

河川基金助成事業

「河川源流域に生息する水生生物の遺伝構造からみる源流
生態系保全のあり方」

助成番号：2023-5311-013

信州大学大学院 総合医理工学研究科
職名 博士課程3年 氏名 鈴木 啓久

2023 年度

1. はじめに

生物の分布域は、対象となる生物のもつ生理・生態的な特徴や系統進化の歴史的背景などに加えて、気候、地形的特徴、それらの時間的な変遷¹⁻⁴、また、他の生物種との種間相互作用や偶然性など、様々な要素の複合的な結果として決定される⁵⁻⁷。つまり、生物種の分布域を理解することは、その生物種のたどってきた進化の歴史だけでなく、その種の生息地の特性も深く理解することにつながる。特に、生物の分布域の空間的な配置と、遺伝構造との間には密接な関係がある（例えば、分集団化と地理的隔離に伴い、その集団固有の遺伝子型が形成される）^{3,8,9}。そのため、遺伝的系統関係と遺伝構造の空間的パターンから生物種の進化を理解する手法である分子系統・生物地理学的手法は、生物種の進化の歴史を紐解くために有効なアプローチであるといえよう^{8,9}。また、遺伝的バックグラウンドに基づく系統解析や集団遺伝学的解析によって、集団間の遺伝的交流のパターンやそのスケール（遺伝子流動が制限されやすいか、否か）を示すことも可能であり、生物種の遺伝的多様性や健全性／脆弱性を評価することができる。前述したとおり、生物種の分布域決定やその空間分布パターンは、あらゆる生物的・非生物的要素によって決定されるため、生物種のハビタット特性との関係性についても議論され、種の多様化メカニズムの要因を追究することにも直結する¹⁰⁻¹²。

河川は線的なネットワークが複雑に接続しあって構成される樹状ネットワークである水系（river system）としてとらえることが重要であり¹³⁻¹⁶、源流から河口までの水系ネットワーク全体が河川生物の重要なハビタットとなる¹⁶。水系ネットワークは線的なつながりをもつが、本流と支流や支流同士が接続する水系ネットワーク内を生物が自在に往来できるとは限らない¹⁶。特に、源流域に生息する魚類や水生昆虫では、ハビタットが孤立・散在的に分布する傾向にあり、小さな集団がパッチ状に形成され、集団間の移動・分散が制限され、遺伝的交流もほとんど見られなくなる¹⁶⁻¹⁹。このような特異的なハビタットに生息する生物種を対象として、集団内での遺伝的固定化、近接する集団間における遺伝的分化を評価することで、遺伝構造とハビタットとの対応関係が研究されてきた²⁰⁻²²。ただし、水系ネットワークの端緒に存在する、高山帯の細流や湧き水に生息する生物種についての調査・研究は未だ多くはない。

高山帯に存在する細流や湧泉などの水域は、水源として雪解け水や表層水に依存しており、水域がモザイク状に分布する傾向がある²³。そのため、高山帯に存在する細流や湧泉に生息する水生生物の生息地は孤立・散在する傾向が強い²⁴⁻²⁶。また、成虫時に飛翔によって移動・分散する可能性のある水生昆虫において、飛翔性が小さく移動・分散能力が極めて小さい種がいることが知られている^{24,27}。従って高山帯に存在する細流や湧泉に生息する生物種の集団の多くは、他の集団との遺伝的交流が制限されることとなる^{24,28,29}。

さらに高山帯の集団の集団サイズは小さくなる傾向がある³⁰⁻³²。小さな集団サイズのため、個々の集団は遺伝的浮動の影響を受け、ランダムな遺伝的固定化が生じやすい³³。このような遺伝的交流の制限と遺伝的固定化により、世界各地の高山帯には隔離・遺存的に生息する固有種や固有系統が存在するため、種多様性／遺伝的多様性を遺伝構造から議論することが可能である³⁴⁻³⁶。特に、近年の気候変動に伴う、地球温暖化に対する高山帯の生物種の脆弱性については注目されており³⁷、積雪量の減少に伴う水域の縮小による、生息環境の喪失に伴う生物多様性の低下は懸念されており、高山帯に棲息する水生生物の遺伝構造の解明（固有種・固有系統や固有遺伝子型の発見など）は、生物多様性の保全という文脈においても重要な知見である^{37,38}。

加えて、高山帯は気温、降雨量（降雪量）、紫外線量などの環境要因において低地とは大きな差異があり³⁹、盆地などの低地が生物の移動・分散障壁として機能することも遺伝的交流が制限される要因の一つである。また、連続する山脈の場合においても、亜高山帯や森林帯などを有する山麓で接続されていたとしても、高山帯と亜高山帯とでは環境的に大きな差異があるため、低地を介した移動・分散に制限が加えられ、高山帯に棲息する生物種の生息地の孤立性は高くなる³³。そのため、高山帯は、海洋が移動・分散障壁として機能し、生息地が孤立・散在的となる島嶼になぞらえて、「Sky islands（天空の島々）」⁴⁰として知られる（図1）。

さらに、「Sky islands (天空の島々)」に適応した種の生息地が孤立する要因の多くは、地殻変動による山岳の形成過程と密接に関係している。そのような地殻変動によって形成された山岳の中には、多くの種の分断化された生息地が存在する⁴¹⁻⁴³。また「Sky islands (天空の島々)」に生息する生物種の分布域変化に、第四紀更新世(約258万年前から1万年前)の周期的に繰り返された氷期-間氷期サイクルが影響したことが知られている³。過去に氷床が広い地域を覆っていたヨーロッパでは、寒冷適応種(Cold adapted species)は更新世の氷期において分布域を拡大したが、温暖な環境に適応した種は分布域を縮小し、低地や山麓で生き残った^{3,41,44-46}。一方、氷河が高緯度地域や高山帯のみを覆っていたと考えられている日本列島の場合、氷期には多くの生物種が低緯度地域に分布域をシフトさせた⁴⁷⁻⁵⁰。特に、山岳は寒冷適応種(Cold adapted species)のレフュジア(逃避地)として機能していたことが高山植物の研究から知られている⁵¹。しかし、日本列島の「Sky islands (天空の島々)」に生息する水生生物に関する知見は多くはない。従って、「Sky islands (天空の島々)」に生息する水生昆虫を対象とした、遺伝構造を解明する本研究は、環境要因(主に地史と気候変動)と分布域の決定との関係性を考察するために重要である。

本研究の対象種であるナガレグリトビケラ *Rivulophilus sakaii* は、日本列島の本州の中央部から東部の高山帯から亜高山帯にかけてパッチ状に存在する細流や湧泉のみに生息する日本固有の水生昆虫である(図2)⁵²。ナガレグリトビケラの成虫は秋に出現し、産卵する⁵³。そして若齢幼虫で越冬することが知られており、冬期に凍結しない流水環境を必要とする⁵³。本種の成虫の飛翔による移動・分散能力についてのデータは見当たらないが、ナガレグリトビケラと同じ科であるエグリトビケラ科に属し、ナガレグリトビケラと同様に秋に成虫が出現し、高山帯の細流に生息する種に関する研究では、極めて成虫の移動・分散能力は極めて小さいことが示されている⁴。そのため、ナガレグリトビケラの移動・分散能力は小さいと予想され、温暖な気候である現代において、集団間の遺伝的交流も制限されているため、日本列島が経験した山岳形成史や気候変動の影響が顕著に遺伝構造に現れていると考えられる。

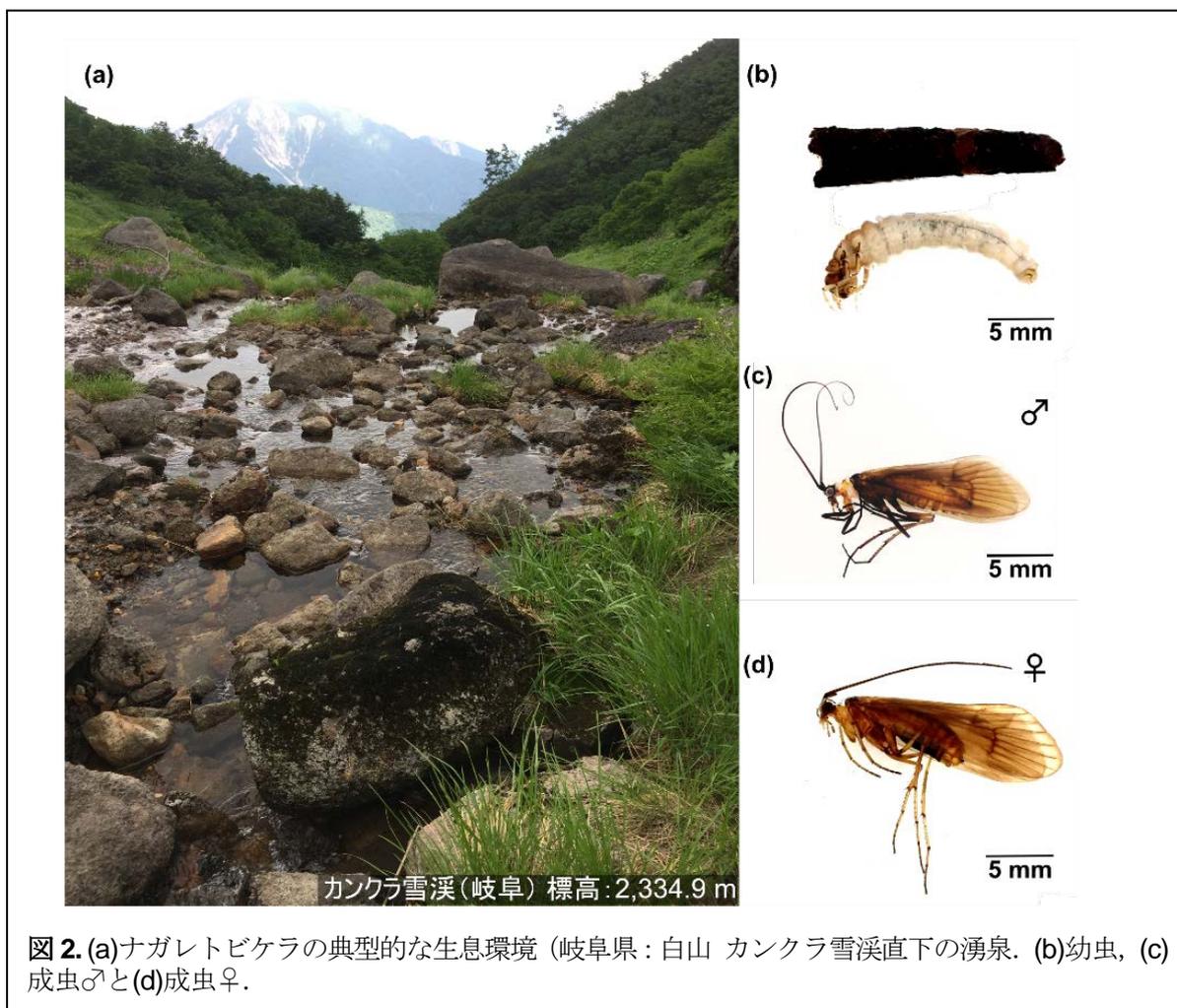


図2. (a)ナガレトビケラの典型的な生息環境(岐阜県:白山 カンクラ雪溪直下の湧泉). (b)幼虫, (c)成虫♂と(d)成虫♀.

本研究では、水系ネットワークの端緒である「Sky islands (天空の島々)」の細流や湧泉に注目し、そこに生息するナガレグリトビケラの分子系統解析を行い、本種の進化の歴史を考察する。また、ナガレグリトビケラの遺伝構造の空間パターンにおいて、水系ネットワークと高山域の遺伝構造のつながりについて新たな知見を提示した。なお、本研究の一部は 2023 年度に原著論文²⁸として公表した。

2. 方法

2.1 研究材料・試料の採集と DNA 抽出・PCR・アライメント・遺伝構造解析

2021 年, 2022 年の期間にかけて、本州よりナガレグリトビケラのほぼ全ての分布域を網羅するように 36 地点から 201 個体の幼虫および成虫を採集した。これらのすべてのサンプルは野外で 99.5%エタノールで固定した。外群としてキリバネトビケラ科に属する *Limnephilus centralis*, *Limnephilus externus*, *Hesperophylax designates*, *Ecclisopteryx guttulate* を用いた。また、エグリトビケラ科内におけるナガレグリトビケラの系統学的位置づけ、分岐年代推定のために複数の科のトビケラの DNA 配列データを GenBank から得た⁵⁴。

全ゲノム DNA はサンプルの 99.5%エタノールで保存した組織から抽出し、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、製造元の説明書に従って精製した。抽出した全ゲノム DNA を用いて、Suzuki et al. (2023) に示すプライマーセットでポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により DNA 断片 [ミトコンドリア DNA (mtDNA) cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) 領域 と 16S rRNA 領域, 核 DNA (nDNA) 28S rRNA 領域, 18S rRNA 領域, carbamoyl phosphate synthetase (*CAD*) 領域, elongation-factor 1 alpha (*EF1- α*) 領域そして RNA polymerase II (*POLII*) 領域] を増幅させた。PCR 産物は、ExoSAP-IT (GE Healthcare, Amersham, UK) を用いて精製した。精製した DNA 断片は、BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、自動シーケンサー (ABI 3130xl DNA Analyzer; Perkin Elmer/Applied Biosystems) 上で自動で配列決定をした。

すべての配列データは日本 DNA データバンク (DDBJ データベース) に登録され、アクセッション番号は原著論文の補足資料に記載した²⁸。アセンブルは、CLC Workbench software (CLC bio, Aarhus, Denmark) を用いて各遺伝子について個別に実施した。すべての配列データは、MAFFT v. 7.470 (MAFFT online service)⁵⁵にてソフトウェアのデフォルトセッティングで自動的にアライメントした。アライメント後に得られた配列は、その後の解析の前にソフトウェア DnaSP v. 6.12.03⁵⁶を用いて、固有のハプロタイプを決定した。

ハプロタイプネットワークはソフトウェア PopART v. 1.7⁵⁷で、TCS プログラム v. 1.2.1⁵⁸を用いて構築した。各クレードのハプロタイプ多様度 (h) とヌクレオチド多様度 (π)⁵⁹はソフトウェア DnaSP v. 6.12.03⁵⁶を用いて算出した。また、サンプリングポイントごとのハプロタイプ多様度 (h) とヌクレオチド多様度 (π) も同様に算出した。クレード間の遺伝的距離 (p -distance) は MEGA v7.0⁶⁰を用いて算出し、クレード間の F_{ST} は Arlequin v. 3.5.2.2⁶¹を用いて算出した。

2.2 系統解析・分岐年代推定

ナガレグリトビケラとエグリトビケラ科内を含む近縁な科に属する種との系統関係を nDNA 28S rRNA (992bp), 18S rRNA (770bp) そして *CAD* (756bp) 領域の結合配列に基づき、系統解析を行った。また、ナガレグリトビケラの種内遺伝系統群の系統関係を明らかにするために mtDNA *COI* (652bp) と 16S rRNA (349bp) の 2 領域の結合配列を用いた解析と nDNA 28S rRNA (992bp), 18S rRNA (770bp), *CAD* (756bp), *EF1- α* (368bp) そして *POL-II* (772bp) の 5 領域の結合配列を用いた解析を別々に行った。

これらのデータセットの解析は IQ-TREE v. 2.1.3⁶² を用いた最尤法で行い、ソフトウェアに実装されている ModelFinder⁶³で適するモデル選択を行った (nDNA 28S rRNA 領域: TN+F+I+G4; nDNA 18S rRNA 領域: K2P+I; nDNA *CAD* 領域: TIM2+F+I+G4; nDNA *EF1- α* 領域: K2P; nDNA *POL-II* 領域: K2P; mtDNA *COI* 領域: TIM2+F+I+G4; mtDNA 16S rRNA 領域: HKY+F+I)。系統樹における支持率は 1,000 回の繰り返し計算による Nonparametric bootstrap を採用し

た。

分岐年代推定を行う際に、BEAST2 v.2.4.8⁶⁴を使用した。ナガレエグリトビケラの化石記録がないため、ナガレエグリトビケラの種内遺伝系統群の分化を調べるために、以下のような方法を行った。1つ目に化石記録による年代較正を行ったトビケラ目の高次系統における系統解析の先行研究⁵⁴で用いられたデータセットに本研究で解析したナガレエグリトビケラの遺伝子配列を加えて系統解析を行い、ナガレエグリトビケラとエグリトビケラ科内を含む近縁な科に属する種との系統関係及び分岐年代を推定した。得られた結果から近縁なグループとナガレエグリトビケラとの分岐年代を調べた。系統解析はnDNA 28S rRNA, 18S rRNA, CAD領域に基づき実施した。いくつかの塩基配列は先行研究に従って属レベルにおいて2種、または3種の配列を結合させキメラ・タクサとして用いた。年代較正は先行研究で用いられた化石記録の内、2つを用いた。

ナガレエグリトビケラのエグリトビケラ科内の近縁種 *Hesperophylax designates* との分岐年代は11.1–30.1 Ma (95%信頼区間)と推定されたため、この数値を事前設定として用い、mtDNA COI と 16S rRNA 領域の結合配列に基づいて、ナガレエグリトビケラの種内遺伝系統群の分岐年代を推定した。

エグリトビケラ科を含めた近縁な科における分岐年代と、ナガレエグリトビケラ種内遺伝系統群における分岐年代の推定は、いずれも BEAST2 v.2.4.8⁶⁴ を用いたベイズ法で推定した。分岐年代の推定、系統解析を行うにあたり、プログラム Kakusan4⁶⁵ を用いて、Schwarz のベイズ情報量 (BIC)⁶⁶ に基づいて適切なモデルを選択した。置換モデルを以下のように選択した。nDNA 28S rRNA, CAD 領域のそれぞれは HKY + Gamma, nDNA 18S rRNA 領域は JC69+Homogeneous を選択した。mtDNA COI, 16S rRNA 領域のいずれも HKY+Gamma を選択した。ベイズ解析における MCMC シミュレーションはそれぞれのデータセットで 100,000,000 世代繰り返し、2,000 世代ごとにサンプリングして実行され、Clock Model は Lognormal relaxed clock, Tree prior は Birth Death Model を選択した。出力ファイルは Tracer v 1.6⁶⁷ を用いて 10% の Burn-in を除去した後有効サンプリングサイズ (ESS > 200) を調べ Tree Annotator (BEAST package) で要約した後、FigTree v1.4.3⁶⁸ を用いて系統樹を可視化した。

2.3 集団動態解析

集団の拡大に伴って予想される中立性からの逸脱を調べるため、Tajima's *D* 統計量 (Tajima's *D*)⁶⁹ と Fu's *F_s* 統計量 (Fu's *F_s*)⁷⁰ との測定値を得た。また、ミスマッチ分布検定は観測値と期待値を比較することで実施された。これらは Arlequin v. 3.5.2.2⁶¹ を用いて計算された。

BEAST2 v.2.4.8⁶⁴ に実装されている Extended Bayesian Skyline Plot⁷¹ (EBSP) を用いて、mtDNA COI 領域に基づき時間経過による有効集団サイズの変化を描画した。適する塩基置換モデルは、上記の系統解析と同様の方法で計算した結果、HKY + Gamma を選択した。Clock Model については Strict clock を選択し、Clock rate は上記のナガレエグリトビケラ種内遺伝系統群間の分岐年代推定から算出された値 (1.235%/Myr) を用いた。MCMC シミュレーションは 100,000,000 世代繰り返し、2,000 世代ごとにサンプリングして実行された。出力ファイルは Tracer v 1.6⁶⁷ を用いて有効サンプリングサイズ (ESS > 200) を調べ、EBSP の図は統計解析ソフト R によって描画した⁷²。

2.4 ナガレエグリトビケラ生息地の地理的特徴の可視化

ナガレエグリトビケラの生息地の地形的特徴を評価するため、調査地に最も近接する河川を地図上より抽出し、緯度 (N°), 経度 (E°) と標高 (m) 情報に基づき、その河川が属する河川系を可視化した。なお、地理データ (GIS データ) は国土数値情報 (<https://nlftp.mlit.go.jp/ksj/>) より、標高データは国土地理院 (https://www.gsi.go.jp/kankyochiri/gm_jpn.html) より取得した。解析については、Qgis 3.22 (<https://www.qgis.org/ja/site/>) と、R パッケージ rgl (<https://dmurdoch.github.io/rgl/>) を用いた。

なお、本研究の一部は 2023 年度に原著論文として公表済みであり、用いたデータセットのサンプリング地点や遺伝子情報、分子実験に用いたプライマーセットなどの詳細情報については、原著論文²⁸を参照していただきたい。

3. 得られた成果

3.1 ナガレエグリトビケラの分布域, 生息地の特性

ナガレエグリトビケラ 201 個体が採集された 33 地点はいずれも標高 1,000 m 以上の高標高地であり, 各河川系の源流部であった (図 3).

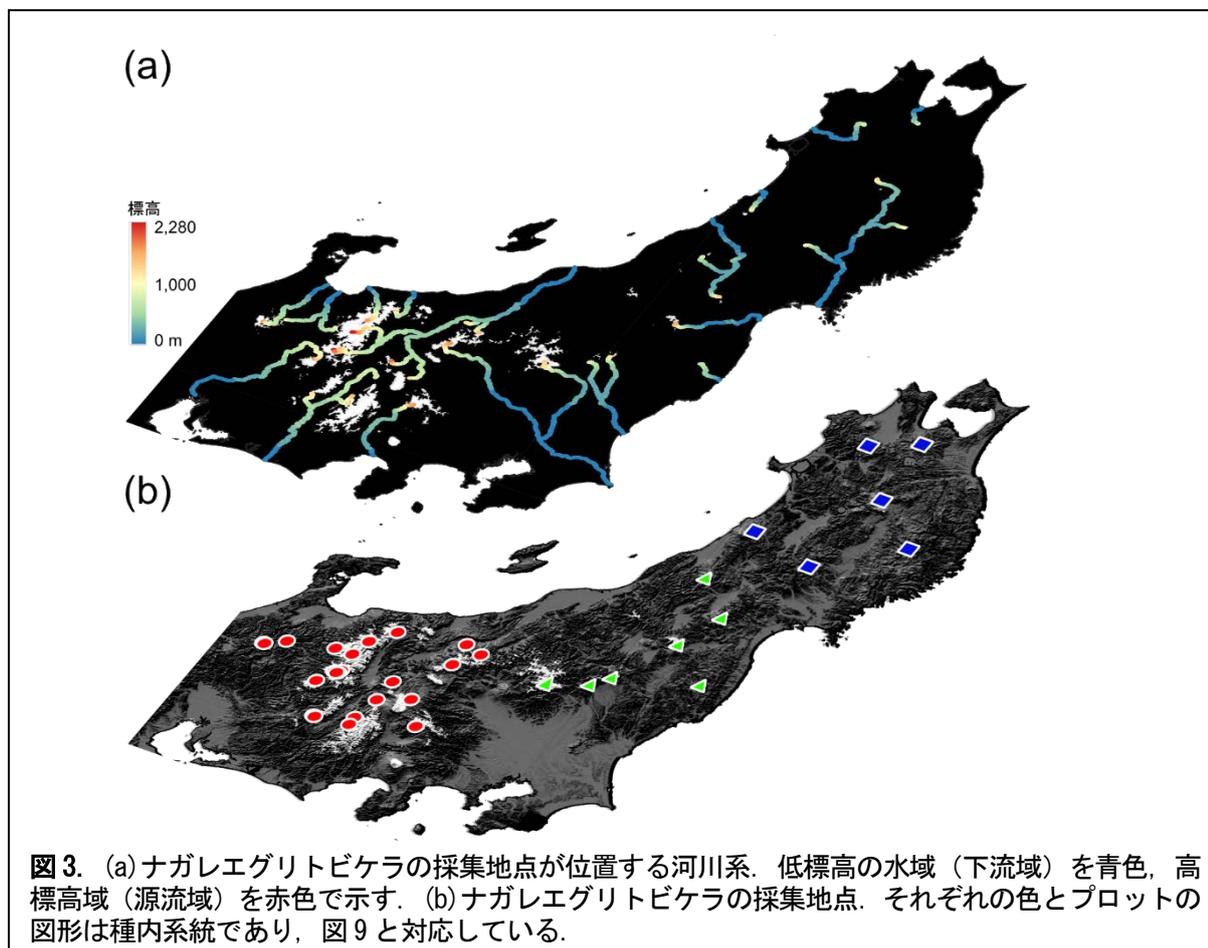


図 3. (a)ナガレエグリトビケラの採集地点が位置する河川系. 低標高の水域 (下流域) を青色, 高標高域 (源流域) を赤色で示す. (b)ナガレエグリトビケラの採集地点. それぞれの色とプロットの図形は種内系統であり, 図 9 と対応している.

ただし, 緯度が低下するに従い, 生息地はより高標高地に位置する傾向があった. また, 採集地の年平均気温は約 8.0°C 以下であり, 冷涼な気候を好むことも示唆された (図 4).

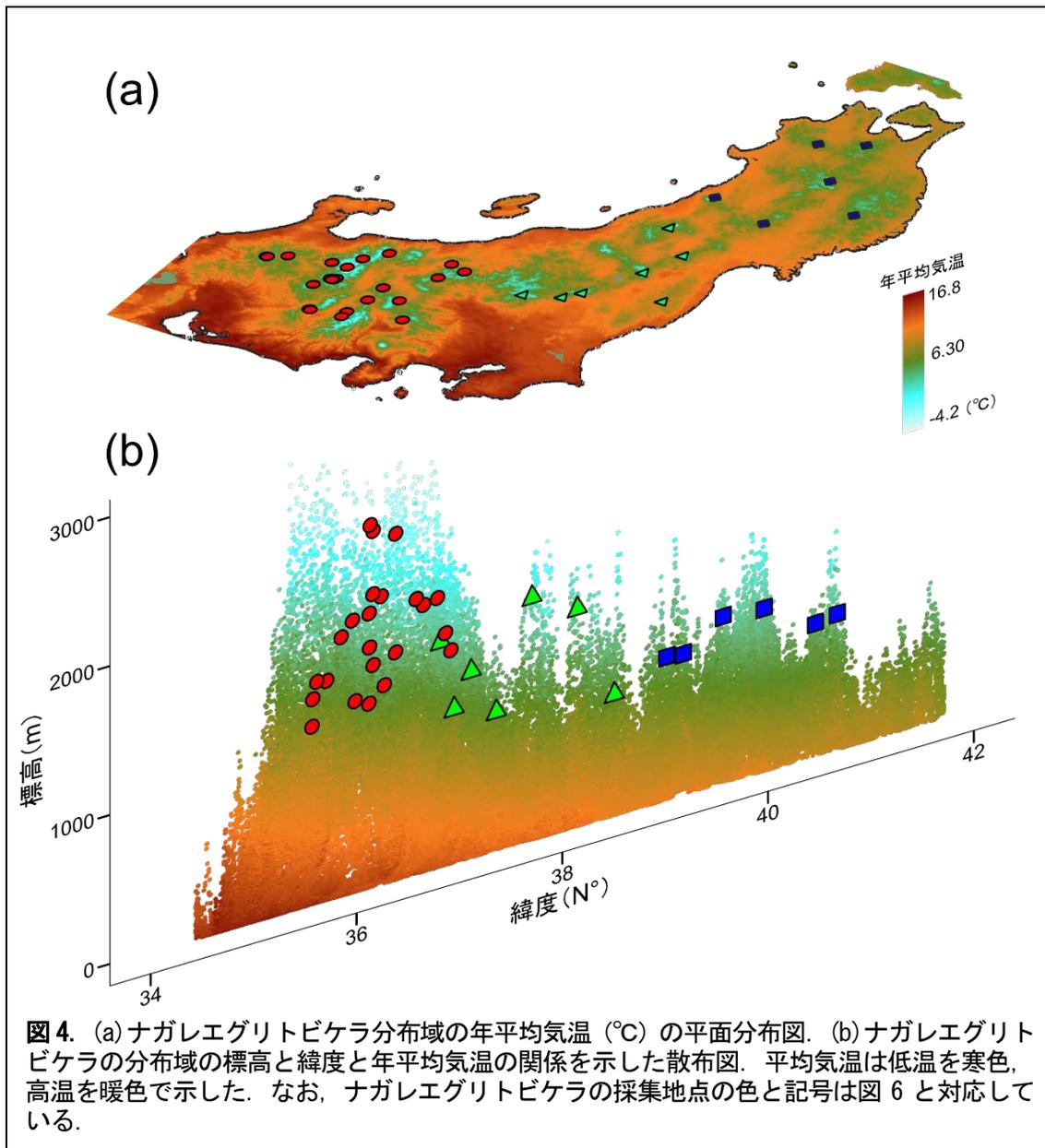


図4. (a)ナガレエグリトビケラ分布域の年平均気温 (°C) の平面分布図. (b)ナガレエグリトビケラの分布域の標高と緯度と年平均気温の関係を示した散布図. 平均気温は低温を寒色, 高温を暖色で示した. なお, ナガレエグリトビケラの採集地点の色と記号は図6と対応している.

ナガレエグリトビケラは中部山岳域以西に採集記録はなく, 筆者が調査した際にも生息は確認できなかった⁵. 白山を含む中部地方の山岳域は多くの寒冷適応種の分布西限として知られており^{73,74}, これら寒冷適応種と同様に高山帯のような冷涼な環境に依存していると推察される. また, 信濃・千曲川水系に注目すると, 同一河川系でも, ナガレエグリトビケラの生息地はいくつもの山塊に分かれて孤立・散在的に存在していることが示され, 河川系内においては生息地の接続性は低いことが推察された (図5).

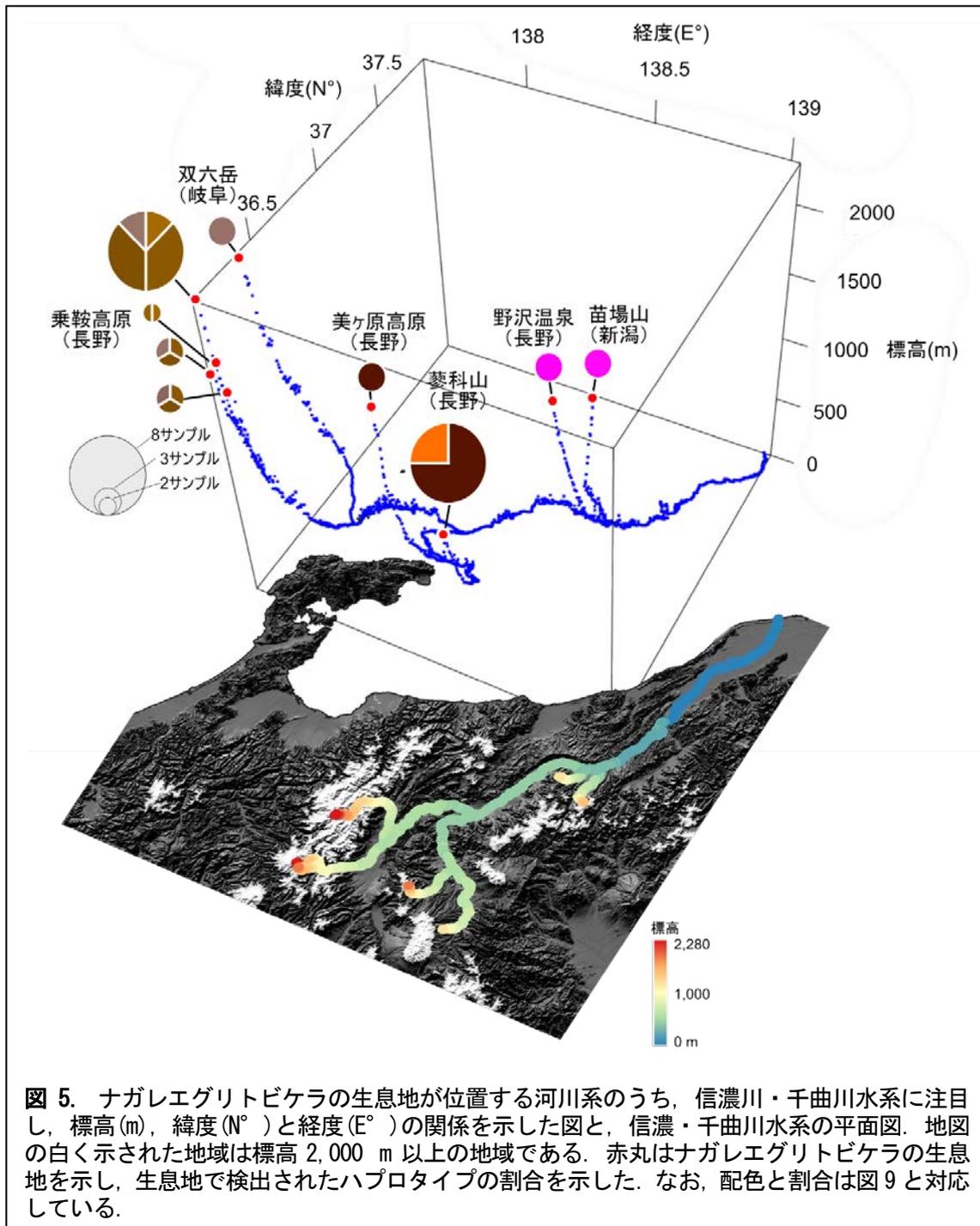


図 5. ナガレグリトビケラの生息地が位置する河川系のうち、信濃川・千曲川水系に注目し、標高(m)、緯度(N°)と経度(E°)の関係を示した図と、信濃・千曲川水系の平面図。地図の白く示された地域は標高 2,000 m 以上の地域である。赤丸はナガレグリトビケラの生息地を示し、生息地で検出されたハプロタイプの割合を示した。なお、配色と割合は図 9 と対応している。

3.2 ナガレグリトビケラの種内系統の進化史

mtDNA *COI*, 16S rRNA 領域に基づくナガレグリトビケラ種内の系統解析において、遺伝的に分化した 3 つの種内系統の存在が示され、それぞれの系統は地理的に分化することが示唆された(東北北部系統: 系統 N, 東西南部-関東北部系統: 系統 C と中部山岳系統: 系統 S) (図 6)。また、mtDNA *COI* 領域に基づく遺伝的距離を示す *p*-distance と *F_{ST}* を算出したところ、系統間において大きな遺伝的分化を示した (表 1)。

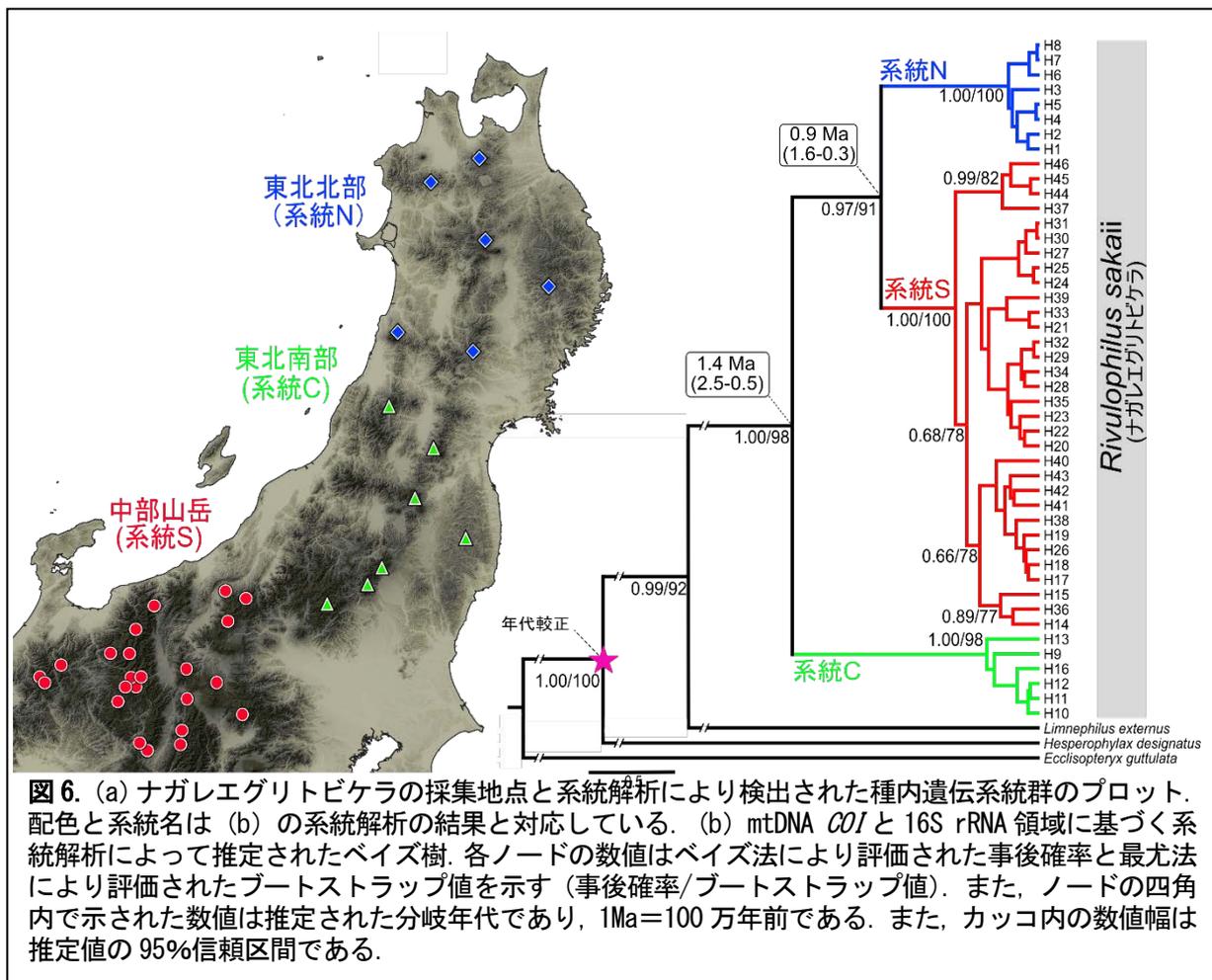


図 6. (a) ナガレエグリトビケラの採集地点と系統解析により検出された種内遺伝系統群のプロット。配色と系統名は (b) の系統解析の結果と対応している。 (b) mtDNA *COI* と 16S rRNA 領域に基づく系統解析によって推定されたベイズ樹。各ノードの数値はベイズ法により評価された事後確率と最尤法により評価されたブートストラップ値を示す (事後確率/ブートストラップ値)。また、ノードの四角内で示された数値は推定された分岐年代であり、1Ma=100 万年前である。また、カッコ内の数値幅は推定値の 95%信頼区間である。

表 1. mtDNA *COI* 領域に基づくナガレエグリトビケラ各種内系統間の遺伝的距離

	系統N	系統S	系統C
東北北部 (系統N)		0.900	0.736
東北南部 (系統C)	0.029		0.828
中部山岳 (系統S)	0.022	0.036	

表中上部: *p*-distance, 表中下部: pairwise F_{ST}

ナガレエグリトビケラが属するエグリトビケラ科 (Limnephilinae) を含んだトビケラ類のデータセットにおける nDNA 18S rRNA, 28S rRNA と *CAD* 領域に基づく化石記録に基づく年代較正を行った分岐年代推定は、ナガレエグリトビケラと近縁種である北米大陸に生息・分布する *H. designatus* との分岐年代は約 2,040 万年前 (95%信頼区間: 3,010–1,110 万年前) と推定された。続いてナガレエグリトビケラと *H. designatus* との分岐年代を較正年代として用い、mtDNA *COI* と 16S rRNA 領域に基づく分岐年代推定を行ったところ、東北南部–関東北部系統 (系統 C) の系統の分化は 140 万年前 (95%信頼区間: 250–50 万年前) と推定され、東北北部系統 (系統 N) と中部山岳系統 (系統 S) の分化は 90 万年前 (95%信頼区間: 160–30 万年前) と推定された (図 6)。

推定された分岐年代より、ナガレエグリトビケラの種内系統が分化した時期は第四紀更新世 (約 258 万年前–1 万年前) であることが示唆された。日本列島では、約 500 万年前に始まった海洋プレートの運動方向の変化に伴い 75–77, この時代以降、多くの火山や山脈の形成が促進された 78,79。これらの地形的変化は生物種の集団の分断化や、移動・分散の障壁として機能し、種分化や系統分化に影響したことが知られている 80–84。従って、このような日本列島

の活発な地殻変動が、ナガレグリトビケラの系統分化の促進と維持に影響していることが推察される。

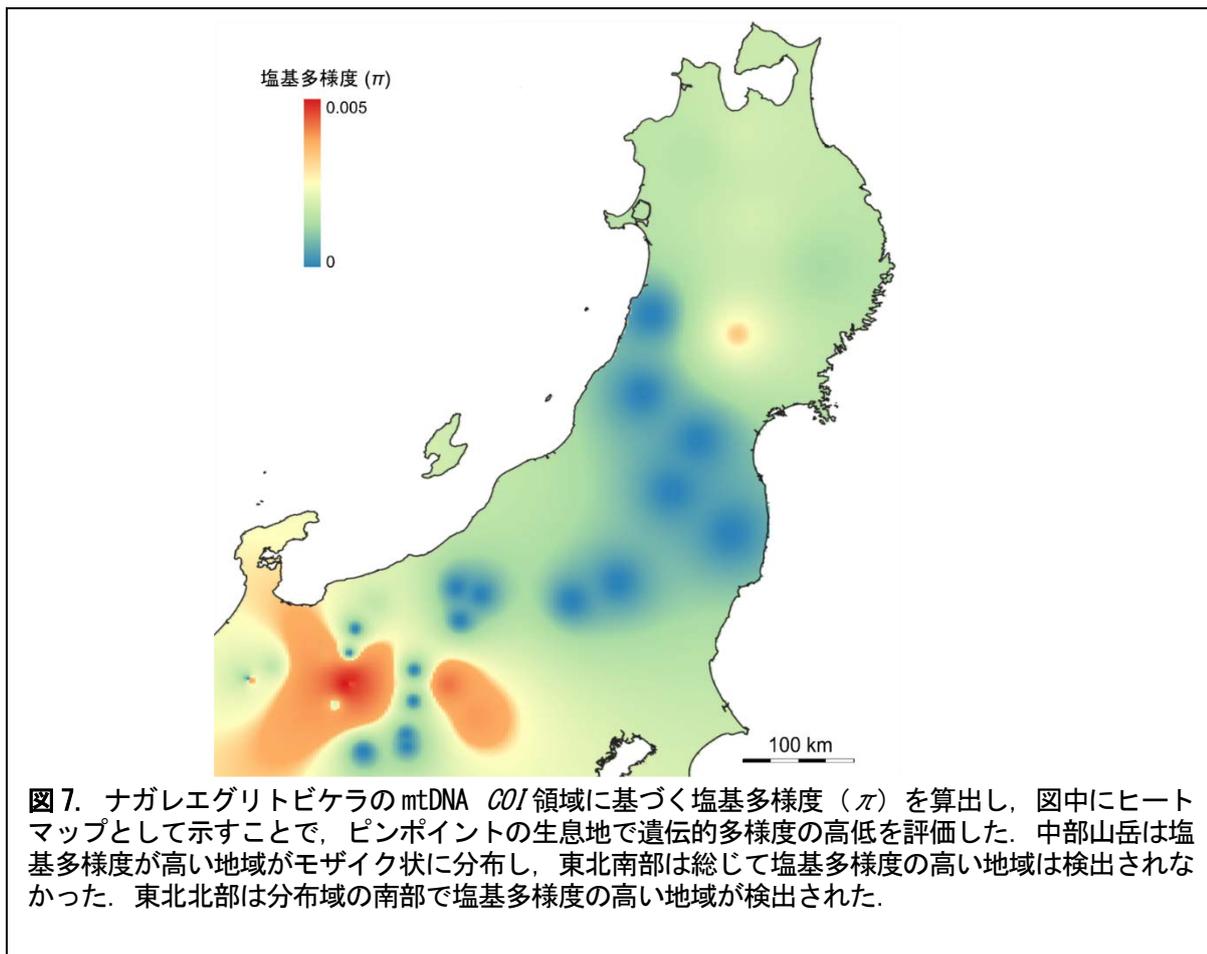
3.3 ナガレグリトビケラの各種内系統の遺伝構造

すべてのナガレグリトビケラのサンプルの mtDNA *COI* 領域に基づき検出された遺伝子型（ハプロタイプ）は 46 パターン存在した（表 1）。また、それぞれの種内系統の遺伝的多様度を示すハプロタイプ多様度 (h) と塩基多様度 (π) を mtDNA *COI* 領域に基づき算出した。すると、より北方に分布する系統ほど遺伝的多様度が低下する傾向がみられた（表 1）。また、算出された塩基多様度 (π) を地図上に可視化する図（ヒートマップ）により、各種内系統の塩基多様度 (π) の地理的パターンを示した。中部山岳域（系統 S の分布域）では、モザイク状に塩基多様度の高い地域が示され、東北南部-関東北部（系統 C の分布域）では、総じて塩基多様度は低く、東北北部（系統 N の分布域）は南部に塩基多様度の高い地域が検出された（図 7）。

表 2. mtDNA *COI* 領域に基づくナガレグリトビケラの遺伝的多様度と中立性検定の結果。中立性検定は各指標 (Tajima's D と Fu's F_s) が負の値であると集団拡大を示す。統計的有意性について、系統 C の Fu's F_s 以外は支持されず

	N	H	h	π	D	F_s
東東北(系統N)	41	8	0.735	0.001	-0.951	-2.464
東北南-関東北(系統S)	56	6	0.831	0.003	0.898	1.885
中部山岳(系統C)	104	32	0.966	0.007	-0.766	-14.725**
全体	201	46	0.967	0.020	1.423	-2.923

N : 個体数, H : 検出されたハプロタイプ数, h : ハプロタイプ多様度, π : 塩基多様度, D : Tajima's D , F_s : Fu's F_s , * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,



塩基置換パターンに基づき遺伝子型（ハプロタイプ）をネットワーク状に表現することで遺伝子型（ハプロタイプ）同士の関係性を評価することができる（ハプロタイプネットワーク）⁸⁵。例えば 1 つの優占するハプロタイプを中心

とする「花火型」の形状が検出された場合、近年に急激な集団拡大が生じたことを示唆する⁸⁵。ナガレグリトビケラのいずれの系統も「花火型」のハプロタイプネットワークは示されなかった。また集団動態解析として、Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP)、ミスマッチ分布 (図 8)、遺伝的指数である Tajima's D と Fu's F_s に基づく統計的有意性の評価を行ったが、各種内系統の近年の集団拡大は示唆されなかった (表 2)。また、ハプロタイプネットワークによって示された遺伝的に近縁なハプロタイプは地理的に近接する場所 (同一山塊) より検出される傾向があった (図 9)。

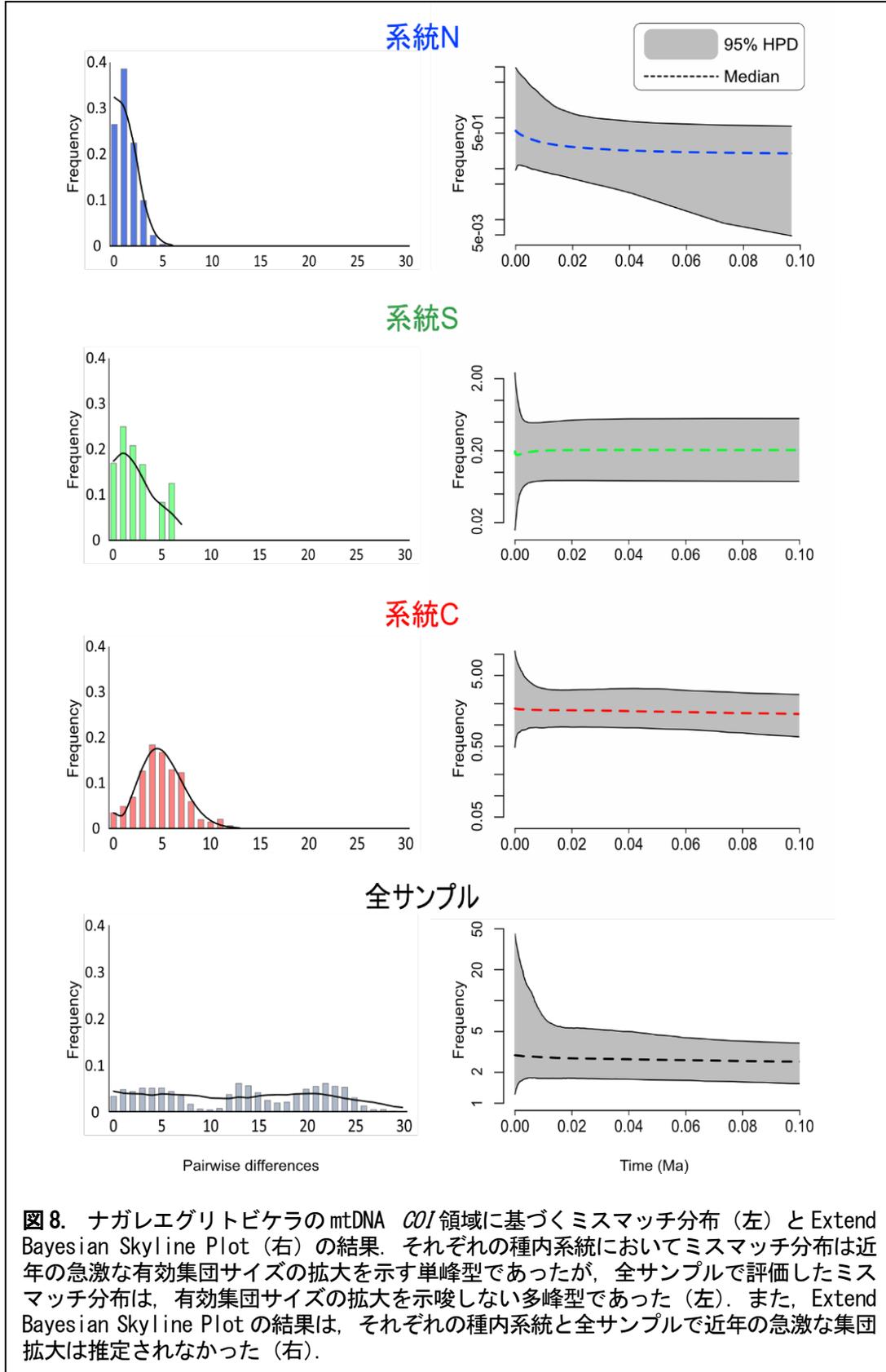


図 8. ナガレグリトビケラの mtDNA *COI* 領域に基づくミスマッチ分布 (左) と Extend Bayesian Skyline Plot (右) の結果. それぞれの種内系統においてミスマッチ分布は近年の急激な有効集団サイズの拡大を示す単峰型であったが、全サンプルで評価したミスマッチ分布は、有効集団サイズの拡大を示唆しない多峰型であった (左). また、Extend Bayesian Skyline Plot の結果は、それぞれの種内系統と全サンプルで近年の急激な集団拡大は推定されなかった (右).

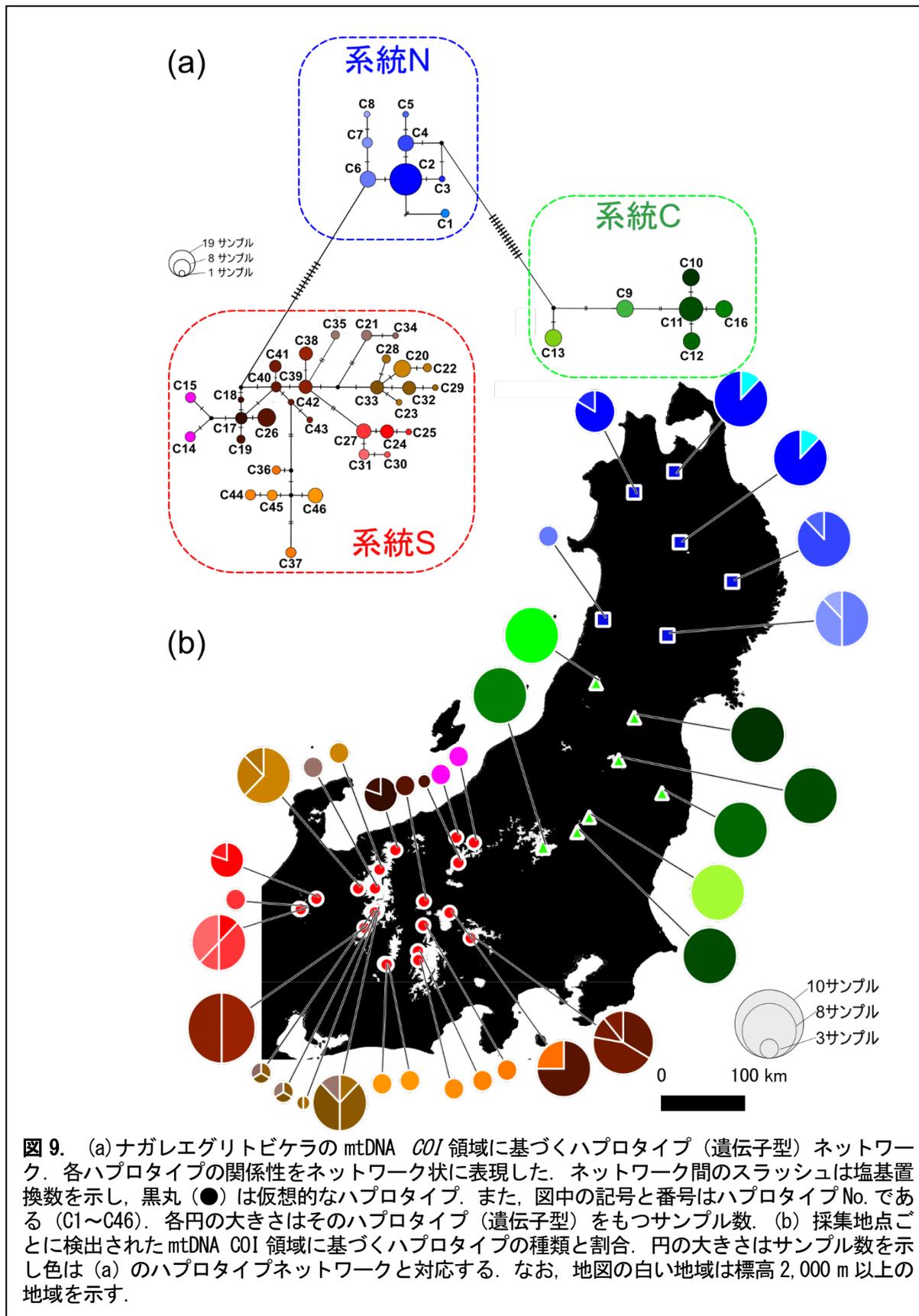


図9. (a)ナガレグリトピケラの mtDNA *COI* 領域に基づくハプロタイプ（遺伝子型）ネットワーク。各ハプロタイプの関係性をネットワーク状に表現した。ネットワーク間のスラッシュは塩基置換数を示し、黒丸（●）は仮想的なハプロタイプ。また、図中の記号と番号はハプロタイプ No. である（C1～C46）。各円の大きさはそのハプロタイプ（遺伝子型）をもつサンプル数。(b) 採集地点ごとに検出された mtDNA *COI* 領域に基づくハプロタイプの種類と割合。円の大きさはサンプル数を示し色は (a) のハプロタイプネットワークと対応する。なお、地図の白い地域は標高 2,000 m 以上の地域を示す。

「Sky islands (天空の島々)」に生息する生物種は、現在生息する集団における移動・分散に伴う遺伝子流動が起きにくい。そのため生物種の遺伝構造より、過去に起きた分集団化や地理的隔離などの分布域シフト・イベントを理解することに適している^{33,86}。第四紀更新世の氷期・間氷期サイクルによって、多くの生物種は分布域シフトを余儀なくされてきた⁸⁷。特に、氷河が高緯度地域や高山帯のみを覆っていたと考えられている日本列島の場合、氷期には多くの生物種が低緯度地域に分布域をシフトさせた⁴⁷⁻⁵⁰。その際、多くの生物種は生存に不適な時期を低緯度地域の沿

岸部で生き延びたとされている^{49,88}。このような、生存に不適な時期を生き延びることができた地域を「逃避地（レフュジア）」と呼ぶ。ナガレエグリトビケラに関しては中立性検定、ミスマッチ分布検定、Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP) の結果からは近年の集団拡大に伴う遺伝構造の変化は支持されていない。ただし、集団（サンプリングサイト）ごとの塩基多様度 (π) を算出し、地図上に可視化すると局所的にヌクレオチド多様度 (π) の高くなる地域が検出された。一般的に集団の遺伝的多様性の高さは、生存に不適な時期を生き延びるための「逃避地（レフュジア）」となった地域を特徴づけることが示唆されている^{30,89}。そのため、ナガレエグリトビケラの遺伝構造は複数の局所的に存在したレフュジア（マイクロレフュジア）において長期的に集団を維持した経緯を示している。さらに地理的に明確に集団が区別される遺伝構造は、集団間の二次的接触や交雑が制限されたことを示唆しており、第四紀更新世の繰り返された氷期-間氷期サイクルにおいて系統間の交雑を促す程度の大規模な分布域の拡大/縮小を繰り返さなかったと推測される。

寒冷適応した生物種の第四紀更新世の氷期-間氷期サイクルに伴う分布域シフトは高山植物で多くの研究が知られている^{48,51}。例えばヨツバシオガマ *Pedicularis chamissonis*、ミヤマタネツケバナ *Cardamine nipponica* など、間氷期である現在において、中部山岳域の高山帯に隔離・依存的に生息・分布している種内遺伝系統群が存在している^{90,91}。また、中部山岳域は氷期でも湿潤な環境が維持されており、生物種が長期的に集団を維持することができたとされている^{92,93}。従って、中部山岳域は日本列島の他地域とは異なる遺伝構造を示す場合が多く報告されており、遺伝的多様性も高い⁹³。ナガレエグリトビケラも中部山岳域が「逃避地（レフュジア）」として機能したと想定されるが、水生生物は陸上生物とは異なる進化史をたどった可能性が想定される。水中は陸上に比べ、温度の変化は緩やかであり、山間部の溪流や湧泉などの水域は凍結や乾燥のリスクを軽減できる。従って、陸上生物よりも高標高地で寒冷な気候に耐えることができたと考えられている^{25,46,94}。つまり水生生物は、氷期に低緯度へ生息地を移動するような広範囲な移動は必要とせず、山塊内で分布域を垂直方向で移動を繰り返すことで更新世の気候変動に対応できた可能性が高い。陸上生物とは異なる分布域シフトを経験したと想定される水生生物の生物群集は陸上生物とは区別され、「Dinodal Biome」と称される⁹⁴。ナガレエグリトビケラについても、山塊内の局所的に存在する不凍な水域（湧水や細流）で生存に不適な氷期を生き延びた結果、長期的に隔離・依存的に集団が維持され、山塊ごとに遺伝子型（ハプロタイプ）が固定化され、遺伝子型の地域性が生じたと推察される。

特に、信濃・千曲川水系のハプロタイプの地理的分布に注目したところ、河川系単位よりも、源流部が位置する山塊単位での遺伝的な近縁性が示唆された（図 5）。これまでに、河川源流部や飛沫帯といった特異的な環境に適応した生物種群（源流棲生物種群）を対象とした研究において、ハビタットごとの集団サイズが小さくなる傾向や、その結果として集団内での遺伝的固定化、遺伝的多様性の低下が示されてきた^{21,22,95}。今回研究対象としたナガレエグリトビケラは河川の最源流部に生息し、これらの源流棲生物種と同様の結果が得られたが、同じエグリトビケラ科に属するオンダケトビケラ類 *Pseudostenophylax* の遺伝構造と特に類似している²⁹。ナガレエグリトビケラもオンダケトビケラ類も「Sky islands（天空の島々）」に孤立・分散的に分布・生息しており、山塊ごとにクラスタリングされる遺伝構造が確認された²⁹。つまり、これらの生物種の遺伝構造は河川源流域（特に「Sky islands（天空の島々）」に存在する水域）は集団を長期的に維持するために必要不可欠なハビタットであることが示唆された^{28,29}。

4. まとめ

今回、本研究では日本列島の「Sky islands（天空の島々）」に生息するトビケラの地域ごとの系統分化と地理的構造を明らかにした。この結果は、高標高地に生息する生物において日本列島の山岳形成が移動・分散の障壁として機能したことと、第四紀更新世の周期的な気候変動（氷期-間氷期サイクル）が種内系統の分化や、種内系統内の遺伝構造に影響を与えたことを示した。また、ナガレエグリトビケラの遺伝構造から、過去に広範囲が氷床で覆われなかった日本列島の山岳地域に局所的な「逃避地（レフュジア）」が存在したことが推察された。特に高地に存在する氷期にも不凍であった水域（湧水・細流）などの安定的に水生生物の集団を存続させる可能性があった。従って、山塊内

の「Sky islands (天空の島々)」に存在する水域は河川系単位に加え、山塊単位で生物多様性を理解するために必要な地域であることが指摘された。

5. 謝辞

本研究は、河川学術研究会千曲川グループならびに北陸地方整備局 千曲川河川事務所の皆さま、野崎隆夫氏、伊藤富子氏、田中政行氏、船越進太郎氏、川瀬英夫氏、岐阜県環境生活部 環境企画課の皆さまのご協力のもと調査を実施した。また、研究遂行について信州大学理学部生物学コースの東城幸治教授、竹中將起助教をはじめ、東城研究室の皆さまに全面的に支援いただいた。心よりお礼を申し上げる。なお、本研究における高山帯の調査に関しては環境省（環中中国許第 2109012 号、第 2206271 号）のもと実施した。

6. 引用文献

1. Elith, J., H. Graham, C., P. Anderson, R., Dudík, M., Ferrier, S., Guisan, A., J. Hijmans, R., Huettmann, F., R. Leathwick, J., Lehmann, A., et al. (2006). Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29, 129–151.
2. Gueuning, M., Suchan, T., Rutschmann, S., Gattolliat, J.-L., Jamsari, J., Kamil, A.I., Pitteloud, C., Buerki, S., Balke, M., Sartori, M., et al. (2017). Elevation in tropical sky islands as the common driver in structuring genes and communities of freshwater organisms. *Sci. Rep.* 7, 16089.
3. Hewitt, G.M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 359, 183–195.
4. Lehrian, S., Bálint, M., Haase, P., and Pauls, S.U. (2010). Genetic population structure of an autumn-emerging caddisfly with inherently low dispersal capacity and insights into its phylogeography. *J. North Am. Benthol. Soc.* 29, 1100–1118.
5. Okamoto, S., and Tojo, K. (2021). Distribution patterns and niche segregation of three closely related Japanese ephemerid mayflies: a re-examination of each species' habitat from “megadata” held in the “National Census on River Environments.” *Limnology* 22, 277–287.
6. Okamoto, S., Takenaka, M., and Tojo, K. (2022). Seasonal modifications of longitudinal distribution patterns within a stream: Interspecific interactions in the niche overlap zones of two *Ephemera* mayflies. *Ecol. Evol.* 12, e8766.
7. Saito, R., and 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. *Freshw. Sci.* 35, 712–723.
8. Avise, J.C. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Harvard, UK.
9. Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., and Saunders, N.C. (1987). INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489–522.
10. Baggiano, O., Schmidt, D.J., Sheldon, F., and Hughes, J.M. (2011). The role of altitude and associated habitat stability in determining patterns of population genetic structure in two species of *Atalophlebia* (Ephemeroptera: Leptophlebiidae). *Freshw. Biol.* 56, 230–249.
11. Finn, D.S., and Poff, N.L. (2011). Examining spatial concordance of genetic and species diversity patterns to evaluate the role of dispersal limitation in structuring headwater metacommunities. *J. North Am. Benthol. Soc.* 30, 273–283.
12. Finn, D.S., Theobald, D.M., Black, W.C., 4th, and Poff, N.L. (2006). Spatial population genetic structure and limited dispersal in a Rocky Mountain alpine stream insect. *Mol. Ecol.* 15, 3553–3566.
13. Rice, S.P., Greenwood, M.T., and Joyce, C.B. (2001). Tributaries, sediment sources, and the longitudinal organisation of macroinvertebrate fauna along river systems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58, 824–840.

14. Poole, G.C. (2002). Fluvial landscape ecology: addressing uniqueness within the river discontinuum. *Freshw. Biol.* *47*, 641–660.
15. 中村太士. (2013). 河川生態学. 講談社. 東京, 日本
16. 平林公男, 東城幸治. (2024). 河川生態学入門: 基礎から生物生産まで. 共立出版. 東京, 日本.
17. Finn, D.S., Blouin, M.S., and Lytle, D.A. (2007). Population genetic structure reveals terrestrial affinities for a headwater stream insect. *Freshw. Biol.* *52*, 1881–1897.
18. Ruppert, J.L.W., James, P.M.A., Taylor, E.B., Rudolfsen, T., Veillard, M., Davis, C.S., Watkinson, D., and Poesch, M.S. (2017). Riverscape genetic structure of a threatened and dispersal limited freshwater species, the Rocky Mountain Sculpin (*Cottus* sp.). *Conserv. Genet.* *18*, 925–937.
19. Suzuki, H., Takenaka, M., and Tojo, K. (2024). Evolutionary history of a cold-adapted limnephilid caddisfly: Effects of climate change and topography on genetic structure. *Mol. Phylogenet. Evol.* *191*, 107967.
20. 東城幸治. (2005). 河川源流域に棲息する水生昆虫類の遺伝的特性—ガガンボカゲロウ（昆虫綱 カゲロウ目）におけるミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子配列の変異を例に—. *応用生態工学* *7*, 119–127.
21. Takenaka, M., and Tojo, K. (2019). Ancient origin of a dipteromimid mayfly family endemic to the Japanese Islands and its genetic differentiation across tectonic faults. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* *126*, 555–573.
22. Takenaka, M., Tokiwa, T., and Tojo, K. (2019). Concordance between molecular biogeography of *Dipteromimus tipuliformis* and geological history in the local fine scale (Ephemeroptera, Dipteromimidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* *139*, 106547.
23. Brown, L.E., Hannah, D.M., and Milner, A.M. (2003). Alpine Stream Habitat Classification: An Alternative Approach Incorporating the Role of Dynamic Water Source Contributions. *Arct. Antarct. Alp. Res.* *35*, 313–322.
24. Lehrian, S., Pauls, S.U., and Haase, P. (2009). Contrasting patterns of population structure in the montane caddisflies *Hydropsyche tenuis* and *Drusus discolor* in the Central European highlands. *Freshw. Biol.* *54*, 283–295.
25. Pauls, S.U., Lumbsch, H.T., and Haase, P. (2006). Phylogeography of the montane caddisfly *Drusus discolor*: evidence for multiple refugia and periglacial survival. *Mol. Ecol.* *15*, 2153–2169.
26. Brown, L.E., Hannah, D.M., and Milner, A.M. (2007). Vulnerability of alpine stream biodiversity to shrinking glaciers and snowpacks. *Glob. Chang. Biol.* *13*, 958–966.
27. Monaghan, M.T., Spaak, P., Robinson, C.T., and Ward, J.V. (2001). Genetic differentiation of *Baetis alpinus* Pictet (Ephemeroptera: Baetidae) in fragmented alpine streams. *Heredity* *86*, 395–403.
28. Suzuki, H., Takenaka, M., and Tojo, K. (2023). Phylogeography of an insect inhabiting ‘Sky Islands’: the relationships among genetic structures and geographical characteristics, geohistorical characteristics, and cyclical climate changes. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.*, blad112.
29. Mikami, K., Takenaka, M., Nozaki, T., Bae, Y.J., and Tojo, K. (2023). Phylogeography of alpine and subalpine adapted *Pseudostenophylax* caddisflies (Limnephilidae: Trichoptera): a strong relationship with mountain formation. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.*, *139*, 257–274.
30. Knowles, L.L., and Carstens, B.C. (2007). Estimating a geographically explicit model of population divergence. *Evolution* *61*, 477–493.
31. Martinez-Sañudo, I., Basso, A., Ortis, G., Marangoni, F., Stancher, G., and Mazzon, L. (2022). Strong genetic differentiation between fragmented alpine bush-cricket populations demands preservation of evolutionary significant units. *Insect Conserv. Divers.* *15*, 752–762.
32. Zhang, D., Hao, G.-Q., Guo, X.-Y., Hu, Q.-J., and Liu, J.-Q. (2019). Genomic insight into “sky island” species diversification in a mountainous biodiversity hotspot. *J. Syst. Evol.* *57*, 633–645.
33. Flantua, S.G.A., Hooghiemstra, H., and Hoorn, C. (2018). “Historical connectivity and mountain biodiversity” Mountains, climate and biodiversity. John Wiley & Sons. New Jersey, USA.
34. Previšić, A., Graf, W., Vitecek, S., Kučinić, M., Bálint, M., Keresztes, L., Pauls, S.U., and Waringer, J. (2014). Cryptic diversity of caddisflies in the Balkans: the curious case of *Ecclisopteryx* species (Trichoptera: Limnephilidae). *Arthropod Syst.*

35. Pauls, S.U., Nowak, C., Bálint, M., and Pfenninger, M. (2013). The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Mol. Ecol.* 22, 925–946.
36. Schultheis, A.S., Booth, J.Y., Perlmutter, L.R., Bond, J.E., and Sheldon, A.L. (2012). Phylogeography and species biogeography of montane Great Basin stoneflies. *Mol. Ecol.* 21, 3325–3340.
37. Khamis, K., Hannah, D.M., Clarvis, M.H., Brown, L.E., Castella, E., and Milner, A.M. (2014). Alpine aquatic ecosystem conservation policy in a changing climate. *Environ. Sci. Policy* 43, 39–55.
38. Wilkes, M.A., Carrivick, J.L., Castella, E., Ilg, C., Cauvy-Fraunié, S., Fell, S.C., Füreder, L., Huss, M., James, W., Lencioni, V., et al. (2023). Glacier retreat reorganizes river habitats leaving refugia for Alpine invertebrate biodiversity poorly protected. *Nat Ecol Evol* 7, 841–851.
39. Wan, J.-Z., Wang, C.-J., and Marquet, P.A. (2023). Environmental heterogeneity as a driver of terrestrial biodiversity on a global scale. *Prog. Phys. Geogr.* 47, 912–930.
40. Heald, W.F. (1951). Sky islands of Arizona. *Nat. Hist.* 60, 56–63.
41. Halbritter, D.A., Storer, C.G., Kawahara, A.Y., and Daniels, J.C. (2019). Phylogeography and population genetics of pine butterflies: Sky islands increase genetic divergence. *Ecol. Evol.* 9, 13389–13401.
42. Masta, S.E. (2000). Phylogeography of the jumping spider *Habronattus pugillis* (araneae: salticidae): recent vicariance of sky island populations? *Evolution* 54, 1699–1711.
43. Osborne, M.J., Cordova, S.J., Cameron, A.C., and Turner, T.F. (2019). Isolation by elevation: mitochondrial divergence among sky island populations of Sacramento Mountain salamander (*Aneides hardii*). *Conserv. Genet.* 20, 545–556.
44. Jansen van Rensburg, A., Robin, M., Phillips, B., and Van Buskirk, J. (2021). European common frog (*Rana temporaria*) recolonized Switzerland from multiple glacial refugia in northern Italy via trans- and circum-Alpine routes. *Ecol. Evol.* 11, 15984–15994.
45. Schmitt, T. (2007). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Front. Zool.* 4, 11.
46. Theissinger, K., Bálint, M., Feldheim, K.A., Haase, P., Johannesen, J., Laube, I., and Pauls, S.U. (2013). Glacial survival and post-glacial recolonization of an arctic-alpine freshwater insect (*Arcynopteryx dichroa*, Plecoptera, Perlodidae) in Europe. *J. Biogeogr.* 40, 236–248.
47. Aoki, K., Kato, M., and Murakami, N. (2011). Phylogeography of *Phytophagous Weevils* and Plant Species in Broadleaved Evergreen Forests: A Congruent Genetic Gap between Western and Eastern Parts of Japan. *Insects* 2, 128–150.
48. Ikeda, H. (2022). Decades-long phylogeographic issues: complex historical processes and ecological factors on genetic structure of alpine plants in the Japanese Archipelago. *J. Plant Res.* 135, 191–201.
49. Tojo, K., Sekiné, K., Takenaka, M., Isaka, Y., Komaki, S., Suzuki, T., and Schoville, S.D. (2017). Species diversity of insects in Japan: Their origins and diversification processes. *Entomol. Sci.* 20, 357–381.
50. Ueki, G., and Tojo, K. (2023). The phylogeography of the stag beetle *Dorcus montivagus* (Coleoptera, Lucanidae): Comparison with the phylogeography of its specific host tree, the Japanese beech *Fagus crenata*. *Entomol. Sci.* 26. e12535.
51. Fujii, N., and Senni, K. (2006). Phylogeography of Japanese alpine plants: biogeographic importance of alpine region of Central Honshu in Japan. *Taxon* 55, 43–52.
52. Nishimoto, H., Nozaki, T., and Ruitter, D.E. (2000). New limnephilid genus (Trichoptera) from Japan, with description of a new species. *Entomol. Sci.* 3, 377–386.
53. Nozaki, T. (2002). Life history of *Rivulophilus sakaii* Nishimoto et al. (Limnephilidae: Limnephilinae) in a small intermittent brook, central Japan. *Proceedings of the 10th International Symposium on Trichoptera* 15, 439–448.
54. Thomas, J.A., Frandsen, P.B., Prendini, E., Zhou, X., and Holzenthal, R.W. (2020). A multigene phylogeny and timeline for Trichoptera (Insecta). *Syst. Entomol.* 45, 670–686.
55. Katoh, K., Rozewicki, J., and Yamada, K.D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence

choice and visualization. *Brief. Bioinform.* 20, 1160–1166.

56. Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., and Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol. Biol. Evol.* 34, 3299–3302.
57. Leigh, J.W., and Bryant, D. (2015). Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.* 6, 1110–1116.
58. Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., and Crandall, K. (2002). TCS: estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium. IEEE Computer Society.* 2, 7
59. Nei, M., and Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5269–5273.
60. Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
61. Excoffier, L., and Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567.
62. Minh, B.Q., Schmidt, H.A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M.D., von Haeseler, A., and Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol. Biol. Evol.* 37, 1530–1534.
63. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., and Jermini, L.S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* 14, 587–589.
64. Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.-H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A., and Drummond, A.J. (2014). BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003537.
65. Tanabe, A.S. (2007). Kakusan: a computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. *Mol. Ecol. Notes* 7, 962–964.
66. Schwarz, G. (1978). Estimating the Dimension of a Model. *Ann. Stat.* 6, 461–464.
67. Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D., and Drummond, A.J. (2014). Tracer version 1.6. MCMC trace analysis tool. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer/>. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer/>. accessed via Mar. 2024.
68. Rambaut, A. (2016). FigTree version 1.4.3. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. accessed via Mar. 2024
69. Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
70. Fu, Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925.
71. Heled, J., and Drummond, A.J. (2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evol. Biol.* 8, 289.
72. R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <https://www.R-project.org>. accessed via Mar. 2024.
73. Tani, N., Tomaru, N., Tsumura, Y., Araki, M., and Ohba, K. (1998). Genetic structure within a Japanese stone pine (*Pinus pumila regel*) population on Mt. Aino-dake in central Honshu, Japan. *J. Plant Res.* 111, 7–15.
74. Nakatani, T., Usami, S., and Itoh, T. (2012). Historic cycles of fragmentation and expansion in the Alpine butterfly *Erebia ligea* (Lepidoptera, Nymphalidae) on the Japanese Archipelago, inferred from mitochondrial DNA. *Lepid. Sci.* 63, 204–216.
75. Otsuki, K. (1990). Neogene tectonic stress fields of northeast Honshu Arc and implications for plate boundary conditions. *Tectonophysics* 181, 151–164.
76. Sato, H. (1994). The relationship between late Cenozoic tectonic events and stress field and basin development in northeast Japan. *Oceanogr. Lit. Rev.* 5, 372.
77. Takahashi, M. (2017). The cause of the east–west contraction of Northeast Japan. *Bull. Geol. Surv.* 68, 155–161.

78. Chen, K.-X., Gung, Y., Kuo, B.-Y., and Huang, T.-Y. (2018). Crustal magmatism and deformation fabrics in northeast Japan revealed by ambient noise tomography. *J. Geophys. Res.* *123*, 8891–8906.
79. Machida, H. (2002). Volcanoes and tephras in the Japan area. *Glob. Environ. Res.* *6*, 19–28.
80. Hayashi, M., Song, S.D., and Sota, T. (2012). Molecular phylogeny and divergence time of the water penny genus *Eubrianax* (Coleoptera: Psephenidae) in Japan. *Entomol. Sci.* *15*, 314–323.
81. Miyazaki, J.-I., Dobashi, M., Tamura, T., Beppu, S., Sakai, T., Mihara, M., and Hosoya, K. (2011). Parallel evolution in eight-barbel loaches of the genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes) revealed by mitochondrial and nuclear DNA phylogenies. *Mol. Phylogenet. Evol.* *60*, 416–427.
82. Suzuki, T., Kitano, T., and Tojo, K. (2014). Contrasting genetic structure of closely related giant water bugs: Phylogeography of *Appasus japonicus* and *Appasus major* (Insecta: Heteroptera, Belostomatidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* *72*, 7–16.
83. Tsuchiya, K., Suzuki, H., Shinohara, A., Harada, M., Wakana, S., Sakaizumi, M., Han, S.H., Lin, L.K., and Kryukov, A.P. (2000). Molecular phylogeny of East Asian moles inferred from the sequence variation of the mitochondrial cytochrome b gene. *Genes Genet. Syst.* *75*, 17–24.
84. Yoshikawa, N., Matsui, M., Nishikawa, K., Kim, J.-B., and Kryukov, A. (2008). Phylogenetic relationships and biogeography of the Japanese clawed salamander, *Onychodactylus japonicus* (Amphibia: Caudata: Hynobiidae), and its congener inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* *49*, 249–259.
85. Bandelt, H.J., Forster, P., Sykes, B.C., and Richards, M.B. (1995). Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* *141*, 743–753.
86. Love, S.J., Schweitzer, J.A., Woolbright, S.A., and Bailey, J.K. (2023). Sky Islands Are a Global Tool for Predicting the Ecological and Evolutionary Consequences of Climate Change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* *54*, 219–236.
87. Hewitt, G.M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* *405*, 907–913.
88. Tsukada, M. (1985). Map of vegetation during the last glacial maximum in Japan. *Quat. Res.* *23*, 369–381.
89. Vences, M., Hauswaldt, J.S., Steinfartz, S., Rupp, O., Goesmann, A., Künzel, S., Orozco-terWengel, P., Vieites, D.R., Nieto-Roman, S., Haas, S., et al. (2013). Radically different phylogeographies and patterns of genetic variation in two European brown frogs, genus *Rana*. *Mol. Phylogenet. Evol.* *68*, 657–670.
90. Fujii, N., Ueda, K., Watano, Y., and Shimizu, T. (1997). Intraspecific sequence variation of chloroplast DNA in *Pedicularis chamissonis* Steven (Scrophulariaceae) and geographic structuring of the Japanese “Alpine” plants. *J. Plant Res.* *110*, 195–207.
91. Ikeda, H., Senni, K., Fujii, N., and Setoguchi, H. (2008). Consistent geographic structure among multiple nuclear sequences and cpDNA polymorphisms of *Cardamine nipponica* Franch. et Savat. (Brassicaceae). *Mol. Ecol.* *17*, 3178–3188.
92. Suyama, Y., Tsumura, Y., and Ohba, K. (1997). A cline of allozyme variation in *Abies mariesii*. *J. Plant Res.* *110*, 219–226.
93. Sota, T., and Nagata, N. (2008). Diversification in a fluctuating island setting: rapid radiation of *Ohomopterus* ground beetles in the Japanese Islands. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *363*, 3377–3390.
94. Malicky, H., Ant, H., Aspöck, H., De Jong, R., Thaler, K., and Varga, Z. (1983). Argumente zur Existenz und Chorologie mitteleuropäischer (extramediterran-europäischer) Faunen-Elemente. *Entomol. Gen.* *9*, 101–119.
95. Kato, Y., Morii, Y., and Tojo, K. (2013). Molecular phylogeographic analysis of East Asian cryptoperlan stoneflies (Insecta: Plecoptera, Peltoperlidae). *Limnology* *14*, 179–194.