

## DNA マーカーによるウナギ属魚類の系統解析と種査定法の開発

青山 潤 (東京大学海洋研究所)

jaoyama@ori.u-tokyo.ac.jp

世界に分布するウナギ属魚類 18 種・亜種を採集し、形態形質の観察とミトコンドリア DNA のデータベースを構築した。これを用いて、従来のウナギ属の分類を再検討するとともに、分子系統学的手法により本属魚類の系統関係と進化過程を明らかにした。また、このデータベースを基に開発した DNA マーカーによる簡便な種査定法は、ウナギの移入種問題など応用研究にも貢献した。

### はじめに

現在、世界には 18 種・亜種のウナギ属魚類 (以下ウナギ) が認められ、これらの多くは、それぞれの国や地域で重要な水産資源となっている。我が国には、*Anguilla japonica* (ニホンウナギ) と *A. marmorata* (オオウナギ) の 2 種が生息している。このうち特にニホンウナギは、年間 13 万トン以上も消費される重要な食資源であるのみならず、民話や信仰の対象として我が国の文化にも深く関わっている。しかし、1970 年代をピークに世界のウナギ資源は減少の一途をたどり、大西洋では絶滅の危機さえ囁かれるようになった。本来の生息域を超えた商取引が一般化しているウナギでは、資源問題は国際的な関心事であり、早急な管理・保全対策が望まれる。

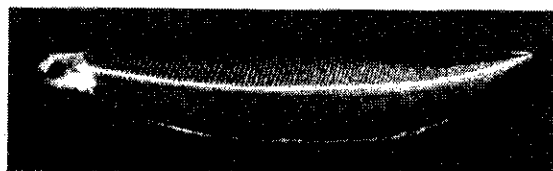


図1 ウナギのレプトケファルス幼生

一方、降下回遊魚であるウナギは海で産卵する。外洋でふ化したウナギはレプトケファルスと呼ばれる透明な柳の葉状の浮遊幼生となり (図 1)、海流に流されながらやがてシラスウナギへと変態し、成育場である淡水域へたどり着く。ここで 5-15 年ほど過ごしたウナギは、再び河を下って外洋の産卵場へ戻り、産卵の後その一生を終える。大西洋ウナギ 2 種 (*A. anguilla* ヨーロッパウナギ、*A. rostrata* アメリカウナギ) とニホンウナギは、それぞれサルガッソー海とマリアナ諸島西方海域に産卵場を持ち、数千キロにおよぶ大回遊を行うことが知られている。しかしながら、これまでのウナギの研究が温帯に生息する一部の種に集中していることにより、系統分類や進化などウナギ属全体を包括的に理解するための基礎知見はほとんど得られていない。

### 系統と進化

温帯・亜熱帯に生息するウナギの分布は、原則として暖流に洗われる各大陸の東側に集中している (図 2)。熱帯起源と考えられるウナギが赤道付近に産卵場を持ち、レプトケファルスが亜熱帯・温帯域へ受動的に輸送されることから、このような分布様式が主に海流系によるものであることは容易に想像される。ユーラシア大陸西側のヨーロッパウナギの分布は、強大な湾流の影響として説明される。しかし、暖かいブラジル海流が存在するにもかかわらず、なぜ南アメリカ大陸の東岸にウナギは分布しないのか。また、なぜ太平洋東部と南大西洋はウナギの

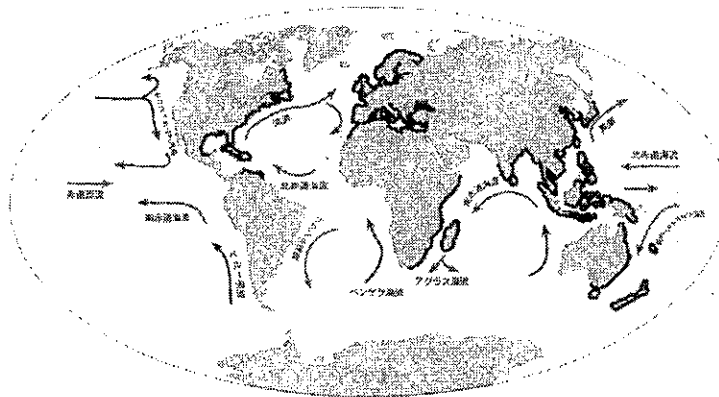


図2 世界の主な海流系とウナギ属魚類の分布域

分布の空白域であり、北大西洋の 2 種がインド・太平洋の他の 16 種・亜種と完全に隔離されているのか (図 2)。このようなウナギの特異な地理分布や、数千キロにおよぶ大産卵回遊の成立過程を知るためには、まず、現在地球上に生息するウナギの類縁系統関係を明らかにする必要がある。

そこで、本研究では 1993 年から 1998 年にかけて世界各地よりウナギ計 1736 個体を採集した。これらの標本を形態学的に解析するとともに、全種についてミトコンドリア DNA 部分塩基配列の決定を行った。得られた約 2500 塩基を分子系統学的に解析したところ、ウナギの中ではボルネオ島東岸にのみ生息する *A. borneensis* が最も古い系統であり、ウナギは地理分布に対応する 4 つのグループ（オセアニア群、熱帯太平洋群、インド-太平洋群、インド-大西洋群）に分かれることがわかった（図 3）<sup>1,2)</sup>。

これらの結果を生物地理、古環境および化石記録などの知見と合わせ、ウナギの分布拡大に関する「テーティス海仮説」を提示した<sup>1,2,3)</sup>。すなわち、5000 - 6000 万年前に現在のインドネシア付近に出現したウナギの祖先種は、当時存在したテーティス海を通過して直接北大西洋に侵入したため、現在の地理分布が成立したと考えられた（図 4）。また、ウナギの種分化に大きな役割を果たしているのは、レプトケファルスによる受動的な分散であると推察された<sup>3)</sup>。さらに、大回遊を行う大西洋ウナギ 2 種とニホンウナギは、それぞれインド洋と太平洋の熱帯ウナギと祖先を共有することも明らかになった。

### 熱帯ウナギの産卵・回遊生態

親と全く異なる特異な形態をしたレプトケファルスや、形態的に未発達であるシラスウナギの同定は極めて難しい。特に複数種が同所的に出現する熱帯海域では、正確な種レベルの同定はほとんど不可能である。そこで、上記研究により得られた塩基配列データによるウナギの種判別を試みた。これによりインドネシア・スラウェシ島に接岸するシラスウナギの種組成を調べたところ、ここには 3 種が接岸することがわかった<sup>4)</sup>。これに端を発した一連の研究は、これまで全く知られていなかった熱帯ウナギの初期生活史を次々に解明している<sup>5)</sup>。さらに、1995 年-2002 年にかけて、東京大学海洋研究所研究船白鳳丸とインドネシア科学院調査船バルナジャヤ 7 により、南太平洋とインドネシア周辺海域において計 5 回のウナギ産卵場調査航海を実施した。得られた標本を遺伝子により種査定したところ、これまでわずか 16 個体しか報告されていなかった南太平洋のウナギレプトケファルスに、新たに 5 種

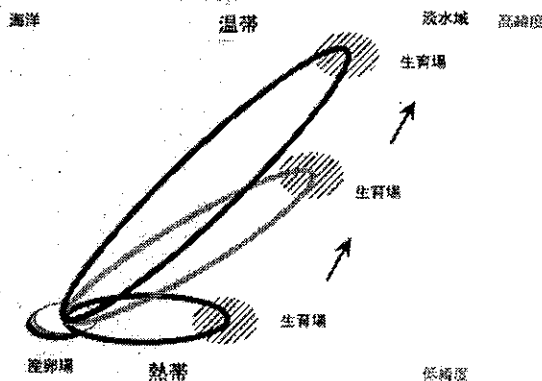


図 5 ウナギの大回遊の進化

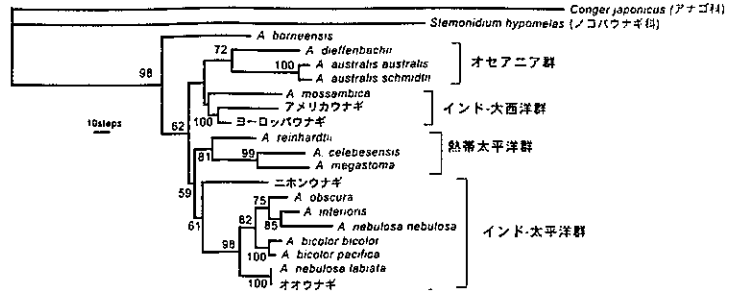


図 3 ウナギ属魚類の分子系統

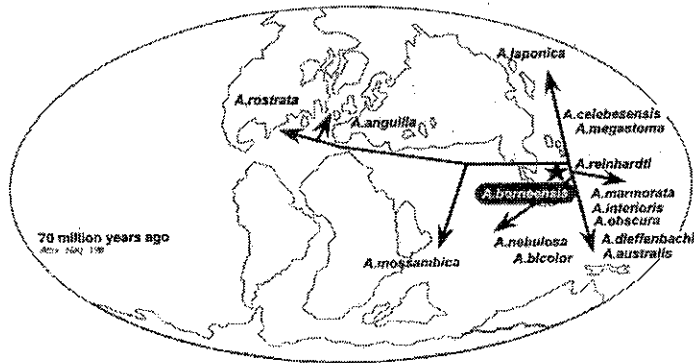


図 4 ウナギの分布拡大に関するテーティス海仮説

63 個体を記録することができた<sup>6)</sup>。さらに、体長 10mm 前後の小型のレプトケファルスが採集されたことから、*A. borneensis* がセレベス海に、また *A. celebesensis* がセレベス海とスラウェシ島のトミニ湾に産卵場を持つことが明らかになった。これら 2 種がそれぞれの沿岸に生育場を持つことから、両種の産卵回遊は数十から百キロ程度の短いものであることが示された<sup>7)</sup>。また、*A. celebesensis* は複数の産卵場を持ち、遺伝的に異なる地域集団を形成している可能性も示唆された<sup>8)</sup>。

最も古い系統と考えられる *A. borneensis* やその他の熱帯ウナギが局所的な回遊を行っていることから、熱帯に派生したウナギの祖先種も、生育場の近くに産卵場を持ち小規模な回遊をしていたものと推察される。ウナギの大回遊

は温帯種でのみ報告されており、本研究の結果からこの回遊特性は多系統的に派生したものであることが明らかになった<sup>2)</sup>。これまでの知見から、ウナギがすべて赤道付近に産卵場を持つことはほぼ間違いない。したがって、現在の温帯種に認められる大回遊は、レプトケファルス<sup>1)</sup>の海流による受動的輸送によって生育場が序々に高緯度へ広がる一方、産卵場が熱帯に残されたため生じてきた行動と考えられた<sup>7,8)</sup>。

### 種査定法の開発と外来種問題

ウナギは形態的に酷似しており、形態のみによる正確な種判別は困難であることが報告されている<sup>9)</sup>。また近年では、従来の形態学的な分類形質が種内変異を著しく過小評価しており、実際には正確に同定できない個体<sup>10)</sup>が出現することもわかった。このことは、本研究で集積した遺伝子データが有効な分類形質となることを示唆する。さらに、一生を通じて変化することのない遺伝子情報を用いた種判別は、ウナギのようにレプトケファルスからシラスウナギを経て、親ウナギになるという劇的な形態変化を伴う生物には極めて有効であると考えられる。

そこで本研究では、まず、ミトコンドリア DNA16S リボソーム RNA 遺伝子領域の制限酵素切断型多型(PCR-RFLP)分析によりウナギ属全種に適用できる種判別法の開発を行った<sup>11)</sup>。これは上述の塩基配列の比較によるレプトケファルスの種査定に対して、若干精度は劣るものの極めて簡便であり、大量の標本処理を可能とする。また、東京大学海洋研究所では、1998年からウナギの産卵場をピンポイントで特定するための研究航海を実施している<sup>12)</sup>。ここでは、未だ誰も見たことがない天然のウナギ卵を、研究船上で素早く、正確に検出することが望まれる。そこで、遺伝子データベースに基づきニホンウナギの識別に特化したリアルタイム PCR による判別法も開発した<sup>13)</sup>。分子遺伝学的実験手法が日々進歩している今日では、対象となる遺伝子マーカーやその検出法は無数に存在し、実験コストや判別精度、標本数などの条件に応じた適切なアプローチが可能となっている。遺伝子による種判別は、基礎となる情報さえあれば、無限の可能性を秘めている。本研究で構築したデータベースは、将来的にも極めて利用価値の高いものであると考えられる。

近年、わが国に輸入される外国産ウナギの量は飛躍的に増加している。これに伴い、本来日本には生息しないウナギが、各地の水系から報告されるようになった。これら外国産ウナギが日本の河川・沿岸の生態系に与える影響は全く未知の状態であり、移入した外国産ウナギの実態把握が緊急の課題となっている。そこで、本研究により開発した PCR-RFLP による種査定法を用いて、我が国の様々な水系から採集したウナギ 595 個体の種判別を実施したところ、2 県 3 水系で計 3 個体のヨーロッパウナギが認められた。さらに、1997 年に新潟県・魚野川で捕獲されたウナギ計 46 個体を解析したところ、これらはヨーロッパウナギ 42 個体、アメリカウナギ 1 個体で、ニホンウナギはわずか 2 個体であることがわかった<sup>14)</sup>。加えて、1997-1998 年に東シナ海男女群島沖 70km で採捕された産卵回遊中の銀ウナギ 52 個体にヨーロッパウナギ 1 個体が含まれていることも明らかにした<sup>14)</sup>。これらの結果は、我が国の天然水系に外国産ウナギが生息しており、少なくともその一部は成熟して降河回遊を行っていることを初めて明らかにしたものである。また現在では、本研究による遺伝子情報に基づく様々なウナギ種判別法が考案され、日本各地のウナギ資源と生態系の保全や、蒲焼き製品の産地表示問題の解決に貢献している。

### おわりに

ここで構築したウナギのデータベースは、全種を網羅する点で未だ世界唯一のものである。さらに、ここには得られた遺伝子データのみでなく、形態学的研究のためのホルマリン標本と遺伝子解析用組織標本が保存され、新たな理論や手法による再解析を可能としている。事実、これらを用いて最近ではミトコンドリア DNA 全塩基配列<sup>15)</sup>やマイクロサテライト遺伝子座に関する情報も集積されつつある。今後、これらに年齢や成長、成熟などの生態学的情報を付加することにより、その応用範囲はウナギの形態学や集団遺伝学のみならずひとつのモデルケースとして魚類学、水産学全体の発展の一助になるものと確信している。

### 引用文献

- 1) Aoyama, J., Nishida, M., and Tsukamoto, K. (2001) Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eel, genus *Anguilla*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 20: 450-459.
- 2) Aoyama J. (2003) Origin and Evolution of the freshwater eels genus *Anguilla*. In *Eel Biology*. (ed. Aida K., Tsukamoto K. and Yamauchi K.), Springer, Tokyo. pp. 19-29.

- 3) Aoyama, J. and Tsukamoto, K. (1997) Evolution of the freshwater eels. *Naturwissenschaften* 84(1):17-21.
- 4) Arai, T., Aoyama, J., Limbong, D., Tsukamoto K. (1999) Species composition and inshore migration of the tropical eels, *Anguilla* spp. recruiting to the estuary of the Poigar River, Sulawesi Island. *Marine Ecology Progress Series*. 188:299-303.
- 5) Arai, T., Aoyama, J., Ishikawa, S., Miller, M.J., Otake, T., Inagaki, T., Tsukamoto, K. (2001) Early life history of tropical *Anguilla* leptocephali in the western Pacific Ocean. *Marine Biology* 138(5), 887-895.
- 6) Aoyama, J., Mochioka, N., Otake, T., Ishikawa, S., Kawakami, Y., Castle, P.H.J., Nishida, M., Tsukamoto, K. (1999) Distribution and dispersal of anguillid leptocephali in the western Pacific revealed by molecular analysis. *Marine Ecology Progress Series*. 188:193-200.
- 7) Aoyama J., Wouthyzen S., Miller M. J., Inagaki T. and Tsukamoto K. (2003) Short-distance spawning migration of tropical freshwater eels. *Biological Bulletin*, 204, 104-108.
- 8) Tsukamoto K., Aoyama J. and Miller M. J. (2002) Migration, speciation and the evolution of diadromy in anguillid eels. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 59, 1989-1998.
- 9) Aoyama, J., Watanabe, S., Ishikawa, S., Nishida M., Tsukamoto, K. (2000) Are morphological characters effective enough to discriminate two species of freshwater eels, *Anguilla celebesensis* and *A. interioris* ? *Ichthyological Research*. 47(1):157-161.
- 10) Watanabe S., Aoyama J., and Tsukamoto K. (2004) Reexamination of Ege's (1939) use of taxonomic characters of the genus *Anguilla*. *Bulletin of Marine Science*, 74(2), 337-351.
- 11) Aoyama, J., Watanabe, S., Nishida, M., Tsukamoto, K. (2000) Discrimination of catadromous eel species, genus *Anguilla*, using PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 16S rRNA domain. *Transactions of the American Fisheries Society*. 129: 873-878.
- 12) Aoyama, J., Ishikawa, S., Otake, T., Mochioka, N., Suzuki, Y., Watanabe, S., Shinoda, A., Inoue, J., Lokman, P. M., Inagaki, T., Oya, M., Hasumoto, H., Kubokawa, K., Lee, T. W., Fricke, H., and Tsukamoto, K. (2001) Molecular approach for species identification of eggs with respect to determination of the spawning site of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*. 67: 761-763.
- 13) Watanabe S., Minegishi Y., Yoshinaga T., Aoyama J. and Tsukamoto K. A quick method for species identification of the Japanese eel *Anguilla japonica* using real-time PCR: an onboard application for use during sampling surveys. *Marine Biotechnology*. In press.
- 14) Aoyama, J., Watanabe, S., Miyai, T., Sasai, S., Nishida, M., Tsukamoto, K. (2000). The European eel, *Anguilla anguilla* (L.), in Japanese waters. *Dana* 12: 9-13.
- 15) Minegishi Y., Aoyama J., Inoue J. G., Miya M., Nishida M/ and Tsukamoto K. Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eels genus *Anguilla* based on the whole mitochondrial genome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. In press.

### **Molecular Approaches for Evolutionary Study and Species Identification of Freshwater Eels**

Jun Aoyama (Ocean Research Institute, The University of Tokyo)

jaoyama@ori.u-tokyo.ac.jp