

ウナギ属魚類の集団構造と分類に関する研究

2006

東京大学 農学生命科学研究科 水圏生物学専攻
峰岸 有紀

指導教員 東京大学 教授
塚本 勝巳

目次

第1章 緒言	1
第1節 ウナギ属魚類と分子情報	1
第2節 研究の目的	4
第2章 <i>Anguilla marmorata</i> の集団構造	6
第1節 材料	6
第2節 方法	
第1項 マイクロサテライト DNA 解析	9
第2項 ミトコンドリア DNA 解析	13
第3節 結果	
第1項 マイクロサテライト DNA の地理的変異	16
第2項 ミトコンドリア DNA の地理的変異	40
第4節 考察	
第1項 マイクロサテライト DNA の変異性	52
第2項 調節領域の変異性	53
第3項 <i>Anguilla marmorata</i> の集団構造	54
第3章 <i>Anguilla bicolor</i> の集団構造	62
第1節 材料	62
第2節 方法	
第1項 マイクロサテライト DNA 解析	62
第2項 ミトコンドリア DNA 解析	63
第3節 結果	
第1項 マイクロサテライト DNA の地理的変異	65
第2項 ミトコンドリア DNA の地理的変異	72
第4節 考察	83
第4章 <i>Anguilla australis</i> の集団構造	86
第1節 材料	86
第2節 方法	
第1項 マイクロサテライト DNA 解析	86
第2項 ミトコンドリア DNA 解析	86
第3節 結果	
第1項 マイクロサテライト DNA の地理的変異	89

第2項	ミトコンドリア DNA の地理的変異	95
第4節	考察	99
第5章	系統関係	105
第1節	材料	105
第2節	方法	
第1項	DNA 抽出	105
第2項	ロング PCR	108
第3項	DNA 断片の増幅と塩基配列の決定	108
第4項	系統解析	110
第3節	結果	
第1項	種間の系統関係	113
第2項	集団間の系統関係	115
第4節	考察	
第1項	系統関係	117
第2項	ウナギ属魚類の進化	120
第6章	分類	125
第1節	材料	
第1項	個体群の定義	125
第2項	標本	126
第2節	方法	
第1項	塩基配列の決定	126
第2項	変異量の比較	129
第3節	結果	
第1項	調節領域における変異量とその比較	131
第2項	cyt <i>b</i> 遺伝子における変異量とその比較	139
第3項	16S rRNA 遺伝子における変異量とその比較	143
第4節	考察	
第1項	ウナギ属魚類の遺伝的分化程度と分類の階層構造	148
第2項	ウナギ属魚類の「種」と分類体系	150
第7章	総合考察	154
第1節	ウナギ属魚類の分類	
第1項	研究小史	154
第2項	新たな分類体系	158

第2節	生物の分類	
第1項	生物の「種」と現在の分類学	160
第2項	分類学の役割とこれからの分類学	162
第3節	ウナギ属魚類の回遊と進化	
第1項	繁殖集団から見た回遊の特性	164
第2項	ウナギ属魚類の回遊環	167
第3項	ウナギ属魚類の回遊環と種分化	171
第4節	水産学と生物学への応用	173
第5節	今後の課題	178
要約		180
謝辞		183
引用文献		185
付表		A.1

第1章 緒言

第1節 ウナギ属魚類と分子情報

近年の分子遺伝学の台頭は、形態形質に基づく伝統的な分類学や系統学の体系に多くの疑問を投げかけている。ウナギ属魚類 *Anguilla* の分類においても例外ではない。20世紀前半に Ege (1939) によって確立された18種・亜種とされるウナギ属魚類の包括的な分類体系は、半世紀以上にもわたり、ほとんど見直されることなく用いられてきた。しかし、近年、分子データが分類形質として取り入れられるようになったことで、いくつかの分類学的問題が急速に浮かび上がってきた（例えば、Dijkstra and Jellyman 1999, Aoyama et al. 1999a, Watanabe 2003 など）。Dijkstra and Jellyman (1999) は、*A. australis australis* と *A. australis schmidtii* について、ミトコンドリア DNA (以下、mtDNA) の調節領域 (611塩基対) の解析を行った。その結果、*A. australis australis* と *A. australis schmidtii* 間の遺伝的変異がきわめて小さいことが明らかになった。そのため、これらは2亜種として別々に扱うよりも、*A. australis* として単一種とする方が妥当であるとした (Dijkstra and Jellyman 1999)。また、Aoyama et al. (1999a) は、ニューギニア島から採集したウナギ属魚類の標本の分子形質 (mtDNA の 16S ribosomal RNA; 以下、16S rRNA) を調べたところ、Ege (1939) に従うと *A. celebesensis* と同定される標本の中に、*A. interioris* が多数含まれることを明らかにした。つまり、遺伝的に明らかに異なる個体が、Ege (1939) が記載した形態形質では同定できないことが分かってきたのである。さらに、Watanabe (2003) は、計52種類の形態形質に加え、分子形質として16S rRNA 遺伝子の制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism; 以下、RFLP) を用い、ウナギ属魚類の分類学的再検討を行った。その結果、Ege (1939) が示した形態形質の範囲は、いずれも全種もしくは多くの種で重複しており、形態形質のみでは18種・亜種には分けられないことが明らかとなった。すなわち、ウナギ属魚類の分類に有用な形態形質は、体表の斑紋の有無、主上顎骨上の歯帯の幅の広さ、背鰭起始部の位置のわずかに3形質であり、これにより4群にしか分けられないことが分かった。一方、分子形質を用いるならば、ウナギ属魚類は14群に分かれることが明らかになった。さらに、これに脊椎骨数を合わせると、ウナギ属魚類は明瞭に15群に分類できることが示された。また、Ege (1939) により *A. bicolor*, *A. nebulosa*, *A. australis* の計3種にそれぞれ設けられた亜種カテゴリーについては、いずれの種の亜種間にも明瞭な形態的、遺伝的差異が認められないことが分かった。そこで

Watanabe (2003) は, Ege (1939) により3種について記載されていた亜種をすべて認めず, いずれも単一種として扱うことを提唱し, 最終的にはウナギ属魚類を15種とした. しかし, 研究者によっては, 依然としてEge (1939) による18種・亜種を用いる例もあり, ウナギ属魚類の分類は, 特に亜種をどう扱うかという点において大きな混乱がある.

分子情報の導入は, ウナギ属の系統関係についても新しい説を生み出している. 青山ら (1996) は, ウナギ属の系統関係を分子の眼で見直すため, 分岐分類に基づく分子系統学の理論と技術をいち早く採り入れ, 8種のウナギ属魚類について系統解析を行った. また, Aoyama and Tsukamoto (1997) は, ウナギ属8種の分子系統樹に基づき, ウナギ属魚類は現在のインドネシア付近に起源し, そこから世界中に分布域を広げたとする仮説を提唱した.

一方で, ウナギ属魚類の集団遺伝学においても, 分子技術の導入と発展により新しい展開があった. 大西洋に生息するヨーロッパウナギ *Anguilla anguilla* とアメリカウナギ *A. rostrata* の2種は, ウナギ属の中でも最も早くから集団解析が行われてきた (表 1-1, Avise 2003 に総説). 当初は, それぞれアロザイムを用いて解析が行われ, これら2種の地理的変異の有無について議論されてきた. Avise et al. (1986) は, mtDNA の RFLP を用いて, ウナギ属で初めて DNA レベルでの集団解析を行った. その結果, *A. rostrata* には, 北アメリカ大陸の沿岸 4000 km に亘って地理的な遺伝的変異がないことが明らかになった (Avise et al. 1986). その後, 分子マーカーの解像度は飛躍的に向上し, 近年では, 核 DNA のマイクロサテライト DNA 領域が集団解析に用いられるようになった. これにより, アフリカ北部からヨーロッパまで広い範囲に分布する *A. anguilla* は, 遺伝的にゆるく結びついている局所個体群が集まったメタ個体群構造をなすことが報告された (Daemen et al. 2001, Wirth and Bernatchez 2001). 一方, *A. anguilla* と産卵場を共有する *A. rostrata* についても同様の解析が行われたが, 本種の場合は単一の繁殖集団であることを支持する結果が得られている (Wirth and Bernatchez 2003). 太平洋においても, 台湾から日本まで南北に広い分布域をもつ *A. japonica* について, 早くから集団解析が行われており (Taniguchi and Numachi 1987, Sang et al. 1994, Chan et al. 1997 など), 現在では本種は種全体で1つの大きな繁殖集団であるとの考えが優勢である (Sang et al. 1994, Ishikawa et al. 2001, 吉澤 2006). また, ウナギ属魚類のなかで最大の分布域を有し, インド洋西部から太平洋東部にまで広く分布するオオウナギ *A. marmorata* では, 相互に遺伝的交流のない繁殖集団が5つ, それぞれ北太平洋, フィジー, タヒチ, スマトラ, マダガスカルに存在することが示されている (Ishikawa et al. 2004). このように, ウナギ属魚類の種は, メタ個体群構造, 単一繁殖集団, 複数繁殖集団と様々な構造を持つことが, 分子情報から分かって

表1-1 これまでに行われたウナギ属魚類における集団遺伝学的研究

文献	種	マーカー	結果
Drilhon et al. (1967)	<i>A. anguilla</i>	アロザイム	地理的変異あり
Pantelouris et al. (1971)	<i>A. anguilla</i>	アロザイム	地理的変異あり
Williams et al. (1973)	<i>A. rostrata</i>	アロザイム	地理的・空間的変異あり
Campanini et al. (1977)	<i>A. anguilla</i>	アロザイム	共通の遺伝子プールに由来
Koehn and Williams (1978)	<i>A. rostrata</i>	アロザイム	地理的変異あり, 自然選択の結果?
Campanini and Rodino (1980)	<i>A. anguilla</i>	アロザイム	地理的変異なし
Avise et al. (1986)	<i>A. rostrata</i>	mtDNA	地理的変異なし
Taniguchi and Numachi (1987)	<i>A. japonica</i>	アロザイム	単一の繁殖集団
Sang et al. (1994)	<i>A. japonica</i>	mtDNA	単一の繁殖集団
Chan et al. (1997)	<i>A. japonica</i>	アロザイム	地理的変異あり
Daemen et al. (1997)	<i>A. anguilla</i>	マイクロサテライト	地理的な差異なし
Lintas et al. (1998)	<i>A. anguilla</i>	mtDNA	単一の繁殖集団
Daemen et al. (2001)	<i>A. anguilla</i>	mtDNA, マイクロサテライト	わずかな差異あり
Ishikawa et al. (2001)	<i>A. japonica</i>	mtDNA	単一の繁殖集団
Smith et al. (2001)	<i>A. australis</i> / <i>A. dieffenbachii</i>	アロザイム	いずれも単一の繁殖集団
Tseng et al. (2001)	<i>A. japonica</i>	マイクロサテライト	多型性あり
Wirth and Bernatchez (2001)	<i>A. anguilla</i>	マイクロサテライト	メタ個体群構造
Maes and Volckaert (2002)	<i>A. anguilla</i>	アロザイム	緯度勾配あり
Mank and Avise (2003)	<i>A. anguilla</i> / <i>A. rostrata</i>	マイクロサテライト	わずかな差異あり
Tseng et al. (2003)	<i>A. japonica</i>	マイクロサテライト	時間的な集団ない
Wirth and Bernatchez (2003)	<i>A. anguilla</i> / <i>A. rostrata</i>	マイクロサテライト	<i>A. anguilla</i> は距離による隔離あり, <i>A. rostrata</i> は任意交配集団
Ishikawa et al. (2004)	<i>A. marmorata</i>	mtDNA, AFLP*	5集団
Dannewitz et al. (2005)	<i>A. anguilla</i>	マイクロサテライト	単一の繁殖集団
Tseng et al. (2006)	<i>A. japonica</i>	マイクロサテライト	緯度勾配あり
吉澤 (2006)	<i>A. japonica</i>	マイクロサテライト	単一の繁殖集団

* , 増幅断片長多型 Amplified Fragment Length Polymorphism

きた。

このようなことを考えると、ウナギ属魚類において、種以下の亜種や集団の扱いに見られる従来の混乱を解決し、その分類を見直すためには、解像度の高い分子形質を用いて種の内部の構造を詳細に検討する必要がある。ウナギ属魚類においては、前出の種も含めて、これまで計6種において集団遺伝学的研究が行われた(表 1-1)。しかしながら、これらは、その6種それぞれの種内に限って地域間、もしくは年級群間の遺伝的分化を調べたものである。また、これらはアロザイム解析(Drillhon et al. 1967, Williams et al. 1973, Taniguchi and Numachi 1987, Smith et al. 2001 など)、mtDNA塩基配列解析(Sang et al. 1994, Lintas et al. 1998, Ishikawa et al. 2004 など)、核DNAのマイクロサテライトDNA解析(Daemen et al. 1997, 2001, Wirth and Bernatchez 2001, 2003 など)など、研究によって手法が様々であるため、各種内の分化程度、つまり、種内変異の量を種間で相互に比較することはできなかった。すなわち、ある種で検出された地域間、もしくは年級群間の遺伝的な差異(分化程度)が、別の種で検出された遺伝的差異と比して、どの程度のものかということが分からない。また現在、ウナギ属魚類全種のmtDNA全塩基配列が決定されているが(Minegishi et al. 2005)、それはそれぞれの種についてわずか1個体ずつ解析されたものである。つまり、ウナギ属では、種内、および種間の遺伝的変異量を属内全体で比較できる十分な量の分子情報はないということができる。そのため、各種において多数の標本について分子形質を精査し、その変異の程度をウナギ属全体で統一的に俯瞰することによって分類を見直す作業ができないのである。

第2節 研究の目的

ウナギ属魚類という生物を研究するためには、その分類が基礎となる。生態を調べる場合も、資源保護を行う上でも、ウナギ属魚類の正確な分類と集団構造に関する情報が必要不可欠である。そこで本研究では、従来のウナギ属魚類の分類が抱える亜種や集団をどう扱うかという問題を、分子情報を用いて解決することを目的とした。さらに、種、亜種、集団というそれぞれの分類学的なカテゴリーの遺伝的変異量を十分に吟味した上で、ウナギ属魚類の分類体系を見直すことも研究の狙いとした。

本研究では、マイクロサテライトDNAおよびmtDNAの調節領域を用いて、まず、第2章において、複数の繁殖集団が存在することが既に知られている *Anguilla marmorata* の集団解析を行った。続く第3章および第4章において、いずれも2亜種が記載されている *A. bicolor* と *A.*

australis の集団構造をそれぞれ明らかにした。第5章では、上記3種で検出された繁殖集団のウナギ属内における系統的位置を明らかにするため、mtDNAを用いてウナギ属の種間と集団間の系統推定を行った。第6章では、本研究で検出した各繁殖集団のmtDNAの変異量が従来の分類段階（種、亜種、集団）のそれに対してどの程度のものかということと比較検討した。以上の結果に基づいて、ウナギ属魚類の種の定義を行い、ウナギ属魚類の新しい分類体系を提唱した。最後に第7章では、ウナギ属魚類の分類の変遷を振り返り、本研究により得られた新しいウナギ属魚類の分類の視点から、生物の分類について総合的に考察した。

第2章 *Anguilla marmorata* の集団構造

Anguilla marmorata は、ウナギ属魚類のなかで最大の分布域を有し、インド洋西部から太平洋北部、および東部にまで広く分布する (Ege 1939)。 *A. marmorata* の分布域は複数の海域にまたがるため、海域で繁殖を行い、淡水・汽水域で成長するウナギ属魚類の回遊生態を考慮すると、本種が単一の産卵場に由来するとは考えにくい。事実、Ishikawa et al. (2004) は *A. marmorata* の集団構造を調べ、本種には遺伝的に交流のない5つの繁殖集団が存在することを示した。しかし、Ishikawa et al. (2004) が解析した標本は、 *A. marmorata* の分布域を十分に網羅していない (例えば、グアムなど)。また、Ishikawa et al. (2004) は、mtDNA (調節領域5'側の部分塩基配列) 解析はすべての標本に対して行っているが、核DNA (AFLP) 解析については、解析に供した標本は、分布域の一部のものに限られている。従って、 *A. marmorata* の分布域全体から採集した標本については、核DNAを用いた集団構造解析は実施されることがないといえる。そこで本章では、分布域を網羅した標本採集を行い、高感度の分子マーカーであるマイクロサテライトDNAとmtDNAの調節領域を用いて、 *A. marmorata* の詳細な繁殖集団を正確に把握することを目的とした。

第1節 材料

標本採集は、 *Anguilla marmorata* の分布域を網羅するように行った。すなわち、マダガスカル、レユニオン、スマトラ、スラウェシ、フィリピン、台湾、日本 (種子島、和歌山、茨城、小笠原)、グアム、アンボン、パプアニューギニア、ニューカレドニア、フィジー、タヒチの計13地点から採集した計455個体を用いた (表2-1, 図2-1)。標本は、Watanabe (2003) に従い、形態形質と分子形質により、厳密に同定したものをを用いた。採集した標本から組織 (肝臓もしくは胸鰭) の一部を切り出して99%エタノール中に保存し、遺伝子解析に供した。

表2-1 A. marmorata の標本採集地点、解析個体数、解析年、全長

地域	地点	総標本数	マイクロサテライト解析に		採集年	全長 (mm)
			用いた個体数	調節領域解析に 用いた個体数		
インド洋西部	マダガスカル	33	33	28	1994-1996	425-762
	レユニオン	34	34	24	2002/?	96-343
インド洋東部	スマトラ	47	46	36	1997-2003	155-869
北太平洋	スラウェシ	27	27	14	1993-1996	288-54
	フィリピン	33	33	12	1996	?
	台湾	50	46	41	2000	49-55
	日本	37	37	13	1996-2002	48-764
	グアム	51	51	9	1998-2004	248-494
	アンボン	38	37	37	1995-1998	31-625
南太平洋西部	バブアニューギニア	29	29	15	1996	257-534
	ニューカレドニア	15	15	11	1997	248-673
	フィジー	32	32	23	1995-2005	178-671
南太平洋東部	タヒチ	29	29	27	1996	124-784
合計 5地域	13地点	455	449	290	-	-
?	不明					

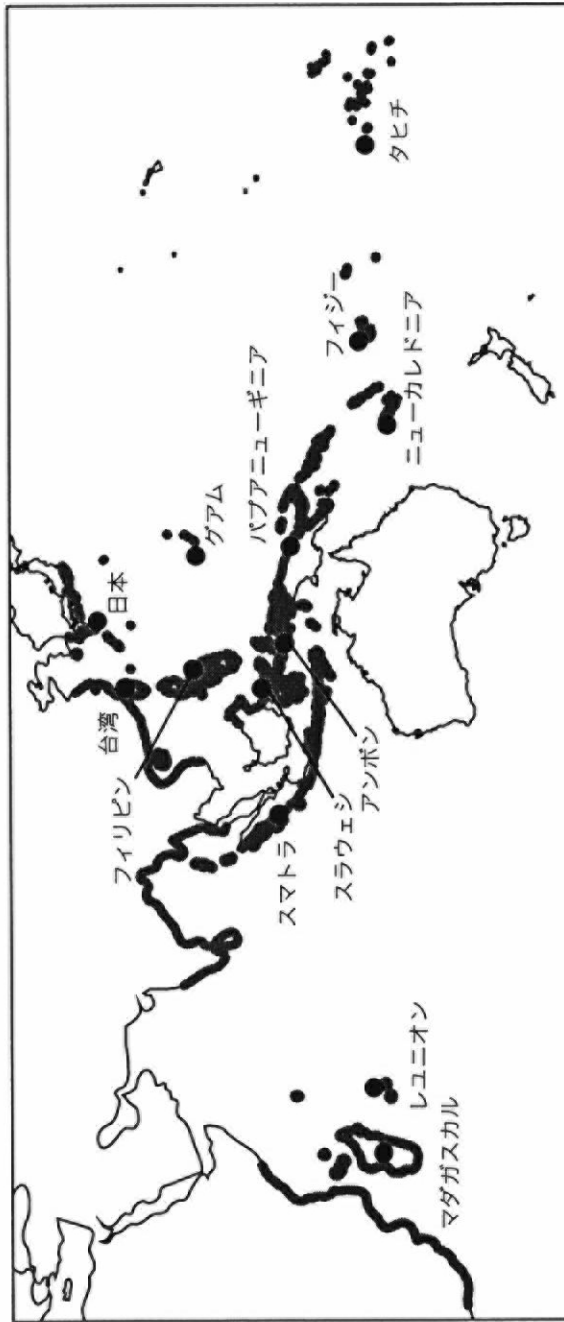


図2-1 A. marmorataの標本採集地点、太線はA. marmorataの分布域を示す。

第2節 方法

第1項 マイクロサテライト DNA 解析

DNA の抽出

エタノール中に保存した組織片の一部を 10 μ L の Proteinase K (10 mg/mL) を含む 500 μ L の TNES 8M Urea buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 125 mM NaCl; 50 mM EDTA; 1 % SDS; 8 M urea) に溶解し、フェノール・クロロホルム法により全 DNA を抽出した。抽出した全 DNA は、エタノール沈殿法により精製し、500 μ L の TE buffer (pH 8.0) に溶解した。

解析に使用するマイクロサテライト遺伝子座の検討と選定

解析には、ウナギ属 3 種 (*Anguilla anguilla*, *A. rostrata*, *A. japonica*) の既報 (2005 年 12 月 31 日現在) の計 29 個のマイクロサテライト遺伝子座を用いた (表 2-2)。まず、これらを *A. marmorata* の解析に使うことができるかどうかを調べた。すなわち、タヒチから 8 個体の標本を無作為に選び、29 個の遺伝子座について、PCR で特異的な増幅が認められるかどうか (既報のプライマーの有効性) を調べた。反応液は、dNTP 各 0.2 mM, 10 \times PCR buffer (TaKaRa) もしくは 10 \times Amplification buffer (Sambrook and Russel 2001) 1.5 μ L, フォワードおよびリバースプライマー各 0.5 μ M, *Taq* DNA polymerase (TaKaRa) 0.2 unit, および全 DNA 溶液 1.0 μ L に滅菌水を加えて最終容量を 15.0 μ L とした。反応には Mode 9700 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) もしくは Model TP600 PCR サーマルサイクラー Dice (TaKaRa) を用い、94 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した後、熱変性 94 $^{\circ}$ C 15 秒、アニーリング 58 $^{\circ}$ C 15 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 30 秒の過程を 35 回繰り返した。PCR 産物は、1.5 % のアガロースゲル (LO3, TaKaRa) を用いて電気泳動を行い、臭化エチジウム染色と紫外線照射により、増幅産物の有無を確認した。これにより、単一の増幅産物が確認された遺伝子座について、蛍光標識したフォワードプライマーを用いて、上記の条件と同様に PCR を行った。この PCR 産物の電気泳動は、ABI3100 もしくは 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行い、DNA 断片長の決定は Gene Scan HD500 [LIZ] size standards (Applied Biosystems) と、GENESCAN 3.1 software または GeneMapper software version 3.1 (Applied Biosystems) を用いて行った。

マイクロサテライト遺伝子座の変異性の基礎情報として、GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset 1995) を用い、各遺伝子座について、対立遺伝子の数、ヘテロ接合度の期待値 (H_E) と観察値 (H_O) を求めた。さらに、Hardy-Weinberg 平衡からのずれを検討す

表2-2 ウナギ属魚類の既報のマイクロサテライト遺伝子座とその変異性

遺伝子座	モチーフ	プライマー配列 (5' → 3')	Ni	Na	サイズ (範囲)	H _E	H _O	文献
Aan01	(CA) ₁₄	F* GTC TGA TCT CAT TAA CAA TCG AGG AGA G R* ATA ATT CTT CTT CAT TTT GGC TTG CCA T	246	17	214-250	0.716	0.676	Daemen et al. (1997)
Aan02	(GT) ₁₅	F GGA TTC CGC ACA GCA CAA CG R GGT TGC GTT GGC AGA CTT TGG	247	6	168-182	0.286	0.278	Daemen et al. (1997)
Aan03	(GT) ₁₀	F GGC AAC AAG CTA GCC ATG ACC R CCT GGC ACA AAT GTG CTG TTG	239	16	212-242	0.767	0.696	Daemen et al. (1997)
Aan04	(GT) ₈	F TCA GCA GCC TGA GCA AAG CCA GG R GGC AGT CGT GCA AGT TGA ATC ATA GGA	242	34	127-255	0.94	0.737	Daemen et al. (1997)
Aan05	(GT) ₁₇	F TGC TTG TAT GCA TAT GTA TGT TCA TGC R CAG CAT GGC CTG AAG CAG TCT ACT AGA	253	10	177-197	0.704	0.705	Daemen et al. (1997)
AJMS-1	(GT) ₁₆	F TCG AGA CAC CAG ATA GTC AC R ACA TCC TAG GCT CAC ACC	35	13	194-226	0.89	0.63	Tseng et al. (2001)
AJMS-2	(GA) ₁₅	F ATT TCA CGT CAT CGG ACC TGC R GCT GGG AGC GAC GCT TTA TC	41	18	103-137	0.92	0.67	Tseng et al. (2001)
AJMS-3	(GT) ₁₀	F GGT ATG AAT GCA GGC GTT TAT G R GCA ACC GAT TTG ATC TCC AG	59	7	79-91	0.72	0.58	Tseng et al. (2001)
AJMS-5	(GT) ₁₅	F CCT TCA GAT TGC TAG CAC R CGG AGT CTA ATT GTC TCC TC	28	17	117-153	0.96	0.89	Tseng et al. (2001)
AJMS-6	(GT) ₁₉	F ACA GAG CCA GAC AAA CAG AC R GGT CAG CAA GCA AAA CGA AC	52	13	85-111	0.84	0.54	Tseng et al. (2001)
AJMS-10	(GA) ₁₇	F TGT CTA ACA CTA AGA AAA GGA GAG G R GGC TGC CAG TAT CTT CTC AAA G	40	20	137-175	0.97	0.70	Tseng et al. (2001)
Aro054	(CA) ₁₄	F CTC AAC TCC AGC ACA CTG GA R ACA AAA TAG CTC CGT AAC AC	-	-	~122	-	-	Wirth and Bernatchez (2001)
Aro063	(GA) ₁₂	F CCA GAT ACC TTG ACA ACG GC R TCA AGA GCT TCC TGA CCC TC	-	-	~127	-	-	Wirth and Bernatchez (2001)
Aro095	(GT) ₁₀	F GGC TGT TAT TCT GGA CGT CG R CCC TAA GTA TCC TAC ATA CAG	-	-	~87	-	-	Wirth and Bernatchez (2001)
Aro121	(GT) ₁₅	F TTG GGA AGG TCA TGG ACG TG R CTA ATA AAT GTC TGG GTA GGC	-	-	~86	-	-	Wirth and Bernatchez (2001)
Ang101	(CA) ₁₇	F GAA AAC AAT CGG GTA CCA CAG R ACA GTC AGT CAC AAT GAG CC	-	-	~137	-	-	Wirth and Bernatchez (2001)
Ang114	(TC) ₂₆	F CCT GTG AAT CCA ACA GGT GG R GGA TAA TGC GGC AGA GTT CCC	-	-	~199	-	-	Wirth and Bernatchez (2001)
Ang151	(GT) ₁₅	F GAT CTG TGG AGA GAT GTT GG R AGT AGC ATG CCT AGA ACT GG	-	-	~137	-	-	Wirth and Bernatchez (2001)
AjTR-04	(GT) ₁₅	F CAC CCT TGC CCT ATT TTG ATA R GCT GAG TCA TGA TCA CCT GT	22	17	207 (167-217)	0.918	0.591	Ishikawa et al. (2001)
AjTR-05	(CA) ₁₆ (TA) ₃	F GGA GCA GTA TGG AAT AAC ATG A R CAT GTA TTT ACA TAG GGG ATG A	22	14	195 (177-205)	0.854	0.818	Ishikawa et al. (2001)
AjTR-12	(AG) ₁₄	F AAC GTT AGT CCC TAG GTT CC R TAA GGG TGT TAT ATG TTC AG	16	17	157 (154-214)	0.893	0.875	Ishikawa et al. (2001)
AjTR-17	(AC) ₁₀	F GTT ATG CAC TCA CGC TAA R ATC ACC ATT ATT CTT TCT GA	22	13	151 (139-169)	0.871	0.500	Ishikawa et al. (2001)
AjTR-23	(TC) ₁₁ (AC) ₁₁ AA(AC) ₃	F GGA TAG AGA ACA AAC GCA GT R GGA CAT GAA CTT CTT ACA CAG A	21	15	260 (238-276)	0.915	0.857	Ishikawa et al. (2001)
AjTR-24	(AC) ₁₃ N ₁₅ (AC) ₁₃	F AAA CAA CAT ACA CCA ATA CC R ATG ATC CCT CTG AAT GAT A	21	14	140 (120-186)	0.818	0.810	Ishikawa et al. (2001)
AjTR-25	(AC) ₆ CA(AC) ₇ A ₃ G ₂ (CA) ₆	F GCA TAC ACG ATT ACA TGC AC R ACA TAA AGG TGA CCG GAA C	21	24	219 (145-289)	0.931	0.762	Ishikawa et al. (2001)
AjTR-27	(TC) ₈ (CT) ₃ (CCT) ₂	F GTC CTC CAG CCA TCA TTT GT R CTT TGG CAT TCT TAC GCT CA	22	6	161 (157-167)	0.624	0.500	Ishikawa et al. (2001)
AjTR-37	(TG) ₁₄	F AGA CCT TAT GTC ACC TTA TGC T R AAG ATG TTA AAT TCA ATT GTG C	14	8	200 (188-202)	0.842	0.857	Ishikawa et al. (2001)
AjTR-42	(TG) ₁₂	F GTG AAC ATT GAT CCT ATT CAT AAT C R ATA ACT AGC CCT ACT AAC TGT TTT G	24	6	245 (241-251)	0.738	0.458	Ishikawa et al. (2001)
AjTR-45	(CT) ₃ T(TC) ₂ C(CT) ₆	F GCG CAT GGA GAA CTC TAA T R CAA TAG AGT GAG GAC AGT AGA	22	12	149 (141-165)	0.871	0.864	Ishikawa et al. (2001)

Ni, number of individual 解析個体数
 Na, number of allele 対立遺伝子数
 H_E, expected heterozygosity ヘテロ接合度 (期待値)
 H_O, observed heterozygosity ヘテロ接合度 (観察値)

るため、Genetix 4.05 (Belkhir et al. 2004) を用いて F_{IS} (Wright 1965) を算出し、Workman and Niswander (1970) に従って、その有意性を検定した。

遺伝子型の決定とマイクロサテライト遺伝子座の変異性の検討

以上により、集団解析における有効性が確認された遺伝子座を用い、すべての標本についてマイクロサテライト領域の増幅と遺伝子型の決定を行った。得られた遺伝子型から、上記と同様に各遺伝子座について、標本全体の対立遺伝子の数、 H_E および H_O を求めた。また、 F_{IS} (Wright 1965) を算出し、その有意性を検定した (Workman and Niswander 1970)。

ヌル対立遺伝子の頻度 (r) は、Brookfield (1996) に従って、次式により算出した；

$$r = (H_E - H_O) / (1 + H_E)$$

MISAT (Nielsen 1997) を用いて、マイクロサテライト DNA の変異モデルとして、マイクロサテライト領域の繰り返し単位が1つずつではなく、複数増減する割合と、遺伝的多様度 (θ) を最尤法により推定した。

解析に用いるマイクロサテライト遺伝子座の間に連鎖があるかどうかを検討するため、GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset 1995) を用いて、Markov chain methods (Goudet et al. 1996) による検定を行った。

地理的な遺伝的変異性の検討

地理的な遺伝的変異性を調べるために、上記の方法と同様に、地点ごとに、各遺伝子座について、対立遺伝子の数、 H_E 、 H_O 、 F_{IS} (Wright 1965) の算出、およびその有意性の検定を行った (Workman and Niswander 1970)。また、出現した対立遺伝子のサイズと数を頻度分布に表した。

地点間の遺伝的分化程度を検討するために、Arlequin ver. 2.001 (Schneider et al. 2000) を用いて、固定指数、すなわち、Weir and Cockerham (1984) により補正した F_{ST} (Wright 1965)、および R_{ST} (Slatkin 1995) を算出した。これらの有意性は10000回の無作為化検定を行うことにより検定した。

Assignment test

各個体の遺伝子型に基づいてクラスタリングを行い、遺伝的に似たグループ (以下、クラスターと呼ぶ) の数を推定するため、STRUCTURE 2.0 (Pritchard et al. 2000) を用いて、ベイ

ズ法に基づく Assignment test を行った。得られた結果の信頼性を確認するため、仮定したクラスターの数 (K) の値それぞれについて、3回の計算を独立して行った。Assignment score (q) が80%以上の個体を、正確にクラスターに振り分けられたとした (Pritchard et al. 2000)。また、集団間の分散が均一でないなどの場合には、データの対数尤度のみでは K の推定を誤ることがあるため (Evanno et al. 2005), Evanno et al. (2005) に従い、対数尤度の変化の割合 (ΔK) を次式に従って算出した；

$$\Delta K = \text{mean } |L''(K)| / \text{standard deviation } |L(K)|$$

なお、このとき、 $L(K)$ は K のときの対数尤度で、 $L''(K) = L'(K+1) - L'(K)$ であり、 $L'(K) = L(K) - L(K-1)$ で与えられる。

階層的集団構造解析

固定指数により有意差が検出されなかった地点をそれぞれ同一集団としてまとめ、それらの集団間と地点間の階層的な遺伝的差異を検討するため、locus-by-locus 階層的集団構造解析 (Analysis of Molecular Variance ; 以下, AMOVA) を行い、集団間の遺伝的分化程度を調べた。この解析は Arlequin ver. 2.001 (Schneider et al. 2000) を用いて行い、その有意性は 10000 回の無作為化検定を行うことにより検定した。

集団の有効な大きさ N_e と有効移住個体数 N_m の推定

集団の有効な大きさ (N_e) は、津村・戸丸 (2001) に従い、以下の式により算出した；

$$N_e = H/4(1-H)\mu$$

このとき、 H はヘテロ接合度、 μ は突然変異率である。ここでは、 μ 値として、ゼブラフィッシュの2塩基繰り返しのマイクロサテライト DNA の変異率である 1.5×10^{-4} (Shimoda et al. 1999) を用いた。

集団間の移住と遺伝的浮動が平衡状態にあると仮定して、Wright (1931) に従い、以下の式により集団間の有効移住個体数 (N_m) を推定した；

$$N_m = (1-F_{ST})/4F_{ST}$$

第2項 ミトコンドリア DNA 解析

調節領域の増幅と塩基配列の決定

mtDNAの調節領域の全長の塩基配列を決定するため、ウナギ属魚類のmtDNA全塩基配列(Minegishi et al. 2005)に基づいて、*Anguilla marmorata*に特異的な4個のプライマーを新たに設計した(表2-3)。これに既報の2個の魚類汎用プライマー(Miya and Nishida 2000, Inoue et al. 2001a)を加え、計6個のプライマーを様々に組み合わせて用いた。反応液は、dNTP各0.2 mM, 10×PCR buffer (TaKaRa) もしくは10×Amplification buffer (Sambrook and Russel 2001) 1.5 μL, フォワードおよびリバースプライマー各0.5 μM, *Taq* DNA polymerase (TaKaRa) 0.2 unit, および全DNA溶液1.0 μLに滅菌水を加えて最終容量を15.0 μLとした。反応にはModel 9700サーマルサイクラー (Applied Biosystems) もしくはModel TP600 PCRサーマルサイクラーDice (TaKaRa) を用い、94°Cで5分間加熱した後、熱変性94°C 15秒, アニーリング50°C 15秒, 伸長反応72°C 1分の過程を30~35回繰り返した。得られたPCR産物は、1%のアガロースゲル(LO3, TaKaRa)を用いて電気泳動を行い、臭化エチジウム染色と紫外線照射により、増幅産物の有無を確認した。得られた2本鎖のPCR産物は、Pre-Sequencing kit (USB)を用いて、Exonuclease Iにより余剰のプライマーおよび1本鎖DNAを分解し、Shrimp Alkaline Phosphataseにより余剰のdNTPのリン酸基を加水分解した後、BigDye Terminator v 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems)を用いてDye Termination反応を行った。プライマーとサーマルサイクラーはPCRに用いたものと同じものを使用し、反応条件は付属の説明書(Applied Biosystems)に従った。反応産物は、ABI 3100もしくは3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて泳動し、塩基配列の決定を行った。

得られた泳動像の編集はEdit View ver. 1.0.1 (Applied Biosystems)を用いて行い、泳動像と得られた塩基配列を目視により確認し、これらが明瞭でない領域を削除した。Auto Assembler 2.1 (Applied Biosystems)を用いて得られた塩基配列を連結し、調節領域の全長の塩基配列を得た。

相同性の確認

得られた塩基配列は、Clustal X (Thompson et al. 1997)を用いて大まかにアラインメントを行った後、DNASIS ver. 3.7 (Hitachi Software Engineering)とMacClade 4.0 (Maddison and Maddison 2000)上で目視により相同性を確認した。なお、ウナギ属魚類のmtDNA全塩

表2-3 調節領域の塩基配列決定に使用したプライマーとその配列

プライマー名	配列 (5' → 3')
L15625-CR	TTT GTA ATC CGA AGA TTG AAG
H16401-MarmCR	CCG TGA ATT AAT GCT CGG C
L16279-MarmCR	CAT TTG GTT CCT ATT TCA GG
H84-CR	CAG AAC TGA TGT TAA AGT CAG
L15774-CYB*	ACA TGA ATT GGA GGA ATA CCA GT
H598-Phe**	TAG CAT TTT CAG TGT TAW GCT TT

*, Inoue et al. (2001a)

**, Miya and Nishida (2000)

基配列 (Minegishi et al. 2005) から *Anguilla marmorata* の調節領域を切り出し、比較対照に用いた。得られた塩基配列は塩基配列型 (以下、ハプロタイプと呼ぶ) ごとに整理した。

塩基配列の変異性と中立性の検定

PAUP* 4.0b10 (Swofford 1998) を用いて、これらのハプロタイプのすべての組み合わせにおける転位 (トランジション)、転換 (トランスバージョン) サイト数、および遺伝距離 (HKY85 モデル; Hasegawa et al. 1985) を算出した。これらは、縦軸に転位サイト数を、横軸に転換サイト数と遺伝距離をそれぞれとり、塩基置換の飽和の程度を確認した。また、Arlequin ver. 2.001 (Schneider et al. 2000) を用いて、ハプロタイプ間の転位および転換サイトの総数と、塩基多様度 (π) を算出した。さらに、Tajima's D を用いた Neutrality test により、解析に用いる塩基配列の変異が自然選択に対して中立であるかどうかを調べた。この検定は、Arlequin ver. 2.001 (Schneider et al. 2000) によって行った。

地理的な遺伝的変異性の検討

ハプロタイプの地理的なまとまりを調べるため、算出した遺伝距離に基づいて、PAUP* 4.0b10 (Swofford 1998) を用いて、近隣結合法 (Saitou and Nei 1987) に基づく遺伝子系統樹を推定した。地点間の遺伝的分化程度を検討するため、Arlequin ver. 2.001 (Schneider et al. 2000) を用いて、Weir and Cockerham (1984) により補正した F_{ST} (Wright 1965) を算出した。その有意性は 10000 回の無作為化検定を行うことにより検定した。

AMOVA

F_{ST} により有意差が検出されなかった地点をそれぞれ同一集団としてまとめ、それらの集団間と地点間の階層的な遺伝的差異を検討するため、locus-by-locus AMOVA を行い、集団間の遺伝的分化程度を調べた。この解析は Arlequin ver. 2.001 (Schneider et al. 2000) を用いて行い、その有意性は 10000 回の無作為化検定を行うことにより検定した。

集団の有効な大きさ N_e と有効移住個体数 N_m の推定

集団の有効な大きさ (N_e) は、Wilson et al. (1985) に従って、以下の式により算出した；

$$N_e = 10^8 \pi / s g$$

ここで π は塩基多様度、 s は 100 万年あたりの塩基置換率 (%), g は世代時間 (年) を表す。

ここでは、 s 値には mtDNA の一般的な分子進化速度とされる 100 万年あたり 2 % の値 (Wilson et al. 1985) を代入した。本研究では、 g 値は産卵回遊に向かう銀ウナギの年齢とし、インドネシア・ボソ湖における *Anguilla marmorata* の銀ウナギの平均年齢である 8.2 年 (Sugeha 2003) を代入した。

第3節 結果

第1項 マイクロサテライト DNA の地理的変異

解析に使用するマイクロサテライト遺伝子座の検討と選定

まず、既報の 29 個のマイクロサテライト遺伝子座 (表 2-2) について、タヒチで採集した 8 個体を用いて予備的に変異性を調べ、解析に使用する遺伝子座の選定を行った。その結果、17 個の遺伝子座 (AJMS-3, AJMS-5, AJMS-6, AJMS-10, Aro054, Aro063, Aro095, Aro121, AjTR-04, AjTR-05, AjTR-12, AjTR-23, AjTR-24, AjTR-27, AjTR-37, AjTR-42, AjTR-45) において、1~10 個の対立遺伝子が認められた (表 2-4)。これらの遺伝子座では、いずれも、Hardy-Weinberg 平衡からのずれは認められなかった ($P > 0.05$)。このうち、5 個の遺伝子座 (AjTR-05, AjTR-23, AjTR-24, AjTR-27, AjTR-45) は、繰り返し単位の配列中に挿入塩基を含むか、2 塩基と 3 塩基の繰り返し単位の組み合わせから成る (表 2-2)。そのため、本研究で行う電気泳動による解析では、マイクロサテライト (繰り返し) 領域が変化することによって生ずる対立遺伝子と、挿入塩基の数が変異することにより生ずる対立遺伝子を正確に判別することができないと考え、これらの遺伝子座は解析から除外した。また、2 個の遺伝子座 (AJMS-5 および AjTR-42) では、出現した対立遺伝子はわずかに 1 個であった。そのため、この 2 個の遺伝子座は変異性が極めて低いか、ヌル対立遺伝子が存在すると考えられるので、解析から除外した。以上より、本研究では、10 個のマイクロサテライト遺伝子座 (AJMS-3, AJMS-6, AJMS-10, Aro054, Aro063, Aro095, Aro121, AjTR-04, AjTR-12, AjTR-37) を *Anguilla marmorata* の集団解析に有効なマーカーであると判断した (表 2-4)。

マイクロサテライト遺伝子座の変異性

上記の 10 個のマイクロサテライト遺伝子座を用いて、すべての標本について遺伝子型の決定を行い、計 449 個体について遺伝子型を得た。その結果、それぞれの遺伝子座において、

表2-4 A. marmorata におけるウナギ属魚類の既報のマイクロサテライト遺伝子座の変異性

遺伝子座	PCR*	Ni	Na	サイズ** (範囲)	H _E	H _E (n.b.)	H _O	H _O /H _E	F _{IS} ***
Aan01	2								
Aan02	3								
Aan03	2								
Aan04	2								
Aan05	3								
AJMS-1	2								
AJMS-2	2								
AJMS-3	1	8	3	79,85 (79-87)	0.602	0.642	0.875	1.364	-0.400
AJMS-5	1	8	1	121	0.000	0.000	0.000		-
AJMS-6	1	7	3	99 (99-105)	0.357	0.385	0.143	0.372	0.647
AJMS-10	1	8	2	139 (139-141)	0.469	0.500	0.500	1.000	0.000
Aro054	1	8	3	160 (160-164)	0.227	0.242	0.250	1.034	-0.037
Aro063	1	8	8	197 (197-223)	0.828	0.883	1.000	1.132	-0.143
Aro095	1	6	7	123,127 (111-147)	0.819	0.894	0.833	0.932	0.074
Aro121	1	6	4	124 (116-126)	0.681	0.742	0.667	0.898	0.111
Ang101	3								
Ang114	3								
Ang151	2								
AjTR-04	1	6	4	197,201 (195-201)	0.736	0.803	0.833	1.038	-0.042
AjTR-05	1	4	4	195,197 (195-201)	0.688	0.786	0.500	0.636	0.400
AjTR-12	1	8	3	154 (154-242)	0.406	0.433	0.500	1.154	-0.167
AjTR-17	3								
AjTR-23	1	8	1	236	0.000	0.000	0.000		-
AjTR-24	1	8	10	178 (164-192)	0.859	0.917	0.875	0.955	0.049
AjTR-25	2								
AjTR-27	1	6	2	155 (143-155)	0.153	0.167	0.167	1.000	-
AjTR-37	1	7	5	200 (192-206)	0.674	0.725	0.857	1.182	-0.200
AjTR-42	1	8	1	241	0.000	0.000	0.000		-
AjTR-45	1	8	3	137 (133-139)	0.648	0.692	0.750	1.084	-0.091

*, 1, 単一増幅産物が得られた；2, 非特異的増幅産物が認められたか、産物量が少なかった；3, 増幅が確認されなかった

Ni, number of individual 解析個体数

Na, number of allele 対立遺伝子数

**、最頻値

H_E, expected heterozygosity ヘテロ接合度 (期待値)

H_O, observed heterozygosity ヘテロ接合度 (観察値)

***, *, P < 0.05

8~33個の対立遺伝子が得られた(表2-5)。 H_E は0.574~0.908、 H_o は0.373~0.938であった。各遺伝子座における r をBrookfield(1996)に従って推定したところ、0.8~26.9%となった。また、これらの遺伝子座のマイクロサテライト領域の突然変異モデルとして、繰り返し単位が複数増減する割合を推定したところ、1.0~34.5%であった(表2-5)。このうち、Aro054、Aro063、およびAjTR-37の3個の遺伝子座以外は、その割合は10%未満であった。また、 θ は4.1~72.1で、遺伝子座によって大きく異なっていた。連鎖不平衡を検定した結果、どの遺伝子座の組み合わせにおいても連鎖は認められず($P>0.05$)、それぞれの遺伝子座は独立に組み換えられることが示された。

地理的な遺伝的変異性

各地点において出現した対立遺伝子の数は、遺伝子座AJMS-3で3~7個、AJMS-6で5~14個、AJMS-10で2~9個、Aro054で2~15個、Aro063で10~22個、Aro095で10~17個、Aro121で4~18個、AjTR-04で4~12個、AjTR-12で2~8個、AjTR-37で4~12個であった(表2-6)。地点ごとに見ると、どの遺伝子座においても、概ね、北太平洋に位置する日本、台湾、フィリピン、スラウェシ、アンボンの5地点は、他の南太平洋、インド洋およびグアムの8地点に比べて、より多数の対立遺伝子が出現した。

標本の採集地点ごとに出現した対立遺伝子の頻度分布を見ると、上述の対立遺伝子の出現数と同様の傾向が認められた(図2-2~11)。すなわち、日本、台湾、フィリピン、スラウェシ、アンボンの5地点は、いずれの遺伝子座においても、多数の対立遺伝子が様々な頻度で出現した。他方、南太平洋、インド洋およびグアムの8地点は、比較的少数の対立遺伝子が高頻度で出現した。グアムは地理的には北太平洋に位置するにもかかわらず、北太平洋の5地点ではなく、南太平洋およびインド洋の7地点に類似した頻度分布パターンを示した。

遺伝子座ごとに、各地点においてHardy-Weinberg平衡からのずれを検定した結果、51/130で有意なずれが認められた($P<0.05$) (表2-6)。このうち、遺伝子座AJMS-3およびAro121では、13地点中12地点でHardy-Weinberg平衡からのずれが認められた($P<0.05$)。そのため、これらの2つの遺伝子座は以降の解析から除外した。それ以外の多くの地点においては、Hardy-Weinberg平衡が成り立っていた。また13地点をまとめ、標本全体として見ると、いずれの遺伝子座においてもヘテロ接合度の有意な減少が認められた($P<0.05$) (表2-6)。

地点間の遺伝的分化程度の指標となる固定指数 F_{ST} および R_{ST} を算出したところ、 F_{ST} は-0.006~0.240、 R_{ST} は-0.025~0.221であった(表2-7)。 F_{ST} では、北太平洋の4地点(日本、

表2-5 A. marmorata における本研究に用いたマイクロサテライト遺伝子座の変異性

遺伝子座	Ni	Na	サイズ* (範囲)	H _E	H _E (n.b.)	H _o	ヌル対立遺伝子頻度**	反復単位が複数増減する割合	遺伝的多様度 (θ)
AJMS-3	422	8	85 (77-91)	0.739	0.739	0.938	-0.114	0.010	4.1
AJMS-6	417	17	99 (89-121)	0.793	0.794	0.779	0.008	0.059	21.1
AJMS-10	435	12	139 (137-161)	0.737	0.737	0.529	0.120	0.084	7.2
Aro054	436	18	160 (148-188)	0.574	0.574	0.381	0.123	0.157	14.9
Aro063	437	33	197 (161-245)	0.903	0.904	0.799	0.055	0.108	72.1
Aro095	409	23	117 (103-151)	0.908	0.909	0.812	0.051	0.085	50.5
Aro121	402	21	124 (96-140)	0.877	0.878	0.373	0.269	0.059	46.3
AJTR-04	415	16	195 (189-223)	0.708	0.708	0.581	0.075	0.059	21.6
AJTR-12	420	9	154 (144-162)	0.628	0.629	0.438	0.117	0.059	4.3
AJTR-37	433	13	200 (188-212)	0.815	0.816	0.755	0.034	0.345	14.4

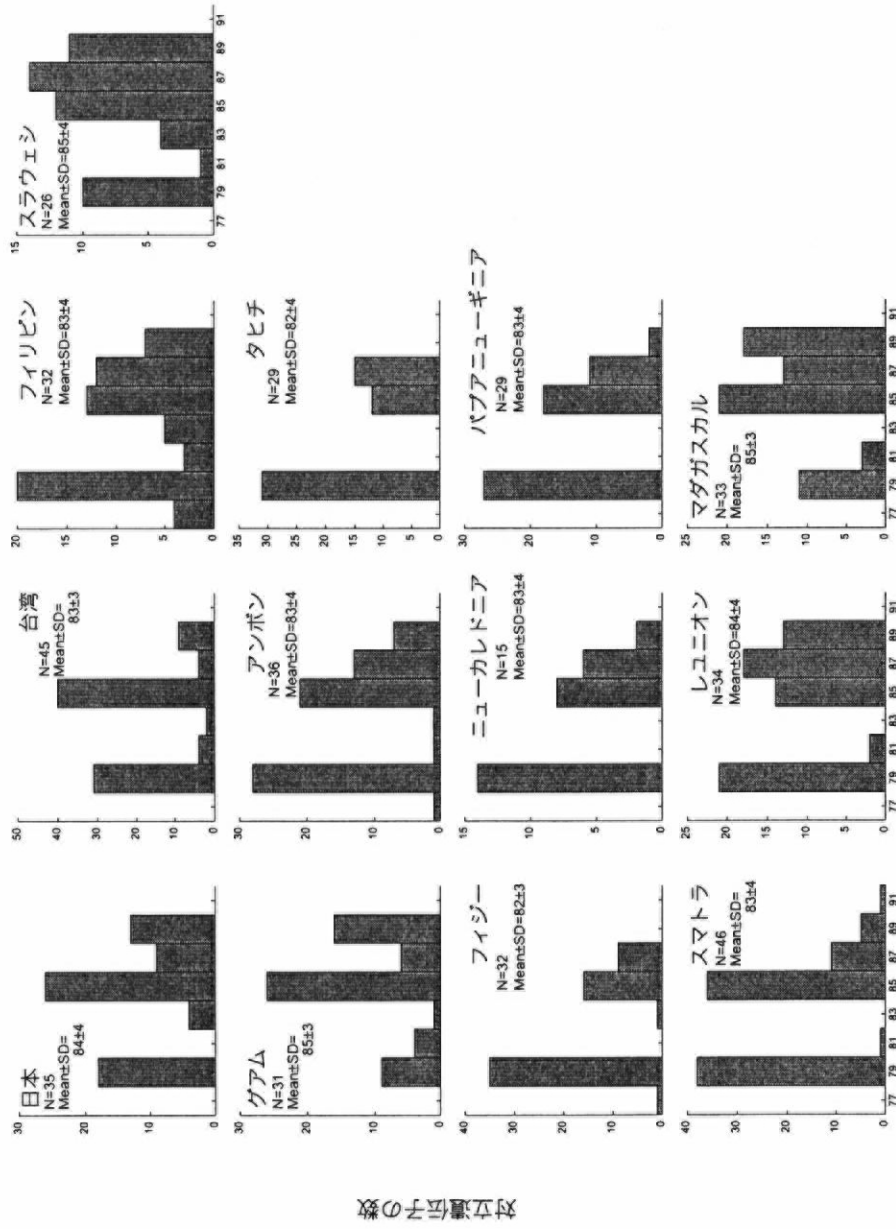
Ni, number of individual 解析個体数

Na, number of allele 対立遺伝子数

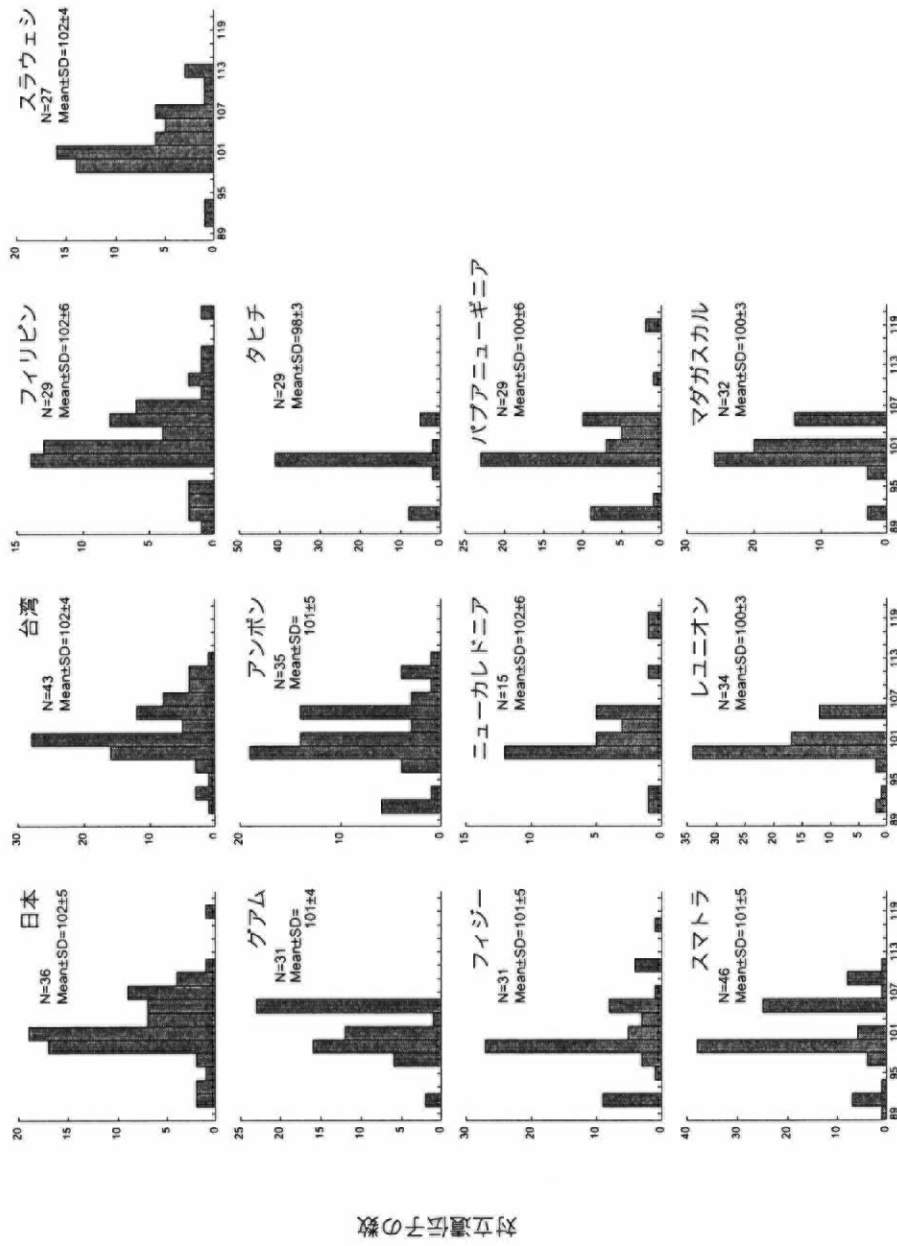
*, 最頻値

H_E, expected heterozygosity ヘテロ接合度 (期待値); n.b., non-biased (Nei 1978)H_o, observed heterozygosity ヘテロ接合度 (観察値)

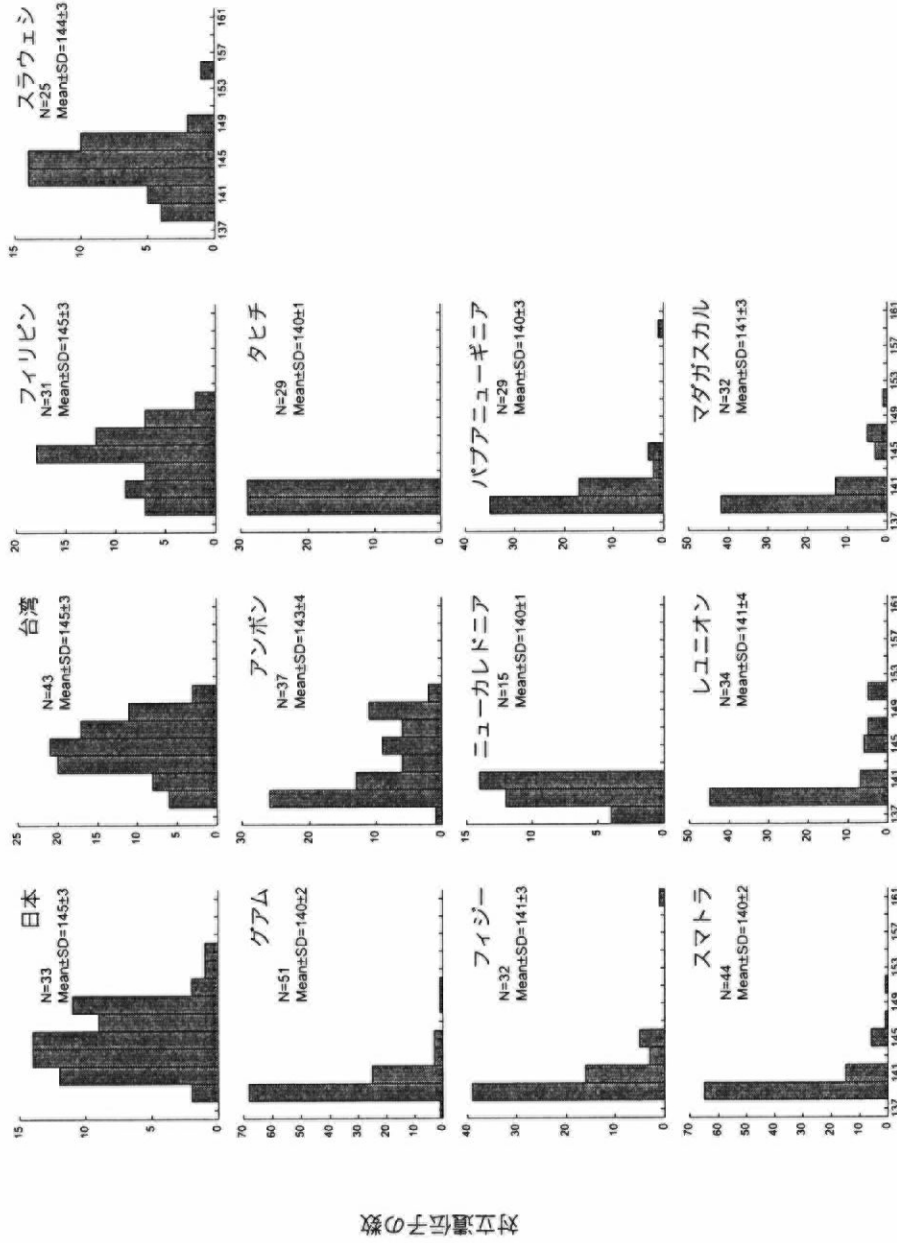
**, Brookfield (1996)



対立遺伝子のサイズ (塩基対)
図2-2 遺伝子座AJMS-3におけるA. marmorataの対立遺伝子の頻度分布

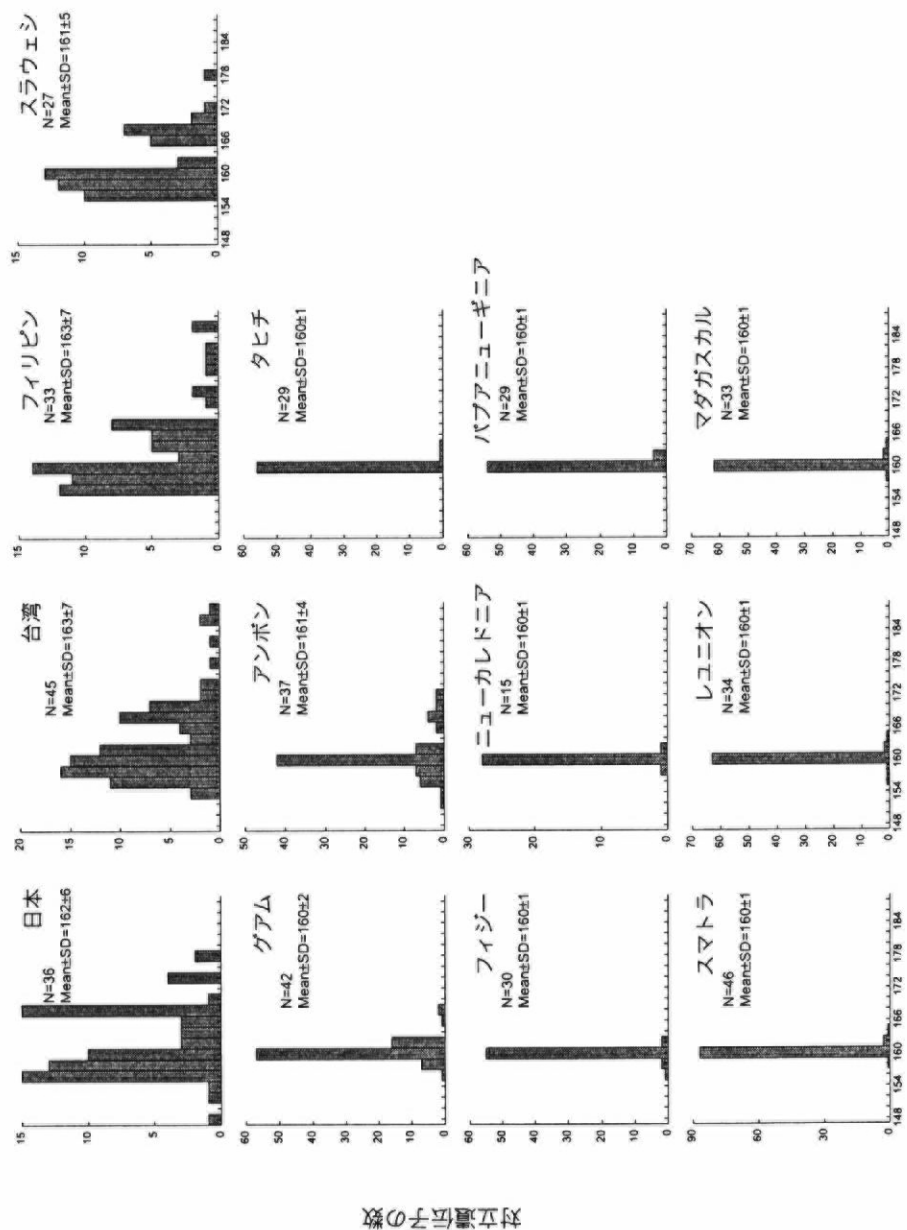


対立遺伝子のサイズ (塩基対)
 図2-3 遺伝子座AJMS-6におけるA. marmorataの対立遺伝子の頻度分布



対立遺伝子のサイズ (塩基対)

図2-4 遺伝子座AJMS-10におけるA. marmorataの対立遺伝子の頻度分布



対立遺伝子のサイズ (塩基対)
 図2-5 遺伝子座Aro054におけるA. marmorataの対立遺伝子の頻度分布

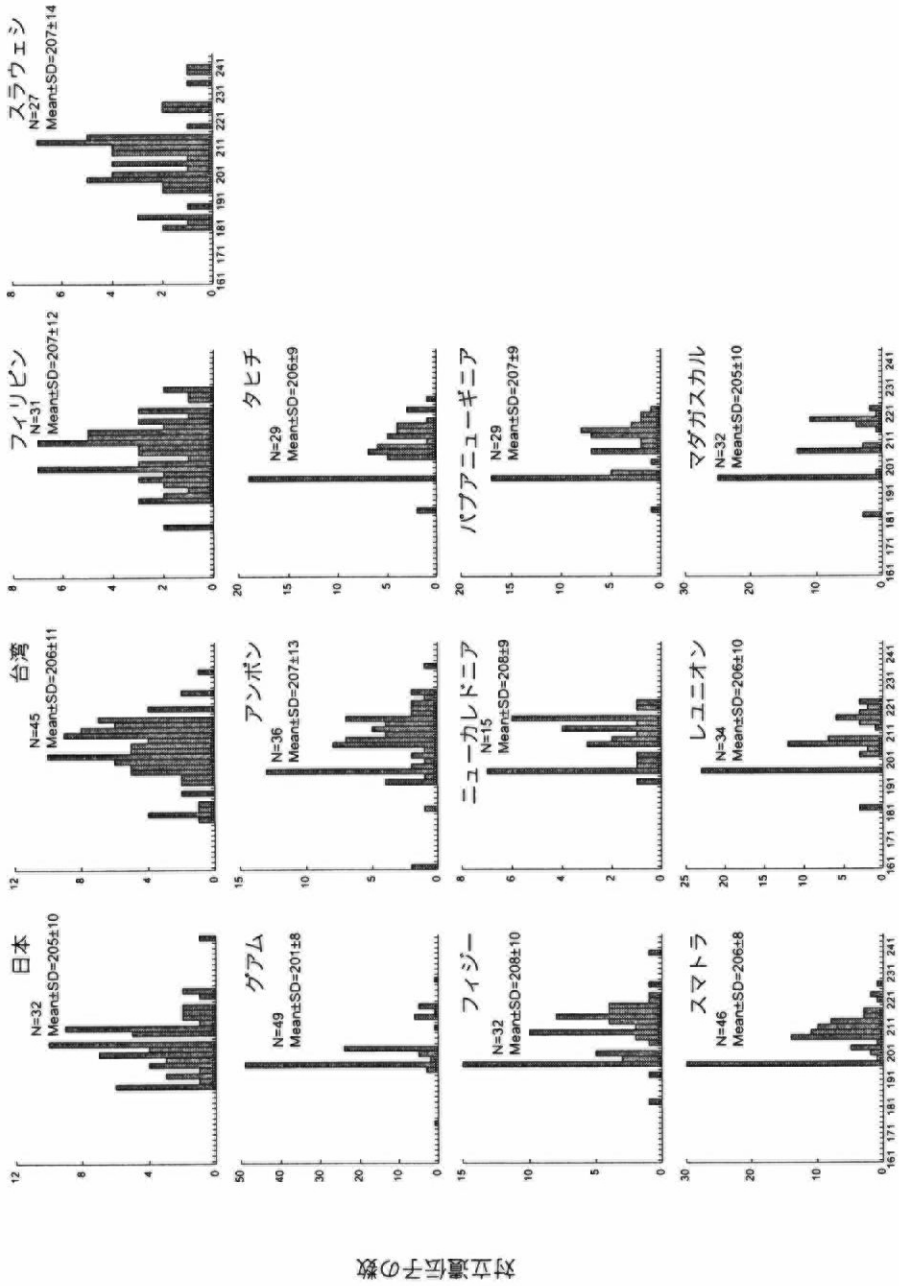


図2-6 遺伝子座Aro063におけるA. marmorataの対立遺伝子の頻度分布

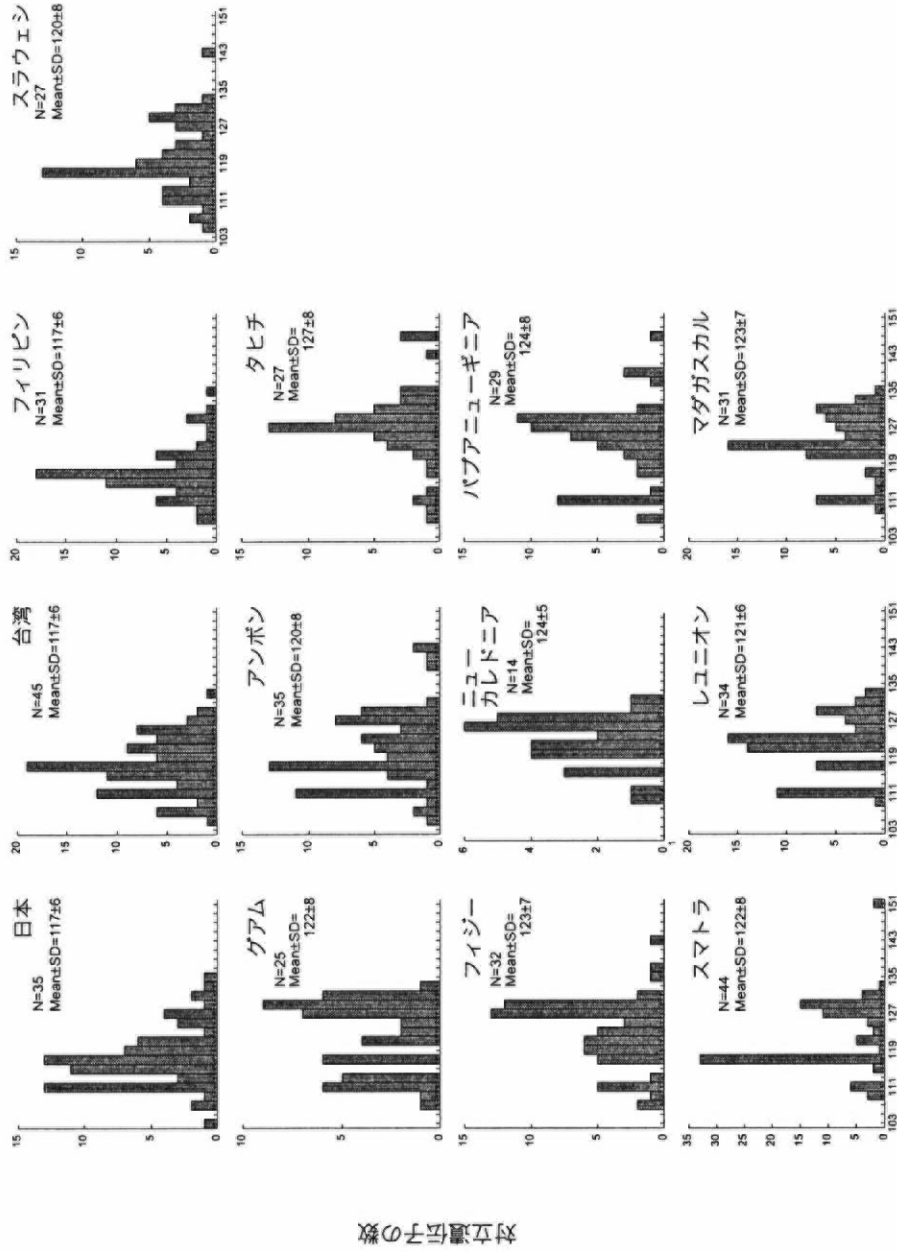
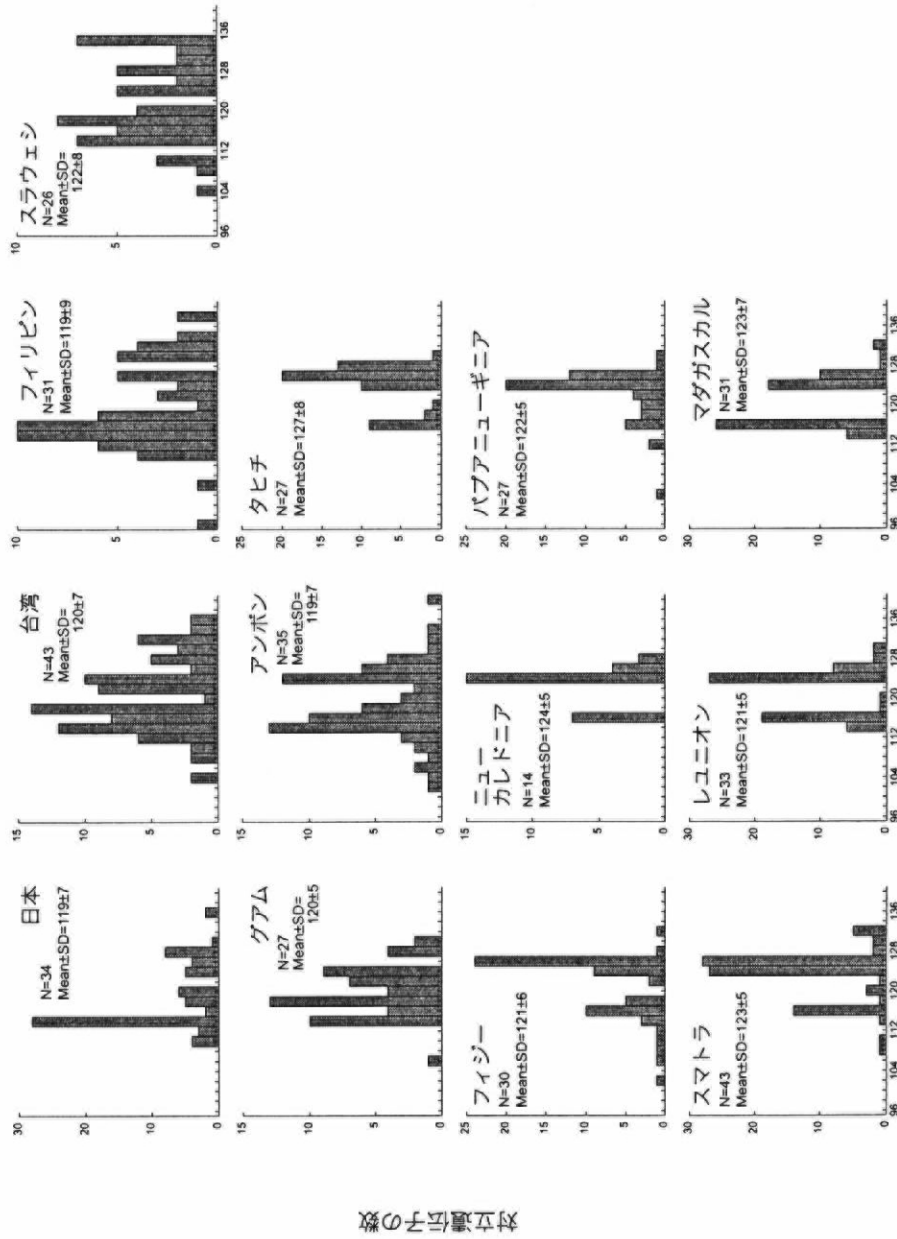


図2-7 遺伝子座Aro095におけるA. marmorataの対立遺伝子の頻度分布



対立遺伝子のサイズ (塩基対)

図2-8 遺伝子座Aro121におけるA. marmorataの対立遺伝子の頻度分布

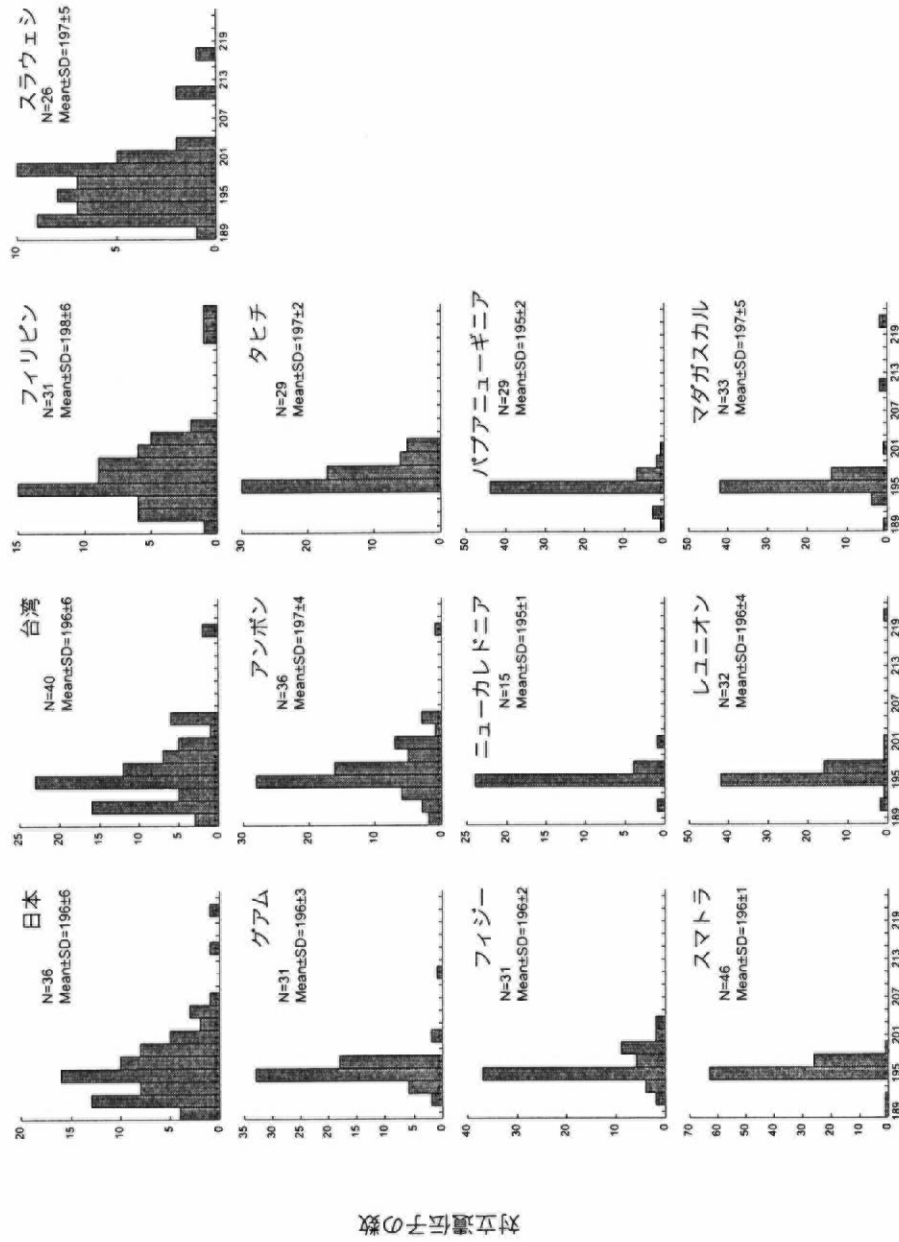
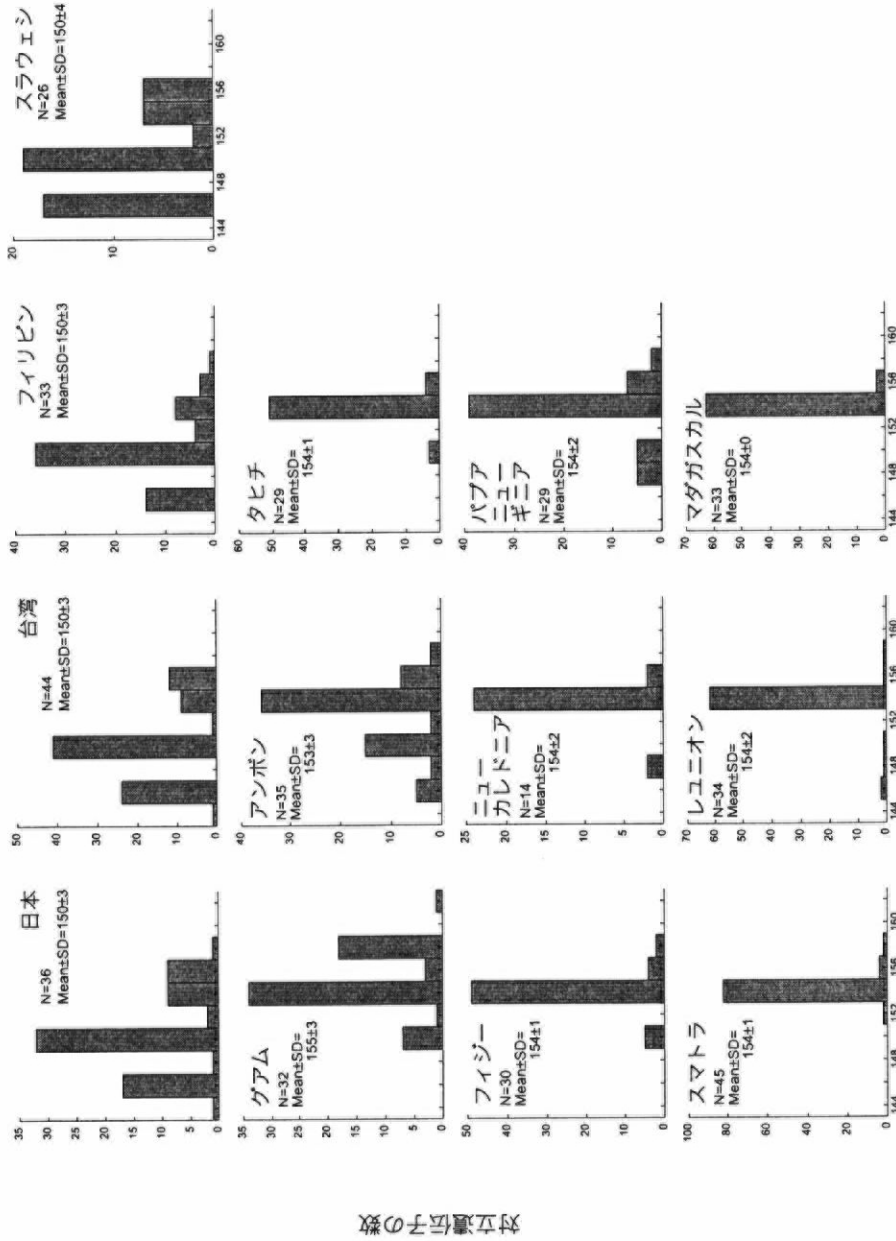


図2-9 遺伝子座AJTR-04におけるA. marmorataの対立遺伝子の頻度分布



対立遺伝子のサイズ (塩基対)
 図2-10 遺伝子座AJTR-12におけるA. marmorataの対立遺伝子の頻度分布

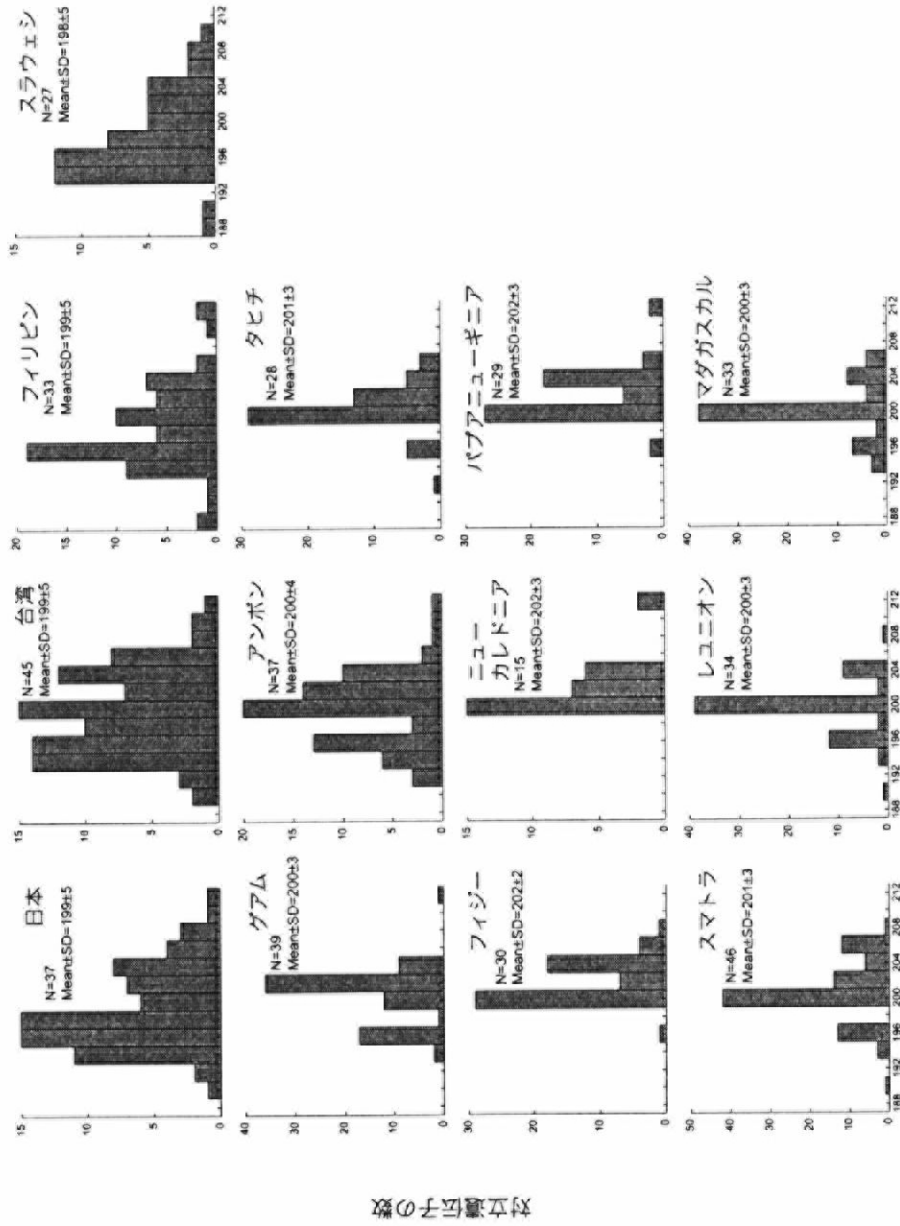


図2-11 遺伝子座AJTR-37におけるA. marmorataの対立遺伝子の頻度分布

表2-6 各地点における対立遺伝子数、サイズ、ヘテロ接合体、およびF_{IS}

AJMS-3												
	マダガスカル	レユニオン	スマトラ	スラウエシ	フィリピン	台湾	日本	グアム	アンボン	バブアニューギニア	ニューカレドニア	全体
Ni	33	34	46	26	32	45	35	31	36	29	15	29
Na	5	5	6	6	7	6	5	6	7	4	4	3
対立遺伝子サイズ	79-89	79-89	79-91	79-89	77-89	79-89	79-89	79-89	77-89	79-89	79-89	77-87
H _e (n.b.)	0.767	0.766	0.666	0.802	0.815	0.677	0.752	0.735	0.731	0.661	0.890	0.603
H _o	0.879	1.000	0.935	0.885	0.969	0.978	0.971	0.871	1.000	0.931	0.933	0.871
H _e /H _o	1.145	1.305	1.404	1.103	1.189	1.445	1.291	1.186	1.368	1.353	1.445	1.513
F _{IS}	-0.148*	-0.312*	-0.410*	-0.106*	-0.193*	-0.452*	-0.287*	-0.189	-0.375*	-0.418*	-0.371*	-0.456*
AJMS-6												
	マダガスカル	レユニオン	スマトラ	スラウエシ	フィリピン	台湾	日本	グアム	アンボン	バブアニューギニア	ニューカレドニア	全体
Ni	33	34	46	27	29	43	36	30	35	29	15	29
Na	5	6	10	10	14	12	12	12	11	8	9	5
対立遺伝子サイズ	91-105	91-105	89-111	91-113	89-121	91-113	91-119	91-105	91-113	91-119	91-119	91-117
H _e (n.b.)	0.715	0.664	0.744	0.823	0.866	0.830	0.846	0.743	0.840	0.779	0.795	0.769
H _o	0.727	0.677	0.870	0.926	0.862	0.744	0.722	0.700	0.886	0.897	0.933	0.839
H _e /H _o	1.018	1.019	1.169	1.126	0.996	0.896	0.854	0.942	1.054	1.152	1.173	1.091
F _{IS}	-0.018*	-0.019	-0.171	-0.128	0.004	0.105	0.148	0.059*	-0.055*	-0.155	-0.181	-0.092
AJMS-10												
	マダガスカル	レユニオン	スマトラ	スラウエシ	フィリピン	台湾	日本	グアム	アンボン	バブアニューギニア	ニューカレドニア	全体
Ni	32	34	44	25	31	43	33	51	37	29	15	32
Na	5	5	5	7	7	7	9	7	8	5	3	2
対立遺伝子サイズ	139-151	139-151	139-155	139-155	139-151	139-151	139-155	137-151	137-151	139-159	137-141	139-161
H _e (n.b.)	0.528	0.541	0.425	0.801	0.831	0.826	0.841	0.498	0.622	0.555	0.625	0.567
H _o	0.469	0.294	0.318	0.800	0.839	0.744	0.939	0.451	0.622	0.414	0.133	0.406
H _e /H _o	0.888	0.544	0.748	0.989	1.009	0.901	1.117	0.905	0.772	0.745	0.213	0.717
F _{IS}	0.113	0.460*	0.254*	0.001	-0.009	0.100	-0.119	0.096*	0.231*	0.258	0.793*	0.286*
Aro054												
	マダガスカル	レユニオン	スマトラ	スラウエシ	フィリピン	台湾	日本	グアム	アンボン	バブアニューギニア	ニューカレドニア	全体
Ni	33	34	46	27	33	45	36	42	37	29	15	30
Na	4	5	5	9	13	15	13	6	10	2	3	4
対立遺伝子サイズ	158-164	158-164	158-164	158-178	158-186	154-188	148-188	156-168	152-172	160-162	158-162	156-164
H _e (n.b.)	0.118	0.142	0.106	0.844	0.877	0.893	0.864	0.501	0.657	0.131	0.131	0.160
H _o	0.121	0.147	0.109	0.704	0.697	0.844	0.750	0.333	0.487	0.138	0.133	0.167
H _e /H _o	1.028	1.034	1.029	0.834	0.795	0.945	0.869	0.665	0.741	1.055	1.018	1.043
F _{IS}	-0.028	-0.034	-0.030	0.168*	0.207	0.055	0.133	0.338*	0.262*	-0.057	-0.018	-0.043
Aro063												
	マダガスカル	レユニオン	スマトラ	スラウエシ	フィリピン	台湾	日本	グアム	アンボン	バブアニューギニア	ニューカレドニア	全体
Ni	32	34	46	27	31	45	32	49	36	29	15	32
Na	10	12	14	21	22	21	18	11	21	13	13	17
対立遺伝子サイズ	183-223	183-223	197-227	181-241	179-231	179-235	189-245	175-229	161-237	185-223	193-223	183-239
H _e (n.b.)	0.779	0.837	0.840	0.949	0.953	0.945	0.926	0.686	0.928	0.865	0.894	0.895
H _o	0.813	0.882	0.848	0.815	0.710	0.689	0.594	0.816	0.806	0.862	0.867	0.875
H _e /H _o	1.043	1.055	1.010	0.859	0.745	0.729	0.641	1.189	0.988	0.997	0.969	0.977
F _{IS}	-0.044	-0.055	-0.010	0.144*	0.258*	0.273*	0.363*	-0.192	0.134*	0.004	0.052	0.023

Ni, number of individual 標本個体数
 Na, number of alleles 対立遺伝子数
 H_e, expected heterozygosity ヘテロ接合体 (期待値); n.b., non-biased (Nei 1978)
 H_o, observed heterozygosity ヘテロ接合体 (観察値)
 *, P < 0.05

表2-6 各地点における対立遺伝子数, サイズ, ヘテロ接合度, および F_{IS} (続き)

Aro095		マダガスカル	レユニオン	スマトラ	スラウエシ	フィリピン	台湾	日本	グアム	アンボン	パプアニューギニア	ニューカレドニア	フィジー	タヒチ	全体
Ni	31	34	27	31	31	45	35	25	35	29	14	14	32	27	409
Na	13	10	13	16	14	16	14	12	17	14	11	13	15	16	23
対立遺伝子サイズ	109-135	109-133	109-151	105-143	107-135	105-133	103-135	107-133	107-143	107-147	111-133	111-133	107-143	107-147	103-151
H_e (n.b.)	0.881	0.859	0.810	0.908	0.865	0.897	0.892	0.902	0.910	0.898	0.892	0.892	0.896	0.900	0.909
H_o	0.839	0.882	0.818	0.852	0.774	0.800	0.686	0.680	0.829	0.786	0.786	0.786	0.906	0.852	0.812
H_e/H_o	0.952	1.027	1.010	0.938	0.895	0.892	0.769	0.754	0.911	0.881	0.881	0.881	1.011	0.946	0.893
F_{IS}	0.049	-0.028	-0.010	0.063	0.106	0.109	0.234*	0.250*	0.090*	0.079	0.123*	0.123*	-0.011	0.055*	0.107*
Aro121		マダガスカル	レユニオン	スマトラ	スラウエシ	フィリピン	台湾	日本	グアム	アンボン	パプアニューギニア	ニューカレドニア	フィジー	タヒチ	全体
Ni	32	33	43	26	31	43	34	27	35	26	14	14	30	28	402
Na	7	8	12	13	15	16	11	9	18	10	4	4	13	7	21
対立遺伝子サイズ	114-132	114-130	108-132	104-134	96-138	104-136	110-136	106-130	102-140	102-130	116-128	116-128	102-132	116-130	96-140
H_e (n.b.)	0.733	0.736	0.772	0.916	0.916	0.914	0.799	0.861	0.903	0.790	0.648	0.648	0.790	0.773	0.878
H_o	0.188	0.152	0.442	0.385	0.323	0.395	0.294	0.407	0.400	0.654	0.214	0.214	0.567	0.393	0.373
H_e/H_o	0.256	0.206	0.573	0.420	0.352	0.433	0.368	0.473	0.443	0.828	0.331	0.331	0.717	0.508	0.425
F_{IS}	0.747*	0.797*	0.430*	0.585*	0.652*	0.570*	0.635*	0.532*	0.561*	0.175	0.678*	0.678*	0.287*	0.496*	0.575*
AJTR-04		マダガスカル	レユニオン	スマトラ	スラウエシ	フィリピン	台湾	日本	グアム	アンボン	パプアニューギニア	ニューカレドニア	フィジー	タヒチ	全体
Ni	33	32	46	26	31	40	36	31	36	29	15	15	31	29	415
Na	7	7	5	10	12	10	12	6	10	6	4	4	7	4	16
対立遺伝子サイズ	189-221	191-221	189-199	189-217	189-223	189-219	189-221	191-211	189-219	189-201	191-201	191-201	191-203	195-201	189-223
H_e (n.b.)	0.552	0.513	0.456	0.877	0.877	0.842	0.875	0.631	0.784	0.413	0.352	0.352	0.616	0.639	0.708
H_o	0.667	0.500	0.370	0.731	0.807	0.650	0.722	0.548	0.667	0.310	0.333	0.333	0.645	0.517	0.561
H_e/H_o	1.207	0.975	0.811	0.833	0.920	0.772	0.825	0.869	0.850	0.752	0.948	0.948	1.047	0.809	0.820
F_{IS}	-0.211	0.026	0.191	0.170	0.081	0.230*	0.177	0.133	0.152*	0.251	0.054	0.054	-0.048	0.194	0.180*
AJTR-12		マダガスカル	レユニオン	スマトラ	スラウエシ	フィリピン	台湾	日本	グアム	アンボン	パプアニューギニア	ニューカレドニア	フィジー	タヒチ	全体
Ni	33	34	45	26	33	44	36	32	35	29	14	14	30	29	420
Na	2	6	4	5	6	6	8	6	7	5	3	3	4	3	9
対立遺伝子サイズ	154-156	146-158	152-158	146-156	146-158	144-156	144-158	150-162	146-158	148-158	148-156	148-156	150-158	150-156	144-162
H_e (n.b.)	0.088	0.169	0.169	0.736	0.647	0.687	0.724	0.634	0.679	0.526	0.265	0.265	0.326	0.223	0.629
H_o	0.091	0.118	0.178	0.808	0.546	0.773	0.806	0.594	0.543	0.379	0.286	0.286	0.267	0.207	0.438
H_e/H_o	1.032	0.694	1.053	1.057	0.844	1.125	1.112	0.937	0.800	0.721	1.080	1.080	0.818	0.927	0.697
F_{IS}	-0.032	0.309	-0.054	-0.099	0.159	-0.126	-0.114	0.064*	0.202*	0.283*	-0.083	-0.083	0.185	0.074	0.303*
AJTR-37		マダガスカル	レユニオン	スマトラ	スラウエシ	フィリピン	台湾	日本	グアム	アンボン	パプアニューギニア	ニューカレドニア	フィジー	タヒチ	全体
Ni	33	34	46	27	33	45	37	39	37	29	15	15	30	28	433
Na	7	8	8	11	12	12	12	7	11	6	4	4	6	6	13
対立遺伝子サイズ	194-206	190-208	190-208	188-210	188-212	190-212	190-212	194-212	192-212	196-212	200-212	200-212	196-208	192-206	188-212
H_e (n.b.)	0.642	0.629	0.734	0.866	0.857	0.867	0.875	0.711	0.842	0.683	0.674	0.674	0.669	0.671	0.816
H_o	0.667	0.735	0.739	0.704	0.849	0.822	0.892	0.615	0.757	0.555	0.733	0.733	0.800	0.821	0.755
H_e/H_o	1.038	1.170	1.007	0.813	0.990	0.927	1.020	0.666	0.898	0.959	1.069	1.069	1.196	1.225	0.925
F_{IS}	-0.039	-0.173	-0.007	0.190	0.010	0.074	-0.020	0.136	0.103	0.041	-0.092	-0.092	-0.200	-0.230	0.075*

Ni, number of individual genotypes
 Na, number of alleles
 H_e , expected heterozygosity (Nei 1978)
 H_o , observed heterozygosity (Nei 1978)
 *, $P < 0.05$

表2-7 8マイクロサテライト遺伝子座によるA. marmorata の地点間の遺伝的分化程度

	日本	台湾	フィリピン	スラウエシ	タヒチ	フィジー	ニューカレドニア	バプアニューギニア	スマトラ	レユニオン	マダガスカル	アンボン	グアム
日本													
台湾	0.009												
フィリピン	-0.007	-0.003											
スラウエシ	-0.014	0.000	-0.022										
タヒチ	0.095**	0.088***	0.091**	0.053*									
フィジー	0.072**	0.083***	0.079**	0.048*	0.002								
ニューカレドニア	0.090**	0.108**	0.103**	0.059*	0.001	-0.022							
バプアニューギニア	0.100**	0.095***	0.102***	0.061*	-0.005	-0.025	-0.014						
スマトラ	0.120***	0.098***	0.113***	0.066**	-0.011	0.012	0.023	0.003					
レユニオン	0.074**	0.057**	0.062**	0.029	-0.003	0.026	0.039	0.016	-0.004				
マダガスカル	0.079**	0.069**	0.074**	0.036	-0.009	0.016	0.025	0.007	-0.004	-0.011			
アンボン	-0.005	0.020	-0.005	-0.007	0.019	0.007	0.011	0.021	0.030*	0.016	0.011		
グアム	0.157***	0.117***	0.167***	0.140***	0.118***	0.182***	0.221***	0.081**	0.108***	0.082**	0.076**	0.122***	

上段はF_{ST}, 下段はR_{ST}

*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001

台湾、フィリピン、スラウェシ)と、それ以外の9地点(タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、パプアニューギニア、スマトラ、レユニオン、マダガスカル、アンボン、グアム)のすべての組み合わせの地点間において、有意な差異が認められた($F_{ST}=0.037\sim 0.240$, $P<0.001$)。また、南太平洋の4地点(タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、パプアニューギニア)とインド洋の3地点(スマトラ、レユニオン、マダガスカル)のすべての組み合わせの地点間においても、有意な差異が認められた($F_{ST}=0.018\sim 0.059$, $P<0.05$)。一方、北太平洋内の4地点間では、いずれの組み合わせにおいても有意な差異は認められなかった($F_{ST}=-0.003\sim 0.002$, $P>0.05$)。南太平洋内の4地点間では、タヒチ-フィジー、タヒチ-パプアニューギニア、フィジー-ニューカレドニアの3つの組み合わせについてのみ、有意な差異が認められた($F_{ST}=0.020\sim 0.028$, $P<0.05$)。インド洋内の3地点では、スマトラ-マダガスカル間においてのみ有意な差異が認められた($F_{ST}=0.013$, $P<0.05$)。南太平洋内およびインド洋内に認められた地点間の分化程度は、北太平洋-南太平洋、北太平洋-インド洋、および南太平洋-インド洋の地点間の分化に比べて小さいものであった。アンボンおよびグアムの2地点は、それぞれ他の12地点のいずれの組み合わせにおいても、有意な差異が認められた(アンボン, $F_{ST}=0.037\sim 0.071$, $P<0.001$; グアム, $F_{ST}=0.048\sim 0.173$, $P<0.001$) (図2-12)。

一方、 R_{ST} では、北太平洋の4地点は、南太平洋の4地点とのすべての組み合わせの地点間において有意な差異が認められた($R_{ST}=0.048\sim 0.108$, $P<0.05$) (表2-7)。また、北太平洋の4地点は、インド洋の3地点との間でも、スラウェシ-レユニオン、スラウェシ-マダガスカル間を除くすべての組み合わせにおいて有意な差異が認められた($R_{ST}=0.057\sim 0.120$, $P<0.01$)。これに対し、南太平洋の4地点とインド洋の3地点の間では、すべての組み合わせにおいて、有意な差異が認められなかった($R_{ST}=-0.025\sim 0.039$, $P>0.05$)。北太平洋内の4地点間、南太平洋内の4地点間、およびインド洋内の3地点間では、いずれの組み合わせにおいても、有意な差異は認められなかった($R_{ST}=-0.011\sim 0.009$, $P>0.05$)。アンボンは、スマトラとの間のみ有意な差異が認められたが($R_{ST}=0.030$, $P<0.05$)、その他の11地点との間には有意な差異は認められなかった($R_{ST}=-0.007\sim 0.021$, $P>0.05$)。これに対し、グアムは他の12地点とのいずれの地点間においても有意な差異が認められた($R_{ST}=0.076\sim 0.221$, $P<0.01$)。グアムと他の地点間の分化程度は、北太平洋-南太平洋、北太平洋-インド洋、および南太平洋-インド洋の地点間で認められた分化程度よりも大きなものであった。

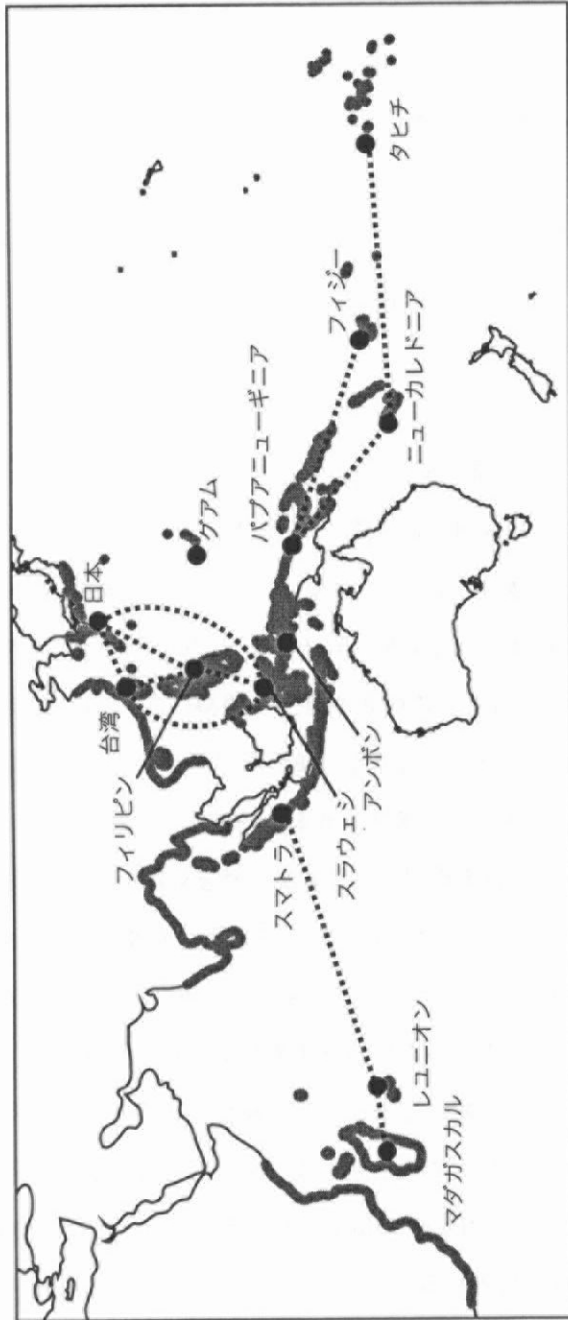


図2-12 マイクロサテライトDNAによる*A. marmorata*の集団構造。太線は、*A. marmorata*の分布域を、黒丸は標本採集地点をそれぞれ表す。破線は、その地点間において遺伝的交流があることを示す。

Assignment test

各個体の遺伝子型に基づいて、ベイズ法によるクラスタリングを行った結果、 K （クラスタの数）が大きくなるほど、全体の尤度は高くなった（ $K=1\sim 14$, 対数尤度 $=-13158.7\sim -10450.8$ ）（表 2-8）。 ΔK は、 $K=2$ のとき最大で（ $\Delta K=19627.5$ ）（表 2-8）、各地点の 86.5~100 %の個体がいずれかのクラスタに割り振られた（表 2-9）。このとき、一方のクラスタは、北太平洋の日本、台湾、フィリピン、スラウェシの 4 地点の標本から成っていた。他方のクラスタには、南太平洋の 4 地点（タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、パプアニューギニア）とインド洋の 3 地点（スマトラ、レユニオン、マダガスカル）、およびグアムの標本が含まれた。アンボンの標本は、これらの 2 つのクラスタに均等に割り振られた（表 2-9）。

AMOVA

F_{ST} により有意な差異が検出されなかった地点を同一集団として、13 地点を以下の 5 つの集団に分けて locus-by-locus AMOVA を行い、集団間、および地点間の階層的な集団構造を調べた；北太平洋（日本、台湾、フィリピン、スラウェシ）、南太平洋（タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、パプアニューギニア）、インド洋（スマトラ、レユニオン、マダガスカル）、アンボン、グアム（表 2-10A）。その結果、上記の 5 つの集団間の変異は、全体の変異量の 11.9 % を占めており、これら 5 つの集団は遺伝的に有意に異なっていた（ $F_{CT}=0.119$, $P<0.001$ ）。また、Assignment test において、標本全体が遺伝的に異なる 2 つのグループに由来する個体から成ることが示唆されたアンボンを除いて 4 集団で解析を行った場合、集団間の変異の割合は、全体の変異量の 13.7 % であり、遺伝的に有意に異なっていた（ $F_{CT}=0.137$, $P<0.001$ ）（表 2-10B）。これらの解析では、集団内でさらに分化している徴候が見られた（いずれも $F_{SC}=0.008$, $P<0.001$ ）。さらに詳細な集団構造を検討するため、アンボンと、他集団との分化が明瞭と考えられる北太平洋（日本、台湾、フィリピン、スラウェシ）を除いて、3 集団で解析を行った。その結果、全体の変異量に対して、南太平洋、インド洋およびグアムの 3 つの集団間の変異が占める割合は 3.9 % と小さかったものの、有意に異なっていた（ $F_{CT}=0.039$, $P<0.001$ ）（表 2-10C）。また、集団の内部でさらに分化している徴候が認められた（ $F_{SC}=0.017$, $P<0.05$ ）。

集団の有効な大きさ N_e と有効移住個体数 N_m の推定

N_e は、1.71（ニューカレドニア）~6.54（スラウェシ） $\times 10^4$ であった（表 2-11）。北太平洋内の 4 地点は 5.23（台湾）~6.54（スラウェシ） $\times 10^4$ であったのに対し、南太平洋および

表2-8 ベイズ法によるAssignment testにおけるクラスターの数とそのときの対数尤度、および ΔK

クラスターの数	尤度			SD	L (K)	L'(K)	L''(K)	ΔK
	1回目	2回目	3回目					
1	-13158.7	-13158.7	-13158.6	0.058	-13158.7	-	-	-
2	-11825.1	-11825.2	-11825.1	0.058	-11825.1	1333.5	1133.2	19627.5
3	-11624.9	-11624.9	-11624.6	0.173	-11624.8	200.3	14.6	84.3
4	-11436.7	-11443.6	-11436.8	3.955	-11439.0	185.8	3.7	0.9
5	-11256.8	-11257.0	-11257.0	0.115	-11256.9	182.1	54	467.7
6	-11135.3	-11125.6	-11125.7	5.572	-11128.9	128.1	28.6	5.1
7	-11029.1	-11029.9	-11029.3	0.416	-11029.4	99.4	24.3	58.4
8	-10906.0	-10906.0	-10905.0	0.577	-10905.7	123.8	32	55.4
9	-10814.5	-10812.8	-10814.5	0.981	-10813.9	91.7	11.3	11.5
10	-10730.4	-10699.4	-10702.8	17.002	-10710.9	103.1	25.7	1.5
11	-10628.0	-10629.9	-10642.6	7.938	-10633.5	77.4	24.4	3.1
12	-10580.3	-10581.6	-10579.7	0.971	-10580.5	53.0	18.5	19.0
13	-10518.1	-10488.0	-10521.0	18.273	-10509.0	71.5	15.5	0.8
14	-10456.0	-10450.8	-10452.4	2.663	-10453.1	56.0	-	-

表2-9 ベイズ法によるAssignment test (K =2)

地点 (個体数)	クラスター		どのクラスターにも割り 振られなかった個体数	いずれかのクラスターに割り 振られた個体の割合* (%)
	I	II		
日本 (37)	0.943 (32)	0.057 (0)	5	86.5
台湾 (45)	0.96 (40)	0.04 (0)	5	88.9
フィリピン (33)	0.969 (32)	0.031 (0)	1	97.0
スラウェシ (27)	0.985 (26)	0.015 (0)	1	96.3
タヒチ (29)	0.012 (0)	0.988 (28)	1	96.6
フィジー (32)	0.084 (1)	0.916 (28)	3	90.6
ニューカレドニア (15)	0.003 (0)	0.997 (15)	0	100.0
パプアニューギニア (29)	0.033 (0)	0.967 (28)	1	96.6
スマトラ (46)	0.036 (1)	0.964 (44)	1	97.8
レユニオン (34)	0.077 (1)	0.923 (30)	3	91.2
マダガスカル (33)	0.025 (0)	0.975 (32)	1	97.0
アンボン (37)	0.519 (17)	0.481 (17)	3	91.9
グアム (51)	0.098 (3)	0.902 (46)	2	96.1

*, $q > 0.80$ の個体数の割合

表2-10 8マイクロサテライト遺伝子座によるA. marmorata の階層的集団構造解析

(A) 5集団；北太平洋（日本、台湾、フィリピン、スラウェシ）、南太平洋（タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、バブアニューギニア）、インド洋（スマトラ、レユニオン、マダガスカル）、アンボン、グアム

	自由度	平方和	分散成分	変異の割合 (%)	固定指数
集団間	4	257.5	0.37	11.9	0.119 (F_{CT})*
集団内の地点間	8	32.8	0.02	0.7	0.008 (F_{SC})*
地点間	885	2291.8	2.74	87.4	0.126 (F_{ST})*

*, $P < 0.001$

(B) 4集団；北太平洋（日本、台湾、フィリピン、スラウェシ）、南太平洋（タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、バブアニューギニア）、インド洋（スマトラ、レユニオン、マダガスカル）、グアム

	自由度	平方和	分散成分	変異の割合 (%)	固定指数
集団間	3	254.2	0.43	13.7	0.137 (F_{CT})*
集団内の地点間	8	32.8	0.02	0.7	0.008 (F_{SC})*
地点間	812	2061.9	2.69	85.6	0.144 (F_{ST})*

*, $P < 0.001$

(C) 3集団；南太平洋（タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、バブアニューギニア）、インド洋（スマトラ、レユニオン、マダガスカル）、グアム

	自由度	平方和	分散成分	変異の割合 (%)	固定指数
集団間	2	39.3	0.09	3.9	0.039 (F_{CT})*
集団内の地点間	5	23.4	0.04	1.6	0.017 (F_{SC})*
地点間	530	1141.4	2.30	94.5	0.055 (F_{ST})*

*, $P < 0.001$

表2-11 マイクロサテライト遺伝子座から算出した集団の有効な大きさ N_e

地点	ヘテロ接合度	集団サイズ N_e ($\times 10^4$)
日本	0.778	5.83
台湾	0.758	5.23
フィリピン	0.760	5.29
スラウェシ	0.797	6.54
タヒチ	0.507	1.71
フィジー	0.613	2.64
ニューカレドニア	0.526	1.85
パプアニューギニア	0.560	2.12
スマトラ	0.537	1.93
レユニオン	0.529	1.87
マダガスカル	0.549	2.03
アンボン	0.700	3.89
グアム	0.588	2.38

インド洋の7地点では1.71（ニューカレドニア）~2.64（フィジー） $\times 10^4$ で、北太平洋の地点の半分以下であった。グアムの N_e は 2.38×10^4 で、南太平洋およびインド洋の地点と同程度であった。アンボンの N_e は 3.89×10^4 で、北太平洋の4地点とそれ以外の8地点の値の中間的な値を示した（表2-11）。

N_m は、0.8~ ∞ であった（表2-12）。北太平洋内、南太平洋内、インド洋内の各地点間では、 N_m は8.7~ ∞ であったのに対し、北太平洋の4地点と、南太平洋およびインド洋の7地点間では0.8~1.3であった。また、南太平洋の4地点とインド洋の3地点間では4.0~13.5であった。アンボンと他の12地点間の N_m は3.3~6.5、グアムと他の12地点間の N_m は1.2~4.9であった（表2-12）。

第2項 ミトコンドリア DNA の地理的変異

調節領域の変異性

mtDNAの調節領域の塩基配列を決定した計290個体から、計1,067サイトの配列を得た。得られた塩基配列中に合計で507サイトに変異が認められた。変異の内訳は、転位が392サイト、転換が77サイト、挿入・欠失が136サイトで、変異の大部分は転位で占められていた（表2-13）。これらの変異によって、290個体の塩基配列は267のハプロタイプに分けられ、92.1%の個体がそれぞれ異なる配列を持っていた。

塩基置換の飽和の程度を確認するため、縦軸に転位サイト数を、横軸に遺伝距離および転換サイト数をそれぞれとり、その相関の程度を調べた。その結果、転位サイト数も転換サイト数も、どちらも概ね遺伝距離に比例していた（図2-13A）。また、転位サイト数は、転換サイト数に対して比例している傾向が認められた（図2-13B）。以上より、塩基置換が明らかに飽和に達している傾向は見られなかった。

得られた塩基配列の変異が自然選択に対して中立であるかどうかをNeutrality testによって検証した結果、すべての変異が中立であることが示された（Tajima's $D = -1.130$, $P > 0.05$ ）。

地理的な遺伝的変異性

ハプロタイプは、日本（茨城）と台湾、日本（口永良部）と台湾、タヒチとフィジー、タヒチとニューカレドニア、フィジーとニューカレドニア、レユニオンとマダガスカルの計6つの地点間において共有されているものが認められた。このうち、タヒチとフィジーは3つのハプ

表2-12 8マイクロサテライト遺伝子座から算出した地点間の有効移住個体数Nm

	日本	台湾	フィリピン	スラウエシ	タヒチ	フィジー	ニューカレドニア	バブアニューギニア	スマトラ	レユニオン	マダガスカル	アンボン
台湾	160.0											
フィリピン	237.8	∞										
スラウエシ	∞	∞	∞									
タヒチ	0.9	1.0	1.0	0.9								
フィジー	1.0	1.3	1.3	1.2	8.7							
ニューカレドニア	1.1	1.3	1.3	1.2	∞	12.0						
バブアニューギニア	0.9	1.1	1.2	1.0	12.4	∞	18.6					
スマトラ	0.8	1.0	1.0	0.9	7.5	13.2	4.7	12.5				
レユニオン	0.8	1.0	1.1	1.0	4.9	10.6	4.0	10.5	28.6			
マダガスカル	0.8	1.0	1.0	0.9	6.9	10.6	4.8	13.5	19.6	∞		
アンボン	4.0	5.3	6.5	4.8	3.4	5.5	5.0	4.2	3.7	3.6	3.3	
グアム	1.2	1.4	1.5	1.2	2.1	2.4	2.0	2.5	3.0	2.1	2.0	4.9

表2-13 A. marmorata の調節領域の塩基配列に見られた変異性

地点	個体数	長さ (塩基対)	多型数	変異サイト数	転位 (Ts)	転換 (Tv)	挿入・欠失	塩基多様度 (π)
日本	13	1017-1021	13	115	99	3	14	0.0268
台湾	41	1011-1022	41	231	187	10	40	0.0341
フィリピン	12	1014-1021	12	121	102	7	15	0.0291
スラウェシ	14	1018-1022	14	129	111	6	13	0.0322
タヒチ	27	1016-1036	19	141	99	18	28	0.0245
フィジー	23	1019-1028	23	147	123	8	18	0.0258
ニューカレドニア	11	1017-1027	11	103	84	6	18	0.0283
バブアニューギニア	15	1005-1028	15	164	115	18	43	0.0347
スマトラ	36	1018-1019	36	121	106	8	8	0.0147
レユニオン	24	1004-1020	24	134	109	8	26	0.0293
マダガスカル	28	1004-1020	25	126	94	9	36	0.0251
アンボン	37	1004-1027	36	286	230	28	58	0.0504
グアム	9	1017-1027	7	105	78	7	20	0.0317
全体	290	1004-1036	267	507	392	77	136	0.0469

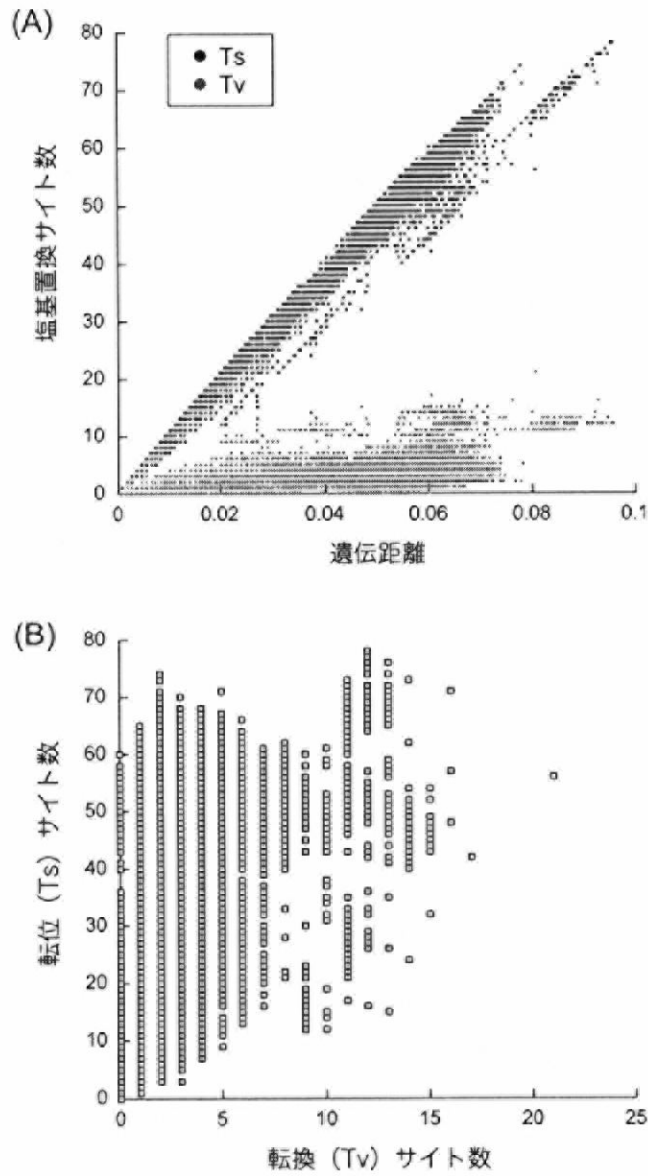


図2-13 mtDNAの調節領域における (A) 遺伝距離 (HKYモデル; Hasegawa et al. 1985) に対する塩基置換サイト数、および (B) 転換 (Tv) サイト数に対する転位 (Ts) サイト数。

ロタイプを共有しており、他の5地点間では1つずつハプロタイプを共有していた。

ハプロタイプ間の遺伝距離に基づいて、近隣結合法により遺伝子系統樹を構築したところ、図2-14に示す系統樹を得た。台湾の2つのハプロタイプを除いて、北太平洋の4地点（日本、台湾、フィリピン、スラウェシ）から得られたハプロタイプは、明瞭にひとつの枝にまとまった。また、南太平洋（タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、パプアニューギニア）、インド洋西部（レユニオン、マダガスカル）、インド洋東部（スマトラ）は、ある程度のまとまりが見られたが、いずれも明瞭ではなかった。南太平洋の4つのハプロタイプとインド洋西部の6つのハプロタイプは、インド洋東部のハプロタイプからなる枝に含まれた。また、グアムは、1つのハプロタイプを除いて、すべてのハプロタイプが南太平洋と同じ枝に含まれた。さらに、アンボンの標本から得られた36のハプロタイプ（図2-14中、黒丸）は、そのみでまとまる傾向は見られず、3はインド洋、18は北太平洋、15は南太平洋のハプロタイプがまとまる枝にそれぞれ含まれた。

地点間の遺伝的分化程度の指標となる F_{ST} は -0.032~0.698 であった（表2-14）。北太平洋の4地点（日本、台湾、フィリピン、スラウェシ）は、それ以外の9地点（タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、パプアニューギニア、スマトラ、レユニオン、マダガスカル、アンボン、グアム）とのすべての組み合わせにおいて有意な差異が認められた（ $F_{ST}=0.172\sim0.698$, $P<0.001$ ）。また、南太平洋の4地点（タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、パプアニューギニア）はインド洋の3地点（スマトラ、レユニオン、マダガスカル）とのすべての組み合わせにおいて、有意な差異が認められた（ $F_{ST}=0.131\sim0.503$, $P<0.001$ ）。一方、北太平洋内の4地点間では、いずれの組み合わせにおいても、有意な差異は認められなかった（ $F_{ST}=-0.023\sim0.008$, $P>0.05$ ）。南太平洋内の4地点間では、タヒチ-ニューカレドニア、タヒチ-パプアニューギニア、フィジー-パプアニューギニアの3つの組み合わせの地点間において、有意な差異が認められた（ $F_{ST}=0.053\sim0.132$, $P<0.05$ ）。インド洋内の3地点では、スマトラ-レユニオンおよびスマトラ-マダガスカル間において有意な差異が認められた（ $F_{ST}=0.563\sim0.592$, $P<0.001$ ）。南太平洋内の地点間において認められた分化程度は、北太平洋-南太平洋、北太平洋-インド洋、および南太平洋-インド洋の地点間の分化程度に比べて小さいものであった。これに対し、インド洋内（インド洋の東西）の分化程度は、北太平洋-南太平洋、および南太平洋-インド洋間の分化程度と同程度であった。アンボン、およびグアムの2地点は、他のいずれの地点との組み合わせにおいても、それぞれ有意な差異が認められた（アンボン, $F_{ST}=0.108\sim0.315$, $P<0.01$; グアム, $F_{ST}=0.175\sim0.522$, $P<0.001$ ）。これらの分化程度は、北太平洋内、南太平洋内および

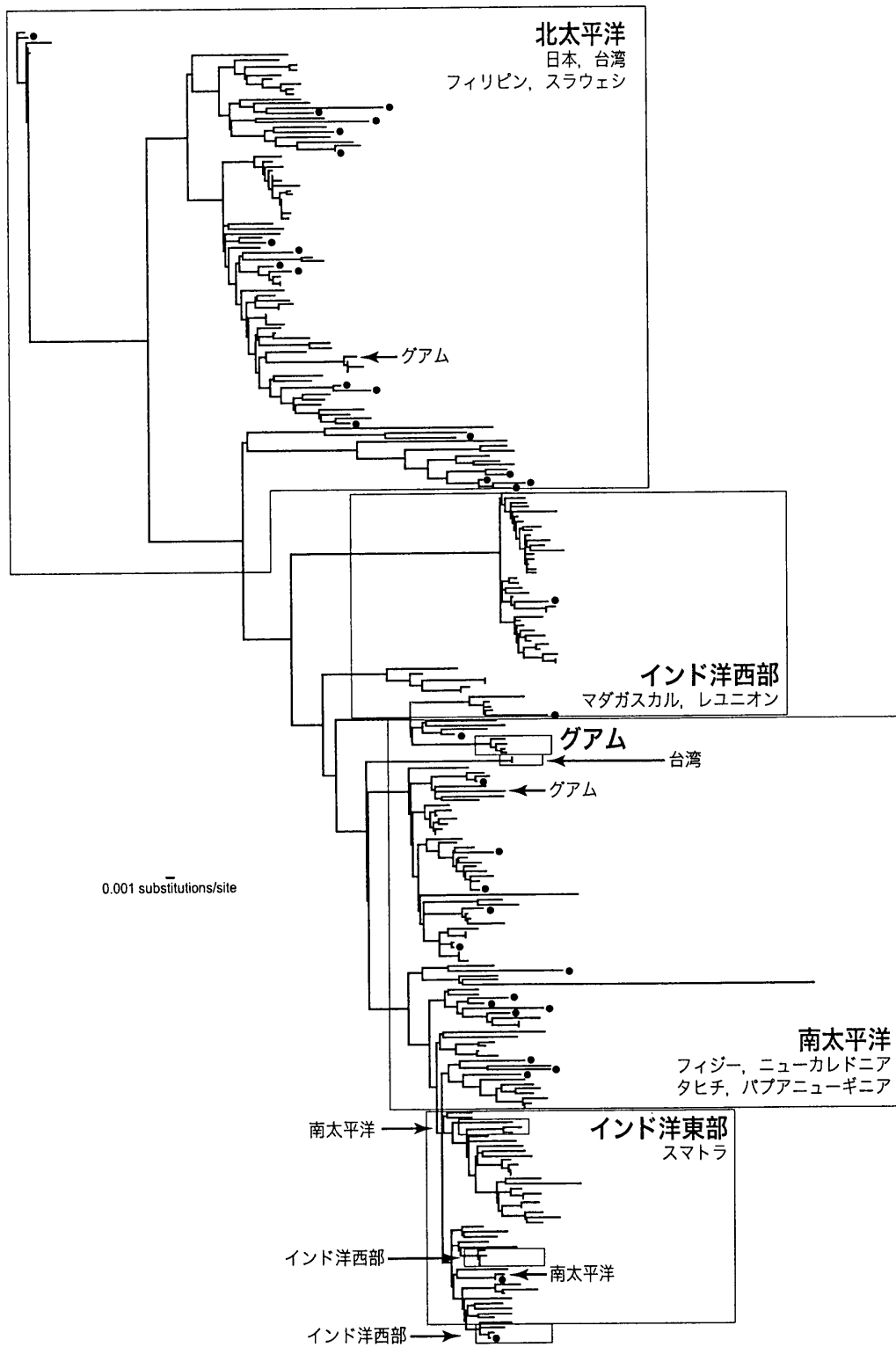


図2-14 調節領域の遺伝距離 (HKYモデル; Hasegawa et al. 1985) に基づく近隣結合樹. 黒丸はアンボンの個体を示す.

表2-14 調節領域によるA. marmorata の地点間の遺伝的分化程度 F_{ST}

	日本	台湾	フィリピン	スラウエシ	タヒチ	フィジー	ニューカレドニア	バブアニューギニア	スマトラ	レユニオン	マダガスカル	アンボン
台湾	-0.005											
フィリピン	-0.023	-0.003										
スラウエシ	0.002	-0.001	0.008									
タヒチ	0.585***	0.511***	0.587***	0.568***								
フィジー	0.572***	0.501***	0.575***	0.555***	0.001							
ニューカレドニア	0.547***	0.471***	0.546***	0.522***	0.079*	0.016						
バブアニューギニア	0.515***	0.463***	0.517***	0.500***	0.132***	0.053*	-0.032					
スマトラ	0.691***	0.589***	0.698***	0.676***	0.376***	0.288***	0.176***	0.131***				
レユニオン	0.552***	0.501***	0.556***	0.541***	0.456***	0.438***	0.415***	0.397***	0.563***			
マダガスカル	0.595***	0.537***	0.602***	0.586***	0.503***	0.482***	0.466***	0.442***	0.592***	-0.012		
アンボン	0.188***	0.172***	0.196***	0.182***	0.191***	0.161***	0.108**	0.113***	0.252***	0.273***	0.315***	
グアム	0.514***	0.447***	0.504***	0.484***	0.361***	0.335***	0.285**	0.253***	0.522***	0.417***	0.476***	0.175***

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$

インド洋内の地点間で認められた分化よりも十分大きかった (図 2-15).

AMOVA

F_{ST} により有意な差異が検出されなかった地点を同一集団としてまとめ、13 地点を以下の 6 つの集団に分けて locus-by-locus AMOVA を行い、集団間、および地点間の階層的な集団構造を調べた；北太平洋 (日本, 台湾, フィリピン, スラウェシ), 南太平洋 (タヒチ, フィジー, ニューカレドニア, パプアニューギニア), インド洋東部 (スマトラ), インド洋西部 (レユニオン, マダガスカル), アンボン, グラム (表 2-15A). その結果, これら 6 つの集団間の変異は全体の変異量の 42.6 % を占めており, これらの集団は有意に異なっていた ($F_{CT}=0.426$, $P<0.001$). また, 遺伝子系統樹 (図 2-14) において, 地理的なまとまりが認められなかったアンボンを除く 5 つの集団で解析を行った. この場合にも, 集団間の変異の割合は, 全体の変異量の 49.7 % を占め, 5 つの集団は遺伝的に有意に異なっていた ($F_{CT}=0.497$, $P<0.001$) (表 2-15B). これらの解析では, いずれも集団内でさらに分化している徴候が認められた (それぞれ $F_{SC}=0.014$, 0.022 , $P<0.001$). さらに, 遺伝子系統樹 (図 2-14) において分化が明瞭でなかった南太平洋およびインド洋の集団構造を検討するため, アンボンと北太平洋 (日本, 台湾, フィリピン, スラウェシ) を除いて 4 つの集団で解析を行った. その結果, 集団間の変異の割合は全体の変異量に対して 40.6 % を占め, 遺伝的に有意に異なっていた ($F_{CT}=0.406$, $P<0.001$) (表 2-15C). このとき, 集団内においてさらに遺伝的に分化していることが示された ($F_{SC}=0.038$, $P<0.05$).

集団の有効な大きさ N_e と有効移住個体数 N_m の推定

N_e は, 0.90 (スマトラ) ~ 3.07 (アンボン) $\times 10^5$ であった (表 2-16). スマトラでやや小さく, アンボンでやや大きい以外は, すべての地点が $1.5\sim 2.0 \times 10^5$ 程度の値を示し, 地点間で大きな差異は認められなかった.

N_m は $0.1\sim\infty$ であり, 地点間の組み合わせによって様々な値を示した (表 2-17). 北太平洋の 4 地点と南太平洋およびインド洋の 7 地点の間では $0.1\sim 0.3$, 南太平洋の 4 地点とインド洋の 3 地点の間では $0.2\sim 1.7$ であり, 非常に小さかった. 北太平洋内の 4 地点間では N_m は $30.3\sim\infty$ であった. 南太平洋内の 4 地点のうち, F_{ST} において有意差が認められたタヒチ-ニューカレドニア, タヒチ-パプアニューギニア, フィジー-パプアニューギニア間では $1.6\sim 4.5$ であったが, それ以外の組み合わせでは $15.6\sim\infty$ であった. インド洋内の 3 地点では, レユニオン-マ

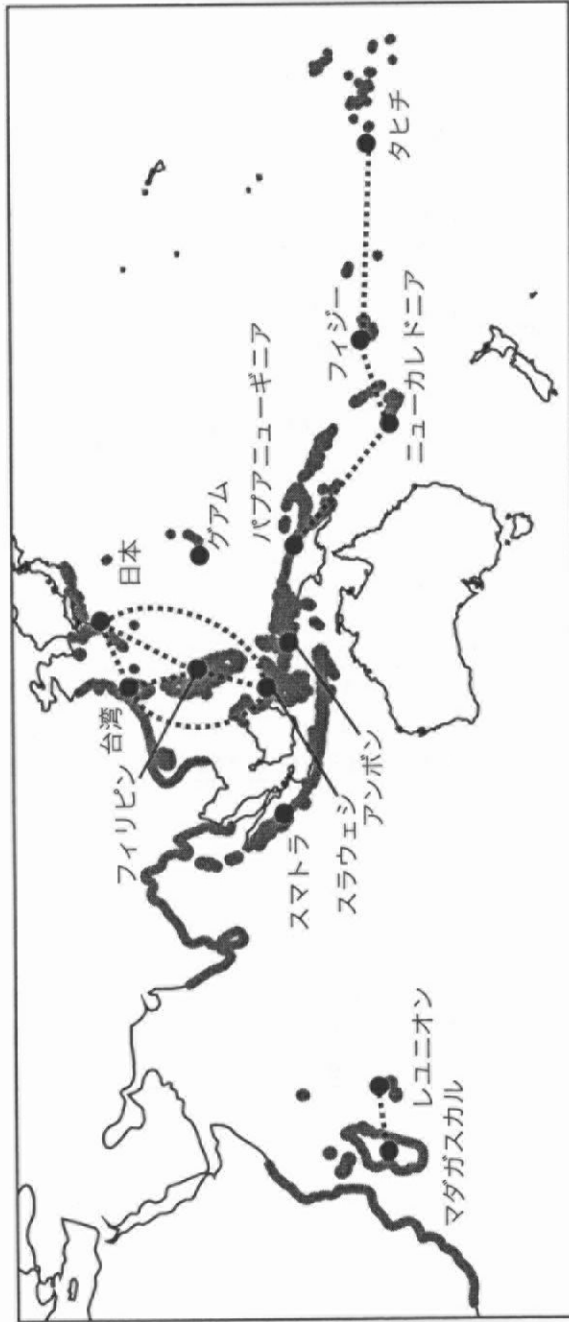


図2-15 調節領域の F_{ST} によるA. marmorataの集団構造。太線はA. marmorataの分布域を、黒丸は標本採集地点をそれぞれ表す。破線は、その地点間において遺伝的交流があることを示す。

表2-15 調節領域によるA. marmorata の階層的集団構造解析

(A) 6集団；北太平洋（日本、台湾、フィリピン、スラウェシ）、南太平洋（タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、バプアニューギニア）、インド洋東部（スマトラ）、インド洋西部（レユニオン、マダガスカル）、アンボン、グアム

	自由度	平方和	分散成分	変異の割合 (%)	固定指数
集団間	5	2784.4	11.7	42.6	0.426 (F_{ct})*
集団内の地点間	7	138.9	0.2	0.8	0.014 (F_{sc})*
地点間	277	4305.4	15.5	56.6	0.434 (F_{st})*

*, $P < 0.001$

(B) 5集団；北太平洋（日本、台湾、フィリピン、スラウェシ）、南太平洋（タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、バプアニューギニア）、インド洋東部（スマトラ）、インド洋西部（レユニオン、マダガスカル）、グアム

	自由度	平方和	分散成分	変異の割合 (%)	固定指数
集団間	4	2737.6	14.1	49.7	0.497 (F_{ct})*
集団内の地点間	7	138.9	0.3	1.1	0.022 (F_{sc})*
地点間	241	3359.1	13.9	49.3	0.508 (F_{st})*

*, $P < 0.001$

(C) 4集団；南太平洋（タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、バプアニューギニア）、インド洋東部（スマトラ）、インド洋西部（レユニオン、マダガスカル）、グアム

	自由度	平方和	分散成分	変異の割合 (%)	固定指数
集団間	3	1128.4	9.1	40.6	0.406 (F_{ct})*
集団内の地点間	4	92.0	0.5	2.3	0.038 (F_{sc})*
地点間	165	2109.7	12.8	57.1	0.429 (F_{st})*

*, $P < 0.001$

表2-16 調節領域から算出した集団の有効な大きさ N_e

地点	塩基多様度 (π)	集団サイズ N_e ($\times 10^5$)
日本	0.0268	1.64
台湾	0.0341	2.08
フィリピン	0.0291	1.78
スラウェシ	0.0322	1.97
タヒチ	0.0245	1.50
フィジー	0.0258	1.58
ニューカレドニア	0.0283	1.72
パプアニューギニア	0.0347	2.12
スマトラ	0.0147	0.90
レユニオン	0.0293	1.79
マダガスカル	0.0251	1.53
アンボン	0.0504	3.07
グアム	0.0317	1.93

表2-17 調節領域から算出した地点間の有効移住個体数Nm

	日本	台湾	フィリピン	スラウェシ	タヒチ	フィジー	ニューカレドニア	バブアニューギニア	スマトラ	レユニオン	マダガスカル	アンボン
台湾												
フィリピン	∞											
スラウェシ	∞	∞										
タヒチ	117.7	∞	30.3									
フィジー	0.2	0.2	0.2	0.2								
ニューカレドニア	0.2	0.2	0.2	0.2	328.7							
バブアニューギニア	0.2	0.3	0.2	0.2	2.9	15.6						
スマトラ	0.2	0.3	0.2	0.3	1.6	4.5	∞					
レユニオン	0.1	0.2	0.1	0.1	0.4	0.6	1.2	1.7				
マダガスカル	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	0.4	0.2			
アンボン	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	∞		
グアム	1.1	1.2	1.0	1.1	1.1	1.3	2.1	2.0	0.7	0.7	0.5	
	0.2	0.3	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.2	0.4	0.3	1.2

ダガスカル間は ∞ であったのに対し、スマトラとこれらの地点間ではともに0.2であった。アンボンと他の12地点間のNmは0.5~2.1、グアムと他の12地点間のNmは0.2~1.2であった(表2-17)。

第4節 考察

第1項 マイクロサテライト DNA の変異性

マイクロサテライト DNA は、ゲノム中に多量に散在することから(例えば、Li et al. 2002 など)、解析可能な遺伝子座が多い、変異性(多型性)が高い、サイズが小さいためPCRによる増幅が簡便で、微量な標本でも解析が可能などの利点がある(Beaumont and Bruford 1999, 井鷲 2001)。これらのことから、マイクロサテライト DNA は、ここ10数年の間に、集団遺伝学的研究にさかんに利用されてきた(Zhang and Hewitt 2003)。ウナギ属魚類においても、Wirth and Bernatchez (2001)をはじめ、アロザウムやmtDNAでは検出することができなかつたわずかな遺伝的差異をマイクロサテライト DNA によって検出している(Daemen et al. 2001, Wirth and Bernatchez 2001, Tseng et al. 2001, 2003, 2006, Maes and Volckaert 2002, Dannewitz et al. 2005)。

集団構造解析のための分子マーカーとして、マイクロサテライト遺伝子座は、ウナギ属では、これまで3種(*Anguilla anguilla*, *A. rostrata*, *A. japonica*)について報告されている(表2-2を参照)。このうち、*A. anguilla*と*A. rostrata*はきわめて近縁であることから、集団構造解析において、それぞれの種から特異的に単離された遺伝子座が相互に利用されてきた(Wirth and Bernatchez 2001, 2003, Maes and Volckaert 2002, Mank and Avise 2003, Dannewitz et al. 2005)。ウナギ属では、別種においてマイクロサテライト遺伝子座を用いた解析はこの2種に限られていたが、ごく最近になって、系統的により離れた種においてもマイクロサテライト遺伝子座が利用されるようになった。例えば、Maes (2005)では、*A. anguilla*と*A. rostrata*に対して報告された計8個のマイクロサテライト遺伝子座を用い、これら2種に*A. japonica*および*A. marmorata*を加えた計4種を対象として、Assignment testを利用して種査定を行った。こういった近縁な同属種間、あるいは同科他属の種間において、マイクロサテライト遺伝子座が利用できることは、ウナギ属だけでなく、カワヒメマス属*Thymallus* (Koskinen and Primmer 1999)やナマズ属*Silurus* (Krieg et al. 1999)、コイ科魚類(Tong et al. 2002,

Holmen et al. 2005) などにおいても報告されている。さらに、魚類に限らず、鳥類 (Primmer et al. 1996) や植物のシロイヌナズナ *Arabidopsis* 属と *Arabis* 属間 (Clauss et al. 2002) など、広範な分類群においても同様の報告がされている。これは、マイクロサテライト DNA 領域を挟むフランキング領域の塩基配列が保存的であるため、プライミングサイトとして有効であることによると考えられている (Primmer et al. 1996, Tong et al. 2002)。

マイクロサテライト 遺伝子座が近縁種間にも有効であることを利用して、本研究では、既報のウナギ属魚類のマイクロサテライト 遺伝子座のうち、*Anguilla japonica* と *A. rostrata* からそれぞれ単離された計 10 個の 遺伝子座について、*A. marmorata* の標本の 遺伝子型を決定した。このうち、集団解析に用いた 8 個の 遺伝子座については、本種において得られたヘテロ接合度が (表 2-5)、*A. japonica* および *A. rostrata* (表 2-2) と比較して概ね高かっただけでなく、遺伝子座間の連鎖や中立性を考えても、*A. marmorata* の集団構造解析に有効であると考えられた。一方、解析から除外した 2 個の 遺伝子座については、メンデル遺伝の法則に従わない原因として、染色体上で自然選択に関与する機能遺伝子の近傍に位置する、あるいは、その頻度の推定から (表 2-5)、ヌル対立遺伝子が存在するなどの可能性が考えられた。以上より、遺伝子座によっては集団解析に適さないことがあるものの、ウナギ属魚類においても、ある種から単離されたマイクロサテライト 遺伝子座が別の種の集団解析にも利用できるものと考えられた。

第2項 調節領域の変異性

mtDNA は多くの後生動物が有しており、系統解析や集団遺伝学的研究のための理想的な性質を多数取り揃えている (Avice et al. 1987, Moritz et al. 1987)。なかでも調節領域は、タンパク質や RNA 遺伝子をコードせず、mtDNA の中でもっとも変異性が高い (Brown et al. 1979)。そのため、調節領域は、様々な分類群において集団構造解析に利用されている。魚類では、アユ *Plecoglossus altivelis* (Iguchi et al. 1997, 1999) やツバメコノシロ属 *Polynemus sherdani* (Chenoweth and Hughes 2003)、ブラントラウト *Salmo trutta* (Apostolidis et al. 1997)、また、ウナギ目ではマアナゴ *Conger myriaster* (Kimura et al. 2004) など調節領域を用いた集団構造解析の事例は多い。ウナギ属魚類においても、調節領域はマイクロサテライト DNA などに先立って、集団解析に用いられてきた (Sang et al. 1994, Lintas et al. 1997, Ishikawa et al. 2001, 2004)。Sang et al. (1994) では、31 個体の *Anguilla japonica* について、調節領域前半の部分塩基配列 487 塩基対を決定した。そのうち、30 個体が互いに異なる

配列を持ち、ウナギ属魚類においても調節領域の多型性が高いことが明らかになっている (Sang et al. 1994).

Anguilla marmorata においても、ほとんどの個体が各々固有の塩基配列を持っており、変異性が非常に高いことが明らかになった (表 2-13). また、明らかな塩基置換の飽和は認められなかったことから (図 2-13), mtDNA のなかでは分子進化速度が速く (Brown et al. 1979), ウナギ属においては、種間レベルでは正確なアラインメントさえできない調節領域は (Minegishi et al. 2005), より分化の小さな種内レベルの系統推定や集団解析には適切であり、有用な情報を提供すると考えられた.

第3項 *Anguilla marmorata* の集団構造

集団構造

本章では、マイクロサテライト DNA と mtDNA の調節領域を用いて、*Anguilla marmorata* の集団構造を詳細に検討した. その結果、まず、13 地点の標本をすべてまとめた場合、集団解析に用いた 8 個のマイクロサテライト遺伝子座のいずれにおいても、ヘテロ接合度の減少が見られたことから、*A. marmorata* が複数の繁殖集団から成ることが示唆された (表 2-6). 集団全体が、遺伝子頻度の異なる部分集合から成る場合、全体としては、Hardy-Weinberg 平衡から予測されるよりもヘテロ接合度が減少することがある (Wahlund 効果, Wahlund 1928). この Wahlund 効果は、カレイ科の *Pleuronectes platessa* (Hoarau et al. 2002) やアルプスイワナ *Salvelinus alpinus* (Wilson et al. 2004), ヨーロッパイガイ *Mytilus edulis* (Raymond et al. 1997) などでも報告されている. 従って、多産で高い分散能を持つ水棲生物では、Wahlund 効果は一般的な現象と考えられる. また、固定指数 (マイクロサテライト遺伝子座から算出した F_{ST} と R_{ST} , および調節領域から算出した F_{ST}) (表 2-7,14) から、北太平洋 (日本, 台湾, フィリピン, スラウェシ), 南太平洋 (タヒチ, フィジー, ニューカレドニア, パプアニューギニア), インド洋 (スマトラ, レユニオン, マダガスカル) の 3 地域と、アンボンおよびグアムの 2 地点は、それぞれが互いに遺伝的に異なるものと考えられた. これらの地域内の地点間では、基本的には有意な差異は認められなかったが、いくつかの地点間では、固定指数および分子マーカーによって結果が一致しなかった. マイクロサテライト遺伝子座から算出した F_{ST} と R_{ST} において結果が一致しなかった原因としては、マイクロサテライト DNA の変異モデルの違いが考えられる. マイクロサテライト DNA の F_{ST} は、その変異モデルとして、任意の分子進化

速度で変異が起こるたびに、新しい対立遺伝子が生まれるとする Infinite Allele Model (IAM; Kimura and Crow 1964) を仮定している。他方、 R_{ST} では、マイクロサテライト領域の繰り返し単位がひとつずつ増減する Stepwise Mutation Model (SMM; Kimura and Ohta 1978) を仮定する (Slatkin 1995)。そこで本研究では、変異モデルとして、マイクロサテライト DNA の繰り返し単位が複数増減する頻度を推定したところ、多くの遺伝子座では、その変異の割合は 10 %未満であった (表 2-5)。従って、この割合から考えれば、多くの遺伝子座では、 F_{ST} よりも R_{ST} の方が、*A. marmorata* の遺伝的分化をより正確に反映している可能性がある。他方で、本研究のように、解析するマイクロサテライト遺伝子座が 20 以下、あるいは、標本の数がないなどの場合には、 R_{ST} より F_{ST} の方が、より遺伝的な分化を反映しているとも考えられている (Gaggiotti et al. 1999)。また、本研究を含め、一般に固定指数は、解析に用いた複数の遺伝子座をまとめて算出する。さらに、マイクロサテライト DNA の変異モデルとして、IAM と SMM の他にも、新しい対立遺伝子が生じる確率はつねに等しいと考える *K*-Allele Model (KAM; Kimura and Crow 1964) や、確率 p で繰り返し単位がひとつずつ増減し、確率 $(1-p)$ で複数の繰り返し単位が増減すると考える Two-Phase Model (TPM; Valdes et al. 1993, Di Rienzo et al. 1994) なども提唱されている。そのうえ、マイクロサテライト DNA の繰り返し単位の数が変化する機構として、DNA 複製時の翻訳のミス (翻訳スリップ Slippage) や組み換え、あるいは、それらの相互作用などが考えられている (例えば、Li et al. 2002 など)。以上のようなことから、マイクロサテライト DNA の変異を単純に推測することは難しいと言える。そのため、 F_{ST} と R_{ST} のいずれの指標が *A. marmorata* の種内の分化をより正確に反映しているか、一概には判断できないものと考えられる。そのため、本研究では、マイクロサテライト遺伝子座の F_{ST} と R_{ST} の双方を算出したうえで、本種の遺伝的分化を総合的に検討した。次に、分子マーカーによって結果が一致しなかった原因としては、核 DNA と mtDNA の遺伝様式の違いが考えられる。核 DNA が両系遺伝で、組み換えが起こるのに対し (Brown 2002)、mtDNA は母系遺伝であり、組み換えが起こらない (Moritz et al. 1987)。そのため、過去の一時期のみに他集団から移入した DNA と、現在の移入による DNA を区別できない可能性がある (西田 2001)。つまり、調節領域から算出した固定指数は、現在だけでなく、過去の遺伝子流動の影響も示している可能性がある。以上より、本研究では、マイクロサテライト遺伝子座から算出した F_{ST} と R_{ST} 、さらに調節領域から算出した F_{ST} も併せ、全体として結果を解釈することが適当と考えた。

その結果、*Anguilla marmorata* の種内には、4 つの遺伝的に異なる繁殖集団が存在すると考

えられた。すなわち、(1) 日本、台湾、フィリピン、スラウェシを含む北太平洋集団、(2) タヒチ、フィジー、ニューカレドニア、パプアニューギニアを含む南太平洋集団、(3) スマトラ、レユニオン、マダガスカルを含むインド洋集団、および(4) グアムを含む海域のマリアナ集団の4つである。また、アンボンには、主に北太平洋集団と南太平洋集団に由来する個体が混在することが明らかとなった(図2-16)。アンボンは、いずれの解析においても、北太平洋集団と、それ以外の3集団の特徴を合わせ持つような結果を示した。また、調節領域の塩基多様度 π は、アンボンが最大(0.0504)であった(表2-16)。これらの結果は、アンボンに複数の繁殖集団に由来する個体が混在すると考えると、十分説明がつく。アンボンは地理的に北太平洋と南太平洋の境界に位置する。本研究の標本採集地点のなかでは、アンボンは、スラウェシとパプアニューギニアの間である(図2-1)。すなわち、アンボンは、独自の繁殖集団を持つものではなく、主に、北太平洋と南太平洋に由来する個体群により構成されていると考えられた。また、これらの4集団を仮定したAMOVAにおいても、集団が分化していることが支持された(表2-10B)。

本研究で明らかになった4集団のうち、北太平洋集団が最も大きく分化しており、他の3集団間の分化は互いに非常に小さいと考えられた。マイクロサテライト遺伝子座から算出した F_{ST} では、北太平洋集団の4地点と他の9地点の間の分化($F_{ST}=0.037\sim 0.240$)は、南太平洋集団とインド洋集団の地点間の分化($F_{ST}=0.018\sim 0.059$)に比べて、最大で10倍以上大きい(表2-7)。このことは、マイクロサテライト遺伝子座の対立遺伝子の頻度分布パターン(図2-2~11)やAssignment test(表2-9)、AMOVA(表2-10B,C)、さらには、調節領域による遺伝子系統樹(図2-14)においても示されている。これに対し、南太平洋、インド洋、およびマリアナ集団では、それぞれの集団間の差異が互いに非常に小さいと考えられる。本章で得られた結果は、北太平洋集団が集団独自の遺伝子型を持つほど分化しているのに対し、南太平洋、インド洋、マリアナ集団がそれぞれ独自の遺伝子型を持つほど互いに分化していないことを示している。南太平洋、インド洋、およびマリアナ集団は、固定指数では各集団の地点間には有意に異なるので(表2-7,14)、遺伝的な交流はないものと考えられる。このことは、3つの集団がわずかな交流を保っているために集団間における分化が小さいのではなく、進化的に分岐して間もないことを示唆する。

北太平洋集団は、他の3集団と比較して、遺伝的多様性が高いと考えられた。このことは、北太平洋集団が大きな繁殖集団を維持しているのに対し、南太平洋集団、インド洋集団、マリアナ集団は小さな繁殖集団であることを示唆する。マイクロサテライト遺伝子座と調節領域を

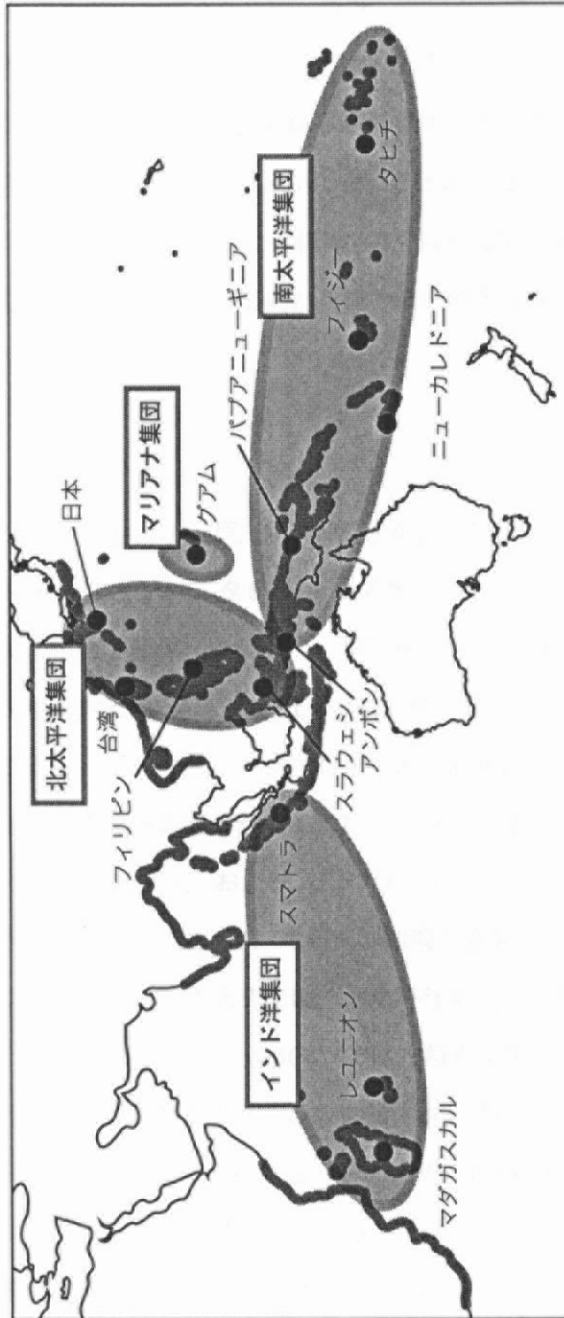


図2-16 A. marmorataの集団構造。太線はA. marmorataの分布域を、黒丸は標本採集地点をそれぞれ示す。

用いて、それぞれの集団の有効な大きさ N_e を算出したところ、マイクロサテライト遺伝子座から算出した値の方が調節領域から算出した値よりも1桁程度小さかった(表2-11,16)。この理由として、前述の固定指数と同様、遺伝様式の違いや過去の遺伝子流動の影響などが考えられるが、いずれが繁殖集団の大きさを正確に反映しているかは、現在のところ、判断できない。しかしながら、全体の傾向は一致していたため、集団の大きさの絶対値ではなく、相対的に比較すると、実際に、北太平洋集団に含まれる地点では、より集団サイズが大きく、他の3集団に含まれる各地点では、より集団サイズが小さいことが示された。ただし、もし前述の通り、南太平洋集団、インド洋集団、マリアナ集団がごく最近互いに分化したとすれば、ボトルネック効果よりも、むしろ創始者効果が働いた影響で遺伝的多様性が低くなっているものと推測される。

先行研究

Ishikawa et al. (2004) は、小笠原、沖縄、口永良部(以上、日本)、スラウェシ、アンボン、ボルネオ、スマトラ、フィジー、タヒチ、マダガスカルの計10地点から採集した *Anguilla marmorata* の標本(計162個体)を用いて、集団構造解析を行った。手法は、調節領域5'側の部分塩基配列626塩基対と核DNAのAFLP解析に依った。その結果、Ishikawa et al. (2004) は、日本、スラウェシ、ボルネオ、アンボンをまとめて北太平洋集団とし、残りの4地点はそれぞれ互いに遺伝的に異なる集団であるとした。この結果は、アンボンを北太平洋集団に含めていること、タヒチとフィジー、およびスマトラとマダガスカルのそれぞれを互いに異なる集団としていることの3つの点において、本研究の結論と異なっている。

まず、アンボンについては、本研究では、北太平洋集団と南太平洋集団に由来する個体が混在すると結論した。Ishikawa et al. (2004) では、解析に用いたアンボンの標本は、わずか4個体である。本研究の結果を考えると、この4個体は、偶然、すべてが北太平洋集団に由来する個体であった可能性が高いと考えられる。そのため、Ishikawa et al. (2004) は、アンボンには、南太平洋集団に由来する個体も存在することを検出できなかったと考えられる。次に、フィジーとタヒチ、およびスマトラとマダガスカルについては、本研究では、これらはそれぞれ同一の繁殖集団に属すると結論した。Ishikawa et al. (2004) では、北太平洋集団以外のフィジー、タヒチ、スマトラ、マダガスカルの4地点間については、調節領域に加え、AFLP解析も行っている。その結果、調節領域の固定指数において、これらの4地点間に有意な差異が検出されただけでなく、AFLP解析においても、4地点間の差異は、各地点内の差異に比べて大

きかった (Ishikawa et al. 2004). 本研究においても、マイクロサテライト DNA 解析では、Ishikawa et al. (2004) と同様の結果が得られている。すなわち、フィジー-タヒチ間、スマトラ-マダガスカル間は、それぞれ遺伝的に有意に異なっている (表 2-7, 図 2-12)。他方、mtDNA 解析では、スマトラ-マダガスカル間は、やはり遺伝的に異なるが、フィジー-タヒチ間では差異はない (表 2-14, 図 2-15)。Ishikawa et al. (2004) が解析した調節領域は配列が短いので、そこに含まれる情報は少ないことが考えられる。また、Ishikawa et al. (2004) は北太平洋内においては、比較的密な標本採集を行っているが、南太平洋およびインド洋については、フィジー、タヒチ、スマトラ、マダガスカルのわずかに 4 地点である。南太平洋やインド洋は、完全な任意交配集団ではないと考えられるため (後述)、標本の採集地点や用いる分子マーカーによっては差異が検出される可能性がある。そのため、Ishikawa et al. (2004) では、上記の 4 地点をそれぞれ別個の繁殖集団とみなしたものと考えられた。

Ege (1939) は、*Anguilla marmorata* の脊椎骨数に地理的な変異があることを示した (表 2-18A)。これを本研究で検出した集団構造に従って整理し直してみると表 2-18B のようになる。すなわち、北太平洋集団 (セレベス) でやや脊椎骨数は少なく、南太平洋集団 (パプアニューギニア、フィジー、サモア、タヒチ、マルケサス) とインド洋集団 (マダガスカル、レユニオン) は差異が小さい。他方、マリアナ集団 (マリアナ、パラオ、カロリン諸島) の脊椎骨数は明らかに他のどの集団よりも大きい。また、Watanabe et al. (2003) は、本研究とほぼ同様の 13 地点から得た計 389 個体の標本について、脊椎骨数を調べた。その結果、北太平洋集団、南太平洋・インド洋集団、グアムの 3 つのグループ間に互いに差異があることを示した (Watanabe et al. 2003)。この結果もまた、本研究で示した集団構造をよく反映しているものと考えられる。これらのことは、遺伝的集団構造が形態形質においても支持されることを示していると言える。

各集団の内部

集団の内部については、まず、北太平洋集団は、固定指数 (表 2-7, 14, 図 2-12, 15)、遺伝子系統樹 (図 2-14) などの結果から、完全に任意に交配を行っている単一の繁殖集団と考えられた。この集団内の日本、台湾、フィリピン、スラウェシの 4 地点では、 N_e (表 2-11, 16)、および N_m (表 2-12, 17) は、いずれの地点、地点間においても大きな差異が見られなかった。このことから、これら 4 地点間においては、遺伝的な交流が制限されているような箇所はないと考えられる。

表2-18 A. marmorata の脊椎骨数の差異

(A) Ege (1939)		個体数	範囲	幅	平均値
地点	集団	個体数	範囲	幅	平均値
セレベス	北太平洋	136	100-107	8	104.6
パプアニューギニア	南太平洋	106	103-108	6	105.7
フィジー	パプアニューギニア, フィジー サモア, タヒチ, マルケサス	12	104-108	5	106.3
サモア	インド洋	8	105-107	3	105.9
タヒチ	マダガスカル, レユニオン	12	103-107	5	105.5
マルケサス	グアム	39	104-109	6	105.7
レユニオン	マリアナ, パラオ, カロリン諸島	162	104-109	6	106.4
マダガスカル	セレベス	8	106-110	5	106.9
マリアナ, パラオ, カロリン諸島	北太平洋	132	103-108	6	105.6
Indo-Malaya	南太平洋	14	103-107	5	105.5
	インド洋	14	108-110	3	108.6
	グアム	64	103-107	5	105.0

(B) Ege (1939)を本研究の集団構造に従って、整理し直したもの

集団	個体数	範囲	幅	平均値
北太平洋	136	100-107	8	104.6
セレベス				
南太平洋	347	103-110	8	106.1
パプアニューギニア, フィジー サモア, タヒチ, マルケサス				
インド洋	146	103-108	6	105.6
マダガスカル, レユニオン				
グアム	14	108-110	3	108.6
マリアナ, パラオ, カロリン諸島				

これに対し、南太平洋集団およびインド洋集団は、固定指数では、それぞれの集団内のいくつかの地点間で有意差を検出した(表2-7,14)。もし、それぞれの繁殖集団が任意交配を行っていたら、分子マーカーに依らず、集団内のいずれの地点間においても差異は認められないはずである。このことから、南太平洋集団およびインド洋集団は、それぞれ完全な任意交配ではないと考えられる。mtDNAが過去の遺伝的交流を反映しているとするれば、南太平洋集団は、かつては、地理的に隣り合う地点とのみ交流を保っている島モデル(Maynard-Smith 1989)に相当するような集団構造であったと考えられる。しかし、過去のある時点から何らかの要因によって交流が保たれるようになり、現在では地理的に隣り合う地点に限らず、南太平洋集団内の各地点の個体群は混ざり合うようになったと考えられる。例えば、解析した南太平洋の4地点のすぐ近くにそれぞれ産卵場が存在し、タヒチの産卵場で生まれた個体の多くはタヒチに來遊するものの、一部がニューカレドニアへも加入するとすれば、マイクロサテライトDNAでタヒチとニューカレドニア間に遺伝的な差異が認められなかったことを説明することができる。同様に、フィジーの産卵場で生まれた個体の多くはフィジーに來遊するものの、一部はパプアニューギニアにも加入し、ニューカレドニアの産卵場で生まれたものの多くはニューカレドニアに加入するが、一部はパプアニューギニアにも加入するとすれば、これらの地点間に保たれている遺伝的交流が説明される。インド洋集団においても同様で、かつてインド洋の東西の個体群は、遺伝的に異なる集団であったと考えられる。しかし、本集団も過去のある時点からインド洋東西の個体群が混ざるようになったものと考えられた。

グアムは、固定指数では、解析した他の12地点すべてと異なっていたものの(表2-7,14)、マイクロサテライトの対立遺伝子の頻度分布(図2-2~11)やAssignment test(表2-9)から、南太平洋集団およびインド洋集団と遺伝的によく似ていることが明らかになった。北太平洋に位置するグアムが、南太平洋集団と遺伝的交流を保つとは考えにくい。また、グアムは小さな島嶼であるので、グアム島のみで1つの繁殖集団を維持していることも考えづらい。さらに、前述の通り、Ege(1939)は、マリアナ、パラオ、カロリン諸島全体が他の地域と形態学的に異なることを示している。これらのことから、グアムは、マリアナ諸島一帯で、北太平洋集団とも南太平洋集団とも異なる集団を形成しているものと考えられた。今後は、パラオ諸島、ヤップ島などのミクロネシアの地点を網羅的に調べ、この地域の集団構造を明らかにしていきたい。

第3章 *Anguilla bicolor* の集団構造

Anguilla bicolor には、アフリカ大陸東岸やマダガスカルなどのインド洋西部と、インドネシア・スマトラ島などのインド洋東部に生息する *A. bicolor bicolor* と、フィリピンからスラウェシ島、ニューギニア島までの西太平洋沿岸に分布する *A. bicolor pacifica* の2亜種が記載されている (Ege 1939)。これらの分布域と海流系から、*A. bicolor* の産卵場は、少なくともインド洋と太平洋に1つずつ存在することが示唆される。一方、インド洋に生息するウナギ属魚類の一種 *A. nebulosa* は、インド洋の東西において、それぞれ *A. nebulosa nebulosa* と *A. nebulosa labiata* の2亜種に分類されていることから (Ege 1939)、それぞれが独立した産卵場と回遊経路を持つと考えられる。*A. nebulosa* がインド洋の中で亜種に分化しているということは、ほぼ同様の分布域を持つ *A. bicolor bicolor* もインド洋の東西においてさらに分化している可能性がある。そこで本章では、第2章と同様、マイクロサテライト DNA と調節領域を用いて、主にインド洋の個体群に着目し、*A. bicolor* の遺伝的集団構造を明らかにすることを目的とした。

第1節 材料

Anguilla bicolor の分布域を代表するように、インド洋西部のマダガスカル、レユニオン、マヨット、セイシェル、インド洋東部のスマトラ、および太平洋のフィリピンの計6地点から採集した計145個体の標本を解析に用いた (表3-1, 図3-1)。標本の同定と組織の保存は、第2章第1節と同様に行った。

なお、本章では以降、亜種名を用いず、採集地域および採集地点ごとに、集団もしくは個体群と表記する。

第2節 方法

第1項 マイクロサテライト DNA 解析

方法は、第2章第2節第1項に準じた。なお、解析に使用するマイクロサテライト遺伝子座の検討には、マダガスカルとレユニオンから無作為に8個体を選び、解析に供した。

表3-1 A. *bicolor* の標本採集地点、解析個体数、採集年、全長

亜種	地域	地点	総標本数	マイクロサテライト 解析に用いた個体数	調節領域解析に 用いた個体数	採集年	全長 (mm)
<i>bicolor</i>	インド洋西部	マダガスカル	5	5	4	1996	384-616
		レユニオン	11	11	7	1997-2004	?
		マヨット	9	9	7	2003	?
		セイシエル	8	8	5	2003	?
インド洋東部							
<i>pacifica</i>	太平洋	フィリピン	33	33	19	1997-2003	302-568*
		6地点	145	141	89	2000	447-656
合計	3地域		145	141	89	-	-

*: 一部形態データなし
?, 不明

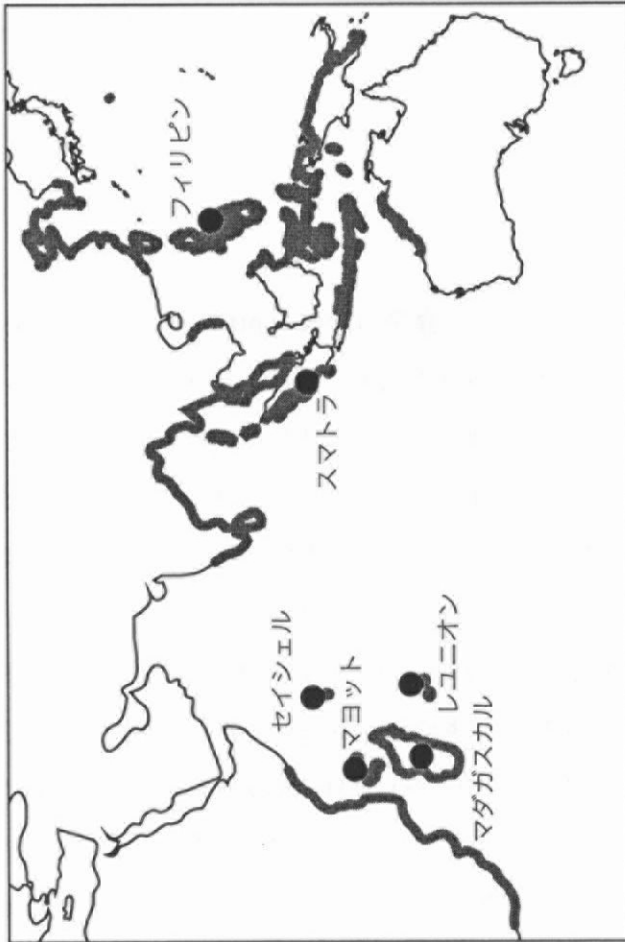


図3-1 A. bicolorの標本採集地点. 太線はA. bicolorの分布域を示す.

第2項 ミトコンドリア DNA 解析

方法は、第2章第2節第2項に準じた。調節領域全長の塩基配列の決定には、L15625-CR (表2-3を参照) と H16437-BibiCR (5'-TCCACCTTAATTGACTTCTC-3') もしくは H16437-BipaCR (5'-TCCACCTTAATTAACCTTTTC-3'), および L16319-JpBiCR (5'-CTCGTTACCCACCAAGCC-3') と H84-CR (表2-3を参照) の3つのプライマー対を用いた。また、遺伝距離を算出する際にガンマ補正を行った ($\alpha=0.729$)。集団の有効な大きさ (N_e) の算出にあたって、世代時間 g 値には、インド洋西部のレユニオンで採集された本種の銀ウナギの年齢として、8年 (Robinet et al. 2003a) を代入した。

第3節 結果

第1項 マイクロサテライト DNA の地理的変異

解析に使用するマイクロサテライト遺伝子座の検討と選定

解析に使用する遺伝子座を選定するため、既報の計29個のマイクロサテライト遺伝子座について、マダガスカルとレユニオンの8個体を用いて予備的に変異性を調べた。その結果、14個の遺伝子座 (Aan02, Aan03, AJMS-3, AJMS-5, AJMS-6, Aro054, Ang101, Ang151, AjTR-04, AjTR-05, AjTR-12, AjTR-37, AjTR-42, AjTR-45) において、1~10個の対立遺伝子が認められた (表3-2)。これらの遺伝子座がそれぞれ Hardy-Weinberg 平衡にあるかどうか検定を行ったところ、4個の遺伝子座 (Aan02, Aro054, Ang101, AjTR-04) において、Hardy-Weinberg 平衡からの有意なずれが認められた ($P<0.05$)。そのため、これらの遺伝子座は自然選択に対して中立ではないと考えられるので、集団解析のマーカーとして適当ではないと判断した。また、Hardy-Weinberg 平衡にある10個の遺伝子座のうち、AjTR-05およびAjTR-45は、繰り返し単位の配列中に挿入塩基を含む複雑な配列であるため、解析から除外した (第2章第3節第1項、表2-2を参照)。Ang151では、出現した対立遺伝子がわずかに1個であった。また、Aan03は、解析した5個体中、ヘテロ接合であったのは1個体のみで、残りの4個体はすべてホモ接合であった。そのため、これら2個の遺伝子座は多型性が低いと判断し、以降の解析から除外した。以上より、本研究では、*Anguilla bicolor* について6個の遺伝子座 (AJMS-3, AJMS-5, AJMS-6, AjTR-12, AjTR-37, AjTR-42) を集団解析に有効なマーカーであると判断した (表3-2)。

表3-2 A. bicolor におけるウナギ属魚類の既報のマイクロサテライト遺伝子座の変異性

遺伝子座	PCR*	Ni	Na	サイズ** (範囲)	H _E	H _E (n.b.)	H _o	H _o /H _E	F _{IS} ***
Aan01	2								
Aan02	1	7	7	202 (188-222)	0.827	0.890	0.143	0.161	0.850*
Aan03	1	5	2	178,180	0.180	0.200	0.200	1.000	-
Aan04	2								
Aan05	3								
AJMS-1	3								
AJMS-2	3								
AJMS-3	1	8	5	87 (79-91)	0.742	0.792	1.000	1.263	-0.287
AJMS-5	1	8	5	123 (117-131)	0.688	0.733	0.625	0.852	0.157
AJMS-6	1	8	8	99 (99-121)	0.797	0.850	0.875	1.029	-0.032
AJMS-10	2								
Aro054	1	7	10	164 (158-178)	0.878	0.945	0.571	0.605	0.415*
Aro063	2								
Aro095	2								
Aro121	2								
Ang101	1	8	6	165 (163-185)	0.734	0.783	0.500	0.638	0.378*
Ang114	2								
Ang151	1	8	1	185	0.000	0.000	0.000	0.000	-
AjTR-04	1	7	9	193,195,201,205,211 (187-221)	0.878	0.945	0.429	0.453	0.566*
AjTR-05	1	8	4	87 (85-91)	0.680	0.725	0.625	0.862	0.146
AjTR-12	1	8	8	152 (140-166)	0.836	0.892	0.750	0.841	0.168
AjTR-17	3								
AjTR-23	2								
AjTR-24	2								
AjTR-25	2								
AjTR-27	2								
AjTR-37	1	7	8	200 (190-210)	0.837	0.901	1.000	1.110	-0.120
AjTR-42	1	8	8	249 (245-275)	0.789	0.842	0.750	0.891	0.116
AjTR-45	1	7	7	145 (133-153)	0.816	0.879	1.000	1.138	-0.151

*, 1, 単一増幅産物が得られた；2, 非特異的増幅産物が認められたか、産物量が少なかった；3, 増幅が確認されなかった

Ni, number of individual 解析個体数

Na, number of allele 対立遺伝子数

**、最頻値

H_E, expected heterozygosity ヘテロ接合度 (期待値) ; n.b., non-biased (Nei 1978)

H_o, observed heterozygosity ヘテロ接合度 (観察値)

***, *, P < 0.05

マイクロサテライト遺伝子座の変異性

上記の集団解析に有効と判断された6個の遺伝子座について、すべての標本について遺伝子型の決定を行い、計141個体について遺伝子型を得た。その結果、それぞれの遺伝子座において9~23個の対立遺伝子が得られた(表3-3)。 H_E は0.802~0.924、 H_o は0.557~0.907であった。これらの各遺伝子座におけるヌル対立遺伝子の頻度(r)をBrookfield(1996)に従って推定したところ、0.7~14.2%となった。また、各遺伝子座について、マイクロサテライトDNAの突然変異モデルとして、マイクロサテライト領域の繰り返し単位が複数増減する割合を推定したところ、2個の遺伝子座(AJMS-3, AjTR-42)は4.0%未満、残りの4個の遺伝子座は10.0%以上であった(表3-3)。さらに、連鎖不平衡を検定した結果、どの遺伝子座の間にも連鎖は認められず($P>0.05$)、それぞれの遺伝子座は独立に組み換えられることが示された。

地理的な遺伝的変異性

採集地点ごとに出現した対立遺伝子の頻度分布を見ると、いずれの遺伝子座においても、多数の対立遺伝子が様々な頻度で出現した(図3-2)。対立遺伝子の頻度分布パターンは、AJMS-6, AjTR-37, AjTR-42の3個の遺伝子座では、太平洋とインド洋東西の間で異なっていた。また、インド洋の東部と西部では、いずれの遺伝子座においても、対立遺伝子の頻度分布パターンに違いは認められなかった。

各地点において出現した対立遺伝子の数は、遺伝子座AJMS-3で7~9個、AJMS-5で10~13個、AJMS-6で14~21個、AjTR-12で10~19個、AjTR-37で14~22個、AjTR-42で15~18個であった(表3-4)。出現した対立遺伝子数は、地点間で大きな差異は認められなかった。

地点ごとに、各遺伝子座がHardy-Weinberg平衡にあるかどうかを検定した結果、AJMS-5では、3地点すべてにおいてヘテロ接合度の有意な減少が認められた($P<0.05$)。そのため、AJMS-5は以降の解析から除外した。それ以外の遺伝子座では、いずれの地点においても、Hardy-Weinberg平衡が成り立っていた($P>0.05$)。また3地点すべてをまとめ、*Anguilla bicolor*の標本全体として見ると、いずれの遺伝子座においてもヘテロ接合度の減少が認められ、そのうちの3個の遺伝子座(AJMS-5, AjTR-12, AjTR-37)では有意であった($P<0.05$) (表3-4)。

地点間の遺伝的分化程度の指標となる固定指数 F_{ST} および R_{ST} を算出したところ、 F_{ST} は0.003~0.018、 R_{ST} は-0.004~0.022であった(表3-5)。 F_{ST} では、インド洋の東西の地点は、どちらも太平洋と有意に異なっていた($P<0.001$)。これに対し、インド洋の東西の間に有意な

表3-3 A. bicolor における本研究に用いたマイクロサテライト遺伝子座の変異性

遺伝子座	Ni	Na	サイズ* (範囲)	H _E	H _E (n.b.)	H _o	ヌル対立遺伝子頻度**	反復単位が複数 増減する割合	遺伝的多様度 (θ)
AJMS-3	139	9	89 (79-95)	0.802	0.805	0.791	0.007	0.010	15.8
AJMS-5	140	17	123 (101-147)	0.811	0.814	0.557	0.142	0.133	26.1
AJMS-6	138	23	101 (91-145)	0.915	0.918	0.906	0.007	0.108	51.0
AJTR-12	139	23	154 (140-186)	0.870	0.873	0.748	0.066	0.108	57.7
AJTR-37	139	22	206 (190-232)	0.924	0.928	0.907	0.011	0.108	70.2
AJTR-42	130	23	249 (237-293)	0.910	0.913	0.877	0.019	0.035	55.9

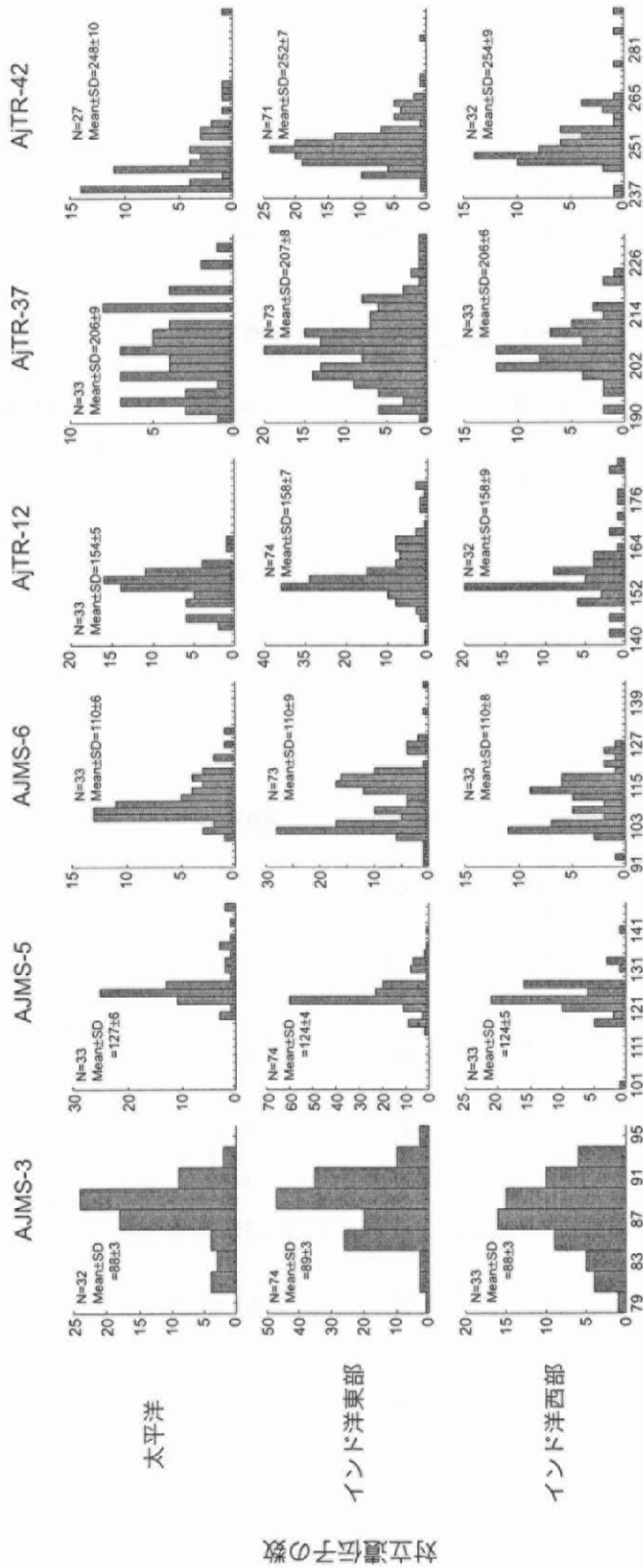
Ni, number of individual 解析個体数

Na, number of allele 対立遺伝子数

*, 最頻値

H_E, expected heterozygosity ヘテロ接合度 (期待値); n.b., non-biased (Nei 1978)H_o, observed heterozygosity ヘテロ接合度 (観察値)

**, Brookfield (1996)



対立遺伝子のサイズ (塩基対)

図3-2 A. bicolorにおける6個のマイクロサテライト遺伝子座の対立遺伝子の頻度分布

表3-4 各地点の対立遺伝子数, サイズ, ヘテロ接合度

AJMS-3				
	インド洋西部	インド洋東部	太平洋	全体
Ni	33	74	32	139
Na	8	9	7	9
対立遺伝子サイズ	79-93	79-95	81-93	79-95
$H_E(n.b.)$	0.843	0.794	0.761	0.805
H_O	0.909	0.730	0.813	0.791
H_O/H_E	1.079	0.919	1.067	0.984
F_{IS}	-0.080	0.081	-0.068	0.016

AJMS-5				
	インド洋西部	インド洋東部	太平洋	全体
Ni	33	74	33	140
Na	10	13	13	17
対立遺伝子サイズ	101-141	115-141	119-147	101-147
$H_E(n.b.)$	0.812	0.783	0.794	0.814
H_O	0.455	0.608	0.546	0.557
H_O/H_E	0.560	0.776	0.687	0.685
F_{IS}	0.444*	0.225*	0.316*	0.316*

AJMS-6				
	インド洋西部	インド洋東部	太平洋	全体
Ni	32	73	33	138
Na	16	21	14	23
対立遺伝子サイズ	93-127	91-145	99-131	91-145
$H_E(n.b.)$	0.916	0.908	0.886	0.918
H_O	0.938	0.959	0.758	0.906
H_O/H_E	1.023	1.056	0.855	0.986
F_{IS}	-0.024	-0.057	0.147	0.014

AjTR-12				
	インド洋西部	インド洋東部	太平洋	全体
Ni	32	74	33	139
Na	16	19	10	23
対立遺伝子サイズ	142-186	140-180	144-166	140-186
$H_E(n.b.)$	0.866	0.878	0.854	0.873
H_O	0.781	0.878	0.424	0.748
H_O/H_E	0.902	1.001	0.497	0.857
F_{IS}	0.099	-0.001	0.507*	0.143*

AjTR-37				
	インド洋西部	インド洋東部	太平洋	全体
Ni	33	73	33	139
Na	14	22	16	22
対立遺伝子サイズ	192-224	190-232	190-230	190-232
$H_E(n.b.)$	0.902	0.931	0.934	0.928
H_O	0.939	0.945	0.788	0.907
H_O/H_E	1.042	1.015	0.844	0.977
F_{IS}	-0.043	-0.015	0.158	0.023*

AjTR-42				
	インド洋西部	インド洋東部	太平洋	全体
Ni	32	71	27	130
Na	17	18	15	23
対立遺伝子サイズ	237-293	239-285	239-293	237-293
$H_E(n.b.)$	0.897	0.898	0.878	0.913
H_O	0.906	0.901	0.778	0.877
H_O/H_E	1.011	1.004	0.885	0.960
F_{IS}	-0.011	-0.004	0.117	0.040

Ni, number of individual 解析個体数

Na, number of allele 対立遺伝子数

 H_E , expected heterozygosity ヘテロ接合度 (期待値); n.b., non-biased (Nei 1978) H_O , observed heterozygosity ヘテロ接合度 (観察値)*: $P < 0.05$

表3-5 5マイクロサテライト遺伝子座によるA. bicolor の地域間の遺伝的分化程度

	インド洋西部	インド洋東部	太平洋
インド洋西部		0.003	0.018**
インド洋東部	-0.004		0.018**
太平洋	0.021	0.022*	

上段は F_{ST} , 下段は R_{ST}
 *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$

遺伝的差異は認められなかった ($P>0.05$). また, R_{ST} は, インド洋東部と太平洋の間には有意な差異が認められたが ($P<0.05$), インド洋の西部と太平洋, およびインド洋の東西には有意な差異は認められなかった ($P>0.05$) (表 3-5).

Assignment test

ベイズ法による Assignment test を用いて, 各個体の遺伝子型に基づいてクラスタリングを行った結果, K (クラスターの数) が大きくなるほど, 全体の尤度は高くなった ($K=1\sim 4$, 対数尤度=-3394.5~-3130.9) (表 3-6). ΔK は, $K=2$ のとき最大であったが ($\Delta K=204.9$) (表 3-6), すべての個体がいずれのクラスターにも割り振られなかった (表 3-7).

AMOVA

F_{ST} において有意差が認められなかったインド洋の東西をまとめ, 標本全体をインド洋と太平洋の2つの集団に分け, locus-by-locus AMOVA を行った. その結果, 集団間の変異の割合は, 全体の変異量の 2.5 % を占めており, インド洋と太平洋の間には, 有意な差異が認められた ($F_{CT}=0.025$, $P<0.05$). また, 集団内でさらに分化している徴候が見られた ($F_{SC}=0.0027$, $P<0.001$) (表 3-8).

集団の有効な大きさ N_e と有効移住個体数 N_m の推定

N_e は, 3.09 (太平洋) ~3.77 (インド洋東部) $\times 10^4$ であった (表 3-9). N_m は, 太平洋とインド洋東西の間ではいずれも 13.6, インド洋東西の間では 83.1 であった.

第2項 ミトコンドリア DNA の地理的変異

調節領域の変異性

調節領域の全長の塩基配列を決定することができた計 89 個体から, 計 1,000 サイトの配列を得た. 得られた塩基配列中に合計で 350 サイトに変異が認められた. 変異の内訳は, 転位が 295 サイト, 転換が 53 サイト, 挿入・欠失が 44 サイトで, 変異の大部分は転位で占められていた (表 3-10). これらの変異によって, 89 個体すべてがそれぞれ異なる配列を持っていた.

塩基置換の飽和の程度を確認するため, 縦軸に転位サイト数を, 横軸に遺伝距離および転換サイト数を取り, その相関の程度を調べた. その結果, 転位サイト数も転換サイト数も遺伝距

表3-6 ベイズ法によるAssignment testにおけるクラスターの数とそのときの対数尤度, およびΔK

クラスターの数	尤度				SD	L'(K)	L''(K)	ΔK
	1回目	2回目	3回目	L'(K)				
1	-3394.5	-3394.4	-3394.4	-3394.4	0.058	-3394.4	-	-
2	-3281.9	-3281.6	-3281.7	-3281.7	0.153	-3281.7	112.7	204.9
3	-3200.2	-3200.2	-3200.6	-3200.6	0.231	-3200.3	81.4	52.8
4	-3130.9	-3131.4	-3131.0	-3131.0	0.265	-3131.1	69.2	-

表3-7 バイズ法によるAssignment test ($K = 2$)

地域 (個体数)	クラスター		どのクラスターにも割り 振られなかった個体数	いずれかのクラスターに割り 振られた個体の割合* (%)
	I	II		
インド洋西部 (33)	0.488 (0)	0.512 (0)	33	0
インド洋東部 (75)	0.482 (0)	0.518 (0)	75	0
太平洋 (33)	0.587 (0)	0.413 (0)	33	0

*, $q > 0.80$ の個体数の割合

表3-8 5マイクロサテライト遺伝子座によるA. bicolor の階層的集団構造解析

	自由度	平方和	分散成分	変異の割合 (%)	固定指数
集団間	1	7.8	0.06	2.5	0.0247 (F_{CT})*
集団内の地点間	1	2.7	0.01	0.3	0.0027 (F_{SC})**
地点間	279	594.7	2.20	97.3	0.0274 (F_{ST})**

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$

表3-9 マイクロサテライト遺伝子座から算出した有効な集団の大きさ N_e

地域	ヘテロ接合度	集団サイズ N_e ($\times 10^4$)
インド洋西部	0.658	3.20
インド洋東部	0.694	3.77
太平洋	0.650	3.09

表3-10 A. bicolor の調節領域の塩基配列に見られた変異性

地点	個体数	長さ (塩基対)	多型数	変異サイト数	転位 (Ts)	転換 (Tv)	挿入・欠失	塩基多様度 (π)
インド洋西部	23	973-978	23	173	146	15	17	0.0386
インド洋東部	47	974-980	47	227	189	23	25	0.0357
太平洋	19	972-977	19	152	137	13	10	0.0289
全体	89	972-980	89	350	295	53	44	0.0615

離に比例していた (図 3-3)。また、転位サイト数と転換サイト数の関係は、軸の左下側のまとまりでは、転位サイト数は転換サイト数に対して比例していた (図 3-3)。一方で、軸の右上側のまとまりは、転換サイト数が増加しても、転位サイト数は増加せず、塩基置換は頭打ちになっていた (図 3-3)。従って、転換については塩基置換が飽和に達している傾向は見られなかったが、転位については塩基置換が飽和に達していた。

得られた塩基配列の変異が自然選択に対して中立であるかどうかを Neutrality test によって検証した結果、すべての変異が中立であることが示された (Tajima's $D=-0.384$, $P>0.05$)。

地理的な遺伝的変異性

ガンマ補正した遺伝距離 (Hasegawa et al. 1985) を算出し、近隣結合法 (Saitou and Nei 1987) により遺伝子系統樹を構築したところ、太平洋の個体群は明瞭にひとつのグループにまとまった。これに対し、インド洋の東西の個体群は、それぞれ標本の採集地点に関係なく、2つの枝に分かれた (図 3-4)。

地点間の遺伝的分化程度の指標となる F_{ST} は 0.008~0.706 であった。インド洋の東西の地点は、それぞれ太平洋と有意に異なっていた (それぞれ $F_{ST}=0.706, 0.697$, $P<0.001$)。これに対し、インド洋の東西の間に有意な遺伝的差異は認められなかった ($F_{ST}=0.008$, $P>0.05$)。

AMOVA

F_{ST} において有意差が認められなかったインド洋の東西をまとめ、標本全体をインド洋と太平洋の2つの集団に分け、locus-by-locus AMOVA を行った。その結果、集団間に占める変異の割合は、全体の変異量の 69.3 % であり、インド洋と太平洋の間には有意な差異が認められた ($F_{CT}=0.693$, $P<0.05$)。また、集団内でさらに分化している徴候が見られた ($F_{SC}=0.010$, $P<0.05$) (表 3-11)。

集団の有効な大きさ N_e と有効移住個体数 N_m の推定

N_e は、1.80 (太平洋) ~2.41 (インド洋西部) $\times 10^5$ であった (表 3-12)。 N_m は、太平洋とインド洋の東西の間ではいずれも 0.1、インド洋東西の間では 30.2 であった。

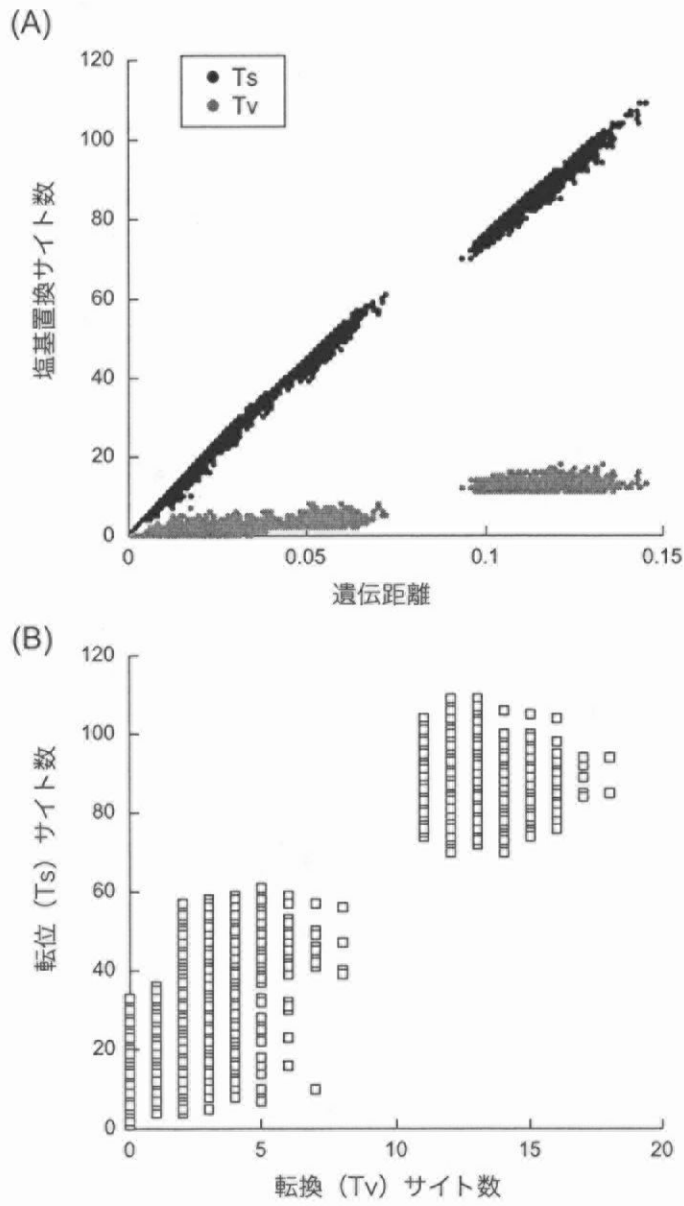


図3-3 調節領域における (A) 遺伝距離 (HKYモデル; Hasegawa et al. 1985) に対する塩基置換サイト数, および (B) 転換 (Tv) サイト数に対する転位 (Ts) サイト数.

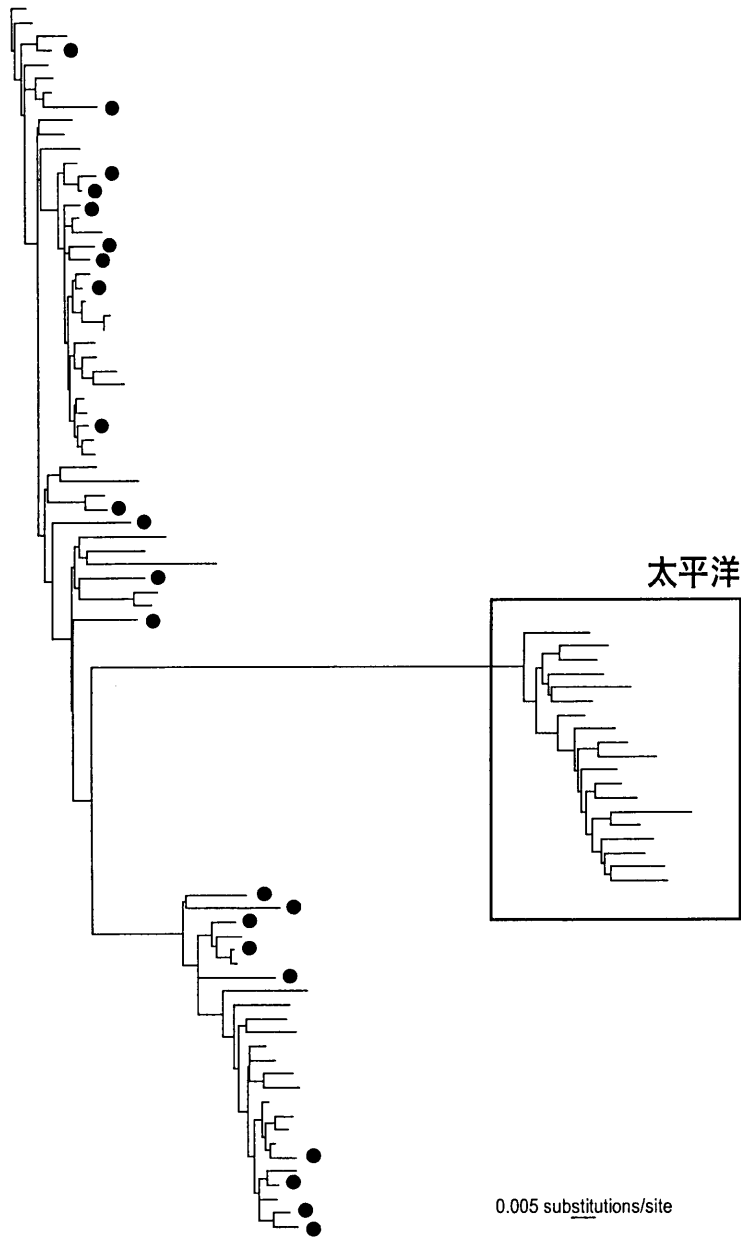


図3-4 調節領域の遺伝距離 (HKY+ Γ モデル; Hasegawa et al. 1985) に基づく *A. bicolor* の遺伝子系統樹。枠内は太平洋の個体を, 黒丸はインド洋西部の個体をそれぞれ示す。

表3-11 調節領域による*A. bicolor* の階層的集団構造解析

	自由度	平方和	分散成分	変異の割合 (%)	固定指数
集団間	1	1195.8	39.3	69.3	0.693 (F_{CT})**
集団内の地点間	1	22.7	0.2	0.3	0.010 (F_{SC})*
地点間	86	1484.6	17.3	30.4	0.696 (F_{ST})**

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$

表3-12 調節領域から算出した集団の有効な大きさ N_e

地点	塩基多様度 (π)	集団サイズ N_e ($\times 10^5$)
インド洋西部	0.0386	2.41
インド洋東部	0.0357	2.23
太平洋	0.0289	1.80

第4節 考察

本研究では、*Anguilla bicolor* の集団解析を初めて行った。解析に用いたマーカーのうち、まず、マイクロサテライト遺伝子座については、多型性の高さ（表3-4）や連鎖が認められなかったことなどから、本種の集団構造解析に有効なマーカーであると考えられた。一方、調節領域についても、非常に変異性が高いと考えられたが、転位型の置換については飽和している傾向が認められた（図3-3）。生物間の遺伝距離は多重置換によって過少評価される危険があるため（熊澤ら 2000）、*A. bicolor* においては、調節領域を用いて系統推定を行う場合は、ガンマ補正を行うか（熊澤ら 2000）、転位サイトは解析から除外する必要があると考えられた。

本研究の結果、 F_{ST} （表3-5）、locus-by-locus AMOVA（表3-8,11）、遺伝子系統樹（図3-4）から、それぞれ亜種とされていたインド洋の *Anguilla bicolor bicolor* と太平洋の *A. bicolor pacifica* が、遺伝的に明瞭に異なる繁殖集団であることが示された。しかしながら、マイクロサテライト DNA から算出した R_{ST} に限り、太平洋とインド洋西部の間においては有意な差異が認められなかった（表3-5）。さらに Assignment test はこれとも異なり、2 亜種を別々のクラスターに割り振ることもできなかった（表3-7）。mtDNA の調節領域では、*A. bicolor bicolor* と *A. bicolor pacifica* は、転位型の塩基置換が明らかに飽和に達するほど遺伝的に分化していることが明らかになった（図3-3）。他方、マイクロサテライト DNA では、マイクロサテライト領域の繰り返し単位の数の変異は無限ではなく、長さの制約があり、変異はいずれは飽和に達すると考えられている（Nauta and Weissing 1996）。すなわち、マイクロサテライト DNA に比べれば明らかに分子進化速度の遅い mtDNA でも、その塩基置換が飽和に達している *A. bicolor* 2 亜種では、マイクロサテライト遺伝子座の変異も既に飽和に達し、真の集団構造を反映しなくなっているものと考えられる。事実、対立遺伝子の頻度分布（図3-2）を見ると、インド洋東西と太平洋の間で頻度分布パターンは異なっているものの、その差異は、より分化が小さいと考えられる *A. marmorata* の北太平洋集団とそれ以外の集団間で認められた差異のように明瞭ではない（図2-2~11）。さらに最近、Wilson（2006）は、ヨウジウオ属 *Syngnathus* において、同属他種間のマイクロサテライト遺伝子座の塩基配列を調べ、size homoplasy が、ランキング領域の変異や、反復配列以外の塩基の挿入などによっても生じ得ることを報告している。そのため、とくにマイクロサテライト DNA を用いて種間レベルでの比較を行う場合には、注意を要することを指摘している（Wilson 2006）。以上のことから、*A. bicolor bicolor* と *A. bicolor pacifica* は、本研究で用いた集団解析のための分子マーカーでは、そのマーカーが持つ本来の鋭敏さで検出できる範囲を超えるほど明瞭に分化した個体群であると考えられる。また、第2

章の *A. marmorata* と同様、*A. bicolor* についても有効な集団の大きさはマーカーによって異なっていた (表 3-9, 12)。この違いの原因は第2章第4節第3項で述べた通り、遺伝様式の違いや過去の遺伝子流動だけでなく、分子マーカーの変異の飽和による可能性があるかもしれない。そこで、ここでも集団の大きさを相対的に比較すると、*A. bicolor bicolor* と *A. bicolor pacifica* で特に顕著に異なることはなかった。そのため、*A. bicolor* 2 亜種は、概ね同程度の大きさの個体群であると考えられた。

次に、*Anguilla bicolor bicolor* 内部の集団構造を見ると、インド洋の西部と東部では、遺伝的に分化していないと考えられた。ただし、調節領域による遺伝子系統樹では、*A. bicolor bicolor* は地理分布とは対応しない2つのグループが認められた (図 3-4)。このことは、東西両岸を含むインド洋の *A. bicolor bicolor* の mtDNA には2種類の遺伝子型が存在することを示す。この理由として、2つの可能性が考えられる。まず、mtDNA は過去の遺伝子流動を示す可能性がある (西田 2001)。そのため、*A. bicolor bicolor* の祖先種がインド洋に侵入した当初から、本亜種には遺伝的に異なる2つのグループが存在したか、あるいは、かつては何らかの形でインド洋内で2つの集団に分化していたと推測される。ただし、本研究で解析した標本は、インド洋の東西で異なる年度に採集したものであることから、かつてインド洋にどのような集団があったにせよ、それらが現在では混合した状態で生息していると考えられる。恐らく、このような混合が始まってから十分な時間が経過していないために、mtDNA にはその痕跡が残っている可能性が高い。第2の可能性としては、隠蔽種が考えられる。しかし、マイクロサテライト DNA を用いて、系統樹 (図 3-4) で認められた2グループの遺伝的分化程度を調べてみると、これらのグループ間に有意な差異は認められなかった ($F_{ST} = -0.004$, $P > 0.05$)。つまり、現時点では、これらのグループ間で遺伝的な交流が保たれていると考えることができる。従って、インド洋に隠蔽種が存在したとしても、それは前者の可能性の通り、過去に存在したものであり、現在、*A. bicolor bicolor* とは異なる産卵場や回遊生態を持った個体群がインド洋に生息するというわけではなさそうである。

Anguilla bicolor bicolor の脊椎骨数の平均値は 109.7、*A. bicolor pacifica* は 107.1 で、これらの間には平均で 2.6 の差異が認められている (Ege 1939)。この差異は、*A. bicolor bicolor* と *A. bicolor pacifica* が異なる繁殖集団であることから支持される。他方、インド洋の東西においては、東部の脊椎骨数の平均値は 109.6、西部は 109.7 と、ほぼ同じである (Ege 1939)。Watabane et al. (2005) は、新たに採集した *A. bicolor bicolor* の標本と Ege (1939) のデータを合わせた解析を行っており、その結果においても、インド洋の東西において脊椎骨数に差

異はないことが確認されている。以上のことから、従来から形態形質に認められていた差異は、インド洋と太平洋では完全に遺伝的に分化している一方、インド洋の東西では分化していないという本種の集団構造をよく示していると言える。

インド洋の東西に生息する集団が遺伝的に均一であることは、*Anguilla bicolor bicolor*に限ったことではない。スズメダイ科の *Dascyllus trimaculatus* や *Dascyllus aruanus* (McCafferty et al. 2002)、ヘラヤガラ科の *Aulostomus chinensis* (Bowen et al. 2001)、魚類の他、ウニ *Tripenustes* 属 (Lessios et al. 2003) などにおいても、インド洋の東西において遺伝的な交流が保たれていることが示されている。これらは、幼生期や仔稚魚期が100日前後と長く、なかには100日を優に超えるものもある (Bowen et al. 2001, Lessios et al. 2001, 2003, McCafferty et al. 2002)。このことは、これらの水棲生物が長い幼生期間を持つことにより、インド洋の東西という広い範囲に分散することが可能であることを示すと考えられる。*A. bicolor bicolor* も68日 (Robinet et al. 2003b) ~202日 (Arai et al. 1999a) と多少ばらつきがあるものの、長い仔魚期間を持つ。さらに、インド洋ではモンスーンの影響により、夏と冬で方向と強さが変化する海流もある (Schott and McCreary 2001)。従って、*A. bicolor bicolor* についても、インド洋の東西で、十分、遺伝的な交流を維持することができると思われる。

一方、太平洋の *Anguilla bicolor pacifica* は、本研究で解析を行ったフィリピンだけでなく、北は日本から (Yamamoto et al. 2000) 南はパプアニューギニアまで分布する (Ege 1939)。太平洋の複数の地点から採集されたレプトセファルスの耳石輪紋解析から、*A. bicolor pacifica* が長い産卵時期を持つこと、また、比較的長い距離の回遊を行うことなどが明らかになっている (Kuroki et al. 2006)。今後、*A. bicolor pacifica* がその分布域全般において、どのような集団構造を形成しているかを明らかにし、上記のような生態学的な情報と合わせることで、本種の回遊生態が明らかになると考えられる。

Anguilla bicolor は、インド洋においても太平洋においても生態調査は少なく、研究は近年、始まったばかりである。今後、集団構造のみならず、海域と淡水域と双方の調査が進むことにより、産卵場や回遊経路、接岸および降河生態に関する具体的な知見が蓄積されていくことが期待される。