

## (63) 進化系統を考慮した河川水生昆虫 ヒゲナガカワトビケラの遺伝的多様性の評価

鈴木 祥一<sup>1\*</sup>・渡辺 幸三<sup>2</sup>・八重樫 咲子<sup>1</sup>・大村 達夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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)

<sup>2</sup>Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries (Mueggelseedamm 301, 12587 Berlin, Germany)

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

宮城県中南部および本州各地に分布するヒゲナガカワトビケラ地域個体群を対象にmtDNAのCO I領域のシーケンス解析を行った。その結果、解析した400個体から58種類のハプロタイプが検出された。ハプロタイプは2つのクレード (Clade1, 2) に分類され、これら2つは約70万年前に分岐したと推定された。Clade2に分類された個体は主に源流域に分布しており、間氷期に日本列島を北側から拡大してきたClade2の個体群が源流域に残されている可能性が考えられた。これら源流の地域個体群は、ヒゲナガカワトビケラ全体の遺伝的多様性を高めており、分布域が狭いものの優先的に保全する必要があることがわかった。

**Key Words :** genetic diversity, mtDNA, evolutionary lineage, *Stenopsyche marmorata*

### 1. はじめに

近年、生物多様性保全の観点から遺伝的多様性の保全は重要な課題となっている。遺伝的多様性が低下した集団は近交弱勢の影響により生存率や繁殖力が低下し、集団の絶滅の可能性が高まる<sup>1)</sup>。一方、遺伝的多様性の高い集団は環境が変化した場合に、新しい環境に適応できる可能性が高い。

種内の遺伝的多様性は、突然変異により遺伝系統が多様化してきた種内進化の歴史を反映している。突然変異遺伝子の頻度が集団中で増加すれば、新たな系統として種に存続しやすくなる。周辺からの個体の移入 (遺伝子流動) が強い地域では、系統間競争が激しくなり、突然変異遺伝子が地域内で生まれても次世代に残される可能性は低い。逆に、遺伝子流動が小さい地域では、新たに生まれた系統が地域固有の進化系統として存続しやすい。遺伝系統は生物の進化の歴史そのものとして捉えることができる<sup>2)</sup>。したがって、系統を守ることは、種を将来の絶滅から守るだけでなく、過去の種の歴史を守るということでもある。

渡辺ら<sup>3)</sup>は、宮城県内4流域内に生息する水生昆虫ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*)

の移動分散パターンをAmplified Fragments Length Polymorphism (AFLP) マーカーを用いて評価した。その結果、河道の上下流間で遺伝子流動が起りやすいが、源流域が遺伝的に孤立傾向にあることを発見した。しかし、AFLPマーカーはホモ個体 (例, AA, aa) とヘテロ個体 (Aa) を区別できない優性マーカーであり、対立遺伝子 (A, a) それぞれの進化系統を明らかにすることはできない。この欠点は、ミトコンドリアDNA (mtDNA) マーカーを用いることで補われる。mtDNAは母性遺伝をし、父親のmtDNAは次世代に関与しない遺伝様式をとるため、系統関係を再現するのに適している。また、mtDNAの塩基置換は一定の割合で起り、時間の経過とともに変異が蓄積されるため「分子時計」として機能する。この分子時計を用いると塩基置換の割合から、現在見られる遺伝系統がどのくらい前に共通祖先から分岐したのかを推定できる。そのため、mtDNAマーカーを用いることで種内進化の歴史的背景をより深く理解することができる。

上記背景のもと、本研究では、宮城県中南部地域および宮城県を除く近畿から東北にかけての本州6地点に分布するヒゲナガカワトビケラと近縁種の地域個体群を対象にmtDNAのcytochrome oxidase

subunit I (CO I) 領域のシーケンス解析を行った。解析結果より宮城県中南部地域および本州6地点に分布するヒゲナガカワトビケラ地域個体群の進化系統を把握し、種内の遺伝的多様性保全の観点から重要度の高い地域の存在を明らかにすることを目的とした。

## 2. 方法

### (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（以下、宮城）で互いに隣接する4水系（七北田川水系、名取川水系、増田川水系、五間堀川水系）の25地点で河川底生動物を採取した（図-1a）。4水系の中で最も流域面積が広い名取川水系（=939km<sup>2</sup>）は、幹川流路延長が55.0kmで、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。流域面積が二番目に大きな七北田川水系（=229km<sup>2</sup>）は奥羽山脈を源として太平洋まで流下する。他の2水系は、標高が比較的低い丘陵地を源としている。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、地理学および物理的環境変数の範囲は幅広い。

また、系統地理学的観点から宮城の地域集団を考察するために、宮城県を除く近畿から東北にかけての本州6地点（以下、本州6地点）でもサンプリングを行った（図-1b）。2003年10月に、北上川水系人首川（岩手県）、井田川水系野積川（富山）、利根川水系鮎川（群馬）、多摩川水系多摩川（東京）で、2008年1月に、淀川水系賀茂川（京都）で、2008年3月に、北上川水系本郷川（岩手）でそれぞれ1地点ずつから採取された。採取したサンプルは99.5%エタノールで保存した。

### (2) 対象種

ヒゲナガカワトビケラ幼虫は日本の河川に広く分布し、しばしば瀬における優占種となる。幼虫は礫間に分泌絹糸で作った巣網を張って営巣し、巣網にかかるセストンを摂食する。交尾後、多くの雌成虫は河川に沿って上流方向に3m/秒程度の速度で遡上し、上流で水中の礫に産卵する<sup>4), 5)</sup>。対象種は成虫の遡上飛行によって幼虫の流下が補われ、一定の分布域が保たれるコロニゼーションサイクル<sup>6), 7)</sup>を有する種として知られている。また、ヒゲナガカワトビケラの近縁種であるチャバネヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche sauteri*) を宮城県 St.11 から4個体採取し、比較対象として遺伝子解析した。

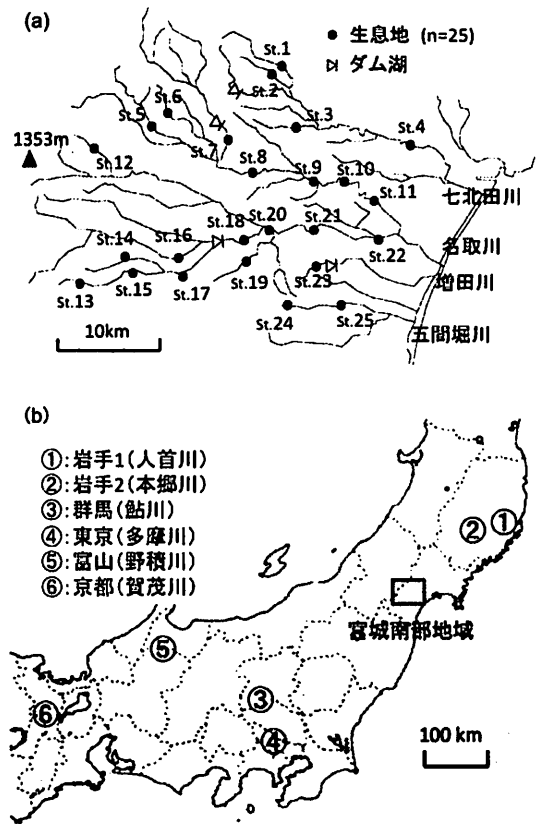


図-1 (a)宮城県中南部4水系の調査地点 (b)本州各地の調査地点

### (3) DNA 分析

各地点で採取した幼虫サンプル（平均=12.9個体/地点；表-1）からDNAをQIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kitsを用いて抽出した。その後、mtDNAのCOI領域を、LCO1490（5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'）とHCO2198（5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'）の2種類のユニバーサルプライマー<sup>8)</sup>を用いてPCR増幅した。PCR反応液は、濃度を5ng/μlに調整した鋳型DNAを1.0μl、Forward側プライマーおよびReverse側プライマー（1.0pM）をそれぞれ1.5μl、TaKaRa Taq<sup>TM</sup>を0.5μl、付属されている10×PCR Bufferを1.0μl、dNTP Mixtureを0.8μl、MgCl<sub>2</sub>を1.2μlに、滅菌水を合わせて10μlとした。PCR反応はVeritiサーマルサイクラー（ABI社製）で94℃を5分後、熱変性を94℃で30秒間、アニーリングを45℃で30秒間、伸長反応を72℃で1分間を1サイクルとして30サイクル行い、反応停止を68℃で5分間行った。PCR産物はアガロースゲル電気泳動でDNA断片がCO I 領域の塩基長（約720bp）

で増幅されていることを確認した。得られたDNA断片はGENECLEAN KIT (MP社) で精製した。

#### (4) データ解析

シーケンス解析は、北海道システム・サイエンス株式会社に委託し、ABI 3730xl DNA Analyzerで、Forward側およびReverse側双方向から塩基配列を解読した。シーケンス結果はCodonCode Aligner 2.0.6 (CodonCode Corporation) で塩基配列のアライメントを行い、ハプロタイプを検出した。解析には全個体で塩基配列が決定できた信頼できる領域を用いた。なお、シーケンス結果が不明瞭な個体は解析から除いた。その後、TCS version 1.21<sup>9)</sup>を用いて近縁種チャバネヒゲナガガワトビケラのシーケンスデータを加えたハプロタイプ・ネットワーク図を作成し、ハプロタイプをいくつかのクレードに分類した。また、Neiの遺伝距離を測度とするUPGMAによるクラスター解析をPhylip3.68<sup>10)</sup>のneighborおよびdrawgramで行い、地点間の遺伝系統図を作成した。Neiの遺伝距離は、地点1、地点2のハプロタイプ数をそれぞれ  $k, k'$ 、地点1の  $i$  番目のハプロタイプの出現頻度を  $x_{1i}$ 、 $i$  番目と  $j$  番目のハプロタイプの塩基置換数を  $\delta_{ij}$  とすると、

$$D = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{k'} x_{1i} x_{2j} \delta_{ij} \quad (2.1)$$

で定義される。各調査地点において各クレードの出現頻度を算出し (表-1)、各クレードの分布を宮城および本州各地の地図上に示した。

各集団内の遺伝的変異の程度を表す尺度として、平均ヌクレオチド多様度を使用した。ある遺伝子座における対立遺伝子  $i$  の頻度を  $p_i$ 、対立遺伝子の数を  $k$  とすると、ある遺伝子座におけるヌクレオチド多様度は

$$\hat{\pi} = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right) \quad (2.2)$$

で定義される。平均ヌクレオチド多様度  $\pi$  は、すべての遺伝子座にわたる  $\hat{\pi}$  の平均で与えられる。 $D$  および  $\pi$  の計算にはArlequin version 3.1<sup>11)</sup>を用いた。

宮城各地点の  $\pi$  および地点個体群内のClade2の割合(%Clade2) (図-2) と16の環境変数および個体群密度との相関関係をピアソンの積率相関係数の有意性検定で調べた。環境変数は地理的環境因子 (標高、河口からの距離、緯度、経度)、物理的環境因子 (河川次数、川幅、水深、流速、石礫の平均粒径、個体群密度)、水質指標 (BOD、SS、硝酸態窒素、リン酸態リン)、周辺の土地利用状況 (森林、農用地、建物・交通用地) からなる。

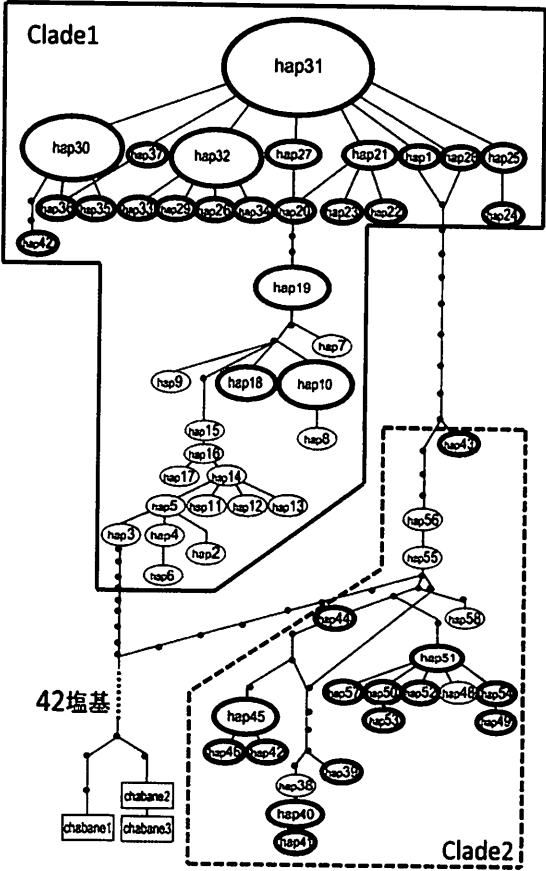


図-2 塩基置換数に基づいて作成したハプロタイプ・ネットワーク図。数字はハプロタイプ No.、楕円の大きさは各ハプロタイプの出現頻度、黒点は1塩基置換を表す。宮城で確認されたハプロタイプを太線の楕円で示した。四角で示した近縁種チャバネヒゲナガガワトビケラのハプロタイプは大きく離れた。

### 3. 結果

#### (1) ハプロタイプについて

解析した400個体から503bpのシーケンスデータが得られ、そのうち55bpが多型サイトであった。58種類の遺伝的ハプロタイプが検出され、そのうち宮城で確認されたハプロタイプは38種類であった。塩基置換数が5塩基以上離れた各ハプロタイプを遺伝的に区分すると、58種類のハプロタイプは2つのクレード (Clade1, Clade2) に分類された (図-2)。2つのクレードは503塩基のうち8塩基、つまり1.6%の塩基サイトで置換が生じていた。Gaunt<sup>12)</sup>は昆虫のCO I 領域の塩基置換が100万年に2.2%の塩基サイトで生じると結論づけた。これに基づいて計算した結果、2つのクレードは約70万年前に分岐した。

表-1 各地点個体群の Clade1 と Clade2 の個体数および平均ヌクレオチド多様度( $\pi$ )

| 調査地点  | 解析個体数 | Clade1の<br>個体数 | Clade2の<br>個体数 | %Clade2 | $\pi$  |
|-------|-------|----------------|----------------|---------|--------|
| St.1  | 12    | 12             | 0              | 0.00    | 0.0142 |
| St.2  | 16    | 1              | 15             | 0.94    | 0.0053 |
| St.3  | 12    | 10             | 2              | 0.17    | 0.0011 |
| St.4  | 17    | 16             | 1              | 0.06    | 0.0013 |
| St.5  | 9     | 6              | 3              | 0.33    | 0.0102 |
| St.6  | 18    | 7              | 11             | 0.61    | 0.0195 |
| St.7  | 4     | 4              | 0              | 0.00    | 0.0020 |
| St.8  | 2     | 2              | 0              | 0.00    | 0.0119 |
| St.9  | 15    | 15             | 0              | 0.00    | 0.0137 |
| St.10 | 14    | 13             | 1              | 0.07    | 0.0163 |
| St.11 | 13    | 13             | 0              | 0.00    | 0.0239 |
| St.12 | 19    | 3              | 16             | 0.84    | 0.0125 |
| St.13 | 3     | 3              | 0              | 0.00    | 0.0023 |
| St.14 | 13    | 3              | 10             | 0.77    | 0.0223 |
| St.15 | 19    | 17             | 2              | 0.11    | 0.0085 |
| St.16 | 2     | 2              | 0              | 0.00    | 0.0197 |
| St.17 | 9     | 8              | 1              | 0.11    | 0.0151 |
| St.18 | 10    | 7              | 3              | 0.30    | 0.0155 |
| St.19 | 17    | 14             | 3              | 0.18    | 0.0158 |
| St.20 | 13    | 10             | 3              | 0.23    | 0.0054 |
| St.21 | 13    | 10             | 3              | 0.23    | 0.0110 |
| St.22 | 16    | 12             | 4              | 0.25    | 0.0066 |
| St.23 | 14    | 14             | 0              | 0.00    | 0.0040 |
| St.24 | 12    | 12             | 0              | 0.00    | 0.0026 |
| St.25 | 7     | 7              | 0              | 0.00    | 0.0045 |
| 岩手1   | 20    | 16             | 4              | 0.20    | 0.0149 |
| 岩手2   | 12    | 11             | 1              | 0.08    | 0.0120 |
| 群馬    | 14    | 10             | 4              | 0.29    | 0.0071 |
| 東京    | 19    | 19             | 0              | 0.00    | 0.0074 |
| 富山    | 20    | 20             | 0              | 0.00    | 0.0204 |
| 京都    | 16    | 16             | 0              | 0.00    | 0.0090 |
| 計     | 400   | 313            | 87             | 0.22    | 0.0108 |

ことが推定された。また、ヒゲナガカワトビケラと近縁種チャバネヒゲナガカワトビケラのハプロタイプは系統樹上で大きく離れた。2種は約470万年前に種分化したと推定された。

## (2) 地点間の遺伝的類似性

各クレード頻度の分布図(図-3)から、Clade2の個体は宮城源流域(St.2, 6, 12, 14)に集中的に出現しており、宮城中・下流域や本州6地点ではほとんど出現しなかった。また、地点間の遺伝系統樹(図-4)より、宮城源流域と中・下流域の遺伝距離は、本州6地点と宮城中・下流域の遺伝距離よりも広がった。

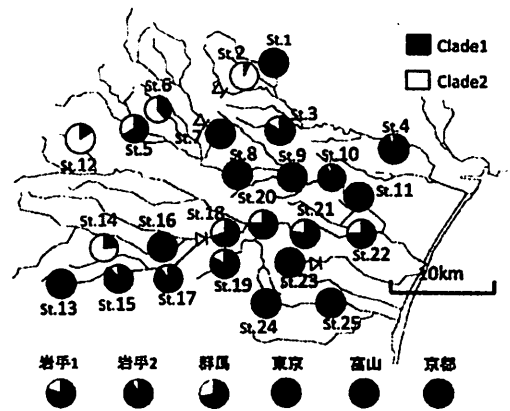


図-3 各クレードの分布地図

表-2 宮城県中南部調査地点(n=25)の地理的・物理的環境変数の範囲と平均ヌクレオチド多様度および Clade2 の割合とのピアソンの積率相関係数。\*\*は  $P<0.01$ , \*は  $P<0.05$  の有意水準で帰無仮説が棄却されたことを示す。

|         |                    | 単位    | 範囲              | $\pi$ との<br>相関係数 | P | %Clade2との<br>相関係数 | P  |
|---------|--------------------|-------|-----------------|------------------|---|-------------------|----|
| 地理的環境因子 | 標高                 | m     | 2 - 384         | 0.17             |   | 0.59              | ** |
|         | 河口からの距離            | km    | 8.0 - 46.5      | 0.09             |   | 0.51              | ** |
|         | 緯度                 | rad   | 0.6654 - 0.6699 | 0.00             |   | 0.34              |    |
|         | 経度                 | rad   | 2.4531 - 2.4592 | -0.22            |   | -0.42             | *  |
| 物理的環境因子 | 河川次数               | -     | 1 - 5           | 0.10             |   | -0.18             |    |
|         | 平均川幅               | m     | 1.2 - 38.8      | -0.03            |   | 0.17              |    |
|         | 平均水深               | cm    | 13.1 - 47.6     | -0.20            |   | -0.27             |    |
|         | 平均流速               | m/s   | 0.236 - 1.287   | -0.17            |   | -0.04             |    |
|         | 石礫の平均粒径            | cm    | 8.04 - 22.23    | 0.03             |   | -0.08             |    |
|         | 個体群密度              | ind./ | 0.3 - 55.6      | -0.10            |   | -0.36             |    |
| 水質      | BOD                | mg/L  | 0.04 - 2.39     | -0.09            |   | -0.24             |    |
|         | SS                 | mg/L  | 0.6 - 10        | -0.27            |   | -0.38             |    |
|         | NO <sub>x</sub> -N | mg/L  | 0.17 - 1.5      | -0.06            |   | -0.32             |    |
|         | PO <sub>4</sub> -P | mg/L  | 0.003 - 0.042   | -0.01            |   | -0.28             |    |
| 土地利用    | 森林                 | %     | 0 - 100         | 0.08             |   | 0.39              |    |
|         | 農用地                | %     | 0 - 100         | -0.11            |   | -0.29             |    |
|         | 建物・交通用地            | %     | 0 - 100         | -0.07            |   | -0.13             |    |

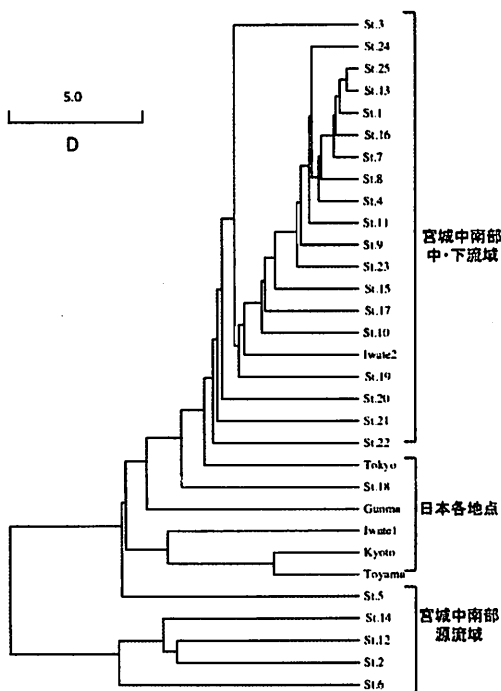


図-4 Neiの遺伝距離を測度とし UPGMA で作成した地点間(宮城 25 地点および本州 6 地点)の遺伝系統樹

### (3) 遺伝的多様性と環境変数

表-2に宮城各地点の $\pi$ および%Clade2と環境変数とのピアソンの積率相関係数を示した。 $\pi$ はいずれの環境変数および個体群密度とも有意な相関はなかった。 $\pi$ は、河口からの距離と有意な正の相関があった。また、%Clade2は標高、河口からの距離と有意な負の相関があり、宮城では西の調査地点ほどClade2個体の割合が大きいことが分かった。 $\pi$ は、河口からの距離と有意な負の相関があり、宮城では西の調査地点ほどClade2個体の割合が大きいことが分かった。 $\pi$ は、河口からの距離と有意な負の相関があり、宮城では西の調査地点ほどClade2個体の割合が大きいことが分かった。

## 4. 考察

### (1) ハプロタイプ

本研究で解析した400個体から58種類のハプロタイプが検出された。mtDNAのCOI領域を調べた他の水生昆虫では、オーストラリア南東部の*Cheumatopsyche* sp. 216個体から31種類<sup>13)</sup>、アメリカ西部の*Baetis bicaudatus* 238個体から24種類のハプロタイプを検出している<sup>14)</sup>。これら豪州と北米の先行研究の調査範囲の地理的規模は本研究と同程度であ

る。このことから考えると、ヒゲナガカワトビケラのハプロタイプの数は多く、遺伝的多様化が進んでいると考えられる。

地球の歴史を振り返ると、氷期と間氷期が約10万年周期で繰り返されており、氷期に多くの種が絶滅してきた。約2万年前の最終氷期に、アメリカ西部は現在の氷河地域のような気候であり<sup>15)</sup>、オーストラリア南西部は非常に乾燥していて植生相が減少した<sup>16)</sup>。しかし、日本列島は標高の高い地域を除き氷河化しなかった<sup>17)</sup>。そのため、日本の水生昆虫には長い進化時間があり、他地域の水生昆虫に比べて遺伝的多様性が高い可能性がある。また、日本の起伏に富んだ地形も遺伝的多様性を高める要因の一つと考えられる。2005年にコンサベーション・インターナショナルは、種多様性の面から日本列島を「生物多様性ホットスポット」として選定したが、日本は遺伝的多様性の面でも地球上のホットスポットになっている可能性がある。この検証が今後進むことが期待される。

集団サイズが小さいと突然変異が起こる個体が集団内に出現する確率が小さくなり、遺伝的多様化は起こりにくくなる。一方、集団サイズが大きい集団では突然変異が起こる個体が集団内に出現する確率が大きくなり、遺伝的多様化が起こりやすくなる。本研究においてClade1に比べてClade2の地理的な分布域は狭く限られており、集団サイズが少ないことが予想された。しかし、Clade2は個体数が少ないながらハプロタイプ数が比較的多く、クレード内での遺伝的変異が大きい(図-3)。したがって、Clade2はかつては個体数が多く分布していたが、何らかの要因により、現在は源流域を中心とする限られた生息地に残存していると考えられる。

### (2) 源流域の特殊な遺伝系統

一般的に遺伝距離と地理的距離は比例関係にある<sup>18)</sup>。地点間の遺伝系統樹(図-4)より、宮城源流域と中・下流域の遺伝距離は、本州6地点と宮城中・下流域の遺伝距離よりも広がった。よって、宮城源流域の地域個体群は極めて特殊な遺伝構造を有していることが分かった。宮城源流域にはClade2の個体は多く分布しているが、Clade1の個体は少ない。仮にこれら源流域でも周辺との交流が強く起きていれば、中・下流域に多く見られるClade1の個体も多く分布しているはずである。したがって、宮城源流域の地域個体群は周辺の個体群から遺伝的に孤立していると考えられる。また、%Clade2と河口からの距離および標高の相関関係から、源流に近い地域

個体群ほどClade2の個体が多く生息している傾向が明らかとなった。

古くは日本列島はユーラシア大陸東岸と地続きであり、鮮新世（500万～180万年前）に弧状列島としての形となったが、その後氷河期が終わる約1万3,000年前まで海水準が低下するなどして、大陸と陸続きになることがしばしばあったとされている。現在日本に分布している水生昆虫は、中国と日本列島が陸続きであった時期に現在のロシア沿海州および朝鮮半島を通じてそれぞれ日本に渡り、日本各地に拡大した可能性がある。ヒゲナガカワトビケラにもその現象が当てはまると仮定すると、Clade1の個体は朝鮮半島から日本列島に広まり、南から北へ拡大していき、逆にClade2の個体はロシア沿海州から日本列島に広まり、その後北から南へ拡大していったと推測することができる。Clade2の個体は北から拡大したため、調査地点の中で気温・水温の低い源流域において出現が確認された可能性がある。Clade2内のハプロタイプの多様さから、かつてはClade2の個体は北日本を中心に広く分布していたとすると、間氷期で気候が温暖になると共に、南に多く分布していたと思われるClade1の個体が宮城の中・下流域に拡大し、Clade2の個体は源流域に限定して生息するようになった可能性も考えられる。本研究は日本各地での調査地点が少なく、また、源流域の調査地点は宮城にしか含まれていない。今後、北海道や中国地方、九州などを含めた地点での、源流域～下流域の幅広い調査が望まれる。

### (3) 遺伝的多様性

平均ヌクレオチド多様度  $\pi$  はいずれの環境変数とも有意な相関はなかった(表-2)。ただし、遺伝的多様性の大きさは現在の遺伝子流動以外にも、様々な要因で決まる。源流の多様性が低下していないのは、過去の有効集団サイズの履歴、創始者効果などの可能性が考えられる。

種内の遺伝的多様性は、地点内の多様性と地点間の多様性から構成される。源流域のヒゲナガカワトビケラ地域個体群内の遺伝的多様性は高くなかった。しかし、源流域の地域個体群は中・下流域と大きく異なる遺伝構造を示しており、種内全体の遺伝的多様性を高めることに貢献していた。Hughes<sup>19)</sup>は、*C. zebra*などの多くの水生生物について、中・下流域に比べ源流域の方が遺伝的分化が大きいことを報告している。河川源流域が太古から孤立していたとすると、周辺に存在する他系統に淘汰されにくいため、源流域内で起きた系統分化が保存される可能性

が高まる。したがって、源流域が特異的な多くの系統で構成されたと考えられる。

### (4) 河川環境管理への応用

現在の宮城には、約70万年前に分岐して独自に進化してきたClade1とClade2のヒゲナガカワトビケラ個体が共存しており、地域全体の遺伝的多様性は非常に高く保たれている。この遺伝的多様性は数万年単位の遺伝的プロセスの結果である。この知見を数年～数十年単位で環境を変化させる河川環境管理に反映させる方策を考えることが重要である。数十万年かけて自然界で形成された遺伝構造は、数年の人間活動によって簡単に崩壊する可能性がある。地球温暖化による分布域の変化、ダムによる遺伝子流動が低下などが挙げられる。例えば、Watanabe<sup>20)</sup>らは湛水面積が異なる戦後に建設された6つのダム湖の上下流局所集団間の遺伝距離を調べ、湛水面積3.3km<sup>2</sup>以上の2つのダムで遺伝子流動が低下していることを報告している。遺伝的多様性を失うことは、数十万年の進化の歴史を失うことである。また、一度失った遺伝的多様性を回復させるのには、膨大な時間を要することになる。本研究では、Clade1の個体は主に中・下流の広域に、Clade2の個体は主に源流域に生息していることが分かった。流域全体の遺伝的多様性を保全するためには、現在個体数が少ないClade2の限られた生息環境を保全することが有効である。

## 5. おわりに

本研究は、宮城県中南部に生息分布するヒゲナガカワトビケラ地域個体群の遺伝的多様性保全の観点から重要度の高い地域を特定することを目的として、mtDNAのCO I 領域のシーケンス解析を行った。以下に、本研究で得られた主な成果をまとめる。

- 1) 解析した400個体から得たシーケンスデータから58種類の遺伝的ハプロタイプを検出した。58ハプロタイプは約70万年前に分岐したと推定される2つのクレード（Clade1, Clade2）に分類された。
- 2) Clade2の個体は宮城県中南部源流域に多く分布していたが、宮城県中南部中・下流域や本州各地の調査地点にはほとんど分布していなかった。Clade2の個体はClade1の個体に比べ現在個体数が少なく、また、出現地点が源流域に集中的に分布していた。
- 3) 源流域の地域個体群は地域個体群内の多様性は

高くはないが、地点間の多様性を増大させることで、宮城県中南部地域全体の多様性の増大に大きく貢献していた。

**謝辞：**本研究の一部は、国土交通省建設技術研究開発補助金、科学研究費補助金（基盤研究A、特別研究員奨励費）、（財）河川環境管理財団（河川整備基金）、日本学術振興会（海外特別研究員制度）から資金的援助を受けた。また、一部は文部科学省の科学技術振興調整費戦略的研究拠点育成事業「サステナビリティ学連携研究機構構想」の一環で実施した。ここに記して謝意を表します。

## 参考文献

- 1) Allendorf, F. and Leary, R. F. : Heterozygosity and fitness in natural populations of animals, in "The Science of Scarcity and Diversity", Sinauer Associates, Massachusetts, 57-76, 1986.
- 2) Felix, F., Richard, G., Mathieu, R., Jonathan, D., Richard M., Daniel, P. F., Andrew B., John C. M., Serban, P., Michelle, B., Gail, R., Terry A. J. H., and Vincent S.: Preserving the evolutionary potential of floras in biodiversity hotspots. *Nature* 445, 757-760, 2007.
- 3) 渡辺幸三, 八重樫咲子, 菊池裕二, 竹門康弘, 風間聡, 大村達夫 : DNA 多型マーカーによるヒゲナガカワトビケラの流域内移動分散パターンの評価。水環境学会誌, 投稿中
- 4) Nishimura, N.: Ecological studies on the net-spinning caddisfly, *Stenopsyche griseipennis* McLachlan II. Upstream-migration and determination of flight distance. *Mushi* 40, 39-46, 1967.
- 5) 青谷晃吉, 横山宜雄 : 東北地方におけるヒゲナガカワトビケラ属 2 種の生活環について。日本陸水学会誌 48, 41-53, 1987.
- 6) Waters, T. F.: Interpretation of invertebrate drift in stream. *Ecology* 46, 327-334, 1965.
- 7) Muller, K. : The colonization cycle of freshwater insects. *Oecologia* 52, 202-207, 1982.
- 8) Folmer, O., Black, M., Hoch, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R.: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294-299, 1994.
- 9) Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.: TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 4, 4407-4418, 2000.
- 10) Felsenstein, J. : Phylip N Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5, 164-166, 1989.
- 11) Laurent, E., Guillaume, L., and Stefan, S.: Arlequin ver 3.1: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis, Computational and Molecular Population genetics Lab, University of Berne, Switzerland, 2006.
- 12) Gaunt M. & Miles M. : An insect molecular clock dates the origin of insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 748-761, 2002.
- 13) Baker, A. M., S. A. Williams, and J. M. Hughes.: Patterns of spatial genetic structuring in a hydropsychid caddisfly (*Cheumatopsyche* sp. AVI) from southeastern Australia. *Molecular Ecology*, 12, 3313-3324, 2003.
- 14) Hughes, J.M., P. B. Mather, M. J. Hillyer, C. Cleary, Genetic structure in a montane mayfly *Baetis bicaudatus* (*Ephemeroptera: Baetidae*), from the Rocky Mountains, Colorado, *Freshwater Biology*, 48, 2149-2162, 2003.
- 15) Brocklehurst, S. M., Whipple, K. X., and Foster, D. : Ice thickness and topographic relief in glaciated landscapes of the western USA, *Geomorphology* 97, 35-51, 2008.
- 16) Petherick, L., McGowan, H., Moss, P. : Climate variability during the Last Glacial Maximum in eastern Australia: evidence of two stadials?, *JOURNAL OF QUATERNARY SCIENCE* 23, 787-802, 2008.
- 17) Nakagawa, T., Kitagawa, H., Yasuda, Y., Tarasov, P. E., Nishida, K., Gotanda, K., Sawai, Y., Yangtze River Civilization Program Members : Asynchronous Climate Changes in the North Atlantic and Japan During the Last Termination, *Science* 31, 688-691, 2003.
- 18) McPhee, M. V., Utter, F., Stanford, J. A., Kuzishchin, K. V., Savvaitova, K. A., Pavlov, D. S., Allendorf, F. W.: Population structure and partial anadromy in *Oncorhynchus mykiss* from Kamchatka: relevance for conservation strategies around the Pacific Rim, *Ecology of Freshwater Fish* 16, 539-547, 2007.
- 19) Hughes, J. M.: Constraints on recovery: using molecular methods to study connectivity of aquatic biota in rivers and streams. *Freshwater Biology* 52, 616-631, 2007.
- 20) Watanabe, K., Omura, T.: Relationship between reservoir size and genetic differentiation of the caddisfly *Stenopsyche marmorata*, *Biological Conservation* 136, 203-211, 2007.

(2009.05.22 受付)

Evaluation of Genetic diversity of *Stenopsyche marmorata* (Stenopsychae,  
Stenopsychidae) populations based on the evolutionary lineages

Shoichi SUZUKI<sup>1</sup>, Kozo WATANABE<sup>2</sup>, Sakiko YAEGASHI<sup>1</sup> and Tatsuo OMURA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University

<sup>2</sup>Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries

We investigated genetic structures of *Stenopsyche marmorata* populations in South-Central area in Miyagi Prefecture and several localities distributed throughout the Japanese mainland based on nucleotide sequence analysis of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI). As a result, 58 haplotypes were identified from 400 analyzed individuals. The 58 haplotypes were classified into 2 clades (Clade1 and 2), which are estimated to be diversified *ca* 300 thousand years ago. Most of individuals in Clade2 were observed in headwater areas. They may spread to the Japanese islands from the northern area in the last interglacial stage, and presently remain limited headwater areas. The headwater populations highly contributed to sustain high total genetic diversity of *S. marmorata* population by increasing turnover variation among sites. Our data suggests the importance of conservation of the headwater populations.