

ミトコンドリア D-Loop 領域の塩基配列分析による北大西洋およびミナミマグロ漁場におけるニシネズミザメ集団構造についての検討

Population structure of Porbeagle (*Lamna nasus*) in the North Atlantic Ocean and SBT fishery ground as inferred from mitochondrial DNA control region sequences.

日本エヌ・ユー・エス (株) 北村徹  
遠洋水産研究所 熱帯性まぐろ資源部 松永浩昌

Toru Kitamura  
*Japan NUS, Co., LTD.*  
Hiroaki Matsunaga  
*National Research Institute of Far Seas Fisheries, FRA, JAPAN*

Genetic population structure of porbeagle *Lamna nasus* in the SBT fishery ground (South Atlantic Ocean and Indian Ocean) and North Atlantic Ocean was investigated using nucleotide sequence of the mitochondrial DNA. We analyzed sequence variation of 293bp of the D-Loop region of 94 sharks, four with North Atlantic, 49 with South Atlantic and 41 with Indian Ocean. Neighbor-joining and UPGMA trees reveal that North Atlantic and SBT fishery ground populations are genetically divided. Porbeagle prefers cold water and does not occur in equatorial seas. These biological data indicate restriction of gene flow between North Atlantic Ocean and SBT fishery ground populations. Concordance between genetic and biological information is taken as robust evidence of population structure, and it is considered that two populations should be managed separately.

Molecular phylogenetic tree suggests that, in SBT fishery ground, there is not any sub-populations of porbeagles which need to be manage separately. Furthermore, no distinct factor to restrict the gene flow supports this suggestion. Genetic studies using additional samples collected from wide area of Atlantic Ocean and research with other techniques (e.g., genetic study with microsatellite marker or satellite tagging survey) are desirable to further understand the migration pattern and population structure of porbeagle in SBT fishery ground.

Finally, haplotype diversity and nucleotide diversity of porbeagle in the SBT fishery ground are high, which suggests that there is no trend of decline in the porbeagle stock in the SBT fishery ground.

**【要約】**

ミナママグロ漁場および北大西洋で漁獲された、94 個体のニシネズミザメから抽出した DNA について、ミトコンドリア D-Loop 部分領域の塩基配列分析を行なった。得られた塩基配列から分子系統樹を作成した結果、大きく 2 つのグループに識別できる事が明らかとなった。このうちの一つは北大西洋の 4 個体のみで構成されているが、他方のグループにはインド洋と南大西洋の個体が混在していた。従って、北大西洋の個体はインド洋および南大西洋の個体とは遺伝的に異なることが示唆された。

一方、南大西洋とインド洋の個体は、1 つのグループに混在しており、両海域の個体を識別する事は出来なかった。両海域間には、遺伝的交流を妨げるような障壁が無い事からも、本結果は支持されると思われる。また、南大西洋およびインド洋で漁獲された個体について、ハプロタイプ多様度およびヌクレオチド多様度を調べた結果、どの海域においても高い値を示し、個体数が減少している等の兆候は確認されなかった。

**【はじめに】**

ニシネズミザメはネズミザメ目、ネズミザメ科に属するサメ類で、北大西洋および南半球の亜寒帯海域を分布域とし、マグロはえ縄漁業において混獲されている。本種の産仔数は 1~5 尾で、春~夏にかけて 60~75cm の仔魚が産出される (Compagno 2001)。

本種は、2007 年 6 月にオランダで行われたワシントン条約締約国会議において、ドイツ (EU 代表) により付属書 II への掲載提案が行なわれたが、多数決の結果本提案は否決されている。しかしながら、本種の繁殖生態や集団構造など、資源管理を行なうために必要な知見は乏しく、資源評価を科学的に行なうための情報を蓄積する事が重要である。

一方、近年非常に多くの生物について行われている遺伝学的研究は、資源管理を行う際に重要となる系群に関する情報や、資源状態を反映すると考えられる遺伝的多様性に関する知見を報告しており、資源評価を行う際の重要性が増してきている。

そこで本研究では、北大西洋およびミナママグロ漁場 (南大西洋、インド洋) において漁獲したニシネズミザメについて遺伝学的研究を行い、その集団構造についての検討を行なった。

**【材料と方法】**

南大西洋 (南緯 30° ~40 度、経度 0° ~東経 11° ) にて漁獲した 49 個体、北大西洋で漁獲した 4 個体 (北緯 41° 付近、西経 55 度付近) および、インド洋 (南緯 30° ~40 度、東経 99° ~145° ) で漁獲した 41 個体の合計 94 個体について分析を行なった (表 1)。分析に用いた各個体の筋肉片は、漁獲後に船上にて切り出し、100%エタノール中に浸漬して常温にて保管した。筋肉片からの Total DNA の抽出は、QIAGEN 社製 DNeasy Tissue Kit

を用いて行なった。抽出した DNA については、PCR 法により DNA 断片の増幅を行った。なお、PCR に用いたプライマーは、DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている、ホホジロザメ (*Carcharodon carcharias*) D-Loop 領域の塩基配列 (Pardini et al. 2001) を参考にして作成した、Nishinezu-DLL (5' GAC ATG ACC CAC ATA CCT TA) および、Nishinezu-DLH (5' ATC TTG ACG CGA TCA AGG AC) である。また、PCR サイクルについては、98°C-30sec 後、98°C-10sec、55°C-30 sec、72°C-60sec を 30 回繰り返す、最後に 72°C-2min の伸長反応を行なった。PCR 増幅産物は、アガロースゲル電気泳動にて増幅断片長を確認後、Amersham Biosciences 社製 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit により精製し、Applied Biosystems 社製 BigDye Terminator v3.1 を用いてシーケンシング反応を行った。反応後のサンプルについては、Amersham Biosciences 社製 Auto-SeqTMG-50 により精製した後、ABI PRISM 3100 genetic Analyzer により H 鎖および L 鎖の塩基配列を決定した。

決定した塩基配列については、解析ソフト DNASIS Pro V2.2(Hitachi Software Engineering) を用いてアライメント解析を行い、各個体のハプロタイプを決定した。さらに、MEGA 4 (Tamura et al. 2007) を用いて Kimura's two parameter 法 (Kimura 1980) により遺伝距離を計算し、近隣結合法(Saitou and Nei 1987)および UPGMA 法 (Sneath and Sokal 1973) により分子系統樹を作成した。また、ハプロタイプ多様度および、塩基多様度については、解析プログラム DNASP version 3.14 (Rozas and Rozas 1999) を用いて計算した。

#### 【結果と考察】

94 個体のニシネズミサンプルから抽出した DNA について、新たに設計したプライマーセットを用いて PCR を行ったところ、全てのサンプルについて目的長の増幅産物を得ることができた。そこで、得られた増幅産物について、塩基配列分析を行った結果、D-Loop 領域の 5'側部分について 293 塩基対の配列を決定することができた。得られた塩基配列について比較検討を行ったところ、25 の部位において塩基置換が検出され、26 種類のハプロタイプが得られた。なお、欠失/挿入変異は確認されなかった。得られた配列について、近隣結合法および UPGMA 法による分子系統樹を作成したところ、大きく 2 つのクラスターに分かれる樹形となった (図 1、2)。このうち、一方のクラスターは北大西洋の 4 個体のみで構成されているが、もう一方のクラスターにはインド洋と南大西洋の個体が混在しており、北大西洋の個体は南大西洋およびインド洋の個体とは遺伝的に異なること明らかとなった。

ニシネズミザメの分布域は、地中海・北大西洋からバレンツ海まで広がる北半球の分布域と、南緯 30° ~60° の幅で太平洋・大西洋・インド洋に広がる南半球の分布域とに分かれるが、Francis et al. (2008)によると、南半球では海水温 1~23°C 付近に分布し、北大西洋では -1~15°C の海水温域で多くの個体が漁獲されている。一方、赤道海域は水深 10m 付近の水温が 25°C 以上となるため (Weisberg and Colin 1986)、ニシネズミザメが赤道海域を越える事は非常に稀であると思われる。従って、南北集団が距離的に非常に離れている上、両集団を分けるようにして高温の赤道海域が存在する事が、遺伝的交流を制限してい

と思われる。ニシネズミザメは第 14 回のワシントン条約締約国会議において、付属書 II への掲載が提案されたサメ類である。この提案で指摘されたのは、主に北半球におけるニシネズミザメ集団の資源状態であったが、本研究において両集団が遺伝的に異なることが示されたことから、南北のニシネズミザメ集団については、別々に資源管理を行っていくべきであると思われる。

一方、南大西洋とインド洋の集団は、近隣結合法および UPGMA 法で作成した分岐系統樹の樹形からは識別する事が出来なかった (図 1、2)。ミナミマグロ漁場において漁獲されたニシネズミザメの漁獲海域は南緯 30 度以南であり、アフリカ大陸南端の希望岬は、両集団間の遺伝的交流を妨げるような地理的障壁になるとは考えにくい。さらに、両海域間には赤道海域のような高温域も存在せず、両集団間では遺伝的交流が行なわれている可能性が高いと考えられる。以上の事より、インド洋と南大西洋の集団は遺伝的に区別できず、同一の繁殖集団として資源管理を行うべきであると思われる。

また、ミナミマグロ漁場で漁獲されたニシネズミザメ 90 個体については、解析プログラム DnaSP を用いて、遺伝的多様性についての検討を行った (表 2)。南大西洋、インド洋、および両海域を一緒にした場合について、ハプロタイプ多様度およびヌクレオチド多様度を調べた結果、どの海域においても高い値を示した。Grant and Bowen(1998)によると、生物集団が縮小してボトルネックの影響が出てくると、ハプロタイプ多様度で 0.5 以下、ヌクレオチド多様度で 0.005 以下になると予想される。ハプロタイプ多様度は、南大西洋で 0.816 (ハプロタイプ数 11)、インド洋で 0.778 (ハプロタイプ数 17) となり、両海域を一緒にすると 0.814 (ハプロタイプ数 26) の値を得ている。また、塩基多様度は、南大西洋で 0.00893、インド洋で 0.00826、両海域を一緒にすると 0.01105 であり、南大西洋およびインド洋のニシネズミザメ集団では、個体数減少に伴う遺伝的多様度の減少傾向は確認されなかった。

本研究では、大西洋における南北のニシネズミザメ集団は、遺伝的に識別できるとの結果を得た。しかしながら、分析を行なった北大西洋のニシネズミザメは 4 個体と非常に少ないため、今後は更に分析数を増やして分析を行い、東西海域による違いなど北大西洋におけるニシネズミザメの集団構造についても検討を行う必要があると思われる。また、ミナミマグロ漁場における集団構造についても、さらに調査海域を拡げて調査を行う事によって、ニシネズミザメの集団構造に関する新たな知見が得られる可能性があると思われる。また、マイクロサテライトマーカーを利用した研究や、サテライトタグを用いた行動学的研究なども、ニシネズミザメの資源管理を行なう上で非常に重要であると思われる。

#### 【結論】

本研究で分析を行った大西洋およびインド洋で漁獲されたニシネズミザメは、北大西洋海域とミナミマグロ漁場との間で遺伝的に異なることが明らかとなり、両集団については別々に資源管理を行なう必要があると考えられた。一方、南大西洋およびインド洋で漁獲

された個体については、遺伝的に同一である可能性が高く、1つの集団として資源管理を行なうべきであると考えられた。また、ミナママグロ漁場で漁獲されたニシネズミザメについて、ハプロタイプ多様度、およびヌクレオチド多様度を調べた結果、両集団とも高い値を示し、高い遺伝的多様性が維持されていると考えられた。

#### 【文献】

- Compagno, L.J.V. (2001): FAO species catalog, Vol.4: Sharks of the world; Part 2 Ballehad, mackerel and carpet sharks. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Rome, Italy. 269pp.
- Francis, M. P., L. J. Natanson and S. E. Campana (2008): The biology and ecology of the porbeagle shark, *Lamna nasus*. p.105-113. In: *Sharks of the Open Ocean, Biology, Fisheries and Conservation* (eds. M. D. Camhi, E. K. Pikitch and E. A. Babcock). Blackwell Publishing, Oxford UK.
- Felsenstein J (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Grant, W.S. and B.W. Bowen (1986): Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Ame. Genet. Ass.* 89: 415-426.
- Kimura M (1980): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Pardini, A., C. S. Jones, L. R. Noble, B. Kreiser, H. Malcolm, B. D. Bruce, J. D. Stevens, G. Cliff, M. C. Scholl, M. Francis, C. A. J. Duffy, A. P. Martin. (2001): Sex-biased dispersal of great white sharks. *Nature* 412: 139-140.
- Rozas, J. and R. Rozas (1999): DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15:174-175.
- Saitou N & Nei M (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sneath PHA & Sokal RR (1973): *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Weisberg R. H. and C. Colin (1986): Equatorial Atlantic Ocean temperature and current variations during 1983 and 1984. *Nature* 322: 240-243.

**Table 1 Sample No., Area and Catch year of individuals of Porbeagle sharks.**

Sample No	Area	Year	Sample No	Area	Year	Sample No	Area	Year	Sample No	Area	Year
1	North Atlantic	07	25	South Atlantic	95	49	South Atlantic	94	73	Indian Ocean	94
2	North Atlantic	07	26	South Atlantic	95	50	South Atlantic	94	74	Indian Ocean	94
3	North Atlantic	07	27	South Atlantic	95	51	South Atlantic	94	75	Indian Ocean	94
4	North Atlantic	07	28	South Atlantic	95	52	South Atlantic	94	76	Indian Ocean	94
5	South Atlantic	92	29	South Atlantic	95	53	South Atlantic	94	77	Indian Ocean	94
6	South Atlantic	92	30	South Atlantic	95	54	Indian Ocean	94	78	Indian Ocean	94
7	South Atlantic	92	31	South Atlantic	95	55	Indian Ocean	94	79	Indian Ocean	94
8	South Atlantic	92	32	South Atlantic	95	56	Indian Ocean	94	80	Indian Ocean	94
9	South Atlantic	92	33	South Atlantic	92	57	Indian Ocean	94	81	Indian Ocean	94
10	South Atlantic	92	34	South Atlantic	92	58	Indian Ocean	94	82	Indian Ocean	94
11	South Atlantic	92	35	South Atlantic	92	59	Indian Ocean	94	83	Indian Ocean	94
12	South Atlantic	92	36	South Atlantic	92	60	Indian Ocean	94	84	Indian Ocean	94
13	South Atlantic	92	37	South Atlantic	92	61	Indian Ocean	94	85	Indian Ocean	94
14	South Atlantic	92	38	South Atlantic	92	62	Indian Ocean	94	86	Indian Ocean	94
15	South Atlantic	92	39	South Atlantic	92	63	Indian Ocean	94	87	Indian Ocean	94
16	South Atlantic	92	40	South Atlantic	92	64	Indian Ocean	94	88	Indian Ocean	94
17	South Atlantic	92	41	South Atlantic	92	65	Indian Ocean	94	89	Indian Ocean	94
18	South Atlantic	92	42	South Atlantic	92	66	Indian Ocean	94	90	Indian Ocean	92
19	South Atlantic	95	43	South Atlantic	92	67	Indian Ocean	94	91	Indian Ocean	92
20	South Atlantic	95	44	South Atlantic	92	68	Indian Ocean	94	92	Indian Ocean	92
21	South Atlantic	95	45	South Atlantic	92	69	Indian Ocean	94	93	Indian Ocean	92
22	South Atlantic	95	46	South Atlantic	92	70	Indian Ocean	94	94	Indian Ocean	92
23	South Atlantic	95	47	South Atlantic	94	71	Indian Ocean	94			
24	South Atlantic	95	48	South Atlantic	94	72	Indian Ocean	94			

**Table 2 DNA Polymorphism of Porbeagle shark in each area**

Area	Number of samples	Number of haplotypes	Haplotype diversity	Nucleotide Diversity
South Atlantic	49	17	0.816	0.00893
Indian Ocean	41	11	0.778	0.00826
South Atlantic Ocean +	90	22	0.797	0.0086

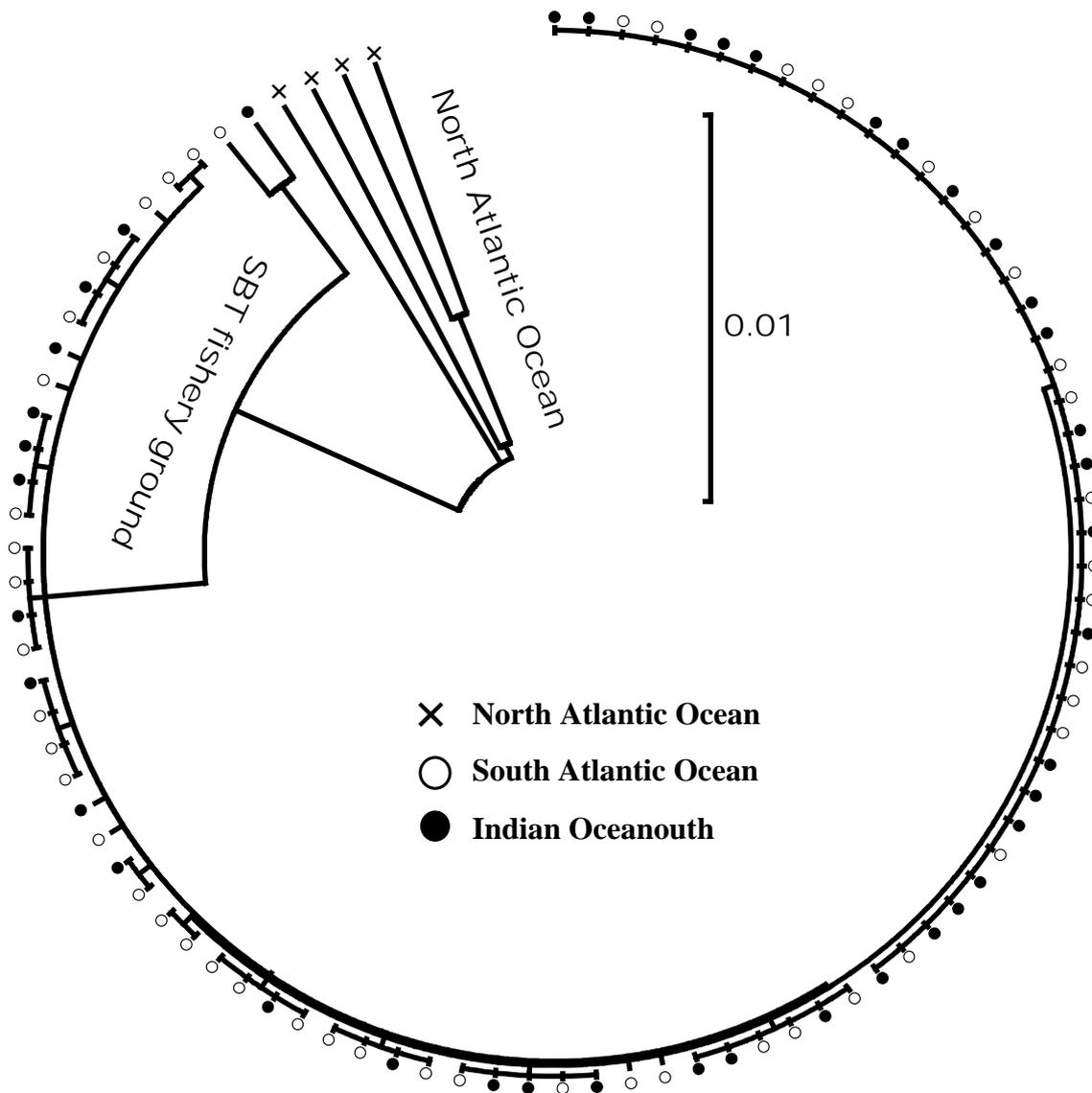


Figure 1. UPGMA tree of 94 Porbeagles in the SBT fishery ground and North Atlantic Ocean.

The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 70% bootstrap replicates are collapsed. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree.

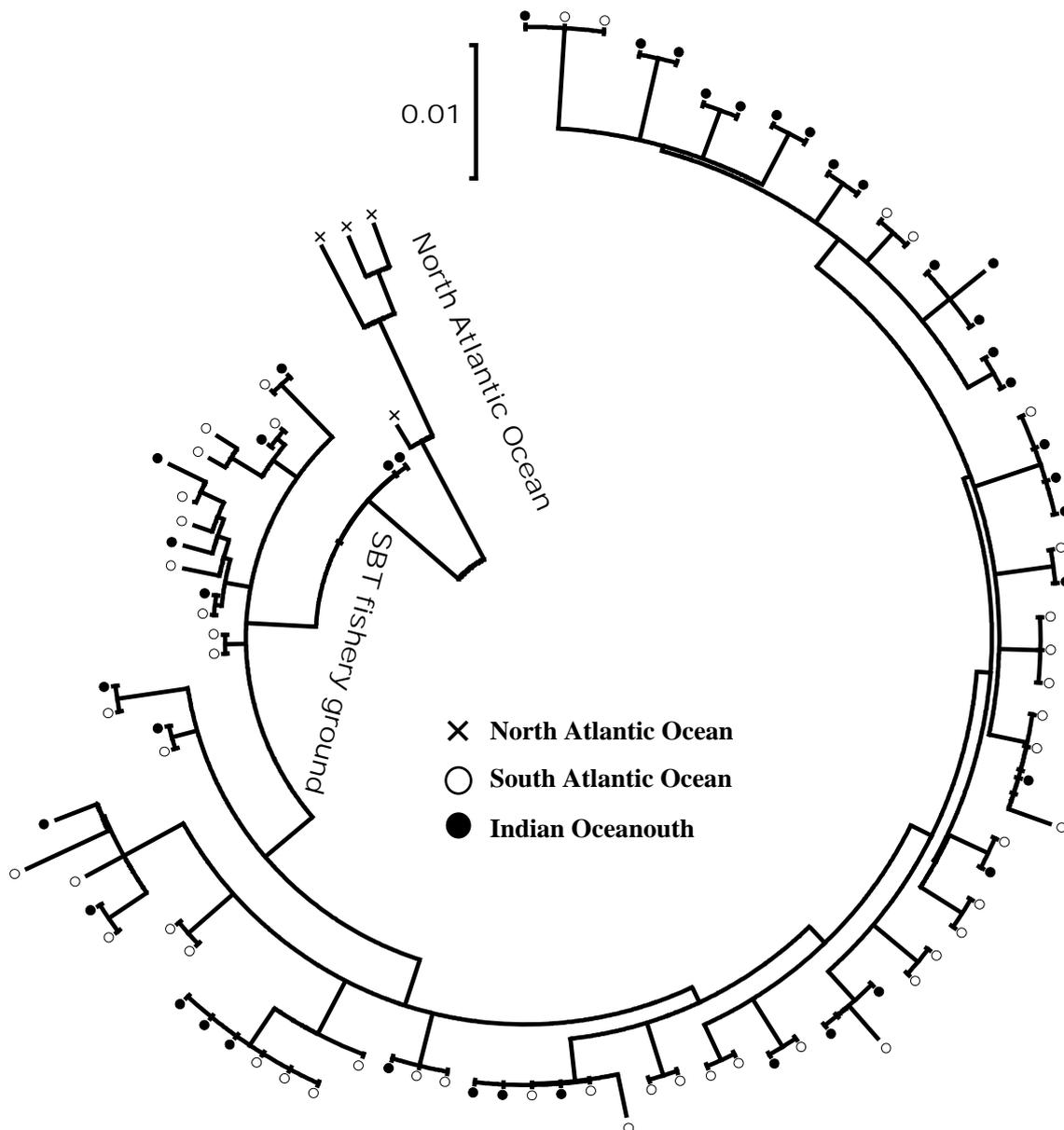


Figure 2. Neighbor-Joining tree of 94 Porbeagles in the SBT fishery ground and North Atlantic Ocean.

The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 70% bootstrap replicates are collapsed. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree.