

〔農工研技報 212〕
〔177 ~ 188, 2012〕

流域の連続性と分断がホトケドジョウ *Lefua echigonia* の 遺伝的構造・多様性に与える影響分析

— ミトコンドリア DNA D-loop の解析 —

西田一也*・小出水規行*・竹村武士**・渡部恵司*・森 淳*

目 次

I 緒 言	177	3 ハプロタイプ多様度 (h)	180
II 材料と方法	178	IV 考 察	180
1 対象流域	178	1 国内スケールにおける系統関係	180
2 サンプリング	178	2 流域スケールにおける遺伝的構造・多様性	184
3 遺伝子解析	178	V 結 言	185
III 結 果	180	参考文献	185
1 国内スケールにおける系統関係	180	Summary	188
2 遺伝的分化指数 (F_{st})	180		

I 緒 言

日本では、稲作によって形成された水田水域において、多くの水生生物の生息環境が維持されてきた(守山, 1997)。特に魚類ではメダカ *Oryzias latipes* やドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus*、フナ属 *Carassius spp.* 等が水田や農業水路、河川といった水域を生活史に応じて利用している(斉藤ら, 1988; Hata, 2002)。しかし、これら魚類の生息環境は農業生産性の向上に貢献してきた圃場整備等によって劣化していると指摘されている(WCMC, 1998; 中川, 2001)。

このような状況の中、水田水域に生息する魚類を保全するために、各魚種についての水路の生息場利用(例えば藤咲ら, 1999)や水田利用(例えば皆川ら, 2006)、移動分散特性(例えば西田ら, 2006)が把握され、また、これらを踏まえた水田魚道に代表される生態系配慮工法の開発と施工(例えば鈴木ら, 2004)が進められてきた。

一方、水田水域に生息する魚類のうち、標徴種であるメダカやドジョウでは、全国スケールにおける遺伝的構造が明らかにされてきたが(例えば, Takehana et al., 2003; Morishima et al., 2008; 小出水ら, 2009)、水田

水域に生息する多くの淡水魚は、一般的によく見られる種であっても遺伝情報の蓄積が十分でない。そのため、近縁種や個体群の判別やさまざまな空間スケールにおける個体群構造の把握が進んでいない。

本研究ではホトケドジョウ *Lefua echigonia* を対象とした。本種はコイ目ドジョウ科に属する日本固有種であり(澤田, 2001)、環境省レッドリストの絶滅危惧 IB 類に指定されている(環境省, 2007)。また、本種は谷津田域や低平地水田地帯の湧水を水源とする水路・小河川に生息しており(満尾ら, 2007; 守山ら, 2007; 大平ら, 2008)、水域の連続性や分断が本種の生息や遺伝的多様性に影響することが予想される。

本種については、ミトコンドリア DNA (以下、mtDNA とする) の解析によって全国スケールの遺伝的構造が明らかにされており(Saka et al., 2003; Sakai et al., 2003; Mihara et al., 2005)、都道府県スケールの研究(北野ら, 2008; Aiki et al., 2009)もみられるが、それ以下のスケールでの研究は谷津間の遺伝的分化や多様性を予備的に解析した小出水ら(2008)を除けば筆者らの知る限り存在しない。流域またはそれ以下のスケールにおける遺伝的構造の把握により個体群構造を推定することは、個体群の保全策(例えば魚道等の設置)を検討する上で有用と考えられる。しかし、このようなスケールでの研究は従来の系統地理研究の中には少ない(樋口・渡辺, 2005)。

本研究では、多摩川流域に生息するホトケドジョウについて 1) 既往の研究で明らかにされている全国の

* 資源循環工学研究領域生態工学担当

** 農村基盤研究領域資源評価担当

平成 23 年 12 月 15 日受理

キーワード: ホトケドジョウ, *Lefua echigonia*, ミトコンドリア DNA, 流域, 谷津田域, 遺伝的構造, 遺伝的多様性

mtDNA のハプロタイプ (配列の種類) を利用して国内スケールにおける系統解析を行い、人為的移植等の有無を確認した上で、2) 流域スケールにおける水域ネットワークとその分断が本種の遺伝的構造・多様性に与える影響を分析した。

多摩川流域には関東地方に多くみられる丘陵地や、河岸段丘といった地形が存在する。本種の主な生息場はそれらに存在する谷津や段丘崖からの湧出水を水源とする水田水域である。加えて都市～都市近郊地域である当該流域では、全国的にみられる都市化の進行に伴う区画整理や河川・水路の改修による水域ネットワークの分断が進んできた。したがって、水域ネットワークの分断による本種の遺伝的構造・多様性への影響を評価するのに適切な対象地であると考えられる。

サンプリングおよび分析の一部は東京農工大学農学部水資源計画学研究室の大平充氏、山本康仁氏、正田惇氏にご協力いただきました。匿名の査読者には貴重なコメントをいただきました。ここに記して深謝いたします。また、本研究はとうきゅう環境浄化財団研究助成 (学術研究, No.288) および科学研究費補助金 (特別研究員奨励費, No.22・6719) による支援を受けたことを付記いたします。

II 材料と方法

1 対象流域

多摩川は山梨県笠取山を水源とし、東京都西部から東京都と神奈川県の間を流下して東京湾に注ぐ河川長138km、流域面積1,240km²の一級河川である。流域内には谷津および段丘崖からわき出る湧水が存在する (新多摩川誌編集委員会, 2001)。多摩川は後期更新世中期～末期 (約10～1.5万年前) に武蔵野台地を形成する過程で、徐々に流路を南へと変え、現在に近い流路を流れるようになったと推察されている (貝塚, 1997)。また、その後の縄文時代草創期 (約1万～9千年前) には南を流れる鶴見川と合流していたと推察されている (松島, 1994)。

多摩川流域はその大部分が都市～都市近郊地域である。そのため、流域内の低平地や丘陵地の谷津に存在する水田水域が戦後から現在までの都市化によって減少している (薄井, 2000)。1950年には東京都内に36,021ha存在した耕地面積は2009年には1/4以下の7,800haに減少している (農林省総務局統計課, 1952; 農林水産省大臣官房統計部, 2011)。戦後の主要作物の作付面積は米、麦、いも、野菜で高かったが、米と麦の作付面積が経年的に減少し、近年は野菜、果樹、いもの作付面積が大半を占める (仲宇佐, 2003)。すなわち、水田の耕地面積の減少が顕著であり、1950年から2009年の間に1/20 (7,265 → 301ha) 以下に減少した (農林省総務局統計課, 1952; 農林水産省大臣官房統計部, 2011)。一方で、宅

地転用等が起りやすく積極的な農地整備が行われなかったことから、当該流域内には生物の生息に良好な未整備の水田水域が局所的に残されており、生息する生物の保全方法に関する知見が必要とされている (皆川ら, 2010)。

2 サンプリング

2006年5月～2011年9月の間に、多摩川流域内の14地点において266個体 (各地点5～26個体) を採集し (Fig.1)、尾鰭の一部を切除した。切除した個体は活魚のまま採集地点に放流し、尾鰭は99.5%エタノールに浸した状態で室温または-20℃で保存した。

対象種が絶滅危惧種であるため、各サンプリング地点の詳細の説明は控えるが、Y1～8は丘陵地の谷津田域を流れ、水田の水源として利用される小河川 (以下、谷津小河川という) に位置する。T1～6は多摩川支流およびワンドに位置する。このうちT2とT3は低平地水田域を流れ、水田への水源として利用される支流に位置する。また、Y1～8は一～三次支川に、T1～6は一次支川にあたる。谷津小河川と谷津小河川が流入する河川との間には河川改修によって0.3～1.5m程度の落差が複数生じているため、他水域からY1～8への移入は強く妨げられているか、不可能であると予想される。また、本研究が対象とした谷津小河川の下流部は河川改修によって三面コンクリート化が進んでおり、本種の生息範囲と推測される区間は中～上流部に限られていた。T1～6は多摩川本流や支流によって連続しており、本流・支流を介して魚類の移出入が可能であると予想される。以降では、Y1～8に存在する個体群を「谷津個体群」、T1～6に存在する個体群を「支流・ワンド個体群」とする。

3 遺伝子解析

a 塩基配列の読み取り

mtDNAはミトコンドリアが保有する独自のゲノムであり、ほとんどの種で母系遺伝し、核DNAのような組み換えを起こさないことから、系統解析に優れている (小池・松井, 2003)。ホトケドジョウのmtDNAのD-loopでは既往の研究によって全国におけるハプロタイプが明らかにされているため、これらを利用して系統解析を行うことで人為的移植の有無を把握できると考えられる。D-loopは遺伝情報をコードしていないため突然変異による塩基置換を容易に固定し、大きな進化速度 (10万年で2%程度の塩基置換率) をもつ。そのため、種内の個体群レベルの遺伝的多様性の検出に利用されることが多い (小池・松井, 2003)。核DNAのマイクロサテライト領域も、進化速度が極めて大きいため、種内の個体群レベルの遺伝的多様性の検出に利用されるが、全国における本種の遺伝子型が明らかにされていないため、人為的移植の有無を把握することができない。そのため、

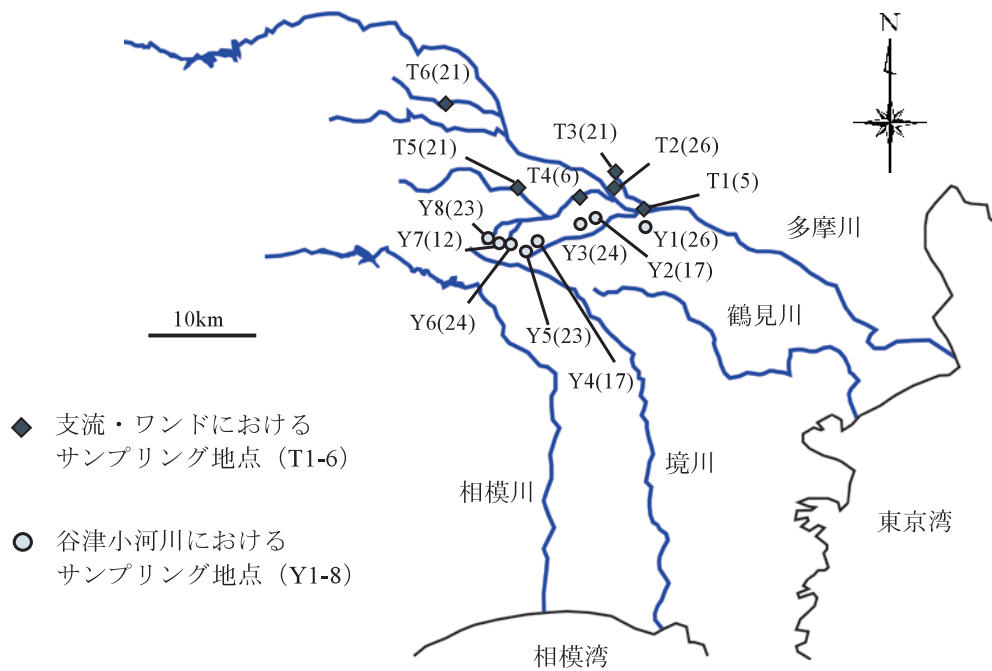


Fig.1 多摩川およびサンプリング地点の位置 (括弧内はサンプリング個体数)
Sampling locations of specimens in the Tama River Basin. The number of specimens is in parentheses.

本研究では mtDNA の D-loop を解析した。

まず、Dneasy Tissue & Blood kit (QUIAGEN) または Gene Prep Star PI-80X (KURABO) によってサンプリングした尾鰭から DNA を抽出した。次に MyCycler Thermal Cycler または C1000 Thermal Cycler (ともに BIO RAD) を用い、抽出した DNA を鋳型として Polymerase Chain Reaction (PCR) により対象領域を増幅した。PCR では、94°C、1 分の熱変性、57°C、1 分のアニーリング、72°C、1 分の伸張反応を 30 回繰り返した。プライマーとして Pro S (5'-GCATCGGTCTTGTAATCCGAAGAT-3'), Phe AS (5'-GGACCAAGCCTTTGTGCATGCGGAG-3') を使用した。PCR による増幅産物の精製には AMPure (Agencourt) を用いた。

精製した PCR 産物を使って、各検体の mtDNA の D-loop の塩基配列を読み取った。読み取り反応には BigDye Terminator ver 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および、プライマーとして Pro S, Phe AS に加えて 296S (5'-ATATATTAATGTAGTAAGAAACCACCAACCAG-3') を使用し、反応物の精製には CleanSEQ (Agencourt) を用いた。シーケンサーには 3130xl ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems) を使用した。

b ハプロタイプの特定制と系統関係の解析

Seqscape ver.2.6 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列をアセンブルした後、CLUSTAL X ver.1.8 (Thompson et al., 1997) によってアラインメントし、DNaSP ver.5.1 (Librado and Rozas, 2009) によってハプロタイプを特定した。特定したハプロタイプと DNA データベース DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている既知のハプロ

タイプを合わせて MEGA ver.5.05 (Tamura et al., 2007) を用いて最尤法により系統樹を作成し、国内スケールにおける系統関係を確認した。本種の mtDNA については全国スケールでの遺伝的構造が明らかにされており (Sakai et al., 2003; Mihara et al., 2005), 既知のハプロタイプと照合することで北関東・南関東・東海・近畿・北陸・東北などの地方スケールでの系統関係の把握が可能である。樹形の分岐パターンについては 1000 回のブートストラップ検定を行った (Felsenstein, 1985)。既知のハプロタイプには、AB102823 (新潟県長岡市), AB102831 (栃木県今市市), AB102837 (東京都浅川), AB102839 (神奈川県座間市), AB102843 (岐阜県岐阜市), AB102846 (愛知県渥美町), AB102848 (滋賀県志賀町), AB102849 (三重県伊勢市), AB177692 (福島県富岡町), AB177694 (石川県黒崎町), AB177695 (福井県敦賀市), AB177697 (京都府西方町), AB177698 (兵庫県春日町), AB177702 (福島県松川町), AB177704 (埼玉県小川町), AB177705 (山梨県忍野村), AB177708 (長野県須坂市), AB251866 (静岡県相良町), AB251867 (茨城県北茨城市), AB251868 (神奈川県相模川), AB251869 (神奈川県鶴見川), AB471827 (山形県川西町), AB471838 (宮城県仙台市), AB471843 (宮城県), AB471847 (山形県) (Sakai et al., 2003; Mihara et al., 2005; Aiki et al., 2009) を用いた。

c 遺伝子流動の推定

任意の 2 つの個体群間の遺伝的分化指数 F_{st} を DNaSP ver.5.1 によってギャップ (塩基の挿入/欠失) を考慮して算出し、谷津個体群間 (Y-Y 間, 組合せ数: 28), 谷津-支流・ワンド個体群間 (Y-T 間, 組合せ数: 48),

支流・ワンド個体群間 (T-T 間, 組合せ数 15) の 3 グループを比較した。理論上 F_{st} は 0 ~ 1 の値をとり, 値が大きいほど遺伝的分化の程度が大きく, 遺伝子流動 (個体の移出入) が少ないと判断される (Frankham et al., 2002)。得られた F_{st} の解釈として, 0 ~ 0.05 では分化なし, 0.05 ~ 0.15 で中程度の分化, 0.15 ~ 0.25 では高度の分化, 0.25 以上では極めて高度の分化が起きているとされる (Hartl, 1987)。

算出した F_{st} と水路距離 (2つのサンプリング地点間の流路に沿った最短距離) との関係から, 遺伝子流動 (個体の移出入) の程度を判断した。水路距離と無関係に F_{st} が高い場合には遺伝子流動はほとんどなく, 逆に F_{st} が低い場合には頻繁な遺伝子流動があると判断される (小泉・山本, 2004)。また, F_{st} と水路距離との間に正の相関関係が認められれば, より近くの個体群間で遺伝子流動があると判断される (小泉・山本, 2004)。水路距離は数値地図 50000 (埼玉・東京・神奈川) および表示ソフト ver.4.1 (国土地理院) を用いて測定した。 F_{st} と水路距離との相関関係を検定する場合には, Arlequin ver 3.5 (Excoffier et al., 2010) によって Mantel test (Mantel, 1967) を行った。

ハプロタイプ出現頻度の差を検定する場合には DNAsP ver.5.1 によってカイ二乗検定を行った。谷津個体群間 (Y-Y 間), 谷津-支流・ワンド個体群間 (Y-T 間), 支流・ワンド個体群間 (T-T 間) の 3 グループ間の F_{st} の差を検定する場合には R 2.11.1 を用いて Steel-Dwass test を行った。

d 個体群間のハプロタイプ多様度の比較

検体数の少ない個体群 (T1, T4) を除外した後, 各個体群のハプロタイプ多様度 h を DNAsP ver.5.1 によってギャップを考慮して算出した。 h は 0 ~ 1 の値をとり, 値が大きいほど遺伝的多様性が高いと判断される。一般に分断の進んだ小個体群の h は低い値を示す (Frankham et al., 2002)。

谷津個体群 (Y) と支流・ワンド個体群 (T) の 2 グループ間の h の差を検定する場合には R 2.11.1 を用いて Welch t test を行った。

III 結果

1 国内スケールにおける系統関係

全 266 個体について 915 ~ 925bp の塩基配列が得られ, 配列には 16 塩基サイトにおいて挿入・欠失がみられた。全配列から 30 のハプロタイプ (Hap 1 ~ 30) が検出された (Table 1)。これらのハプロタイプを DDBJ/EMBL/GenBank に登録した (Accession number: JQ410356-85)。ハプロタイプ出現頻度は地点間で異なった (カイ二乗検定, $p < 0.01$, Table 2)。

Hap 1 ~ 30 および既知のハプロタイプを元に系統樹

を作成すると, Hap 1 ~ 30 は南関東集団 (Mihara et al., 2005) のクレードに属した (Fig.2)。南関東集団クレード内において, Hap 1 ~ 29 は多摩川支流の浅川のハプロタイプおよび, 多摩川の南を流れ, 多摩川と同様に東京湾に流入する鶴見川 (Fig.1) のハプロタイプと同じサブクレード B に属した。一方, Y6 のみに出現した Hap 30 は相模川水系のハプロタイプと同じサブクレード A に属した。なお, Hap 30 と同じサブクレード A に含まれるハプロタイプ「山梨県忍野村」は相模川源流域に, 「神奈川県座間市」は相模川中流域に位置する。

2 遺伝的分化指数 (F_{st})

F_{st} について, 谷津個体群間 (Y-Y 間), 谷津-支流・ワンド個体群間 (Y-T 間), 支流・ワンド個体群間 (T-T 間) それぞれの平均値 ± 標準偏差は 0.43 ± 0.25 , 0.39 ± 0.27 , 0.16 ± 0.11 であり, それぞれの最小~最大値は $0.09 \sim 0.97$, $0.00 \sim 1.00$, $0.00 \sim 0.32$ であった (Fig.3)。谷津個体群を含む 2 個体群間 (Y-Y 間と Y-T 間) の F_{st} は, どちらも支流・ワンド個体群間 (T-T 間) の F_{st} に比べて高かった (Steel Dwass test, $p < 0.05$)。ただし, ばらつきが大きく, なかには支流・ワンド個体群間 (T-T 間) の値を下回る組み合わせも認められた。支流・ワンド個体群間 (T-T 間) の F_{st} は水路距離との間に正の相関関係が認められたが (Mantel test, $p < 0.05$), それ以外の個体群間では認められなかった (Mantel test, $p > 0.05$)。

3 ハプロタイプ多様度 (h)

h について, 谷津個体群 (Y1 ~ 8) と支流・ワンド個体群 (T2, T3, T5, T6) それぞれの平均値 ± 標準偏差は 0.48 ± 0.29 , 0.73 ± 0.14 であり, 最小~最大値はそれぞれ $0 \sim 0.76$, $0.55 \sim 0.86$ であった (Fig.4)。支流・ワンド個体群の h は 0.5 以上の値を示したのに対して, 谷津個体群の中では Y5 が 0 を示し, Y1 と Y8 が 0.5 以下の値を示した。しかし, 谷津個体群と支流・ワンド個体群の 2 グループ間の h の差は有意ではなかった (Welch t test, $p > 0.05$)。

IV 考察

1 国内スケールにおける系統関係

国内スケールにおける mtDNA の D-loop の解析によって, ホトケドジョウは南関東・東海・近畿・北陸・東北の 6 つの集団に分かれると報告されている (Sakai et al., 2003; Mihara et al., 2005)。これらの集団は 140~70 万年前に開始した日本列島における山脈の隆起によって分岐したと推定されている (Mihara et al., 2005)。本研究では, まず, 当該流域のホトケドジョウから得られたハプロタイプと既知のハプロタイプを用いて系統樹を作成し, 全国スケールでの系統関係を確認した。その結果, 全てのハプロタイプ (Hap 1 ~ 30) は南関東集団のク

Table 2 各個体群におけるハプロタイプの出現頻度 (ハプロタイプの番号は Table 1 と同様。)
Haplotype Frequencies in each population. Haplotype numbers are defined in Table 1.

ハプロタイプ	谷津個体群								支流・ワンド個体群					
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1		2												
2		24								9	5			3
3										1				
4													3	
5													2	
6		2	15	1		9	7	19	4	11	6	6	14	1
7													1	
8											1			
9		3		7		3		3	1	1	6			
10				2										
11				1										
12			6	5										
13				1	23									
14										1	1			
15														3
16						9							1	
17										1				
18							3							
19		3												
20										2	2			
21								1						
22														5
23														5
24														1
25														3
26							2							
27			2											
28		1	1											
29		8												
30						3								
合計	26	17	24	17	23	24	12	23	5	26	21	6	21	21

レードに属した。南関東集団のクレードの中では、Hap 1～29のハプロタイプは既知の多摩川、鶴見川水系のハプロタイプと同じサブクレードBに属した。鶴見川は多摩川の南を流れ、どちらも東京湾に流入しており (Fig.1), また、縄文時代草創期 (約1万～9千年前) には、多摩川は鶴見川と合流していたと推察されている (松島, 1994)。以上の地史的条件下から両河川のホトケドジョウの遺伝的差異は小さいと推察され、また、このことは本研究の系統樹において多摩川と鶴見川水系のハプロタイプがともにサブクレードBに属したことを支持する。

Hap 30は例外的に既知の相模川水系のハプロタイプと同じサブクレードAに属した。Hap 30が得られた谷津小河川 (Y6) は、多摩川と境川上流部との分水界の北側に位置している (Fig.1)。また、Hap 30が得られた谷津小河川と最も近い境川支流との直線距離は1km以内である。境川のハプロタイプは不明であるが、境川は相模川と同様に相模湾に流入しており (Fig.1), 後期更新世中期 (約10～3万年前) には相模川が境川の流路を流れていたと推察されていることから (奥村, 1981),

境川と相模川間のホトケドジョウの遺伝的差異は小さいと予想される。したがって、Hap 30が得られた谷津小河川が、過去の河川争奪 (浸食の優勢な河川上流部が他の河川上流部を自らの流域に組み込む現象) 等によって境川流域から多摩川流域に組み込まれたため、境川流域のホトケドジョウが多摩川流域の当該谷津小河川に移住した可能性が考えられる。そのため系統樹では、Hap30が相模川のハプロタイプ (境川と遺伝的差異が小さいと推察される) と同じサブクレードAに属したと推察される。河川上流部に生息する他の魚種についても河川争奪による他流域への移住が報告されている (例えばイワナ *Salvelinus leucomaenis* では Kikko et al., 2008)。なお、Hap 30が得られた谷津小河川 (Y6) と同様、多摩川流域と境川流域との分水界の北側に位置し、境川支流との直線距離は1km以内である Y7, Y8 ではサブクレードAに属するハプロタイプは検出されなかったことから、これらの谷津小河川と境川支流の間では過去に河川争奪が起こらなかったと推察される。しかし、河川争奪後に境川由来のハプロタイプが消失した可能性

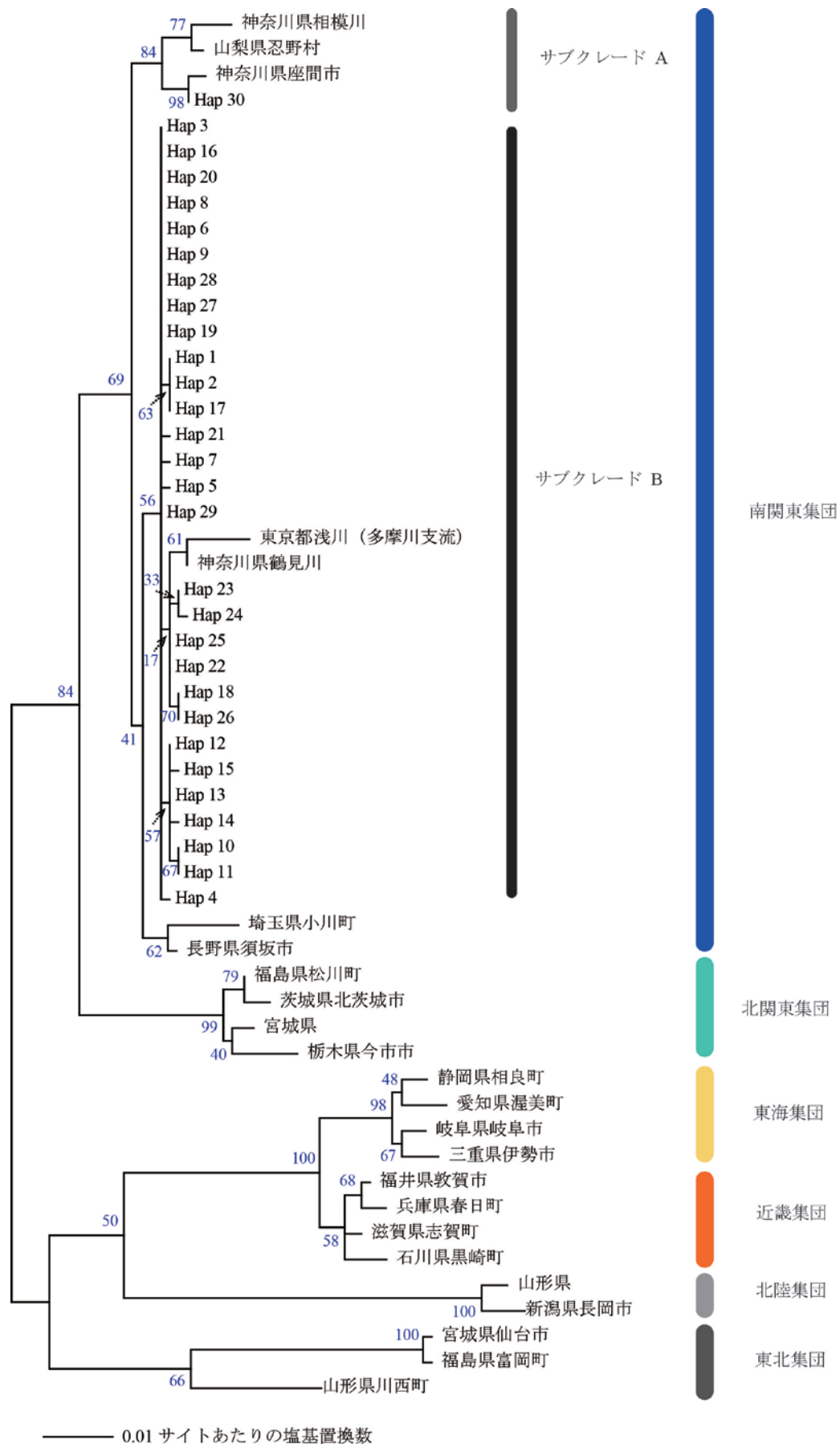


Fig.2 最尤法により作成したハプロタイプの系統樹 (数字はブートストラップ分岐確率 (%), ハプロタイプの番号は Table 1 と同様。)
 Maximum Likelihood tree based on the genetic distance estimated from the mtDNA D-loop region sequences. The number beside each internal branch indicates bootstrap values based on 1000 replications. Haplotype numbers are defined in Table 1.

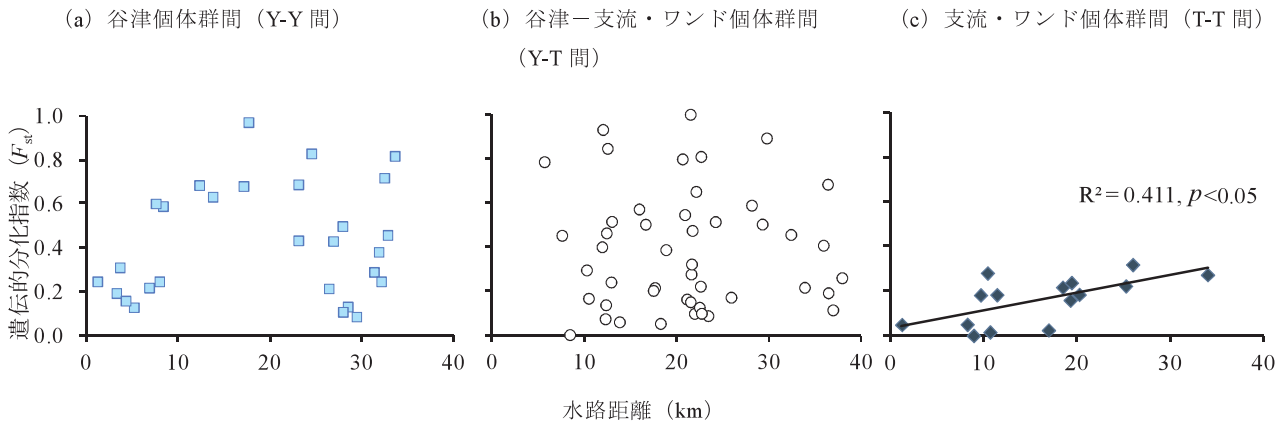
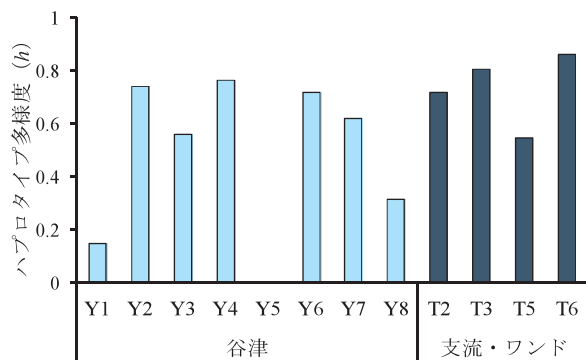
Fig.3 F_{st} と水路距離の関係Relationship between F_{st} -value and distance between populations along water course

Fig.4 ハプロタイプ多様度

Haplotypes diversity of each population

や、境川由来のハプロタイプを有する個体がサンプリングされなかった可能性も否定できない。

以上のことから、本研究で解析したホトケドジョウは、地史的イベントによって多摩川流域に生じた固有のハプロタイプを持つ個体であったと推察される。ただし、東京都内におけるゲンジボタル *Luciola cruciata* では中部や西日本のハプロタイプが、関東地方におけるメダカでは瀬戸内や九州のハプロタイプが検出されており(鈴木, 2001; 竹花・酒泉, 2002), 本種においても人為的な移殖個体が含まれていた可能性は否定できない。しかし、既往の研究における本種の mtDNA 解析では、本来その地域に分布しないと判断されるハプロタイプは検出されていない (Mihara et al., 2005; Aiki et al., 2009; 小出水ら, 2010)。ゲンジボタルやメダカといった標徴種に比べて目立ちにくい本種では、人為的な移殖の可能性は高くないと予想されるが、今後は隣接する他流域を含めたスケールでの遺伝的構造を解明する必要がある。

2 流域スケールにおける遺伝的構造・多様性

前述の国内スケールに比べて、流域またはそれ以下のスケールにおける遺伝的構造や多様性はあまり注目されてこなかったため(樋口・渡辺, 2005), 知見の蓄積は十分ではない。しかし、流域またはそれ以下のスケール

において水域ネットワークとその分断が遺伝的構造・多様性に与える影響を分析することは、生息場間を連続させる魚道の設置や、それを經由して移出入を行う個体群の保全管理などの保全策を検討するにあたって有益な情報になり得ると考える。

対象流域における谷津小河川では、1940年代から開始された河川改修(菅原, 2010)によって谷津小河川と谷津小河川の流入河川との間に落差が生じているため、他の個体群からの遺伝子の流入(個体の移入)が強く妨げられているか、不可能になっている。また同時に、谷津小河川の下流部は河川改修による三面コンクリート張り化が進み、生息場は中～上流部に限られているため、ホトケドジョウの個体群サイズが減少していると推察される。そのため、支流・ワンドの個体群間(T-T間)に比べて谷津個体群を含む個体群間(Y-Y間とY-T間)の F_{st} が高い場合や、谷津個体群の h が低い場合が認められたと考えられる。核DNAに対してmtDNAは有効集団サイズが1/4に減少するため、遺伝的浮動(確率的な遺伝子頻度の変化)を起こしやすい(小池・松井, 2003)。Pergams et al. (2003)は、過去50～150年間の都市化の進展と並行して、シロアシネズミ *Peromyscus leucopus* のmtDNAの遺伝子型が変化したことを報告している。Hirota et al. (2004)は多摩地域のアカネズミ *Apodemus speciosus* のmtDNAを解析し、市街化によって分断された個体群間の F_{st} が、多摩川の河川敷緑地によって連続する個体群間の F_{st} に比べて著しく高く、また、分断された個体群の h が低いことを報告しており、このことは本研究結果と近い。ただし、本研究では谷津個体群を含む個体群間(Y-Y間とY-T間)の F_{st} であっても低い値を示す場合や、谷津個体群の h であっても高い値を示す場合が認められた。このことの原因は不明であるが、遺伝的浮動の影響によって偶然、遺伝子頻度が類似した、または、過去の遺伝子流動の歴史や流域内における位置、個体群サイズの大小やボトルネックの有無などが影響したのかもしれない。

小出水ら(2008)は、栃木県南東部の谷津小河川に生

息する本種のマイクロサテライト DNA 領域を解析した結果、高度な遺伝的分化や著しい遺伝的多様性の低下は認められなかったことを報告している。対象地域や解析部位が異なるためこの報告と本研究を単純に比較することはできないが、多摩川流域の谷津田域における本種の高度な遺伝的分化や多様性の消失は、都市化の進行に伴う谷津小河川の改修による分断や小集団化の影響を強く受けたことを示唆している可能性がある。一般に小個体群では、遺伝的浮動や近親交配により遺伝的多様性が低下し、その結果、繁殖力や近交弱勢による適応度の低下が起り、さらに個体数が減少することが指摘されている (Frankham et al., 2002)。これらの一連のサイクルは絶滅の渦と呼ばれる (Gilpin and Soulé, 1986)。Frankham et al. (2002) は、近親交配の悪影響は個体群に世代あたり 1 個体以上の移入があれば大幅に緩和されると指摘しており、このことは実証実験によって支持されている (例えば Bryant et al., 1999)。 F_{st} や h の結果から、谷津個体群では落差等によって遺伝子流動が強く妨げられているか、消失していたと推察される。このことは遺伝的多様性の低下を防ぐための遺伝的管理 (魚道等の水域ネットワークの整備による移出入経路の確保や他の個体群からの個体の移殖など) が必要である可能性を示唆する。したがって、今後は核 DNA のマイクロサテライト領域等異なる領域の遺伝子解析等を行うことで本種の遺伝的構造・多様性の実態を総合的に解明する必要がある。

一方、支流・ワンド個体群間 (T-T 間) の F_{st} は谷津個体群のような高い値を示さず、また、水路距離との間に正の相関関係が認められた。さらに、谷津個体群に比べれば支流・ワンド個体群の h はいずれも一定以上の値を示した。以上のことから、支流・ワンド個体群は多摩川本流・支流を介してある程度の遺伝子流動 (個体の移出入) をもったメタ個体群 (局所個体群が適度な移住によってつながりをもった集団) 構造をなしており、それによって遺伝的多様性が保たれていたと考えられる。また、多摩川本流や支流にも堰等の横断構造物が設置されているものの、谷津小河川と谷津小河川の流入河川との間の落差に比べれば、遺伝子流動 (個体の移出入) を妨げていなかった可能性が考えられる。

君塚 (1990) は多摩川支流の浅川における河床の掘り下げによって堤外地の湧水が枯渇し、ホトケドジョウが激減したことを報告している。支流・ワンド個体群では F_{st} が流路距離との間に正の相関が認められたことから、支流・ワンド個体群はより近くの個体群で遺伝子流動があると判断される。今後、河川整備等により支流・ワンド個体群においていずれかの個体群が消失し、各個体群の孤立化が進めば、遺伝子流動は起こりにくくなると予想される。したがって、各個体群の存続を維持するための生息場の保全 (繁殖場や越冬場の復元・造成など) が重要であると推察される。

今後はどのような保全技術が遺伝的多様性の維持や個体群存続に効果的であるか検討できるよう、遺伝的構造・多様性の実態に基づき、水域ネットワークの構築や生息場の保全・復元による遺伝的多様性への影響を考慮した個体群存続シミュレーション評価法を開発していくことが課題として考えられる。

V 結 言

本研究では流域スケールにおける水域ネットワークとその分断がホトケドジョウの遺伝的構造・多様性に与える影響を分析して本種の保全策を検討するため、多摩川流域に生息するホトケドジョウの mtDNA の D-loop を解析した。

既知の全国のプロタイプとともに作成した系統樹では、検出されたプロタイプが南関東集団のクレードに属し、さらに、一つのプロタイプを除けば既知の多摩川流域のプロタイプと同じサブクレードに属した。なお、一つのプロタイプは例外的に多摩川流域の南を流れる相模川流域と同じクレードに分かれたが、このことは過去の河川争奪に伴って本種が他流域から多摩川流域に移住したことを示唆していた可能性がある。以上のことから、解析したホトケドジョウは当該流域固有のプロタイプを有していたと推察される。ただし、相模川流域と同じクレードに属したプロタイプは人為的な移殖由来である可能性も否定できないため、今後は隣接する他流域を含めたスケールでの遺伝的構造を解明する必要がある。

谷津個体群を含む個体群間の遺伝的分化指数 (F_{st}) は高い値を示す場合が、また、谷津個体群のプロタイプ多様度 (h) は低い値を示す場合が認められた。一方、支流・ワンド個体群間の F_{st} は、谷津個体群を含む場合に比べて高い値を示すことはなく、流路距離との間で正の相関関係を示し、また、 h は高い値を示した。以上のことから、谷津個体群では、谷津小河川の改修によって小集団化や、遺伝子流動 (個体の移出入) の阻害が起っていると考えられる。遺伝的多様性の低下に伴う谷津個体群の脆弱化や絶滅を防ぐための遺伝的管理 (魚道等の水域ネットワークの整備による移出入経路の確保や他の個体群からの個体の移殖など) が必要である可能性を示唆する。

一方、支流・ワンド個体群はメタ個体群 (局所個体群が適度な移住によってつながりをもった集団) 構造をなしており、それに伴う遺伝子流動によって遺伝的多様性が保たれていたと考えられる。今後、河川整備等により支流・ワンド個体群においていずれかの個体群が消失し、各個体群の孤立化が進めば、遺伝子流動は起こりにくくなると予想される。そのため、各個体群の存続を維持するための生息場の保全 (繁殖場や越冬場の復元・造成など) が重要であると推察される。

今後はどのような保全技術が遺伝的多様性の維持や個

体群存続に効果的であるか検討できるよう、遺伝的構造・多様性の実態に基づき、水域ネットワークの構築や生息場の保全・復元による遺伝的多様性への影響を考慮した個体群存続シミュレーション評価法を開発していくことが課題としてあげられる。

参考文献

- Aiki, H., Takayama, K., Tamaru, T., Mano, N., Shimada, M., Komaki, H. and Hirose, H. (2009): Phylogeography of the Japanese eight-barbel loach *Lefua echigonia* from the Yamagata area of the Tohoku district, Japan, *Fishery Science*, **75**, 903-908.
- Bryant, E. H. and Reed, D. H. (1999): Fitness decline under relaxed selection in captive populations, *Conservation Biology*, **13**, 665-669.
- 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, *Molecular Ecology Resources*, **10**(3), 564-567.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, *Evolution*, **39**, 783-791.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. (2002): Introduction to conservation genetics, Cambridge University Press.
- 藤咲雅明・神宮寺寛・水谷正一・後藤章・渡辺俊介 (1999): 小河川・農業水路系における魚類の生息と環境構造の関係, 応用生態工学, **2**(1), 53-61.
- Gilpin, M. E., and Soulé, M. E. (1986): Minimum viable populations: processes of species extinction, In Soule M. E.(ed), Conservation biology: the science of scarcity and diversity, *Sinauer Associates*, 19-34.
- Hartle, D. L. (1987): 集団遺伝学入門, 向井輝美, 石和貞男監訳, 培風社.
- Hata, K. (2002): Perspectives for fish protection in Japanese paddy field irrigation systems, *JARQ*, **36**(4), 211-218.
- 樋口文夫・渡辺勝敏 (2005): 横浜市を流れる河川におけるアブラハヤの遺伝的多様性と交雑, 魚類学雑誌, **52**(1), 41-46.
- Hirota, T., Hirohata, T., Mashima, H., Satoh, T. and Obara, Y. (2004): Population structure of the large Japanese field mouse, *Apodemus speciosus* (Rodentia: Muridae), in suburban landscape, based on mitochondrial D-loop sequences, *Molecular Ecology*, **13**, 3275-3282.
- 貝塚爽平 (1997): 新版東京都地学のガイド, コロナ社.
- 環境省 (2007): 哺乳類, 汽水・淡水魚類, 昆虫類, 貝類, 植物 I 及び植物 II のレッドリストの見直しについて, 報道記者発表, <http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=8648> (確認日: 2011/12/1).
- Kikko, T., Kuwahara, M., Iguchi, K., Kurumi, S., Yamamoto, S., Kai, Y. and Nakayama, K. (2008): Mitochondrial DNA population structure of the White-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) in the Lake Biwa water system, *Zoological Science*, **25**, 146-153.
- 北野聡・山形哲也・柳生将之・小林尚・上原武則・市川寛・美馬純一・小林建介 (2008): 長野県におけるホトケドジョウの分布・生息環境およびミトコンドリア DNA ハプロタイプ, 長野県環境保全研究所研究報告, **4**, 45-50.
- 小池裕子・松井正文 (2003): 保全遺伝学, 東京大学出版会.
- 小泉逸郎・山本祥一郎 (2004): サケ科魚類の遺伝的構造, サケ・マス生態と進化, 前川光司編, 文一総合出版, 243-279.
- 小出水規行・竹村武士・渡部恵司・森淳 (2009): ミトコンドリア DNA によるドジョウの遺伝特性—チトクローム b 遺伝子の塩基配列による系統解析—, 農業農村工学会論文集, **77**(1), 7-16.
- 小出水規行・渡部恵司・高振麗・水谷正一・森淳・竹村武士 (2008): マイクロサテライト DNA を用いた栃木県小貝川上流域のホトケドジョウ集団の予備的解析, 農業農村工学会論文集, **76**(4), 55-61.
- 小出水規行・渡部恵司・高振麗・水谷正一・竹村武士・森淳 (2010): 栃木県東部におけるホトケドジョウのミトコンドリア DNA ハプロタイプ, 農業農村工学会論文集, **78**(1), 61-62.
- Librado, P. and Rozas, J. (2009): DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- Mantel, N. (1967): The detection of disease clustering and a generalized regression approach, *Cancer Research*, **27**(2), 209-220.
- 松島義章 (1994): 多摩川低地の生い立ち, 大田区史研究, 史誌 **39**, 51-62.
- Mihara, M., Sakai, T., Nakano, K., Martins, L. O., Hosoya, K. and Miyazaki, J. (2005): Phylogeography of loaches of the genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes) inferred from mitochondrial DNA sequences, *Zoological Science*, **22**, 157-168.
- 皆川明子・西田一也・藤井千晴・千賀裕太郎 (2006): 用排兼用型水路と接続する未整備水田の構造と水管理が魚類の生息に与える影響について, 農業土木学会論文集, **74**(4), 467-474.
- 皆川明子・西田一也・千賀裕太郎 (2010): 東京に現存する水田地帯の特徴とその意義, 農業農村工学会誌, **78**(7), 11-14.
- 満尾世志人・西田一也・千賀裕太郎 (2007): 谷津水域におけるホトケドジョウの生息環境に関する研究—大栗川上流域を事例として—, 農業農村工学会論文集, **75**(4), 99-105.
- Morishima, K., Nakamura-Shiokawa, Y., Bando, E., Li, Y.-J.,

- Boroń, A., Khan, M. M. R. and Arai, K. (2008): Cryptic clonal lineages and genetic diversity in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses, *Genetica*, **132**, 159-171.
- 守山 弘 (1997)：水田を守るとはどういうことか，農山漁村文化協会.
- 守山拓弥・水谷正一・後藤章 (2007)：栃木県西鬼怒川地区の湧水河川におけるホトケドジョウの季節移動，*魚類学雑誌*, 54(2), 161-171.
- 中川昭一郎 (2001)：農業農村整備とビオトープの保全・創出，*農業土木学会誌*, 69(9), 1-6.
- 仲宇佐達也 (2003) 東京農業史，けやき出版.
- 西田一也・藤井千晴・皆川明子・千賀裕太郎 (2006)：一時的水域で繁殖する魚類の移動・分散範囲に関する研究－東京都日野市の向島用水・国立市の府中用水を事例として－，*農業土木学会論文集*, 74(4), 151-163.
- 農林省総務局統計課 (1952)：昭和20年第22次農林省統計表.
- 農林水産省大臣官房統計部 (2011)：平成21年～22年第85次農林水産統計表.
- 大平充・西田一也・満尾世志人・角田裕志・千賀裕太郎 (2008)：低標高小流域における魚類の流程分布と環境条件，(社)環境情報科学センター，*環境情報科学論文集*, 22, 175-180.
- 奥村清 (1981)：改訂神奈川県地学のガイド，コロナ社.
- Pergams, O. R. W., Barnes, W. M. and Nyberg, D. (2003): Rapid change of mouse mitochondrial DNA, *Nature*, **423**, 397.
- 齊藤憲治・片野修・小泉顕雄 (1988) 淡水魚の水田周辺における一時的水域への侵入と産卵，*日本生態学会誌*, 38, 35-47.
- Saka, R., Takehana, Y., Suguro, N. and Sakaizumi, M. (2003): Genetic population structure of *Lefua echigonia* inferred from allozymic and mitochondrial cytochrome *b* variations, *Ichthyological research*, **50**, 301-309.
- Sakai, T., Mihara, M., Shitara, H., Yonekawa, H., Hosoya, K. and Miyazaki, J. (2003): Phylogenetic relationships and intraspecific variations of loaches of the Genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes), *Zoological Science*, **20**(4), 501-514.
- 澤田幸雄 (2001)：ホトケドジョウ，改訂版日本の淡水魚，川那部浩哉，水野信彦，細谷和海編，山と溪谷社，p400.
- 新多摩川誌編集委員会 (2001)：新多摩川誌，河川環境管理財団.
- 菅原健二 (2010)：川の地図辞典 多摩東部編，之潮.
- 鈴木浩文 (2001)：ホタルの保護・復元における移植の三原則－東京都におけるゲンジボタルの遺伝子調査の結果を踏まえて－，第34回全国ほたる研究会誌，5-9.
- 鈴木正貴・水谷正一・後藤章 (2004)：小規模魚道による水田，農業水路および河川の接続が魚類の生息に及ぼす影響の効果，*農業土木学会論文集*, 72(6), 59-69.
- Takehana, Y., Nagai, N., Matsuda, M., Tsuchiya, K. and Sakaizumi, M. (2003): Geographic variation and diversity of the cytochrome *b* gene in Japanese wild populations of Medaka, *Oryzias latipes*, *Zoological Science*, **20**, 1279-1291.
- 竹花佑介・酒泉満 (2002)：メダカの遺伝的多様性の危機，*遺伝*, 56, 66-71.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007): MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0, *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997): The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876-4882.
- 薄井清 (2000)：東京から農業が消えた日，草思社.
- WCMC (World Conservation Monitoring Centre) (1998): Freshwater biodiversity: a preliminary global assessment, WCMC-World Conservation Press.

Mitochondrial DNA D-Loop Sequence-Based Analysis of the Influence of River Basin Connectivity and Fragmentation on the Genetic Structure and Diversity of the Japanese Eight-Barbel Loach *Lefua echigonia*

Nishida Kazuya, Koizumi Noriyuki, Takemura Takeshi, Watabe Keiji and Mori Atsushi

Summary

This study aims to analyze the influence of basin connectivity and fragmentation on the genetic structure and diversity of the populations of the Japanese eight-barbel loach *Lefua echigonia* in the Tama River Basin, Tokyo, by analyzing their mitochondrial DNA D-loop sequences. A total of 266 specimens were collected from 8 habitats in tributaries and oxbows that were perhaps linked by the Tama River and from 6 habitats in streams that were located in hill-bottom valley (yatsu) and were perhaps fragmented because of the installation of drop structures and concrete lining for river improvement. Thirty haplotypes were detected in the 266 specimens. Every haplotype from the Tama River Basin was identified as an endemic haplotype because these haplotypes were classified into a clade of the South-Kanto group and almost every haplotype was closely related to known haplotypes from the Tama River Basin in this clade in the phylogenetic tree. Several coefficient of genetic differentiation (F_{st}) values between populations, including those for populations in the streams in the hill-bottom valley, were high, and several haplotype diversity (h) values of the populations in the streams in the hill-bottom valley were low. The F_{st} values between populations in tributaries and/or oxbows were low, and showed significantly positive correlation with the distances between populations along the water-course. The h values of the populations in the tributaries and/or oxbows were high. These findings suggest that 1) the populations in the streams in the hill-bottom valley were segmented and reduced because of the measures implemented for the river improvement, i.e., installation of drop structures and concrete lining, and this segmentation and reduction probably decreased genetic diversity; and 2) the populations in the tributaries and oxbows constituted a metapopulation structure, and the gene flow between populations probably preserved genetic diversity.

Keywords: Japanese eight-barbel loach, *Lefua echigonia*, Mitochondrial DNA, Drainage basin, Paddy fields on hill-bottom valley, Genetic structure, Genetic diversity