

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 1 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450292

研究課題名(和文) 激減したマイワシ資源の3次元的な遺伝的多様性変化の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the three-dimensional genetic diversity change of the pilchard resources which decreased sharply

研究代表者

柳本 卓 (Yanagimoto, Takashi)

国立研究開発法人水産総合研究センター・中央水産研究所・主任研究員

研究者番号：30443386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：mtDNAの塩基配列分析によりマイワシの日本海から太平洋にかけて広く水平的な遺伝的多様性について調べた。集団間には差がなく、日本周辺のマイワシは一つのメタ集団を形成していると考えられた。マイワシの主な産卵場所である土佐湾で1990年から2012年に採集された集団について、mtDNAの塩基配列分析を行った。経年的な遺伝的な差はみられなかった。資源が激減しているが、遺伝的な多様性に差はなかった。1990年代は数百万トンの漁獲量があり、2012年にはわずか数万トンであるが、遺伝的な多様性に減少を及ぼすほどではなかった。

研究成果の概要(英文)：Applying coalescent models to mitochondrial DNA sequences from the Japanese sardine, we found evidence for reproductive skew, which can produce an excess of rare alleles and extremely low ratios of effective population size to census size.

研究分野：漁業生態学

キーワード：マイワシ 遺伝的多様性 有効集団サイズ コアレセント解析

1. 研究開始当初の背景

マイワシはニシン目ニシン科マイワシ属に属し、日本の太平洋と日本海沿岸、朝鮮半島東部、オホーツク海、北西太平洋と広く分布している。^{1,2)}その資源量は莫大で、我が国にとって最も重要な漁業資源の一つである。しかし、その資源は海洋環境などの影響を受けて、数十年規模の変動をされると言われている。我が国では、大きく太平洋系群と対馬暖流系群に分けて資源管理が行われている。^{1,2)}それによると、両系群とも 1980 年代前半から 1990 年代前半に漁獲量は多かったが、その後減少に転じ、1990 年代後半から激減した。2000 年代になっても漁獲量は激減したままである。特に、2000 年代は低水準で推移していたと考えられる。一方、2010 年に大きな卓越年級群が発生したと報告されており、今後これらの卓越年級群によって資源が回復することが期待されている。³⁾

しかし、一度激減した資源が、再び増加したからといって、通常の資源管理を行っているのか疑問が持たれている。資源が激減した前後で遺伝的な組成が異なっている可能性や、遺伝的な多様性が失われている可能性がある。資源の激減に伴って遺伝的な健全性が失われているとすると、通常の資源管理を行うことにより、増加してきた資源への重大なダメージを与えてしまう可能性が考えられる。このような資源に対して遺伝的多様性、塩基置換数、塩基置換部位の違いなどを調べ、遺伝的な面から資源管理と評価に役立てることは重要である。

2. 研究の目的

現在、マイワシの資源評価は対馬暖流系群と太平洋系群に二つに分けて実施されている。^{1,2)}しかし、1980 年代には様々な海域に産卵場が形成されたこと、日本から遠く離れた北西太平洋にも分布していることから、改めて地域的な遺伝的な変化を調べ、集団構造解析を行う必要がある。マイワシ類の資源構造に関する論文は多数あるが、⁴⁻⁷⁾日本周辺海域からのサンプルを用いた研究はほとんどない。⁸⁾そこで、DNA 分析によりマイワシの集団構造を明らかにすることを目的とする。これらの時系列的な解析と空間的な解析を行い、3 次元的なマイワシの遺伝的な変異性を明らかにして、資源管理へ役立てることを最終的な目的とする。

本研究では、太平洋系群の主な産卵場である土佐湾で 1990 年から経年的に集められているマイワシのサンプルを用いて、mtDNA の塩基配列分析を行い、塩基配列の組成や多様性に資源激減による影響があるかどうかを検討する。また、新たにマイクロサテライト DNA マーカーの探索を行い、そのマーカーによってマイクロサテライト DNA 分析を行うことにより、核 DNA の多様性なども資源激減による影響があるかどうかを検討する。

また、マイワシは日本周辺から北西太平洋

まで広く分布している。これらの広い海域からサンプリングを行い、集団間で遺伝的な多様性や組成に有意な差がないかを検討する。

資源量の変動に伴い遺伝的な多様性が変化することは、野生動物などは一般的に知られている。しかし、海産魚などにおいて、そのような研究はほとんどされていない。一般的に、海産魚などにおいて、経年的なサンプリングが行われていないからである。しかし、中央水産研究所には 1990 年からの経年的なマイワシのサンプルがある。通常、このような過去のサンプルは入手することができず、大変貴重なものである。また、中央水産研究所および関連機関により、マイワシの幅広い分布域で調査や市場においてのサンプリングなどが行われている。本研究では、これらを利用することができる。遺伝子解析を行うことで、マイワシ資源評価と管理に重要な情報を提供できる可能性がある。これにより、資源管理法が確立されれば、現状より更にマイワシ資源の持続的な有効な利用が可能になると考えられる。

背景と目的の引用文献

1)西田宏・本田聡・川端淳・能登正幸.(2011)平成 23 年度マイワシ太平洋系群の資源評価. 水産庁

(<http://abchan.job.affrc.go.jp/digests23/details/2301.pdf>)

2)田中寛繁・大下誠二・安田十也.(2011)平成 23 年度マイワシ対馬暖流系群の資源評価. 水産庁

(<http://abchan.job.affrc.go.jp/digests23/details/2302.pdf>)

3)水産総合研究センター.(2010)マイワシ太平洋系群 2010 年生まれは卓越年級群 .1-5. (<http://www.fra.affrc.go.jp/pressrelease/pr23/230606/besshi.pdf>)

4)Parrish RH, Serra R, Grant WS. (1989) The monotypic sardines, *Sardina* and *Sardinops*: Their taxonomy, distribution, stock structure, and zoogeography. *Can J Fish Aquat Sci* 46: 2019-2036.

5)Bowen B, Grant WS. (1997) Phylogeography of the sardines (*sardinops* spp.): assessing biogeographic models and population histotemperate upwelling zone. *Evol* 51: 1601-1610.

6)Grant WS, Bowen BW. (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J Heredity* 89:415-426.

7)Grant WS, Clark AM, Bowen BW. (1998) Why restriction length polymorphism analysis (*Sardinops*) biogeography: insights from mitochondrial DNA cytochrome b sequence. *Can J Fish Aquat Sci* 55: 2539-2547.

8)Okazaki T, Kobayashi T, Uozumi Y

(1996) Genetic relationships of pilchards (genus: *Sardinops*) with anti-tropical distributions. *Mar Biol* 126: 585-590.

3. 研究の方法

(1) 様々な海域のサンプリングと経年的なサンプルの整理

中央水産研究所と関連する研究機関が実施している調査などにより、マイワシの分布域から幅広いサンプリングを行った。サンプリングしたものと、1990年から経年的に行われていたサンプルについて、整理を行いながら、筋肉組織の切り出しを行った。切り出した筋肉組織はエタノール溶液に入れて冷凍保存した。これらの筋肉組織の一部を用いて、Qucik Gene(Toyobo)によりDNA抽出を行った。

(2) mtDNAの変異性の高い領域の特定と塩基配列分析

本研究を行うに当たって、mtDNAのどの領域の塩基配列分析を行えばよいかを検討するため、Cytb領域、16S rRNA領域、D-Loop領域などについて、ユニバーサルプライマーを用いてPCR法による増幅実験を行った。PCR法によって増幅産物が得られたものについて、余分なプライマーとdNTPを除去した。精製したものをテンプレートとして、サンガー法によって塩基配列分析を行った。これらによって変異性が高い領域を調べた。得られた塩基配列の変異性を検討する指標として、ハプロタイプ多様度、塩基置換数、塩基置換部位数、塩基多様度などを用いた。変異性の高かった領域を用いて、経年的なサンプルの分析を行った。これらの分析で得られた塩基配列を使い、時系列的な多様性の変化及び有効資源尾数の変化などをコアレセント・シミュレーションにより解析を行った。

(3) マイクロサテライトDNAマーカーの探索と分析

マイワシのDNAを用いて次世代シーケンサーRoche454によるシーケンシングを行った。これらによって得られた塩基配列をNewblerによってアセンブルする。得られたコンティグの中からTandem Repeat FinderによってマイクロサテライトDNAを含む配列を抽出した。抽出したコンティグについて、Primer3によってマイクロサテライトDNAを増幅するプライマーセットを抽出した。これらのプライマーセットについて、PCRによる増幅実験、変異性の検討などを行い、最終的に使用するマイクロサテライトDNAマーカーの決定を試みた。良いマーカーが得られたら、それを用いてmtDNAと同様の解析を行う。

(4) マイワシ近縁種の分析

マイワシの近縁種であり、過去のDNAデータがあるカタクチイワシとサツパについて、mtDNAのD-Loop領域の塩基配列分析を行った。マイワシ同様に解析を行った。

4. 研究成果

(1) mtDNAによる集団構造について

秋田県沖、新潟県沖、天野橋立、五島列島、天草沖、吹上沖、土佐湾、茨城県沖、北西太平洋の沖合3カ所の計11カ所から集めたマイワシ285個体を用いた。PCR法によりD-Loop領域を含む約1700bpを増幅することができた。PCR産物をテンプレートとして約1661bpの塩基配列を決定した。D-Loop領域のハプロタイプは239個出現し、ハプロタイプ多様度は0.993から1であった。塩基多様度は0.04から0.07となり、非常に高かった。集団間のpairwise F_{ST} は-0.18937から0.07073で、集団間に有意差はなかった。また、AMOVA分析を行ったところ、集団間の変異の割合は小さく、集団間に有意差はなかった。また、集団間の遺伝距離からNJ図を作成したところ、集団間の遺伝距離は小さく、また物理的な距離に関わらず、クラスターが形成されていた日本周辺に分布するマイワシに遺伝的な差はなく、一つの大きな集団であると考えられた。太平洋系群の産卵場は土佐湾で、日本海系群の産卵場は薩摩灘とされている。薩摩灘の産卵場から卵やふ化した仔魚が黒潮によって太平洋側に移送される可能性がある。また、太平洋に分布するマイワシが土佐湾より南に移動して、薩摩灘で産卵する可能性もある。スケトウダラなどでも同様な報告があり、マイワシも集団間で遺伝的な交流があると考えられた。日本周辺におけるマイワシは一つのメタ集団であると推測された。

(2) 土佐湾のマイワシの経年的な遺伝的な多様性変化

1990年、2007年、2010年、2012年に採集されたマイワシ262個体からQuickGene(Fujifilm)を用いて、DNAを抽出した。それらから、D-Loop領域は211個体、16S領域は172個体、Cytb領域は171個体について調べた。D-Loop領域については、PCR法によりD-Loop領域を含む約1500bpを増幅することができた。PCR産物をテンプレートとして約1212bpの塩基配列を決定した。D-Loop領域のハプロタイプ多様度は0.998から1で、変異性は非常に高かったが、年集団間に有意差はなかった。塩基多様度は0.00605から0.00661で、年集団間に有意差はなかった。年集団間のpairwise F_{ST} は-0.00027から0.00094で、年集団間に有意差はなかった。また、AMOVA分析を行ったところ、年集団間に有意差はなく、同じ集団と考えられた。16SrRNA領域については、566bpの塩基配列を決定することができた。16SrRNA領域のハプロタイプ多様度は0.229から0.310で、変異性は小さく、年集団間に有意差はなかった。塩基多様度は0.00043から0.00059で、年集団間に有意差はなかった。COI領域については、592bpの塩基配列を決定することができた。ハプロタイプ多様度は0.492から0.733で、年集団に差はなかった。

塩基多様度は 0.00157 から 0.00245 で、年集団に差はなかった。

このように、マイワシ資源は激減しているが、遺伝的な多様性の減少を伴っていないことが分かった。マイワシの年齢-体重関係から 1 個体の平均体重を約 100 g とすると、最も漁獲量が少ない 2005 年の 2 万 5 千トンで、漁獲尾数は 25 万個体になる。この資源への低下の後でも、遺伝的な多様性の減少はみられなかった。

(3) マイクロサテライト DNA マーカーの探索と近縁種の経年変化

次世代シーケンサー Roche454 によりマイワシのマイクロサテライト DNA マーカーの探索を行い、多数のマーカーが得られた。その中から 20 種類ほどのマーカーについて、PCR 法による増幅実験を行った。しかし、再現性がなく、また、多様性の少ないものが多かった。今後、更に検討することにより、良いマーカーが得られると考えられた。

1997 年と 2015 年に東京湾で採集されたカタクチイワシについて、mtDNA の D-Loop 領域の部分配列を決定して比較したところ、マイワシと同様に遺伝的な多様性に差はなかった。また、2005 年と 2015 年に岡山で採集されたサツパについて、mtDNA の D-Loop 領域の部分配列を決定して比較したところ、マイワシ同様に遺伝的多様性に差はなかった。

(4) コアレセントシミュレーション解析結果

1990 年および 2010-2012 年採取のマイワシ mtDNA 標本の 20 年間にわたる遺伝子頻度の変化のコアレセント解析から、この間の有効集団サイズは 630 尾と推定された(用いた事前分布は uniform Dirichlet)。この数値は実在する資源尾数と比べ極端に小さい。マイワシ mtDNA 配列の多様性の標準コアレセント理論に基づく解析からは、この 20 年間に観測された小さな有効集団サイズは得られず、その 3 桁ほど大きい値が推定された。

一方、マイワシ mtDNA 配列多型の Beta コアレセント解析からは、矛盾のない推定値が得られた。このように、水産分野でも一般的に用いられている標準コアレセント解析は誤った結論を導く。これはマイワシ集団では親魚が次世代に残す仔の数のバラツキが極端に大きく、仔数分布がベキ則の裾を持つことを示している。再生産がベキ則分布に従う集団の加入過程をシミュレーションしたところ、例外的に大きな加入(卓越年級)が間欠的に起こり、このとき遺伝的多様性(有効集団サイズ)が大きく低下することが分かった。これは卓越年級群の発生には少数の親魚が大きく寄与していることを意味する。こうして、膨大な数の卵を産むマイワシでは親魚が次世代に残す仔の数に極端な偏りが存在し、仔数分布の極端な偏りが卓越年級を生み出す、ということが明らかにされた。

有効集団サイズは、絶滅危惧種においてはその保全に際し重要な指標となっている。一

方、マイワシのように、大きな遺伝的浮動と相補的に大きな実在サイズを特徴とする海産魚介類においては、繁殖生態や加入過程の把握に役立つことが期待され、保全生態学とは異なる観点から重要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1) 柳本 卓・梨田一也・丹羽洋智. 2016. マイワシ mtDNA D-Loop 領域の塩基配列の

地理的変異について、DNA 多型 23:印刷中.

2) Niwa H, Nashida K, Yanagimoto T. 2016. Reproductive skew in Japanese sardine inferred from DNA sequences. ICES. Doi:10.1093/icesjms/fsw070.

3) 梨田一也・赤嶺達郎. 2016. 平成 27

(2015) 年度ニギス太平洋系群の資源評価.

平成 27 年度我が国周辺水域の漁業資源評価

(魚種別系群別資源評価・TAC 種以外)、水産庁増殖推進部、国立研究開発法人 水産総合研究センター、894-910.

4) 梨田一也・廣田祐一. 2016. 土佐湾におけるマイワシ、ウルメイワシの調査船による

漁獲状況. 黒潮の資源海洋研究、17、

65-72.

5) 柳本 卓・丹羽洋智・梨田一也. 2015.

資源の増減に伴うマイワシ mtDNA の遺伝的多様性の変化について、DNA 多型 22: 89-91.

6) 丹羽洋智. 2015. パレート系統樹を有する海産魚介類集団のダイナミクス、数理解析研究所講究録 1937:101-108.

7) Niwa H-S. 2014. Uncertainty in a measurement of density dependence on population fluctuations. Applied Mathematics 5:1108-1119.

[学会発表](計 8 件)

1) 柳本 卓・梨田一也・丹羽洋智. 2015. mtDNAD-Loop 領域の塩基配列によるマイワシの集団構造、日本 DNA 多型学会第 24 回学術集会抄録集、pp72. 岡山.

2) 丹羽洋智. 卓越年級群の加入に伴う遺伝的多様性の低下. 2015 年度水産海洋学会研究発表大会、講演要旨集、p.70. 釧路.

3) 柳本 卓・丹羽洋智・梨田一也. 2014 . 資源の増減に伴うマイワシ mtDNA の遺伝的多様性の変化について、日本 DNA 多型学会学術集会抄録集、pp86. 名古屋 .

4) 丹羽洋智・柳本卓・梨田一也 . 2014 . Poisson vs Pareto 型繁殖：DNA 多型情報に基づく加入過程の推測、2014 年度水産海洋学会研究発表大会、講演要旨集、pp68. 横浜 .

5) 丹羽洋智 . 2014 . パレート系統樹を有する海産魚介類集団のダイナミクス、RIMS 研究集会 第 11 回 生物数学の理論とその応用予稿集
<http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/konr/tbma11th/abstract.pdf> . 京都 .

6) 丹羽洋智 . 2014 . 個体群動態における bottleneck と sweepstakes が DNA 配列に残す痕跡、第 61 回日本生態学会大会、講演要旨
<http://www.esj.ne.jp/meeting/abst/61/G2-08.html> . 広島 .

7) 丹羽洋智・柳本卓・梨田一也 . 2013 . コアレセント・シミュレーションによるマイワシ加入過程の検討、2013 年度水産海洋学会研究発表大会、講演要旨集、pp12 . 京都 .

8) 丹羽洋智 . 2013 . 群れ形成過程におけるサイズ選択と頻度分布、第 23 回日本数理生物学会年会、講演要旨、pp103. 浜松 .

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://ices.dk/news-and-events/news-archiving/news/Pages/IJMS-Editor's-Choice---studying-the-sardine-skew.aspx>

(ICES のニュースサイトで本研究成果が解

説記事とともに紹介されている)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柳本 卓 (YANAGIMOTO, Takashi)

国立研究開発法人・

水産研究総合研究センター・中央水産研究所・主任研究員

研究者番号：30443386

(2)研究分担者

丹羽洋智 (NIWA, Hiroshiro)

国立研究開発法人・

水産研究総合研究センター・中央水産研究所・主幹研究員

研究者番号：60372083

梨田一也 (NASHIDA, Kazuya)

(国立研究開発法人・

水産研究総合研究センター・中央水産研究所、主任研究員

研究者番号：10371882