

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03012

研究課題名(和文)アカメは“いま”何個体いるのか？ マルチコホートCKMR法による個体数推定

研究課題名(英文) Estimating the absolute number of individuals of *Lates japonicus* using the CKMR method

研究代表者

高橋 洋 (Takahashi, Hiroshi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・准教授

研究者番号：90399650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脊椎動物の中で最も遺伝的多様性が低く、生活史の多くが不明である“幻の魚”アカメについて、遺伝資源の保全・管理の根幹をなすパラメータである現在の有効集団サイズ( $N_e$ )を明らかにすることを目的とした。そのために、複数年級群からサンプリングされた当歳魚の血縁関係に基づく新たな遺伝的標識再捕(CKMR)の理論を構築し、それに基づいて現在の $N_e$ を推定した。全ゲノムシーケンスデータから年級群間の半兄弟関係ペア数を推定し、CKMRにより $N_e$ 推定を行ったところ、対象期間の成魚数は489-1263個体の範囲と推定された。またその過程で、推定精度向上に必要な生態学的情報などの洗い出しも行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種の個体数は遺伝資源の保全・管理に必須のパラメータであるにもかかわらず、多くの種、特に成体の定量的採集の困難な海洋生物においては、その推定は極めて困難である。本研究は、脊椎動物中最も遺伝的多様性が低く、“幻の魚”と呼ばれる大型魚アカメについて、成魚の採集によらない、遺伝標識再捕(CKMR)法に基づく個体数推定を行い、研究期間中の成魚個体数を一定の精度で明らかにした。本研究で実践された個体数推定法およびそのための理論構築は、定量的採集が困難な海洋生物の保全・管理に新たな道筋を示すとともに、アカメの極めて低い遺伝的多様性の謎を解明し、国と県で統一されていない保全策にも一石を投ずると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to determine the current effective population size ( $N_e$ ), a parameter fundamental to the conservation and management of genetic resources in *Lates japonicus*, which has the lowest genetic diversity among vertebrates and much of its life history is unknown. To this end, we developed a new theory of close-kin mark-recapture (CKMR) based on kinship relationships of yearlings sampled from multiple year classes, and estimated the current  $N_e$  based on this theory. The number of half-sibling pairs between year classes was estimated from whole genome sequencing data and  $N_e$  estimation was performed by CKMR, resulting in an estimated range of 489-1263 adult fish during the study time. In the process, ecological information necessary to improve the accuracy of the estimation was also identified.

研究分野：集団遺伝学

キーワード：遺伝的多様性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

生物のもつ遺伝的多様性、すなわち遺伝資源を適正に保全・管理することは、その利用のみならず、その生物の将来の進化可能性をも左右することから極めて重要である。遺伝資源の増減は、各世代の有効集団サイズ（次世代に遺伝的に貢献している非血縁の親数、 $N_e$ ）に基づいて理論的に予測できるが、人為的影響が反映されるごく最近の  $N_e$  の変化を捉えることは極めて難しい。これまで、実際に個体数を数えたり、漁獲統計や標識再捕法などから推定されたりして得られる個体数 ( $N_c$ ) が、野生生物から得られる唯一の情報と考えられてきた。通常、 $N_c$  と  $N_e$  の間には大きな隔りがあり、その間を埋めるさまざまな生活史パラメータを加味して  $N_e/N_c$  比が推定される。しかしながら、多くの種、特に成体の定量的採集の困難な海洋生物においては、その推定は極めて困難である。もし、子の遺伝情報に基づいて、それらを生んだ親の数、すなわち現在の  $N_e$  が直接推定できれば、小卵多産の戦略をとる傾向が強い海洋生物の保全・管理に新たな道筋を示すことができる。

### 2. 研究の目的

本研究では、脊椎動物の中で最も遺伝的多様性が低く、生活史の多くが不明である“幻の魚”アカメ (*Lates japonicus*) を研究対象に、複数年級群からサンプリングされた当歳魚の血縁関係に基づく新たな遺伝的標識再捕（マルチコホート CKMR 法）の理論を構築し、現在の  $N_e$ （次世代に貢献している成魚個体数）を推定することを目的とする。アカメは日本固有種であり、主に宮崎県と高知県に分布する大型魚であり、単純な種内地理的集団構造をもち、過去の  $N_e$  が 1000～3000 個体と小さいことが明らかになっている。また、その年に生まれた当歳魚が汽水域のコアマモ群落に蟄集することから、種全体を代表する年級群（コホート）のサンプリングが実現できる可能性が高い。国際自然保護連合（2019 年指定）や環境省が本種を絶滅危惧種に指定する中、宮崎県は指定希少野生動植物として捕獲等を全面的に禁止しているのに対し、高知県は 2017 年にレッドデータから除外（デリスト）しており、本種の保全策は保全主体間で足並みが揃わない状況になっている。本研究は、その研究過程を通じて、定量的採集が困難な海洋生物が現在何個体いるのかを推定する手法を構築するとともに、アカメの極めて低い遺伝的多様性の謎を解き明かし、さらにその保全策にも一石を投ずることを目指している。

### 3. 研究の方法

研究目的を達成するために、①定量的なコホートサンプリング、②半兄弟関係を検出するのに最適なゲノム分析手法の検討、③アカメに最適な CKMR 法の理論モデルの構築、および④CKMR 法による“現在の”  $N_e$  推定の 4 つのステップで研究を行った。

#### ①定量的なコホートサンプリング

アカメはその年の初夏に生まれた当歳魚が、河川下流部の汽水域に発達するコママモ群落に依存して成長するため、毎年秋季に当歳魚がコママモ群落に蟄集する。このタイミングで、高知県と宮崎県の主要なコママモ群落で調査を行えば、種全体を代表するコホートサンプリングが実現する可能性が高い。すでに先行研究によって 2017 年から宮崎県および高知県において実施されてきたコホートサンプリング（100 個体/年）に加え、当研究期間の 2020 年にも両県においてコホートサンプリングを行った。サンプリングは例外なく地元漁協の同意を得て行い、指定希少野生動植物等捕獲等許可申請や特別採捕許可申請など自治体おける必要な手続きを経て許可を得た上で行った。当歳魚の採集には小型引網を用い、DNA 試料の採取は低侵襲的手法を用いて行い、研究期間を通じてアカメは 1 個体も殺さずに現場に放流した。

#### ②半兄弟関係を検出するのに最適なゲノム分析手法の検討

既存の DNA 試料を用いた予備実験の結果、RAD-seq や GRAS-Di などの Genotyping by Sequencing (GBS) 手法では血縁推定に必要な一塩基多型 (SNPs) 数が確保できないことがわかり、最適なゲノム分析手法を LWGS（低カバレッジ全ゲノムシーケンス）による SNPs 検出に決定した。LWGS 用ライブラリ作成法として HackFlex 法を検討し、また血縁推定に必要なデータ量などを検討した。

#### ③アカメに最適な CKMR 法の理論モデルの構築

LWGS によって検出された SNPs データに基づき、血縁推定におけるさまざまなパラメータを調節し、必要予算、コンピュータ計算時間、および推定精度の各方面から最適な理論モデルの構築を行った。予算面の制約から、当初計画していた宮崎県と高知県の 2 地点のうち、宮崎県のみの 3 年分の年級群を用いて最終的な推定を行うことにした。また、この際の集団構造の影響などを考慮するために、分集団間の移動個体数を推定する CKMR のモデル構築を行った。

#### ④CKMR 法による“現在の” $N_e$ 推定

3年分の年級群間の半同胞推定結果に基づき、ベイズ推定によるCKMRの適用法を検討し、当研究期間中の成魚個体数を推定した。

#### 4. 研究成果

##### ①定量的コホートサンプリング

2020年に、宮崎県および高知県で予定されていた当歳魚のDNA試料(100個体)をサンプリングできた。また、DNA試料は低侵襲的に採取し、アカメは1個体も殺さず、現場に放流することができた。先行研究のサンプルと合わせて、両県において2018年~2020年の3年間分のコホートサンプル(100個体/年)が得られた。なお、後述の通り研究資金をNGS解析に最大限配分するために、2021年および2022年のサンプリングは行わなかった。

##### ②最適なゲノム分析手法の検討

HackFlex法によるLWGS用ライブラリ作成を行い、まずは予備分析として2019年の宮崎県の38個体を平均デプス20×程度で全ゲノムリシーケンス法によりデータを取得した。このデータを用いて、15×、12×、10×などのダウンサンプルを作成し、20×データを用いた場合と同様の血縁推定結果が得られるかを検討した。その結果、10×ダウンサンプルのデータセットでも、20×データセットの血縁推定結果を再現可能であることが確認され、全個体10×以上のデータ量を得るために、平均デプス12×程度でシーケンスすることを決定した。なお、この段階で宮崎県および高知県の両県において3年分のデータを得ることが研究予算上不可能となり、以降のステップでは得られる研究成果を考慮して、宮崎県のサンプルのみについて解析を行うことになった。

##### ③アカメに最適なCKMR法の理論モデルの構築

まず既存の近似ベイズ推定やMCMCを用いたベイズ推定によるCKMR法を検討した。その結果、マルチコホートCKMRの点推定値と95%信用区間の算出には、MCMCを用いたベイズ推定法を用いることになった。本推定法の具体的な流れは以下の通りである：まず、各年の成魚個体数を指数関数増加の個体群動態の式に従うと仮定して推定し、その下である2個体がHSPである確率(pHSP)をCKMRの理論式から求め、算出したpHSPのもとで実際に得られた血縁推定結果の起こりやすさ(対数尤度)を求める。つぎに、事前分布から対数事前確率を求め、対数尤度を加味して対数事後確率に相当する値を求め、MCMCアルゴリズムを用いて個体群動態に関する新たなパラメータを提案し、それらの対数事後確率を比較する。MCMCを繰り返し行い、パラメータを一定間隔でサンプリングしながら、対数事後確率の高いパラメータに収束させる。また、以上の理論モデルに加えて、見出された親子や(半)兄弟関係から、分集団間の移動個体数を推定する理論を開発した<sup>1)</sup>。遺伝的差異の小さな集団間において、移動の情報を得る方法論は限られているが、この理論はそのような状況下で効果を発揮し、保全や資源管理上の応用が期待される。

##### ④CKMR法による“現在の”Ne推定

2018年~2020年の3年間分のコホートサンプル(各年90~96個体)について、平均デプス11~12×が期待される全ゲノムリシーケンスを実施した。最低デプス5×以上、マイナーアレル頻度5%以上などのフィルタリングを施した結果、20,579座位のSNPsが得られた。得られたデータセットに基づき、COLONY2.0ソフトウェアによって血縁推定を行ったところ、それぞれのコホート内では全兄弟関係が3~16ペア、半兄弟関係が13~36ペア見出された(図1)。

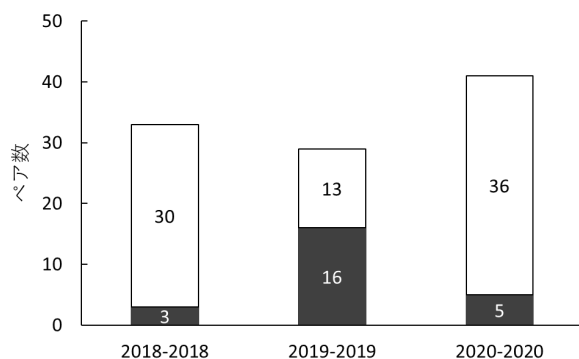


図1. 同一年級群内の稚魚間で推定された血縁ペア数。黒は全兄弟、白は半兄弟を示す。

異なるコホート間では半兄弟関係のみが確認され、その数は2018-2019年間で43ペア、2018-2020年間で79ペア、2019-2020年間で49ペアであった(図2)。コホート間のHSP数に基づい

て CKMR 法を行ったところ、対象期間のアカメ成魚数は 489～1263 個体の範囲と推定された。

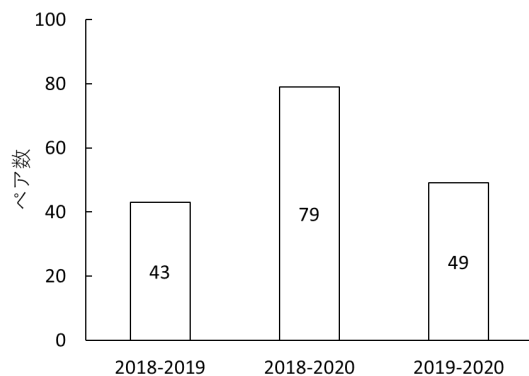


図 2. 異なる年級群の稚魚間で推定された半兄弟ペア数。  
全兄弟は確認されなかった。

2 年間隔のコホート間での HSP 数が 1 年間隔の場合より多かったことから、一部の個体が隔年繁殖していることも予想されたため、今後そのような生態的情報を CKMR 法に組み入れることで、より精度の高い推定が可能になると考えられる。

本研究で実践された個体数推定法およびそのための理論構築は、定量的採集が困難な海洋生物の保全・管理に新たな道筋を示すとともに、アカメの極めて低い遺伝的多様性の謎を解明し、国と県で統一されていない保全策にも一石を投ずると期待される。

#### 〈引用文献〉

- 1) Akita T., Estimating contemporary migration numbers of adults based on kinship relationships in iteroparous species, *Molecular Ecology Resources*, 22:8, 3006-3017 (2022).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 竹下直彦・近藤卓哉・池田 至・高橋 洋・永田新悟・星野和夫	4. 巻 70
2. 論文標題 水温と塩分がアカメ未成魚の摂餌と成長に及ぼす影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 水産大学校研究報告	6. 最初と最後の頁 27-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mishina Tappei, Takeshima Hirohiko, Takada Mikumi, Iguchi Kei' ichiro, Zhang Chunguang, Zhao Yahui, Kawahara-Miki Ryouka, Hashiguchi Yasuyuki, Tabata Ryoichi, Sasaki Takeshi, Nishida Mutsumi, Watanabe Katsutoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Interploidy gene flow involving the sexual-asexual cycle facilitates the diversification of gynogenetic triploid Carassius fish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01754-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Muto Nozomu, Kakioka Ryo, Ghaffar Mazlan Abd, Quan Nguyen Van, Vilasri Veera, Traifalgar Rex F. M., Babaran Ricardo P., Muto Fumihito, Takeshima Hirohiko, Motomura Hiroyuki, Ishikawa Satoshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Fine scale phylogeography of coastal fishes in the South China Sea: Possible roles of biological traits and geography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biogeography	6. 最初と最後の頁 2785 ~ 2800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jbi.14239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ueda Rui, Takeshima Hirohiko, Sato Takuya	4. 巻 69
2. 論文標題 Difficulty in sex identification of two local populations of red-spotted masu salmon using two salmonid male-specific molecular markers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ichthyological Research	6. 最初と最後の頁 275 ~ 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10228-021-00837-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akita Tetsuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Nearly unbiased estimator of contemporary Ne/N based on kinship relationships	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 10343 ~ 10352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ece3.6421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kodama Taketoshi, Ohshimo Seiji, Tawa Atsushi, Furukawa Seishiro, Nohara Kenji, Takeshima Hirohiko, Chiba Satoru N., Ishihara Taiki, Sawai Etsuro, Kawazu Masanori, Okazaki Makoto, Ono Tsuneo, Suzuki Nobuaki	4. 巻 175
2. 論文標題 Vertical distribution of larval Pacific bluefin tuna, <i>Thunnus orientalis</i> , in the Japan Sea	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography	6. 最初と最後の頁 104785 ~ 104785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dsr2.2020.104785	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamasaki Yo Y., Takeshima Hirohiko, Kano Yuichi, Oseko Naoharu, Suzuki Toshiyuki, Nishida Mutsumi, Watanabe Katsutoshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Ecosystem size predicts the probability of speciation in migratory freshwater fish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Ecology	6. 最初と最後の頁 3071 ~ 3083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mec.15415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Hiroshige, Kodama Taketoshi, Suzuki Nobuaki, Mochizuki Yosuke, Ashida Hiroshi, Sato Takuya, Takeshima Hirohiko, Nohara Kenji	4. 巻 86
2. 論文標題 The distribution and early growth of juvenile Pacific bluefin tuna <i>Thunnus orientalis</i> around Sado Island in the eastern Sea of Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 1019 ~ 1028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-020-01470-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamasaki Yo Y., Kakioka Ryo, Takahashi Hiroshi, Toyoda Atsushi, Nagano Atsushi J., Machida Yoshiyasu, Miller Peter R., Kitano Jun	4. 巻 375
2. 論文標題 Genome-wide patterns of divergence and introgression after secondary contact between <i>Pungitius sticklebacks</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 20190548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rstb.2019.0548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Hiroshi, Kurogoushi Taiki, Shimoyama Ryo, Yoshikawa Hiroyuki	4. 巻 68
2. 論文標題 First report of natural hybridization between two yellowtails, <i>Seriola quinqueradiata</i> and <i>S. lalandi</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ichthyological Research	6. 最初と最後の頁 139 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10228-020-00752-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 武藤望生・柿岡 諒・永野 惇・坪井健人・清水祐大・猪瀬周・清水洋平・川崎琢真・高橋 洋
2. 発表標題 メバル属魚類の接合後隔離と形態分化にかかわる遺伝領域の探索
3. 学会等名 日本魚類学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryoya Yanada, Kaede Kusunaga, Hiroshi Takahashi
2. 発表標題 The genetic basis of egg size variation in ninespine stickleback, <i>Pungitius pungitius</i>
3. 学会等名 26th Joint International Symposium between National Fisheries University and Pukyong National University (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋口康之
2. 発表標題 硬骨魚類における嗅覚受容体遺伝子の多様性：生活史との関連に着目して
3. 学会等名 日本進化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋口康之・井上順治・中島 淳
2. 発表標題 魚類におけるフェロモン受容体OR114の起源と分子進化
3. 学会等名 日本魚類学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田るい, 金岩稔, 照井慧, 瀧本 岳, 武島弘彦, 勝村啓史, 橋口康之, 山崎 曜, 佐藤拓哉
2. 発表標題 森と川のつながりが維持するアマゴの生活史多様性：野外操作実験とゲノム解析の融合へ
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋田鉄也
2. 発表標題 近親標識法による集団間の移動個体数推定
3. 学会等名 第37回個体群生態学会大会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Hiroshi Takahashi
2. 発表標題 Molecular diagnostic methods for identifying pufferfish species and their hybrid to prevent pufferfish poisoning
3. 学会等名 The 35th Annual Meeting of the Korean Society of Food Hygiene and Safety (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yo Yamasaki, Tomoyuki Kokita, Koki Kato, Asato Irifune, Mitsuki Kuroda, Hiroshi Takahashi, Yoshiyasu Machida, Asano Ishikawa, Mikiko Tanaka, Seiichi Mori, Atsushi Toyoda, Jun Kitano
2. 発表標題 Multiple paths to the same goal: the repeated use of hotspot genes for convergent plate reduction in sticklebacks
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of the Ecological Society of Japan (ESJ67)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安武由矢・高橋 洋・望岡典隆
2. 発表標題 AFLP法による種同定に基づく九州北部海域のメバル複合種群の計数形質
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hiroshi Takahashi他著, Yoshiaki Kai他編	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 454
3. 書名 Fish Diversity of Japan: Evolution, Zoogeography, and Conservation	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中山 耕至  (Nakayama Kouji)  (50324661)	京都大学・農学研究科・助教    (14301)	
研究分担者	橋口 康之  (Hashiguchi Yasuyuki)  (70436517)	大阪医科薬科大学・医学部・講師    (34401)	
研究分担者	秋田 鉄也  (Akita Tetsuya)  (60625507)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産資源研究所(横浜)・研究員    (82708)	
研究分担者	武島 弘彦  (Takeshima Hirohiko)  (50573086)	福井県立大学・海洋生物資源学部・客員研究員    (23401)	
研究分担者	小関 右介  (Koseki Yusuke)  (00513772)	大妻女子大学・家政学部・准教授    (32604)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関