

第4章 *Anguilla australis* の集団構造

Anguilla australis は、オーストラリア大陸東岸、ニュージーランド、ニューカレドニア、およびタスマン海の島々に分布する (Ege 1939)。本種には、オーストラリアなどタスマン海の西部に生息する *A. australis australis* と、タスマン海東部のニュージーランドに生息する *A. australis schmidtii* の2亜種が記載されている (Ege 1939)。しかしながら、近年行なわれた mtDNA 解析では、これら2亜種間に遺伝的な差異は認められず、単一種とするべきという主張もある (Dijkstra and Jellyman 1999, Watanabe et al. 2006)。この議論に決着をつけるためには、両者の遺伝的変異を知る必要がある。そこで本章では、第2章、第3章と同様、マイクロサテライト DNA と調節領域を用いて2亜種間の遺伝的変異を把握し、*A. australis* 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

標本は、オーストラリア (クイーンズランド、ヴィクトリア) とニュージーランド (クライストチャーチ、アッパーハット、オークランド) で採集された計73個体を用いた (表4-1, 図4-1)。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、ニュージーランドで得られた標本の中から無作為に8個体を選び、解析に供した。

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4-1 A. australis の標本採集地点、解析個体数、解析年、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>australis</i>	タスマン海西部	オーストラリア	32	32	27	1998	448-675
		クイーンズランド	3	3	2	1998	553-617
		ヴィクトリア	29	29	25	1998	448-675
<i>schmidtii</i>	タスマン海東部	ニュージーランド	41	41	26	1996-1999	311-689
		クライストチャーチ	20	20	18	1999	311-689
		アッパーハット	10	10	3	1996	518/?
		オークランド	11	11	5	1996	338-586
合計	2地域		73	73	53	-	-

? 不明



図4-1 *A. australis*の標本採集地点. 太線は*A. australis*の分布域を示す.

(表 2-3 を参照) と H16407-AustCR (5'-GGAGGTGTCCCACATGTA-3'), および L16287-AustCR (5'-ATCTGGCATCTGATTAATGG-3') と H84-CR (表 2-3 を参照) の 2 つのプライマー対を用いた。また、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、銀ウナギの年齢として、オーストラリアでは 22 年 (Sloane 1982)、ニュージーランドでは 13 年 (Boubee et al. 2001) 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

解析に使用するマイクロサテライト遺伝子座を選定するため、ニュージーランドの 8 個体の標本を用いて、既報の計 29 個のマイクロサテライト遺伝子座について予備的に変異性を調べた。その結果、13 個の遺伝子座 (Aan02, Aan03, AJMS-5, AJMS-6, Aro054, Aro095, Aro121, Ang101, Ang114, AjTR-04, AjTR-23, AjTR-27, AjTR-45) において、2~12 個の対立遺伝子が認められた (表 4-2)。これらの遺伝子座について、各々 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, Aan03, AJMS-6, 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 4 個の遺伝子座は、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 平衡にあった AjTR-23 と AjTR-45 は、繰り返し単位の配列中に挿入塩基を含む複雑なモチーフ配列であるため、解析から除外した (第 2 章第 3 節第 1 項, 表 2-2 を参照)。Aro054 は、2 個の対立遺伝子が出現したが、解析に供した 8 個体中、ヘテロ接合であった個体は 1 個体のみで、残りの 7 個体はすべてホモ接合であった。そのため、Aro054 は多型性が低いと判断し、以降の解析から除外した。さらに、Aro095 は、予備解析に用いたすべての個体において、得られた対立遺伝子が Ang114 で得られた対立遺伝子とそれぞれ完全に一致していた。Ang114 で得られた対立遺伝子が既報のサイズ範囲と近いのに対し (表 2-2 を参照)、Aro095 で得られた対立遺伝子は既報のサイズ範囲から極端にずれていたため、Aro095 は以降の解析から除外した。以上より、本研究では、4 個の遺伝子座 (AJMS-5, Aro121, Ang101, Ang114) を *Anguilla australis* の集団解析に有効なマーカーであると判断した (表 4-2)。

表4-2 *A. australis* 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	8	4	158 (156-178)	0.414	0.442	0.125	0.283	0.731*
Aan03	1	8	4	174 (172-178)	0.484	0.517	0.250	0.484	0.533*
Aan04	2								
Aan05	3								
AJMS-1	3								
AJMS-2	2								-
AJMS-3	2								-
AJMS-5	1	7	3	123 (121-125)	0.561	0.604	0.571	0.945	0.059
AJMS-6	1	8	11	107 (97-143)	0.891	0.950	0.500	0.526	0.491*
AJMS-10	2								
Aro054	1	8	2	148,156	0.492	0.525	0.875	1.667	-0.750
Aro063	2								
Aro095	1	8	8	217 (211-231)	0.758	0.808	0.875	1.083	-0.089
Aro121	1	8	10	128 (114-146)	0.883	0.942	0.875	0.929	0.075
Ang101	1	6	8	169 (163-185)	0.778	0.849	1.000	1.179	-0.200
Ang114	1	8	8	217 (211-231)	0.758	0.808	0.875	1.083	-0.089
Ang151	2								
AjTR-04	1	7	6	169,183 (163-187)	0.725	0.780	1.000	1.282	-0.313*
AjTR-05	3								
AjTR-12	3								
AjTR-17	3								
AjTR-23	1	8	7	248 (236-252)	0.828	0.883	0.625	0.708	0.307
AjTR-24	3								
AjTR-25	2								
AjTR-27	1	8	2	147,151	0.117	0.125	0.125	1.000	-
AjTR-37	2								
AjTR-42	2								
AjTR-45	1	8	12	151 (141-171)	0.883	0.942	1.000	1.062	-0.067

*, 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

集団解析に有効と判断された上記の4個の遺伝子座を用いて、オーストラリアとニュージーランドで採集した計73個体について遺伝子型を決定した。その結果、それぞれの遺伝子座において、12~24個の対立遺伝子が得られた(表4-3)。 H_E は0.668~0.917、 H_o は0.537~0.889であった。これらの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、1.7~12.1%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%の値が得られ、遺伝子座によって大きく異なっていた(表4-3)。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

標本の採集地点ごとに、各遺伝子座について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4-2)。対立遺伝子の頻度分布パターンは、オーストラリアとニュージーランドの間に顕著な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、AJMS-5で9~10個、Aro121でともに19個、Ang101で15~17個、Ang114で6~14個であった(表4-4)。Ang114以外の遺伝子座では、出現した対立遺伝子数が2地点でほぼ同じであった。Ang114については、ニュージーランドでは出現した対立遺伝子が6個だったのに対し、オーストラリアではニュージーランドの2倍以上の14個の対立遺伝子が出現した。

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、両地点でヘテロ接合度の有意な減少が認められた($P<0.05$)(表4-4)。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。また2地点をまとめ標本全体として見ると、Aro121ではHardy-Weinberg平衡が成り立っていたが、それ以外の遺伝子座ではいずれもヘテロ接合度の有意な減少が認められた(表4-4)。

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0.019、 R_{ST} は0.062で、いずれも地点間で有意に異なっていた($F_{ST}, P<0.001$; $R_{ST}, P<0.01$)。

表4-3 A. australis 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-5	72	12	123 (109-139)	0.744	0.750	0.537	0.121	0.345	15.9
Aro121	72	24	124 (102-170)	0.917	0.923	0.889	0.018	0.108	73.8
Ang101	73	20	167 (159-207)	0.899	0.905	0.781	0.065	0.010	66.9
Ang114	73	14	217 (201-237)	0.668	0.673	0.644	0.017	0.108	29.0

Ni, number of individual 解析個体数

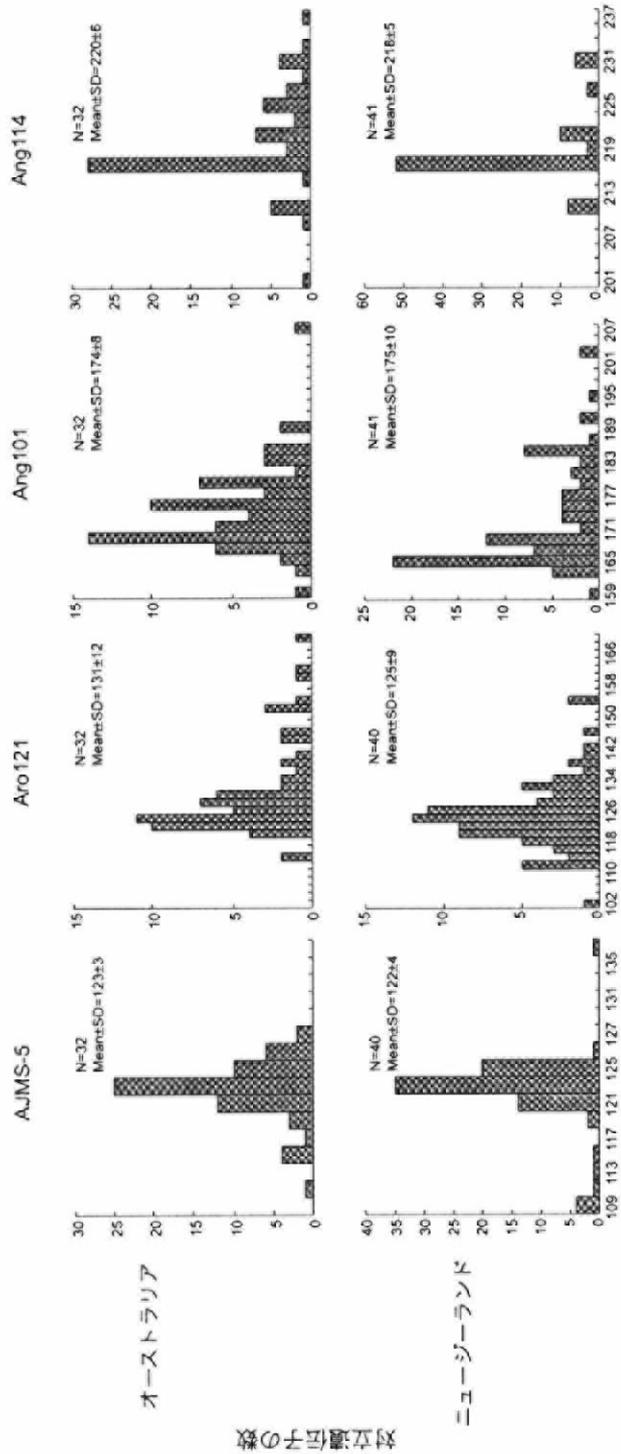
Na, number of allele 対立遺伝子数

*, 最頻値

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

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

** , Brookfield (1996)



対立遺伝子のサイズ (塩基対)

図4-2 A. australisにおける4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4-4 各地点の対立遺伝子数, サイズ, ヘテロ接合度

AJMS-5			
	オーストラリア	ニュージーランド	全体
Ni	32	40	72
Na	9	10	12
対立遺伝子サイズ	111-129	109-139	109-139
$H_E(n.b.)$	0.784	0.721	0.750
H_o	0.469	0.350	0.403
H_o/H_E	0.598	0.486	0.537
F_{IS}	0.406*	0.517*	0.464*

Aro121			
	オーストラリア	ニュージーランド	全体
Ni	32	40	72
Na	19	19	24
対立遺伝子サイズ	114-170	102-154	102-170
$H_E(n.b.)$	0.920	0.924	0.923
H_o	0.906	0.875	0.889
H_o/H_E	0.985	0.947	0.963
F_{IS}	0.015	0.053	0.037

Ang101			
	オーストラリア	ニュージーランド	全体
Ni	32	41	73
Na	15	17	20
対立遺伝子サイズ	159-207	159-205	159-207
$H_E(n.b.)$	0.899	0.885	0.905
H_o	0.813	0.756	0.781
H_o/H_E	0.904	0.854	0.863
F_{IS}	0.097	0.147	0.138*

Ang114			
	オーストラリア	ニュージーランド	全体
Ni	32	41	73
Na	14	6	14
対立遺伝子サイズ	201-237	211-231	201-237
$H_E(n.b.)$	0.783	0.572	0.673
H_o	0.813	0.512	0.644
H_o/H_E	1.037	0.895	0.957
F_{IS}	-0.038	0.106	0.043*

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)*: $P < 0.05$

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) = 1 と仮定した場合よりも、 $K=2$ の場合の方が、全体の尤度は高かった (それぞれ、対数尤度 = -1285.1, -1209.3)。 ΔK の算出には、 $K-1$ のときの尤度が必要であるため (Evanno et al. 2005, 第2章第2節第1項を参照)、 $K=1$ の場合には ΔK を算出することができない。そのため、 $K=1$ の場合も $K=2$ の場合も ΔK の算出は行わなかった。 $K=2$ のとき、どちらかのクラスターに割り振られた個体は1個体もなかった (表 4-5)。

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 はオーストラリアでは 5×10^5 、ニュージーランドは 2.85×10^5 であった。 N_m は 13.2 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

調節領域の塩基配列を決定した計 53 個体から、計 974 サイトの配列を得た。得られた塩基配列中に合計で 155 サイトに変異が認められた。変異の内訳は、転位が 126 サイト、転換が 15 サイト、挿入・欠失が 25 サイトで、変異の大部分は転位で占められていた (表 4-6)。これらの変異によって、53 個体の塩基配列は 52 のハプロタイプに分けられ、オーストラリアの 1 個体を除いて、すべて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取り、その相関の程度を調べた。その結果、転位、転換サイト数ともに遺伝距離に比例していた (図 4-3A)。また、転位サイト数と転換サイト数の関係を見ても、転位サイト数は転換サイト数の増加に対して頭打ちになる傾向は認められなかった (図 4-3B)。以上より、いずれの塩基置換も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 $D = -1.46$, $P > 0.05$)。

地理的な遺伝的変異性

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、オーストラリ

表4-5 ベイズ法によるAssignment test ($K=2$)

地点 (個体数)	クラスター		いずれ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		
オーストラリア (32)	0.489 (0)	0.511 (0)	32	0
ニュージーランド (41)	0.506 (0)	0.494 (0)	41	0

*, $q > 0.80$ の個体数の割合

表4-6 A. australis の調節領域の塩基配列に見られた変異性

	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)
オーストラリア	27	957-969	26	112	91	6	19	0.0209
ニューージーランド	26	957-968	26	115	89	12	20	0.0242
全体	53	957-969	52	155	126	15	25	0.0229

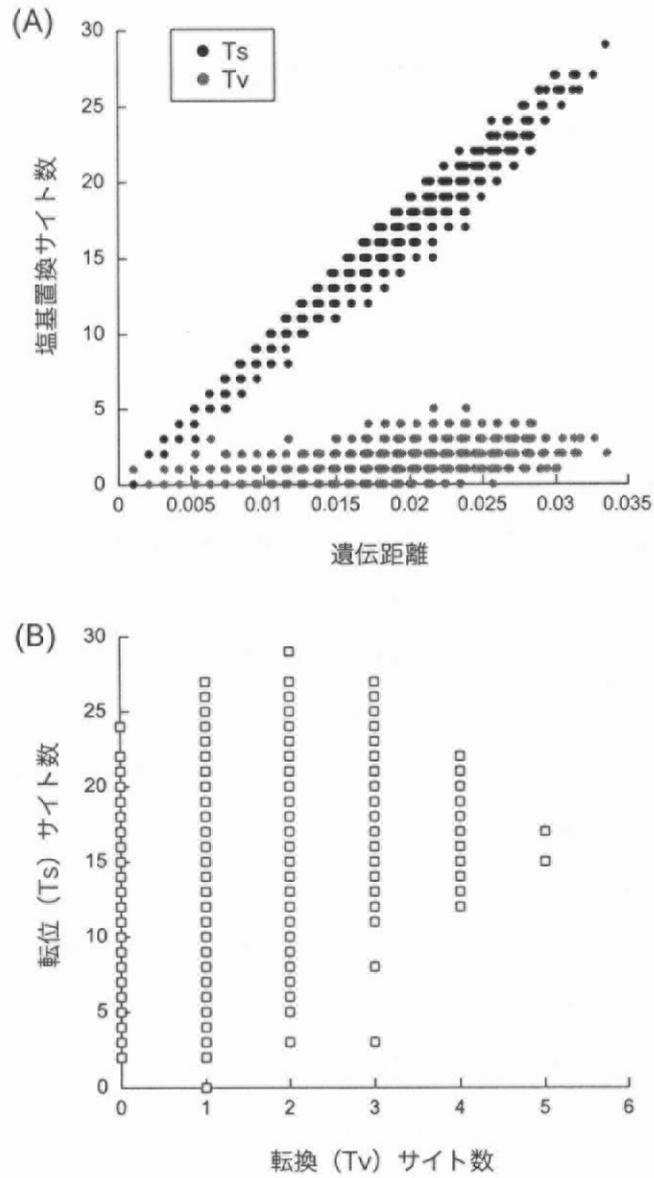


図4-3 調節領域における (A) 遺伝距離 (HKYモデル; Hasegawa et al. 1985) に対する塩基置換サイト数, および (B) 転換 (Tv) サイト数に対する転位 (Ts) サイト数

アとニュージーランドのハプロタイプに地理的なまとまりは見られなかった (図 4-4).

地点間の遺伝的分化程度の指標となる F_{ST} は 0.037 であり, オーストラリアとニュージーランド間で有意に異なっていた ($P < 0.05$).

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 はオーストラリアでは 4.7×10^4 , ニュージーランドは 9.3×10^4 であった. N_m は 6.6 であった.

第4節 考察

本研究で解析に用いた4個のマイクロサテライト遺伝子座, および調節領域は, いずれも多型性が高く (表 4-4), それぞれ遺伝子座間の連鎖やヌル対立遺伝子の影響, 塩基置換の飽和 (図 4-3) などを考慮しても, *Anguilla australis* の集団構造解析に有効であると考えられた.

マイクロサテライト DNA と mtDNA の調節領域を用いて, *Anguilla australis* の集団構造を詳細に検討した結果, 固定指数から, オーストラリアの *A. australis australis* とニュージーランドの *A. australis schmidtii* は, 遺伝的に異なる繁殖集団であることが明らかになった. このことは, 遺伝子座 Ang101 と Ang114 において, 2 地点をまとめて標本全体として見た場合, ヘテロ接合度の減少が認められたことから支持される (表 4-4). この2個の遺伝子座は, ヌル対立遺伝子の頻度がそれぞれ 6.5 % および 1.7 % と低い (表 4-3). そのため, ヘテロ接合度の減少は, ヌル対立遺伝子の影響によるものではないと考えられる. 従って, 標本全体としてヘテロ接合度が減少した原因は, *A. marmorata* (第2章第3節第1項を参照) や *A. bicolor* (第3章第3節第1項を参照) において認められたように, 遺伝的に異なる集団をまとめて解析したためと考えられた (Wahlund 効果, Wahlund 1928).

しかしながら, Assignment test (表 4-5) および遺伝子系統樹 (図 4-4) では, *Anguilla australis australis* と *A. australis schmidtii* が分化している傾向は認められなかった. このことは, 固定指数が集団全体の対立遺伝子の頻度分布の違いを検出するのに対し (Avice 2004), 遺伝子系統樹や Assignment test は各個体の遺伝子型の違いに基づいてクラスタリングを行うためと考えられた. すなわち, *A. australis* 2 亜種間の分化は非常に浅く, それぞれの繁殖集団 (亜種) としては遺伝子頻度は互いに異なるものの, 2 亜種それぞれで独自の遺伝子型を各個体

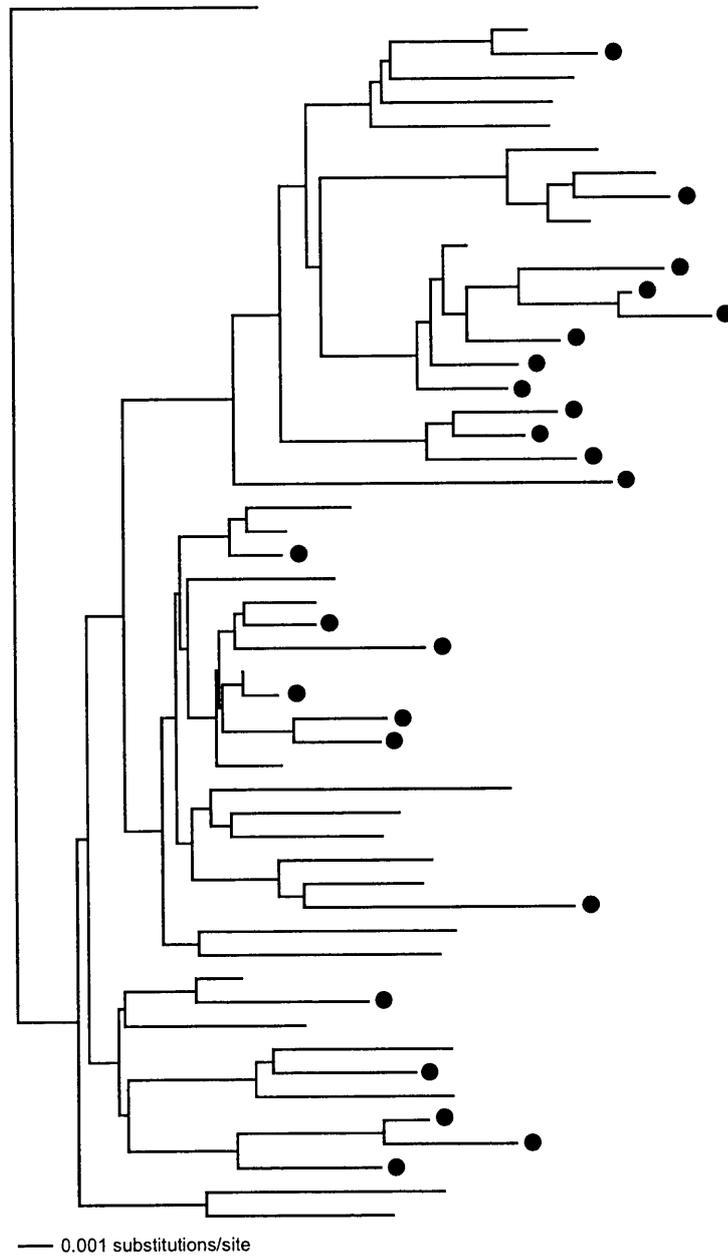


図4-4 調節領域の遺伝距離（HKYモデル；Hasegawa et al. 1985）に基づく遺伝子系統樹。黒丸はニュージーランドの個体を示す。

が獲得し、それが蓄積されるに至っていないことを示すと考えられる。また、集団サイズに認められた差異は、第2章、第3章と同様に考えられる。ただし本種においては、マイクロサテライト遺伝子座に基づいて算出した場合はオーストラリアの方が、調節領域に基づいて算出した場合はニュージーランドの方が大きかったため、現時点では相対的な比較さえ難しいものと考えられた。

Dijkstra and Jellyman (1999) は、調節領域の5'側半分の部分塩基配列611塩基対を決定し、その遺伝的差異に基づいて、*Anguilla australis australis* と *A. australis schmidtii* をそれぞれ亜種として扱うことが妥当かどうかを調べた。Dijkstra and Jellyman (1999) が算出した F_{ST} の値は0.186 (P 値の記載なし) であり、本研究で算出された0.037より、はるかに大きな値であった。 F_{ST} の値は、一般に、0~0.05ではわずかな遺伝的差異、0.05~0.15では中程度の差異、0.15~0.25では大きな差異、0.25より大きい場合は非常に大きな差異を表すことが知られている (Wright 1978, Hartl and Clark 1997)。実際には、算出した固定指数がゼロから有意に異なるかどうか、調べる複数の集団が単一繁殖集団か否か、などは統計解析ののち判断する (Balloux and Lugin-Moulin 2002)。そのため、 F_{ST} の値だけで一概に判断することはできないものの、上記の F_{ST} 値の解釈の目安によると、Dijkstra and Jellyman (1999) が示した *A. australis australis* と *A. australis schmidtii* の遺伝的な差異は大きいものと言える。また、Dijkstra and Jellyman (1999) によると、2亜種間の有効移住個体数は3.46であり、本研究で算出した値(6.6)よりもさらに小さい。これらの結果の違いは、Dijkstra and Jellyman (1999) は調節領域の5'側半分(前述)のみを解析に用いたのに対し、本研究では調節領域の全長を用いたために生じたものと考えられる。より情報量が少ないと考えられる調節領域の5'側半分のみを用いた場合でも、以上のような結果が得られることから、Dijkstra and Jellyman (1999) が示した結果は、いずれも *A. australis* 2亜種が互いに別集団であることを強く示すものと考えられる。ただし、近隣結合樹は、本研究と同様、*A. australis australis* と *A. australis schmidtii* はそれぞれの亜種ごとにまとまっていない。しかし、これについては、遺伝的に異なる個体群から得られた標本によって系統樹を推定しても、これらの個体群が互いに近縁な場合は、遺伝子の系統樹は混じり合ってしまう(根井 1990)。そのため、系統樹では亜種ごとにまとまらないものと考えられた。以上より、Dijkstra and Jellyman (1999) の結果も本研究と同様、*A. australis* 2亜種は極めて分化の浅い別繁殖集団であることを示していると考えられる。

Ege (1939) によると、*Anguilla australis australis* の脊椎骨数は平均112.640(範囲109~116)であるのに対し、*A. australis schmidtii* については平均111.699(108~115)であ

り、平均値で0.941の差異が認められている (Ege 1939)。同様の結果は、Schmidt (1928), Sloane (1984), Jellyman (1987), Watanabe et al. (2006) においても得られている。Jellyman (1987) は、この差異が孵化時期の水温に起因するとして、*A. australis* に亜種を設定することは妥当ではないとした。しかし、7~12月の半年間に亘ってニュージーランドに毎月接岸するシラスウナギの脊椎骨数を調べたところ、季節を通じて、Ege (1939) が記載した脊椎骨数の値が維持されることが示されている (Jellyman 1987)。もし、*A. australis australis* と *A. australis schmidtii* の脊椎骨数の差異が孵化時の水温によって決まるなら、フィジー東方と考えられている (Jellyman 1987) *A. australis* の産卵場の水温が変化すると考えられる半年の間に脊椎骨数の値は変化すると予想される (すなわち、水温の低い7月より、水温の高い12月の方が脊椎骨数は少なくなる)。しかし、オーストラリアに接岸する個体群 (*A. australis australis*) については未調査であるものの、少なくとも、ニュージーランドに接岸した個体群 (*A. australis schmidtii*) においては、半年もの間、脊椎骨数は一定に保たれている (Jellyman 1987)。このことは、脊椎骨数の差異は、水温に起因するものではないことを示唆する。*A. australis* 2 亜種間の脊椎骨数の差異は、孵化時の経験水温ではなく、遺伝的に異なる集団であることに起因する可能性が考えられる。

Anguilla australis australis と *A. australis schmidtii* は、Dijkstra and Jellyman (1999) をはじめ、近年、多くの研究において単一種として扱われてきた。しかしながら、オーストラリア (*A. australis australis*) とニュージーランドの個体群 (*A. australis schmidtii*) の間には、生態学的な差異が認められている (表 4-7)。例えば、シラスウナギの接岸日齢は、オーストラリアでは平均 208 日であるのに対し、ニュージーランドでは 232 日である (Arai et al. 1999b)。また、変態開始日齢も、オーストラリアでは平均 173 日 (Shiao et al. 2002) であり、ニュージーランドは 185 日である (Arai et al. 1999b)。本種の産卵場は、南緯 5~15 度、西経 150~170 度あたりの海域で、そこで生まれた仔魚は南赤道海流に乗って西へ運ばれ、東オーストラリア海流に乗り換えてオーストラリア東岸に接岸する (Jellyman 1987)。東オーストラリア海流は、オーストラリア大陸に沿って南下し、タスマンフロントにぶつかって向きを変え、東進する。これにより、海流に乗っていた仔魚は、オーストラリアより遅れてニュージーランドに接岸すると考えられている (Jellyman 1987)。この仮説によれば、オーストラリアとニュージーランドの 2 亜種間に見られる生態学的な違い (表 4-7) を説明することができる。すなわち、この 2 地点でシラスウナギの接岸時期や接岸日齢等が異なるのは、仔魚が産卵場からオーストラリアまで運ばれた後、さらに、タスマンフロントに乗って東進してニュージーランドへ

表4-7 オーストラリアとニュージーランドにおける*A. australis* の生態学的特性の比較

生活史イベント	オーストラリア	ニュージーランド	文献
孵化時期	11月中旬~1月上旬	11月下旬~1月下旬 (西) 12月中旬~2月上旬 (東)	Arai et al. (1999b)
	8月下旬~2月上旬	10~1月	Marui et al. (2001) Shiao et al. (2002)
仔魚期間 (日)	164±18.6 (138-198)	185±17.3 (161-208) (西) 187±18.9 (161-211) (東)	Arai et al. (1999b)
接岸時期	2~11月	8~11月	Jellyman (1977)
	6~8月		Sloane (1984)
			Beumer and Sloane (1990) Jellyman et al. (1999)
接岸日齢 (日)	208±17.4 (186-239)	232±19.8 (214-263) (西) 237±20.0 (208-266) (東)	Arai et al. (1999b)
	214~261	216-326 258 (西) 246 (東)	Marui et al. (2001) Shiao et al. (2001)
	229.2±29.4		Shiao et al. (2002)
	164±18.6 (138-198)	185±17.3 (161-208) (西) 187±18.9 (161-211) (東) 151-265	Arai et al. (1999b) Marui et al. (2001)
変態開始日齢	173±20.5		Shiao et al. (2002)
産卵場~接岸期間	6~8ヶ月	7~9ヶ月	Arai et al. (1999b)
	7~8ヶ月		Shiao et al. (2002)
産卵時期	11~1月	11~1月 (西) 12~2月 (東)	Arai et al. (1999b)
	夏~秋		Shiao et al. (2002)
降河時期	11~4月 (メス)		Sloane (1982)
	1~5月 (オス, メス)		Beumer (1986)
		2~4月	Jellyman (1987)
		2~3月 (オス) 3月 (メス)	Todd (1980)
		2~5月 (メス)	Boubee et al. (2001)

到達するためである (Jellyman 1987)。また、脊椎骨数に見られる差異については、産卵場のより北部 (すなわち、より温暖な海域) で生まれたものは上記の回遊経路によりオーストラリア東岸に接岸し、産卵場のより南部 (すなわち、より水温の低い海域) で生まれたものは、ニュージーランドに接岸すると説明している (Jellyman 1987)。しかし、この仮説では、ニューカレドニアのシラスウナギの接岸時期と脊椎骨数の差異を説明することができない。ニューカレドニアの個体群の脊椎骨数は、ニュージーランドの *A. australis schmidtii* と同じであり、Jellyman (1987) の仮説に従うと、これらは同じ海域で生まれ、同じ輸送経路でニュージーランドとニューカレドニアまで運ばれると考えられる。すなわち、シラスウナギの接岸は、オーストラリアの後に、ニュージーランドおよびニューカレドニアの順に起こると予想される。しかし、Ege (1939) は、*A. australis* のシラスウナギはニューカレドニアに4~7月、ニュージーランドに7~11月、オーストラリアに3~11月に接岸するとしている。つまり、*A. australis* のシラスウナギは、まずニューカレドニアに接岸し、次いでオーストラリア、ニュージーランドの順に接岸する。Jellyman (1987) の単一繁殖集団仮説では、オーストラリアとニュージーランドの *A. australis* 個体群に認められる生態学的、形態学的な差異を説明することができないのである。

一方で、本章で明らかになった *Anguilla australis* の集団構造は、形態学的、生態学的差異を容易に説明する。*A. australis australis* と *A. australis schmidtii* は、遺伝的に異なる繁殖集団であると結論されるので、形態的、生態的差異があっても全くおかしくないのである。ただし、ニューカレドニアの接岸に関しては依然不明であり、今後は、ニューカレドニアや Lord Howe 島、Norfolk 島など、タスマン海の中の地点の標本を遺伝的、形態学および生態学的解析に加えることにより、*A. australis* の詳細な集団構造が明らかになるものと考えられる。さらに今後、調査航海が多数行われるようになれば、*A. australis* 2 亜種の詳細な産卵場の位置、および仔魚の輸送経路が明らかになるものと期待される。

第5章 系統関係

ウナギ属魚類 18 種・亜種は、熱帯を中心に世界中に広く分布する (図 5-1, Ege 1939)。このウナギ属魚類の進化の道筋を明らかにするため、これまでに多数の系統推定が行われた (Tagliavini et al. 1995, 1996, 青山ら 1996, Aoyama and Tsukamoto 1997, Tsukamoto and Aoyama 1998, Bastrop et al. 2000, Lehmann et al. 2000, Aoyama et al. 2001, Lin et al. 2001)。しかしながら、ウナギ属魚類の系統関係は未だ明らかでない。その最大の原因は、これまでの研究で解析に使用された遺伝子領域の塩基配列が短く、十分な系統情報が得られていなかったためと考えられる。そこで本章では、ウナギ属魚類全種の mtDNA 全塩基配列を決定し、それらに基づいて系統関係を解明することを目的とした。また、第2章において、4 個の繁殖集団が検出された *Anguilla marmorata* についても、mtDNA の cytochrome *b* (以下、*cyt b*) 遺伝子を用いて、種内における集団間の系統関係を明らかにすることも目的とした。

第1節 材料

ウナギ属魚類の系統解析には、Ege (1939)、および Castle and Williamson (1974) に基づくウナギ属魚類 18 種・亜種を用いた。このうち、*Anguilla japonica* は既報 (DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. AB038556; Inoue et al. 2001a) の塩基配列を用いた。標本は、当研究室において、1993 年から 2000 年にかけて世界中で採集された 1,214 個体のウナギ属魚類のうち、それぞれ分布域の中心付近で得られた黄ウナギ各種 1 個体を用いた。ただし、*A. anguilla* については、2001 年にフランスで採集されたシラスウナギ 1 個体を用いた (表 5-1)。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。

Anguilla marmorata の集団系統解析には、第2章で用いたものと同じ標本を用いた。すなわち、13 地点から得た計 455 個体である (表 2-1 を参照)。

第2節 方法

第1項 DNA 抽出

Anguilla anguilla, *A. bicolor bicolor*, *A. bicolor pacifica*, および *A. rostrata* の 4 種・亜種につ



図5-1 ウナギ属魚類の分布域 (太線, Ege 1939). 番号は表5-1に示した通りで, それぞれの種のおよその分布域に対応する. 広範囲に分布する種については, 複数回, 番号を記載した.

表5-1 ウナギ属内の系統解析に用いた標本の採集地点, 採集日時, 全長, およびAccession No.

番号*	種	標本採集地点	採集日時	全長 (mm)	Accession No.
1	<i>A. anguilla</i> **	Vilaine, France	23 June 2003	~ 70	AP007233
2	<i>A. australis australis</i>	Burnett River, Australia	8 January 1998	617	AP007234
3	<i>A. australis schmidtii</i>	Christchurch, New Zealand	2 August 1999	635	AP007235
4	<i>A. bicolor bicolor</i>	Yangon, Myanmar	23 March 1999	609	AP007236
5	<i>A. bicolor pacifica</i>	Cebu, Philippines	2 March 2000	554	AP007237
6	<i>A. borneensis</i>	Mahakam River, Borneo, Indonesia	14 June 1996	432	AP007238
7	<i>A. celebesensis</i>	Moaat lake, Sulawesi, Indonesia	6 June 1996	543	AP007239
8	<i>A. dieffenbachii</i>	Christchurch, New Zealand	2 August 1999	558	AP007240
9	<i>A. interioris</i>	Saba River, Weaku, Papua New Guinea	15 September 1996	448	AP007241
10	<i>A. japonica</i> ***	Tokyo, Japan	-	-	AB038556
11	<i>A. marmorata</i>	Hitu River, Ambon, Indonesia	22 December 1997	556	AP007242
12	<i>A. megastoma</i>	Ouagou River, St. Laurent, New Caledonia	13 June 1997	677	AP007243
13	<i>A. mossambica</i>	Ikopa River, Madagascar	7 December 1996	506	AP007244
14	<i>A. nebulosa labiata</i>	Liowde, Malawi	6 November 1998	402	AP007245
15	<i>A. nebulosa nebulosa</i>	Chittagong, Bangladesh	1 June 1995	408	AP007246
16	<i>A. obscura</i>	Boys Town, Fiji	21 August 1995	487	AP007247
17	<i>A. reinhardtii</i>	Burnett River, Australia	8 January 1998	578	AP007248
18	<i>A. rostrata</i>	Maryland, USA	5 November 1999	324	AP007249

*, 図5-1, 2の図中の番号に対応する

**, シラスウナギ

***, Inoue et al. (2001a)

いては、QIAGEN QIAamp Tissue Kit (QIAGEN) を用い、製品付属の説明書 (QIAGEN) に従って全 DNA を抽出した。これ以外の 13 種・亜種については、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) に組織片の一部を溶解した後、フェノール・クロロホルム法により全 DNA を抽出した (渡邊 2001a)。

第2項 ロング PCR

Anguilla japonica を除くウナギ属魚類全種については、まず mtDNA を精製するため、7 個の魚類汎用プライマー (Miya and Nishida 1999, 2000, Kawaguchi et al. 2001) と、新たに設計した 1 個のウナギ目汎用プライマー、3 個のウナギ属汎用プライマー、および 18 個の種特異的プライマーを用いてロング PCR (Cheng et al. 1994, Miya and Nishida 1999) により mtDNA 全長の増幅を行った。ウナギ属汎用および種特異的プライマーについては、*A. japonica* (Inoue et al. 2001a) と、ウナギ属魚類他種の塩基配列を参考にして設計した (表 5-2, Minegishi et al. 2005)。

ロング PCR には Model 9700 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) を使用し、反応は 98°C で 5 分間加熱した後、熱変性 98°C 10 秒、アニーリングと伸長反応 68°C 16 分の過程を 30 回繰り返した。反応液は、10 \times LA PCR buffer (TaKaRa) 2.5 μ L, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP 各 0.2 mM, フォワードおよびリバースプライマー各 0.2 μ M, LA Taq DNA polymerase (TaKaRa) 1.25 unit, および全 DNA 溶液 5.0 μ L で、これに滅菌水を加え最終容量を 25.0 μ L とした。PCR 産物は、1.0 % 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によりバンドの有無と増幅断片の長さを確認した。

第3項 DNA 断片の増幅と塩基配列の決定

mtDNA 全塩基配列決定のための PCR の鋳型として、前項で得られた各種の PCR 産物を、電気泳動像のバンドの濃さにより 5~20 倍に希釈した。プライマーは原則として、魚類汎用プライマー計 147 個を用いた (Miya and Nishida 1999, 2000, Inoue et al. 2000, 2001a,b,c,d, Ishiguro et al. 2001, Kawaguchi et al. 2001)。これらによって増幅できなかった領域については、ウナギ属汎用プライマー 1 個と、新たに設計した計 60 個の種特異的プライマーを用いて、

表5-2 ウナギ属魚類全種のロングPCRのために新たに設計したプライマーとその配列

フォワードプライマー	リバーズプライマー	配列 (5' → 3')	配列 (5' → 3')
AnUn-16S-L ^{*2}	CCC GCC TGT TTA CCA AAA ACA TCG CCT CCT G	Mega-CO1-H ^{*8}	GGG GTT TCT CAT TTG ACA GCC CCT CCG TGT
AnUn-16S-L2 ^{*2}	CCT AGT CAA TGA AAT TGA TCT GCC CGT GCA	Inte-CO1-H ^{*6}	TGT GGG AAG AAG GTC AGG TTT ACC CCT ACG
Mega-ND2-L ^{*8}	GGC CTT AAT AGA TGG GAG GGC CTC GAT CCC	Obsc-CO1-H ^{*10}	CCG AAG TGT ACT TTG GTT CAT GTG TCG TGC
Obsc-CO1-L ^{*10}	CGT AGA CAC CCG TGC TTA CTT CAC TTC TGC	Auau-ATP-H ^{*3}	ACT GCG CCT GTT AGG GGT CAT GGG CTT GGG
Inte-CO1-L ^{*6}	AGA CAC CCG TGC TTA CTT CAC TTC CGC CAC	Marm-ATP6-H ^{*7}	GTT GAA TTA GTA GAT GGC CTG CTG TTA GGT
Obsc-ND6-L ^{*10}	ACC CCA CAA CCA CCA GCA GCT GCC AAC ACC	Moss-ATP-H ^{*9}	GGC CTG CTG TCA GGT TCT GCT GTA ACG TCG
Auau-CYB-L ^{*3}	CCC AGT AGG ACT GAA CTC CGA CGC AGA CAA	Cele-CO3-H ^{*5}	CGG CTA CTG CGC CTG TTA GGG GTC ATG GGC
Cele-CYB-L ^{*5}	GCC GTC CCA TAC GTA GGA GAC TCC CTA GTC	Rein-CO3-H ^{*11}	CGG CTA CTG CGC CTG TTA AGG GTC ATG GGC
Marm-CYB-L ^{*7}	ACC CAG TAG GAT TGA ACT CCG ACG CGG ACA	AfUn-Gly-H ^{*1}	GGA AGT CAT TTG TAT TGA AGT TGA TAC TAG AAA GAT
Rein-CYB-L ^{*11}	GAT GCC CTA GTG GAT CTA CCA ACC CCC TCC	Born-ND5-H ^{*4}	ACT ATT ATA AGG CCG AGC TGG CTG GAT GTT
		Mega-ND5-H ^{*6}	CTC AGC TGT TTA GGT TTA TTG CCA TTC AGG
		AnUn-CYB-H ^{*2}	TTG GAT GGG GTT GGT AGA TCC ACT AGG GC

^{*1}, ウナギ目汎用プライマー；^{*2}, ウナギ属汎用プライマー；^{*3}, *A. australis australis* 特異的プライマー；^{*4}, *A. borneensis* 特異的プライマー；^{*5}, *A. celebesensis* 特異的プライマー；^{*6}, *A. interioris* 特異的プライマー；^{*7}, *A. marmorata* 特異的プライマー；^{*8}, *A. megastoma* 特異的プライマー；^{*9}, *A. mossambica* 特異的プライマー；^{*10}, *A. obscura* 特異的プライマー；^{*11}, *A. reinhardtii* 特異的プライマー

PCRによる増幅を行った(表5-3, Minegishi et al. 2005). PCRにはModel 9700 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) を使用し, 反応は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 45秒の過程を30回繰り返した. 反応液の組成は, 10×PCR buffer (TaKaRa) 1.5 μL, dNTP 各0.2 mM, 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) 0.3 unit, および鋳型DNA溶液0.6 μLで, これに滅菌水を加え最終容量を15.0 μLとした. PCR産物は, 前項と同様に確認した.

Anguilla marmorata の *cyt b* 遺伝子の塩基配列の全長を決定するため, 新たに3対, 計6個のプライマーを設計した(表5-4). PCRの反応液組成および反応条件は, 第2章第2節第2項と同様とした.

以上により得られたPCR産物は, 第2章第2節第2項に準じ, 塩基配列の決定を行った.

第4項 系統解析

種間の系統推定

外群には, ウナギ目アナゴ科のマアナゴ *Conger myriaster* (AB038381; Inoue et al. 2001b), ホラアナゴ科のイラコアナゴ *Synaphobranchus kaupii* (AP002977; Inoue et al. 2004), ノコバウナギ科のノコバウナギ *Serrivomer sector* (井上 2001) を用いた.

DNASIS ver 3.7 (Hitachi Software Engineering) と MacClade ver. 4.0 (Maddison and Maddison 2000) を用いて, 塩基配列の編集と相同性の確認を行った. 13個のタンパク質コード領域は, *Anguilla japonica* の塩基配列 (Inoue et al. 2001a) とアミノ酸配列に基づき決定した. 22個のtransfer RNA (以下, tRNA) 遺伝子については, tRNAのクローバー葉二次構造 (Kumazawa and Nishida 1993) とアンチコドンに基づきその領域を判別した. 2個のrRNA遺伝子は, タンパク質コード領域と同様, *A. japonica* (Inoue et al. 2001a) および他のウナギ属魚類の塩基配列との類似性や二次構造 (Gutell et al. 1993, Gutell 1994, Wang and Lee 2002) を比較することにより, その領域を判別した.

ベイズ法による解析には, MrBayes 3.04b (Ronquist and Huelsenbeck 2003) を用いた. 塩基置換モデルには, Modeltest 3.06 (Posada and Crandall 1998) により最適と選定された GTR (general time reversible) +I+Γモデル (Yang 1994) を採用した. 解析時の設定は以下の通りとした; "lset nst=6", "rates=invgamma (I+Γ)", "mcmc ngen=1000", "samplefreq=100", "mchains=4", "unlink", "prset ratepr=variable". 得られたベイズ系統樹の安定性を確認するため,

表5-3 ウナギ属魚類全種のmtDNA全塩基配列決定のために新たに設計したプライマーとその配列

フォワードプライマー	配列 (5' → 3')	リバースプライマー	配列 (5' → 3')
Inte-L379-CR ^{*7}	CTC AGC TCG CGG TAG TAA AG	Obsc-H948-12S ^{*13}	ACT GCT GAA CTC CCT TGT GG
Cele-L1069-12S ^{*6}	CAA ATA TCA TCC GCC AGG GG	Nene-H3659-ND1 ^{*12}	CCC AGG ATT GAG TAG ACT GC
Ausc-L2988-16S ^{*4}	TCC CAG AGT CCA TAT CGA CG	Obsc-H6830-CO1 ^{*13}	CTC CTA TGG ACA GAA CAT AG
Nene-L3227-16S ^{*12}	CTC GCC GTC GCA TTC CTG AC	Inte-CO1-H ^{*7}	TGT GGG AAG AAG GTC AGG TTT ACC CCT ACG
Rein-L3280-16S ^{*14}	CGC CGT CGC ATT CCT GAC AC	Inte-H7345-CO1 ^{*7}	GTG GTA TGG CGG AGG ACA TC
Angu-L3511-ND1 ^{*2}	CTC ACA TCA TTA ATC CTC TA	Inte-H9797-CO3 ^{*7}	ACT GCT AAG AAG GTG GAG CC
Rost-L3513-ND1 ^{*15}	CAT CAT TAA TCC TCT AGC AT	Ausc-H12234-Ser ^{*4}	GGA CTA GCA ATT CTT CAG GC
Born-L4768-ND2 ^{*5}	CAC AAT CCT TGC CCT AGG AC	Inte-H14078-ND5 ^{*7}	TAG CAG GAT ATG GTG GGT CG
Angu-L5362-ND2 ^{*2}	CAC ACT AGC AAC AGG ATG AA	Nela-H14608-ND6 ^{*11}	GTA GCT TCT AAT CCT GCT CC
Rost-L5396-ND2 ^{*15}	TAC AGC ACT AAC TAT GGC CA	Rein-H14821-CYB ^{*14}	CAT AAT CCT AGG AGA GAG CC
Obsc-L5539-ND2 ^{*13}	CCT GCA GGA CTC TAT CCC AC	Auau-H15864-CYB ^{*3}	GGC TAT TAA GCT ACT AGG GC
Nela-L5597-ND2 ^{*11}	CCT GAA TGC AAC TCA GAT GC	AnUn-CYB-H ^{*1}	TTG GAT GGG GTT GGT AGA TCC ACT AGG GC
Rein-L6028-CO1 ^{*14}	TGT CAT CGT CAC AGC GCA TG	Auau-H16574-CR ^{*3}	GTT AAT GCT CGG CTT GGT GG
Moss-L6059-CO1 ^{*10}	CGC CCT TCT TGG AGA TGA TC	Rein-H16608-CR ^{*14}	TCT ACC TTG GCG GAC TTT CC
Angu-L6252-CO1 ^{*2}	TTC TTG GAG ATG ACC AAA TT	Mega-H16626-CR ^{*9}	GGT GTT CTA CAT GTA AGA TG
Cele-L6771-CO1 ^{*6}	TGG TCT GAG CAA TGA TGG CC	Nela-H16626-CR ^{*11}	GAA GGT GTC CCA CAT GTA AG
Inte-L6972-CO1 ^{*7}	GGG CTT TGT ACA CTG ATT CC	Marm-H16651-CR ^{*8}	TTG ACG GAC TTT TAC CGA GG
Nene-L7630-CO2 ^{*12}	GTT AGG TTT CCA AGA CGC AG	Cele-H16642-CR ^{*6}	TAT GTT CCA CCT TCG TGG GC
Moss-L7889-CO2 ^{*10}	CTA GGA CTG CTC CCA TAC AC	Rost-H338-CR ^{*15}	TAT GTT CTA CCC TGG CGT AC
Rost-L8607-Lys ^{*15}	TAG TGA CAT GCC ACA ATT AA	Angu-H486-CR ^{*2}	TTG ACG AAA ATC TAA CGG GG
Rein-L10914-ND4 ^{*14}	GAG ATA GGA TGA TCC ACC AC		
Obsc-L10947-ND4 ^{*13}	TCA CTT CCA CTG CTT GTT GC		
Marm-L10974-ND4 ^{*8}	CCT ATC AAC GCC ACT TCT AG		
Ausc-L10979-ND4 ^{*4}	CTA TCC TGC TGG CTT CTC CC		
Inte-L11421-ND4 ^{*7}	ACA AGC TAT GAT GAG CAG GC		
Rost-L11443-ND4 ^{*15}	CAG AAC GAC TCA ATG CAG GA		
Nene-L11764-ND4 ^{*12}	ACT ATT AGC TCG AGG TCT GC		
Born-L12982-ND5 ^{*5}	CAC ACT CCC TTC TCA TAG GC		
Moss-L13028-ND5 ^{*10}	CCG CCC AAT TCG GAC TGC AC		
Inte-L13897-ND5 ^{*7}	CAT GCT AGG CTA CTT CCC AG		
Obsc-L14331-ND5 ^{*13}	CTA AAA TCT CCA CGC AAC AC		
Rein-L14431-ND6 ^{*14}	CTC AGC GGC AAG AGC AGC AG		
Marm-L14540-ND5 ^{*8}	GCA GCT GCC AAC ACC AAC CC		
Angu-L15362-CYB ^{*2}	ACG GCT CAT ACC TTT ACA TA		
Marm-L15447-CYB ^{*8}	TCC TAC AAA GAC CTG CTA GG		
Nela-L15718-CYB ^{*11}	GGA ATA CCA GTA GAA CAC CC		
Mege-L15968-CYB ^{*9}	CAA CTC CCA AAG CTG AGA TC		
Angu-L16188-CR ^{*2}	ACA TGA ACT CCT AAA CAC GG		
Rost-L16340-CR ^{*15}	GAA AGT CCT TGA TCC AGC TG		
Obsc-L16351-CR ^{*13}	CAG CAT GAA ATT CTC CAT AC		
Marm-L16416-CR ^{*8}	AAG CGC AGT AAG AAA CCA CC		

*; プライマーの位置はヒトのmtDNA上での位置 (Anderson et al. 1981) に相当する。LとHはそれぞれlight鎖、heavy鎖を示す。

*1 ウナギ属汎用プライマー; *2 *A. anguilla* 特異的プライマー; *3 *A. australis australis* 特異的プライマー; *4 *A. australis schmidtii* 特異的プライマー; *5 *A. borneensis* 特異的プライマー; *6 *A. celebesensis* 特異的プライマー; *7 *A. interioris* 特異的プライマー; *8 *A. marmorata* 特異的プライマー; *9 *A. megastoma* 特異的プライマー; *10 *A. mossambica* 特異的プライマー; *11 *A. nebulosa labiata* 特異的プライマー; *12 *A. nebulosa nebulosa* 特異的プライマー; *13 *A. obscura* 特異的プライマー; *14 *A. reinhardtii* 特異的プライマー; *15 *A. rostrata* 特異的プライマー

表5-4 *cyt b* 遺伝子の塩基配列決定に使用したプライマーとその配列

プライマー対	プライマー名	配列 (5' → 3')
1	L14373-CYB	AAC TCA TAA TTT CTA CCC GG
	H15000-CYB	AGT GGA ATG CGA AGA ATC G
2	L14842-CYB	GAT ATG TAC TCC CAT GAG G
	H15479-CYB	TGG TAT YCC TCC RAT TCA TG
3	L15348-CYB	CTA GTM CTA ATA GTA GTA CC
	H15710-CYB	GGG AGT TGA GGA TGG AAG

generationの回数に伴う尤度の変化を調べ、同様の解析を独立に3回行った。約50000 generations (-Ln=71890)で尤度が明らかに安定したため、それ以前に得られた1000本の系統樹を捨て、残りの9001本の系統樹から合意樹(以下、ベイズ合意樹)と事後確率を得た。

最尤法による解析は、PAUP* 4.0b10 (Swofford 1998)を用いて行った。塩基置換モデルには、GTR+I+ Γ モデル (Yang 1994)を用いた。各種パラメータはベイズ合意樹から算出した。最尤樹におけるブートストラップ確率は計算に膨大な時間を要するため、算出しなかった。

集団の系統推定

*Anguilla marmorata*の種内の系統関係を推定するため、cyt *b* 遺伝子の全長の塩基配列を用いた。外群は、上記の方法によって得られたウナギ属他種のmtDNA全塩基配列からcyt *b* 遺伝子の塩基配列を切り出して用いた。第2章第2節第2項と同様に遺伝距離を算出し、近隣結合法 (Saitou and Nei 1987)に基づき遺伝子系統樹を推定した。

第3節 結果

第1項 種間の系統関係

ウナギ属魚類全種のmtDNA全塩基配列から、タンパク質コード領域11,394サイト、tRNA遺伝子領域1,468サイト、rRNA遺伝子領域2,325サイトの計15,187サイトを解析に用いた。なお、調節領域は種間で長さの変異が著しく、サイト間の相同性が確認できるような正確なアラインメントを行うことはできなかつたため、解析から除外した。

ベイズ合意樹(図5-2)では、ウナギ属魚類の中で、まず、*Anguilla mossambica*の系統がもっとも早く分岐した。次いで、以下の2つの大きな系統に分かれた；(1) *A. borneensis*, *A. anguilla*, *A. rostrata*, *A. dieffenbachii*, *A. australis australis*, *A. australis schmidtii*の計6種・亜種、(2) *A. japonica*, *A. reinhardtii*, *A. celebesensis*, *A. megastoma*, *A. marmorata*, *A. nebulosa nebulosa*, *A. nebulosa labiata*, *A. interioris*, *A. obscura*, *A. bicolor bicolor*, *A. bicolor pacifica*の計11種・亜種。前者の(1)の系統のなかでは、インドネシア・ボルネオ島にのみ生息する*A. borneensis*が最も早く派生した。これに続き、地理的に大きく離れた大西洋に分布する2種(*A. anguilla*, *A. rostrata*；以下、大西洋グループ)と、オセアニアに分布する3種・亜種(*A. dieffenbachii*, *A. australis australis*, *A. australis schmidtii*；以下、オセアニ

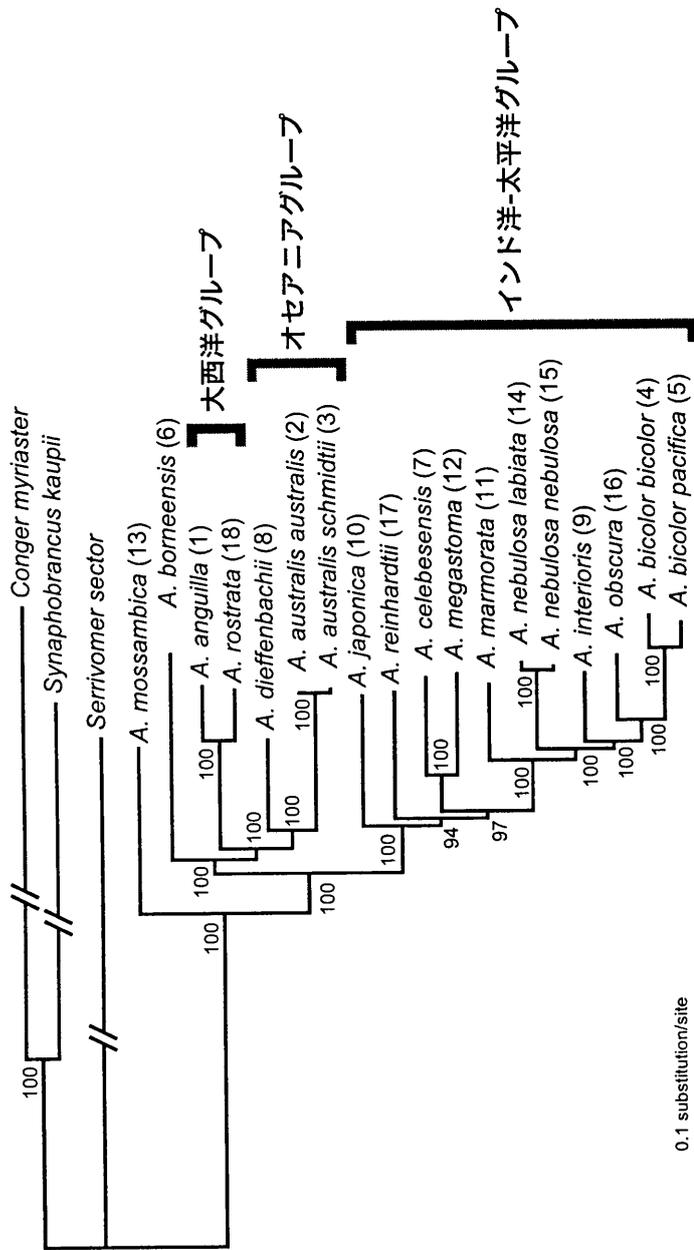


図5-2 mtDNA全塩基配列に基づくウナギ属魚類のベイズ合意樹。内枝近傍の数字はベイズ事後確率を示し、種名の後ろの数字は、図5-1中の各種のおよその分布域に対応する。

アグループ) が分岐した。後者のインド洋から太平洋に生息する種から成る (2) の系統 (以下, インド洋-太平洋グループ) では, 上記の 11 種・亜種が順次派生した。このうち, *A. celebesensis* と *A. megastoma*, *A. nebulosa nebulosa* と *A. nebulosa labiata*, *A. bicolor bicolor* と *A. bicolor pacifica* はそれぞれ姉妹群となった。2ヶ所を除き, すべての枝は事後確率 100 % で支持された。なお, 複数回独立に解析を行った場合も, 同じ樹形の合意樹を得た。

最尤法による系統樹では, *Anguilla japonica* と *A. reinhardtii* の分岐の順序が逆であった以外は, ベイズ合意樹と完全に同じ樹形の系統樹を得た。

第2項 集団間の系統関係

Anguilla marmorata については, 計 237 個体について *cyt b* 遺伝子の全長の塩基配列, 計 1,140 サイトを決定した。これらの塩基配列中に合計で 78 サイトの変異が認められ, これによって, 237 個体の塩基配列から 90 のハプロタイプを得た。

前項のウナギ属種間の系統推定において, *Anguilla marmorata* に最も近縁であることが示された *A. nebulosa nebulosa* を外群として, ハプロタイプ間の遺伝距離 (Hasegawa et al. 1985) を算出し, 図 5-3 に示した系統樹を得た。これによると, *A. marmorata* は, その種内に 3 つの大きな系統を含んでいた (図 5-3 中 A~C)。すなわち, 最初に 1 ハプロタイプが派生し (図 5-3 中 A), 続いて, 大きな 2 つの系統に分かれた (図 5-3 中 B,C)。系統 B に比べ, 系統 C では, ハプロタイプ間, および系統間の樹長が非常に短かく, 多分岐になった箇所が多かったため, 繁殖集団の詳細な分化の順序は分からなかった。

この系統関係にハプロタイプの地理情報を合わせると, 系統 A と B のハプロタイプが北太平洋集団由来であった。つまり, 北太平洋集団は, 側系統群であることが明らかになった。系統 A は日本 (和歌山) に由来するハプロタイプで, 他のいずれの集団, および北太平洋集団内の他のいずれの地点とも共有していないものであった。また, 北太平洋集団のなかで, さらに地点ごとにまとまる傾向は認められず, 北太平洋集団と他の 3 集団は, いずれもハプロタイプを共有していなかった。系統 C では, 南太平洋集団 (ニューカレドニア) 由来の 1 ハプロタイプが最初に分岐した。次に, グアムの 1 ハプロタイプが派生した (図 5-3 中, 矢印)。続いて, 南太平洋集団とインド洋集団 (図 5-3 中, 黒または白丸) のハプロタイプが分岐したが, これらのハプロタイプは集団ごとに明瞭にはまとまらなかった。また, いくつかのハプロタイプは, 南太平洋集団, インド洋集団, マリアナ集団の異なる集団間で共有されていた。さらに, 第 2

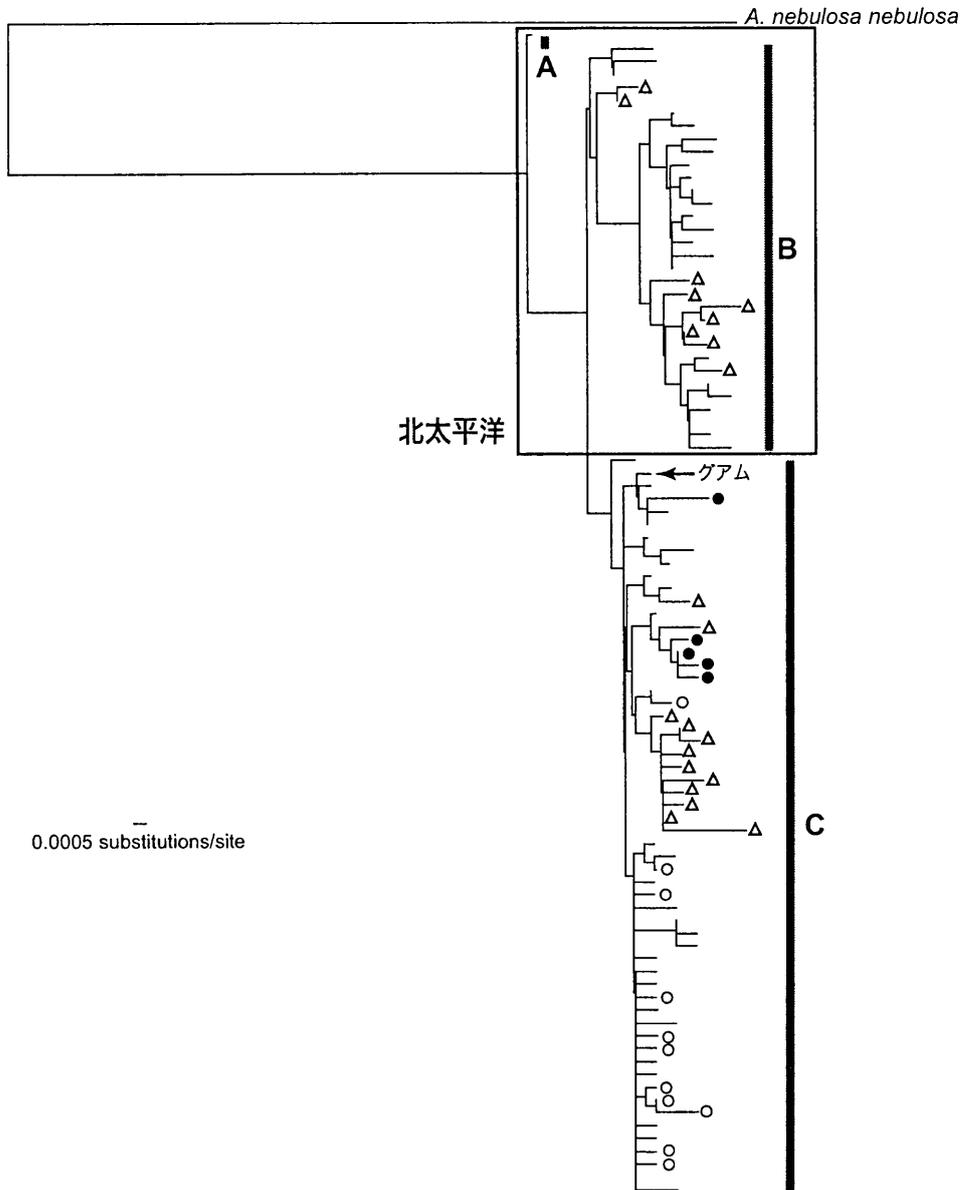


図5-3 *cyt b*遺伝子領域の遺伝距離 (HKYモデル; Hasegawa et al. 1985) に基づく *A. marmorata* の遺伝子系統樹。枠内は北太平洋集団のハプロタイプを、枠外の枝のうち、黒丸はインド洋西部、白丸はインド洋東部、三角はアンボン、シンボルのないものは南太平洋のハプロタイプをそれぞれ示す。

章において示されたよう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アンボンの標本は、系統BおよびCに出現した(図5-3中、白三角)。

第4節 考察

第1項 系統関係

種間の系統関係

本章では初めてウナギ属魚類全種を扱い、そのmtDNA全塩基配列に基づいて属内の系統推定を行った。得られた系統樹によると、ウナギ属のなかでは *Anguilla mossambica* が最も早く分岐し、大西洋グループ、オセアニアグループ、インド洋-太平洋グループ (*A. borneensis* を除く) の3つの大きな地理的な系統があることが(図5-2)。また、各枝のベイズ事後確率は、ほとんど100%であった。解析方法が異なるため、単純に比較することはできないものの、これは、いずれの先行研究よりも高い統計的支持と考えられる。

これまでのウナギ属魚類の系統関係に関する研究では、アナゴ科のクロアナゴ *Conger japonicus* やノコバウナギ科のヒメノコバウナギ *Stemonidium hypomelas* (Aoyama et al. 2001)、アナゴ科のニラミアナゴ *Ariosoma shiroanago major* (Lin et al. 2001) など、それぞれの研究で用いられた外群は異なっていた。系統推定にあたって、外群として用いるものは、内群にできるだけ近縁なものが望ましい(例えば、Baverstock and Moritz 1996 など)。近年、井上(2001)などにより、ウナギ目魚類内部の系統関係が示されてきており、ウナギ属にもっとも近縁なものはノコバウナギ科であることが明らかになってきた。ウナギ目魚類は非常に大きな分類群であるため(Nelson 1994)、今後の解析によっては、ノコバウナギ科よりもさらに近縁な分類群が明らかになるかもしれない。Aoyama et al. (2001) が指摘した通り、この外群の問題は、選定した種によって大きく樹形が変わることもあるため、今後さらに検討を続ける必要があると考えられた。

本研究で用いた塩基配列は計15,187サイトであり、これまでのウナギ属魚類の系統関係の推定に用いられてきた配列の数~数10倍にもあたる量であった。従来のmtDNAを用いた魚類の高次系統解析(例えば、Ishiguro et al. 2003, Inoue et al. 2004 など)に比べ、互いに近縁なウナギ属内では相同性の不確かなサイトが少なく、mtDNAのほぼ全領域を系統解析に用いることができた。例えば、mtDNAによる解析では、rRNA遺伝子はその相同性の不確かさから系

系統解析に含めないこともしばしばあるが、近縁な属内ではそのようなサイトは少なく、この領域にも系統推定における情報が含まれることが示唆された。また同様に、科や目といった大きな分類群の系統関係を解くためには、tRNA 遺伝子のステム部分が有効であることが知られている (Kumazawa and Nishida 1993)。しかし、ウナギ属内においては、tRNA 遺伝子のステム部分はきわめて保存的で、系統推定に有用な情報はないに等しいのに対し、逆にループ部分は塩基置換が比較的多く認められ、さらに長さの変異が少ないため正確なアラインメントが可能である。以上より、近縁なウナギ属内では、これまでの高次分類群の解析において除外されてきた領域 (rRNA 遺伝子、tRNA 遺伝子ループ部分) にも、系統推定を行う上で有用な情報が含まれると考えられた。調節領域については、長さ、塩基置換ともに変異の程度が著しく、近縁な同属の種間レベルでも系統解析に用いることはできないことが示された。しかしながら、第2~4章で用いたように、調節領域は、集団構造の解析には有効であると考えられた。

ウナギ属では、青山ら (1996) により、8種のウナギ属魚類の *cyt b* 遺伝子の塩基配列 (410塩基対) を用いて、初めて系統推定が行われた。その後、Bastrop et al. (2000) は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (約600塩基対) を用いて、ウナギ属魚類8種の系統推定を行った。Bastrop et al. (2000) により得られた系統関係は、本章で示したものと基本的によく似ている。しかし、Bastrop et al. (2000) の系統樹は、ウナギ属魚類全体の系統関係を推定するには種数が少なすぎ、統計的支持もきわめて低いと考えられる。さらに、*Anguilla mossambica* と *A. reinhardtii* の塩基配列は、同種と思われるほど変異が少ない (Bastrop et al. 2000)。前者はアフリカ大陸東岸に生息し、体表に斑紋を持たないが、後者は南太平洋に生息し、斑紋を持つことから、この2種の同定を誤る可能性は低いと考えられる。このことから、青山 (2001) は、*A. mossambica* と *A. reinhardtii* の間で、単純な実験上のミスが起こった可能性があるとは指摘している。Lin et al. (2001) は、12S rRNA 遺伝子と *cyt b* 遺伝子を用いて、ウナギ属魚類12種の系統推定を行った。得られた系統樹の統計的支持 (ブートストラップ確率) は、50% かそれ以下と非常に低いため、ウナギ属の系統関係が十分解けたとは言い難い。さらに Aoyama et al. (2001) は、本章で用いた塩基配列の量のおよそ5分の1にあたる 16S rRNA 遺伝子と *cyt b* 遺伝子の全長の塩基配列を用いて解析を行った。Aoyama et al. (2001) は、まず、外群としてウナギ目魚類を含めた系統解析を行い、ウナギ属の中で *A. borneensis* の分岐が最も古いことを明らかにし、次に、この *A. borneensis* を外群に、残りのウナギ属他種を内群として、ウナギ属内の系統推定を行った。しかしながら、最初の解析において、*A. borneensis* の分岐が最も古いと結論するほどには、統計的支持は高くない (ブートストラップ

確率 62 %，Aoyama et al. 2001)。そのような種を外群として用いた場合，内群となるウナギ属魚類の残りの種の系統関係は正確に推定することができない可能性があると考えられる。さらに，*A. marmorata* の姉妹種となった *A. nebulosa labiata* については，形態形質による同定の誤りとしている（Aoyama et al. 2001）。以上のような先行研究で得られた系統樹と比較して，本研究で得られた系統関係は，きわめて信頼性の高いものと考えられる。

集団間の系統関係

Anguilla marmorata の種内の系統関係を推定するため，本章では *cyt b* 遺伝子を用いた。種内の変異を調べるには，mtDNA のなかでは分子進化速度の大きな調節領域（Brown et al. 1979）が適当であると考えられる。しかしながら，調節領域は分子進化速度が大きいために，ウナギ属魚類の他種間では相同性を確認することがきわめて困難である。つまり，*A. marmorata* の種内では相同性を確認することができても，外群としてウナギ属他種を用いる場合，他種との相同性が確認できない。他方，*cyt b* 遺伝子は，タンパク質コード領域であるためコドンの読み枠があるばかりでなく，従来から系統解析（Aoyama et al. 2001, Lin et al. 2001）の他，ウナギ属魚類の種同定（若尾ら 1999, Zhang et al. 1999）などにも用いられてきた。そこで本章では，他種との相同性を正確に確認することのできる *cyt b* 遺伝子を用いて，*A. marmorata* の種内の系統解析を行った。

第2章において，*Anguilla marmorata* には，日本からスラウェシ島までを含む北太平洋集団，パプアニューギニアからタヒチに広がる南太平洋集団，インド洋の東西全域にわたるインド洋集団，そして，地理的に北太平洋に位置し，遺伝的には南太平洋集団の特徴を持つマリアナ集団の4つの繁殖集団が存在することが明らかとなった。本章では，ウナギ属内で *A. marmorata* に最も近縁な *A. nebulosa nebulosa* を外群として（図5-2），これらの集団間の系統関係を推定した。その結果，*A. nebulosa nebulosa* と *A. marmorata* 間の樹長に比べ，*A. marmorata* の各集団（ハプロタイプ）間の樹長は非常に短いことや，*A. marmorata* の種内において，多分岐になっている箇所が多いことから，*A. marmorata* の各繁殖集団は系統的に相互に極めて近いことが示された（図5-3）。

得られた系統樹によると，集団間の分岐は必ずしも明瞭ではなかったものの，北太平洋集団が最初に派生し，次いで，南太平洋集団，マリアナ集団，インド洋集団が短時間に派生したと考えられた。また，アンボンのハプロタイプは，異なる系統に由来することが示された。調節領域による遺伝子系統樹（第2章，図2-14）は系統的な意味を持たないものの，北太平洋集団

が他の3集団間と大きく分化している点、また、残りの3集団間の分化が明瞭でないという点、さらにアンボンが、北太平洋集団と南太平洋集団の双方に遺伝的に似ているという点において、本章で得られた系統樹とよく一致している。北太平洋集団は、他の3集団と集団遺伝学的に大きく分化しているが（第2章を参照）、これは、北太平洋集団が *Anguilla marmorata* のなかで古い系統であるため、分岐してから現在までの時間が長く、集団独自の変異を蓄積していることを示しているものと考えられた。また、北太平洋集団は *A. marmorata* のなかで最も早く分岐した系統Aを含むため、他の集団と比較して、その遺伝的多様性が高いと考えられた（第2章を参照）。他方、南太平洋集団、マリアナ集団、インド洋集団は、互いの分化が小さく、遺伝的によく似ているだけでなく、遺伝的多様性も低い（第2章を参照）。これは、ごく最近、これら3つの繁殖集団が適応放散のように短い時間の間に一気に広がったために、集団間の分岐が極めて浅いことによると考えられた。このうち、マリアナ集団は、北太平洋集団ではなく、進化的に南太平洋集団から派生したことが示唆された。アンボンについては、第2章において示されたように、今現在、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だけでなく、*A. marmorata* が集団の分化を始めた当初から、現在のような混在状態が続いていると考えられた。

第2項 ウナギ属魚類の進化

本章第3節において得られたウナギ属内の系統樹（図5-2）と、4つの繁殖集団を持つ *Anguilla marmorata* の種内の系統樹（図5-3）を合わせ、ウナギ属魚類の系統樹を図5-4に示した。

一般に地球規模で分布する生物群では、地理的に隣り合う地点の種（集団）は、系統的にも近いことが示されている（ヘラヤガラ属 *Aulostomus*, Bowen et al. 2001; ウニ *Tripneustes* 属, Lessios et al. 2003）。このため、ウナギ属魚類においても、系統的に近いものは地理分布も近いと考え、従来から系統関係に基づいて進化仮説が提唱されてきた。ウナギ属魚類のほとんどがインド洋から太平洋に分布するのに対し、*Anguilla anguilla* と *A. rostrata* の2種だけが北大西洋に分布することから、この2種の分散経路として、テーチス海仮説（Aoyama and Tsukamoto 1997, Tsukamoto and Aoyama 1998, Bastrop et al. 2000, Aoyama et al. 2001）とパナマ地峡仮説（Lin et al. 2001）の2つが提示されていた。前者では、インド洋の西の端に分布する *A. mossambica* と大西洋グループが姉妹群になったため、ウナギ属魚類の大西洋へ

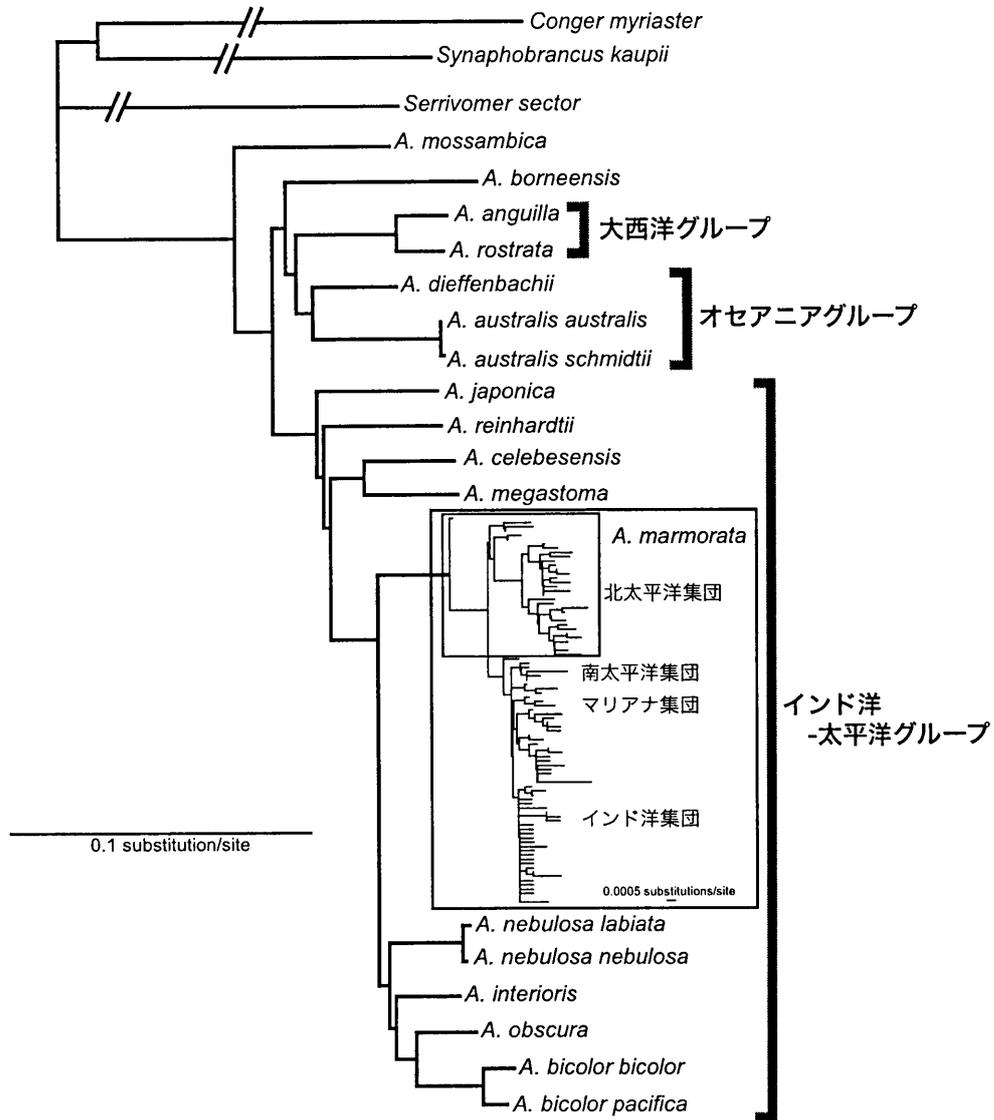


図5-4 ウナギ属魚類の系統樹。枠内は*A. marmorata*の遺伝距離に基づく近隣結合樹で、他はベイズ合意樹。

の分散は太平洋から西周りに起こったと考えられた (Aoyama and Tsukamoto 1997, Aoyama et al. 2001). つまり, およそ6000万年前に現在のインドネシア付近に起源したウナギ属魚類の祖先は, その当時開いていたテーチス海を通過して, 西へと分布域を拡大したというものである. このとき, レプトセファルス幼生が地球をゆっくり一周する環赤道海流に乗って, 分散に寄与したと考えられている (Aoyama et al. 2001). 一方, 後者は, テーチス海仮説とは正反対の太平洋の東の端に分布する *A. megastoma* と大西洋グループが姉妹群になっていた (Lin et al. 2001). そのため, ウナギ属魚類の祖先はおよそ2000万年前に太平洋に起源し, そこから東へと進み, パナマ地峡を通過して大西洋まで分布域を拡大したと考えられている. また, この分布域の拡大は, 成魚が東へ向かって泳いでいったことによるとされている (Lin et al. 2001).

しかし, どちらの分散経路にせよ, 本研究で得られた系統関係 (図5-4) はそれらを支持しない. ウナギ属魚類では, 地理的に遠く離れた大西洋グループとオセアニアグループが互いに姉妹群となっており, その間を埋めるように分布するインド洋-太平洋グループは, まったく別の系統である (図5-4). すなわち, ウナギ属魚類においては, 大きな地理的なグループは各々共通祖先を持つものの, 現在の地理分布は系統関係を反映しない. このことは, ウナギ属魚類の進化過程は, 従来のような地理分布のみに基づいて提示された分散仮説のように単純ではないことを意味する. これまで基本的に考慮されていなかった絶滅や大規模な移動による分布域の変化なども取り入れて, ウナギ属魚類の分散経路や進化の過程については, 再考する必要があると考えられる.

一方, ウナギ属魚類の分岐年代についても, テーチス海が閉じた年代 (Aoyama et al. 2001) と, 分子時計 (Lin et al. 2001, Minegishi et al. 2005) からそれぞれ推定されている. しかし, その推定分岐年代は両者で大きく異なっており, 前者では, ウナギ属魚類は約6000万年前に (Aoyama et al. 2001), 後者では約2000万年前 (Lin et al. 2001, Minegishi et al. 2005) にそれぞれ派生したと推定されている. テーチス海が閉じた年代に基づいて推定したウナギ属魚類の分岐年代は, テーチス海仮説 (前述) に基づいているが, この分散経路は系統樹と各種の分布域から推定したものであり, 他にこの仮説を支持する直接的な証拠があるわけではない. 他方, 分子時計は, 分子進化速度の違いだけでなく, 代謝速度や世代時間にも影響を受けるという問題点がある (Martin and Pulmbi 1993). ウナギ属魚類の代謝速度は遅いことから (斉藤 1925), Minegishi et al. (2005) は, 算出した分岐年代が過少評価である可能性があることを指摘している. また, ウナギ属魚類の化石記録 (白亜紀後期, Patterson 1993) を考えると,

分子時計に基づく年代推定は非常に新しい。逆に、テーチス海から推定した6000万年という年代は、この化石記録とよく一致している (Aoyama et al. 2001)。現在のところ、この化石記録以外に、これらのうちのいずれの推定分岐年代が正しいのか知る手だてはない。そのため、現時点では、分岐年代推定からも、ウナギ属魚類の進化を推察することは難しいと考えられる。

分散経路や分岐年代を明瞭に示すことはできなかったものの、大西洋の2種を除くすべてのウナギ属魚類がインド洋から太平洋に生息することを考えると、現在のインド洋から太平洋に相当する辺りにウナギ属魚類の祖先が派生したと考えるのが自然であろう。およそ2000万年前には概ね現在の大陸配置が完成したが (Briggs 1995)、更新世 (1~2万年前) には、地球の寒冷化による海面の低下に伴い、スマトラ島からボルネオ島、ジャワ島が繋がってスダ列島が現れ、オーストラリアとニューギニア島も陸続きになり、インド洋と太平洋の間で交流が分断されたと考えられている (Voris 2000)。また、これらの障壁は、2つの大洋間で海生生物の種や亜種、あるいは集団レベルの分化をもたらすのに十分であったと言われている (Springer and Williams 1990)。そのため、ウナギ属魚類の分岐年代は明らかではないが、この氷期の海面低下は、本属魚類の種分化にも影響を与えた可能性があるだろう。例えば、インド洋の *Anguilla bicolor bicolor* と太平洋の *A. bicolor pacifica* の亜種の分化、もしくは *A. marmorata* の南太平洋集団とインド洋集団の集団分化は、最終氷期の海面低下が引き金になったかもしれない。

Anguilla marmorata についても、その集団分化の過程を推測することは難しいものの、もし、上述のようにインド洋集団と南太平洋集団の分化が氷期の海面低下の影響を受けたとすれば、それよりも以前に太平洋で *A. marmorata* の祖先種が派生したと推測される。そこから南太平洋に分布域を拡大し、そこで繁殖を行うようになったものが生じ、さらにその中から再び北太平洋のマリアナ海域に戻ったマリアナ集団と、インド洋に分布域を上げたインド洋集団が派生したものと考えられる。南太平洋からマリアナ海域へ回帰する海流などは考えづらいため、この集団分化は仔魚の輸送によるものではなく、例えば、南太平洋集団に由来する親魚が偶然、マリアナ海域近辺で産卵するようになったのかもしれない。また、インド洋集団の祖先個体群は、南太平洋からオーストラリア北部、インドネシアを経て、インド洋に侵入した後に氷期を迎え、インド洋で産卵場を獲得したと推測される。そして、海面が再び上昇した後も、その産卵回遊を維持することによって、各々分化していると考えられる。

近年、分子データに加え、化石記録や地史情報などから年代較正点を様々に設定することのできるバイズ法に基づく分岐年代推定 (Thorne et al. 1998, Kishino et al. 2001, Thorne and

Kishino 2002) が盛んに行われている (例えば, Teeling et al. 2003, Inoue et al. 2005 など), ウナギ属魚類は化石記録も乏しく, 年代較正点が非常に限られるため, ウナギ属魚類のみではベイズ法を用いることは難しい. しかし, ウナギ目魚類や他の魚類も含めることで, 年代較正点を増やすことができれば, ウナギ属魚類が派生した年代を知ることも可能になるものと期待される. ウナギ属魚類の進化過程を明らかにするためには, このような分岐年代推定だけでなく, より信頼性のある化石記録や, 実際の種分化の機構として, 生態学的な情報等からウナギ属魚類の種分化を引き起こす具体的な要因を推定することなどが必要となると考えられる.

第6章 分類

ウナギ属魚類には15種が記載されており (Ege 1939, Watanabe 2003) , そのうち3種は、それぞれ2亜種から成る (Ege 1939) . しかし、それらの亜種の扱いは研究者によって異なっている。また、ウナギ属魚類 (表 1-1, 第1章第1節を参照) のみならず、近年、様々な生物種で遺伝的集団構造が明らかにされてきた。そのような明瞭に分かれる複数の繁殖集団を含む種を分類学的にどう扱うのか、未だ統一的な見解は得られていない。

そこで本章では、本研究の第2章から第5章において得られた塩基配列をもとに、集団、亜種、種、それぞれの分類学的階級における遺伝的変異量を調べることにした。これらをウナギ属全体で相互に比較することにより、ウナギ属魚類の分類体系の見直しを行なうことを目的とした。

第1節 材料

第1項 個体群の定義

本章において遺伝的変異量を調べる際の個体群の単位として、「集団」、「亜種」、「種」、および「繁殖集団」を用いた。現在の分類カテゴリーと第2章から第4章までの結果に基づいて、これらの単位を以下の通りに定義した。

「集団」 : 種や亜種カテゴリーよりも分化が小さいと考えられる個体群。

(*Anguilla marmorata* の4個の繁殖集団)

「亜種」 : Ege (1939) によって記載された、それぞれの亜種。

(*A. bicolor bicolor*, *A. bicolor pacifica*, *A. australis australis*, *A. australis schmidtii*)

「種」 : Ege (1939) によって記載された *A. ancestralis* を除く計15種で、集団や亜種を含むもの。

「繁殖集団」 : 第2章から第4章の集団解析において検出された、他と生殖隔離が成立している個体群。

(*A. marmorata* の4集団, *A. bicolor* の2亜種, *A. australis* の2亜種)

例えば、*A. marmorata* の4つの繁殖集団は、4個それぞれを「集団 (例えば、北太平洋集団)」

として扱い、4 集団をすべてまとめて「種 (*A. marmorata*)」とした。

第2項 標本

単一繁殖集団で種を形成する *Anguilla japonica* (吉澤 2006) を、種内の変異量を比較する際の基準として用いるため、台湾、種子島、茨城の3 地点からシラスウナギを24 個体ずつ、計72 個体を採集し、解析に供した(図6-1)。シラスウナギの同定は篠田(2004)に従い、標本の保存は第2 章第1 節と同様に行った。

集団内、集団間、亜種内、亜種間、種内の遺伝的変異量を比較するため、*Anguilla japonica*, *A. marmorata*, *A. bicolor*, *A. australis* の計4 種について、調節領域、*cyt b* 遺伝子、16S rRNA 遺伝子領域の解析を行った。このときの標本は、前述の *A. japonica* に加え、第2~4 章と同じものを用いた。すなわち、*A. marmorata* はアンボンを除く計12 地点、計417 個体(表2-1を参照)、*A. bicolor* は計6 地点、計145 個体(表3-1を参照)、*A. australis* は計2 地点、計73 個体(表4-1を参照)である。なお、*A. japonica* 以外の3 種の調節領域については第2~4 章において、*A. marmorata* の *cyt b* 遺伝子については第5 章において、それぞれ決定した塩基配列を用いた(表6-1)。

種間の遺伝的変異量を調べるため、第5 章で得られたウナギ属魚類のうち、*Anguilla bicolor pacifica*, *A. nebulosa labiata*, *A. australis schmidtii* の3 亜種を除いた15 種(表5-1を参照)各1 個体の塩基配列を用いた(表6-1)。

第2節 方法

第1項 塩基配列の決定

Anguilla japonica の調節領域については、以下の条件でPCR を行い、その後の実験と解析は、第2 章第2 節第2 項に準じた。プライマー対は、L15348-CYB(表5-2を参照)とH84-CR(表2-3を参照)を用いた。反応液は、dNTP 各0.4 mM, 10×PCR buffer (TaKaRa) 2.5 μL, MgCl₂ 2.5 mM, フォワードおよびリバースプライマー各0.4 μM, LA Taq DNA polymerase (TaKaRa) 1.25 unit, および全DNA 溶液5.0 μL に、滅菌水を加えて最終容量を25.0 μL とした。反応条件は、98°C で5 分間加熱した後、熱変性98°C 15 秒、アニーリング

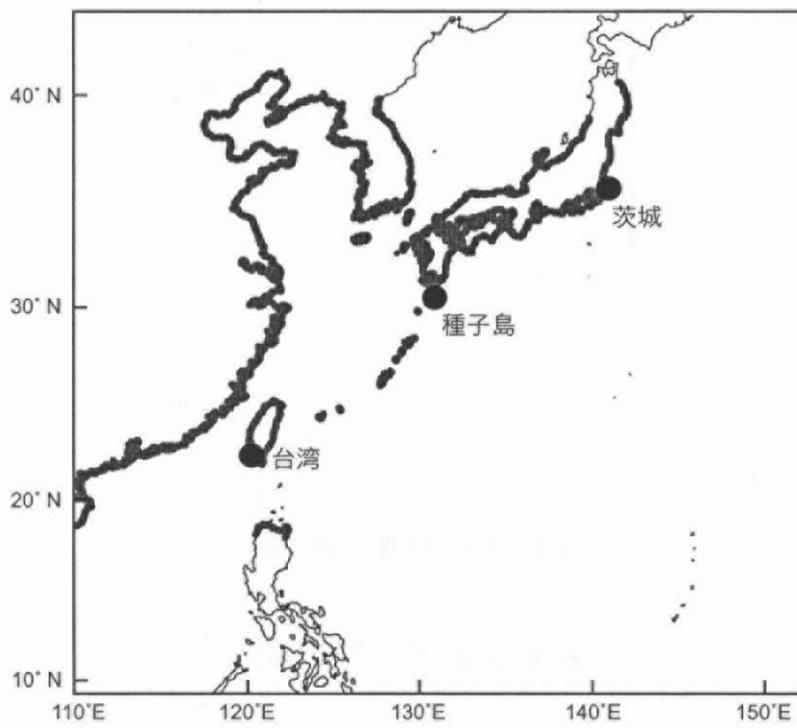


図6-1 *A. japonica*の標本採集地点。太線は*A. japonica*の分布域を示す。

表6-1 解析に用いた遺伝子領域。黒丸は本章で塩基配列を決定したもの、白丸は各分類段階における遺伝的変異量の比較に用いたものを示す。

種	亜種	集団	塩基配列の決定		遺伝的変異量の比較						
			調節領域	cyt b	16S rRNA	(1) 集団内	(2) 集団間	(3) 亜種内	(4) 亜種間	(5) 種内*	(6) 種間
<i>A. japonica</i>			●	●	●						○
<i>A. marmorata</i>		北太平洋	第2章	第5章	●			○			○
		南太平洋	第2章	第5章	●		○				○
		インド洋	第2章	第5章	●		○				○
		マリアナ	第2章	第5章	●		○				○
<i>A. bicolor</i>	<i>bicolor</i>		第3章	●	●				○		○
	<i>pacifica</i>		第3章	●	●				○		○
	<i>australis</i>		第4章	●	●				○		○
<i>A. australis</i>	<i>australis</i>		第4章	●	●				○		○
	<i>schmidtii</i>		第4章	●	●				○		○
<i>Anguilla</i> 15種**			第5章	第5章	第5章						○

*; *A. marmorata* ; (1)+(2), *A. bicolor*, *A. australis* ; (3)+(4)

**、亜種を除く

55°C 15 秒, 伸長反応 72°C 3 分の過程を 30~35 回繰り返した。

Anguilla japonica, *A. bicolor*, および *A. australis* の *cyt b* 遺伝子の塩基配列の決定には, 第 5 章で用いたプライマーと同じものを用いた (表 5-2)。また, 16S rRNA 遺伝子の全長の塩基配列を決定するため, *A. japonica*, *A. marmorata*, *A. bicolor*, および *A. australis* の 4 種汎用プライマーを新たに設計した (表 6-2)。以上のプライマーを用いて, PCR による増幅と塩基配列の決定, 塩基配列の相同性の確認, 変異サイト数の算出は, 第 2 章第 2 節第 2 項と同様に行った。

第 2 項 変異量の比較

遺伝的変異量として, 各遺伝子座について変異サイト数 (範囲と平均) を算出し, それらを本章第 1 節第 1 項で定義した個体群を用いて, 以下のように区分した (表 6-1)。

- (1) 集団内変異; それぞれの「集団」に含まれるすべての個体の総当たりの変異サイト数
- (2) 集団間変異; 異なる「集団」に含まれる個体の総当たりの変異サイト数
- (3) 亜種内変異; それぞれの「亜種」に含まれるすべての個体の総当たりの変異サイト数
- (4) 亜種間変異; 同種内の別「亜種」に含まれる個体の総当たりの変異サイト数
- (5) 種内変異 ; それぞれの「種」に含まれるすべての個体の総当たりの変異サイト数
- (6) 種間変異 ; 異なる「種」に含まれる個体の総当たりの変異サイト数

従って, (1) 集団内変異は, *Anguilla marmorata* の 4 集団それぞれにおいて, 各集団に含まれる個体間の変異を, (2) 集団間変異は, *A. marmorata* の 4 集団のすべての組み合わせにおいて, 異なる集団間の個体間の変異を, (3) 亜種内変異は, *A. bicolor* の 2 亜種, および *A. australis* の 2 亜種の計 4 亜種それぞれに含まれる個体間の変異を, (4) 亜種間変異については, *A. bicolor bicolor* と *A. bicolor pacifica* 間, *A. australis australis* と *A. australis schmidtii* 間の個体間の変異をそれぞれ調べた。 (5) 種内変異は, *A. japonica* の全個体間の変異, および (1) から (4) までで用いた 3 種それぞれの集団内, 集団間, 亜種内, 亜種間変異の量の総和とした。すなわち, *A. marmorata* の種内変異は (1) + (2), *A. bicolor* と *A. australis* の種内変異はそれぞれ (3) + (4) である。 (6) 種間変異は, ウナギ属魚類 15 種の各 1 個体のすべての組み合わせ間の変異を調べた (表 6-1)。

各遺伝子座において, 個体群間の分化程度と分類学的な階級の対応関係を調べるため, (2) 集団間, (4) 亜種間, (6) 種間の変異量を相互に比較した。また, それぞれの分類学的なカテ

表6-2 16S rRNA遺伝子の塩基配列の決定に使用したプライマーとその配列

プライマー対	プライマー名	配列 (5' → 3')
1	L983-16S	AAC ACG GTA AGT GTA CCG G
	H1635-16S	TAT GAT CCT TGT CCT CCT G
2	L1489-16S	GAA ATG AAT GTT AGT TCA GCC
	H2126-16S	GAT TAC GCT ACC TTC GCA C
3	L1976-16S	AGG AGA AGA AGG AAC TCG G
	H2619-16S	ATC GTT GAA CAA ACG AAC CC
4	L2499-16S	AGG GAT AAC AGC GCA ATC C
	H2892-16S	TGT TCA TAG CTG AAG GAG G

ゴリーにおける変異量を調べるため、(1) 集団内、(3) 亜種内、(5) 種内変異を相互に比較した。

第3節 結果

第1項 調節領域における変異量とその比較

本章では、計24個体の *Anguilla japonica* について塩基配列を決定し、合計で973サイトを得た(表6-3)。これを、第2章で塩基配列を決定した *A. marmorata* の253個体(計1,067サイト)、第3章の *A. bicolor* の89個体(計1,000サイト)、第4章の *A. australis* の53個体(計974サイト)とともに変異量を比較した。なお、ウナギ属の種間では、サイト間の相同性を確認することができないので、種間変異は算出できなかった。

Anguilla japonica

Anguilla japonica では、合計で80サイトに変異が認められた。変異の内訳は、転位が64サイト、転換が7サイト、挿入・欠失は11サイトで、変異の大部分は転位で占められていた(表6-3)。これらの変異によって24個体の塩基配列は23のハプロタイプに分けられ、95.8%の個体がそれぞれ異なる配列を持っていた。

(5) 種内変異としてのすべての個体間の変異サイト数の範囲は0~15、平均は9.0サイトであった(表6-4, 図6-2)。

Anguilla marmorata

Anguilla marmorata では、北太平洋、南太平洋、インド洋、およびマリアナ集団のそれぞれの(1) 集団内変異は0~77サイトの範囲で、平均は22.5~33.7であった(表6-4, 図6-2)。(2) 集団間変異は、4集団のすべての組み合わせにおいて1~90サイトの範囲で、平均は35.9~56.4であった。このうち、北太平洋-南太平洋、北太平洋-インド洋、インド洋-マリアナ集団間の3つの組み合わせでは(2) 集団間変異は最小でもそれぞれ22, 27, 18サイトであったのに対し、残りの北太平洋-マリアナ、南太平洋-インド洋、南太平洋-マリアナ集団の3つの組み合わせの(2) 集団間変異の最小値はそれぞれわずかに2, 7, 1サイトであった(表6-4, 図6-2)。

表6-3 調節領域の変異性 (*A. australis* については表4-6と同じ)

種	集団	亜種	地点、地域	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
<i>A. japonica</i>	-	-	茨城	7	966	7	29	23	4	2	0.010
	-	-	種子島 台湾	14 3	962-968 966-967	14 3	50 17	37 15	4 1	9 1	0.010 0.012
<i>A. marmorata</i> *	全体	-	-	24	962-968	23	80	64	7	11	0.010
	北太平洋集団	-	日本 台湾	13 41	1017-1021 1011-1022	13 41	115 231	99 187	3 10	14 40	0.027 0.034
	-	-	フィリピン スラウェシ	12 14	1014-1021 1018-1022	12 14	121 129	102 111	7 6	15 13	0.029 0.032
	-	-	北太平洋集団全体	80	1011-1022	78	284	235	17	50	0.032
	南太平洋集団	-	タヒチ	27	1016-1036	19	141	99	18	28	0.025
	-	-	フィジー	23	1019-1028	23	147	123	8	18	0.026
	-	-	ニューカレドニア	11	1017-1027	11	103	84	6	18	0.028
	-	-	パプアニューギニア	15	1005-1028	15	164	115	18	43	0.035
	-	-	南太平洋集団全体	76	1005-1036	63	274	200	35	60	0.028
	インド洋集団	-	スマトラ レユニオン	36 24	1018-1019 1004-1020	36 24	121 134	106 109	8 8	8 26	0.015 0.029
マリアナ集団 全体	-	-	マダガスカル	28	1004-1020	25	126	94	9	36	0.025
	-	-	インド洋集団全体	88	1004-1020	83	227	188	17	44	0.035
	-	-	グアム	9	1017-1027	7	105	78	7	20	0.032
	-	-	全体	253	1004-1036	231	480	369	65	125	0.047
<i>A. bicolor</i> **	<i>bicolor</i>	-	インド洋東部 インド洋西部 インド洋全体	47 23 70	974-980 973-978 973-980	47 23 70	227 173 277	189 146 229	23 15 33	25 17 32	0.036 0.039 0.029
	<i>pacifica</i> 全体	-	太平洋	19 89	972-977 972-980	19 89	152 350	137 295	13 53	10 44	0.029 0.061
	<i>australis</i> <i>schmidtii</i> 全体	-	オーストラリア ニュージーランド	27 26 53	957-969 957-968 957-969	26 26 52	112 115 155	91 89 126	6 12 15	19 20 25	0.021 0.024 0.023

*、アンボンを除外して、表2-13を改訂
 **、インド洋東西を合わせて表3-10を改訂

表6-4 mtDNAの3つの遺伝子座における集団内, 集団間, 亜種内, 亜種間, 種内, および種間の変異量 (変異サイト数)

比較段階	種	亜種	集団	調節領域			cyt b			16S rRNA		
				範囲	幅	平均	範囲	幅	平均	範囲	幅	平均
(1) 集団内	<i>A. marmorata</i>		北太平洋	0-70	71	28.9	0-9	10	3.3	0-8	9	2.5
				0-77	78	22.5	0-7	8	1.8	0-6	7	1.6
				0-71	72	33.7	0-7	8	1.8	0-5	6	1.5
				0-63	64	26.9	0-3	4	1.1	0-5	6	1.7
(2) 集団間	<i>A. marmorata</i>		北太平洋-南太平洋	22-90	69	53.0	3-11	9	6.9	2-11	10	4.1
			北太平洋-インド洋	27-72	46	56.4	3-12	10	7.1	1-10	10	4.1
			北太平洋-マリアナ	2-67	66	52.0	3-9	7	6.1	1-8	8	4.0
			南太平洋-インド洋	7-83	77	35.9	0-8	9	2.0	0-7	8	1.8
			南太平洋-マリアナ	1-89	89	36.1	0-5	6	2.1	0-7	8	1.9
			インド洋-マリアナ	18-71	54	43.1	0-5	6	2.2	0-6	7	2.0
(3) 亜種内	<i>A. bicolor</i>	<i>A. bicolor bicolor</i>	1-66	66	33.5	0-18	19	6.6	0-12	13	3.7	
			14-39	26	26.8	0-12	13	4.1	0-6	7	2.1	
			0-28	29	16.4	0-8	9	2.9	0-7	8	1.8	
(4) 亜種間	<i>A. australis</i>	<i>A. australis australis</i>	3-31	29	17.9	0-6	7	2.2	0-6	7	1.6	
			82-122	41	97.9	21-34	14	25.5	9-18	10	12.4	
(5) 種内*	<i>A. japonica</i>	<i>A. australis schmidtii</i>	1-29	29	17.5	0-7	8	2.5	0-7	8	1.7	
			0-15	16	9.0	0-7	8	2.4	0-5	6	1.4	
			0-90	91	40.0	0-12	13	3.5	0-11	12	2.6	
			1-122	122	55.1	0-34	35	14.4	0-18	19	7.3	
			0-31	32	17.3	0-8	9	2.5	0-7	8	1.7	
(6) 種間**	<i>Anguilla</i>		-	-	-	48-118	71	88.0	14-58	45	40.9	

**A. marmorata* : (1)+(2), *A. bicolor*, *A. australis* : (3)+(4)

**, ウナギ属15種 (亜種を除く)

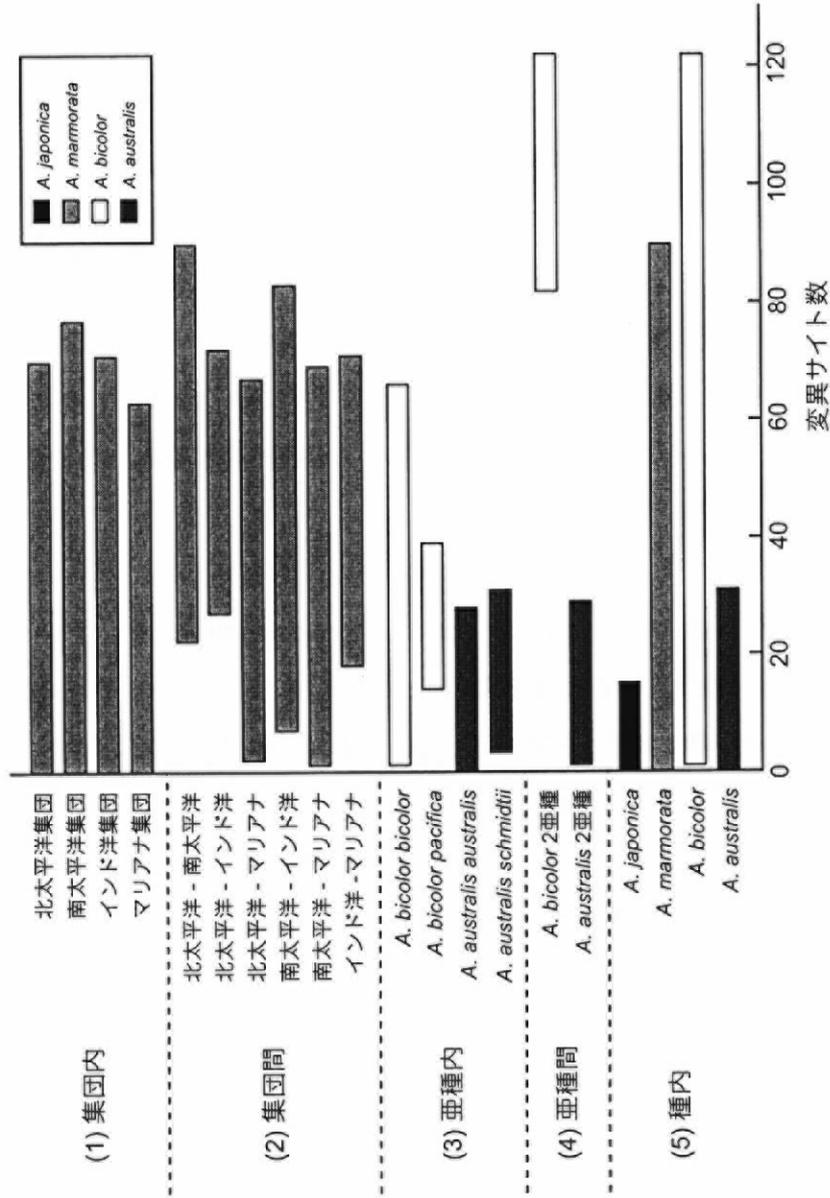


図6-2 調節領域における集団内、集団間、亜種内、亜種間、および種内の変異量

Anguilla marmorata の4つの集団それぞれに特異的な変異サイトは認められなかったものの、塩基配列中に、variable number of tandem repeat (以下、VNTR) 配列が認められた(図6-3)。VNTR配列は、原則的にTATAAATという7塩基のモチーフ配列が最多で4回縦列した配列であった。その塩基配列は、モチーフ配列の繰り返し数に応じて5つに大別された。タイプ1は北太平洋集団と南太平洋集団、およびインド洋集団のうちのスマトラのハプロタイプに、タイプ2は南太平洋集団のハプロタイプにそれぞれ認められた。タイプ3は、タヒチのハプロタイプのうちの1つが唯一有していた。タイプ4はインド洋集団のうちのレユニオンとマダガスカルハプロタイプに認められた。さらに、そのうちの4個体のみがタイプ5のハプロタイプを有していた。*A. marmorata* の(5)種内変異としてのすべての個体間の変異サイト数の範囲は0~90、平均は40.0サイトであった(表6-4, 図6-2)。

なお、転位および転換サイトについては、転位サイト数は、転換サイト数に比して、およそ5倍多かった(表6-3)。しかし、転位サイトと転換サイト数の関係を見ると、互いに比例関係にあり(図2-13を参照)、塩基置換が飽和している傾向は認められなかった。

Anguilla bicolor

Anguilla bicolor では、*A. bicolor bicolor* と *A. bicolor pacifica* の(3)亜種内変異は1~66サイトの範囲で、平均はそれぞれ33.5、26.8であった(表6-4, 図6-2)。他方、(4)亜種間変異は82~122サイトの範囲(平均97.9)であり、(3)亜種内変異に比べて明らかに大きかった。また、(3)亜種内と(4)亜種間の変異サイト数の範囲は重複せず、平均値で見れば、(4)亜種間変異は(3)亜種内変異に比べて3倍程度大きかった。さらに、2亜種間で明瞭に異なるサイトが28サイト認められた(表6-5A)。(5)*A. bicolor* の種内変異としてのすべての個体間の変異サイト数の範囲は1~122(平均55.1)であった。(表6-4, 図6-2)。

なお、転位および転換サイト数の関係については、転位サイト数は転換サイト数の約5.6倍であった(表6-3)。しかし、これらの関係を見ると、転位サイト数は転換サイト数の増加に対して頭打ちになっており、転位型の塩基置換が飽和している傾向が認められた(図3-3を参照)。

Anguilla australis

Anguilla australis では、*A. australis australis* と *A. australis schmidtii* の(3)亜種内変異は0~31サイトの範囲で、平均はそれぞれ16.4、17.9であった(表6-4, 図6-2)。他方、(4)亜種間変異は1~29サイトの範囲(平均17.5)であり、(3)亜種内変異より小さかった。2亜種そ

```

                292                                329
                *****
Type1          TACGGATTAC-AAAT-----ATACAACATA
Type2          TACAAATTAC-AAATTACAAAT-----GTACAATTA
Type3          TACAAATTAC-AAATTACAAATTACAAATGTACAATTA
Type4          TATAAATTAC-AAAT-----ATGCAATCA
Type5          TA-----CAATTA

```

図 6-3 *A. marmorata* の調節領域に認められた 5 タイプの variable number of tandem repeat (VNTR) 配列。アスタリスクは塩基置換が認められたサイトを示す。

表6-5 *A. bicolor* の3つの遺伝子領域において認められた亜種特異的塩基置換パターン

(A) 調節領域			(B) <i>cyt b</i>			(C) 16S rRNA		
塩基位置	塩基置換		塩基位置	塩基置換		塩基位置	塩基置換	
	<i>bicolor</i>	<i>pacifica</i>		<i>bicolor</i>	<i>pacifica</i>		<i>bicolor</i>	<i>pacifica</i>
22	T	A	476	C	T	637	A	C
25	C	T	705	A	G	682	G	A
101	-	T/C	721	A	T	719	G/A	C
102	A	-	762	T	C	768	T	C
109	G/A	-	840	C	T	820	A	C
120	C/T	-	852	T	C	1026	T	A
147	T/C	-	894	C	T	1196	G	T/A
150	T/C	-	1062	A	C/G	1324	A	G
154	C	A	1092	G	A	1692	T	C
155	A/-	T	1128	T/A	G			
171	T	C						
207	C/T	-						
216	-	C						
220	C/T	-						
227	C/T	G/A						
252	A	C/G						
262	C	T						
297	T	C						
324	G/A	C						
396	A	C						
486	G/A	T/C						
519	C	T						
590	C/T	G/A						
736	A	T						
820	A	G						
884	A	G						
891	C	T						
949	A	G						

れぞれに特異的な変異は認められなかった。(5) *A. australis* の種内変異としてのすべての個体間の変異サイト数の範囲は0~31 (平均17.3) であった (表6-4, 図6-2)。

調節領域の変異量の比較

調節領域における変異量をウナギ属で比較してみると (表6-4, 図6-2), まず, 個体群間 (集団間, 亜種間) の変異については, (2) 集団間変異は全体としては1~90サイトの範囲で, 変異サイト数の最大値では, *Anguilla marmorata* の北太平洋-南太平洋集団間が最も大きく (90), 北太平洋-マリアナ集団間で最小であった (67)。また, 変異サイト数の変異幅では, 南太平洋-マリアナ集団間で最大であり (89), 北太平洋-インド洋集団間で最小であった (46)。(4) 亜種間変異は *A. bicolor* と *A. australis* で大きく異なっており, *A. australis australis* と *A. australis schmidtii* 間の変異 (範囲1~29, 平均17.5) に比べて, *A. bicolor bicolor* と *A. bicolor pacifica* 間の変異 (82~122, 97.9) は, 約3~4倍大きかった。*A. australis* の (4) 亜種間変異は, *A. marmorata* の4集団のいずれの組み合わせの (2) 集団間変異よりも小さかった。一方で, *A. bicolor* の (4) 亜種間変異は, *A. marmorata* の3つの組み合わせ (北太平洋-南太平洋, 南太平洋-インド洋, 南太平洋-マリアナ) の集団間変異とわずかに変異サイト数の範囲が重複するものの, いずれの (2) 集団間変異よりも明らかに大きかった (平均値で1.7~2.7倍)。

次に, 個体群内 (集団内, 亜種内, 種内) の変異については, *Anguilla marmorata* の4集団の (1) 集団内変異の最大値は63~77サイトであった。また, (3) 亜種内変異は *A. bicolor bicolor* で最大で (範囲1~66), *A. australis australis* で最小であり (0~28), 最大値において2倍以上の差異が認められた。いずれの (3) 亜種内変異も, *A. marmorata* の北太平洋集団, 南太平洋集団, インド洋集団の (1) 集団内変異 (それぞれ, 0~70, 0~77, 0~71) よりも小さいことが分かった。マリアナ集団の (1) 集団内変異 (0~63) についても, *A. bicolor bicolor* を除く他の3亜種の (3) 亜種内変異より大きかった。(5) 種内変異は *A. bicolor* が最大で (範囲1~122), 次いで *A. marmorata* (0~90), *A. australis* (0~31), *A. japonica* (0~15) の順に小さくなった。(5) 種内変異は, *A. australis* は *A. marmorata* の半分程度, *A. japonica* はさらにその半分程度であり, 種によって大きな違いが認められた。*A. australis* と *A. japonica* の (5) 種内変異は, *A. marmorata* の4集団のいずれの (1) 集団内変異, および *A. bicolor* 2亜種の (3) 亜種内変異よりも小さかった。

第2項 *cyt b* 遺伝子における変異量とその比較

Anguilla japonica は計 44 個体, *A. marmorata* は計 209 個体, *A. bicolor* は計 95 個体, *A. australis* は計 62 個体について, それぞれ塩基配列を決定した. 得られた塩基配列は計 1,140 サイトであった (表 6-6).

Anguilla japonica

Anguilla japonica では, 合計で 30 サイトに変異が認められた. 変異の内訳は, 転位が 27 サイト, 転換が 3 サイト, 挿入・欠失は認められず, 変異の大部分は転位で占められていた. これらの変異によって 44 個体の塩基配列は 26 のハプロタイプに分けられ, 59.1 %の個体がそれぞれ異なる配列を持っていた (表 6-6).

(5) 種内変異としてのすべての個体間の変異サイト数の範囲は 0~7 で, 平均は 2.4 であった (表 6-4, 図 6-4).

Anguilla marmorata

Anguilla marmorata では, 合計で 71 サイトに変異が認められた. 変異の内訳は, 転位が 65 サイト, 転換が 8 サイト, 挿入・欠失は認められず, 変異の大部分は転位で占められていた. これらの変異によって 209 個体の塩基配列は 69 のハプロタイプに分けられ, 33.0 %の個体がそれぞれ異なる配列を持っていた (表 6-6).

4 集団の (1) 集団内変異は全体としては 0~9 サイトの範囲であった (表 6-4, 図 6-4). このうちマリアナ集団の変異サイト数の最大値 (3) は, 他の 3 集団 (北太平洋集団は 9, 南太平洋およびインド洋集団は 7) より非常に小さかった. (2) 集団間変異は, 4 集団のすべての組み合わせにおいて 0~12 サイトの範囲であった. このうち, 北太平洋集団と他の 3 集団の間では, 変異サイト数の範囲は 3~12 であり (平均 6.1~7.1), (1) 集団内変異の最大値よりやや大きかったものの, 範囲は重複していた. 他方, 南太平洋, インド洋, およびマリアナ集団では, いずれの組み合わせにおいても (2) 集団間変異の変異サイト数の範囲は 0~8 (平均 2.0~2.2) で, (1) 集団内変異 (0~9) と完全に重複していた. また, 各集団に特異的な変異サイトは認められなかった. (5) 種内変異としてのすべての個体間の変異サイト数の範囲は 0~12 で, 平均は 3.5 であった (表 6-4, 図 6-4).

表6-6 *cyt b* 遺伝子の変異性

種	集団, 亜種	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
<i>A. japonica</i>	-	茨城	16	1140	11	15	14	1	0	0.0019
		種子島 台湾	21 7	1140 1140	11 6	12 6	10 6	2 0	0	0.0019 0.0015
<i>A. marmorata</i>	全体		44	1140	26	30	27	3	0	0.0021
	北太平洋集団	日本 台湾	14 14	1140 1140	11 12	22 15	20 14	3 2	0	0.0040 0.0026
		フィリピン スラウェシ	6 5	1140 1140	3 5	2 9	2 8	0 1	0	0.0008 0.0035
		北太平洋集団全体	39	1140	24	29	27	4	0	0.0029
	南太平洋集団	タヒチ	27	1140	8	10	10	0	0	0.0014
		フィジー	28	1140	13	16	16	0	0	0.0016
		ニューカレドニア	15	1140	13	17	15	2	0	0.0023
		パプアニューギニア	16	1140	11	14	14	0	0	0.0016
		南太平洋集団全体	86	1140	28	33	31	2	0	0.0016
	インド洋集団	スマトラ レユニオン マダガスカル インド洋集団全体	30 16 14 60	1140 1140 1140 1140	12 8 4 19	12 11 5 23	10 9 5 19	2 2 0 4	0	0.0008 0.0022 0.0012 0.0016
マリアナ集団 全体	グアム	24 209	1140 1140	3 69	3 73	3 65	0 10	0	0.0010 0.0031	
<i>A. bicolor</i>	<i>bicolor</i>	インド洋東部 インド洋西部 インド洋全体	45 22 67	1140 1140 1140	34 19 52	68 26 80	60 25 71	10 2 12	0	0.0056 0.0051 0.0057
	<i>pacifica</i> 全体	太平洋	28 95	1140 1140	23 75	38 115	33 104	5 17	0	0.0036 0.0126
	<i>australis</i> <i>schmidtii</i> 全体	オーストラリア ニュージーランド	30 32 62	1140 1140 1140	20 18 34	28 19 41	27 18 39	1 1 2	0	0.0023 0.0020 0.0022

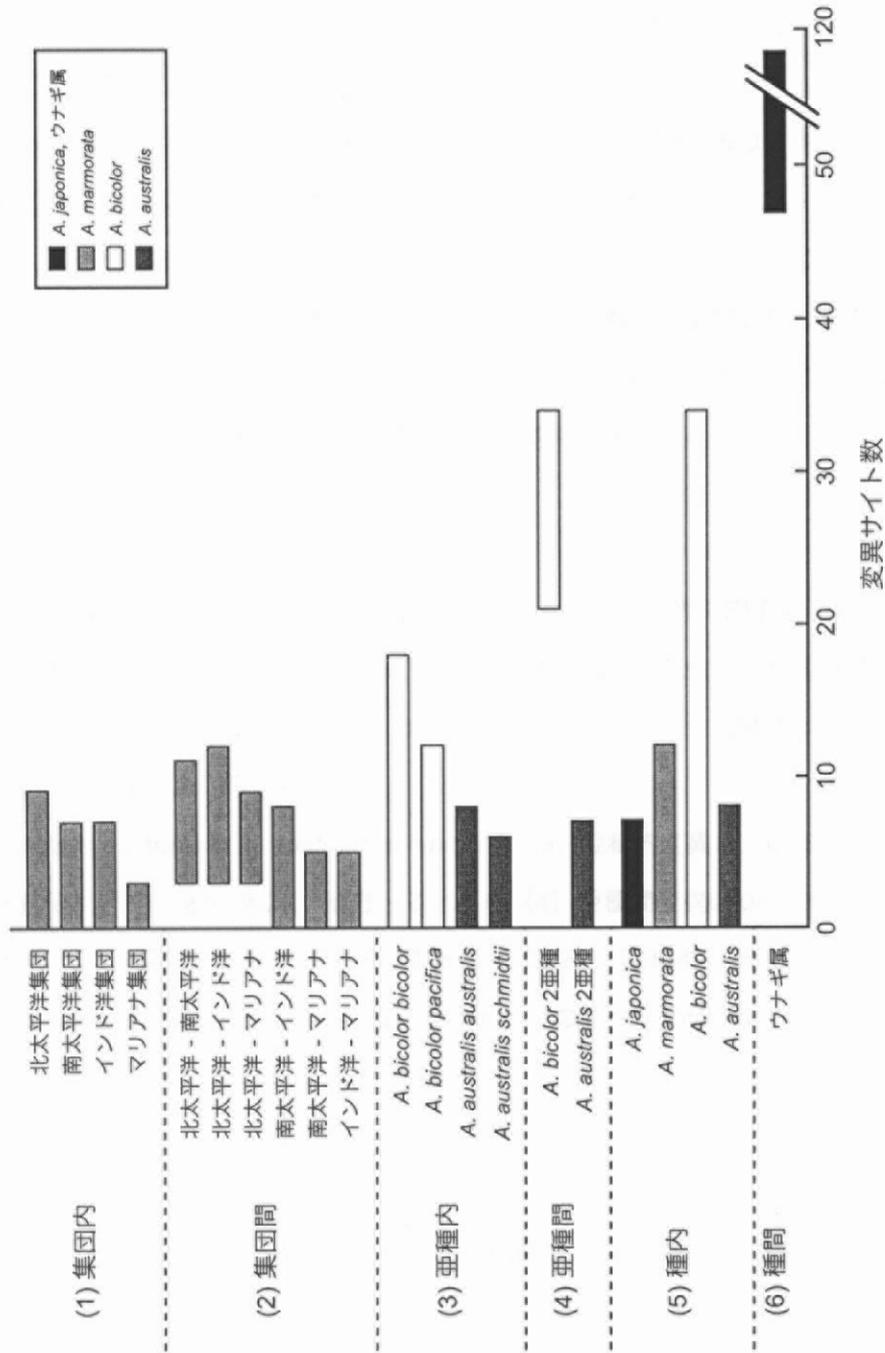


図6-4 cytb遺伝子領域における集団内、集団間、亜種内、亜種間、種内、および種間の変異量

Anguilla bicolor

*Anguilla bicolor*では、合計で115サイトに変異が認められた。変異の内訳は、転位が104サイト、転換が17サイト、挿入・欠失は認められず、変異の大部分は転位で占められていた。これらの変異によって95個体の塩基配列は75のハプロタイプに分けられ、78.9%の個体がそれぞれ異なる配列を持っていた（表6-6）。

*Anguilla bicolor bicolor*と*A. bicolor pacifica*の（3）亜種内変異は0~18サイトの範囲（それぞれ、平均6.6, 4.1）であった（表6-4, 図6-4）。他方、（4）亜種間変異は21~34サイトであり（平均25.5）、（3）亜種内変異に比べて平均値で4~6倍大きかった。また、これらの変異サイト数の範囲は重複しなかった（表6-4, 図6-4）。さらに、2亜種間で明瞭に異なる変異サイトが10サイト認められた（表6-5B）。*A. bicolor*の（5）種内変異としてのすべての個体間の変異サイト数の範囲は0~34で、平均は14.4であった（表6-4, 図6-4）。

Anguilla australis

*Anguilla australis*では、合計で41サイトに変異が認められた。変異の内訳は、転位が39サイト、転換が2サイト、挿入・欠失は認められず、変異の大部分は転位で占められていた。これらの変異によって62個体の塩基配列は34のハプロタイプに分けられ、54.8%の個体がそれぞれ異なる配列を持っていた（表6-6）。

*Anguilla australis australis*と*A. australis schmidtii*の（3）亜種内変異は、0~8サイトの範囲であった（それぞれ、平均2.9, 2.2）。他方、これらの（4）亜種間変異は0~7サイトの範囲であり（平均2.5）、（3）亜種内変異とほぼ同じであった（表6-4, 図6-4）。また、各集団に特異的な変異サイトは認められなかった。（5）種内変異としてのすべての個体間の変異サイト数の範囲は0~8で、平均は2.5であった（表6-4, 図6-4）。

ウナギ属 15種

ウナギ属全体の（6）種間変異は48~118サイトの範囲で、平均は88.0であった（表6-4, 図6-4）。

cyt b 遺伝子の変異量の比較

cyt b 遺伝子における変異量をウナギ属で比較してみると（表6-4, 図6-4）、まず、個体群間（集団間、亜種間、種間）の変異については、（4）亜種間変異は、*Anguilla bicolor* 2 亜種間

(範囲21~34)と*A. australis* 2亜種間(0~7)では、変異サイト数の範囲も最大値も大きく異なっていた。*A. bicolor*の(4)亜種間変異は、いずれの(2)集団間変異(0~12)よりも十分大きく、集団間変異の最大値と比べて約2倍程度大きかった。これに対し、*A. australis*の(4)亜種間変異は、いずれの(2)集団間変異とも変異幅が重複しており、最大値も小さかった。ウナギ属の(6)種間変異(48~118)は、すべての(2)集団間変異、および(4)亜種間変異と比較して、十分大きかった。*A. bicolor*の(4)亜種間変異は、すべての(2)集団間変異と(6)種間変異の中間的な値であった。

次に、個体群内(集団内、亜種内、種内)の変異については、*Anguilla marmorata*の(1)集団内変異は、マリアナ集団(範囲0~3, 平均1.1)を除く*A. marmorata*の3集団(0~9, 1.8~3.3)で大きな差異は認められなかった。(3)亜種内変異は、変異幅も平均値も4亜種のうち*A. bicolor bicolor*が最大で(0~18, 6.6)、*A. australis schmidtii*が最小であった(0~6, 2.2)。*A. bicolor* 2亜種の(3)亜種内変異はいずれも*A. marmorata*の(1)集団内変異より大きかったが、*A. australis* 2亜種の(3)亜種内変異はいずれも(1)集団内変異と同程度であった。さらに(5)種内変異は、*A. bicolor*が最大で(0~34, 14.4)、他の*A. japonica*(0~7, 2.4)、*A. marmorata*(0~12, 3.5)、および*A. australis*(0~8, 2.5)の3種は、同程度の変異量であった。*A. bicolor*以外の3種の(5)種内変異は、(1)集団内変異、および(3)亜種内変異と同程度であった。

第3項 16S rRNA 遺伝子における変異量とその比較

*Anguilla japonica*は計42個体、*A. marmorata*は計180個体、*A. bicolor*は計132個体、*A. australis*は計64個体について塩基配列を決定した。その結果、*A. japonica*、*A. marmorata*、*A. australis*では、いずれも計1,708サイト、*A. bicolor*では計1,704サイトの塩基配列を得た(表6-7)。

Anguilla japonica

*Anguilla japonica*では、得られた塩基配列中に合計で20サイトに変異が認められた。変異の内訳は、転位が15サイト、転換が5サイト、挿入・欠失は1サイトで、変異の大部分は転位で占められていた。これらの変異によって、42個体の塩基配列は19のハプロタイプに分けられ、45.2%の個体がそれぞれ異なる配列を持っていた(表6-7)。

表6-7 16S rRNA遺伝子の変異性

種	集団, 亜種	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
<i>A. japonica</i>	-	茨城	16	1703-1704	9	9	6	2	1	0.0010
		種子島 台湾	17 9	1704 1704	7 6	8 7	6 6	2 1	0 0	0.0006 0.0009
<i>A. marmorata</i>	全体		42	1703-1704	19	20	15	5	1	0.0008
	北太平洋集団	日本 台湾	12 10	1707 1707	7 9	10 12	8 11	2 1	0 0	0.0012 0.0015
		フィリピン	5	1707	3	3	3	0	0	0.0009
		スラウェシ	8	1707	6	11	10	1	0	0.0021
		北太平洋集団全体	35	1707	18	25	33	3	0	0.0015
	南太平洋集団	タヒチ	14	1707	8	9	9	0	0	0.0011
		フィジー	28	1706-1707	16	16	10	4	2	0.0012
		ニューカレドニア	14	1707	8	7	6	1	0	0.0007
		パプアニューギニア	11	1706-1707	7	6	5	0	1	0.0006
		南太平洋集団全体	67	1706-1707	26	26	18	5	3	0.0010
インド洋集団		スマトラ	34	1706-1707	8	11	10	0	1	0.0004
		レユニオン	14	1707	7	7	7	0	0	0.0012
		マダガスカル	14	1707	4	4	4	0	0	0.0007
		インド洋集団全体	62	1706-1707	15	17	16	0	1	0.0009
マリアナ集団		グアム	16	1707-1708	6	8	7	0	1	0.0013
	全体		180	1706-1708	61	62	50	8	5	0.0015
<i>A. bicolor</i>		インド洋東部	74	1699-1704	50	66	50	8	12	0.0027
		インド洋西部	31	1697-1704	22	34	21	5	10	0.0028
		インド洋全体	105	1697-1704	67	83	61	13	15	0.0027
<i>pacifica</i>		太平洋	27	1701-1704	19	29	24	1	25	0.0015
	全体		132	1697-1704	86	109	81	18	17	0.0042
<i>A. australis</i>		オーストラリア	30	1708	15	18	15	3	0	0.0011
		ニュージールランド	34	1708	21	25	19	7	0	0.0010
	全体		64	1708	33	37	29	9	0	0.0010

(5) 種内変異としてのすべての個体間の変異サイト数の範囲は 0~5 で、平均は 1.4 であった (表 6-4, 図 6-5).

Anguilla marmorata

Anguilla marmorata では、得られた塩基配列中に合計で 62 サイトに変異が認められた。変異の内訳は、転位が 50 サイト、転換が 8 サイト、挿入・欠失は 5 サイトで、変異の大部分は転位で占められていた。これらの変異によって、180 個体の塩基配列は 61 のハプロタイプに分けられ、33.9 %の個体がそれぞれ異なる配列を持っていた (表 6-7).

Anguilla marmorata の 4 つの (1) 集団内変異は、北太平洋集団で最も大きく (範囲 0~8, 平均 2.5), 次いで南太平洋集団が大きく (0~6, 1.6), インド洋集団とマリアナ集団の変異サイト数の範囲は同じであった (0~5, それぞれ 1.5, 1.7) (表 6-4, 図 6-5). (2) 集団間変異は、全体としては 0~11 の範囲で、その最大値は北太平洋-南太平洋集団間で最も大きく (11), インド洋-マリアナ集団間で最小であった (6). 北太平洋-南太平洋集団間, および北太平洋-インド洋集団間の (2) 集団間変異は、いずれの (1) 集団内変異の量より大きかったが、他の 4 つの組み合わせの (2) 集団間変異は、いずれも北太平洋集団の (1) 集団内変異よりも小さかった。また、各集団に特異的な変異サイトは認められなかった。(5) 種内変異としてのすべての個体間の変異サイト数の範囲は 0~11 で、平均は 2.6 であった (表 6-4, 図 6-5).

Anguilla bicolor

Anguilla bicolor では、得られた塩基配列中に合計で 109 サイトに変異が認められた。変異の内訳は、転位が 81 サイト、転換が 18 サイト、挿入・欠失は 17 サイトで、変異の大部分は転位で占められていた。これらの変異によって、114 個体の塩基配列は 86 のハプロタイプに分けられ、75.4%の個体がそれぞれ異なる配列を持っていた (表 6-7).

(3) 亜種内変異は、*Anguilla bicolor bicolor* (範囲 0~12, 平均 3.7) の方が、*A. bicolor pacifica* (0~6, 2.1) より大きかった (表 6-4, 図 6-5). また、(4) 亜種間変異は、9~18 サイトの範囲で (平均 11.8), *A. bicolor pacifica* の (3) 亜種内変異よりも十分大きい。また、*A. bicolor bicolor* の (3) 亜種内変異とは変異幅が重複していた。また、*A. bicolor bicolor* と *A. bicolor pacifica* それぞれの亜種に特異的な変異サイトが 9 サイト認められた (表 6-5C). *A. bicolor* の (5) 種内変異としてのすべての個体間の変異サイト数の範囲は 0~18 で、平均は 6.3 であった (表 6-4, 図 6-5).

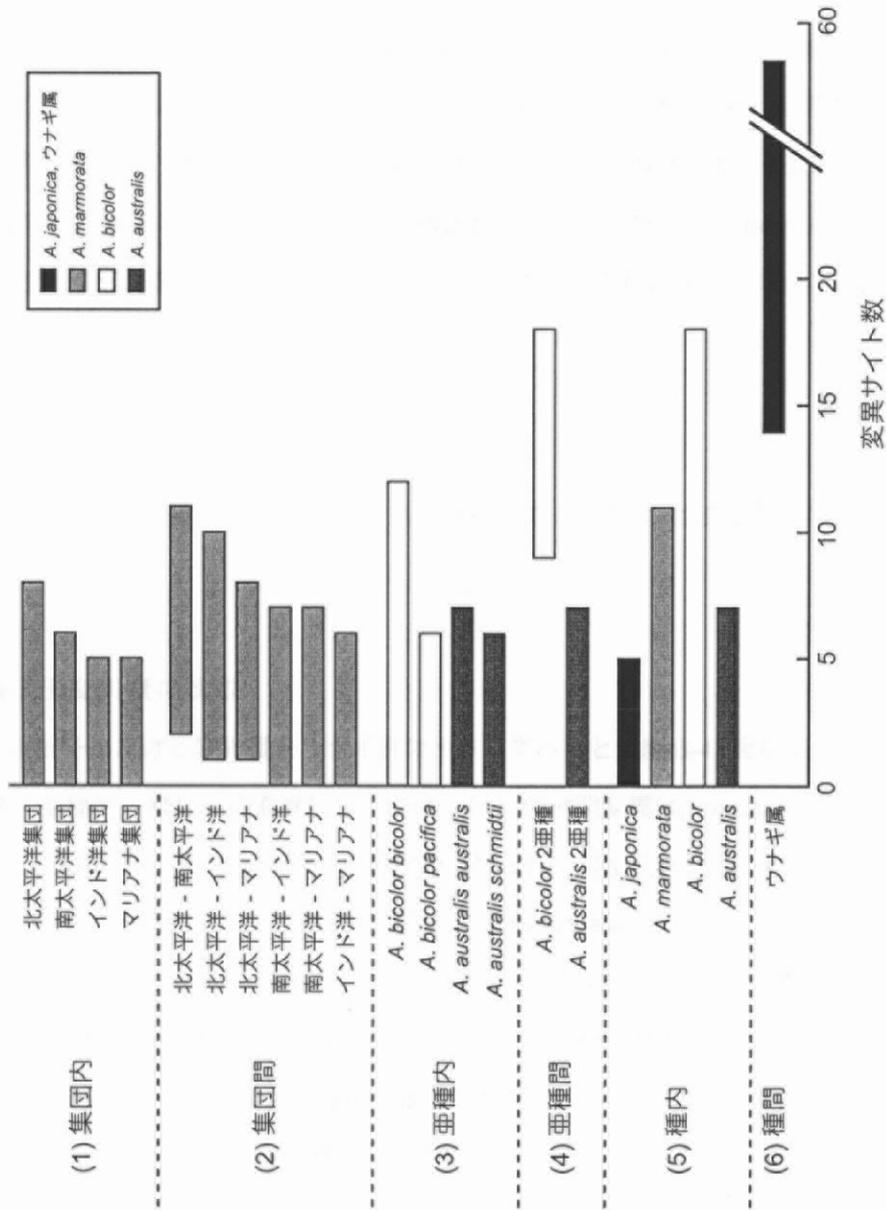


図6-5 16S rRNA遺伝子領域における集団内、集団間、亜種内、亜種間、種内、および種間の変異量

Anguilla australis

Anguilla australis では、得られた塩基配列中に合計で 37 サイトに変異が認められた。変異の内訳は、転位が 29 サイト、転換が 9 サイトで、挿入・欠失は認められなかった。変異の大部分は転位で占められていた。これらの変異によって、64 個体の塩基配列は 33 のハプロタイプに分けられ、51.6%の個体がそれぞれ異なる配列を持っていた（表 6-7）。

(3) 亜種内変異は、*Anguilla australis australis*、および *A. australis schmidtii* それぞれで 0~7（平均 1.8）、0~6（1.6）サイトの範囲であった（表 6-4, 図 6-5）。(4) 亜種間変異は、0~7 サイトの範囲であり（1.7）、これは (3) 亜種内変異の変異サイト数の範囲と完全に重複していた。また、各亜種に特異的な変異サイトは認められなかった。*A. australis* の (5) 種内変異としての全体の個体間の変異サイト数の範囲は 0~7 で、平均は 1.7 であった（表 6-4, 図 6-5）。

ウナギ属 15 種

ウナギ属全体の (6) 種間変異は 14~59 サイトの範囲で、平均は 40.9 であった（表 6-4, 図 6-5）。

16S rRNA 遺伝子変異量の比較

16S rRNA 遺伝子における変異量をウナギ属で比較してみると（表 6-4, 図 6-5）、まず、個体群間（集団間、亜種間、種間）の変異については、(4) 亜種間変異は、*Anguilla bicolor*（範囲 9~18）と *A. australis*（0~7）で 2 倍程度の差異が認められ、また変異サイト数の範囲が重複しなかった。*A. bicolor* 2 亜種の (4) 亜種間変異は、*A. marmorata* の (2) 集団間変異（0~11）よりも明らかに大きかった。これに対し、*A. australis* 2 亜種の (4) 亜種間変異は、*A. marmorata* の (2) 集団間変異と同程度であった。また *A. bicolor* 2 亜種の (4) 亜種間変異は、ウナギ属の (6) 種間変異（14~59）と重複するほど大きかった。

次に、個体群内（集団内、亜種内、種内）の変異については、(3) 亜種内変異は、全体として 0~12 サイトの範囲であった。このうち、*Anguilla bicolor bicolor* が最大で（0~12）、*A. bicolor pacifica*（0~6）と *A. australis* 2 亜種（0~6, 0~7）は同程度であり、これらの (3) 亜種内変異は *A. bicolor bicolor* のそれのおよそ半分であった。(1) 集団内変異と比較すると、*A. bicolor bicolor* の (3) 亜種内変異は (1) 集団内変異よりやや大きかったが、他の 3 亜種の (3) 亜種内変異は、*A. marmorata* の 4 集団の (1) 集団内変異と同程度であった。(5) 種内変異は、

A. japonica で最小で (0~5), 次いで, *A. australis* (0~7), *A. marmorata* (0~11), *A. bicolor* (0~18) の順に大きくなった。また, *A. japonica* と *A. australis* の (5) 種内変異は, *A. marmorata* 北太平洋集団の (1) 集団内変異 (0~8), および *A. bicolor bicolor* の (3) 亜種内変異 (0~12) よりも小さかった。

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

分子遺伝学が発展した現在, 分子形質は, 他の多くの生物学の分野と同様, 分類学的研究にも多用されている。その際, 個体群間の変異を比較する場合と, 個体群内の変異を比較する場合がある。Abbott and Double (2003) や Andriaholinirina et al. (2006) などでは, 分類学的に混乱のある種間や集団間の遺伝的変異を, 対象種 (集団) の近縁種間のそれと比較している。Abbott and Double (2003) では, 分類学的には別種とされるものの, 形態学的にも遺伝的にも明瞭な差異が認められない2タイプのアホウドリの遺伝的変異量を調べ, 明らかに別種とされている同属他種の種間変異量と比較した。その結果, 問題となっている2タイプの間の変異が「種レベル」に達していないと結論している (Abbott and Double 2003)。一方, Trapnell et al. (2004) は, 形態学的に類似しているだけでなく, 生殖隔離の明瞭でない5種のラン科植物 *Calopogon* 属について, 複数の集団から標本を採集し種内変異を調べた。その結果, いずれの種の種内変異も, 他種の種内変異と比較して十分大きかったことから, これらはそれぞれ「別種」として認識できる程度に分化しているとしているとした (Trapnell et al. 2004)。

そこで本章では, 分子進化速度の異なる計3個の遺伝子領域 (調節領域, *cyt b* 遺伝子, 16S rRNA 遺伝子) を用いて, 個体群間 (集団間, 亜種間, 種間) の変異と, 個体群内 (集団内, 亜種内, 種内) の変異の双方に基づいて, 分類学的なカテゴリーに応じて「集団レベル」「亜種レベル」「種レベル」の変異を調べた。

その結果, まず, 本章で調べたいずれの遺伝子座においても, 多くの場合, *Anguilla marmorata* の集団間変異は, *A. australis* の亜種間変異よりも大きいことが明らかになった。逆に, *A. bicolor* の亜種間変異は, ウナギ属の種間変異に相当するほど大きい場合があることが示された (表6-4, 図6-2,4,5)。また, *A. bicolor* の種内変異の量は, いずれの遺伝子座においても, *A. japonica*, *A. marmorata*, *A. australis* の3種と比べて非常に大きい (表6-4, 図6-2,4,5)。

例えば 16S rRNA 遺伝子において, *A. japonica* の種内変異と比較すると, *A. bicolor* が持つ種内変異量は, *A. japonica* のそれのおよそ 3~4 倍, *A. marmorata* ではおよそ 2 倍, *A. australis* ではおよそ 1.4 倍大きいことが分かる (表 6-4, 図 6-5). 「亜種」や「集団」についても同様である. つまり, 従来の分類において「種」, 「亜種」, あるいは「集団」とされていた個体群の遺伝的変異量は, 各々の個体群によって様々であり, 「種 (亜種, 集団) レベル」という一定の変異量 (変異サイト数) があるわけではないことが明らかになった.

分類学が採用しているリンネ式階層分類体系の延長として, そのカテゴリーと同様に, これまで形質の差異の程度 (分化程度) についても, 属, 種, 亜種, 集団という階層的な順序が暗に受け入れられてきた. 分類学や系統学の研究分野では, これらの各階層の分化程度は, 生物群によって大きく異なることが示されてきたものの, これまで, 同一生物群 (同一系統) 内において相対的な比較が詳細に行われたことはなかった. これに対し, 本研究の結果, ウナギ属魚類では, ある個体群が持つ遺伝的な変異量は様々であり, 集団や亜種, 種といった階層的な分類カテゴリーの分化程度に応じた一定の変異量があるわけではないことが明らかになった. このことは, 「個体群間の変異サイト数がいくつ以上なら別種 (別亜種, 別集団) とする」といった分類基準を作ることができないことを意味する.

さらに, 本研究で調べたウナギ属 4 種のうち, *Anguilla marmorata*, *A. bicolor*, *A. australis* の「種」という個体群については, 各々, 複数の繁殖集団から構成されている (第 2~4 章を参照). それらの繁殖集団間の分化の度合いは様々で, *A. bicolor* の 2 つの繁殖集団のように分子マーカーの変異が飽和に達するほど大きく分化していることもあれば (第 3 章を参照), *A. australis* のように, それぞれの集団が独自の遺伝子型を持つには至っていないほど分化が小さい場合もある (第 4 章を参照). そのため, 従来の分類による「種」を単位として遺伝的変異量を互いに比較すると, 個々の種が内包する集団間の分化の程度によって, 種ごとに種内変異量が大きく異なるものと考えられた.

そこで, 従来の分類学的なカテゴリーではなく, 本研究で検出した「繁殖集団」を単位として, 遺伝的変異量を比較してみる. すなわち, *Anguilla marmorata* の北太平洋集団, 南太平洋集団, インド洋集団, マリアナ集団, *A. bicolor* の 2 亜種 (*A. bicolor bicolor*, *A. bicolor pacifica*), *A. australis* の 2 亜種 (*A. australis australis*, *A. australis schmidtii*), および *A. japonica* である. 遺伝的変異量 (変異サイト数) を基準に用いるとすると, 繁殖集団は, 繁殖集団内の変異量の最大値, あるいは, 繁殖集団間の変異量の最小値を基準として定義されると考えられる. ところが, これらの 9 個の繁殖集団の遺伝的変異量は, 解析したいずれの遺伝子

領域においても、繁殖集団により大きく異なった。例えば調節領域で見ると、これら9繁殖集団の集団内変異の最大値は15~77サイトであり、他方、集団間変異の最小値は1~82サイトであり、集団を分ける基準となる集団内変異の最大値と、集団間変異の最小値が逆転する場合もあることが明らかになった。これより、繁殖集団を認識する共通の基準として、遺伝的変異量（変異サイト数）のある一定値を適用することはできないことは明らかである。

個体群間、個体群内の遺伝的多様性は、個体群の大きさや世代時間、生活史、分岐してからの時間、個体の移動、進化史などの様々な影響を受けると推測される。例えば、遺伝的浮動（無方向的な分散）による影響は、個体群が小さいほど強く、逆に個体群が大きいほど弱い（メイナード＝スミス 2000）。すなわち、個体群が小さいと、分散の揺れの程度が相対的に大きいので、ある突然変異（対立遺伝子）が、偶然にその個体群からなくなってしまうたり、逆に個体群全体に急速に広まったりということが起こりやすい（鷲谷・矢原 2003）。その結果、小さな個体群では、大きな個体群に比べて遺伝子頻度が固定しやすい。そのようにして一度、遺伝子頻度が固定してしまうと、その世代以降、新たに突然変異が起こらない限りは、遺伝子頻度に変動が起こらなくなってしまう。そのため、個体群が小さい場合、容易なことでは遺伝的変異性は回復しないとされる（野澤 2004）。事実、個体群の大きさに伴う遺伝的多様性の減少は、African cheetah (*Acinonyx jubatus jubatus*; O'Brien et al. 1983, 1985) や African elephant (*Loxodonta africana africana*; Whitehouse and Harley 2001) など、絶滅が危惧されるような生物ではとくに有名である。集団の大きさは、進化的な時間規模でも変化する。個体群ごとに遺伝的多様性が異なる要因を特定することはできないものの、ウナギ属魚類においても遺伝的多様性は恒常的に一定の値をとるわけではなく、常に変化するものと推察される。

第2項 ウナギ属魚類の「種」と分類体系

分類学の目的は、自然界の多様性を体系的に認識することである（馬渡 1994）。また、この目的のために行う「分類」という作業は、「個々の種を区別し、それらを単位として生物を体系化すること」とされる（馬渡 1994）。この際、分類の最小単位は「種」であり、種を区別したり、体系立てたりするためには、何らかの基準が必要となる。従来ウナギ属魚類の分類では、その基準として、個体群間の形質の差異に着目していた。しかしながら、近年の分類学的混乱を見ると、少なくとも形態形質による分類は限界に達していると考えざるを得ない。そこで本研究では、遺伝子（分子形質）という新たな側面からウナギ属魚類の分類を試みた。その結果、

ウナギ属魚類では、分化程度に応じた遺伝的変異量が一定ではないので、1つの分類基準を設けることはできないことが分かった。繁殖集団としては実体があるにもかかわらず、これを一定の物差しで認識することができないのである。それは前述の *Anguilla australis australis* と *A. australis schmidtii* のように、異なる繁殖集団でありながら、その集団間の分化が極めて小さいような場合に代表的である。さらに、用いる形質によっても、認識することのできる個体群は変わり得る。*A. bicolor bicolor* と *A. bicolor pacifica* は、マイクロサテライトや調節領域という形質で見れば明らかに異なる繁殖集団である（第3章を参照）。また、16S rRNA 遺伝子でも、計9サイトに一塩基置換が見つまっていることから（表6-5C）、これらのサイトで見れば、やはり別繁殖集団であることが分かる。しかし、同じ16S rRNA 遺伝子でも、変異サイト数という形質で見れば、亜種内変異と亜種間変異の変異幅は重複し、2つの亜種（繁殖集団）の分化は明瞭ではなかった（表6-4、図6-5）。つまり、マイクロサテライト DNA と調節領域、および *cyt b* 遺伝子、16S rRNA 遺伝子の一塩基置換という形質では、*A. bicolor* は2つの繁殖集団に見え、16S rRNA 遺伝子の変異サイト数という形質では、1つの繁殖集団に見えるということである。ある1つの基準では認識することができないからといって、そのような個体群を種（タクサ）として認めない分類は、自然界を正しく反映しない。すなわち、個体群を区別するために、何らかの形質を用いて1つの基準を設けていては、自然界の多様性をありのままに認識することができないと考えられる。

Mayr (1969) は、「種」とは、「互いに交配しうる個体が構成する自然集団で、他のそのような集団からは生殖的に隔離されているもの」と定義した（生物学的種概念 biological species concept）。すなわち、生殖隔離という壁（例えば、馬渡 1994 を参照）によって隔てられる個体群が互いに別種となる。このような集団内、すなわち種内では遺伝子交換が行われ、その子孫は遺伝的に連続する。その結果、種内の個体同士は、概ね遺伝的にも形態的にも似る。他方で、生殖隔離の壁が成立していれば、もし複数の個体群が同所的に生息しても、それらは交流することなく、各々独自に進化の道を歩んでいくことになる。従って、生物の進化、そして、進化の結果である生物の多様性を考える上では、最小単位は「繁殖集団」であり、「生殖隔離」という基準は非常に重要な意味を持つ。そのため、分類の第1段階は、繁殖集団（Mayr 1969）を認識することであるといえる。一方で、一般に、天然の環境は一様ではないため、実際に生物が生息可能な空間はパッチ状に分布する。そのため、天然の生物の集団は、そういったパッチ状の生息地の間を、個体が稀に移動分散しているような状態にあると考えられている（嶋田ら 2005）。すなわち、メタ個体群構造である。そのような局所的に存在する個体群の集まりは、

様々な度合いの遺伝子流動により遺伝的に結びついている (Levins 1968, Wade and McCauley 1988). 従って, もし, 個体群間で個体の移動がなくなれば, 遺伝的な交流が遮断され, 個体群ごとに独自の遺伝子型が徐々に蓄積していく. つまり, メタ個体群や局所個体群は, 隔離されている状態がさらに続けば, それ自身が独立した「種」として分化する可能性を秘めているのである (佐々治 1991). そのため, メタ個体群に対しては, 単純に生物学的種概念 (Mayr 1969) を当てはめることができない. また, 分化程度と変異量が一定でないウナギ属魚類においては, いつ, どの時点までがメタ個体群で, どの時点から種になるのか定義することは不可能と考えられる. ウナギ属魚類の分類を確立するためには, 「種」を新たに定義する必要がある.

そこで, 本研究では Mayr (1969) に倣い, ウナギ属魚類において, 「種」とは, 他と生殖隔離が成立している「単一の繁殖集団」と定義する. その繁殖集団が任意交配集団か, メタ個体群であるかは問わない. また, 変異サイト数の範囲や平均, あるいは脊椎骨数といった様々な形質に基づく種の基準は, 個体群間の分化程度と形質の解像度に強く依存するばかりでなく, 分化が小さい場合には, 繁殖集団を検出できないことがある (前述). さらに, Ege (1939) の形態形質のみで認識することのできる4群が繁殖集団を反映しないように (第1章第1節を参照), ある形質で作った基準によって認識した個体群が, 繁殖集団と同じであるとは限らない. また, 降河回遊というウナギ属魚類の特異な生活史を考えると, メタ個体群内の局所的個体群を別個に扱うことは適当ではないと考える. 互いに緩く繋がっているメタ個体群内の局所個体群は, 他の個体群と産卵場を共有する, あるいは回遊経路を同じにするなどの何らかの遺伝的交流を保つ機構を維持していると推測されるからである. 以上のことから, 第2章で検出した *Anguilla marmorata* の4繁殖集団, 第3章で調べた *A. bicolor bicolor* と *A. bicolor pacifica*, 第4章で調べた *A. australis australis* と *A. australis schmidtii* の計8個の遺伝的に異なる繁殖集団は, いずれも, それぞれ種として扱うことができると考えられた. また, 各集団の地理分布や形態形質 (脊椎骨数) 等を考慮しても, これは妥当と考えられる.

「種=繁殖集団」という定義に従うと, *Anguilla marmorata* は1種から4種に, *A. bicolor* と *A. australis* はそれぞれ1種から2種となる. ここでは, 仮に種名を与えて, Ege (1939) が記載した *A. marmorata* のうち, 日本からスラウェシまで分布し, 4集団の中で最大の変異量を保有する北太平洋集団を現在の学名通り *A. marmorata*, タヒチからパプアニューギニアの範囲に分布する南太平洋集団を *A. fidjiensis* (Günther 1870, フィジーで採集された模式標本に命名された学名を使用), 東西全域に亘るインド洋集団を *A. mauritiana* (Bennett 1831, モー

リシヤスの標本に命名された学名を使用), グアムを含むマリアナ海域に生息する集団を新たに *A. marianaensis* としてみる。また, *A. bicolor* は, Ege (1939) による亜種名を種小名として用い, インド洋の東西に分布する *A. bicolor bicolor* を *A. bicolor*, 太平洋に分布する *A. bicolor pacifica* を *A. pacifica* と呼ぶ。 *A. australis* も同様に, オーストラリアに分布する *A. australis australis* を *A. australis*, ニュージーランドに生息する *A. australis schmidtii* を *A. schmidtii* と呼ぶ。これら8種に残りのウナギ属他種を合わせ, 本研究では, ウナギ属魚類を以下の計21種に分類することを提案する; *A. marmorata*, *A. fidjiensis*, *A. mauritiana*, *A. marianaensis*, *A. bicolor*, *A. pacifica*, *A. australis*, *A. schmidtii*, *A. anguilla*, *A. borneensis*, *A. celebesensis*, *A. dieffenbachii*, *A. interioris*, *A. japonica*, *A. megastoma*, *A. mossambica*, *A. nebulosa*, *A. labiata*, *A. obscura*, *A. reinhardtii*, *A. rostrata* である。

なお, *Anguilla nebulosa* については, その遺伝的な差異が詳細に検討されたことはないものの, 第5章において決定した mtDNA 全塩基配列を見ると, 2 亜種が系統的に異なることは明らかである (図 5-2)。また, 形態的な差異も認められていることから (Ege 1939), *A. nebulosa* についても, その亜種は, 互いに異なる繁殖集団を形成している可能性があると考えられるため, 本研究では暫定的に *A. nebulosa nebulosa* を *A. nebulosa*, *A. nebulosa labiata* を *A. labiata* とした。