

助成番号：2005-2（ハ）河川生態系の遺伝的多様性の保全に関する基礎研究

調査研究の課題「河川生態系の遺伝的多様性の保全に関する基礎研究」

調査・研究の実施内容及び成果に関する報告書

(1) 報告書

京都大学大学院理学研究科 渡辺勝敏

河川生態系の遺伝的多様性の保全に関する基礎研究

要旨

1. はじめに
2. 日本産淡水魚類の遺伝的多様性データベース「GEDIMAP」の構築
 2. 1 遺伝的多様性とは何か
 2. 2 GEDIMAP の目的
 2. 3 基本構成と機能
 2. 4 運用方針
3. 網羅的遺伝的多様性研究の試みと GEDIMAP の活用
 3. 1 網羅的遺伝的多様性研究とデータベース
 3. 2 モデル地域における網羅的遺伝分析の実践
4. 今後の課題と展望
 4. 1 課題
 4. 2 成果の活用

成果の公表の現状

謝辞

参考文献

要旨

生物多様性はあらゆるレベルの生物現象の多様性の総体であり、その中でも「遺伝的多様性」は上位の多様性を支える重要な要素である。河川生態系は生物多様性の重要スポットであるが、河川生物の遺伝的多様性に関する情報は不十分で、かつ散在している。本調査研究は、日本産淡水魚類を対象とした遺伝的多様性の包括的データベース「GEDIMAP」を構築し、既存のデータの集積に加え、あらたなデータを多量に得ることにより、このようなデータベースの河川管理や生物保全における活用方法や環境教育における役割について、具体的な像を提示することを目指した。

GEDIMAP はミトコンドリア DNA (mtDNA) の塩基配列に基づく遺伝的多様性とその分布に関するリレーショナル・データベースであり、塩基配列、集団の地理情報や遺伝子頻度をはじめ、分類体系、河川・湖沼、文献のデータベースが内包され、外部のデータベースともリンクしている。また、検索されたデータに関して、地図の表示や簡易な集団遺伝解析が可能である。2007 年末の時点で mtDNA の塩基配列データを含む出版物は約 100 本あり、現在までに 50%弱、122 種・亜種について約 580 集団、900 配列が登録され、公開されている。

一方、日本の淡水魚類の種多様性のコアといえる琵琶湖-淀川水系と伊勢湾周辺域に生息する 14 種の約 160 集団から計約 1600 個体の mtDNA シトクロム *b* 遺伝子の部分塩基配列を決定し、GEDIMAP への登録を進めた。多魚種の比較解析から、(1) 集団内遺伝的多様性には種ごとにばらつきがあり、(2) 比較的単純と想定された地理構造のもとでも、各魚種はいくつかの異なるパターンに分けられる集団構造を示すこと、(3) 広域分布種において同種の国内・国外外来種の侵入が突き止められることなどが分かった。今後、さまざまな全国的・地域的調査とリンクさせ、生息種の網羅的な試料収集と解析を実現することが課題である。生物の遺伝的多様性分布が把握されることにより、生物多様性の空間構造と歴史性を考慮した流域管理が可能となり、研究機関のみならず、建設・環境・教育行政、市民が情報を共有しながら、河川生態系の保全に取り組むことが可能となる。

GEDIMAP (β 版) URL : <http://gedimap.zool.kyoto-u.ac.jp/>

1. はじめに

生物多様性の保全は世界的な課題であり、日本においても緊急かつ優先的な課題である。河川は生物多様性の重要なスポットであるが、現在多くの人為的な要因により環境変化が進んでおり、その生物多様性も危機にさらされている。生物多様性は「遺伝子から景観まで」といわれるようにあらゆるレベルの生物現象の多様性の総体である¹⁾。その中でも「遺伝的多様性」は各生物の集団の存続や適応の基盤をなすものであり、目には見えにくいながら、上位の多様性を支える本質的に重要な生物多様性要素である²⁾。したがって、河川生物の遺伝的多様性の把握・管理は、本来、河川生態系の保全のために必須である。しかし、そのような情報が得られている生物群はわずかであり、その情報も散在している。今日、遺伝的多様性の意味と重要性を広く啓発し、それを踏まえた河川生物とその環境保全を推し進めるための情報・教育基盤が必要とされている。

本調査研究では、第一に、河川の生物多様性の現状を記録し、将来にわたって情報を蓄積していくために、単なる生物相データを越えた、遺伝的多様性の全国的なデータベース・システムのプロトタイプを構築することを目的とした。データベースは「GEDIMAP」(Genetic Diversity and Distribution Map)と名付けられ、河川生態系の主要な構成員の1つである淡水魚類を対象にして、現在一定のコンテンツを登録した上で、β版が公開されている。本報告の前半は、まず一般に十分に理解されているとは言い難い「遺伝的多様性」について若干詳しく説明したあとに、このデータベース・システムの概要を紹介する。

一方、これまで遺伝的な分析がなされ、データが公開されている魚種や地域は限定されている³⁾。理想的には魚種・地域網羅的に相互に比較可能な遺伝情報がデータベース上で利用できるのが望ましいが、現実はそのとは大きく隔たっている。そこで、本調査研究では、モデル地域を定め、本州中部の特定地域に着目して重点的なデータ収集を行った。この多種横断的なサンプリングと遺伝分析の戦略を概説し、得られたデータから導き出せる学術的な、あるいは保全上の知見を簡単に説明する。

以上を踏まえ、最後に、今後、河川生物の遺伝的多様性を踏まえた河川生態系の保全・管理を目指す上での具体的課題や実行可能な戦略についてとりまとめ、さらに網羅的な遺伝的多様性情報が身近な自然・河川環境への見方や理解に与える影響についても考察する。

2. 日本産淡水魚類の遺伝的多様性データベース「GEDIMAP」の構築

2. 1 遺伝的多様性とは何か

2. 1. 1 遺伝的多様性とその意味

生物多様性とは、あらゆるレベルの生物現象の多様性の総体であり、その中には、地域生態系・景観の多様性、生態系を構成する群集内の種や種間関係の多様性、種内の地域集団間の多様性、そして集団内の個体間の多様性が含まれる。地球上には1000万種ともその10倍ともいわれる生物種が存在し、それらの形態、生態、行動、生息場所、種間関係は実に多様・多彩で、変化に富む。生物は30数億年前の誕生以来、遺伝情報（DNA）を親から子へ受け継ぎながら、環境との相互作用のもとで今日の多様な世界を作り上げてきた。

生物の多様性の源は、この遺伝情報の継承の過程で生じる「変異」（突然変異）であり、それが進化学的な過程の中で新たな種を生み、ひいては新たな種間関係や環境との相互作用を創出しながら、今日に至ったものである。つまり、遺伝的な変異・多様性は、歴史的な視野のもとでは、すべての生物多様性の源であり、さらに現在みられる種内の地域集団間あるいは集団内の遺伝的多様性は、まさに現在進行中の進化・歴史の主体だということができる。

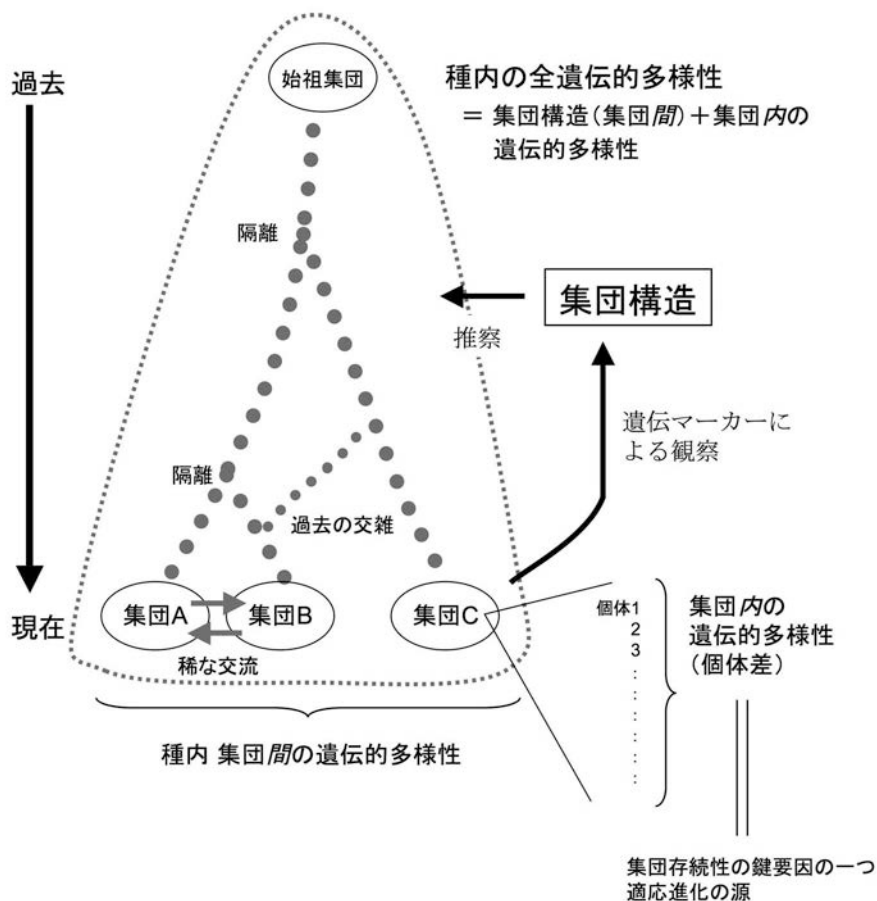
種の多様性は、多くの人にとって、実経験に基づき自然に理解できる対象である。「種」は完全に定義することはできないカテゴリーであるが、一般に「生物学的種概念⁴⁾」、つまり「実際あるいは潜在的に相互に交配する自然集団のグループであり、他の同様の集団から生殖的に隔離されているもの」として認められるグループである。多くの場合、形態や生態・行動から人間が同一なグループとして認識することができる。

それに対して、同一種内の変異・多様性に対する認識は乏しい場合がある。種は一般に起源を一にする複数の地域集団（＝地域個体群）に分かれて、ある地理範囲に分布している（ただし、ある地域で進化（種分化）し、その地域にしか分布しない場合や、広く分布していた種が1つの集団を残して絶滅した場合は、種＝1集団である）。「(地域) 集団」とは、生息場所をともにし、相互に交配が行われるような同種個体の集まりである。この種内の複数の地域集団の結びつきのあり方が「(種内) 集団構造」である。集団構造の中には、種が実質的に全体で1つの集団である場合（構造がない、ともいう）から、すべての集団が隔離されている状態、そしてその中間として、いくつかの集団が稀な個体の移動によって近い関係にあり、いくつかの集団グループを作る場合などが含まれる（図2・1）。集団間の結びつきとは、遺伝的交流の有無と程度である。遺伝的交流がない場合、2つの力（過程）によって集団間には遺伝的な差異が生じる（＝遺伝的分化）。2つの力とは「淘汰」と「浮動」²⁾である（後述）。つまり、集団構造の存在は種内の集団間に遺伝的な多様性を生じる。そして、さまざまな遺伝特性をもつ集団が種内に存在することは、環境変化に対して生き残る集団を含む可能性を増すことにより、種全体の存続性を高める効果がある。

遺伝的な多様性にはもう1つの重要なレベルがある。それは「集団内の多様性」であり、言い

図 2・1 種内集団構造と遺伝的多様性の諸要素

種内の全遺伝的多様性は、集団間と集団内の遺伝的多様性の成分に分けられる。集団間の歴史と現在の遺伝子交流を反映する「集団構造」は分子遺伝マーカーによって観察され、集団プロセスの推定に用いられる。集団内の遺伝的多様性は集団の存続性や進化可能性に影響を与える。



換えると遺伝的な基盤をもつ個体差である（図 2・1）。集団内の遺伝的多様性は 2 つの点で重要である²⁾。1 つは、環境の変化・病気の流行などに対して、それに関連する遺伝特性の多様性が低い集団は絶滅しやすい。つまり、集団の生残（存続性）に影響する。野生生物における病気の流行は、現代人が考える以上に、一般に深刻な問題である（ヒトも実は例外ではない）。2 点目は、1 つ目に関連するが、集団内の遺伝的多様性は適応進化の可能性を高める。現実の集団は、各地域のさまざまに異なった環境に対して、形態・生態形質が微妙に調整されていることが分かってきた（局所適応）。集団内の遺伝的多様性の喪失は、この長期的な集団の存続や進化の可能性を低下させる。

集団内の遺伝的特性は先に述べた「淘汰」と「浮動」の作用で変化する。これによって上記の集団間の遺伝的多様性が生じる。淘汰（自然淘汰）は、ある世代で特定の対立遺伝子（同じ遺伝子座にある別のタイプ；アレル）をもつ個体が相対的に多くの子を次世代に残すことである。そして、その結果、その遺伝子の頻度が集団の中で広がる過程が適応進化である。浮動（ランダムな遺伝的浮動）は、淘汰がはたらかなくても、次世代を残す際のランダムなサンプリング（抽出）の効果によって、世代間で対立遺伝子の頻度が変わる偶然の過程のことであり、集団の個体数が少ない場合に顕在化する。つまり、個体数が少ない場合、偶然の作用が淘汰による適応進化の作用を越えてしまうことがあり、有害な遺伝子が集団に広がることもある（近交弱勢）。

以上をまとめると、種内の遺伝的多様性とは、「集団間の遺伝的多様性」+「集団内の遺伝的多様性」の総和であり、集団構造とは、種の全遺伝的多様性がどのように空間分布しているかと言い換えることができる（図 2・1）。そしてさまざまなレベルの遺伝的多様性は、「進化的な実体」としての集団や種にとって、その存続性や将来にわたる進化可能性の基盤となる本質的な特性であるといえる。

2. 1. 2 遺伝的多様性の種類と計測

集団遺伝学の理論は 20 世紀前半にまず大きく発達したが、野生生物の遺伝的な多様性や差異の計測は 1970 年代以降に技術的に可能になった。このための遺伝マーカー（遺伝標識）としては、アロザイム（酵素タンパク質の電気泳動性多型）から実用が始まり、核ゲノムや細胞内小器官であるミトコンドリアや葉緑体（植物）の DNA に対する制限断片長多型（RFLP）、塩基配列、マイクロサテライト、ミニサテライト・RAPD・AFLP などの DNA 指紋法等、各種のマーカーが現在利用可能となった³⁾。

この中でも、特にミトコンドリア DNA（mtDNA）は、動物において、変異の速度が大きく、母系遺伝性で 1 倍体であること、ゲノムサイズが 1 万数千塩基対（bp）と小さいことなどの特徴から、技術的にも理論的にも遺伝集団解析に適した特徴をもつため、1980 年代以降、それを用いた膨大な研究が行われてきた。同時に、塩基配列データは、DNA を構成する 4 種類の塩基、すなわち A（アデニン）、C（シトシン）、G（グアニン）、T（チミン）の配列であるため、完全にデジタルデータとして、蓄積や比較が容易である。これらの理由と技術的・費用的な状況の改善から、1990 年代以降現在に至るまで、

mtDNA 塩基配列を用いた研究は、淡水魚類等の遺伝マーカーを用いた研究の中心となっている（図 2・2）³⁾。

一方、これまで利用されてきた遺伝マーカーのほとんどすべては、淘汰に対して中立的なマーカーである。厳密にいうと、実際には中立ではない部分を含むが、総じて中立的であることを期待されて、ほとんどの遺伝マーカーは用いられてきた。このことは、前項で述べた「集団の存続性」や「適応進化の可能性」と一見関係のない遺伝マーカーを用いているといえる。逆に適応に関係し、淘汰を受

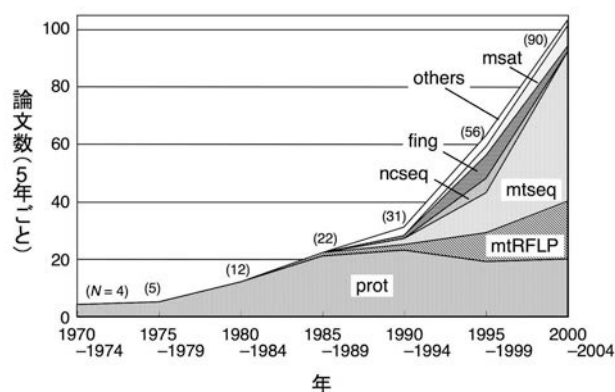


図 2・2 遺伝マーカーを用いた日本の淡水魚類に関する研究論文数（5 年ごと）³⁾

prot、アロザイム等タンパク質電気泳動多型分析；mtRFLP、mtDNA 制限酵素断片多型分析；mtseq、mtDNA 塩基配列分析；ncseq、核 DNA 塩基配列分析；fing、DNA 指紋法分析（RAPD、AFLP など）；msat、マイクロサテライト分析；others、その他。

ける遺伝マーカーとしては、MHC（主要組織適合遺伝子複合体）の多型やその他の特定の形質に関わる遺伝子が用いられることもある。しかし、一般に中立的なマーカーが用いられる積極的な理由としては、淘汰ではなく浮動という一般的に理論化しやすい形質であること、中立マーカーの多様性の大きさは集団サイズ（集団に含まれる個体数）と関係があり、ひいては適応形質の多様性にも関連する場合が多いことなどがある。

つまり、中立マーカーである一般的な遺伝マーカーを用いて測定される遺伝的多様性は、集団の存続性や適応に関して考察する際には十分な注意が必要であるものの、魚種を越えた一般的な適用や比較に適しており、実験・理論・解析上の利点、そしてデータの蓄積といった点から、将来にわたる基礎データとして重要な役割を持ち続けると判断できる。

以上から、次項に述べるデータベース「GEDIMAP」では、魚類において最も多くのデータの蓄積があり、今後も使用され続けるであろう mtDNA の塩基配列データを対象とした。

実際の遺伝的多様性の程度を示す指標としては多くのものがある²⁾。まず、集団内の遺伝的多様性としては、ヘテロ接合度 H （mtDNA のような 1 倍体の場合、ハプロタイプ多様度 h ）、塩基多様度 π 、対立遺伝子数（mtDNA の場合、ハプロタイプ数）、有効対立遺伝子数などがある。集団間の遺伝的多様性に関する指標としては、 D 、 D_A 、 F_{ST} 、 Φ_{ST} 、 G_{ST} 、そのほか遺伝マーカーの種類に応じたさまざまな遺伝距離がある。

2. 2 GEDIMAP の目的

2. 2. 1 淡水魚類における遺伝的多様性情報の解明と把握の必要性

日本には、純淡水魚と通し回遊魚（海と淡水域を行き来する魚類）を合わせて、300 種あまりの淡水魚類が生息する⁵⁾。日本列島は約 2000 万年前（前・中期中新世）に形成し始め、それ以降の地質変動や海水準変動の複雑な影響のもとで、固有性、地域性に富む豊富な淡水魚類相が成立してきた³⁾。

特に一生を淡水域で過ごす純淡水魚類は、その移動・分散が陸水系に限定されるため、地域間の魚類相の異質性や種内の集団分化が著しい。種や亜種の分布レベルで、日本列島の淡水魚類相は図 2・3 のような階層構造をもつことが知られている³⁾。この構造は、北海道石狩平野以西とそれより北の地域で魚類相が大きく二分されること、前者も本州中部のフォッサマグナ周辺を境に東西 2 つ（東日本・西日本）に分かれること、そして西日本は琵琶湖-淀川水系等、固有種が存在する「核」とその周縁域からなること、などを示している。

一方、広い地理範囲にわたり出現する広域分布種もまた、地域的な分化の構造（集団構造）を示すことが普通である。代表的な広域分布種であるメダカは、これまで最も遺伝集団解析が進

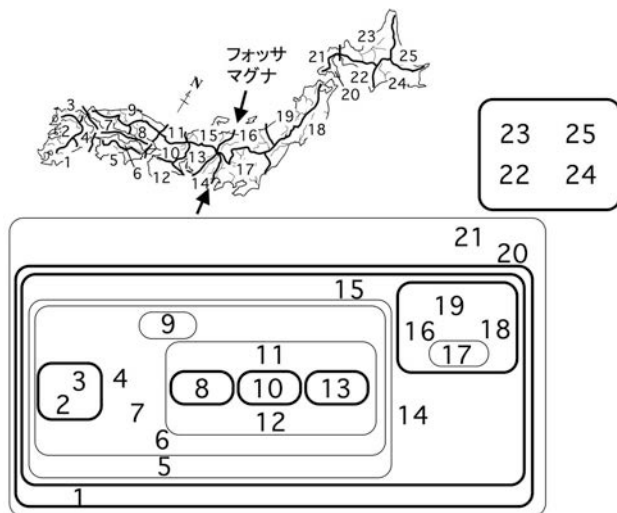


図 2・3 日本の純淡水魚類相の階層構造（地域固有性の最節約分析 PAE に基づく）³⁾

ホトケドジョウ、シマドジョウ、カジカ類、イトヨ等³⁾があり、今後さらに多くの種で見いだされるだろう。

このように身近な淡水魚類にみられる地域的な集団分化は何を意味するだろうか。

まず、分類学的に、あるいは一般的に同一種と扱われている種の内部に、数十万年から数百万年という時間スケールで分化した地域集団が実際には含まれるということである³⁾。我々ヒトの歴史がせいぜい 10～20 万年であることを考えると、分化の大きさがイメージできるだろう。

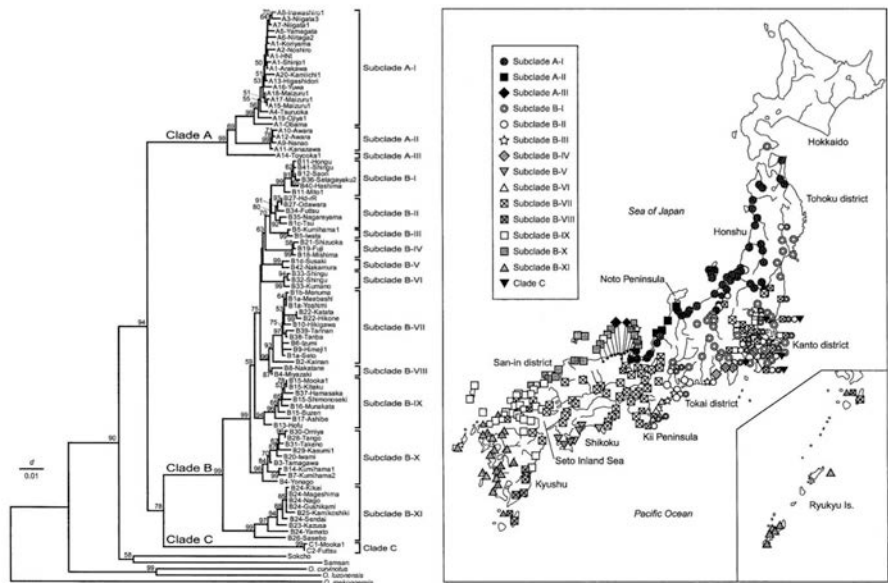
また、保全の単位として、このような集団分化を考慮に入れる必要があるだろう。大きく遺伝的に分化した地域集団間での魚種の人為的な移動は、長い歴史をともなう地域集団を保全するという理念的な観点からも、また想定される地域環境への局所適応を乱すという保全の目的自体に反する点からも、避けなければならない。種内の保全単位については、「進化的に重要な単位 (Evolutionarily significant units; ESUs)」という概念があり、保全単位の認識や設定には、遺伝的集団構造が重要な情報の 1 つとなる²⁾。つまり、すべての地域集団が同等に保全上の優先度をもつわけではなく、できるだけ種全体の多様性を残す上で代表的な集団のセットが高い優先度をもつと考えることができる。

一方、集団の経てきた歴史や、特に近年の人為的な河川環境の改変に関係して、集団内の遺伝的多様性が減少・喪失している場合が知られている (例えば、ウシモツゴ⁷⁾、ミヤコタナゴ⁸⁾、リュウキュウアユ⁹⁾)。集団遺伝学の理論によると、本来の遺伝的多様性が低下するのは非常に大きなボトルネック (集団サイズの縮小) が 1 世代で起こるか (例えば、20 個体以下)、中程度のボトルネックが長期間にわたって起こるかのいずれかである²⁾。すなわち、実際に遺伝的多様性の減少が観察されるのは、非常に大きな影響が集団に与えられた証拠となる。多くの魚類の場合、個体数の自然増加率は高く、年変動も大きい。したがって、いったん集団サイズが小さくな

んだ種の 1 つであり、300 地点以上の個体について解析が進められている (図 2・4)⁶⁾。その結果、一般にメダカ 1 種として認識されていながら、北日本日本海側を中心とする地域とそれ以外の地域のメダカは別亜種あるいは別種レベルで分化していることが分かった。また関東地方には、同等に古く分岐した第 3 の集団の痕跡が mtDNA に残っている。また、それぞれのグループ内にも地域的なサブグループが数多く認識されている。

メダカ同様に非常に古い集団分岐が明らかになっている広域分布種にカワヤツメ類、

図 2・4 ミトコンドリア DNA シトクロム *b* 塩基配列に基づくメダカ分子系統樹と遺伝子マップ⁶⁾



っても、見かけ上は速やかに個体数を回復する場合もあるだろう。しかし、近親交配や進化可能性は、見かけの個体数ではなく、遺伝的多様性のふるまいに関係する有効集団サイズ²⁾が決定するので、実際の個体数のデータに合わせて、野生あるいは飼育集団の遺伝的診断は重要な意味をもつ。遺伝的多様性の長期モニタリングは、鱗サンプルが残っているサケ科などでごくわずかな例があるのみであり、今後の環境変化を考えると、速やかに開始すべきである。

2. 2. 2 GEDIMAP の目的

以上のような背景から、淡水魚類の遺伝的多様性の情報を収集し、研究者のみならず、行政・教育関係者、市民が利用しやすい形でその情報を共有する今日的価値は非常に高い。研究で得られた DNA 配列データは、一般に国際的な DNA データベース（日本の DDBJ、アメリカ合衆国の GenBank、ヨーロッパの EMBL）に登録される。しかし、遺伝的多様性・集団構造・系統地理研究で得られるような、わずかず異なる多数の塩基配列のすべてをこれらの国際データベースに登録することは稀であり、代表的な少数の配列のみが登録されるのが一般的である。また、各集団での遺伝子頻度が記述されることもほとんどない。魚類の mtDNA データに特化した重要なデータベースである MitoFish (<http://mitofish.ori.u-tokyo.ac.jp/>) でも同様である。したがって、ある魚種の地域集団における遺伝的多様性や集団構造を知るために必須である、出現した mtDNA ハプロタイプのすべての塩基配列とそれらの頻度の情報は、オリジナルの文献に当たるしか、入手しようがないのが現状である（ただし、オリジナルの文献にも必要な情報が記載されていない場合もある）。

そこで、そのような情報を入手しやすい形で提供する基盤として、今回、日本産淡水魚類の遺伝的多様性データベース・システム「GEDIMAP」を構築した。

主な目的は以下のとおりである。

- (1) **遺伝的多様性データの集約と提供**：文献や国際データベースに散在する淡水魚類の遺伝的データ (mtDNA 配列) を集約し、誰でも (研究者、環境・建設・教育行政および関連機関、学校、市民など)、出典情報を含め、利用できるようにする。
- (2) **利用環境の整備**：データベース上のデータを利用して、二次的な解析・利用や遺伝的多様性に関する学習を行えるようにする。
- (3) **保全のための情報の発信**：特に、淡水魚やそれを取り巻く流域環境の適切な保全を進めることができるようなデータやその他の情報を発信する。
- (4) **データの蓄積基盤の提供**：将来にわたりデータを追加・蓄積し、遺伝的多様性モニタリングのための基盤を提供する。

本調査研究では、データベースの本体の設計と基本的機能の作成に加え、データの登録を進めながら、β版として公開することを目標とした。

2. 3 基本構成と機能

2. 3. 1 概要

GEDIMAP (図 2・5) は、現在 DELL Dimension 5150c (CPU: Pentium D, 3 GHz; 2 GB RAM)、Window XP 上で走る Apache HTTP サーバ上の SQL 系データベース管理システムで管理されるリレーショナルデータベースであり、主に PHP5 によりプログラミングされている。GEDIMAP には、文献・データベース・未発表データに基づく、日本および周辺域の淡水魚類の mtDNA ハプロタイプ塩基配列や集団の地理情報、ハプロタイプ頻度をはじめ、分類体系、河川・湖沼、文献のデータベースが内包され、外部の DNA データベースなどともリンクしている (図 2・6)。また、検索・選択されたデータに関して、地図の表示や遺伝的多様性指数・集団間遺伝距離の算出等の簡易解析が可能であり、他のソフトウェアのファイル形式でも入出力できる。内外の専門家をはじめ、遺伝的多様性や保全に関心をもつ一般市民や学校・行政関係者等が利用できるような、わかりやすいブラウザ・インターフェースを有している。

GEDIMAP (β版) の URL は次のとおりである：<http://gedimap.zool.kyoto-u.ac.jp/>

GEDIMAP を使用する上での注意・免責事項として、サイトには以下の 4 点が記されている。

- ・本サイトは、学術・生物環境教育・自然環境保全等の目的においてのみ利用できる。
- ・本サイトの所有するプログラム・テキスト・写真等を営利的に二次利用することは固く禁止する。
- ・本サイトにおける学術的情報は、必ずしも正確であるとは限らない。本サイトを利用したこ

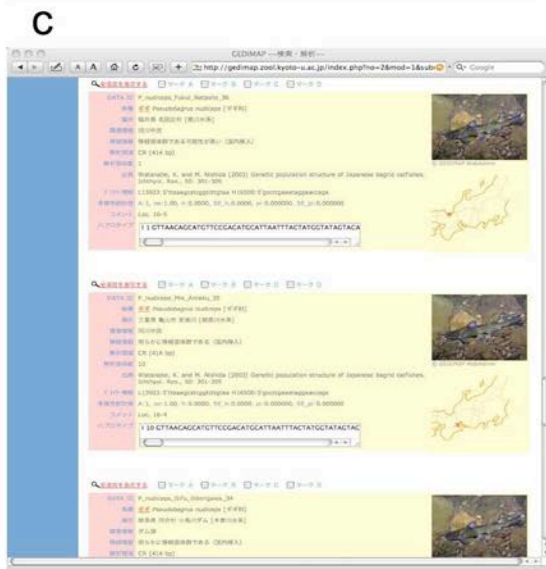
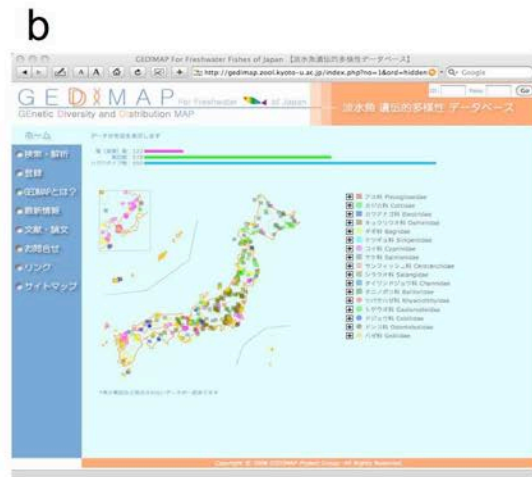


図 2・5 GEDIMAP のトップ画面 (a)、簡易検索画面 (b)、検索結果例 (c)

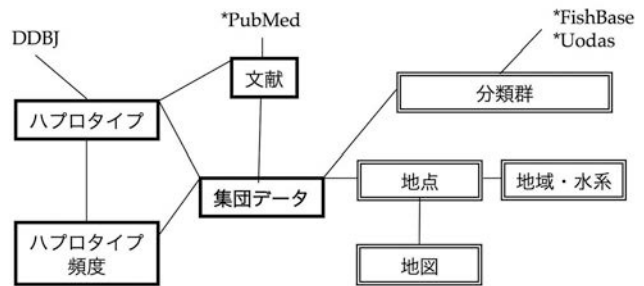


図 2・6 GEDIMAP のリレーショナルデータベースの構成
*対応予定の外部データベース

とによる損失や損害について、本サイトでは一切責任を負わない。

・本サイトの情報を出版物・メディア・ホームページ等で掲載する場合は、必ずオリジナルの出典を明記すること。オリジナルの出典がない場合は本サイト (GEDIMAP) を引用すること。本サイトの引用は、GEDIMAP Project Group. 2007. GEDMAP—Genetic diversity and distribution map for freshwater fishes of Japan: <http://gedimap.zool.kyoto-u.ac.jp> (参照日)。

2. 3. 2 基本構成と機能一覧

GEDIMAP は一般的なインターネットブラウザ (Internet Explorer, Firefox, Safari など) で閲覧することができる (図 2・5)。日本語か英語で見ることができる。以下の仕様は適宜改善のため変更されることがある。

ホームページ (図 2・5a) には画面の上部にタイトルとログインの窓がある。データの登録以外ではログインは不要で、そのまま自由に閲覧・検索・解析等ができる。画面の左側にメニューが並んでいる。

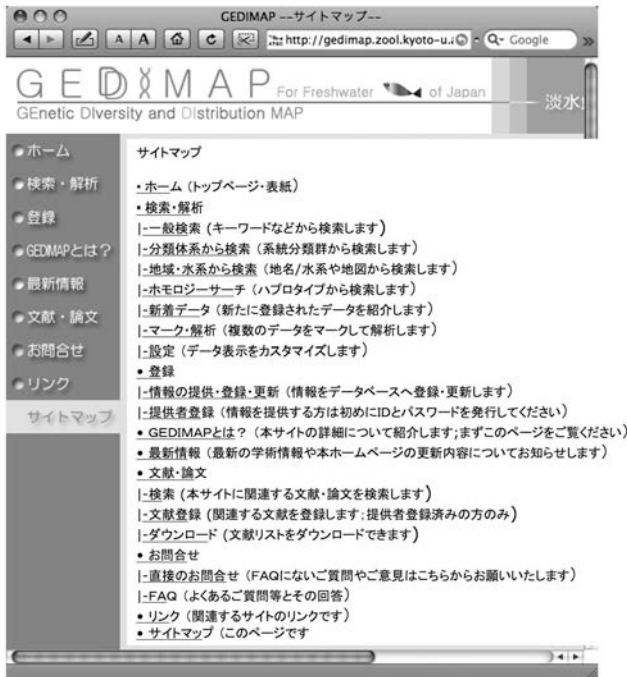


図 2・7 GEDIMAP のサイトマップ

最も簡単かつ直感的にコンテンツに達したい場合には、画面中央の日本地図周辺をクリックするか、左中程の「NEXT>>」をクリックすると、登録データが地図上に科ごとにシンボル分けされて表示される（図 2・5b）。上部には登録データの「種（亜種）数」、「集団数」、「ハプロタイプ数」が表示される。科のリストの前の＋マークをクリックすると、各科の種ごとのリストとプロットが表示され、プロットをクリックすると、該当データが検索・表示される（図 2・5c）。地図上のプロットをクリックすると、その集団についてのデータが検索・表示される。

GEDIMAP のサイトマップを図 2.7 に示す。項目は左メニューに対応している。

〔検索・解析〕は本データベースの中核である。利用は大きく分けて 2 つの段階を含む。まず、「検索」し、必要とするデータを「マーク」するのが第 1 段階である。閲覧するだけであれば、検索するだけで終了である。第 2 段階では「マークデータ・解析」（上のサブメニュー）に移動し、簡易な集団解析や解析結果やデータファイルの出力を行うことができる。

「検索」は大きく 5 通りの方法で行うことができる。

- ・一般検索：キーワード（魚種名や地域など）や解析領域から検索できる。
- ・分類体系からの検索：目、科、属、種（亜種）のさまざまな分類階級から登録データを選ぶことができる。
- ・地域・水系からの検索：日本周辺域を 31 に分割した地域、あるいは水系一覧、湖沼一覧、都道府県一覧から登録データを検索することができる。
- ・新着データ：利用者が指定した日数内に登録されたデータをリストアップする。
- ・ホモロジー検索：利用者の手持ちの塩基配列から種あるいは集団の同定を行うための検索であり、DNA データベースとして必須の機能である。GEDIMAP では「GEDIMAP 内のデータ」と「国際 DNA データベース」の検索のいずれかを選び、実行することができる。GEDIMAP 内のデータに関しては現在暫定版が実装されているのみで、検索できる塩基長や速度の上で制限が大きい。今後 BLAST（一般的なホモロジー検索アルゴリズム）等を実装し、改善する計画である。国際 DNA データベースのデータに対しては、DDBJ の BLAST 検索にデータを送り、結果を得ることができる。

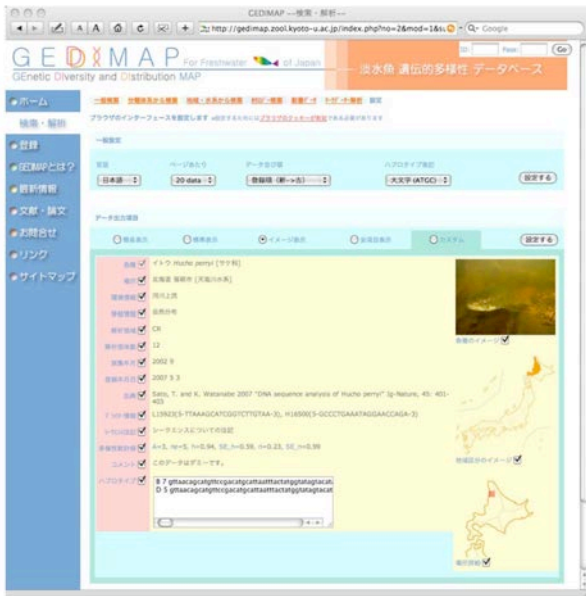


図 2・8 GEDIMAP の検索結果表示の設定ページ画面

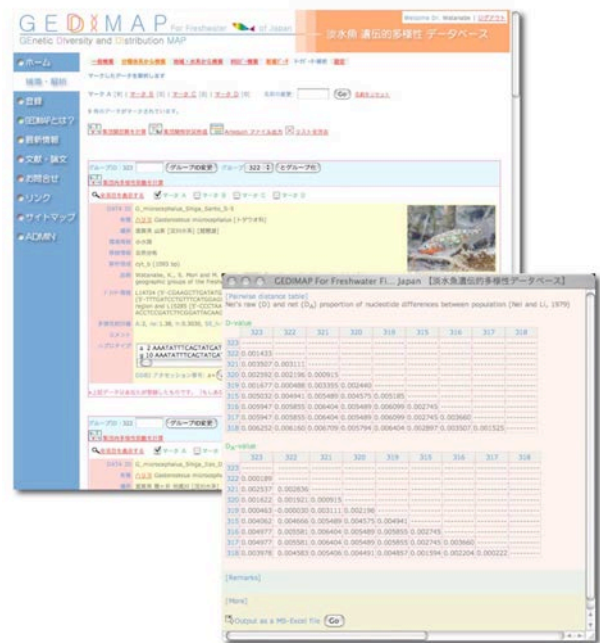


図 2・9 GEDIMAP のマークデータ・解析ページと解析結果（集団間の遺伝的距離）の出力例

さまざまな方法で検索した結果は、「マーク」のチェックボックスをチェックすることで、最大4セットまで別個に保存が可能である。ただし、ブラウザでクッキーを有効にする必要である。

検索結果（図 2.5c）は、簡易表示、地図や写真入りの詳細表示、表示項目を自由に選ぶカスタム表示など、「設定」（上のサブメニュー）から自由に設定できる（図 2.8）。

「マークデータ・解析」では、マークされたデータセットについて、簡易な解析やデータファイルの出力が可能である（図 2・9）。ただし、解析は、現在のところ、アライメントされた（＝相同な塩基座位を複数の塩基配列で揃えた）相同領域であることを前提にしている。明らかにそうでない場合、アラート（注意書き）が出る。またそのほか、解析機能は未完成的な部分が残っている。主な解析機能は次のとおりである。

- ・ 集団の統合（グループ化）：複数の集団（登録単位）をグループ化して、1つの新たな集団として解析する。
- ・ 集団間の距離を計算：集団間の遺伝距離として、塩基置換率（D）と純塩基置換率（ D_A ）¹⁰を計算し、行列表示するとともに、Excelファイルとしてダウンロードができる。
- ・ 集団間樹状図作成（未実装）：集団間の遺伝距離をもとに、集団間の遺伝的類縁関係を示す樹状図を表示する。純塩基置換率（ D_A ）に基づく近隣結合樹を描かせる予定である。
- ・ 塩基配列ファイルの出力（未実装）：マークデータセットに含まれる全シーケンスを重複なしに抽出して、一般的な塩基配列ファイルである FASTA 形式で出力する。利用者は出力ファイルを利用してアライメントや分子系統樹の作成など、さまざま解析を行うことがで

きる。

- Arlequin ファイルの出力：定評のある統合的な集団遺伝解析パッケージである Arlequin¹¹⁾ 用のデータファイルを出力し、ダウンロードできる。

「未登録データの解析」（未実装）は、登録前のデータの事前処理を GEDIMAP 上で行えるようにすることで、GEDIMAP への登録・利用を促進するための機能である。例えば、「塩基配列の生データからのハプロタイプの抽出」、「Arlequin ファイルの作成補助」、そして「DNA データバンクへの登録フォームの作成補助」などである。

【登録】は管理者か登録利用者がログインしたのちに行うことができる。登録ページでは、メインである遺伝的多様性に関するデータのほかに、文献を登録することができる。また登録者情報を変更することができる。

データの登録は大きく2つの方式がある。1つは「ウィザード(対話)」方式、もう1つは「Arlequin 形式 (.arp) からの複数集団データの一括登録+集団情報の追加」による入力方式である。後者は現時点で未完成である。

ウィザード方式によるデータ登録は2つの段階に分かれている。第1段階はハプロタイプ（塩基配列）の登録（「ハプロタイプを登録」）、そして第2段階は集団情報の登録（「集団を一つずつ登録」）である。入力は、クッキーを利用して、同一の指定を極力繰り返さずにすむように設計されている。

「ハプロタイプを登録」からは、科を特定したあと、ハプロタイプを一つずつ繰り返して、あるいは同じ出典の場合にはまとめて一度に登録することができる。塩基のインデル（挿入・欠失）がある場合には、登録時に「-」を入れてアライメントしておくことが強く推奨される。

「集団を一つずつ登録」では、集団の遺伝子（ハプロタイプ）頻度と地理情報、出典、その他の情報を入力する。この情報が GEDIMAP において最も特徴的なデータとなる。1 集団ごとに、種や遺伝子領域、出現ハプロタイプ数、およその塩基長を入力することで、候補となるハプロタイプがドロップダウンリストとして現れ、入力できる。出現個体数を入力することで、ハプロタイプ多様度や塩基多様度などの遺伝的多様性指数が自動的に計算され、データベースに加えられる。地理情報は、目的や希少魚などに対する考慮から、あまり正確さを重視せず、地域区分や水系情報などを基本情報として、それ以上は任意の精度で入力することとした。

「Arlequin 形式 (.arp) からの複数集団データの一括登録+集団情報の追加」（未完成）では、ハプロタイプ配列とその頻度の登録までを arp 形式の入力ファイルから一括して行い、その後、集団の位置情報や出典などの追加情報をウィザード形式で入力する仕様となる計画である。

「文献を登録する」からは、日本産淡水魚類の遺伝情報（mtDNA 以外を含む）が記載された文献の情報を登録することができる。

【GEDIMAP とは？】では、本データベースの基本的な説明とともに、利用方法を研究者およ

び研究者以外に分けて説明している。現在、テキストベースのマニュアルの形式をとっているが、今後、画像を交え、よりわかりやすい、実用的なものに改善していく予定である。

【最新情報】は、最新の学術情報や本ホームページの更新内容について記されている。

【文献・論文】からは、「文献検索」と「文献登録」、文献リストの「ダウンロード」が可能である。

「文献検索」からは、遺伝マーカー（mtDNA 以外を含む）を用いた日本産淡水魚類に関わる各種研究をキーワード検索でき、分類群（科）、分析手法、あるいは登録期間を限定することができる。表示オプションとして、年、著者名や生物群による並び替え、簡易リスト／詳細表示の選択ができる。2007 年末時点で 289 件が登録されている。最も古い文献は 1972 年にさかのぼる。

「文献登録」は登録利用者のみがログインした後に行うことができる。[登録]メニューからも文献登録は可能である。

「ダウンロード」からは、全文献データを Excel や CSV 形式でダウンロードできる。

【お問合せ】からは、質問等を管理者に送ることができる。また、FAQ（よくある質問）に対する回答を記している。

【リンク】では、関連するデータベース、大学研究室、遺伝分析のソフトウェア、その他のウェブページにリンクが張られている。

【サイトマップ】は GEDIMAP のサイト構成と各ページ（メニュー）の簡単な説明が記されている。

【ADMIN】は管理者専用のページであり、データのメンテナンスや問い合わせのチェックなどを管理者が行えるようになっている。

2. 4 運用方針

GEDIMAP を長期的に発展させながら継続するために、現在以下の基本方針で運用を開始しており、今後さらに運用・管理体制を整備していく予定である。

管理・運用は「GEDIMAP プロジェクトグループ」が行い、このグループは、現時点で筆者を総括責任者とし、2 名の主要推進メンバー、1 名の技術補佐メンバーを含んでいる。

基本的な運用方針として、「学術的・社会的な活用と成果」を最大化しつつ、「運用・管理コスト」を最小化することとしている。

「学術的・社会的な活用と成果」を高めるために、本データベースをさまざまな場面で「使える」ものとする必要がある。このために、コンテンツの充実と機能の拡張に加え、活用方法の啓発、他プロジェクトとの連携等を課題としている（第 4 章）。

「運用・管理コスト」については、継続的なファンドの取得を努力するとともに、利用者がデ

ータ登録の一部を担えるよう、核となる研究者との連携を深めていく計画である。また、前述のとおり、GEDIMAP は将来にわたる遺伝的多様性のモニタリングの基盤として活用が可能であり、そのためにも長期的に継続できる低コストな運用を目指している。

GEDIMAP は本助成期間の終了時である 2007 年末にβ版として公開することができた。今後の短期的なタイムスケジュールとして、既存データの入力（現在約 40%）を進めること、そして、未完成の基本機能を完成させることを 2008 年の目標としている。同時に、データベースの機能の拡張（解析、チュートリアルなど）を計画し、実現化を図っていく予定である。

3. 網羅的遺伝的多様性研究の試みと GEDIMAP の活用

3. 1 網羅的遺伝的多様性研究とデータベース

日本産淡水魚類において、先に触れたメダカなど、分布域全域にわたり、詳細な遺伝分析が実施されてきた種は 20 種以上に及ぶ。しかし、それらに用いられた分子マーカーは、アロザイム、mtDNA のさまざまな領域、マイクロサテライトなど、まちまちであり、また地域的なサンプリング精度も異なっているため、定量的に結果を相互比較することは難しい。また、他の多くの種については未だ研究がなされていない。淡水魚類の分布や集団構造は、いくつかの主要なパターンが共有されることも多いが、種・種群の多様化の歴史や生態特性により、異なるパターンも示されている³⁾。日本の淡水魚類相の歴史的な背景や現在の集団構造・保全単位については未だ断片的な知見しかなく、全貌の理解にはほど遠い。

一方、日本には純淡水魚、通し回遊魚を合わせて 300 種あまりが分布するのみであり、主要な水系（1 級水系など）も 100–200 水系と限られている。もし、分類群・地域網羅的に、統一された遺伝マーカーに基づくデータセットが手に入れば、我々は一定の精度で上記の問題についての解答を手にすることができるだろう。最近の遺伝分析技術や機器の発展により、分析量は現実的となった（第 4 章）。21 世紀初頭の現在、かろうじて残された淡水魚類相の歴史情報を、将来にわたり利用可能な形で取得し、蓄積していく必要性は高い。また、GEDIMAP を介してデータを蓄積・共有していくことにより、機関間で協同的な情報収集も可能となるだろう。

以下に、網羅的な遺伝的多様性の解明をめざす先行的な取り組みとして、本州中部をモデル地域とした調査・分析結果を、特に手法に重点を置いて報告する。

なお、本報で示すデータや結果は予備的なものであり、よりデータを増し、詳細な解析を行った後に学術雑誌に報告する予定である。本報の結果自体は未発表データとして、基本的に引用できないものとする。

3. 2 モデル地域における網羅的遺伝分析の実践

3. 2. 1 対象地域

本調査研究では、本州中部の琵琶湖-淀川流域とその東に位置する伊勢湾流域を主な対象とした(図 3・1)。琵琶湖-淀川流域は、日本の中で、固有性、種多様性いずれの点においても随一の淡水魚類相を擁する³⁾。伊勢湾流域は、濃尾平野を中心に高い種多様性を示すとともに、いくつかの地域固有種を擁している。これらの地域は、西日本の東縁部に位置し、かつその淡水魚類相の中核的な位置にある。琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域は、南北に走る伊吹、鈴鹿、布引山系によって隔てられており、この山系は更新世前期(100~150 万年前)に隆起し、両地域の分水嶺となったことが知られている¹²⁾。

淡水魚類相の特徴と地史的情報から、伊勢湾流域の魚類相の成立に関して次のような基本仮説を立てることができる。「更新世前期の山地形成により、伊勢湾流域の魚類相は琵琶湖-淀川水系の魚類相と地理的に分断された。すなわち、両地域にまたがって分布する広域分布種は、それぞれの地域で別々にグループを作り、両地域の集団は約 100 万年前に分化した。」

このような比較的単純な地史的背景と豊富な魚類相をもつ両地域は、網羅的遺伝分析の実践モデル地域としてふさわしいと考えられる。

3. 2. 2 サンプル戦略

遺伝分析の基本戦略は次のとおりとした。

- ・琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域それぞれから、できるだけ多くの地点で淡水魚の DNA 分析試料を得る。
- ・合わせて、可能な限りより西の地域からも比較試料を採取する。
- ・分子進化速度に大きなばらつきがないように近縁グループを対象とし、かつできるだけ多くの種を対象とする。
- ・mtDNA の同じ遺伝子領域、かつ多くの比較データが蓄積されている領域を選択する。

以上から、今回、コイ科魚類 14 種群、の

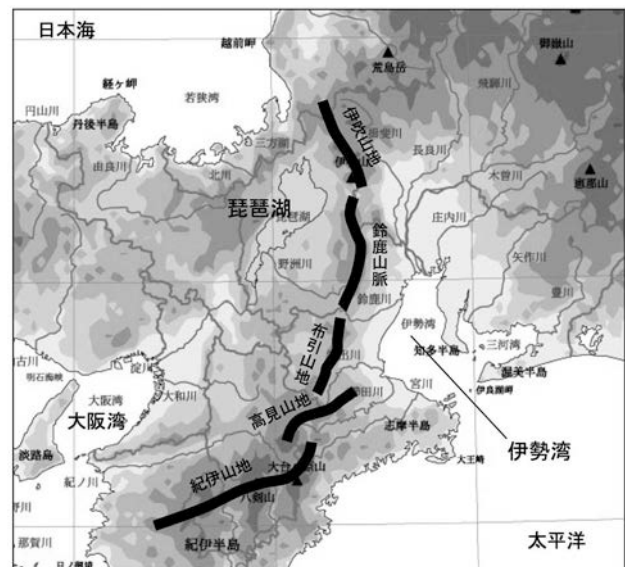


図 3・1 琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域、およびそれらを隔てる山脈

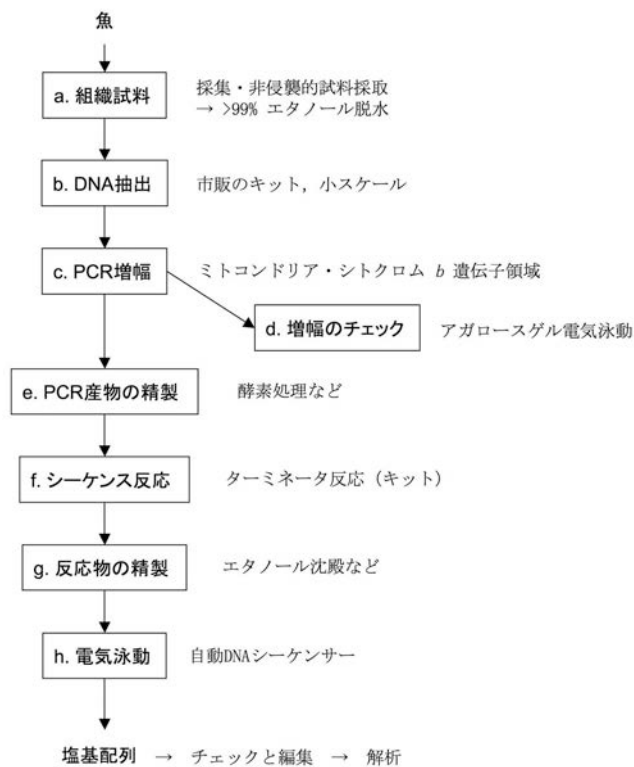


図 3・2 DNA 塩基配列決定の実験の流れ

の小容器でエタノール中に保存した。標本は室温で遮光して保存した。

DNA の抽出時に、DNA サンプルに通し番号を付け、DNA サンプルと試料の情報を対応付けた。DNA 抽出は AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (BioRad) か Wizard Genomic DNA Purification Kit (プロメガ) を用いた (図 3・2b)。抽出には 0.2 mL の 8 連チューブを用い、組織消化時の総量を 100 μ L からはじめ、最終的に 70~100 μ L の DNA 抽出液を得た。

cytb の増幅はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で行い、L14724 (5'-TGA CTT GAA RAA CCA YCG YYG-3') と H15915 (5'-ACC TCC GAT CTY CGG ATT ACA AGA C-3') のペアを用いた。PCR は 8 連チューブもしくは 96 穴プレートを用い、以下の反応液 (総量 12 μ L) で行った: 超純水 6.4 μ L、dNTP (各 2.5 mM) 1.2 μ L、10 \times Ex Taq Buffer (TaKaRa) 1.2 μ L、各プライマー (0.5 μ M) 1.2 μ L ずつ、Ex Taq (TaKaRa) 0.06 μ L、DNA 溶液 0.8 μ L。

PCR は ASTEC 製の 96 穴温度コントローラー (PC808 ほか) を用いて以下の条件で行った: 熱変性 94 $^{\circ}$ C で 2 分間、(熱変性 94 $^{\circ}$ C で 15 秒+アニール 48 $^{\circ}$ C で 15 秒+伸長 72 $^{\circ}$ C で 30 秒) \times 30 サイクル、伸長 72 $^{\circ}$ C で 7 分、冷却保存 (図 3・2c)。PCR 産物は、1%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド溶液で染色後、紫外線を照射して約 1 kbp のバンドの増幅を確認した (図 3・2d)。

増幅に成功した PCR 産物を 2 μ L に、精製用の ExoSAP-It (usb Corp.) を 4 倍希釈したものを

べ 156 地点、1564 個体を分析対象とし (表 3・1)、遺伝マーカーとしては、これまで魚類で最もよく使われ、種内変異も十分に期待される mtDNA のシトクロム *b* 遺伝子領域 (*cytb*) を選んだ (全約 1140 bp のうち後半の平均約 680 bp)。

3. 2. 3 材料と方法

遺伝子分析用の試料としては、99%の合成エタノールで保存した魚体あるいは鱭の一部のサンプルをもちいた (図 3・2a)。魚種の同定に問題がないときには、多くの場合、腹鱭の一部を現場で切除した後、魚は生息場所に戻した。魚体サンプルの場合は、採集後、少なくとも 2 度、エタノールを換え、十分に水分を取り除いた。鱭サンプルは 1.5~10 mL

表3・1 解析した魚種・集団・個体数と集団内遺伝的多様性（ハプロタイプ多様度；h）の種間比較

魚種	琵琶湖-淀川流域		伊勢湾流域		その他の流域	
	集団数 (平均個体数)	h: 平均±標準 偏差 (範囲)	集団数 (平均個体数)	h: 平均±標準 偏差 (範囲)	集団数 (平均個体数)	h: 平均±標準 偏差 (範囲)
カワムツ	6 (7.0)	0.244 ± 0.210 (0.000-0.531)	9 (7.4)	0.528 ± 0.164 (0.219-0.688)	3 (5.3)	0.240 ± 0.251 (0.000-0.500)
ヌマムツ	5 (6.8)	0.422 ± 0.299 (0.000-0.741)	3 (6.0)	0.333 ± 0.289 (0.000-0.500)	2 (9.5)	0.342 ± 0.484 (0.000-0.684)
オイカワ	7 (8.6)	0.720 ± 0.320 (0.000-0.883)	7 (9.0)	0.554 ± 0.192 (0.219-0.757)	3 (10.7)	0.779 ± 0.079 (0.694-0.852)
カワバタモロコ	1 (8.0)	0.000	8 (11.6)	0.441 ± 0.309 (0.000-0.867)	1 (11.0)	0.182
タモロコ	7 (8.1)	0.502 ± 0.158 (0.180-0.688)	10 (7.4)	0.465 ± 0.218 (0.000-0.688)	1 (12.0)	0.417
ホンモロコ	1 (26.0)	0.660	—	—	—	—
ムギツク	6 (10.3)	0.124 ± 0.209 (0.000-0.500)	1 (10.0)	0.000	3 (5.0)	0.290 ± 0.315 (0.000-0.625)
モツゴ	2 (7.0)	0.245 ± 0.346 (0.000-0.490)	8 (7.3)	0.394 ± 0.260 (0.000-0.667)	1 (8.0)	0.469
ヒガイ類	1 (55.0)	0.355	2 (11.5)	0.381 ± 0.404 (0.095-0.667)	5 (12.0)	0.532 ± 0.334 (0.000-0.780)
カマツカ	3 (11.3)	0.717 ± 0.248 (0.444-0.930)	8 (6.6)	0.453 ± 0.325 (0.000-0.815)	2 (5.5)	0.582 ± 0.194 (0.444-0.719)
スゴモロコ類	11 (18.2)	0.424 ± 0.199 (0.215-0.888)	3 (13.3)	0.692 ± 0.065 (0.625-0.756)	5 (13.8)	0.652 ± 0.174 (0.375-0.805)
デメモロコ	3 (15.7)	0.640 ± 0.149 (0.500-0.796)	3 (17.7)	0.177 ± 0.307 (0.000-0.531)	—	—
イトモロコ	3 (9.7)	0.082 ± 0.141 (0.000-0.245)	4 (5.5)	0.094 ± 0.188 (0.000-0.375)	2 (6.0)	0.222 ± 0.314 (0.000-0.444)
ズナガニゴイ	3 (7.7)	0.366 ± 0.404 (0.000-0.800)	1 (12.0)	0.000	2 (11.0)	0.243 ± 0.344 (0.000-0.486)
計	59 (計691個体)		67 (計586個体)		30 (計287個体)	

1 μL 加え、8 連チューブを用いて、温度コントローラーで 37°C30 分、85°C15 分、反応させた (図 3・2e)。それに、超純水 3.8 μL、5×BigDye Buffer (Applied Biosystems) 1.6 μL、プライマー (H15915、0.5 μM) 1 μL、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit Ver. 1.1 (Applied Biosystems) 0.6 μL を混合した溶液 (各計 7 μL) を混合した (総量 10 μL)。それについて、以下の条件で温度コントローラーを用いてシーケンス反応 (ダイ・ターミネーター反応) を行った: 96°C で 2 分間、(熱変性 96°C で 10 秒 + アニール 50°C で 5 秒 + 伸長 60°C で 4 分) × 25 サイクル、伸長 72°C で 7 分、冷却保存 (図 3・2f)。反応後、3M の酢酸ナトリウムと 99% エタノールを 1:16 で混合した液を 28 μL 加え、攪拌後 15 分間静置し、微量遠心分離器 MX-300 (TOMY) の 8 連チューブ用ラックで 25 分間、15,000 rpm で遠心分離した (図 3・2g)。上澄みを完全に除去した後、70% エタノール 100 μL を加え、5 分間、15,000 rpm で遠心分離した。上澄みを完全に捨てて、風乾し、自動シーケンサーでの泳動まで、冷暗所で保存した。

自動シーケンサーとして、ジェネティックアナライザー GA310 (Applied Biosystems) を用いた (ポリマー POP4、Short キャピラリー、通常ラン; あるいは POP6、long キャピラリー、通常ラン) (図 3・2h)。泳動前に 16~20 μL の HiDi (脱イオンフォルムアミド; Applied Biosystems) をサンプルに加え、攪拌後、94°C で 2 分間ヒートショックを行った (必ずしも必要でない)。泳動データは、Sequence Analysis (Applied Biosystems) やその他のソフトで入念に編集し、cytb 後半

の約 600–700 bp の塩基配列を完成させた。

データ解析には、Arlequin v.3.1、PAUP*4.0b などのコンピュータ・ソフトウェアを適宜利用した。今回は主に、琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域の分断が各魚種の集団構造にどのような影響を与えているかに注目し、樹形（ネットワーク）分析を元に結果を概説する^{3,10,11}。地域集団間の分化は、塩基置換率と時間に比例して大きくなる純塩基置換率（Nei の D_A ）¹⁰ によって評価した。

3. 2. 4 遺伝分析の結果と考察

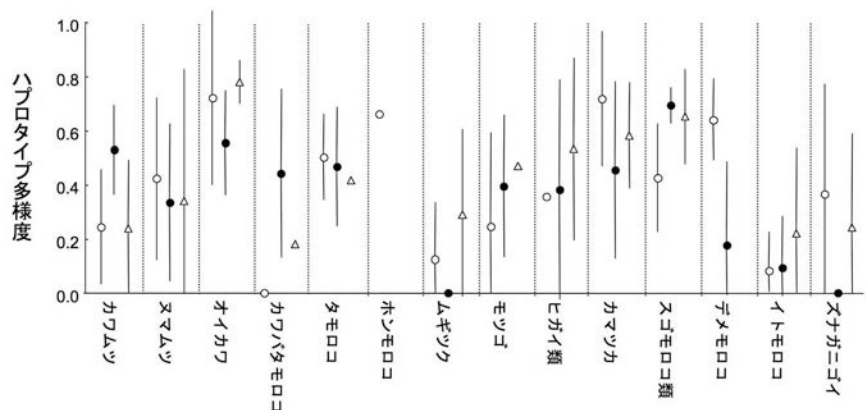
3. 2. 4. 1 集団内の遺伝的多様性

分析対象とした 14 種それぞれの集団内の遺伝的多様性指標値（ハプロタイプ多様度）を図 3・3 に示す。オイカワ、カマツカ、スゴモロコなどが高い集団内多様性をもつものに対し、ムギツク、イトモロコ、ズナガニゴイやその他一部の集団では多様性が低かった。琵琶湖周辺に生息するホンモロコ、スゴモロコ、デメモロコなどの集団では、高い遺伝的多様性を示した。

集団内の遺伝的多様性は、歴史的な集団サイズと正の相関関係がある²⁾。集団サイズは、生息地の大きさ（環境収容量）と関係するほか、個体数変動パターン、繁殖様式などの生態特性、そして人為を含む環境変動に対する感受性などが関係する。琵琶湖集団での遺伝的多様性の大きさは、琵琶湖で歴史的に大きな集団サイズが維持されてきたと考えられることと整合的である。また、近縁種のうち、オイカワに比べて、カワムツやヌمامツでは遺伝的多様性が低い傾向にあったが、これも生息地の環境・広さと関係があるかもしれない。また、ムギツクやイトモロコなど、遺伝的多様性が低い集団は、人為を含め、環境変動の影響で個体数が大きく変動する傾向があるかもしれない。

図 3・3 集団内の遺伝的多様性の種間、地域間比較

ハプロタイプ多様度の平均±標準偏差を、琵琶湖-淀川流域（白丸）、伊勢湾流域（黒丸）、その他（△）ごとに示す。



以上のように、集団内の遺伝的多様性は、集団の個体数の歴史や、それに関わる生態学的・保全生物学的な新たな仮説・着目点を発見するのに役立つ。より比較可能な解析集団数や個体数を増やすことにより、いくつかの仮説は検証しうるだろう。

3. 2. 4. 2 遺伝的集団構造

図3・4~8に分析対象とした14種に関するmtDNAハプロタイプのネットワークと、主要クレード（ハプロタイプ・グループ）の地理的分布を示す。

琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域の分断に関係した集団構造として、以下の5以上のパターンが検出された。

琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域の集団が約1%で分化している種：オイカワ ($D_A = 1.4\%$)、カワバタモロコ (1.6%)、カマツカ (1.1%)、イトモロコ (1.0%) がこれに当たり (図3・4)、モツゴ (0.93%) も国外・国内移植と考えられるものを除けばこのグループに入るかもしれない。両地域で出現するハプロタイプは、基本的に地域ごとにしっかりと固まっている(それぞれ単系統)。なお、カマツカでは10%以上分化した大きな2つのmtDNAグループが見いだされ、そのそれぞれにおいて両地域間で約1%の分化を示す(ここでは一方だけを示している)。

ヨーロッパのコイ科魚類で地史データをもとにキャリブレーション(較正)された、百万年あたり0.76%という分子時計(ペアワイズの分化はその2倍の百万年あたり1.52%)を用いると、上記の1.0~1.6%は66万~105万年と換算され、更新世前期の鈴鹿山脈等の隆起(100~150万年前)にともなう両地域の分断を反映したものと考えられる。

なお、伊勢湾流域のオイカワやイトモロコに稀に出現する琵琶湖-淀川流域型のmtDNAハプロタイプは、その頻度の低さ、分布の不規則性、および琵琶湖産コアユの放流実績から、人為移植の結果である可能性が高い。

1%よりかなり大きな分化を示す種：カワムツ ($D_A = 6.2\%$)、ヒガイ ($D_A = 2.8\%$)、そして今回対象外のゼゼラ(平均配列差異2.5~3.2%)¹³⁾がこれに当たる(図3・5)。これらは上記と同様両地域でそれぞれ単系統であるが、分化の程度が著しく大きい。

この理由としては、「これらのグループで進化速度が速い」、「集団構造・人口学的特性や生態特性が異なるために、大きく分化した結果を示す」、あるいは「より古い分断の歴史を反映する」といったことが考えられるが、今のところ、特定できない。

1%より小さい分化を示す種：デメモロコ ($D_A = 0.74\%$) とスゴモロコ (0.32%) はそれぞれの地域でほぼ単系統的にまとまるが、その分化の程度は小さい(図3・6)。この理由もはっきりとはしない。また、デメモロコのmtDNAは、スゴモロコと共通こそしないものの、後者のハプロタイプネットワークに埋没するほど近い関係にある(図には示していない)。これはそれほど遠

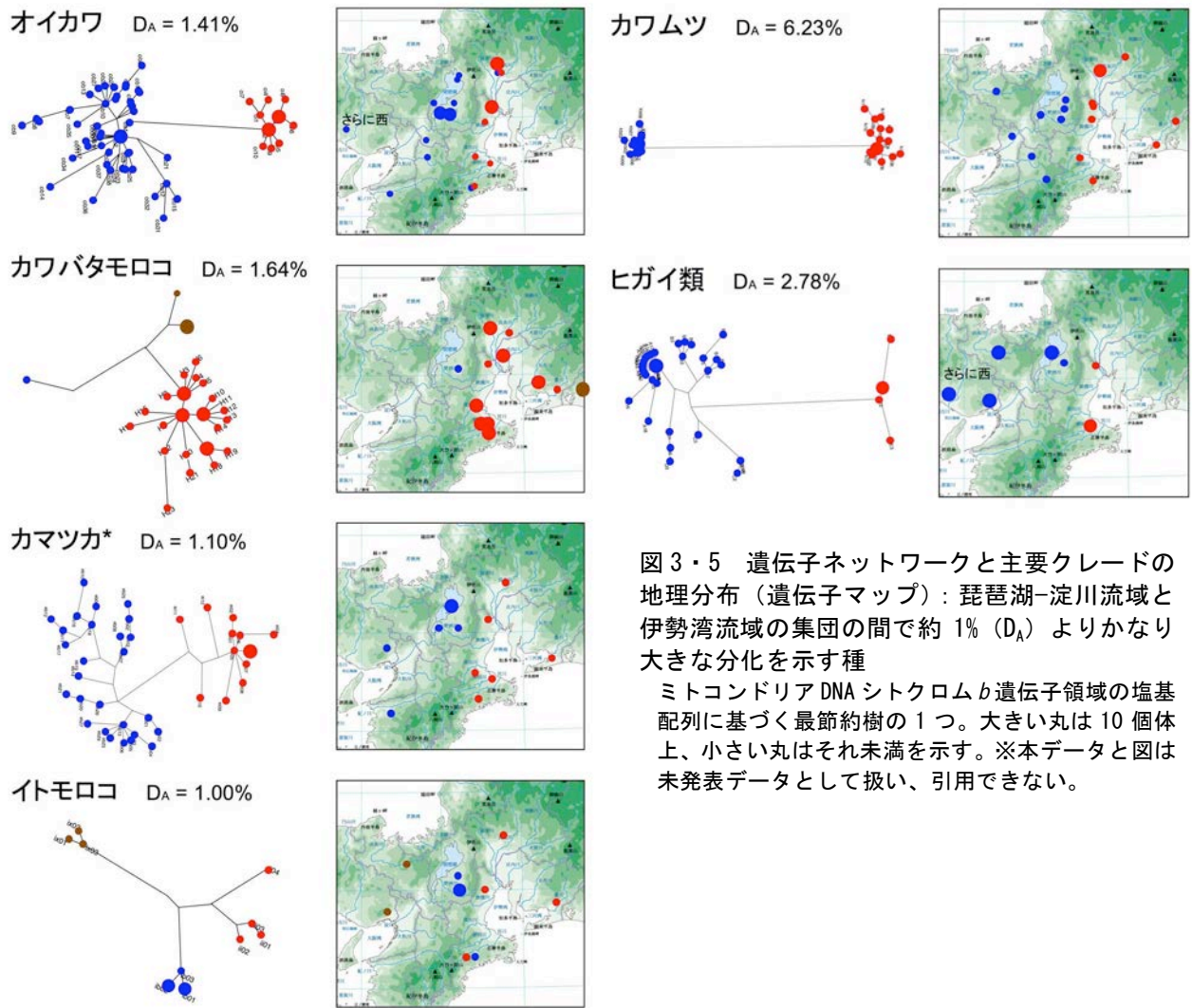


図3・5 遺伝子ネットワークと主要クレードの地理分布（遺伝子マップ）：琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域の集団の間で約 1% (D_A) よりかなり大きな分化を示す種

ミトコンドリア DNA シトクロム *b* 遺伝子領域の塩基配列に基づく最節約樹の 1 つ。大きい丸は 10 個体上、小さい丸はそれ未満を示す。※本データと図は未発表データとして扱い、引用できない。

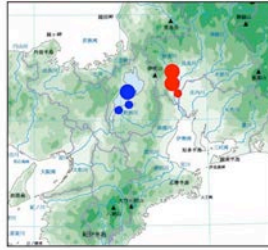
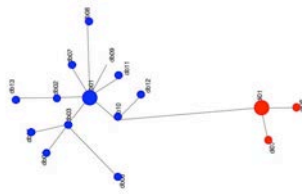
図3・4 遺伝子ネットワークと主要クレードの地理分布（遺伝子マップ）：琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域の集団の間で約 1% (D_A) の分化を示す種

ミトコンドリア DNA シトクロム *b* 遺伝子領域の塩基配列に基づく最節約樹の 1 つ。大きい丸は 10 個体上、小さい丸はそれ未満を示す。カマツカは 10% 以上分化した 2 つのグループのうちの主要な一方のみを示す。オイカワやイトモロコでみられる伊勢湾流域で出現する「琵琶湖グループ（青丸）」は人為移植の可能性が高い。※本データと図は未発表データとして扱い、引用できない。

くない地質時代に両者が交雑したことを示す可能性が高い。スゴモロコでは、伊勢湾流域の各地に琵琶湖-淀川流域のハプロタイプが出現するが、これはオイカワなどと同じ理由から、人為移植の結果である可能性が非常に高い。

琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域の集団で mtDNA グループを共有する種：分布が伊勢湾流域の西部、雲出川などに限られることが知られるムギツクとズナガニゴイでは、伊勢湾流域特有のハプロタイプは現れなかった（図 3・7）。これは、「自然分布であるが、非常に近い地質時代に河川

デメモロコ $D_A = 0.74\%$



スゴモロコ $D_A = 0.32\%$

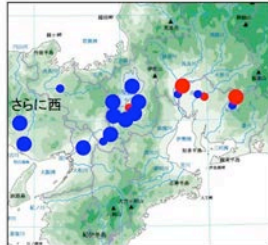
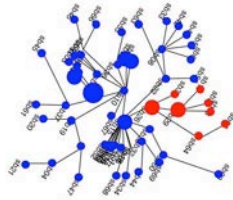


図3・6 遺伝子ネットワークと主要クレードの地理分布（遺伝子マップ）：琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域の集団の間で約 1% (D_A) より小さい分化を示す種

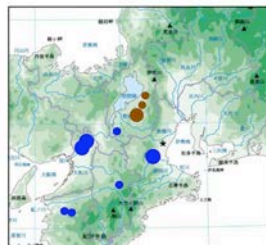
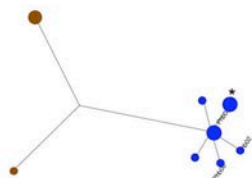
ミトコンドリア DNA シトクロム *b* 遺伝子領域の塩基配列に基づく最節約樹の 1 つ。大きい丸は 10 個体上、小さい丸はそれ未満を示す。スゴモロコにおいて伊勢湾流域で出現する「琵琶湖グループ（青丸）」は人為移植の可能性がある。※本データと図は未発表データとして扱い、引用できない。

争奪などにより、分布を広げた」、「伊勢湾流域における局所分布が人為移植による」、あるいは「自然分布であるが、移植集団と置き換わった」などの理由が考えられる。これまでの情報からは最初の理由がもっともらしいが、より詳しい研究が必要である。一方、ズナガニゴイにおいて琵琶湖東岸の集団と伊勢湾流域の集団が同様のハプロタイプを示すのに対し、ムギツクでは琵琶湖東岸に大きく分化したハプロタイプが見られる。これらの集団構造の違いは今後の研究課題である。

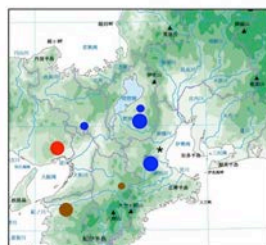
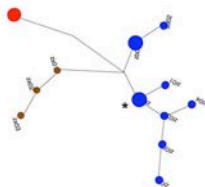
タモロコ類は上記 2 種とは全く異なるが、伊勢湾流域に現れる mtDNA グループが隣接する湖東を中心に分布を広げているために分布域が重なるので、このカテゴリーに加えた。また、琵琶湖-淀川流域のハプロタイプにより近いが大きく分化した mtDNA グループがあり、琵琶湖固有種のホンモロコのほとんどがそれをもっている。タモロコとホンモロコの間には、ごく一部で mtDNA の異種間遺伝子浸透が見いだされた。またタモロコ類の 3 つの mtDNA グループの分化は非常に大きく、上記のカワムツ以上の種内変異である。

その他の種：ヌمامツは、上記のデメモロコなどと似て、琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流

ムギツク $D_A = 0.21\%$



ズナガニゴイ $D_A = 0.18\%$



タモロコ類 $D_A = 4.5\%$

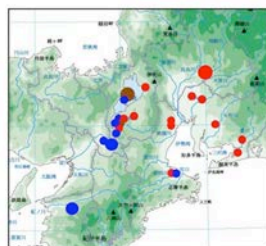
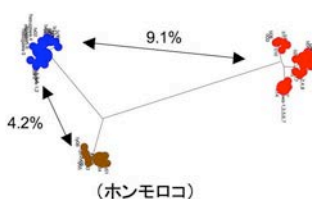


図3・7 遺伝子ネットワークと主要クレードの地理分布（遺伝子マップ）：琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域の集団の間で mtDNA グループを共有する種

ミトコンドリア DNA シトクロム *b* 遺伝子領域の塩基配列に基づく最節約樹の 1 つ。大きい丸は 10 個体上、小さい丸はそれ未満を示す。※本データと図は未発表データとして扱い、引用できない。

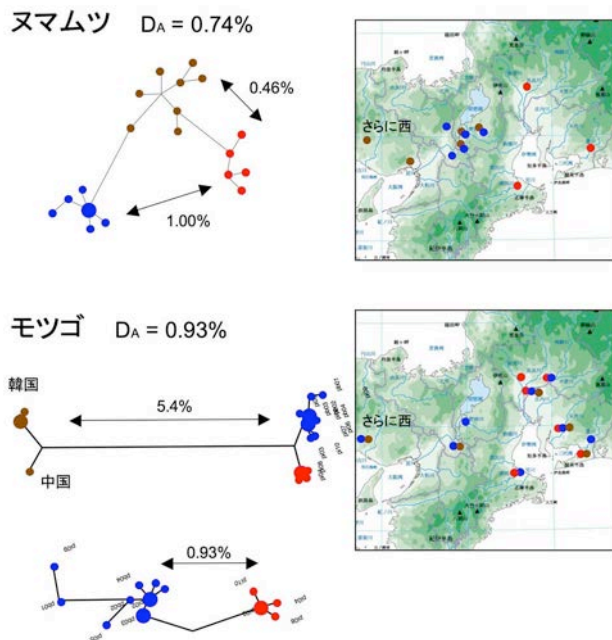


図 3・8 遺伝子ネットワークと主要クレードの地理分布（遺伝子マップ）：その他の種

ミトコンドリア DNA シトクロム *b* 遺伝子領域の塩基配列に基づく最節約樹の 1 つ。大きい丸は 10 個体上、小さい丸はそれ未満を示す。モツゴでは中国・韓国それぞれから得られたハプロタイプと一致するものが得られ、「国外移植」の結果と考えられる。それ以外に約 1% の分化を示す 2 つのグループがあるが（下のネットワーク）、伊勢湾流域では大きく混在し、「国内移植」の結果である可能性が高い。※本データと図は未発表データとして扱い、引用できない。

域の集団で 1% より小さい分化を示すが ($D_A = 0.74\%$)、琵琶湖-淀川流域に大きく分化した 2 つの mtDNA グループが同所的に出現する (図 3・8)。より広域・高精度の系統地理分析が必要である。

モツゴは上記のように約 1% の分化を示す mtDNA グループが存在するが、伊勢湾流域に、琵琶湖-淀川流域に出現するハプロタイプが多数出現する (図 3・8)。人為移植の結果である可能性が高い。さらに、5% 以上の分化を示す別のハプロタイプが両地域ともに現れる。それらは韓国と中国それぞれの標本からのハプロタイプと完全に一致した。以上から、モツゴは、国内、国外からの移植の影響を大規模に受けているようである。mtDNA 解析は、十分な基礎データがある場合には、同種内の移植の影響を検出する非常に有効なツールだといえる。

3. 2. 5 実践からの一般的教訓

今回の解析から、網羅的遺伝的多様性解析に関して、大きく 4 つの一般的な教訓を得ることができる。

(1) 集団内の遺伝的多様性には大きなばらつきがあるが、種や生息環境によって一定の傾向もありそうである。多くの種の集団を解析することで、遺伝的多様性の大きさの決定要因が推察でき、それに対する人為の影響をより合理的に抽出・分離することも可能になるだろう。

(2) 比較的単純な地史背景にあると考えられた地域でさえ、魚種によって異なる集団構造のパターンを示すことが明らかになった。これは、地域生物相が、我々の今日の知見に基づく予想を大きく超えて、さらに複雑な歴史的背景のもとで成立してきたことを示し、またデータの蓄積によって、より深いレベルでそれらを理解していくことが可能であることも示唆する。

(3) 上にも関係して、身近でよく知られ、また比較的研究が進んでいる淡水魚類であっても、隠蔽種や大きな種内分化がまだ未解明のまま残されている事実が明らかになった。これは、学術的な関心を越えて、広く我々が日本の生物やその多様性をどう理解するかに関わる問題であり、

逆に知らないままに貴重な自然・資源・情報を失いつつあることにもつながる。

(4) 試料採集を短期間のうちに十分に網羅的・体系的に行うことは困難であり、今回もサンプリングが不十分な種が残っている。しかし、解析する種や地域の網羅性は、生物多様性の理解や保全において本質的に重要な要素であり、大きな課題である。

4. 今後の課題と展望

4. 1 課題

GEDIMAP プロジェクトが目指す究極的な目標である「(淡水魚類の) 遺伝的多様性の網羅的かつ経時的なモニタリング・システム」を実現していくためには、今後、大きく5つの側面について、充実、発展、前進させていかなければならない。

課題1. GEDIMAP の充実と啓発：前述のように、GEDIMAP 本体は現在β版であり、予定されているいくつかのウェブ上の機能が未完成である。今後、研究者、関連行政、市民にとって、より「使える」システムとして充実させていく必要がある。

また、コンテンツの充実のためには、既存のデータの入力作業を進めるとともに、その対象を文献から国際DNAデータベース、および研究者の私蔵データにまで広げる働きかけを進めていくことが有効である。今回の実践結果を含む新たな研究成果を継続的にコンテンツに加えていくこと、そして今後、成果を論文の形で公表する研究機関「以外」からのデータ、つまり行政、調査会社、学校における実習などからのデータを広く GEDIMAP に集約させ、効果的な社会還元につなげていくことも挑戦的な課題である。

課題2. 体系的な試料収集の戦略：淡水魚類（および一般に野生生物）の自然集団の多くが人為的な理由により急速に消失しつつある現在、遺伝的多様性・集団構造を含め、現在の自然集団の姿を調査し、記録していくことは、我々の最低限の責務であるし、消失に歯止めをかける上でも有効な根拠となる。日本には純淡水魚、通し回遊魚を合わせて300種あまり（純淡水魚は100種以下）が分布するのみであり、主要な水系（1級水系など）も100〜200水系と限られている。しかし、これらからのサンプルを体系的・網羅的に収集することは、一定以上の規模の協力体制がない限り、少なくとも短期的には難しい。

同時代的（例えば今後10年以内）に、十分に体系的な試料収集を行うためには2つの有効な戦略がある。まず、1つには分散的な試料収集ネットワークの構築である。これは、関連する研究者や機関、調査機関、市民団体等に広く呼びかけ、それらの可能な範囲での協力をコアとなるグループが束ね、保存瓶、保存液、郵送費などの最低限の供給を、実態に合わせてコア・グループが保証するという形態となるだろう。問題点としては、牽引力を維持するのが難しく、実際に

必要とされる成果レベルに、特に体系性という面で達しない可能性がある。またその場合の責任の所在が不明確である。しかし、現在、多くの機関・団体・個人が各所で淡水魚類の調査・採集を行っているので、きめ細かな情報収集という点ではこのような協力体制・ネットワークづくりは非常に重要である。

もう1つの戦略は、すでに存在する全国的な試料収集のシステムを活用することである。このような既存のシステムとしては、国土交通省が行う「河川水辺の国勢調査」¹⁴⁾がある。その調査では、1993年より、5年を1巡として、国の管理する全国の河川・湖・ダム湖周辺を中心に、淡水魚類を含む生物の大規模な採集調査が体系的に行われている。この際に少なくとも一時的に採捕される魚の鱗の一部を100%エタノールに保存するだけで、それらはDNA分析が可能な試料となる。それらの遺伝分析を行うことにより、種の正確な同定や、自然分布と人為移植の区別（後者の場合、その由来の推定）、地域集団の遺伝的診断（多様性の減少の有無）等を行うことができ、将来的にも比較が可能となる。「河川水辺の国勢調査」の意義や成果を今後いっそう高めていくためには、これまでの種の分布の有無や半定量的な生息量データとともに、遺伝子試料の収集を組み入れていくことが、低コストで、かつ将来にわたる重大な成果をもたらす事業改善の1つであり、今後是非考慮することが望まれる。

以上の2つの戦略が相補的に機能することで、解析とは異なって、現在しかやりえない、現時点での試料収集が実現されると考えられる。

課題3. 遺伝分析戦略：試料収集とともに、現実的かつ効率的な多量の遺伝分析の戦略も求められる。これには、遺伝マーカーの統一、分析手法の低コスト・効率化、データの保存・蓄積、分析体制の確立が含まれる。

(1) 遺伝マーカー：まず、遺伝マーカーとしては、デジタルデータで蓄積性の高い塩基配列データが好ましい。塩基配列はACGTの4塩基の配列であり、アライメントという作業を介して、相同な（＝部分的に塩基置換が起こっていても起源が同じ塩基座位どうしの対応が付いた）遺伝子領域として、誰が、いつ、どこで、どのような機器で得たデータでも比較が可能である。これは、他のタイプの遺伝マーカーでは部分的に実現できない特徴である。また、これまでのデータの蓄積に加え、多魚種で標準化したデータを扱える点からミトコンドリアDNAが好ましい。核DNAのマーカーは、淡水魚類全体で標準的に扱える遺伝子領域が確立されておらず、さらに2倍性のため、1個体で2タイプ（対立遺伝子）が現れることがあり、1倍体であるmtDNAと比べて、分析の時間的・経済的コストや実験施設の限定のために、実用面で大きく劣っている。一方、mtDNAの問題点、特に異種間交雑による遺伝子浸透の影響は、個別の研究による知見で補っていく必要がある。

mtDNAの中でもシトクロム*b* (cyt *b*) 遺伝子は、種内変異が（ベストではないが）十分にあり、比較できる情報が多いという点で最も優れていると考えられる^{13, 15)}。現在、国際的に大き

く発展しつつある DNA バーコードプロジェクト (CBOL)¹⁶⁾ では mtDNA の CO I 遺伝子 (約 1500 塩基) が用いられているが、これは (特に昆虫の) 種の識別に有効な遺伝子領域として採択されており、魚類の種内変異を重視する遺伝的多様性分析への適性は若干低いようである¹³⁾。またこれまでの淡水魚類の研究では、調節領域 (CR / D-loop)、ND4, 5, 6 ほか、いくつかの高変異領域も有効に用いられている。しかし、多種間の比較を念頭に置いた場合、いずれかの遺伝子領域に統一することが明らかに効率的であり、ここでは最も蓄積データの多い¹⁵⁾ シトクロム *b* 遺伝子を推奨するものである。シトクロム *b* 遺伝子は 1100 塩基あまりの長さを持ち、現在一般的な DNA シーケンサーでは、少なくとも 2 ランの電気泳動が必要である。今回行ったように、時間・経済コストの抑制のために 1 ランの電気泳動から得られた半分の配列のみを用いる場合には、イトヨなどでの分析結果¹⁷⁾ から、後半領域 (3'側) の方が変異が大きいようなので、前半よりも好ましいかもしれない。もちろん全長の決定がより望ましい。

(2) 分析手法の低コスト・効率化：目標とされる「網羅」の水準を、平均して 200 種 × (5~50) 水系・地点 × 16 個体とすると、16,000~160,000 試料となる。これをおよそ 5 万試料として、塩基配列決定は 5 万ランあるいは 10 万ランが必要となる。また、塩基数でいうと、1 試料 1000 塩基として、50~100 × 10⁶ 塩基であり、ヒトゲノム (約 30 × 10⁹) の 1%未満である。

現在、数百塩基 (1 ラン) の最低限の塩基配列データを得るために、組織試料から始めて、機器・人件費を除く消耗品費で約 200~1,000 円以上の単価がかかる (計 1 千万円~1 億円)。分析時間は一般的な中程度のシーケンサーで約 200 ラン/台/日である (ちなみに、本研究では 10 分の 1 ほどの出力速度の機器を用いた)。すでにある程度のデータが存在することと、コアになる研究機関を中心に複数箇所で分散することを想定すると、数年の時間枠で十分に解析可能な分量とコストである。さらに、DNA 抽出ほかの簡素化や大量実験系の構築など、さらに低コスト化、分析の簡素化が可能である。

(3) データの保存・蓄積：GEDIMAP システムを活用することにより、上記のデータを集約し、利用しやすい形で学術貢献および社会還元することが可能である。

(4) 分析体制の確立：現在、淡水魚類の遺伝的多様性に関して研究を進めている機関は、大学関係に限っても、北海道大学、東北大学、新潟大学、富山大学、東京大学、山梨大学、名古屋大学、岐阜大学、三重大学、京都大学、福井県立大学、水産大学校、九州大学、琉球大学などにそれぞれ 1 つ以上の研究室があり、そのほかに国や県、あるいは独立行政法人の研究機関が関連の研究を行っている。その結果、すでに GEDIMAP のコンテンツが存在し、今後もあるペースで情報は充実していくと期待される。上記のうちの一部が、自らの研究活動の一環として協力体制を構築し、さらに予算等の推進条件がともなうことにより、網羅的解析は格段に加速するだろう。

課題 4. 成果公表：GEDIMAP をベースにした遺伝的多様性の網羅的解明とその利用を進める上で、学術的・一般的な公表と啓発は不可欠である。現在は、データベースの β 版が公開に至っ

たところであるが、これまでに複数の関連学会、シンポジウム等で GEDIMAP 計画に関して公表を行ってきた（文末リスト参照）。今後、学術論文としての報告をはじめ、研究者、関連行政、一般への公表を、さまざまな発表の機会やメーリングリスト、ウェブページ等を利用して行っていく必要があり、同時に、対象ごとに焦点を合わせたチュートリアル（使用ガイド）などの充実を図っていくべきである。

課題 5. 他プロジェクトとの連携：GEDIMAP を含む網羅的遺伝的多様性の解明とその社会還元は、本来、より広い枠組みで推進されるべき内容を含んでいる。淡水魚類に限った場合でも、一つには、上で述べてきたように、試料の体系的収集という観点から、「河川水辺の国勢調査」（国交省）やその他の現地調査をとまなう事業との連携が考えられる。また環境省の種・遺伝的多様性、分布基礎調査、外来種対策等の枠組みの中で、網羅的な遺伝的多様性分析は重要な位置づけができるはずである。また、主要ないくつかの自然史博物館（国立科学博物館、琵琶湖博物館ほか）では、博物館における標本収集の意義を理解し、その普及にも努めてきたが、近年では、生物体標本と合わせて、遺伝分析用試料の収集、保管、提供も開始している。

以上を有機的につなぎ合わせ、統合的に機能させていくことは、日本の生物多様性理解と保全のための先駆的な枠組みとなる。また生物多様性条約に批准する日本において、学術、環境保全および国土整備の観点から、率先して推し進めるべき課題である。将来的には、他の生物群でも同様な発想のもとで遺伝的多様性分析とデータベース化の試みが始められることは間違いない。

4. 2 成果の活用

GEDIMAP、ひいては網羅的遺伝的多様性分析により、何が可能になるか、現時点で想定できる内容を列記する。

種と集団の正確な同定：すでに述べてきたように、データベースの充実により、特に同定の難しい種や、卵、仔稚魚、胃内容物や遺体などについて、正確な種の同定が可能となる。さらには、同種の国外・国内移植の多くも検出が可能になり、妥当な保全対象の設定（例えば、人為移植種の不適切な保全の回避）の助けとなる。これは、特に研究機関、建設・環境行政、学校、調査会社等において有用である。

日本の生物相の起源の解明：日本の生物相は、2000 万年にも及ぶ日本列島の形成史のなかで、大陸との複数回の交流や隔離、固有種の形成、絶滅を経て、非常に複雑な地域構造をもつと考えられている。しかし、すでに述べてきたように、それに対する我々の知識は非常に断片的であり、比較的研究の進んだ淡水魚類に関してさえ、科学的な理解にはほど遠い。このような複雑な生物相を解きほぐす有効な手段が遺伝解析に基づく比較系統地理であり、網羅的な遺伝解析に基づくそのような解析は、日本の生物相の成立過程に対して、画期的な成果をもたらすはずである³⁾。

これは、一義的には学術研究分野における貢献であるが、以下に述べるような社会的な還元も大きい。

保全単位の明確化：近年の生物保全の理論と実践において、保全の単位は種よりも下にあると認識されることが多く、進化的に重要な単位（ESU）や管理単位（MU）などと呼ばれる（2. 2. 1 参照）。これらの概念にはさまざまな論争があるが、特に淡水魚類のように歴史的に隔たった水系間での集団の隔離が明白である場合、それらが別の遺伝学的、人口学的、生態学的な単位であることは論議の余地がない。その差異の程度の大きい順に保全の単位を認識することは、おおむね一般に正しいと考えられる。mtDNA 塩基配列に基づく遺伝的集団構造は、保全単位を相対的に設定する上で、簡便性や定量性、比較可能性のために優れている。

なお、mtDNA などの核ゲノム外の（ほぼ）中立的マーカーが、核 DNA、あるいはより重要な適応に関係する遺伝子と異なる分布パターンを示すこともあるが、これについては個別の研究の進展が必要である。にもかかわらず、これまでに蓄積された知見から判断して、mtDNA による集団構造を初期情報とすることは効果的である。建設・環境行政や保全を目指す市民団体にとって、このような知見は特に有用である。例えば、保全のための移植の妥当性や、その具体的方策の決定の際に重要な情報となる。

生物観の変革と保全の動機付け：現在の日本では、一般市民は、生物は「種」という固定的で最重要な最小単位からなると理解していることが多いようである。その結果、同じ種なら異なる地域の個体、あるいは飼育個体を安易に移植・放流して、逆に生物多様性に害をなしているケースが非常に多い。生物種の存在様式は実際にはさまざまに異なっており、特に隔離されやすい淡水魚の場合、分布域の広さや生息環境によって、ある種の種内変異が別のグループの種間の差異に匹敵する場合も珍しくない。また、さまざまな気候的、生物的環境のもとで長年生息してきた地域集団は、それぞれの環境に適応した生態、生活史、繁殖形質や繁殖期、形態、行動などをもっていることが一般的である。つまり、ある地域の淡水魚は「地付きの魚」として、まさにその地域の一部として存在してきた。ある地域に固有な希少種と並んで、広域に分布する普通種さえ、多くの場合、その地域と密着した固有の歴史をもち、適応を示すはずである。正しく認識さえすれば、もともといずれの種も、郷土のかけがえのない文化・学術遺産として位置づけうるのかもしれない。

身近な淡水魚類の遺伝的多様性や変異性をインターネットブラウザで簡単に、またわかりやすい形で見ることができれば、種が内包する歴史性や地域固有性を直感的、主体的に理解することも可能となるだろう。またそのような生物の進化的な存在様式を理解することは、生物学、また環境教育において根幹的な重要性をもつ。そのような歴史性や固有性、地域性への理解こそが、地域的、また地球規模の環境保全の基盤となる科学的根拠と情緒的な深みのある自然観を醸成するはずである。

成果の公表の現状

(少なくとも一部が本助成を利用して行われたもの)

学会発表

渡辺勝敏*・鹿野雄一・高橋洋・柿岡諒 (2007/10/7). GEDIMAP: 日本産淡水魚類の遺伝的多様性データベース. 第40回日本魚類学会年会 (北海道大学学術交流会館, 札幌).

Watanabe K, Kano Y, Takahashi H, Kakioka R (2008/3/3-4) <予定> A strategy for exhaustive phylogeographic analyses of Japanese freshwater fishes, using GEDIMAP, a database for mtDNA genetic diversity. International Symposium on Systematics and Diversity of Fishes (National Museum of Nature and Science, Tokyo).

渡辺勝敏・鹿野雄一・高橋洋・柿岡諒 (2008/3/15-17) <予定>. 日本産淡水魚類の遺伝的多様性データベースと網羅的系統地理解析の展望. 55回日本生態学会 (福岡国際会議場, 福岡).

論文

Watanabe K, Mori S (2008) Comparison of genetic population structure between two cyprinids, *Hemigrammocypripis rasborella* and *Pseudorasbora pumila* subsp., in the Ise Bay basin, central Honshu, Japan. *Ichthyol Res* 55, in press

謝辞

本調査研究は以下の方々に協力を受けた。GEDIMAP プロジェクトグループのメンバーとして、設計・デザイン・プログラミングは鹿野雄一氏 (現・九州大学大学院工学府) がそのほとんどを担った。基本構想や機能については高橋洋氏 (水産大学校) のアイデアや助言によるところが大きい。柿岡諒氏 (京都大学大学院理学研究科) は実験および GEDIMAP のデータ入力に大きく貢献した。また、実験環境の整備において、西田睦教授 (東京大学海洋研究所) には多大な援助を頂いた。宮正樹博士 (千葉県中央博物館) には DNA データベースの最新の動向についてご教示いただいた。スゴモロコ属については柿岡氏の、ヒガイ類は小宮竹史氏の、またカマツカ類については富永浩史氏との共同研究の未発表の結果である。標本採集は、森誠一博士をはじめ、山根英征、北村淳一、関慎太郎、浅香智也、西尾和久、金尾滋史、小川裕久の各氏にご助力いただいた。以上の方々に厚くお礼申し上げます。

参考文献

できるだけ一般的な本や総説類を引用し、必ずしも原典を引用していない。

- 1) 鷲谷いづみ・矢原徹 (1996) 保全生態学入門—遺伝子から景観まで. 文一総合出版社, 東京.
- 2) Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press: 西田睦監修, 高橋洋・山崎裕治・渡辺勝敏訳 (2007). 保全遺伝学入門. 文一

総合出版, 東京.

- 3) 渡辺勝敏・高橋洋・北村晃寿・横山良太・北川忠生・武島弘彦・佐藤俊平・山本祥一郎・竹花佑介・向井貴彦・大原健一・井口恵一朗 (2006) 日本産淡水魚類の分布域形成史: 系統地理的アプローチとその展望 (総説). 魚類学雑誌, 53: 1-38.
- 4) 岩槻邦男・馬渡俊輔 (1996) 生物の多様性 (バイオディバーシティ・シリーズ 1). 裳華房, 東京.
- 5) 川那部浩哉・水野信彦・細谷和海 (2001) 日本の淡水魚. 山と溪谷社, 東京.
- 6) Takehana Y, Nagai N, Matsuda M, Tsuchiya K, Sakaizumi M (2003) Geographic variation and diversity of the cytochrome *b* gene in Japanese wild populations of medaka, *Oryzias latipes*. Zool Sci 20: 1279-1291.
- 7) Watanabe K, Mori S (2008) Comparison of genetic population structure between two cyprinids, *Hemigrammocypripis rasborella* and *Pseudorasbora pumila* subsp., in the Ise Bay basin, central Honshu, Japan. Ichthyol Res 55, in press
- 8) Kubota H, Watanabe K (2003) Genetic diversity in wild and reared populations of the Japanese bitterling, *Tanakia tanago* (Cyprinidae). Ichthyol Res 50: 123-128.
- 9) Kakehi Y, Nakayama K, Watanabe K, Nishida M (2005) Inheritance of amplified fragment length polymorphism markers and their utility in population genetic analysis of *Plecoglossus altivelis*. J Fish Biol, 66: 1529-1544.
- 10) Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York : 五条堀孝・斎藤成也訳 (1990) 分子進化遺伝学. 培風館, 東京.
- 11) Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1: 47-50.
- 12) 米倉伸之・貝塚爽平・野上道男・鎮西清高 (2001) 日本の地形, 1 総説. 東京大学出版会, 東京.
- 13) 堀川まりな・中島淳・向井貴彦 (2007) 九州北部のゼゼラにおける在来および非在来ミトコンドリア DNA ハプロタイプの分布. 魚類学雑誌 54: 225-230.
- 14) 国土交通省 (2008) 河川環境データベース (河川水辺の国勢調査). <http://www3.river.go.jp> (参照: 2008年1月20日)
- 15) Miya M, Saitoh K, Wood R, Nishida M, Mayden RL (2006) New primers for amplifying and sequencing the mitochondrial ND4/ND5 gene region of the Cypriniformes (Actinopterygii; Ostariophysi). Ichthyol Res 53: 75-81.
- 16) Consortium for the Barcode of Life (2008) <http://barcoding.si.edu/DNABarCoding.htm> (参照: 2008年1月20日)
- 17) Watanabe K, Mori S, Nishida M (2003) Genetic relationships and origin of two geographic groups of the freshwater threespine stickleback, 'Hariyo'. Zool Sci 20: 265-274.