

ニシン目魚類の分子系統学的研究

浅沼 剛^{*1}・松岡 教理^{*2}

^{*1} 弘前大学理学部生物学科

^{*2} 弘前大学農学生命科学部生物機能科学科生命理学講座

(2001年9月10日受付)

序 論

ニシン目は、現在約 80 属 330 種を含む真骨魚類の原始的な一群である。これらの種はほとんどが熱帯、亜熱帯の比較的温暖な海域に生息し、世界中に広い分布域を有している。ニシン目の中には、ニシンやイワシなどをはじめとし、食用として一般に広く知られたものが多い。これらは、大衆魚ともいわれ、古くから世界各地で食用にされており、水産資源として大変重要なものである。世界的に見て、漁獲量の上位を占める種を多く含む。しかしながら近年では、これらの種の漁獲量は減少傾向にあり、水産資源の世界的な枯渇が見え始めている。これに対して、1996年7月には国連海洋法条約が発効し、水産資源を長期的視点から確保することが求められた。これに基づき、日本では1997年から水産庁がイワシなどの漁獲量の制限を定めるなど、保護政策が行われ始めている。このような水産資源としての重要性から、ニシン目については、数多くの研究が古くから行われている。しかしながら、解明は十分に進んでおらず、更なる研究が必要とされている。

系統分類学上、ニシン目は、条鰭類の進化においても最も進化した真骨魚類に属する。真骨魚類は原生魚類の中で圧倒的多数を占めており、およそ2万種に達するといわれている。また、これら真骨魚類は原生脊椎動物全体のおよそ半分にあたる程種類が多い。この真骨魚類の中でも、ニシン目は最古の分類群に入ると考えられており、ジュラ紀にフォリドフォルス型の祖先から出現したとされ (GREENWOOD *et al.*, 1966), 原始的な形質を多く有している。系統分類学は、主に形態学的な面から、BERG (1940), BERTIN and ARAMBOURG (1958), GOSLINE (1960), WHITEHEAD (1963) などをはじめとし、数多くの報告がなされている。しかしながら、ニシン目魚類内での種間の系統類縁関係には不明な点が多く存在している。そのため、研究者間で分類体系が異なっており、未だ一致した分類体系は示されていない。これは、研究者がどの形質をどのように取り上げ、重みづけ

を行うかにより、結論が大きく変化してしまうことにも起因している。また、同じ形質に基づく議論であっても、形質変化の方向についての考え方が異なっていれば、異なった結論に達する。高次の分類群における系統分類であるため、比較する形質の選択が難しいこともそれを増長している。これらを防ぐためには、より多くの多面的なデータの解析が必要とされる。

一方、近年発達してきた分子系統学では、DNA や RNA、また、その遺伝子の直接産物であるタンパク質を解析することにより、系統類縁関係を明らかにすることができる。これは、現存する生物の遺伝的組成をもとに、その生物がたどってきた進化の道筋を明らかにすることである。この手法の優れた点は、分析の対象とするデータを客観的に定量化し数値化するため、系統類縁関係を一定の尺度で比較することができる点である。また、遺伝子の置換が時間の経過とともに一定の速度で起こることを利用して、相違の程度から2つの集団が分化した後の経過時間 (分岐年代) を推定することが可能である。つまり、この遺伝子置換速度を分子時計として分岐年代を推定する方法が ZUCKERKANDL and PAULING (1962) によって示されている。このため化石資料の乏しい生物種や分類に混乱が生じている生物群にも有効な手法となる。なかでも、酵素タンパク質のアイソザイムを分析する手法は、簡便で費用もあまりかからず、広く用いられている。そのため様々な生物における知見が蓄積されており、これらのデータが客観的な一定尺度の数値であるため、様々な面から互いのデータの比較検討も可能となっている。その他、よく用いられる手法としてミトコンドリア DNA の解析があるが、進化速度が速いこと、核 DNA とは独立した存在であること、調査できる塩基サイト数はアイソザイム分析と比較して少ないことなどから、種間以上での系統類縁関係はアイソザイム分析の方がはるかに優れていると思われる。アイソザイム分析では、核 DNA 上にある多数の遺伝子座を同時に分析することが可能である。

これらのことから、本研究では、以前の知見では行わ

^{*2} 別刷請求先 (住所: 〒036 8561 青森県弘前市文京町 3 弘前大学農学生命科学部生命理学講座)

れていなかった生化学的な手法であるアイソザイム分析を用いて、新たな面からニシン目魚類における諸群間の系統縁関係を調査した。

調査した種は、日本近海に生息する代表的なニシン目魚類の 7 種である、ニシン科のウルメイワシ属ウルメイワシ *Etrumeus teres*, キビナゴ属キビナゴ *Spratelloides gracilis*, マイワシ属マイワシ *Sardinops melanostictus*, サッパ属サッパ *Sardinella zunasi*, ニシン属ニシン *Clupea pallasii*, コノシロ属コノシロ *Konosirus punctatus*, カタクチイワシ科のカタクチイワシ属カタクチイワシ *Engraulis japonicus* の合計 2 科 7 属 7 種である。

これらの種は、全て食用とされており、古くから人々の生活と深い係わりを持って来た。ウルメイワシ、マイワシ、カタクチイワシは一般的に“イワシ”と呼ばれるが、正式には別科および別属の属に属する。ウルメイワシは、その名の通り、眼が潤んで見えることから名付けられた。これは、ウルメイワシが脂瞼と呼ばれる膜を眼の表面に持つためである。マイワシは、幼魚をシラスと呼ぶこともある。近年、漁獲量の減少が大きい。カタクチイワシは、俗称セグロイワシ、ヒコとも呼ばれることがある。英名は、anchovy でヨーロッパでも古くから食用とされている。サッパは、俗称ママカリとも呼ばれ、山陽地方で好んで食される。ニシンは、俗称カドイワシとも呼ばれる。日本では北海道が主な漁場であったが、1897 年をピークとして漁獲量は激減した。そのまま食することもあるが、日本ではカズノコとして食されることが多い。コノシロは、関東においては、小型のものをシンコ、10cm 程のものをコハダ、大型のものをコノシロと呼ぶ。関西では、小中型のものをツナシ、大型のものをコノシロと呼ぶ。以上のように、俗称や成長に従い呼び名の変わる出生魚が多く、人々の生活に密着した様子が伺える。

本研究では、それらのニシン目魚類の 2 科 7 属 7 種の

系統進化学的関係を分子系統学的に調査し、新たな手法による知見として、諸群間での系統進化学的位置づけを明らかにすることを目的とした。

実験材料及び実験方法

実験材料

本研究に用いたのは、ウルメイワシ属ウルメイワシ *Etrumeus teres*, キビナゴ属キビナゴ *Spratelloides gracilis*, マイワシ属マイワシ *Sardinops melanostictus*, サッパ属サッパ *Sardinella zunasi*, ニシン属ニシン *Clupea pallasii*, コノシロ属コノシロ *Konosirus punctatus*, カタクチイワシ属カタクチイワシ *Engraulis japonicus* の計 7 種である (Table 1)。これらは、すべて市販の新鮮なものを購入し、実験に使用するまでフリーザー内で -45℃ にて冷凍保存しておいた。分析には、各々の種につき 12 個体ずつ用いた。なお、本文中の和名、学名、および分類体系は益田ら (1984) に従った。

電気泳動試料の作成法

-45℃ で冷凍保存しておいた個体を 0℃ 前後で解凍した後、筋肉・肝臓・腸を取り出す。そして、それぞれに各サンプル重量の 3 ~ 5 倍量にあたる 20mM リン酸バッファー (0.1M KCL, 20mM EDTA) pH7.0 を加える。これを冷水下でホモジナイザーを用いてホモジナイズする。その後、10,000rpm で 5 分間、遠心分離機にかけ、これによって分離した上清を取り出し、それを電気泳動試料とした。

タンパク電気泳動法

各個体につき、0.07ml の電気泳動試料を用い、Davis (1964) の方法に従い、7.5 %ポリアクリルアミドゲルを支持体とする DISC 電気泳動にかけ、各タンパク質を分

Table 1. Taxonomic position (Masuda *et al.*, 1984) of seven species used in this study

Order	Family	Subfamily	Genus	Species
Clupeiformes ニシン目	Clupeidae ニシン科	Dussumieriinae ウルメイワシ亜科	<i>Etrumeus</i> ウルメイワシ属	<i>E. teres</i> ウルメイワシ
		Spratelloidinae キビナゴ亜科	<i>Spratelloides</i> キビナゴ属	<i>S. gracilis</i> キビナゴ
		Clupeinae ニシン亜科	<i>Sardinops</i> マイワシ属	<i>S. melanostictus</i> マイワシ
			<i>Sardinella</i> サッパ属	<i>S. zunasi</i> サッパ
			<i>Clupea</i> ニシン属	<i>C. pallasii</i> ニシン
		Dorosomatinae コノシロ亜科	<i>Konosirus</i> コノシロ属	<i>K. punctatus</i> コノシロ
		Engraulididae カタクチイワシ科	<i>Engraulis</i> カワクチイワシ属	<i>E. japonicus</i> カタクチイワシ

離する。緩衝液には0.38 M Glycine-Tris, pH 8.3を用いて、カラムあたり 3mA の直流定電流を流す。泳動はマーカーである BPB (Bromophenol blue) が分離ゲルを約 3cm 移動するまで泳動した。電気泳動終了後、カラムからゲルを取り出して、各種の酵素活性染色を施し、各種酵素タンパクをゲル上にバンドとして検出した。それより、バンドの移動度を測定した。測定後、マーカーを指標として、各ゲルの全長が 3cm になるようにバンドの移動度を換算し、他のゲルとの比較を行った。

実験に使用した酵素

活性染色に用いるための酵素は、Table 2の30種類の酵素の中から発色実験を行い、活性バンドが出た酵素を選択した。発色実験は、ニシンの筋肉、肝臓、腸を各々使用した。発色実験の結果はTable 3に示してある。この発色実験の結果、バンドが示されず、活性が見られなかった酵素は除外し、分析に用いるのに適した酵素及び組織を選択した。これより、筋肉において7酵素、肝臓において6酵素、腸において1酵素が検出され、これら

対立遺伝子頻度の決定

1個体につき3回以上の電気泳動を行い、安定したバンドパターンの再現性が確認されたうえで、各酵素の電気泳動パターンを決定した。これより、各酵素の遺伝子座 (Locus) と対立遺伝子 (Allele) を決定した。ただし、以後分析に用いる遺伝子座は、7種すべての種において、対立遺伝子が検出されたものだけを用いた。

遺伝的多型の指標

対立遺伝子頻度から各々の種ごとに、遺伝的多型を表すパラメーターである1遺伝子座あたりの対立遺伝子数 (A)、多型的遺伝子座の割合 (P)、平均ヘテロ接合体率の期待値 (H) を求めた。なお、ここにおいては、最も頻度が高い対立遺伝子頻度が 0.95 以下のものを多型的な遺伝子とした。 H は、各遺伝子座におけるヘテロ接合体の頻度の期待値を平均化したものである。ある遺伝子座の、ある対立遺伝子 i の頻度を x_i としたとき、

$$H = 1 - \sum x_i^2$$

として与えられる。

Table 2. Enzymes assayed in the present allozyme study

Enzyme	E. C. No.	Abbreviation	Stain reference
Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	ADH	Ayala <i>et al.</i> (1972)
-glycerophosphate dehydrogenase	1.1.1.8	-GPDH	Ayala <i>et al.</i> (1972)
Formaldehyde dehydrogenase	1.2.1.1	FDH	Murphy <i>et al.</i> (1990)
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1.1.1.49	G6PD	Ayala <i>et al.</i> (1974)
Hexose-6-phosphate dehydrogenase	1.1.1.49	H6PD	Matsuoka and Suzuki (1987)
Hexanol dehydrogenase	1.1.1.1	HexDH	Ayala <i>et al.</i> (1972)
Hydroxybutyrate dehydrogenase	1.1.1.30	HBDH	Ayala <i>et al.</i> (1974)
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42	ICDH	Ayala <i>et al.</i> (1972)
Lactate dehydrogenase	1.1.1.27	LDH	Shaw and Prasad (1970)
Malate dehydrogenase	1.1.1.37	MDH	Shaw and Prasad (1970)
Malic enzyme	1.1.1.40	ME	Ayala <i>et al.</i> (1972)
Nothing dehydrogenase		NDH	Matsuoka <i>et al.</i> (1984)
Octanol dehydrogenase	1.1.1.73	ODH	Ayala <i>et al.</i> (1972)
6-phosphogluconate dehydrogenase	1.1.1.44	6-PGD	Shaw and Prasad (1970)
Shikimate dehydrogenase	1.1.1.25	SKDH	Murphy <i>et al.</i> (1990)
Sorbitol dehydrogenase	1.1.1.14	SDH	Shaw and Prasad (1970)
Succinate dehydrogenase	1.3.99.1	SUDH	Murphy <i>et al.</i> (1990)
Xanthine dehydrogenase	1.2.1.37	XDH	Shaw and Prasad (1970)
Superoxide dismutase	1.15.1.1	SOD	Ayala <i>et al.</i> (1972)
Fumarase	4.2.1.2	FUM	Shaw and Prasad (1970)
Glucose phosphate isomerase	5.3.1.9	GPI	Shaw and Prasad (1970)
Hexokinase	2.7.1.1	HK	Shaw and Prasad (1970)
Phosphoglucomutase	2.7.5.1	PGM	Shaw and Prasad (1970)
Aspartate aminotransferase	2.6.1.1	AAT	Marcus (1977)
Acid phosphatase	3.1.3.2	ACPH	Ayala <i>et al.</i> (1972)
Alkaline phosphatase	3.1.3.1	ALK	Ayala <i>et al.</i> (1972)
Peroxidase	1.11.1.7	PO	Shaw and Prasad (1970)
Esterase	3.1.1.~6	EST	Shaw and Prasad (1970)
Amylase	3.2.1.1	AMY	Marcus (1977)
Leucine aminopeptidase	3.4.11.1	LAP	Ayala <i>et al.</i> (1972)

Table 3. Electrophoretically detectable enzymes in *Clupea pallasii*

Enzyme	Muscle	Liver	Intestine	Enzyme	Muscle	Liver	Intestine
G6PD	-	+	-	ADH	-	-	-
HBDH	-	+	-	FDH	-	-	-
LDH	+	-	-	-GPDH	-	-	-
NDH	++	+	-	H6PD	-	-	-
ODH	+	-	-	HexDH	-	-	-
6-PGD	+	++	-	ICDH	-	-	-
SOD	++	+	-	SKDH	-	-	-
AAT	+	-	-	SDH	-	-	-
ACPH	-	++	-	SUDH	-	-	-
ALK	-	+	-	MDH	-	-	-
EST	+	-	-	AMY	-	-	-
FUM	+	++	-	HK	-	-	-
LAP	-	-	+	PO	-	-	-
ME	+	-	-	PGI	-	-	-
PGM	+	++	-				

++ : Enzymes which showed high activity.

+ : Enzymes which were detected on the gel.

- : Enzymes which did not exhibit the active band.

Table 4. Enzymes and tissues examined in the present allozyme study

Enzyme	Abbreviation	Tissues
Lactate dehydrogenase	LDH	M
Nothing dehydrogenase	NDH	M
Octanol dehydrogenase	ODH	M
Superoxide dismutase	SOD	M
Aspartate aminotransferase	AAT	M
Esterase	EST	M
Malic enzyme	ME	M
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	L
Hydroxybutyrate dehydrogenase	HBDH	L
6-phosphogluconate dehydrogenase	6-PGD	L
Acid phosphatase	ACPH	L
Fumarase	FUM	L
Phosphoglucomutase	PGM	L
Leucine aminopeptidase	LAP	I

M = Muscle , L = Liver , I = Intestine

遺伝的類似度 (I) 及び遺伝的距離 (D) の算出

種間の遺伝的分化の程度を示すために、先に求めた対立遺伝子の頻度から Nei (1972) に基づき、遺伝的類似度 (Genetic identity : I) 及び遺伝的距離 (Genetic distance : D) を算出した。このパラメーターは、進化の研究に用いるのに適したものであり、種間または集団間における遺伝子の違いの程度を定量化するものである。 I は、遺伝的にどれほど類似しているかを示しており、0 ~ 1 の値を取り、大きいほど遺伝的類似度が高い事を示す。 D は遺伝的にどれだけ離れた関係にあるかを示しており、

$$D = - \ln I$$

で求められる。この値は 0 ~ の値を取り、大きいほど

遺伝的な距離が離れており、遠縁の関係であることを示す。

この遺伝的類似度及び遺伝的距離は ROYCHOUDHURY *et al.* (1991) の program GD3 (MS-DOS 版) を用いて算出した。

Group I および Group II 酵素の多型の比較

今回、分析した酵素を 2 つの大きなグループに分け、各々の平均ヘテロ接合体率 (H) を調査した。分類は、エネルギー代謝に関与する解糖系の酵素を Group I、それ以外の酵素を Group II とした。本研究で用いた酵素のうち Group I に属するのは、FUM、G6PD、LDH、ME、PGM の 5 酵素である。Group II に属するのは、AAT、

ACPH, EST, HBDH, LAP, NDH, ODH, 6-PGD, SOD の 9 酵素である。

分子系統樹の作成法

遺伝的距離 (D) からクラスター分析を行うため、SNEATH and SOKAL (1973) の遺伝的距離平均化法 (UPGMA 法) 及び SAITOU and NEI (1987) の近隣結合法 (NJ 法) の 2 つのアルゴリズムにより分子系統樹を作成した。

遺伝的距離平均化法では、すべての OTU (operational taxonomic unit; 操作上の分類単位) 間において求められた進化距離を用いる。その中で最小の距離を持つ OTU 間においてその中心で結合し、新しいクラスターとする。これはつまり、OTU 間の距離は算術平均によって求められるということである。これにより、クラスタリングを続け、系統樹を作成する。また、これは遺伝子置換速度の期待値が一定であるという仮定に基づいた結果ともいえる。さらにこれにより、Nei (1975) の方法に従い、それぞれの種の分岐年代 (T) を算出した。

近隣結合法は、SAITOU (1995) の NJ-package (Mac 版) によって作成した。この近隣結合法は、比較的簡単な計算により、多量の労力を有する最小進化法に非常に似た系統樹を得る方法である。ここでは、最も近隣にある OTU 間を結合させる。次にその結合させた OTU と、最も近隣にある別の OTU をさらに結合させる。このように、近隣にあるものを次々に結合させて、系統樹を作成する。この近隣結合法によって得られる系統樹は無根系統樹であるが、UPGMA による系統樹との比較のため、OTU を結ぶ樹長のうち最も長いものの中央を樹根として有根系統樹を作成した。この方法は、無根系統樹を作成する距離 Wagner 法 (FARRIS, 1972) で用いられたものであるが、近隣結合法やその他の無根系統樹に対してもしばしば適用されている。

結 果

電気泳動結果

Table 4 に示した 14 酵素により、ニシン目 7 種についての分析を行ったところ、29 遺伝子座が検出された。そのうち、7 種すべてが共有している 19 遺伝子座を分析に用いた。電気泳動の方向は、陰極である上方から陽極である下方へと定直流電流を流した。G6PD, HBDH, LDH, NDH, ODH, SOD, AAT, PGM, では集団内変異が認められた。特に、EST, 6-PGD においては、多くの集団内変異が検出された。

対立遺伝子頻度

電気泳動パターンから対立遺伝子の頻度を求めたものが、Table 5 である。合計 14 酵素、19 遺伝子座が示され

ている。本研究で用いた 14 酵素のうち、G6PD, HBDH, LDH, NDH, ODH, SOD, AAT, PGM の 8 酵素では単型のな遺伝子座であった。6-PGD, ACPH, EST, FUM, LAP, ME の 6 酵素では多型のな遺伝子座であった。7 種すべてにおいて、同じ対立遺伝子が固定されている遺伝子座は検出されなかった。

集団内の遺伝的変異

対立遺伝子頻度の遺伝的多型を表すパラメーターである、1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数、多型の遺伝子座の割合 (P)、平均ヘテロ接合体率の期待値 (H) を求めた結果が Table 6 である。1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数、 P とともに結果の数値から二つのグループに分けられた。キビナゴ、マイワシ、サッパ、コノシロが低い値を示し、1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数は 1.11, $P = 10.5\%$ となった。ウルメイワシ、ニシン、カタクチワシは、1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数 = 1.16, $P = 15.8\%$ となった。平均値は、1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数 = 1.13, $P = 12.8\%$ であり、種による違いに大きな差は無かった。

H は、マイワシとコノシロで最小値の $H = 4.8\%$ を示し、カタクチワシで最大値 $H = 8.6\%$ を示した。7 種の平均は、 $H = 6.1\%$ となった。

Group I・Group II 酵素における遺伝的多型の比較

Group I, Group II 酵素ごとに H を比較したものが、Table 7 である。Group I 酵素では、 $H = 0 \sim 10.0\%$ 、平均 $H = 2.9\%$ であったのに対し、Group II 酵素では、 $H = 4.2 \sim 15.9\%$ 、平均 $H = 10.8\%$ を示し、Group II 酵素の方が高い遺伝的多型を示した。Group I 酵素よりも Group II 酵素において、より多くの遺伝的多型が見られたのは、コノシロだけであった。この結果において、 H の値は Group I 酵素と Group II 酵素間で有意な差が存在する否かを分析するために、両グループ間で H の値についての t 検定を行った。その結果、5% の有意水準で有意差が示され、Group I 酵素の H の値と Group II 酵素の H の値が有意に異なるといえる。これより、Group I 酵素よりも Group II 酵素の方が、より多くの遺伝的多型が観察されたという結果を示している。

遺伝的類似度 (I) 及び遺伝的距離 (D)

Table 8 に、ニシン目 7 種間についての I と D を示した。 I は、マイワシとニシン間で最小値 $I = 0.169$ となり、遺伝的に最も遠縁の関係を示した。最大値は、マイワシとカタクチワシ間の $I = 0.591$ となり、最も近縁な関係を示した。また、 $I = 0.3 \sim 0.4$ の値を示すものが 12 箇所と集中しており、この間の値が最頻度値 (モード) となっている。

D でも同様に、マイワシとカタクチワシ間で最小値 $D = 0.525$ となり、最も近縁な関係を示した。最大値は、

Table 5. Allele frequencies at 19 genetic loci in the seven species of the order Clupeiformes

Locus	Allele	<i>Et</i>	<i>Sg</i>	<i>Sm</i>	<i>Sz</i>	<i>Cp</i>	<i>Kp</i>	<i>Ej</i>	Locus	Allele	<i>Et</i>	<i>Sg</i>	<i>Sm</i>	<i>Sz</i>	<i>Cp</i>	<i>Kp</i>	<i>Ej</i>	
LDH	a	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	AAT	a	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	b	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00		b	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	1.00	
	c	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00		c	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	
	d	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		ACPH	a	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.54
NDH-1	a	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	b		1.00	0.00	1.00	1.00	0.00	1.00	0.46	
	b	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	EST-1	a	0.46	0.00	0.75	1.00	0.00	1.00	0.54	
NDH-2	a	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00		b	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	b	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00		c	0.54	0.00	0.25	0.00	1.00	0.00	0.46	
	c	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	EST-2	a	1.00	1.00	0.00	0.00	0.58	0.00	1.00	
NDH-3	a	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	
	b	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		c	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	
ODH	a	1.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	EST-3	d	0.00	0.00	1.00	0.00	0.42	0.00	0.00	
	b	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00		a	0.50	0.50	0.50	0.00	0.67	0.00	0.00	
	c	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00		b	0.00	0.00	0.00	0.67	0.33	1.00	0.00	
SOD	a	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00		FUM	c	0.50	0.50	0.50	0.33	0.00	0.00	1.00
	b	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00			a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50
EST-4	a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	1.00	0.00	b		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.50	
	b	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	c		1.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	
	c	0.00	0.00	0.00	1.00	0.50	0.00	0.00	d		0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.50	0.00	
	d	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	PGM	e	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
ME	a	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00		a	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	b	0.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00		b	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	c	0.08	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00		c	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	
G6PD	a	1.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	LAP	d	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	
	b	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00		e	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	
HBDH	a	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00		a	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	
	b	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00		b	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	0.00	
6-PGD	a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.75	0.00			c	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.96
	b	0.00	0.00	1.00	0.67	1.00	0.00	1.00										
	c	1.00	0.54	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00										
	d	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00	0.00	0.00										
	e	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00										

Alleles are correspondingly letters from "a", this being the allele of the lowest mobility. *Et* = *Etrumeus teres*, *Sg* = *Spratelloides gracilis*, *Sm* = *Sardinops melanostictus*, *Sz* = *Sardinella zunasi*, *Cp* = *Clupea pallasii*, *Kp* = *Konosirus punctatus*, *Ej* = *Engraulis japonicus*

Table 6. Genetic variation in the seven species of the order Clupeiformes

Parameter	<i>Et</i>	<i>Sg</i>	<i>Sm</i>	<i>Sz</i>	<i>Cp</i>	<i>Kp</i>	<i>Ej</i>	Mean
No. of individuals examined	12	12	12	12	12	12	12	12
No. of alleles per locus	1.16	1.11	1.11	1.11	1.16	1.11	1.16	1.13
Proportion of polymorphic loci : P (%)	15.8	10.5	10.5	10.5	15.8	10.5	15.8	12.8
Expected average heterozygosity : H_{exp} (%)	6.3	5.5	4.8	4.9	7.9	4.8	8.6	6.1

Et = *Etrumeus teres*, *Sg* = *Spratelloides gracilis*, *Sm* = *Sardinops melanostictus*, *Sz* = *Sardinella zunasi*, *Cp* = *Clupea pallasii*, *Kp* = *Konosirus punctatus*, *Ej* = *Engraulis japonicus*

Table 7. Average heterozygosity for glucose metabolizing enzymes (Group I) and non-glucose metabolizing enzymes (Group II) in the allozyme study

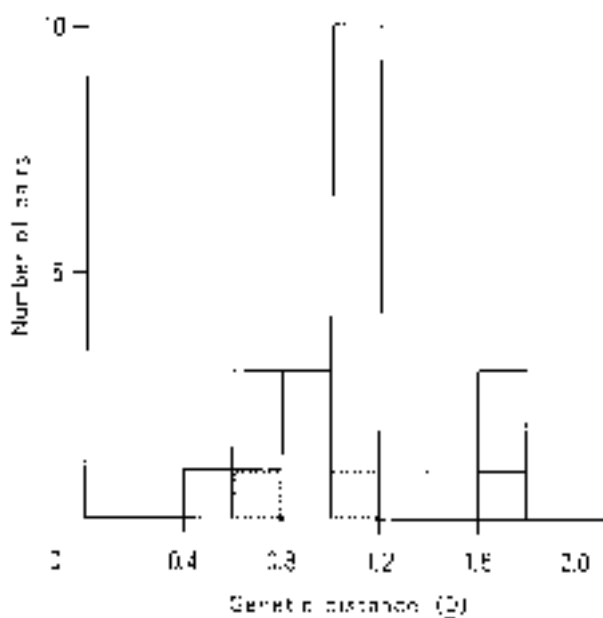
Species	Average heterozygosity (%)	
	Group I	Group II
<i>Etrumeus teres</i>	0	12.8
<i>Spratelloides gracilis</i>	0	11.1
<i>Sardinops melanostictus</i>	0	9.8
<i>Sardinella zunasi</i>	0	9.8
<i>Clupea pallasii</i>	0	15.9
<i>Konosirus punctatus</i>	10.0	4.2
<i>Engraulis japonicus</i>	10.0	12.0
Mean	2.9	10.8

Group I : FUM, G6PD, LDH, ME, PGM

Group II : AAT, ACPH, EST, HBDH, LAP, NDH, ODH, 6-PGD, SOD

Table 8. Genetic identities (above diagonal) and genetic distances (below diagonal) between seven species of the order Clupeiformes

Species	1	2	3	4	5	6	7
1 . <i>Etrumeus teres</i> ウルメイワシ	-	0.510	0.338	0.374	0.309	0.318	0.365
2 . <i>Spratelloides gracilis</i> キビナゴ	0.673	-	0.194	0.342	0.334	0.174	0.285
3 . <i>Sardinops melanostictus</i> マイワシ	1.086	1.639	-	0.475	0.169	0.428	0.591
4 . <i>Sardinella zunasi</i> サツバ	0.984	1.073	0.745	-	0.359	0.535	0.339
5 . <i>Clupea pallasii</i> ニシン	1.175	1.098	1.779	1.024	-	0.356	0.375
6 . <i>Konosirus punctatus</i> コノシロ	1.145	1.749	0.848	0.626	1.034	-	0.353
7 . <i>Engraulis japonicus</i> カタクチイワシ	1.008	1.254	0.525	1.083	0.981	1.042	-

Genetic identities (I) and genetic distances (D) were calculated by the method of Nei (1972).Fig. 1. Distribution of Nei's D values in this study. The sources of data are quoted from the D values in Table 8. The shaded portions are the D values between the two families, Clupeidae and Engraulidae.

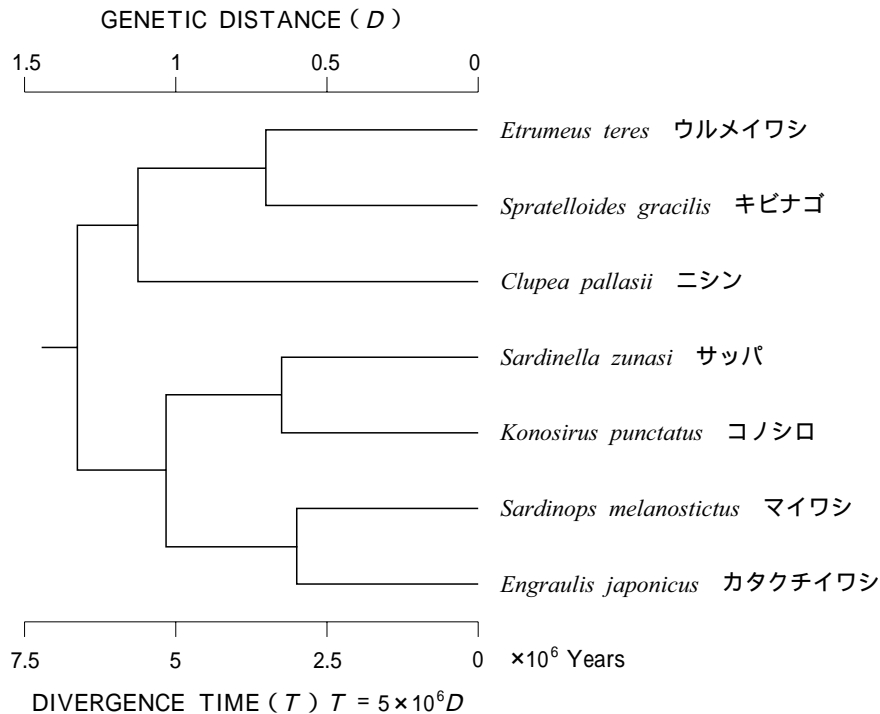


Fig. 2. Molecular phylogenetic tree for the seven species of the order Clupeiformes. It was constructed from the Nei's genetic distance (Nei, 1972) by using the UPGMA clustering method. The divergence time estimated from the Nei's equation (Nei, 1975) using the genetic distance is also given in the phylogenetic tree.

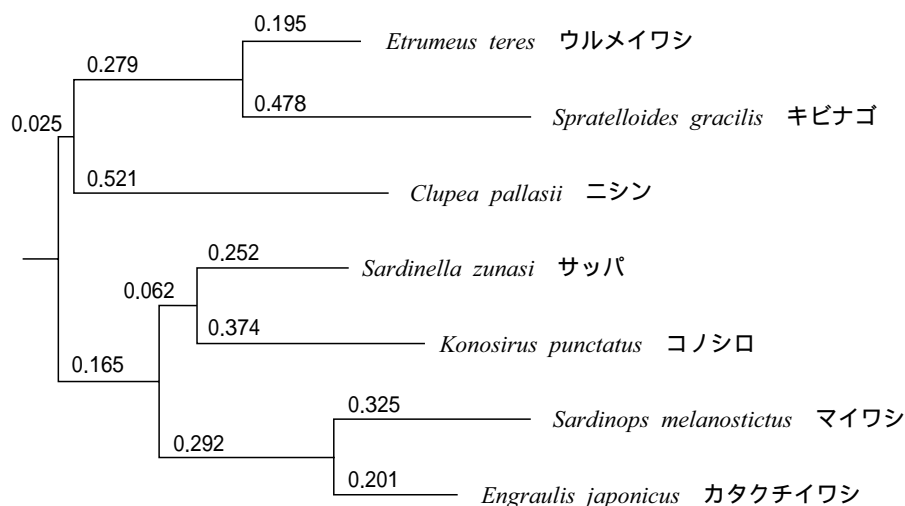


Fig. 3. Molecular phylogenetic tree for seven species of the order Clupeiformes. This tree was constructed from Nei's (1972) genetic distance (D) by using NJ method. The tree was rooted at the midpoint of longest branch. The values given to each branch are the estimate of branch length.

マイワシとニシン間で、 $D = 1.779$ となり、最も遠縁な関係を示した。 $D = 1.0 \sim 1.2$ の値を示すものが 10 箇所みられ、この間の値がモードとなっている。

分子系統樹

Table 8 の遺伝的距離 (D) より UPGMA 法を用いて作成した分子系統樹が Fig. 2 である。上目盛りに遺伝距離 (D)、下目盛りに分岐年代 (T) が示してある。こ

れより、マイワシとカタクチイワシが最初にクラスターを形成し、次に、サッパとコノシロ、ウルメイワシとキビナゴが、それぞれクラスターを形成した。その後、サッパとコノシロのクラスターとマイワシとカタクチイワシのクラスターが、1 つにクラスタリングされた。一方、ニシンは最後に、ウルメイワシとキビナゴにクラスタリングされた。よって、Fig. 2 の分子系統樹の結果では、まず (ウルメイワシ・キビナゴ・ニシン) の系統と、

(サッパ・コノシロ・マイワシ・カタクチイワシ)の系統に2分され、さらに、(ウルメイワシ・キビナゴ)(ニシン)(サッパ・コノシロ)(マイワシ・カタクチイワシ)の4系統に分けられた。また、ニシンがこれら7種の内でもっと古い時期に分岐したという結果が明確に示された。

前と同じ値であるTable 8の遺伝距離(D)より、NJ法を用いて作成した分子系統樹がFig. 3である。本来、NJ法により作成した系統樹は無根系統樹である。そのため、UPGMA法を用いて作成した系統樹と比較するために、先に方法で述べた通りの手法により、樹長の最大値の中心に仮の樹根を設けてある。この系統樹の結果においても、Fig. 2のUPGMA法を用いて作成した分子系統樹と相同な樹形が得られ、同様の系統類縁関係が示された。

考 察

分析した遺伝子座数および個体数

アイソザイム分析を行う際に用いる遺伝子座は、その遺伝子座を検出する染色法が確立されていることが必要である。その遺伝子座を用いるかどうかは、酵素活性染色法が存在するか否かに依存しており、ゲノムから無作為に抽出された遺伝子のデータであると見なすことができると考えられている(HUBBY and LEWONTIN, 1966)。遺伝的多型の程度や遺伝子の進化速度は、遺伝子座により差がある。そのため、先の無作為抽出のデータであるという仮定は、これらの遺伝子座から各種パラメーターを求め、分析する際の確立論的誤差を十分に減少させることを可能とする。具体的には、サンプルとして遺伝子座を抽出する過程と、調査に用いる個体を集団から抽出する過程の2つからなる。これら2つの過程から誤差が生じると考えられる。そのため、前者は調査する遺伝子座を増やすことにより、その誤差を減少させることができる。一方、後者は調査する個体数を増やすことにより、その誤差を減少させることができる。よって、電気泳動法で調査すべき遺伝子座数、個体数は重要なファクターである。これについては、NEI and ROYCHOUDHURY (1974)やNEI (1978a)などによって数学的に研究されている。これによると、各推定値の誤差は、より多くの遺伝子座を調査することによって減少し、遺伝子座あたりの個体数にはあまり依存しないことが確かめられている。つまり、遺伝子抽出の誤差は、その多くがゲノムから遺伝子座を抽出する際に生じており、調査個体数による誤差はそれに比較すると極めて小さいとされている。そのため、仮に調査個体数が少なくても、調査遺伝子座数を増やすことにより、十分に正確なデータを得ることができる。

よって、できるかぎり多くの遺伝子座を調査することが求められるが、酵素活性染色法や分離法など実験技術的な問題からその調査数には制限がある。これは、アイ

ソザイム分析で用いる酵素には、生物が生存するうえで必須の酵素も多く存在するが、その酵素が必ずしも検出されるとは限らないためである。検出されないのは、その酵素が存在しないのではなく、その酵素についての染色法が十分に確立されていないか、適切な泳動条件でないか、酵素の絶対量が不足しているかなどの技術的制約のためである。よって、検出されるということは、その酵素が存在することの十分条件であるが、検出されないということは、その酵素が存在しないということの十分条件とはなり得ない。

アイソザイム分析において最低限必要とされる遺伝子座数については、研究者により意見が異なるが、WARD (1977)、GRAUR (1985)は15遺伝子座を基準としてさまざまな生物の平均ヘテロ接合体率を比較するなどの調査をしており、最低でも15酵素が必要であるということが一般的である。

本研究では、調査個体はすべての種において12個体ずつ用いた。分析酵素は、筋肉で7酵素、肝臓で6酵素、腸で1酵素の計14酵素、19遺伝子座について調査している。また、その19遺伝子座は、すべての個体でその対立遺伝子が検出されたもののみを用いている。これより、上記の2つの過程にもとづく確率論的誤差を十分に減少させており、分析に用いるのに十分なデータであると見なすことができる。

また、調査した酵素は、Group I酵素と呼ばれる糖代謝系に關与する酵素と、Group II酵素と呼ばれる糖代謝に關与せず、体液や組織中に比較的高濃度でみられる酵素の両者を含んでいる。Group IとGroup IIでは遺伝的多型の割合が異なるという報告(GILLESPIE and LAUGLEY, 1974)もあり、より正確な分析を行うには、両者のGroupの酵素を分析に加えるべきである。本研究では、Group I酵素から5酵素、Group II酵素から9酵素を調査に用いた。

遺伝的変異

遺伝子の多型現象の程度は、多型的遺伝子座の割合(P)および平均ヘテロ接合体率(H)で示すことができる。 P は、一般的にはその多型の尺度として、ある遺伝子座の、最も頻度の高い対立遺伝子の頻度が99%または95%以下であるときにその遺伝子座を多型的遺伝子座とみなしている。この数値には特に理論的な根拠は無い。むしろ調査個体数の大小により任意に決められていることが多い。ちなみに、本研究では、95%以下の基準を用いた。また、この値は調査個体数に左右されやすい値であるため、あまり正確な尺度ではないとされる(藤尾, 1985)。

一方、平均ヘテロ接合体率(H)は集団内の遺伝的変異の量を表すことができ、定義もはっきりしていることから、さまざまな研究で用いられてきた。また、この値はその集団のおかれた遺伝的な環境を反映しているた

め、集団遺伝学的にも有用である。本研究結果における P は、最小値 $P = 10.5\%$ 、最大値 $P = 15.8\%$ 、平均値 $P = 12.8\%$ となった。 H においては、最小値 $H = 4.8\%$ 、最大値 $H = 8.6\%$ 、平均値 $H = 6.1\%$ となった (Table 6)。一般に魚類においては、過去に蓄積されたデータから $P = 5 \sim 20\%$ 、 $H = 5\%$ となることが報告されている (藤尾, 1985)。これより、本研究の結果は、それらの一般的魚類の値と一致しており、特に変異的な値はみられなかった。一般にヘテロ接合体率は、その集団サイズが小さく、gene flow が十分でない程、小さな値をとる傾向がある。また、GYLLENSTEN (1985) は、さまざまな魚類を海産魚、回遊魚、淡水魚の 3 つのグループに分け、それぞれの H を分析した。それによると、海産魚で平均 $H = 6.3\%$ 、回遊魚で平均 $H = 4.1\%$ 、淡水魚で平均 $H = 4.3\%$ であった。これらの H は、それらの集団構造に相関しているとされる。つまり、海産魚、淡水魚、回遊魚の順に gene flow の割合が小さくなっているためと考えられる。

本研究に用いた種は、すべて沿岸部に生息する海産魚である。その中で回遊を行うとされている種は、マイワシ、ニシン、コノシロ、カタクチイワシである。マイワシ、コノシロでは、ともに $H = 4.8\%$ と比較的低い値が示された。しかし、ニシン、カタクチイワシでは $H = 7.9\%$ 、 $H = 8.6\%$ と高い値を示した。これは、ニシンとカタクチイワシの回遊が、完全に他の集団と隔離されたものではないためではないかと予測される。これについては、再度より多くの個体数と遺伝子座を用いて、詳細な調査を必要とするであろう。

また、 H を Group I と Group II の酵素ごとに分けて比較すると、Group II 酵素の方が Group I 酵素よりも有意に H が大きいことが、Table 7 で示された。これは、Group II 酵素の方が Group I 酵素よりも遺伝的な多型が多いということを示している。方法でも述べたように、Group I 酵素はエネルギー代謝に関与する解糖系の酵素であり、生物が生存上欠かすことのできない酵素である。そのため、これらの酵素の機能的制約はかなり大きいと予想される。一方、Group II 酵素においては、そのようなエネルギー代謝には関与せず、機能的制約は前者に比べてかなり小さいと予想される。本研究の結果における遺伝的変異の相違は、以上のような機能的制約の違いによるものと考えられる。つまり、Group I 酵素の方が機能的制約が大きいと、遺伝的変異が小さいという結果が得られたと考えられる。これは、機能的制約の小さなものほど遺伝的変異が多いとする木村資生博士が提唱した分子進化の中立説 (KIMURA, 1983) を支持する結果である。

遺伝的分化の程度

遺伝的分化の程度を示す Nei (1972) による遺伝的類似度 I に注目してみる。THORPE (1982) は、さまざま

な生物種間の I を調査し、その結果、同属別種間においては、 $I = 0.35 \sim 0.85$ の値をとり、同科別属間では $I = 0.35$ になると報告している。本研究結果では (Table 8)、ニシン科に属する同科別属であるウルメイワシ、キビナゴ、マイワシ、サッパ、ニシン、コノシロ間では、 $I = 0.169 \sim 0.535$ の値をとり、平均 $I = 0.347$ 、 $SD = 0.108$ を示した。一方、カタクチイワシ科のカタクチイワシと先のニシン科 6 種との間の I は、 $I = 0.285 \sim 0.591$ の値をとり、平均 $I = 0.385$ 、 $SD = 0.097$ を示した。

本研究結果のニシン科内の比較における D の値は、THORPE (1982) の報告よりも多少大きな値をとっている箇所もあるが、ほぼこれに沿った結果となっている (Fig. 1)。一方、同目別科の関係であるカタクチイワシ科とニシン科の 6 種では (Fig. 1 の斜線部)、先のニシン科内の比較における D の値とほぼ等しく、従来の分類に沿った値ではなかった。カタクチイワシがニシンと別科であれば、より小さな I が示されるはずである。現在、カタクチイワシはカタクチイワシ科に属しているが、この結果はカタクチイワシがよりニシン科に違い遺伝的形質を有していることを強く示唆している。

同様に、Nei (1972) による遺伝的距離 (D) についても分類体系との相関関係が示されている。藤尾 (1985) によると、一般に魚類においては、同科別属間で平均 $D = 2.067$ 、 $SD = 0.709$ であると報告している。本研究結果においては、Table 8 に示すようにニシン科内では、平均 $D = 1.112$ 、 $SD = 0.346$ を示している。この結果は、藤尾 (1985) の示した同科別属間での値と、5 % の有意水準で有意差は認められず、同じ結果が得られたといえる。

一方、カタクチイワシ科 1 種とニシン科 6 種との関係においては、平均 $D = 0.982$ 、 $SD = 0.222$ となった。この値は藤尾 (1985) の示した同目別科間の値とは大きく外れ、むしろ同科別属間の値と考えられる。本研究結果の中で比較した場合においても、カタクチイワシとニシン科 6 種における遺伝的距離 (D (Fig. 1 の斜線部)) は、ニシン科内で同科別属における D とほとんど等しい値をとっている (Fig. 1)。カタクチイワシとニシン科 6 種の同目別科関係における D と、ニシン科内で同科別属における D との間で t 検定を行ったところ、5 % の有意水準で有意差は認められず、両者の値は等しいという結果が示された。このことから、分類学上、カタクチイワシはニシン科と別科ではなく、同科に含めるべきである。

分子系統樹が示す系統縁関係

本研究においては、クラスター分析を行うために、遺伝的距離 (D) から、SNEATH and SOKAL (1973) の遺伝的距離平均化法 (UPGMA 法) 及び SAITOU and NEI (1987) の近隣結合法 (NJ 法) の 2 つのアルゴリズムを

用いて系統樹を作成した。この2つの系統樹は、同じ値である D から作成したものであるが、その作成は異なった過程に基づくアルゴリズムにより行っている。現在までにさまざまな系統樹作成法が考案されているが、系統樹を復元する能力は異なっており、また、確率論的誤差が含まれることは避けがたい。そのため、コンピュータシミュレーションなどを用いて、系統樹作成法についての各種研究も行われている (NEI *et al.*, 1983)。それらより UPGMA 法は塩基置換速度がほぼ一定であるとき、種の系統樹を作成するのに有効であること、また、NJ 法は一般に真の樹形を復元する上で有効であることなどが報告されている (根井, 1990)。このような二つの異なった性質はかなり信頼性が高いといえる。本研究結果においては、UPGMA 法による系統樹と NJ 法による系統樹は、一致した樹形を示した (Fig. 2 および Fig. 3)。よって、本研究で求められた系統樹は、高い信頼性を持つと考えられる。

Fig. 2 および Fig. 3 に示された、それぞれのクラスターに注目すると、ウルメイワシとキビナゴが一つにクラスタリングされている。Masuda *et al.* (1984) の分類によると、ウルメイワシはウルメイワシ亜科に属し、キビナゴはキビナゴ亜科に属するとし、両種は同科別亜科の関係であるとしている (Table 1)。しかし、Whitehead (1985) の分類では、ウルメイワシとキビナゴは、ともにウルメイワシ亜科 (the subfamily Dussumieriinae) に属し、同亜科別属であるとしている。本研究の結果は、この Whitehead (1985) が提唱した分類体系を強く支持する結果となった。

また、Fig. 2 から、これら7種の内、ニシンが最も古

い時期に分岐したことが判明した。形態学的知見だけでなく化石資料などからみても、ニシンは、ニシン目の中でも非常に原始的で、初期の型に比べてそれほど特殊化していないとする説が一般的である (Romer, 1933)。ニシン目の祖先種は、化石知見などからみても、現在のニシン様形態を有している。本研究結果はこれらの知見と一致し、ニシンはニシン目の祖先種の形質を最も多く有し、原始的な種であると考えられる。さらに、このニシン目は、真骨魚類の中でも最も原始的な真骨魚類の低位群に属し、フォリドフォルス型の祖先型から、ジェラ紀に出現したとされている (上野・沖山, 1988)。真骨魚類としても、ニシンは祖先的形質を多く有した種であるといえる。

形態学的分類と分子系統学の比較

本研究の結果では、それまでに行われた形態学的知見に基づいた分類とほぼ同様の結果が得られた。しかしながら、先にも述べたように、カタクチイワシについての位置付けには、大きな相違が見られた。

形態学的には、カタクチイワシ科とニシン科においては、口の形態に大きな差が認められる (Fig. 4のa c)。ニシン科では、口が小さく、その後端は眼の後縁を越えない。カタクチイワシ科では、口は大きく、その後端は眼の後縁を大きく越える。この形質の違いが、ニシン科とカタクチイワシ科を分ける大きな分類基準である。

本実験結果によると、カタクチイワシは、ニシン科のマイワシと極めて近縁関係にあり、形態レベルでの分類体系を支持しない。この2種の形態を比較すると、口と鰓蓋の形態の違いが明確である (Fig. 4のb d)。しかし

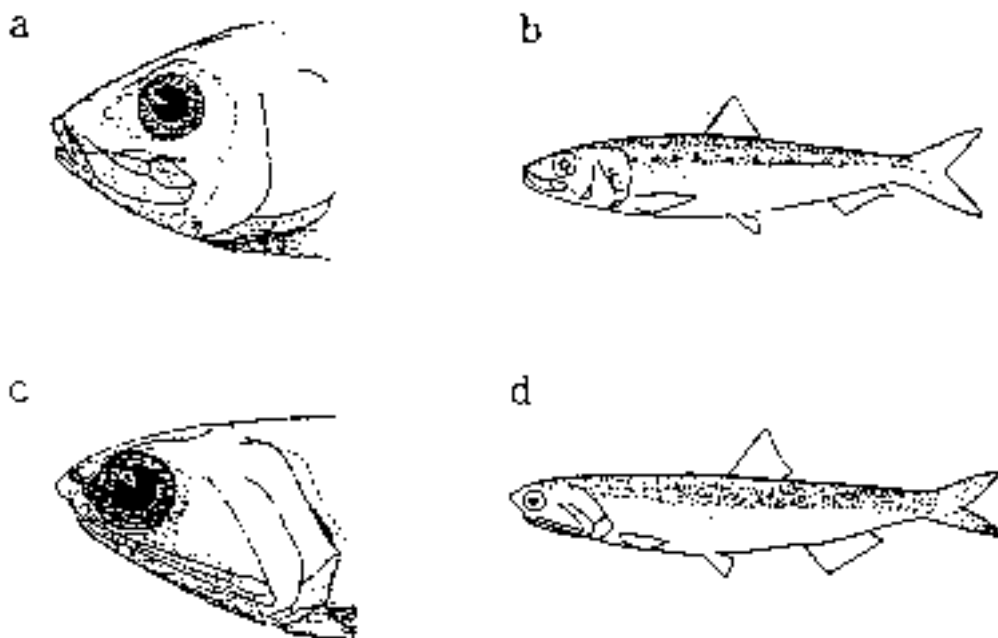


Fig. 4. Mouth shapes in the two families, Clupeidae and Engraulidae. a = typical Clupeidae, b = *Sardinops melanostictus*, c = typical Engraulidae, d = *Engraulis japonicus*.

ながら、その他の形態は、よく類似している。和名での名称が、カタクチイワシとマイワシであり、『カタクチ』という口の違いを省けば、イワシになるということに似ているのは興味深い。2種は、食料として古くから人々の生活に密着している。その中において、味や性質、形態などの総同性に基づき名をつけ、このような分類を行ったのであろう。ある意味では、古い分類体系ともいえるのではないだろうか。本研究結果におけるカタクチイワシとマイワシの類縁関係は、それに近い結果を示した。

形態学的知見に基づく系統分類では、そこで用いる形質にどのような重みづけを行うかにより、大きな差が生じる場合がある。また、その形質に存在するであろう、相同、相似、平行現象、収斂、などの関係から、相同形質のみを分類形質として選択する際にも、慎重な分析を必要とする。このような分析を行う中で、ニシン目については、カタクチイワシ科を設ける際における口の形態の特徴について、その形質に対し重みをつけ過ぎていると断言できる。

特に、口の形状は、食性を大きく反映している。ニシン目魚類は、おもに浮遊性の生物、プランクトンを食しており、鰓耙を発達させている。カタクチイワシ群は、ニシン科から派生し、その中でもより大きな口を持つことによって、その食性に適応した、特殊化した群ではないだろうかと予測される。

また、Fig. 2およびFig. 3に示された結果では、そのクラスタリングは、大まかな外部形態の輪郭における類似性をよく反映している。ニシンを標準型としたとき、キビナゴとウルメイワシに見られる細長い輪郭のタイプと、コノシロとサッパに見られる両側から押し潰したような太くて短い輪郭のタイプは、それぞれ同じクラスターを形成している。また、そのどちらにも属さず、標準型に近い輪郭を持つマイワシとカタクチイワシが1つのクラスターを形成している。このように、今回の分子レベルでの研究は、外部形態の分類と極めてよく一致している。

ニシン目魚類の種分化

上野ら(1988)とGREENMOOD *et al.*(1966)によると、ニシン目魚類はジェラ紀にフォリドフォルス目(Pholidphoriformes 全骨魚類に属し白亜紀に絶滅)から出現したとされている。本研究結果より求められた分岐年代によると(Fig. 2)、ニシン目からこれら7種が分岐したのは、ジェラ紀から約1億3000万年後に相当する、今から約260～650万年前の新世代第三紀であると推定される。この時期は、現代生物群の発展期で、現在のものに著しく類似したもの、あるいは、その直接の祖先などが見られる。気候は、比較的温暖であり各地に独特の種が増加したとされる(日本古生物学会, 1991)。その他の属は約260～340万年前に分岐した。これは新世代

第三紀の新第三紀鮮新世に相当する。この時期は、それまでの温暖な気候から、徐々に気温が低下し、次の第四紀での大氷河期へとつながったとされる。

このように、ニシンは他の属と比べてかなり古く、他の属とは異なった時代に分岐している。ニシンがニシン目の中でも祖先的形質を多く有する原始的な種であることは、先にも述べたように形態学的にも明らかにされており、今回のアロザイムの分子的な結果は、この結果とよく一致する。ではなぜ、ニシンはそのような古い時期に分岐し、現在まで原始的な形質を残しているにもかかわらず、繁栄しているのだろうか。ニシン目魚類は、そのほとんどが熱帯・亜熱帯・温帯の比較的温暖な海域に生息している。その中で、ニシン属は他の属とは異なり、寒帯の寒冷な海域に生息している。これについては、次のようなことが予測される。ニシン属は中新世に派生して繁栄したが、その後、温暖な海域では、鮮新世に派生した他のニシン目の種などに取って代わられた。しかし、寒冷な海域までは、それらの新しい種は侵入することができず、寒冷な海域に生息するニシンのみが現在まで生き残ったのではないだろうか。それらを明らかにするには、さらにニシン科の他の属を詳細に調査し、ニシン属との系統類縁関係を分析することに加え、古生物学や動物地理学に基づいた調査も必要であろう。

要 約

ニシン目魚類は、真骨魚類の原始的な一群である。それらの種は、多くが熱帯、亜熱帯の比較的温暖な海域に生息し、世界中に広く分布している。ニシン目の中には、ニシンやイワシなどをはじめとし、食用として一般に広く知られたものが多く、水産資源として大変有用なものが多い。このような水産資源としての重要性から、ニシン目魚類については、さまざまな研究が古くからなされており、系統分類は、主に形態学的な面から、数多くの報告がなされてきた。しかしながら、ニシン目内での諸群間の系統類縁関係については、不明な点が極めて多い。

本研究では、ニシン目内での諸群間における系統類縁関係を明らかにするため、それまでニシン目については行われてこなかった。分子系統学的手法であるアイソザイム分析を用いて、ニシン目魚類の2科7属7種について分子系統学的解析を行った。この分子系統学は、遺伝子の産物であるタンパク質を解析することにより、系統類縁関係を明らかにするものである。本研究では、タンパク電気泳動法により、酵素タンパク質の多型現象を検出し、アイソザイム分析を行った。

調査した種は、ニシン科のウルメイワシ属、ウルメイワシ(*Etrumeus teres*)、キビナゴ属、キビナゴ(*Spratelloides gracilis*)、マイワシ属、マイワシ(*Sardinops melanostictus*)、サッパ属、サッパ

(*Sardinella zunasi*), ニシン属, ニシン (*Clupea pallasii*), コノシロ属, コノシロ (*Konosirus punctatus*), カタクチイワシ科のカタクチイワシ属, カタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) の合計 2 科 7 属 7 種である。

アイソザイム分析では, 14 酵素 19 遺伝子座を用いた。その結果, 平均ヘテロ接合体率 (H) の期待値は, $H = 4.8 \sim 8.6\%$ となり, 平均 $H = 6.1\%$ であった。この値は, 魚類における一般的な平均ヘテロ接合体率に相当するものであった。

また, Nei (1972) の遺伝的類似度 (I) および遺伝距離 (D) を求め, 遺伝距離から遺伝距離平均化法 (UPGMA 法) と近隣結合法 (NJ 法) を用いて, 2 つの分子系統樹を作成した。得られた 2 つの分子系統樹は, 相同な樹形を示し, 高い信頼性を持つものであった。その結果, (ウルメイワシ・キビナゴ) 群, ニシン群, (サッパ・コノシロ) 群, (マイワシ・カタクチイワシ) 群, の 4 つの分類群に分かれることが判明した。これらは形態学的研究では得られない, 全く新しい知見であり, 分子系統学の有力性を示すものである。特に, カタクチイワシは, 従来の分類体系とは異なり, ニシン科に属するという有益な結果も得られた。

分岐年代を算出した結果, ニシン以外の 6 種は, 約 260 ~ 340 万年前の新第三紀鮮新世に分岐したと推定された。一方, ニシンはそれら 6 種より古く, 約 650 万年前の新第三紀中新世に分岐したと推定された。形態学的知見だけでなく化石資料などからみても, ニシンはニシン目の中で非常に原始的な種であるとされており, 本研究の分子系統学的研究はこれを強く支持するものである。

参 考 文 献

- AYALA, F. J., POWELL, J. R., TRACEY, M. L., MOURAO, C. A. and PEREZSALAS S. (1972) Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genetic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, 70 : 113 139.
- AYALA, F. J., TRACEY, M. L., BARR, L. G., McDONALD, J. F. and PEREZSALAS, S. (1974) Genetic variation in natural populations of five *Drosophila* species and the hypothesis of the selective neutrality of protein polymorphisms. *Genetics*, 77 : 343 384.
- BERG, L. S. (1940) Classification of fishes, both recent and fossil. *Tran. Inst. Zool. Acad. Sci. URSS, Leningrad*, 5 : 87 517.
- BERTIN, L. and ARAMBOURG, C. (1958) *Super-ordre des teleosteens (Teleostei)* in *Traite de Zoologie*, 13 : 2204 2500.
- BLAXTER, J. H. S. (1985) The herring : A successful species? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42 : 21 30.
- DAVIS, B. J. (1964) Disc electrophoresis-II. Method and application to Human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121 : 404 427.
- FARRIS, J. S. (1972) Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Am. Nat.*, 106 : 645 668.
- 藤尾芳久 (1985) アイソザイム分析手法による魚介類の遺伝的特性の解明に関する研究. 昭和 59 年度農林水産業特別試験研究費補助金による研究報告書, 水産庁. 1 58.
- GILLESPIE, J. H. and LANGLEY, C. H. (1974) A general model to account for enzyme variation in natural populations. *Genetics*, 76 : 837 848.
- GOSLINE, W. A. (1960) Contributions toward a classification of modern isospondylous fishes. *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Zool.)*, 6 : 325 365.
- GRANDE, L. (1982) A revision of the fossil genus *Knightia*, with a description of a new genus from the green river formation (Teleostei, Clupeidae). *Amer. Mus. Novit.*, 2728 : 1 34.
- GRAUR, D. (1985) Gene diversity in hymenoptera. *Evolution*, 39 : 190 199.
- GREENWOOD, P. H., ROSEN, D. E., WEITZMAN, S. H. and MYERS, G. S. (1966) Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, 131 : 339 456.
- GYLLENSTEN, U. (1985) The genetic structure of fish : difference in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous, and freshwater species. *J. fish. Biol.*, 26 : 691 699.
- HATL, D. L. (1987) 集団遺伝学入門. 培風館, 東京.
- KIMURA, M. (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- 益田一・尼岡邦夫・荒賀忠一・上野輝彌・吉野哲夫 (1988) 日本産魚類大図鑑. 東海大学出版会, 東京.
- MATSUOKA, N., CHIBA, Y. and SAITOH, K. (1984) Biochemical evidence for the genetic differentiation between two morphologically very similar species of *Neope* (Lepidoptera, Satyridae) from Japan. *Proc. Japan Acad.*, 60(B) : 245 248.
- MURCUS, N. H. (1977) Genetic variation within and between geographically separated populations of the sea-urchin, *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.*, 153 : 560 567.
- MURPHY, R. W., SITES, J. W., BUTH, D. G. and HAUFLE, C. H. (1990) Protein I : Isozyme electrophoresis. In *Molecular Systematics* (Ed. by Hillis, D. M. and Moritz, C.), pp. 45 126.
- 中坊徹次 (1993) 日本産魚類検索図鑑. 東海大学出版会, 東京.
- NEI, M. (1972) Genetic distance between populations. *Amer. Natur.*, 106 : 283 292.
- NEI, M. and ROYCHOUDHURY, A. K. (1974) Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76 : 379 390.
- NEI, M. (1975) *Molecular Population Genetics and Evolution*. North-Holland, Amsterdam.
- NEI, M. (1978a) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89 : 583 590.
- NEI, M. (1978b) The theory of genetic distance and evolution of human races. *Jap. J. Human Genet.*, 23 : 341 369.
- 根井正利 (1990) 分子進化遺伝学, 培風館, 東京.
- 日本古生物学会 (1981) 古生物学辞典, 浅倉書店, 東京.
- ROMER, A. S. (1981) The Vertebrate Story. どうぶつ社, 東京. (in Japanese)
- ROYCHOUDHURY, A. K., TATENO, Y., GRAUR, D., TAJIMA,

- F. and SAITOU, N. (1991) Program for computing average heterozygosity and Nei's genetic distance. Program GD3.
- SAITOU, N. (1995) Nj-package. A Macintosh program package for the neighbor-joining method.
- SAITOU, N. and NEI, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4 : 406-425.
- SHAW, C. R. and PRASAD, R. (1970) Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, 4 : 297-320.
- SNEATH, P. H. and SOKAL, R. R. (1973) Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- THORPE, J. P. (1982) The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 13 : 139-168.
- 上野輝彌・沖山宗雄 (1988) 現代の魚類学. 浅倉書店, 東京.
- WARD, R. D. (1977) Relationship between enzyme heterozygosity and quaternary structure. *Biochem. Genet.*, 15 : 123-135.
- WHITEHEAD, P. J. P. (1963) A contribution to the classification of Clupeoid fishes. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, 13-th Ser., 5 : 737-750.
- WHITEHEAD, P. J. P. (1985) Kong herring: his place amongst the Clupeoids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42 : 3-20.
- ZUCKERKANDL, E. and PAULING, L. (1962) Molecular disease, evolution and genetic heterogeneity. In *Horizons in Geochemistry* (Ed. by Kasha, M. and Pullman, B.), pp. 189-225. Academic Press, New York.

Phylogenetic relationships among seven fish species of the order Clupeiformes inferred from allozyme variation

Tsuyoshi ASANUMA¹ and Norimasa MATSUOKA²

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Hirosaki University,
3 Bunkyo-cho, Hirosaki, Aomori 036-8561, Japan

² Department of Biofunctional Science, Faculty of Agriculture & Life Science,
Hirosaki University, 3 Bunkyo-cho, Hirosaki, Aomori 036-8561, Japan

SUMMARY

The order Clupeiformes includes the seven common fish species in Japanese waters : *Etrumens teres*, *Spratelloides gracilis*, *Sardinops melanostictus*, *Sardinella zunasi*, *Clupea pallasii*, *Konosirus punctatus* and *Engraulis japonicus*. The phylogenetic relationships and allozyme variation were studied in these seven species from Japanese waters by electrophoretic analysis of 14 different enzymes. From the allozyme variation observed in 19 genetic loci scored, it was calculated that the average heterozygosities (H values) are in the range of 4.8-8.6%, with a mean of 6.1%. These H values were comparable to those of many other fishes. The molecular phylogenetic tree for the seven species which was constructed from Nei's genetic distances indicated the following : (1) Among seven species of the order Clupeiformes, the seven species were divided into the two large clusters : one is the group of *E. teres*, *S. gracilis* and *C. pallasii*, the other is the group of *S. zunasi*, *K. punctatus*, *S. melanostictus* and *E. japonicus*. (2) In the first cluster, *E. teres* and *S. gracilis* are closely related to each other. (3) In the second cluster, *S. melanostictus* is most closely related to *E. japonicus*, and further the present molecular study also showed the close relationship between *S. zunasi* and *K. punctatus*. (4) *Clupea pallasii* of the subfamily Clupeinae is the most primitive and ancestral type of the seven species. These molecular results were discussed through the comparison with other non-molecular evidence.