受賞者総説

魚類の集団構造と系統に関する分子進化学的研究*1

(平成 10 年度日本水産学会賞進歩賞受賞)

西 田 睦*2

福井県立大学生物資源学部*3

種の集団構造（系群構造）を把握することは、資源管理を考える上で最も基本的なことからひとつである。しかし、魚類をはじめとする水産生物には、その生活史の初期に浮遊幼生期を有するものが多いため、その集団構造の把握には大きな困難が存在している。つまり、ある水域に生息する集団がそこで繁殖しているものとは限らず、異なった水域に生息するまったく別々のものに見える諸集団が、浮遊幼生の頻繁な交流によって、実質上同じ繁殖単位に属しているということも十分あり得るからである。この集団構造の把握における困難を乗り越えるためのひとつの方途として、分子生物学的手法を活用した遺伝学的なアプローチが考えられる。この分子学的アプローチはまた、種の異同の判別や系統関係の解析にもたいへん有効である。多様な水圏生物界の系統的成り立ちを理解することは、最近とみに注目されている生物多様性問題を考えるまでもなく、水産学にとって重要な課題であると言える。

分子的手法を活用して水圏生物の集団構造や系統関係を解析しようとする研究は、この半世紀の間に次第に盛んになってきたが、とくに最近、DNA レベルの分析が本格的に導入されたことにより、新しい展開が見られつつある。本稿では、そうした新しい流れを念頭に置きながら、筆者らが行なってきた研究例をもとにして、魚類の集団構造と系統に関する分子進化学的研究の現状と展望について概説する。

1. 分子学的アプローチとは

分子学的アプローチの重要性の根拠は、生命が遺伝子の発現および伝達のシステムであるということにある。すべての生物は、いわば生命の設計図とも呼べる情報を、DNA という物質に遺伝子として格納している。そ

して、その情報をもとに個体を作り上げ、また日々刻々を生きている。生物集団（個体群）はある時空間を占める同種個体の集合であるが、同種個体同士は交配の際に遺伝子をミックスして子孫をつくるものであるから、集団というものは遺伝子のプールと見ることができる。

また、いま地球上に生きている生命というのは、その遺伝子 DNA を一回の断絶もなく延々と伝達してきたものである。そして、現在その減少が心配されている生物多様性とは、遺伝子の伝達経路の分岐と、伝達の過程での遺伝情報の変化とによって、歴史的・進化的にもたらされたものである。したがって、生物界を深く理解しようとするなら、その系統的成り立ちを究明する必要があるということとは明らかである。

以上のような認識——すなわち、集団とは遺伝子のプールであり、系統とは遺伝子の伝達経路の分岐順序であるという認識——に立脚すれば、集団構造や系統の分析に、遺伝情報そのものを調べるのがたいへん有効であることが容易に理解できよう。ここでいう分子学的アプローチとは、遺伝子そのものである DNA か、その情報が直接的に反映した（RNA や）タンパク質の分析を意味する。最近までは、タンパク質が主たる分析対象分子で、電気泳動法によるアロザイム分析などによって研究が進められていた。しかし、10 年あまり前に出現した PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法により、DNA が急速に分析対象に加わることとなった。これらをはじめとするタンパク質レベルおよび DNA レベルの分析手法には、その精度ならびに手間や費用のかかり具合などの点でさまざまなものがあるが、その特徴に応じて研究目的によって使い分けることが望ましい。¹⁾

ところで、魚類など動物には 2 タイプのゲノムが存在する。1 つは核ゲノムであり、もう 1 つは細胞質にあ

*1 Molecular Evolutionary Studies on Population Structure and Phylogeny of Fishes.

*2 Mutsumi Nishida (Department of Marine Bioscience, Faculty of Biotechnology, Fukui Prefectural University, Gakuen-cho 1-1, Obama, Fukui 917-0003, Japan/Present address: Ocean Research Institute, University of Tokyo, Minamidai 1-15-1, Nakano, Tokyo 164-8639, Japan).

*3 現所属：東京大学海洋研究所

るミトコンドリアゲノム (mtDNA) である。前者は遺伝情報の大部分を保有する著しく複雑なものである。すなわち、それはふつう各個体に2セットずつ存在し、遺伝子以外に種々の反復配列や転移要素などが点在する。そして、遺伝子の多くはさまざまなレベルに重複しており、これらは減数分裂のたびに組み換えられる。一方、mtDNAは、少数の限られた遺伝子が重複や余分なスペースなしに並んでいるコンパクトなもので、しかも1個体内に1セットが備わっているだけである。こうした単純明解さゆえに、これは集団や系統の解析に用いられることが多い。通常、mtDNAは卵の細胞質を通じて組み換えなしに母系遺伝するので、母系系統を追跡するのに好適な分析対象となる。また、mtDNAは核DNAに比べて変異性が高いので、集団構造解析に有用な遺伝情報源となる。²⁾ 交雑によって個体群間・異種間でmtDNAが移動した場合には、組み換えがないため、それはそのまま移動先に残る可能性がある。このことはmtDNAの遺伝マーカー源としての弱点ではなく、むしろ、交雑すると混合される核DNAの分析を併せて実施することにより、過去に起こった交雑などを検討する手がかりを与えるものと見るべきである。

2. 集団構造解析

種の集団構造を明らかにする研究は、分布域の各地から収集した標本を分析することから始まる。我々は以前よりアユを対象種に、分子的手法を活用しながらそうした分析を進めてきた。まず取り組んだアロザイム分析の結果、はっきりした遺伝的特徴を示す琵琶湖集団を除くと、本州・四国・九州からの両側回遊型アユは相互に遺伝的によく似ており、明瞭な集団の分節化は認められなかった。^{3,4)} これに対し、琉球列島の集団は他と遺伝的に著しく異なっていた。^{4,5)} こうした遺伝的変異パターンは、谷口らの同様の分析⁶⁾や、我々のmtDNA分析^{7,8)}によっても基本的に確認され、アユの集団構造の全体像はほぼ明らかになった。

こうした集団構造の形成には、幼生時期の沿岸海域を通じての移動分散性と地史という2つの要素が重要な影響を与えているものと考えられた。⁴⁾ 形態的変異は遺伝的変異パターンと比較的よく一致したが、^{4,9)} 産卵期などの繁殖形質の地理的変異パターンはそれとは必ずしも一致しなかった。⁴⁾ このことは、後者の形質はより適応的なものであるため、それに関与する遺伝子座に強い自然選択が地域ごとに働いている結果ではないかと推測された。

亜種 (リュウキュウアユ) として記載された¹⁰⁾ 琉球列島固有集団の存在は、琉球列島の生物多様性や生物地理を考える上で興味深く、¹¹⁾ また遺伝的資源としても重

要なものであると考えられる。その分布範囲や生息状況の調査も進められており、¹²⁻¹⁶⁾ そうした研究から得られる情報を基礎に、本亜種が適切に管理・保護されることが求められる。

我々は、同様のアプローチをDNAレベルの分析に比重を移しつつ、海洋域の魚介類にも適用して研究を進めている。その結果、たとえばヒラメは、日本近海では全体にわたって遺伝的にほぼ均質であることが明らかになりつつある。^{17,18)} ただし、分布縁辺部の集団では、多少の遺伝的分化を示すことがあることも分かってきたが、¹⁹⁾ この点はアユの場合でも同じである²⁰⁾ のは興味深い。

広域分布する海洋生物においては、より広い範囲の集団間にも実質的な遺伝的分化が認められないという事例のあることも分かってきた。たとえば、オニヒトデでは、何千キロも離れた沖縄とオーストラリアのグレートバリアリーフの集団間にさえ、明瞭な遺伝的分化は検出されない。²¹⁾ 一方、隔てる距離が同程度ではあっても、沖縄—ハワイ間には、ある程度の分化が検出される。²¹⁾ このことは、介在する島嶼域が間にあるかないかが、集団構造の形成に関わっていることを示唆する。すなわち、浮遊幼生による遺伝子の交流が、中継地を伝って世代を超えて起こり得るかどうかに関係しているものと考えられる。

完全に浮遊性あるいは遊泳性の動物では、さらに広域の集団間での連続性が大きいことが考えられる。事実、大型ネクトンであるソデイカでは、日本近海はもとより、太平洋の東西の集団を比較しても、これまでのところ明瞭な分化は検出できていない。²²⁾ こうした結果は、マグロ類など大型遊泳魚類での研究結果²³⁻²⁵⁾ とも整合的である。

ただし、外洋の生物集団は常に遺伝的に均質かという、必ずしもそうは言えない。中・深層に生息するユキオニハダカは世界の大洋に1種のみが分布すると考えられていたが、世界の種々の海域から得た標本のmtDNAを分析したところ、相互に混合のない遺伝的にかなり分化した複数の地域集団群が存在することが明らかになった。²⁶⁾ 同様の結果は、他の魚種でも得られつつある。これらの知見は、こうした分化が大洋の内部においてどのようにして生じ、維持されているかなどについて、興味深い問題を投げかけるものであると同時に、外洋の生物界は必ずしも均質ではないことに改めて注意を促すものである。

3. 系統解析

比較対象生物の範囲を種間に広げ、時間軸を考慮に入れると、分子分析の研究は、いわゆる系統解析へと容易

につながる。我々はアロザイム分析、最近では主としてミトコンドリア DNA の塩基配列分析を通じて、種々の魚類グループの系統関係を明らかにしようと試みている。その結果、いくつかのグループのそれが明らかになってきたが、ここで強調したい興味深い点は、こうして系統関係が推定できると、それに基づいて、種々の形質（たとえば形態や行動など）の進化パターンについて、具体的に検討できるようになることである。

たとえば、大部分が両側回遊性種であるヨシノボリ種群の中に、大きな卵を産む河川性種が存在する。それらがどのようにして生じ得たのかは興味深い問題である。日本列島産河川性種であるカワヨシノボリは、他の両側回遊性種から十分に遺伝的分化を遂げたものであったが、²⁷⁾ 沖縄の河川性種（アオバラヨシノボリ）を同じ河川に生息する両側回遊性種と比較したところ、後者の1種とのみ非常に高い遺伝的類似性を有していた。²⁸⁾ このことは、沖縄の河川性種は、カワヨシノボリとはまったく独立に、比較的最近に両側回遊性種から分化した可能性を示唆するものである。ユニークな繁殖形質と生活史を有する河川性種は、複数回にわたって異なった種から独立に生じ得たことが推察される。

また、アフリカの古代湖群に生息するカワスズメ科魚類の諸形質の多様な進化パターンも、分子データを基に系統関係が解明されることによって、次第に明らかになってきた。²⁹⁻³³⁾ さらに、海洋性の魚類や無脊椎動物においても我々は同様の経験をしつつある。³⁴⁻³⁶⁾

なお、系統解析を精緻に進め、さらに進化時間の推定をも行おうとすると、種々の DNA 領域の分子進化様式についての詳細な知見が、基礎的情報として重要となる。1 つには、有効な系統解析を進めるためには、解明しようとする分岐の古さに応じて、ほどよい変異性・進化速度を有する DNA 領域を分析対象に選ぶ必要がある。たとえば、新しい分岐を問題にするのに、進化速度の遅い領域を分析対象に選んでしまったなら、いずれの標本からのデータもほとんど違いがなく、有用な系統情報はなにも得られないということになりかねない。mtDNA は核 DNA に比べて進化速度が速いので、比較的近縁な生物の系統分析に適しているとされる。しかし、我々が検討したところ、そのような mtDNA であっても、かなり古い分岐、たとえば、脊椎動物の主要グループ間の分岐に関わる 1 億年以上前の分岐関係も、分析対象領域を精選すれば、十分に推定可能であることが推察された。³⁷⁾

また、分子分析によってもたらされる遺伝距離は、多重置換がうまく補正でき、適切な地史的出来事によって較正できるならば、いわゆる「分子時計」となり得る性質をもっている。魚類に関しては、まだ遺伝距離の良好

な時間較正がない。そこで我々は、カワスズメ科魚類がいわゆる Gondwana 大陸型の分布を示すことに着目し、この分布が 1 億 5 千万年から 1 億年ばかり前の Gondwana 大陸の分裂によって形成されたとする、魚類の主要グループの分岐時期がどのような時期のできごとであったと推定できるかを調べた。その結果、正真骨魚類の主要グループの放散時期は、従来推定されているところよりもかなり古いかもしれないという感触が得られている。³⁸⁾ このように、分子のデータは、魚類全体の系統と進化史について再検討を促すような情報をも提供しつつある。

4. 今後の展望——まとめに代えて

この数年の間に、魚類の集団構造や系統に関する遺伝学的研究の進め方は、タンパク質分析から DNA 分析を主とするものへと大きく転換しつつある。その動きを加速したものは、上述のように、画期的な DNA 増幅手法である PCR 法の出現である。この方法を用いると、試料はごくわずかでいいので、個体を殺さずに採取できる鱗や鱗からでも DNA 分析が可能となるわけで、生態学や保全に関わる新たな研究展開が考えられる。また、通常の方法では種の識別が困難な小さな卵や仔魚も十分 DNA 分析用の試料となり得るので、ここにも新たな研究の芽があると期待できる。

集団構造の解析には、アロザイム分析や mtDNA 分析などに加えて、マイクロサテライト DNA 分析や増幅断片長多型 (AFLP) 分析なども、総合的に幅広く活用されるようになるであろう。

一方、系統解析には、それに有用な核 DNA 上のシングルコピー遺伝子に関する知見の増加が望まれる。mtDNA を用いた解析も次第にその姿を変えるかもしれない。それというのも、比較的容易に mtDNA の全塩基配列を解読できるようになってきたからである。mtDNA の全塩基配列データが得られると、塩基配列を用いた系統解析の精度が格段に高くなる一方、遺伝子配置の変化という新たな系統的情報を得ることができる可能性も高くなる。実際、新たにワニトカゲ目魚類の 1 種について、mtDNA 上の全遺伝子の塩基配列を決定したところ、まだ他の脊椎動物では見出されていないような遺伝子配置が観察された。³⁹⁾ 現在、同様の研究を他の広範な種に広げ、解析を進めつつある。

レトロポソンの一種である SINE の挿入位置分析も、ゲノムの再編に関する情報を活用するという点では上記と同様で、系統解析にたいへん有望である。すでに岡田らのグループによって、サケ・マス類のかなり信頼性の高い系統推定が SINE 分析によってなされているが、アフリカのカワスズメ類についても、この解析がたいへ

ん有用であることが判明したので、⁴⁰⁾ 現在より詳細な分析を推進中である。

DNA 分析を中心とした新しい分析技法は、まだまだ急速な勢いで発展し続けている。また、ヒトなどのゲノムプロジェクトから得られる情報も飛躍的に増えつつある。こうした新たな研究手法の発展と遺伝情報の増大を積極的に活用して、広大な水圏における生物の実態解明とその適正な維持管理のための研究が、ますます精力的に展開されることが期待される。

謝 辞

ここで取り上げた我々の研究の多くは、様々な方々との共同研究として行われた。また、これらの研究は、さらに多くの方々の協力や励ましによって可能となった。ここに記して、心から感謝の意を表したい。

文 献

- 1) M. Nishida: Recent developments in the use of molecular genetic markers in fisheries biology, in "Proceeding of the Second International Symposium on Efficient Application and Preservation of Marine Biological Resources" (ed. by J.-X. Wang and S.-L. Hyang), Shanghai Fisheries Univ., Shanghai, 1996, pp. 151-165.
- 2) 西田 睦, 大河俊之, 岩田祐士: ミトコンドリア DNA 分析による集団構造解析法. 水産育種, **26**, 81-100 (1998).
- 3) M. Nishida and Y. Takahashi: Enzyme variation in populations of Ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 1059-1064 (1978).
- 4) M. Nishida: Geographic variation in the molecular, morphological and reproductive characters of the ayu *Plecoglossus altivelis* (Plecoglossidae) in the Japan-Ryukyu Archipelago. *Japan. J. Ichthyol.*, **33**, 232-248 (1986).
- 5) M. Nishida: Substantial genetic differentiation in ayu *Plecoglossus altivelis* of the Japan and Ryukyu Islands. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 1269-1274 (1985).
- 6) 関 伸吾, 谷口順彦, 田 祥麟: 日本及び韓国の天然アユ集団間の遺伝的分化. 日水誌, **54**, 559-568 (1988).
- 7) K. Iguchi, Y. Tanimura, and M. Nishida: Sequence divergence in the mtDNA control region of amphidromous and landlocked forms of ayu. *Fisheries Science*, **63**, 901-905 (1997).
- 8) K. Iguchi, Y. Tanimura, H. Takeshima, and M. Nishida: Genetic variation and geographic population structure of amphidromous ayu *Plecoglossus altivelis* as examined by mitochondrial DNA sequencing. *Fisheries Science*, **65**, 63-67 (1999).
- 9) M. Nishida and Y. Sawashi: Geographic differences in the number of longitudinal scales of the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **53**, 2089 (1987).
- 10) M. Nishida: A new subspecies of the ayu, *Plecoglossus altivelis*, (Plecoglossidae) from the Ryukyu Islands. *Japan. J. Ichthyol.*, **35**, 236-242 (1988).
- 11) 西田 睦: 分子データから探る琉球列島の生物地理. 沖縄生物学会誌, **28**, 25-42 (1990).
- 12) 西田 睦, 内村真之: 奄美大島のアユの産卵生態. 琉大地理紀要, **43**, 71-82 (1987).
- 13) 西田 睦, 澤志泰正, 西島信昇, 東 幹夫, 藤本治彦: リュウキュウアユの分布と生息状況—1986年の調査結果—. 日水誌, **58**, 199-206 (1992).
- 14) 澤志泰正, 藤本治彦, 東 幹夫, 西島信昇, 西田 睦: 琉球列島北部におけるアユの分布ならびにその遺伝的・形態的特徴. 日水誌, **59**, 191-199 (1993).
- 15) Y. Sawashi and M. Nishida: Genetic differentiation in populations of the Ryukyu-ayu *Plecoglossus altivelis ryukyuensis* on Amami-oshima Island. *Japan. J. Ichthyol.*, **41**, 253-260 (1994).
- 16) 高木基裕, 谷口順彦: DNA フィンガープリントにおけるリュウキュウアユの遺伝変異保有量と地理的分化. 水産育種, **20**, 29-37 (1994).
- 17) M. Tanaka, T. Ohkawa, T. Maeda, I. Kinoshita, T. Seikai, and M. Nishida: Ecological diversities and stock structure of the flounder in the Sea of Japan in relation to stock enhancement. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.*, Suppl., **3**, 77-85 (1997).
- 18) 朝日田卓, 齊藤憲治, 山下 洋, 青沼佳方, 小林敬典: ミトコンドリア DNA の制限酵素切断型分析によるヒラメ天然集団の遺伝的変異. 日水誌, **64**, 377-383 (1998).
- 19) T. Fujii and M. Nishida: High sequence variability in the mitochondrial DNA control region of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, **63**, 906-910 (1997).
- 20) 澤志泰正, 東 幹夫, 藤本治彦, 西田 睦: 対馬暖流域の島嶼におけるアユの生息状況とその遺伝的特徴. 魚類学雑誌, **45**, 87-99 (1998).
- 21) M. Nishida and J. S. Lucas: Genetic differences between geographic populations of the Crown-of-thorns starfish throughout the Pacific region. *Mar. Biol.*, **98**, 359-368 (1988).
- 22) J. Kitaura, G. Yamamoto, and M. Nishida: Genetic variation in populations of the diamond-shaped squid *Thysanoteuthis rhombus* as examined by mitochondrial DNA sequence analysis. *Fisheries Science*, **64**, 538-542 (1998).
- 23) J. M. Grijalva-Chon, K. Numachi, O. Sosa-Nishizaki, and J. de la Rosa-Velez: Mitochondrial DNA analysis of north Pacific swordfish (*Xiphias gladius*) population structure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **115**, 15-19 (1994).
- 24) S. Chow and H. Ushima: Global population structure of albacore (*Thunnus alauunga*) inferred by RFLP analysis of the mitochondrial ATPase gene. *Mar. Biol.*, **123**, 39-45 (1995).
- 25) J. E. Graves and A. E. Dizon: Mitochondrial DNA sequence similarity of Atlantic and Pacific albacore tuna. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**, 870-873 (1989).
- 26) M. Miya and M. Nishida: Speciation in the open ocean. *Nature*, **389**, 803-804 (1997).
- 27) Y. Masuda, T. Ozawa, and S. Enami: Genetic differentiation among eight color types of the freshwater goby, *Rhinogobius brunneus*, from western Japan. *Japan. J. Ichthyol.*, **36**, 30-41 (1989).
- 28) M. Katoh and M. Nishida: Biochemical and egg size evolution of freshwater fishes in the *Rhinogobius brunneus* complex (Pisces, Gobiidae) in Okinawa, Japan. *Biol. J. Linn. Soc.*, **51**, 325-335 (1994).
- 29) A. Meyer, T. D. Kocher, P. Basasibwaki, and A. C. Wilson: Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, **347**, 550-553 (1990).
- 30) M. Nishida: Lake Tanganyika as an evolutionary reservoir of old lineages of East African cichlid fishes: Inferences from allozyme data. *Experientia*, **47**, 974-979 (1991).
- 31) T. D. Kocher, J. A. Conroy, K. R. McKaye, and J. R. Stauffer: Similar morphologies of cichlid fish in Lakes Tan-

- ganyika and Malawi are due to convergence. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **2**, 158-165 (1993).
- 32) C. Sturmbauer, E. Verheyen, and A. Meyer: Mitochondrial phylogeny of the Lamprologini, the major substrate spawning lineage of cichlid fishes from Lake Tanganyika in Eastern Africa. *Mol. Biol. Evol.*, **11**, 691-703 (1994).
- 33) M. Nishida: Phylogenetic relationships and evolution of Tanganyikan cichlids: A molecular perspective, in "Fish Communities in Lake Tanganyika" (ed. by H. Kawanabe, M. Hori, and M. Nagoshi), Kyoto Univ. Press, 1997, pp. 3-23.
- 34) M. Miya and M. Nishida: Molecular phylogenetic perspective on the evolution of the deep-sea fish genus *Cyclothone* (Stomiiformes: Gonostomatidae). *Ichthyol. Res.*, **43**, 375-389 (1996).
- 35) M. Miya and M. Nishida: Molecular phylogeny and evolution of the deep-sea fish genus *Sternophyx*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **10**, 11-22 (1998).
- 36) J. Kitaura, K. Wada, and M. Nishida: Molecular phylogeny and evolution of unique mud-using territorial behavior in ocypodid crabs (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae). *Mol. Biol. Evol.*, **15**, 626-637 (1998).
- 37) Y. Kumazawa and M. Nishida: Sequence evolution of the mitochondrial tRNA genes and deep-branch animal phylogenetics. *J. Mol. Evol.*, **37**, 380-398 (1993).
- 38) Y. Kumazawa, M. Yamaguchi, and M. Nishida: Origin of euteleostean biodiversity: Familial radiation of perciforms may have considerably predated the Cretaceous/Tertiary boundary, in "Biology of Biodiversity" (ed. by M. Kato), Springer, (in press).
- 39) M. Miya and M. Nishida: Organization of the mitochondrial genome of a deep-sea fish *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes): The first example of tRNA gene rearrangements in bony fishes. *Mar. Biotechnol.*, (in press).
- 40) K. Takahashi, Y. Terai, M. Nishida, and N. Okada: A novel family of short interspersed repetitive elements (SINEs) from cichlids: The patterns of insertion of SINEs at orthologous loci support the proposed monophyly of four major groups of cichlid fishes in Lake Tanganyika. *Mol. Biol. Evol.*, **15**, 391-407 (1998).