

河川基金助成事業

「千曲－信濃川水系で新規発見されたカワヨシノ
ボリ集団の遺伝構造：その起源の究明と保全」

助成番号：2018-5311-001

信州大学大学院総合工学系研究科
(現：基礎生物学研究所)

博士課程 3 年 竹中將起
現：学振 特別研究員PD)

平成 30 年度

1. はじめに

日本列島は、世界の中でも種多様性と固有性が高く¹、陸地面積は世界の陸地面積の 0.3%にも満たないものの、生物の種多様性における「世界的ホットスポット」であるとして扱われている¹⁻⁵。日本列島は、大部分がユーラシア大陸から離裂した「大陸島」要素で構成され、加えて伊豆諸島や小笠原諸島のような「海洋島」要素も含まれる島嶼群である。日本列島は、南北に長い弧状列島で亜寒帯から亜熱帯を縦断し、本州中部の高山帯では寒帯の気候帯にも位置付けられていることもあり、複数の生物地理区（バイオーム biome）を跨いでいる。また、列島を貫く脊梁山脈の存在も大きく、本州中部の広域においては、3,000m 超の標高差を有する。また、アジアモンスーン気候の影響や後述するような日本海の形成（日本列島が大陸から離裂したこと）により、日本列島全域において湿潤な環境（豊富な水環境）が維持されている。特に水生生物に関しては、種多様性の高さに加えて大きなバイオマス（現存量）を有することも大きな特徴の一つである。

日本列島の多様性の高さは、様々な要因が複合的に関連しあっている^{1,4,5}。特に、日本列島の周辺では世界的にも稀な 4 枚の地殻プレートがぶつかり合う地域であり、激しい地殻変動の影響を受けてきた。その影響により、日本列島の形成史はとても複雑で、東北日本と西南日本がそれぞれ独立してユーラシア大陸から離裂したとする「観音開き型離裂説（"double-door" opening model）」が提唱されている⁶（図 1.1）。この説によると、2,000 万年前頃までは日本列島の原型となる陸塊はユーラシア大陸の東縁に位置していた。その後、中新世中期に海洋プレートの沈み込みにより大陸辺縁の分離が活発化し、日本海盆が開いたことで日本海が形成された^{7,8}（図 1.1B）。

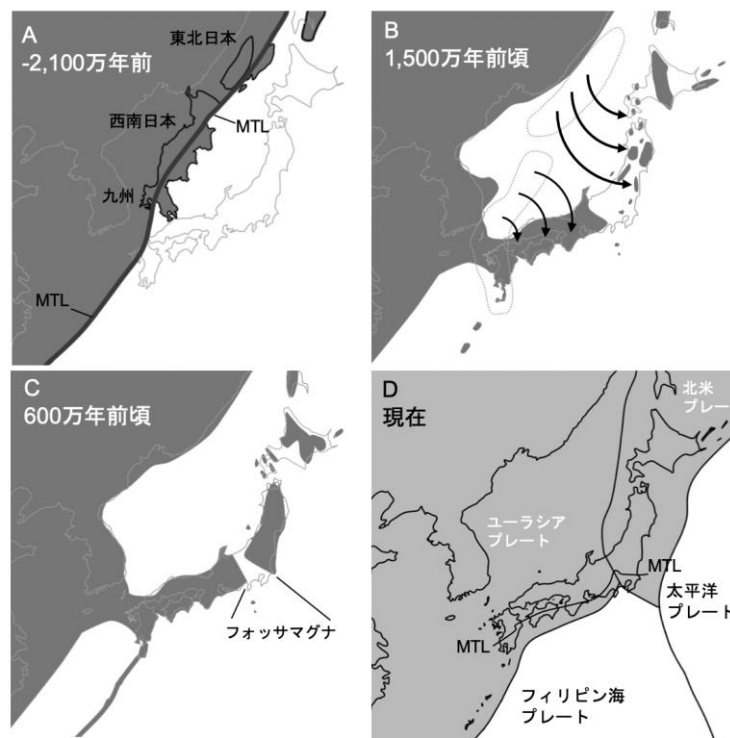


図1.1 日本列島の形成プロセス (Otofujii et al. 1985参照)

特に、1,600～1,500 万年前の時代が、より激しい運動であったとされ、このころの東北日本は小さく分断された飛鳥状の島嶼群であったとされている⁶ (図 1.1B)。このように大陸から離裂するようにして日本列島の原型が形成されて以降も東北日本と西南日本の間は深い海峡で隔たれ、1,500～500 万年前の期間に堆積物や火山噴出物がこの間を埋めていたとされる (図 1.1C)。このようにできた地層のエリアは「フォッサマグナ Fossa Magna」と呼ばれ生物相形成や集団構造、そして遺伝構造にも大きな影響をもたらしてきたと考えられている。実際に、フォッサマグナ地域を境とする種分化や種内の遺伝系統分化は、多くの生物種群において報告されている (水棲昆虫のオオシロカゲロウ *Ephoron shigae*⁹; チラカゲロウ *Isonychia japonica*¹⁰; オサムシ類のマイマイカブリ *Damaster blaptoides*¹¹; 原始的な魚類 (無顎類) のスナヤツメ *Lethenteron* sp.¹²; コイ科魚類のカマツカ *Pseudogobio esocinus*¹³; 両生類のアカハライモリ *Cynops pyrrhogaster*¹³)。

また、日本列島は複雑な形成史をもつことだけでなく、今なお激しく地殻変動が生じている世界的スケールにおいても極めて興味深い地史・地形を有する地域である。地殻変動などの地質学的なイベントは、生物多様性や遺伝構造に大きな影響を与える¹⁴⁻¹⁶。例えば、山岳形成やそれに伴う河川形成などの物理的な障壁の形成によって、生物の分散 (遺伝子流動) が妨げられることにより、異所的種分化を駆動する¹⁷⁻¹⁹。また、河川の形成や流路の変更はその地域に生息する生物に大きな影響を与える。これらの分集団化による集団サイズの変化や分集団内で独自の進化を遂げることは遺伝的多様性にも大きな影響を与える。つまり、激しい地殻変動を経験してきた日本列島は、生物集団がどのように地殻変動の影響を受け、その結果としての生物多様性の変遷を究明するのに好適な地域であると言える^{4,5}。

このような背景から、日本列島において、分子マーカーを用いた分子系統地理学的研究が様々な生物種群において展開されてきた。近年では、河川棲の生物に焦点をあてた研究も注目を集めている。水生生物は水域に依存的に生活する。特に、陸生生物が面的な移動が可能であるのとは対照的に、河川棲の生物は河川に沿った「線」的な移動に強く制限される。また、河川上流域から下流域へと向かう分散は比較的容易であるものの、下流域から上流域へ向かう分散は困難である²⁰。さらに、河川内の上流-中-下流の流程においては、生物が棲息する場 (ハビタット) の環境要因も劇的に変化する。結果として、特定の流程に適応した生物種群が流程分布する傾向が強い。源・上流域に適応した種群は中・下流域に適応した種群と比べて集団サイズが小さく、遺伝的浮動の影響を受けやすい。また、源流域は下流域に比べハビタットが孤立・散在的となりがちであり、限定的なパッチ状の集団構造をとる傾向が強いと考えられる²⁰⁻²³。そのため、比較的近隣の集団間においても遺伝子流動は生じ難く、遺伝的固定化がおこりやすく²⁴⁻²⁵、過去の地形・地史の影響を強く反映した遺伝構造を保持していることが多い。

純淡水魚類は、一生を淡水域に依存するため、水系を跨ぐような移動・分散は難しい。水系を跨ぐような移動分散には、河川の氾濫などによる下流域の接続や、「氷期-間氷期サイクル」に伴う海水準の変動による近隣水系同士の河口域での接続、地殻変動による河川争奪などの流路変更があげられる。淡水域に依存し、通常は「線」的な移動分散に制限されるような水生生物にと

って、水系を跨ぐような接続は重要な移動分散イベントの一つであると考えられる。また、上・中流域に適応する純淡水魚類は、下流域が接続されたとしても、隣接する水系への分散は生じ難く、河川争奪などの地史イベントは重要な移動分散イベントの一つであると言える。そのため、地殻変動による影響を強く受けると考えられ、淡水魚類は地史と生物の分布形成を追究する最適なグループである²⁶。河川争奪とは、ある河川が他の河川の流域を奪う現象をいい、山岳の隆起や谷の侵食などによって河川の上流域が隣接する他の河川に流れ込み、流路を変えることをいい、河川争奪によって分水嶺を超えた分散生じる²⁶。前述したが、日本列島は地殻変動が近年においても活発に生じており、河川争奪などの地質学的イベントと遺伝構造の関連を究明する上で最適なフィールドである。

ハゼ科に属するカワヨシノボリ *Rhinogobius flumineus* (図1.2) は、主に河川上・中流域の瀬環境に生息する純淡水魚類である。日本列島固有種であり本州(西部)・四国・九州(北部)のほか、壱岐島や五島列島(福江島)などの島嶼にも生息し、従来、日本海側では常願寺川以西、太平洋側では富士川水系以西の分布とされてきた。おそらく、この分布域は前述した日本列島の形成史に強く影響を受けているものと考えられる。カワヨシノボリの形態は、近縁種のトウヨシノボリや他種とよく似ているが、カワヨシノボリがやや上流域に適応しており、さらに他種より大卵を産み、胸びれ条数が短い傾向にあるなど、生涯淡水棲としての適応した特徴を有する。さらに、先行研究から遺伝的な地域性がみ



図1.2 カワヨシノボリ *Rhinogobius flumineus*

られることが示唆されている(向井ら、未発表)。

近年では自然分布域外の多摩川や相模川、狩野川などからも発見され、分布域の不連続性などから人為的な移入である集団が報告されている。そんな中、これまでの調査において、これまでに報告のなく、さらに日本海側の自然分布域の水系から大きく東側である千曲-信濃川水系の支流からカワヨシノボリが確認され、人為的な移入であると考えてきた²⁷。しかし、天竜川水系と千曲-信濃川水系の分水嶺周辺地域は、日本列島の中でも活発な地殻変動を経験してきた地域であることが知られており、前述した日本列島の生物を東西に大きく2分する糸魚川-静岡構造線や日本列島を南北に分ける本邦最大断層である中央構造線のほか、近年にも活発に活動している牛伏寺断層、伊那谷断層、境峠断層、木曾山脈西縁断層帯など極めて地殻変動が激しい地域である。これらのことから、千曲-信濃川水系のカワヨシノボリが自然分布集団である可能性が考えられる。

保全の観点から、新規に発見された千曲-信濃川水系集団が自然分布集団であるか、人為移入集団であるかについて調べることの意義は大きく、保全対策も大きく異なってくる。自然分布であった場合は、カワヨシノボリの最東端集団であり、分布の縁に分布する集団の絶滅のリスク

は他集団より高く、保全の観点においても極めて重要な集団であり、保全対策が急務である。一方で、人為移入集団であれば、日本在来種ではあるものの、国内外来種として知られ、本来生息しない地域に移入されたり、異なる遺伝的背景の集団が移入されることで、在来集団などと競合し生態系を乱したり、遺伝子汚染が生じてしまい、近年に問題となっている。そのため、レッドリストの対象からは外れてしまうため、自然分布集団であるか、人為移入集団であるかについては、極めて重要である。また、その移入元を特定することで、さらなる人為移入を防ぐなどの、今後の保全対策に関する指針に関する情報を提供できると考えている。これまでの研究において、千曲－信濃川水系のカワヨシノボリと近隣水系にあたる木曾川・天竜川・富士川水系の自然分布する集団と形態形質を比較検討した結果、天竜川水系の集団とよく似た形態形質をもつことが示唆されている。しかし、自然分布なのか、またその詳細な起源などについては明らかにすることができなかった。

2. 研究の目的

新規発見された千曲－信濃川水系のカワヨシノボリの起源推定に関して、従来の分布域外であることから人為的な移入であると考えられてきた。しかし、水系内の複数の支川に孤立・散的に分布していることや、近隣水系との形態形質の比較、そして対象地域の地質学的特徴などから、地殻変動による河川争奪の可能性が示唆された。そこで、分子マーカーを用いてより詳細な千曲－信濃川水系集団の起源を追究する。河川争奪による自然分布集団であるか、もしくは人為的な移入であるかについて調べる。自然分布集団であった場合は、カワヨシノボリの最末端地域集団であることから保全対象として、再検討する必要がある。また、河川争奪などの地質学的イベントの影響を強く受けている可能性が高いことから、世界的にも激しい地殻変動の影響を受ける中部地方において、河川争奪による純淡水生物の影響を追究することで、生物の分布拡大イベントの基礎的な知見を蓄積できると期待される。河川争奪によって分水嶺を跨いで分散は、純淡水生物の分布域拡大イベントとして極めて重要な要素である。一方で、人為移入集団であった場合は、前述した通り、今後の保全対策に関する指針に関する情報を提供できると考えている。さらに、在来か外来かについて分子マーカーを用いて判断する一般性の高いモデルケースとなり得る基礎的な知見を蓄積する。河川管理において、保全対策の対象とする地域の生物種が在来であるのか、外来であるかについては極めて重要な要素である。また、近年日本の他地域からの移入に関しても国内外来種として扱われることが多くなってきているが、それを判断することは難しい。そこで、本研究では人為移入であることが明らかな多摩川集団のサンプルも加え、さらに水系内の遺伝構造や日本広域における系統学的位置付けについて自然分布集団と人為移入集団の間においてを比較・検討することで、一般化し、河川管理における重要な基礎的知見を蓄積することを目的とする。

3. 方法

3.1 研究材料および試料からのゲノム DNA の抽出

千曲-信濃川水系のカワヨシノボリの起源推定を実施するために、千曲-信濃川水系の6支川7地点から、近隣水系の天竜川水系の8地点、木曾川水系2地点、富士川水系1地点、神通川水系2地点、人為移入集団である多摩川水系から1地点、そして、西日本も合わせて30地点においてカワヨシノボリを採集した(表3.1; 図3.1)。採集したサンプルは、その個体の生存に影響しない程度に鱭の一部を採集し、99.5%アルコールで固定し、信州大学理学部の東城研究室へ持ち帰った(実験終了後、同室に保管)。

3.2 遺伝子解析

固定試料を実体顕微鏡下で解剖し、採集した鱭の一部を摘出し、全ゲノム DNA を抽出・精製した。全ゲノム DNA 抽出および精製に関しては、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) を用い、製品のプロトコルに準じて行った。この全ゲノム DNA を鋳型に mtDNA DNA cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) 領域と NADH dehydrogenase subunit 5 (*ND5*) 領域を解析した。PCR の酵素には rTaq (TOYOBO, 大阪) を用い、また PCR 増幅には Program Temp Control System PC350 サーマルサイクラー (Astec, 福岡) を用い、[mtDNA *ND5* 領域: 5'-GGT CTT AGG AAC CAA AAA CTC TTG GTG CAA-3' と 5'-AAG GCT GTG AAT GAT GGA GC -3'^{28,29}; mtDNA *COI* 領域 : 5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC -3' と 5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA -3'³⁰] のプライマーセットをそれぞれ利用した。mtDNA *ND5* 領域の PCR では、94°C で1分間のプレヒート後、「94°C で1分間の熱変性、60°C で1分間のアニーリング、72°C で1分間の伸長」を1サイクルとする反応を30サイクル行った後、72°C で7分間のファイナルエクステンションを行い、4°C で保存した。mtDNA *COI* 領域の PCR は、94°C で2分間のプレヒート後、「94°C で1分間の熱変性、68°C で1分30秒間のアニーリングと伸長」を1サイクルとする反応を30サイクル行った後、72°C で7分間のファイナルエクステンションを行い、4°C で保存した。

PCR 産物の精製には ExoSAPIT (GE Healthcare, Buckinghamshire) または Illustra ExoStar (GE Healthcare, Buckinghamshire) を用い、シーケンス反応においては BigDye Terminator v1.1 Sequencing Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire) を用いて蛍光ラベリングを行った。これらの反応には、Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, California) を用いた。この後、ABI 3130、または ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, California) を用いて塩基配列を解析した。シーケンス後の塩基配列については、ソフトウェア CLC Genomics Workbench (Filgen, 名古屋) を用いて、アセンブリとアライメント作業を行った。解析サンプル間の塩基配列のアライメント

表3.1 ヨシノボリの採集地点の情報

地点	GPS		集団	系統
長野県松本市清水	36.23547	137.97718	?	1
長野県松本市村井町南	36.17390	137.96653	?	1
長野県松本市井川城	36.22533	137.96443	?	1
長野県東筑摩郡生坂村下生坂	36.45571	137.96371	?	1
長野県東筑摩郡生坂村東広津	36.47059	137.93849	?	1
長野県安曇野市明科中川手東栄町	36.35912	137.93596	?	1
長野県安曇野市穂高北穂高	36.34852	137.90538	?	-
長野県上伊那郡辰野町上島	36.01877	137.97247	自然分布	1
長野県伊那市狐島	35.83593	137.96068	自然分布	1
長野県下伊那郡高森町山吹	35.56783	137.89582	自然分布	-
長野県下伊那郡泰阜村温田	35.33444	137.83775	自然分布	1
長野県飯田市座光寺	35.52251	137.86973	自然分布	1
長野県飯田市松尾上溝	35.50563	137.85264	自然分布	1
長野県諏訪郡富士見町富士見御射山神戸	35.92578	138.21261	自然分布	-
長野県茅野市金沢青柳	35.94363	138.19608	自然分布	-
静岡県浜松市天竜区春野町堀之内	34.95822	137.90652	自然分布	1
長野県木曾郡木祖村藪原	35.94825	137.77866	自然分布	2
長野県木曾郡大桑村野尻	35.68294	137.64810	自然分布	2
岐阜県高山市上切町	36.16969	137.22758	自然分布	2
山梨県甲斐市宇津谷	35.68684	138.47498	自然分布	3
富山県富山市楡原	36.53878	137.22474	自然分布	Rk
京都府南丹市美山町盛郷	35.33109	135.56622	自然分布	3
三重県亀山市山下町	34.85522	136.41874	自然分布	3
奈良県吉野郡東吉野村木津川	34.39821	135.99275	自然分布	3
兵庫県西宮市山口町上山口	34.82700	135.24225	自然分布	-
岡山県岡山市北区建部町吉田	34.84322	133.92408	自然分布	-
岡山県久米郡美咲町江与味	34.94311	133.80027	自然分布	3
島根県江津市桜江町江尾	34.92911	132.32544	自然分布	2
広島県庄原市東城町帝釈宇山	34.88806	133.19033	自然分布	Rk
山口県美祢市秋芳町嘉万	34.31593	131.29374	自然分布	2
高知県高知市薊野	33.58756	133.55535	自然分布	Rk
愛媛県東温市井内	33.75616	132.92352	自然分布	3
福岡県田川郡香春町鏡山	33.67024	130.87912	自然分布	Rk
熊本県水俣市久木野	32.17502	130.51939	自然分布	Rk
鹿児島県南さつま市金峰町白川	31.42230	130.37142	自然分布	Rk
鹿児島県鹿屋市上高隈町	31.52310	130.83404	自然分布	Rk
東京都西多摩郡日の出町平井	35.74008	139.26128	人為	2

Rk, *Rhinogobius kurodai*;

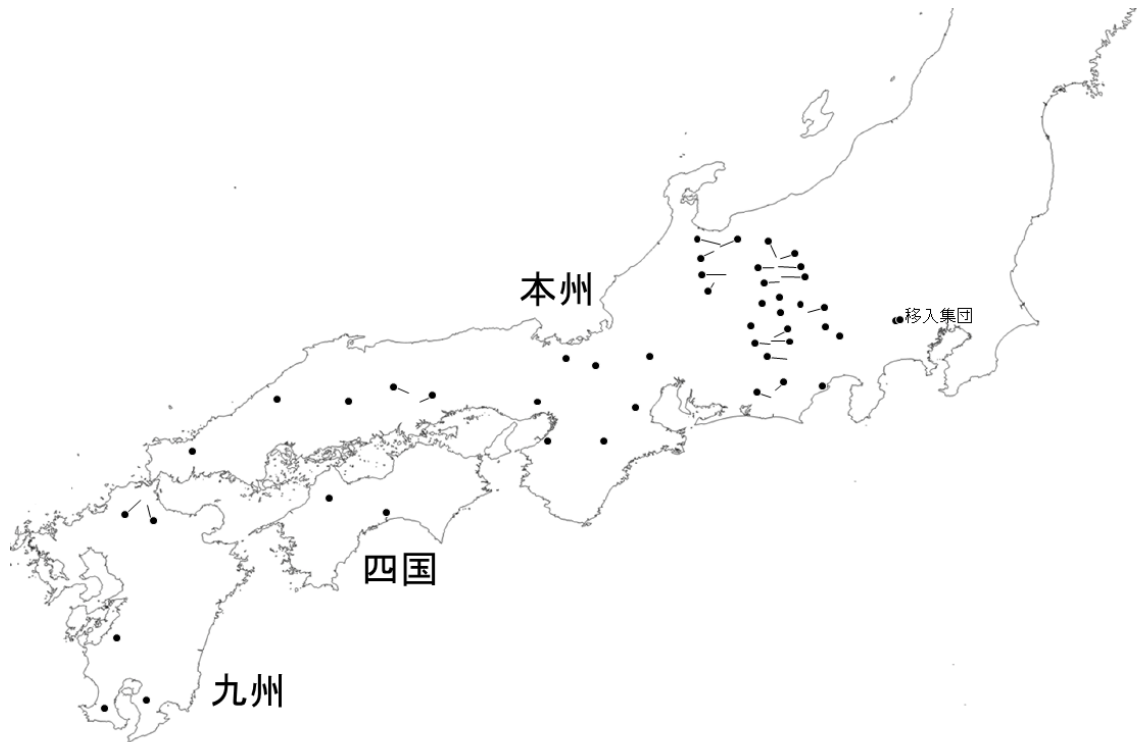


図3.1 本研究におけるヨシノボリの採集地点, およびGenBankに登録されている産地. 自然分布域を広く採集し, さらに人為移入集団である多摩川水系も採集した.

にはソフトウェア Clustal W³¹ および MEGA ver. 6.06³² を用いた. 整列した塩基配列を基に, ソフトウェア DnaSP v4.0³³ を用いてハプロタイプとジェノタイプを決定した. ハプロタイプ多様度³⁴ (h) およびヌクレオチド多様度³⁵ (π) についても, DnaSP v4.0 を用いて計算した.

核遺伝子の解析に関して, 鋭敏な分子マーカーを用いた解析手法であるマイクロサテライトを用いて, より詳細な遺伝構造や移動分散経路の推定を実施した. マイクロサテライトは, 生物のゲノム中に存在する反復配列で, 数塩基単位の繰り返し配列 (simple sequence repeat; SSR) を解析する手法で, 個体識別や親子判定などにも用いられるような多型を多く含む領域とされている. しかし, 多型を多く含むため, 種ごと (もしくは近縁種ごと) にマーカーの設計が必要とされるなどの難点がある. そんな中, 魚類に関しては汎用性の分子マーカーが開発されており³⁶, 本研究ではこの先行研究において開発されているマーカーの中からハゼ科魚類で増幅に成功しているマーカーを選抜した. 抽出した全ゲノム DNA を鋳型に 5 座位のマイクロサテライト領域を 2 つのマルチプレックス反応 (Multi1: Orla12-160, Orla16-32, Orla17-260; Multi2: Orla19-162, Orla21-231) を用いた実験をデザインし, PCR 法によって増幅した. PCR の酵素には KOD FX Neo (TOYOBO, 大阪) を用い, あらかじめタグ配列をつけたプライマーとそのタグに特異的に結合する蛍光物質 [カスタム蛍光プライマーの 6-FAM, HEX, NED, PET (Applied Biosystems, California)] を用いて実施した. PCR 増幅には Program Temp Control System PC350 サーマルサイクラー (Astec, 福岡) を用いた. 全ての領域の PCR では, 94°C で 2 分間のプレヒート後, 「98°C で 10 秒間の熱変性, 58°C

で 30 秒間のアニーリング, 68°Cで 30 秒間の伸長」を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル行った後, 68°Cで 5 分間のファイナルエクステンションを行い, 4°Cで保存した. 得られた産物を ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, California) を用いて解析し, GenMapper (Applied Biosystems 社)を用いてアレルサイズの決定を実施した.

3.3 系統解析

ミトコンドリア遺伝子に基づく系統解析は, ソフトウェア MEGA ver. 6.06³² を用いて計算した. 最尤法 [Maximum likelihood (ML) 法³⁷] による分岐図を作成した. また, 系統解析の結果に基づいて区分された各クレードを対象に, ハプロタイプ多様度およびヌクレオチド多様度を DnaSP v4.0³³ により算出した. 遺伝的距離の算出には, ソフトウェア MEGA ver. 6.06²⁹ を使用した.

核遺伝子 (マイクロサテライト) に基づく系統解析は, 検出されたアレル型をもとに, 集団の遺伝構造を推定するために Structure 2.3.4⁴¹ を用いて K=2, 3 の場合について解析した. しかし, 本研究の解析で得られたアレルにほとんど変異がなく, 遺伝構造を推定することができなかったため, 集団解析に関しては実施しなかった.

3.4 潜在的な分布地域の推定

カワヨシノボリの現在の分布域 (河川水辺の国勢調査の採集地点と本研究の調査地点) から, MAXENT 3.3.3⁴² を用いて潜在的な分布範囲を推定した.

4. 得られた成果

4.1 千曲-信濃川水系集団の系統学的位置付け

カワヨシノボリ *Rhinogobius flumineus* の分布域の広域から採集したサンプルを用いて, 系統解析を実施した (図 4.1-4.3). その結果, mtDNA *ND5*, *COI* 領域共に, 3 つの系統に分かれることが明らかとなった (図 4.2-4.3). ブートストラップ値の低いノードも見られるが, 2 つの領域において同様の傾向を示した. 系統 1 は, 千曲-信濃川水系と天竜川水系から検出された. つまり, 新規発見した千曲-信濃川水系は, 天竜川と遺伝的に近縁な集団であることが明らかとなり, 天竜川水系起源であると考えられる. 系統 2 は, 木曾川水系と神通川水系, 揖斐川, 野洲川水系などから検出され, さらに, 人為的移入集団である多摩川水系の集団は全て系統 2 の木曾川水系や揖斐川水系集団と同一の遺伝子型が検出され, 多摩川水系からの多型は一切検出されなかった.

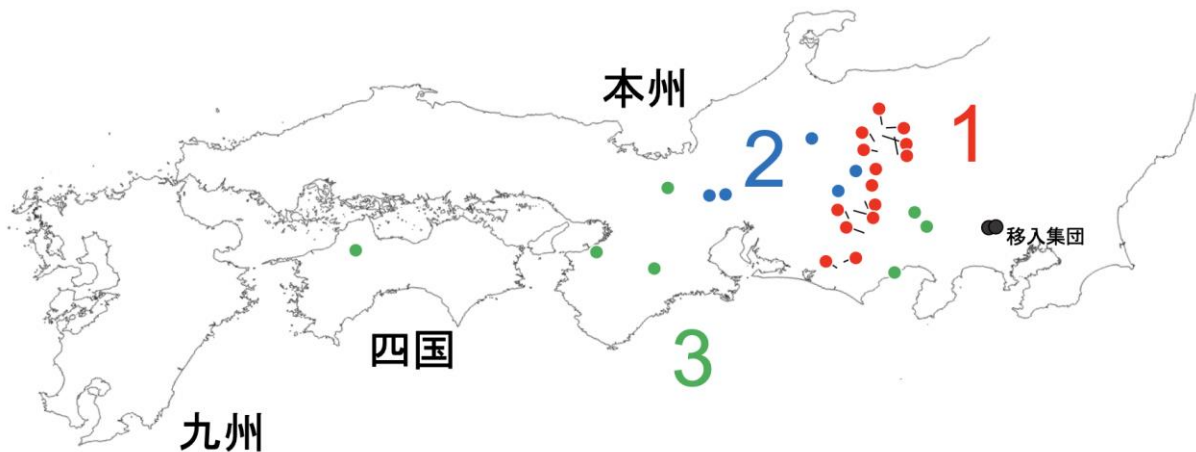


図4.1 本研究における系統解析に用いたカワヨシノボリの地点.
プロットの色は図4.2, 4.3参照.

表4.1 水系ごとのmtDNA *ND5*に基づく遺伝的多様性

	n	H	h	π	GD
千曲-信濃川水系	12	2	0.530	0.0006	0.001
天竜川水系	15	5	0.476	0.0025	0.003
木曾川水系	6	2	0.533	0.0006	0.001
富士川水系	4	2	0.667	0.0007	0.001
多摩川水系	6	1	0.000	0.0000	0.000

n, サンプル数; H, ハプロタイプ数; h, ハプロタイプ多様度; π , ヌクレオチド多様度; GD, 遺伝的距離

最後に、系統3は富士川水系、瀬戸川水系、そして西日本集団の各水系から検出される結果となった。また、系統内においては基本的に水系ごとに分化しており、水系を跨ぐ自然分散は稀であることを示唆する。そんな中、千曲-信濃川水系集団が天竜川水系と単系統群を形成したことから、少なくとも集団の起源は天竜川であることが示唆される。

4.2 千曲-信濃川水系集団内の遺伝構造

千曲-信濃川水系集団と天竜川水系の集団の系統内の遺伝構造に関して、はじめに、天竜川下流域の集団と千曲-信濃川水系と天竜川水系上流域との間で、明確に遺伝的に分化した。天竜川は、一般的な河川とは異なる特殊な河川として知られている。天竜川は、上流部の伊那・飯田盆地の平地上の地形から天竜峡の渓谷状地形を通り、下流部の浜松市の平地へと流れている。系統1内

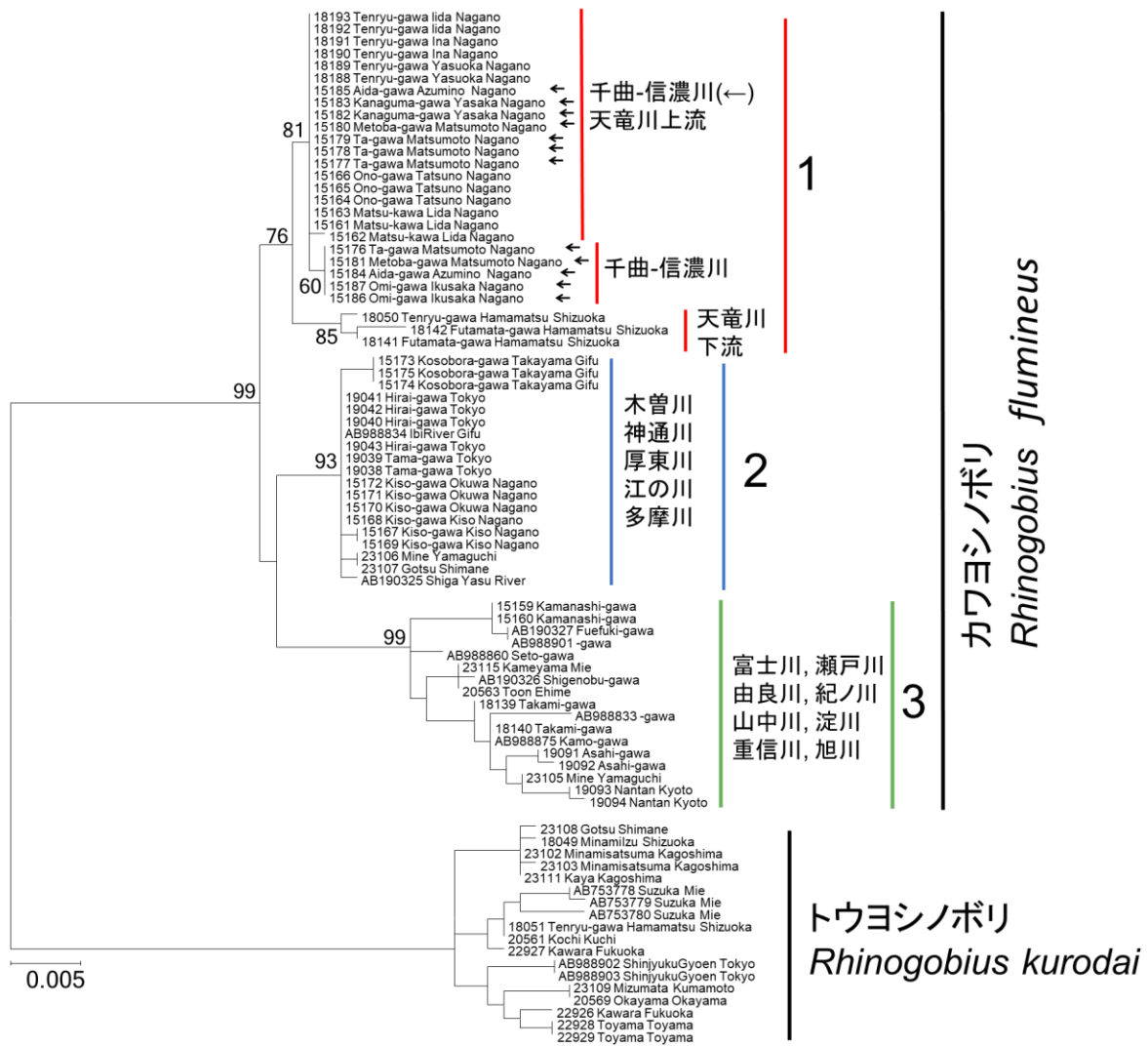


図4.2 ミトコンドリア遺伝子ND5領域に基づくML法を用いた分子系統樹。ノードの値は、ブートストラップ値を示した。スケールバーは、サイトごとの塩基置換数を示した。各系統の色は、地図の色と対応している。

においては、この天竜峡を境とした遺伝的分化が観察された。一方で、溪流千曲-信濃川水系と天竜川水系上流域との間では明確な遺伝的分化は検出できなかったものの、千曲-信濃川水系独自の単系統群は観察された。また純淡水魚であるカワヨシノボリは、頻繁に水系間を跨ぐような分散は難しいことが示唆されたためと考えられるため、水系ごとの遺伝的分化の程度や多様性についてを比較した(表 4.1)。また、西日本集団に関してはサンプル数が少ないためこの解析からは除外した。その結果、千曲-信濃川水系の遺伝的距離や遺伝的多様性が、自然分布集団である他水系と同程度であった。一方で、人為移入集団である多摩川水系の遺伝的多様性が著しく低く、遺伝的多型は検出しなかった。つまり、人為移入集団の場合、遺伝的多型がみられなかったり、遺伝的多様性も著しく低い。そんな中、千曲-信濃川水系集団は遺伝的多様性も従来の自然集団と同程度であり、さらに、独自の単系統群も認められた。これらのことから、千曲-信濃川水系集団は人為

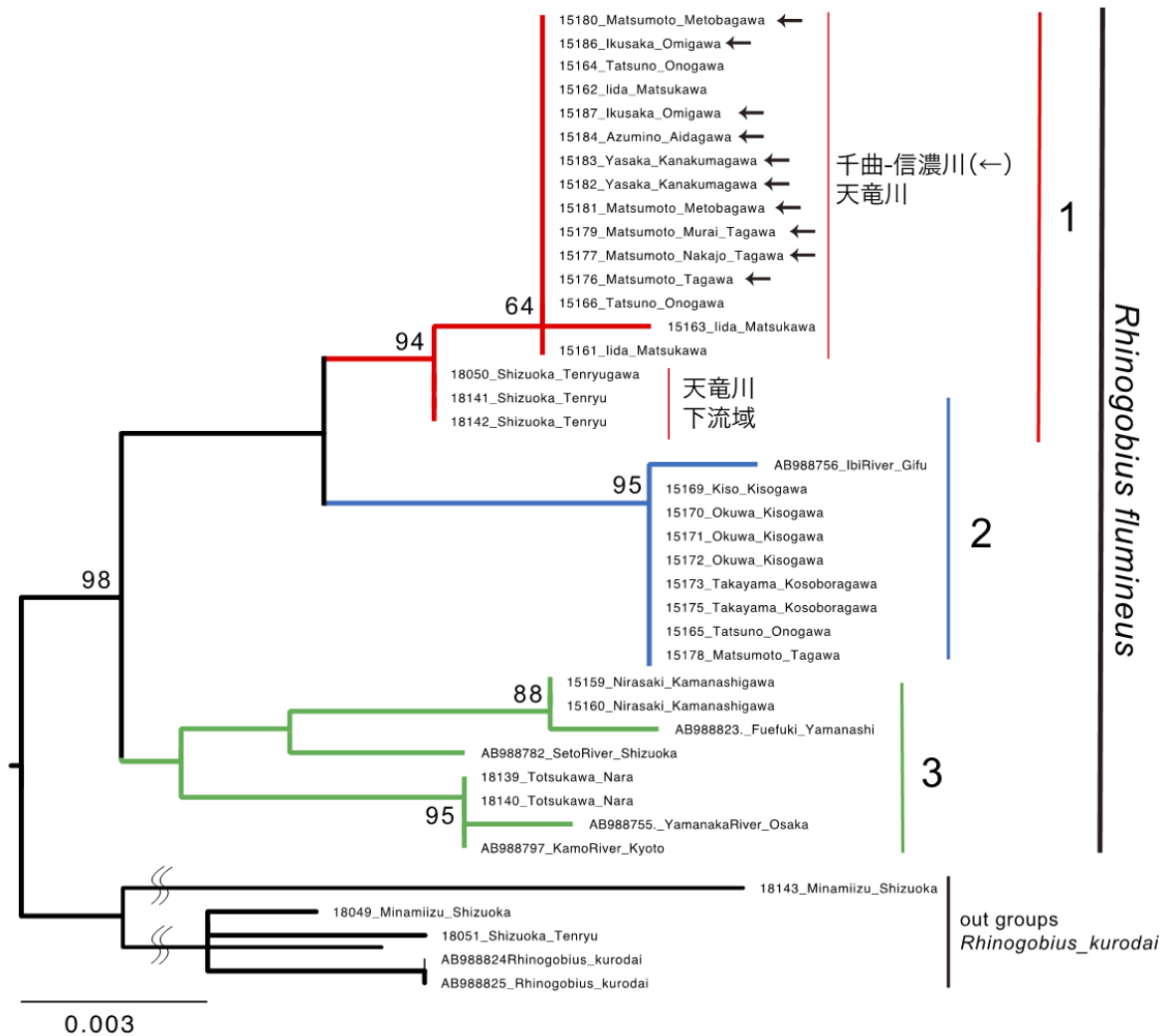


図4.3 ミトコンドリア遺伝子COI領域に基づくML法を用いた分子系統樹。ノードの値は、ブートストラップ値を示した。スケールバーは、サイトごとの塩基置換数を示した。各系統の色は、地図の色と対応している。

移入ではなく、自然分散した集団である可能性が高い。天竜川と千曲-信濃川水系との間で明確に遺伝的分化していないことから千曲-信濃川水系と天竜川との間で、移動・分散し、分断化してから長い時間が経過しておらず、比較的近年の地史イベントであると考えられる。

4.4 マイクロサテライト解析

自然分布集団である可能性は明らかにすることができたが、どれくらいの時期に生じた分散イベントであるのか、また一度起こった分散が複数化起こった分散イベントか明らかにできていない。また、従来の分布範囲から天竜川水系から千曲-信濃川水系への分散が推定されるが、遺伝的構造からは、千曲-信濃川水系から天竜川水系への分散も否定できない。これらのことから、よ

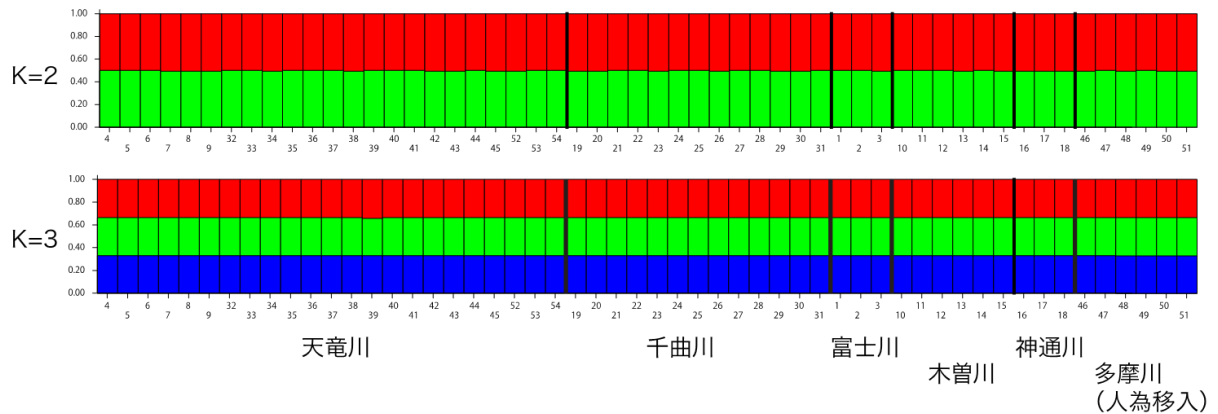


図4.4 座位のマイクロサテライトマーカーに基づく, Structure 2.3.4⁴¹を用いた集団構造解析. 縦のブロックが1サンプルを示し, 太線が水系ごとの境界線を示した.

り鋭敏な分子マーカーを用いた解析を実施するために, マイクロサテライト解析を試みた. しかし, 先行研究で用いられてきたマイクロサテライトマーカーでは, カワヨシノボリの地域差を検出できる領域は検出されなかった (図). 今後, マイクロサテライトマーカーを開発することで, より詳細な分布拡大イベントについて究明できると期待される.

4.5 結論

これまでの解析の結果, 千曲-信濃川水系集団のカワヨシノボリは, 形態形質からもミトコンドリア遺伝子に基づく系統解析の結果からも天竜川水系起源であることが明らかとなった. また, 人為移入水系集団と比べて明らかに遺伝的に分化し, その程度が自然集団の遺伝的分化に相当することも明らかとなった. さらに, 千曲-信濃川水系集団独自の系統も検出されたことから, 自然分布集団である可能性が高いと考えられる. もちろん, 天竜川水系から何度も人為移入した可能性や, 人移入した際の遺伝的ソースが高く, それらの遺伝子型が偶然天竜川から検出されていない可能性も考えられる. しかし, 本研究における結果から総合的に, 本研究では自然分布集団であると結論した. さらに, イワナの集団構造からニッコウイワナは信濃川水系に分布し, ヤマトイワナは天竜川に分布しているが, 千曲-信濃川水系の源頭部にニッコウイワナが分布している⁴³. これは, 本研究で対象としたカワヨシノボリと同様の傾向を示している. イワナは, 源・上流域に適応した純淡水棲魚類であり, 同様の地史の影響を受けた可能性が高い. 今後, 同様のハビタットに生息するようなカジカやニジマスなど複数種を対象とすることで網羅的な解析ができると考えている. つまり, 地殻変動による河川争奪が生じたことで, 分散イベントが生じたと考えられる. もちろん, 分散イベントが起こったとしても, 分散した先に適した環境がなければ, 生きていけなかったり, 繁殖に成功せず無効分散となる. 本研究では, カワヨシノボリが自然分布する地点情報とその環境データから潜在的な分布範囲を Maxent 3.3.3 を用いて推定した (図 4.5).

その結果、千曲-信濃川水系は潜在的に適した地域であると推定された。さらに、本研究で用いたマイクロサテライト領域では不十分ではあったが、マーカー開発を行うことで、近年の遺伝子流動を検討できるような解析を実施し、天竜川から千曲川への移動が生じた時期についても推定することで、より詳細な千曲-信濃川水系集団の起源について究明できると期待される。

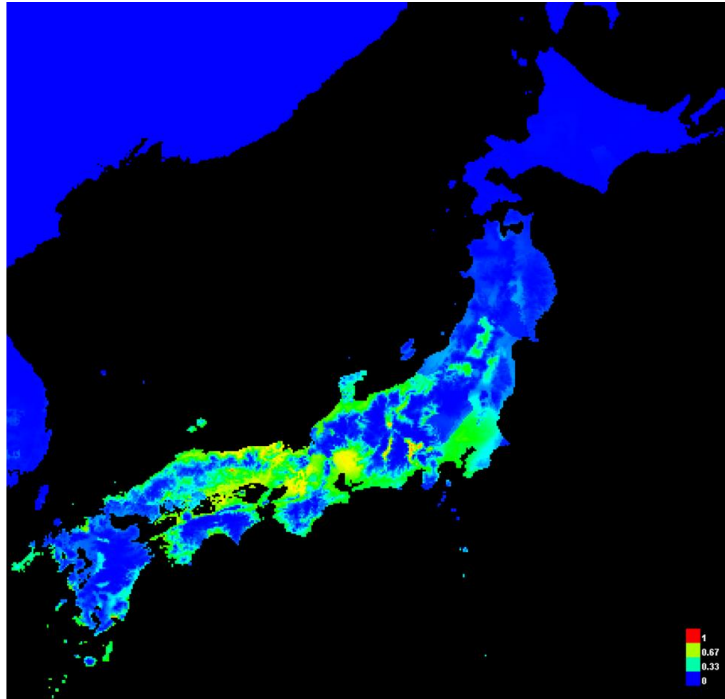


図4.1 生態ニッチモデリングにより推定されたカワヨシノボリの潜在的な分布範囲

5. 河川事業等の推進に寄与することが期待される効果

本研究では、新規に発見されたカワヨシノボリが自然分布集団であるか、人為的移入集団であるかを判断する上でのモデルケースとなる研究となり得る。河川管理において、そこに生息している生物が在来集団（在来種）であるのか、人為的な移入集団（外来種）であるかは、極めて重要な課題である。特に、今回注目したカワヨシノボリは、日本列島に在来の種であるが、日本国内での人為的な移入が知られ、地域によっては国内外来種として報告されている。同一種であったとしても、地域ごとにその遺伝的な背景や異なる進化史を持っている可能性があるため、日本在来種であったとしても、他地域への生物の移動には細心の注意が必要である。近年問題となっている有名な事例として、アユやイワナ、ニジマスを放流によって在来集団の系統が他地域集団の系統と交雑してしまい、純粋な在来系統が失われてきた。また、ホタルに関しては、西日本と

東日本との間で遺伝的に分化しているだけでなく、配偶行動などに用いる明滅パターンも異なっており、研究者によっては繁殖隔離が生じているとも言われている。しかし、同一種とみなされているため、西日本系統の集団が東日本の各地域に移入され、在来集団系統を追いやっている事例が多数報告されている。しかし、蛍のように明確に区別できる場合は判断しやすいが、判断が難しいことが多い。

本研究では、遺伝子解析や、多角的な解析から在来集団であるか、人為移入集団であるかを判断し、そして分子マーカーを用いた集団の正体について判断するための基準となる基礎的な知見を蓄積することができた。人為移入集団である多摩川水系は、地理的に大きく離れた木曾川集団と同一の遺伝子型が検出された。また、解析したサンプルが全て同一ハプロタイプで構成されていた。これらのことから、木曾川水系の集団、もしくは木曾川水系と近縁な遺伝子型をもつ集団（本研究では未検出）から人為的に移入されたと考えられる。なぜなら、純淡水魚でありため広域な分散が頻繁に生じ流とは考え難く、またカワヨシノボリは遺伝的にも地域性が見られるため、地理的に大きく離れた集団と自然分散によって同一遺伝子型が検出される可能性は低い。さらに遺伝的多様性がゼロ（全て同一の遺伝子型）であることから、これまでの知見どおり人為的な移入で間違いないと考えられる。一方で、千曲-信濃川水系は天竜川水系と同一系統であることが明らかとなったが、千曲-信濃川水系独自の系統も存在する。また、自然集団と同程度の遺伝的多様性が検出されたことも合わせると、天竜川から千曲-信濃川水系への分散が生じ、独自の進化を経験している。もちろん、天竜川からこの系統が採集できていないサンプリングエラーの可能性や、天竜川からの移入時の遺伝的多様性が高かった可能性は否定できないが、形態形質と遺伝的解析、そして、地形・地史などを総合的に判断して、本研究では自然分布集団である可能性が高いと結論した。つまり、ミトコンドリア遺伝子を解析することで、その集団の遺伝構造、系統学的位置付け、遺伝的多様性、そしてこれらのデータに合わせて形態形質も比較することで、総合的に判断することが重要であると考えられる。また、本研究において解析した生態ニッチモデリング解析は、現在の分布傾向から、環境的に（気候データに基づいて）どのような地域に適応できるかについて推定した。もちろん、気候データのみを扱っているため、分布していない地域にも分布可能性が推定されるが、それらの地域でも気候的には生存できると考えられる。さらに、過去の潜在的な分布範囲や未来（どれだけ温暖化が進行するか）における分布推定も可能な技術となっており、河川管理においても重要な解析の一つになり得ると考えている。

さらに生物の移動・分散に関して、より詳細な解析を実施するために、本研究ではマイクロサテライト解析を実施したが、先行研究で開発されたマイクロサテライトマーカーでは、地域差に関しての情報は得られなかった。今後カワヨシノボリ独自の分子マーカーを開発することで、どの程度の時代に千曲-信濃川水系集団が形成され、その後、水系間でどの程度移動が生じていたかを詳細に明らかにでき、精度の高い判断基準の策定が期待できるだろう。さらに、マイクロサテライトマーカーを開発することで、水系内での生物の移動・分散についても推定することが期待される。保全対策の策定に際して、生物の生涯の移動範囲や、世代ごとにどの程度移動するの

か推定することで、その生物を保全する際にどの程度の範囲や、どの程度の環境を整備する必要があるかなどの詳細な対策案を提示できると期待される。また、進化生物学的知見に関しても、水生生物の移動・分散範囲を推定することで、より詳細な進化史を追跡することができるものと考えられる。

6. 謝辞

本研究において、研究全般にわたり、信州大学理学系・東城幸治教授には、多大なるご協力・ご支援をいただきました。また、信州大学東城研究室の谷野宏樹氏には、サンプル採集および分子系統解析に関して多大なご協力をいただきました。また、本研究を進めるにあたり、株式会社環境アセスメントセンターの柳生将之氏、信州大学東城研究室 OB の小林建介氏、信州大の鈴木智也氏には、ご協力いただきました。また、信州大学東城研究室の山崎遥氏、百瀬加奈子氏、富澤亮太氏、吉田正樹氏には、サンプルの採集や収集に関してご協力いただきました。また、国土交通省北陸地方整備局千曲川管理事務所、ならびに河川生態学術研究会・千曲川研究グループのメンバーには研究を円滑に進めるため協力いただいた。この場をお借りして感謝申し上げます。

7. 引用文献

- 1) Motokawa M, Kajihara H (2017) *Species Diversity of Animals in Japan*. Springer. Japan.
- 2) Marchese C (2015) Biodiversity hotspots: a shortcut for a more complicated concept. *Global Ecology and Conservation* 3, 297–309.
- 3) Conservation International (2016) *The Critical Ecosystem Partnership Fund: Protecting Nature's Hotspots for People and Prosperity*. [Cited Oct 2016.] Available from URL: <http://www.cepf.net/Pages/sitemap.aspx>.
- 4) Tojo K, Sekiné K, Suzuki T, Saito R, Takenaka M (2017a) The species and genetic diversities of insects in Japan, with special reference to the aquatic insects. In: Motokawa M, Kajihara H. (eds). *Species diversity of animal in Japan*. Springer, Berlin, 229–247.
- 5) Tojo K, Sekiné K, Takenaka M, Isaka Y, Komaki S, Suzuki T, Schoville SD (2017b) Species diversity of insects in Japan: Their origins and diversification processes. *Entomological Science* 20, 357–380.
- 6) Otofujii Y, Matsuda T, Nohda S (1985) Opening mode of the Japan Sea inferred from the palaeomagnetism of the Japan Arc. *Nature* 317, 603–604.
- 7) Maruyama S, Isozaki Y, Kimura G, Terabayashi M (1997) Paleogeographic maps of the Japanese Islands: plate tectonic synthesis from 750 Ma to the present. *Island Arc* 6, 121–142.

- 8) Isozaki Y, Maruyama S, Nakama T, Yamamoto S, Yanai S (2011) Growth and shrinkage of an active continental margin: updated geotectonic history of the Japanese Islands. *Journal of Geography (Chigaku Zasshi)* 120, 65–99.
- 9) Sekiné K, Hayashi F, Tojo K (2013) Phylogeography of the East Asian polymitarcyid mayfly genus *Ephoron* (Ephemeroptera: Polymitarcyidae): a comparative analysis of molecular and ecological characteristics. *Biological Journal of the Linnean Society* 109, 181–202.
- 10) Saito R, Tojo K (2016) Complex geographic-and habitat-based niche partitioning of an East Asian habitat generalist mayfly *Isonychia japonica* (Ephemeroptera: Isonychiidae) with reference to differences in genetic structure. *Freshwater Science* 35, 712–723.
- 11) Su ZH, Tominaga O, Okamoto M, Osawa S (1998) Origin and diversification of hindwingless *Damaster* ground beetles within the Japanese islands as deduced from mitochondrial ND5 gene sequences (Coleoptera, Carabidae). *Molecular Biology and Evolution* 15, 1026–1039.
- 12) Yamazaki Y, Goto A, Nishida M (2003) Mitochondrial DNA sequence divergence between two cryptic species of *Lethenteron*, with reference to an improved identification technique. *Journal of Fish Biology* 62, 591–609.
- 13) Tominaga A, Matsui M, Yoshikawa N, Nishikawa K, Hayashi T, Misawa Y, Tanabe S, Ota H (2013) Phylogeny and historical demography of *Cynops pyrrhogaster* (Amphibia: Urodela): Taxonomic relationships and distributional changes associated with climatic oscillations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66, 654–667.
- 14) Cox CB, Moore PD, Ladle R (2016) *Biogeography: an ecological and evolutionary approach*. John Wiley & Sons, New York.
- 15) Lomolino MV, Riddle BR, Whittaker RJ, Brown JH (2010) *Biogeography, 4th edition*. Sinauer Associates Inc, UK.
- 16) Xu X, Kuntner M, Liu F, Chen J, Li D (2018) Formation of rivers and mountains drives diversification of primitively segmented spiders in continental East Asia. *Journal of Biogeography* 45, 2080–2091.
- 17) Hoorn C, Wesselingh FP, Steege HT, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, Antonelli A (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330, 927–931.
- 18) Wang Y, Yan G (2014) Molecular phylogeography and population genetic structure of *O. longilobus* and *O. taihangensis* (*Opisthopappus*) on the Taihang mountains. *PLoS ONE* 9, e104773.
- 19) Weir JT, Faccio MS, Pulido-Santacruz P, Barrera-Guzmán AO, Aleixo A (2015) Hybridization in headwater regions, and the role of rivers as drivers of speciation in Amazonian birds. *Evolution* 69, 1823–1834.
- 20) Tojo K (2010) The current distribution of aquatic insects in habiting river systems, with respect to their population and genetic structure. In Harris EL, Davies NE (eds). *Insect habitats: characteristics, diversity and management*. Nova Science, New York, 157–161.

- 21) Tojo K (2005) Genetic diversity in a headwater-specific aquatic insect *Dipteromimus tipuliformis* McLachlan (Ephemeroptera, Dipteromimidae), based on the mitochondrial 16S rRNA gene sequences. *Ecology and Civil Engineering Society* 7, 119–127. (in Japanese with English abstract).
- 22) Miyairi K, Tojo K (2007) Biology of the mayfly *Bleptus fasciatus* Eaton (Insecta: Ephemeroptera, Heptageniidae), with special reference to the distribution, habitat environment, life cycle, and nuptial behavior. *Limnology* 8, 85–93.
- 23) Kato Y, Morii Y, Tojo K (2013) Molecular phylogeographic analysis of East Asian cryptoperlan stoneflies (Insecta: Plecoptera, Peltoperlidae). *Limnology* 14, 179–194.
- 24) Hughes JM (2007) Constraints on recovery: using molecular methods to study connectivity of aquatic biota in rivers and streams. *Freshwater Biology* 52, 616–631.
- 25) Hughes JM, Huey JA, Schmidt DJ (2013) Is realised connectivity among populations of aquatic fauna predictable from potential connectivity? *Freshwater Biology* 58, 951–966.
- 26) Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.
- 27) 小林建介 (2011) 松本市・田川で確認された淡水魚類. *塩尻市立自然博物館紀要* 14, 47-58.
- 28) Miya M, Nishida M (2000) Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17, 437-455.
- 29) 向井貴彦, 平嶋健太郎, 古橋芽, 古田莉奈, 淀太我, 中西尚文 (2012) 三重県鈴鹿市南部のため池群におけるヨシノボリ類の分布と種間交雑. *日本生物地理学会会報* 67, 15-24.
- 30) Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360, 1847-1857.
- 31) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.
- 32) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725–2729.
- 33) Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497.
- 34) Nei M 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- 35) Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 5269–5273.
- 36) Gotoh RO, Tamate S, Yokoyama J, Tamate HB, Hanzawa N (2013) Characterization of comparative genome-derived simple sequence repeats for acanthopterygian fishes. *Molecular ecology resources* 13, 461-472.

- 37) Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17, 368–376.
- 38) Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564–567.
- 39) Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
- 40) Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925.
- 41) Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- 42) Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological modelling* 190, 231–259.
- 43) Yamamoto S, Morita K, Kitano S, Watanabe K, Koizumi I, Maekawa K, Takamura K (2004) Phylogeography of white-spotted *charr* (*Salvelinus leucomaenis*) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Zoological Science* 21, 229–241.

・助成事業者紹介

竹中 將起 (理学博士)

助成を受けていた際の所属：信州大学大学院 総合工学系研究科

(現職：基礎生物学研究所進化発生研究部門)