

# アカイカ亜科イカ類5種の酵素の遺伝的差異

Allozyme Differentiation Among Five Ommastrephidae Species  
(Cephalopoda, Ommastrephidae)

余川 浩太郎<sup>1)</sup>・内藤友康<sup>2)</sup>

Kotaro Yokawa and Yukoh Naitoh

## 緒 言

アカイカ科イカ類の分類はこれまでにVoss(1977)、Wormuth(1976)、Nesis(1997)、Roper et al.(1984)、Roeleveld(1988)らが研究を試みている。アカイカ科を構成する3つの亜科の各々の特徴は比較的安定しているが、属以下のレベルでは研究者間で多少の異論があり、アカイカ亜科でもニセアカイカ (*Sthenoteuthis pteropus*) をアカイカ属とするかニセアカイカ属とするかは研究者間で意見が分かれている。

アカイカ亜科以外の2つの亜科でも分類には多少の混乱が存在している。例えばアルゼンチンイレックス (*Illex argentinus*) の未熟個体や雌は、同属のヨーロッパイレックス (*I. coindetii*) やカナダイレックス (*I. illecebrosus*) のそれと形態的特徴から識別することが非常に困難である。ニセイレックス (*Todaropsis eblanae*) はヨーロッパからアフリカの西岸にかけて分布しているが、一方で地理的にかけ離れているオーストラリア沿岸にも同一種がいるとされている (Lu and Dunning, 1982)。

イカ類は体のほとんどが軟体部から出来ているために計測が難しく、体表は色素胞で覆われているために各個体の体色変化は著しい。このため外部形態の中に分類形質となるものが少なく、このことがイカ類の分類を困難にしている大きな要因だと考えられる。加えてアカイカ亜科に属するイカ類は分布域が外洋で且つ広範囲なために生態の研究が難しく、分類を研究するための情報が十分にあるとは言い難い状況にある。

アイソザイム分析によって遺伝的変異を推定する手法は、これまで魚類の種あるいは属間の遺伝的類縁関係を求めたり形態的に識別できない種の検出に大きな威力を発揮してきた (e.g. Shaklee et al., 1982)。一方イカ類ではアイソザイム分析を用いた研究例はまだ少ない (e.g. Smith et al., 1987 ; 藤尾・川田, 1989 ; 余川・和田, 1993 ; Carvalho & Loney, 1989 ; Carvalho et al., 1992 ; Brierley et al., 1993 ; Katugin, 1993) が、魚類同様にアイソザイム分析がアカイカ科イカ類の分類に関して有益な情報をもたらす可能性は高いと考えられる。本研究ではアカイカ亜科に属する5種のアイソザイム分析を行い、アカイカ亜科イカ類の分類ならびに種の判別におけるアイソザイム分析の有用性を調べることを目的とした。

---

<sup>1)</sup> 遠洋水産研究所 <sup>2)</sup> 東海大学

## 材料と方法

実験には、わが国の調査船およびいか釣船が釣獲したアカイカ亜科イカ類5種を使用した(表1)。採集した標本は直ちに凍結し、輸送期間も含めて実験直前まで-20℃以下で保存した。実験に当っては各標本の中から鮮度がよいと思われる2個体を選び、全てのサンプルを同一のゲルで泳動して比較した。

表1. 実験に用いたアカイカ亜科イカ類

種名	漁獲年月日	漁獲場所	漁獲位置	船名	漁法
アカイカ	1992. 8. 6	北太平洋	43' 3"N, 176' 17"W	茨城丸	釣り
アメリカオオアカイカ	1991. 11. 9	ペルー沖	1' 15"N, 110' 6"W	第2新興丸	釣り
スジイカ	1991. 5. 9	八丈島沖	33' 52"N, 138' 52"E	俊鷹丸	釣り
トビイカ	1991. 9. 10	八丈島沖	34' 13"N, 138' 32"E	開洋丸	釣り
ニセアカイカ	1991. 6. 17	ナミビア沖	21' 47"S, 11' 27"E	正寿丸	釣り

実験の方法は、前報(余川・和田, 1993)に示した方法を用いた。遺伝子座の名称はShaklee et al. (1990)に基づいて表2に示した略号で表し、対立遺伝子の名称は調べた5種の中で最も頻度が高かったものを100とした時の相対値で表した。種の遺伝的分化の程度を示す指標にはNei(1972)の遺伝距離(D)を用い、D値をもとにした系統樹の作成には非加重結合法(UPGMA)を用いた(Sokal and Michener, 1958)。

## 結果

表2には緩衝液を変えて電気泳動を行ったときの、ゲル上の各酵素の染色強度ならびにバンドの分離の変化を示してある。各酵素の染色強度とバンドの分離は泳動に使用する緩衝液によって大きく変化し、また酵素によっては強く染色される緩衝液とバンドの分離が良くなる緩衝液は必ずしも一致しなかった。

今回の研究では14種類の酵素で23遺伝子座の遺伝子頻度を推定することが出来た(表3)。分析したのは5種ともに2個体と少なかったが、分析した23遺伝子座のうち変異が観察されたのはスジイカのIDH-Iだけであった(表4)。種間の差は13遺伝子座で観察された。GAPでは分析した5種類のイカが全て異なる対立遺伝子に固定されていた。AK、G6PD、SODではニセアカイカが、またNPではアメリカオオアカイカが他の4種と異なる対立遺伝子に固定されていた。MPI-1、MPI-2、PEP-1ではアカイカ(アカイカ属)、アメリカオオアカイカ(アメリカオオアカイカ属)、スジイカ(スジイカ属)、ニセアカイカ(ニセアカイカ属)がそれぞれ異なる対立遺伝子に固定されていたが、アカイカ属とニセアカイカ属のどちらに属するかで分類学者の間で意見の分かれているトビイカはニセアカイカと同じ対立遺伝子に固定されていた。

調べた23遺伝子座全ての対立遺伝子組成から求めた種間のD値を表5に示した。D値はニセアカイカと

トビイカの間で最小 (0.47) を示し、ニセアカイカとアカイカ、アメリカオオアカイカとの間で最大 (0.93) を示した。D値をもとにUPGMAで作成したデンドログラムを図1に示した。デンドログラムではまず最初にスジイカ、アカイカ、アメリカオオアカイカとニセアカイカ、トビイカがD=0.81で分かれ、次にスジイカがD=0.77でアカイカ、アメリカオオアカイカと分かれた。アカイカとアメリカオオアカイカはD=0.70で分かれ、トビイカとニセアカイカはD=0.47で分かれた。

表2. 実験に用いた酵素ならびに遺伝子座とその分析条件

酵素名 (酵素略名)	E.C.番号	遺伝子座	緩衝液 <sup>4)</sup>	組織
アデニル酸キナーゼ (AK)	2.7.4.3	AK	Tris citrate	白筋
ペプチダーゼ (PEP)	3.4.1.1	PEP-1 <sup>1)</sup>	TVB-LB	白筋
		PEP-2 <sup>2)</sup>	Li-B, TVB-LB	肝臓
		PEP-3 <sup>3)</sup>	Li-B, TVB-LB	肝臓
		PEP-4 <sup>2)</sup>	Li-B, TVB-LB	肝臓
アルギニンキナーゼ (APK)	2.7.3.3	APK-1	Tris citrate	白筋
		APK-2	Tris citrate	口球
グリセロ3リン酸 脱水素酵素 (GPD)	1.1.1.8	GPD	CAPM7	白筋
グルコース-6-リン酸 脱水素酵素 (G6PD)	1.1.1.49	G6PD	TVB-LB	口球
イソクエン酸 脱水素酵素 (IDH)	1.1.1.42	IDH-1	Tris citrate	白筋
		IDH-2	Tris citrate	口球
リンゴ酸脱水粗酵素 (MDH)	1.1.1.37	MDH-1	CAPM7	白筋
		MDH-2	CAPM7	白筋
マリックエンザイム	1.1.1.40	ME-1	Tris citrate	口球
		ME-2	Tris citrate	口球
マンノースリン酸 イソメラーゼ (MPI)	5.3.1.8	MPI-1	Tris citrate, CAPM7	白筋
		MPI-2	Tris citrate, CAPM7	白筋
ヌクレオチド ホスホリラーゼ (NP)	2.4.2.1	NP	Tris citrate	白筋
6-フォスフォグルコン酸 脱水粗酵素 (6PGD)	1.1.1.44	6PGD	TVB-LB, CAPM7	白筋
グルコースリン酸 イソメラーゼ (GPI)	5.3.1.9	GPI	TVB-LB	白筋
フォスフォグルコ ムターゼ (PGM)	2.7.5.1	PGM	TVB-LB	口球
スーパーオキシド ディムスターゼ (SOD)	1.1.5.1.1	SOD	TVB-LB	肝臓

1); 基質は, L-フェニルアラニル-L-プロリン。

2); 基質は, グリシル-DL-ロイシン。

3); 基質は, ロイシル-グリシル-グリシン。

4); Tris citrate: トリス-クエン酸緩衝液 (pH8.0), (Carvalho & Loney, 1989)

CAPM7 : クエン酸-N (3-アミノプロピル) モルフォリン緩衝液 (pH7.0), (沼知, 1989)。

TVB-LB : ゲル; 水酸化リチウム-ホウ酸緩衝液 (pH8.4), 電極槽; トリス-ホウ酸緩衝液 (pH8.5), (芽野, 1978)。

Li-B : ゲル; トリス-クエン酸緩衝液 (pH8.5), 電極槽; トリス-ホウ酸緩衝液 (pH8.1), (Ridgway et al., 1970)。

表3. 緩衝液に対する酵素の染色強度<sup>1)</sup>と分離<sup>2)</sup> ( )内の数字は電極槽に使用した緩衝液のpHを表す。

酵素 略名 (pH)	CAPM6 <sup>3)</sup> (6.0)		CAPM7 (7.0)		Tris citrate (8.0)		Li-B (8.1)		TVB-LB (8.5)	
	強度	分離	強度	分離	強度	分離	強度	分離	強度	分離
AK			++	+++	+++	++			+++	+
PAP-1			+	+	+	+++			+++	++
PAP-2							++	++	+	+
PAP-3							++	++	++	+
PAP-4							++	++	+	+
APK			++	++	+++	++				
GPD	+	++	++	++	++	++				
G6PD					+	+			++	+
IDH	+	+++	++	+++	+++	+				
MDH	++	+++	+++	+++	+++	++				
ME	+	++	++	++	+++	+				
MPI			+	++	++	++			+++	+
NP			++	++	++	+			++	+
6PGD			+	+++	+	+			++	+
GPI			+	++	+	++			+++	+
PGM			+	+	+	+	+	+	++	+
SOD					+	+	++	++	++	++

1): 強度

+++ : 強い  
++ : 普通  
+ : 弱い

2): 分離

+++ : 非常に良い  
++ : 良い  
+ : 悪い

3): クエン酸-N (3-アミノプロピル) モルフォリン緩衝液 (pH6.0), (沼知, 1989).

表4. 分析した遺伝子座と遺伝子頻度 ( ) 内の数字は、分析した  
個体数をあらわす。

遺伝子座	対立 遺伝子	アカイカ (2)	アメリカ オオアカイカ (2)	スジイカ (2)	トビイカ (2)	ニセ アカイカ (2)
AK	100	1.0	1.0	1.0	1.0	
	91					1.0
PEP-1	104		1.0			
	100				1.0	1.0
	98			1.0		
	76	1.0				
PEP-2	100	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
PEP-3	100	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
PEP-4	100	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
APK-1	100	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
APK-2	100	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
GPD	100					1.0
	95			1.0		
	86				1.0	
	84		1.0			
	39	1.0				
G6PD	107					1.0
IDH-1	100	1.0	1.0	1.0	1.0	
	135			0.7		
	119			0.3		
	100				1.0	1.0
IDH-2	96	1.0	1.0			
	100				1.0	1.0
	92		1.0	1.0		
MDH-1	86	1.0				
	100	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
MDH-2	100	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ME-1	100	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ME-2	100	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ME-3	101			1.0		
	100		1.0		1.0	1.0
MPI-1	85	1.0				
	100				1.0	1.0
	93			1.0		
MPI-2	83	1.0				
	73		1.0			
	100				1.0	1.0
	89			1.0		
	78	1.0				
NP	58		1.0			
	100	1.0		1.0	1.0	1.0
6PGD	35		1.0			
	100	1.0	1.0		1.0	1.0
GPI	82			1.0		
	100			1.0	1.0	1.0
	61		1.0			
	35	1.0				
PGM	100	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
SOD	100	1.0	1.0	1.0	1.0	
	65					1.0

## 考 察

今回の研究においてアカイカ亜科イカ類の酵素の電気泳動像は、表2に示したように泳動に使用する緩衝液によってバンドの分離と染色強度が大きく異なることが判った。ME-3、MPI-1、IDH-2等幾つかの遺伝子座では pH8.0以上の緩衝液を使用した場合に、泳動像の染色強度は強くても、種間の差を検出することが困難であった。したがって各酵素の分析にあたっては電気泳動時の緩衝液の選択を注意深く行う必要があると思われる。

表5. 実験結果から求めたアカイカ亜科5種の遺伝距離(D値)

	アカイカ	アメリカオオアカイカ	スジイカ	トビイカ
アメリカオオアカイカ	0.70			
スジイカ	0.77	0.77		
トビイカ	0.70	0.70	0.70	
ニセアカイカ	0.93	0.93	0.92	0.47

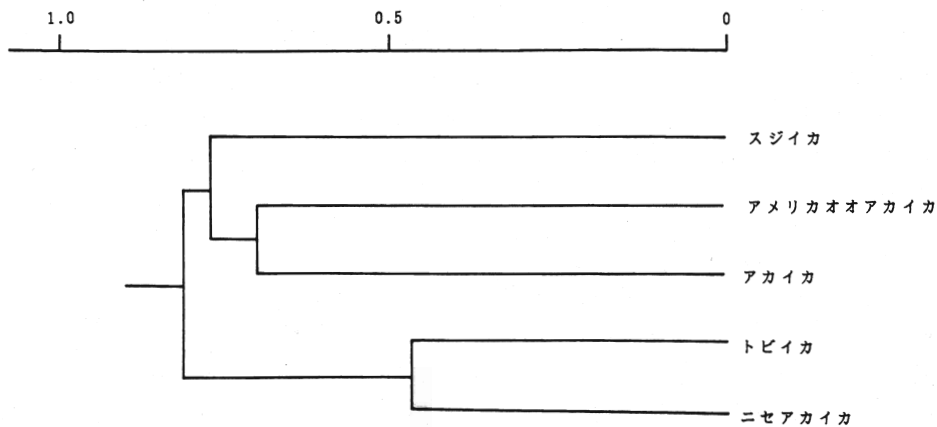


図1. 遺伝距離(D)をもとに非加重結合法 (UPGMA) で描いたデンドログラム

本研究では、分析した個体数が各種とも2個体と限られていた。Nei(1978)は種間のD値より系統樹を作成しようとする場合、対象とする種の平均ヘテロ接合体率が低くて且つそれぞれの種間のD値が大きい時には、分析する遺伝子座数を多くすれば分析個体数は少なくすることが出来ると報告している。本研究において調べた5種の間D値は全て0.47以上であり(表5)、これらの値は種間あるいは属間の遺伝距離としては他の生物と比べても大きい方である(Nei, 1987)。藤尾・川田(1989)は、アカイカとトビイカのアイソザイム分析を行い、その結果アカイカとトビイカの平均ヘテロ接合体率(観察値)がそれぞれ $0.004 \pm 0.003$ と0.011という低い値であったと報告している。Katugin(1993)はこれまでのイカ類のアイソザイム分析研究結果の概要を示しているが、それによるとイカ類の平均ヘテロ接合体率はほとんどの場合0.1以下の低い値を示している。本研究で用いた推定遺伝子座の数(23)は必ずしも十分に大きいとは言

えないが、上記のようなことを考慮すれば図1に示した系統樹は実際の遺伝的類縁関係を反映したものであると考えられる。

本研究で推定した23遺伝子座のうちGPDでは分析した5種全てが異なる対立遺伝子に固定されていた。また、AKやNPのように特定の1種類だけが異なる対立遺伝子に固定されている遺伝子座も観察された。こうしたことより比較する遺伝子座を適切に選べば、今回使用したアカイカ亜科の5種はごく少数のアイソザイムを調べるだけで容易に識別出来ると考えられる。

トビイカはアカイカ属とニセアカイカ属のどちらに属するかということで研究者間で意見が分かれているが、本研究ではトビイカはニセアカイカに遺伝的に最も近く両者の間のD値は今回調べた5種の間で最も小さいと言う結果が得られた(表5)。このことは奥谷(1991)やNesis(1982)らのトビイカはニセアカイカ属であると言う説を強く支持している。また今回の研究ではトビイカとニセアカイカの間を除くと、太平洋で漁獲された種(アカイカ、アメリカオオアカイカ、スジイカ、トビイカ)の間のD値の方が、太平洋で漁獲された種(アカイカ、アメリカオオアカイカ、スジイカ)と大西洋で漁獲されたニセアカイカの間のD値よりも小さくなる傾向を示した。この傾向が生息水域の遠近と関係しているか否かを調べるには、大西洋のアメリカヤセトビイカ、アカイカやインド洋のトビイカ、アカイカ等のアイソザイムも分析する必要がある。

以上のようにアイソザイム分析により種間の遺伝的近縁度を求めることは、アカイカ亜科を始めとする多くのイカ類の分類や系統発生を研究していく上で重要な情報をもたらすものと考えられる。今後は対象とする種をアカイカ科全体に広げてアイソザイム分析を行い、それらの遺伝的近縁度を明らかにすると共に、外部形態に基づく分類の研究を併せて行いアカイカ科イカ類の系統分類について明らかにしていきたい。

## 参 考 文 献

- Brierley, A.S., J.P. Thorpe, M.R. Clarke and H.R. Martins. 1993. A preliminary biochemical genetic investigation of the population structure of *Loligo forbesi* Steenstrup, 1856 from the British Isles and the Azores. In: Okutani, T., O'Dor, R. and Kubodera, T. eds. Recent advances in cephalopod fisheries biology. Tokai University Press, Tokyo. 61-69.
- Carvalho, G.R. and K.H. Loney. 1989. Biochemical genetic studies on the Patagonian squid *Loligo gahi* d'Orbigny. 1. Electrophoretic survey of genetic. J. Exp. Biol. Ecol., Vol. 126, 231-241.
- Carvalho, G.R., A. Thompson and A.L. Stoner. 1992. Genetic diversity and population differentiation of the shortfin squid *Illex argentinus* in the south-west Atlantic. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 158, 105-121.
- 藤尾芳久・川田暁. 1989. イカ類の遺伝的分化と変異性: アイソザイムによる魚介類の集団解析. 海洋生物集団の識別等に関する先導的評価手法の開発事業報告書, 日本水産資源保護協会, 508-523.
- 茅野博. 1978. カスリショウジョウバエ (*Drosophila hydesi* Sturtevant) の長崎市集団における遺伝的変異. 長崎県生物学会誌, 16, 4-12.

- Katugin, O.N. 1993. Genetic variation in the squid *Berryteuthis magister* (Berry, 1913) (Oegopsida: Gonattidae). In: Okutani, T., O'Dor, R. and Kubodera, T. eds. Recent advances in cephalopod fisheries biology. Tokai University Press, Tokyo. 201-213.
- Lu, C.C. and M. Dunning. 1982. Identification guide to Australian arrow squid (family Ommastrephidae). Technical Report, Victorian Institute of Marine Science, 2, 30pp.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York. 208-253.
- Nesis, K.N. 1987. Cephalopods of the world. T.F.H. Publications, Neptune City, N.J. 226-237.
- 沼知健一. 1989. アイソザイムによる魚介類の集団解析：海洋生物集団の識別等に関する先導的評価手法の開発事業報告書, 日本水産資源保護協会, 30-63.
- 奥谷喬司. 1991. イカの分類と分布：イカーその生物から消費まで－. 奈須敬二・奥谷喬司・小倉通男編集. 成山堂書店, 東京. 1-33.
- Ridgway, G.J., S.H. Sherburne and R.D. Lewis. 1970. Polymorphism in the esterases of Atlantic herring. *Transactions of the American Fisheries Society*, 99(1), 147-151.
- Roeleveld, M.A. 1988. Generic interrelationships within the Ommastrephidae (Cephalopoda). In: Clarke, M.R. and Trueman, E.R., eds. *The Mollusc Vol. 12*. Academic Press, London. 277-291.
- Roper, C.F.E., M.J. Sweeney and C.E. Nauen. 1894. FAO species catalogue Vol.3. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fish Synopsis. No.125, Vol.3, 156-187.
- Shaklee, J.B., F.W. Allendorf, D.C. Morizot and G.S. Whitt. 1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 119, 2-15.
- Shaklee, J.B., Tamaru, C.S. and R.S. Waples. 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins. *Pacific science*, Vol.36, No.2, 141-157.
- Smith, P.J., R.H. Mattlin, M.A. Roeleveld and T. Okutani. 1987. Arrow squids of the genus *Nototodarus* in New Zealand waters: systematics, biology and fisheries. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21, 315-326.
- Sokal, R.R. and C.D. Michener. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Sci. Bull.*, 28, 1409-1438.
- Voss, G.L. 1977. Classification of recent cephalopods. In: Nixon, M and Messenger, J.E., eds. *The biology of cephalopods*, appendix 2, 575-579.
- Wormuth, J.H. 1976. The biogeography and numerical taxonomy of the oegopsid squid family Ommastrephidae in the Pacific ocean. *Bulletin of Scripps Institution of Oceanography of University of California*. 23, 91pp.
- 余川浩太郎・和田志郎. 1993. アルゼンチンイレックス3群とカナダイレックスの遺伝子頻度の比較. 平成3年度イカ類資源・漁海況検討会議報告. 105-113.