

論文の内容の要旨

水圏生物学専攻
平成8年度博士課程入学
岩下 誠
指導教官 若林 久嗣

論文題目

魚類寄生シュードダクチロギルス亜科単生虫の種分化に関する研究

内容

単生虫は主に魚類の外部に寄生する扁形動物である。多くの種類が記載されているが、一般に近縁の単生虫は特定の宿主群に寄生する傾向がある。これは、宿主の進化にともない寄生虫も進化してきたことを反映していると考えられる。シュードダクチロギルス亜科（以下、本亜科）単生虫は単後吸盤類に属し、*Pseudodactylogyrus* 属と *Pseudodactylogyroides* 属の2属からなる一群である。*Pseudodactylogyrus* 属はアジア地域、パプアニューギニア、オーストラリア、ヨーロッパ、アメリカの6種のウナギ属魚類から7種、日本、中国、オーストラリアの3種のハゼ科魚類から3種の計10種が知られている。一方、*Pseudodactylogyroides* 属は、日本のネブツダイから1種とマレーシアのハゼ科魚2種から2種の計3種が記載されている。このように本亜科の寄生虫は近縁でありながら、系統的にかなり離れた宿主に寄生している。また、ウナギ属寄生種は、ウナギ属の起源とされ、多くの種が分布している東南アジア地域からは見つかっていないことなど、宿主と分布の関係も不連続的である。

ニホンウナギ *Anguilla japonica* 寄生の *Pseudodactylogyrus anguillae* と *Pseudodactylogyrus bini* は元来東アジア地域を天然分布域とする種とされるが、ヨーロッパの *Anguilla anguilla* およびアメリカの *Anguilla rostrata* からも報告され、ヨーロッパでは有害種として問題となっている。これらの寄生虫は近年の

世界的なウナギの輸出入に伴い、寄生虫もその分布を広げたと考えられているが、天然分布であるという説もある。

本論文では本亜科単生虫の形態および遺伝子を用いたアプローチにより系統関係を推定し、さらにその中で宿主範囲と分布域が例外的に広い *P. anguillae* と *P. bini* の2種について、その理由を考察することを目的とした。

1. 形態による系統関係の推定

本亜科を構成する 13 種について、固定標本および文献情報より得られた、交接器と固着器官における 10 形態について検討し、分岐分類法により系統関係を推定した。

その結果、樹長が 12 ステップの 1 つの系統樹が選択された。この系統樹では、まず *Pseudodactylogyroides* 属が、次いで *Pseudodactylogyrus* 属が分岐した。結果として本亜科の 13 種は、*Pseudodactylogyroides apogonis*、マレーシア産ハゼ科寄生の 2 種、ウナギ属寄生種 7 種とオーストラリア産ハゼ寄生種 *Pseudodactylogyrus cooloolensis*、アジア産ハゼ科寄生 2 種の 4 つの群に分けられた。しかし、最も種数の多いウナギ属寄生種とハゼ寄生種を含む群では形質に違いが見られず、種レベルでの系統関係は明瞭に示されなかった。

2. 核酸による系統関係の推定

(1) リボゾーム RNA 遺伝子を用いた系統関係の推定

Pseudodactylogyrus 属 5 種、*Pseudodactylogyroides* 属 1 種、外群としてハゼ科魚類に寄生する単生虫 *Ancyrocephalus mogurndae* と、データベースに登録されている単生虫 2 種と吸虫 1 種について、リボゾーム RNA 遺伝子の 18SrRNA と ITS の 2 つの領域を用いて系統関係を推定した。常法に従い核酸を抽出し、18SrRNA 遺伝子ユニバーサルプライマーと 6 本の内部プライマーを設計し、全領域または相同な約 1870bp の配列を決定した。ITS 領域には 4 本のプライマーを設計し、全領域を決定した。系統解析は近隣結合法と最大節約法を用いた。

その結果、ウナギ属寄生 3 種では 18SrRNA 遺伝子 1975bp が決定された。種間の塩基の変異数は日本産 *A. japonica* 寄生の *P. anguillae* と *P. bini* 間では 1 塩基、*P. anguillae* とオーストラリア産 *Anguilla reinhardti* 寄生の *Pseudodactylogyrus gusevi* とは 7 塩基、*P. bini* と *P. gusevi* 間では 6 塩基であり、ウナギ属寄生種間の違いは少なく、非常に近縁であることが示された。他の種を含めて解析した結果、2 種類の解析法とともに（外群，(*Pseudodactylogyroides apogonis*, (*Pseudodactylogyrus haze*, (*P. cooloolensis*, (*P. gusevi*, (*P. bini*, *P. anguillae*))))という系統樹が構成され、*Pseudodactylogyrus* 属は単系統であることが示された。また、マハゼ寄生 *P. haze* は日本に分布しているが、*A. japonica* に寄生する 2 種とは系

統的に遠いことが示され、分布域と系統関係は一致しない結果となった。

本亜科単生虫 5 種の ITS 領域の配列は、ウナギ属寄生種間では長さにはほとんど差はないが、ハゼ科寄生種および *P. apogonis* 間では最大 128 塩基もの違いが見られた。そのため、ITS1 領域ではアラインメントが著しく不明瞭になり、系統解析に用いることができなかった。*P. gusevi* の ITS2 領域の配列には 2 型が見られ、その距離は *A. japonica* 寄生 2 種間と同程度であったため、一方を *Pseudodactylogyrus* sp. として分けて扱った。

ITS2 領域による系統解析の結果、18SrRNA 遺伝子の結果と異なり、*P. haze* が、属の異なる *P. apogonis* よりも先に分岐したことにより、*Pseudodactylogyrus* 属は多系統関係を示したが、(*P. cooloolensis*, ((オーストラリア産ウナギ寄生種), (日本産ウナギ寄生種))) の関係は ITS2 でも示された。

(2) ミトコンドリア DNA を用いた系統関係の推定

リボゾーム RNA よりも進化速度が速いとされるミトコンドリア DNA の COI 遺伝子部分配列の 383bp を用いて、系統関係を推定した。全配列、第 3 塩基を除いた配列、アミノ酸配列に翻訳した場合の 3 通りについて行った。

第 3 塩基を除いた配列を用いた最大節約法による系統樹以外は、リボゾーム RNA での結果と同様に (*P. cooloolensis*, ((オーストラリア産種), (日本産種))) の関係が示された。異なる遺伝子を用いた場合でも同じ樹形が示されたことから、この関係は確度が高いと考えられる。

3. ウナギ属寄生 *Pseudodactylogyrus* spp. の分布状況

ウナギ属寄生種は淡水産であるので、各地の集団間で隔離が起きていると考えられる。そのうち、*P. anguillae* と *P. bini* は、例外的に広い分布域と宿主範囲をもつ。そこで、これら 2 種を複数の分布域で採集し、虫体の遺伝子組成を比較し、アジア以外に分布する寄生虫は天然分布であるのか、人為的な移入の結果によるものかを調べた。

日本 3 地点、中国 1 地点、台湾 1 地点、ハンガリー 1 地点、デンマーク 1 地点、アメリカ 2 地点で採集された虫体を用い、リボゾーム RNA 遺伝子の ITS2 領域、ミトコンドリア DNA の COI 遺伝子、ND1 遺伝子を決定し、比較を行った。

ITS2 領域では、両種ともにほとんどの地域で同一の塩基配列が得られた。COI では *P. anguillae* で 10 タイプ、*P. bini* は 7 タイプ、ND1 では *P. anguillae* で 10 タイプ、*P. bini* は 9 タイプに分かれた。

それぞれのハプロタイプの出現状況は、*P. anguillae* ではアジア地域で確認された配列と同一の塩基配列がアメリカとハンガリーの虫体からも得られた。進化速度の速いミトコンドリア DNA の塩基配列が同一ということは、これらの

寄生虫がもともとそこに分布していて、長期間隔離されていたとは考えにくい。しかし、アジア3カ国でも共通した塩基配列を持つ個体が見られたため、移入元の地域を特定することはできなかった。一方、人為的影響が及んでいないと思われる屋久島産 *Anguilla marmorata* 寄生の *P. anguillae* は、他地域のものとは独立したハプロタイプであった。このことより、宿主の移動が行われる以前は、それぞれの天然分布域で隔離された集団が形成されていたことが示唆された。

まとめ

形態および遺伝子を用いた系統解析の結果、シュードダクチロギルス亜科単生虫の種分化の道筋が推定された。いずれの解析においても本亜科の種は、おおむね宿主範囲と一致する4つの群に分かれることが示された。そのなかでウナギ属寄生種7種とオーストラリア産ハゼ寄生種 *P. cooloolensis* の群は、姉妹群にハゼ科寄生 *Pseudodactylogyroides* 属を持つことから、ウナギ属寄生種の祖先はハゼ科寄生であったことが示唆された。さらに遺伝子解析の結果より、祖先種は *P. cooloolensis* が分かれた後、ウナギ属に宿主を転換し、*A. japonica* 寄生種祖先と *A. reinhardti* 寄生種祖先に分化したことが示唆された。これは宿主の分化とともに寄生虫も分化した、すなわち共進化の結果と考えられる。また、ウナギ属と *Pseudodactylogyrus* 属の共進化は、極東からオーストラリアに分布するウナギにのみ見られることから、宿主転換もウナギ祖先型がこれらの地域に適応放散していく過程で起こったと推定される。

P. anguillae と *P. bini* については、地域によって同一のハプロタイプが世界各地で見つかった。一方、人為的な魚の移動が行われていない地域の *P. anguillae* は、独立したハプロタイプを持っていたことより、両種が最も広い宿主範囲と分布域を持つのは、宿主の移動の結果と考えられる。

以上、シュードダクチロギルス亜科の成り立ちは、宿主との共進化と宿主転換により現在の種群へと分化してきたと推定されるが、ウナギ属魚種の間では、人為的な活動によって、本来の関係が混乱していることが明らかになった。