

オオウナギの集団構造に関する分子遺伝学的研究

Molecular study on the population structure of *Anguilla marmorata*

1998

石川 智士

Satoshi ISHIKAWA

①

オオウナギの集団構造に関する分子遺伝学的研究

Molecular study on the population structure
of *Anguilla marmorata*

1998

東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻

石川智士

指導教官 東京大学教授

塚本勝巳

目次

第1章 緒言	1
第2章 ミトコンドリアDNAによる集団の解析	5
第1節 標本の採集と種査定	6
第1項 標本採集	6
第2項 標本の種査定	10
第2節 集団解析に用いる分析対象DNA領域の選定	10
第1項 材料と方法	12
1. 材料	
2. 粗全DNAの抽出	
3. DNA断片の増幅	
4. 塩基配列の決定	
5. GENE BANKより得た塩基配列	
6. 塩基配列の相同性の確認	
7. 3 DNA領域間の変異性の比較と有効性の検討	
第2項 結果	17
1. 塩基配列の相同性の確認	
2. 3領域間の変異性と比較と集団分析への有効性の検討	
第3節 遺伝子系統樹の構築	22
第1項 材料と方法	25
1. 標本および塩基配列決定	
2. 塩基配列の検討	
3. 遺伝子系統樹の算出	
第2項 結果	26
1. 塩基配列の特徴	
2. 遺伝子系統樹	
3. ハプロタイプグループの地理的分布の検討	
第4節 標本採集地点間の遺伝距離	38
第1項 材料と方法	38
第2項 結果	39
1. 平均塩基置換率	
2. 純塩基置換指数	
3. 固定指数	
4. 集団構造の統計解析	
第5節 各分集団の遺伝的変異性の評価	44
第1項 材料と方法	46
1. 塩基配列	
2. データの解析方法	
第2項 結果	48
1. 遺伝子系統樹	
2. 平均塩基置換率	
3. 統計的検定	

第6節 考察	53
第1項 オオウナギのミトコンドリアDNAの調節領域	53
第2項 オオウナギの生活史と集団間の分離モデル	57
第3項 ミトコンドリアDNAデータで解析しきれない問題について	59
第3章 核DNA解析による集団構造の検討	62
第1節 AFLP法の有効性の検討	63
第1項 材料と方法	63
1. 粗全DNA	
2. DNAの切断とAdapter pairの付加	
3. DNA断片の増幅	
4. バンドパタンの確認と再現性の確認	
5. 有効性の検討	
第2項 結果	66
1. 再現性の確認	
2. 集団解析に対する有効性の検討	
第2節 核DNAデータによる分子系統樹	71
第1項 材料と方法	71
第2項 結果	73
1. 北太平洋集団	
2. 南太平洋東部集団とインド洋東部集団	
3. 南太平洋西部集団	
4. インド洋西部集団	
第3節 核DNA解析による集団構造の統計的検討	89
第1項 方法	89
第2項 結果	90
第4節 考察	92
第1項 AFLP法の有効性	92
第2項 集団間の移住様式の推定	94
第4章 集団構造形成の歴史	97
第1節 集団の系統樹	98
第1項 材料と方法	98
第2項 結果	98
第2節 集団の有効個体数の推定	100
第1項 材料と方法	100
第2項 結果	101
第3節 各集団間における移住の評価	103
第1項 材料と方法	103
第2項 結果	106
第4節 考察	108
第1項 各集団の形成順序	108
第2項 集団サイズの変遷	112

第5章 総合考察	116
第1節 オオウナギは単一種か	116
第2節 集団分離の要因	119
第3節 各集団の産卵場	122
第4節 ウナギ属魚類の種分化メカニズムへの示唆	126
第5節 ウナギ属魚類の資源構造の理解に向けて	128

要 旨	131
-----	-----

謝 辞	136
-----	-----

文 献	139
-----	-----

付 表

資 料

第1章 緒言

ウナギ属魚類の分布は広く、南アメリカ大陸と極地方を除く、全世界におよんでいる。そのため、世界各地で人間との関わりが深く、東南アジアやミクロネシアなどでは、神話の主人公として登場していることも知られている。また、古くから本属魚類を食資源として利用してきた地域は、広くアフリカ東岸域やアジアおよびヨーロッパの各地に広がっている。とくに日本においては、弥生時代からすでに食用とされているうえに(松井, 1962)、現在では本属魚類の一種であるウナギ *A. japonica* を対象とした養鰻業が盛んにおこなわれており、たいへん重要な水産対象種となっている。

このような人間との関わり方の深さということもさることながら、本属魚類が生物学的に大きな注目を浴びる理由がある。それは、本属魚類が魚類全体を見渡しても特異な生活史を有しているということである。本属魚類の生活史に関する研究は、今世紀のはじめに Schmidt (1925) が、*A. anguilla* と *A. rostrata* の産卵場がサルガッソ海にあることを明らかにしたことに端を発する。Schmidt (1925) は、本属魚類の産卵場と淡水生活域は数千キロも離れており、産卵場から淡水生活域への移動には、レプトケファルス幼生期の海流による受動的な輸送が大きく影響していると述べた。近年、この特異な回遊生態がウナギ *A. japonica* にも当てはまることが推定され (Tsukamoto, 1992; Kimura *et al.*, 1994)、Schmidt が提示した生活史は、ウナギ属魚類全般に当てはまるものではないかと考えられるようになってきた。さらに、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の解析からは、*A. rostrata* と *A. japonica* は種全体が、それぞれ一つの繁殖集団を形成していることを支持するデータも得られつつある (例えば、Avise *et al.*, 1986; Sang *et al.*, 1994)。

このような数千キロも離れた産卵場と淡水生活域の間を往復する回遊生態や、種全体が一つの繁殖集団を形成しているような特異な再生産構造は、どのようにして形成されてきたのであろうか。塚本 (1994) は、ウナギ属魚類が行き来する産卵場と

淡水生活域の間のルートは、種ごとに厳密に決まっているという回遊環モデルを提唱し、大回遊の成立を、元々は局所的な小さい回遊環があったものが、そのルートが伸長することで成立したという仮説を提出している。そして、一つの回遊環から別の地域に新たな回遊環が形成されることで、ウナギ属魚類の分布域が拡大されてきたとするとした。この回遊環モデルは、これまで産卵場とレプトケファルス幼生期の回遊経路が調べられている *Anguilla anguilla* や *A. rostrata* およびウナギには良く当てはまっているものと思われる。

ところで、ウナギ属魚類の中には、上記の3種のように1つの大洋とその沿岸に分布するもの以外に、複数の大洋にまたがって分布する種も存在する。その典型的な例がオオウナギ *A. marmorata* で、インドネシアから日本にかけての北西太平洋に加え、アフリカ大陸東岸からインド洋をわたり、太平洋東部海域のマルケサス諸島に至る広大な分布域を持つ。このように、本種の分布域は、海流系の異なる複数の大洋にまたがっており、1つの種が1つの回遊環を持つという考え方を厳密に当てはめて本種の産卵場と淡水生活域の関係や回遊生態を説明することはむずかしい。かつて、広大な分布域を持つことから、オオウナギは複数の産卵場を有しており、いくつかの繁殖集団に分かれている可能性があることが指摘されたこともある (Jespersen, 1942; Bertin, 1955)。その可能性はまだ検討されていないが、もしこれが事実であれば、“1種-1回遊環モデル”は改変を要することになる。一方、固有の産卵場を持ついくつかの個別の繁殖集団があるというのではなく、広い範囲にわたって連続的ないしは断続的に産卵場が存在し、繁殖集団と呼べるような明瞭な単位を有さない集団構造を持っている可能性も考えられる。これが事実ならば、上記モデルはさらに変更を要することになる。また、もし一つの産卵場しか持たず、種全体が一つの繁殖集団を形成しているのであれば、本種の回遊構造は、これまでウナギ属魚類について考えられてきたものとは全く異なることになり、ウナギ属魚類の回遊と進化についての考え方を改めなければならないことになろう。いずれにしても、オオウナギの回遊生態や集団構造を明らかにすることは、ウナギ属魚類の回

遊と進化についての理解を深める上で重要かつ必要不可欠なものである。

このように、本種がウナギ属魚類の生活史をより深く理解する上で重要な鍵となることが明白であり、また、種内に複数の繁殖集団が存在する可能性が示唆されながらも、今までこの点について研究されてこなかった背景には、分布域の中心が熱帯であり標本の入手が困難であることに加えて、ウナギ属魚類を外部形態形質によって分類することの困難さが大きいことも上げられる。このことは、Tucker (1959)が*A. anguilla* と *A. rostrata* が同種であると主張することではじまった“Tucker論争”が、生化学的な研究に答えを求めたことからもうかがえる (Gemeroy and Boyden, 1961; Pantelouris *et al.*, 1968~71)。そこで、本研究では、最近急速に発展した分子生物学的手法を用いて上記の課題、すなわちオオウナギの集団構造と回遊環の実態解明という課題にアプローチすることを目指した。とくに、mtDNAと核DNAという異なったゲノムを解析することで、オオウナギの遺伝的集団構造について深く検討することを目的とした。

DNA解析を中心とした分子集団遺伝学的研究は、Mullis *et al.* (1985)によってPCR法が開発されて以来、多くの生物を対象に行われるようになってきた。しかし、魚類においてオオウナギのように広大な分布域を持つ種を対象に、その全地域を網羅したかたちでの集団解析を行った研究はない。したがって、本研究の結果は、広域分布種を対象として集団解析を行う場合の指針を与えるものとなるであろう。さらに、本研究においては、核DNAとmtDNAの解析結果を総合することで、集団の形成過程や集団間の移住とそれに伴う交雑の有無などについて考察を加える。このような核DNAとmtDNAという2つの異なるゲノムを持つ遺伝的・系統的情報を解析し、それらを通じて集団を解析する研究はまだ始まったばかりであり、本研究の取り組みは、分子集団遺伝学的研究の新たな展開を図る試みである。

以下では、まず次の第2章において、mtDNAの解析から集団構造を推定し、第3章で核DNAを解析し、mtDNA解析から推定された集団構造をさらに詳細に検討する。つづく第4章では集団構造の形成過程をmtDNAと核DNAの遺伝的分析結果を

総合して推察する。そして最後の第5章では、本研究で得られた結果全てを総合して、オオウナギの集団構造形成要因について述べ、また、それぞれの産卵場と海流構造の関係について考察する。さらに、今後、ウナギ属魚類の資源構造を理解する上での留意点を論じる。

第2章 ミトコンドリアDNAによる集団構造の解析

遺伝的な集団構造を把握しようとする場合、まずはじめに行うことは、各個体が持つ遺伝的な情報を解析することによって、対象生物が遺伝的組成の異なる分集団に分かれているかどうかを調べることであろう。もし、複数の分集団に分かれているのであれば、それぞれの集団の分布域を調べ、集団間に地理的な分離が生じているかを検討し、集団構造を把握する。従来、このような試みには、DNAの一次産物である酵素タンパク質の多型を検出するアロザイム分析法が広く用いられてきた。しかし、オオウナギのように熱帯を中心に分布する生物では、アロザイム分析に必要な生きた標本もしくはタンパク質が変成しないように冷蔵保存された試料を入手することは非常に困難である。一方、PCR法を用いてDNAの塩基配列を決定し、その塩基配列がもつ遺伝情報を解析する方法は、アルコール固定された試料を使用することができる。さらに、遺伝物質であるゲノムを直接解析することで、より多くの情報を考慮することができることから、本研究に適していると考えられる。

一部の原生生物を除いた真核生物の細胞内には、核DNA以外にミトコンドリアDNA (mtDNA)が存在する。mtDNAは、大きさが約16000塩基対 (bp)と核DNAに比べ小さく (Brown, 1983)、比較的容易に抽出できることから、ヒトをはじめとする多くの生物を対象とした研究に利用されてきた (例えば、Avise, 1994; Meyer, 1993)。このため、mtDNAについてはかなりの知見が蓄積されており、魚類においてもコイ *Cyprinus carpio* やニジマス *Oncorhynchus mykiss* などいくつかの種において、全塩基配列が決定されつつある (例えば、Chang *et al.*, 1994; Zardoya *et al.*, 1995)。さらに、集団解析を行う場合に重要となる、変異性や進化速度を評価する手法も多く開発されている。

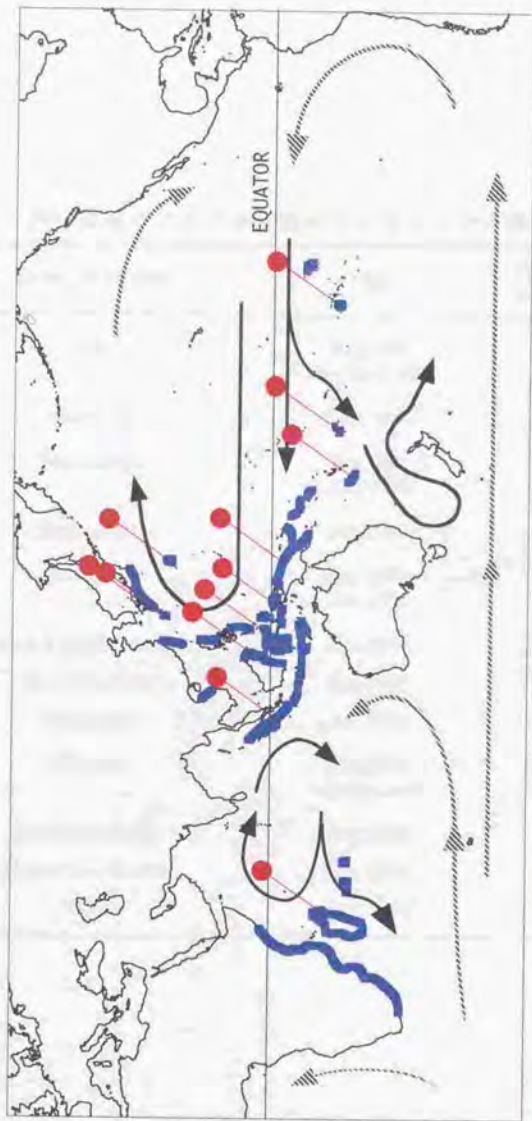
そこで本章では、まずこのmtDNA分析によって、オオウナギの集団構造を解析することを試みる。第1節で研究に用いる標本の採集と種査定について述べたあと、第2節で、オオウナギの集団解析に用いる分析対象領域の選定を行う。そして、第3節

で、塩基配列を元に遺伝子系統樹を作成することで標本内の遺伝的構造性の存在を確認し、第4節で採集地点間の遺伝的変異性から集団構造を推定する。つぎに、第5節では、これまでの研究から種全体が1つの繁殖集団を形成していると考えられているウナギ *A. japonica* の種内の変異性と、推定したオオウナギの各集団内および集団間の遺伝的変異性を比較することで、各集団の遺伝的分化程度の評価を行う。

第1節 標本の採集と種査定

第1項 標本採集

1993年2月から1997年6月にかけて、オオウナギの全分布域を網羅するように、小笠原父島、口永良部島、沖縄、インドネシア（スラウェシ島、アンボン島、スマトラ島）、バブアニューギニア、フィジー、タヒチ、ニューカレドニア、マダガスカル、マレーシア（ボルネオ島北部）、バングラディッシュならびにタンザニアの10ヶ国14地域において、ウナギ属魚類の標本採集を行った。その結果、上記の14地域のうち、バングラディッシュ、タンザニアの2地域を除く12地域より（図2-1）、分布域、体表の斑紋パターンからオオウナギと判断された195個体を収集した（表2-1）。また、ウナギ属魚類における種内と種間の遺伝的な変異性を比較するために、外群としてオオウナギ以外の6種（*A. celebesensis*, *A. megastoma*, *A. mossambica*, *A. nebulosa nebulosa*, *A. obscura*, *A. bicolor bicolor*）をそれぞれの分布域より採集した（表2-2）。標本採集時に肝臓組織もしくは筋肉組織の一部を切り出し、99%エタノール中に固定保存した。*A. anguilla*の標本は、フランスで採取され岩手県の養鰻業者により飼育されていた個体を用いた。*A. rostrata*については、アメリカ・メイン州において採取された個体のエタノール固定された肝臓組織標本を試料とした。*A. japonica*の標本は、1988年に種子島で採取され、99%エタノール中に保存されていたシラスを用いた。



●：標本採集地点，—：オオウナギの分布域，→：暖流，---：寒流

図2-1 オオウナギの分布域と標本採集地点

表2-1 各採集地点における採集年月とオオウナギ標本個体数

Sampling location	Date	Number of individuals	Total
Fiji	Aug.1995	8	25
	May-Jun. 1996	17	
Ambon Is.	Nov. 1995	4	4
Sulawesi Is.	Sep.1993	11	19
	Aug.1996	8	
Sumatera Is.	Feb.1997	11	11
Madagascar	Sep.1994	8	25
	Dec.1996	17	
Borneo Is.(Kalimantan Is.)	Apr.1996	6	6
New Caledonia	Jun.1997	8	8
Ogasawara	Jun.1993	18	18
Okinawa	Apr.1995	6	14
	Jul.-Oct.1996	8	
Kuchinoerabu Is.	Aug.1996	16	16
Papua New Guinea	Sep. 1996	24	24
Tahiti	Aug. 1996	25	25

表2-2 ウナギ属魚類9種の標本の形態計測値と採集地点

Species	Total length (mm)	Preal length (mm)	Predorsal length (mm)	Head length (mm)	No. of vertebrae	Sampling date	Locality
<i>A. celebesensis</i>	547.0	221.0	165.0	65.1	103	4-Sep-93	Slawesi Is., Indonesia
<i>A. megastoma</i>	329.0	126.0	89.0	39.0	110	10 Jun 97	Thio riv, Thio village, New Caledonia
<i>A. messambica</i>	355.0	150.0	98.0	49.1	104	9-Sep-94	Antananarivo, Madagascar
<i>A. nebulosa nebulosa</i>	589.0	247.0	172.0	82.5	-	1-Jun-95	Chittagong, Bangladesh
<i>A. obscura</i>	615.0	274.0	251.0	100.0	-	21-Aug-95	Boys town, Fiji
<i>A. japonica</i>	55.0	-	-	-	114	16-Jan-88	Tanegasima Is. Japan
<i>A. bicolor bicolor</i>	554.0	236.0	210.0	77.5	-	15-Sep-93	Sumatera Is., Indonesia
<i>A. anguilla</i>	874.5	365.0	273.0	102.0	115	15-Nov-93	Loire river, France
<i>A. rostrata</i>	-	-	-	-	-	1-Nov-93	Soudabscok stream, Maine U.S.A

第2項 標本の種査定

採集したオオウナギと思われる標本のうち、成体の標本については、斑紋、体長、吻端・肛門長、吻端・背鰭前端基部長を計測し、Ege (1939)にしたがって種査定を行った。また、シラスの標本については脊椎骨数を計数し、同じくEge (1939)にしたがって種査定の再確認を行った。その結果、186個体は全ての形質と特徴がオオウナギの範疇に入り(表2-3)、Ege (1939)に従う限り、オオウナギであることが確認された。残りの9個体については、背鰭前端基部と肛門の距離の体長に対する割合(AD%)がEgeの報告では12~19%であるのに対し、2個体でこれより低い割合を示し(付表1, FI-382, PNG-96303), 7個体で高い割合を示した(付表1, ISL-032, MAD-132, MAD-142, FI-392, MAD-96533, MAD-96545, NC-97325)。低い値を示した2個体は背鰭前端基部に奇形が認められ、背鰭前端基部と肛門の距離が正しく計測出来ない標本であったが、歯列の形状に基づいてオオウナギと査定した。また、割合が高い値を示した7個体についても、ウナギ属魚類のうち、斑紋がある種の中でAD%が最も高い種がオオウナギであることから、オオウナギと査定した。

第2節 集団解析に用いる分析対象DNA領域の選定

mtDNAは13種類のタンパク質をコードする遺伝子領域、2種類のリボソームRNAをコードする遺伝子領域、22個の転移RNA(tRNA)をコードする遺伝子領域、およびグアニン(G)とシトシン(C)の含量が多いH (Heavy)鎖の複製開始点を含む調節領域から成り立っている。これまでの研究から(例えば、Wolstenholme and Jeon, 1992など)、それぞれの領域の塩基置換速度は、タンパク質をコードする領域が最も遅く、次いでリボソームRNA遺伝子領域、調節領域の順に速いとされている。また、対象生物によっても塩基置換速度に差があることが知られている(例えば、Wu and Li,

表2-3 オオウナギ標本の形態形質

a) young or adult

	TL (mm)		PAL/TL (%)		PDL/TL (%)		HL/TL (%)		AD/TL (%)	
	Collected samples	Ege's samples	Collected samples	Ege's samples	Collected samples	Ege's samples	Collected samples	Ege's samples	Collected samples	Ege's samples
Average	483.4	-	43.6	39.8-44.0	26.9	10.3-12.6	15.1	13.2-15.6	16.7	14.9-16.6
SE	173.14		1.90		1.78		1.13		1.47	
Max	1177.0	600<	48.1	<46.9	35.8	<14.9	18.1	<17.9	20.5	<18.9
Min	124.0	<100	31.6	>38.0	19.0	>8.0	7.9	>11.0	8.4	>12.0

Ege's samples : Morphological data of *A. marmorata* from Ege(1939)

TL: Total length, PA: Preanal length, PD: Predorsal length, HL: Head length, AD: Distance between verticals through anus and origin of dorsal fin

b) glass eel

	TL (mm)	VN
Average	17.9	103.6
SE	17.53	1.14
Max	55.8	105.0
Min	4.2	102.0

VN : Number of vertebrae

1985; Zardoya and Meyer, 1996など).

したがって、オオウナギの集団解析を本格的に始めるまえに、本種の集団解析に有効な分析対象領域の選定が必要と考えられる。そこで、mtDNAの遺伝子領域の中で、最も変異性が高い調節領域、リボソームRNA遺伝子領域のなかでは変異性が高い16SリボソームRNA遺伝子(16S)領域、タンパク質をコードする領域のなかでは比較の変異性が高いと予想されるNADHデヒドロゲナーゼ・サブユニット2遺伝子(ND2)領域の3遺伝子領域について塩基配列を決定した。この3領域の中から、オオウナギの種内で変異性が最も高い領域を選定した。また、選定した領域のオオウナギの種内における塩基置換率が、ウナギ属魚類の種間における塩基置換率を越えていないことを、外群9種のウナギ属魚類を用いて確認した。

第1項 材料と方法

1. 材料

分析対象領域の選定に用いた材料は、全12の採集地点中から、小笠原、フィジー、タヒチ、マダガスカルの計4カ所から、それぞれ5個体を無作為に選んだ。

2. 粗全DNAの抽出

エタノール固定された肝臓組織標本もしくは筋肉組織標本から約1mm³の組織片を切り出し、細かく刻んだ後、500 μ lの抽出用Buffer (10mM Tris, pH8.0, 2mM EDTA, 1% SDS) に5~10 μ lのproteinase K (10mg/ml)を加えた溶液に入れ、37℃で3~12時間かけてゆるく攪拌しながら溶解させた。これに、タンパク質を変成させるために500 μ lのフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、30分~3時間静かに攪拌したあとで10000~12000rpmで10~15分間遠心し、成層させた。DNAを含む上層を滅菌した新しいチューブに移し、再度500 μ lのフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコールを加え、遠心までの同じ行程を繰り返した。つぎに、取り出した上層から有機溶媒を除くためにジエチル

エーテル500 μ lを加え、軽く攪拌したあとで3000rpmで数分の遠心によって成層させ、有機溶媒を含むジエチルエーテル層を取り除いた。チューブに残った溶液に、20 μ lの5M NaClと1mlのエタノールを加えて静かに攪拌し、氷温で15~30分静置した。そのあと15000rpmで15分遠心することでDNAをベレットとして沈殿させ、ベレット以外の水層を取り除いた。ベレットに含まれている過剰の塩分を取り除くために、70%エタノールを500 μ l加えてベレットを洗い、再度ベレットを沈殿させるために15000 rpmで15分遠心した。ベレット以外の水層を取り除き、乾燥させてから500 μ lのTE Buffer (10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA)を加えてベレットを溶解させた。この溶液の一部(3~5 μ l)を、1~2%のアガロースゲルによる電気泳動にかけ、臭化エチジウム染色によりDNAの存在の確認を行った。

3. DNA断片の増幅

抽出した粗全DNAを試料として、AmpliTaq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer Corp.)のプロトコルにしたがい、調節領域前半約600bp、16S領域後半約600bpおよびND2領域約700bpの塩基配列を決定した。なお、PCR法にはPerkin Elmer Corp.製のサ-マルサイクラー (Model 480または2400)を使用し、94°Cで2分加熱した後、94°C・20~30秒、50~52°C・20~30秒、72°C・40~60秒の過程を30~35回繰り返した。使用したプライマーは、調節領域を増幅するにはL15923-H16498、L15774-H16498の2組のプライマーセットを使用した(表2-4)。16S領域を増幅するには、L2482-H3058のプライマーセットを用いた(表2-4)。また、ND2領域を増幅するには、L4367-H5074、L4452-H5074、L5038-H5635の3組のプライマーセットを使用した(表2-4)。PCR産物2~3 μ lをDNA分子量マーカー(ϕ X174-Hinc II digest)と一緒に1.5%アガロースゲルによる電気泳動にかけ、臭化エチジウム染色により当該領域のDNA断片の増幅を確認した。

4. 塩基配列の決定

DNA断片の増幅が確認されたPCR産物を、マイクロコン100 (Amicon Inc.)を用

表2-4 PCR法およびDye terminator反応に使用したプライマー

Name	Sequence(5'→3')	Source
L1523	5'-TTAAAGCATCGGTCTTGTA-3'	M.Nishida (Unpublished)
L1574	5'-ACATGAATTGGAGGAATACCAGT-3'	M.Nishida (Unpublished)
H16498	5'-CCTGAAGTAGGAACCCAGATG-3'	Kocher et al., 1989
L2482	5'-GAGGAACTCGGCAAA-3'	M.Nishida (Unpublished)
H3058	5'-TCCGGTCTGAACTCAGATCACGTA-3'	Kumazawa and Nishida, 1995
L4367	5'-GACCCATACCTGAGAGATCAA-3'	M.Nishida (Unpublished)
L4445	5'-GGGCCATACCCCGAACAT-3'	M.Nishida (Unpublished)
L5038	5'-GCCTTCTCATCAATCGCCATATAGGATGAAT-3'	M.Nishida (Unpublished)
H5635	5'-AGGCTTAGCTTAATTAAG-3'	M.Nishida (Unpublished)
H5540	5'-CCGCTGAGGGCTTTGAAGGC-3'	M.Nishida (Unpublished)
H4980	5'-ATCTTCGTAGTCTGTTGRTT-3'	Kawaguchi and Nishida (Unpublished)

いて遠心透析により精製し、細かなDNA断片や反応に用いられなかった塩基などを除去した。この精製後のPCR産物をテンプレートとして、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Corp.)を用いて、PCR法と同じサーマルサイクラでDye terminator反応を行い、オートシーケンサー(373A Automated Sequencer, Perkin Elmer Corp.)によって直接塩基配列を決定した。なお、Dye terminator反応に使用したプライマーは、PCR法によるDNA断片の増幅に用いたものと同じプライマーを使用した。また、1個体の塩基配列を決めるのに、GC含量の多いH鎖との塩基配列と、それに相補的な塩基配列を持つL(Light)鎖の塩基配列をそれぞれ別に決定した。このH鎖とL鎖の塩基配列をDNASYS (DNA Sequence Input and Analysis System-Macintosh, Hitachi Software Engineering Corp., 1992)上において比較し、両塩基配列が相補的になっていることを確認した。

5. GENE BANKより得た塩基配列

NCBI (National Center of Biotechnology Information)より、Sang *et al.* (1994)が決定したウナギ 31個体についての調節領域の塩基配列と、Lee *et al.* (1995)によって報告されたカワスズメ科魚類5種およびタラ属魚類10種の調節領域の塩基配列を入手し、塩基配列の相同性確認や解析の比較検討に用いた(表2-5)。

6. 塩基配列の相同性の確認

決定した塩基配列は、はじめにCLUSTAL W Multiple Sequence Alignment Programを用いて大まかに相同性の確認(アライメント)を行った後、シーケンスエディター(SeqPup ver. 0.6 development release, Gilbert, 1995)上で目視によってアライメントを行った。なお、調節領域の目視によるアライメントにおいては、塩基サイトごとの変異性を、カワスズメ科魚類5種やタラ属魚類10種および外群となるウナギ属魚類9種の塩基配列と比較し、その結果を考慮して行った。

7. 3つのDNA領域間における変異性の比較と有効性の検討

表2-5 本研究の比較資料にしたタラ科魚類とカワスズメ科魚類の種名
およびその調節領域の塩基配列データの所在

Order	Family	Species	Accession No.
Perciformes	Cichlidae	<i>Bathybates sp.</i>	U12556
		<i>Champsochromis spilorrhynchus</i>	U12553
		<i>Cichlasoma citrinellum</i>	U12555
		<i>Cyrtocara moorii</i>	U12554
		<i>Haplochromis obesus</i>	U12552
		<i>Lethrinops auritus</i>	U12551
		<i>Lobochilotes labiatus</i>	U12550
		<i>Petrochromis orthognathus</i>	U12549
		<i>Petrotilapia sp.</i>	U12547
		<i>Rhamphochromis sp.</i>	U12548
Gadiformes	Gadidae	<i>Microgadus tomcod</i>	U12058
		<i>Gadus morhua</i>	U12063
		<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	U12066
		<i>Pollachius virens</i>	U12069

Accession No. ; The nucleotide sequences used in this paper as references had been submitted to the GeneBank/ISBN Data Bank, with these accession numbers

配列決定した3つの領域それぞれの塩基配列について、変異サイトの割合、系統的情報を含む変異サイト(個体変異を除いた変異サイト)の割合、転位型変異(Ti)および転換型変異(Tv)の割合、挿入・欠失(Indel)の割合などを求め、その変異性を比較した。さらに、それぞれの塩基配列に存在した変異に系統的な情報がどれだけ含まれているかを見るために、繰り返しを許すかたちで無作為に選んだ塩基サイトのデータを基に、PAUP ver. 3.1.1 (Swofford, 1993)を用いて求めた最節約樹(Random tree)のステップ数の頻度分布を調べた。以上の分析の結果から、それぞれの領域の変異性を検討し、本格的に分析を行う際の対象領域を選定した。また、選定された領域については、オオウナギの種内の変異性がウナギ属魚類の種間の変異性を越えていないことを確認するとともに、その塩基置換が自然選択にたいして中立であるかを、Tajima's D (1989a; 1989b; 1993)を用いたNeutrality testによって検証した。これにはArlequine (software package for population genetics, Schneider *et al.*, 1996)を使用した。

第2項 結果

1. 塩基配列の相同性の確認

オオウナギ15個体について決定した塩基配列を、CLUSTAL Wによってアライメントを行った結果、16S領域とND2領域の塩基配列にはIndelが認められず、それぞれ607bpおよび729bpの相同性が確認された。また、ND2領域の変異にはアミノ酸置換を伴う変異は認められなかった。調節領域においては約80サイトのIndelが認められた。

調節領域ににおいて、Indelが認められたサイトに隣接する領域の相同性を確認するために、カワスズメ科魚類、タラ属魚類および外群のウナギ属魚類9種の塩基配列とオオウナギの塩基配列との比較を行った。その結果、オオウナギを含めウナギ属魚類の調節領域には、カワスズメ科魚種とタラ属魚類で認められたCSB-D (Conserved sequence block-D, Brown *et al.*, 1979)が認められなかった。また、

塩基配列を10サイト毎に区分し、その1つの区分に含まれる変異サイト数の頻度分布を比較した(図2-2)。その結果、カワスズメ科魚類とタラ属魚類ではL鎖上においてtRNA^{PRO}に引き続く調節領域の5'末端から数えて200番目の塩基付近までのサイトの変異性が高く、引き続く200~500塩基付近までは保存性が高い傾向が認められた。これに対し、ウナギ属魚類においては、5'末端から数えて100塩基付近までのサイトが高い保存性を持ち、引き続く450塩基付近までは変異性が高い傾向が認められた(図2-2)。このことから、カワスズメ科魚類およびタラ属魚類とウナギ属魚類との間では、調節領域において変異性が高いサイトと低いサイトの位置が異なると推察される。そこで、このウナギ属魚類の調節領域のアライメントを正確に行うために、つぎのような手順をふんだ。まず、外群のウナギ属魚類9種に小笠原で採集されたオオウナギ1個体(OG-01)を加えた10種10個体間で塩基配列の比較を行い、10%以上の種で塩基が異なるサイトの頻度分布を求め(図2-3)、保存性の高いサイトの位置を確認した。その結果、調節領域の5'末端から数えて90番目の塩基まで、100番目から140番目の塩基までなど、保存性が高い領域が認められた(図2-3において※で表示)。そこで、はじめに保存性が高い部分についての相同性を確認し、次いでそれら領域と連続するサイトの相同性を次々に確認する形で626bpの相同性を確認した。

2. 3領域間の変異性の比較と集団分析への有効性の検討

オオウナギの種内において、決定した3領域(調節領域、16S領域、ND2領域)の変異性を比較したところ、変異サイトの割合は調節領域が24.1%と最も高く、次いで16S領域が5.6%、ND2領域が2.5%であった(表2-6)。ND2領域の塩基配列について、アミノ酸をコードするコドンの座位ごとに変異サイトの割合を見てみると、第1座位が0.4%、第2座位が2.5%、第3座位が4.5%であった。また、個体変異を除いた系統的情報を含むと思われる変異サイト(Informative sites)の割合は、調節領域が12.1%、16S領域が4.1%、ND2領域が1.5%(第1座位=0.4%、第2座位=1.2%、第3座位

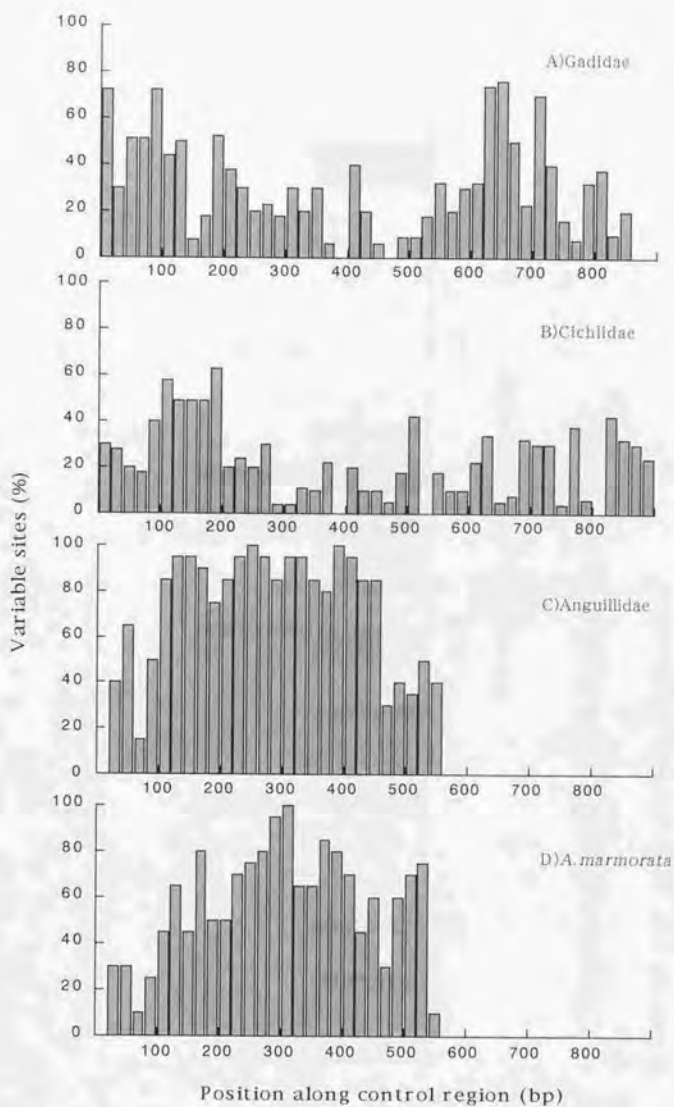


図2-2 調節領域における10サイトごとの変異サイト数

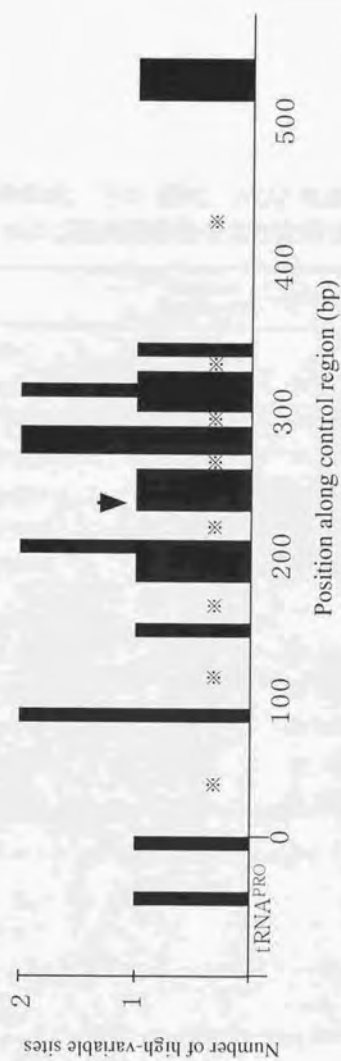


図2-3 ウナギ属魚類の調節領域における保全性の高い領域の位置

※: Conserved range → : Position of subsequent indels

High-variable sites are more than 10% of pairs among haplotypes are varied

表2-6 調節領域, 16S 領域, ND2 領域に認められた
変異サイトおよび系統的情報を含む変異サイトの割合

	length of sequence (bp)	variable site	informative site
within <i>A. marmorata</i>			
Control region	626	151 24.1%	76 12.1%
16S rRNA	607	34 5.6%	25 4.1%
ND2 with all positions	729	18 2.5%	11 1.5%
1st position	243	1 0.4%	1 0.4%
2nd position	243	6 2.5%	3 1.2%
3rd position	243	11 4.5%	7 2.9%
among 10 species of Anguillidae			
Control region	601	365 60.7%	282 46.9%
ND2 with all positions	1011	246 24.3%	147 14.5%
1st position	337	52 15.4%	30 8.9%
2nd position	337	19 5.6%	6 1.8%
3rd position	337	175 51.9%	111 32.9%

=2.9%)であった(表2-6)。さらに、TiやTvおよびIndelを有するサイト数を計数したところ、どの領域においてもTiが最も多いことが示された(表2-7)。決定した3領域の塩基配列から、Random treeのステップ数の頻度分布を求めたところ、分布の幅は明らかに調節領域が最も広い結果となった(図2-4)。このことから、調節領域の変異性が最も高く、集団解析に必要な遺伝的・系統的な情報を多く含んでいるものと思われる。

以上の結果から、調節領域が、集団解析に最も有用であると判断される。しかし、この調節領域の変異性がオオウナギの集団解析に有効であるためには、その変異性が、種間よりも種内での均質性が高いこと、ならびに、その変異が自然選択に対して中立であることが望ましい。そこで、外群のウナギ属魚類9種9個体について、オオウナギと同様の方法で調節領域601bpの塩基配列を決定した。これにオオウナギ1個体(OG-01)を加えた10種10個体において変異サイトの割合を求めた。その結果、種間の変異サイトの割合は60.7%であった。オオウナギ種内では上記のように24.1%でこれより小さい。195個体を分析して求めた変異サイトの割合でも45.2%(第3節で後述)で、種内の変異サイトの割合が種間のそれを越えないことが確認できた。さらに、調節領域に見られた変異の中立性をTajima's Dを用いたNeutrality testによって検証した結果、各サイト毎の変異について解析した場合(Segregation sites, $D=-1.08664$, $p<0.10$)においても、全ての変異サイトについて解析した場合(Total number of mutations, $D=-1.29943$, $p<0.10$)においても、調節領域で見られる変異が自然選択的に中立であるとみなしてよいことが示された。

以上より、多くの中立的な塩基置換が蓄積していると考えられる調節領域が、オオウナギの集団解析を行うのに最適なmtDNA上の領域であると判断した。

第3節 遺伝子系統樹の構築

表2-7 転位・転換型変異 および Indelを有するサイトの割合

	transition	transversion	indel
within <i>A.marmorata</i>			
Control region	117 18.7%	3 0.5%	31 5.0%
16S rRNA	2 0.3%	2 0.3%	0 0.0%
ND2 with all positions	15 2.1%	3 0.4%	0 0.0%
1st position	42 17.3%	17 7.0%	4 1.6%
2nd position	17 7.0%	2 0.8%	4 1.6%
3rd position	157 64.6%	43 17.7%	5 2.1%
among 10 species of Anguillidae			
Control region	310 51.6%	210 34.9%	130 21.6%
ND2 with all positions	216 21.4%	62 6.1%	13 1.3%
1st position	42 12.5%	17 5.0%	4 1.2%
2nd position	17 5.0%	2 0.6%	4 1.2%
3rd position	157 46.6%	43 12.8%	5 1.5%

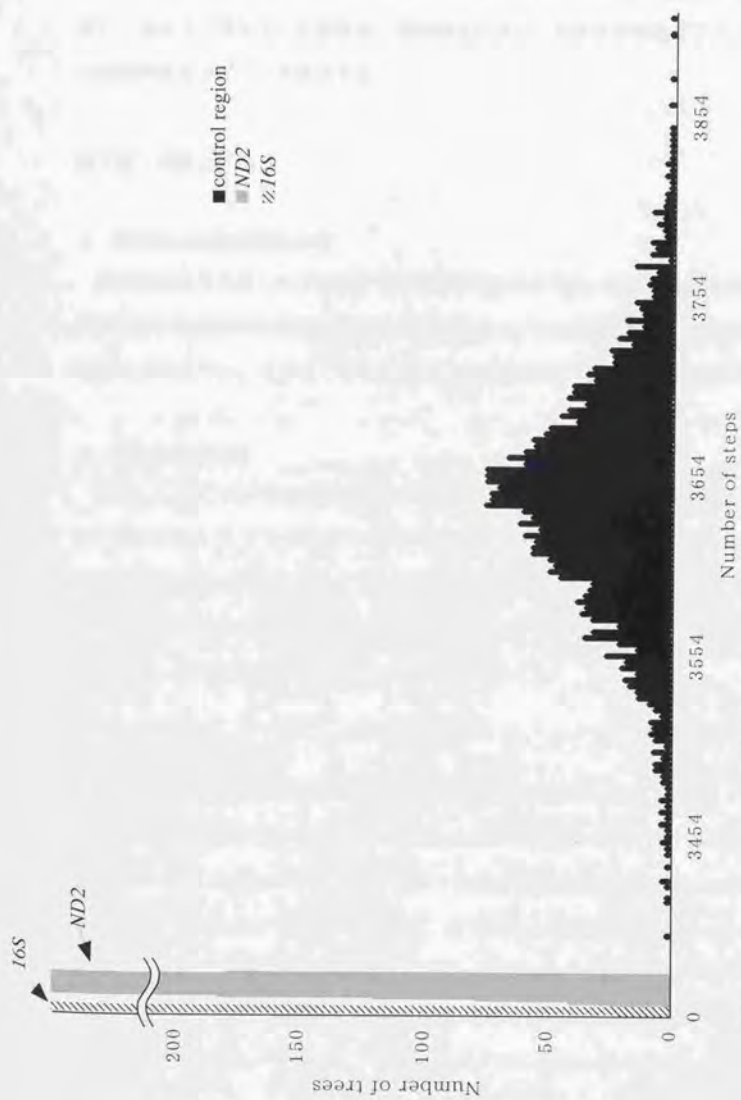


図2-4 Random treeの頻度分布

本節では、オオウナギの種内に複数の地域集団が存在するかどうかを調べるために、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の調節領域の塩基配列を基に遺伝子系統樹を推定し、各地点で採集された個体が、系統樹上においてもそれぞれ地点ごとにまとまる傾向があるかどうかを検討する。

第1項 材料と方法

1. 標本および塩基配列決定

全12地点より採集したオオウナギの標本195個体のうち、前節で分析対象領域の選定に用いた15個体に加え、残りの180個体についても前節と同様の方法で粗全DNAの抽出を行い、ミトコンドリアDNAの調節領域626bpの塩基配列を決定した。

2. 塩基配列の検討

決定した合計195個体の調節領域の塩基配列を個体間で比較し、変異サイト数やその中に含まれるTiやTvおよびIndelを有するサイト数を計数した。各個体より得られた塩基配列をハプロタイプ(この場合は塩基配列型)に整理し、ハプロタイプ間の遺伝距離(Kimuraの2変数法)とTiの数およびTvの数との関係を調べ、系統樹を推定する際の、TiとTv間の重みづけについて検討を加えた。

3. 遺伝子系統樹の推定

各ハプロタイプ間の系統的關係を探るため、見いだされた全ハプロタイプについての遺伝子系統樹を求めた。まず、最節約法による系統樹(最節約樹, MP tree)を、PAUP-ver. 3.1.1 (Swofford, 1993) 用いて発見的構築法 (Heuristic search) を100回繰り返すことによって推定した。また、最尤法による系統樹(最尤樹, ML tree)をFASTDNAML (Olsen *et al.*, 1994) を用いて、100回のjumbling を行い推定した。最節約法においては、塩基サイトを繰り返しをゆるして無作為に抽出することで1000個のデータセットを作成し、それに基づいてbootstrap値を算出した。

第2項 結果

1. 塩基配列の特徴

配列決定したオオウナギ195個体についてのmtDNA・調節領域の塩基配列626bpには、Indelが合計78サイト、Tiが262サイト、Tvが54サイト、合計283サイト(45.2%)で変異が認められた。これらの変異によって195個体の塩基配列は179ハプロタイプに分けられた。

ハプロタイプ間におけるTiおよびTvの数と遺伝距離の関係を見るために、遺伝距離に対するTiおよびTvの数を図示してみた(図2-5 A)。そのところ、遺伝距離とTiの数の間では高い相関($r=0.99$)が得られ、遺伝距離が遠くなるにしたがってTiが一定の割合で蓄積していることが示された。これに対し、遺伝距離とTvの数の間では相関は低く($r=0.34$)、Tvの数は遺伝距離にあまり関係なく低い値を示した(図2-5 A)。また、Tvの数に対するTiの数をプロットしてみると(図2-5 B)、Tvの数が同じであってもTiの数が大きく異なる場合が多数みられた。とくにTvの数が少ない時にTiの数の幅が大きく、Tvが1サイトだけで見られるような個体の組み合わせの中には、Tiが見られない場合もあれば、Tiが53サイトで認められる組み合わせもあり、TiとTvの数の関係は、一次の比例式で表すことは出来ないことが分かった。なぜなら、TiとTvの重みづけを行った場合、最高で約50倍の誤差が生じることになるからである。本研究の場合は、Tvのサイト数が遺伝距離に関係なく低い値を示していることもあり、系統樹を推定する際にはTiやTvという塩基置換型による加重を行わない方が誤差が少なく、より確かな系統樹が得られるものと推察される。

また、調節領域の5'末端から数えて250番目の塩基付近に7~21塩基連続したIndelがみられた。このIndelだけに着目した場合、179ハプロタイプは6つのタイプ(タイプ-1~6)に分けられた(図2-6)。この6タイプの各採集地点における出現数をみると、タイプ-1は全12採集地点の標本に見られた。タイプ-2、-3、-5はそれぞれ1個体ずつしか認められず、それぞれのタイプが出現したの採集地点は、タイプ-2

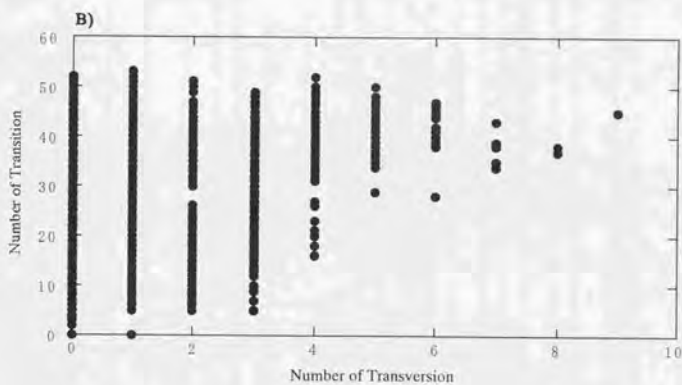
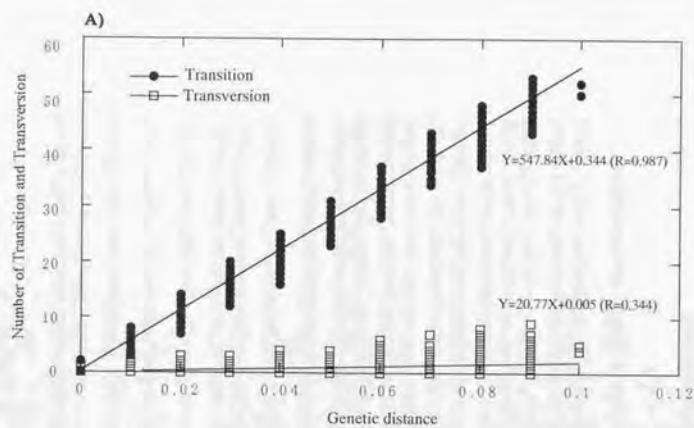


図2-5 遺伝的距離と転位・転換型変異の相関

A) Relationship between the number of transition or transversion and inferred genetic distances.

B) Relationship between the number of transition and transversion

OG	1	CAAGAAACATCCACATTTAATGT-----ACGAATTGCAAAAT-----GTACGACTA-AATG-GCCAGTAAACAACCTAAAATTTGCAT
	2	CAAGAAAACATTCACATTTAATGT-----ACAAATCACAAAT-----GTGCTAGTAAACAACCTAACCCTGGTAT
KE	1	CAAGAAAACATCCACATTTAATGT-----ACGAATTGCAAAAT-----GTACGACTA-AATG-GCTAGTAAACAACCTAAAATTTGCAT
	1	CAAGAAAACATCCACATTTAATGT-----ACGAATTGCAAAAT-----GTACGACTA-AATG-GCTAGTAAACAACCTAAAATTTGGCAT
IAN	1	CAAGAAAACATCCACATTTCAATGT-----ACGGATTACAAAT-----ATAACAATA-AATG-GTTAGTAAACAACCTAAAATTTGCAT
	1	CAAGAAAACATCCACATTTAATGT-----ACGAATTGCAAAAT-----GTACGACTA-AATG-GCTAGTAAACAACCTAAAATTTGGCAT
ISL	3	CAAGAAAACATTCATTAATTTCAATATTCACATACAAATTTACAAAT-----GTACAATTACAATG-GCTAGTAAACAACCTAAAATTTGCAT
	1	CAAGAAAACATCCACATTTCAATGT-----ACGAATTGCAAAAT-----GTACAACAATA-AATG-GCTAGTAAACAACCTAAAATTTGGCAT
ISU	1	CAAGAAAACATTCACATTTAATGT-----ACAAAGTTACAAAT-----GTACAATTTATAATG-GTTAATAAACAACCTAAAATCTGGCAT
	1	CAAGAAAACATTCACATTTAATGT-----ACAAATTTACAAAT-----GTACAATTTACAATG-GTTAGTAAACAACCTAAAATCTGGCAT
PNG	4	CAAGAAAACATTCACATTTAATGT-----ACAAATTTACAAATTTACAAAT-----GTACAATTTACAATG-GTTAGTAAACAACCTAAAATCTGGCAT
	4	CAAGAAAACATTCACATTTAATGT-----ACAAATTTACAAATTTACAAAT-----GTACAATTTACAATG-GTTAGTAAACAACCTAAAATCTGGCAT
NC	4	CAAGAAAACATTCACATTTAATGT-----ACAAATTTACAAATTTACAAAT-----GTACAATTTACAATG-GTTAGTAAACAACCTAAAATCTGGCAT
	4	CAAGAAAACATTCACATTTAATGT-----ACAAATTTACAAATTTACAAAT-----GTACAATTTACAATG-GTTAGTAAACAACCTAAAATCTGGCAT
FI	1	CAAGAAAACATTCACATTTAATGT-----ACAAATTTACAAAT-----GTACAATTTACAATG-GTTAGTAAACAACCTAAAATCTGGCAT
	4	CAAGAAAACATTCACATTTAATGT-----ACAAATTTACAAATTTACAAAT-----GTACAATTTACAATG-GTTAGTAAACAACCTAAAATCTGGCAT
TA	4	CAAGAAAACATTCACATTTAATGT-----ACAAAGTTACAAAT-----GTACAATTTACAATG-GTTAGTAAACAACCTAAAATCTGGCAT
	4	CAAGAAAACATTCACATTTAATGT-----ACAAATTTACAAATTTACAAAT-----GTACAATTTACAATG-GTTAGTAAACAACCTAAAATCTGGCAT
MAD	5	CAAGAAAACATTCACATTTAATGT-----ACAAATTTACAAATTTACAAATTTACAAATGTTACAATGTACAATGTTACAATG-GTTAGTAAACAACCTAAAATCTGGCAT
	1	CAAGAAAACATTCACATTTCAATGT-----ATAAATTTACAAAT-----ATGCCATCA-AATG-GTTAGTAAACAACCTAAAATCTGGCAT
	6	CAAGAAAACATTCGCATTTAATGT-----ACAAATTTA-----AATG-GTTAGTAAACAACCTAAAATCTGGCAT

OG: Ogasawara, KE: Kuchinoerabu Is., OK: Okinawa, IAN: Ambon Is., ISL: Sulawesi Is., MBO: Bornoeo Is., ISU: Sumatera Is., PNG: Puap New Guinea, NC: New Caledonia, FI: Fiji, TA: Tahiti, MAD: Madagascar

図2-6 オオウナギの調節領域に認められた連続した挿入・欠失部分の塩基配列

は小笠原 (OG)、タイプ-3はスラウェシ島 (ISL)、タイプ-5はタヒチ (TA)であった。また、タイプ-6はマダガスカル (MAD)において2個体が認められた。しかし、タイプ-4はタヒチ (TA)、バブアニューギニア (PNG)、ニューカレドニア (NC)、フィジー (FI)の南太平洋の4地点で認められた。

2. 遺伝子系統樹

上記の検討結果に基づき、TiとTvの重みづけを行わずに、179ハプロタイプの遺伝子系統樹を最節約法と最尤法の2つの方法で推定した。そして、両方法で得られた系統樹の樹型を比較することで、ミトコンドリアゲノムハプロタイプ間の系統関係を明らかにすることを試みた。なお、最節約法による系統樹推定の際には、Indelを有するサイトが持つ系統的情報を調べるために、IndelをMissingとした場合と、5番目の形質状態 (5th character) とした場合の2通りで系統樹を推定し、2つの場合で得られた樹型を比較して樹型の変化を調べた。

IndelをMissingとした場合、最節約法によって5つの遺伝子系統樹 (MP tree, Tree length=910, CI=0.35, RI=0.85, RC=0.30)が推定された。この5本の系統樹を基に厳密合意系統樹を作成し、主な枝のbootstrap値を算出した (図2-7 A)。また、5th Characterの場合は4つのMP tree (Tree length=914, CI=0.35, RI=0.85, RC=0.30)が推定され、これらの系統樹を基に厳密合意系統樹とbootstrap値を求めた (図2-7 B)。

IndelをMissingとした場合の厳密合意系統樹においても、5th characterとした場合の厳密合意系統樹においても、179ハプロタイプは大きく3つの枝に分かれ、それぞれの枝 (図2-7, ①~③)のbootstrap値は82~95と高い値を示した。これら3つの枝や、さらに内部の枝を相互に隔てている軸の中に、比較的長い枝が存在することは、遺伝的・進化的にまとまりのあるミトコンドリアゲノムのグループがオオウナギ内部に存在していることを表している。なお、それぞれの枝に含まれるハプロタイプはMissingの場合と5th characterの場合で差が見られなかった。また、両系統樹の間で、CIやRIなどの一致係数がほとんど変化しないことから、Indelも他の塩基置

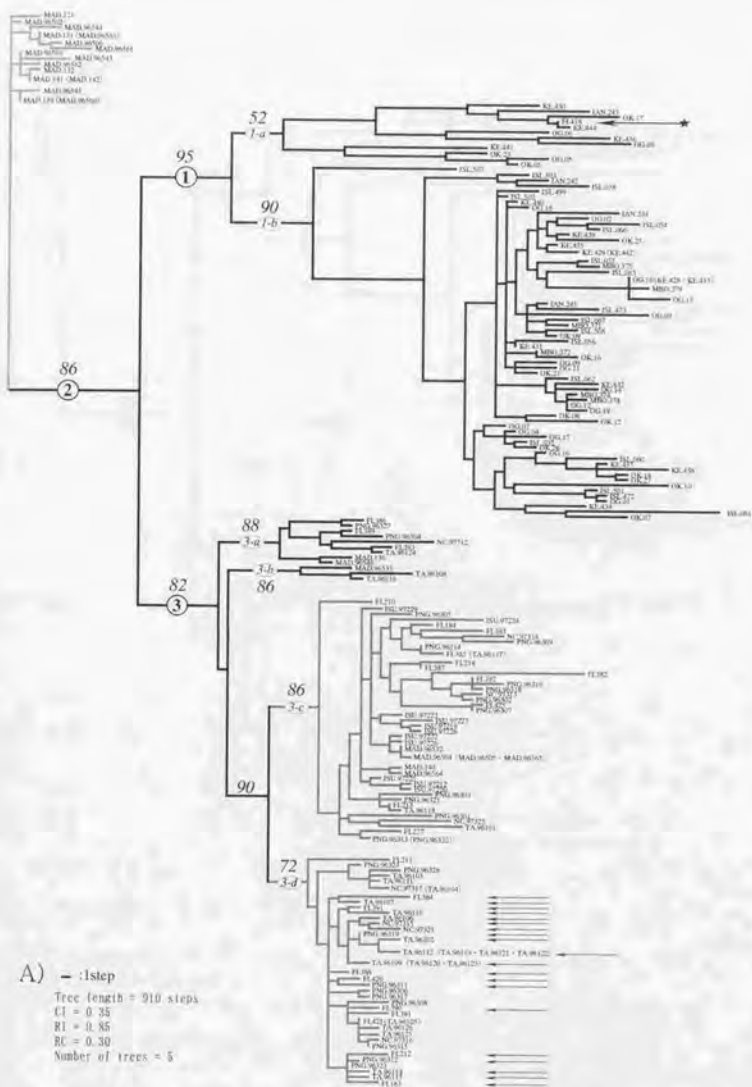
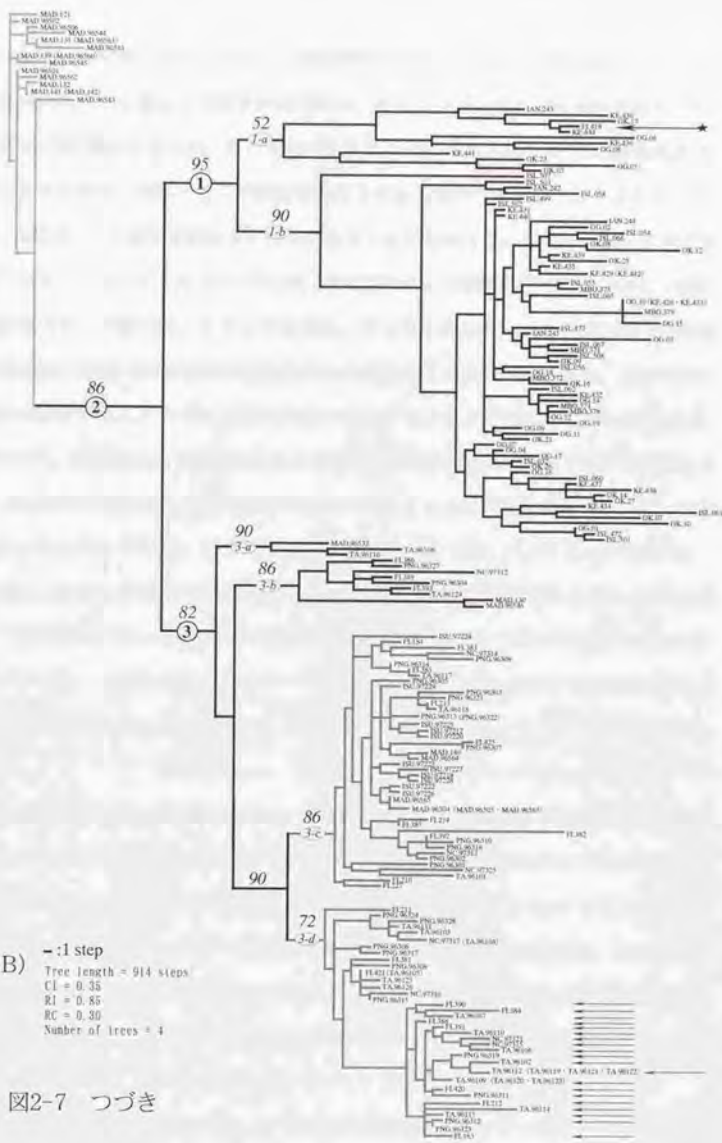


図2-7 最節約法による179ハプロタイプの厳密合意系統樹

Marks on end of each branch are sample names which have each mtDNA haplotype
 A.Indels are treated as missing data. Italic number over branches are 1000times Bootstrap values.
 B.Indels are treated as 5th character



換による形質状態の変化と同様の系統的情報を含んでいるものと思われた。

最節約法による遺伝子系統樹の樹型から、ミトコンドリアゲノムには大きく3つのグループが認められたが、それぞれのミトコンドリアゲノムグループに含まれるハプロタイプを持つ個体がどこで採集されたものかを調べてみると、ミトコンドリアゲノムグループには地理的なまとまりがあることが分かった。つまり、枝①にまとまるミトコンドリアゲノムグループには、北半球の5つの採集地点(小笠原-OG, 口永良部島-KE, 沖縄-OK, スマトラ島-ISL, ボルネオ島-MBO)とアンボン島(IAN)の合計6地点で採集された個体に認められたハプロタイプが全てが含まれ、この6地点以外の個体ではフィジーの1個体(FI.418)のハプロタイプだけがこのグループに含まれていた。枝②によってまとめられるミトコンドリアゲノムグループは、マダガスカル(MAD)で採集された個体に認められたハプロタイプだけで構成されていた。枝③にまとまるグループには、南半球の6地点(スマトラ島-ISU, バブアニューギニア-PNG, ニューカレドニア-NC, フィジー-FI, タヒチ-TA)の個体に認められたハプロタイプが含まれていた(以下、この枝①にまとまるグループを“北太平洋型ハプロタイプグループ”、枝②にまとまるグループを“マダガスカル型ハプロタイプグループ”、枝③にまとまるグループを“スマトラ・メラネシア型ハプロタイプグループ”と呼称する)。

マダガスカル型ハプロタイプグループは内部に含むハプロタイプ数は他の2つのミトコンドリアゲノムグループに比べ少なく、また内部のそれぞれのハプロタイプを隔ている枝も短いものであったが、北太平洋型ハプロタイプグループとスマトラ・メラネシア型ハプロタイプグループは、内部に多くのハプロタイプを含み、比較的長い枝が見られたため、さらにいくつかのミトコンドリアゲノムグループに分かれている可能性が考えられた。そこで、北太平洋型ハプロタイプグループとスマトラ・メラネシア型ハプロタイプグループの内部についてさらに詳しく調べてみた。

北太平洋型ハプロタイプグループ(枝①)に含まれるハプロタイプは、さらに枝1-aと枝1-bに2分される。枝1-aはbootstrap値が52と比較的低い値を示し、この枝に

は小笠原 (OG), 口永良部島 (KE), 沖縄 (OK), アンボン島 (IAN) で採集された個体のハプロタイプが含まれ, スラウエシ島 (ISL) とボルネオ島 (MBO) の個体に見られたハプロタイプは含まれていなかった。枝 1-b は bootstrap 値が 90 と高い値を示し, 小笠原 (OG), 口永良部島 (KE), 沖縄 (OK), アンボン島 (IAN), スラウエシ島 (ISL), ボルネオ島 (MBO) で採集された個体のハプロタイプが全て含まれていた。小笠原 (OG), 口永良部島 (KE), 沖縄 (OK), アンボン島 (IAN) で採集された個体に見られたハプロタイプが両方の枝 (1-a と 1-b) に位置したことから, この 2 つの枝 (1-a と 1-b) には明確な地理的な偏りはないものと考えられた。

スマトラ・メラネシア型ハプロタイプグループ (枝③) に含まれるハプロタイプは bootstrap 値が 72~88 と高い値を示す 4 つの枝 (枝 3-a~d) にさらに分かれる。枝 3-a によって 9 つのハプロタイプがまとめられ, これらは, フィジー (FI), パプアニューギニア (PNG), ニュカレドニア (NC), タヒチ (TA), マダガスカル (MAD) で採集された個体に認められたものであった。わずか 9 ハプロタイプの中に, 異なる 5 つの地点で採集された個体のハプロタイプが含まれることから, 枝 3-a が, 地理的なまとまりを持ったハプロタイプをまとめていることはないと思われる。枝 3-b にまとまるハプロタイプは, 3 つと非常に少なく, 1 つはマダガスカル (MAD) で採集された個体にみとめられたハプロタイプで, 残りの 2 つはタヒチ (TA) で採集された個体に認められたものであった。この 3 つのハプロタイプには, 採集地点間の地理的距離が最も遠いマダガスカルとタヒチのハプロタイプであることから, この枝 3-b にも地理的なまとまりは認められない。枝 3-a と b の 2 つの枝にまとめられたハプロタイプを持つ個体は, 南半球に位置するほとんどの地点で採集されており, さらに, この 2 つの枝の位置が枝③の根本付近であることから, この枝 3-a と枝 3-b によってそれぞれまとめられるハプロタイプは, 祖先的形質を多く残しているものであると考えられる。

枝 3-c には 46 ハプロタイプとかなり多くのハプロタイプがまとめられ, このなかには, スマトラ島 (ISU) で採集された個体に認められたハプロタイプが全て含まれて

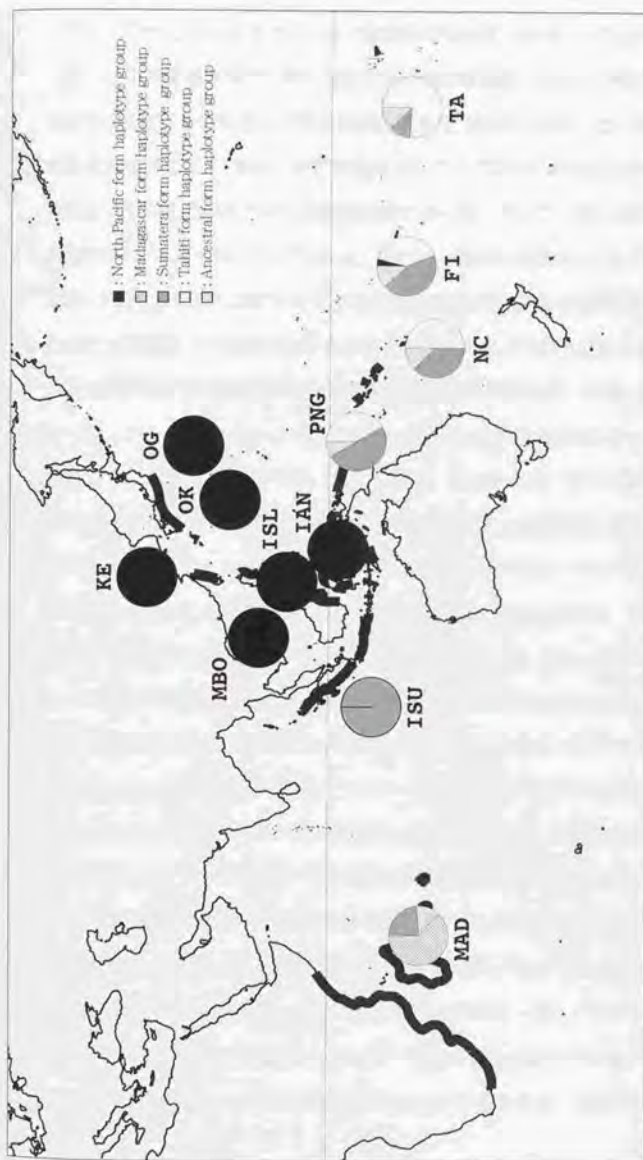
いるのとは対照的に、タヒチ (TA) で採集された個体のハプロタイプはわずか3つしか含まれていなかった。これとは反対に、枝3-dにまとめられるハプロタイプには、タヒチ (TA) で採集された個体のハプロタイプの85% (20ハプロタイプのうち17ハプロタイプ) が含まれた。

以上のことから、スマトラ・メラネシア型ハプロタイプグループは、祖先形質状態を多く残していると考えられるグループ (枝3-a,b)、スマトラ島の個体が全て含まれるグループ (枝3-c)、およびタヒチの個体が多いグループ (枝3-d) の3つのミトコンドリアゲノムグループに分かれているとみなしてよさそうである。以下、枝3-cにまとまるグループをスマトラ型ハプロタイプグループとし、枝3-dでまとめられるグループをタヒチ型ハプロタイプグループと呼ぶことにする。したがって、ミトコンドリアゲノムは、北太平洋型ハプロタイプグループ、マダガスカル型ハプロタイプグループ、スマトラ型ハプロタイプグループ、タヒチ型ハプロタイプグループ、祖先型ハプロタイプグループの合計5つのハプロタイプグループに大別できる。

最尤法による遺伝子系統樹においても、最節約樹 (MP tree) に認められた枝①~③と、③の枝の内部の枝3-a~dが認められ、それぞれの枝に含まれるハプロタイプに差が無かった (図2-8)。すなわち、最尤法による系統樹においても、オオウナギの持つミトコンドリアの系統が、大きく5つのハプロタイプグループに大別されることが支持された。この5つのグループを分かりやすくするために、この最尤法による遺伝子系統樹上に (図2-8)、それぞれの5つのハプロタイプグループをグレーの線で囲って表示した。

3. ハプロタイプグループの地理的分布の検討

上記の5つのハプロタイプグループの各採集地点ごとの出現割合を求め地図上に示すと、地理的なパターンが明瞭に浮かび上がる (図2-9)。まず、北太平洋に位置する6地点 (小笠原-OG、口永良部島-KE、沖縄-OK、スラウェシ島-ISL、アンボン島-IAN、ボルネオ島-MBO) の標本は、全て北太平洋型ハプロタイプグループのmtDNAを有する個体によって占められる点で共通していた。インド洋西部のマダガスカル



OG:Ogasawara, OK:Okinawa, KE:Kuchinoerabu Is., MBO:Borneo Is. (Karimantan Is.), ISL:Sulawesi Is., IAN:Ambom Is., ISU:Sumatera Is., PNG: Papua New Guinea, NC:New Caledonia, FI:Fiji, TA:Tahiti, MAD:Madagascar

図 2-9 各採集地点におけるハプロタイプグループの出現頻度

(MAD)の標本は、マダガスカル型ハプロタイプグループおよびスマトラ型ハプロタイプグループのmtDNAを有する個体が大部分(88%)を占めるといって他と異なっていた。インド洋北東部に位置するスマトラ島の標本は、東インド洋グループのmtDNAを有する個体だけで構成されている点で特徴的であった。南太平洋東部海域に位置するタヒチ(TA)は、タヒチ型ハプロタイプグループのmtDNAを有する個体が大部分(76%)を占めるといって特徴的であった。そして、残りのバブアニューギニア(PNG)、ニューカレドニア(NC)、フィジー(FI)の3地点はスマトラ型ハプロタイプグループとタヒチ型ハプロタイプグループのmtDNAを有する個体がほぼ同数含まれ、この2つのグループの個体で全体のほとんどを占める点で他と異なっていた。

北太平洋に位置する6地点(小笠原-OG、口永良部島-KE、沖縄-OK、スラウェシ島-ISL、アンボン島-IAN、ボルネオ島-MBO)とその他の6地点(バブアニューギニア-PNG、ニューカレドニア-NC、フィジー-FI、タヒチ-TA、スマトラ島-ISU、マダガスカル-MAD)の遺伝的組成が明確に異なっていることは明らかであり、同じ地域集団に含まれているとは考えがたい。また、西インド洋グループのハプロタイプを有する個体がマダガスカル(MAD)だけに特異的に存在したことから、マダガスカル(MAD)も固有の地域集団を形成していると考えられる。スマトラ島(ISU)についても、スマトラ型ハプロタイプグループを有する個体以外の個体が認められないことから、固有の地域集団を形成していると判断される。残りのバブアニューギニア(PNG)、ニューカレドニア(NC)、フィジー(FI)、タヒチ(TA)の4地点については、出現したハプロタイプグループの種類にはほとんど差が見られなかった。ただし、それぞれのハプロタイプグループの出現割合には大きな偏りが見られた。とくに、タヒチ(TA)ではスマトラ型ハプロタイプグループを有する個体の出現割合が明瞭に少なく、その他のバブアニューギニア(PNG)、ニューカレドニア(NC)、フィジー(FI)の3地点ものとは別の地域集団に含まれると判断される。一方、バブアニューギニア(PNG)、ニューカレドニア(NC)、フィジー(FI)の3地点がすべて同じ地域集団に含まれるか、さらにいくつかの集団に分かれているかについては、今回の結果からは明瞭

な判断は下しにくい。

以上の分析により、オオウナギの内部には、遺伝的組成が大幅に異なる地域集団が、少なくとも5つは存在していると考えられる。この5つの集団を分布域を考慮して、(1)小笠原(OG)、口永良部島(KE)、沖縄(OK)、スラウェシ島(ISL)、アンボン島(IAN)、ボルネオ島(MBO)を含む集団を北太平洋集団とし、以下、(2)マダガスカル(MAD)周辺の西部インド洋集団、(3)スマトラ島(ISU)周辺の東部インド洋集団、(4)パプアニューギニア(PNG)、ニューカレドニア(NC)、フィジー(FI)を含む南太平洋西部集団、そして(5)タヒチ(TA)周辺の南太平洋東部集団と呼ぶことにする。そこで次節では、これを作業仮説として、遺伝距離を手がかりに、mtDNAからみたオオウナギの遺伝的集団構造の解明を試みる。

第4節 標本採集地点間の遺伝距離

前節において、オオウナギの種内には最低5つの地域集団が存在することが推察された。本節では、塩基配列を基に採集地点間の遺伝距離を算出し、その結果をふまえて、この地域集団に関する推察結果に検討を加えることを目的とする。

第1項 材料と方法

第3節の系統樹推定に用いたオオウナギ195個体の塩基配列を使用した。平均塩基置換率は、2つの塩基配列間にみられる異なった塩基の割合の平均値、すなわち塩基多様度であり、塩基多様度はNei(1990)の以下の式によって求められる。

$$dx = (nx/nx - 1) \sum x_i x_j d_{ij}$$

ここでdxは塩基多様度、nxは塩基配列数、xiは集団内におけるタイプiの頻度、xjは集団内におけるタイプjの頻度、dijはハプロタイプiとj間で異なっている塩基の割合

である。したがって、ある地点における平均塩基置換率は、その地点で採集された個体が含まれる集団が任意交配を行っている集団である場合の塩基レベルでのヘテロ接合度に相当する。また、2つの地点間における平均塩基置換率は、その2つの地点で採集された個体と同じ繁殖集団に含まれると仮定した場合、その繁殖集団における塩基レベルでのヘテロ接合度を表している。

純塩基置換指数は、Neiが2集団間における対立遺伝子座当たりのコドン差の最小数を推定するために提唱した最小遺伝距離(Dm)を、mtDNAの塩基配列に応用したものであり、ある2集団間の遺伝的分化程度を示す指数である。この純塩基置換指数は、平均塩基置換率からつぎの式で求められる(Nei, 1990)。

$$Z=Y-(XA+XB)/2$$

ここで、Zは純塩基置換指数、Yは2つの集団(A,B)を1つの集団としたときの平均塩基置換率、XAは集団Aの平均塩基置換率、XBは集団Bの平均塩基置換率である。

固定指数(Fixation index)のうち、分集団の遺伝的分化を計る尺度となるFST、をWier and Cockerham (1984)にしたがって求めた。なお、Cokerhamは遺伝子頻度の分散分析に基づいて固定指数を定義しているが、本研究では塩基配列の各サイトを1つの遺伝子とみなし、サイト毎の分散分析に基づいて各採集地点間の固定指数(FST)を求めた。また、塩基配列を基に、10000回のpermutation testをおこない、2つの地点で採集された個体に見られる塩基配列の相違が、任意交配を行っている同じ繁殖集団から無作為に抽出したときに再現される確率を求めた。

Arlequin ver.1.0 (Schneider *et al.*, 1996)を用いてAMOVA (Analysis of Molecular Variance)解析を行い、推定された集団構造がmtDNAの塩基配列からどの程度支持されるか検定した(Excoffier *et al.*, 1992)。

第2項 結果

1. 平均塩基置換率

各採集地点内における個体間の平均塩基置換率を表2-8に示す。平均塩基置換率が

最も高いのがアンボン島 (IAN)における4.87%であり、反対に、スマトラ島 (ISU)の値が最も低く1.37%であった。また、全体として北太平洋集団の6地点における平均塩基置換率が、南半球に位置する6地点の値より大きい傾向が認められた(表2-8)。

前節で、同じ集団に含まれた2地点間について個体間の平均塩基置換率を求めたところ、北太平洋集団に含まれた6地点(小笠原-OG, 口永良部島-KE, 沖縄-OK, スラウェシ島-ISL, ボルネオ島-MBO, アンボン島-IAN)間の値は2.81~4.58%であり、南太平洋西部集団に含まれた3地点(バブアニューギニア-PNG, ニューカレドニア-NC, フィジー-FI)間での値は2.98~3.32%であった(表2-8)。これに対し、それぞれ異なる集団に含まれる2地点間での平均塩基置換率は、2.80%(バブアニューギニアとタヒチ間)から7.00%(ボルネオ島とマダガスカル間)の値を示した。このことは、前節で示された集団区分において、それぞれ異なる集団に含まれる個体間の遺伝的類縁性より、同じ集団に含まれる個体間の類縁性が高いことを示している。したがって、前節で推定された集団区分は、平均塩基置換率による分析からも支持されようと考えられる。

2. 純塩基置換指数

採集地点間における純塩基置換指数を表2-8に示した。地点間の変異性からそれぞれの地点内の変異性を差し引いた純塩基置換指数を見てみると、上の平均塩基置換率に認められた集団内と集団間の遺伝的な差がより明瞭に示された。つまり、北太平洋集団の6地点間における純塩基置換指数は-0.19~0.38%であり、南太平洋西部の3地点間でのそれは-0.04~0.08%であった。このように、同じ集団に含まれる地点間の純塩基置換指数は、負の値から高くても0.38%であった。これに対し、それぞれ異なる集団に含まれる地点間で求めた純塩基置換指数は、タヒチと南太平洋西部集団の3地点間での値が0.19~0.29%であることを除けば、0.42~5.08%と高い値を示した(表2-8)。比較的低い値を示したタヒチと南太平洋西部集団の3地点間においても、南太平洋西部集団内の純塩基置換指数が-0.04~0.08%であったことを考慮すると、これら3地点とタヒチとの間の値も十分に遺伝的な差を表していると思わ

表2-8 採集地点内および地点間における平均塩基置換率(%)と採集地点間の純塩基置換指数(%)

	OG	OK	KE	MBO	ISL	IAN	ISU	PNG	NC	FI	TA	MAD
OG	3.70	4.15	4.01	3.03	3.49	4.19	6.40	6.43	6.35	6.55	6.24	6.59
OK	-0.01	4.63	4.55	3.76	4.01	4.58	6.60	6.68	6.64	6.77	6.52	6.84
KE	-0.07	0.01	4.46	3.47	3.97	4.48	6.72	6.74	6.62	6.83	6.53	6.86
MBO	0.11	0.38	0.17	2.14	2.81	3.67	6.83	6.80	6.68	6.93	6.57	7.00
ISL	0.07	0.11	0.17	0.17	3.15	3.91	6.90	6.87	6.70	6.97	6.64	6.94
IAN	-0.10	-0.17	-0.19	0.17	-0.10	4.87	6.54	6.66	6.60	6.74	6.48	6.63
ISU	3.86	3.60	3.80	5.08	4.65	3.42	1.37	2.45	3.06	2.88	3.19	4.28
PNG	3.23	3.01	3.16	4.38	3.94	2.87	0.42	2.70	2.98	2.99	2.80	4.47
NC	2.95	2.77	2.83	4.05	3.56	2.61	0.82	0.07	3.12	3.32	2.91	4.77
FI	3.02	2.77	2.92	4.18	3.71	2.62	0.52	-0.04	0.08	3.36	3.09	4.66
TA	3.24	3.04	3.15	4.35	3.90	2.89	1.35	0.29	0.19	0.26	2.31	4.48
MAD	3.19	2.98	3.09	4.39	3.82	2.65	0.96	1.58	1.67	1.44	1.77	3.09

Above diagonal: Sequence difference between and within locations

Below diagonal: Nei-sequence difference index between locations

OG:Ogasawara, OK:Okinawa, KE:Kuchinoerabu Is., MBO:Borneo Is.(Karimantan Is.), ISL:Sulawesi Is., IAN:Ambom Is., ISU:Sumatera Is., PNG: Papua New Guinea,

NC:New Caledonia, FI:Fiji, TA:Tahiti, MAD:Madagascar

れる。

また、集団の組み合わせ方によって純塩基置換指数が高い組み合わせと低いものがあることが示された。つまり、北太平洋集団の6地点とその他4集団に含まれる6地点間における純塩基置換指数は最低でも2.61%であるのに対し、北太平洋集団を除く4集団間でのそれは0.19~1.67%と低い値であった。このことから、北太平洋集団とその他の4集団の間における遺伝的な変異が最も顕著であると推察される。一方、北太平洋集団を除く南半球に位置する4集団間においても、先ほども述べたように南太平洋西部集団の3地点と南太平洋東部集団(タヒチ)間では低い値(0.19~0.29%)であり、南太平洋西部集団の3地点とインド洋東部集団(スマトラ島)間の値も0.42~0.82%と低い値をであった。これに対し、インド洋西部集団(マダガスカル)とその他の3集団に含まれる地点との間の値は0.96~1.77と比較的高い値であった。このことから、南半球に位置する4集団においても、インド洋西部集団だけが、とくに遺伝的に離れていると推察される。

3. 固定指数

地点間で求めた固定指数とPermutation testによって、2つの地点が同じ集団に含まれる可能性検討する(表2-9)、平均塩基置換率や純塩基置換指数と同じように、同じ集団の2地点間で求めた固定指数(-0.0352~0.0865)より、異なる集団の地点間のそれ(0.0836~0.7718)が大きい値を示す傾向が認められた。さらに、同じ集団に含まれるとされる地点での組み合わせのうち、Permutation testの結果から同集団に含まれる確率が0.05%を下回った組み合わせは、わずかに3通りの組み合わせだけであった(沖縄-OKとスラウェシ島-ISL、口永良部島-KEとスラウェシ島-ISL、アンボン島-IANとボルネオ島-MBO)。これに対し、異なる集団に含まれるとされる地点間においては、Permutation testによる確率は全て0.05%を下回った。したがって、固定指数ならびにそれに基づくPermutation testの結果も、前節で推定されたオオウナギの5つの集団が、それぞれ異なる繁殖集団を形成していることを支持している。

表2-9 採集地点間の固定指数(F_{ST})

	OG	OK	KE	MBO	ISL	IAN	ISU	PNG	NC	FI	TA
OK	-0.0022 ^{NS}										
KE	-0.0187 ^{NS}	0.0015 ^{NS}									
MBO	0.0087 ^{NS}	0.0607 ^{NS}	0.0115 ^{NS}								
ISL	0.0207 ^{NS}	0.0347 [*]	0.0470 [*]	0.0364 ^{NS}							
IAN	0.0047	-0.0359 ^{NS}	-0.0352 ^{NS}	0.0865 [*]	0.0256 ^{NS}						
ISU	0.5855 ^{***}	0.5346 ^{***}	0.5478 ^{***}	0.7718 ^{***}	0.6624 ^{***}	0.6420 ^{***}					
PNG	0.5234 ^{***}	0.4854 ^{***}	0.4965 ^{***}	0.6427 ^{***}	0.5944 ^{***}	0.5296 ^{***}	0.1447 ^{**}				
NC	0.4657 ^{***}	0.4090 ^{***}	0.4186 ^{***}	0.6145 ^{***}	0.5483 ^{***}	0.4419 ^{**}	0.2932 ^{***}	0.0326 ^{NS}			
FI	0.4778 ^{***}	0.4356 ^{***}	0.4497 ^{***}	0.5824 ^{***}	0.5489 ^{***}	0.4570 ^{***}	0.1425 ^{***}	-0.0139 ^{NS}	0.0222 ^{NS}		
TA	0.5412 ^{***}	0.5060 ^{***}	0.5124 ^{***}	0.6705 ^{***}	0.6093 ^{***}	0.5638 ^{***}	0.3992 ^{***}	0.1064 ^{**}	0.0869 [*]	0.0836 ^{**}	
MAD	0.4976 ^{***}	0.4581 ^{***}	0.4687 ^{***}	0.6081 ^{***}	0.5630 ^{***}	0.4710 ^{***}	0.4352 ^{***}	0.3479 ^{***}	0.3463 ^{***}	0.3024 ^{***}	0.3909 ^{***}

*: $0.05 > p \geq 0.01$, **: $0.01 > p \geq 0.001$, ***: $0.001 > p$ Results of 10000times permutation test

OG:Ogasawara, OK:Okinawa, KE:Kachinoerabu Is., MBO:Borneo Is.(Karimantan Is.), ISL:..Sulawesi Is., IAN:Anbom Is., ISU:Sumatera Is., PNG: Papua New Guinea, NC:New Caledonia, FI:Fiji, TA:Tahtiti, MAD:Madagascar

以上の結果から、前節で示されたオオウナギの5つの地域集団が遺伝的に分化していることが強く支持され、さらに、この5つの集団の遺伝的な関係は以下のような階層性があることが推察された。つまり、オオウナギの集団構造は、北太平洋集団と南半球に位置する4集団で大きく遺伝的に離れており、さらに後者4集団内においてもインド洋西部集団が他の3集団と遺伝的に大きく離れているということが示唆された。

4. 集団構造の統計解析

これまでの分析から、オオウナギには少なくとも5つの繁殖集団が存在し、これらの集団が階層的な構造を持っていることが推定された。そこで、この階層的集団構造が、塩基置換を統計的に処理することによりどの程度支持されるか検証するため、AMOVA解析を行った。その結果、それぞれの集団間の分化を支持する ϕ_{ST} は0.0094であり、各集団に含まれる地点間の分化を支持する ϕ_{SC} は0.0032、個体間の分化を示す ϕ_{CT} は0.0063となった(表2-10)。10000回のpermutation testの結果、任意に選んだ2つの集団が一つの集団を形成している確率は0.01%以下と非常に低い値であった。このことから、推定された5つの集団がそれぞれ異なる繁殖集団を形成していることは確かであると思われる。また、同じ集団に含まれた2地点で採集された個体が、1つの集団から採集された確率は5%を上回ったことから、mtDNAのみを用いた解析からは、同じ集団に含まれる地点がさらに細かな集団に分かれていることはないと言えそうである。

第5節 各分集団の遺伝的変異性の評価

前節において平均塩基置換率や純塩基置換指数および固定指数を基に、オオウナギには最低5つの繁殖集団が存在することを推察した。しかし、平均塩基置換率などの塩基多様度には、一つの繁殖集団を限定するような基準値があるわけではなく、研究対象生物の種類や繁殖集団の有効個体数および分析対象遺伝子領域の違いに

表2-10 mtDNA解析で得られたオオウナギの集団構造に関する
AMOVA解析の結果

Source of variance	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Φ -statistics
Among Population	4	2.551	0.00314	0.63	$\Phi_{ST}=0.0094$ **
Among locations within Population	7	3.623	0.00158	0.32	$\Phi_{SC}=0.0032$ NS
Among individuals	183	90.733	0.49581	99.05	$\Phi_{CT}=0.0063$ NS

**: $P<0.01$, Results of 10000times permutation test
NS: $P>0.5$, Results of 10001times permutation test

よって、様々な値をとりうる。そこで、これまでの解析で推定されたオオウナギの5つの分集団の平均塩基置換率と純塩基置換指数を、ウナギ属魚類のうちで、種全体が一つの繁殖集団を形成していると考えられているウナギ *A. japonica* の値と比較することで、それぞれの集団の遺伝的変異性の評価を行った。

第1項 材料と方法

1. 塩基配列

これまでの解析に用いたオオウナギ195個体と外群9種の調節領域の塩基配列に加えて、NCBIに登録されているSang *et al.* (1994)が決定した、中国で採集された5個体、台湾で採集された18個体、瀬戸内海で採集された8個体、合計31個体のウナギの調節領域の塩基配列を取り寄せた。これら31個体の塩基配列を解析に加えた(表2-11)。また、第2節で用いたウナギのシラスの塩基配列に加え、同時に種子島で採取したウナギのシラス16個体の塩基配列も第2節と同じ方法で決定し、これら合計17個体の塩基配列も解析に用いた。

2. データの解析方法

合計48個体のウナギの塩基配列を基に、最節約法による系統樹を推定した (PAUP ver 3.1.1)。この樹型から、ウナギの内部に複数の繁殖集団が存在しないかどうかの確認を行った。ウナギ全体の平均塩基置換率と、ウナギを採集地点ごとに4つのグループに分けた場合のグループ内およびグループ間の平均塩基置換率を求めた。一つの繁殖集団を形成していると考えられているウナギ全体の平均塩基置換率と、オオウナギの5つの集団のそれを比較することで、オオウナギの各集団がどの程度の遺伝的変異性を持っているかを検討した。さらに、ウナギのグループ間における平均塩基置換率を2地点が同じ集団に含まれる場合の値として、この値とオオウナギの集団間の平均塩基置換率と比較することで、オオウナギの集団間の遺伝的変異性の評価を行った。

表2-11 NCBIより取り寄せたウナギ*A.japonica* の塩基配列
の所在とその標本の採集地点 (Sang *et al.*, 1994より)

Locality	Sampling Date	code	accession No.
Taiwan	Nov.1990	TC2201	M95885
	Nov.1990	TC2202	M95886
	Dec.1991	TC1251	M95883
	Dec.1991	TC1252	M95884
	Mar.1992	TC9242	M95887
	Dec.1990	Ss1	M95878
	Dec.1990	Ss2	M95880
	Nov.1990	TSr1	M95871
	Nov.1990	TSr2	M95872
	Dec.1990	TTs1	M95859
	Dec.1990	TTs2	M95870
	Nov.1990	LC1	M95876
	Nov.1990	LC2	M95877
	Nov.1990	LC3	M95878
	Jan.1990	DC1	M95874
	Jan.1990	DC2	M95873
	Jan.1990	HKLs1	M95881
	Jan.1990	HKLs2	M95882
	Mainland China	1987	CK1
Feb.1993		AM1	L13335
Feb.1993		AM2	L13336
Feb.1993		AM3	L13337
Seto Nai Kai, Japan	Feb.1993	AM4	L13366
	Feb.1990	Japan1	M95867
	Feb.1990	Japan2	M95868
	Feb.1990	Japan3	L13367
	Feb.1990	Japan4	L13368
	Feb.1990	Japan5	L13369
	Feb.1990	Japan6	L13370
	Feb.1990	Japan7	L13371
Feb.1990	Japan8	L13372	

オオウナギの集団構造について第4節で行ったAMOVA解析の結果を評価するため、ウナギについてもAMOVA解析を行い、2つの解析結果を比較した。このウナギのAMOVA解析は、ウナギを、中国、台湾北部、台湾西南部、瀬戸内海、種子島の5つの地点に細分し、国別に3つのグループにまとまるという集団構造の仮定のもとで行った。

第2項 結果

1. 遺伝子系統樹

今回決定したウナギの塩基配列の長さは601bpであることから、NCBIより取り寄せたウナギの塩基配列も、同じ領域だけを解析に使用した。この601bpの塩基配列には合計で83サイトに変異がみられた。このうち系統的情報を持っている変異サイトは35サイトあった。TIが70サイト、Tv20サイトで見られ、Indelは5サイト認められた。また、全体の平均塩基置換率は7.2%であり、全く同じ塩基配列を持つ個体は認められなかった(表2-12)。

PAUP ver. 3.1.1を用いて最節約法による系統樹(最節約樹)を推定したところ、8本の最節約樹(Total step Number=127, CI=0.71, RI=0.70, RC=0.50)が推定された(図2-10 A)。全ての最節約樹において、Sang *et al.* (1994)が塩基配列を決定した中国、台湾、瀬戸内海の個体と本研究で塩基配列を決定した種子島の個体が同じ枝の内部に位置することが認められ、逆に、採集地点ごとにまとまる傾向は認められなかった。また、推定された8本の最節約樹を基にconsensus treeを求めたところ、その樹型はほとんどの枝が多分岐となった(図2-10 B)。このことから、種内に分集団の存在は認められず、ウナギは従来から考えられているように、種全体が一つの繁殖集団を形成していると考えられる。

2. 平均塩基置換率と純塩基置換指数

表2-12 オオウナギの5集団と*A.japonica*の採集地点ごとにおける変異サイト数

A.marmorata

	Number of individuals	Variable site	Informative site	Transition	Transversion	Indel
North Pacific Population	77	259	146	184	30	45
Western Indian Population	25	93	64	71	4	18
Eastern Indian Population	11	32	12	31	1	0
Western South Pacific Population	57	198	99	155	18	27
Eastern South Pacific Population	25	100	53	72	9	19

B.A.japonica

	Number of individuals	Variable site	Informative site	Transition	Transversion	Indel
China	5	12	2	8	3	1
Taiwan	18	38	9	29	7	2
Seto Nai Kai	8	14	3	10	2	2
Tanegashima	17	45	14	35	10	0
Total	48	83	35	70	20	5

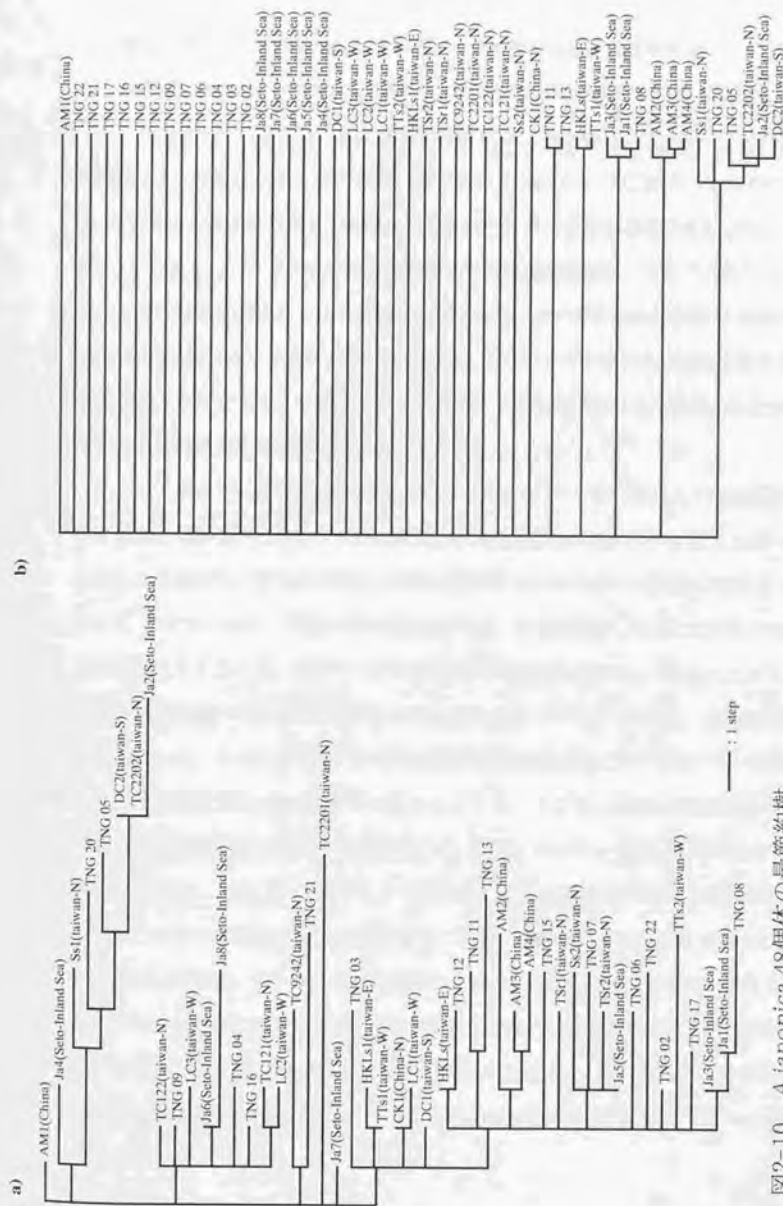


図2-10 *Ajaponica* 48個体の最節約樹

A. One of the 8 MP tree B. Strict consensus tree of 8 MP tree

オオウナギの5つの集団内および集団間で求めた平均塩基置換率を表2-13に示した。各集団内における平均塩基置換率は、北太平洋集団の値が3.85%と最も高く、インド洋西部集団の値が1.37%と最も低い値を示した(表2-13)。一方、ウナギを採集地点ごとに中国、台湾、瀬戸内海、種子島の4つのグループに分け、それぞれのグループ内の平均塩基置換率を求めたところ0.80~1.41%と低い値を示した(表2-13)。このように、オオウナギの各集団内の平均塩基置換率は、ウナギの各グループ内の平均塩基置換率に比べ高い値を示した。また、ウナギ全体の48個体で求めた平均塩基置換率が1.2%であり、この値と比較してもオオウナギの各集団内における値が高いことが示された。したがって、オオウナギの各集団はウナギの種全体よりも高い遺伝的変異性を保持していると考えられる。

つぎに、オオウナギの5つの分集団間とウナギのグループ間における平均塩基置換率を比較してみる。オオウナギの集団間の平均塩基置換率は3.19~6.81%と高い値を示したのに対し、ウナギのグループ間のそれは1.09~1.38%と低い値となった(表2-13)。ウナギのグループ間の平均塩基置換率を、2地点が同じ集団に含まれる場合の基準値とするならば、オオウナギの集団間のそれが約3倍以上であることから、いくつかの集団が同じ集団に含まれることはなさそうである。さらに、純塩基置換指数でみると、オオウナギの5つの分集団間の遺伝的変異性とウナギのグループ間のそれとが明瞭に異なることが浮かび上がってくる。オオウナギの集団間における純塩基置換指数は0.36~4.06%であるのに対し、ウナギのグループ間のそれは0.00~0.17%とほとんど0に近い値を示した(表2-13)。平均塩基置換率の場合と同様に、ウナギのグループ間の純塩基置換指数を同じ集団内に含まれる2地点間で求めた場合の基準値とすれば、オオウナギの集団間のそれは十分に大きく、5つの集団をどのように組み合わせても同じ集団に含まれることはないと思われる。以上の結果から、mtDNA解析により推定されたオオウナギの各集団は、それぞれがウナギの種全体よりも高い遺伝的変異性を保持するような、別々の繁殖集団を形成しているものと推察される。

表2-13 オオウナギ5集団内および集団間と*A.japonica* 4地点内および地点間の平均塩基置換率(%)と集団間および地点間の純塩基置換指数(%)

A) *A. marmorata*

	NP	EI	WI	WSP	ESP
North Pacific Population	3.85	6.66	6.81	6.70	6.50
Eastern Indian Population	4.06	1.37	4.28	3.62	3.19
Western Indian Population	3.34	2.05	3.09	4.63	4.48
Western South Pacific Population	3.09	1.25	1.40	3.37	3.21
Eastern South Pacific Population	3.42	1.35	1.77	0.36	2.31

Above diagonal: Sequence divergence between and within populations

Below diagonal: Net-sequence divergence index between populations

NP: North Pacific Population, EI: Eastern Indian Ocean Population, WI: Western Indian Ocean Population, WSP: Western South Pacific Population, ESP: Eastern South Pacific Population

B) *A. japonica*

	China	Taiwan	Seto Nai Kai	Tanegashima
China	0.80	1.17	1.09	1.23
Taiwan	0.12	1.29	1.18	1.38
Seto Nai Kai	0.17	0.01	1.05	1.23
Tanegashima	0.12	0.02	0.00	1.41

Above diagonal: Sequence divergence between and within group

Below diagonal: Net-sequence divergence index between group

3. 統計的検討

ウナギを採集地点ごとに中国, 台湾北部, 台湾南西部, 瀬戸内海, 種子島の5つに細分し, 国別に3つのグループにまとまるという集団構造を仮定した上でAMOVA解析を行った。その結果, グループ間の分化を支持する ϕ STの値は0.0048であり, すべての塩基置換に占めるグループ間の分化を支持する置換の割合は計算上-0.02と負の値を示し, グループ間の分離を示す変異が実質上存在しないことが示された(表2-14)。そこで, 先ほどの平均塩基置換率と同様に, この数値を全ての個体が同じ集団に含まれる場合の基準値として, 前節で求めたオオウナギのAMOVA解析の結果と比較してみると, オオウナギの集団間の分離が統計的に支持されることが明瞭に浮かび上がる。つまり, オオウナギのAMOVA解析の結果において, 全体の塩基置換に占める集団間の分化を支持する塩基置換の割合は0.63%であり(表2-14), ウナギのそれは-0.02と負の値を示したのとは大きく異なる。したがって, 前節で行ったオオウナギに関するAMOVA解析の結果も, オオウナギの5つの集団がそれぞれ別の繁殖集団を形成していることを明確に表しているものと判断される。

第6節 考察

第1項 オオウナギのミトコンドリアDNAの調節領域

mtDNAは12個のタンパク質をコードした領域, 2個のリボゾームRNAをコードする領域, 22個の転移RNAをコードする領域およびH鎖の転写開始点を含む調節領域によって構成されている(例えば, Doda *et al.*, 1981; Clayton, 1982; Brown *et al.*, 1982; Hasegawa, 1984; Cann *et al.*, 1987 など)。このうち塩基置換速度が最も早いとされているのが調節領域であり(例えば, Brown *et al.*, 1979など), ヒトをはじめとして多くの生物の集団解析に用いられている(例えば Vigilant *et al.*, 1991;

表2-14 *A.japonica* のAMOVA解析の結果

	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Φ -statistics
Among group	2	1.035	-0.0001	-0.02	$\Phi_{ST}=0.0048$ NS
Among locations within groups	2	1.044	0.00248	0.50	$\Phi_{SC}=0.005$ NS
Among individuals	43	21.400	0.49767	99.52	$\Phi_{CT}=-0.0002$ NS

NS: $P>0.5$ Results of 10000times permutation test

Rienzo and Willson, 1991; Bernatchez *et al.*, 1992; Garner and Ryder, 1995 など)。本研究においても、決定した3領域のなかで調節領域の変異性が最も高いことが示された。

オオウナギの種内に見られた変異サイトの割合を他の魚種のそれと比較することで、オオウナギの調節領域の変異性について若干検討してみたい。これまでに研究された主な魚種の調節領域に見られる変異サイトの割合は、淡水魚についてはカワスズメ科魚類の *Simochromis marginatus* が7.0% (N=28, Meyer *et al.*, 1996)、サケ目魚類のブラウントラウト *Salmo trutta* のそれが3.8% (N=151, Bernatchez *et al.*, 1992)である。また、海産魚についてはタラ目魚類のモンツキダラ *Melanogrammus aeglefinus* で2.0% (N=14, Purcell and Kornfield, 1996)、ヒラメ *Paralichthys olivaceus* で36.0% (N=55, Fujii and Nishida, 1997)であるという報告がなされている。また、両側回遊魚のアユ *Plecoglossus altivelis* では変異サイトの割合が22.1% (N=60, Iguchi *et al.*, 1997)と算出されている。これらの数値を比較してみると、モンツキダラの値が低いことを除けば、淡水魚、両側回遊魚、海産魚の順に変異サイトの割合が高くなっている。これに対し、降河回遊魚であるオオウナギの種内に見られた変異サイトの割合は45.2%であり、ウナギのそれは13.8%であった。上記5種の数値と比較しても、オオウナギの変異性が高いことがうかがえる。しかし、ウナギの値が両側回遊魚のアユと近い値を示したことから、降河回遊魚の変異性が一般に高いということではないようである。むしろ、オオウナギの変異性が高いことは、本種がその内部に、複数の遺伝的に分化した繁殖集団を有することが影響したものと考えられる。

調節領域の構造と機能については、これまでに多くの研究がなされており、H鎖の転写開始位置が含まれていること以外にも、ほ乳類の調節領域には保存性が高いCSB's (conserved sequence block)が存在することが示されており、このCSB'sは何らかの機能を持っている推定されている (Brown, 1986; Saccone *et al.*, 1987)。しかし、一部の魚類にはCSB'sが認められないことが明らかにされており (Lee *et al.*

1995)、本研究においてもウナギ属魚類の塩基配列にCSB'sは認められなかった。ウナギ属魚類間では、共通する高い保存性を有する領域の存在と位置が確認された。そのウナギ属魚類における高い保存性を持つ領域と変異性の高い領域の配置が、タラ属魚類やカワスズメ科魚類のそれと異なることが分かった。タラ属魚類の10種間もしくはカワスズメ科魚類の5種間では、高い保存性を持つ領域と変異性が高い領域の配置が、それぞれの属内では似ていることを考えると、魚類の調節領域の構造と機能の関係には多くのパターンが存在し、それぞれのパターンは何らかの系統的情報を含んでいるのかもしれない。今後、魚類における調節領域の構造と機能を解明するためには、より多くの魚類における情報の収集が必要であろう。

調節領域ではIndelを有するサイトが多く見られることが報告されており (Brown, 1986; Saccone *et al.*, 1987)、この領域の塩基配列を基に系統樹を推定する際には、このIndelを有するサイトの取り扱いが問題となる。本研究においても全体で12.5%のIndelを有するサイトが見られた。また、7塩基連続したIndelによって特徴付けられるハプロタイプが南太平洋で採集された個体にのみ認められた (図2-4)。本研究においては、Indelが遺伝的情報を持っているかどうかを見るために、IndelをMissing dataとした場合と、5番目の形質状態として考慮に入れた場合 (5th character) の2通りで最節約樹を推定し、その樹型を比較した。その結果、両樹型に大きな変化は見られず、この7塩基連続したIndelサイトに塩基を持つ個体は、両方の系統樹上で一つの枝にまとまって位置した。このことから、調節領域のIndelは、連続したIndel以外の単体のIndelを含め、他の塩基置換と同じように遺伝的・系統的な情報を含んでいるものと思われる。連続したIndel部分に見られる塩基配列 (TACAAAT) と同じ塩基配列が、そのすぐ前に存在することから、この連続したIndelは、数回の変異が蓄積したというよりも、1回の変異で生じたと考える方が妥当である。これまでの研究から、このような連続したIndelはmtDNAの複製終了地点付近に多くみられることが報告されており (Doda *et al.*, 1981; Saccone *et al.*, 1985; 1987; Brown *et al.*, 1986など)、ウナギ属魚類の複製終了地点は調節領域の5'末端から数えて250

塩基付近にあるのかもしれない。

第2項 オオウナギの生活史と集団間の分離モデル

mtDNA調節領域の約600bpの塩基配列データを基にして行った上記の解析結果から、オオウナギには、日本周辺からインドネシア・アンボン島にわたって分布する北太平洋集団、マダガスカル周辺に分布するインド洋西部集団、インド洋に面したスマトラ島周辺に分布するインド洋東部集団、バブアニューギニアからフィジーにわたって分布する南太平洋西部集団、タヒチ周辺に分布する南太平洋東部集団の少なくとも5つの繁殖集団が存在することが示された(図2-11)。遺伝的分化程度が最も明瞭であったのが、北太平洋集団とその他の南半球に位置する4集団との間であった。このことは、北太平洋集団とその他の4集団間ではかなり長い期間にわたって遺伝的交流が実質上なかったことを示すと思われる。もし遺伝的交流が行われていたのならば、北太平洋集団内に南半球で見られたハプロタイプを持つ個体が含まれ、反対に南半球の4集団に北太平洋集団のハプロタイプを持つ個体が出現するはずである。しかし、今回の結果では、そうした現象はほとんど観察されなかった。

北太平洋集団と地理的に最も近くに分布するのは南太平洋西部集団であり、この2集団の境界はインドネシア・スラウェシ島およびアンボン島とニューギニア島の間が存在することが示された。オオウナギの各集団の分布域が数千キロにもおよぶことを考えると、この2集団が最大でも数百キロしか離れていないにもかかわらず、遺伝的に分化していることは興味深い。さらに、北太平洋集団とその他の集団間の遺伝的分化が最も顕著であったことから、この2集団における分離のメカニズムは、オオウナギの各集団間における分離要因を明らかにする上で良いモデルとなりうるものと考えられる。

北太平洋集団と南太平洋西部集団の境界が位置する海域は、陸上動物相の境界であるウォーレス線や淡水魚類相の境界であるウェーバー線がある(Wallace, 1876; Weber and Beaufort, 1911; 1951; Darlington, 1957)(図2-11)。WallaceやWeber

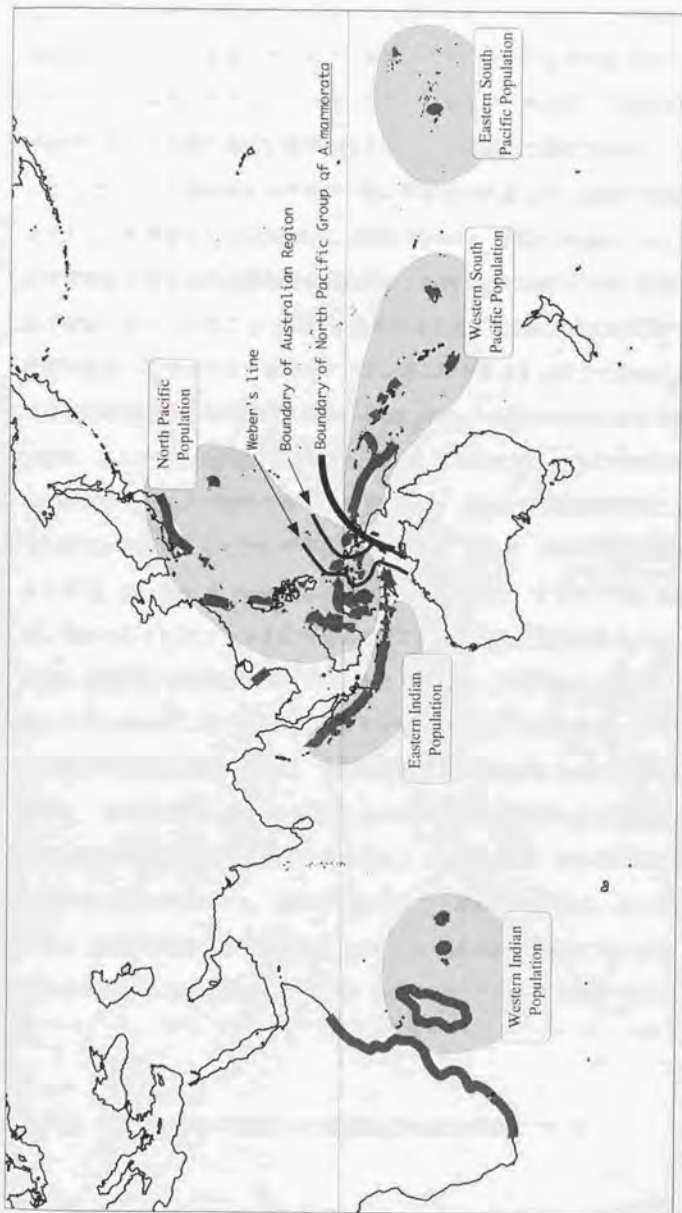
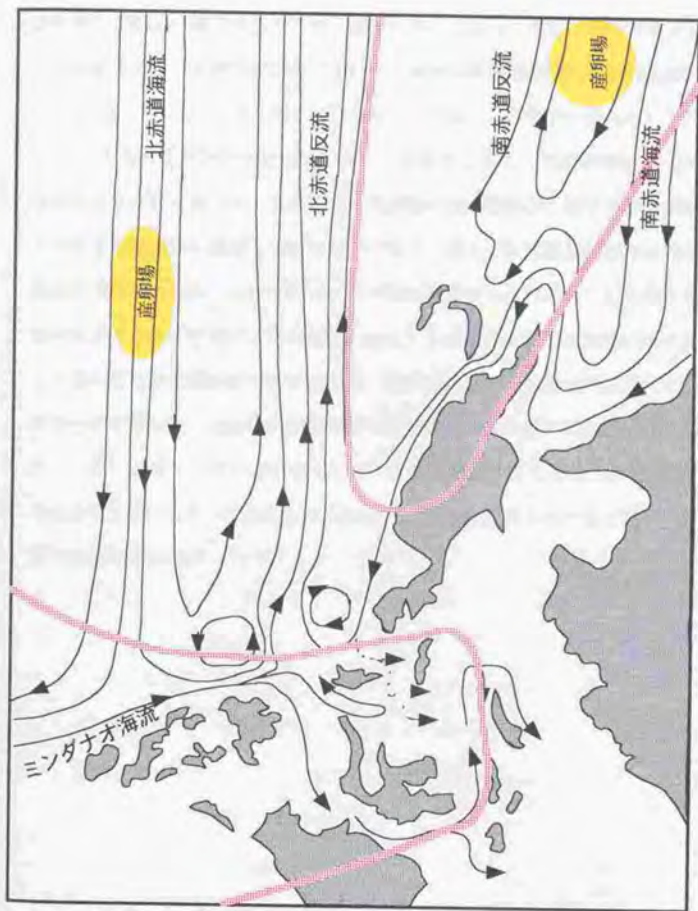


図2-11 mtDNAの解析結果から推定されたオオウナギの集団構造

は、これらの生物相の境界は、過去に海面変動があったものの、その期間を通して陸地が繋がることがなかったために、淡水魚類等の移住や分布の拡大が阻害されたことによって形成されたとしている。しかし、オオウナギは通し回遊魚なので、本研究で示された本種の集団の境界は彼らの説では直接には説明できない。

そこで、ウナギ属魚類の分布域が一般に産卵場の位置とそこを流れる海流に影響されることを考慮して (Avisé *et al.*, 1986; Kimura, 1983; Chang *et al.*, 1997), 北太平洋集団と南太平洋西部集団の境界がある海域の海流構造が分離に影響しているかを検討した。バブアニューギニアの北岸は南赤道海流が北赤道反流に取り込まれる位置であり、一方スラウェシ島やアンボン島は南下するミンダナオ海流と北赤道海流の影響を強く受ける海域にある (Godfrey *et al.*, 1993; Gordon and Fine, 1996)。北太平洋集団の産卵場が北赤道反流よりも北にあり、南太平洋西部集団の産卵場が南赤道反流より南に位置するのであれば、この2つの集団は海流によって隔てられていると考えることができる (図2-12)。つまり、北半球の温帯域に生息する3種 (*A. anguilla*, *A. rostrata*, *A. japonica*)と同様に、オオウナギも各集団ごとに、卵からレプトケファルス幼生期にかけて海流による受動的輸送によって淡水生活域へと運ばれる生活史を持っているものとする。上記のような分布パターンが理解しやすいということである。このような集団分離のメカニズムは、オオウナギの分布域の中を流れる海流の中で、北赤道海流および黒潮が最も強い流れを持つ海流であり、両海流が流れる地域に形成された北太平洋集団が最も広い分布域を持ち、かつ遺伝的にも最も離れた集団である事実とよく整合する。南半球にはこれより細かな種々の海流が存在する。南半球のオオウナギ諸集団の分布は、これらの海流システムと密接に関係していると考えられ、その関連性の詳細については、次章で核DNAを解析した上で改めて第5章の「総合考察」において検討することにした。

第3項 ミトコンドリアDNAデータで解析しきれない問題について



(Dordon and Fine, 1996; Godfrey et al. 1993. 改)

図2-12 北半球集団と南太平洋西部集団の境界

mtDNAの塩基配列データによる集団構造解析の場合、ミトコンドリアが組換えなしに母系遺伝することから、1世代だけの無効分散と過去の移入との区別をつけることができないという問題点がある。とくにウナギ属魚類は、そのレプトケファルス幼生期に受動的に輸送されるため、海流の変化によって容易に無効分散が生じることが考えられる。本研究の結果において、南太平洋西部集団に含まれる3地点(バブアニューギニア、ニューカレドニア、フィジ)では、この集団に固有のハプロタイプグループが存在したわけではなく、各ハプロタイプグループの出現割合が他の集団とは異なっただけであった。この3地点で採集された個体が、南太平洋東部集団とインド洋東部集団から漂着しているだけであり、南太平洋西部集団の分布域とされる海域では再生産を行っていないという可能性は否定しきれない。したがって、集団構造をより正確に把握するためには、推定した集団がそれぞれ独自に再生産を行っているかどうかを確かめる必要がある。現時点では産卵生態が解明されていないオオウナギについて、生態学的な側面から再生産の実態を確かめるのは非常に難しい。しかしながら、DNA分析を用いてこの点を確認することは十分に可能である。すなわち、mtDNAとは遺伝様式の異なる核DNAを解析する方法である。そこで本章では核DNAの解析を行う。

第3章 核DNA解析による集団構造の検討

前章においてmtDNA調節領域の塩基配列を解析することで、オオウナギに5つの集団が存在することを推察した。しかし、母系遺伝するmtDNAの解析だけでは、当世代の移住個体と過去の移入によって持ち込まれた系統のミトコンドリアゲノム(外来mtDNA)を持つ交雑個体を識別することができない。極端な場合は、ある地点に生息する全ての個体が、複数の集団から無効分散によって漂着している場合、そこに架空の繁殖集団を推定してしまう恐れさえある。前章で推察された5つの集団の場合、南太平洋西部集団には、南太平洋東部集団とインド洋東部集団から無効分散によって漂着した個体が多数含まれている可能性が否定できず、場合によっては南太平洋西部集団は実在していないことも考えられる。

ところで母系遺伝するmtDNAに対し、核DNAは常に組換えられながら母系と父系の両方から受け継がれる。したがって、過去の移入の影響はすみやかに集団の中に分散し薄まってしまう。この点が組換えのないmtDNAと大きく異なる点である。したがって、核DNAを分析することによって、その個体が有するmtDNAタイプにかかわらず、当該集団に属する個体の交配によって生じた個体かどうかを識別することができる。

そこで本章では、mtDNAとは遺伝様式の異なる核DNAを分析し、その結果とmtDNAの解析結果を総合して、その集団で生まれた個体と当世代の移住個体さらには交雑個体をそれぞれ識別し、mtDNAの解析で推定された集団構造モデルを検証することを目的とした。

しかし、mtDNAに比べ核DNAのサイズは非常に大きく、脊椎動物で最も小さいゲノムを持つとされるトラフグ*Takifugu rubripes*でさえ 0.4×10^9 bpとmtDNAの約25万倍もあり(Elger *et al.*, 1993)、その解析は非常に困難である。従来、核DNAの情報を解析する場合には、酵素タンパクの分子構造の差異を解析するアロザイム分

析が多く用いられてきているが、この方法には生きた標本か酵素活性を維持出来るように冷凍保存された試料が必要である。しかし、オオウナギが熱帯地方を中心に分布することから、このような標本を入手することはきわめて難しく、核DNAを解析する別の方法が必要である。核DNA分析方法として様々な手法が開発されている。しかし、RAPD法、マイクロサテライトやミニサテライトを解析するシングルロカス法など、従来の方法には再現性の問題やDNAの一部の領域しか解析出来ないといった問題点が指摘されており、核DNAの全体的な解析を行うことは容易ではない。

本研究では、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)法を用いた解析を試みた。ただし、この方法は植物の核DNA解析用に最近開発された方法であり、魚類について本法を用いた研究例はない。そこでまず第1節でAFLP法が魚類の核DNA解析にも有効であることの確認を行った後に、第2節でAFLP法によって増幅され、そのサイズが確認されたDNA断片(バンド)のパターンを基に分子系統樹を推定し、オオウナギの集団構造解析を行う。また第3節では、mtDNAと核DNAの解析結果を総合して得られた集団構造を、バンド共有率を基に行ったAMOVA解析によって統計的に確認する。

第1節 AFLP法の有効性の検討

第1項 材料と方法

1. 粗全DNA

第2章でmtDNAの塩基配列を決定したウナギ属魚類9種9個体に、種子島で採集されたウナギ*A. japonica*のシラスを17個体加えた計26個体、さらにmtDNAの塩基配列を決定したオオウナギ195個体より178個体を加え、これらの個体を用いて魚類の核DNA解析に対するAFLP法の有効性を検討した。AFLP法分析の試料する粗全

DNAは第2章で抽出したものを、DNA濃度を吸光度計 (Spectrophotometer DU650, Beckman Inc.)を用いて計測し、DNAの濃度が80~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように調整して用いた。

2. DNAの切断とAdapter Pairの付加

AFLP^{MT} Plant Mapping (Perkin Elmer Corp.)のプロトコルに従い、粗全DNAをEcoR I (England BioLabs Inc.)とMse I (England BioLabs Inc.)によって切断する反応と、EcoR Iで切断された部位にEcoR I-Adaptor Pairを、Mse Iによって切断された部位にMse I-Adaptor Pair (Ligation and Preselective Amplification Module, Regular Plant Genomes, Perkin Elmer Corp.)をそれぞれ結合させる反応を20℃で16~20時間かけて同時に行った。

3. DNA断片の増幅

AFLP法では引き続き2回のPCR反応によって特定のDNA断片の増幅反応を行う(図3-1)。はじめのPCR反応はPreselective PCRと呼ばれ、既知の2つの制限酵素とAdaptor Pairの塩基配列に1塩基付加した2種類のPreselective Primer (EcoR I-PrimerとMse I-Primer, Ligation and Preselective Amplification Module, Regular Plant Genomes, Perkin Elmer Corp.)を用いて行われる。次のPCR反応はSelective PCRと呼ばれ、Preselective PCR産物をテンプレートにSelective Amplification Start-Up Module (Perkin Elmer Corp.)のSelective PCR Primerを用いてプライマー結合部位に特定の塩基配列を持つ断片だけを増幅するものである。本研究では以下の3組のプライマー (EcoR I-ACA FAM/Mse I-CAC, EcoR I-AAC TAMRA/Mse I-CAT, EcoR I-AAG JOE/Mse I-CAT)を使用した。全てのPCR反応はPerkin Elmer GeneAmp Thermalcycler 2400を用いて行った。

4. バンドパターンの確認と再現性の確認

Selective PCRによる産物をABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer上で、POP-4

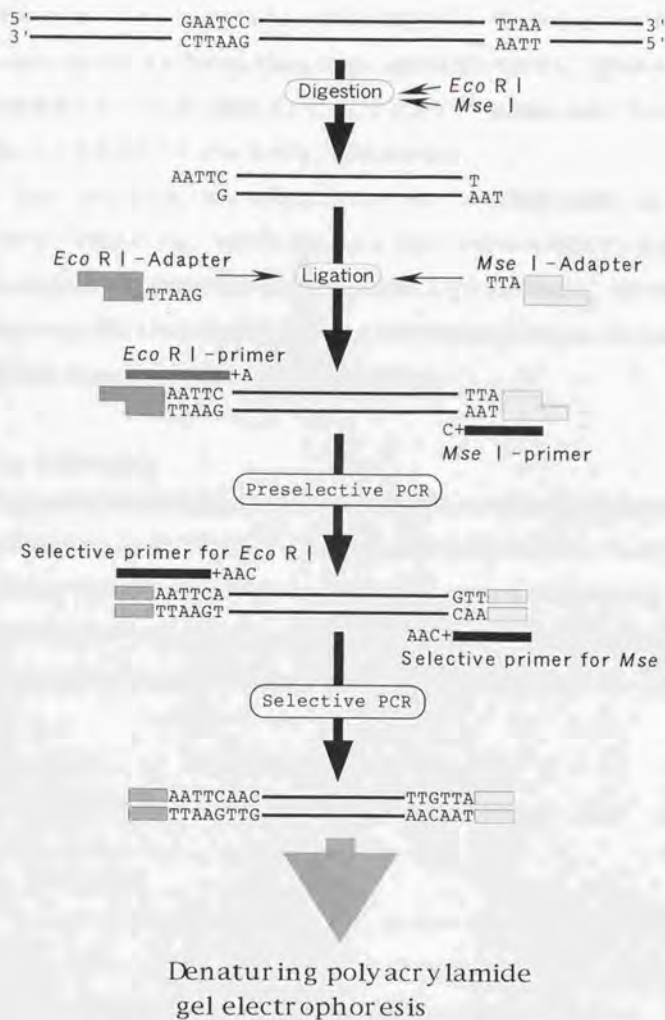


図3-1 AFLP法の原理

Polymerを用いて電気泳動を行い、45~450bpの範囲に入るDNA断片の数とサイズを決定した。プライマーの組み合わせ毎に、確認されたバンドの長さ(サイズ)をGenotyper ver. 2.0 (Perkin Elmer Corp., 1996)を用いて計算し、個体間のバンドの相同性をサイズを基に識別した。このことによって、各個体に出現するバンドの数とそれぞれのサイズ(バンドパターン)が決定できた。

なお、AFLP法分析によって得られるバンドパターンの再現性を確認するために、オオウナギ標本のうち、マダガスカルとタヒチのそれぞれから3個体ずつを選び、これら6個体についてAFLP反応の繰り返し実験を2回ないし3回行った。それぞれの個体について増幅されるDNA断片の数とサイズの再現性をGenotyper ver. 2.0 (Perkin Elmer Corp., 1996)を用いて比較検討した。

5. 有効性の検討

AFLP法分析の集団解析への有効性を検討するために、ウナギ17個体とオオウナギ178個体についてバンドの数とサイズを検出した。検出された全バンドに対する個体間で共有するバンドの割合(共有バンド率)を求め、採集地点内および地点間での平均値(平均バンド共有率)を算出した。この値とmtDNAの平均塩基置換率を比較し、AFLP法分析が採集地点間の遺伝的差を検出できるかを検討した。

第2項 結果

1. 再現性の確認

同一個体で繰り返し実験を行ったところ、各バンドの判定されるサイズは最高で約0.3bpずれることがあったが、サイズが45bp以上で、バンドが検出される強さを表すPeak Hightが60を越えるものについては100%の再現性が確認された。このことから、各増幅断片のサイズによる相同性の確認を行う場合は、一つのバンドのサイズ幅を最大で0.8bpと決め、全てのバンドをサイズ順に並べた場合に、最も近いバ

バンドとのサイズ差が0.4bp以上である場合は異なるバンドとして、バンドの相同性の確認を行った。この方法でバンドの99%は確定された。ただし、この方法でバンドの相同性の確認を行った場合、同一個体において0.8bpのサイズ幅の中に、複数のバンドを有する場合がごくまれにあった。このような場合は、他個体から検出されるバンドを含めて0.8bpの幅に入るバンドの近接の程度によって以下の2つの方法で対処した。1つは、隣接するバンドのサイズ差のほとんどが0.1bp以下で、それぞれのバンドサイズが非常に揃っている場合は、その差が0.4bp未満であってもサイズ差が最大値を示す地点を境にそれぞれ別のバンドとした。第2の方法は、隣接するバンドのサイズ差が0.1bpより大きい値を示し、それぞれのバンドのサイズが連続的に増加する場合は、バンドの相同性が確認できないと判断し、この0.8bpの範囲に入る一連のバンドは解析データから削除した。

2. 集団解析に対する有効性の検討

3つのプライマーセットを用いて増幅した結果を総合すると、オオウナギ内部では446本、ウナギ内部では481本のバンドがそれぞれ検出された(表3-1)。オオウナギ全体における個体間の平均バンド共有率は82.4%であり、ウナギ全体のそれは80.8%であった。

オオウナギの各採集地点内における個体間の平均バンド共有率を見ると(表3-2)、最大値はボルネオ島(MBO)の88.6%で、最小値はマダガスカル(79.3%)であった。また、採集地点間の値を見ると(表3-2)、北太平洋集団の6地点間では82.0~86.4%、南太平洋西部集団の3地点間では82.1~83.8%であったのに対し、それぞれ別の集団に含まれる2地点間での値は77.8~82.5%とやや低い値を示した(表3-2)。mtDNAの解析で推察された5つの集団構造において、同じ集団に含まれる採集地点間の平均バンド共有率が、それぞれ別の集団に含まれる採集地点間のそれよりも高い値を示したことは、AFLP法によって得られるバンド共有率が、mtDNA塩基配列と同様に、集団解析に有効な遺伝的情報を含んでいると考えられる。

なお、ウナギ属魚類10種10個体間で求めたバンド共有率は64.0~80.4%を示し、

表3-1 AFLP法において各プライマーセットで検出されるバンド数とバンドサイズ

Total band number	Selective primer set					
	Eco RI-ACA +Mse I-CAC		Eco RI-AAG +Mse I-CAT		Eco RI-AAC +Mse I-CAT	
	N	Range (bp)	N	Range (bp)	N	Range (bp)
Interspecies	200	50.7-443.6	155	52.0-446.7	196	49.3-434.9
Intraspecies of <i>A.marmorata</i>	180	59.8-443.7	121	68.4-448.7	145	53.2-445.6
Intraspecies of <i>A.japonica</i>	198	51.6-443.6	114	48.9-435.8	169	50.0-434.2

表3-2 採集地点内および地点間におけるオオウナギ個体間の平均バンド共有率(%)

	OG	OK	KE	ISL	IAN	MBO	PNG	NC	FI	TA	ISU	MAD
Ogasawara	84.4	82.4	82.0	83.6	83.3	85.7	81.8	81.6	82.0	78.9	79.4	78.1
Okinawa		86.4	83.0	84.8	86.2	85.1	80.6	82.0	82.0	80.8	82.3	79.8
Kuchinoerabu Is.			81.4	83.0	84.2	83.1	78.8	79.8	79.9	78.5	79.6	77.8
Sulawesi Is.				86.5	86.4	85.6	81.1	81.9	82.0	80.7	81.9	80.0
Ambon Is.					88.4	85.7	80.5	82.2	82.2	81.8	82.3	80.7
Borneo Is.						88.6	81.8	82.5	82.3	80.9	81.5	79.9
Papua New Guinea							86.0	82.1	83.7	80.1	80.6	79.5
New Caledonia								82.8	83.8	82.3	82.8	79.9
Fiji									84.5	82.1	82.4	80.6
Tahiti										80.9	82.3	80.1
Sumatera Is.											83.4	80.7
Madagascar												79.3

OG: Ogasawara, OK: Okinawa, KE: Kuchinoerabu Is., ISL: Sulawesi Is, IAN: Ambon Is., MBO: Borneo Is., PNG: Papua New Guinea, NC: New Caledonia, FI: Fiji, TA: Tahiti, ISU: Sumatera Is., MAD: Madagascar

表3-3 AFLP法におけるウナギ属魚類10種間のバンド共有率(%)

	<i>A.celebesensis</i>	<i>A.narmorata</i>	<i>A.japonica</i>	<i>A.mossambica</i>	<i>A.megastoma</i>	<i>A.nebulosa neb.</i>	<i>A.rostrata</i>	<i>A.obscura</i>	<i>A.bicolor bic.</i>
<i>A.anguilla</i>	68.4	69.7	65.1	70.9	66.4	69.1	80.4	70.2	69.7
<i>A.celebesensis</i>		73.5	67.1	72.2	75.3	76.6	68.6	74.4	73.1
<i>A.narmorata</i>			69.8	71.3	74.4	79.3	69.1	76.4	75.5
<i>A.japonica</i>				67.5	64.0	67.5	64.9	67.8	65.4
<i>A.mossambica</i>					69.8	71.5	72.2	74.0	68.4
<i>A.megastoma</i>						76.4	65.1	77.1	71.8
<i>A.nebulosa nebulosa</i>							68.9	79.9	77.5
<i>A.rostrata</i>								71.1	69.5
<i>A.obscura</i>									79.7

平均では71.5%であった(表3-3)。オオウナギ内部の個体間の平均バンド共有率(82.4%)やウナギ内部の平均バンド共有率(80.8%)と比較すると、ウナギ属10種10個体間のバンド共有率は低い値となった。このことは、AFLP法によるバンド共有率が遺伝的に近縁である種内では高く、遺伝的に離れた種間では低い値となることを示すものであり、バンド共有率が種間において遺伝的差異を検出できることを示していると考えられる。ちなみに、ウナギ属魚類10種10個体にオオウナギ全個体とウナギ全個体を加えた合計203個体について、バンドパターンを基に、1つのバンドを1形質として最節約法による系統樹を推定したところ、オオウナギ178個体とウナギ17個体は、それぞれ一つの枝を形成した(図3-2)。また、その系統樹の樹型は、これまでmtDNAの解析(Aoyama and Tsukamoto, 1997)や形態形質(Ege, 1939)から推定された系統樹とほぼ同じである。とくに*A. anguilla*と*A. rostrata*が近縁となり、その姉妹種に*A. mossambica*が位置する点や、*A. bicolor*と*A. obscura*が近縁となり、その姉妹種に*A. nebulosa*が位置する点など、近縁種間の類縁関係はAoyama and Tsukamoto (1997)が提示した樹型と同じであった。

第2節 核DNAデータによる分子系統樹

第1項 材料と方法

第1節で求めたオオウナギ178個体のAFLP法によるバンド共有率を基に、この178個体について、最節約法による系統樹を推定し、個体間の核DNA情報解析による遺伝的・系統的関係の検討を行った。次に、mtDNAの解析結果とAFLP法による核DNAの解析結果を詳しく検討するために、12の採取地点より数地点を組み合わせ、最節約樹を推定した。

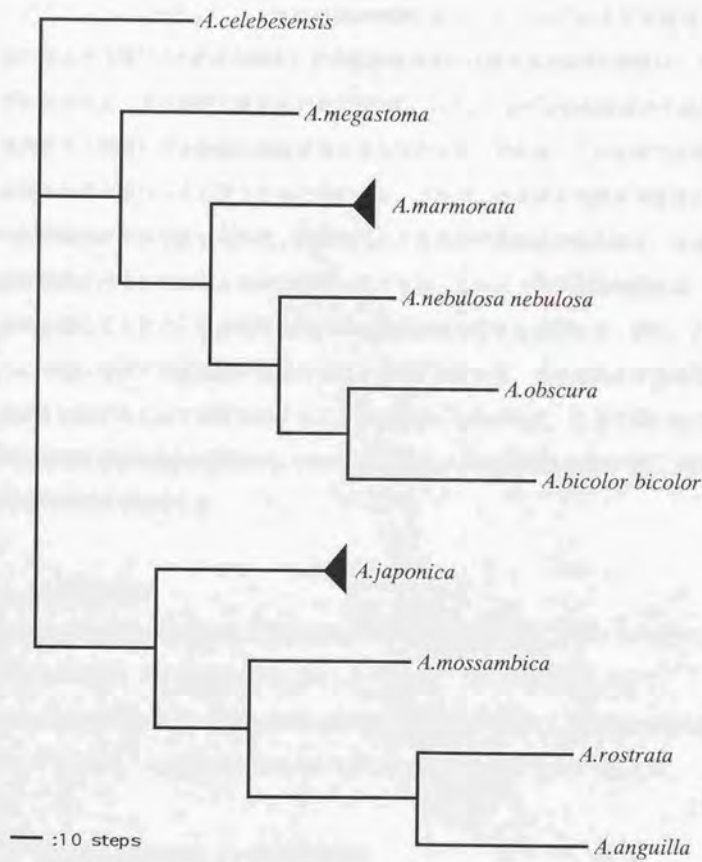


図3-2 AFLP法によるウナギ属魚類10種の系統樹

第2項 結果

オオウナギ178個体について求めた最節約樹においても、mtDNAの解析結果と同様に北太平洋集団の6地点の個体とその他の南半球に位置する4集団の個体は、それぞれ別々にまとまる傾向が認められた(図3-3)。しかし、mtDNAの解析から求めた系統樹ほど明確には各集団の個体がまとまらなかった。それは、この分析では多くの個体変異を検出してしまうためと思われる。つまり、各系統を支持する変異に比べ個体変異がかなり多いために、偶然にバンドを共有する確率が高くなり、本来の遺伝情報が再現されなかったのではないだろうか。このような機会的な振れは、個体数を減らすことで、その確率を減少させることができるとと思われる。また、ここでの課題は近接する集団間の交流の有無を見ることであり、そのためには当該集団だけを比較することで目的を達することができる。したがって、以下では、mtDNAの解析で示された5つの集団から、2~3集団もしくは地点を組み合わせて、それぞれの個体だけで解析する。

1. 北太平洋集団

mtDNA解析で示された北太平洋集団の6地点の個体について、バンドパターンを基に最節約法による分子系統樹を推定した(図3-4)。この系統樹上において、mtDNA解析と同様に、6つの採集地点の個体がそれぞれ地点ごとまとまる傾向はなく、これらが一つの繁殖集団を形成していることを改めて示す結果であった。

2. 南太平洋東部集団とインド洋東部集団

mtDNA解析において、ハプロタイプグループの出現割合が明瞭に異なっていたインド洋東部集団(スマトラ島-ISL)と南太平洋東部集団(タヒチ-TA)の個体について、バンドパターンを基に最節約法によって系統樹を推定した(図3-5)。この系統樹上において、2集団の個体は、それぞれの個体を持つmtDNAのハプロタイプに関係なく、両集団の個体が、それぞれ別々にまとまった。このことは、核DNAを持つ遺



図3-3 AFLP法のバンド変異による
オオナギ178個体の最節約樹

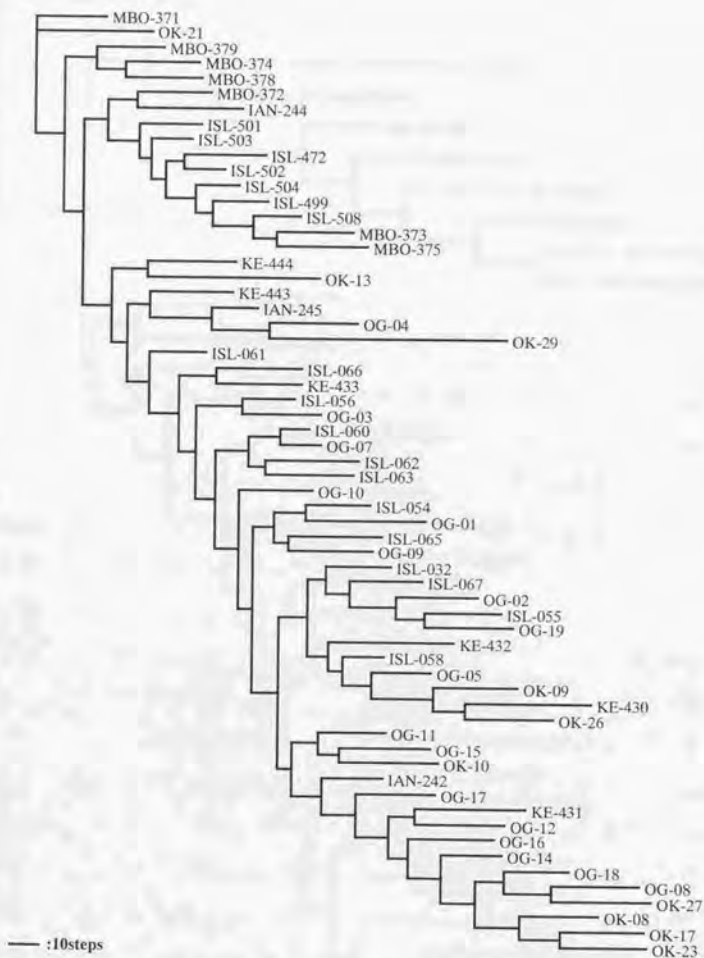


図3-4 AFLP法のバンド変異による北半球の5地点とアンボン島で採集された個体の最節約樹

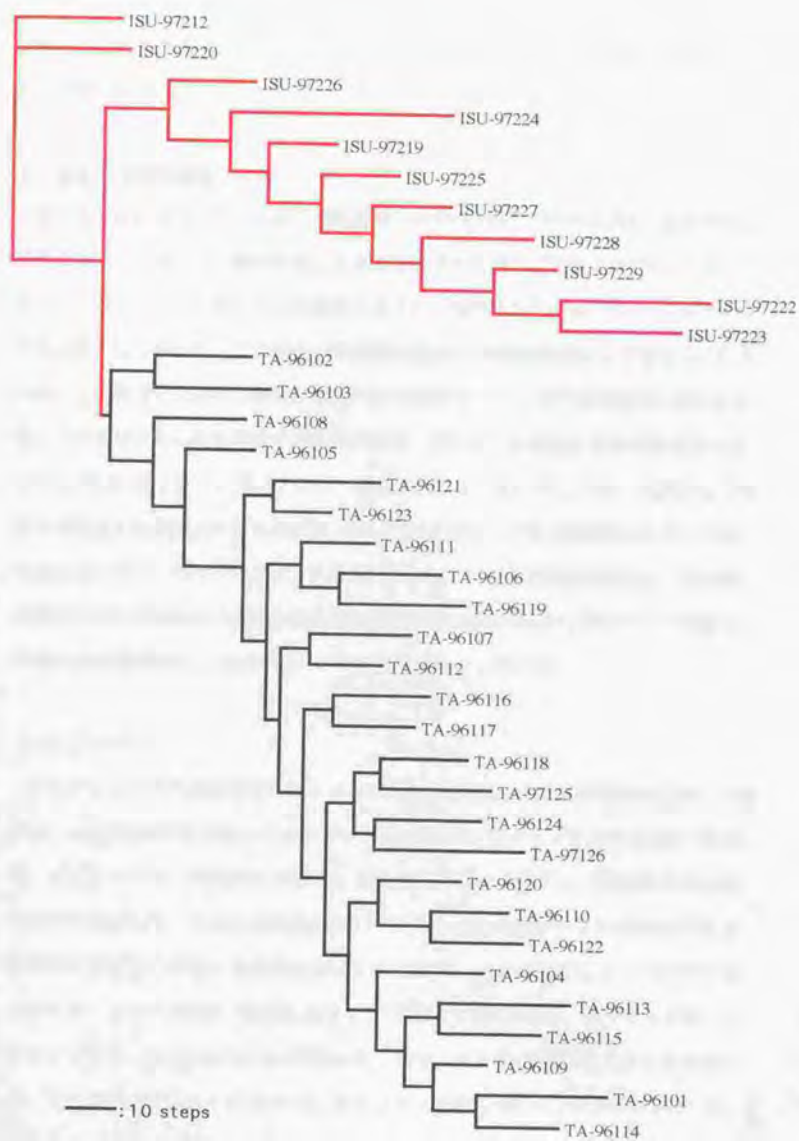


図3-5 AFLP法バンド変異によるスマトラ島とタヒチで採集された個体の最節約樹

The branches on which the individuals collected from Sumatera Is. appear are colored in red

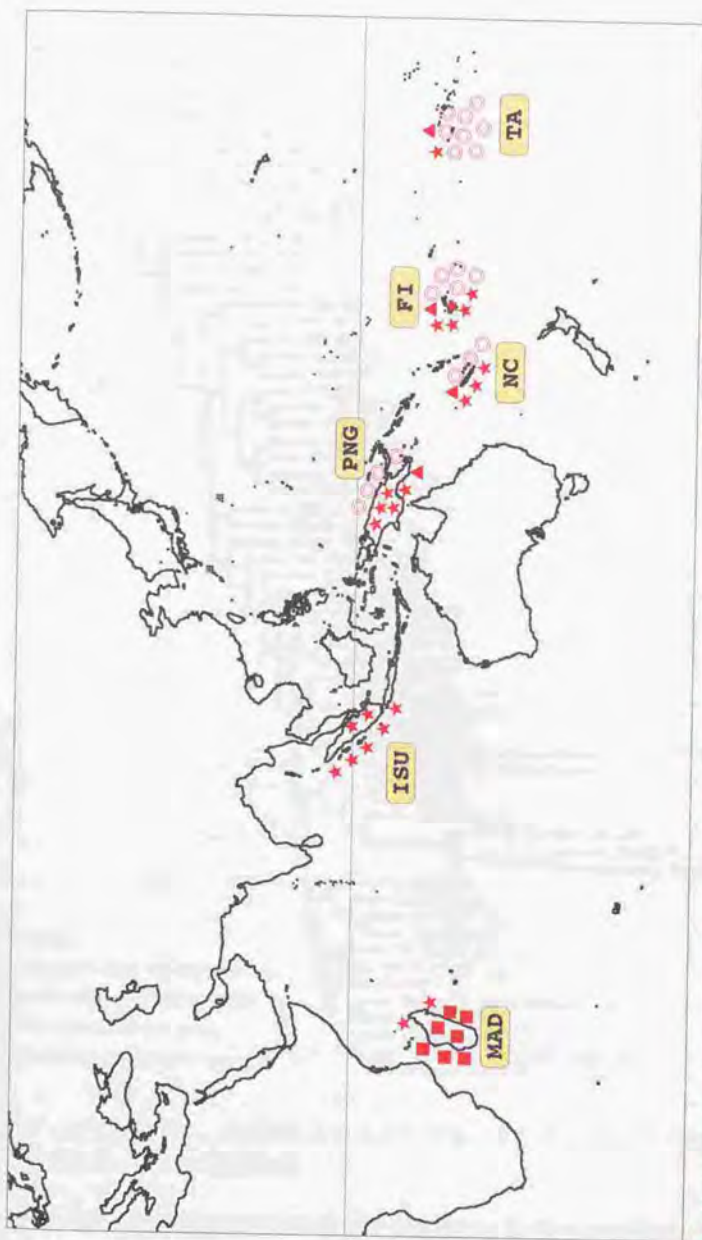
伝的・系統的な情報においても、南太平洋東部集団とインド洋東部集団の遺伝的分化が支持されることを示している。

3. 南太平洋西部集団

南太平洋西部集団のほとんどの個体を持つmtDNAのハプロタイプは、mtDNAの解析において、タヒチの個体のほとんどを含むタヒチ型ハプロタイプグループのハプロタイプと、スマトラ島の全ての個体が含まれる東部インドグループのハプロタイプであった。したがって、この南太平洋西部集団が1つの繁殖集団として存在しているのか、この集団に含まれる個体が南太平洋東部集団とインド洋東部集団の個体が漂着しているだけなのかを検証する必要がある。そこで、この南太平洋西部集団に含まれる3地点(フィジー、バブアニューギニア、ニューカレドニア)と、集団としての存在が確認された南太平洋東部集団(タヒチ)およびインド洋東部集団(スマトラ島)を組み合わせて、バンドパターンからそれぞれ別々に最節約樹を推定した。その系統樹上における各地点の個体の位置と各個体を持つmtDNAのハプロタイプ(図3-6参照)の対応関係から、各個体がどの集団に属するかを調べた。

(1) フィジー

タヒチとスマトラ島ならびにフィジーの3地点の個体について最節約樹を推定し(図3-7)、mtDNAがタヒチ型ハプロタイプグループのハプロタイプを有する個体には◎印、東インドグループの個体には★印、祖先型ハプロタイプグループの個体には▲印を付けて表示した。この最節約樹上において、フィジーの個体のうち6個体がタヒチの個体に混ざって位置し(図3-7において◀で表示)、残りの個体はフィジーだけでまとまった。タヒチの個体と混在したフィジーの個体のmtDNAは、全てタヒチ型ハプロタイプグループに含まれるものであった。また、フィジーだけでまとまった個体には、タヒチ型ハプロタイプグループ、東インド・南西太平洋ハプロタイプグループ、祖先型ハプロタイプグループのハプロタイプグループに含まれるmtDNAをもつ個体が含まれた。



■: Madagascar form haplotype group, ○: Tahiti form haplotype group, ★: Sumatra form haplotype group, ▲: Aucestral form haplotype group.

図3-6 南半球の6地点におけるmtDNAハプロタイプグループの出現状況



図3-7 AFLP法のバンド変異によるスマトラ島・タヒチ・フィジーで採集された個体についての最節約樹

The branches on which the individuals collected from Sumatra Is. appear are colored in red

タヒチの個体と混ざって位置した個体のmtDNAが、タヒチのほとんどの個体を含むタヒチ型ハプロタイプグループに含まれていたことは、これらの個体はmtDNAの情報から見ても、核DNAの情報から見てもタヒチの個体と同質のゲノムを持っている個体であると考えられる。つまり、これらの6個体はタヒチの個体と同じ繁殖集団で生まれたものであり、それがフィジーに偶然に生息していたと考えられる。

もし、フィジーで採集された個体が南太平洋東部集団(タヒチ)とインド洋東部集団(スマトラ島)の個体が漂着しただけであり、フィジーの個体だけでは再生産を行っていないのであれば、全ての個体において各mtDNAのハプロタイプグループと核DNAの情報は一致するはずである。つまり、フィジーで採集された個体のうち、スマトラ型ハプロタイプグループに含まれるmtDNAを有する個体は、AFLP法による系統樹上においてもスマトラ島の個体と同じ枝に位置するであろうし、タヒチ型ハプロタイプグループに含まれるmtDNAを持つ個体は、やはりAFLP法による系統樹上においてもタヒチと混ざり合って位置するはずである。しかし、実際にはフィジーの個体だけで形成される枝が認められ、その枝に位置する個体には、スマトラ型ハプロタイプグループとタヒチ型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体が両方とも含まれていた。このことは、フィジーだけでまとまった個体は、南太平洋東部集団やインド洋東部集団と異なる繁殖集団で生まれた個体であることを示している。したがって、このフィジーに生息しているオオウナギは、ほとんどが独自で再生産を行っている集団の個体であり、そこに、南太平洋東部集団で生まれた個体が一部混ざっていると考えることができる。

(2) バブアニューギニア

バブアニューギニア、タヒチ、スマトラ島の3地点の個体について、バンドパターンをもとに最節約法によって系統樹を求めた(図3-8)。先ほどと同様に、mtDNAがタヒチ型ハプロタイプグループに含まれた個体は○印、スマトラ型ハプロタイプグループに含まれた個体は★印、祖先型ハプロタイプグループに含まれた個体は▲印で示した。系統樹上において、バブアニューギニアとスマトラ島の個体が一つの枝にまとまり、タヒチの個体は別の枝を形成した。バブアニューギニアとスマトラ島の個体が

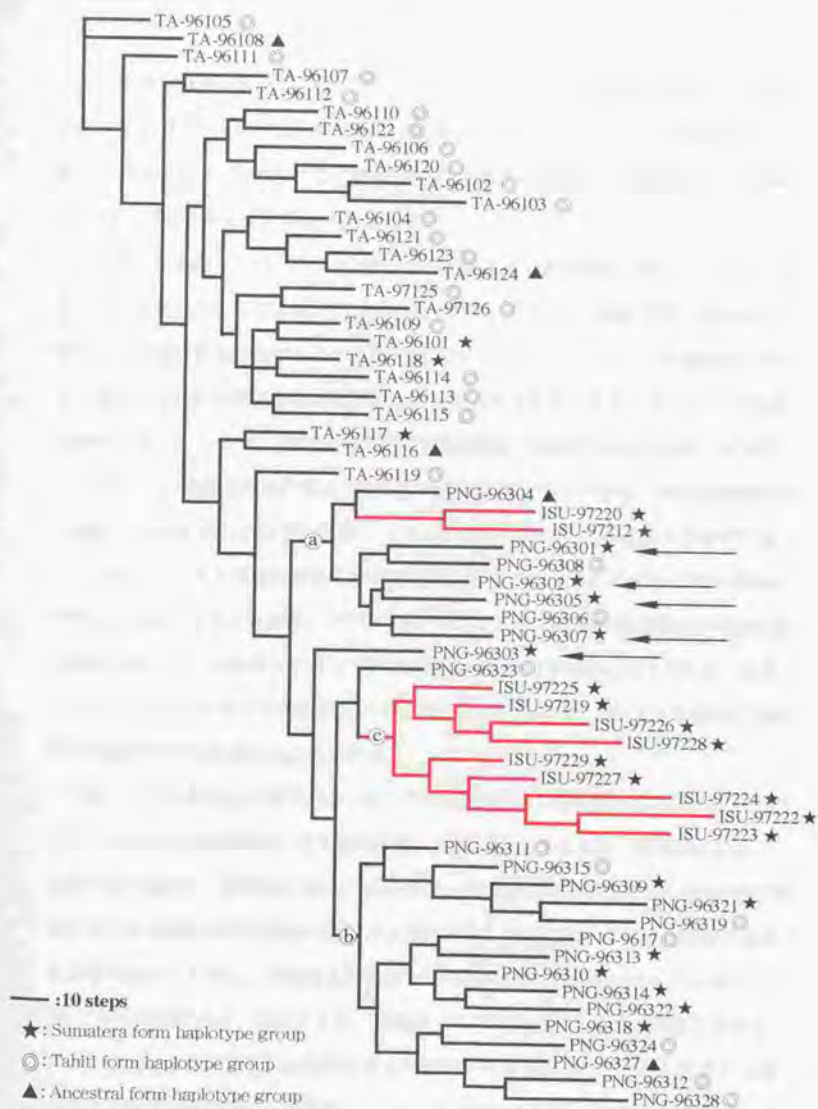


図3-8 AFLP法の変異によるスマトラ島・タヒチ・バブアニューギニアで採集された個体の最節約樹

The branches on which the individuals collected from Sumatra Is. appear are colored in red

位置した枝の内部において、バブアニューギニアとスマトラ島の個体の両地点の個体によって構成される枝(図3-8においてaで表示)、バブアニューギニアの個体だけで構成される枝(図3-8においてbで表示)、スマトラ島の個体だけで構成される枝(図3-8においてcで表示)が認められた。

系統樹上において、バブアニューギニアの個体がタヒチの個体と混ざり合うような枝が形成されなかったことは、バブアニューギニアとタヒチの個体を持つ核DNAの遺伝的・系統的情報に差があることが推察され、バブアニューギニアの個体は、タヒチの個体とは異なる繁殖集団で生まれたことが考えられる。また、もしスマトラ島の個体とバブアニューギニアの個体と同じ繁殖集団に含まれているならば、バブアニューギニアの個体に含まれるような、タヒチ型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体(図3-8において◎で表示)が、スマトラ島の個体の中にも出現するはずである。しかし、スマトラ島の個体はすべてスマトラ型ハプロタイプグループのmtDNAを有している。このことから、バブアニューギニアにはスマトラ島の個体とは別の繁殖集団に属している個体が生息していることを示す結果であると考えられる。おそらく、バブアニューギニアの個体だけで構成された枝(図3-8においてbで表示)に含まれる個体がそれに相当すると思われる。

では、スマトラ島とバブアニューギニアの両方の個体で構成される枝に位置したバブアニューギニアの個体は、どの繁殖集団に属するのであろうか。母系遺伝するmtDNAと異なり、核DNAではホモ接合体とヘテロ接合体が存在する。AFLP法においてはヘテロ個体がホモ個体の持つバンドを共有してしまい、これらを識別することはできない。しかし、系統樹上の位置とその個体を持つmtDNAのハプロタイプグループから推察すると、少なくとも、系統樹上においてスマトラ島の個体と入り交じって位置した個体がヘテロ個体である可能性が考えられる。つまり、スマトラ島の個体と混ざって位置したバブアニューギニアの個体のうち、mtDNAが祖先型ハプロタイプグループに含まれる個体(図3-8において▲で表示)とタヒチ型ハプロタイプグループに含まれる個体(図3-8において◎で表示)が、スマトラ島と同じ繁殖集団生

まれの個体であるならば、先ほどと同様にスマトラ島の個体にも、祖先型ハプロタイプグループやタヒチ型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体が現れるはずである。しかし、スマトラ島の個体のmtDNAは全てスマトラ型ハプロタイプグループに含まれることから、mtDNAが祖先型ハプロタイプグループに含まれる個体(図3-8において▲で表示)とタヒチ型ハプロタイプグループに含まれる個体(図3-8において◎で表示)は、スマトラ島の個体とは異なる繁殖集団で生まれたヘテロ個体であると考えられる。

また、スマトラ島の個体と混ざって位置したバブアニューギニアの個体のうち、スマトラ型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体(図3-8において★で表示)には、次の2通りの可能性が考えられる。1つは、スマトラ島の個体と同じ繁殖集団で生まれた個体であるという可能性、もう1つは、バブアニューギニアで生まれたが、片親がスマトラ島の個体である可能性である。つまり、1世代前にスマトラ島(インド洋東部集団)からバブアニューギニアへ移住した個体があり、その移住個体とバブアニューギニアに元々いた個体の間に生まれたヘテロ個体である可能性である。

したがって、バブアニューギニアに生息するオオウナギは、南太平洋西部集団で再生産を行っている個体と、インド洋東部集団(スマトラ島)生まれの個体と南太平洋西部集団の個体との交雑個体が大多数を占め、一部にインド洋東部集団生まれの個体が含まれていると考えられる。

(3) ニュウカレドニア

ニュウカレドニア、タヒチ、スマトラ島の個体について、バンドパターンを基に、最節約法によって系統樹を推定した(図3-9)。上と同様に、各個体の持つmtDNAのハプロタイプグループを★、◎、▲の3つの印で図中に示した。この系統樹上において、ニュウカレドニアの個体は、mtDNAのハプロタイプグループとは関係なく、スマトラ島の1個体(ISU-97228)を含んで1つにまとまった枝を形成した。

ニュウカレドニアの個体の一つの枝を形成したことは、ニュウカレドニアの個体がタヒチやスマトラ島の個体とは異なる繁殖集団に属することを意味している。

上記の、ニュウカレドニアの個体によって構成される枝に含まれたスマトラ島の個

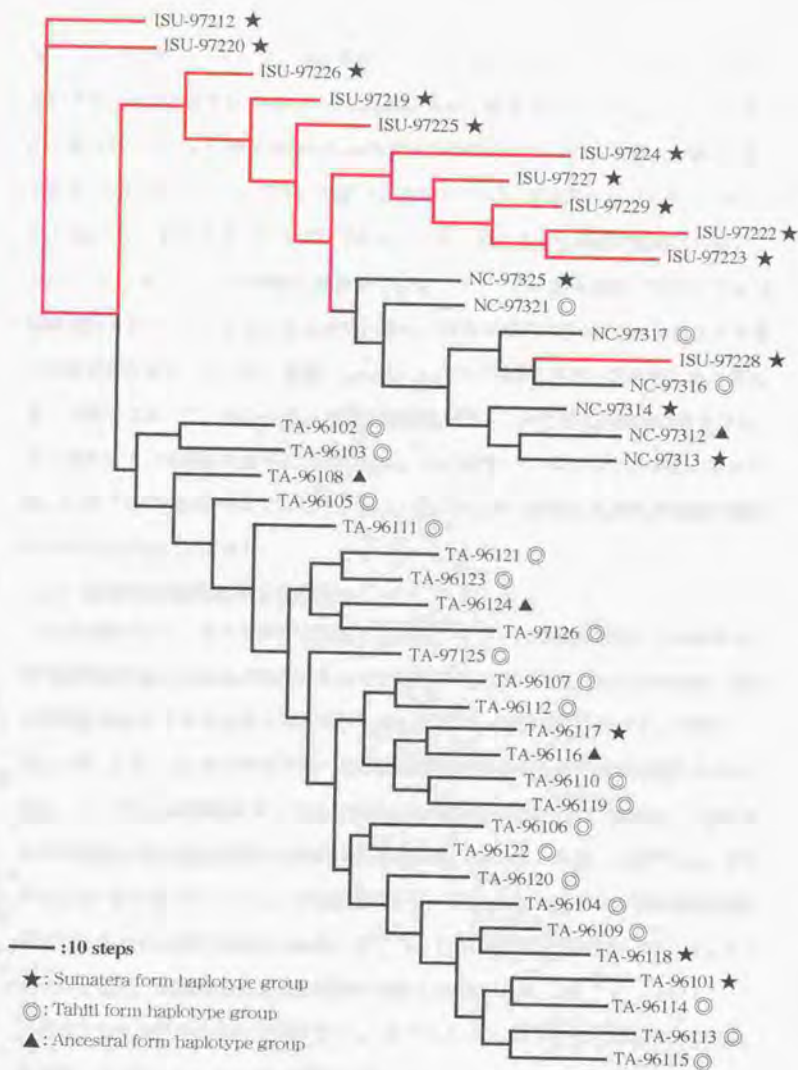


図3-9 AFLP法のバンド変異によるスマトラ島・タヒチ・ニューカレドニアで採集された個体の最節約樹

The branches on which the individuals collected from Sumatra Is. appear are colored in red

体 (ISU-97228) は、インド洋東部集団 (スマトラ島) の個体とニューカレドニアが含まれる南太平洋西部集団の個体の交雑個体である可能性が考えられる。しかし、湖の2集団間において交雑が現在も行われているのであれば、インド洋東部集団の個体を持つmtDNAの中に、スマトラ型ハプロタイプグループ以外のハプロタイプのmtDNAを持つ個体が見られるはずである。しかしそのような個体が認められないことは、ニューカレドニアの個体に混ざって位置したスマトラ島の個体 (ISU-97228) は交雑個体であるとするよりも、多くの個体変異を含むAFLP法の特徴が影響する確率的な振れによって、偶然ニューカレドニアの個体に混ざって位置したと考える方が妥当であろう。もしくは、共通祖先集団が持っていた遺伝的情報が現在でも多く保有している個体であると考えられる。この場合、ニューカレドニアとスマトラ島との間での移住はないことになり、ニューカレドニアには南太平洋西部集団の個体だけが生息することになる。

(4) 南太平洋西部集団内の集団構造

以上の結果から、南太平洋西部集団の個体は、インド洋東部集団もしくは南太平洋東部集団生まれの個体が漂着したのではなく、その多くはこれら2つの集団とは別の繁殖集団由来であると考えられる。しかし同時に、系統樹上において、バブアニューギニアとニューカレドニアの一部の個体がスマトラ島と同じ枝に位置したのに対し、フィジーの個体はスマトラ島の個体とは同じ枝に位置することはなく、逆にタヒチの個体と同じ枝に位置する個体が認められた。このことから、バブアニューギニアとニューカレドニア、フィジーの3地点のうち、フィジーの個体だけが別の繁殖集団を形成している可能性が考えられる。そこで、この3地点の個体について、バンドパターンを基に、最節約法による系統樹を推定した (図3-10)。

推定された系統樹においてバブアニューギニアとニューカレドニアの個体と同じ枝に位置したのに対し、フィジーの個体が別の枝に一つにまとまる結果となった。もし、3地点の個体が全て同じ繁殖集団に属するのであれば、系統樹上においてバブアニューギニアとニューカレドニアの個体が位置したように、一つの枝の内部で混ざって位置するはずであり、フィジーの個体だけが別の枝を形成するようなことはないは

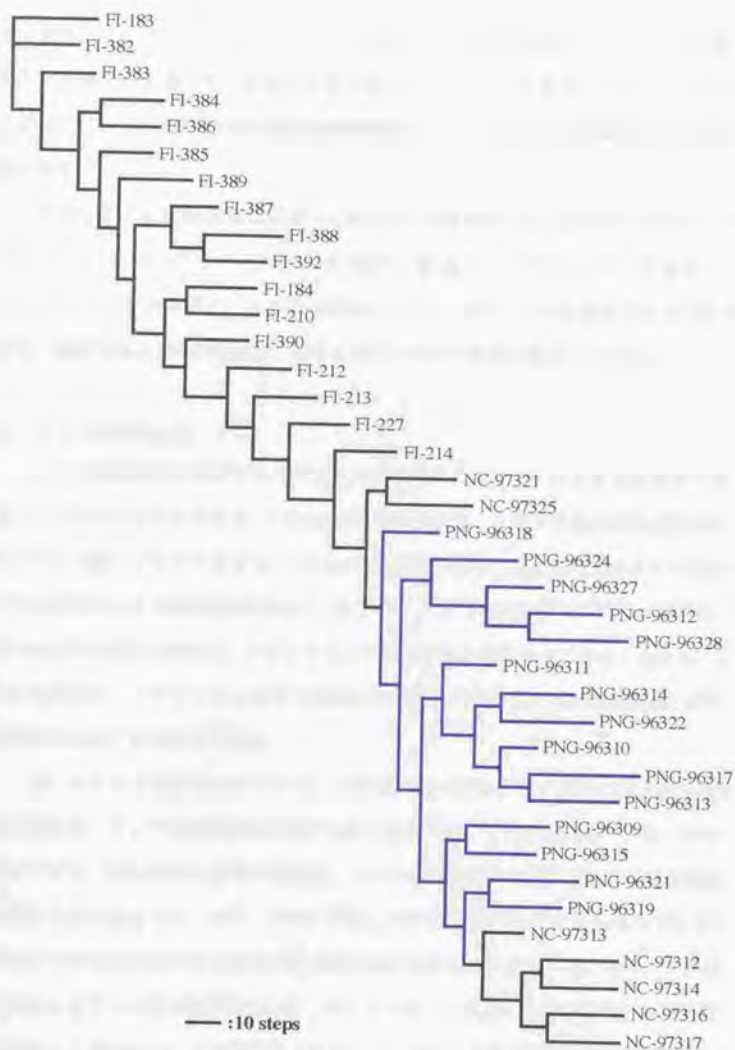


図3-10 AFLP法のバンド変異によるバブアニューギニア・フィジー・ニューカレドニアで採集された個体の最節約樹

The branches on which the individuals collected from Papua New Guinera appear are colored in blue

ずである。したがって、この系統樹の結果は、この3地点の個体の中でフィジーの個体だけが核DNAの遺伝的・系統的情報が異なっていることを意味している。つまりこれは、フィジーの個体は別の繁殖集団を形成しているという先の仮説を支持する結果である。

したがって、mtDNAの解析によって南太平洋西部集団にまとめられたパプアニューギニア、ニューカレドニア、フィジーの3地点の集団は、パプアニューギニアおよびニューカレドニアの集団と、フィジーの集団の2つに分かれていると結論できる。以下では、前者を南太平洋西部集団、後者を南太平洋中央集団と呼ぶことにする。

4. インド洋西部集団

インド洋西部集団を構成するマダガスカル個体には、マダガスカル特有のマダガスカル型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体、スマトラ島の個体が含まれたスマトラ型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体、祖先型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体が認められた(第2章)。マダガスカル型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体は、マダガスカルで採集された個体だけであることから、これらの個体は、マダガスカル周辺で独自に再生産しているインド洋西部集団に属する個体であることは確かである。

一方、スマトラ型ハプロタイプグループや祖先型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体は、インド洋西部集団に属するのであろうか、それともスマトラ型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体は、スマトラ島の個体と同じインド洋東部集団に属するのであろうか。まず、スマトラ型ハプロタイプグループと祖先型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体がどの繁殖集団に属するかを調べるために、マダガスカルとスマトラ島の個体について、バンドパターンを基に最節約法による系統樹を推定した(図3-11)。この系統樹上において、スマトラ島とマダガスカルの個体は、それぞれ別の枝にまとまった。スマトラ島の個体とマダガスカルの個体がそれぞれ別の枝にまとまったことは、マダガスカルの個体は、マダガスカル型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体(図3-11において■で表示)だけでなく、スマトラ

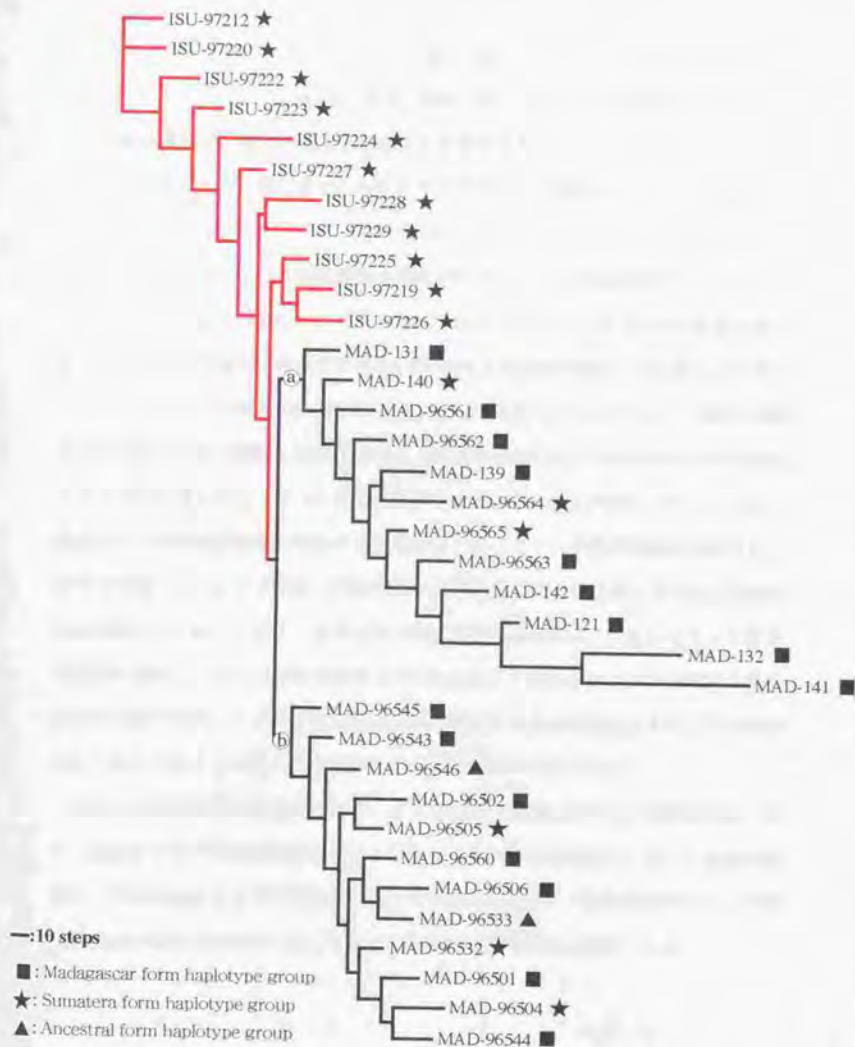


図3-11 AFLP法のバンド変異によるスマトラ島とマダガスカルで採集された個体の最節約樹

The branches on which the individuals collected from Sumatra Is. appear are colored in red

型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体(図3-11において★で表示)および祖先型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体(図3-11において▲で表示)もすべて、インド洋西部集団に属する個体であることを意味する。

また、大きく一つの枝にまとめられたマダガスカル個体は、その枝の内部の2つの枝(aとb)によって、さらに2つに分けられた。このことから、マダガスカルに生息する個体には、2つの繁殖集団の個体が生息している可能性が考えられる。しかし、両方の枝の内部に、スマトラ型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体、マダガスカル型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体、祖先型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体が、ほぼ同数ずつ位置していたことや、同時に採集された個体(MAD-96560, MAD-96561, MAD-96562)が2つの枝の分かれて位置したことなどを考えると、2つの繁殖集団が存在するとは考えがたい。むしろ、近い過去にインド洋東部集団の個体がある程度まとまってインド洋西部集団に移住し、スマトラ型ハプロタイプグループのmtDNAゲノムはこのときに移入されたと仮定すれば理解しやすい。つまり、どちらかの枝に含まれる個体は、移住したインド洋東部集団の個体と、それ以前のマダガスカルに生息していた個体との間の雑種の数世代目の子孫であり、インド洋東部集団の個体の核ゲノムの情報を多く残しているためにこのような2つの枝が形成されたのではないかと考えられる。

結局、マダガスカル個体は全て、インド洋西部集団に属すると判断される。また、過去にインド洋東部集団からインド洋西部集団にある程度まとまった個体に移住し、その移住からあまり時間が経過していないために、一部の個体ではインド洋東部集団の遺伝情報を多く残している個体が存在していると推察される。

第3節 核DNA解析による集団構造の統計的検討

第1項 方法

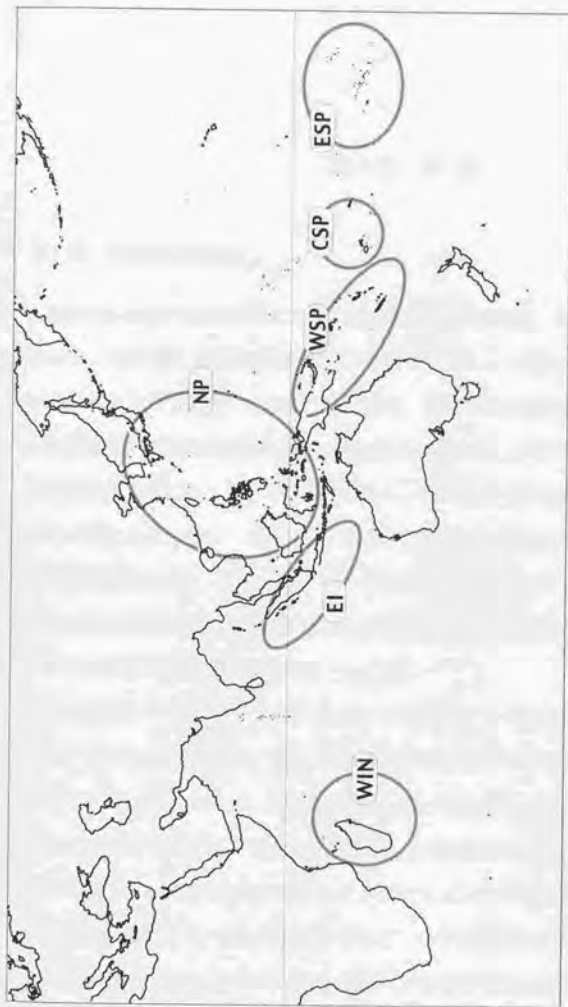
この節では、はじめにこれまでのmtDNAの解析結果とAFLP法による核DNAの解析結果を整理し、オオウナギの階層的集団構造を推定する。そして、その集団構造が統計的にどの程度支持されるか見るために、AFLP法におけるバンドパターンを基にAMOVA解析を行った。

第2項 結果

AFLP法による核DNAの解析結果から、mtDNA解析で示された5集団のうち、南太平洋西部集団がさらに2つの分集団に分かれていることが推察された。したがって、オオウナギには日本周辺からインドネシアのアンボン島に至る北太平洋集団、バブアニューギニアからニューカレドニアに至る南太平洋西部集団、フィジー周辺に存在する南太平洋中央集団、タヒチ周辺に存在する南太平洋東部集団、スマトラ島周辺に存在するインド洋東部集団、マダガスカル周辺に存在するインド洋西部集団の6つの集団が存在することになる(図3-12)。

推定された6集団について、北太平洋集団とその他の5集団の間における、mtDNA調節領域の塩基置換率が、その他の5集団間で求めたそれより明瞭に高い値を示し、AFLP法のバンド共有率においても北太平洋集団とその他の5集団との間のバンド共有率が比較的低い値を示した。このことから、北太平洋集団と南半球に位置するその他の5集団の間の遺伝的分化が、他の5つの集団の間に比べて進んでいると思われる。また、南太平洋西部集団と中央集団は、mtDNA解析では検出されなかったことから、この2集団間の遺伝的分化程度は他の集団間に比べて低いものと思われる。つまり、オオウナギの6集団間には、北太平洋集団と南半球の5集団の間でまず大きな分化があり、南半球の5集団においては南太平洋西部集団と南太平洋中央集団がとくに近縁であるという階層的集団構造が推定される。

この階層的集団構造について、AFLP法のバンドパターンを基にAMOVA解析を行ったところ、それぞれの集団間の分化程度を示す Φ_{ST} は0.0091となり、10000回のpermutation testによって、6集団の中から選んだ任意の2集団が同じ繁殖集団に含



NP:North Pacific Population, EI:Eastern Indian Population, WIN:Western Indian Population, WSP:Western South Pacific Population, CSP:Central South Pacific Population, ESP:Eastern South Pacific Population

図3-12 mtDNA解析とAFLP法による核DNA解析の結果から明らかになったオオウナギの集団構造

まれる確率は、いずれも $p < 0.0001$ となった。この結果は、バンドパターンに含まれる遺伝的・系統的な情報は、推定した階層的集団構造を支持することを示している(表3-4)。

第4節 考察

第1項 AFLP法の有用性

Zabeau and Vos (1993)によって提唱されたAFLP法は、当初は植物への応用が試みられ、種特異的(集団特異的)なバンドの有無によって個体や種を識別するような方法で利用されてきた。このような方法で、近年では細菌類の分類(Mueller *et al.*, 1996)においても有効であるとする報告もある。また、一方ではDNAmappingにも応用されるようになってきている。しかし、この方法を脊椎動物に対して応用した例はまだほとんどない。本研究で、魚類の個体間や近縁種間での、バンド共有率による類縁性の検討や、バンドパターンを基に系統樹を推定することが出来ることが示された。したがって、今後さらに多様な生物にこの方法が応用出来る可能性があることを本研究結果は示しているといえる。

AFLP法はマイクロサテライトなどのシングルローカス法と異なり、前もってゲノムの一部の塩基配列を知っておくという前提条件がないため、容易に種々の生物に活用できるというメリットがある。本法を用いることで、これまで困難であった核DNAの全般的な解析が、比較的容易に行える可能性が示された。核DNAの全般的な解析がこうして比較的容易にできるようになると、その解析結果とmtDNAの解析結果を総合することで、集団の構造分析など、分子生態学的な分析がより深く行えるようになる。つまり、別の集団から移住してきた個体が当該集団の個体と交雑することによって、別集団の核DNAゲノムとmtDNAゲノムを移入する場合、1世代を経た段階ですでに外来集団の核DNAゲノムを持つ個体はなくなる。一方、mtDNA

表3-4 核DNA分析から推定されたオオウナギの集団構造を基に行った
AMOVA解析の結果

Source of variance	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Φ -statistics
Among Population	5	3.068	0.00398	0.8	$\Phi_{ST}=0.0091$ **
Among locations within Population	1	0.516	0.00054	0.11	$\Phi_{SC}=0.0011$ *
Among individuals	171	84.815	0.49599	99.1	$\Phi_{CT}=0.0080$

*: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$. Results of 10000times permutation test

ゲノムは組み換えなしに母系遺伝するため、移入されたmtDNAの系統がたまたま途絶えることがない限り、その集団に存在し続ける。このような核DNAとmtDNAの違いを考慮して、第2節で行ったような当世代の移住個体か過去の移住個体との雑種個体かを個体レベルで識別することができるわけである。今後この方法は集団間の移動や移住の様式を明らかにするためのDNA手法として活用されるべきであろう。

第2項 集団間の移住様式の推定

AFLP法による分析の結果、mtDNA解析によって推定されたオオウナギの集団構造モデルが核DNA解析によっても裏付けられるとともに、両者の分析結果を総合することで、mtDNAの解析だけでは検出することの出来なかった集団の分けも可能となった。その結果、オオウナギには以下の6つの繁殖集団が存在することが結論された。日本周辺からインドネシアのスラウェシ島とアンボン島に至る北太平洋集団、バブアニューギニアからニューカレドニアに至る南太平洋西部集団、フィジー周辺の南太平洋中央集団、タヒチ周辺の南太平洋東部集団、マダガスカル周辺のインド洋西部集団、スマトラ島のインド洋に面した地域のインド洋東部集団の6集団である(図3-12)。

さて、上述したようなmtDNAと核DNAの遺伝様式の違いから、交雑個体と当世代の移住個体を識別することが可能となり、集団間における移住の様式を推定することもできた。そこで次に、上で推定されたオオウナギ集団間の移住過程を整理しておこう。

タヒチ型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ南太平洋中央集団(フィジー)の個体(図3-7において◎←印で表示)は南太平洋東部集団から南太平洋中央集団への当世代の移住個体であり、この2集団間では南太平洋東部集団から中央集団への一方向的な移住が現在も生じていることが示唆された。

インド洋東部集団(スマトラ島)と南太平洋西部集団(バブアニューギニア、ニューカレドニア)の2集団間においては、スマトラ型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ

南太平洋西部集団 (バブアニューギニア, ニューカレドニア)の個体のうち, 図3-8および図3-9において★印をつけた個体は, おそらくインド洋東部集団から南太平洋西部集団への当世代の移住個体であり, ◎印をつけた個体は, 過去に南太平洋西部集団に移住したインド洋東部集団の個体が産卵に参加し, その過去に移住した個体と南太平洋西部集団の個体との交雑個体であると推察された。このことからこの2集団間においてもインド洋東部集団から南太平洋西部集団への一方向的な移住が生じていると考えられる。

南太平洋西部集団と中央集団の2集団においては, mtDNAの解析ではハプロタイプグループの出現割合がほとんど同じであるが, 核DNAの解析から求めた系統樹上において, 2つの集団の個体は, それぞれ別の枝にまとまった。このことから, この2集団が別集団を形成していることは確かであると思われた。そして, mtDNAの解析で分離されなかったことは, mtDNAが集団全体へと広がる時間が核DNAが広がる時間よりも多くの世代を要することが影響したものであると考えられる。

インド洋東部集団 (スマトラ島)とインド洋西部集団 (マダガスカル)の2集団においては, インド洋西部集団の個体にはマダガスカル型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体とスマトラ型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体が認められた。また, インド洋東部集団の個体のmtDNAは, 全てスマトラ型ハプロタイプグループのものであった。しかし, AFLP法による系統樹上ではこれら2集団の個体はそれぞれ異なる枝にまとまった。このことから, それぞれの集団で採集された個体は, 確かにその集団で生まれた個体であると思われる。しかし, マダガスカル型ハプロタイプグループはインド洋西部集団に固有のハプロタイプグループである。また, マダガスカル型ハプロタイプグループとスマトラ型ハプロタイプグループは遺伝的に明瞭に異なる。なぜ, この2つのハプロタイプグループのmtDNAがインド洋西部集団に見られるのであろうか。もし, インド洋の2集団の祖先集団がマダガスカル型ハプロタイプグループとスマトラ型ハプロタイプグループの両グループのハプロタイプを有していたのであれば, インド洋東部集団にもマダガスカル型ハプロタイ

グループのハプロタイプが少しは出現するはずである。また、この2集団が元々持っていたハプロタイプはスマトラ型ハプロタイプグループであり、マダガスカル型ハプロタイプグループのハプロタイプがインド洋西部集団内だけで分化したという可能性もある。しかし、この2グループのハプロタイプが遺伝的に明瞭に異なることから、その形成時にはかなりの長い期間、交流が断たれなければならない。だが、それぞれのハプロタイプを持つ個体と同じ場所で採集されていることから、このような隔離された期間があったと考えがたい。むしろ、インド洋西部集団に見られるこのスマトラ型ハプロタイプグループのmtDNAゲノムは、移住によって持ち込まれたものであると考える方が自然である。したがって、インド洋東部集団とインド洋西部集団の間では、過去に偶然に漂着する個体が存在し、東部集団から西部集団への移住があったと推察される。なお、AFLP法による系統樹上で2集団の個体がそれぞれ一つにまとまったことから、近い過去から現在は移住が起きていないと思われる。

第4章 集団構造形成の歴史

各集団の形成順序は、集団を単位とした系統樹から推察できる。しかし、そのためには各集団に固有の系統的な情報を解析する必要がある。また、各集団に固有の遺伝的な情報が特定できれば、各集団の現在の有効個体数やその変遷を推察することができる。さらに、過去の集団間の移住率も評価することができ、集団間の類縁性について考察することが可能となる。その上、集団の地理的な位置関係を考慮することによって、集団構造の形成過程を推察することもできると考えられる。今回推定されたオオウナギの6つの集団についても、集団の形成順序が特定されれば、本種がどのような経路で分布域を拡大させてきたかを推察することができると思われる。

第3章において示されたように、同じ個体のmtDNAと核DNAの両方を解析した結果、その個体が生まれた集団を特定することができる。さらに、その個体の核ゲノムが、その個体が生まれた集団に固有の遺伝情報だけを持つホモ接合体であるのか、父系か母系のどちらかが他の集団の遺伝情報をもつヘテロ接合体であるのかが推察される。したがって、それぞれの集団に含まれる個体の中から、ホモ接合型の核ゲノムを持つと推測される個体を選び、それらの個体の持つ遺伝的情報を解析することによって、各集団固有の遺伝的・系統的情報だけについての解析を行うことができるものと考えられる。

そこで本章では、各集団固有の遺伝的・系統的情報を、その集団に含まれるホモ接合型のAFLPバンドパターンを持つ個体のデータで代表させ、集団間の系統類縁関係を推察することで、集団の形成順序と集団構造の形成過程について考察することを目的とした。さらに、その結果を踏まえて、オオウナギがどのように分布域を拡大させてきたのかについても考察を加えた。

第1節 集団の系統樹

第1項 材料と方法

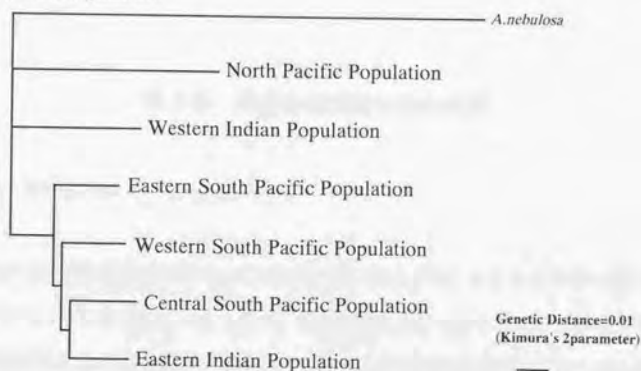
これまでの解析で推定された6つの繁殖集団それぞれより、その集団固有のmtDNAハプロタイプと、その集団固有のホモ接合型のAFLPバンドパターンを併せもつ個体を9~10個体、合計59個体選び、それに*A. nebulosa* 1個体を加えた合計60個体について解析を行った。

それぞれの繁殖集団を単位として、mtDNAデータでは集団間の遺伝距離 (Kimuraの2変数法)を、核DNAデータでは平均バンド共有率をそれぞれ算出し、この数値を基に近隣結合法による集団の系統樹を推定した。また、集団間の地理的距離をそれぞれの集団に含まれる代表的な採集地点間の距離で代表させ、この地理的距離と遺伝距離との相関をMantel testによって検討した。

第2項 結果

mtDNAデータおよび核DNAデータに基づいて推定した集団の系統樹をそれぞれ図4-1のaとbに示した。この2つの系統樹はほぼ同じ樹型を示し、その樹型から現在の諸集団の分化過程が以下のように推察される。まずはじめに、一つのオオウナギの祖先集団から、北太平洋集団、インド洋西部集団、そして残りの4集団の共通の祖先集団の3つの集団が形成されたと見ることができる。その後、4集団の共通祖先集団からインド洋東部集団、南太平洋西部集団、南太平洋中央集団、南太平洋東部集団の4つが形成されたと推察される。これら4集団の形成順序の詳細については、系統樹からだけでは明らかにすることはむずかしいが、この4集団の中ではインド洋西部集団と南太平洋東部集団が遺伝的に最も離れていることは確かであろう。また、後述する集団間の移住についての検討結果を考慮することで、4集団の形成順序が推察できると思われる。このことについては考察で述べることにする。

A)mtDNA Sequence data



B)AFLP data

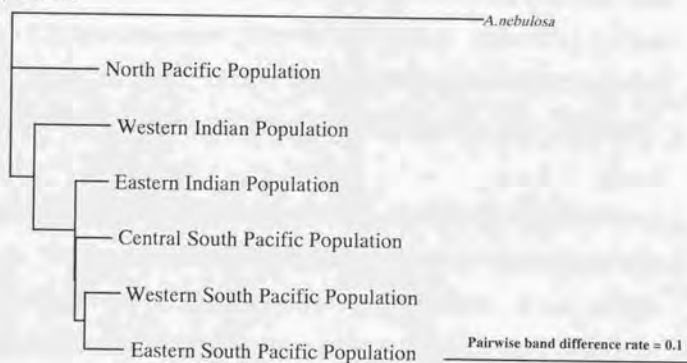


図4-1 集団間の系統類縁関係

地理的距離と遺伝距離の相関を調べたところ、相関係数 (r) は 0.020 となり、両距離の相関関係は非常に低いものであった。このことから、オオウナギの分布域は、ある地点から一方向的に広がったものではないと推察される。

第2節 集団の有効個体数の推定

第1項 材料と方法

それぞれの繁殖集団に特有な mtDNA のハプロタイプは、もともとは単一のハプロタイプグループに含まれていたものが、集団が形成されてから現在に至るまで間に、突然変異による塩基置換が蓄積し、各集団に特有な塩基配列を持つハプロタイプが形成されたと考えられる。突然変異は個体を単位に起こることから、突然変異によって生まれた mtDNA のハプロタイプが集団内に残っているということは、突然変異によって生まれた mtDNA のハプロタイプを持つ個体が、繁殖に参加して子孫を残しているということである。したがって、集団内にみられる mtDNA の遺伝的変異性は、大まかには繁殖に参加する個体数、つまり集団の大きさによって規定されると考えられる。

mtDNA の遺伝的変異性と集団の大きさの関係は、全ての生物に当てはまるものと考えられる。そこでこの節では、有効個体数をオオウナギの 6 つの繁殖集団それぞれについて求めるだけでなく、ウナギ全体についても同様に求めた。そして、有効個体数をオオウナギの集団間で比較するとともに、ウナギ全体とオオウナギの各集団の間でも比較し、オオウナギの各集団の有効個体数の評価をおこなう。

mtDNA の塩基配列を用いて有効個体数 (N_e) を推定する方法は Wilson *et al.* (1985) によって次の式が与えられている。

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

ここで、 π は塩基多様度、 g は年で数えた世代時間、 s は 100 万年当たりのパーセント

置換速度である。

本研究の場合、同じウナギ属内の集団を取り扱っていることから、塩基置換速度 (s)と1世代の時間 (g)は一定であると仮定される。したがって、有効個体数 (N_e)を比較することは、そのまま塩基多様度 (π)を比較することと同義である。そこで、まず、第1節と同じ個体を用いてオオウナギの各集団毎の塩基多様度 (π)を求めた。次に、第3章で用いた種子島で採集されたウナギ17個体についての塩基多様度 (π)を求めた。なお、第3章の結果から、この種子島で採集された17個体の塩基置換率は、ウナギ全体の塩基多様性を包含していると推察される。この塩基多様度 (π)を有効個体数の相対値とし、オオウナギの集団間およびウナギとオオウナギのそれぞれの集団間での有効個体数の比較を行った。

また、現在の有効集団数と個体間における塩基置換数の頻度分布から、各集団の有効個体数の変遷を推察できることがHaesler *et al.* (1995)によって提唱されている。そこで、オオウナギの各集団とウナギ種内における個体間の塩基置換数の頻度分布を検討した。

第2項 結果

オオウナギの各集団について求めた塩基多様度 (π)を表4-1に示した。北太平洋集団の塩基多様度が最も高く0.0434であった。北太平洋集団に次いで高い値を示したのが、南太平洋中央集団 (0.0395)と南太平洋西部集団 (0.0341)であった。この3集団に比べると残りの3集団の塩基多様度は小さく、南太平洋東部集団が0.0202、インド洋西部集団が0.0180であった。そして、インド洋東部集団が0.0146と最も低い値を示した。また、ウナギの種内における塩基多様度 (π)は0.0131で、オオウナギのどの集団よりも小さい値を示した。したがって、1世代当たりの時間と突然変異率が同じであると仮定すると、現在の各集団のサイズは、北太平洋集団、南太平洋中央集団、南太平洋西部集団、南太平洋東部集団、インド洋西部集団、インド洋東部集団の順で大きいことが推察される。また、オオウナギの各集団の大きさはいずれ

表4-1 オオウナギの6集団における塩基多様度(π)

	π ± SD
North Pacific Population	0.0434 ± 0.0235
Western India Population	0.0180 ± 0.0101
Eastern Indian Population	0.0146 ± 0.0084
Western South Pacific Population	0.0341 ± 0.0186
Central South Pacific Population	0.0395 ± 0.0215
Eastern South Pacific Population	0.0202 ± 0.0113

も、ウナギ種全体に比べて同程度かもしくはそれより大きいサイズを有していると推察される。

オオウナギの6集団について個体間の塩基置換数の頻度分布図を図4-2に示した。各集団における分布の幅を比較してみると、塩基多様度と同様に北太平洋集団が最も広く ($SD=13.75$)、次いで南太平洋中央集団 ($SD=7.54$)、南太平洋西部集団 ($SD=7.07$)の順であった。頻度の分布パターンをみると、南太平洋東部集団とインド洋東部集団では塩基置換数が少ないところにピークが形成され、そのピークの幅も先にあげた3集団に比べ著しく小さかった (南太平洋東部集団, $SD=3.06$ 、インド洋東部集団, $SD=3.83$)。インド洋西部集団では分布幅は北太平洋集団に次いで広い値を示したが ($SD=12.68$)、明確に分離した2つのピークが形成され、それぞれのピークの分布幅は小さかった ($SE=2.66, 1.88$)。ウナギの塩基置換数の頻度分布 (図4-3)は、南太平洋東部集団やインド洋東部集団と同様に、置換数の少ない位置に一つのピークを形成し、その分布幅は南太平洋東部集団とほぼ同じ値を示した ($SD=2.82$)。

これらの結果についての考察は、次節の結果と総合して、第4節においてまとめて行う。

第3節 各集団間における移住の評価

第1項 材料と方法

ホモ接合型のAFLPバンドパターンを有する個体だけを用いた場合、そのmtDNA塩基配列データ解析から推定される集団間の移住率は、過去に起こった移住の頻度であると考えられる。なぜなら、その推定への当世代の移住や1世より前の移住の影響は、交雑の影響のありそうな個体をAFLPバンドパターンによって除いているので、必然的に除かれているからである。ここで言う過去に起こった移住とは、それぞれの集団に特異的なmtDNAの系統が形成される過程での移住ということになる。各集団の形成順序が推定され、また過去における各集団間の移住の頻度が推定でき

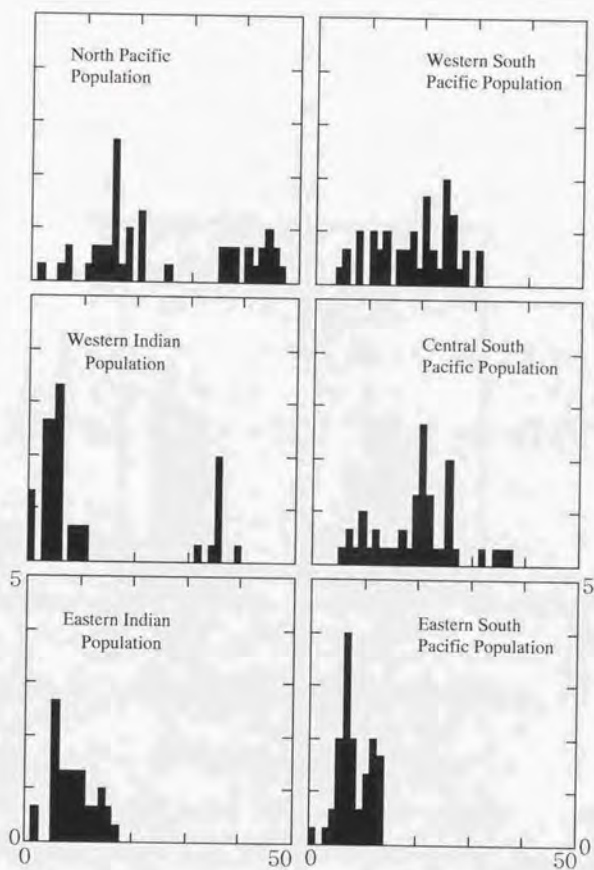


図4-2 オオウナギの6集団内における個体間塩基置換数の頻度分布

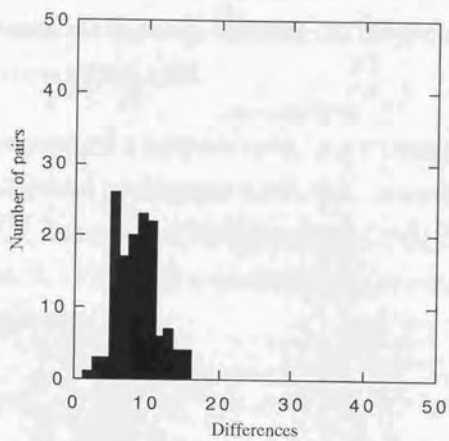


図4-3 *A. japonica*の個体間の塩基置換数の頻度分布

れば、現在の集団構造が形成されてきた過程を推察できるものと思われる。

集団間の移住率 (m) と固定指数 (F_{ST}) の間には、

$$F_{ST} = 1 / (4Nm + 1)$$

という関係が成り立つことが Crow and Kimura (1970) によって示されている (N は集団の有効個体数)。そこで、塩基配列を基に第2章と同様の方法で求めた各集団間の固定指数 (F_{ST}) と、第2節で求めた塩基多様度 (π) を有効個体数を上の式に当てはめ、それぞれの集団間における推定移住個体数の割合 ($N'm$) を求めた。

遺伝距離と移住率の関係は Nei and Feldman (1972), Chakraborty and Nei (1974), Slatkin and Maruyama (1975) および Li (1976) によって研究されており、淘汰がないという仮定の上では、

$$m = \mu I / (1 - I)$$

という関係が成り立つことが示されている。ここで I は遺伝子同一度、 μ は1世代における遺伝子座あたりの突然変異率を示す。また、遺伝子同一度 (I) と塩基置換率 (D) の間には、 $I = k(1 - D)$ という関係が成り立つ (ここで、 k は比例定数)。この場合、1世代における遺伝子座あたりの突然変異率 (μ) を一定と仮定すれば、相対的な移住率の指数 (m') は

$$m' = 1 - D/D$$

で求められる。

第2項 結果

上記の方法で求めた推定移住個体数の割合 ($N'm$) を表4-2 aに示した。集団の組み合わせによって、 $N'm$ に差が見られた。北太平洋集団およびインド洋西部集団は、いずれの集団との組み合わせにおいても $N'm$ が低い値を示した ($Nm = 0.351 \sim 0.534, 0.216 \sim 0.404$)。また、南太平洋東部集団とインド洋東部集団との間の値も 0.358 と低い値となった。これに対し、インド洋東部集団と南太平洋西部集団との間の $N'm$ は 2.694 、インド洋東部集団と南太平洋中央集団間は 3.164 と高い値を示した。また、南太平洋の3集団間の $N'm$ も $1.321 \sim inf$ と高い値を示した。

表4-2 各集団間の推定移住個体数の割合と移住率

a) $N'm$

	Western South Pacific Population	Central South Pacific Population	Eastern South Pacific Population	Eastern Indian Population	Western Indian Population
North Pacific Population	0.531	0.534	0.361	0.352	0.351
Western South Pacific Population		inf	1.901	2.694	0.396
Central South Pacific Population			1.321	3.164	0.404
Eastern South Pacific Population				0.358	0.217
Eastern Indian Population					0.216

b) $m' = 1 - D/D$

	Western South Pacific Population	Central South Pacific Population	Eastern South Pacific Population	Eastern Indian Population	Western Indian Population
North Pacific Population	12.66	12.39	13.43	12.74	12.28
Western South Pacific Population		30.06	32.78	33.72	16.36
Central South Pacific Population			29.03	33.36	16.04
Eastern South Pacific Population				26.78	17.21
Eastern Indian Population					16.39

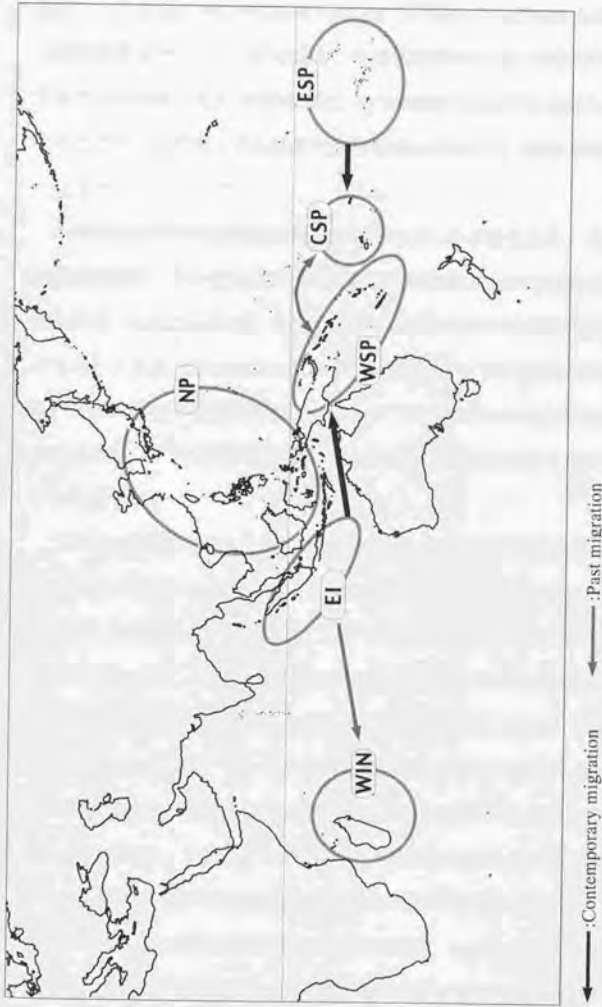
移住率の相対的な指数 (m')においても、 $N'm$ とほぼ同様の傾向が示された(表4-2 b)。つまり、北太平洋集団とその他の5集団間における m' は12.18~13.43と低い値となった。南半球においても、インド洋西部集団とその他の4集団間における m' は16.04~17.21と低い値を示した。これに対し、南太平洋の3集団間の m' は29.03~32.78と高い値となった。また、インド洋東部集団と南太平洋西部集団および南太平洋中央集団との間のそれぞれの m' は33.72および33.36と高い値であった。南太平洋東部集団とインド洋東部集団の m' は26.78となり、中間的な値となった。

これらの結果から各集団間で過去に起こった移住の頻度を推察すると、北太平洋集団とインド洋西部集団は、他のどの集団ともほとんど移住が起こっていなかったと考えられる。また、インド洋東部集団と南太平洋東部集団の間の移住もほとんど起こらなかったと推察される。反対に、南太平洋の3集団間ではある程度の移住が起こっていたことが推察され、とくに南太平洋西部集団と南太平洋中央集団の間における移住は、最も高い頻度で起こっていたと考えられる。また、インド洋東部集団と南太平洋西部集団および南太平洋中央集団の間では移住が比較的多く起こっていたと考えられる(図4-4)。相互の移住が認められた南太平洋の3集団うち、南太平洋西部集団と南太平洋中央集団の2集団とインド洋東部集団間では移住が認められ、一方、南太平洋東部集団とインド洋東部集団の間では移住がほとんど認められないことは一見矛盾するように思えるが、これはそれぞれの集団の形成順序と形成過程が影響した結果と考えられる。このことについての詳しい考察は、次の第4節で行う。

第4節 考察

第1項 各集団の形成順序

集団の形成順序は、集団を単位とした系統樹が求められれば、その樹型から推察



NP:North Pacific Population, EI:Eastern Indian Population, WIN:Western Indian Population, WSP:Western South Pacific Population, CSP:Central South Pacific Population, ESP:Eastern South Pacific Population

図4-4 オオウナギの集団間における移住の模式図

することができる。そのためには、各集団からそれぞれの集団に固有の遺伝情報を持つ個体だけを解析する必要がある。しかし、一般に集団に含まれる個体には、他集団との交雑個体や数世代前の交雑によって移入された他集団の遺伝情報を多く持つ個体が含まれている。そのため、その集団固有の遺伝情報だけを持つ個体を識別することは困難である。本研究では、一つの個体をmtDNAと核DNAの両方から解析することで、はじめてその集団に固有の遺伝情報を持つ個体を識別することが可能となった。

mtDNAと核DNAの遺伝情報から求めた2つの系統樹より、北太平洋集団、インド洋西部集団、その他の4集団の共通祖先集団の3集団がはじめに分岐したことが推察される。このことから、北太平洋集団とインド洋西部集団は形成時期が古い集団であると言える。その後の南太平洋の3集団とインド洋東部集団の形成順序については、両系統樹で一致が見られなかったが、南太平洋東部集団が南太平洋西部集団と近縁であり、インド洋東部集団が南太平洋中央集団と近縁であることは、両系統樹から推察できる。

この南太平洋の3集団とインド洋東部集団の形成順序は系統樹からだけでは推定することができなかったが、mtDNA塩基配列データから求めた過去の移住の効果を考慮することによって、形成順序について検討することができる。1つの可能性として、4集団のうち、まず南太平洋西部集団もしくは中央集団がはじめに形成され、その集団からインド洋東部集団と南太平洋東部集団が派生したというシナリオを考えてみよう。この場合、インド洋東部集団と南太平洋東部集団の2集団に含まれる個体の塩基配列は、相当の時間が経過しない限り相互にある程度の類似性を持ついると考えられる。つまり、この2集団と南太平洋西部集団および南太平洋中央集団の4つの集団間の $N'm$ や m' は同程度の値を示すはずである。しかし、インド洋東部集団と南太平洋東部集団の間の $N'm$ は0.358であり、 m' は26.78であるのに対し、この2集団それぞれと、南太平洋西部集団もしくは南太平洋中央集団の間の $N'm$ は1.321~ ∞ 、 m' は29.03~33.72とかなり高い値を示した。したがって、南太平洋西部集団が

中央集団がはじめに形成され、そこからインド洋東部集団と南太平洋東部集団が派生したというシナリオは考えがたい。

次に、インド洋東部集団もしくは南太平洋東部集団のどちらかがはじめに形成され、その集団から他の3集団が順次一方向的に派生したというシナリオはどうか。この場合、北太平洋集団（もしくはインド洋西部集団）との間の $N'm$ や m' には、派生時期が遅い集団ほど先の2集団との間の $N'm$ や m' が低い値を示すはずである。さらに、地理的な距離と遺伝距離の間にも相関が認められるはずである。しかし、インド洋東部集団および南太平洋東部集団と北太平洋集団もしくはインド洋西部集団のそれぞれの間で求めた推定移住個体数や移住率はほぼ同程度であった。さらに、Mantel testの結果、遺伝的距離と地理的距離に相関が見られなかった。このことから、インド洋東部集団もしくは南太平洋東部集団のどちらかがはじめに形成され、その集団から他の3集団が順次派生したという一方向的な派生のシナリオも採用しがたい。

南太平洋の3集団とインド洋東部集団の4集団の形成順序についての残るシナリオは、共通祖先集団から、まずインド洋東部集団と南太平洋東部集団が同時期に形成され、その後、この2集団から南太平洋西部集団と南太平洋中央集団が派生したという過程である。このシナリオは、図4-1に示した系統樹上において、南太平洋の3集団にインド洋東部集団を加えた4集団の中で、インド洋東部集団と南太平洋東部集団が最も遺伝的に離れていることと整合的である。推定移住個体数や移住率においても、第3節で述べたように、相互の移住が認められた南太平洋の3集団うち、南太平洋西部集団と南太平洋中央集団の2集団とインド洋東部集団の間では移住が認められ、南太平洋東部集団とインド洋東部集団の間ではほとんど認められないことは、この形成順序のシナリオに基づくとうまく説明できる（図4-5）。さらに、オオウナギのmtDNAは7塩基連続したIndelによって6つのタイプ分けられたが（第2章）、このうちタイプ4を持つ個体が、南太平洋東部集団と南太平洋中央集団で高頻度で、南太平洋西部集団ではわずかの頻度でそれぞれ出現したのに対し、インド洋東部集団

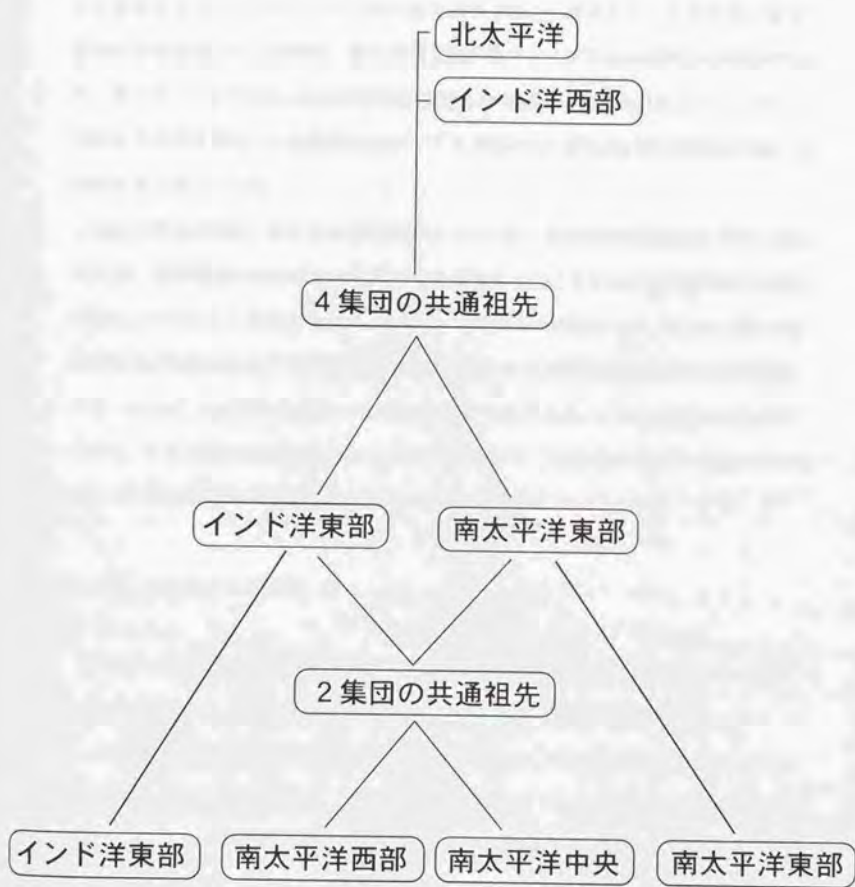


図4-5 各集団の形成順序

には見られなかったことも(第2章), 南太平洋東部集団とインド洋東部集団がはじめに形成されたとする本シナリオでうまく説明できる。すなわち, この2集団間で遺伝的交流が全くない期間に, 南太平洋東部集団でタイプ4のmtDNAの系統が生まれ, その後この2集団から南太平洋西部集団と中央集団が形成されたことにより, この南太平洋西部集団と中央集団にはタイプ4の系統のmtDNAを持つ個体が共通して出現すると考えられる。

南太平洋西部集団と南太平洋中央集団については, mtDNAの解析から求めた N_m や m が, 他の集団の組み合わせに比べ高い値であったことから, 比較的頻繁に移住が起こっていたことが推察される。しかし, 核DNAの解析からは, この2集団の遺伝的分化が明瞭に示されていることから, 現在この2集団間に移住はないと判断される。さらに, mtDNAと核DNAの遺伝様式を考慮すると, この2集団は形成されたから, それぞれの集団に固有のmtDNAハプロタイプが形成されるほどは, 時間が経過していないことが推察される。

第2項 集団サイズの変遷

Haeseler *et al.* (1995)は各集団内の個体間塩基置換数の頻度分布パターンと現在の有効個体数から, 集団サイズ(個体数)の変遷を推定する方法を提唱した。彼らは, 集団を有効個体数と塩基置換数の頻度分布パターンから大集団, 小集団, ビン首集団の3つの型に区分した。大集団とは, 形成されてから集団サイズを減少させることなく大きな集団サイズを維持している集団である。小集団とは集団サイズがとくに小さい集団, そしてビン首集団とは一旦集団サイズが減少しその後急速に個体数を増加させた集団である。

さて, 第2節で求めた π と個体間における塩基置換数の頻度分布から, オオウナギの6集団とウナギの集団をこの3つの型に当てはめてみる。北太平洋集団, 南太平洋西部集団, 南太平洋中央集団は, π の値が大きく塩基置換数の頻度分布の幅も大きいことから大集団にあてはまる。これまでの結果から, 北太平洋集団は形成時期

が古いことから、形成されてから現在にいたるまで多くの突然変異が蓄積した結果、集団内に高い多様性を持つに至ったと考えられる。したがって、ある程度大きな集団サイズを維持してきた集団であると推察されことから、大集団としてよいであろう。南太平洋西部集団、南太平洋中央集団は、形成時期が新しいため、その多様性の高さは突然変異が蓄積した結果とは考えがたい。むしろ、この2集団は、インド洋東部集団と南太平洋東部集団の個体が混ざりあって形成されたために、高い多様性を持っていると考えられる。しかし、現在もその多様性を保っていることから、形成時期は新しいが、形成されてからはある程度大きな集団サイズを維持してきた大集団であると推察される。

インド洋東部集団と南太平洋東部集団およびウナギの集団は、 π の値がある程度大きく塩基置換数の頻度分布の幅が小さいことからビン首集団に該当するものと思われる。これらの集団や種は、同じように個体数の減少と回復を経験したのかもしれない。あるいは、それぞれの集団において個体数が急激に増加したために、見かけ上はビン首集団に見られるような頻度分布を形成した(創始者効果)とも考えられる。このことは、ウナギ属魚類において繁殖集団が形成される過程は、オオウナギにおいてもウナギにおいてもよく似ている可能性を示唆していると考えられる。

残るインド洋西部集団については、 π の値は大きいですが、塩基置換数の頻度分布に明確に分離した2つのピークが存在したことから、何れの型にも当てはまらなかった。しかし、塩基置換数の頻度分布にみられたそれぞれのピークの分散が非常に小さいことから、過去において集団サイズが非常に小さい期間を経験した後、ごく最近に大規模な移住とそれに伴うmtDNAの移入が起こったと考えられる。この大規模な移住は、第2章におけるmtDNAのハプロタイプグループの出現頻度からも推察されたことである。したがって、本集団のサイズの変遷は、当初この集団に固有のマダガスカル型ハプロタイプグループのmtDNAを有する個体で形成される集団があり、その集団のサイズが減少する時期があった。その後、かなり多くのスマトラ型ハプロタイプグループのmtDNAを持つ個体が、おそらくはインド洋東部集団から移

住し、高い多様性を持った集団が再編成されたと推察される。そして、移住によつて高められた塩基多様度が維持されていることから、再編成されてからは、ある程度大きい集団サイズを維持していると推察される。

第5章 総合考察

本研究を通して、オオウナギには6つの繁殖集団が存在することが明らかになった。そして、それらの各集団間の遺伝的分化は、まず北半球と南半球の間で大きく分化しており、さらに南半球内においては、インド洋西部集団とそれ以外の集団との間で分化が進んでいることが分かった。これらの結果をふまえ、オオウナギの階層的集団構造を推定し、その形成過程についても考察を加えた。

そこで本章では、本研究で得られた結果を基に、まず、遺伝的に分化した各集団は別種もしくは亜種と見るべきか、あるいはオオウナギは単一種と見るべきかについて議論する。つぎに、集団間の分離要因を詳しく考察するとともに、各集団の産卵場について推論する。また、集団の遺伝的な分化は種分化の始まりとなる可能性も考え得るので、オオウナギの研究で得られた知見から、ウナギ属魚類の種分化メカニズムについての考えをまとめ、そして最後に、今後のウナギ属魚類の資源構造理解に向けて、若干考察を行ってみたい。

第1節 オオウナギは単一種か

オオウナギに認められた6つの繁殖集団は、それぞれが遺伝的に分化しているだけでなく、その遺伝的変異性がウナギの種全体よりも高いことが明らかになった。このことから、それぞれの繁殖集団は種もしくは亜種として存在しており、現在1種とされているオオウナギには複数の種もしくは亜種が含まれているのではないかという疑問が生じるかもしれない。そこで本節では、まずこの点から議論する。

今回mtDNAの調節領域の塩基配列を決定したオオウナギ195個体において、個体間の遺伝距離 (Kimura's 2 変数法, $Tl/Tv = 2$) の平均値は 0.056 ± 0.024 であり、最大値は北太平洋集団のスラウェシ島で採集された ISL-061 と南太平洋中央集団のフ

イジで採集されたFI-382の間の0.117であった。ウナギ属魚類10種間の遺伝距離を、オオウナギと同じ領域の塩基配列を基に算出した。その結果、*A. anguilla* と *A. rostrata* の間の値が0.122と最も小さく、オオウナギと *A. anguilla* の間の値が0.392と最も高い値を示した(表5-1)。また、これまでの研究からオオウナギに最も近縁であると考えられている *A. nebulosa* とオオウナギ(OG-01)との遺伝距離は0.304であり、この遺伝距離においても *A. nebulosa* がオオウナギに最も近縁であることが示された(表5-1)。オオウナギ種内の遺伝距離の最大値が、ウナギ属魚類10種間の遺伝距離の最小値よりも小さいことから、オオウナギの各繁殖集団間の遺伝距離も種間の最小値よりも小さいと思われる。したがって、遺伝距離でみればオオウナギの各集団は、別種と言えるほどには分化していないとすることができる。また、オオウナギと *A. nebulosa* との遺伝距離が、オオウナギ種内の最大のものの約3倍であったこと、ならびにウナギ属魚類10種間における遺伝距離の最小値が、オオウナギ種内の遺伝距離の最大値より大きいことも、この見解を支持する。

また、インド洋の2集団の間、南太平洋西部集団と中央集団の間、インド洋東部集団と南太平洋西部集団の間では、集団間の移住とそれに伴う交雑が起こっていることが推察された。このことから、生物学的種の概念に照らし合わせても、オオウナギは単一種であるとみなすのが穏当であろう。さらに、Ege(1939)は、タヒチ、インドネシア・セレベス海周辺、マダガスカル北東部に位置するレユニオンの3地点で採集した個体について13の形態学的形質を計測し、採集地点間で形態形質の比較を行ったが、各地点の個体に明確な差を見い出せなかった。唯一、インドネシアで採集された個体の背鰭前端基部と肛門の位置の差の体長に対する割合(AD%)が小さい値を示す傾向を認めたとすにすぎない。このことから、オオウナギが単一種であることは形態学的にも支持されるものと思われる。

しかしながら、オオウナギ以外のウナギ属魚類で、種内に複数の繁殖集団の存在が確認された例はない。もし繁殖集団の分離とそれに伴う遺伝的な分化がウナギ属魚類における種分化の引き金であるとすれば、オオウナギはまさにいくつかの種に

表5-1 mtDNA調節領域の塩基配列から求めたウナギ属魚類10種間の遺伝距離

	<i>A. anguilla</i>	<i>A. bicolor bic.</i>	<i>A. celebesensis</i>	<i>A. japonica</i>	<i>A. megastoma</i>	<i>A. mossambica</i>	<i>A. nebulosa neb.</i>	<i>A. obscura</i>	<i>A. rostrata</i>	<i>A. marmorata</i>
<i>A. anguilla</i>		0.245	0.264	0.225	0.231	0.220	0.269	0.262	0.105	0.290
<i>A. bicolor bicolor</i>	0.316		0.248	0.250	0.269	0.254	0.224	0.185	0.220	0.242
<i>A. celebesensis</i>	0.344	0.316		0.269	0.262	0.268	0.279	0.278	0.247	0.292
<i>A. japonica</i>	0.286	0.322	0.353		0.247	0.272	0.258	0.266	0.215	0.284
<i>A. megastoma</i>	0.295	0.354	0.342	0.317		0.282	0.285	0.284	0.232	0.279
<i>A. mossambica</i>	0.279	0.330	0.351	0.362	0.378		0.277	0.284	0.208	0.259
<i>A. nebulosa nebulosa</i>	0.356	0.282	0.371	0.337	0.383	0.366		0.216	0.250	0.237
<i>A. obscura</i>	0.345	0.225	0.369	0.352	0.382	0.378	0.271		0.242	0.285
<i>A. rostrata</i>	0.122	0.276	0.318	0.269	0.295	0.261	0.326	0.313		0.274
<i>A. marmorata</i> (OG.01)	0.392	0.310	0.388	0.382	0.374	0.340	0.304	0.384	0.364	

Above diagonal: Pairwise sequence difference (PAUP 3.08)

Below diagonal: Kimura's 2 parameter (PHYMLIP dnadist)

分化する過程にあると考えることもできる。そうだとすると、どのような要因によってオオウナギの各繁殖集団が分離しているかを検討することによって、ウナギ属魚類の種分化機構を考える上で必要な情報を提供できるかもしれない。この繁殖集団の分離要因については、以下で詳しく考察する。

第2節 集団分離の要因

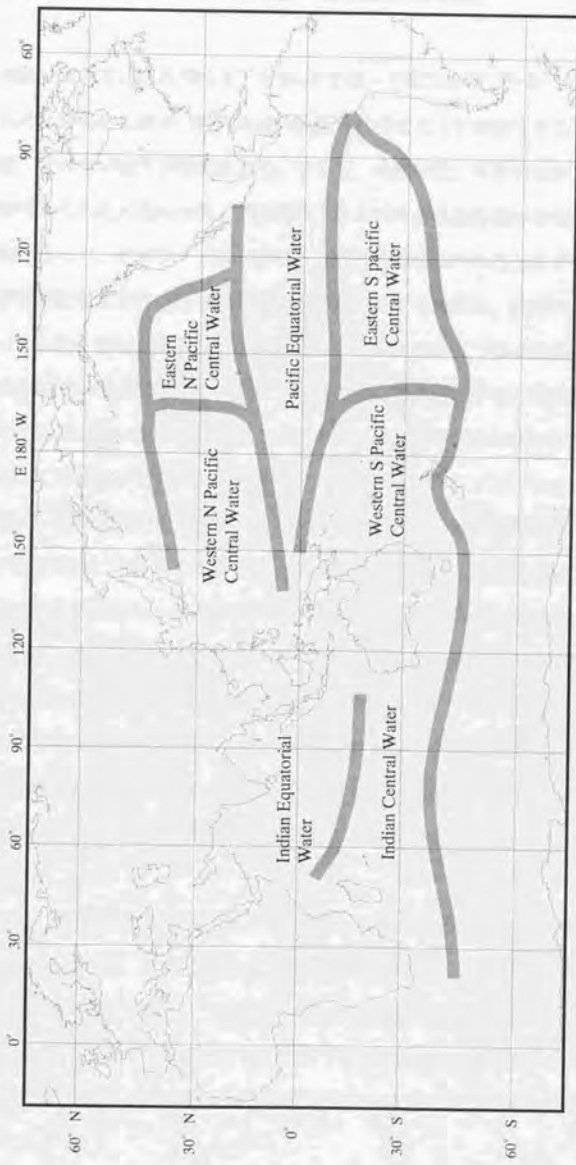
オオウナギの各繁殖集団間にはどのような要因によって分離されているのであろうか。本節ではこの問題について考察する。6つの集団間において最も分化が進んだ集団は北太平洋集団であった。ウナギ属魚類の分布域が産卵場の位置とそこを流れる海流によって限定されることから、この北太平洋集団と隣接して位置する南太平洋西部集団との分離は、先の第2章でも述べたように産卵場の位置と海流構造によってうまく説明される。つまり、北太平洋集団と南太平洋西部集団の産卵場が、北赤道海流と南赤道海流の影響を受ける海域にそれぞれ形成され、それぞれの産卵場で生まれた卵やレプトケファルス幼生は、北太平洋集団では北赤道海流とそれに連なる黒潮、およびこれらの海流と隣接するミンダナオ海流の3つの海流によって、また南太平洋西部集団では南赤道海流によって、それぞれ淡水生活域へと輸送されることで分離していると思われる。

南太平洋の3集団とインド洋の2集団の間の分離は、これらの集団の分布域は、それぞれが異なる海流系をもつ別の大洋に位置し、インドネシアやバブアニューギニアによって地理的にも隔てられていることから、先の2集団間の分離と同様に、産卵場が海流系の異なる海域に存在するために、淡水生活域が異なるということで説明できるであろう。

一方、それぞれの大洋内での集団の分離は海流構造や地理的な隔離によって単純には説明することができない。しかし、海洋の水塊構造を考慮に入れると、それら

の集団間の分離も説明ができそうである。本研究で推定されたオオウナギの集団構造と、塩分と水温によって分けられた表層の水塊構造(Sverdrup *et al.*, 1942)を比較すると、いくつかの集団の境界と水塊の境界に一致が見られる(図5-1)。つまり、西経160°付近に見られるEastern South Pacific Central WaterとWestern South Pacific Central Waterの境界が、南太平洋東部集団と南太平洋中央集団の境界と一致し、南緯10°付近にあるIndian Equatorial WaterとIndian Central Waterの境界が、インド洋東部集団とインド洋西部集団の境界部と一致する。北半球の温帯域に生息する3種(*A. anguilla*, *A. rostrata*, *A. japonica*)の産卵生態に関するこれまでの研究から、水温・塩分が急激に変化することがウナギ属魚類の産卵行動の引き金となり、その水温と塩分の躍層付近の高温・高塩分な水塊でウナギ属魚類が産卵する考えられている(Schmit, 1925; Jespersen, 1945; Bertin, 1955; Klecner *et al.*, 1983; Tsukamoto, 1992)。オオウナギの産卵場の環境条件と産卵回遊生態が、先の温帯種と同じであると仮定すれば、この集団の境界と水塊の境界の一致は以下のような生活史から説明できる。つまり、それぞれの淡水生活域から外洋の産卵場へ向かう親魚は、水塊の境界を越えることなく、その境界付近で産卵を行うものと考えられ、産卵された卵や生まれたレプトケファルス幼生は、それぞれの産卵場を流れる海流によって受動的に運ばれながら発生をつづけ、それぞれの淡水生活域へとたどり着くと考えることで説明される。

このように各集団の分離は海流構造と水塊構造を考慮することである程度は説明されるが、南太平洋西部集団と南太平洋中央集団の境界については依然説明がつかない。この2集団間の分離要因については、産卵の時期や水深のずれ、あるいは回遊経路の差などの生態学的な条件が関わっている可能性が考えられる。しかし、オオウナギを含めウナギ属魚類の産卵生態に関する知見はまだ著しく乏しく、これらの可能性をこれ以上検討することは、現在のところ困難である。



(Sverdrup *et al.*, 1942 改)

図5-1 表層の水塊構造の模式図

第3節 各集団の産卵場

前節において、遺伝学的なアプローチによって明らかにした6つの繁殖集団のそれぞれの産卵場の位置が、海流構造や水温と塩分によって特徴づけられる水塊構造に関連している可能性が提示された。そこで、本節では、外洋の水温と塩分によって特徴付けられる水塊の分布と海流構造、ならびに各繁殖集団の分布域についての知見を総合して、オオウナギの産卵場の位置の推定を試みることにする。

熱帯域に生息するウナギ属魚類の産卵場に関する知見は、まだほとんどないと言つてよい。Schmidt (1925)とJespersen (1942)はいくつかの海域をウナギ属魚類の産卵場であると推定しているが、それぞれの海域がどの種の産卵場であるかについては言明していない。これまでウナギ属魚類の産卵場を特定するためには、外洋においてネットサンプリングを繰り返し、より小さなレプトケファルスを採集することで、産卵海域を絞り込んでいく方法が取られてきた。これまでの調査の結果、北半球温帯域に生息する3種 (*A. anguilla*, *A. rostrata*, *A. japonica*)の産卵場が、ほぼ特定されつつあり、産卵場が形成されるための水温や塩分などの環境条件に関する知見が次第に蓄積されてきている。また、観測機器の発達から効率のよい調査が行えるようになってきてはいるが、広い外洋においてウナギ属魚類の産卵場を特定することは非常に困難である。熱帯に生息する種については生態学的な情報が少なく、困難はなおさらである。こうした状況下で、本研究で遺伝学的に明らかにしたオオウナギの繁殖集団構造に関する知見は、きわめて重要な意味を持っていると考えられる。

さて、本種の北太平洋集団は、日本周辺からインドネシア・アンボン島付近にかけて分布している。このことから、本集団の分布域は、北赤道海流と黒潮の影響を受けていると考えられる。オオウナギの北太平洋集団の個体と同様に、この2つの海流の影響を受けていると考えられるウナギ *A. japonica* は、産卵場をフィリピン沖の北緯15°、東経140°付近に有することが知られている (Tsukamoto, 1992)。しか

し、ウナギがインドネシアには分布していないことを考えると、受動的に輸送されるオオウナギのレプトケファルス幼生は黒潮に乗る一方で、南下するミンダナオ海流にも乗っていることになる。このことから、オオウナギの産卵場はウナギの産卵場より南にあると見るべきであろう。1995年6月から9月にかけての東京大学海洋研究所の白鳳丸による調査航海(KH95-2)において、北緯14°、東経140°付近でオオウナギのレプトケファルス幼生が採集されており、その体長が同じ海域で採集されたウナギのレプトケファルス幼生より大型であったことを考慮すると(青山, 1998)、オオウナギの産卵場がウナギの産卵場より南にあるばかりでなく、さらに東寄りに位置していることが推察される(図5-2)。

次に、インド洋西部集団の産卵場であるが、本集団に属すると考えられるオオウナギはマダガスカルをはじめとしてレユニオンやアフリカ東岸のケニア付近まで分布していると推測される。したがって、本集団の分布パターンは、インド洋の南赤道海流の影響を受けるマダガスカル北東部の海域に形成されるのではないかと考えられる。Jespersen (1942)によれば、本集団の分布域と思われる範囲では、南緯10°、東経60°付近の海域に夏期に水温が25℃以上で塩分が35‰以上となる高温・高塩分の水塊が形成されることが報告されている。またこの高温・高塩分な海域は、Schmidt (1925)によってウナギ属魚類の産卵場があると推定されたことのある場所でもある。彼はこの海域がオオウナギ, *A. bicolor bicolor*, *A. nebulosa labiata*, *A. mossambica*の4種のうちの1種あるいは数種の産卵場であると推定したが、少なくともオオウナギがこの海域で産卵していることは確かであると思われる(図5-2)。

インド洋東部集団の分布域はスマトラ島周辺であると推定される。Jespersen (1942)によって、スマトラ島の西側にあるメンタワイ海溝で小型のレプトケファルス幼生が採集されたことが報告されている。また彼はこの海域の水温・塩分の分布も詳しく調べ、この海域がウナギ属魚類の産卵場であると推定している。本集団の分布域が、Sverdrup et al. (1942)が示して水塊構造において、Indian Equatorial

Waterに含まれることや(図5-1), スマトラ島西岸をインド洋の赤道反流が流れることを考慮すると, メンタワイ海溝付近が本集団の産卵場であると考えて良さそうである(図5-2)。

南太平洋西部集団と南太平洋中央集団は, 今回その分離要因を海流や水塊の構造と十分に関連づけることができなかった。しかし, 1995年6月から7月にかけての白鳳丸による調査航海(KH95-2)において, バブアニューギニアの北東から東方海域(南緯 $0\sim 6^\circ$, 東経 $158\sim 160^\circ$)とフィジの北方海域(南緯 $9\sim 10^\circ$, 東経 175°)においてオオウナギのレプトケファルス幼生が採集された(青山, 1998)。このことから, 南太平洋西部集団の産卵場は, 南赤道海流の影響を受ける南緯 $0\sim 10^\circ$, 東経 170° 付近の海域ではないかと推察される。また, 南太平洋中央集団の産卵場は, さらに東よりに位置することが考えられ, 西経 160° あたりに存在する水塊の境界付近で, 南赤道海流の影響を受ける海域にあると憶測される(図5-2)。しかし, これに関しては, 確たる証拠は今のところない。

南太平洋東部集団の産卵場は, 本集団の分布域が, Sverdrup *et al.* (1942)が提唱した水塊構造においてEastern South Pacific waterの内部に位置することから, おなじこの水塊内に位置しているのではないだろうか。Jespersen (1942)の調査によれば, この海域には, 南緯 10° , 西経 140° 付近の表層 $100\sim 200\text{m}$ に, 水温 26°C 以上で塩分が 36% 以上の水塊が形成されることを報告しており, この海域に産卵場があるのではないかと推察される(図5-2)。

以上のように, 海流・水塊構造と海洋の環境条件の情報を基にすると, オオウナギに見い出された6つの繁殖集団のそれぞれの産卵場は, 予察的ながらおおよそ推測することができた。今後, より正確に産卵場の位置を明らかにするためには, 外洋において調査を行い, 卵や小型のレプトケファルス幼生を採集する必要がある。そして, それぞれの集団から採集したシラスウナギの耳石の日輪を解析することで産卵後の時間を推定し, その場の海流の様子から, 産卵場の特定を進めていくことになる。この場合, 卵やレプトケファルス幼生がどの集団のものかを識別する方法

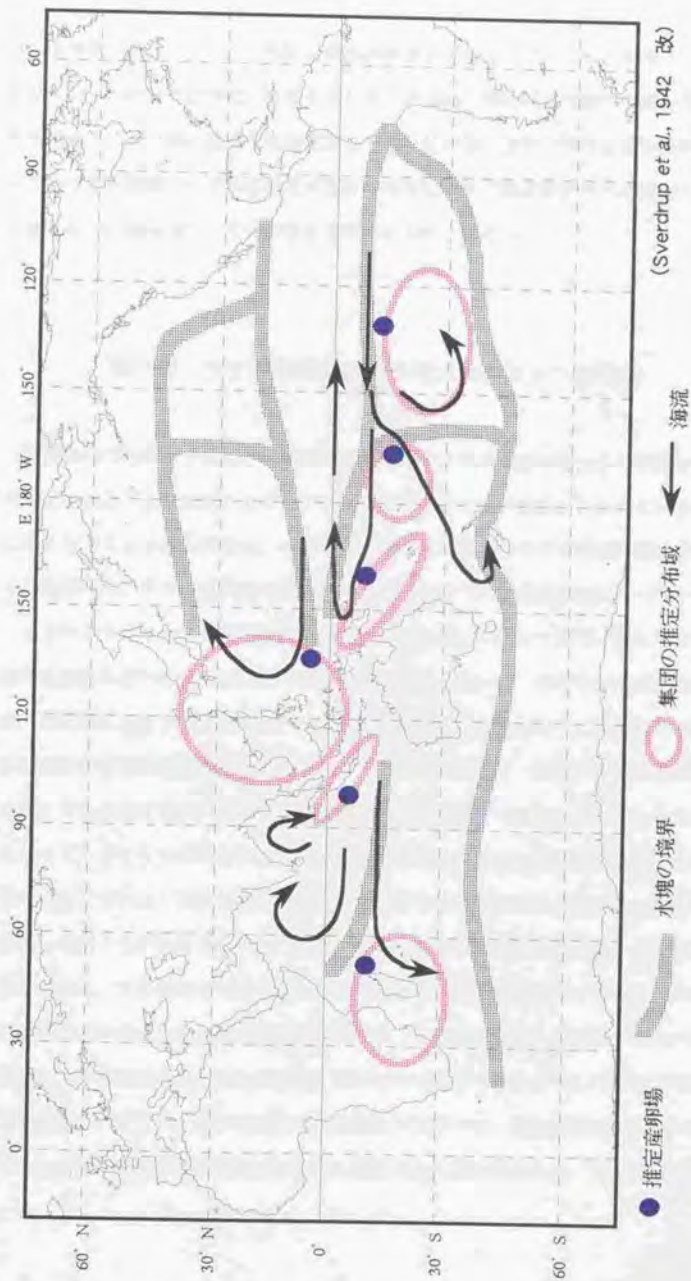


図5-2 オオウナギの各集団の推定産卵場

は、本研究で明らかにした各集団の遺伝的特徴を遺伝子マーカーとして使用する以外にはない。本研究の結果は、今後そうしたウナギ属魚類の回遊生態や産卵生態の研究を進める上で非常に重要な役割を演じることになる。また、野外調査を展開する上で、ここで推測した産卵場のおおよその位置は、まず調査を行うべき海域を特定するための作業仮説として有用性を発揮するものとなろう。

第4節 ウナギ属魚類の種分化メカニズムへの示唆

繁殖集団の分離とそれに伴う遺伝的な分化がウナギ属魚類の種分化を引き起こす要因であるとするならば、オオウナギは今まさにいくつかの種に分かれている過程にあると言えるかもしれない。そこで、本節では、オオウナギの集団分離の要因やその機構から、ウナギ属魚類の種分化メカニズムについて考察する。

オオウナギの6つの繁殖集団はそれぞれが遺伝的に分化しており、またその分布域や集団間の境界の位置は海流や水塊構造と関連している。オオウナギの産卵場が、広範囲にわたって連続的ないしは断続的に存在する場合は、このように各集団が明瞭に分化した集団構造は形成されない。このことから、オオウナギの産卵場は確かに複数存在するが、それは各繁殖集団ごとに1つづつあるものと思われる。したがって、オオウナギにおいても、各集団ごとに見れば塚本(1994)が提唱した回遊環が成立していると思なせることから、オオウナギの分布域拡大はこの回遊環を単位として起こったと考えられる。また、各集団の分布域が回遊環によって規制されることから、各集団間の交流が阻害され遺伝的分化が生じたと考えられる。このような回遊環を単位とした分布域の拡大機構が、ウナギ属全種に当てはまるのであれば、ウナギ属魚類の種分化も回遊環を単位として生じてきたと考えられるのではないだろうか。つまり、ウナギ属魚類の種分化プロセスは、回遊環が成立しているある地域から、無効分散の形で別の地域へ流されることから始まり、それらの無効分

散個体がある程度の個体数に達したときに、新たな回遊環が形成されれば、そこに新しい集団が形成される。オオウナギは今この状態であろう。次に、2つの回遊環の間で遺伝的な交流が断たれると、各集団間で遺伝的分化がおこり、長い年月を経てそれぞれ別の種に分化すると思われる。

全てのウナギ属魚類が降河回遊型の生活史を有することから、降河回遊生態は本属魚類が誕生した時に既に形成されていた形質であると考えられる。したがって、上記の種分化プロセスは、全てのウナギ属魚類に当てはまる機会があったと思われる。それに関わらず、現在、局所的にしか分布しない種 (*A. celebesensis*, *A. interioris*など)が存在することから、ウナギ属魚類の分布域拡大と種分化については、回遊環の拡大以外にも種々の条件があるものと思われる。そこで、次にオオウナギの場合を例に、分布域拡大とそれに伴う種分化の条件について考察してみたい。

まず、種としての歴史が長いものほど分布拡大のチャンスが多かったということが考えられる。しかし、青山(1998)によれば、ウナギ属魚類は数回の適応放散によって一気に種分化を遂げたことが示唆されており、オオウナギだけがとくに古いという根拠はない。したがって、種としての歴史の長さや分布の広さには関連はなさそうである。

次に、淡水生活期における競争力の強い種だけが分布を広げることができた可能性がある。つまり、淡水生活期の生息場所をめぐる競争においてオオウナギの競争力がとくに強く、他種を排除したため他種は分布を広げることができなかったため、結果としてオオウナギだけが広大な分布を獲得し得たのかもしれないということである。タヒチやモーレアにおいては、オオウナギと *A. megastoma* ならびに *A. obscura* が生息するが、標高250mを境にそれより低い河口付近にオオウナギが、それより高い地域では *A. megastoma* がそれぞれ優先種であることが報告されている (Marquet, 1987)。このような淡水生活域における生息域の偏りは、マダガスカルにおける標本採集時にも観察された。すなわち、河口付近にはオオウナギが多く、内陸部および標高の高い地域には *A. mossambica* や *A. bicolor* が多く生息していた。

このような種間の生息域の分離が競争の結果とはすぐに結論づけることはできないが、降河回遊魚であるウナギ属魚類の生活史を考慮すると、オオウナギが河口付近という他の場所に比べて有利な生息域を占めていることは明らかである。今後、オオウナギを含めた複数の種が同所的に生息する河川を対象に、シラス期の淡水域への加入から産卵回遊を始めるまでの生活史を明らかにし、種間の生態学的関係を断続的に調査することによって、ここで述べた可能性の検討が行えるのではないだろうか。

上記のこと以外にも、分布域拡大とそれに伴う種分化の条件については、産卵場の水温や塩分の制約やレプトケファルス幼生期の柔軟性が種によって異なることが考えられる。つまり、オオウナギでは他の種に比べ、産卵場の水温や塩分の条件が厳しくなく、比較的容易に産卵場を形成することができるということがあるかもしれない。また、レプトケファルス幼生期の長さが環境に応じて比較的容易に変化できるのであれば、海流による受動的輸送によって様々な地域へと運ばれる可能性が高くなる。このような、産卵場の条件やレプトケファルス幼生の生態学的な問題は、それぞれの種の産卵場が明らかにされた後、確かめなければならない課題であろう。

第5節 ウナギ属魚類の資源構造の理解に向けて

日本においてはウナギを対象とした養鰻業が盛んに行われており、ヨーロッパでも *A. anguilla* の燻製などは有名な水産物である。また、それ以外の地域でも、各地で本属魚類を対象とした産業があることや、本属魚類を対象とした漁具が存在することから、ウナギ属魚類は種を問わず重要な水産資源であると言えるであろう。ところが、日本において最近ウナギシラスの来遊量が激減しており、深刻な問題となっている。このため、ウナギの資源管理の必要性がようやく議論され始めたが、合理的な資源管理には資源構造の正確な理解が不可欠である。

mtDNAを用いたこれまでの研究から、ウナギや*A. rostrata*は種全体が一つの繁殖集団を形成していることを支持するデータも得られつつある (Avisé *et al.*, 1986; Sang *et al.*, 1995). また、ウナギや*A. anguilla* および*A. rostrata*については、外洋における産卵場調査が行われており、この3種のレプトケファルス幼生の分布パターンと海流構造や水塊構造の情報も徐々に集積されてきている。これらの知見から、ウナギ属魚類の産卵場と回遊経路は種ごとに厳密に決まっているという1種-1回遊環モデルが提唱された (塚本, 1994)。一方、オオウナギの場合は、本種が広大な分布域を持つことから、このモデルを厳密に当てはめることは難しいと考えられた。事実、本研究において、オオウナギは遺伝的に分化した6つの繁殖集団に分かれてはいることが示され、種全体が一つの繁殖集団を形成していないことが明らかにされた。しかし、オオウナギの各集団間における分離が海流や水塊構造によってうまく説明されることから、各繁殖集団ごとでは、それぞれ一つの回遊環を形成しているものと思われる。したがって、本研究の結果を考慮すると、1種-1回遊環モデルは1繁殖集団-1回遊環モデルへ拡張されるべきと考えられる。このように拡張された1繁殖集団-1回遊環モデルは、ウナギ属魚類の中で、最も広い分布域を有するオオウナギにも当てはまることから、ウナギ属魚類の全種に適応できるものであろうことが推測され、*A. anguilla*や*A. rostrata* およびウナギは、その特殊な例であると考えられる。

ウナギ属魚類の生活史や再生産構造が1繁殖集団-1回遊環モデルで説明されることから、本属魚類の資源管理はこの回遊環ごとに形成される繁殖集団を単位として行うべきであるという議論を提起することができる。しかし、ウナギ属魚類の分布域は概して広く、オオウナギの場合でも1つの繁殖集団が複数の国や地域にまたがって分布している。このような場合、1つの繁殖集団に含まれるものは、国や地域が異なっても、同じ資源として取り扱わなければ有効な資源管理は行えない。たとえば、オオウナギの北太平洋集団はインドネシアのアンボン島から日本周辺まで分布する。このため、仮に日本だけで資源管理を行っても本集団の適切な管理は行えな

い。また、ある地域の資源量が減少した場合に、単純に地理的に近い地点で採集した個体を放流すれば良いというものではない。たとえばオオウナギの場合、パプアニューギニア (PNG) とアンボン島 (IAN) は数百キロしか離れていないが、この2地点に生息する個体は、それぞれ別の集団に属している。反対にアンボン島と小笠原 (OG) は数千キロも離れているにも関わらず、この2地点で採集される個体は同じ集団に含まれる。したがって、もし、アンボン島に放流を行う場合は、地理的に近いパプアニューギニア (PNG) の個体ではなく、同じ集団に含まれる小笠原 (OG) などの個体を用いるべきだということである。

近年、人間活動の急速な発展によって、多くの生物が絶滅し、現在もおお多くの生物がその危機に瀕している。このような状況において、資源管理や環境保全という試みの重要性が認められるようになってきているが、それらはえてして人間が決めた国や地域を単位として行われる場合が多い。しかし、生物は、その種特有の生態と密接に関連した集団構造が維持されることで、はじめて存在し続けられる。なぜなら、生物の集団構造が、偶然に形成される単なる個体の集まり方ではなく、その生物が生まれてから現在に至る進化の歴史を通して形成されるものだからである。したがって、実効ある資源管理を目指すのであれば、対象生物の生態や集団構造を十分に研究し、その生物学的知見に立脚して、資源管理や環境保全のための方策の策定に取り組む必要があると考えられる。そうした研究の推進に、本研究で活用した分子集団遺伝学的・分子系統学的アプローチは、今後、より本格的に展開されるべきであろう。

要旨

現在分類学的には一種とされているオオウナギ *Anguilla marmorata* は、インド洋と太平洋の熱帯域を中心として、南北両半球にまたがる広大な分布域を持つ。この様に広大な分布域は魚類全体を見渡しても特異である。また、一般にウナギ属魚類は外洋に産卵場を持ち、ここで生まれた仔魚はレプトケファスル幼生として約半年の浮遊期を送る。この間海流により受動的に輸送され、それぞれの淡水生息域へ到着する。このことを考えると、海流系の全く異なる大洋にまたがって広く分布する本種の産卵場がただ1ヶ所であり、そこで生まれた仔魚が全ての分布域全域に回遊していくとは考えにくく、むしろいくつかの繁殖集団に分かれていると考える方が自然である。そこで本研究では、この仮説を検証するためミトコンドリアDNAと核DNAの遺伝子情報を解析して、オオウナギの遺伝的集団構造を解明することを目的とした。また、その集団構造の形成過程について考察を加えた。

ミトコンドリアDNAによる集団構造の解析

オオウナギの分布域全域を代表するよう10ヶ国14地点を選び、計195個体のオオウナギ標本を採集した。同時に他のウナギ属魚類9種についても、各種1~20個体を採集し外群として用いた。採集した個体は、斑紋、体長、頭長、吻端・肛門長、吻端・背鰭前端基部長等の外部形態形質を観察・計測し、Ege(1939)にしたがって種査定を行った。

オオウナギの集団解析に適したミトコンドリアDNA(mtDNA)の遺伝子領域を選定するために、北太平洋、南太平洋、インド洋から得た個体の中からそれぞれ5~10個体を選んだ。これらについて調節領域前半約600bp、16SリボソームRNA遺伝子(16S)領域後半約600bp、ならびにタンパク質コーディング領域のNADHデヒドロゲナーゼ・サブユニット2遺伝子(ND2)領域約700bpの塩基配列を決定し、3領域の変異性を比較した。その結果、オオウナギの個体間における変異率が最も高いのは調節

領域であることが分かった。次に、外群9種についても調節領域の塩基配列を決定し種間の変異率を求めて種内の値と比較したところ、種内の変異率(45%)が種間の変異率(61%)を越えることはなかった。さらに調節領域の変異はNeutrality testによって中立であることが示唆された。以上のことから、オオウナギの集団解析には調節領域が最適であると判断した。

オオウナギ195個体の塩基配列を決定し、個体間の遺伝的関係をみるために最節約法ならびに最尤法によって分子系統樹を推定したところ、北半球の6地点(小笠原、口永良部島、沖縄、アンボン島、ボルネオ島、スラウェシ島)で採集された個体は一つの枝にまとまった。これに対して、南半球の6地点(スマトラ島、バブアニューギニア、ニューカレドニア、フィジー、タヒチ、マダガスカル)で採集された個体については、4つの枝に分かれた。しかし中でも、タヒチ、マダガスカル、スマトラ島の3地点の個体はそれぞれ別の枝にまとまる傾向が示された。この結果から、オオウナギの内部には分集団が存在していることが示唆された。

次に各採集地点間の遺伝的分離を詳しく調べるために、各採集地点を一つの単位として、遺伝的分離の程度を表す固定指数(Fst)を求め、異なる2つの採集地点の個体が同じ集団に含まれる確率を求めた。その結果、北半球の採集地点と南半球の採集地点の組み合わせでは全て遺伝的に大きく分離していることが分かった

($F_{st}=0.409\sim 0.772; P<0.001$)。さらに、各半球内についてみると、北半球の6地点においては、各採集地点の個体間の分離はほとんど認められなかったのに対し、南半球の6地点では、バブアニューギニア、ニューカレドニア、フィジーの3地点間の組み合わせ($F_{st}=0.014\sim 0.037; P>0.05$)以外は、12通りの組み合わせ全てで明確な遺伝的差異が認められた($F_{st}=0.103\sim 0.457; P<0.001$)。

以上の結果から、オオウナギには日本周辺からアンボン島にかけて分布する北太平洋集団、マダガスカル周辺に分布するインド洋西部集団、スマトラ島周辺に分布するインド洋東部集団、バブアニューギニアからフィジーにかけて分布する南太平洋西部集団、さらにタヒチ周辺に分布する南太平洋東部集団の少なくとも5つの分

集団の存在していることが示唆された(AMOVA; $p < 0.001$).

また、これらの各集団内の塩基置換率を求め遺伝的多様性の程度を、種全体が一つの繁殖集団を形成していると考えられている*A.japonica*の塩基置換率を基準に評価したところ、オオウナギの各集団の多様性(1.37~3.85%)は、*A.japonica*の種全体(1.20%)より高いことが分かった。特に塩基置換率が高かったのはバブアニューギニア、ニューカレドニア、フィジーの3地点を含む南太平洋西部集団であり、その値が*A.japonica*のその約3倍であった。オオウナギの各集団が*A.japonica*と同じ様な一つの繁殖集団を形成しているのであれば、この南太平洋西部集団には、今回のmtDNA解析からは検出することの出来なかったさらに細かい分集団が存在している可能性があると思われた。

核DNA多型解析による集団構造の検討

mtDNAは母系遺伝するため一代限りの無効分散が起こっている場合は、集団構造の推定で誤った結果を導く可能性がある。そこでより詳細な集団構造の検討を行うために、最近植物の核DNA解析用に開発されたAFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)法をウナギ属魚類に適応し、特にmtDNA解析で示された南太平洋西部集団に焦点を当て、核DNAの解析を行った。

mtDNAの塩基配列を決定したオオウナギ195個体の内178個体について、AFLP法のバンドパターンの変異を基に最節約法による系統樹を推定した。その結果mtDNA解析の結果と同様に、まず北半球の6地点で収集された個体と南半球の6地点で採集された個体がそれぞれ別々の枝にまとまる傾向がみとめられ、南北両半球間で明らかに集団が異なることが示された。さらに南太平洋においても、mtDNAの解析結果で認められたものと同様、インド洋西部集団(マダガスカル)、インド洋東部集団(スマトラ島)、南太平洋東部集団(タヒチ)の3集団が認められた。しかし、mtDNA解析で示された南太平洋西部集団においては、さらに細かく次の2集団に分かれていることが明らかになった。すなわち、バブアニューギニアからニューカレ

ドニアに至る集団（今後はこれを南太平洋西部集団とよぶ）とフィジー周辺に存在する集団（南太平洋中央集団）である。したがって、AFLP法による核DNAの解析によれば、オオウナギには合計6つの集団が存在していることが明らかとなった。

さらに、mtDNAの解析とAFLPの解析結果を総合的に検討することによって、集団間の移住の様式について検討した。AFLPの分子系統樹でタヒチ個体と混在したフィジー個体は、mtDNAのグループにおいてもタヒチと同じ枝に位置していた。これより、これらの個体はタヒチ個体と同じ繁殖集団（南太平洋東部集団）から生じたものであり、レプトケファスル幼生期に偶発的に南太平洋中央集団（フィジー）に漂着・混入したものと考えた。この結果から、南太平洋東部集団と中央集団の間では、東部から中央への一方向的な移住の存在することが明らかになった。インド洋東部集団（スマトラ島）と南太平洋西部集団（バプアニューギニア）の間においても、前者から後者への一方向的な移住が推察された。また、インド洋の2集団においては、東部集団（スマトラ島）から西部集団（マダガスカル）への一方向的な移住が過去において起こったと推察された。しかし、南太平洋西部集団（バプアニューギニア）と南太平洋中央集団（フィジー）の間においては、AFLPではそれぞれ別々の枝を形成したのに対し、mtDNAでは両者は混在したので、双方向的な移住が過去においてのみ生じていたと推察された。

集団構造形成の歴史

明らかになった6集団の形成順序を、集団を単位として近隣結合法によってもとめた系統樹の樹型から推定した。その結果、ある一つのオオウナギの祖先集団から、まずはじめに北太平洋集団、インド洋西部集団、そして残りの4集団の共通の祖先集団に3分岐したことが分かった。その後4集団の共通祖先集団からインド洋東部集団と南太平洋東部集団が派生し、さらに、この2集団から南太平洋西部集団、南太平洋中央集団のが派生したものと考えられた。

以上をまとめると、オオウナギは種としてのまとまりを保ちつつも、明らかに遺伝的に異なる6つの繁殖集団に分かれていることが明らかになった。また、幼期にレプトケファスル幼生として受動的に海流によって輸送されるウナギ属魚類は、原則として一つの繁殖集団ごとにそれぞれ別々の産卵場を持つものと考えられ、本研究の結果によると、オオウナギには少なくとも6つの産卵場があることが推測された。今後、各集団の産卵場とそれぞれの集団に属するレプトケファスル幼生の分布を把握し、本研究において分子データから明らかにされた集団構造を生態的側面からも確認することが重要である。また、本研究で得られたオオウナギの集団構造とその形成過程に関する知見は、ウナギ属魚類の資源管理において重要な基礎資料となるものと考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、東京大学海洋研究所漁業測定部門の塚本勝巳教授に、終始暖かいご指導とご鞭撻を賜った。ここに深く謝意を表する。福井県立大学生物資源学部海洋生物資源学科の西田睦教授には、研究の始めより様々な局面で適切なご指導と研究全般にわたる有益なご助言を賜った。心より厚く御礼申し上げる。また、東京大学海洋研究所資源生物部門の沖山宗雄教授、農学部水産資源学講座の谷内透教授、ならびに水圏生物学講座の渡部終五教授には、本論文の審査に際して貴重なご指摘を賜った。ここに記して深く御礼を申し上げる。

水産庁中央水産研究所の井口恵一郎博士、同日本海区水産研究所の藤井徹生氏には、実験を始める当たって有益なご助言を頂いた。深く御礼申し上げる。東京大学農学部大学院生の青山潤氏には、研究全般にわたってご支援とご協力を頂いた。京都大学農学部大学院生の大河俊之氏に、実験とその結果の解析方法に関する助言と協力を頂いた。両氏に深く感謝する。

ミトコンドリアDNAの解析では、千葉県立中央博物館の宮正樹博士、福井県立大学研究生の川口亮氏、東京大学農学部大学院生の森田ひとみ氏にご支援とご助言を頂いた。核DNAの解析においては、京都大学農学部大学院生の中山耕至氏に多くのご助言とご協力を頂いた。重ねて厚く御礼申し上げる。

標本採集に同行してくださり、多大なご助力を賜った琉球大学理学部の鹿谷一博士、フランス南太平洋大学のMarquet博士、東京大学海洋研究所教務技官の稲垣正博士、ならびに東京大学農学部大学院生の渡邊俊氏、吉永龍起氏、新井崇臣氏に深く感謝申し上げます。メイン大学のJhon Beumer博士には、*Anguilla rostrata*の肝臓組織標本を送って頂いた。小笠原海洋センターの菅沼弘行副所長、立川浩之博士、ならびに堀越和夫博士ご夫妻には、小笠原における標本採集において種々の便宜を図って頂いた。口永良部島における標本採集では、広島大学生物生産学部大学院生の坂本耕一氏にご協力頂いた。フィジーにおいて、FAO職員の田中秀幸氏とそ

のご家族には、お宅に宿泊させて頂き、情報収集や標本の持ち出し許可取得等、甚大なご支援とご協力を賜った。インドネシアのスラウェシ島における標本採集では、サムラトゥランギ大学のDaniel Limbong博士、Inneke Rumengan博士ならびに同大学の学生の方々に同行して頂き、Bambang Soeroto教授は有益な情報を賜った。スマトラ島における採集では、ベカンバル大学のMughtar Ahmad副学長の甚大なご支援を賜り、ブンハッタ大学のEni Kamal助手と同大学の学生Dada氏にご協力を頂いた。マダガスカルにおける採集に当たり、科学技術庁研究開発局の盛高明氏から有益な情報を賜り、在マダガスカル日本大使館の山越和彦氏(現 財団法人日本国際協力システム)には、採集に同行して頂きご協力頂いた。同東原茂氏には標本の持ち出し許可を取得する際、甚大なご協力を賜った。バブアニューギニアでの採集では、三重大学生物資源学部の大竹二雄助教授から有益な情報を頂き、バブアニューギニア在住の川端静氏には、種々の便宜を図って頂いた。タヒチにおける採集では、Heinawa氏とご家族にご協力頂き、Dominica氏には所有地内での採集の許可を頂いた。ボルネオ島における標本採集に当たっては、(社)青年海外協力協会の山下知勢子氏から情報を頂いた。バングラディッシュでは、Ananat氏およびNunu Ranjan Jaladsa氏のご協力を得た。また、Rupari BankのKanees Fatema Ahmad氏、Iqubal Hoosain氏ならびにBaccho Lasker氏には、情報収集等種々のご支援を頂いた。タンザニアにおいて、突然の訪問にもかかわらず在タンザニア日本大使館の嘱託職員の木村英子氏が種々の便宜を図ってくださり、Rodrick Haure氏は、情報収集と釣りに同行して頂いた。当時青年海外協力隊の高橋氏には現地での通訳をして頂いた。標本の採集には、ここに挙げた方の他にも多くの方々にご協力頂いた。標本採集にご協力頂いた全ての方に御礼申し上げる。

さらに、研究を進めるに当たって東京大学海洋研究所漁業測定部門の青山碩子技官と大矢真知子技官には、公私にわたり暖かい御援助と激励を頂いた。ここに記して感謝の念を表す。また、ダンスダフナージュ海洋研究所の益田玲爾博士とゲルブ大学研究員の阪倉良孝博士には、適切なご指摘と暖かい励ましを賜った。心から感

謝する。福井県立大学生物資源学部大学院生の真田麻夕氏には、資料の整理等を手伝って頂いた。また、東京大学海洋研究所漁業測定部門、ならびに福井県立大学生物資源学部海洋生物資源学科海洋生物研究室に在籍する(あるいは在籍した)学生の方々には、多くの助言と励ましを頂いた。研究生生活を支援してくださったこれらの方々に、感謝の念を表す。

最後に、学生生活を支援してくれた弟と、研究生生活を支えて下さった両親に深く感謝申し上げる。

文 献

- Adachi, J., Y. Cao and M. Hasegawa (1993). Tempo and mode of mitochondrial DNA evolution in vertebrates at the amino acid sequence level: rapid evolution in warm-blooded vertebrates. *J. Mol. Evol.*, 36: 270-281.
- Adachi, J. and M. Hasegawa (1996). Instability of quartet analyses of molecular sequence data by the maximum likelihood method: the Cetacea/Artiodactyla relationships. *Mol. Phyl. Evol.*, 6(1): 72-76.
- アンデル, T. H. V. (1985). さまよえる大陸と海の系譜 (卯田 強 訳). 築地書館, 東京, 352pp.
- 青木 宙・隆島 史夫・平野 哲也 編 (1997). 魚類のDNA - 分子遺伝学的アプローチ. 恒星社厚生閣, 東京, 467pp.
- 青山 潤 (1995). ミトコンドリアDNAによるウナギ属魚類の系統と進化に関する研究. 東京大学大学院農学生命科学研究科修士論文, 53pp.
- 青山 潤 (1998). ウナギ属魚類の系統と進化に関する研究. 東京大学大学院農学生命科学研究科博士論文
- Aoyama, J. and K. Tsumakoto (1997). Evolution of the freshwater eels. *Naturwissenschaften*, 84: 17-21.
- Aoyama, J., M. Nishida and K. Tsukamoto (1997). Molecular phylogenetic approach to the evolution of the freshwater eels, *Anguilla*. *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 44: 2-10.
- Árnason, E. and D. M. Rand (1992). Heteroplasmy of short tandem repeats in mitochondrial DNA of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Genetics*, 132: 211-220.
- Árnason, U., A. Gullberg and B. Widegren (1993). Cetacean mitochondrial DNA control region: sequences of all extant baleen whales and two sperm whale species. *Mol. Biol. Evol.*, 10(5): 960-970.
- Ava, F. and F. Breden (1992). Mitochondrial DNA sequence variation among natural populations of the trinidad guppy, *Poecilia reticulata*. *Evolution*, 46(5): 1457-1465.
- Avise, J. C. (1989). Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43(6): 1192-1208.
- Avise, J. C., R. M. Ball and J. Arnold (1988). Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: a comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. *Mol.*

- Biol. Evol.*, 5(4): 331-344.
- Avise, J. C., R. T. Alisauskas, W. S. Nelson and C. D. Ankney (1992). Matriarchal population genetic structure in avian species with female natal philopatry. *Evolution*, 46(4): 1084-1096.
- Avise, J. C., G. S. Helfman, N. C. Saunders and L. S. Hales (1986). Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 4350-4354.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb and N. C. Saunders (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 489-522.
- Beland, K. F. (1996). The relation between redd counts and Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr population in the Dennys River, Maine. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 513-519.
- Bembo, D. G., A. J. Weightman, R. J. H. Beverton and R. C. Cresswell (1994). Mitochondrial DNA variation in River Usk brown trout, *Salmo trutta*. *J. Fish Biol.*, 44: 717-723.
- Bermingham, E. and J. C. Avise (1986). Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics*, 113: 939-965.
- Bernatchez, L. and J. J. Dodson (1990). Allopatric origin of sympatric populations of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) as revealed by mitochondrial-DNA restriction analysis. *Evolution*, 44(5): 1236-1271.
- Bernatchez, L., R. Guyomard and F. Bonhomme (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Mol. Ecol.*, 1: 161-173.
- Bernatchez, L. and A. Osinov (1995). Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Mol. Ecol.*, 4: 285-297.
- Bertin, L. (1956). Eels, a biological study. Cleaver-Home Press Ltd., Lond., 192pp.
- Billington, N. and P. D. N. Hebert (1991). Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48(Suppl. 1): 80-94.
- Block, B. A., J. R. Finnerty, A. F. R. Stewart and J. Kidd (1993). Evolution of endothermy in fish: mapping physiological traits on a molecular phylogeny. *Science*, 260: 210-214.
- Bogenhagen, G. and D. A. Clayton (1978). Mechanism of mitochondrial DNA

- replication in mouse L-cells: kinetics of synthesis and turnover of the initiation sequence. *J.Mol.Biol.* 119: 49-68.
- Brenner, S., G. Elger, R. Sandford, A. Macrae, B. Venkatesh and S. Aparicio (1993). Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature*, 366(6452): 265-268.
- Briggs, J. C. (1995). Global biogeography, Developments in palaeontology and stratigraphy 14. Elsevier, Amsterdam, 452pp.
- Brown, G.G., G.Gadaleta, G.Pepe, C.Saccone and E.Sibisa (1986). Structural conservation and variation in the D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J.Mol.Biol.* 192: 503-511.
- Brown, G. G. (1986). Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, 192: 503-511.
- Brown, J. R., A. T. Beckenbach and M. J. Smith (1992). Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmy in population of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genetics*, 132: 221-228.
- Brown, W. M., M. George Jr. and A. C. Wilson (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(4): 1967-1971.
- Brown, W. M., E. M. Pranger, A. Wang and A. C. Wilson (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Biol.*, 18: 225-239.
- Bruton, M. N., A. H. Bok and M. T. T. Davies (1987). Life history styles of diadromous fishes in inland water of Southern Africa. American Fisheries Society Symposium, 1: 104-121.
- Cann, R. L., M. Stoneking and A. C. Wilson (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325: 31-36.
- Carvalho, G. R. and L. Hauser (1995). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. In G. R. Carvalho and T. J. Pitcher (eds.), *Molecular genetics in fisheries*, pp. 55-79. Chapman & Hall, Lond.
- Chan, I. K. K., D. K. O. Chan, S. C. Lee and K. Tsukamoto (1997). Genetic variability of the Japanese eel *Anguilla japonica* (Temminck & Schlegel) related to latitude. *Ecol. Freshwater Fish*, 6: 45-49.
- Chang, D. D. and D. A. Clayton (1985). Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 351-355.
- Chang, D. D. and D. A. Clayton (1986). Identification of primary transcriptional start sites of mouse mitochondrial DNA: accurate in vitro initiation of both

- heavy- and light-strand transcripts. *Mol. Cell. Biol.*, 6(5): 1446-1453.
- Chang, Y.-S., F.-I. Huang and T.-B. Lo (1994). The complete nuclear sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.*, 38: 138-155.
- Chenoweth, S. F. and J. M. Hughes (1997). Genetic population structure of the catadromous Perciform: *Macquaria novemaculeata* (Percichthyidae). *J. Fish Biol.*, 50: 721-733.
- Clayton, D. A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28: 693-705.
- Clayton, D. A. (1984). Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Ann. Rev. Biochem.*, 53: 573-594.
- Clayton, D. A. (1992). Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *International Rev. Cytol.*, 141: 217-232.
- Clayton, D. A. (1996). Mitochondrial DNA gets the drift. *Nature Genet.*, 14: 123-125.
- Crowley, P. H. (1992). Resampling methods for computation-intensive data analysis in ecology and evolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 23: 405-447.
- Darlington, P. J., Jr. (1948). The geographical distribution of cold-blooded vertebrates. *Quarterly Rev. Biol.*, 23: 1-26, 105-123.
- Darlington, P. J., Jr. (1957). Zoogeography: the geographical distribution of animals. Kreiger, Florida, 675pp.
- D'Erchia, A. M., C. Gissi, G. Pesole, C. Saccone and U. Arnason (1996). The guinea-pig is not a rodent. *Nature*, 381: 597-600.
- Dillon, M. C. and J. M. Wright (1993). Nucleotide sequence of the D-loop region of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) mitochondrial genome. *Mol. Biol. Evol.*, 10(2): 296-305.
- Doda, J. N., C. T. Wright and D. A. Clayton (1981). Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(10): 6116-6120.
- Domanico, M. J. and R. B. Phillips (1995). Phylogenetic analysis of pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) based on mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Phyl. Evol.*, 4(4): 366-371.
- Dutton, P. H., S. K. Davis, T. Guerra and D. Owens (1996). Molecular phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4-Leucine tRNA and control regions of mitochondrial DNA. *Mol. Phyl. Evol.*, 5(3): 511-521.
- Ege, V. (1939). A revision of the genus *Anguilla* Shaw, a systematic, phylogenetic

- and geographical study. *Dana Rep.*, 16: 1-256.
- Excoffier, L., P. Smouse and J. Quattro (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes. Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Faith, D. P. (1991). Cladistic permutation tests for monophyly and nonmonophyly. *Syst. Zool.*, 40(3): 366-375.
- Fajen, A. and F. Breden (1992). Mitochondrial DNA sequence variation among natural populations of the trinidad guppy, *Poecilia reticulata*. *Evolution*, 46(5): 1457-1465.
- Felsenstein, J. (1973). Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Syst. Zool.*, 22: 240-249.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies with a molecular clock. *Syst. Zool.*, 34(2): 152-161.
- Floork, P. K., C. H. F. Rowell and G. Gellissen (1995). The sequence, organization, and evolution of the *Locusta migratoria* mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.*, 41: 928-941.
- Foighil, D. Ó. and M. J. Smith (1995). Evolution of asexuality in the cosmopolitan marine clam *Lasaea*. *Evolution*, 49(1): 140-150.
- Friar, E. A., R. H. Robichaux and D. W. Mount (1996). Molecular genetic variation following a population crash in the endangered Mauna Kea silversword, *Argyroxiphium sandwicense* ssp. *sandwicense* (Asteraceae). *Mol. Ecol.*, 5: 687-691.
- Fujii, T. and M. Nishida (1997). High sequence variability in the mitochondrial DNA control region of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, 63(6): 906-910.
- Fumagalli, L., P. Taberlet, L. Favre and J. Hausser (1996). Origin and evolution of homologous repeated sequence in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Mol. Biol. Evol.*, 13(1): 31-46.
- Gach, M. H. and W. M. Brown (1997). Characteristics and distribution of large tandem duplications in brook stickleback (*Culaea inconstans*) mitochondrial DNA. *Genetics*, 145: 383-394.
- Garner, K. J. and O. A. Ryder (1995). Mitochondrial DNA diversity in gorillas. *Mol. Phylog. Evol.*, 6(1): 39-48.
- 月刊海洋編集部 編 (1994). ウナギの生物学. 月刊海洋, 26(5): 1-322.
- Gemery, D. and A. Boyde (1961). Preliminary report on Precipitin tests with

- America and European eel *Sera. Serol Mus.*, 26.
- Gemmell, N. J., P. S. Western, J. M. Watson and J. A. M. Graves (1996). Evolution of the mammalian mitochondrial control region – comparisons of control region sequences between monotreme and therian mammals. *Mol. Biol. Evol.*, 13(6): 798-808.
- Giuffra, E., L. Bernatchez and R. Guyomard (1994). Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from northern Italy. *Mol. Ecol.*, 3: 161-171.
- Godfrey, J.S., A.C. Hirst and J. Wilkin (1993). Why does the Indonesian throughflow appear to originate from the North Pacific?. *J. Physiol. Ocean.* 23:1087-1098
- Gordon, A.L. and R.A. Fine (1996). Pathways of water between the Pacific and Indian Oceans in the Indonesia Seas. *Nature*. 379:146-149
- Graven, L., G. Passarino, O. Semino, P. Boursot, S. Santachiara-Benerecetti, A. Langaney and L. Excoffier (1995). Evolutionary correlation between control region sequence and restriction polymorphisms in the mitochondrial genome of a large Senegalese Mandenka sample. *Mol. Biol. Evol.*, 12(2): 334-345.
- Grewe, P. M., C. C. Krueger, C. F. Aquadro, E. Bermingham, H. L. Kincaid and B. May (1993). Mitochondrial DNA variation among lake trout (*Salvelinus namaycush*) strains stocked into Lake Ontario. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 2397-2403.
- グリビン, J. (1993). 地球生命35億年物語 進化の秘密は氷河期にあった (木原悦子 訳, 松井 孝典 監修). 徳間書店, 東京, 298pp.
- Grøsvik, B. E. and A. J. Raae (1992). The genome size and the structure and content of ribosomal RNA genes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 101B(3): 407-411.
- Haeseler, A., A. Sajantila and S. Pääbo (1995). The genetical archaeology of the human genome. *Nature Genet.*, 14: 135-140.
- Haig, S. M., J. M. Rhymer and D. G. Heckel (1994). Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockled woodpeckers *Picoides borealis*. *Mol. Ecol.*, 3: 581-595.
- 長谷川 政美 (1984). DNAからみた人類の起源と進化 –分子人類学序説–. 海鳴社, 東京, 282pp.
- 長谷川 政美・岸野 洋久 (1996). 分子系統学. 岩波書店, 東京, 257pp.
- Hasegawa, M., H. Kishino and N. Saitou (1991). On the maximum likelihood method in molecular phylogenetics. *J. Mol. Evol.*, 32: 443-445.

- Hasegawa, M., T. Yano and H. Kishino (1984). A new molecular clock of mitochondrial DNA and the evolution of hominoids. *Proc. Jpn. Acad.*, B60: 95-98.
- Hayasaka, K., T. Gojobori and S. Horai (1988). Molecular phylogeny and evolution of primate mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, 5: 626-644.
- Hedges, S. B., S. Kumar, K. Tamura and M. Stoneking (1991). Human origins and analysis of mitochondrial DNA sequences. *Science*, 255: 737-739.
- Higgins, D. G. and P. M. Sharp (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, 73: 237-244.
- Hoelzel, A. R., J. M. Hancock and G. A. Dover (1991). Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Mol. Biol. Evol.*, 8(3): 475-493.
- Hoelzel, A. R., J. V. Lopez, G. A. Dover and S. J. O'Brien (1994). Rapid evolution of a heteroplasmic repetitive sequence in the mitochondrial DNA control region of carnivores. *J. Mol. Evol.*, 39: 191-199.
- Horai, S., K. Hayasaka, R. Kondo, K. Tsugane and N. Takahata (1995). Recent African origin of modern humans revealed by complete sequence of hominoid mitochondrial DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 532-536.
- Hrincevich, A. W. and D. W. Foltz (1996). Mitochondrial DNA sequence variation in a sea star (*Leptasterias* spp.) species complex. *Mol. Phyl. Evol.*, 6(3): 408-415.
- Iguchi, K., Y. Tanimura and M. Nishida (1997). Sequence divergence in the mtDNA control region of amphidromous and landlocked forms of ayu. *Fish. Sci.*, 63(6): 901-905.
- Ishida, N., T. Oyunsuren, S. Mashima, H. Mukoyama and N. Saitou (1995). Mitochondrial DNA sequences of various species of the genus *Equus* with special reference to the phylogenetic relationship between Prewalskii's wild horse and domestic horse. *J. Mol. Evol.*, 41: 180-188.
- Jenuth, J. P., A. C. Peterson, K. Fu and E. A. Shoubridge (1996). Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nature Genet.*, 14: 146-151.
- Jespersen, P. (1942). Indo-Pacific leptocephalids of the genus *Anguilla*, systematic and biological studies. *Dana Rep.*, 22: 1-128.
- Johansen, S. and I. Bakke (1996). The complete mitochondrial DNA sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*): relevance to taxonomic studies among codfishes. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 5(3): 203-214.
- Johansen, S., P. H. Guddal and T. Johansen (1990). Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucleic Acids Res.*

- Kawata, M. (1995). Effective population size in a continuously distributed population. *Evolution*, 49(6): 1046-1054.
- Kimura, S., K. Tsukamoto and T. Sugimoto. (1994). A model for the larval migration of the Japanese eel: roles of the trade winds and salinity front. *Marine Biology*, 119: 185-190.
- Kimura, M. and T. Maruyama (1971). Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. *Genet. Res. Camb.*, 18: 125-131.
- King, T. L. and H. O. Pate (1992). Population structure of spotted seatrout inhabiting the Texas gulf coast: an allozymic perspective. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 121: 746-756.
- Kleckner, R. C., J. D. McCleave and G. S. Wipplhauser (1983). Spawning of American eel, *Anguilla rostrata*, relative to thermal fronts in the Sargasso Sea. *Environmental Biol. Fishes*, 9(3-4): 289-293.
- Knowlton, N. (1993). Sibling species in the sea. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 24: 189-216.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca and A. C. Wilson (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6196-6200.
- Kohn, M., F. Knauer, A. Stoffella, W. Schröder and S. Pääbo (1995). Conservation genetics of the European brown bear – a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Mol. Ecol.*, 4: 95-103.
- Kolman, C. J. and E. Bermingham (1997). Mitochondrial and nuclear DNA diversity in the Chocó and Chibcha Amerinds of Panamá. *Genetics*, 147: 1289-1302.
- Kotoulas, G., F. Bonhomme and P. Borsa (1995). Genetic structure of the common sole *Solea vulgaris* at different geographic scales. *Mar. Biol.*, 122: 361-375.
- Lecomte-Finiger, R. (1994). The early life of the European eel. *Nature*, 370: 424.
- Lee, W.-J., J. Conroy, W. H. Howell and T. D. Kocher (1995). Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *J. Mol. Evol.*, 41: 54-66.
- Lunt, D. H. and B. C. Hyman (1997). Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature*, 387: 247.
- Marquet, G. (1987). Perilogie des anguilles de Tahiti-Moorea en polynesie Francaise. Ministère de L'education nationale ecole pratique hautes etudes. 3 section. :1-151.

- Marquet, G., B. Séret and R. Lecomte-Finiger (1997). Inventaires comparés des poissons des eaux intérieures de trois îles océaniques tropicales de l'Indo-Pacifique (La Réunion, la Nouvelle-Calédonie et Tahiti). *Cybium*, 21(Suppl.): 27-34.
- Marshall, H. D. and A. J. Baker (1997). Structural conservation and variation in the mitochondrial control region of fringilline finches (*Fringilla* spp.) and greenfinch (*Carduelis chloris*). *Mol. Biol. Evol.*, 14(2): 173-184.
- Martin, A. (1993). Hammerhead shark origins. *Nature*, 364: 494.
- Martin, A. P. (1995). Metabolic rate and directional nucleotide substitution in animal mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, 12(6): 1124-1131.
- Martin, A. P., G. J. P. Naylor and S. R. Palumbi (1992). Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature*, 357: 153-155.
- 松井 魁 (1972). 鰻学, 生物学の研究篇, 恒星社厚生閣, 東京, 283pp.
- Matsui, I. (1957). On the records of a leptocephalus and catadromous eels of *Anguilla japonica* in the waters around Japan with a presumption on their spawning places. *J. Shimonoseki Coll. Fish.*, 7(1): 151-167.
- McCleave, J. D., R. C. Klecker and M. Castonguay (1987). Reproductive sympatry of American and European eels and implications for migration and taxonomy. *American Fisheries Society Symposium*, 1: 286-297.
- McMillan, W. O. and E. Bermingham (1996). The phylogeographic pattern of mitochondrial DNA variation in the Dall's porpoise *Phocoenoides dalli*. *Mol. Ecol.*, 5: 47-61.
- Merilä, J., M. Björklund and A. J. Baker (1997). Historical demography and present day population structure of the greenfinch, *Carduelis chloris* – an analysis of mtDNA control-region sequences. *Evolution*, 51(3): 946-956.
- Meyer, A. and A. C. Wilson (1990). Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. *J. Mol. Evol.*, 31: 359-364.
- Meyer, A. (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In P. W. Hochachka and T. P. Mommsen (eds.), *Molecular biology frontiers, Biochemistry and molecular biology of fishes vol. 2*, pp. 1-38. Elsevier, Amsterdam.
- Meyer, A., L. L. Knowles and E. Verheyen (1996). Widespread geographical distribution of mitochondrial haplotypes in rock-dwelling cichlid fishes from Lake Tanganyika. *Mol. Ecol.*, 5: 341-350.
- Michalakis, Y. and L. Excoffier (1996). A genetic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, 142: 1061-1064.

- Mitchell-Olds, T. (1995). The molecular basis of quantitative genetic variation in natural populations. *TREE*, 10(8): 324-328.
- Mitton, J. B. (1994). Molecular approaches to population biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 25: 45-69.
- Miyata, T., K. Kuma, N. Iwabe and N. Nikoh (1994). A possible link between molecular evolution and tissue evolution demonstrated by tissue specific genes. *Jpn. J. Genet.*, 69: 473-480.
- Moran, P. and I. Kornfield (1995). Were population bottlenecks associated with the radiation of the mbuna species flock (teleostei: Cichlidae) of Lake Malawi? *Mol. Biol. Evol.*, 12(6): 1085-1093.
- Mueller, U. G., S. E. Lipari and M. G. Milgroom (1996). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of symbiotic fungi cultured by the fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. *Mol. Ecol.*, 5: 119-122.
- Mullis, K. and F. Fallona. (1987). In: Methods in Enzymology. Edited by Wu, R., San Diego. Academic Press., p.155.
- 根井 正利 (1990). 分子進化遺伝学 (五條堀 孝・斎藤 成也 訳). 培風館, 東京, 433pp.
- Nielsen, J. L., C. A. Gan, J. M. Wright, D. B. Morris and W. K. Thomas (1994). Biogeographic distributions of mitochondrial and nuclear markers for southern steelhead. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 3(5): 281-293.
- 日本生化学会 編 (1993). 新化学実験講座 16, 分子進化実験法. 東京化学同人, 東京, 511pp.
- 西 源二郎・今井 貞彦 (1969). 屋久島産オオウナギ幼期の生態ならびに形態学的研究. 鹿児島大学水産学部紀要, 18: 65-76.
- Nishida, M. (1991). Lake Tanganyika as an evolutionary reservoir of old lineages of East African cichlid fishes: inferences from allozyme data. *Experientia*, 47: 974-979.
- Nordeng, H. (1983). Solution to the "char problem" based on Arctic char (*Salvelinus alpinus*) in Norway. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40: 1372-1387.
- Norman, J. A., C. Moritz and C. J. Limpus (1994). Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. *Mol. Ecol.*, 3: 363-373.
- Ohta, T. (1992). The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 23: 263-286.

- Oohara, I., K. Sawano and T. Okazaki (1997). Mitochondrial DNA sequence analysis of the masu salmon - phylogeny in the genus *Oncorhynchus*. *Mol. Phyl. Evol.*, 7(1): 71-78.
- Ortú, G., M. A. Bell, T. E. Reimchen and A. Meyer (1994). Global survey of mitochondrial DNA sequences in the threespine stickleback: evidence for recent migrations. *Evolution*, 48(3): 608-622.
- Ovenden, J. R. (1990). Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 41: 835-853.
- Ozawa, T., F. Kakino, O. Tabeta, T. Maeda and Y. Yuwaki (1991). Japanese eel leptocephali from three cruises in the western north Pacific. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(10): 1877-1881.
- Palumbi, S. R. (1996). Macrospatial genetic structure and speciation in marine taxa with high dispersal abilities. In J. D. Ferraris and S. R. Palumbi (eds.), *Molecular zoology: advances, strategies, and protocols*, pp. 101-117. Wiley-Less, Inc., N. Y.
- Palumbi, S. R. and C. S. Baker (1994). Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Mol. Biol. Evol.*, 11(3): 426-435.
- Palumbi, S. R. and A. C. Wilson (1990). Mitochondrial DNA diversity in the sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* and *S. droebachiensis*. *Evolution*, 44(2): 403-415.
- Pamilo, P. and M. Nei (1988). Relationships between gene trees and species trees. *Mol. Biol. Evol.*, 5(5): 568-583.
- Pantelouris, E. M., A. Arnason and F. W. Tesch (1970). Genetic variation in the eel. II. Transferrins, haemoglobins and esterases in the eastern North Atlantic. Possible interpretations of phenotypic frequency differences. *Genet. Res.* 11: 277-284.
- Pantelouris, E. M., A. Arnason and F. W. Tesch (1971). Genetic variation in the eel. III. Comparisons of Rhode Island and Icelandic populations. Implications for the Atlantic eel problem. *Marine Biology*, 9: 242-249.
- Pantelouris, E. M., A. Arnason and R. H. Payne (1968). Genetic variation in the eel. I. The detection of haemoglobin and esterase polymorphisms. *Genet. Res.* 11: 319-325.
- Park, L. K. and P. Moran (1995). Developments in molecular genetic techniques in fisheries. In G. R. Carvalho and T. J. Pitcher (eds.), *Molecular genetics in fisheries*, pp. 1-27. Chapman & Hall, Lond.
- Perna, N. T. and T. D. Kocher (1995). Unequal base frequencies and the estimation of substitution rates. *Mol. Biol. Evol.*, 12(2): 359-361.

- Pogson, G. H., K. A. Mesa and R. G. Boutilier (1995). Genetic population structure and gene flow in the Atlantic cod *Gadus morhua*: a comparison of allozyme and nuclear RFLP loci. *Genetics*, 139: 375-385.
- Pope, L. C., A. Sharp and C. Moritz (1996). Population structure of the yellow-footed rock-wallaby *Petrogale xanthopus* (Gray, 1854) inferred from mtDNA sequences and microsatellite loci. *Mol. Ecol.*, 5: 629-640.
- Purcell, M. K., I. Kornfield, M. Fogarty and A. Parker (1996). Interdecadal heterogeneity in mitochondrial DNA of Atlantic haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) from Georges Bank. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 5(3): 185-192.
- Quinn, T. W. and D. P. Mindell (1996). Mitochondrial gene order adjacent to the control region in crocodile, turtle, and tuatara. *Mol. Phyl. Evol.*, 5(2): 344-351.
- Quinn, T. W. and A. C. Wilson (1993). Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. *J. Mol. Evol.*, 37: 417-425.
- Raay, T. J. V. and T. J. Crease (1995). Mitochondrial DNA diversity in an apomictic *Daphnia* complex from the Canadian High Arctic. *Mol. Ecol.*, 4: 149-161.
- Redd, A. J., N. Takezaki, S. T. Sherry, S. T. MacGarvey, A. S. M. Sofro and M. Stoneking (1995). Evolutionary history of the COII/tRNA^{Leu} intergenic 9 base pair deletion in human mitochondrial DNAs from the Pacific. *Mol. Biol. Evol.*, 12(4): 604-615.
- Reeder, T. W. (1995). Phylogenetic relationships among phrynosomatid lizards as inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences: substitutional bias and information content of transitions relative to transversions. *Mol. Phyl. Evol.*, 4(2): 203-222.
- Rienzo, A. D. and A. C. Wilson (1991). Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1597-1601.
- Rigaa, A., M. Monnerot and D. Sellos (1995). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the repeated unit and flanking gene of the scallop *Pecten maximum* mitochondrial DNA: putative replication origin features. *J. Mol. Evol.*, 41: 189-195.
- Ritchie, P. A., L. Bargelloni, A. Meyer, J. A. Taylor, J. A. Macdonald and D. M. Lambert (1996). Mitochondrial phylogeny of trematomid fishes (Nototheniidae, Perciformis) and the evolution of Antarctic fish. *Mol. Phyl. Evol.*, 5(2): 383-390.
- Robins, C. R. (1989). The phylogenetic relationships of the Anguilliform fishes. In B. B. Eugenia (ed.), *Fishes of the western north Atlantic, Sears Foundation Memoir No. 1, Part 9*, pp. 9-23. Sears foundation for marine research, Yale Univ., New Haven.

- Ross, K. G. (1997). Multilocus evolution in fire ants: effects of selection, gene flow and recombination. *Genetics*, 145: 961-974.
- Rozas, J. and R. Rozas (1997). DnaSP version 2.0: a novel software package for extensive molecular population genetics analysis. *Comput. Applic. Biosci.*, 13: 307-311.
- Saccone, C., M. Attimonelli and E. Sbisà (1987). Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop-containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 26: 205-211.
- Saccone, C., G. Pesole and E. Sbisà (1991). The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *J. Mol. Evol.*, 33: 83-91.
- Sang, T. K., H. Y. Chang, C. T. Chen and C. F. Hui (1994). Population structure of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Mol. Biol. Evol.*, 11(2): 250-260.
- Schmidt, J. (1909). On the distribution of the fresh water eels (*Anguilla*) throughout the world I. Atlantic ocean and adjacent region. *Meddr. Kommn. Havunders., Ser. Fisk.*, 1-45.
- Schmidt, J. (1923). The breeding places of the eel. *Phil. Trans. R. Soc.*, 211: 179-208.
- Schmidt, J. (1925). On the distribution of the fresh water eels (*Anguilla*) throughout the world II. Indo-Pacific region. *Skr. Kongel. Dansk. Selsk. Nat. Afd. Kobh.*, 10: 329-382.
- Schmidt, J. (1929). Introduction to the oceanographical reports. *Oceanogr. Rep., Dana Exped. 1920-22*, 1: 1-86.
- Schuler, G. D., M. S. Boguski, E. A. Stewart, L. D. Stein, G. Gyapay, K. Rice, R. E. White, P. Rodriguez-Tomé, A. Aggarwal, E. Bajorek, S. Bentolila, B. B. Birren, A. Butler, A. B. Castle, N. Chiannikulchai, A. Chu, C. Clee, S. Cowles, P. J. R. Day, T. Dibling, N. Drouot, I. Dunham, S. Duprat, C. East, C. Edwards, J.-B. Fan, N. Fang, C. Fizames, C. Garrett, L. Green, D. Hadley, M. Harris, P. Harrison, S. Brady, A. Hichs, E. Holloway, L. Hui, S. Hussain, C. Louis-Dit-Sully, J. Ma, A. MacGilvery, C. Mader, A. Maratukulam, T. C. Matisse, K. B. McKusick, J. Morrisette, A. Mungall, D. Muselet, H. C. Nusbaum, D. C. Page, A. Peck, S. Perkins, M. Piercy, F. Qin, J. Quackenbush, S. Ranby, T. Reif, S. Rozen, C. Sanders, X. She, J. Silva, D. K. Slonim, C. Soderlund, W.-L. Sun, P. Tabar, T. Thangarajah, N. Vega-Czarny, D. Vollrath, S. Voyticky, T. Wilmer, X. Wu, M. D. Adams, C. Auffray, N. A. R. Walter, R. Brandon, A. Dehejia, P. N. Googfellow, R. Houlgatte, J. R. Hudson Jr., S. E. Ide, K. R. Iorio, W. Y. Lee, N. Seki, T. Nagase, K. Ishikawa, N. Nomura, C. Phillips, M. H. Polymeropoulos, M. Sandusky, K. Schmitt, R. Berry, K. Swanson, R. Torres, J. C. Venter, J. M. Sikela, J. S. Beckmann, J. Weissenbach, R. M. Myers, D. R.

- Cox, M. R. James, D. Bentley, P. Deloukas, E. S. Lander and T. J. Hudson (1996). A gene map of the human genome. *Science*, 274: 540-546.
- Shadel, G. S. and D. A. Clayton (1996). Mapping promoters in displacement-loop region of vertebrate mitochondrial DNA. *Methods in enzymology*, 264: 139-148.
- Shields, G. F. and J. R. Gust (1995). Lack of geographic structure in mitochondrial DNA sequences of Bering Sea walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 4(1): 69-82.
- Shoemaker, D. D. and K. G. Ross (1996). Effects of social organization on gene flow in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Nature*, 383: 613-616.
- Shulman, M. J. and E. Bermingham (1995). Early life histories, ocean currents, and the population genetics of Caribbean reef fishes. *Evolution*, 49(5): 897-910.
- Skúlason, S. and T. B. Smith (1995). Resource polymorphisms in vertebrates. *TREE*, 10(9): 366-370.
- Skúlason, S., S. S. Snorrason, D. L. G. Noakes and M. M. Ferguson (1996). Genetic basis of life history variations among sympatric morphs of Arctic char, *Salvelinus alpinus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 1807-1813.
- Sloane, R. D., (1984). Distribution and abundance of freshwater eels (*Anguilla* spp.) in Tasmania. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, 35: 463-470.
- Slobodyanyuk, S. Y., M. E. Pavlova and S. I. Belikov (1994). Analysis of tandem DNA repeats of cottoid fish in Lake Baikal by direct consensus sequencing. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 3(6): 301-306.
- Sourdis, J. and M. Nei (1988). Relative efficiencies of the maximum parsimony and distance-matrix methods in obtaining the correct phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.*, 5(3): 298-311.
- Southern, S. O., P. J. Southern and A. E. Dizon (1988). Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.*, 28: 32-42.
- Sperling, F. A. H. and R. G. Harrison (1994). Mitochondrial DNA variation within and between species of the *Papilio machaon* group of swallowtail butterflies. *Evolution*, 48(2): 408-422.
- Stewart, D. T. and A. J. Baker (1994). Patterns of sequence variation in the mitochondrial D-loop region of shrews. *Mol. Biol. Evol.*, 11(1): 9-21.
- Strecker, U., C. G. Meyer, C. Sturmbauer, and H. Wilkins (1996). Genetic divergence and speciation in an extremely young species flock in Mexico formed by the genus *Cyprinodon* (Cyprinodontidae, Teleostei). *Mol. Phyl. Evol.*, 6(1): 143-149.
- Strimmer, K. and A. von Haeseler (1996). Quartet puzzling: a quartet maximum-

- likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.*, 13(7): 964-969.
- Sturmbauer, C., E. Verheyen and A. Meyer (1994). Mitochondrial phylogeny of the Lamprologini, the major substrate spawning lineage of cichlid fishes from Lake Tanganyika in Eastern Africa. *Mol. Biol. Evol.*, 11(4): 691-703.
- Sverdrup, H. U., M. W. Johnson and R. H. Fleming (1942). The water masses and currents of the oceans. In *The oceans, their physics, chemistry, and general biology*, pp. 605-690. Prentice-Hall Inc., N. J.
- Swofford, D.L. (1993). PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, Ver. 3.1.1. Smith. Instit., Washington.
- Tabeta, O. and T. Takai (1973). An elver of *Anguilla japonica* found in the northern part of the South China Sea. *J. Shimonoseki Univ. Fish.*, 22(2): 49-53.
- Tabeta, O., K. Tanaka, J. Yamada and W.-N. Tzeng (1987). Aspects of the early life history of the Japanese eel *Anguilla japonica* determined from otolith microstructure. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53(10), 1727-1734.
- Tajima, F. (1989a). Stastical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Tajima, F. (1989b). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 597-601.
- Tajima, F. (1993). Measurement of DNA polymorphism. In: Mechanism of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology. Edited by Takahata, N. and Clark, A.G.. Tokyo. Sunderland, MA: Japan Scientific Societies Press. Sinauer, 37-59.
- Talbot, S. L. and G. F. Shields (1996). Phylogeography of brown bears (*Ursus arctos*) of Alaska and paraphyly within the Ursidae. *Mol. Phyl. Evol.*, 5(3): 477-494.
- Talbot, S. L. and G. F. Shields (1996). A phylogeny of the bears (Ursidae) inferred from complete sequences of three mitochondrial genes. *Mol. Phyl. Evol.*, 5(3): 567-575.
- Tanaka, S. (1975). Collection of leptocephali of the Japanese eel in waters south of the Okinawa islands. *Bull. Japanese Soci. Sci. Fisher.*, 41(2): 129-136.
- Tateno, Y. (1990). A method for molecular phylogeny construction by direct use of nucleotide sequence data. *J. Mol. Evol.*, 30: 85-93.
- Taylor, E. B. and P. Bentzen (1993). Molecular genetic evidence for reproductive isolation between sympatric populations of smelt *Osmerus* in Lake Utopia, south-western New Brunswick, Canada. *Mol. Ecol.*, 2: 345-357.
- Tomoda, H. and K. Tsukamoto (1996). Morphogenesis of the brain in larval and

- juvenile Japanese eels, *Anguilla japonica*. *Brain Behav. Evol.*, 47: 33-41.
- Travis, S. E., J. Maschinski and P. Keim (1996). An analysis of genetic variation in *Astragalus crennophylax* var. *crennophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Mol. Ecol.*, 5: 735-745.
- Tsukamoto, K. (1992). Discovery of the spawning area for Japanese eel. *Nature*, 356(6372): 789-791.
- 塚本 勝巳 (1994). ウナギー大回遊の成立. 後藤 晃・塚本 勝巳・前川 光司 編, 川と海を回遊する淡水魚, pp. 42-58. 東海大学出版会, 東京.
- 梅澤 彰馬 (1991). ウナギの初期生活史と接岸回遊機構に関する研究. 東京大学大学院農学系研究科博士論文, 173pp.
- Vigilant, L., M. Stoneking, H. Harpending, K. Hawkes and A. C. Wilson (1991). African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, 253: 1503-1507.
- Vogler, A. P. and R. DeSalle (1993). Phylogeographic patterns in coastal North American tiger beetles (*Cicindela dorsalis* Say) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, 47(4): 1192-1202.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijmans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Fritjers, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau (1995). AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res.* 23(21): 4407-4414.
- Wainscoat, J. S., A. V. S. Hill, A. L. Boyce, J. Flint, M. Hernandez, S. L. Thein, J. M. Old, J. R. Lynch, A. G. Falusi, D. J. Weatherall and J. B. Clegg (1986). Evolutionary relationships of human population from an analysis of nuclear DNA polymorphism. *Nature*, 319: 491-493.
- Wakeley, J. (1993). Substitution rate variation among sites in hypervariable region 1 of human mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 37: 613-623.
- Walker, D., V. J. Burke, I. Barak and J. C. Avise (1995). A comparison of mtDNA restriction sites vs. control region sequences in phylogeographic assessment of the musk turtle (*Sternotherus minor*). *Mol. Ecol.*, 4: 365-373.
- Wallace, A.R. (1876). The geographical distribution of animals. London, Macmillan, 2.
- Wang, J. Y., D. E. Gaskin and B. N. White (1996). Mitochondrial DNA analysis of harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, subpopulations in North American waters. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 1632-1645.
- Ward, R. H., B. L. Frazier, K. Dew-Jager and S. Pääbo (1991). Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8720-8724.

- Weber, M. and L. F. de Beaufort (1911-1951). The fishes of the Indo-Australian archipelago. Leiden. E. J. Brill, 9 vols.
- Weir, B. S. (1996). Genetic data analysis II. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, 445pp.
- William, J., O. Ballard and M. Kreitman (1995). Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *TREE*, 10(12): 485-488.
- Williams, S. T. and J. A. H. Benzie (1997). Indo-West Pacific patterns of genetic differentiation in the high-dispersal starfish *Linckia laevigata*. *Mol. Ecol.*, 6: 559-573.
- Wire, B.S. and C.C. Cockerham (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38: 1358-1370.
- Wolkinson, G. S., F. Mayer, G. Kerth and B. Petri (1997). Evolution of repeated sequence arrays in the D-loop region of bat mitochondrial DNA. *Genetics*, 146: 1035-1048.
- Wolstenholme, D. R. and K. W. Jeon (eds.) (1992). Mitochondrial genomes, International review of cytology/A survey of cell biology vol. 141. Academic Press, Inc., Lond., 377pp.
- Wu, C.-I. and W.-H. Li (1985). Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 1741-1745.
- Yang, Y.-J., Y.-S. Lin, J.-L. Wu and C.-F. Hui (1994). Variation in mitochondrial DNA and population structure of the Taipei treefrog *Rhacophorus taipeianus* in Taiwan. *Mol. Ecol.*, 3: 219-228.
- Yang, Z. (1994). Statistical properties of the maximum likelihood method of phylogenetic estimation and comparison with distance matrix methods. *Syst. Zool.*, 43(3): 329-342.
- Zabeau, M., and Vos, P. (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 92402629.7 (Publication number: 0 534 858 A1).
- Zardoya, R., A. Garrido-Pertierra and J. M. Bautista (1995). The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Mol. Evol.*, 41: 942-951.
- Zhang, D. X., J. M. Szymura and G. M. Hewitt (1995). Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 40: 382-391.
- Zhu, D., B. G. M. Jamieson, A. Hugall and C. Moritz (1994). Sequence evolution and phylogenetic signal in control-region and cytochrome b sequence of rainbow fishes (Melanotaeniidae). *Mol. Biol. Evol.*, 11(4): 672-683.

Zischler, H., H. Geisert, A. Haeseler and S. Pääbo (1995). A nuclear 'fossil' of the mitochondrial D-loop and the origin of modern humans. *Nature*, 378: 489-492.

付表・資料

- 付表1 オオウナギ標本の形態形質・・・・・・・・・・ I
- 付表2 オオウナギ種内に認められたAFLP法におけるバンドのサイズ・・・・・・・・・・ IV
- 付表3 ウナギ属魚類10種間に認められたAFLP法におけるバンドのサイズ・・・・・・・・・・ XI
- 付表4 ウナギ種内に認められたAFLP法におけるバンドのサイズ・・・・・・・・・・ XX
- 資料1 オオウナギ195個体の調節領域の塩基配列・・・・・・・・・・ XXI
- 資料2 オオウナギ15個体の16S領域の塩基配列・・・・・・・・・・ XLI
- 資料3 オオウナギ19個体のND2領域の塩基配列・・・・・・・・・・ XLII
- 資料4 ウナギ属魚類8種の調節領域の塩基配列・・・・・・・・・・ XLIV
- 資料5 ウナギ属魚類9種のND2領域の塩基配列・・・・・・・・・・ XLV
- 資料6 ウナギ17個体の調節領域の塩基配列・・・・・・・・・・ XLVI

付表1 オオウナギ標本の形態形質

付表1

Fish No.	Total length	PAL	PDL	HL	Tail length	Trunk length	VN	UJ	IJ	DEJ
FI-183	671.0	305.0	191.0	109.0	366.0	196.0		35.2	35.5	11.2
FI-184	554.0	248.0	147.0	90.0	306.0	158.0		28.4	29.2	7.8
FI-210	414.0	177.0	110.0	63.0	237.0	114.0	105	50.5	20.8	4.1
FI-211	433.0	198.0	120.0	72.0	235.0	126.0	105	24.0	24.6	7.3
FI-212	327.0	143.0	89.0	49.0	184.0	94.0	105	14.3	15.1	3.6
FI-213	547.0	241.0	151.0	86.0	306.0	155.0		25.4	27.4	6.9
FI-214	552.0	240.0	148.0	81.0	312.0	159.0	27.0	27.7	8.0	
FI-227	497.0	206.0	129.0	72.6	291.0	133.4			19.0	
EI-381	536.0	240.0	145.0	80.0	296.0	160.0		28.2	28.8	8.1
FI-382	354.0	130.0	92.0	49.0	224.0	81.0	105	15.2	16.1	3.3
FI-383	440.0	185.0	111.0	63.0	255.0	122.0	105	20.8	21.2	4.3
FI-384	401.0	173.0	104.0	57.0	228.0	116.0	106	19.8	20.3	4.6
FI-385	495.0	214.0	132.0	74.0	281.0	140.0	105	23.2	24.1	5.3
FI-386	437.0	186.0	111.0	65.0	251.0	121.0	105	21.2	22.2	5.5
FI-387	685.0	314.0	193.0	107.0	371.0	207.0		38.5	39.0	11.1
FI-388	582.0	263.0	158.0	98.0	319.0	165.0		32.5	33.8	8.9
FI-389	432.0	191.0	116.0	69.0	241.0	122.0	104	22.8	24.2	6.0
FI-390	513.0	226.0	135.0	78.0	287.0	148.0	106	25.0	25.9	5.6
FI-391	469.0	213.0	126.0	74.0	256.0	139.0	104	24.7	25.6	7.1
FI-392	487.0	221.0	128.0	73.0	266.0	148.0	100>	24.4	25.3	5.7
FI-393	475.0	207.0	126.0	75.0	268.0	132.0	106	25.3	26.3	6.0
FI-418	466.0	198.0	120.0	75.0	268.0	123.0				
FI-420	400.0	170.0	103.0	62.0	230.0	108.0				
FI-421	356.0	152.0	92.0	53.0	204.0	99.0				
FI-425	515.0	228.0	133.0	78.0	287.0	150.0				
IAN-242	455.0	205.0	133.0	66.0	250.0	139.0				
IAN-243	547.0	241.0	151.0	86.0	306.0	155.0		22.1	15.3	5.4
IAN-244	552.0	240.0	148.0	81.0	312.0	159.0		25.4	27.4	6.9
IAN-245	933.0	412.0	250.0	140.0	521.0	272.0	27.0	42.0	42.7	11.8
ISL-032	1069.0	508.0	300.0	152.0	561.0	356.0		44.9	47.0	10.1
ISL-054	308.0	130.0	85.0	48.0	178.0	82.0		16.0	16.7	3.9
ISL-055	358.0	155.0	96.0	55.0	203.0	100.0		18.2	18.7	4.4
ISL-056	320.0	138.0	89.0	48.0	182.0	90.0		15.5	15.8	3.9
ISL-058	353.0	152.0	96.0	53.0	201.0	99.0		17.2	17.9	4.5
ISL-060	446.0	198.0	125.0	70.0	248.0	128.0		23.9	24.6	6.5
ISL-061	385.0	180.0	109.0	62.0	205.0	118.0		19.3	19.9	5.1
ISL-062	433.0	192.0	119.0	69.0	241.0	123.0		24.2	24.8	6.3
ISL-065	379.0	163.0	107.0	60.0	216.0	103.0		21.6	23.0	6.0
ISL-066	361.0	154.0	98.0	51.0	207.0	103.0		19.0	19.6	5.6
ISL-067	312.0	134.0	83.0	50.0	178.0	84.0		16.4	17.1	4.5
ISL-472	515.0	230.0	136.0	70.5	285.0	159.5		22.1	23.0	6.3
ISL-473	288.0	124.0	78.0	43.5	164.0	80.5	104	14.5	15.3	2.9
ISL-499	301.0	122.0	78.0	44.0	179.0	78.0	102	13.1	13.5	2.8
ISL-501	450.0	204.0	127.0	67.0	246.0	137.0	105	22.0	22.9	6.4
ISL-502	494.0	220.0	143.0	74.0	274.0	146.0	104	24.9	24.9	7.5
ISL-503	461.0	200.0	121.0	67.0	261.0	133.0	105	20.7	20.7	6.2
ISL-507	468.0	213.0	137.0	74.0	255.0	139.0	104	24.9	25.7	6.8
ISL-508	231.0	96.0	62.0	34.0	135.0	62.0	106	8.6	9.2	1.5
ISU-97212	506.0	225.0	131.0	75.0	281.0	150.0	105	23.6	24.4	5.8
ISU-97219	472.0	207.0	124.0	72.0	265.0	135.0		22.6	23.1	5.3
ISU-97220	554.0	249.0	147.0	85.0	305.0	164.0		27.1	28.2	8.0
ISU-97222	869.0	391.0	240.0	130.0	478.0	261.0		40.6	40.6	13.0
ISU-97223	477.0	209.0	130.0	74.0	268.0	135.0		23.2	24.1	6.0
ISU-97225	567.0	225.0	148.0	74.0	292.0	151.0	105	22.6	23.5	6.1
ISU-97226	480.0	253.0	156.0	92.0	314.0	161.0		28.4	30.0	8.0
ISU-97227	507.0	208.0	132.0	72.0	272.0	136.0	105	22.2	23.0	5.0
ISU-97228	396.0	172.0	104.0	57.0	224.0	115.0	104	23.7	23.5	7.0
ISU-97229	507.0	221.0	144.0	75.0	286.0	146.0		18.2	18.5	4.8
KE-428	263.0	110.0	65.0	35.0	153.0	75.0	105	11.3	11.9	3.0
KE-429	496.0	213.0	133.0	74.0	283.0	139.0		25.2	26.4	6.4
KE-430	764.0	341.0	232.0	118.0	423.0	223.0		39.0	40.2	12.0
KE-431	393.0	169.0	103.0	58.0	224.0	111.0	103	21.4	21.6	6.2
KE-432	559.0	243.0	148.0	89.0	316.0	154.0		31.3	31.9	9.2
KE-433	352.0	151.0	96.0	51.0	201.0	100.0	104	16.6	17.0	4.4
KE-434	276.0	117.5	73.0	40.5	158.5	77.0	104	13.4	13.8	3.5
KE-435	296.0	127.0	78.0	45.0	169.0	82.0	105	15.1	15.6	3.8
KE-436	737.0	339.0	224.0	121.0	398.0	218.0		38.7	40.8	13.0
KE-437	261.0	111.0	70.0	37.0	150.0	74.0	103	11.4	11.8	2.6
KE-438	278.0	120.0	75.0	42.0	158.0	78.0	104	14.5	14.8	4.2
KE-439	329.0	144.0	87.0	48.0	185.0	96.0	105	16.3	17.4	4.6
KE-440	182.0	77.0	49.0	27.0	105.0	50.0	105	7.0	7.6	1.9
KE-441	412.0	176.0	109.0	58.0	236.0	118.0	103	18.8	19.7	4.5
KE-442	406.0	178.0	108.0	56.0	228.0					
KE-444	623.0	274.0	168.0	89.0	349.0	185.0		31.9	32.6	9.7
MAD-121	425.0	190.0	121.0	62.0	235.0	128.0		17.8	18.4	3.7

付表1

Fish No.	Total length	PAL	PDL	HL	Tail length	Trunk length	VN	UJ	IJ	DEJ
MAD-130	693.0	269.0	167.0	92.0	424.0	177.0		29.1	29.7	8.3
MAD-131	719.0	327.0	197.0	100.0	392.0	227.0		28.7	30.0	7.7
MAD-132	741.0	334.0	182.0	95.0	407.0	239.0		31.3	31.7	9.1
MAD-139	638.0	272.0	156.0	85.0	366.0	187.0		24.2	24.5	6.6
MAD-140	546.0	225.0	128.0	75.0	321.0	150.0		23.6	25.1	6.3
MAD-141	720.0	260.0	153.0	87.0	460.0	173.0		16.9	27.4	7.2
MAD-142	641.0	270.0	147.0	88.0	371.0	182.0		25.4	25.8	6.2
MAD-96501	488.0	209.0	119.0	68.0	279.0	141.0	105	19.0	19.9	3.8
MAD-96502	619.0	276.0	165.0	93.0	343.0	183.0		28.4	29.7	7.0
MAD-96504	363.0	157.0	93.0	55.0	206.0	102.0		16.2	17.0	3.7
MAD-96505	591.0	260.0	158.0	87.0	331.0	173.0		25.6	26.5	6.2
MAD-96506	609.0	274.0	170.0	95.0	335.0	179.0		27.9	29.1	7.0
MAD-96532	530.0	230.0	130.0	71.0	300.0	159.0		22.3	22.9	5.8
MAD-96533	653.0	299.0	162.0	95.0	364.0	194.0		31.1	32.0	9.6
MAD-96543	529.0	231.0	142.0	84.0	298.0	147.0	106	24.4	25.5	5.2
MAD-96544	447.0	192.0	115.0	64.0	255.0	126.0		20.3	21.1	5.1
MAD-96545	604.0	272.0	155.0	82.0	332.0	190.0				
MAD-96560	386.0	168.0	96.0	56.0	218.0	112.0	105	17.1	17.5	4.1
MAD-96560	519.0	221.0	131.0	68.0	298.0	153.0	105	22.3	23.0	5.9
MAD-96561	514.0	234.0	149.0	86.0	280.0	148.0	104	27.2	27.8	6.4
MAD-96562	490.0	221.0	132.0	78.0	269.0	143.0	104	24.8	25.5	6.8
MAD-96563	678.0	306.0	187.0	99.0	372.0	207.0		34.6	34.6	11.4
MAD-96564	689.0	304.0	188.0	93.0	385.0	211.0		33.5	34.6	7.8
MAD-96565	762.0	348.0	211.0	120.0	414.0	228.0		42.6	42.6	13.8
NBO-371	483.0	211.0	135.0	71.0	272.0	140.0	105	22.2	22.8	6.4
NBO-372	330.0	141.0	88.0	47.0	189.0	94.0	104	15.4	15.7	4.2
NBO-373	444.0	206.0	126.0	73.0	238.0	133.0	105	22.8	24.4	6.5
NBO-374	457.0	206.0	131.0	69.0	251.0	137.0		21.9	22.5	6.3
NBO-375	306.0	129.0	82.0	42.0	177.0	87.0	104	12.8	13.4	2.9
NBO-378	307.0	132.5	82.0	42.0	174.5	90.5	105	13.4	14.2	3.5
NBO-379	443.0	197.0	118.0	65.0	246.0	132.0		21.2	22.2	8.7
NC-97312	248.0	104.0	62.0	36.0	144.0	68.0		11.1	11.5	3.6
NC-97313	365.0	155.0	92.0	52.0	210.0	103.0		14.5	15.6	3.5
NC-97314	452.0	204.0	121.0	71.0	248.0	133.0		25.8	26.5	7.5
NC-97315	480.0	203.0	124.0	72.0	277.0	131.0		24.5	25.5	7.3
NC-97316	544.0	261.0	160.0	88.0	283.0	173.0		28.2	28.7	8.5
NC-97317	673.0	294.0	169.0	88.0	379.0	206.0		29.9	29.9	10.3
NC-97321	486.0	211.0	134.0	74.0	275.0	137.0		23.0	23.9	6.0
NC-97325	252.0	111.0	62.0	38.0	141.0	73.0	107	11.5	11.8	1.9
PNG-96301	434.0	194.0	114.0	68.0	240.0	126.0	106	22.9	23.2	6.3
PNG-96302	420.0	188.0	118.0	69.0	232.0	119.0	105	21.8	22.0	6.1
PNG-96303	534.0	236.0	191.0	79.0	298.0	157.0		26.8	27.5	9.6
PNG-96304	487.0	208.0	140.0	75.0	279.0	133.0		22.4	22.8	6.7
PNG-96305	376.0	170.0	114.0	59.0	206.0	111.0	105	20.1	18.9	5.6
PNG-96306	351.0	152.0	89.0	54.0	199.0	98.0	105	18.8	20.3	5.7
PNG-96307	456.0	209.0	128.0	73.0	247.0	136.0		23.2	23.9	6.9
PNG-96308	376.0	162.0	94.0	60.0	214.0	102.0	105	19.7	20.2	4.8
PNG-96309	257.0	110.0	68.0	39.0	147.0	71.0	105	12.8	13.6	2.8
PNG-96310	428.0	194.0	121.0	69.0	234.0	125.0	104	22.7	23.3	5.9
PNG-96311	455.0	200.0	130.0	75.0	255.0	125.0	106	23.7	24.2	7.4
PNG-96312	360.0	153.0	92.0	56.0	207.0	97.0	105	17.5	17.8	4.7
PNG-96313	495.0	215.0	127.0	76.0	280.0	139.0		25.9	26.0	8.7
PNG-96314	345.0	157.0	103.0	59.0	188.0	98.0	105	19.3	19.8	5.6
PNG-96315	455.0	201.0	128.0	77.0	254.0	124.0	106	25.2	25.7	7.4
PNG-96317	330.0	146.0	93.0	53.0	184.0	93.0	106	17.8	18.7	4.2
PNG-96318	270.0	116.0	72.0	43.0	154.0	73.0	105	15.4	16.0	3.4
PNG-96319	418.0	193.0	115.0	68.0	225.0	125.0	104	22.8	22.8	5.8
PNG-96321	328.5	145.5	90.0	52.0	183.0	93.5	105	17.2	17.8	4.1
PNG-96322	385.0	172.0	112.0	65.0	213.0	107.0	106	21.0	22.0	6.7
PNG-96323	371.0	166.0	105.0	61.0	205.0	105.0	107	19.5	19.7	5.2
PNG-96324	419.0	190.0	115.0	66.0	229.0	124.0	105	22.7	23.6	6.2
PNG-96327	399.0	172.0	103.0	56.0	227.0	116.0	106	18.8	20.2	4.6
PNG-96328	321.0	144.0	89.0	52.0	177.0	92.0	105	17.3	18.1	3.6
TA-96101	665.0	293.0	178.0	103.0	372.0	190.0		34.6	35.5	11.9
TA-96102	781.0	332.0	194.0	112.0	449.0	220.0		35.2	36.5	9.6
TA-96103	968.0	306.0	184.0	105.0	662.0	201.0		31.4	32.8	8.0
TA-96104	1177.0	542.0	326.0	93.0	635.0	449.0			78.0	
TA-96105	928.0	424.0	269.0	160.0	504.0	264.0		54.3	54.5	18.8
TA-96106	423.0	176.0	107.0	62.0	247.0	114.0	106	20.6	21.3	6.6
TA-96107	124.0	50.0	31.0	19.0	74.0	31.0				
TA-96108	233.0	99.0	61.0	34.0	134.0	65.0	107	12.3	12.7	2.7
TA-96109	193.0	75.0	48.0		118.0		107			
TA-96110	187.0	75.0	46.0	28.0	112.0	47.0	106	8.3	9.0	2.5
TA-96111	228.0	96.0	64.0	36.0	132.0	60.0	105	11.7	12.4	3.2
TA-96112	233.0	97.0	62.0		136.0		106			
TA-96114	346.0	148.0	87.0	52.0	198.0	96.0	105	18.9	19.4	5.6
TA-96115	487.0	209.0	128.0	71.0	278.0	138.0	105	23.5	23.8	6.9
TA-96116	346.0	148.0	91.0	53.0	198.0	95.0	107	17.6	18.3	5.4

付表 1

Fish No.	Total length	PAL	PDL	HL	Tail length	Trunk length	VN	UJ	LJ	DEJ
TA-96117	496.0	211.0	126.0	80.0	285.0	131.0	105	25.1	26.1	6.9
TA-96118	481.0	203.0	123.0	72.0	278.0	131.0	106	22.8	23.9	5.7
TA-96119	430.0	180.0	106.0	62.0	250.0	118.0	106	20.2	20.9	5.5
TA-96120	408.0	173.0	110.0	63.0	235.0	110.0	106	20.6	21.2	5.2
TA-96121	748.0	322.0	188.0	107.0	426.0	215.0		33.3	33.6	11.4
TA-96122	784.0	352.0	221.0	129.0	432.0	223.0		44.6	44.6	12.2
TA-96123	534.0	231.0	151.0	81.0	303.0	150.0		25.3	25.8	6.6
TA-96124	314.0	132.0	79.0	47.0	182.0	85.0	106	15.3	16.0	4.3
TA-96125	268.0	114.0	68.0	40.0	154.0	74.0		13.3	14.4	3.8
TA-96126	391.0	163.0	101.0	56.0	228.0	107.0	106	19.2	20.6	6.0
OG-01	802.0	361.0	222.0	117.0						
OG-02	1034.0	480.0	305.0	159.0						
OG-03	476.0	218.0	135.0	72.0						
OG-04	504.0	232.0	152.0	88.0						
OG-05	838.0	403.0	260.0	152.0						
OG-06	556.0	249.0	163.0	81.0						
OG-07	408.0	183.0	113.0	63.0						
OG-08	649.0	287.0	180.0	101.0						
OG-09	624.0	285.0	176.0	93.0						
OG-10	785.0	367.0	245.0	136.0						
OG-11	398.0	168.0	103.0	58.0						
OG-12	622.0	279.0	171.0	94.0						
OG-14	378.0	166.0	105.0	59.0						
OG-15	375.0	161.0	101.0	57.0						
OG-16	574.0	249.0	159.0	83.0						
OG-17	538.0	234.0	146.0	83.0						
OG-18	523.0	238.0	160.0	85.0						
OG-19	455.0	198.0	136.0	71.0						
OK-07	4.69						104			
OK-05	4.75						102			
OK-08	5.2						105			
OK-09	4.8						102			
OK-10	4.7						102			
OK-12	5.1						105			
OK-14	4.2						106			
OK-16	42.2						104			
OK-17	18.0						105			
OK-21	12.3						104			
OK-23	5.1						105			
OK-25	30.0						103			
OK-26	15.0						103			
OK-27	55.8						104			

PAL:Preanal length, PDL:Predorsal length, VN:Number of vertebrae,
 UJ:Length of upper jaw, LJ:Length of lower jaw, AD: Distance from
 DEJ:Distance from perpendicular thorough eye center on margin of upper jaw to angle of

付表2 オオウナギに認められたAFLP法によるバンドのサイズ

A) Eco R1-ACA/Mes 1-CAC

No.	median	difference	max	min	range
1	59.8	1.0	60.07	59.54	0.53
2	60.8	1.0	61.07	60.51	0.56
3	61.8	1.0	61.91	61.69	0.22
4	62.8	1.1	63.13	62.5	0.63
5	63.9	1.3	64.13	63.67	0.46
6	65.2	1.4	65.39	64.97	0.42
7	66.6	3.0	66.84	66.36	0.48
8	69.6	1.5	69.78	69.34	0.44
9	71.1	1.3	71.36	70.85	0.51
10	72.4	1.6	72.61	72.25	0.36
11	74.0	1.0	74.19	73.83	0.36
12	75.1	0.8	75.21	74.9	0.31
13	75.9	0.7	75.85	75.85	
14	76.6	1.1	76.72	76.39	0.33
15	77.6	0.5	77.67	77.55	0.12
16	78.2	1.4	78.32	77.98	0.34
17	79.5	2.4	79.52	79.52	
18	81.9	1.0	82.19	81.64	0.55
19	82.9	1.5	83.11	82.72	0.39
20	84.5	2.2	84.46	84.46	
21	86.7	2.5	86.85	86.53	0.32
22	89.2	0.7	89.37	89.04	0.33
23	89.9	1.3	90.03	89.73	0.3
24	91.2	1.3	91.44	90.99	0.45
25	92.6	0.9	92.86	92.27	0.59
26	93.5	1.3	93.55	93.42	0.13
27	94.8	1.4	95.09	94.45	0.64
28	96.2	0.9	96.51	95.88	0.63
29	97.1	1.0	97.3	96.86	0.44
30	98.1	1.2	98.42	97.76	0.66
31	99.3	1.2	99.42	99.2	0.22
32	100.5	2.6	100.71	100.22	0.49
33	103.1	0.9	103.23	102.87	0.36
34	104.0	0.8	104.16	103.75	0.41
35	104.8	2.1	104.9	104.66	0.24
36	106.9	0.8	107.08	106.64	0.44
37	107.6	1.0	107.86	107.4	0.46
38	108.6	1.4	108.85	108.36	0.49
39	110.0	1.9	110.28	109.7	0.58
40	111.8	1.2	112.09	111.6	0.49
41	113.1	1.0	113.24	112.9	0.34
42	114.0	1.0	114.23	113.84	0.39
43	115.0	0.7	115.25	114.75	0.5
44	115.7	1.5	115.71	115.66	0.05
45	117.2	1.3	117.6	116.83	0.77
46	118.5	1.4	118.47	118.47	
47	119.9	1.8	120.05	119.67	0.38
48	121.6	1.1	121.88	121.41	0.47
49	122.7	1.0	122.99	122.45	0.54
50	123.7	1.4	123.92	123.5	0.42
51	125.1	1.2	125.29	124.91	0.38
52	126.3	1.1	126.6	125.91	0.69
53	127.4	0.8	127.5	127.23	0.27
54	128.2	2.0	128.53	127.86	0.67
55	130.2	1.9	130.5	129.89	0.61
56	132.1	2.5	132.28	131.88	0.4
57	134.6	2.7	134.79	134.36	0.43
58	137.3	1.9	137.45	137.17	0.28
59	139.3	3.3	139.38	139.13	0.25
60	142.6	0.8	142.85	142.35	0.5
61	143.5	0.9	143.6	143.3	0.3
62	144.4	0.8	144.36	144.36	0
63	145.2	1.6	145.43	144.93	0.5
64	146.8	1.1	146.98	146.58	0.4
65	147.9	1.2	148.09	147.66	0.43
66	149.1	1.2	149.24	148.95	0.29
67	150.3	1.0	150.51	150	0.51
68	151.3	2.4	151.25	151.25	

付表2

69	153.6	1.5	153.93	153.31	0.62
70	155.1	2.0	155.21	155.02	0.19
71	157.1	1.1	157.34	156.82	0.52
72	158.2	1.0	158.43	157.96	0.47
73	159.2	0.8	159.39	158.98	0.41
74	159.9	0.9	160.24	159.64	0.6
75	160.9	1.0	161.16	160.59	0.57
76	161.9	1.1	162.2	161.6	0.6
77	163.0	1.2	163.35	162.71	0.64
78	164.2	1.8	164.56	163.82	0.74
79	165.9	2.4	166.23	165.65	0.58
80	168.4	1.8	168.76	167.98	0.78
81	170.2	0.9	170.37	169.94	0.43
82	171.1	1.2	171.39	170.75	0.64
83	172.3	1.3	172.56	172.04	0.52
84	173.7	2.1	173.86	173.44	0.42
85	175.7	1.3	175.71	175.71	
86	177.0	1.7	177.28	176.69	0.59
87	178.7	1.7	179.02	178.35	0.67
88	180.4	2.8	180.47	180.28	0.19
89	183.1	5.6	183.43	182.85	0.58
90	188.8	1.0	189.17	188.38	0.79
91	189.8	1.6	189.77	189.77	
92	191.4	2.4	191.64	191.07	0.57
93	193.7	0.8	193.91	193.52	0.39
94	194.5	0.8	194.52	194.52	
95	195.3	1.7	195.57	195.04	0.53
96	197.0	1.1	196.98	196.98	
97	198.1	1.6	198.3	197.94	0.36
98	199.8	1.9	200	199.52	0.48
99	201.6	3.6	201.71	201.54	0.17
100	205.3	1.0	205.25	205.25	
101	206.2	2.0	206.53	205.96	0.57
102	208.2	1.4	208.42	207.98	0.44
103	209.6	0.8	209.75	209.37	0.38
104	210.3	0.8	210.49	210.15	0.34
105	211.1	0.9	211.09	211.09	
106	212.0	0.8	212.29	211.71	0.58
107	212.8	1.5	212.83	212.83	
108	214.4	1.2	214.61	214.09	0.52
109	215.6	3.5	215.6	215.6	
110	219.1	1.0	219.11	219.11	
111	220.1	1.3	220.1	220.1	
112	221.4	1.9	221.59	221.14	0.45
113	223.3	5.4	223.51	223.1	0.41
114	228.8	1.3	228.89	228.61	0.28
115	230.1	5.0	230.4	229.75	0.65
116	235.1	2.7	235.07	235.07	
117	237.8	1.9	237.94	237.67	0.27
118	239.7	1.6	239.94	239.48	0.46
119	241.3	1.7	241.28	241.27	0.01
120	243.0	3.5	243.46	242.49	0.97
121	246.5	2.9	246.61	246.4	0.21
122	249.4	2.0	249.62	249.17	0.45
123	251.4	9.8	251.63	251.24	0.39
124	261.2	1.3	261.71	260.76	0.95
125	262.5	1.2	262.76	262.28	0.48
126	263.7	1.9	263.96	263.48	0.48
127	265.6	4.3	265.78	265.48	0.3
128	269.9	2.0	270.2	269.63	0.57
129	272.0	4.2	271.96	271.96	
130	276.2	0.8	276.38	276.01	0.37
131	277.0	2.7	277.04	277.04	
132	279.8	1.6	280.08	279.44	0.64
133	281.3	4.2	281.35	281.27	0.08
134	285.5	3.1	285.74	285.26	0.48
135	288.6	3.0	288.76	288.43	0.33
136	291.6	2.9	291.76	291.42	0.34
137	294.5	2.4	294.52	294.52	
138	296.9	2.6	297.3	296.5	0.8
139	299.5	1.7	299.87	299.19	0.68
140	301.3	1.1	301.6	300.92	0.68
141	302.4	1.7	302.4	302.4	
142	304.1	1.1	304.14	304.14	

付表2

143	305.2	1.1	305.2	305.2	
144	306.3	3.0	306.27	306.27	
145	309.3	8.3	309.53	309.02	0.51
146	317.6	10.5	317.75	317.42	0.33
147	328.0	0.9	328.36	327.72	0.64
148	328.9	4.4	329.11	328.74	0.37
149	333.3	1.8	333.49	333.08	0.41
150	335.1	2.3	335.06	335.06	
151	337.4	2.1	337.81	336.95	0.86
152	339.5	1.9	339.74	339.24	0.5
153	341.4	2.0	341.39	341.39	
154	343.4	1.9	343.87	342.83	1.04
155	345.3	4.5	345.55	344.96	0.59
156	349.8	8.1	350	349.57	0.43
157	357.8	2.2	358.13	357.56	0.57
158	360.1	9.7	360.53	359.65	0.88
159	369.8	4.5	369.75	369.75	
160	374.2	4.7	374.21	374.21	
161	378.9	2.9	379.34	378.53	0.81
162	381.8	2.1	381.82	381.82	
163	384.0	1.6	384.23	383.7	0.53
164	385.5	1.2	385.82	385.25	0.57
165	386.8	4.9	387.12	386.42	0.7
166	391.7	6.2	391.69	391.69	
167	397.9	5.1	397.9	397.87	0.03
168	403.0	7.2	403.58	402.48	1.1
169	410.2	2.2	410.62	409.74	0.88
170	412.4	2.5	412.71	412.03	0.68
171	414.9	1.3	415.07	414.68	0.39
172	416.2	3.0	416.5	415.85	0.65
173	419.1	0.8	419.42	418.86	0.56
174	419.9	3.0	420.13	419.68	0.45
175	422.9	3.2	422.88	422.88	
176	426.1	1.5	426.55	425.61	0.94
177	427.5	1.2	427.93	427.15	0.78
178	428.8	3.9	429.2	428.32	0.88
179	432.6	11.0	432.94	432.3	0.64
180	443.7		444.18	443.14	1.04

B) Eco R1-AAG/Mse 1-CAT

No.	median	difference	max	min	range
1	68.4	2.4	68.57	68.2	0.37
2	70.8	1.7	71.01	70.6	0.41
3	72.5	0.5	72.54	72.54	
4	73.1	0.9	73.11	73.05	0.06
5	74.0	1.7	74.19	73.83	0.36
6	75.7	1.4	75.75	75.64	0.11
7	77.1	1.2	77.14	76.98	0.16
8	78.3	2.3	78.45	78.09	0.36
9	80.6	1.0	80.76	80.43	0.33
10	81.6	1.8	81.82	81.44	0.38
11	83.4	1.2	83.76	83.02	0.74
12	84.5	1.6	84.74	84.35	0.39
13	86.1	1.5	86.36	85.84	0.52
14	87.6	1.7	87.94	87.2	0.74
15	89.3	1.2	89.46	89.15	0.31
16	90.5	0.6	90.77	90.19	0.58
17	91.1	1.1	91.1	91.1	
18	92.2	1.2	92.41	91.92	0.49
19	93.4	0.8	93.37	93.37	
20	94.1	1.3	94.4	93.89	0.51
21	95.5	1.8	95.84	95.06	0.78
22	97.2	1.2	97.52	96.93	0.59
23	98.4	1.3	98.76	98.05	0.71
24	99.7	0.9	99.89	99.53	0.36
25	100.6	1.4	100.63	100.63	
26	102.0	0.8	102.02	102.02	
27	102.8	1.5	103.06	102.54	0.52
28	104.3	3.2	104.61	103.99	0.62
29	107.5	1.0	107.86	107.16	0.7
30	108.5	0.9	108.49	108.49	
31	109.4	1.5	109.89	108.81	1.08
32	110.9	1.7	110.96	110.83	0.13

付表2

33	112.6	1.2	112.57	112.57	
34	113.7	1.1	113.99	113.5	0.49
35	114.8	1.1	115.04	114.61	0.43
36	115.9	0.9	116.21	115.66	0.55
37	116.9	4.7	117.08	116.62	0.46
38	121.6	1.1	121.88	121.24	0.64
39	122.7	1.8	122.85	122.5	0.35
40	124.5	1.1	124.79	124.2	0.59
41	125.6	1.2	125.63	125.63	
42	126.8	0.7	127.06	126.63	0.43
43	127.5	2.5	127.59	127.49	0.1
44	130.1	1.4	130.05	130.05	
45	131.5	1.0	131.68	131.28	0.4
46	132.5	1.7	132.72	132.33	0.39
47	134.2	1.4	134.33	134.15	0.18
48	135.6	2.1	135.84	135.38	0.46
49	137.7	1.1	137.68	137.68	
50	138.8	1.3	139	138.54	0.46
51	140.1	1.2	140.11	140.11	
52	141.4	2.5	141.35	141.35	
53	143.9	3.3	144.04	143.66	0.38
54	147.2	3.6	147.38	146.94	0.44
55	150.8	1.2	150.99	150.51	0.48
56	152.0	2.2	152.05	151.92	0.13
57	154.2	2.4	154.35	153.95	0.4
58	156.6	1.5	156.85	156.31	0.54
59	158.1	1.4	158.41	157.84	0.57
60	159.6	1.6	159.88	159.24	0.64
61	161.2	5.6	161.54	160.85	0.69
62	166.8	1.0	167.15	166.4	0.75
63	167.8	1.0	167.89	167.65	0.24
64	168.7	3.5	168.74	168.74	
65	172.2	1.2	172.53	171.92	0.61
66	173.4	0.7	173.65	173.17	0.48
67	174.1	1.0	174.18	174	0.18
68	175.1	1.9	175.29	174.86	0.43
69	176.9	2.0	177.24	176.65	0.59
70	179.0	2.2	179.24	178.72	0.52
71	181.2	2.0	181.51	180.81	0.7
72	183.1	1.4	183.43	182.85	0.58
73	184.5	0.9	184.84	184.25	0.59
74	185.5	4.4	185.66	185.27	0.39
75	189.8	10.0	190.18	189.51	0.67
76	199.9	3.9	199.89	199.89	
77	203.8	1.0	203.96	203.6	0.36
78	204.8	1.9	205.07	204.43	0.64
79	206.6	3.1	206.64	206.64	
80	209.7	3.7	210.01	209.4	0.61
81	213.5	1.3	213.76	213.14	0.62
82	214.8	10.8	214.93	214.58	0.35
83	225.6	2.1	225.58	225.58	
84	227.7	1.9	227.94	227.42	0.52
85	229.6	3.6	229.71	229.51	0.2
86	233.2	11.1	233.19	233.19	
87	244.3	1.9	244.35	244.19	0.16
88	246.2	2.0	246.38	245.98	0.4
89	248.2	6.7	248.19	248.12	0.07
90	254.9	3.1	255.13	254.59	0.54
91	257.9	2.1	257.93	257.93	
92	260.0	1.8	260.21	259.88	0.33
93	261.8	1.3	262.01	261.62	0.39
94	263.1	4.4	263.12	263.12	
95	267.5	8.3	267.61	267.39	0.22
96	275.8	8.4	276.01	275.67	0.34
97	284.3	5.2	284.45	284.08	0.37
98	289.4	4.2	289.67	289.19	0.48

付表 2

99	293.6	6.0	293.71	293.53	0.18
100	299.6	4.2	299.61	299.61	
101	303.8	1.4	304.15	303.46	0.69
102	305.2	12.8	305.51	304.82	0.69
103	318.0	3.8	318.18	317.74	0.44
104	321.8	1.1	322.25	321.35	0.9
105	322.9	2.0	322.89	322.89	
106	324.9	4.4	324.9	324.9	
107	329.3	1.6	329.38	329.14	0.24
108	330.9	1.3	330.97	330.74	0.23
109	332.2	16.4	332.19	332.19	
110	348.6	1.7	348.67	348.52	0.15
111	350.3	5.0	350.77	349.73	1.04
112	355.2	1.8	355.54	354.86	0.68
113	357.0	51.9	357.03	357.03	
114	408.9	11.6	409.18	408.65	0.53
115	420.6	5.3	420.87	420.24	0.63
116	425.8	1.8	426.3	425.35	0.95
117	427.6	16.5	427.88	427.33	0.55
118	444.1	1.0	444.55	443.67	0.88
119	445.2	1.5	445.18	445.14	0.04
120	446.7	2.0	447.24	446.16	1.08
121	448.7		448.96	448.52	0.44

C) Eco R1-AAC/Mse 1-CAT

	median	difference	max	min	range
1	53.2	2.9	53.61	52.78	0.83
2	56.1	2.0	56.47	55.81	0.66
3	58.2	4.1	58.49	57.82	0.67
4	62.3	3.1	62.25	62.25	
5	65.3	1.8	65.51	65.15	0.36
6	67.1	0.8	67.28	66.89	0.39
7	67.9	2.0	68.04	67.78	0.26
8	69.9	1.0	69.89	69.89	
9	70.9	1.0	71.24	70.58	0.66
10	71.9	0.8	72.05	71.73	0.32
11	72.7	0.5	72.78	72.56	0.22
12	73.2	0.8	73.2	73.2	
13	74.0	1.5	74.21	73.83	0.38
14	75.5	1.2	75.64	75.32	0.32
15	76.7	2.1	76.72	76.72	
16	78.8	1.2	78.77	78.77	
17	79.9	1.2	80.1	79.76	0.34
18	81.2	0.6	81.39	80.93	0.46
19	81.8	0.8	82	81.56	0.44
20	82.6	2.2	82.79	82.45	0.34
21	84.9	0.9	85.09	84.62	0.47
22	85.8	2.4	86.06	85.47	0.59
23	88.2	1.8	88.17	88.17	
24	90.0	2.2	90.22	89.82	0.4
25	92.2	0.6	92.43	92.03	0.4
26	92.8	4.6	93.07	92.61	0.46
27	97.4	1.8	97.39	97.39	
28	99.2	0.7	99.44	98.93	0.51
29	99.9	1.1	100.1	99.65	0.45
30	101.0	2.2	101.22	100.77	0.45
31	103.2	2.8	103.49	102.99	0.5
32	106.1	1.0	106.25	105.85	0.4
33	107.0	1.6	107.02	107.02	
34	108.6	1.2	108.73	108.43	0.3
35	109.8	0.8	109.94	109.6	0.34
36	110.6	1.1	110.58	110.58	
37	111.7	1.5	111.77	111.53	0.24
38	113.2	0.9	113.51	112.83	0.68
39	114.1	3.1	114.33	113.82	0.51
40	117.1	1.0	117.34	116.91	0.43

付表2

41	118.1	5.0	118.23	117.96	0.27
42	123.1	1.1	123.33	122.91	0.42
43	124.3	1.0	124.3	124.22	0.08
44	125.3	1.5	125.52	124.99	0.53
45	126.7	1.4	126.91	126.51	0.4
46	128.1	1.0	128.4	127.88	0.52
47	129.1	1.0	129.29	128.93	0.36
48	130.1	1.0	130.26	129.98	0.28
49	131.1	4.7	131.26	130.96	0.3
50	135.8	2.0	135.97	135.57	0.4
51	137.8	1.2	137.98	137.54	0.44
52	138.9	2.6	139.12	138.76	0.36
53	141.5	2.9	141.64	141.34	0.3
54	144.4	1.8	144.6	144.15	0.45
55	146.1	1.6	146.31	145.97	0.34
56	147.7	2.0	147.71	147.71	
57	149.7	1.2	149.87	149.47	0.4
58	150.8	4.5	150.88	150.77	0.11
59	155.4	1.2	155.52	155.22	0.3
60	156.5	1.1	156.85	156.23	0.62
61	157.6	2.2	157.82	157.37	0.45
62	159.8	2.7	160.12	159.49	0.63
63	162.6	0.8	162.55	162.55	
64	163.3	1.3	163.34	163.34	
65	164.7	2.8	164.96	164.39	0.57
66	167.4	4.2	167.62	167.24	0.38
67	171.7	0.8	171.87	171.47	0.4
68	172.4	1.3	172.68	172.17	0.51
69	173.8	1.5	173.77	173.77	
70	175.3	2.0	175.39	175.13	0.26
71	177.3	3.6	177.47	177.05	0.42
72	180.8	4.6	180.82	180.82	
73	185.4	3.6	185.75	185.1	0.65
74	189.0	1.3	189.28	188.72	0.56
75	190.3	2.3	190.28	190.28	
76	192.6	3.6	192.62	192.59	0.03
77	196.2	1.3	196.4	196.01	0.39
78	197.5	2.4	197.51	197.51	
79	199.9	2.9	200.12	199.64	0.48
80	202.8	1.2	203.08	202.49	0.59
81	204.0	2.1	204.12	203.85	0.27
82	206.1	0.9	206.24	205.92	0.32
83	207.0	1.4	207.2	206.84	0.36
84	208.4	1.5	208.54	208.21	0.33
85	209.9	6.8	210.25	209.48	0.77
86	216.6	1.8	216.78	216.45	0.33
87	218.4	2.7	218.61	218.24	0.37
88	221.2	1.0	221.16	221.16	
89	222.1	3.8	222.31	221.96	0.35
90	225.9	0.8	225.89	225.89	
91	226.7	2.6	226.69	226.69	0
92	229.2	0.8	229.53	228.95	0.58
93	230.1	2.4	230.19	229.99	0.2
94	232.5	0.8	232.54	232.54	
95	233.3	8.3	233.55	233.12	0.43
96	241.7	1.8	241.65	241.65	
97	243.5	1.3	243.65	243.35	0.3
98	244.8	3.4	244.95	244.57	0.38
99	248.2	0.8	248.15	248.15	
100	249.0	8.2	249.18	248.74	0.44
101	257.1	4.4	257.14	257.14	
102	261.5	8.1	261.65	261.34	0.31
103	269.6	1.1	269.69	269.5	0.19
104	270.7	1.6	271.02	270.44	0.58
105	272.3	1.3	272.32	272.32	
106	273.6	3.0	273.63	273.63	

付表2

107	276.7	0.9	276.89	276.46	0.43
108	277.6	1.9	277.76	277.44	0.32
109	279.5	1.6	279.84	279.12	0.72
110	281.1	4.5	281.35	280.9	0.45
111	285.7	2.4	285.79	285.53	0.26
112	288.1	4.4	288.1	288.1	
113	292.5	3.0	292.83	292.08	0.75
114	295.5	2.2	295.72	295.23	0.49
115	297.6	2.2	297.99	297.27	0.72
116	299.9	1.7	299.87	299.87	
117	301.6	2.7	301.95	301.19	0.76
118	304.3	1.2	304.49	304.14	0.35
119	305.5	1.4	305.77	305.2	0.57
120	306.9	3.4	307.18	306.54	0.64
121	310.2	9.6	310.24	310.24	
122	319.9	7.9	319.88	319.88	
123	327.7	2.7	327.74	327.74	
124	330.4	0.8	330.63	330.22	0.41
125	331.2	1.9	331.39	331.1	0.29
126	333.2	4.5	333.54	332.83	0.71
127	337.7	1.8	337.68	337.68	
128	339.5	1.5	339.62	339.32	0.3
129	340.9	14.0	341.16	340.73	0.43
130	355.0	1.1	355.5	354.41	1.09
131	356.1	0.9	356.25	355.96	0.29
132	357.0	1.4	357.01	357.01	
133	358.4	6.8	358.72	358.06	0.66
134	365.2	6.7	365.49	364.86	0.63
135	371.9	1.3	372.25	371.46	0.79
136	373.1	2.8	373.67	372.61	1.06
137	375.9	19.9	376.45	375.43	1.02
138	395.8	11.1	395.84	395.84	
139	406.9	1.0	406.9	406.9	
140	407.9	1.4	407.87	407.87	
141	409.3	1.2	409.66	408.84	0.82
142	410.4	13.3	410.41	410.41	
143	423.8	11.8	423.75	423.75	
144	435.5	10.1	435.72	435.34	0.38
145	445.6		445.59	445.59	

付表 3 ウナギ属魚類10種間に認められたAFLP法によるバンドのサイズ

A) Eco R1-ACA/Mse 1-CAC

	mode	difference	range	max	min
1	50.7	6.17	0.43	50.94	50.51
2	56.9	1.12	0.41	57.1	56.69
3	58.0	4.74	0.65	58.34	57.69
4	62.8	1.24	0.50	63	62.5
5	64.0	1.43	0.21	64.09	63.88
6	65.4	1.27	0.58	65.71	65.13
7	66.7	3.80	0.57	66.97	66.4
8	70.5	0.88	0.10	70.53	70.43
9	71.4	1.01	0.53	71.63	71.1
10	72.4	1.76	0.48	72.61	72.13
11	74.1	0.92	0.33	74.3	73.97
12	75.1	0.94	0.53	75.32	74.79
13	76.0	0.64	0.33	76.16	75.83
14	76.6	1.42	0.32	76.8	76.48
15	78.1	1.33	0.42	78.27	77.85
16	79.4	1.09	0.09	79.43	79.34
17	80.5	1.95	0.21	80.58	80.37
18	82.4	0.52	0.09	82.47	82.38
19	82.9	1.77	0.19	83.04	82.85
20	84.7	0.37	0.00	84.71	84.71
21	85.1	1.08	0.00	85.08	85.08
22	86.2	0.65	0.00	86.16	86.16
23	86.8	0.43	0.33	86.97	86.64
24	87.2	0.63	0.00	87.34	87.24
25	87.9	3.40	0.11	87.92	87.81
26	91.3	1.73	0.34	91.44	91.1
27	93.0	2.08	1.07	93.53	92.46
28	95.1	2.98	0.11	95.13	95.02
29	98.1	2.32	0.04	98.07	98.03
30	100.4	0.70	0.51	100.62	100.11
31	101.1	0.64	0.16	101.15	100.99
32	101.7	1.23	0.33	101.87	101.54
33	102.9	0.93	0.36	103.12	102.76
34	103.9	2.18	0.39	104.06	103.67
35	106.1	0.86	0.78	106.44	105.66
36	106.9	0.81	0.16	106.99	106.83
37	107.7	0.93	0.06	107.75	107.69
38	108.7	1.58	0.40	108.85	108.45
39	110.2	0.49	0.00	110.23	110.23
40	110.7	1.12	0.09	110.77	110.68
41	111.8	1.09	0.47	112.08	111.61
42	112.9	0.41	0.01	112.94	112.93
43	113.4	0.57	0.00	113.35	113.35
44	113.9	3.17	0.00	113.92	113.92
45	117.1	1.85	0.56	117.37	116.81
46	118.9	0.93	0.31	119.1	118.79
47	119.9	1.60	0.75	120.25	119.5
48	121.5	1.24	0.63	121.79	121.16
49	122.7	1.32	0.33	122.88	122.55
50	124.0	1.07	0.76	124.41	123.65
51	125.1	0.77	0.59	125.39	124.8
52	125.9	0.55	0.00	125.86	125.86
53	126.4	0.61	0.09	126.45	126.36
54	127.0	1.11	0.00	127.01	127.01
55	128.1	1.87	0.49	128.37	127.88
56	130.0	0.97	0.77	130.38	129.61
57	131.0	1.16	0.03	130.98	130.95
58	132.1	1.34	0.00	132.12	132.12
59	133.5	1.06	0.09	133.51	133.42
60	134.5	1.04	0.32	134.68	134.36
61	135.6	2.16	0.42	135.77	135.35
62	137.7	1.54	0.71	138.07	137.36
63	139.3	2.19	0.26	139.38	139.12
64	141.4	1.26	0.41	141.64	141.23
65	142.7	1.07	0.44	142.91	142.47
66	143.8	1.59	0.81	144.16	143.35
67	145.3	1.62	0.52	145.6	145.08
68	147.0	1.01	0.54	147.23	146.69

附表 3

69	148.0	1.20	0.28	148.11	147.83
70	149.2	2.01	0.37	149.36	148.99
71	151.2	1.59	0.13	151.25	151.12
72	152.8	0.75	0.12	152.83	152.71
73	153.5	0.89	0.16	153.6	153.44
74	154.4	0.74	0.00	154.41	154.41
75	155.2	1.91	0.00	155.15	155.15
76	157.1	2.15	0.23	157.18	156.95
77	159.2	0.90	0.11	159.27	159.16
78	160.1	1.94	0.72	160.47	159.75
79	162.1	0.70	0.53	162.32	161.79
80	162.8	1.50	0.35	162.93	162.58
81	164.3	2.82	0.87	164.69	163.82
82	167.1	0.69	0.00	167.07	167.07
83	167.8	0.76	0.00	167.76	167.76
84	168.5	1.07	0.80	168.92	168.12
85	169.6	0.77	0.00	169.59	169.59
86	170.4	1.91	0.79	170.75	169.96
87	172.3	1.11	0.46	172.5	172.04
88	173.4	1.03	0.17	173.46	173.29
89	174.4	0.57	0.32	174.56	174.24
90	175.0	0.39	0.00	174.97	174.97
91	175.4	0.96	0.00	175.36	175.36
92	176.3	0.91	0.00	176.32	176.32
93	177.2	1.59	0.51	177.48	176.97
94	178.8	1.30	0.63	179.13	178.5
95	180.1	1.07	0.58	180.4	179.82
96	181.2	1.96	0.23	181.29	181.06
97	183.1	0.78	0.45	183.36	182.91
98	183.9	3.24	0.00	183.92	183.92
99	187.2	1.70	0.00	187.16	187.16
100	188.9	1.15	0.36	189.04	188.68
101	190.0	1.19	0.12	190.07	189.95
102	191.2	2.18	0.67	191.54	190.87
103	193.4	0.82	0.06	193.41	193.35
104	194.2	1.14	0.00	194.2	194.2
105	195.3	1.79	0.60	195.64	195.04
106	197.1	1.07	0.34	197.3	196.96
107	198.2	1.52	0.34	198.37	198.03
108	199.7	0.98	0.57	200	199.43
109	200.7	0.52	0.00	200.7	200.7
110	201.2	0.66	0.31	201.37	201.06
111	201.9	1.50	0.00	201.88	201.88
112	203.4	0.80	0.00	203.38	203.38
113	204.2	1.79	0.15	204.25	204.1
114	206.0	1.07	0.62	206.27	205.65
115	207.0	1.15	0.38	207.22	206.84
116	208.2	1.42	0.18	208.27	208.09
117	209.6	0.63	0.00	209.6	209.6
118	210.2	1.94	0.00	210.23	210.23
119	212.2	0.87	0.44	212.39	211.95
120	213.0	0.83	0.01	213.04	213.03
121	213.9	0.56	0.00	213.86	213.86
122	214.4	5.00	0.28	214.56	214.28
123	219.4	2.04	0.35	219.59	219.24
124	221.5	1.73	0.68	221.8	221.12
125	223.2	2.88	0.48	223.43	222.95
126	226.1	2.44	0.11	226.13	226.02
127	228.5	1.25	0.41	228.72	228.31
128	229.8	0.68	0.00	229.76	229.76
129	230.4	7.20	0.07	230.47	230.4
130	237.6	2.10	0.89	238.08	237.19
131	239.7	2.72	0.37	239.92	239.55
132	242.5	0.98	0.00	242.46	242.46
133	243.4	4.39	0.55	243.72	243.17
134	247.8	1.78	0.97	248.32	247.35
135	249.6	1.79	0.70	249.96	249.26
136	251.4	0.69	0.40	251.6	251.2
137	252.1	4.35	0.08	252.13	252.05
138	256.4	2.83	0.00	256.44	256.44
139	259.3	1.34	0.00	259.27	259.27
140	260.6	2.02	0.05	260.63	260.58
141	262.6	0.97	0.23	262.74	262.51
142	263.6	1.13	0.52	263.85	263.33

付表3

143	264.7	3.02	0.34	264.89	264.55
144	267.7	1.14	0.49	267.99	267.5
145	268.9	1.23	0.50	269.14	268.64
146	270.1	0.78	0.26	270.25	269.99
147	270.9	2.31	0.24	271.02	270.78
148	273.2	5.06	0.00	273.21	273.21
149	278.3	0.75	0.05	278.29	278.24
150	279.0	1.21	0.00	279.02	279.02
151	280.2	0.96	0.00	280.23	280.23
152	281.2	1.93	0.00	281.19	281.19
153	283.1	1.48	0.00	283.12	283.12
154	284.6	3.85	0.12	284.66	284.54
155	288.5	3.08	1.00	288.95	287.95
156	291.5	1.92	0.00	291.53	291.53
157	293.5	1.53	0.00	293.45	293.45
158	295.0	0.65	0.00	294.98	294.98
159	295.6	0.61	0.00	295.63	295.63
160	296.2	1.30	0.00	296.24	296.24
161	297.5	0.65	0.00	297.54	297.54
162	298.2	1.35	0.00	298.19	298.19
163	299.5	0.85	0.40	299.74	299.34
164	300.4	1.49	0.00	300.39	300.39
165	301.9	4.81	0.41	302.08	301.67
166	306.7	1.46	0.00	306.68	306.68
167	308.1	1.18	0.00	308.14	308.14
168	309.3	5.31	0.53	309.58	309.05
169	314.6	2.20	0.00	314.62	314.62
170	316.8	1.64	0.00	316.82	316.82
171	318.5	4.85	0.00	318.46	318.46
172	323.3	3.76	0.00	323.31	323.31
173	327.1	1.27	0.00	327.07	327.07
174	328.3	0.82	0.17	328.42	328.25
175	329.2	1.00	0.44	329.38	328.94
176	330.2	2.54	0.31	330.31	330
177	332.7	0.94	0.00	332.69	332.69
178	333.6	1.55	0.00	333.63	333.63
179	335.2	1.42	0.92	335.64	334.72
180	336.6	0.91	0.18	336.69	336.51
181	337.5	2.23	0.00	337.51	337.51
182	339.7	1.77	0.43	339.95	339.52
183	341.5	0.82	0.00	341.51	341.51
184	342.3	7.40	0.00	342.33	342.33
185	349.7	2.25	0.54	350	349.46
186	352.0	3.49	0.00	351.98	351.98
187	355.5	2.88	0.00	355.47	355.47
188	358.4	1.34	0.10	358.4	358.3
189	359.7	6.82	1.28	360.33	359.05
190	366.5	12.16	0.00	366.51	366.51
191	378.7	5.20	0.25	378.79	378.54
192	383.9	2.07	0.00	383.87	383.87
193	385.9	5.77	0.95	386.41	385.46
194	391.7	4.89	0.00	391.71	391.71
195	396.6	2.48	0.00	396.6	396.6
196	399.1	0.92	0.00	399.08	399.08
197	400.0	3.05	0.00	400	400
198	403.1	5.03	0.00	403.05	403.05
199	408.1	1.78	0.00	408.08	408.08
200	409.9	2.01	0.00	409.86	409.86
201	411.9	1.26	0.00	411.87	411.87
202	413.1	3.43	0.00	413.13	413.13
203	416.6	2.84	0.00	416.56	416.56
204	419.4	5.25	0.00	419.4	419.4
205	424.7	1.50	0.00	424.65	424.65
206	426.2	1.32	0.00	426.15	426.15
207	427.5	5.07	0.00	427.47	427.47
208	432.5	7.19	0.00	432.54	432.54
209	439.7	3.91	0.00	439.73	439.73
210	443.6	-	0.52	443.9	443.38

B) Eco R1-AAG/Mse 1-CAT

	median	difference	range	max	min
1	40.1	0.71	0.36	40.27	39.91
2	40.8	0.95	0.13	40.87	40.74
3	41.8	0.99	0.00	41.76	41.76

付表3

4	42.8	0.94	0.32	42.91	42.59
5	43.7	1.25	0.82	44.10	43.28
6	44.9	1.36	0.84	45.36	44.52
7	46.3	0.97	0.74	46.67	45.93
8	47.3	1.53	0.00	47.27	47.27
9	48.8	3.20	1.26	49.43	48.17
10	52.0	0.95	0.36	52.18	51.82
11	53.0	1.20	0.63	53.27	52.64
12	54.2	0.90	0.86	54.58	53.72
13	55.1	0.74	0.00	55.05	55.05
14	55.8	1.05	0.14	55.86	55.72
15	56.8	0.89	0.66	57.17	56.51
16	57.7	1.39	0.62	58.04	57.42
17	59.1	0.71	0.11	59.17	59.06
18	59.8	3.01	0.31	59.98	59.67
19	62.8	0.81	0.25	62.96	62.71
20	63.6	0.95	0.36	63.82	63.46
21	64.6	0.89	0.45	64.82	64.37
22	65.5	2.83	0.00	65.48	65.48
23	68.3	2.51	0.27	68.44	68.17
24	70.8	1.05	0.60	71.12	70.52
25	71.9	2.41	0.73	72.23	71.50
26	74.3	1.21	0.85	74.70	73.85
27	75.5	2.81	0.29	75.63	75.34
28	78.3	0.98	0.19	78.39	78.20
29	79.3	1.40	0.32	79.44	79.12
30	80.7	1.26	0.19	80.77	80.58
31	81.9	1.31	0.00	81.93	81.93
32	83.2	1.16	1.12	83.80	82.68
33	84.4	1.70	0.28	84.54	84.26
34	86.1	1.54	0.33	86.27	85.94
35	87.6	0.99	0.57	87.93	87.36
36	88.6	1.81	0.17	88.72	88.55
37	90.4	2.08	0.88	90.88	90.00
38	92.5	1.49	0.80	92.92	92.12
39	94.0	1.43	0.47	94.25	93.78
40	95.4	8.98	0.15	95.52	95.37
41	104.4	1.67	0.44	104.64	104.20
42	106.1	1.61	0.87	106.52	105.65
43	107.7	1.70	0.85	108.12	107.27
44	109.4	2.53	1.20	109.99	108.79
45	111.9	0.77	0.58	112.21	111.63
46	112.7	1.02	0.16	112.77	112.61
47	113.7	1.12	0.32	113.87	113.55
48	114.8	3.41	0.28	114.97	114.69
49	118.2	0.92	0.00	118.24	118.24
50	119.2	0.56	0.00	119.16	119.16
51	119.7	1.86	0.39	119.92	119.53
52	121.6	0.97	0.32	121.74	121.42
53	122.6	1.51	0.26	122.68	122.42
54	124.1	1.61	0.98	124.55	123.57
55	125.7	1.39	0.32	125.83	125.51
56	127.1	2.16	0.60	127.36	126.76
57	129.2	1.16	0.30	129.37	129.07
58	130.4	1.18	0.39	130.58	130.19
59	131.6	0.91	0.35	131.74	131.39
60	132.5	1.04	0.32	132.63	132.31
61	133.5	1.19	0.49	133.76	133.27
62	134.7	1.00	0.81	135.11	134.30
63	135.7	1.23	0.27	135.84	135.57
64	136.9	1.66	0.02	136.94	136.92
65	138.6	1.57	0.81	139.00	138.19
66	140.2	2.86	0.21	140.27	140.06
67	143.0	0.69	0.00	143.03	143.03
68	143.7	0.63	0.37	143.90	143.53
69	144.4	0.89	0.00	144.35	144.35
70	145.2	0.78	0.32	145.40	145.08

付表3

71	146.0	1.34	0.42	146.23	145.81
72	147.4	3.64	0.51	147.61	147.10
73	151.0	1.66	0.73	151.36	150.63
74	152.7	1.29	0.86	153.08	152.22
75	153.9	1.47	0.42	154.15	153.73
76	155.4	1.14	0.24	155.53	155.29
77	156.6	1.59	0.36	156.73	156.37
78	158.1	2.69	0.34	158.31	157.97
79	160.8	0.81	0.68	161.17	160.49
80	161.6	2.19	0.01	161.64	161.63
81	163.8	3.90	0.00	163.82	163.82
82	167.7	3.38	0.00	167.72	167.72
83	171.1	1.19	0.24	171.22	170.98
84	172.3	1.58	0.08	172.33	172.25
85	173.9	1.16	0.25	174.00	173.75
86	175.0	0.92	0.00	175.04	175.04
87	176.0	0.81	0.40	176.16	175.76
88	176.8	6.44	0.40	176.97	176.57
89	183.2	1.40	0.42	183.42	183.00
90	184.6	1.53	0.23	184.72	184.49
91	186.1	0.87	0.53	186.40	185.87
92	187.0	1.20	0.00	187.00	187.00
93	188.2	1.43	0.10	188.25	188.15
94	189.6	5.55	0.72	189.99	189.27
95	195.2	4.48	1.25	195.80	194.55
96	199.7	1.22	0.00	199.66	199.66
97	200.9	0.86	0.10	200.93	200.83
98	201.7	1.06	0.00	201.74	201.74
99	202.8	3.14	0.40	203.00	202.60
100	205.9	5.28	0.00	205.94	205.94
101	211.2	0.66	0.00	211.22	211.22
102	211.9	1.07	0.31	212.04	211.73
103	213.0	1.52	0.18	213.04	212.86
104	214.5	1.87	0.74	214.84	214.10
105	216.3	5.50	0.00	216.34	216.34
106	221.8	2.69	0.00	221.84	221.84
107	224.5	3.17	0.81	224.94	224.13
108	227.7	0.97	0.10	227.76	227.66
109	228.7	11.84	0.00	228.68	228.68
110	240.5	4.85	0.00	240.52	240.52
111	245.4	1.05	0.00	245.37	245.37
112	246.4	0.78	0.56	246.70	246.14
113	247.2	0.99	0.27	247.34	247.07
114	248.2	1.08	0.31	248.35	248.04
115	249.3	4.61	0.00	249.27	249.27
116	253.9	0.97	0.11	253.94	253.83
117	254.9	0.99	0.41	255.06	254.65
118	255.9	1.08	0.00	255.85	255.85
119	256.9	0.88	0.09	256.97	256.88
120	257.8	1.31	0.00	257.81	257.81
121	259.1	0.94	0.00	259.12	259.12
122	260.1	2.58	0.17	260.15	259.98
123	262.7	4.98	0.42	262.86	262.44
124	267.6	8.17	0.24	267.75	267.51
125	275.8	0.98	0.57	276.09	275.52
126	276.8	0.74	0.15	276.86	276.71
127	277.5	2.85	0.47	277.76	277.29
128	280.4	2.06	0.29	280.52	280.23
129	282.4	0.81	0.39	282.63	282.24
130	283.2	1.15	0.00	283.24	283.24
131	284.4	2.54	0.38	284.58	284.20
132	286.9	2.82	0.00	286.93	286.93
133	289.8	0.86	0.42	289.96	289.54
134	290.6	5.05	0.00	290.61	290.61
135	295.7	2.86	0.00	295.66	295.66
136	298.5	2.13	0.91	298.98	298.07
137	300.7	2.96	0.00	300.65	300.65

付表3

138	303.6	1.56	0.63	303.92	303.29
139	305.2	1.79	0.42	305.38	304.96
140	307.0	1.48	0.28	307.10	306.82
141	308.4	1.50	0.00	308.44	308.44
142	309.9	2.31	0.14	310.01	309.87
143	312.3	2.25	0.20	312.35	312.15
144	314.5	1.28	0.00	314.50	314.50
145	315.8	2.68	0.59	316.08	315.49
146	318.5	3.06	1.03	318.98	317.95
147	321.5	1.26	0.88	321.97	321.09
148	322.8	6.16	0.00	322.79	322.79
149	329.0	6.25	0.00	328.95	328.95
150	335.2	8.85	0.10	335.25	335.15
151	344.1	2.56	0.00	344.05	344.05
152	346.6	1.83	0.18	346.70	346.52
153	348.4	1.03	0.00	348.44	348.44
154	349.5	0.92	0.26	349.60	349.34
155	350.4	4.82	0.51	350.65	350.14
156	355.2	1.03	0.53	355.48	354.95
157	356.3	8.79	0.26	356.38	356.12
158	365.0	18.11	0.26	365.17	364.91
159	383.1	2.04	0.41	383.35	382.94
160	385.2	25.71	0.00	385.18	385.18
161	410.9	9.52	0.00	410.89	410.89
162	420.4	7.35	0.71	420.77	420.06
163	427.8	18.90	0.00	427.76	427.76
164	446.7		0.00	446.66	446.66

C) Eco R1-AAC/Mse 1-CAT

	median	difference	range	max	min
1	42.5	1.5	0.74	42.87	42.13
2	44.0	1.0	0.5	44.23	43.73
3	45.0	0.9	0.57	45.27	44.7
4	45.9	1.6	0.47	46.1	45.63
5	47.5	1.8	1.18	48.06	46.88
6	49.3	1.4	0.95	49.73	48.78
7	50.6	1.0	0.51	50.86	50.35
8	51.6	1.7	0.7	51.95	51.25
9	53.3	2.1	0.37	53.45	53.08
10	55.3	1.1	0.72	55.68	54.96
11	56.5	1.7	0.83	56.88	56.05
12	58.2	0.8	0.3	58.36	58.06
13	59.0	1.9	0.52	59.29	58.77
14	61.0	1.2	1.03	61.47	60.44
15	62.2	2.1	0.27	62.31	62.04
16	64.3	0.8	0	64.32	64.32
17	65.1	1.3	0.32	65.23	64.91
18	66.3	0.8	0.28	66.47	66.19
19	67.1	0.7	0.22	67.2	66.98
20	67.8	2.2	0.34	68	67.66
21	70.0	2.7	0.14	70.07	69.93
22	72.7	1.2	0.07	72.74	72.67
23	73.9	1.1	0.62	74.21	73.59
24	75.0	1.0	0.82	75.42	74.6
25	76.0	0.9	0.41	76.25	75.84
26	76.9	1.6	0.32	77.1	76.78
27	78.5	0.6	0.07	78.55	78.48
28	79.2	0.8	0.11	79.22	79.11
29	80.0	1.2	0.28	80.13	79.85
30	81.2	0.6	0.23	81.29	81.06
31	81.8	0.8	0.4	81.97	81.57
32	82.6	2.3	0.26	82.68	82.42
33	84.9	0.9	0.19	84.95	84.76
34	85.8	1.3	0.6	86.1	85.5
35	87.1	1.7	0.61	87.37	86.76
36	88.7	1.2	0	88.74	88.74

付表3

37	89.9	0.8	0.59	90.23	89.64
38	90.8	1.5	0.03	90.77	90.74
39	92.3	0.8	0.09	92.31	92.22
40	93.1	2.8	0.53	93.33	92.8
41	95.9	0.9	0.22	95.96	95.74
42	96.8	1.1	0.1	96.82	96.72
43	97.9	1.6	0	97.85	97.85
44	99.4	0.7	0.47	99.66	99.19
45	100.2	0.7	0.1	100.21	100.11
46	100.9	0.7	0.53	101.16	100.63
47	101.6	0.9	0	101.57	101.57
48	102.4	0.9	0.38	102.62	102.24
49	103.3	2.8	0.42	103.51	103.09
50	106.1	3.2	0.11	106.11	106
51	109.3	2.5	0	109.25	109.25
52	111.7	1.3	0.41	111.95	111.54
53	113.0	0.9	0.12	113.08	112.96
54	114.0	1.6	0.36	114.14	113.78
55	115.5	0.9	0.07	115.58	115.51
56	116.4	0.8	0	116.41	116.41
57	117.2	1.1	0.44	117.43	116.99
58	118.3	1.0	0.25	118.42	118.17
59	119.3	1.8	0	119.27	119.27
60	121.0	1.1	0.19	121.13	120.94
61	122.1	0.9	0.45	122.35	121.9
62	123.0	1.2	0.17	123.09	122.92
63	124.2	1.2	0.42	124.4	123.98
64	125.3	1.2	0.85	125.77	124.92
65	126.5	1.6	0.78	126.91	126.13
66	128.1	0.9	0.51	128.39	127.88
67	129.0	1.4	0.33	129.16	128.83
68	130.4	0.7	0.42	130.58	130.16
69	131.1	2.1	0.2	131.17	130.97
70	133.2	1.1	0.16	133.28	133.12
71	134.3	1.1	0	134.28	134.28
72	135.4	0.8	0	135.42	135.42
73	136.2	1.8	0.03	136.26	136.23
74	138.0	1.0	0.15	138.09	137.94
75	139.1	1.2	0.12	139.12	139
76	140.2	1.1	0	140.24	140.24
77	141.4	1.3	0.36	141.57	141.21
78	142.7	1.9	0.72	143.03	142.31
79	144.6	0.7	0.65	144.93	144.28
80	145.3	2.2	0.05	145.35	145.3
81	147.5	1.1	0	147.48	147.48
82	148.6	1.1	0.5	148.86	148.36
83	149.7	2.7	0.27	149.87	149.6
84	152.4	2.1	0	152.4	152.4
85	154.5	1.8	0	154.47	154.47
86	156.3	1.2	0.6	156.61	156.01
87	157.5	2.4	0.36	157.67	157.31
88	159.9	2.7	1.68	160.7	159.02
89	162.5	2.2	0.66	162.87	162.21
90	164.7	1.2	0.19	164.8	164.61
91	165.9	0.7	0	165.86	165.86
92	166.6	0.9	0	166.57	166.57
93	167.5	4.8	0.19	167.58	167.39
94	172.3	3.3	0.36	172.51	172.15
95	175.6	1.5	0.6	175.89	175.29
96	177.1	1.9	0.85	177.54	176.69
97	179.0	1.8	0	179.02	179.02
98	180.9	1.4	0.02	180.87	180.85
99	182.2	2.1	0.26	182.37	182.11
100	184.4	1.0	0	184.38	184.38
101	185.4	1.3	0.8	185.78	184.98
102	186.7	2.3	0.01	186.66	186.65
103	189.0	1.2	0.37	189.19	188.82

付表 3

104	190.2	0.8	0	190.22	190.22
105	191.0	3.6	0	191.04	191.04
106	194.6	0.8	0	194.59	194.59
107	195.4	0.8	0	195.41	195.41
108	196.2	1.1	0.32	196.33	196.01
109	197.3	0.5	0	197.3	197.3
110	197.8	1.0	0	197.84	197.84
111	198.9	1.1	0	198.87	198.87
112	199.9	1.6	0.36	200.12	199.76
113	201.5	0.7	0	201.51	201.51
114	202.2	0.8	0.23	202.33	202.1
115	203.0	1.4	0.37	203.18	202.81
116	204.4	0.7	0.47	204.59	204.12
117	205.1	1.0	0.22	205.17	204.95
118	206.1	1.2	0.35	206.26	205.91
119	207.3	1.8	0.6	207.57	206.97
120	209.1	1.1	0	209.08	209.08
121	210.2	2.9	0	210.15	210.15
122	213.1	1.1	0.4	213.28	212.88
123	214.1	2.4	0.31	214.29	213.98
124	216.6	1.8	0.44	216.8	216.36
125	218.4	1.6	0.26	218.53	218.27
126	220.0	1.9	0	220.04	220.04
127	222.0	1.2	0.36	222.15	221.79
128	223.2	4.8	0	223.15	223.15
129	228.0	1.1	0	227.95	227.95
130	229.0	0.9	0.07	229.08	229.01
131	230.0	1.9	0.8	230.39	229.59
132	231.9	1.7	0	231.86	231.86
133	233.6	1.1	0.05	233.58	233.53
134	234.6	1.9	0	234.63	234.63
135	236.5	1.2	0	236.54	236.54
136	237.8	2.0	0.27	237.92	237.65
137	239.8	2.9	0.74	240.17	239.43
138	242.7	0.8	0	242.7	242.7
139	243.5	1.8	0.34	243.67	243.33
140	245.3	3.7	0.61	245.61	245
141	249.0	2.0	0.12	249.02	248.9
142	250.9	1.0	0.35	251.09	250.74
143	251.9	1.0	0.14	251.96	251.82
144	252.9	3.2	0.06	252.92	252.86
145	256.1	5.4	0	256.1	256.1
146	261.5	3.6	0.04	261.51	261.42
147	265.1	4.2	0	265.06	265.06
148	269.3	1.4	0	269.27	269.27
149	270.7	2.0	0.43	270.91	270.48
150	272.7	0.9	0	272.72	272.72
151	273.6	1.9	0	273.64	273.64
152	275.6	2.0	0.3	275.71	275.41
153	277.6	2.1	0.24	277.67	277.43
154	279.6	2.6	0.36	279.79	279.43
155	282.2	4.3	0	282.21	282.21
156	286.6	5.9	0	286.55	286.55
157	292.5	3.1	0.78	292.88	292.1
158	295.6	1.2	0.4	295.76	295.36
159	296.8	1.3	0	296.77	296.77
160	298.1	0.9	0	298.06	298.06
161	298.9	1.0	0	298.91	298.91
162	299.9	3.5	0	299.87	299.87
163	303.3	0.8	0.11	303.39	303.28
164	304.1	1.0	0.47	304.36	303.89
165	305.1	0.9	0.24	305.21	304.97
166	306.0	3.0	0.42	306.18	305.76
167	309.0	2.9	0.94	309.49	308.55
168	311.9	2.4	0	311.92	311.92
169	314.4	1.6	0	314.36	314.36
170	316.0	0.5	0	315.99	315.99

付表3

171	316.5	5.1	0	316.51	316.51
172	321.6	1.4	0	321.63	321.63
173	323.0	4.5	0	323.03	323.03
174	327.5	3.8	0.18	327.58	327.4
175	331.2	2.1	0.19	331.34	331.15
176	333.4	1.4	0.36	333.54	333.18
177	334.8	2.7	0.67	335.11	334.44
178	337.5	1.8	0.53	337.74	337.21
179	339.3	1.2	0.56	339.53	338.97
180	340.4	3.0	0.92	340.9	339.98
181	343.4	1.4	0.26	343.53	343.27
182	344.8	1.0	0	344.76	344.76
183	345.7	1.8	0	345.74	345.74
184	347.5	4.9	0.16	347.62	347.46
185	352.5	0.9	0	352.48	352.48
186	353.4	1.3	0.27	353.56	353.29
187	354.7	1.6	0.82	355.12	354.3
188	356.3	2.4	0.48	356.52	356.04
189	358.7	1.2	0.56	358.96	358.4
190	359.9	5.7	0	359.9	359.9
191	365.6	1.9	0	365.92	365.29
192	367.6	6.8	0	367.55	367.55
193	374.3	1.8	0.48	374.55	374.07
194	376.1	2.1	0	376.37	375.82
195	378.2	9.6	0	378.18	378.18
196	387.7	1.9	0	387.74	387.74
197	389.7	5.2	0	389.68	389.68
198	394.9	0.9	0	394.9	394.9
199	395.8	13.2	0	395.84	395.84
200	409.1	1.3	0	409.06	409.06
201	410.4	15.7	0	410.39	410.39
202	426.1	3.0	0	426.09	426.09
203	429.1	5.7	0.69	429.48	428.79
204	434.9		1.11	435.43	434.32

付表4

付表4 ウナギ種内に認められたAFLP法におけるバンドのサイズ

A) Eco R1-ACA/Mse 1-CAC

	median	difference	max	min	range
1	51.58	3.6	51.85	51.3	0.55
2	55.13	1.4	55.53	54.72	0.81
3	56.56	1.1	56.8	56.32	0.48
4	57.69	2.0	58.01	57.37	0.64
5	59.69	1.7	59.86	59.51	0.35
6	61.40	1.2	61.4	61.4	0.00
7	62.63	1.2	62.88	62.38	0.50
8	63.79	0.6	64.03	63.55	0.48
9	64.35	0.8	64.35	64.35	0.00
10	65.10	1.9	65.21	64.99	0.22
11	67.01	1.5	67.31	66.7	0.61
12	68.49	1.0	68.72	68.26	0.46
13	69.54	1.7	69.68	69.39	0.29
14	71.20	1.1	71.63	70.85	0.78
15	72.34	1.7	72.54	72.14	0.40
16	73.99	1.7	74.15	73.83	0.32
17	75.66	0.9	75.67	75.65	0.02
18	76.56	1.3	76.67	76.44	0.23
19	77.87	0.7	78.08	77.66	0.42
20	78.58	0.8	78.58	78.58	0.00
21	79.33	1.7	79.43	79.23	0.20
22	81.05	1.2	81.18	80.91	0.27
23	82.21	0.7	82.38	82.04	0.34
24	82.94	2.4	83.04	82.83	0.21
25	85.38	0.9	85.38	85.38	0.00
26	86.30	1.4	86.36	86.24	0.12
27	87.74	1.6	87.92	87.56	0.36
28	89.37	0.9	89.5	89.23	0.27
29	90.29	0.9	90.54	90.03	0.51
30	91.15	1.3	91.29	91	0.29
31	92.45	0.7	92.7	92.2	0.50
32	93.18	0.7	93.33	93.02	0.31
33	93.87	1.2	93.87	93.87	0.00
34	95.09	1.0	95.27	94.9	0.37
35	96.07	0.9	96.3	95.84	0.46
36	96.96	1.1	97.11	96.8	0.31
37	98.10	0.9	98.46	97.74	0.72
38	98.99	1.4	99.05	98.93	0.12
39	100.38	0.8	100.53	100.22	0.31
40	101.15	1.6	101.41	100.88	0.53
41	102.79	1.0	102.92	102.66	0.26
42	103.79	1.1	104.13	103.44	0.69
43	104.90	1.5	104.9	104.9	0.00
44	106.45	2.1	106.77	106.13	0.64
45	108.58	1.0	108.71	108.45	0.26
46	109.59	1.2	109.59	109.59	0.00
47	110.74	1.0	110.84	110.64	0.20
48	111.78	1.3	111.99	111.57	0.42
49	113.04	1.7	113.32	112.76	0.56
50	114.78	0.9	114.97	114.59	0.38
51	115.72	1.4	115.94	115.49	0.45
52	117.15	0.8	117.3	116.99	0.31
53	117.91	0.8	117.91	117.91	0.00
54	118.75	1.0	118.88	118.61	0.27
55	119.77	3.2	119.92	119.61	0.31
56	123.00	0.8	123.2	122.8	0.40
57	123.85	4.2	124.05	123.65	0.40
58	128.01	1.0	128.16	127.86	0.30
59	128.97	1.0	128.97	128.97	0.00
60	129.97	1.0	130.12	129.81	0.31
61	130.92	1.7	131.11	130.73	0.38
62	132.66	1.7	132.66	132.66	0.00
63	134.35	3.9	134.47	134.23	0.24
64	138.26	1.0	138.26	138.26	0.00
65	139.26	2.3	139.38	139.13	0.25
66	141.54	0.7	141.57	141.51	0.06
67	142.24	1.4	142.3	142.17	0.13
68	143.69	1.3	144.02	143.35	0.67
69	145.04	2.6	145.25	144.82	0.43
70	147.65	1.2	148	147.29	0.71
71	148.89	2.2	149.1	148.68	0.42

付表4

72	151.04	1.2	151.3	150.78	0.52
73	152.20	2.6	152.2	152.2	0.00
74	154.84	2.0	155.16	154.52	0.64
75	156.82	0.8	156.95	156.69	0.26
76	157.63	0.9	157.65	157.61	0.04
77	158.56	1.3	158.76	158.35	0.41
78	159.88	0.5	160	159.75	0.25
79	160.37	0.9	160.37	160.37	0.00
80	161.24	1.1	161.61	160.87	0.74
81	162.37	1.5	162.63	162.1	0.53
82	163.91	1.9	164.12	163.69	0.43
83	165.80	1.5	166.28	165.31	0.97
84	167.25	0.9	167.25	167.25	0.00
85	168.14	1.1	168.35	167.93	0.42
86	169.26	0.8	169.27	169.24	0.03
87	170.02	0.9	170.08	169.96	0.12
88	170.88	1.2	171.01	170.74	0.27
89	172.07	1.0	172.28	171.85	0.43
90	173.10	1.2	173.46	172.74	0.72
91	174.30	2.2	174.53	174.07	0.46
92	176.49	0.8	176.65	176.32	0.33
93	177.33	1.1	177.48	177.17	0.31
94	178.46	2.1	178.68	178.24	0.44
95	180.55	2.4	181.12	179.98	1.14
96	182.97	1.2	183.15	182.78	0.37
97	184.13	1.0	184.13	184.13	0.00
98	185.10	0.9	185.26	184.93	0.33
99	185.97	1.1	186.21	185.72	0.49
100	187.06	0.7	187.24	186.87	0.37
101	187.79	1.0	187.85	187.72	0.13
102	188.78	1.1	188.78	188.78	0.00
103	189.84	3.4	190.12	189.55	0.57
104	193.19	1.0	193.35	193.03	0.32
105	194.18	1.3	194.2	194.15	0.05
106	195.52	1.6	196.01	195.03	0.98
107	197.08	1.1	197.08	197.08	0.00
108	198.20	1.2	198.47	197.92	0.55
109	199.40	0.8	199.53	199.27	0.26
110	200.25	1.4	200.25	200.25	0.00
111	201.68	2.4	202.37	200.99	1.38
112	204.07	2.3	204.39	203.74	0.65
113	206.35	0.7	206.48	206.22	0.26
114	207.06	1.0	207.28	206.84	0.44
115	208.10	1.4	208.22	207.98	0.24
116	209.48	1.0	209.48	209.48	0.00
117	210.46	2.4	210.64	210.28	0.36
118	212.85	1.3	213.03	212.67	0.36
119	214.11	0.9	214.36	213.86	0.50
120	215.06	0.9	215.11	215	0.11
121	215.93	1.4	215.96	215.9	0.06
122	217.38	1.7	217.66	217.1	0.56
123	219.05	2.5	219.05	219.05	0.00
124	221.53	1.4	221.8	221.25	0.55
125	222.95	3.9	222.95	222.95	0.00
126	226.85	0.8	226.85	226.85	0.00
127	227.64	1.5	227.83	227.44	0.39
128	229.16	1.3	229.16	229.16	0.00
129	230.47	3.0	230.47	230.47	0.00
130	233.43	4.3	233.43	233.43	0.00
131	237.71	2.0	237.86	237.55	0.31
132	239.67	2.1	239.83	239.51	0.32
133	241.74	0.9	241.74	241.74	0.00
134	242.68	2.5	242.68	242.68	0.00
135	245.16	1.1	245.31	245	0.31
136	246.29	1.2	246.29	246.29	0.00
137	247.45	1.8	248.12	246.78	1.34
138	249.25	0.7	249.42	249.07	0.35
139	249.96	1.6	249.96	249.96	0.00
140	251.59	1.9	251.79	251.39	0.40
141	253.53	0.7	253.53	253.53	0.00
142	254.22	0.8	254.22	254.22	0.00
143	255.02	3.8	255.02	255.02	0.00
144	258.80	1.6	258.8	258.8	0.00
145	260.36	1.3	260.36	260.36	0.00
146	261.62	0.8	261.84	261.4	0.44

付表4

147	262.43	1.1	262.61	262.24	0.37
148	263.52	1.0	263.76	263.28	0.48
149	264.49	2.3	264.79	264.19	0.60
150	266.74	0.8	266.74	266.74	0.00
151	267.57	0.9	267.85	267.29	0.56
152	268.43	1.4	268.51	268.34	0.17
153	269.85	1.4	270.01	269.69	0.32
154	271.30	0.7	271.44	271.15	0.29
155	272.03	1.0	272.22	271.83	0.39
156	273.05	1.8	273.21	272.89	0.32
157	274.89	4.4	275	274.78	0.22
158	279.32	0.9	279.32	279.32	0.00
159	280.23	0.7	280.23	280.23	0.00
160	280.91	7.8	280.91	280.91	0.00
161	288.69	1.5	288.79	288.58	0.21
162	290.16	1.1	290.16	290.16	0.00
163	291.27	1.3	291.27	291.27	0.00
164	292.62	2.3	292.89	292.34	0.55
165	294.94	0.8	294.94	294.94	0.00
166	295.73	1.7	295.9	295.55	0.35
167	297.41	2.1	297.54	297.27	0.27
168	299.52	1.2	299.73	299.31	0.42
169	300.70	1.1	300.7	300.7	0.00
170	301.77	1.8	302.15	301.39	0.76
171	303.61	2.9	303.75	303.46	0.29
172	306.48	2.5	306.86	306.09	0.77
173	309.02	5.5	309.36	308.68	0.68
174	314.53	5.1	314.53	314.53	0.00
175	319.60	3.1	319.94	319.25	0.69
176	322.65	3.5	322.65	322.65	0.00
177	326.12	2.9	326.12	326.12	0.00
178	329.03	6.4	330.57	327.48	3.09
179	335.46	1.2	335.46	335.46	0.00
180	336.62	5.9	336.62	336.62	0.00
181	342.54	3.1	342.75	342.32	0.43
182	345.62	2.8	345.9	345.33	0.57
183	348.37	1.3	348.43	348.3	0.13
184	349.65	9.5	349.86	349.43	0.43
185	359.10	7.7	359.26	358.94	0.32
186	366.83	3.1	366.83	366.83	0.00
187	369.95	16.2	370	369.89	0.11
188	386.12	8.5	386.34	385.89	0.45
189	394.63	5.4	394.63	394.63	0.00
190	400.08	1.0	400.29	399.86	0.43
191	401.09	4.3	401.16	401.02	0.14
192	405.40	1.6	405.7	405.1	0.60
193	407.00	5.0	407	407	0.00
194	411.96	1.7	412.42	411.49	0.93
195	413.67	3.0	414.27	413.07	1.20
196	416.71	4.9	417.15	416.26	0.89
197	421.65	3.1	422.53	420.76	1.77
198	424.73	3.2	424.99	424.46	0.53
199	427.94	2.4	427.94	427.94	0.00
200	430.32	2.0	430.32	430.32	0.00
201	432.33	11.3	432.66	432	0.66
202	443.64		443.9	443.38	0.52

B)Eco R1-AAG/Mse 1-CAT

	median	difference	max	min	range
1	48.9	1.56	49.23	48.65	0.58
2	50.5	1.19	50.71	50.28	0.43
3	51.7	0.98	51.96	51.4	0.56
4	52.7	0.94	52.9	52.43	0.47
5	53.6	1.51	54.04	53.17	0.87
6	55.1	1.37	55.32	54.9	0.42
7	56.5	0.90	56.7	56.26	0.44
8	57.4	2.09	57.54	57.22	0.32
9	59.5	0.63	59.61	59.32	0.29
10	60.1	0.61	60.18	60	0.18
11	60.7	0.74	60.75	60.65	0.1
12	61.4	0.89	61.6	61.28	0.32
13	62.3	4.08	62.66	62	0.66
14	66.4	2.29	66.53	66.29	0.24
15	68.7	1.44	68.89	68.26	0.63

付表4

17	70.1	1.26	70.36	69.92	0.44
18	71.4	2.59	71.54	71.26	0.28
19	74.0	1.34	74.05	73.93	0.12
20	75.3	1.44	75.44	75.22	0.22
21	76.8	1.38	77.09	76.45	0.64
22	78.2	1.05	78.3	78.01	0.29
23	79.2	1.29	79.3	79.11	0.19
24	80.5	2.55	80.6	80.38	0.22
25	83.0	1.20	83.09	82.98	0.11
26	84.2	1.70	84.35	84.12	0.23
27	85.9	1.80	86.02	85.84	0.18
28	87.7	0.72	87.85	87.62	0.23
29	88.5	1.21	88.48	88.42	0.06
30	89.7	0.70	89.76	89.57	0.19
31	90.4	1.71	90.62	90.1	0.52
32	92.1	2.02	92.13	92	0.13
33	94.1	0.88	94.2	93.96	0.24
34	95.0	3.04	95.02	94.9	0.12
35	98.0	1.23	98.13	97.86	0.27
36	99.2	2.68	99.41	99.05	0.36
37	101.9	1.20	102.05	101.76	0.29
38	103.1	1.12	103.24	102.97	0.27
39	104.2	1.52	104.34	104.11	0.23
40	105.7	0.69	105.86	105.62	0.24
41	106.4	1.36	106.62	106.23	0.39
42	107.8	4.53	107.94	107.63	0.31
43	112.3	1.30	112.71	111.92	0.79
44	113.6	1.13	113.74	113.49	0.25
45	114.7	0.90	114.91	114.58	0.33
46	115.6	3.99	115.81	115.48	0.33
47	119.6	4.60	119.8	119.47	0.33
48	124.2	1.32	124.45	124.01	0.44
49	125.5	1.08	125.68	125.41	0.27
50	126.6	0.73	126.69	126.55	0.14
51	127.4	4.16	127.4	127.3	0.1
52	131.5	0.89	131.7	131.33	0.37
53	132.4	2.69	132.51	132.3	0.21
54	135.1	1.17	135.34	134.84	0.5
55	136.3	1.59	136.55	135.97	0.58
56	137.9	0.84	137.93	137.77	0.16
57	138.7	1.37	138.75	138.63	0.12
58	140.1	8.76	140.19	139.92	0.27
59	148.8	2.35	148.94	148.68	0.26
60	151.2	3.10	151.41	150.91	0.5
61	154.3	0.99	154.26	154.25	0.01
62	155.2	0.97	155.34	155.15	0.19
63	156.2	1.64	156.26	156.18	0.08
64	157.9	0.94	158	157.71	0.29
65	158.8	0.82	159	158.6	0.4
66	159.6	0.94	159.75	159.49	0.26
67	160.6	2.48	160.75	160.37	0.38
68	163.0	3.19	163.23	162.85	0.38
69	166.2	1.13	166.52	165.93	0.59
70	167.4	1.15	167.41	167.31	0.1
71	168.5	1.69	168.79	168.23	0.56
72	170.2	0.72	170.41	169.98	0.43
73	170.9	1.76	171.08	170.74	0.34
74	172.7	3.92	172.84	172.5	0.34
75	176.6	0.71	176.74	176.44	0.3
76	177.3	1.16	177.42	177.18	0.24
77	178.5	2.44	178.73	178.2	0.53
78	180.9	1.02	181.11	180.7	0.41
79	181.9	1.87	182.05	181.8	0.25
80	183.8	5.72	184	183.58	0.42
81	189.5	13.24	189.64	189.39	0.25
82	202.8	1.25	202.91	202.6	0.31
83	204.0	7.82	204.26	203.48	0.78
85	211.8	2.21	211.92	211.73	0.19
86	214.0	4.79	214.23	213.84	0.39
87	218.8	12.09	218.87	218.77	0.1
88	230.9	2.53	231.04	230.78	0.26
89	233.4	13.46	233.85	233.03	0.82
90	246.9	7.80	247.1	246.7	0.4
91	254.7	2.51	254.84	254.56	0.28
92	257.2	17.79	257.5	256.91	0.59

付表4

93	275.0	5.33	275.5	274.49	1.01
94	280.3	2.06	280.41	280.23	0.18
95	282.4	1.97	282.52	282.24	0.28
96	284.4	2.03	284.47	284.23	0.24
97	286.4	4.46	286.74	286.03	0.71
98	290.8	3.53	290.94	290.75	0.19
99	294.4	10.71	294.58	294.18	0.4
100	305.1	1.74	305.27	304.9	0.37
101	306.8	1.46	307	306.64	0.36
102	308.3	5.94	308.4	308.17	0.23
103	314.2	10.23	314.61	313.83	0.78
104	324.5	3.40	326.5	322.4	4.1
105	327.8	1.13	327.9	327.79	0.11
106	329.0	1.91	329.14	328.8	0.34
107	330.9	10.05	331.06	330.71	0.35
108	340.9	3.19	340.96	340.9	0.06
109	344.1	5.82	344.45	343.78	0.67
110	349.9	5.69	350.14	349.72	0.42
111	355.6	24.68	356.05	355.18	0.87
112	380.3	2.50	380.57	380.03	0.54
113	382.8	31.59	382.94	382.66	0.28
114	414.4	5.82	414.41	414.37	0.04
115	420.2	15.58	420.78	419.63	1.15
116	435.8		435.99	435.57	0.42

C) Eco R1-AAC/Mse 1-CAT

	median	difference	max	min	range
1	41.6	0.82	41.92	41.3	0.62
2	42.4	0.85	42.43	42.43	0.00
3	43.3	1.16	43.56	43	0.56
4	44.4	0.66	44.57	44.3	0.27
5	45.1	2.06	45.38	44.81	0.57
6	47.2	2.90	47.4	46.9	0.50
7	50.0	0.60	50.19	49.9	0.29
8	50.7	0.71	50.65	50.65	0.00
9	51.4	1.61	51.6	51.11	0.49
10	53.0	1.81	53.13	52.8	0.33
11	54.8	1.19	54.95	54.6	0.35
12	56.0	1.94	56.15	55.77	0.38
13	57.9	1.05	58.1	57.7	0.40
14	59.0	0.67	59.12	58.78	0.34
15	59.6	0.87	59.62	59.62	0.00
16	60.5	1.48	60.49	60.49	0.00
17	62.0	0.81	62.09	61.84	0.25
18	62.8	0.73	62.95	62.59	0.36
19	63.5	3.38	63.75	63.26	0.49
20	66.9	0.92	66.94	66.82	0.12
21	67.8	2.71	67.86	67.73	0.13
22	70.5	0.57	70.57	70.44	0.13
23	71.1	0.70	71.19	70.96	0.23
24	71.8	0.67	71.85	71.7	0.15
25	72.4	1.40	72.45	72.44	0.01
26	73.8	1.11	74.06	73.63	0.43
27	75.0	0.99	75.22	74.68	0.54
28	75.9	1.05	76	75.89	0.11
29	77.0	2.03	77.11	76.88	0.23
30	79.0	1.97	79.15	78.89	0.26
31	81.0	0.69	81.16	80.83	0.33
32	81.7	0.86	81.78	81.58	0.20
33	82.5	2.15	82.68	82.41	0.27
34	84.7	0.72	84.8	84.58	0.22
35	85.4	0.78	85.49	85.32	0.17
36	86.2	1.01	86.3	86.07	0.23
37	87.2	2.67	87.21	87.17	0.04
38	89.9	1.20	90.2	89.52	0.68
39	91.1	1.13	91.19	90.92	0.27
40	92.2	0.68	92.24	92.12	0.12

付表4

41	92.9	2.06	93.02	92.7	0.32
42	94.9	0.84	94.92	94.92	0.00
43	95.8	1.62	95.91	95.61	0.30
44	97.4	1.31	97.38	97.38	0.00
45	98.7	1.01	98.69	98.69	0.00
46	99.7	1.17	100	99.4	0.60
47	100.9	0.95	100.97	100.77	0.20
48	101.8	1.40	101.98	101.66	0.32
49	103.2	2.60	103.35	103.08	0.27
50	105.8	1.59	105.96	105.68	0.28
51	107.4	0.51	107.44	107.38	0.06
52	107.9	1.31	107.92	107.92	0.00
53	109.2	0.98	109.25	109.21	0.04
54	110.2	1.61	110.21	110.21	0.00
55	111.8	1.94	111.89	111.74	0.15
56	113.8	1.00	113.91	113.6	0.31
57	114.8	0.63	114.75	114.75	0.00
58	115.4	1.62	115.38	115.38	0.00
59	117.0	1.01	117.16	116.83	0.33
60	118.0	0.93	118.1	117.91	0.19
61	118.9	0.45	118.97	118.89	0.08
62	119.4	2.30	119.38	119.38	0.00
63	121.7	1.35	121.68	121.68	0.00
64	123.0	1.16	123.18	122.89	0.29
65	124.2	2.31	124.3	124.09	0.21
66	126.5	1.42	126.67	126.34	0.33
67	127.9	0.99	128.33	127.52	0.81
68	128.9	1.09	129.02	128.81	0.21
69	130.0	1.05	130.01	130.01	0.00
70	131.1	2.10	131.06	131.06	0.00
71	133.2	0.92	133.18	133.14	0.04
72	134.1	2.68	134.17	133.99	0.18
73	136.8	0.53	136.85	136.67	0.18
74	137.3	0.79	137.29	137.29	0.00
75	138.1	0.92	138.26	137.9	0.36
76	139.0	0.91	139	139	0.00
77	139.9	4.94	139.91	139.91	0.00
78	144.8	1.16	144.87	144.82	0.05
79	146.0	3.59	146.01	146.01	0.00
80	149.6	2.59	149.73	149.47	0.26
81	152.2	0.65	152.33	152.05	0.28
82	152.8	3.29	152.84	152.84	0.00
83	156.1	1.79	156.13	156.13	0.00
84	157.9	1.57	157.99	157.84	0.15
85	159.5	1.00	159.62	159.36	0.26
86	160.5	1.67	160.49	160.49	0.00
87	162.2	1.42	162.35	161.98	0.37
88	163.6	6.42	163.58	163.58	0.00
89	170.0	2.30	170	170	0.00
90	172.3	5.05	172.34	172.25	0.09
91	177.3	1.88	177.63	177.06	0.57
92	179.2	1.53	179.42	179.03	0.39
93	180.8	3.38	180.86	180.65	0.21
94	184.1	0.97	184.13	184.13	0.00
95	185.1	3.46	185.22	184.98	0.24
96	188.6	7.43	188.73	188.38	0.35
97	196.0	3.89	196.13	195.84	0.29
98	199.9	3.04	200	199.76	0.24
99	202.9	1.29	203.03	202.8	0.23
100	204.2	1.76	204.32	204.1	0.22
101	206.0	7.79	206.06	205.87	0.19
102	213.8	2.11	213.75	213.75	0.00
103	215.9	0.79	215.86	215.86	0.00
104	216.7	1.73	216.82	216.48	0.34
105	218.4	0.93	218.51	218.24	0.27
106	219.3	2.78	219.38	219.22	0.16
107	222.1	5.22	222.08	222.08	0.00

付表4

108	227.3	1.77	227.48	227.12	0.36
109	229.1	0.75	229.15	228.99	0.16
110	229.8	2.39	230.05	229.58	0.47
111	232.2	3.44	232.26	232.15	0.11
112	235.7	1.18	235.66	235.64	0.02
113	236.8	6.41	236.83	236.83	0.00
114	243.2	3.73	243.44	243.05	0.39
115	247.0	3.78	246.98	246.98	0.00
116	250.8	0.93	250.9	250.62	0.28
117	251.7	12.15	251.82	251.56	0.26
118	263.8	1.10	263.93	263.75	0.18
119	264.9	2.94	265.02	264.87	0.15
120	267.9	2.64	267.88	267.88	0.00
121	270.5	7.47	270.71	270.33	0.38
122	278.0	4.79	277.99	277.99	0.00
123	282.8	3.17	282.78	282.78	0.00
124	286.0	1.55	285.95	285.95	0.00
125	287.5	2.98	287.5	287.5	0.00
126	290.5	1.78	290.48	290.48	0.00
127	292.3	0.80	292.47	292.06	0.41
128	293.1	2.27	293.06	293.06	0.00
129	295.3	1.75	295.46	295.21	0.25
130	297.1	1.83	297.41	296.75	0.66
131	298.9	0.61	298.91	298.91	0.00
132	299.5	1.72	299.59	299.45	0.14
133	301.2	1.23	301.26	301.22	0.04
134	302.5	1.47	302.47	302.47	0.00
135	303.9	1.03	304.17	303.71	0.46
136	305.0	0.98	305.12	304.81	0.31
137	305.9	5.48	306.05	305.84	0.21
138	311.4	2.17	311.42	311.42	0.00
139	313.6	4.67	313.59	313.59	0.00
140	318.3	4.43	318.56	317.95	0.61
141	322.7	4.67	322.68	322.68	0.00
142	327.3	4.97	327.51	327.18	0.33
143	332.3	2.32	332.32	332.32	0.00
144	334.6	3.32	335.02	334.25	0.77
145	338.0	1.14	337.96	337.96	0.00
146	339.1	1.15	339.52	338.67	0.85
147	340.3	4.36	340.25	340.25	0.00
148	344.6	3.53	344.91	344.31	0.60
149	348.1	1.29	348.14	348.14	0.00
150	349.4	4.07	349.43	349.43	0.00
151	353.5	1.72	353.85	353.16	0.69
152	355.2	2.99	355.22	355.22	0.00
153	358.2	5.24	358.28	358.14	0.14
154	363.5	3.24	363.45	363.45	0.00
155	366.7	7.74	367.01	366.36	0.65
156	374.4	0.88	374.5	374.35	0.15
157	375.3	1.97	375.31	375.31	0.00
158	377.3	1.03	377.28	377.28	0.00
159	378.3	0.66	378.43	378.18	0.25
160	379.0	1.58	378.99	378.93	0.06
161	380.5	2.07	380.82	380.26	0.56
162	382.6	0.80	382.94	382.28	0.66
163	383.4	0.84	383.41	383.41	0.00
164	384.3	1.18	384.25	384.25	0.00
165	385.4	10.22	385.43	385.43	0.00
166	395.7	3.50	396	395.3	0.70
167	399.2	4.77	399.15	399.15	0.00
168	403.9	5.04	403.92	403.92	0.00
169	409.0	1.61	408.96	408.96	0.00
170	410.6	1.77	410.74	410.39	0.35
171	412.3	4.14	412.34	412.34	0.00
172	416.5	9.55	416.49	416.46	0.03
173	426.0	2.53	426.09	425.97	0.12
174	428.6	3.81	428.56	428.56	0.00

付表4

175	432.4	1.82	432.37	432.37	0.00
176	434.2		434.61	433.77	0.84

F1-188
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-189
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-190
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-191
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-192
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-193
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-194
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-195
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-196
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-197
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-198
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-199
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-200
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-201
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-202
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-203
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

F1-204
ATTAAAACTCTCTTAGCCGTA...
TACTATACTACATATATATATATACATACACATGTCACCGCATCTTATTTGTA...

FE-432

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-434

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-435

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-436

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-437

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-438

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-439

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-440

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-441

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-442

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-444

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-445

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-446

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-447

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

FE-448

ATTAAAGTCTTCCTAGCGCTAAA...
TACTATATACATATA...
AAATAAAATAATACACCTTACCT...

00-10

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-16

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-17

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-18

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-19

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-05

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-07

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-08

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-09

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-11

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-12

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-14

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-15

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-17

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-21

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

00-23

ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA... ATFAAAATCTTCCTAGCGCTAAA...

PA-94104

GTAAAGTCAGCTAAACAGCTTTTCGGGCCATACCCGGGACATGTTGGTAAATCCCTTCTTACTAAAGGCCATATGTAACATTCATGATACAAAGTTAGGACTAGGAACTACAACTCATCTCG
 CTAGCTCACACTGCTGCTGGCCGAAATAGGACTAGAAATCAAACTAGACTAGCCATTATTCGCTTATAGGCCAACACACCACCGAGAGGTGTGGAAGCAACAACAAATATTTCCCTCACAGCCGACG
 APCACACTAATCTATTTACACACACATCCATGCAATTAACAGGACAAATAGGACATTCAGACACTATCTCACCCAGCAATTCACCAATTCACATCTTCCTGTAGGAGTAAAGTAGGACTAGCCGCA
 ATCAATTTCTGACCTGGAGATTAACAGAGGTTAGACTAGCCAGGACTATCTCTTACACATGGAAGAACTAGCCGCAATAGCCCTAATTAGCCAACTTCGACAGGAGTAAAGTAGGACTAGCCGCA
 TTACACTAGGATTAATCTGCTCTGTAGGAGGATAGGTTGGAATAAACCAACACACTAGCAAAAATCTTAGCATACCTCAATGAGGCAAGTAAATATTTGTAATAAATACCTGACTAA
 TTTAATATCATAAACCTAATATCTATATCATACATCATCAAGCTTTCATAGCAATAAG

PA-94111

GTAAAGTCAGCTAAACAGCTTTTCGGGCCATACCCGGGACATGTTGGTAAATCCCTTCTTACTAAAGGCCATATGTAACATTCATGATACAAAGTTAGGACTAGGAACTACAACTCATCTCG
 CTAGCTCACACTGCTGCTGGCCGAAATAGGACTAGAAATCAAACTAGACTAGCCATTATTCGCTTATAGGCCAACACACCACCGAGAGGTGTGGAAGCAACAACAAATATTTCCCTCACAGCCGACG
 APCACACTAATCTATTTACACACACATCCATGCAATTAACAGGACAAATAGGACATTCAGACACTATCTCACCCAGCAATTCACCAATTCACATCTTCCTGTAGGAGTAAAGTAGGACTAGCCGCA
 ATCAATTTCTGACCTGGAGATTAACAGAGGTTAGACTAGCCAGGACTATCTCTTACACATGGAAGAACTAGCCGCAATAGCCCTAATTAGCCAACTTCGACAGGAGTAAAGTAGGACTAGCCGCA
 TTACACTAGGATTAATCTGCTCTGTAGGAGGATAGGTTGGAATAAACCAACACACTAGCAAAAATCTTAGCATACCTCAATGAGGCAAGTAAATATTTGTAATAAATACCTGACTAA
 TTTAATATCATAAACCTAATATCTATATCATACATCATCAAGCTTTCATAGCAATAAG

PA-94103

GTAAAGTCAGCTAAACAGCTTTTCGGGCCATACCCGGGACATGTTGGTAAATCCCTTCTTACTAAAGGCCATATGTAACATTCATGATACAAAGTTAGGACTAGGAACTACAACTCATCTCG
 CTAGCTCACACTGCTGCTGGCCGAAATAGGACTAGAAATCAAACTAGACTAGCCATTATTCGCTTATAGGCCAACACACCACCGAGAGGTGTGGAAGCAACAACAAATATTTCCCTCACAGCCGACG
 APCACACTAATCTATTTACACACACATCCATGCAATTAACAGGACAAATAGGACATTCAGACACTATTCACCCAGCAATTCACCAATTCACATCTTCCTGTAGGAGTAAAGTAGGACTAGCCGCA
 ATCAATTTCTGACCTGGAGATTAACAGAGGTTAGACTAGCCAGGACTATCTCTTACACATGGAAGAACTAGCCGCAATAGCCCTAATTAGCCAACTTCGACAGGAGTAAAGTAGGACTAGCCGCA
 TTACACTAGGATTAATCTGCTCTGTAGGAGGATAGGTTGGAATAAACCAACACACTAGCAAAAATCTTAGCATACCTCAATGAGGCAAGTAAATATTTGTAATAAATACCTGACTAA
 TTTAATATCATAAACCTAATATCTATATCATACATCATCAAGCTTTCATAGCAATAAG

PA-94104

GTAAAGTCAGCTAAACAGCTTTTCGGGCCATACCCGGGACATGTTGGTAAATCCCTTCTTACTAAAGGCCATATGTAACATTCATGATACAAAGTTAGGACTAGGAACTACAACTCATCTCG
 CTAGCTCACACTGCTGCTGGCCGAAATAGGACTAGAAATCAAACTAGACTAGCCATTATTCGCTTATAGGCCAACACACCACCGAGAGGTGTGGAAGCAACAACAAATATTTCCCTCACAGCCGACG
 APCACACTAATCTATTTACACACACATCCATGCAATTAACAGGACAAATAGGACATTCAGACACTATTCACCCAGCAATTCACCAATTCACATCTTCCTGTAGGAGTAAAGTAGGACTAGCCGCA
 ATCAATTTCTGACCTGGAGATTAACAGAGGTTAGACTAGCCAGGACTATCTCTTACACATGGAAGAACTAGCCGCAATAGCCCTAATTAGCCAACTTCGACAGGAGTAAAGTAGGACTAGCCGCA
 TTACACTAGGATTAATCTGCTCTGTAGGAGGATAGGTTGGAATAAACCAACACACTAGCAAAAATCTTAGCATACCTCAATGAGGCAAGTAAATATTTGTAATAAATACCTGACTAA
 TTTAATATCATAAACCTAATATCTATATCATACATCATCAAGCTTTCATAGCAATAAG

PA-94105

GTAAAGTCAGCTAAACAGCTTTTCGGGCCATACCCGGGACATGTTGGTAAATCCCTTCTTACTAAAGGCCATATGTAACATTCATGATACAAAGTTAGGACTAGGAACTACAACTCATCTCG
 CTAGCTCACACTGCTGCTGGCCGAAATAGGACTAGAAATCAAACTAGACTAGCCATTATTCGCTTATAGGCCAACACACCACCGAGAGGTGTGGAAGCAACAACAAATATTTCCCTCACAGCCGACG
 APCACACTAATCTATTTACACACACATCCATGCAATTAACAGGACAAATAGGACATTCAGACACTATTCACCCAGCAATTCACCAATTCACATCTTCCTGTAGGAGTAAAGTAGGACTAGCCGCA
 ATCAATTTCTGACCTGGAGATTAACAGAGGTTAGACTAGCCAGGACTATCTCTTACACATGGAAGAACTAGCCGCAATAGCCCTAATTAGCCAACTTCGACAGGAGTAAAGTAGGACTAGCCGCA
 TTACACTAGGATTAATCTGCTCTGTAGGAGGATAGGTTGGAATAAACCAACACACTAGCAAAAATCTTAGCATACCTCAATGAGGCAAGTAAATATTTGTAATAAATACCTGACTAA
 TTTAATATCATAAACCTAATATCTATATCATACATCATCAAGCTTTCATAGCAATAAG

資料 5 ウナギ属魚類 9 種の ND2 領域の塩基配列

A. nebulosa
TGTGGCATGGGACCACAACTACATTCGGTACGCTACACGACGTCGGCTGGAAATGAGGTTGGAAAATTAATACACTAGCCATATATTCCTGCTTAGGCGCAACATCTACCCGACGAGGCGTGAAGAACACAA

A. hispidus
GTCGCTTAGGCTAGGACGACAGCAATCACTTCGGTACGCTACAGCTGACCTTGGCGTGAATGGGAAATTAATACACTAGCCATATATTCCTGCTTAGGCGCAACATCTACCCGACGAGGCGTGAAGAACACAA

A. ephippesensis
TGTAGGCTAGGACGACAGCAATCACTTCGGTACGCTACAGCTGACCTTGGCGTGAATGGGAAATTAATACACTAGCCATATATTCCTGCTTAGGCGCAACATCTACCCGACGAGGCGTGAAGAACACAA

A. hippogon
TGTGGCATGGGACCACAACTACATTCGGTACGCTACACGACGTCGGCTGGAAATGAGGTTGGAAAATTAATACACTAGCCATATATTCCTGCTTAGGCGCAACATCTACCCGACGAGGCGTGAAGAACACAA

A. mesoleuca
CTAGGCTAGGACGACAGCAATCACTTCGGTACGCTACAGCTGACCTTGGCGTGAATGGGAAATTAATACACTAGCCATATATTCCTGCTTAGGCGCAACATCTACCCGACGAGGCGTGAAGAACACAA

A. mesasiatica
TGTGGCATGGGACCACAACTACATTCGGTACGCTACACGACGTCGGCTGGAAATGAGGTTGGAAAATTAATACACTAGCCATATATTCCTGCTTAGGCGCAACATCTACCCGACGAGGCGTGAAGAACACAA

A. nebulosa nebulosa
TGTGGCATGGGACCACAACTACATTCGGTACGCTACACGACGTCGGCTGGAAATGAGGTTGGAAAATTAATACACTAGCCATATATTCCTGCTTAGGCGCAACATCTACCCGACGAGGCGTGAAGAACACAA

A. obscura
TGTGGCATGGGACCACAACTACATTCGGTACGCTACACGACGTCGGCTGGAAATGAGGTTGGAAAATTAATACACTAGCCATATATTCCTGCTTAGGCGCAACATCTACCCGACGAGGCGTGAAGAACACAA

A. zosterus
TGTGGCATGGGACCACAACTACATTCGGTACGCTACACGACGTCGGCTGGAAATGAGGTTGGAAAATTAATACACTAGCCATATATTCCTGCTTAGGCGCAACATCTACCCGACGAGGCGTGAAGAACACAA

資料 6 ウナギ17個体の調節領域の塩基配列

780-02 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-03 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-04 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-05 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-06 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-07 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-08 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-09 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-10 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-11 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-12 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-13 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-14 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-15 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-16 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-17 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-18 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

780-19 AGAAACAAAATAAATAAATGTAAGCCGCTGATGCTTAAATGACAAAGCCTGCGGTTTGTAACTCCGAGAGATGAAAGTAAATATCTCCAGCCGCAAAAATCAGAGAGAAAGACCTTAACTCCGATCC

TR8-22

AGAAAACAAAATAATAAATGATAAGCCCTAGTAGCTTAATAGCTAAAGCATGGTTTTGTAAATCCGAAGATGAAAGATTAATAATCTTCTAGCGCTAAAATTCAGAGAGAAAAGCTTAACTCCACCC
TCAACTCCCAAGCTGAGATCATAAATTAGACCACCCCTCGAAAATATATATATATGGTTTTGCTACATACCTGTATATGACATATTTACATTAAGCATATATATACATATATATTTACATGATCAATTAATG
GAAAACAGCATAAAGCCGATGTACAAATACCATAAATGGTATTAATCCATAAATCGATAAATAGCTAACTCAAACTGAAAATATATATCTCATACTAAAACAGATAAAGTTCACAGATTAATGTTAACGGACATT
TATTTTTAATACATGAAAGAGACATACATAACTGACGTAAGTCTGAAAGCTCAACAAAACCTGACACAGATGAAAGAAAATCTCTTATCCATATTAACTCACCCACATTTCTATGTTTTAAAT
CAACAGTAAAGTCAGAACCATTAAAGCCAGTAAGAACTCCCAACCAGCACAAAACAAGTAAATACGTTTTATGATAGCTCCGSSACAGTATTTGATATTTGGCATAAAATTAACATTAATCTGG



inches
1 2 3 4 5 6 7 8
cm
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak 2007 TM Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

