

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2008～2009  
 課題番号： 20780136  
 研究課題名 (和文) ヤツメウナギ類における成熟機構解明のための分子遺伝学的及び生態学的アプローチ  
 研究課題名 (英文) Molecular genetical and ecological studies for the elucidation of the mechanisms in lamprey maturation.  
 研究代表者  
 山崎 裕治 (YAMAZAKI YUJI)  
 富山大学・大学院理工学研究部 (理学領域)・准教授  
 研究者番号： 30332654

## 研究成果の概要 (和文)：

重要な水産資源であると同時に、進化上重要な位置を占めるヤツメウナギ類について、分子遺伝学および生態学的手法を用いて性成熟決定機構の解明を目指した。分子遺伝学的解析の結果、カワヤツメの回遊型と河川型の間において、成長段階に伴う遺伝子発現パタンの差異が検出された。また、生態学的調査の結果、ヤツメウナギ類の成長や性成熟には餌資源利用を補償する生息環境要因が強く関わっていることが示唆された。

## 研究成果の概要 (英文)：

In order to elucidate the mechanisms of lamprey maturation, both molecular genetical and ecological studies has been conducted. The different gene expression were detected according to the metamorphosis and maturation stages between life histories. Ecological studies indicated the importance of both food resource and water temperature for determination of lamprey maturation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 水産学・水産学一般

キーワード： 増養殖

## 1. 研究開始当初の背景

近年、人為的な環境変化や過剰な漁獲・利用による水産資源の衰退・枯渇が懸念されて

いる。そのような水産資源を持続的に利用するためには、餌生物や生育・繁殖環境の改善や整備を行うと共に、増養殖技術の開発と活用を行うことが必要である。

水産重要種であるカワヤツメ（ヤツメウナギ類）は、食用及び薬用として全国で広く活用されている。しかし、近年カワヤツメの資源が減少しており、その原因として河川環境の悪化が指摘されている。この問題を解決するために、申請者はこれまでヤツメウナギ類における遺伝的集団構造、繁殖形質、そしてハビタット利用など幅広い研究を行っていた。

カワヤツメと同じ遡河回遊性の生活史を持つ魚類においては、神経、ホルモン、そして遺伝子による複雑な性成熟制御機構が存在することが知られている。しかし、ヤツメウナギ類における制御機構は明らかにされていない。

また、ヤツメウナギ類には、寄生性・回遊型と非寄生性・河川型の2つの生活様式が存在し、通常は種によって生活様式は固定されていると考えられていた。しかし、これまでの筆者の研究により、同一種内における生活史多型の出現が明らかになってきている。このことは種分化の直接的な過程の解明に寄与し、生活様式の決定においては、性成熟の開始を司る機構が重要な役割を担っていると考えられている。そのため、性成熟機構の解明は、ヤツメウナギ類における種分化プロセスの解明にもつながることが期待される。

## 2. 研究の目的

ヤツメウナギ類における性成熟機構の解明のために、特に遺伝子による制御機構の解明と自然界において成熟を促す環境要因の特定を目指す。目的達成のために、回遊型の生活史を持つカワヤツメと、河川性のスナヤツメ北方種を用いる。

まず、遺伝子による成熟制御機構の解明においては、変態から成熟までの過程において発現する遺伝子を網羅的に探索し、成熟に特異的な遺伝子の検出を目指す。またこれまでに変態や成熟、あるいは生活史決定に関与することが報告されている遺伝子の構造解析を行う。

次に、自然界における成熟を促す環境要因の特定について、主にモデル生物としてスナヤツメ北方種を対象に研究を進める。スナヤツメ北方種において、成熟（例えば生殖腺の発達）は変態に先駆けて始まると考えられている。ただし、成熟年齢には個体差が存在する。そこで成熟を開始させる要因を明らかにするために、自然河川において定期的な捕獲調査を行い、個体の成長を追跡すると同時に、餌、水質、ハビタットの物理環境などを記録する。個体については標識再捕調査を行うことにより、成熟に至る成長過程を時系列的に把握する。また、スナヤツメ北方種と共存のスナヤツメ南方種の摂餌パターンを調査し、共

存種の存否や生息環境の違いによるパタンの変化を明らかにすると共に、成長や成熟に対する影響を考察する。

そして得られた情報から、成熟機構におけるヤツメウナギ類の独自性と他の脊椎動物における普遍性を明らかにし、脊椎動物における成熟機構の進化を論じる。

## 3. 研究の方法

### (1) 分子遺伝学的アプローチ

#### ①生活史多型間における遺伝的差異

カワヤツメにおいて認められた生活史多型の出現機構を明らかにするために、生活史多型間における遺伝的差異を検出することを目的として、日本列島および周辺地域の河川において採集されたカワヤツメ集団を対象とした集団構造解析を実施した。対象集団として、カワヤツメの一般的な生活史である寄生性・回遊型集団に加え、北海道南部において非寄生性・河川型集団を解析に供した。また、東北地方南部の河川において、ダムに隔離された上流域に生息する非寄生性・河川型の陸封矮小成熟集団および、同流域から1個体採集された寄生性・河川型の陸封大型成熟個体も用いた。

7つの多型的マイクロサテライト遺伝子座を対象として、集団間の遺伝的差異を検出した。またベイズ法に基づく集団構造推定、および長期間と短期間における集団間の遺伝子流動量の推定を行った。またダム上流部に存在する陸封矮小成熟集団の成立年代をGstに基づく換算式を用いて推定した。

#### ②機能遺伝子の構造解析

生活史の違いおよび成長段階の違いにおける遺伝子発現パタンの差異を網羅的に探索するために、河川におけるカワヤツメの寄生性・回遊型、ダム上流域における非寄生性・河川型の陸封矮小成熟個体、およびスナヤツメ北方種の非寄生性・河川型個体について、幼生、変態、そして成熟の各成長段階における個体を採集した。それぞれの個体について、採集した現地において、麻酔後に個体を解剖して脳を摘出し、RNA later を用いて固定した。そして実験室においてtotal RNAを抽出し、mRNAを鋳型とした1本鎖cDNAを合成した。ここからランダムプライマーを用いて2本鎖cDNAを合成を行い、増幅産物に蛍光標識を施した上でDifferential Displayを行った。

また、寄生性・回遊型集団と陸封型矮小成熟集団との間の遺伝的差異をもたらした1つのマイクロサテライト遺伝子座およびその周辺配列を決定し、比較した。またDNAデータベース上において検索し、周辺領域に存

在する遺伝子を探査した。そして該当する遺伝子が検出された場合には、当該遺伝子の配列を生活史型間で比較した。

## (2) 生態学的アプローチ

### ①性成熟を決定する環境要因

ヤツメウナギ類の変態や性成熟決定に影響を与える生態的要因および環境要因を明らかにするために、環境要因の異なるスナヤツメ北方種の生息水域において、複数の調査区を設定し、定期的な生態調査を実施した。調査において、エレクトロフィッシャーを用いて効果的に採集を行うと同時に、採集個体については、計測後に個体標識を付けて現地に放流した。後日、標識個体を再捕することにより、個体の成長を追跡した。またスナヤツメ北方種と南方種は形態的特徴が類似しているため、種判別には遺伝子解析を採用した。定期調査においては、河川環境も同時に計測し、これらを説明変量に用いて、ヤツメウナギ類の変態や性成熟決定に影響を与える要因の特定を試みた。

### ②成長に影響を与える餌資源利用

上記研究により、幼生期の成長率と生息環境が示唆されたことから、スナヤツメ北方種・南方種を対象として、異なる生息環境下における餌資源利用パターン、特に餌選択性を野外調査により調べた。

調査においては、上記と同じ調査区におけるスナヤツメ北方種と南方種の同所的生息地に加え、スナヤツメ南方種の単独生息地においても調査を実施した。各調査地において採集された個体から腸管内容物を採取し、実態顕微鏡下で観察した。主な餌と考えられる珪藻類について、形態的特徴に基づき 12 のカテゴリーに区分し、その資源および腸管からの出現頻度を求めた。また同時に、調査区の底質性餌資源および流下性餌資源を採取し、資源に対する選択性を算出した。

## 4. 研究成果

### (1) 分子遺伝学的アプローチ

#### ①生活史多型間における遺伝的差異

ダム上流部の陸封矮小成熟集団と回遊型集団との間に、有意な遺伝的差異が検出された。この遺伝的差異は主に 1 つの遺伝子座におけるアレル頻度の差異に起因していた。またベイズ法に基づく集団構造推定を行った結果、2 つの遺伝的クラスターの存在が示唆され、概ね上記 2 集団群毎にそれぞれのクラスターに帰属した。

次に集団間における遺伝子流動パターンを推定した結果、長期間においては、いずれの

集団間においても十分かつ双方向の遺伝子流動が認められた(図1)。一方、短期間においては、回遊型集団間においては十分な遺伝子流動が認められたのに対して、陸封矮小成熟集団と回遊型集団間における遺伝子流動はほとんど検出されなかった(図2)。

一方、陸封矮小成熟集団の成立年代を推定した結果、ダム建設年代と概ね一致した。このことから、本水域には、かつては異なる生活史を有する個体からなる集団が存在していたが、ダム建設により、上流部には矮小成熟個体が陸封され、その後は下流部の回遊型個体との交流が途絶えたと推察される。また前者は遺伝的分化を蓄積していることから、種分化における創始集団に相当すると考えられる。加えて、陸封矮小成熟集団において低い遺伝的多様性が示されたことから、将来の種分化成立の可能性を保持するためにも、ダムに隔離された本集団の保全を行う必要性が示唆された。

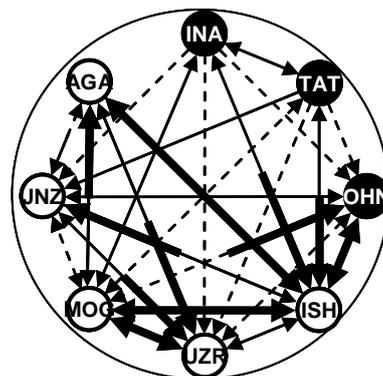


図1. 長期間における遺伝子流動 ( $M$ ).

○: 回遊型, ●: 河川型.

→  $M \geq 10$   
 - - -  $10 > M \geq 5$   
 ···  $5 > M \geq 2$

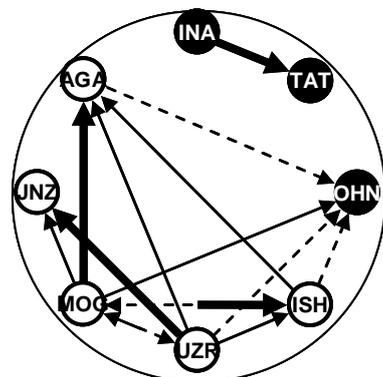


図2. 短期間における遺伝子流動 ( $m$ ).

○: 回遊型, ●: 河川型.

→  $m \geq 0.10$   
 - - -  $0.10 > m \geq 0.05$   
 ···  $0.05 > m \geq 0.02$

## ②機能遺伝子の構造解析

カワヤツメおよびスナヤツメ北方種の各成長段階の個体を対象として、異なる生活史間における遺伝子発現を網羅的に探索した結果、成長段階、特に変態と成熟の段階において特異的に発現している遺伝子が検出された。また、同じカワヤツメでも生活史の異なる個体間では変態時期における遺伝子発現パターンに差異が認められた。

次に、寄生性・回遊型集団と陸封型矮小成熟集団との間の遺伝的差異をもたらした1つのマイクロサテライト遺伝子座およびその周辺配列を決定し、比較した。その結果、陸封型矮小成熟個体において示された配列は、他のカワヤツメ類とは異なるクラスターを形成した(図3)。この差異を生じさせた配列変異の一部は、マイクロサテライト領域における繰り返しモチーフの差異として生じていた。

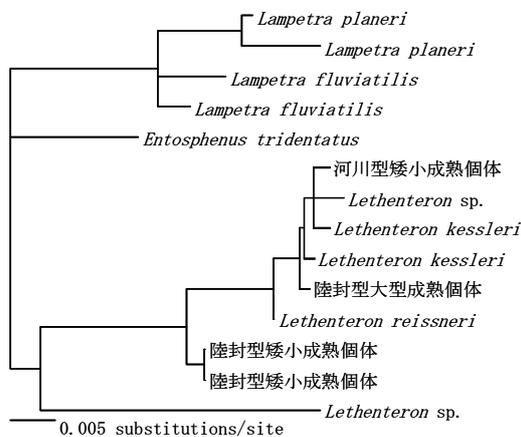


図3. マイクロサテライト配列に基づく分子系統樹

そこで、DNA データベース上において当該配列を検索し、周辺領域に存在する遺伝子を探索した。その結果、当該配列の下流側には、魚類を含むいくつかの脊椎動物において成長、浸透圧調節、産卵制御などに関わることが報告されている複数の遺伝子の相同遺伝子が存在していた。

そのうちの1つの遺伝子前駆体について、構造解析を行った。まず対象となる前駆体を支配する3領域の塩基配列を解読し、アミノ酸配列を調べた。その結果157アミノ酸残基(および終止コドン)が解読された。これをカワヤツメにおいて異なる生活史を持つ個体間および既報の配列との間で比較した結果、アミノ酸配列の差異は認められなかった。同様に近縁種(シベリアヤツメ、スナヤツメ北方種、スナヤツメ南方種)においても解読した結果、アミノ酸配列に違いは無かった。このうち、スナヤツメ南方種と上記他種との系統分岐は古いことが知られているため、当該配列は高度に保存されていることが示唆

される。これに対して、当該遺伝子の発現調整に関わる領域において変異が生じている可能性が考えられ、前記のマイクロサテライト遺伝子座周辺配列が当該遺伝子の発現調節に関わる可能性を検証する必要性が示唆された。

## (2) 生態学的アプローチ

### ①性成熟を決定する環境要因

野外における定期調査に基づき、スナヤツメ北方種の成熟時期を推定した結果、従来の報告とは異なり、11月から翌年2月にかけて繁殖することが明らかになった。このことは、従来の報告が表流水性河川における結果であったのに対して、本研究の調査地は湧水性河川であったことに起因すると考えられる。

また成熟個体の体サイズが、調査区間で異なることが示された(図4)。そこで、これら体サイズの決定機構を明らかにするために、生息地の個体成長や環境要因を調査した結果、幼生期の成長が悪い水域の個体は、成熟時の体サイズが小さく、成熟までに要する年数も多いことが示唆された(図5)。このためヤツメウナギ類の性成熟の決定には、幼生期の成長パターンやそれに影響を与える水温が関与していることが推察された。

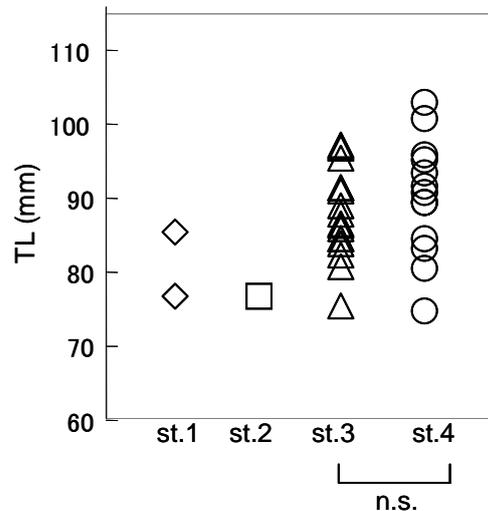


図4. 各調査区における成熟個体の全長。St. 3と4は有意にサイズが大きい。

### ②成長に影響を与える餌資源利用

調査の結果、いずれの調査区においても、腸管内容物と餌資源との間における餌カテゴリーの出現頻度は有意に異なっていた。このことから、ヤツメウナギ類は餌資源利用に対する選択性を有している可能性が示唆された(表1)。また餌利用パターンは調査区間で異なっていた。特に餌資源が豊富な湧水性河川の個体に比べて、餌資源の乏しい河川の個体においては、摂餌量が乏しく、成長に対す

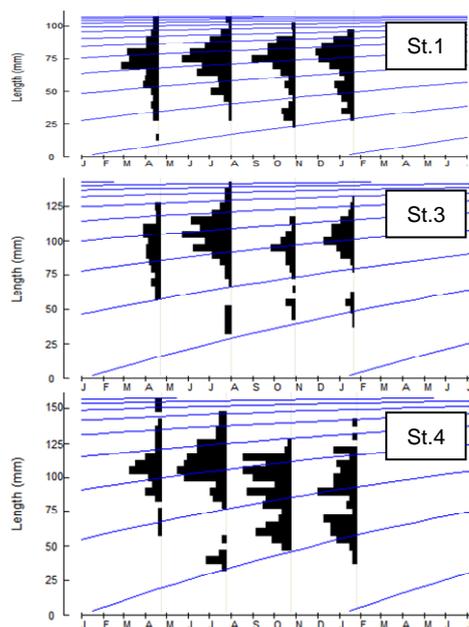


図5. 各調査区における個体の成長. St. 3および4において高い成長率が示されている.

る負の影響が示唆された. さらに湧水性河川において共存するスナヤツメ北方種と餌資源利用パターンが類似しており, 餌を巡る種間競争は乏しいことが考えられた. 以上のことからヤツメウナギ類の成長や性成熟には餌資源利用を補償する生息環境要因が強く関わっていることが示唆された.

表1. スナヤツメ南方種における餌選択性.

餌カテゴリ	P値	選択度指数
菱形類	0.0001	0.313
長方形類	0.0330	0.089
三日月類	0.7378	0.047
楔類	0.1484	0.096
曲り楔類	0.5529	0.069
針類	0.3534	0.152
星形類	0.8551	.
帯類	0.8077	0.007
円形類	0.2012	.
楕円類	0.0038	0.029
たる形類	0.9515	0.052
アウロセイラ類	0.2733	0.030
緑藻綱	0.1320	0.112

以上における分子遺伝学および生態学的研究による成果は, ヤツメウナギ類の保護・保全, 持続可能な資源管理や利用, そして種分化の解明に資するにとどまらず, 脊椎動物における性成熟機構の解明にも重要な示唆を与えるものと評価される.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ①金井聡志, 山崎裕治, 富山県西部の小河川におけるスナヤツメ南方種の摂餌生態, 富山の生物, 査読無, 49, 2010, pp.41-46.
- ②Yokoyama, R., Yamano, A., Takeshima, H., Nishida, M., Yamazaki, Y. Disturbance of the indigenous gene pool of the threatened brook lamprey *Lethenteron* sp. S by intraspecific introgression and habitat fragmentation. Conservation Genetics, 査読有, 10, 2009, 29-43.
- ③Lin, B., Zhang, Z., Wang, Y., Currens, K.P., Spidle, A., Yamazaki, Y., Close, D. A. 2008. Amplified Fragment Length Polymorphism assessment of genetic diversity of Pacific lamprey. North American Journal of Fisheries Management, 査読有, 28, 2008, 1182-1193.

[学会発表] (計4件)

- ①山崎裕治, 長井輝美, 稲葉修, 無顎類カワヤツメ陸封集団における生活史可塑性の検証, 日本生態学会大会, 2010.
- ②山崎裕治, 長井輝美, 横山良太, 後藤晃, カワヤツメ集団の遺伝子流動パターンからみた同所的種分化と遺書の種分化の可能性, 日本進化学会大会, 2009.
- ③山野歩美, 山崎裕治, 同一水系内地点間におけるスナヤツメ北方種の繁殖形質の変異, 日本魚類学会大会, 2008.
- ④長井輝美, 山野歩美, 山崎裕治, スナヤツメ隠蔽種群における初期発生の比較と孵化のメカニズム, 日本魚類学会大会, 2008.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 裕治 (YAMAZAKI YUJI)

富山大学・大学院理工学研究部 (理学領域)・准教授

研究者番号: 30332654