

マイクロサテライトDNAを用いた長良川中流域におけるホトケドジョウ集団の遺伝的構造特性

和田 清¹・藤井 貴洋²・小出水 規行³・寺町 茂⁴

¹正会員（独）国立高専機構 岐阜工業高等専門学校 教授（〒501-0495 岐阜県本巣市上真桑2236-2）
E-mail:wada@gifu-nct.ac.jp

²学生会員（独）国立高専機構 岐阜工業高等専門学校 専攻科（〒501-0495 岐阜県本巣市上真桑2236-2）
E-mail:2009k06@edu.gifu-nct.ac.jp

³正会員（独）農研機構 農村工学研究所農村環境部生態工学研究室（〒305-8609 つくば市観音台2-1-6）
E-mail:koizumin@affrc.go.jp

⁴非会員 水圏域環境研究会（〒501-0417 岐阜県本巣市屋井936-1）

本研究は、マイクロサテライトDNAを用いて、長良川中流域に生息する絶滅危惧種IB 類のホトケドジョウ集団の遺伝解析を行い、個体群間の遺伝子交流の実態を明らかにし、さらに、遺伝的多様性の簡易的な予測シミュレーションを行い、数十世代後の個体群存続性について検討したものである。得られた結論は以下のものである。対象流域において、遺伝子多型が確認されるとともに地点によってヘテロ接合度が低い傾向にあることから、遺伝的劣化に差異が生じていること、遺伝的分化は流域間で偏りが大きいことなどが明らかとなった。さらに、遺伝的多様性の予測結果では、個体数、対立遺伝子数や初期ヘテロ接合度によって集団の存続性が大きく支配され、遺伝的に劣化する世代数は早いもので平均15±標準偏差10世代となるなど、集団の存続・健全性を簡易的に診断する方法が示された。

Key Words : micro satellite DNA, Japanese eight-barbel loach, genetic diversity, habitat

1. はじめに

本研究で対象とするホトケドジョウは、青森県・中国地方西部を除く本州、四国東部に分布する日本固有種の小型魚類である。その多くは、湧水のように水が清澄で冷たく、流れの緩やかな砂泥底で、水草や石など障害物のある場所に生息している。環境省のレッドリスト絶滅危惧種 IB 類、岐阜県のレッドリストでも絶滅危惧種 II 類に指定され、近い将来絶滅の危険性が高い、あるいは絶滅の危険性が增大している野生生物であり、水域環境の指標や事業での保全対象となりやすいなりやすい種である。濃尾平野の湧水源周辺や溜まり、丘陵の低山帯の山際を流れる水草の繁茂した水路などにホトケドジョウの生息を確認することができる。

マイクロサテライトとは生物細胞核上に存在する数塩基（CA_nGT など）の単位配列の繰り返しからなるものである。この繰り返し領域は遺伝子座と呼ばれ DNA 上に多数存在し、個体によって反復回数が異なることから多型を生じている。このマイクロサテライト多型は種内

の系統関係や個体群間の血縁関係を調べる上で、分子生態学など様々な研究分野に幅広く利用されている¹⁾。また、ミトコンドリア DNA 解析と比較して、日本の淡水魚類におけるマイクロサテライト DNA 解析の研究事例は少ない傾向にある。その一つの理由が、マイクロサテライト DNA のプライマーが一般に種特異的なためである²⁾。しかしながら、淡水魚類で開発されたマイクロサテライト DNA（遺伝子座）のプライマーについては、ウナギ、シロザケ、アユ等が挙げられ、最近ではドジョウ、貴重種トミヨ属雄物型等の水田水域の魚類についても開発が進んでいる。また、集団保全の観点から取り組んだ研究については、イワナやドジョウの事例³⁾⁴⁾などがある。

希少種ホトケドジョウの保全をするためには、生息個体数の実態把握に加えて、DNA から得られる遺伝的情報を加味することによって、対象生物の個体群の遺伝的多様性の評価、将来的な存続性までも予測可能であり、生態学的な保全目標をより明確に設定することが可能になる。一方、長良川中流域に生息するホトケドジョウに

対しては、DNA 等を用いた遺伝特性の解明について取り組まれた事例はきわめて少なく、現存している集団の遺伝的多様性や血縁関係などの集団間の遺伝的変異特性が未知である。したがって、希少性の高いホトケドジョウにとって生息量の減少に伴った近親交配の増加や移動経路の阻害による遺伝的ネットワークの分断化が進む可能性も考えられ将来的な存続性が懸念されている。

以上のような背景を踏まえて、世代を越えた移動の過去の履歴から魚類の遺伝的劣化、分化状況が把握できるマイクロサテライト DNA を絶滅危惧種ホトケドジョウに適用し、長良川中流域の集団の予備的な遺伝解析を行う。得られた結果と長良川中流域のネットワークとの関連性を比較検討することで、個体群間の遺伝子交流の実態を明らかにするとともに、生息量の減少に伴う近親交配の多発化、移動経路の阻害による集団の分断化を評価する。また、DNA 情報を活用して、世代ごとに対立遺伝子の任意抽出を考慮したヘテロ接合度の変動について簡易的なシミュレーションを行い、数十世代後の集団の存続性を検討する。



図-1 長良川中流域における分析サンプルの採捕地点

2. 現地調査および分析・解析方法

(1) 現地調査

図-1 に示したように、長良川中流域（伊自良川・石田川・山田川などの支川）における 35 地点のホトケドジョウ個体群（各地点 6～46 個体、体長：平均 $52 \pm$ 標準偏差 2.6cm 、2009 年 5～7 月に採捕）を調査対象とした。1 地点につき無作為に抽出した 5 個体の採取サンプルは、その場で 95% 以上のエタノールで固定し冷蔵保管し、尾鰭標本を DNA 分析に使用した。同一地点複数個体を基本としてタモ網を用いたホトケドジョウ採捕と環境因子調査（水温、水位、植生など）、水理構造物の特性（落差、流速など）などを把握した。なお、水温計測には水中用データロガーを数カ所現地に設置した。

(2) 分析方法

マイクロサテライト DNA 分析では、分析対象ごとに遺伝子座の特定配列を増幅させるためのプライマーと呼ばれる遺伝子の特定配列を増幅する合成 DNA の開発が必要となる。本研究の対象魚種であるホトケドジョウにおいては、日本データバンクにて検索したマイクロサテライト領域を含む塩基配列 Lccl1-Lccl9 の 19 遺伝子座が存在する。そこで、19 遺伝子座の中から 11 遺伝子座を候補に予備分析を行い、本研究に適した遺伝子座の選定を行った。選択対象とした 11 遺伝子座ごとに比較的距離の離れた数地点で採取したサンプルを用いて PCR 処理を行い、PCR 増幅産物をオートシーケンサーにより電気泳動し、解析ソフトによって塩基長を測定した。塩

基長とは部分的に増やした指標となる遺伝子断片の長さである。この結果をもとに対立遺伝子数が比較的多く現れるプライマーについて検討し、11 遺伝子座から 4 遺伝子座に絞り込んで全体の分析を行った。

本解析では、サンプル個体からの DNA 抽出に 3～5 mm 四方の尾ヒレ切片を用いた。DNA 抽出には市販キット（QIAGEN 製）を利用して、1 個体あたり $2 \sim 5 \mu\text{g}$ の DNA を抽出した。設計された蛍光プライマー（遺伝子の特定配列を増幅させるための合成 DNA）を利用した。PCR 増幅ではプライマーである 20～30 塩基の 2 種類の 1 本鎖 DNA、dNTP、DNA ポリメラーゼ（酵素）、基（鋳型）になるサンプル個体の DNA、反応を促進させるバッファーを用い、1 個体あたりの試薬組成を $10 \mu\text{l}$ 系とした。増幅反応はサーマルサイクラー機器を用い、本解析では反応条件として、初期熱変性後（ 94°C ：2 分）、3 段階のサイクル 50 回後、最終伸張（ 72°C ：30 分）を適用した。一連の PCR 増幅反応は約 2～3 時間で終了する。生成された増幅副産物は、配列の塩基を読み取るための PCR 試薬に反応させ、反応後の産物をさらに精製する。

一般にマイクロサテライト遺伝子座の塩基配列は繰り返しの部分が異なるだけで、それ以外の塩基に個体差はないとされている⁹⁾。このことから、生成された PCR 増幅産物については塩基数の計測（フラグメント解析）だけでよく、ミトコンドリア DNA 解析のように一つ一つの塩基を読み取る必要はない。

増幅産物の塩基数の計測は、オートシーケンサーによって電気泳動した。副産物に塩基数がわかっているサイズスタンダードと呼ばれる計測試薬を加えて、熱変性し

たものを試料とする。増幅産物には蛍光色素が付いているために、色の異なる産物を一纏めにして複数産物の同時計測が可能である。一方、シーケンサーからの出力データは蛍光色素のシグナル強度（増幅産物量に相当）を読み取った波形グラフである。塩基数の決定には、フラグメント解析ソフトを用いて塩基長（部分的に増やした指標となる遺伝子断片の長さであり、これを用いて反復回数の多型を推定する）を用いた。それによって得られた塩基数が解析個体の対立遺伝子となる。ここで、1個体について2つの塩基数が決定された遺伝子型はヘテロ接合、1つの場合はホモ接合となり、遺伝的多様性の判断基準となる。なお、オートシーケンサー以降の分析は農村工学研究所において実施した。

(3) 解析方法

a) ヘテロ接合度

本研究では、簡便かつ汎用性の高いヘテロ接合度について、各支川の採捕地点の値を蛍光プライマー別に算出した。ヘテロ接合は核 DNA における同一遺伝子座の対立遺伝子（塩基数や配列）が異なっている状態、ホモ接合は対立遺伝子が同じ状態を示す。一般に、健全な遺伝的特性を示す生物集団ではヘテロ接合となる確率が、遺伝的多様性が失われた集団では、ホモ接合の生じる確率が高くなることが知られている⁷⁾。

ヘテロ接合度は、遺伝子座におけるヘテロ接合型の遺伝子型頻度に相当し、遺伝子多様度のひとつとして利用され0-1の値をとる。ヘテロ接合度には観察値 H_o と期待値 H_e の2種類がある。 H_o はすべての個体数 N において、実際にヘテロ接合している個体数 n の割合を式 (1) で算出したものである。一方、 H_e は対立遺伝子 i の頻度 p_i を計算し、式 (2) によって得られる⁸⁾。

$$H_o = \frac{n}{N} \quad (1)$$

$$H_e = \frac{2N(1 - \sum p_i^2)}{2N - 1} \quad (2)$$

H_e はすべての個体の対立遺伝子 (2N 個) から、任意に2つを抽出した場合のヘテロ接合となる確率に等しい。この確率は集団における個体が偏りなく任意交配しているときの値となる。 H_o と H_e を比較して $H_o \approx H_e$ となる場合、その集団には「Hardy-Weinberg 平衡 (メンデル遺伝)」にしたがって任意交配が仮定される。 $H_o < H_e$ の場合は、集団に近親交配や分断化が生じていると想定される。 H_o と H_e の差が極端に大きい場合は近親交配による遺伝的多様性の損失として、集団の存続が懸念されるようになる。なお、 $H_o > H_e$ の場合の理論的見解はないようであり、解析における計測ミスの可能性が高くデータを再チェックする必要がある。

b) 遺伝的分化指数

対立遺伝子数やヘテロ接合度は1つの集団についてのパラメータである。複数の集団間の遺伝的違い (分化) については、各集団に Hardy-Weinberg 平衡を仮定した上で、遺伝的分化指数 F_{ST} を計算できる。 F_{ST} の値は、1 (完全分化) - 0 (非分化/同一) の範囲である。 F_{ST} の計算式は式 (3) が適用される。

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T} \quad (3)$$

ここで、 H_S は各集団のヘテロ接合度の期待値の平均、 H_T は全集団のヘテロ接合度の期待値である。一般に、 F_{ST} は0-0.05で分化なし、0.05-0.15で中程度、0.15-0.25で高度、0.25以上できわめて高度に分化しているとみなされ⁹⁾、本研究においても概ねその判断基準を採用した。

3. 結果および考察

(1) 各地点におけるヘテロ接合度

対象とした長良川支川 (長良川: 水路網 F, H, 山田川: G, O, 石田川: A, D, K, T, 伊自良川: B, I, Sh, SS) におけるホトケドジョウ個体群のヘテロ接合度 H_o (観察値) と H_e (期待値) を求めた。なお、サンプル数が少ない地点データは解析対象からは除外し、水路網において5個体以上採捕された地点のデータ (水路網 D, H, K, T, O, I, Sh: 7グループ) を使用した。

本解析では、対立遺伝子数、ヘテロ接合度の観察値 H_o と期待値 H_e を推定し、各採捕地点におけるサンプル内の遺伝的多様性について検討した。解析の結果、すべてのプライマーの遺伝子座において多型が出現し、対象地点全体で1.5-4の対立遺伝子数が確認された。全水路網における平均ヘテロ接合度は、観察値 H_o が0.113-0.650 (期待値 H_e : 0.202-0.560) であった。また、Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱 (H_o と H_e の有意差検定) については、すべてのサンプルについて H_o と H_e の間に有意な差は見られなかった ($p > 0.05$)。このことから、どのサンプルにも交配の任意性が仮定され、引き続き遺伝的分化の解析にすべて利用できることが確認され、遺伝子座から検出することはなかった。

図-2は、4種類のマーカーごとに各採捕地点のヘテロ接合度とその平均値で示したものである。同図から、ヘテロ接合度の期待値 H_e について、全体の平均値 ($H_e = 0.368$) 以下の地点は、D1, D2, H3, K2, K3, K4, O7, Sh1, Sh2, T4の10地点である。その中でも、特に値が小さかったのは、D1, H3, Sh1の3地点であった。これらの要因としては、採捕地点が流域の最上流端で生息場が狭く個体が新たに加わることが少ない地点、他の地点と分断した場所であり流域的に孤立している地点などから、ホトケドジョウ

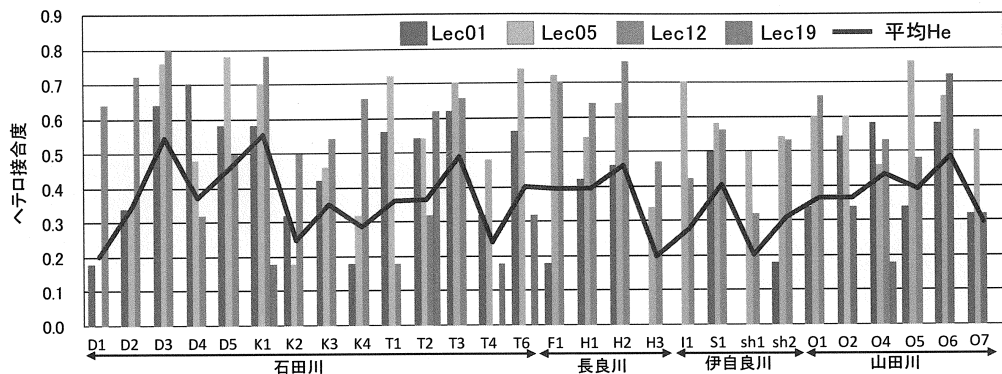


図2 長良川支川のヘテロ接合度の分布 (期待値 H_e と各マーカの平均値)

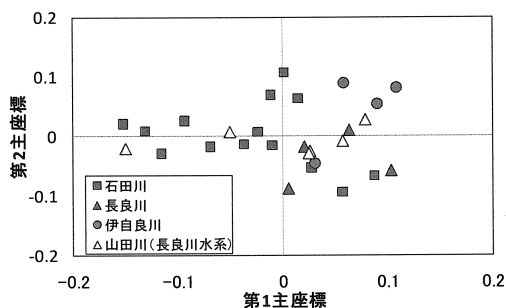


図3 主座標分析による遺伝的分化

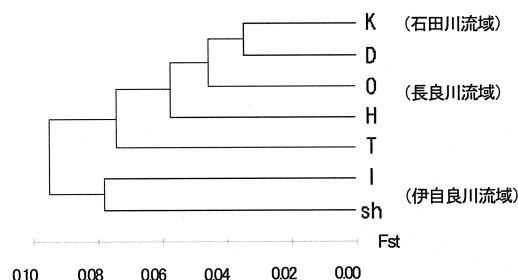


図4 遺伝的分化尺度のクラスター分析 (近接接合法)

の生息空間や移動に制限を受けており、遺伝的多様性が失われ近親交配が多発している可能性が示唆される。

(2) 主座標分析による遺伝的分化

ホトケドジョウ集団が遺伝的に分化あるいは同一であるかを判定するために、各水路網の地点において個体群間の遺伝的分化指数 F_{ST} と遺伝的分化状況(+: 分化, -: 同一)を算出した。なお、一般に、 F_{ST} は0~0.05で分化なしと判定される。その結果は、集団間における遺伝的分化の尺度は0.043(集団間K1~O6)~0.526(Sh2~K2)の範囲で分化していること、主座標分析による遺伝的分化の分布状況から、分散が大きく多くの集団間で分化していることなどが確認されている。この各個体群間の遺伝的分化を類似度行列として、水路網間の遺伝的分化を主座標分析により可視化したものが図-3である。同図より、全水路網の遺伝的分化状況には水系によって遺伝的差異が認められる。遺伝的分化の尺度を水路網ごとについてみると以下のようなものである。長良川 (F, H) では平均0.0212、伊自良川 (I, SS, Sh) では平均0.193、石田川 (D, K, T) では平均0.183、山田川 (O) では平均0.204であった。また分布状況は水系ごとに遺伝的特徴は異なり、遺伝的分化は流域間で大きくなる傾向がある。さらに、図-4は水路網のグループにおける遺伝的分化尺度を用いてクラ

スター分析 (近隣接合法) を行い、 F_{ST} の系統樹として可視化したものである。同図から、ほぼ小流域ごとにグルーピングされ、遺伝的分化は流域間で大きくなる傾向を示している。

(3) 対立遺伝子の変動を考慮したヘテロ接合度

ホトケドジョウの理想的な集団におけるヘテロ接合度の世代間の関係は数学的理論によって表されることが知られている⁸⁾。しかしながら、集団における対立遺伝子の変動までは考慮されていない。以下では、集団内の世代交代において、繁殖にともない対立遺伝子が任意抽出され遺伝子型によってヘテロ接合度が異なることを考慮し、世代ごとに対立遺伝子の任意抽出を組み込んだ遺伝的多様性予測シミュレーションを行った。

基本的な手順は以下のようなものである⁸⁾。ホトケドジョウの繁殖は雌1個体に雄2~3個体が追尾して行われ、雌は1シーズンに5~6回産卵すること、計算過程を簡略化できる等という条件で、対立遺伝子の任意抽出は重複してもよいものとして予測を行った。たとえば、個体数が20、対立遺伝子が4種類の集団を対象とした場合：

- ① 第1世代の個体1~20 (対立遺伝子1~40) について、対立遺伝子A1~A4各10コピーを任意に割り振る。

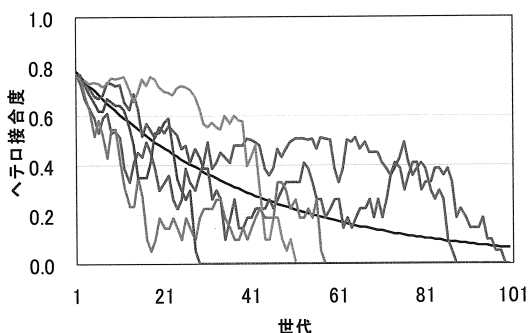


図-5 ヘテロ接合度のシミュレーション結果の一例
(個体数 20, 対立遺伝子数 4)

- ② 1~40の乱数を発生させ、その番号に対応する初
- ③ 代の対立遺伝子コピーを置換する。
- ④ 第2世代の対立遺伝子が得られる。この作業を
100世代まで繰り返す。

交流や変動がないという仮定を用いているので、対立遺伝子が減少すれば、再び増加することではなく減少するものとした。また、母集団の個体数の推定は容易ではないので、採捕数に比例すると考えてその係数を変数とした。さらに、現状の多様性を考慮して、ある個体数以下では交配できないという交配可能な個体数に限界値を定めるなど、いくつかの仮定を設定した。すなわち、

- ・対立遺伝子が全体の2割以下となるとその種は消滅
- ・ヘテロ接合度が0.1以下では次世代で完全に同化することとした。

図-5は、仮想的に対立遺伝子が4種類、個体数が20の場合 (P4N20) についてヘテロ接合度の100世代間の予測を5回繰り返した結果である。なお、ヘテロ接合度の初期値は0.8、図中の太線は個体数が一定かつ個体数の移動のない理想集団におけるヘテロ接合度の変化を示したものである。同図から、理想集団のヘテロ接合度は世代とともに減少すること、対立遺伝子が変動する場合には、その太線を挟んで大きく変動し、やがてヘテロ接合度の値がほぼ0に達することなどがわかる。この時点では、遺伝的多様性は失われ、すべての個体が遺伝的に単一となったことを意味している。さらに、対立遺伝子数 (P=4) は同じで、個体数を2倍に増加させた場合 (P4N40)、個体数が少ないP4N20の方がP4N40よりも早期にヘテロ接合度が0に達する同一化傾向が見られた。このことから、対立遺伝子が同じであれば、繁殖個体の母集団を増加させることが遺伝的劣化の遅延に繋がると考えられる。一方、個体数 (N=30) は同じで対立遺伝子数を増加させた場合 (P4N30とP6N30) では、対立遺伝子数が少ないP4N30の方がP6N30よりも早期にヘテロ接合度が0となる同一化傾向が見られた。これは、複数の集団間で個体群を交流させることで対立遺伝子数の増

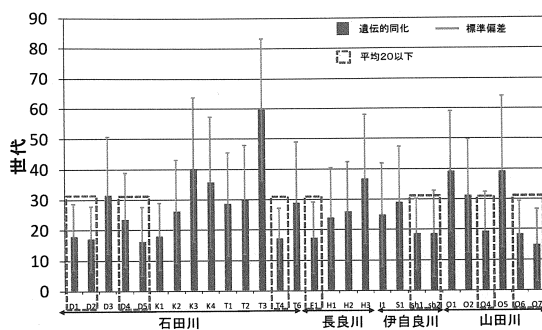


図-6 同化した世代に達する予測シミュレーション
(現地解析データ：ヘテロ接合度，母集団の推定)

加につながり、遺伝的劣化の遅延が可能になる。

図-6は現地調査で得られた解析結果を用いて、ヘテロ接合度の値がほぼ0に達した同化世代数を各水系ごとに示したものである。ただし、母集団の推定は採捕数に比例する任意の係数を変数としている。同図から、変動は大きい各流域の対象地点のホトケドジョウは、平均世代数15~60で遺伝的同化となること、早期に遺伝的に同一となった地点は、母集団の個体数と対立遺伝子数が少ない場合に出現することなどがわかり、現地データにおいても生息数が少なく遺伝的多様性が低い集団ほど、早期にヘテロ接合度が低下することが示された。個体数を増加させるためには、まず生存率を高めるために、餌料生物・水質・生息空間に関して、個体数が増加しても十分に生息していける環境条件を確保する必要がある。また、複数の集団間で個体群を交流させて対立遺伝子数を増加するためには、環境配慮型水路・魚道等のネットワーク工法を整備する生態系保全技術が必要であると考えられる。

さらに、図中の破線枠で示したように、平均世代数が20世代以下と他の地点に比べ早期に遺伝的同化する地点 (D1, D2 などの11地点) が特定された。その中で最も低い平均世代であった地点はO7であり、平均15世代で変動を考慮すると10世代以下で遺伝的同化となる可能性が示唆される。したがって、このような遺伝的多様性が失われ生息場を優先的に保全・回復・強化すべき地点の選定に有効な手段であると考えられる。

4. おわりに

以上のように、絶滅危惧種ホトケドジョウを対象にマイクロサテライトDNAを用いて、世代を越えた移動の履歴から遺伝的劣化、分化状況の観点から把握した。さらに、DNA情報を活用して世代ごとに対立遺伝子の任意抽出を考慮したヘテロ接合度の変動について簡易的なシミュレーションを行い、数十世代後の集団の存続性を

検討した。限られたサンプル数であるが、本研究で得られた結果は以下のである。

- 1) 調査対象地点に生息するホトケドジョウにおいて、19 遺伝子座中の 4 遺伝子座が DNA 分析に適用され、遺伝子座の塩基長について、同一種であっても多型であることが確認でき、個々の遺伝特性を把握するための解析に利用することができる。
- 2) 各標本の 1 遺伝子座あたり平均対立遺伝子は 1.5~4.0、ヘテロ接合度の観察値は 0.0202~0.560 (期待値は同程度)となり、遺伝子多型が確認されるとともに、各地点において遺伝的多様性の劣化に差異がみられた。
- 3) 標本集団間における遺伝的分化の尺度 F_{st} は 0.043~0.526 の範囲であり、クラスター分析、主座標分析により、遺伝的分化は流域間で偏りが大きいことなどが明らかとなった。
- 4) 遺伝的多様性の予測結果では、個体数、対立遺伝子数や初期ヘテロ接合度によって集団の存続性が大きく支配され、遺伝的に劣化する世代数は早いもので、平均 $15 \pm$ 標準偏差 10 となり、集団の存続・健全性を簡易的に診断する方法が示された。

ネットワーク工法の支援は遺伝的多様性の維持に貢献し、その効果目標値としてパラメータを設定できるので、本研究のようなアプローチは、集団の持続可能性を診断する有効なツールとして利用でき一端が示された。

今後は、DNA 解析による生物集団の遺伝的特性を解明するとともに、このような遺伝的分化が将来的な集団

の存続にどのように関わってくるのか、それを予測可能とする詳細なシミュレーション解析を進める予定である。

謝辞：現地調査の遂行に際しては、水圏域環境研究会の会員各位（本田 浩昭氏、西村 美信氏）に多大な協力をいただいた。最後に記して謝意を表する。

参考文献

- 1) 楠田尚史，小野山敬一，紺野康夫：応用個体群生態学，263p.，文一総合出版，2002。
- 2) 種植物学会編：森の分子生態学，pp.110-119，文一総合出版，2001。
- 3) 青木 宙，隆島史生，平野哲也：魚類の DNA，3p.，恒星社厚生閣，1997。
- 4) 小出水規行，村岡敏子，竹村武士，奥島修二：マイクロサテライト DNA を用いた農業排水路におけるドジョウ個体群の遺伝的特性の予備的検討，pp.133-134，農業土木学会論文集，No.233，2004。
- 5) 小出水規行，渡部恵司，高振麗，水谷正一，森 淳，竹村武士：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遺伝解析，pp.724-725，農業農村工学会講演要旨集，2008。
- 6) 向井輝美，石和貞夫：集団遺伝学入門，254p.，培風館，1987。
- 7) 根井正利，S.クマー：分子進化と分子系統学，246p.，培風館，2006。
- 8) 水谷正一，森 淳編著：春の小川の淡水魚-その生息場と保全-，DNA 解析からみた淡水魚とその保全（分担執筆），pp.121-148，学報社，2009。

GENETIC STRUCTURE OF THE JAPANESE EIGHT-BARBEL LOACH IN THE MIDDLE BASIN OF NAGARA RIVER : PRELIMINARY ANALYSIS USING MICRO SATELLITE DNA MARKERS

Kiyoshi WADA, Takahiro FUJII, Noriyuki KOIZUMI and Shigeru TEREMACHI

In this research, the past record of movement over the generations of Japanese eight-barbel loach (*lefua echigonia*) was formed by understanding its genetic characteristics using microsatellite DNA. This research investigated the trend of genetic diversity in living thing group as a utility of DNA information by simulations, and discussed the possibility of continuity between generations. The research area was the middle Nagara River basin in Gifu City. The gene polymorphism was confirmed from the calculation of the heterozygosity by the analyses of DNA, genetic diversity and genetic differentiation. It was admitted that the genetic diversity was different in each point. The difference in genetic characteristics for each river was found out of the analysis of genetic differentiation. In addition, a geographic distance influences the genetic differentiation between rivers. It was understood from calculation of genetic diversity, there was a possibility that the heterozygosity decreases in an early generation when the population was smaller and not genetically diverse. Because the genetic characteristics can be identified with genetic analyses, their results can be used to select the area that should be maintained on a priority basis.