J. Walsh, 1992. 日本水産学会平成4年度春期大会講演要旨.
- 14) Chow, S., E.M. Clarke and P.J. Walsh, 1993. *Fish. Bull.*, 91 (印刷中).
- 15) Bartlett, S.E. and W.S. Davidson, 1991.

- 16) Rossi, E.A., S.R. Shepard, J.C. Poyer, and J.X. Hartmann, 1991. ICCAT Working Document SCRS/91/106.