

(11) 宮城県中南部のウルマーシマトビケラ 地域集団の遺伝的多様性と分化

渡辺幸三^{1*}, 草野光¹, 大村達夫¹

1: 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06)

* E-mail: kozo@water.civil.tohoku.ac.jp

宮城県中南部6水系の58地点でウルマーシマトビケラ地域集団の遺伝構造をAFLPマーカーで調べた。各地点の遺伝的多様性を平均ヘテロ接合度 H_e で評価し、その頻度分布に基づいて、遺伝的多様性を5段階で相対評価する H_e の基準を提案した(例、 $H_e < 0.136$: 非常に低い、 $0.136 < H_e < 0.171$: 低い)。地点間の θ に基づいて遺伝系統樹を作成した結果、調査エリアは3つの遺伝的グループ(A, B, C)に分かれた。このうち56地点を占めたグループAとBの分布域は、標高270-350mを境に上流側(A)と下流側(B)に分かれた。この原因の一つとして、年世代数の違い(A=1, B=2世代/年)に伴う両者の交配時期のずれが推測された。グループCは遺伝的に孤立した2地点で、源流端に位置、下流側が非生息地、狭い川幅の3条件が共通して見られた。

Key Words: genetic diversity, habitat isolation, AFLP, genetic differentiation, elevational genetic groups

1. はじめに

種内個体間の遺伝的変異である遺伝的多様性を豊かに保つことは、将来生息環境が変化した時に、種が新たな環境に適応できる可能性を高める¹⁾。また、遺伝的多様性が極端に小さい種は、近交弱勢により生存率や繁殖力の低下に伴い絶滅する危険が高い^{2),3)}。したがって、河川の生物多様性を後世に継承するために、遺伝的多様性の評価および保全は重要な課題である。しかし、現在行われている河川生物の影響評価やモニタリングのほとんどは、種多様性、貴重種・地域固有種の有無、生物量等の把握に止まり、遺伝的多様性は評価されていない。

遺伝的多様性は個体間のDNA多型を調べることで定量的に評価できるが、その値から多様性が高いのか低いのかを判断するのが難しい。例えば、多様性指標として良く用いられるヘテロ接合度⁴⁾の場合、理論的に取りえる範囲0-0.5を5段階に線形区分し、0-0.1を非常に低い、0.1-0.2を低いと相対的に判断する方法も考えられる。しかし、実際に野外で観測されるヘテロ接合度の範囲はもっと狭い場合がある(例、ヒゲナガカワトビケラの範囲: 0.09-0.37⁵⁾)。また、ヘテロ接合度がある偏った範囲に集中して観測される場合は上記のような線形区分は不適切となる。したがって、遺伝的多様性の状態を合理的に相対評価するに

は、数多くの地点で遺伝的データを収集し、ヘテロ接合度の観測範囲や発生分布等の統計的性質を種ごとに明らかにする必要がある。しかし、水生生物の遺伝的多様性の統計的性質を検討した先行研究はない。

地点間の遺伝的分化は空間的な遺伝的多様性である。ダム⁶⁾、森林開発⁷⁾などによる人為的要因による遺伝的分化は避けるべきだが、自然生態系の中に見られる地域間の遺伝的分化は本来在るべき遺伝的固有性として保全する必要がある。河川水生昆虫は、成虫が水系間を移動しない場合は流域単位で固有の遺伝構造を有する可能性もある。また、分散能力が低い種は、流程やリーチ等のさらに小さい空間スケールを単位とする遺伝構造を形成している可能性もある。種内の遺伝的多様性を保全するには、地点内の遺伝的多様性のみならず、地点間の遺伝子流動や遺伝集団単位等の空間的な遺伝構造を把握する必要がある。

遺伝的に孤立した地点は他地域から多様性が補われにくい。また、仮に個体群が局地的に消滅・縮減した時、孤立した地点は他地域から個体の供給を受けにくい。また、仮に回復しにくい可能性がある¹⁰⁾。このように流域内で孤立した地域は脆弱なので、孤立地域の存在を明らかにして積極的に保全する必要がある。

上記背景のもと、本研究は宮城県中南部に互いに隣接する6水系において、以下4つを目的として、

AFLP (Amplified Fragments Lengths Polymorphism) マーカーでウルマーシマトビケラ (*Hydrosyche orientalis*) の遺伝的多様性と遺伝的分化を評価した。

- 1) 遺伝的多様性の統計分布に基づいて地点ごとの遺伝的多様性を相対的に評価する。
- 2) 地点内の遺伝的多様性と各地点の環境特性の関係を明らかにする。
- 3) 宮城県中南部の地域集団を構成する遺伝的グループの地理的分布を明らかにする。
- 4) 遺伝的に孤立した地点を明らかにし、孤立化と遺伝的多様性の関係および孤立した地点の環境特性を明らかにする。

2. 方法

2.1 調査地点

2006年9月19日から10月24日にかけて、宮城県中南部地域に互いに隣接する6水系の73地点において河川底生動物を採取した(図-1)。このうち、ウルマーシマトビケラの生息が確認されたのは、砂押川水系1地点、七北田川水系12地点、名取川水系40地点、増田川水系1地点、川内沢川水系1地点、五間堀川水系3地点の計58地点だった(図-1)。非生息地($n=15$)は各水系の下流域に存在した。DNA多型分析は生息が確認された58地点のみを対象に実施した。

6水系の中で最も流域面積が広い名取川水系($=939\text{km}^2$)は、幹川流路延長は55.0kmであり、奥羽山脈を源として、丘陵地、仙台平野の順に流下して太

平洋へ注ぐ水系である。流域面積が二番目に大きな七北田川水系($=229\text{km}^2$)も奥羽山脈を源として太平洋まで流下する。他の4水系は、標高が比較的低い丘陵地を源としており、名取川水系や七北田川水系に比べると規模が小さい。調査地域には5つの貯水ダム(釜房、大倉、七北田、樽水、惣の関ダム)と1つの自然沼(サイカチ沼)がある。調査地点は上流から下流まで幅広い河川環境を網羅しており(図-2)、地理学的、物理的、水質の各環境変数の範囲は幅広い(表-1)。

2.2 対象種

ウルマーシマトビケラは、日本列島の溪流に普通に見られる水生昆虫である¹¹⁾。宮城県中部地域において最も生息分布が広い水生昆虫であったため、対象種として選定した。幼虫は石の下や礫間に分泌糸で作った荒い目の巣網を張って営巣し、巣網にかかる河川水中の粒状性有機物を摂食する造網型トビケラに分類される。網は石の上面とくにコケ類の付着した場所に多く、流れの速い場所につくられることが多い¹²⁾。成虫の大きさは、8-15mmで、メスは産卵期に600-700個程の卵を産む¹³⁾。羽化は春から秋にかけて水面で行われる。1日あたりの羽化量が少なく、羽化後も舞い上がらずに水面上を滑ってそのまま岸際の茂み等に入るこむことが多い¹²⁾。成虫の飛行距離に関する知見はない。

2.3 サンプルング

サンプルングは平水時に行った。DNA多型の検出に十分な個体数(20個体程度)を確保するために、同

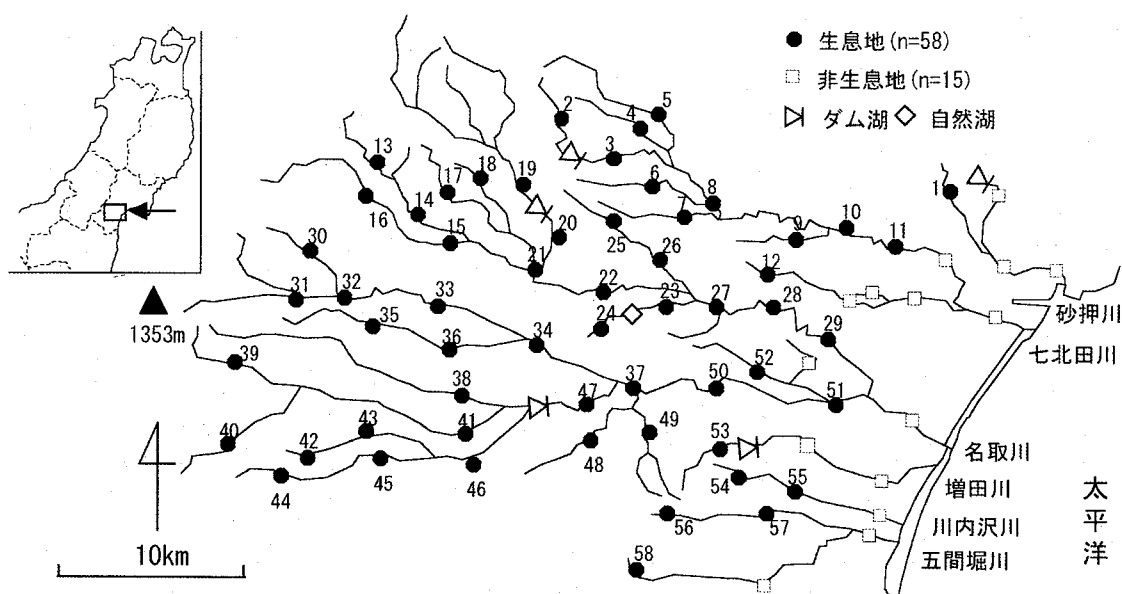


図-1 宮城県中南部の6水系の調査地点。ウルマーシマトビケラのDNA多型分析は生息が確認された58地点で実施した。

一地点において、キックネット法(メッシュサイズ: 250 μ m)による定性的なサンプリングを繰り返し行った。採取したウルマーシマトビケラは99.5%エタノールで保存し、実験室に持ち帰り、実体顕微鏡(150x)を用いて同定した。生物採取の他に、各地点の川幅、水深、流速、石礫の粒径、河川水の生物学的酸素要求量(BOD)、浮遊物質量(SS)、電気伝導度も調査した。水深は各地点の瀬の中でランダムに選んだ20ポイントで標尺を使って計測し、その平均値とした。流速は同20ポイントで水面から水深40%の深さで電磁流速計で計測し、その平均値とした。川幅は右岸と左岸の水際線の距離を、流下方向に30mごとに巻き尺で10回測定し、その平均値とした。石礫の粒径は、河床に設置した1m $\times$ 1mの面格子枠の中の36格子点で2mm以上の河床材料の長径を計り、その平均値とした。3つの水質項目は上水試験法¹⁴⁾に従って計測した。本研究の調査地点は比較的狭い範囲(約40km四方)に分布しており、地点間の気候環境の違いは小さいと考えられるため、各地点の気候に関する環境データ(例、降水量、日照時間、湿度等)は調べなかった。

2.4 AFLP 分析

AFLP分析はDNAを制限酵素で断片化し、その中から特定の断片を選択的にPCR増幅して多型を検出する手法である¹⁵⁾。本研究は計1129個体の幼虫サンプルのAFLP分析を行った。地点当たりの平均サンプル数は19.5であった。既報の方法⁹⁾に従って、各幼虫個体からフェノール抽出したDNAサンプルをそれぞれAFLP分析した。

AFLP分析にはAFLP™ Plant Mapping Kit (ABI)を用いた。まず、0.5mLチューブにMseI(第一化学薬品)100 unit, EcoRI(第一化学薬品)500 unit, T4 DNA Ligase(第一化学薬品)100unit, 1mg/mL BSA 5 μ L, 0.5M NaCl 10 μ L, 10 $\times$ T4 DNA Ligase buffer containing ATP 10 μ Lを加え、滅菌蒸留水で100 μ Lに調整し酵素マスターミックスを作成した。次に、0.5mLチューブの中

で、50ng/ μ Lに濃度調整したDNAサンプル5.5 μ L、酵素マスターミックス1 μ L、キット付属のEcoRIとMseI Adaptor Pairs(アニーリング済)各1 μ L, 0.5M NaCl 1 μ L, 10 $\times$ T4 DNA Ligase buffer containing ATP 1 μ Lを加えて、20 $\sim$ 25 $^{\circ}$ Cで制限酵素反応とライゲーション反応(8 $\sim$ 10時間)を同時に行い、その後TE_{0.1} buffer(最終濃度10mM Tris-HCl, 同0.5M EDTA)を189 μ L加えて希釈した。次に、予備選択プライマーによるDNA断片の予備的PCR増幅と、それに続く選択プライマーによる選択的PCR増幅をサーマルサイクラー(BIO-RAD iCycler)で行った。予備的PCR増幅は、0.5mLチューブの中に制限酵素処理-ライゲーション反応産物の希釈液4 μ L、キット付属のプレセレクトティブプライマー1 μ LおよびAFLP Core Mix 15 μ Lを入れて、2

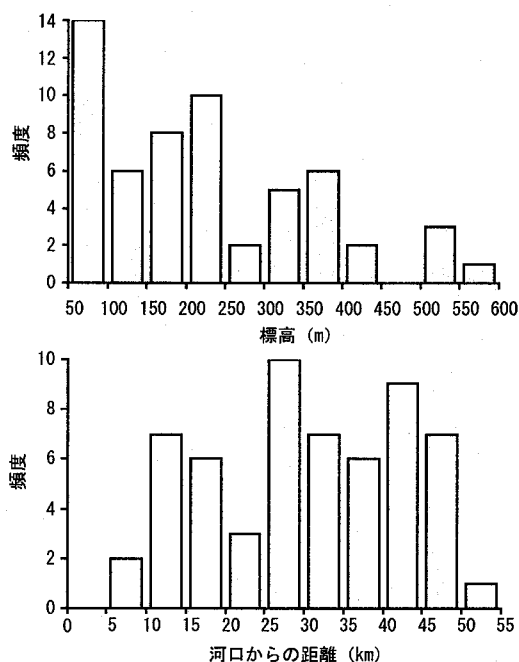


図-2 調査地点(n=58)の標高および河口からの距離の頻度分布。

表-1 調査地点(n=58)の地理学的・物理的、水質環境変数の範囲、平均値、標準偏差および平均ヘテロ接合度とのスピアマンの相関係数。**はP<0.01, *はP<0.05の有意水準で無相関の帰無仮説が棄却された変数。

	単位	範囲	平均	標準偏差	スピアマンの相関係数	P
標高	m	2 - 590	177	142	0.40	**
河口からの距離	km	8 - 52	31	12	0.39	**
河川次数	-	1 - 5	2.41	1.16	-0.11	
川幅	m	1 - 38	2.72	0.37	0.00	
水深	cm	10 - 48	27.3	9.4	-0.01	
流速	m/s	0.03 - 1.29	0.54	0.23	0.14	
石礫の平均粒径	cm	4.8 - 23.0	12.6	4.2	0.20	
生物学的酸素要求量 (BOD)	mg/l	0.03 - 2.394	0.47	0.44	-0.21	
浮遊物質量 (SS)	mg/l	0.32 - 18.02	3.26	3.26	-0.23	
電気伝導度	μ S/m	3.32 - 27.9	9.64	5.25	-0.21	

分間の伸長反応 (72℃) を1回行った後、20秒間の熱変性 (94℃)、30秒間のアニーリング (56℃)、2分間の伸長反応 (72℃) を20サイクル行い、最後に 60℃ (30分間) の加熱を1回行った。その後、TE_{0.1} buffer を用いて予備的 PCR 反応産物を 20 倍に希釈した。AFLP™ Plant Mapping Kit には、選択的 PCR 増幅に用いる EcoRI 断片と MseI 断片に対応するプライマー各々 8 種、延べ 64 組のプライマーペアが用意されている。まず、異なる地点から任意に取り出した 6 サンプルの選択的 PCR を行い、全 64 組のプライマーペアの中でより多くの数のフラグメントを検出した 3 組を用いて全サンプルの分析を行った。選択されたプライマーペアについて、アダプターと相補的な塩基配列にさらに付加した 3 塩基のオリゴヌクレオチドの塩基配列を表-2 に示す。0.5mL チューブに、予備的 PCR 反応産物の希釈液 3μL、キット付属の MseI プライマー、蛍光ラベルした EcoRI プライマーを各 1μL、キット付属の AFLP Core Mix 15μL を混合して、2分間の伸長反応 (72℃) を1回行った後、20秒間の熱変性 (94℃)、30秒間のアニーリング (66℃~56℃、1サイクル毎に 1℃ ずつ温度を下げる)、2分間の伸長反応 (72℃) で 2 分を 10 サイクル行った。

PCR 増幅された DNA 断片を、キャピラリー電気泳動で塩基長ごとに分離して解析した。キャピラリー電気泳動には、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer を用いた。また、フラグメント解析には 3100 Gene Scan® 3.1.2 (ABI) および GeneMapper® (ABI) を使用した。

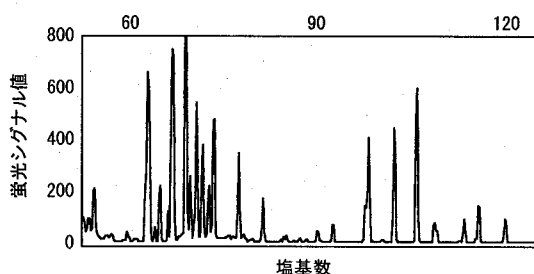


図-3 フラグメント波形データの例。St.1の1個体を対象にプライマーペア ACA/CAC (表-1 参照) で検出した波形の一部。

2.5 データ解析

得られたフラグメント波形データ (図-3) を、各遺伝子座においてピークが検出された場合を1、されなかった場合を0とした1-0データに変換した。同じ種類のプライマーペアから産出された同じ分子量のピークは同一遺伝子座を表すと仮定した。各遺伝子座に優性および劣性の2対立遺伝子があり、ある遺伝子座に関して、ピークが検出されなかった個体の遺伝子型が劣性ホモ接合体であると仮定した¹⁶⁾。そしてハーディ・ワインベルグ平衡の仮定の下、i番目の遺伝子座の劣性遺伝子頻度 (q_i) を Lynch と Milligan¹⁶⁾ の方法で算出した。優性遺伝子頻度 (p_i) は、 $p_i = 1 - q_i$ より算出した。全地点の個体 ($n=1124$) をプールした集団の劣性遺伝子頻度が 0.05-0.95 となる遺伝子座を多型遺伝子座として以降のデータ解析に用いた。各地点の遺伝的多様性を評価するために平均ヘテロ接合体 (H_e) を、 $H_e = (1/r) \sum 2p_i q_i$ より算出した。ここで r は多型遺伝子座の総数を表す。地点間の遺伝的分化の大きさを θ ¹⁷⁾ で評価した。 θ は固定指数 F_{st} と同義であり、ある遺伝子座に関して、全集団から任意に取られた2つの遺伝子が異なる確率と全集団を構成する各分集団から任意に取られた2つの遺伝子が異なる確率の確率比を表す。 θ は次の式で計算される¹⁷⁾。

$$\theta = a/(a+b+c) \cdots (1)$$

$$a = \frac{\bar{n}}{n_c} \left\{ s^2 - \frac{1}{n-1} \left[\bar{p}(1-\bar{p}) - \frac{1}{2}s^2 - \frac{1}{4}\bar{h} \right] \right\} \cdots (2)$$

$$b = \frac{\bar{n}}{n-1} \left[\bar{p}(1-\bar{p}) - \frac{1}{2}s^2 - \frac{2\bar{n}-1}{4n}\bar{h} \right] \cdots (3)$$

$$c = \bar{h}/2 \cdots (4)$$

ここで、

$$n_j: \text{地点 } j (=1, 2) \text{ のサンプル数, } \bar{n} = \sum_{j=1}^2 n_j / 2$$

$$n_c = \left(2\bar{n} - \sum_j n_j^2 / 2\bar{n} \right), \quad \bar{p} = \sum_{j=1}^2 n_j p_j / 2\bar{n}$$

表-2 AFLP 分析の選択的 PCR のプライマーの選択塩基配列 (アダプターと相補的な塩基配列に付加した 3 塩基のオリゴヌクレオチドの塩基配列) および検出された遺伝子座と多型遺伝子座の数

プライマーペアの選択塩基配列 (EcoRI側 / MseI側)	検出された遺伝子座の数	多型遺伝子座の数	多型遺伝子座の割合 (%)
ACA / CAC	60	42	70.0
ACG / CTT	39	17	43.6
AAC / CAG	36	16	44.4
計	135	75	55.6

$$s^2 = \sum_{j=1}^2 n_j (p_j - \bar{p})^2 / 2n, \quad \bar{h} = \sum_{j=1}^2 n_j p_j (1 - p_j)$$

である。θは地点間の遺伝的分化が全く同じである場合0を示し、0よりも大きいほど遺伝的分化が大きいことを表す。θを連関測度とするUPGMAによるクラスター分析をソフトウェアパッケージPHYLIP 3.6b内のプログラムneighborおよびdrawgramを用いて行い、58地点の遺伝系統樹を作成した。作成された遺伝系統樹に基づいて、遺伝構造が類似する地点をグループあるいは各グループ内のサブグループに分類した。

58地点の H_e の出現頻度分布について、一様分布および正規分布との適合性をコルモゴロフ・スミルノフ検定でそれぞれ調べた。遺伝系統樹に基づいて分類した(サブ)グループ間の平均ヘテロ接合度 H_e の平均値の差をウィルコクソンの順位と検定で調べた。各地点の H_e と10項目の環境変数(標高、河口からの河川距離、河川次数、川幅、水深、流速、石礫の平均粒径、BOD、SS、電気伝導度)の間の相関関係をスピアマンの順位相関係数の有意性検定で調べた。

3. 結果

3.1 遺伝的多様性

全1129サンプルから計135遺伝子座が検出された。このうち75が多型遺伝子座だった。平均ヘテロ接合度(H_e)の範囲は0.111-0.287で、全地点の H_e の平均値は0.193(標準偏差=0.049)だった。

58地点の H_e の出現頻度分布を図-4に示した。 H_e の頻度分布は一様分布との適合性はなく($P<0.01$)、正規分布との適合性はあった($P>0.05$)。 H_e の頻度分布には0.15と0.24付近に2つのピークが見られた。 H_e の出現頻度に基づいて、累積出現確率20%、40%、60%、80%を境界として、各地点の H_e を5段階で相対評価した。この評価基準では、 $H_e<0.136$ は「非常に低い(下位0-20%)」、 $0.136<H_e<0.171$ は「低い(20-40%)」、 $0.171<H_e<0.213$ は「中程度(40-60%)」、 $0.213<H_e<0.244$ は「高い(60-80%)」、 $H_e>0.244$ は「非常に高い(80-100%)」と評価される(図-5)。図-6に各地点の H_e の5段階評価の結果を地図上に示した。「非常に高い」や「高い」地点が上流域に多く、中流以降には殆ど見られない傾向があった。逆に、「非常に低い」や「低い」地点は中流や下流に数多く出現した。

表-1に H_e と10項目の環境変数とのスピアマンの順位相関係数を示した。 H_e は標高および河口からの距離と有意な正の相関があった。他の8項目の環境変数は H_e と有意な相関はなかった。

3.2 遺伝的分化

地点間のθは0.004-0.405(平均=0.105)の範囲で測定された。θに基づいて作成した遺伝系統樹を図-7に示す。θ>0.25を境界として各地点を遺伝的に区分すると、宮城県中南部のウルマーシマトピケラ地域集団は3つの遺伝的グループに分かれた(図-7、グループA、B、C)。また、グループ内を細かく見ると、グループAとBの中には遺伝構造が特に類似したサブグループ(A-1、B-1、B-2)が存在し、階層的な遺伝構造が形成されていた。グループA(n=14)は、11地点のサブグループA-1とそれ以外の3地点で構成されていた。グループB(n=42)は、11地点のサブグループB-1と30地点のサブグループB-2とそれ以外

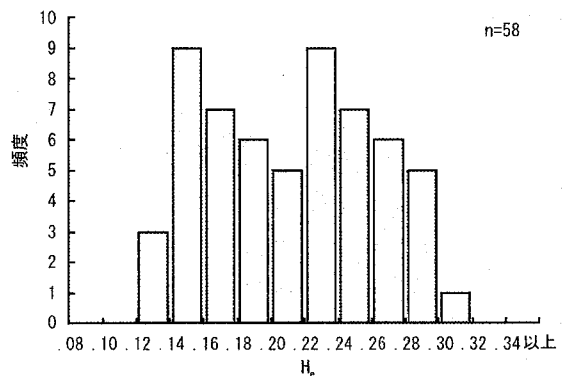


図-4 各地点の平均ヘテロ接合度 H_e の頻度分布

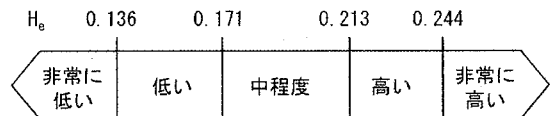


図-5 平均ヘテロ接合度 H_e の頻度分布(図-4)の累積出現確率(20, 40, 60, 80%)に基づく H_e の相対区分。

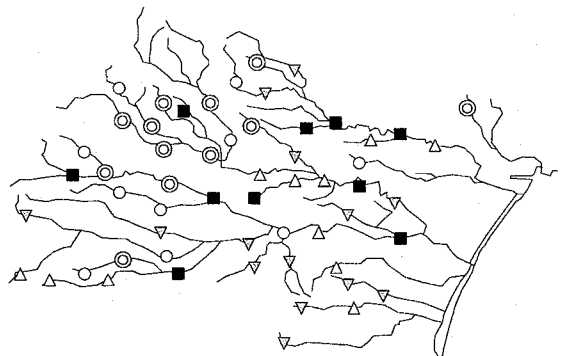


図-6 調査地点(n=58)の平均ヘテロ接合度 H_e の地理的分布。記号は H_e の頻度分布(図-4)に基づく H_e の5段階の相対区分の結果を表す。◎:非常に高い; ○:高い; △:中程度; ▽:低い; ■:非常に低い。

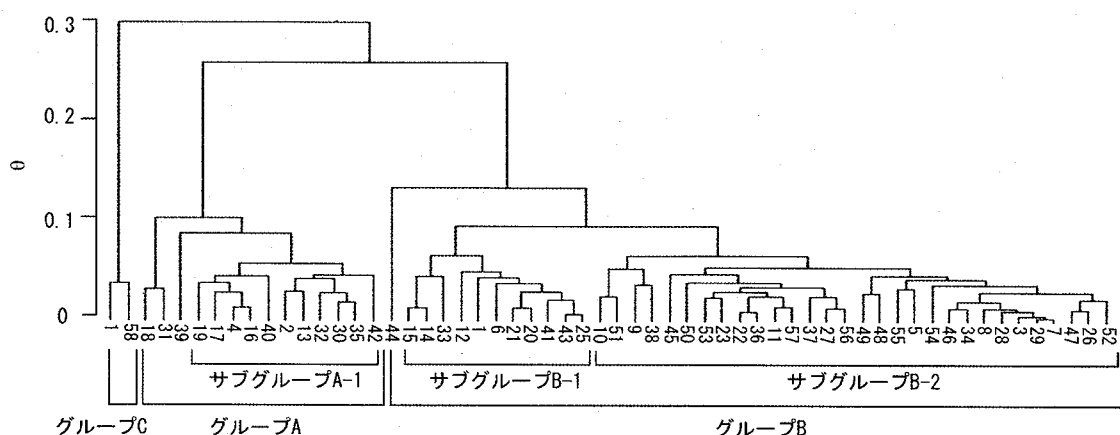


図-7 地点間の θ に基づいてUPGMAで作成した遺伝系統樹。数字は図-1に示した地点番号。

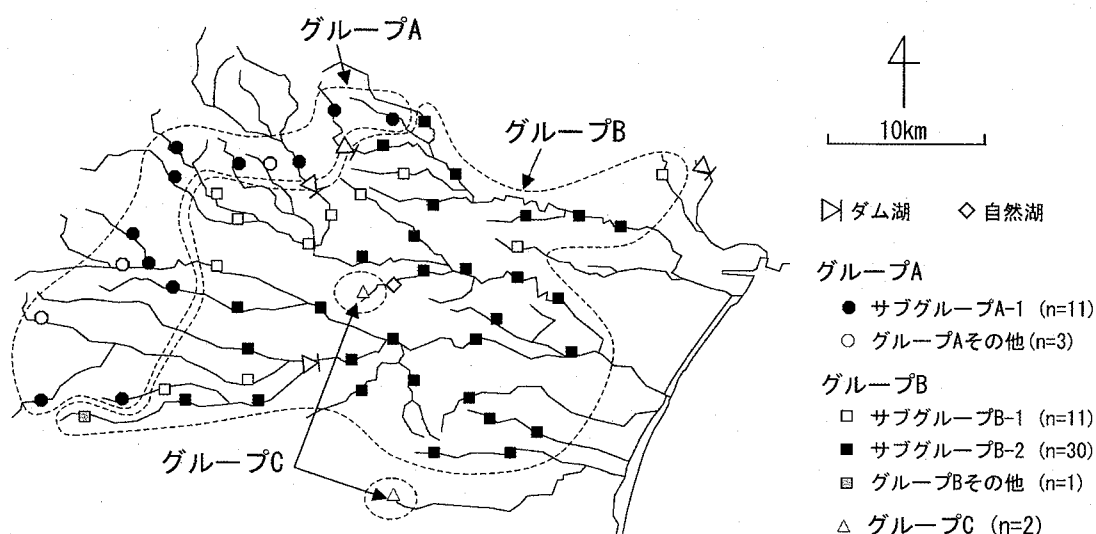


図-8 宮城県中部の6水系に分布するウルマーシマトビケラ地域集団を構成する遺伝的グループおよびサブグループの地理的分布。点線はグループ(A, B, C)が分かれた境界線を表す。

の1地点(St.44)で構成されていた。グループCはSt.1とSt.58の2地点で構成される小グループであった。

図-8に各グループおよびサブグループの地理的分布を地図上に示した。グループAの生息地の標高は270-590m、グループBの生息地の標高は2-350mで、AとBの分布は標高270-350mを境界として地理的に明瞭に分かれていた(図-9)。サブグループB-1はグループBの中で上流側、サブグループB-2は下流側に分かれた(図-8)。グループCは、自然湖(サイカチ沼)に流入する短い小河川の源流端(St.61)と河川の大部分が灌漑水路化された影響で生息域が源流のみに残された小河川の源流端(St.6)の2地点であった。

図-10に(サブ)グループごとに各地点の平均ヘテロ接合度(H_e)を示した。サブグループA-1およびサブ

グループB-1の H_e の各平均値は、グループAその他(サブグループA-1以外の3地点)、サブグループB-2、グループCの各平均値よりもそれぞれ有意に高かった($P<0.005$)。 H_e の平均値が高かったサブグループA-1とB-1の平均値に有意差はなく、 H_e の平均値が低かったグループAその他、サブグループB-2、グループCの間にも有意差はなかった($P>0.005$)。

4. 考察

4.1 地点内の遺伝的多様性

遺伝的多様性の測定値の意味を正しく理解するには、より多くの地点の遺伝的データを収集する必要がある。これまで、水生生物の遺伝的多様性の評価基

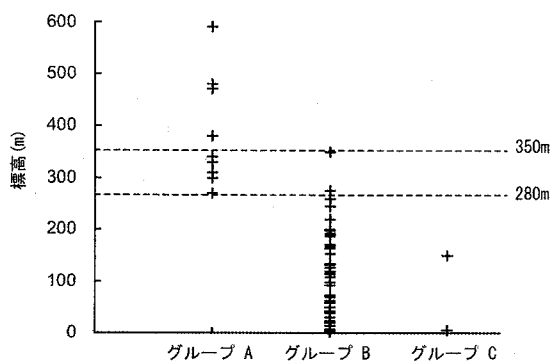


図-9 遺伝系統樹(図-7)で分類された遺伝的グループごとの調査地点の標高。

準が定められていない理由の一つとして、データを収集した地点数が不十分だったことが考えられる。本研究は数多くの地点で H_e を測定し、標本数が大きい H_e の統計分布(図-4)に基づいて、各地点の遺伝的多様性を相対的に5段階で評価する H_e の基準(図-5)を初めて提案した。現在、遺伝的多様性を絶対評価する基準は定められていないので、本研究のように、種ごとに得られた観測値の標本分布に基づいて、遺伝的多様性の高さを相対的に評価するのが現実的な評価手順であると思われる。

一般に個体数や生息域が限られて絶滅に瀕した野生生物集団の遺伝的多様性は小さい²⁾。絶滅に瀕した野生生物集団の平均ヘテロ接合度 H_e をAFLPマーカーで調べた過去の研究において、オヤマノエンドウの一種 *Oxytropis campestris* var. *chartacea* の H_e は0.145-0.189¹⁸⁾、貝類ミズシタダミ科の一種 *Valvata utahensis* の H_e は0.166-0.242と報告されている¹⁹⁾。本研究で測定したウルマーシマトビケラの H_e の範囲0.111-0.287は、これらの絶滅危惧種の H_e の下限値(0.145, 0.166)よりも更に低い範囲を含んでおり、今回 H_e が特に低かった地点は、絶滅危惧種よりも H_e のレベルが低かったことになる。ただし、DNA塩基配列が大きく異なる種間では、AFLPマーカーで測定した遺伝的多様性の値を単純には比較できないので、今回 H_e が特に低かった地点でウルマーシマトビケラが局地的絶滅に瀕していると単純に考えることはできない。DNA塩基配列に違いが少ない近縁種間であれば、遺伝的多様性の種間の比較に意味がある。したがって、シマトビケラ属あるいはシマトビケラ科の他種に対して、今回ウルマーシマトビケラで得られた $H_e < 0.136$ を「非常に低い」、 $H_e < 0.171$ を「低い」と判定する遺伝的多様性の相対基準を適用できる可能性は高い。今後、近縁種の遺伝的多様性を調査してこの可能性を検証する必要がある。

各地点の H_e と環境変数の相関分析の結果、 H_e は物

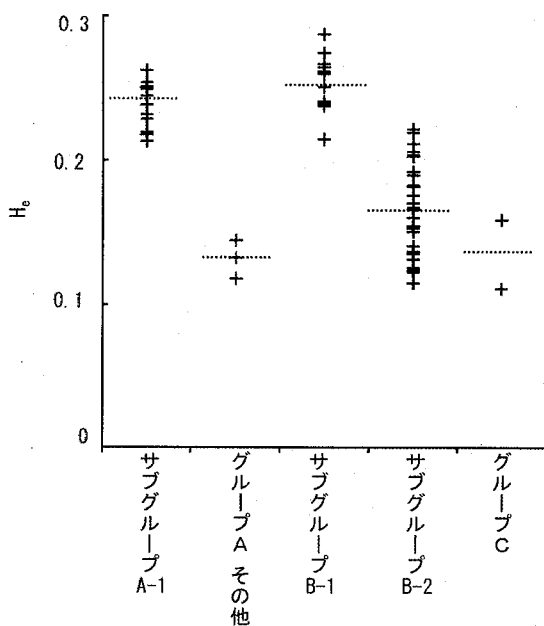


図-10 遺伝系統樹(図-7)で分類された(サブ)グループごとの平均ヘテロ接合度 H_e 。点線は平均値を示す。

理環境変数である川幅、水深、流速、石礫の粒径および水質環境変数であるBOD、SS、電気伝導度と相関を示さなかった。他の生物指標である種多様性や個体群密度の場合、物理環境や水質と密接に関係することが多いため、種多様性や個体群密度を高める物理環境および水質環境を設計し、水生生物の保全を図る場合がある(例、PHABSIM²⁰⁾)。これに対して、 H_e は物理環境変数と相関がなかったため、ウルマーシマトビケラ地域集団の遺伝的多様性を高めるための物理環境および水質環境の設計の実現は難しいと考えられる。地点内の遺伝的多様性は周辺地域集団との遺伝子流動²⁾、祖先の個体群変動²¹⁾、そして創始者効果²²⁾などの局所的な物理環境状態だけでは説明できない様々な因子が影響するので、物理環境や水質環境の特性との関係が表れにくかったものと考えられる。

標高および河口からの距離の地理的環境項目は H_e と相関を示した。標高および河口からの距離と H_e の正の相関は、上流域の地域集団ほど遺伝的多様性が高くなる傾向を説明している。標高が高い地点ほど遺伝的多様性が高くなる関係はHughesら²³⁾が発見した *Yoraperla brevis* (ヒロムネカワゲラ科の1種)の結果と一致した。ただし、本研究の源流域の一部には H_e が「低い (St.39)」や「非常に低い (St.18, 31)」に判定される地点もあり、この関係に当てはまらない例外的な地点も存在した。この原因として遺伝的孤立化の影響が考えられたが、この影響については次節

で述べることとする。標高および河口からの距離は流域内を連続的に変化する地理的変数である。これらの変数が遺伝的多様性と密接に関係していたことから、遺伝的多様性が高い(あるいは低い)地点は流域内に広く分散しているのではなく、一定のエリアに集中して流域内に分布しているものと理解される。

4.2 地域集団の遺伝構造

調査地点は3つの遺伝的グループ(A, B, C)に分かれた。各グループは水系ごとに分かれるのではなく、複数水系に跨って分布していた(図-8)。このことから、ウルマーシマトビケラは生息地間を河川に沿って移動するだけではなく、河川間を飛行して移動する可能性も高いと考えられる。

全58地点のうち56地点を占めたグループAとBの分布域は、標高270-350mを境界として、上流側(A)と下流側(B)に明瞭に分かれていた(図-9)。この境界付近では、強い遺伝子流動が期待される河川で連結された隣接地点間であっても、調査地点がグループAとBに分かれていれば、地点間の遺伝組成が大きく異なるという興味深い現象が観察された。この境界線の一部にはダムが存在するが、境界全体に渡ってグループAとBを物理的に遮断する因子(例、山脈)はなかった。グループAとBの境界で遺伝子流動を弱めている原因仮説として、生息地の標高によるウルマーシマトビケラの年世代数の違いを考えた。谷田²⁹⁾は、貴船川(京都府)のウルマーシマトビケラが、標高による積算水温の違いによって、上流(標高=440m)で年1世代、中流(標高=240m)で年2世代となったことを報告している。年1世代の場合は5-6月に羽化、年2世代の場合は9-10月(非越冬世代)と3-6月(越冬世代)にそれぞれ羽化する²⁹⁾。ウルマーシマトビケラの成虫(産卵前)期間は3-16日間なので²⁹⁾、年世代数の異なる地域集団間で個体が交流した場合、年1世代集団と年2世代の越冬世代集団の羽化期が1ヶ月でもずれば、集団間の交配機会が減少して遺伝子流動は弱まる。また、羽化期が合致しても、生育期間、積算温度、餌資源等の違いによって集団間で体の大きさが異なり、交配しない可能性も考えられる。谷田²⁹⁾が報告した年世代数が変化する標高範囲は、本研究のグループAとBを分けた標高範囲とほぼ一致した。したがって、グループAは年1世代の地点で形成され、グループBは年2世代の地点で形成されたため、両者の交配時期がずれた結果として遺伝的に分化した可能性がある。ただし、京都府と宮城県では気候が違いため、河川の積算水温が貴船川よりも本研究の対象河川の方が低く、対象河川の全域あるいは大部分が年1世代型になっている可

能性も否定できない。したがって、今後、対象河川におけるウルマーシマトビケラの生活環と水温の調査を行い、仮説をさらに検証する必要がある。

上記仮説が正しい場合、地球温暖化がウルマーシマトビケラの遺伝的多様性が減少する可能性がある。グループAとBの遺伝的分化は、流域内の上下流間に形成された空間的な遺伝的多様性である。標高が高い地点が温暖化に伴って年2世代に変化した場合、上流に固有に形成された遺伝集団が下流側の遺伝集団と交雑して、流域内の空間的な遺伝的多様性が減少する可能性がある。これまで、地球温暖化に伴う様々な野生生物の生息分布の変化に伴う種多様性の減少の危険性を指摘されている²⁹⁾が、今後、温暖化による野生生物の生活史の変化に伴う遺伝的多様性の変化にも視野を拡げて、温暖化が生物多様性に及ぼす影響を予測する必要があるのではないだろうか。

グループCは全58地点の中で遺伝的に孤立した2地点(St.24, St.58)であった。St.24は自然湖(サイカチ沼)に流入する約0.5km程度の短い小河川(平均川幅=2.3m)に残された生息地であった。St.58は大部分が灌漑水路化されて生息域が源流のみに残された小河川(平均川幅=2.2m)の源流端に位置した。つまり、グループCの2地点は、1)源流端に位置する、2)下流側が非生息地となっている、3)川幅が狭い、の3条件を共通して満たしていた。これらの条件を満たす孤立小集団は、遺伝的浮動により他集団から遺伝的に分化する可能性が高い。あるいは、孤立小集団が作られた時に創始者効果²⁹⁾が働き、ソースになった集団(地理的にグループBと推測される)と異なる遺伝構造が形成される可能性もある。ただし、上記3条件を満たしても遺伝的に孤立していない地点もあったので(例、St.1)、この関係が必ず成立するとは限らないようである。

グループA(n=14)は、11地点のサブグループA-1と遺伝的に孤立したその他3地点で構成されていた。このその他3地点はグループCの2地点と共に、遺伝的に孤立した地点と考えられる。これら5地点のH_dの平均値(=0.133)は、その他53地点の平均値(=0.199)よりも有意に低かった(ウィルコクソンの順位検定、P=0.004)。つまり、遺伝的に孤立した地点の遺伝的多様性は、孤立していない地点に比べて低いと言える。地点間の遺伝子流動は、遺伝的浮動による地点内の遺伝的多様性の低下を弱める働きをする。上記5地点の遺伝的孤立化が遺伝子流動の乏しさの結果ならば、遺伝的に孤立した地点の遺伝的多様性が低かったのは妥当な結果と言える。

遺伝的多様性が平均的に低かったサブグループB-2は遺伝的に孤立しておらず、むしろ中流以降の30地

点を占める大集団であった(図-8)。にも関わらず、サブグループA-1(11地点)やB-1(11地点)よりも地点内の遺伝的多様性が平均的に低かった(図-10)。同じサブグループに属する地点間は遺伝的に類似しており、地点間の遺伝的多様性は小さい。調査エリアの中流以降の大半はサブグループB-2のみで構成されていたので、宮城県中部の中流以降は、地点間および地点内双方の遺伝的多様性が低下したエリアと考えられる。中流以降はウルマーシマトビケラの個体群密度が高かったため、本種の生息に適した環境と考えられたが、それに反して遺伝的多様性が劣化していたのは興味深い結果であった。個体群密度や生息域が大きいのに関わらず、サブグループB-2の遺伝的多様性が小さかった原因として、サブグループB-2が遺伝的多様性が小さい局所集団をソースとして過去に生息域を急速に拡大した可能性が挙げられる。

サブグループA-1やB-1は、分布域はサブグループB-2よりも小さいが、地点内の多様性が高く、さらにその存在により宮城県中南部におけるサブグループ間の多様性を創出していた。したがって、その分布域の小ささに反して、宮城県中南部のウルマーシマトビケラ地域集団全体の遺伝的多様性を高めることに大きく寄与しているエリアと言える。また、上述したように、遺伝的に孤立した小集団は地点内の多様性は小さかったが、これらが地域集団内の地点間の多様性創出に果たす役割は大きい。地域集団内の遺伝的多様性を保全するためには、地点内の遺伝的多様性の保全と共に、孤立個体群あるいは分布域が小さい個体群を存続させて地点間の多様性を保全する必要がある。そのためには、空間的な遺伝構造を把握し、これらの個体群の存在を知ることが求められる。

おわりに

本研究は、宮城県中南部の6水系においてウルマーシマトビケラ地域集団の遺伝的多様性と遺伝的分化をAFLP法によって評価した。以下に本研究で得られた主な成果をまとめる。

- 1) 平均ヘテロ接合度 H_e の頻度分布の基づいて、地点ごとの遺伝的多様性のレベルを累積出現確率を基準にして相対的に区分した結果、 $H_e < 0.136$ は「非常に低い」、 $0.136 < H_e < 0.171$ は「低い」、 $0.171 < H_e < 0.213$ は「中程度」、 $0.213 < H_e < 0.244$ は「高い」、 $H_e > 0.244$ は「非常に高い」と区分された。
- 2) 平均ヘテロ接合度 H_e は標高および河口からの距離と有意な正の相関があった。河川次数、川幅、水深、

流速、石礫の平均粒径、BOD、SS、電気伝導度は H_e と有意な相関はなかった。

3) 宮城県中南部のウルマーシマトビケラ地域集団は3つの遺伝的グループ(A, B, C)に分かれた。全地点のうち56地点を占めたグループAとBの分布域は、標高270-350mを境界として、上流側(A)と下流側(B)に明瞭に分かれた。この原因の一つとして、標高(水温)差による年世代数の違いによって両者の交配時期がずれたことが推測された。

4) グループCは遺伝的に孤立した2地点の小集団であった。これら2地点には「源流端に位置する」、「下流側が非生息地」、「川幅が狭い」の3条件が共通して見られた。

5) 遺伝的に孤立した地点の遺伝的多様性は孤立していない地点よりも平均的に低かった。

謝辞：本研究の一部には、国土交通省建設技術研究開発補助金(研究代表者：大村達夫、研究課題：流域エコロジカルネットワーク再生による健全な生態系の保全)を使用した。また、(財)リバーフロント整備センターから資金的援助を受けた。同センターの大嶋吉雄氏、佐合純三氏、城戸和寿氏からご助言を賜った。渡辺は科学研究費補助金(特別研究員奨励費、研究課題：水生昆虫集団の個体群動態の履歴に因る遺伝構造の形成と生息地分断による遺伝的分化)を使用した。AFLP分析は東北大学農学研究科の陶山佳久博士と富田基史氏のサポートを受けて行った。ここに記して謝意を表します。

参考文献

- 1) Allendorf, F. W. and Leary, R. F.: Heterozygosity and fitness in natural populations of animals, in "The Science of Scarcity and Diversity" pp.57-76, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, 1986.
- 2) Morden, C. W. and Loeffler, W.: Fragmentation and genetic differentiation among subpopulations of the endangered Hawaiian mint *Haplostachys haplostachya* (Lamiaceae). *Molecular Ecology* 8: pp. 617-625, 1999.
- 3) Saccheri, I., Muussaaari, K., Kankare, M., Vikman, P., Fortelius, W. and Hanski, I.: Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*, 392, pp. 491-494, 1998.
- 4) Nei, M.: *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York, 1987.
- 5) 渡辺幸三、大村達夫：ヒゲナガカワトビケラ(*Stenopsyche marmorata*) 地域集団のRAPD解析によるダム上下流間の遺伝的分化の評価、土木学会論文集, No.790, VII -35, pp. 49-58, 2005.
- 6) 渡辺幸三、大村達夫：RAPD解析によるダム上下流の河川水生昆虫3種地域集団の遺伝的多様性の評価、土

- 木学会論文集, Vol. 62, No.811, VII-38. pp. 48-59, 2006.
- 7) Brotons, L., Wolff, A., Paulus, G., Martin, J.L.: Effect of adjacent agricultural habitat on the distribution of passerines in natural grasslands. *Biological Conservation* 124, pp. 407-414, 2005.
 - 8) Frankham, R.: Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* 78: 311-327, 1997.
 - 9) Hartl, D., and A. G. Clark.: *Principles of Population Genetics*, third ed., Sinauer Associates, Sunderland, 1997.
 - 10) Hughes, J.M.: Constraints on recovery: using molecular methods to study connectivity of aquatic biota in rivers and streams. *Freshwater Biology* 52, pp. 61-631, 2007.
 - 11) Tanida, K.: A revision of Japanese species of the genus *Hydropsyche* (Trichoptera, Hydropsychidae) I.Kontyu, Tokyo, 54, pp. 467-484, 1986.
 - 12) 刈田敏: フライフィッシャーのための水生昆虫小宇宙 Part I, 株式会社つり人社, 2000.
 - 13) 水野信彦, 御勢久右衛門: 河川の生態学, 築地書館, pp.32-99, 2000.
 - 14) 日本水道協会: 上水試験方法, 1993.
 - 15) Vos, P., Hogers, R., Reijmans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, pp. 4407-4414, 1995.
 - 16) Lynch, M., and B. G. Milligan.: Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3, pp. 91-99, 1994.
 - 17) Weir, B.S., Cockerham, C.C.: Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, pp. 1358-1370, 1984.
 - 18) Chung, M., Gelembiuk, G., Givnish, T.J.: Population genetics and phylogeography of endangered *Oxytropis campestris* var. *chartacea* and relatives: arctic-alpine disjuncts in eastern North America. *Molecular Ecology*, 13, pp. 3657-3673, 2004.
 - 19) Miller, M.P., D. Weigel, and K.E. Mock.: Patterns of genetic structure in the endangered aquatic gastropod *Valvata utahensis* (Mollusca: Valvatidae) at small and large spatial scales. *Freshwater Biology*, 51, pp. 2362-2375, 2006.
 - 20) 中村俊六: IFIM 入門. (財)リバーフロント整備センター, 1999.
 - 21) Monaghan, M. T., P. Spaak, C. T. Robinson, and J. V. Ward.: Population genetic structure of 3 Alpine stream insects: influences of gene flow, demographics, and habitat fragmentation, *Journal of the North American Benthological Society*, 21, 114-131, 2002.
 - 22) Mayr, E.: *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1963.
 - 23) Hughes, J.M., Mather, P.B., Sheldon, A.L., Allendorf, F.W.: Genetic structure of the stonefly, *Yoraperla brevis*, populations: the extent of gene flow among adjacent montane streams. *Freshwater Biology*, 41, pp.63-72, 1999.
 - 24) 谷田一三: 貴船川におけるシマトビケラ属3種の生活史と分布、とくに生活環の変異と密度と幼虫の成長との関連について, 陸水学雑誌, 41, pp.95-101, 1980.
 - 25) 柴田喜久雄: 水力発電水路害虫ウルマシマトビケラ (*Hydropsyche ulmeri* Tsuda)の生態と防除, 1975.
 - 26) Parmesan, C.: Evolution and ecology: climate and species range. *Nature* 382, pp.765-766, 1996.

(2007. 5. 25 受付)

GENETIC DIVERSITY AND DIFFERENTIATION OF HYDROSYCHE ORIENTALIS POPULATIONS IN SOUTH-CENTRAL MIYAGI PREFECTURE

Kozo WATANABE¹, Hikaru KUSANO¹ and Tatsuo OMURA¹

¹Dept. of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University

We examined the genetic structure of 58 *H. orientalis* populations in 6 catchments in South-Central Miyagi prefecture, Japan using AFLP markers. Based on the frequency distribution we observed in values of expected heterozygosity (H_e), we formulated five categories of H_e , e.g., <0.136 = very low, $0.136 < H_e < 0.171$ = low, etc. We constructed a dendrogram of the 58 populations using θ , and classified the populations into 3 genetic groups (A, B, C) based on the genetic similarity (e.g., $\theta < 0.25$). Groups A and B were composed of 56 populations that could be divided into upstream (A) and downstream reaches (B) with a boundary occurring between 270 m and 350 m in elevation. Non-overlapping mating seasons that result from different timings of the life cycle was considered to be the cause of this difference in elevational genetic groups. Group C consisted of 2 isolated populations that are both located in narrow headwater streams that are isolated from downstream areas by lentic habitat downstream.