

信州大学審査学位論文

ハビタット・ジェネラリスト種における

系統地理・進化生態学的研究

—チラカゲロウの隠れた遺伝的多様性とその分布特性—

2016年3月

斎藤 梨絵

目次

緒論	3
----	---

第 I 章 東アジア地域に分布するチラカゲロウ類の系統関係

I-1. はじめに	9
I-2. 材料と方法	10
I-3. 結果	13
I-4. 考察	17
表	19
図	24

第 II 章 東アジア地域に分布するハビタット・ジェネラリスト種

チラカゲロウを対象とした系統進化・系統地理学的研究

II-1. はじめに	31
II-2. 材料と方法	32
II-3. 結果	38
II-4. 考察	42
表	47
図	55

第 III 章 日本列島内で検出されたチラカゲロウ内の 2 遺伝系統群に
おける分布特性とハビタット選択性

III-1. はじめに	62
III-2. 材料と方法	63
III-3. 結果	69
III-4. 考察	71
表	76
図	81

第 IV 章 日本列島内における最長の河川・千曲-信濃川水系内における
標高傾度に沿ったチラカゲロウの集団構造と遺伝的構造

IV-1. はじめに	85
IV-2. 材料と方法	88
IV-3. 結果	92
IV-4. 考察	94
表	100
図	106
総合考察	111
謝辞	117
引用文献	120

緒論

約 38 億年もの年月をかけて進化・多様化してきた生物は、今日、地球上に約 180 万種が記載され、未記載種を含めると数千万種は棲息しているとされる。これらの多様な生物の中には、汎世界的に分布するものもいれば、特定の地域に限定して棲息するような種も含まれている。生物種群にとって、その棲息できる範囲、すなわち、分布域はどのように決定されているのだろうか。生物種群の分布域は、地史や物理・化学的要素も含めた環境要因、および生物学的要素が集約され、その複合的な結果として決定されるものと考えられる。もちろん、偶然性も重要な要因の一つであると考えられる。これらの要因のうち、生物学的要素としては、系統進化史、生理的・生態学的特性をはじめ、他種群との相互作用などが挙げられる。このような個々の生物種の分布域決定要因には、その種群を取り巻いている現在の要素のみならず、その種が辿った歴史や進化的プロセスの中で受けてきた要素も反映されているはずである。すなわち、ある特定種の分布域を理解するということは、対象種における基礎的情報の項目を把握するだけでなく、その種がもつあらゆる生物学的要素、科学的要素の総合的理解を示すものである。そして、種レベルでの分布域とそれを規定している要因を解明することは、「なぜこれほどまでに多様な生物種が存在し得るのか」といった生物の進化、種多様性の創出といった、生物学における重要課題にも直結し、種の多様化を理解する上で、非常に重要である (Hewitt, 2004; Elith et al., 2006; Hughes et al., 2009; Lehrian et al., 2010)。

冒頭でも述べた通り、多様な種群の中には、さまざまな要因により分布域の制限を受けることで、特定の環境条件のもとに棲息域が制限されるものがある。特定の環境にのみ適応したようにみえるこのような種群は「ハビタット・スペシャリスト種」として捉えられる。このようなハビタット・スペシャリスト種群においては、ある特定の気候や環境、特定種との相互作用に強く依存することなどで、きめ細かなニッチ分化が生じ、個々の種群レベルでは特殊化へ向かう。その結果、生物多様性の創出に大きく貢献することとなる (Kellermann et al., 2009)。Mayhew (2009) は、ハビタット・スペシャリスト種の生態学的な特殊化が広範囲で進化したことが「なぜこんなにも多くの異なった種類の動植物が存在するのか (Hutchinson, 1959)」という問いへの部分的な

答えであるとしている。一方、生物種群の中には幅広い環境条件に適応して棲息できるような「ハビタット・ジェネラリスト種」も存在する。ハビタット・ジェネラリスト種のように、生態学的なニッチが広ければ環境の予期せぬ変動があったとしても、いずれかの環境に適応した個体が生き残る可能性は確率的に高まり、集団における平均適応度の観点からはとても有利になると考えられる(Mayhew, 2009)。多くの種が分布の制限を受ける中で、ハビタット・ジェネラリスト種は「なぜ広域的に分布できているのか」、「いかにして様々な環境に適応できているのか」、そして、ハビタット・ジェネラリスト種は、幅広いニッチや高い適応度を獲得した「成功者」なのだろうか。ハビタット・ジェネラリスト種が広域分布し得る背景を究明することは、生物種群の種分化機構や種多様性創出における進化・生態学的要因を究明する上で大変重要である。

従来の集団遺伝学や生物地理学における研究では、多くの場合、ハビタット・スペシャリスト種に焦点が当てられてきた。ハビタット・スペシャリスト種には、希少種や絶滅危惧種も多く、保全生物学的な観点からも重要視されてきたほか、分集団化が進みやすく、孤立・散在分布する傾向が強いために、地域集団レベルでの遺伝的分化を検出しやすいといった特徴がある。そのような観点に立脚した研究では、生物種群とその棲息環境についての対応関係の追究が重視されてきた[e.g., 山岳源流棲のカゲロウ類やカワゲラ類 *Dipteromimus tipuliformis* (東城, 2005; Tojo, 2010), *Ameletus inopinatus* (Taubmann et al., 2011), *Cryptoperla* spp. (Kato et al., 2013); オサムシ類 *Carabus solieri* (Garnier et al., 2004); 高山棲の甲虫類 *Pterostichus* spp. (Schmidt et al., 2012); 高山棲のトビケラ類 *Hydropsyche tenuis*, *Drusus discolor* (Lehrian et al., 2009; Pauls et al., 2006); 源流棲のザリガニ類: *Euastacus* spp. (Ponniah and Hughes, 2004), *Austropotamobius* spp. (Fratini et al., 2005) *Cherax destructor* (Nguyen et al., 2004); *Cambaroides japonicas* (Usio, 2007; Koizumi et al., 2012); 溪流棲魚類 *Salvelinus leucomaenis* (Yamamoto et al., 2004)]。

一方で、ハビタット・ジェネラリスト種に関しては、幅広い環境の下に棲息していることから、生物種群とその棲息環境についての対応関係の追究が困難であるほか、「どこにでもいる」

「たくさんいる」といった、いわゆる「普通種」であることもあり、ハビタット・スペシャリスト種とは対照的に、注目されることは稀であった。しかしながら、近年では、遺伝子マーカー技術の発展に伴い、遺伝子解析を用いることで、従来の生物学で扱われてきたような形質だけでは明らかにできなかったような、きめ細やかな評価(例えば遺伝情報として細胞内に刻まれた歴史を解明すること)が比較的容易となった。このような背景から、近年になって、隠蔽種の発見や、同一種内において遺伝的に大きく分化した系統の存在が明らかにされるといった、ハビタット・ジェネラリスト生物の分布に関しても新たな知見がもたらされつつある。

このような背景から、本研究では、ハビタット・ジェネラリスト種のうち、水生昆虫類のチラカゲロウ *Isonychia japonica* Ulmer 1919(昆虫綱 Insecta, カゲロウ目 Ephemeroptera, チラカゲロウ科 Isonychiidae: 図 i-1)に着目した。チラカゲロウは、日本列島、朝鮮半島、中国本土、ロシア沿海州を含む東アジア地域の広域に分布し、とりわけ日本列島においては、河川の上流から下流にいたる流程広域に分布する(石綿・竹門, 2005)。つまり、チラカゲロウは、東アジア広域という「水平(平面)方向」および、河川水系内という「垂直(縦断)方向」という空間的に異なる2つの環境軸下において、広域分布を成し遂げた種である。すなわち、ハビタット・ジェネラリスト種の中でもとくに興味深い種である。

本研究では、(1)「水平(平面)方向」的視点: 近縁のチラカゲロウ類も対象に加えた東アジア広域におけるチラカゲロウ類の系統関係(第I章)、およびチラカゲロウにおける系統地理学的な観点からの遺伝的構造の検討(第II章)、そして(2)「垂直(縦断)方向」的視点: 水系内の上・中・下流域間(支川も含めた水系内)におけるチラカゲロウの集団構造と遺伝的構造の検討(第III章, 第IV章)を行い、ハビタット・ジェネラリスト種が広域分布するに至った系統進化プロセスや環境要因との関係性について究明するとともに、生物種群の種分化機構や種多様性創出における進化生態学的な考察に資することを目的とする。



図 i-1. チラカゲロウ *Isonychia japonica* の幼虫 (A) およびオス成虫 (B)

第1章 東アジア地域に分布するチラカゲロウ類の系統関係

I-1. はじめに

本研究で着目したチラカゲロウ科(昆虫綱, カゲロウ目)は, 体長 10-20mm と大型で, 遊泳型のカゲロウの1グループである(Knopp and Cormier, 1997). チラカゲロウの幼虫は早瀬や平瀬の石礫底の流水部に棲息し, 前肢の長毛列で流下物を濾しとって摂食するといわれている(石綿・竹門, 2005). チラカゲロウの羽化は, 年1化もしくは2化以上であると考えられる. チラカゲロウ科は, 1属(チラカゲロウ *Isonychia* 属)2亜属(チラカゲロウ *Isonychia* 亜属とシマチラカゲロウ *Prinoides* 亜属)から構成される(Tiunova et al., 2004; Tungpairajwong and Boonsoong, 2011). チラカゲロウ科は, 全北区および東洋区の広域に分布しており, 新北区からは17種が記録されている(Kondratieff and Voshell 1984). 旧北区東部におけるチラカゲロウ科については, Tiunova et al. (2004)により分類学的な整理がなされ, その結果, 旧北区東部に8種のチラカゲロウ類が分布するとされている: *Isonychia* 亜属に位置づけられる *I. ignota* (Walker, 1853), *I. japonica* (Ulmer, 1919), *I. ussurica* (Bajkova, 1970), *I. concoloria* (Tiunova et al., 2004), *I. crassiuscula* (Tiunova et al., 2004), *I. sexpetata* (Tiunova et al., 2004), *I. vshikovae* (Tiunova et al., 2004), そして *Prinoides* 亜属に位置づけられる *I. shima* (Matsumura, 1931). また, *I. ussurica* と *I. vshikovae* の2種には, それぞれ亜種区分もなされている: *I. ussurica ussurica* と *I. ussurica siberica*, そして *I. vshikovae vshikovae* と *I. vshikovae sinitschenkova*. また, Tungpairajwong and Boonsoong (2011) により, *Isonychia formosana* (Ulmer, 1912) の存在も再確認された. このように, 旧北区東部におけるチラカゲロウ類についても, 形態学的な分類に基づく整理がなされ, その分布域についても明らかにされつつある一方で, これらのチラカゲロウ類における遺伝子情報および各種の系統関係については明らかとなっていない.

近年, ミトコンドリア DNA (mtDNA) の遺伝子情報は, 陸生生物および水生生物の集団構造や系統関係を解明する上で, 非常に有用かつ重要な役割を担うとして注目されている(Avise, 1994; Williams et al., 2006; Hwang et al., 2013). mtDNA の遺伝子情報は, DNA バー

コーディング (e.g., iBOL: International Barcode of Life) として、多様性の評価や種同定のツールとしても利用されている (Ratnasingham and Hebert, 2007). とりわけ, mtDNA cytochrome *c* oxidase submit I (COI) 領域は、動物界における DNA バーコーディングの主要領域として扱われており (Savolainen et al., 2005; Ratnasingham and Hebert, 2007), 多様な動物種群で利用されている (e.g., Savolainen et al., 2005; Ratnasingham and Hebert, 2007; Ogitani et al., 2011; Kato et al., 2013; Sekiné et al., 2013, 2015; Suzuki et al., 2014).

本研究では、東アジア地域に分布するハビタット・ジェネラリスト種であるチラカゲロウ *Isonychia japonica* に着目して研究するにあたり、まず、これらの東アジア地域に分布する近縁なチラカゲロウ類との類縁関係・系統関係を明らかにするため、旧北区東部に分布するチラカゲロウ類を対象とした分子系統解析を試みた。

チラカゲロウ *I. japonica* に関しては、ロシア沿海州および朝鮮半島の一部および日本列島広域から採集された試料を対象とした。また、チラカゲロウ *I. japonica* と分布域が一部オーバーラップしている *I. ussurica* については朝鮮半島とモンゴルから、*I. ignota* についてはモンゴルから採集された試料を対象とした。また、日本列島にのみ分布し、亜属レベルで異なるとされるシマチラカゲロウ *I. shima* に関しては、本種の分布の北限付近 (北海道北部) から南限付近 (新潟県阿賀野市) にいたる広域からサンプルを採集した (図 I-1, 2)。本研究では、東アジア地域に分布するチラカゲロウのうち、これらの主要 4 種 (チラカゲロウ *I. japonica*, *I. ignota*, *I. ussurica*, シマチラカゲロウ *I. shima*) を対象に、系統解析を実施した。

I-2. 材料と方法

研究材料および試料からのゲノム DNA の抽出

日本列島広域、朝鮮半島、ロシア沿海州、およびモンゴルの 47 地点から採集されたチラカゲロウ類 4 種 (チラカゲロウ *Isonychia japonica*, *Isonychia ignota*, *Isonychia ussurica*, シマチラカゲロウ *Isonychia shima*) の計 100 個体を遺伝子解析試料として用いた (表 I-1, 図 I-2)。外群

として、チラカゲロウ科に近縁な科として扱われているガガンボカゲロウ科 *Dipteromimidae* のガガンボカゲロウ *Dipteromimus tipuliformis*, およびヒメフタオカゲロウ科 *Ameletidae* のヒメフタオカゲロウ *Ameletus montanus* (GenBank アクセス番号: GQ433996.1) とマエグロヒメフタオカゲロウ *Ameletus costalis* (GenBank アクセス番号: JQ650160.1) を使用した。採集した幼生や成虫、亜成虫を 100%エタノール(以降, エタノールを EtOH と表記)で固定した。形態観察にも供試した一部の試料に関しては 70%EtOH で固定したが、形態観察後には、遺伝子解析用試料として 100%EtOH に置換した。これらの固定試料を、実体顕微鏡下で解剖し、胸部あるいは脚部筋肉の一部を摘出し、これらの組織試料よりゲノム DNA の抽出を行った。ゲノム DNA 抽出および精製に関しては、DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN, Hilden)を用い、製品のプロトコルに準じてゲノム DNA を抽出・精製した。チラカゲロウ類の種同定は、Tiunova et al. (2004)における分類学的鍵形質を基に行った。形態観察には実体顕微鏡 SMZ 1500(Nikon, 東京), および生物顕微鏡 ECLIPSE 80i(Nikon, 東京)を用いた。

遺伝子解析

抽出・精製したゲノム DNA を鋳型に mtDNA COI 領域と 16S rRNA 領域, および核 DNA (nDNA) Histone H3 領域の部分配列を解析した。PCR 反応の酵素には rTaq(TOYOBO, 大阪)を用い、また PCR 増幅には Program Temp Control System PC350 サーマルサイクラー(Astec, 福岡)を用いた。各遺伝子領域における PCR には、表 I-2 に示したプライマーセットを利用した。mtDNA 16S rRNA 領域の PCR については、94°C 1 分間のプレヒート後、「94°C で 1 分間の熱変性, 50°C で 1 分間のアニーリング, 72°C で 1 分間の伸長」を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル行った後、4°C で保存した。mtDNA COI 領域の PCR については、94°C 1 分間のプレヒート後、「94°C で 1 分間の熱変性, 50°C で 1 分間のアニーリング, 72°C で 1 分 30 秒間の伸長」を 1 サイクルとする反応を 35 サイクル行った後、72°C で 7 分間の伸長反応を行い、4°C で保存した。nDNA Histone H3 領域の PCR については、94°C 2 分間のプレヒート後、

「94°Cで 30 秒間の熱変性, 60°Cで 30 秒間のアニーリング, 74°Cで 30 秒間の伸長」を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル行った後, 74°Cで 7 分間の伸長反応を行い, 4°Cで保存した。

PCR 産物の精製には ExoSAP IT (GE Healthcare, Buckinghamshire) または Illustra ExoStar (GE Healthcare, Buckinghamshire) を用い, シーケンス反応においては BigDye Terminator v1.1 Sequencing Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire) を用いて蛍光ラベリングを行った。これらの反応には Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, California) を用いた。

この後, ABI 3130, または ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, California) を用いて塩基配列を解析した。シーケンス後の塩基配列については, ソフトウェア CLC Genomics Workbench software (Filgen, 名古屋) を用いて, アセンブリとアライメント作業を行った。解析サンプル間の塩基配列のアライメントには, ソフトウェア Clustal W (Thompson et al., 1994) およびソフトウェア MEGA ver. 5.02 (Tamura et al., 2011) を用いた。整列した塩基配列を基に, ソフトウェア DnaSP v4.0 (Rozas et al., 2003) を用いて, ハプロタイプとジェノタイプを決定した。

系統解析

mtDNA の COI 領域および 16S rRNA 領域の塩基配列に基づく系統解析に加え, これらの両配列を結合させて系統解析することに問題がないかを検定するため, 領域間の進化速度の有意差の有無を ILD 検定 (Incongruence length difference test; Farris et al., 1995) により検定したところ, 棄却されなかったため ($P=0.98$), mtDNA COI 領域および 16S rRNA 領域を結合させた配列のデータセット (807-bp) に基づく解析も試みた。ILD 検定にはソフトウェア PAUP ver. 4.0 beta10 (Swofford, 2002) を用いた。

整列した塩基配列を基に, 最尤 (ML) 法 (Felsenstein, 1981) により分子系統樹を作成した。これらの解析にはソフトウェア MEGA ver. 5.02 (Tamura et al., 2011) を解析ソフトウェアとして用いた。系統樹の各ノード (分岐点) における信頼性を評価するため, ML 法では 1,000 回反

復のブートストラップ解析を行った。ML 法を行う際の最適モデル選択には、ソフトウェア MEGA ver. 5.02 (Tamura et al., 2011) を利用した。ML 法における Best-fit ML モデルの結果を以下に示す: mtDNA COI 領域 + 16S rRNA 領域の結合データセットにおいては HKY + G + I; mtDNA COI 領域のデータにおいては HKY + G + I モデル; mtDNA 16S rRNA 領域においては HKY + G モデル; nDNA Histone H3 領域においては T92 + G モデルが Best-fit として選択された。またソフトウェア BEAST ver.1.7.1 (Drummond et al., 2012) を用いてベイズ法による分岐図を作成した。ベイズ解析を行う際の塩基置換モデルの選択にはソフトウェア Kakusan4 (Tanabe, 2007) を用い、Schwarz's Bayesian Information (BIC; Schwarz, 1978) により最適モデルの選択を行った: mtDNA COI 領域 + 16S rRNA 領域の結合データセットにおいては、HKY85 + G; mtDNA COI 領域においては、TN93ef + G (first position), JC69 + G (second position), TN93 + G (third position); mtDNA 16S rRNA 領域においては、HKY85 + G; nDNA Histone H3 領域においては、F81 + G (first position), JC69 + G (second position), GTR + I (third position) が Best-fit として選択された。ベイズ法の MCMC 解析を 100,000,000 世代繰り返し、2,000 回毎にサンプリングを行い、ソフトウェア Tracer v1.5 (Rambaut and Drummond, 2007) を用いて各パラメーターの確認をした後に、最初の 10% の世代を定常状態に達していない世代と仮定して解析から除いた。加えて、ベイズ法において各ノードにおける信頼性評価のための事後確率を算出した。遺伝的距離の算出には、ソフトウェア MEGA ver. 5.02 (Tamura et al., 2011) を使用した。

I-3. 結果

mtDNA における系統解析

日本列島広域、朝鮮半島、ロシア沿海州およびモンゴルから採集されたチラカゲロウ類を試料として用いて遺伝子解析をした(表 I-1, 図 I-2)。45 地点から採集された 66 個体において mtDNA COI 領域(459-bp)を解析した結果、計 42 のハプロタイプが検出された(表 I- 1, 図

I-3). これらのハプロタイプ間の類縁性に関して、ML 法とベイズ法を用いて分岐図を作成した。その結果、いずれの手法で作成した分岐図においても、種レベルでの単系統性が支持された。各種の単系統性を支持する ML 法におけるブートストラップ値とベイズ法における事後確率を以下に示す: チラカゲロウ *I. japonica*, 62/0.99; *I. ignota*, 100/1.00; *I. ussurica*, 100/1.00; シマチラカゲロウ *I. shima*, 100/1.00 (図 I-3)。mtDNA COI 領域の解析結果に基づく種間の系統関係は $\{I. japonica + [I. shima + (I. ignota + I. ussurica)]\}$ となり、亜属レベルで異なるシマチラカゲロウが他の *Isonychia* 亜属の種群と遺伝的に分化している傾向は認められなかった。しかしながら、 $[I. shima + (I. ignota + I. ussurica)]$ の単系統性を示す支持率は、ML 法およびベイズ法いずれにおいてもとても低い値であった (ML 法/ベイズ法, 37/0.48)。

加えて、46 地点から採集された 96 個体において mtDNA 16S rRNA 領域 (348-bp) を解析した結果、計 33 のハプロタイプが検出された (表 I-1)。これらのハプロタイプ間の類縁性に関して、ML 法およびベイズ法を用いて分岐図を作成した (図 I-4)。その結果、いずれの手法で作成した分岐図においても、各種レベルでの単系統性が支持された。*I. ignota* においては、2 地点から採集された 5 個体を解析したが、1 ハプロタイプのみが検出された。各種の単系統性を支持する ML 法におけるブートストラップ値とベイズ法における事後確率を以下に示す: チラカゲロウ *I. japonica*, 82/0.99; *I. ussurica*, 100/1.00; シマチラカゲロウ *I. shima*, 99/1.00 (図 I-4)。mtDNA 16S rRNA 領域の解析結果に基づく種間の系統関係は $\{I. shima + [I. japonica + (I. ignota + I. ussurica)]\}$ といった系統関係になり、ML 法での支持率は低かったものの、ベイズ法についてはその関係性が強く支持され、亜属レベルで異なるシマチラカゲロウ *I. shima* が他の *Isonychia* 亜属の種群と遺伝的に分化する傾向が認められた。

また、mtDNA COI 領域および 16S rRNA 領域を結合させた配列のデータセット (807-bp) により、44 地点 64 個体を解析した結果、計 49 のハプロタイプが検出された。これらのハプロタイプ間の類縁性に関して、ML 法、ベイズ法を用いて分岐図を作成した結果、いずれの手法で作成した分岐図においても、各種レベルでの単系統性が支持された (図 I-5)。各種の単系

統性を支持する ML 法におけるブートストラップ値とベイズ法における事後確率を以下に示す:
チラカゲロウ *I. japonica*, 100/1.00; *I. ignota*, 100/1.00; *I. ussurica*, 100/1.00; シマチラカゲロウ
I. shima, 100/1.00 (図 I-5). mtDNA COI 領域と 16S rRNA 領域の複合領域の解析結果においても {*I. shima* + [*I. japonica* + (*I. ignota* + *I. ussurica*)]} といった系統関係が認められた. ML
法での支持率は低かったものの, ベイズ法についてはその関係性が強く支持され, 亜属レベルで異なるシマチラカゲロウ *I. shima* が他の *Isonychia* 亜属の種群と遺伝的に分化する傾向が
認められた.

チラカゲロウ *I. japonica* においては, 日本列島内で採集されたチラカゲロウと大陸(ロシア沿海州・朝鮮半島)産チラカゲロウ間では遺伝的に大きく分化していることが示された (i.e., 日本列島産チラカゲロウのクレード J と大陸産チラカゲロウのクレード C; 図 I-5). また, 大陸産チラカゲロウ類に着目すると, 朝鮮半島産チラカゲロウのうち, 地点 No. 31 (Yeongweol, Gangwando) から採集されたサンプルはロシア沿海州産チラカゲロウとともに単系統群を構成した(クレード C-RK; 図 I-3, 4, 5). これに対し, 朝鮮半島から採集された他の全てのサンプル(地点 No.27-30, 32, 33, Gangwando の Yangyang, Inje, Samcheong, Goseong; 図 I-3, 4, 5)はロシア沿海州産チラカゲロウと地点 No. 31 の Yeongweol 産チラカゲロウで構成されるクレード C-RK に対して側系統となった(側系統群 C-K). さらに, 日本列島内のチラカゲロウ *I. japonica* においても遺伝的に大きく分化した 2 系統群から構成されることが明らかとなった(クレード J-D vs. クレード J-U; 図 I-3, 4, 5).

I. ussurica においても, 遺伝的に分化した 2 系統群から構成されることが明らかとなった(クレード U-K vs. クレード U-M; 図 I-3, 4, 5). 朝鮮半島産 *I. ussurica* がクレード U-K を構成し, モンゴル産 *I. ussurica* がクレード U-M を構成しており, 地理的に離れた産地間での遺伝的分化が明らかとなった.

一方, 日本列島の固有種であり, かつ局所的な分布を示すシマチラカゲロウ *I. shima* においては, 現在までに分布が確認されている北限付近から南限付近までを含む分布域を網羅

する 8 地点から採集された 13 個体を解析したものの、地域集団レベルでの遺伝的変異はほとんど認められなかった(図 I-3, 4, 5).

チラカゲロウ類における種間レベルでの遺伝的距離の中央値(*p*-distance)を表 I-3 に、また、種内で大きな遺伝的分化が検出されたチラカゲロウ *I. japonica* と *I. ussurica* に関しては、クレード間(一部は側系統群も含むグループ間)での遺伝的距離における中央値(*p*-distance)表 I-4 に示した.

nDNA における系統解析

日本列島広域、朝鮮半島、ロシア沿海州およびモンゴルから採集されたチラカゲロウ類 30 地点の 47 個体を対象に、nDNA Histone H3 領域の塩基配列(327-bp)を解析した(表 I-1, 図 I-2). これらのジェノタイプ間の類縁性に関して、ML 法、ベイズ法を用いて分岐図を作成した(図 I-6). Histone H3 領域の解析結果において、ヘテロをもつ遺伝子型は検出されなかった. nDNA Histone H3 領域の解析の結果、*I. ignota*, *I. ussurica*, シマチラカゲロウ *I. shima* の 3 種においては、種内でのジェノタイプで多型は検出されなかった. 一方、チラカゲロウ *I. japonica* においては 6 ジェノタイプが検出されたものの、種内の単系統性は強く支持された(ML 法/ベイズ法, 96/0.99; 図 I-6). チラカゲロウ *I. japonica* において、日本列島産チラカゲロウからは 1 遺伝子型のみが検出され、大陸で採集されたチラカゲロウからは 5 ジェノタイプが検出されたものの、mtDNA の解析結果で示されたようなチラカゲロウ *I. japonica* 種内で遺伝的に分化したクレード(クレード J, クレード C)は認められなかった(図 I-6).

nDNA Histone H3 領域においても、{*I. shima* + [*I. japonica* + (*I. ignota* + *I. ussurica*)]} といった系統関係が認められ、ML 法での支持率は低かったものの、ベイズ法についてはその関係性が強く支持され、亜属レベルで異なるシマチラカゲロウが他の種群と遺伝的に分化しているという傾向が認められた.

I-4. 考察

本研究では、東アジアにおける4種を対象とし、mtDNA COIと16S rRNA領域およびnDNA Histone H3領域を解析した。チラカゲロウ亜属とシマチラカゲロウ亜属の系統関係については、mtDNA 16S rRNA領域とnDNA Histone H3領域の解析の結果では、ML法での支持率が低かったものの、チラカゲロウ亜属とシマチラカゲロウ亜属では遺伝的に分化した(図 I-4, 6)。一方で、mtDNA COI領域の解析においては、亜属間で遺伝的に分化しなかった(図 I-3)。

また、4種のチラカゲロウ類における各種レベルでの種の単系統性は、mtDNA(COI, 16S rRNA, COI+16S rRNA領域)およびnDNA(Histone H3領域)の系統解析において支持された。このことから形態学的な分類と遺伝子解析の結果はよく一致しているといえる。また、解析したmtDNA(16SrRNA, COI+16S rRNA領域)とnDNA(Histone H3領域)において作成された分岐図のトポロジーは概ね合致しており、信頼性の高い結果が得られたものと考えられる。加えて、mtDNA COI領域を対象とするDNAバーコーディング法についても、これらの東アジア地域に分布する4種においては有効性が高いと考えられる。

日本列島固有種であるシマチラカゲロウ *I. shima* は、日本列島の北東地域に孤立・散在的に棲息域が確認されているが、本種における地理的分布の詳細は依然として不明瞭である。本研究では、これまでに本種の分布が確認されている北限付近から南限付近にいたる広域でサンプルを採集し、解析に用いた。とりわけ、分布北限に近い北海道士別市の釧路川の集団と分布の南限に近い新潟の阿賀野市の阿賀野川の集団とは直線距離にしても約780kmも離れており、これら集団の間には生物地理区分上の重要な障壁として知られる津軽海峡(ブラキストン線)や石狩低地帯も存在している。しかしながら、シマチラカゲロウ *I. shima* の遺伝的多様性は低く、地理的に離れた集団間においても遺伝的に分化する傾向や大きな遺伝的変異は認められず、地理的な特性を反映した遺伝構造は何ら検出されなかった。

I. ignota に関しては、直線距離で約45kmと地理的に離れたモンゴル内の2地域で採集したサンプルを用いて解析を行った。しかし、これらの集団間で遺伝的に分化する傾向は認めら

れなかった。

I. ussurica においては、直線距離で約 2,500km と地理的に離れた朝鮮半島の集団とモンゴル集団を用いて遺伝子解析を行い、mtDNA COI と 16S rRNA 領域の結果から、朝鮮半島産とモンゴル産の集団間での、遺伝的分化が認められた。地理的に遠く離れた 2 地域を含む解析であったため、妥当な結果であるといえるが、その分岐は、第 II 章において詳述するチラカゲロウ *I. japonica* の種内分化に比べるとそれほど深いものではない(遺伝的距離 mtDNA COI 領域: 0.021, 16S rRNA 領域: 0.008)。

これらの 3 種における種内での遺伝的構造に対して、チラカゲロウ *I. japonica* に関しては、種内での大きな遺伝的分化や高い遺伝的多様性が検出された。本研究での解析結果から、チラカゲロウ *I. japonica* において、まず日本列島と大陸間での大きな遺伝的分化が検出された。加えて、日本列島内(i.e., クレード J-D とクレード J-U)および大陸内(i.e., クレード C-RK と側系統グループ C-K)においても遺伝的に分化したクレード(一部には側系統群も含む)が検出された。チラカゲロウ種内で検出されたこれらの遺伝子系統群の詳細については第 II 章で詳しく述べることとする。

表I-1. 遺伝子解析に用いたサンプルの採集地点情報と検出された遺伝子型 (ハプロタイプ/ジェノタイプ)

採集地点				ハプロタイプ/ジェノタイプ					
No.	県/州	市/町	河川名	緯度(N)	経度(E)	16S rRNA	COI	Histone H3	
チラカゲロウ <i>Isonychia japonica</i>									
日本列島									
1	北海道	遠軽町	湧別川	44°01.25'	143°28.68'	7989	S07	C04	H01
2	北海道	音威子府村	天塩川	44°43.67'	142°15.49'	8032	S07	C04	
3	北海道	千歳市	千歳川	—		5502	S07	C04	
4	岩手県	大船渡市	盛川	39°06.32'	141°41.34'	7671	S07	C03	H01
5	秋田県	大館市	米代川	40°13.54'	140°35.40'	7676	S07	C02	H01
6	福島県	福島市	摺上川	37°54.90'	140°25.52'	6568	S07	C01	
7	福島県	矢祭町	久慈川	36°54.33'	140°25.02'	8040	S08	C07	
8	埼玉県	秩父市	荒川	36°02.57'	139°05.91'	6655	S07	C05	H01
9	石川県	白山市	手取川の支川	36°28.53'	136°37.03'	5428	S11	C16	
						5493	S13	C16	
10	長野県	千曲市	千曲川	36°29.71'	138°08.27'	4401	S07	C04	H01
11	岐阜県	養老町	牧田川	35°18.79'	136°33.86'	6534	S03	C11	H01
12	静岡県	伊豆の国市	狩野川	35°01.06'	138°56.18'	6560	S07	C06	
13	愛知県	豊坂町	相川	35°02.43'	137°43.30'	7969	S14	C16	
						7970	S14	C17	
14	京都府	京都市	桂川	35°00.83'	135°40.87'	7542	S01	C11	H01
15	兵庫県	たつの市	揖保川	34°54.48'	134°33.08'	7988	S05	C08	
						7987	S14	C16	
16	和歌山県	田辺市	音無川	33°50.46'	135°46.19'	7539	S14	C19	H01
17	和歌山県	九度山町	丹生川	—		7547	S12	C21	H01
18	島根県	益田市	高津川	34°37.78'	131°47.66'	5224	S06	C09	
						5444	S14	C18	
19	岡山県	新庄村	野土路川	35°13.83'	133°34.67'	5218	S14	C23	
						5438	S15	C15	
20	香川県	まんのう町	土器川	34°11.62'	133°51.26'	5510	S04	C10	
						5511	S14	C20	
21	愛媛県	内子町	小田川	33°34.10'	132°48.09'	4759	S14	C22	H01
						6551	S10	C13	H01
22	大分県	日田市	大山川	—		6537	S09	C13	
23	宮崎県	延岡市	五ヶ瀬川	32°33.82'	131°32.13'	7784	S02	C12	H01
24	鹿児島県	南九州市	野崎川	31°25.06'	130°27.96'	7519	S14	C14	H01
ロシア沿海州									
25	Primorsky	Novoneghnino	Sunknodol river	43°13.61'	132°32.65'	7450	S19	C25	H05
						7451	S19		H05
26	Primorsky	Nakhodka	Volchanka river	42°56.18'	132°36.21'	12434	S19		H05
						12435	S19	C24	H05
						12436	S19		H05
朝鮮半島									
27	Gangwando	Yangyang	Bangtae stream	38°04.53'	128°26.58'	7452	S25	C27	
						7453	S24		H04
						14272	S24		
						14273	S24		
28	Gangwando	Inje	Bangtae stream	—		7454	S24	C27	H04
						7455	S24		
						14289	S24		
						14290	S24		
						14291	S24		
29	Gangwando	Inje	Bangtae stream	37°58.12'	128°25.25'	8291	S24	C27	
						8290	S24	C27	
30	Gangwando	Samcheog	Maeup stream	37°19.44'	129°12.62'	9531	S22		H03
						9532	S23	C28	H02
						14286	S24		
						14287	S21		
						14288	S20		
31	Gangwando	Yeongweol	Sukhang stream	—		9533	S18		
						9534	S16	C26	H05
						14280	S16		
						14281	S17		
						14282	S16		
						14283	S16		
						14284	S16		
						14285	S16		
32	Gangwando	Inje	Naerin stream	37°57.31'	128°18.98'	8293	S24	C27	H04
						14270	S24		
						14271	S24		
						14276	S24		
						14277	S24		
						14278	S24		
						14279	S24		
33	Gangwando	Goseong	Buk stream	38°21.77'	128°23.35'	8294	S24		

						14274	S24		
						14275	S24		
<i>Isonychia ignota</i>									
モンゴル									
34	Darkhan-uul	Darkhan	Kharaa-gol	49°23.41'	105°54.01'	12431	S26	C29	H06
						12432	S26	C30	H06
						12433	S26	C30	H06
35	Selenge	Javhlant	Sharyn-gol	49°45.43'	106°09.98'	12934		C30	H06
						12935		C30	H06
<i>Isonychia ussurica</i>									
朝鮮半島									
36	Chungcheongbuk	Yeongdong	Geumgang river	36°09.54'	127°41.27'	5604	S29		H07
						9726	S28	C36	H07
						9727	S30	C37	H07
モンゴル									
37	Bulgan province	Selenge	Orkhon-gol	49°27.89'	103°58.93'	12422			H07
						12423			H07
						12424	S27	C34	H07
38	Selenge	Javhlant	Eruu-gol	49°52.68'	106°14.70'	12425	S27	C34	H07
						12426	S27	C34	H07
						12427	S27	C31	H07
39	Bulgan	Orkhon	Orkhon-gol	48°37.35'	103°32.57'	12428	S27	C35	H07
						12429	S27	C32	H07
						12430	S27	C33	H07
シマチラカゲロウ <i>Isonychia shima</i>									
日本列島									
40	北海道	帯広市	札内川	42°52.91'	143°12.13'	9694	S33	C41	H08
41	北海道	せたな町	後志利別川の支流	42°25.48'	140°01.20'	9693	S32	C40	H08
42	北海道	恵庭市	ラルマナイ川			12437	S32	C38	H08
						12438	S32	C41	
						12439	S32	C41	
43	北海道	標茶町	釧路川	43°17.99'	144°36.10'	12923	S32	C41	
44	北海道	清水町	-	-		8122	S32	C42	H08
45	宮城県	大崎市	江合川	38°44.40'	140°44.43'	7682	S32	C41	
						7683	S32	C41	H08
						7684	S32	C39	
46	新潟県	阿賀野市	阿賀野川	37°44.23'	139°18.86'	7685	S31	C41	H08
						7734	S32	C41	
47	福島県	福島市	摺上川	37°54.88'	140°25.54'	7255	S32		

表 1-2. 本研究で使⽤したプライマー情報

遺伝子領域	F/R	配列 (5'→3')	引用文献
COI	Forward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al. (1994)
	Forward	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC	Simon et al. (1994)
	Reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer et al. (1994)
	Reverse	GTAAATATATGRTGDGCTC	Premdini et al. (2005)
16S rRNA	Forward	TTACGCTGTTATCCCTAA	Tojo and Matsukawa (2003)
	Reverse	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Tojo and Matsukawa (2003)
Histone H3	Forward	ATGGCTCGTACCAAGCAGACGGC	Ogden and Whiting (2005)
	Reverse	ATATCCTTGGGCATGATGGTGAC	Ogden and Whiting (2005)

表 I-3. mtDNA COI 領域 (下部) および 16S rRNA 領域 (上部) の解析結果を基に算出したチラカゲロウ類の種間における遺伝的距離 (*p-distance* 値)

	<i>I. japonica</i>	<i>I. ignota</i>	<i>I. ussurica</i>	<i>I. shima</i>
<i>Isonychia japonica</i>	—	0.146	0.145	0.166
<i>Isonychia ignota</i>	0.208	—	0.137	0.173
<i>Isonychia ussurica</i>	0.206	0.172	—	0.199
<i>Isonychia shima</i>	0.223	0.190	0.223	—

表 I-4. mtDNA COI 領域 (下部) および 16S rRNA 領域 (上部) の解析結果を基に算出したチラカゲロウ *Isonychia japonica* および *Isonychia ussurica* のクレード間における遺伝的距離 (p -distance 値)

種	クレード	<i>I. japonica</i>				<i>I. ussurica</i>	
		J-D	J-U	C-RK	C-K*	U-M	U-K
<i>Isonychia japonica</i>	J-D	-	0.031	0.078	0.072	-	-
	J-U	0.153	-	0.078	0.071	-	-
	C-RK	0.153	0.177	-	0.022	-	-
	C-K*	0.127	0.171	0.069	-	-	-
<i>Isonychia ussurica</i>	U-M	-	-	-	-	-	0.008
	U-K	-	-	-	-	0.021	-

*: mtDNA COI 領域の解析においては側系統群であった

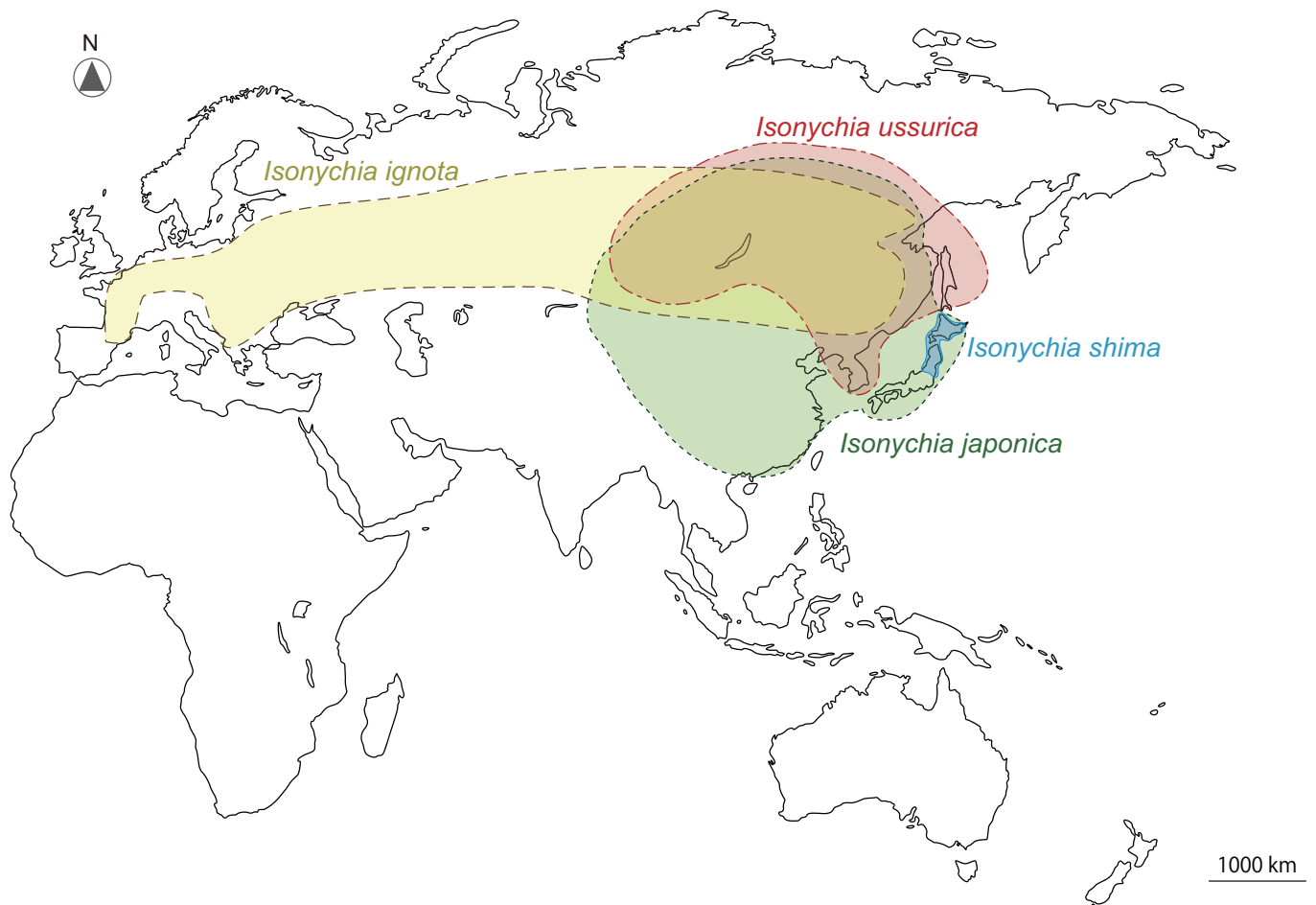


図 I-1. チラカゲロウ類 4 種（チラカゲロウ *Isonychia japonica*, *Isonychia ignota*, *Isonychia ussurica*, シマチラカゲロウ *Isonychia shima*）の分布域

Tiunova et al. (2004) および Papazian et al. (1999) を参考に作成した.

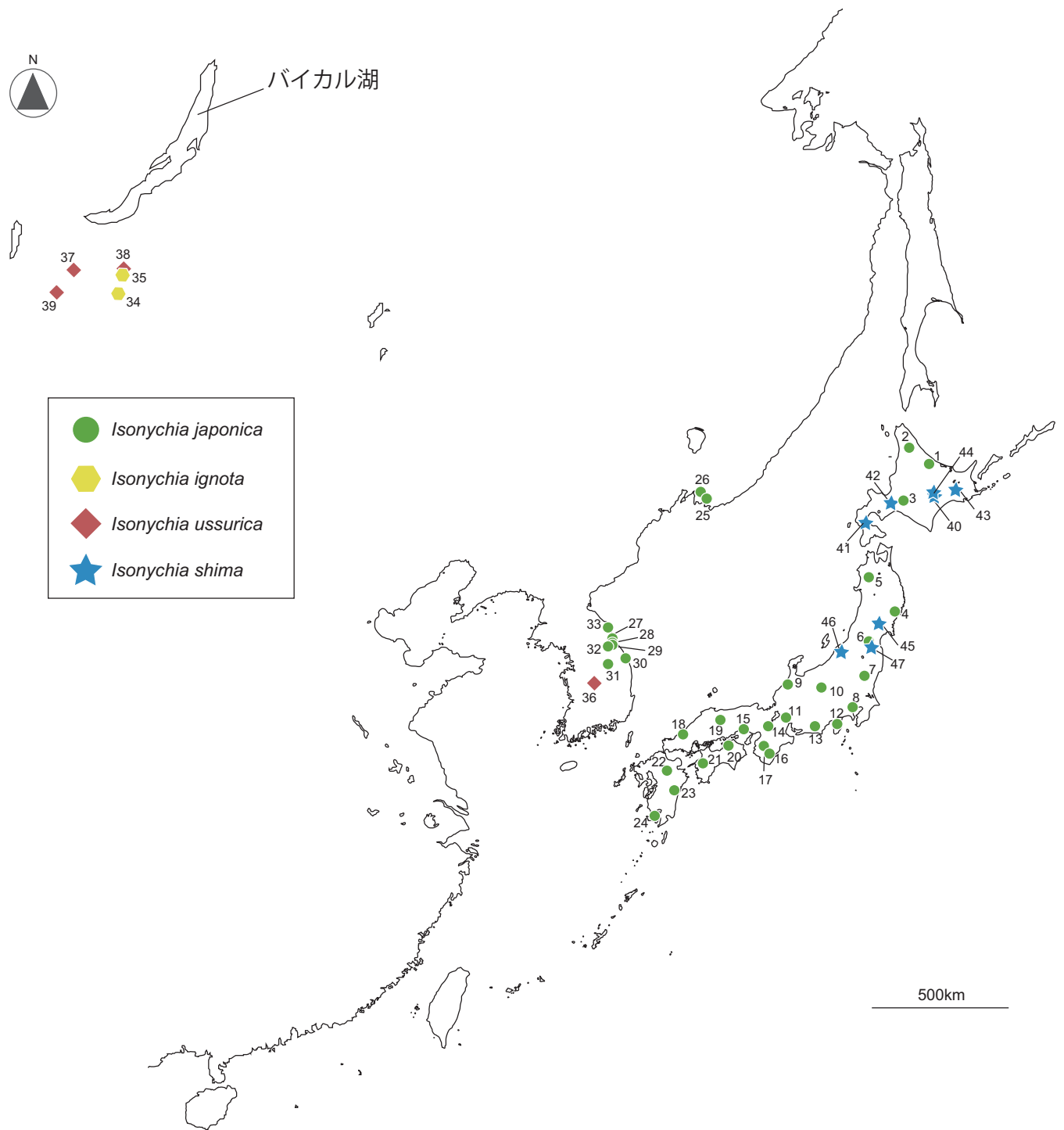


図 1-2. 本研究で用いた遺伝子解析サンプルの採集地点
 地点番号は、表 1-1 の産地情報と対応する。

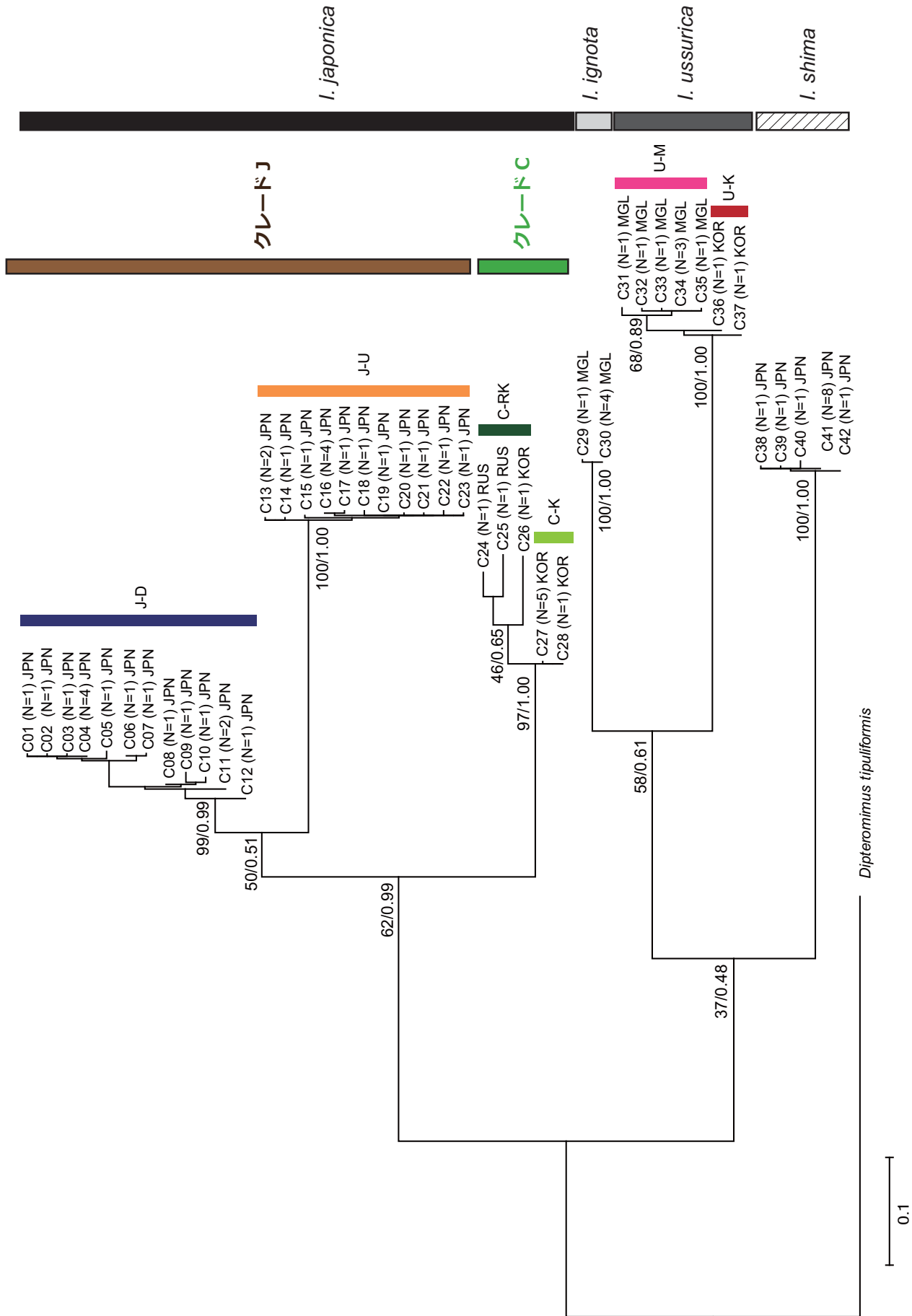


図 I-3. チラカゲロウ類 4 種の mtDNA COI 領域 (459-bp) において検出された各ハプロタイプ間の類関係を示す ML 樹

各ノードの数値は、ML法におけるブートストラップ値とベイズの事後確率を示す。各 OTU 名としては、ハプロタイプ番号と検出された個体数および産地国名の略語を示した。検出されたハプロタイプと産地情報との対応に関しては、表 I-1 を参照。

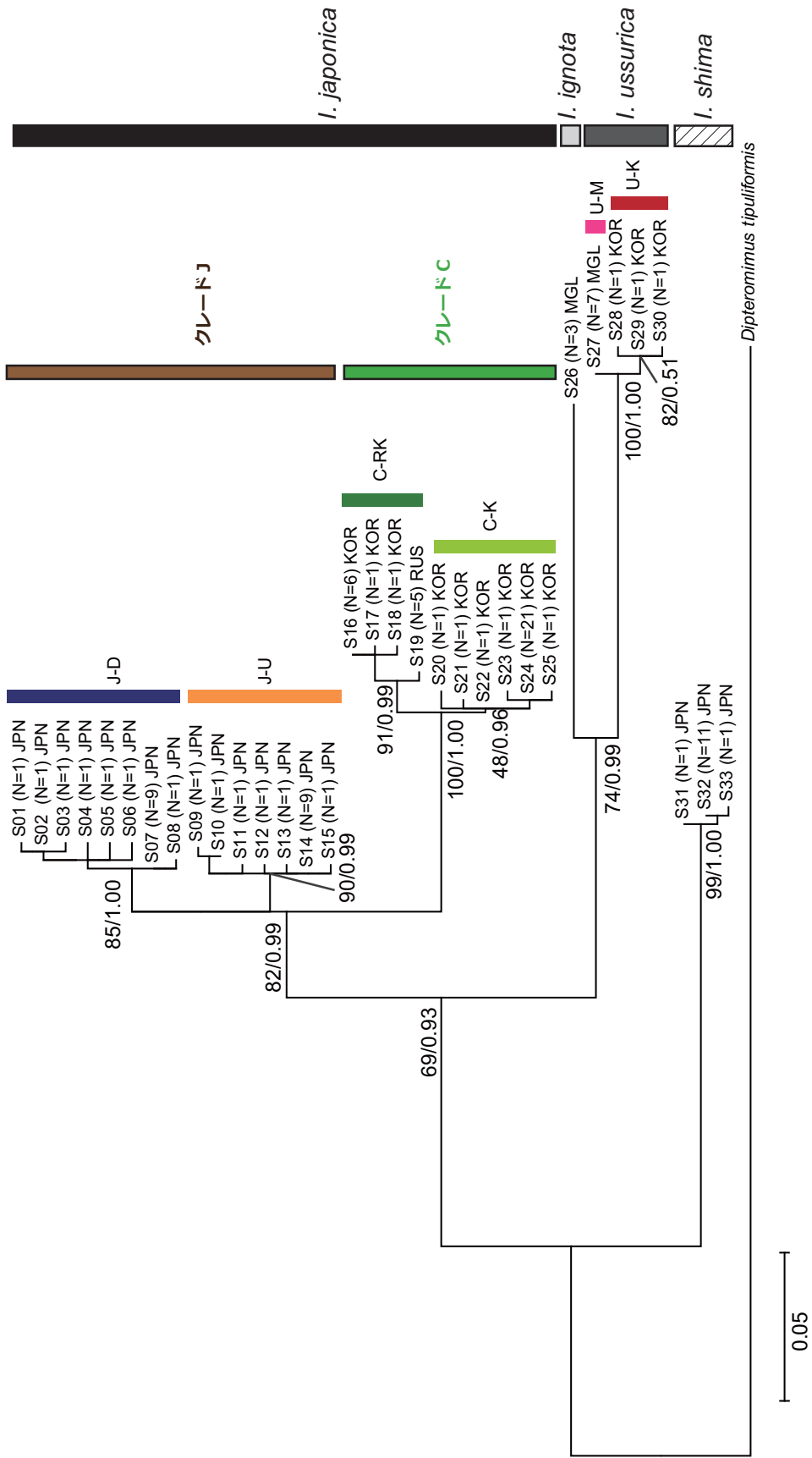


図 I-4. チャカゲロウ類 4 種の mtDNA 16S rRNA 領域 (348-bp) において検出された各ハプロタイプ間の類関係を示す ML 樹

各ノードの数値は、ML法におけるブートストラップ値とベイズの事後確率を示す。各 OTU 名としては、ハプロタイプ番号と検出された個体数および産地国名の略語を示した。検出されたハプロタイプと産地情報との対応に関しては、表 I-1 を参照。

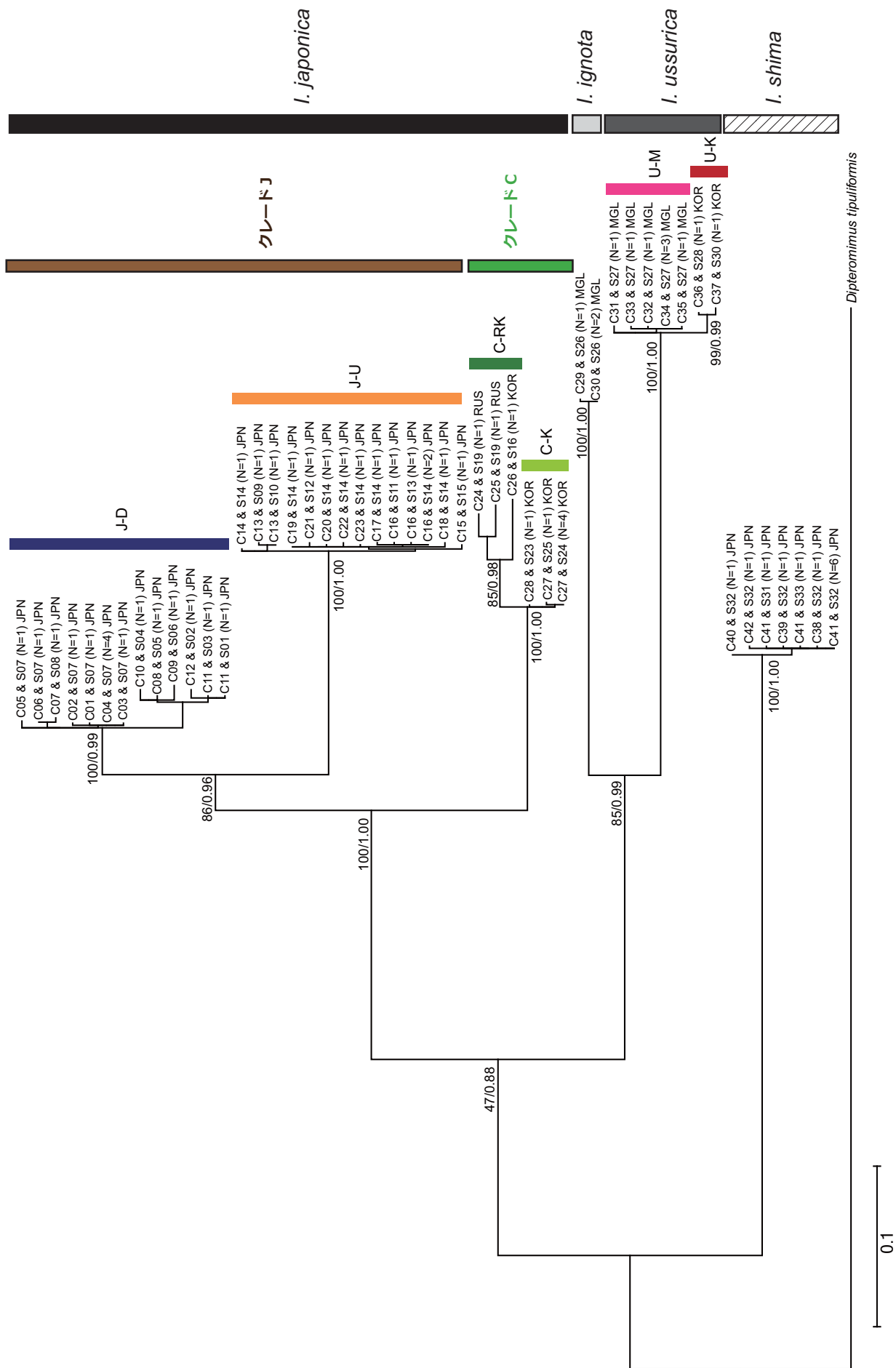


図 I-5. チラカゲロウ類 4 種の mtDNA COI 領域 (459-bp) および 16S rRNA 領域 (348-bp) において検出された各ハプロタイプ間の類関係を示す ML 樹。各ノードの数値は、ML 法におけるブートストラップ値とベイズの事後確率を示す。各 OTU 名として、ハプロタイプ番号と検出された個体数、および産地国名の略語を示した。検出されたハプロタイプと産地情報との対応に関しては、表 I-1 を参照。

第 II 章 東アジア地域に分布するハビタット・ジェネラリスト種
チラカゲロウを対象とした系統進化・系統地理学的研究

II-1. はじめに

現生するあらゆる生物種群は、種分化といった種誕生に至るプロセスや、現在に至るまでの永い期間にわたる棲息環境の変遷に伴い、その分布域の拡大や縮小を繰り返しながら種群を維持してきた。とりわけ地殻変動や気候変化、地史的イベントといった地球環境の変動は、生物種群の分布域の変遷において、大きな影響をもたらしたと考えられる。

日本列島は、後に詳述するが、大陸に起源する「大陸島」の要素と、海底火山などの活動に由来し、大陸とは陸続きにならなかったことのない「海洋島」の要素から構成される。南西諸島なども含む広義の「日本列島」は、南北約 3,000km にもおよぶ長く弧状に配置された島嶼群であり、列島中央には脊梁山脈を有するほか、島嶼や島嶼的環境を有する半島なども含む複雑な地形から構成されている。その気候帯は、緯度や標高傾度に伴って亜熱帯から寒帯まで広がっており、日本列島は平面的かつ標高的に極めて複雑かつ幅広い環境を有している(阿部, 2005; Suzuki et al., 2014)。日本列島内におけるこのような気候帯の変化は、生物種群の分布に大きな影響をもたらすと考えられる。

また、アジア大陸の東縁に位置していたとされる日本列島の原型を構成する陸塊が大陸から離裂するような第三紀の地殻変動に始まり、フォッサマグナによる東・西日本の分断化や第四紀における氷期-間氷期サイクルによる海退や海進、火山活動や山岳形成などの複雑かつ多様な地史的イベントのもとに成立しており、このような地史的イベントも日本列島に棲息する生物相や種群の分布に大きな影響を与えたと考えられている(阿部, 2005; 東城・伊藤, 2015; Tojo et al., 2016)。

近年、分子系統学的研究手法の発展により、日本列島の生物種群の起源や進化プロセスを巡り、大陸に棲息する同一種や近縁種群との遺伝的関連性にまで踏み込んだ精度の高い系統地理学的研究が、多様な生物相を対象として行われるようになってきた。その結果、日本列島の生物相は過去におけるさまざまな地史的イベントや気候変動の影響を強く受け、現在のような分布に至っていることが明らかとなってきた(e.g., Ohdachi et al., 2001, 2004; Sota and

Hayashi, 2007; Tokuda et al., 2010; Li et al., 2011; Futahashi and Sasamoto, 2012; Kato et al., 2013; Sekiné et al., 2013, 2015; Suzuki et al., 2014). 日本列島の生物種群の中には、このような複雑な地史・気候変動プロセスの影響を強く受けてきた種群も多く存在する。一方、日本列島内には、列島広域に分布を成し遂げた広域分布種、さらには大陸にも同一種が棲息するような、いわゆるハビタット・ジェネラリスト種も少なからず存在する。多くの生物種群が地史的イベントや気候による移動・分散の制限や拡大の影響を受けてきた中で、このようなハビタット・ジェネラリスト種群はいかにして分布拡大を可能としてきたのだろうか。

このような背景から、本研究では、日本列島広域(北海道・本州・四国・九州)およびアジア大陸(朝鮮半島, ロシア沿海州, 中国東北部)に分布し、とりわけ日本列島においては、河川の上流から下流にいたる流程広域に分布する水生昆虫のハビタット・ジェネラリスト種であるチラカゲロウ *Isonychia japonica* (カゲロウ目 Ephemeroptera, チラカゲロウ科 Isonychiidae) に注目した。本種はカゲロウ類の中でも、採集・同定が比較的容易な大型種であり(体長約 20mm)、しばしば個体密度や現存量において優占する種であるなど、河川生態学においても重要な種のひとつである。

本研究では、日本列島広域およびアジア大陸東部地域から採集されたチラカゲロウを用いて遺伝子解析を行い、ハビタット・ジェネラリスト種であるチラカゲロウの分子系統地理学的な追究を行うとともに、チラカゲロウが種レベルでの「ハビタット・ジェネラリスト」となり得ている要因について考察する。

II-2. 材料と方法

研究材料および試料からのゲノム DNA の抽出

日本列島広域, 朝鮮半島, およびロシア沿海州の 153 地点より 216 個体のチラカゲロウを採集し、遺伝子解析試料として用いた。外群として、チラカゲロウ科のシマチラカゲロウ *I. shima* と *I. ussurica* およびチラカゲロウ科に近縁な科として扱われているガガンボカゲロウ科

Dipteromimidae のガガンボカゲロウ *Dipteromimus tipuliformis* を使用した。採集した幼生や成虫、亜成虫を 100%EtOH で固定した。形態観察にも供試した一部の試料に関しては 70% EtOH で固定したが、形態観察後には、遺伝子解析用試料として 100%EtOH に置換した。これらの固定試料を、実体顕微鏡下で解剖し、胸部あるいは脚部筋肉の一部を摘出し、ゲノム DNA の抽出を行った。ゲノム DNA 抽出および精製に関しては、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) を用い、製品のプロトコルに準じてゲノム DNA を抽出・精製した。

遺伝子解析

抽出・精製したゲノム DNA を鋳型にミトコンドリア DNA (mtDNA) cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) 領域と 16S rRNA 領域および核 DNA (nDNA) Histone H3 領域と internal transcribed spacer 2 (ITS2) 領域の部分配列を解析した。PCR 反応の酵素には rTaq (TOYOBO, 大阪) を用い、また PCR 増幅には Program Temp Control System PC350 サーマルサイクラー (Astec, 福岡) を用いた。各遺伝子領域における PCR には、表 II-2 に示したプライマーセットを利用した。mtDNA COI 領域の PCR では、94°C 1 分間のプレヒート後、「94°C で 1 分間の熱変性、50°C で 1 分間のアニーリング、72°C で 1 分 30 秒間の伸長」を 1 サイクルとする反応を 35 サイクル行った後、72°C で 7 分間の伸長反応を行い、4°C で保存した。mtDNA 16S rRNA 領域の PCR では、94°C 1 分間のプレヒート後、「94°C で 1 分間の熱変性、50°C で 1 分間のアニーリング、72°C で 1 分間の伸長」を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル行った後、4°C で保存した。nDNA Histone H3 領域の PCR では、94°C 2 分間のプレヒート後、「94°C で 30 秒間の熱変性、60°C で 30 秒間のアニーリング、74°C で 30 秒間の伸長」を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル行った後、74°C で 7 分間の伸長反応を行い、4°C で保存した。nDNA ITS2 領域の PCR では、95°C 1 分間のプレヒート後、「95°C で 1 分間の熱変性、52°C で 1 分 30 秒間のアニーリング、72°C で 2 分間の伸長」を 1 サイクルとする反応を 35 サイクル行った後、72°C で 1 分間の伸長反応を行い、4°C で保存した。

PCR 産物の精製には ExoSAP IT (GE Healthcare, Buckinghamshire) または Illustra ExoStar (GE Healthcare, Buckinghamshire) を用い、シーケンス反応においては BigDye Terminator v1.1 Sequencing Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire) を用いて蛍光ラベリングを行った。これらの反応には Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, California) を用いた。その後、ABI 3130, または ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, California) を用いて塩基配列を解析した。シーケンス後の塩基配列については、ソフトウェア CLC Genomics Workbench (Filgen, 名古屋) を用いて、アセンブリとアライメント作業を行った。解析サンプル間の塩基配列のアライメントにはソフトウェア Clustal W (Thompson et al., 1994) および MEGA ver. 5.02 (Tamura et al., 2011) を用いた。整列した塩基配列を基に、ソフトウェア DnaSP v4.0 (Rozas et al., 2003) を用いてハプロタイプとジェノタイプを決定した。

系統解析

mtDNA の COI 領域および 16S rRNA 領域の塩基配列に基づく系統解析に加え、これらの両配列を結合させて系統解析することに問題がないかを検定するため、領域間の進化速度の有意差の有無を ILD 検定 (Incongruence length difference test; Farris et al., 1995) により検定し、棄却されなかったため ($P=0.98$)、mtDNA COI 領域および 16S rRNA 領域を結合させた配列のデータセット (945-bp) を用いて解析を行った。ILD 検定にはソフトウェア PAUP ver. 4.0 beta10 (Swofford, 2002) を用いた。

整列した塩基配列を基に、近隣結合 (NJ) 法 (Saitou and Nei, 1987)、および最尤 (ML) 法 (Felsenstein, 1981) により分子系統樹を作成した。これらの解析にはソフトウェア MEGA ver. 5.02 (Tamura et al., 2011) を解析ソフトウェアとして用いた。系統樹の各ノード (分岐点) における信頼性を評価するため、ML 法では 1,000 回反復のブートストラップ解析を行った。ML 法を行う際の最適モデル選択には、ソフトウェア MEGA ver. 5.02 (Tamura et al., 2011) を利用した。ML 法における Best-fit ML モデルの結果を以下に示す: mtDNA COI 領域 + 16S rRNA 領域

の結合データセットにおいては T92+G+I; nDNA ITS2 領域においては K2+G; nDNA Histone H3 領域においては T92+G モデルが Best-fit として選択された。またソフトウェア BEAST ver.1.7.1 (Drummond et al., 2012) を用いてベイズ法による分岐図を作成した。ベイズ解析を行う際の塩基置換モデルの選択にはソフトウェア Kakusan4 (Tanabe, 2007) を用い、Schwarz's Bayesian Information (BIC; Schwarz, 1978) により最適モデルの選択を行った: mtDNA COI 領域+16S rRNA 領域の結合データセットにおいては, HKY+G+I; nDNA ITS2 領域においては HKY85+G; nDNA Histone H3 領域においては F81+G が Best-fit として選択された。ベイズ法の MCMC 解析を 1,000,000 世代繰り返し, 2,000 回毎にサンプリングを行い, ソフトウェア Tracer v1.5 (Rambaut and Drummond, 2007) を用いて各パラメーターの確認をした後に, 最初の 10% の世代を定常状態に達していない世代と仮定して解析から除いた。加えて, ベイズ法において各ノードにおける信頼性評価のための事後確率を算出した。遺伝的距離の算出には, ソフトウェア MEGA ver. 5.02 (Tamura et al., 2011) を使用した。

ハプロタイプ多様度・塩基多様度(ヌクレオチド多様度)の算出

ハプロタイプ多様度 (h : Nei, 1973) および塩基多様度(ヌクレオチド多様度, π : Nei and Tajima, 1981) については, ソフトウェア DnaSP v4.0. (Rozas et al., 2003) を用いて算出した。

ミスマッチ分布解析

系統解析(mtDNA COI+16S rRNA 領域の解析)の結果に基づいて区分された各クレードを対象に, 各クレードに位置づけられた集団の歴史性(e.g., 安定維持型, 成長型, ボトルネック型)を比較するため, ソフトウェア Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) を用いてミスマッチ分布解析を行うとともに, 過去に生じた個体数の増減を示す統計値である Tajima's D statistic (Tajima, 1989) と Fu's F_S statistic (Fu, 1997) を算出した。ミスマッチ分布解析における急激な集団拡大の時期の推定を算出するにあたり, 現在, 節足動物で汎用されている 100 万

年あたり 2.69% (Papadopoulou et al., 2010) の塩基置換率を用いた。

地理的距離に対する遺伝的分化の関係性検定(マンテル検定)

mtDNA COI+16S rRNA 領域の解析の結果得られた、各クレードを構成するチラカゲロウにおける採集地点間の地理的距離と遺伝的距離(*p*-distance)に関係性について、ソフトウェア AIS を用いて検出した (Miller, 2005)。またこの関係における有意差検定(マンテル検定)も同じソフトウェアにて実施した。

分岐年代推定

系統解析における各ノード(分岐点)の分岐年代の推定は、ソフトウェア BEAST ver. 1.7.1 (Drummond et al., 2012)を用いて Bayesian relaxed molecular clock による解析を行った。mtDNA COI 領域および 16S rRNA 領域を結合させた配列のデータセットにより解析を行った。塩基置換率は、一般的な節足動物で広く汎用されている Papadopoulou et al. (2010)による 100 万年あたり 2.69%を採用した。BEAST のインプットファイル(.xml)はソフトウェア BEAUti ver. 1.7.1 (part of the BEAST software package) を用いて作成し、uncorrelated lognormal molecular clock による解析を行った。解析は mtDNA COI 領域および 16S rRNA 領域を結合させた全配列長で行い、塩基置換モデルの選択にはソフトウェア Kakusan4 を使い、Schwarz's Bayesian Information Criterion (BIC)より最適なモデルを選択し、HKY+G+I モデルを採用した。ベイズの MCMC 解析は、100,000,000 世代繰り返し、2,000 回毎にサンプリングを行い、ソフトウェア Tracer ver. 1.5 (Rambaut and Drummond, 2007)を用いて各パラメーターの確認をした後に、最初の 10%の世代を定常状態に達していない世代と仮定して解析から除いた。作成した系統樹ファイルについては、ソフトウェア FigTree ver. 1.3.1 (Rambaut, 2009)を用いて編集した。また、ソフトウェア BEAST ver. 1.7.1 (Drummond et al., 2012)を用いて、各クレードごとに Bayesian skyline plot 解析を行い、有効集団サイズの時間スケールにおける変動を推

定した.

解析に用いたチラカゲロウが採集された地点における河川次数と河川集水域面積および河床勾配の計測

遺伝子解析に用いたチラカゲロウが採集された各地点における河川規模を客観的に評価する指標として、河川次数 (stream order) およびその地点の集水域面積と勾配を用いた。河川次数については、以下に詳述するストレーラー (Strahler, 1957) の定義に基づいて行い、国土地理院発行の 2 万 5 千分の 1 の地形図情報を利用して計測した。この Strahler 方法では、支流をもたない最源流の河川を 1 次河川とし、1 次河川同士が合流した場合、それより下流側の流域を 2 次河川、2 次河川同士が合流した場合を 3 次河川というように、同一次数の河川同士が合流するたびに次数を増やしていくものである。次数の異なる河川同士が合流した場合には、それより下流側の河川次数は、大きな河川次数のままとするものである (e.g., 3 次河川に 2 次河川が合流した場合、それらの合流地点よりも下流域は 3 次河川のままとなる)。すなわち、河川次数の数値が大きいほど河川規模が大きいことを意味するものである (ただし、本邦においては、千曲-信濃川水系の下流域などにおいても 7 次河川程度である)。河床勾配については、チラカゲロウが採集された地点に対する標高 \pm 5m の地点間の流路に沿った距離を計測して算出した。これらの河床勾配の計測に加え、チラカゲロウを採集した各地点における集水域面積の計測には、ソフトウェア・カシミール 3D (杉本, 2002, 2010, 2012) を用いた。解析対象とする地図としては、カシミールに掲載されている 5 万分の 1 地形図を用いて測定した。しかし、水系内の上流域や小規模河川においては、適宜 2 万 5 千分の 1 地形図も使用した。

形態比較

チラカゲロウの分子系統解析において大きな遺伝的分化が認められた系統群 (クレード J-D, クレード J-U, およびクレード C) を対象に、形態学的分化が生じているのか否かの比較・検討

を行った。クレード J-D, クレード J-U, およびクレード C に位置づけられたチラカゲロウ個体のうち、オス成虫のみを対象として、チラカゲロウ類における種レベルでの同定における鍵形質 (Key characteristics: Tiunova et al., 2004; 石綿・竹門, 2005) となるオス交尾器 (陰茎および把握器) の形態を観察した。形態観察には実体顕微鏡 SMZ 1500 (Nikon, 東京), および生物顕微鏡 ECLIPSE 80i (Nikon, 東京) を用いた。

II-3. 結果

mtDNA における系統解析

日本列島広域, 朝鮮半島およびロシア沿海州の 153 地点から採集されたチラカゲロウ 216 個体について, mtDNA COI 領域 (573-bp) および 16S rRNA 領域 (375-bp) を解析した。mtDNA COI 領域および 16S rRNA 領域を結合させた配列のデータセット (948-bp) により解析を行い, 計 164 のハプロタイプが検出された。チラカゲロウ種内における mtDNA COI 領域および 16S rRNA 領域の塩基配列には, 塩基の欠失や挿入などといったインデル箇所は全く認められなかった。

これらのハプロタイプ間の類縁性に関して, NJ 法, ML 法, ベイズ法を用いて分岐図を作成した。その結果, いずれの解析手法で作成した分岐図においても, 日本列島内で採集されたチラカゲロウと大陸 (朝鮮半島・ロシア沿海州) 産チラカゲロウ間では遺伝的に大きく分化していること (クレード J vs. クレード C; 図 II-2) が示された。また, 日本列島産のチラカゲロウは, 遺伝的に大きく分化した 2 つのサブクレードから構成されることが明らかとなった (クレード J-D vs. クレード J-U; 図 II-2)。大陸産チラカゲロウが構成するクレード C (朝鮮半島とロシア沿海州の 6 地点 7 個体のチラカゲロウ) からは, 5 ハプロタイプが検出された (表 II-3)。日本列島産チラカゲロウで構成されるクレード J 内に関しては, 遺伝的に大きく分化したサブクレード J-D, J-U から構成され, このうちクレード J-D は日本列島広域 (北海道, 本州, 四国, 九州) の 92 地点から採集された 119 個体のチラカゲロウにより構成され, 83 ハプロタイプが検出された

(表 II-3). 一方, クレード J-U は, 本州, 四国, 九州の 62 地点から採集された 90 個体のチラカゲロウで構成され, 76 ハプロタイプが検出された(表 II-3). ひとつの地点で採集されたチラカゲロウが, クレード J-D を構成する個体とクレード J-U を構成する個体の両方を含んでいるような事例も 7 地点において認められた(採集地点 No. 27, 50, 94, 101, 104, 116, 118; 表 II-1, 図 II-1). すなわち, 本州, 四国, 九州では, 遺伝的に大きく異なる 2 系統が同所的に棲息している地点も複数認められた.

また, クレード J-D を構成するチラカゲロウには, さらに遺伝的に分化した 2 つのサブクレードが検出された(クレード J-DN vs. クレード J-DS; 図 II-2). これらのクレード J-DN, J-DS には, 地理的な分布傾向が認められた. クレード J-DN は, 北海道および本州北東部に位置する地域から採集された(図 II-2). 一方, クレード J-DS は, 本州南西部, 四国, そして九州から採集されたチラカゲロウを中心に構成された(図 II-2).

nDNA における系統解析

日本列島広域および大陸から採集したチラカゲロウのうち, 61 地点 71 個体について, nDNA ITS2 領域の塩基配列(842-bp)を解析した. チラカゲロウ種内における ITS2 領域内の塩基配列には, 塩基の欠失や挿入などといったインデル箇所が認められ, 塩基の欠失や挿入した配列も含めて, 分岐樹を作成した(図 II-3). ITS2 領域の解析の結果, 計 22 のジェノタイプが検出された. ITS2 領域の解析結果では, 日本列島産チラカゲロウにおける mtDNA (COI 領域+16S rRNA 領域)の結果と同様に, 大陸(朝鮮半島・ロシア沿海州)産と日本列島産チラカゲロウ間では遺伝的に大きく分化していること(クレード J vs. クレード C; 図 II-3), さらに, 日本列島産のチラカゲロウは, 遺伝的に大きく分化した 2 つのサブクレードから構成されることが示された(クレード J-D vs. クレード J-U; 図 II-3). さらに, クレード J-D を構成するチラカゲロウでは, 遺伝的に分化した 2 つのサブクレードが検出された(クレード J-DN vs. クレード J-DS; 図 II-3).

加えて、17 個体 (mtDNA の解析の結果、クレード J-D を構成した 8 個体、クレード J-U を構成した 6 個体、そして、大陸から採集された 3 個体) を対象に、nDNA Histone H3 領域の塩基配列 (350-bp) を解析した。その結果、日本列島産チラカゲロウからは 1 ジェノタイプのみが検出され、大陸で採集されたチラカゲロウからは 3 ジェノタイプが検出された (図 II-4)。

分岐年代推定

mtDNA (COI 領域 + 16S rRNA 領域) データに基づく分岐年代推定の結果、日本産チラカゲロウ (クレード J) と大陸産チラカゲロウ (クレード C) の分岐 (ノード X, 図 II-2) は 14.2 百万年前 (以後、百年前を Ma と表記) (95%HPD 9.6-19.8 Ma) と評価された。また、日本列島産チラカゲロウにより構成されたクレード J-D とクレード J-U の分岐 (ノード Y, 図 II-2) は、8.1 Ma (95%HPD 5.3-11.1 Ma) と評価された。クレード J-D のうち、クレード J-DN (北東日本) とクレード J-DS (南西日本) の分岐 (ノード Z, 図 II-2) は、1.2 Ma (95%HPD 0.8-1.7 Ma) と評価された。遺伝的階層ごとの採集地点数、解析個体数、検出ハプロタイプ数の情報に加え、遺伝的多様度 (h)、および塩基多様度 (π) の値を表 II-3 に示した。また Bayesian Skyline Plot 解析の結果から、クレード J-DN およびクレード J-U を構成するチラカゲロウ系統群には急速な集団拡大が生じたことが示唆され、クレード J-DS を構成するチラカゲロウ系統群は近年の安定的な集団の成長を示唆するパターンが認められた (表 II-4, 図 II-5)。

チラカゲロウ種内の遺伝的分化とハビタット特性 (河川次数・集水域面積・河床勾配) との関連性評価

チラカゲロウの mtDNA (COI 領域 + 16S rRNA 領域)、および nDNA (ITS2 領域) を解析した結果、日本列島産のチラカゲロウは、いずれの領域の解析結果においても遺伝的に大きく分化した 2 つのクレード (クレード J-D, クレード J-U) を構成することが明らかとなった。クレード J-D, J-U を構成するチラカゲロウが採集された地点の河川次数と集水域面積、および河床

勾配の結果を表 II-5 に示す.

クレード J-U を構成するチラカゲロウが採集された地点の河川次数は 2.9 ± 1.3 (平均次数 \pm SD), 集水域面積は $225 \pm 447 \text{ km}^2$ (平均集水域面積 \pm SD), 河床勾配は $0.96 \pm 0.91\%$ (平均河床勾配 \pm SD) であった. 一方, クレード J-D を構成するチラカゲロウが採集された地点の河川次数は 4.1 ± 1.2 , 集水域面積は $696 \pm 1127 \text{ km}^2$, 河床勾配は $0.51 \pm 0.53\%$ であった. また河川次数, 集水域面積, 河床勾配のいずれにおいても, クレード間での有意差が認められた (Mann-Whitney U 検定, $p < 0.01$).

以上の結果から, クレード J-U を構成するチラカゲロウはより河川規模の小さな流域で, クレード J-D を構成するチラカゲロウはより河川規模の大きな流域で採集された傾向が示された.

形態比較

日本産チラカゲロウにおける mtDNA (COI + 16S rRNA), および nDNA ITS2 領域の解析の結果, 大きな遺伝的分化として評価された系統群において (クレード J-D, クレード J-U, およびクレード C), それぞれのオス成虫を用いて種識別における分類学的な鍵形質を観察した.

クレード J-D, クレード J-U, およびクレード C に位置づけられたチラカゲロウのいずれにおいても, オスの外部生殖器である陰茎に突起などの付属構造物などは認められず, また, オスの第 9 腹節・腹板後縁には凹み構造が確認され, これらはいずれもチラカゲロウの種における標徴とも合致するものであった. クレード J-D, クレード J-U, およびクレード C を構成するチラカゲロウのオス成虫において, 分類学的鍵形質として扱われてきたような各形態形質の間に何ら差異は認められなかった.

II-4. 考察

大陸産チラカゲロウと日本列島産チラカゲロウ間の遺伝的分化

東アジア地域に広域分布するチラカゲロウにおける遺伝子解析の結果, mtDNA (COI+16S rRNA 領域), nDNA ITS2 領域, および Histone H3 領域のいずれの解析結果においても, 大陸の集団と日本列島の集団の間に遺伝的分化が認められた. クレードJとクレードC間における遺伝的分化は 14.2 Ma (95%HPD: 9.6-19.8 Ma) に生じたと推定された.

日本列島は 2 つの大陸プレート(ユーラシア大陸プレートと北米大陸プレート)と 2 つの海洋プレート(太平洋プレートとフィリピン海プレート)といった計 4 つのプレートがぶつかり合う地域に位置づけられ, これらのプレート間の相互作用により東アジア大陸から離裂された大陸島である (Seno et al., 1993; 図 II-6).

現在の日本列島は, 北海道・本州・四国・九州とその属島など, 多数の大小の島々から構成され, 完全に大陸から隔離されているが, 約 25 Ma まではアジア大陸の一部だったと考えられている(図 II-6a). 古地磁気学的知見からは, 25-15 Ma の期間にかけて現在の東北日本にあたる部分が約 40°反時計回りに回転し, 大陸から分離したことが推察されている. また, やや遅れて南西日本が 22-14 Ma の期間にかけて時計回りに約 45°回転し, このうち 16.1-14.2 Ma の期間は急速に回転したといわれている (Otofujii et al., 1985; Martin, 2011; Mckay, 2012; Schoville et al., 2013; Tojo et al., 2016; 図 II-6b).

大陸および日本列島の両地域にまたがって分布する生物種群の移入・定着の系統地理には, このような大陸から分離して形成された日本列島の地史的な背景が大きく関わっているとされている [e.g., ハンミョウ類 *Cicindela* spp. (Satoh et al., 2004); ガロアムシ類 *Galloisiana* spp. (Schoville et al., 2013); コオイムシ類 *Appasus japonicus* と *A. major* (Suzuki et al., 2014)]. とりわけ, 朝鮮半島および日本列島の両地域にまたがって分布する生物種群の移入・定着には, 対馬海峡の成立と氷期における陸橋形成が大きく関わっていることも, これまで多くの研究から議論されてきた (e.g., 海浜棲のハンミョウ類, Satoh et al., 2004; トウヨウゾウ

Stegodon orientalis, 河村, 1998). また, 純地質学研究において, 対馬海峡の成立は約 1.55 Ma であるとされている (Osozawa et al., 2012). チラカゲロウの場合, mtDNA (COI+16S rRNA) 領域の解析の結果, 大陸産と日本産チラカゲロウの系統群間の遺伝的分化は大きく, その分岐年代は 14.2 Ma と推定された. チラカゲロウにおける大陸集団と日本列島集団の遺伝的分化の程度から, 対馬海峡の形成や間氷期の陸橋解消によるものではなく, それよりも古い時代における地質的なイベントとしての大陸からの日本列島の分離 (約 15 Ma 以前) が遺伝的分化を決定づけたと考えられる. これら系統間の遺伝的分化は日本列島の形成における地質学的なイベントに起因することが示唆された.

日本列島産チラカゲロウ内の遺伝的分化

日本列島広域にわたるチラカゲロウの遺伝子解析の結果, mtDNA の COI と 16S rRNA の複合領域, nDNA ITS2 領域において, 日本列島のチラカゲロウが大きく 2 系統群 (クレード J-D, J-U) から構成されることが明らかとなった.

日本列島内において, 同一種内で遺伝的に大きく分化した複数系統が存在する事例は, 他の生物種群においても報告されており, 遺伝的分化をもたらした要因としては, 主に 4 つの候補が挙げられる. 1) 山岳形成や海峡形成といった地理的イベント等の影響により, 日本列島内において遺伝的分化が生じた [e.g., カワトンボ類 *Mnais costalis* と *M. pruinosa* (Hayashi et al., 2005); コオイムシ類 *Appasus japonicus* と *A. major* (Suzuki et al., 2014); ハムシ類 *Plateumaris sericea* (Sota and Hayashi, 2007); カジカガエル類 *Buergeria buergeri* (Nishizawa et al., 2011); アカガエル類 *Rana tagoi* (Eto et al., 2012)]. 2) 大陸からの異なる移入ルートを経由して, 日本列島内に遺伝的に分化した系統が移入・定着した (i.e., サハリンや朝鮮半島, 琉球列島を経由) [e.g., ハムシ類 *Plateumaris weisei* (Sota and Hayashi, 2007); トノサマバッタ類 *Locusta migratoria* (Tokuda et al., 2010; Ma et al., 2012)]. 3) 大陸から複数回にわたって日本列島内に移入・定着した [e.g., シジミチョウ類 *Tongeia fischeri* (Jeratthitikul et

al., 2013)]. 4) 古い地史的なイベントである大陸からの日本列島の分離(日本列島形成の初期)に遺伝的分化が生じた [e.g., ゲンジボタル *Luciola cruciata* (Suzuki et al., 2002)].

チラカゲロウの場合, mtDNA (COI+16S rRNA 領域)の解析の結果, クレード J-D および J-U の 2 系統間の遺伝的分化は大きく, 分岐年代は 8.1 Ma と推定された. この頃の日本列島は, 山岳形成が活発かつ広範囲にわたって生じた年代であるとともに (Iijima and Tada, 1990), フォッサマグナの存在により南西日本と北東日本が分断されていた年代でもある. 直接的な要因の推定は困難であるが, 分岐年代推定の結果から, 日本列島形成時以降に, 日本列島内で異所的分化により 2 系統に分岐し, その後, 本州中部(フォッサマグナ近辺)で 2 系統が二次的接触をしたものと考えられる.

チラカゲロウ種内 2 系統群(クレード J-D とクレード J-U)のハビタット選択性

日本列島産チラカゲロウ種内 2 系統群(クレード J-D とクレード J-U)に関して, これら両クレードを構成するチラカゲロウの採集地点における河川規模を示す, 採集地点の河川次数と集水域面積, および採集地点の河床勾配を計測した結果, クレード J-D を構成するチラカゲロウは, 主に河川の中・下流域から採集され, クレード J-U を構成するチラカゲロウは, 主に河川の上流域や小規模河川で採集される傾向が示された(表 IV-5). 河川の上流, 中・下流では, 水生生物の棲息環境(水温, および河川の物理的な特性など)に大きな違いがみられる. このような上流域と下流域における河川環境の違いは, 直接的もしくは間接的に生物のハビタット選択性に大きな影響を与えているとされている(Moyle and Vondracek, 1985). とりわけ流水生態系において, ハビタット特性は多くの種の分布を決定する上で重要な要因とされている. とくに淡水生物では, 河川流程に沿った種分化や流程分布が多数論じられている [ヒラタカゲロウ類 *Epeorus* spp. (Ogitani et al., 2011); モンカゲロウ類 *Ephemera* spp. (Tojo and Machida, 1998; Hwang et al., 2013)]. このような流程分布を決定する要因・背景には, それぞれの種の棲息する河川環境の特性に応じた種の生理的・生態的要因が関連していると考えられる

(Ogitani et al., 2011). チラカゲロウにおいても、クレード J-D と クレード J-U を構成するチラカゲロウ間で、生理・生態学的な特性が異なる可能性も考えられ、今後、このような観点での調査・研究を展開することは、とても興味深いと考えている。

日本列島産チラカゲロウ クレード J-D 内における遺伝的分化

クレード J-D を構成するチラカゲロウは、さらに遺伝的に 2 つの系統群(クレード J-DNとクレード J-DS)から構成されることが明らかとなった(図 II-2, 3). クレード J-DN を構成するチラカゲロウは、主として北東日本から検出され、一方、クレード J-DS を構成するチラカゲロウは、南西日本から検出されている(図 II-2). これら 2 系統群の分布境界は、「糸魚川-静岡構造線」付近であった. このように、日本列島の東-西で遺伝的分化が認められる生物は比較的多く、オオシロカゲロウ *Ephoron shigae* (Sekiné et al., 2013, 2015; 関根・東城, 2015), ゲンジボタル *Luciola cruciata* (吉川ら, 2001), ヤツメウナギ *Lethenteron reissneri* (Yamazaki et al., 2003), カマツカ *Pseudogobio esocinus* (Tominaga et al., 2015), アカハライモリ *Cynops pyrrhogaster* (Tominaga et al., 2013)などが挙げられる. このような糸魚川-静岡線構造線を介して、日本列島の東-西における遺伝的分化がみられる要因としては、主に 3 つの可能性が考えられている. 1) 約 25-15 Ma の大陸からの日本列島の分離において、日本列島の東西で異所的分化が生じた可能性. 2) 約 15-5 Ma の長期にわたって帯状海域であったフォッサマグナによる影響を受け、日本列島の東西で集団の分断が生じた可能性(図 II-6). そして、3) 約 1.8-0.8 Ma に活発であったとされる中部山岳域の形成・存在が集団間の移動分散の障壁となり、日本列島の東-西で集団の分断が生じた可能性.

本研究において、mtDNA (COI+16S rRNA 領域)の解析結果を用いてクレード J-DN および J-DS 間における分岐年代を推定したところ、日本列島の東-西の集団間における遺伝的分化は 1.2 Ma (95%HPD 0.8-1.7 Ma)であると推定された. この年代は上述の 3) にあたる中部山岳域の形成年代とおおよそ一致しており、日本アルプスのような山岳域の形成が、クレード

J-DN とクレード J-DS を構成するチラカゲロウ間の遺伝的分化と深く関連した可能性が示唆された。

本研究の東アジア広域に分布する広域分布するハビタット・ジェネラリスト種チラカゲロウに着目した遺伝子解析の結果、本種が遺伝的に異なる複数の系統により構成されることが明らかとなった。各系統はそれぞれの地域レベルでの分化（水平方向での分化）および流程内における上・下流での分化（垂直方向での分化）という異なる 2 つの軸に因る分化傾向が認められ、山岳形成や水系の連結・分断などの地史的な要因や、さらには、河川環境の変化といった生態的要因によりそれぞれの系統が進化したと考えられる。このような異なる進化プロセスをもつ複数の系統群が二次的接触をしたり、またその分布域がオーバーラップするなどして、結果としてはチラカゲロウがハビタット・ジェネラリスト的な分布を維持していると考えられる。

表II-1. 遺伝子解析に用いたサンプルの採集地点情報と検出された遺伝子型 (ハプロタイプ/ジェノタイプ)

採集地点					ハプロタイプ/ジェノタイプ				
No.	県/州	市/町/村	河川名	緯度(N)	経度 (E)	16S rRNA	COI	ITS2	Histone H3
チラカゲロウ <i>Isonychia japonica</i>									
日本列島									
1	北海道	千歳市	千歳川	—		JD01	Jdn16		
2	北海道	千歳市	千歳川	42°49.12'	141°38.16'	JD01	Jdn12		
3	北海道	恵庭市	漁川	42°53.45'	141°35.15'	JD11	Jdn12		
4	北海道	恵庭市	イチャンコッベ沢	—		JD01	Jdn12	JDNi5	
5	北海道	下川町	幌内越沢川	44°26.73'	142°41.38'	JD01	Jdn24		
6	北海道	音威子府村	天塩川	44°43.67'	142°15.49'	JD01	Jdn16		
						JD30	Jdn43		
7	北海道	遠軽町	湧別川	44°01.25'	143°28.68'	JD01	Jdn16	JDNi1	JH1
						JD01	Jdn12		
8	北海道	湧別町	湧別川	44°12.05'	143°35.52'	JD01	Jdn12		
						JD01	Jdn12		
9	北海道	新冠町	新冠川	42°25.58'	142°24.89'	JD01	Jdn51	JDNi4	
						JD01	Jdn12		
10	北海道	上土幌町	居辺川	43°14.03'	143°22.47'	JD01	Jdn45	JDNi5	
11	青森県	中泊町	—	—		JD01	Jdn12		
						JD01	Jdn44	JDNi6	
12	岩手県	盛岡市	北上川	39°42.18'	141°08.25'	JD01	Jdn01		
13	岩手県	大船渡市	盛川	39°06.32'	141°41.34'	JD01	Jdn15	JDNi1	JH1
14	岩手県	花巻市	猿ヶ石川	39°21.91'	141°12.94'	JD01	Jdn38		
15	岩手県	一関市	砂鉄川	38°59.28'	141°17.05'	JD01	Jdn12		
						JD31	Jdn01		
16	岩手県	雫石町	葛根田川	39°44.67'	140°57.67'	JD01	Jdn05		
						JD10	Jdn20		
17	岩手県	九戸村	瀬月内川	40°14.92'	141°24.98'	JD01	Jdn01		
18	秋田県	大館市	長木川	40°16.88'	140°33.81'	JD01	Jdn16		
19	秋田県	大館市	米代川	40°13.54'	140°35.40'	JD01	Jdn17	JDNi1	JH1
20	秋田県	横手市	横手川	39°19.41'	140°33.76'	JD01	Jdn01		
21	宮城県	仙台市	広瀬川	38°13.97'	140°53.43'	JD01	Jdn40		
22	宮城県	大崎市	江合川	38°44.41'	140°44.44'	JD01	Jdn01		
23	宮城県	加美町	田川	38°37.94'	140°42.83'	JD01	Jdn10		
24	山形県	鶴岡市	赤川	38°43.21'	139°50.89'	JD01	Jdn01		
						JD01	Jdn09	JDNi1	
25	山形県	酒田市	最上川	38°53.47'	139°54.76'	JD01	Jdn41		
26	福島県	福島市	摺上川	37°54.90'	140°25.52'	JD01	Jdn30		
						JD06	Jdn13	JDNi1	
27	福島県	いわき市	上遠野川	37°00.38'	140°44.83'	JD01	Jdn01	JDNi1	
						JU01	Ju34	JUi2	
28	福島県	いわき市	鮫川	36°59.07'	140°43.86'	JD01	Jdn01		
						JD08	Jdn04		
29	福島県	いわき市	夏井川	37°08.63'	140°50.18'	JD08	Jdn03		
30	福島県	伊達市	広瀬川	37°51.25'	140°36.16'	JD01	Jdn02	JDNi1	
31	福島県	棚倉町	久慈川	37°01.41'	140°22.26'	JD01	Jdn46		
32	福島県	矢祭町	久慈川	36°54.33'	140°25.02'	JD32	Jdn48		
33	茨城県	常陸大宮市	那珂川	36°33.82'	140°16.59'	JD01	Jdn01		
34	茨城県	大子町	久慈川	36°44.82'	140°23.07'	JD01	Jdn27		
35	茨城県	小美玉市	巴川	36°14.18'	140°20.58'	JD01	Jdn47		
36	栃木県	鹿沼市	武子川	36°33.26'	139°48.06'	JD01	Jdn01		
37	栃木県	日光市	大谷川	36°44.01'	139°41.07'	JD01	Jdn01		
38	栃木県	那須塩原市	箒川	—		JD01	Jdn05		
39	栃木県	さくら市	鬼怒川	36°40.93'	139°57.73'	JD07	Jdn22		
40	栃木県	那珂川町 1	那珂川	36°44.80'	140°08.31'	JD01	Jdn21		
						JD01	Jdn37		
41	栃木県	那珂川町2	箒川	36°47.03'	140°07.41'	JD01	Jdn23		
						JD01	Jdn01		
42	栃木県	益子町	小貝川	36°26.54'	140°08.79'	JU01	Ju34		
43	群馬県	前橋市	利根川	36°23.83'	139°03.10'	JD01	Jdn42		
44	埼玉県	熊谷市	荒川	—		JD01	Jdn35		
45	埼玉県	秩父市	荒川	—		JD01	Jdn34	JDNi1	JH1
46	埼玉県	日高市	高麗川	35°53.95'	139°19.61'	JD01	Jdn01		
47	千葉県	君津市	小櫃川	35°12.13'	140°08.29'	JD01	Jdn19	JDNi1	
						JD03	Jdn54		

48	千葉県	市原市	養老川の支川	35°15.40' 140°08.81'	JD01	Jdn32	
					JD01	Jdn33	
49	千葉県	大多喜町	養老川	35°14.97' 140°09.78'	JD01	Jdn31	
50	東京都	世田谷	多摩川	35°36.60' 139°37.53'	JD01	Jdn09	
					JU01	Ju32	JUi2
51	東京都	日野市	日野用水	35°41.01' 139°23.25'	JD08	Jdn28	
52	神奈川県	相模原市	串川	35°33.52' 139°15.35'	JD01	Jdn29	
					JD01	Jdn16	
53	神奈川県	秦野市	金目川の支川	35°23.04' 139°14.17'	JD01	Jdn04	
54	神奈川県	秦野市	金目川	35°23.23' 139°13.57'	JD01	Jdn18	
					JD01	Jdn11	
55	新潟県	新発田市	加治川	37°56.91' 139°22.03'	JD01	Jdn25	
56	新潟県	佐渡市	国府川の支流	38°01.43' 138°22.01'	JD33	Jdn53	JDNi2
57	新潟県	佐渡市	羽茂川	37°54.34' 138°23.45'	JD34	Jdn52	JDNi1
58	新潟県	佐渡市	久知川	38°03.79' 138°28.21'	JD34	Jdn52	JDNi1
59	新潟県	佐渡市	西三川川	37°53.90' 138°17.73'	JD01	Jdn39	JDNi3
60	新潟県	魚沼市	魚野川	37°15.28' 138°55.42'	JD01	Jdn25	
					JD12	Jdn07	
61	新潟県	阿賀町	阿賀野川	—	JD01	Jdn41	
62	富山県	小矢部市	渋江川	36°37.96' 136°50.08'	JD35	Jds17	
63	石川県	白山市	手取川の支川	36°28.53' 136°37.03'	JU13	Ju01	
					JU20	Ju09	JUi1
64	福井県	勝山市	九頭竜川	—	JD17	Jds14	
65	山梨県	山梨市	笛吹川	35°40.27' 138°40.27'	JD01	Jdn36	
66	山梨県	甲斐市	釜無川	35°39.56' 138°30.29'	JD01	Jdn26	
					JD01	Jdn01	
67	山梨県	都留市	鹿留川	35°30.88' 138°53.11'	JD01	Jdn49	JDNi2
					JD01	Jdn50	JDNi1
68	長野県	松本市	女鳥羽川	36°15.03' 137°58.89'	JD01	Jdn14	
69	長野県	伊那市	大泉川	35°52.24' 137°56.13'	JD08	Jdn08	
70	長野県	塩尻市	奈良井川	35°57.95' 137°48.84'	JD01	Jdn06	
71	長野県	千曲市	千曲川	36°29.71' 138°08.27'	JD01	Jdn01	JH1
72	長野県	小谷村	姫川	36°46.11' 137°54.21'	JD01	Jdn40	JDNi1
73	岐阜県	養老町	牧田川	35°18.79' 136°33.86'	JD21	Jds14	JDSi3
74	静岡県	下田市	稲梓川	34°44.59' 138°56.13'	JU01	Ju34	
					JU27	Ju33	
75	静岡県	伊豆の国市	狩野川	35°01.06' 138°56.18'	JD02	Jdn22	
					JD01	Jdn01	
76	愛知県	犬山市	木曾川	35°22.61' 136°55.48'	JD17	Jds18	JDSi2
					JD13	Jds19	
77	愛知県	新城市	大津谷川	34°59.33' 137°37.28'	JU01	Ju03	
					JU01	Ju17	
78	愛知県	新城市	島田川	34°59.48' 137°29.36'	JU01	Ju15	
					JU01	Ju04	
79	愛知県	新城市	豊川	34°59.40' 137°31.73'	JU01	Ju15	
80	愛知県	豊坂町	相川	35°02.43' 137°43.30'	JU01	Ju01	
					JU25	Ju02	
81	愛知県	豊根村	大入川	35°08.30' 137°41.54'	JU01	Ju06	
					JU26	Ju01	
82	三重県	伊賀市	丸柱川	34°50.31' 136°07.29'	JD16	Jds03	JDSi4
					JD13	Jds01	JDSi2
83	滋賀県	長浜市	高時川	35°28.30' 136°14.75'	JU14	Ju01	JUi5
84	滋賀県	長浜市	姉川	35°24.58' 136°20.03'	JD15	Jds05	JDSi1
85	滋賀県	高島市	麻生川	—	JU01	Ju17	
86	京都府	京都市	鴨川	—	JU01	Ju23	
87	京都府	京都市	桂川	35°00.83' 135°40.87'	JD16	Jds04	
					JD18	Jds14	JDSi4
88	京都府	木津川市	木津川	34°45.02' 135°50.24'	JD28	Jds06	JDSi3
89	京都府	井出町	南谷川	—	JU15	Ju61	
90	大阪府	和泉市	槇尾川	34°27.25' 135°28.45'	JU01	Ju18	JUi1
91	兵庫県	姫路市	菅生川	34°54.16' 134°38.41'	JD17	Jds13	JDSi3
					JD20	Jds13	JDSi4
92	兵庫県	豊岡市	気比川	35°36.92' 134°50.82'	JU01	Ju60	JUi1
					JU01	Ju27	
93	兵庫県	朝来市	市川支川	35°13.18' 134°53.80'	JU01	Ju56	
94	兵庫県	たつの市	揖保川	34°54.48' 134°33.08'	JD27	Jds16	

					JU01	Ju01		
95	兵庫県	福崎町	市川	34°57.92' 134°45.73'	JU01	Ju59	JUi1	
96	奈良県	宇陀市	弁財天川	34°29.88' 136°03.23'	JU01	Ju25		
					JU01	Ju55		
97	奈良県	山添村	名張川	34°41.99' 136°03.59'	JD17	Jds14		
98	和歌山県	和歌山市	阿振川	34°17.68' 135°05.17'	JU01	Ju07		
					JU01	Ju08	JUi1	
99	和歌山県	海南市	貴志川	34°09.88' 135°16.71'	JU21	Ju22	JUi1	
					JU01	Ju01		
100	和歌山県	田辺市	音無川	33°50.46' 135°46.19'	JU01	Ju61	JUi1	JH1
101	和歌山県	橋本市	紀ノ川	34°18.89' 135°36.84'	JD15	Jds13		
					JU01	Ju13		
102	和歌山県	かつらぎ町	高野谷川	34°09.14' 135°32.58'	JU01	Ju22		
					JU01	Ju01		
103	和歌山県	九度山町	丹生川	—	JU19	Ju63	JUi1	JH1
104	島根県	益田市	高津川	34°37.78' 131°47.66'	JD24	Jds08		
					JU01	Ju30		
105	島根県	江津市	江の川	34°57.94' 132°19.94'	JD13	Jds01	JDSi3	
					JD17	Jds13		
106	岡山県	岡山市 1	旭川	34°41.61' 133°56.40'	JD13	Jds01	JDSi3	
					JD15	Jds10	JDSi3	
107	岡山県	岡山市2	宇甘川	—	JD17	Jds13		
108	岡山県	総社市	高梁川	34°38.72' 133°43.73'	JU17	Ju10	JUi1	
109	岡山県	真庭市	旭川	35°04.71' 133°41.53'	JU01	Ju61	JUi1	
					JU01	Ju11		
110	岡山県	真庭市	新庄川	35°06.36' 133°38.90'	JU01	Ju57	JUi1	
					JU22	Ju01		
					JU08	Ju61		
111	岡山県	美咲町	吉野川	—	JU03	Ju14	JUi1	
112	岡山県	新庄村	野土路川	35°13.83' 133°34.67'	JU01	Ju58	JUi1	
					JU16	Ju29	JUi8	
113	広島県	広島市	太田川	34°30.06' 132°30.67'	JD19	Jds12		
114	広島県	三原市	沼田川	34°26.42' 132°57.46'	JU01	Ju31	JUi1	
					JU01	Ju31		
115	山口県	岩国市	島田川	34°05.21' 132°03.73'	JD23	Jds07		
116	山口県	山口市	阿武川	34°20.54' 131°37.59'	JD23	Jds09		
					JU04	Ju22		
117	徳島県	三好市	吉野川	34°01.80' 133°49.09'	JU01	Ju16		
					JU05	Ju19		
118	香川県	まんのう町	土器川	34°11.62' 133°51.26'	JD14	Jds02	JDSi3	
					JU01	Ju12	JUi4	
119	愛媛県	宇和島市	薬師谷川	33°11.70' 132°33.42'	JU12	Ju19		
120	愛媛県	内子町	小田川	33°34.10' 132°48.09'	JU01	Ju62	JUi1	JH1
121	高知県	四万十市	四万十川の支川	32°59.27' 132°55.42'	JU01	Ju21		
122	高知県	安田町	安田川	33°28.38' 133°59.62'	JU01	Ju24	JUi1	
					JU01	Ju28	JUi6	
123	高知県	いの町	勝賀瀬川	33°35.44' 133°21.86'	JU01	Ju20		
124	福岡県	添田町	彦山川	33°32.57' 130°51.72'	JU01	Ju39	JUi1	
125	佐賀県	佐賀市	嘉瀬川	33°25.50' 130°16.69'	JU01	Ju45		
					JU30	Ju47		
126	長崎県	佐世保市	佐々川	33°15.72' 129°44.39'	JU31	Ju48		
127	熊本県	八代市	深水川	32°27.68' 130°39.80'	JU01	Ju43		
					JU01	Ju41		
					JU01	Ju43		
					JU02	Ju43		
128	熊本県	阿蘇市	菊池川	32°58.77' 130°59.57'	JU01	Ju45		
					JU20	Ju26		
129	熊本県	甲佐町	緑川	32°41.98' 130°46.81'	JD24	Jds20		
					JD22	Jds15		
130	熊本県	菊陽町	白川	32°51.23' 130°51.57'	JU01	Ju44		
					JU23	Ju46	JUi1	JH1
131	熊本県	水上村	蓑谷川	32°18.63' 131°02.89'	JU01	Ju39		
132	大分県	大分市	大分川	33°11.89' 131°33.90'	JU01	Ju43		
133	大分県	中津市	山国川	33°33.62' 131°11.65'	JU01	Ju42		
134	大分県	日田市	大山川	—	JU24	Ju46	JUi1	
					JU09	Ju53	JUi1	JH1

135	大分県	日田市	川原川	33°06.79' 130°57.71'	JU06	Ju45		
136	大分県	日田市	三隈川	33°18.17' 130°57.01'	JD15	Jds16		
137	大分県	佐伯市	田代川の支川	32°52.60' 131°38.12'	JU01	Ju51	JUi3	
138	大分県	玖珠町1	日出生川	33°19.45' 131°15.24'	JU01	Ju52		
					JU01	Ju54		
139	大分県	玖珠町2	玖珠川	33°16.82' 131°09.25'	JU01	Ju49		
140	大分県	玖珠町3	森川	33°18.07' 131°09.67'	JU18	Ju45	JUi1	
141	宮崎県	延岡市	五ヶ瀬川	32°33.82' 131°32.13'	JD17	Jds11	JDSi3	JH1
142	宮崎県	木城町	小丸川	32°09.63' 131°28.26'	JU01	Ju41	JUi7	
143	宮崎県	綾町	大淀川の支川	—	JU01	Ju50	JUi3	
					JU01	Ju40		
144	鹿児島県	鹿屋市	苦野川	31°16.68' 130°52.47'	JU09	Ju37	JUi3	
145	鹿児島県	南九州市	野崎川	31°25.06' 130°27.96'	JU01	Ju37	JUi3	JH1
146	鹿児島県	肝付町	二又川	31°14.59' 130°57.52'	JU01	Ju38		
147	鹿児島県	錦江町	雄川	31°09.37' 130°51.94'	JU10	Ju36	JUi1	
					JU11	Ju35		
ロシア沿海州								
148	Primorsky	Novoneghnino	Sunknodol river	43°13.61' 132°32.65'	C01	c01	Ci2	CH2
朝鮮半島								
149	Gangwando	Yangyang	Bangtae stream	38°04.53' 128°26.58'	C02	c03		CH1
150	Gangwando	Inje	Bangtae stream	—	C02	c03		CH1
151	Gangwando	Inje	Bangtae stream	37°58.12' 128°25.25'	C02	c03	Ci4	
					C06	c03	Ci3	
152	Gangwando	Samcheog	Maeup stream	37°19.44' 129°12.62'	C07	c04		
153	Gangwando	Yeongweol	Sukhang stream	37°10.31' 128°32.47'	C09	c02	Ci1	
シマチラカゲロウ <i>Isonychia shima</i>								
日本列島								
154	北海道	帯広市	札内川	42°52.91' 143°12.13'	S02	s01		SH1
155	北海道	せたな町	後志利別川の支流	42°25.48' 140°01.20'	S01	s02		
22	宮城県	大崎市	江合川	38°44.40' 140°44.43'	S01	s01		
					S01	s01		
					S01	s04	Si1	
61	新潟県	阿賀野市	阿賀野川	37°44.23' 139°18.86'	S03	s01	Si2	
					S01	s01		
<i>Isonychia ussurica</i>								
朝鮮半島								
156	Chungcheongbuk	Yeongdong	Geum river	36°09.54' 127°41.27'			Ui2	UH1
							Ui1	

表 II-2. 本研究で使用したプライマー情報

遺伝子領域	F/R	配列 (5'→3')	引用文献
COI	Forward	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC	Simon et al. (1994)
	Reverse	GTAAATATATGRTGDGCTC	Prendini et al. (2005)
16S rRNA	Forward	TTACGCTGTTATCCCTAA	Tojo and Matskawa (2003)
	Reverse	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Tojo and Matskawa (2003)
ITS2	Forward	GAATTGCAGGACACATGAAC	Original this work
	Reverse	TCCTCCGCTTACTAATATGC	Original this work
Histone H3	Forward	ATGGCTCGTACCAAGCAGACGGC	Ogden and Whiting (2005)
	Reverse	ATATCCTTGGGCATGATGGTGAC	Ogden and Whiting (2005)

表 II-3. mtDNA COI 領域および 16S rRNA 領域 (945-bp) の解析結果
に基づく各クレードの遺伝的多様性

	N	Hp	S	h	π
クレード C	7	5	6	0.857	0.0030
クレード J	209	159	147	0.993	0.0578
クレード J-D	119	83	92	0.980	0.0120
クレード J-DN	89	58	69	0.965	0.0050
クレード J-DS	30	25	23	0.984	0.0088
クレード J-U	90	76	62	0.995	0.0067

N: 解析個体数

Hp: 検出されたハプロタイプ数

S: 採集地点数

h : ハプロタイプ多様度

π : 塩基多様度

表 II-4. 各クレードにおけるミスマッチ分布解析および Tajima's D , Fu's F_S , Mantel テストの結果

	N	Hp	τ	θ_0	θ_1	T (Ma)	SSD	R	D	F_S	Mantel テスト
クレード J-D	119	83	1.60	10.76	422.6	0.06	0.0170	0.0047	-1.41*	-24.27**	0.476
クレード J-DN	89	58	4.70	0.79	22.2	0.18	0.0009	0.0076	-2.04**	-25.59**	0.023
クレード J-DS	30	25	7.83	2.21	32.2	0.31	0.0043	0.0087	-1.45	-13.13**	-0.072
クレード J-U	90	76	3.16	2.90	99999.0	0.12	0.0022	0.0090	-2.15	-25.12**	0.238**

N: 解析個体数

Hp: 検出されたハプロタイプ数

τ : 母集団サイズ急増期間を表わす推定値

θ_0 : 集団急増前の集団サイズ

θ_1 : 集団急増後の集団サイズ

T: 集団の急増年代

SSD: 偏差平方和

R: raggedness index

D: Tajima's D

F_S : Fu's F_S

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

表 II-5. クレード J-D, J-U を構成するチラカゲロウが採集された地点の河川次数, 集水域面積および勾配

		クレード J-D	クレード J-U
N		75	48
採集地点における河川次数	平均値±S.D.	4.1±1.2*	2.8±1.4*
	最大値	7	5
	中央値	4	3
	最小値	2	1
	N		75
採集地点における集水域面積	平均値±S.D.	696±1127km ² *	225±447km ² *
	最大値	6,572km ²	2,118km ²
	中央値	255km ²	28km ²
	最小値	3.7km ²	0.4km ²
	N		53
採集地点における勾配	平均値±S.D.	0.51±0.53*	0.96±0.91*
	最大値	2.17	4.04
	中央値	0.28	0.72
	最小値	0.06	0.04

N: 解析に用いた地点数

*: P<0.01 (Mann-Whitney U テスト, P<0.01)

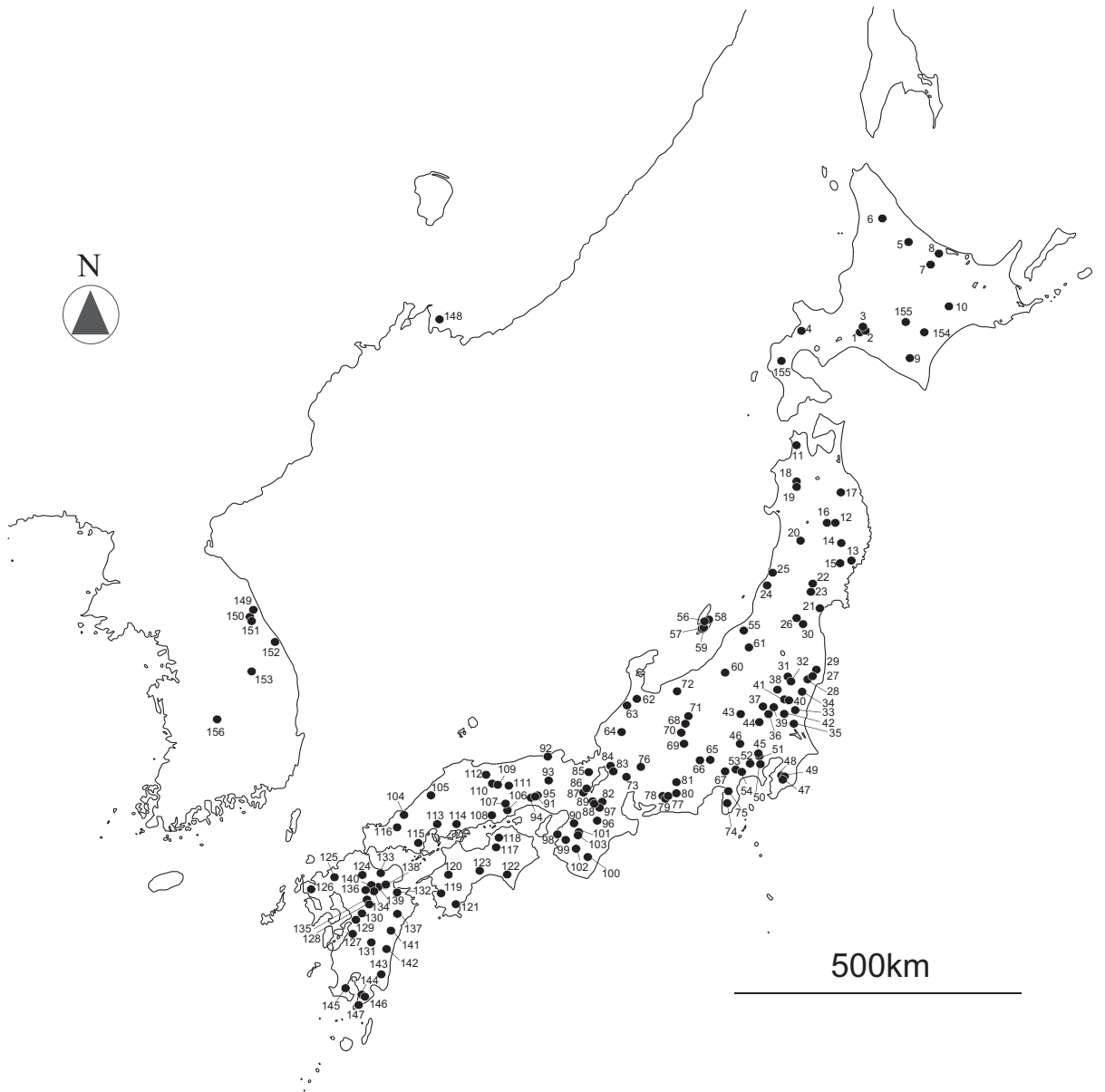


図 II-1. 本研究で用いた遺伝子解析サンプルの採集地点
 地点番号とその詳細な産地情報については表 II-1 を参照。

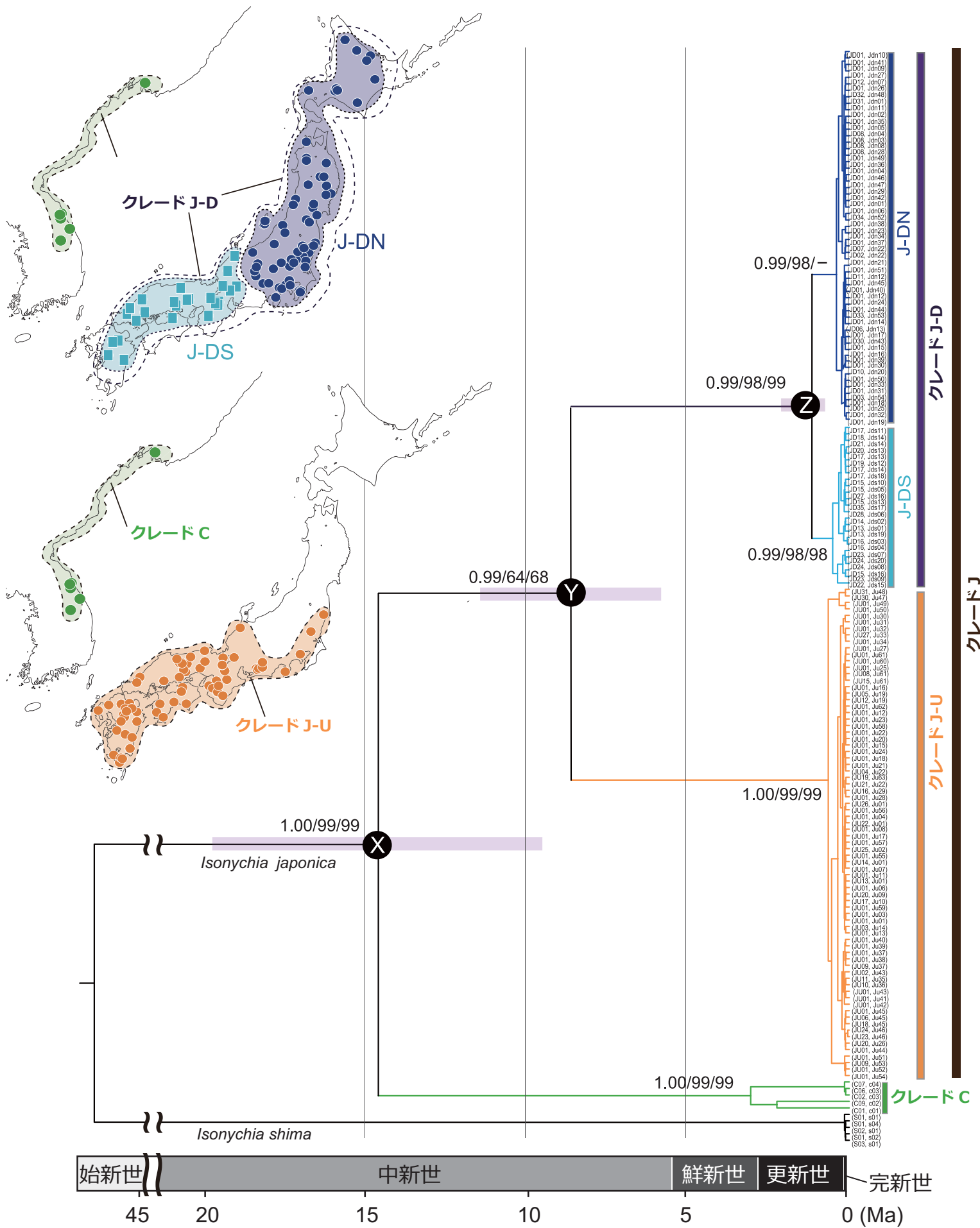


図 II-2. (説明は次頁)

図 II-2. mtDNA COI 領域 (573-bp) および 16S rRNA 領域 (375-bp) において検出された各ハプロタイプ間の類縁関係について Beast 解析し得られた分岐図

各ノードの数値はベイズの事後確率およびNJ法とML法におけるブートストラップ値を示す。各 OTU 名にハプロタイプ番号と検出された個体数を示した。検出されたハプロタイプと産地情報の対応については表 II-1 を参照。ノード X, Y, Z における分岐年代の 95%信頼区間をピンク色のバーで示す。

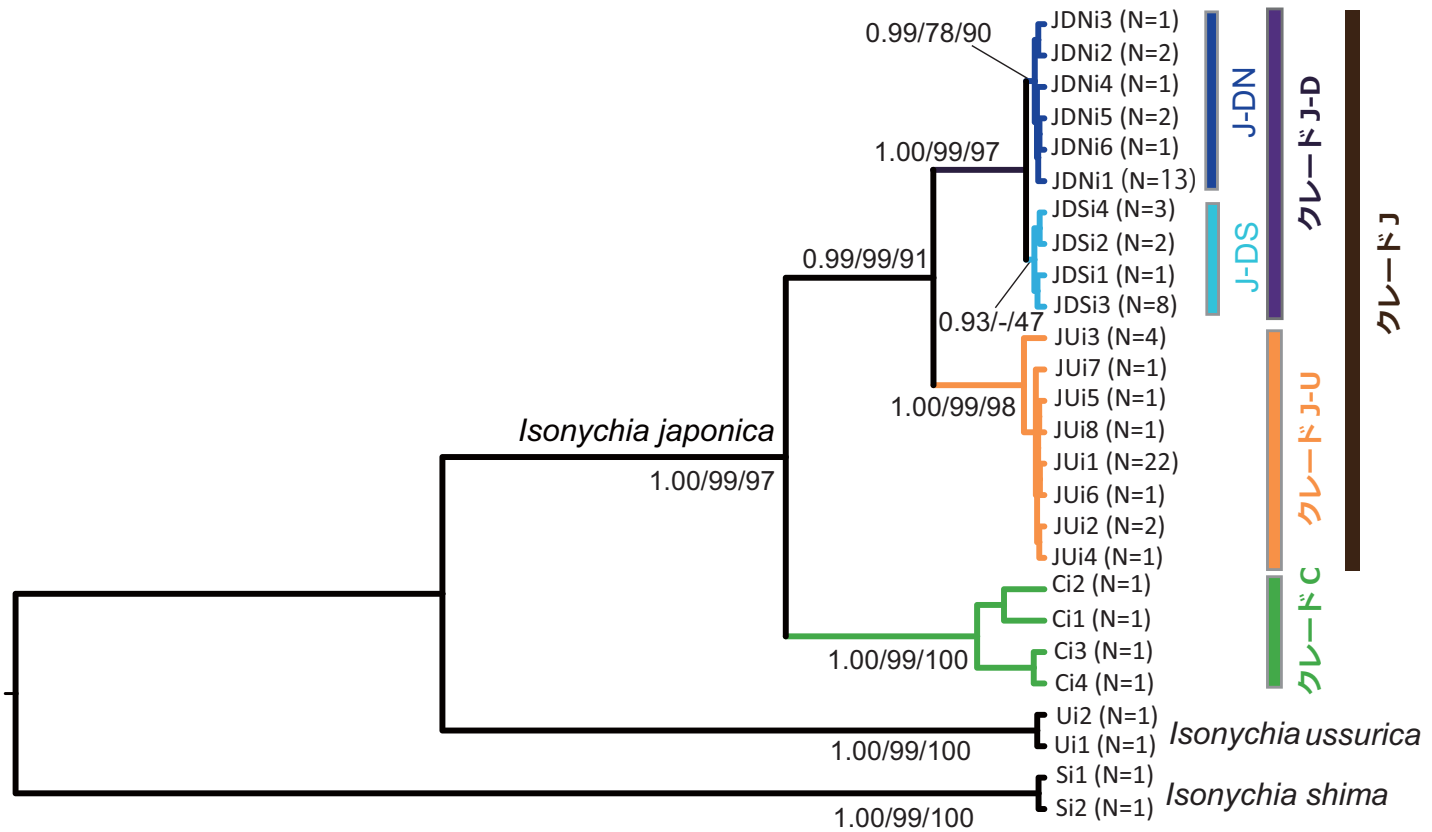


図 II-3. nDNA ITS2 領域 (842-bp) において検出された各ジェノタイプ間の類縁関係について Beast 解析し得られた分岐図

各ノードの数値はベイズの事後確率およびNJ法とML法におけるブートストラップ値を示す。各 OTU 名にはジェノタイプ番号と検出された個体数を示した。検出されたジェノタイプと産地情報の対応については表 II-1 を参照。

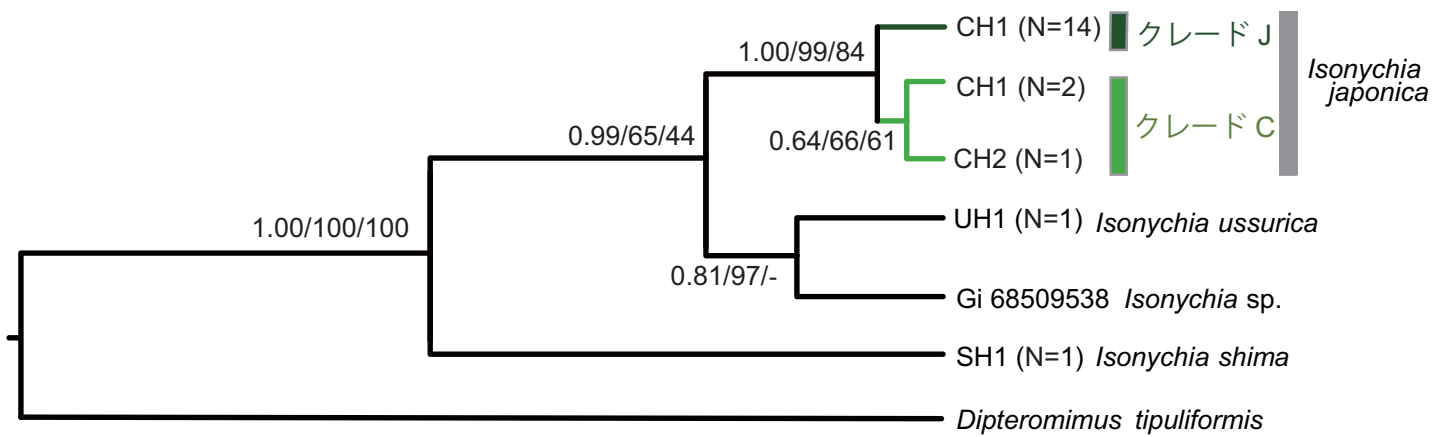
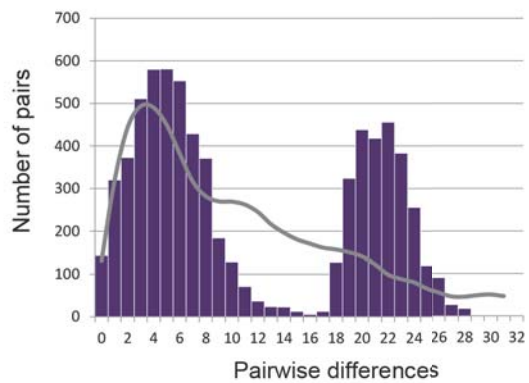
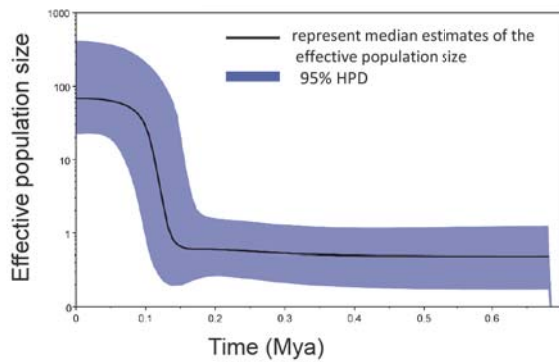


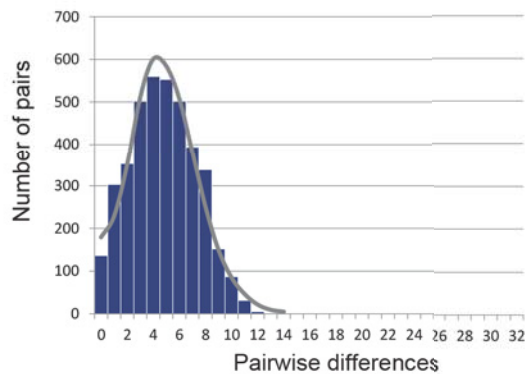
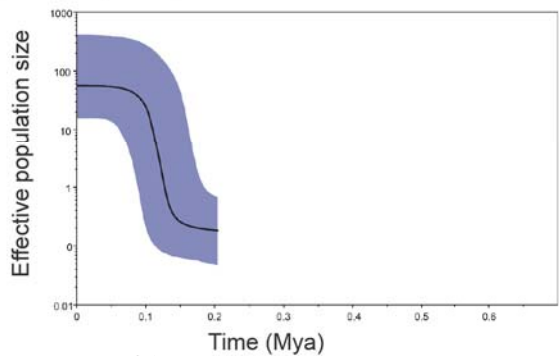
図 II-4. nDNA Histone H3 領域 (350-bp) において検出された各ジェノタイプ間の類縁関係について
Beast 解析し得られた分岐図

各ノードの数値はベイズの事後確率およびNJ法とML法におけるブートストラップ値を示す。各 OTU 名にはジェノタイプ番号と検出された個体数を示した。検出されたジェノタイプと産地情報の対応については表 II-1 を参照。

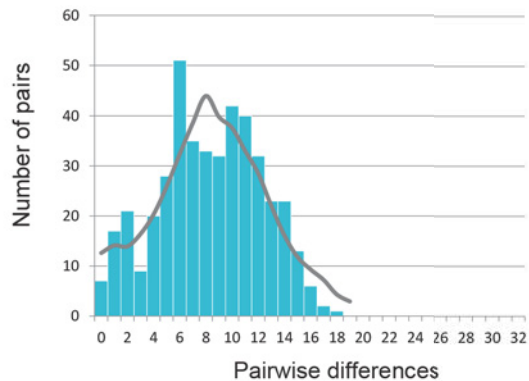
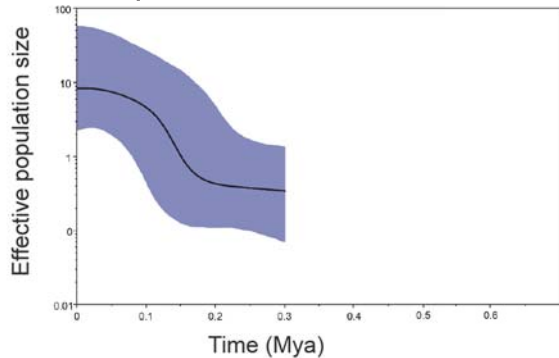
(a) クレードJ-D



(b) クレードJ-DN



(c) クレードJ-DS



(d) クレードJ-U

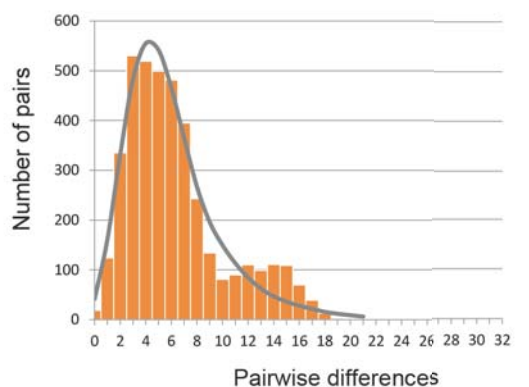
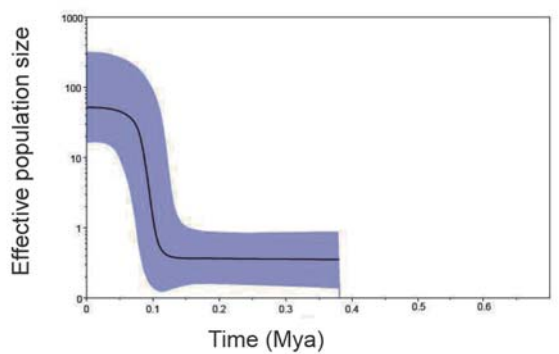


図 II-5. 各クレード(J-D, J-DN, J-DS, J-U)におけるBayesian skyline plot解析(左図)およびミスマッチ分布(右図)の結果

mtDNA COI領域 (573-bp) および16S rRNA領域 (375-bp) を結合した塩基配列のデータセットを用いて解析した。棒グラフが実測値を示し、実線は母集団サイズの急増モデルによる予測を示す。

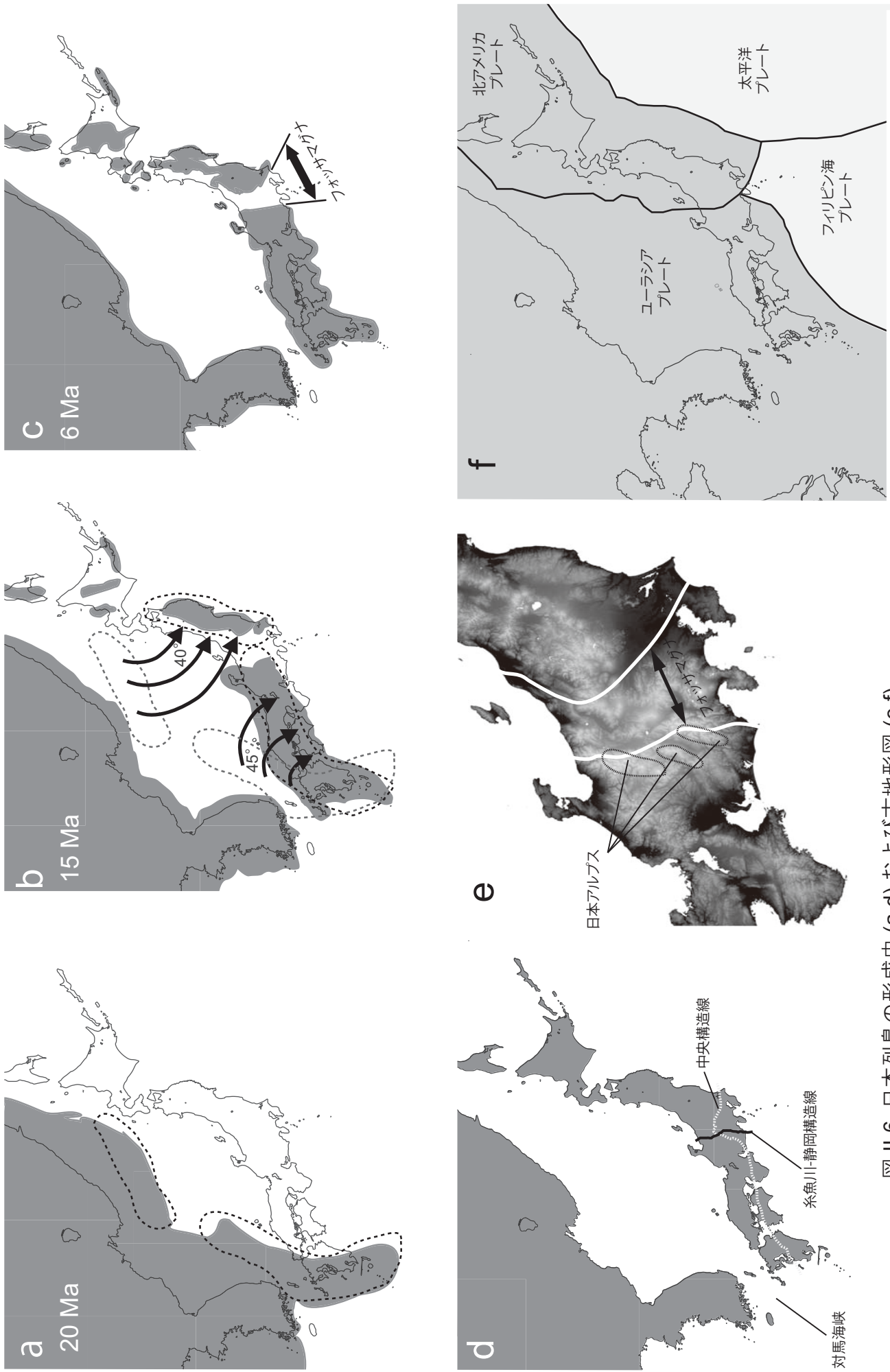


図 11-6. 日本列島の形成史 (a-d) および古地形図 (e-f)

Otofuji et al. (1985), Kano et al. (1991), Seno et al. (1993) Machida et al. (2006), Sekiné et al. (2013) を参考に作成した。

第 III 章 日本列島内で検出されたチラカゲロウ内の
2 系統群における分布特性とハビタット選択性

III-1. はじめに

遺伝子流動の遮断が長期にわたって継続されることで分集団間での遺伝的分化は進行し、この結果として、表現型や生理・生態的な形質などにも分化が生じ、やがては種分化が引き起こされる(Nosil and Feder, 2012; Schield et al., 2015). 生物を取り巻く外的な環境要素は、その生物における生活史や生理・生態といった特性と深く関連しており、それぞれの生物種群における生活史において、最適な環境や利用可能な環境の範囲が決定される. そのため、外的な環境要素は生物種群の集団構造と遺伝子流動の変遷において重要な役割を担っている. ある生物集団が異なる外的環境へ適応・進出することは、種分化を引き起こす要因のひとつであると考えられており、このような環境特性の違いが、集団間の分断・分化、さらには自然選択をもたらす主要因となることがある(Nosil, 2012; Theis et al., 2014).

集団ごとに異なる地域環境への適応が生じることは、生態学的種分化に向けた初期段階であるともいわれている. このような集団レベルでの新規環境への適応や進出機構の解明は、種分化機構を理解する上でも重要である(Clowers et al., 2015; Dowle et al., 2015). Lens (2015) は、「生物がいかにして地域環境に適応しているのか」を理解することは、分子生態学における重要なゴール(Key goal)のひとつであり、異なる環境下に棲息する集団がそれぞれに地域適応することは、種分化における主要な原動力であるとして、種分化機構を解明する上でとても興味深い課題であるとしている.

本研究の第 II 章において、ハビタット・ジェネラリスト種であるチラカゲロウ *Isonychia japonica* の分子系統地理学的な追究を行った結果、日本列島のチラカゲロウが大きく 2 系統群(クレード J-D, J-U)から構成されることが明らかとなった. つまり、チラカゲロウ種内における隠れた遺伝的多様性の実態が明らかとなった. さらに、これら日本列島産チラカゲロウ種内の 2 系統群(クレード J-D, クレード J-U)に関して、両クレードを構成するチラカゲロウの採集地点における河川規模を示す、採集地点の河川次数と集水域面積、および採集地点の河床勾配を計測した結果、クレード J-D を構成するチラカゲロウは主に河川の中・下流域(大きな河川次

数, 大きな集水域面積, 緩やかな河床勾配である地点)から採集され, クレード J-U を構成するチラカゲロウは主に河川の上流域や小規模河川(小さな河川次数, 小さな集水域面積, 比較的急な河床勾配である地点)で採集される傾向が示された. つまり, チラカゲロウ種内において, 異なるハビタットへの適応や進出を成し遂げた種内系統群が存在している可能性が示唆された. チラカゲロウが棲息する「河川系 river system」は様々な要素のハビタットが空間的に配置されたネットワーク構造として捉えられ, 上流から下流にかけて河川ハビタットの環境や質は階層的に, かつ劇的に変化する(Campbell, 2013; Miyazono et al., 2013). ひとつの連続した環境下でありながら, 上流から下流にかけて大きく変遷する河川環境下において, 各クレードを構成するチラカゲロウはどのような環境適応・分布をしているのか, 両系統間で明瞭な「ニッチ分化 niche differentiation」が生じているのであろうか. さらには, これら系統間には, 遺伝子流動あるいは生殖的隔離は生じているのか. 本研究では, 第 II 章において検出された日本列島のチラカゲロウが大きく2系統群(クレード J-D, J-U)から構成される事実に着目し, 両系統が混生していることが確認されている水系で, かつ, 両系統共に高密度で棲息していることが確認されている岡山県の旭川水系を調査対象とし, 連続する河川系における両系統(クレード J-D, J-U)それぞれの分布特性およびそのハビタット特性(環境特性)の関係性について詳細に検討することを目的とした.

III-2. 調査地および材料と方法

調査地

本研究では, 岡山県の旭川水系を調査対象とした. 旭川水系は第 II 章の系統地理学的な研究の際に, 上流域からはクレード J-U を構成するチラカゲロウ(第 II 章の表 II-1, 地点番号 109, 110: 岡山県真庭市)が, 下流域からはクレード J-D を構成するチラカゲロウ(第 II 章の表 II-1, 地点番号 106, 107: 岡山県岡山市)が採集された水系である. 旭川水系は幹川流路長 142km, 流域面積は 1,810km² である. 本研究においては, 旭川本川の全流程と, 水系内の主

要な支流である新庄川, 目木川, および宇甘川を調査対象とした(図 III-1).

旭川本川と主要 3 支川において, 約 10 km 間隔に調査地点を設け, 全 19 地点において調査を実施した(旭川で 10 地点, A1-10; 新庄川で 2 地点, S1-2; 目木川で 3 地点, M1-3; 宇甘川で 4 地点, U1-4; 表 III-1, 図 III-1). 各調査地において採集されたチラカゲロウの系統(クレード J-U, J-D)の分布特性の追求を目的とするため, チラカゲロウの羽化期前にあたる早春季に調査を実施した(2014 年 4 月 20-27 日).

サンプリング方法および採集試料からのゲノム DNA の抽出

旭川水系内に設定した各調査地点において, D フレーム型ハンドネット(間口 0.3m, メッシュ径 1mm)を用いて, 採集の努力量を一定とする(採集時間を一定とした)定量的な水生昆虫採集(3 分間×5 反復)を実施した. ネット内に採集されたサンプルの中から, 現地でチラカゲロウのみを抽出し, 100% EtOH で固定した. これらの採集サンプルのうち, 本研究では, 旭川水系の 17 地点において採集された 173 個体のチラカゲロウを遺伝子解析試料とした. 基本的には各地点あたり 10 個体程度のチラカゲロウを遺伝子解析に用いた.

採集・固定された試料を実体顕微鏡下で解剖し, 胸部あるいは脚部筋肉の一部を摘出し, ゲノム DNA の抽出を行った. ゲノム DNA 抽出および精製に関しては DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) を用い, 製品のプロトコルに準じて行った.

遺伝子解析

抽出・精製したゲノム DNA を鋳型にして, ミトコンドリア DNA (mtDNA) cytochrome c oxidase submit I (COI) 領域と核 DNA (nDNA) internal transcribed spacer 2 (ITS2) 領域の部分配列を解析した. PCR 反応の酵素には rTaq (TOYOBO, 大阪)を用い, また PCR 増幅には Program Temp Control System PC350 サーマルサイクラー (Astec, 福岡)を用いた. 各遺伝子領域における PCR には, 表 III-2 に示したプライマーセットを利用した. mtDNA COI 領域の PCR では,

94°C 1 分間のプレヒート後,「94°Cで 1 分間の熱変性, 50°Cで 1 分間のアニーリング, 72°Cで 1 分 30 秒間の伸長」を 1 サイクルとする反応を 35 サイクル行った後, 72°Cで 7 分間の伸長反応を行い, 4°Cで保存した. nDNA ITS2 領域の PCR では, 95°C 1 分間のプレヒート後,「95°Cで 1 分間の熱変性, 52°Cで 1 分 30 秒間のアニーリング, 72°Cで 2 分間の伸長」を 1 サイクルとする反応を 35 サイクル行った後, 72°Cで 1 分間の伸長反応を行い, 4°Cで保存した.

PCR 産物の精製には ExoSAP IT (GE Healthcare, Buckinghamshire) または Illustra ExoStar (GE Healthcare, Buckinghamshire) を用い, シーケンス反応においては BigDye Terminator v1.1 Sequencing Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire) を用いて蛍光ラベリングを行った. これらの反応には Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, California) を用いた. この後, ABI 3130, または ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, California) を用いて塩基配列を解析した. シーケンス後の塩基配列については, ソフトウェア CLC Genomics Workbench (Filgen, 名古屋) を用いて, アセンブリとアライメント作業を行った. 解析サンプル間の塩基配列のアライメントにはソフトウェア Clustal W (Thompson et al., 1994) およびソフトウェア MEGA ver. 5.02 (Tamura et al., 2011) を用いた.

第 II 章で検出されたクレード J-U, J-D それぞれの系統のチラカゲロウにおける塩基配列をリファレンスとし, 旭川産チラカゲロウの遺伝子解析の結果得られた配列がクレード J-U, J-D のどちらに位置づけられるのかを識別した.

環境因子の計測

クレード J-U およびクレード J-D を構成するそれぞれのチラカゲロウが棲息するハビタットの特性を客観的に評価し, 比較するため, 物理的な環境(標高, 集水域面積, 川幅, 河床勾配, 底質粗度, 早瀬の流速, 平瀬の流速, 開空率)および生物的な環境(クロロフィル a 量, FPOM 量)を計測した. 各環境項目の計測方法を以下に示す.

地理的情報(緯度・経度・標高)

基本的な調査地情報となる緯度および経度等の地理的情報(GPS)は, GARMIN ハンディ GPS eTrex 10(Garmin, Schaffhausen)により計測した. 得られた緯度・経度の情報を基に, ソフトウェア カシミール 3D(杉本, 2010)を用いて標高を計測した.

集水域面積

遺伝子解析に用いたチラカゲロウが採集された各地点における河川規模を客観的に評価する指標として, 集水域面積を用いた. 集水域面積の計測には, ソフトウェア カシミール 3D(杉本, 2010)を用いた. 解析対象とする地図としては, カシミールに掲載されている5万分の1地形図を用いた. しかし, 水系内の上流域や小規模河川においては, 適宜2万5千分の1地形図も使用した.

流速

水の流れの強度(流速)は, 生物が分布・定着する上で, 直接的にも間接的にも大きな影響を与えており, 生物の棲み場を考える上で重要な指標である(沖野, 2002). 各調査地点において, 調査・採集を実施した範囲における早瀬および平瀬の流速を計測した. 早瀬としては主に白波が立っている急流な箇所を選定し, 平瀬には波立ちのあまり目立たない箇所を選定し, それぞれの流速を計測した. 流速の計測には, 電磁流速計 VE-10(ケネック, 東京)を利用した. 早瀬の流速および平瀬の流速をそれぞれ5回計測し, そのうち最大値および最小値を取り除き, 平均値と標準偏差(SD)を算出した.

開空率

藻類食者であるチラカゲロウにとって, 石礫表面に付着する藻類は, 餌資源量として重要な要因のひとつである. その付着藻類の成長にとって光環境は重要な要素となる. また, 羽化後

の成虫の繁殖行動などにおいて、河畔林の存在や開空度などは重要な要素となるほか、河畔林からの落葉・落枝などの河道内への供給は、河道内の有機物供給の面においても重要である。このように、開空度や河畔林の被植度は、直接的あるいは間接的にもチラカゲロウの棲息環境に影響を与えたと考えられる。そこで、全球型魚眼レンズを用いて全天写真を撮影し、開空度合い(開空率)を計測した。Entapano C01 カメラ(インタニヤ, 東京)を用いて全天写真を撮影し、全天写真解析プログラム CanopOn 2 により、開空率を解析した。

河床勾配

河床勾配は、同一水系内の流程における上一下流域の相対的評価において重要な形質である。本研究において、チラカゲロウが採集された地点(各調査地点)を基準としてこの地点に対して標高±5mにあたる地点間の流路に沿った距離を計測して河床勾配を算出した。これらの河床勾配の計測には、ソフトウェア カシミアール 3D(杉本, 2010)を用いた。

河床材料と底質粗度

河床における砂礫構成(サイズ分布)は、河川流程の環境および生物の棲息環境を評価する指標となり得る。本研究では、各調査地の棲息環境の指標として河床状態の評価を行った。0.6m×0.6m のコドラート内に 0.1m 間隔の格子構造をつけ、各格子点(25 交点)に位置する礫サイズを、砂(<2mm)、小礫(2-16mm)、中礫(16-64mm)、大礫(64-256mm)、巨礫(>256mm)、あるいは岩盤の 6 つのカテゴリーに区分して記録し、これらのデータを基に河床の状態を評価した。各調査地点における調査対象域内からランダムに設置した 5 コドラート分の河床状態を判定し、以下の計算式を用いて底質粗度を算出した(Bain et al., 1985; Inoue and Nakano, 1998)。

$$\text{底質粗度} = \text{砂被度} \times 1 + \text{小礫被度} \times 2 + \text{中礫被度} \times 3 + \text{大礫被度} \times 4 + \text{巨礫} \times 5$$

$$(\text{各砂礫サイズ区分の被度} = \text{各区分の検出格子数} / \text{全格子点数})$$

礫付着藻類(クロロフィル a 量)

チラカゲロウの餌資源の一つとして重要な礫付着藻類量の相対的評価を行った。付着藻類量の調査は、チラカゲロウを採集対象域内からランダムに握りこぶしくらいの大きさの礫を 5 つの選定し、それぞれの礫表面 50mm×50mm の方形枠内の全ての付着物を特殊なアクリル繊維 MICRO WIPER(サンアイ, 東京)でこすりとり、10mL の 99.9%のエタノールに浸し、クロロフィルを抽出した。これらの調査手法は、特殊アクリル繊維による付着藻類定量法(谷田ら, 1999)を参考に実施した。その後、採取サンプルを冷暗所で保管し、抽出したクロロフィルを紫外可視分光光度計 V-630 UV-VIS Spectrophotometer (JASCO, 東京)で計測した。99.9%のエタノールをリファレンスとし、波長 750nm, 663nm, 645nm, 630nm で吸光度を計測した。クロロフィル a 濃度(以降, Chl. a 量と表記)はユネスコ法に準じて算出し(西條・三田村, 1995), 単位面積当たりの Chl. a 量を算出した。

河川水懸濁有機物量(FPOM 量)

河川水系内の懸濁有機物量は、河川の平瀬において2-5Lの河川水を採水し、その後にプランクトンネット(メッシュサイズ 40 μ m)を利用して濾過した。濾過した試水(約 300ml)を室内に持ち帰り、あらかじめ 60°C 48 時間で乾燥しておいたガラス繊維濾紙(メッシュサイズ 1.6 μ m; Whatman, 尼崎)を用いて再度濾過した。その後、濾紙を24時間 400°Cで乾燥させ、FPOMの重量を計測し、濾過水量を除いて濃度を算出した。

非計量多次元尺度構成法(NMDS)

各調査地点(全 19 地点)における各地点の環境の類似性を評価するため、各調査地点の物理環境(標高, 集水域面積, 河床勾配, 早瀬の流速, 平瀬の流速, 開空率, 底質粗度), および生物的環境(Chl. a 量, FPOM 量)の値の 4 乗根を算出した後, Bray-Curtis 類似度指数 (Bray and Curtis, 1957)を尺度として非計量多次元尺度構成法 (NMDS: Non-metric

multidimensional scaling)による解析を実施した。解析にはソフトウェア PRIMER v.6 (Clarke and Gorley, 2000)を用いた。

一般化線形モデル(GLM)

クレード J-U およびクレード J-D を構成するチラカゲロウの分布とハビタット特性の関連性を検討するため、各地点におけるチラカゲロウ系統(クレード J-U, クレード J-D)それぞれを構成する幼虫の出現状況(0, 1)を目的変数とし、各地点で計測された環境要因(標高, 集水域面積, 河床勾配, 早瀬の流速, 平瀬の流速, 開空率, 底質粗度, Chl. a 量, FPOM 量)を説明変数とする一般化線形モデル(Generalized linear model: GLM)を構築した。GLM では誤差分布を二項分布, リンク関数をロジットとした。さらに赤池情報基準(AIC: Akaike's information criterion; Akaike, 1973)を用いたモデル選択を行った。これらの解析にはソフトウェア JMP 11.2.0(SAS Institute, Cary, NC)を用いた。

III-3. 結果

旭川水系における流程に沿ったチラカゲロウの遺伝的構造

旭川水系の 17 地点から採集されたチラカゲロウ 173 個体について, mtDNA COI 領域の塩基配列およびnDNA ITS2 領域を解析した。得られた塩基配列(mtDNA COI 領域: 162-610 bp, nDNA ITS2 領域: 737-842 bp)において, 第 II 章で検出されたクレード J-U, J-D の塩基配列をリファレンスとし, 解析の結果得られた配列がクレード J-U, J-D のどちらに位置づけられるのかを識別した。

これらの解析結果を表 III-3 および図 III-2 に示した。上流域からはクレード J-U を構成するチラカゲロウが, 下流域でからはクレード J-D を構成するチラカゲロウが検出される傾向が強く認められた。すなわち, 両系統のチラカゲロウにおける流程分布の傾向が認められた。

旭川本川の A1, A2 地点ではチラカゲロウが採集されず, チラカゲロウが採集された最上流

地点は A3 地点であった。興味深いことに、A3 地点で採集された全ての個体が、クレード J-D に位置づけられた(表 III-3, 図 III-2)。また、旭川本川の A6, A7 地点および宇甘川の U3 地点では、クレード J-U を構成するチラカゲロウ、およびクレード J-D を構成するチラカゲロウがともに採集され、これらの地点においては、両系統が混生していることが明らかとなった(表 III-3, 図 III-2)。これらの地点より上流域ではクレード J-U のチラカゲロウが、これらよりも下流域ではクレード J-D のチラカゲロウが検出された。また、個体レベルで mtDNA と nDNA とで検出される遺伝子系統に齟齬が認められるような事例はひとつもなかった (i.e., mtDNA ではクレード J-D, nDNA ではクレード J-U となるような個体は認められなかった)。

調査地点における環境特性とクレード J-U, J-D を構成するチラカゲロウのハビタットとの関連性

各調査地点における環境データ(標高, 集水域面積, 川幅, 河床勾配, 底質粗度, Chl. a 量, FPOM 量, 早瀬の流速, 平瀬の流速, 開空率)を表 III-3 に示した。また、旭川水系の全調査地点において採集されたチラカゲロウを対象とした遺伝子解析の結果、クレード J-U および J-D が検出されたチラカゲロウが採集された地点における環境項目の平均値と標準偏差を表 III-4 に示した。各環境項目について、一元配置分散分析(one-way ANOVA)を行い、各系統を構成するチラカゲロウが採集された地点を、それぞれ「グループ」として比較した。両クレードが検出された地点(A6, A7, U3)の結果を除いて解析した場合、集水域面積, 河床勾配, 底質粗度において、クレード間で有意性が認められた(ANOVA; 表 III-4)。また、両クレードが検出された地点(A6, A7, U3)の結果を含めて解析した場合においても、標高, 集水域面積, 河床勾配, 底質粗度において、クレード間で有意性が認められた(ANOVA; 表 III-4)。

以上の結果から、クレード J-U を構成するチラカゲロウはより河川規模の小さな流域で、河床勾配が急であり、大きな礫組成(底質粗度が大きな値となる)地点から採集されており、一方、

クレード J-D を構成するチラカゲロウはより河川規模の大きな流域で、かつ勾配が緩やかで、クレード J-U を構成するチラカゲロウが棲息するような地点と比べると、比較的小さな礫組成の(底質粗度が小さな値となる)地点から採集される傾向が示された。

加えて、旭川水系内の各調査地点において計測された各環境特性のデータを基に NMDS を行った結果、クレード J-U を構成するチラカゲロウとクレード J-D を構成するチラカゲロウ間では、ハビタット環境の類似性において異なる傾向が概ね認められた(図 III-3)。しかしながら、旭川本川の最上流地点である A3 地点からは、クレード J-D を構成するチラカゲロウが検出されたものの、この A3 地点のハビタット環境に関しては、クレード J-U を構成するチラカゲロウが採集されている地点により類似する結果となった(図 III-3)。

一般化線形モデル解析による各クレードを構成するチラカゲロウの分布特性とその環境特性

各系統(クレード J-D, J-U)を構成するチラカゲロウ幼虫の出現状況と環境要因との関係を一般化線形モデルにより解析した結果を表 III-5 に示す。両クレードを構成するチラカゲロウが検出された地点(A6, A7, U3)の結果を含める場合／含めない場合、さらには、クレード J-D を構成するチラカゲロウの在／不在、もしくはクレード J-U を構成するチラカゲロウの在／不在を目的変数とした場合のように、考え得る全ての状況を想定し、解析を実施した(表 III-5)。その結果、いずれの解析においても、川幅、集水域面積、河床勾配、底質粗度において有意性が認められた。AIC の値を比較したところ、とりわけ河床勾配のモデルが最適モデルであると考えられた(表 III-5)。

III-4. 考察

本研究により、旭川水系内では、クレード J-U, J-D 両系統を構成するチラカゲロウが同一水系内において流程分布をしている傾向が示された。上流域でクレード J-U, 中・下流域ではクレード J-D を構成するチラカゲロウの存在が認められる傾向が強

確認され、これらの移行帯においては、それぞれのクレードを構成するチラカゲロウが混生していることも明らかとなった。さらに興味深いことに、旭川本川の最上流地点（A-3 地点）では例外として、クレード J-D を構成するチラカゲロウのみが確認された。クレード J-U およびクレード J-D を構成するチラカゲロウが検出されたハビタット特性について、河川の物理的環境（e.g., 集水域面積, 河床勾配, 底質粗度）や生物的環境（e.g., Chl. a 量, FPOM 量）を定量的に計測し、比較した。各系統（クレード J-U, J-D）を構成するチラカゲロウが採集された地点における各環境項目の値について ANOVA により比較したところ、標高, 集水域面積, 河床勾配, 底質粗度において有意性が認められた（表 III-4）。さらに、各系統（クレード J-U, J-D）を構成するチラカゲロウの出現状況と環境要因との関係性について、一般化線形モデル解析（GLM）により検討したところ、河床勾配が最適モデルとして評価され、クレード J-U は比較的河床勾配が急な河川環境、クレード J-D は河床勾配が緩やかな河川環境に分布する傾向が強く支持された。

ここで、旭川水系においてチラカゲロウが採集された最上流域の地点でありながらも、この A3 地点で採集されたチラカゲロウからは、クレード J-D を構成する配列だけが検出されたことに着目してみる。A3 地点は、湯原ダムの上流域に位置しており、ダム湖の存在などにより、河床勾配が緩やかである（河床勾配=0.27）。地理的には水系内の上流域に位置するものの、ダムの（人為的な）影響を受けて、クレード J-D に位置づけられるチラカゲロウが定着したのではないかと考えられる。また、A3 地点においてクレード J-D を構成するチラカゲロウのみが採集されたことについてより詳しく言及すると、A3 地点に分布するチラカゲロウは、ダム形成に伴う環境変化により、上流域に位置しながらも、環境要因としては下流域の地点と類似した要素ももつために（e.g., 緩やかな河床勾配）、定着が可能となった可能性が高いと考えられ、ダム建設（湯原ダム, 1955 年建設）後のここ数十年（約 70 年）の間に分散・定着したものと推察され

る。上流域でほとんど確認されていないクレード J-D が、いかにして(どの流域のクレード J-D を構成するチラカゲロウが供給源 Source となって)この地点に定着したのかを考えると、旭川水系(もしくは近隣の別水系)の中・下流域に分布しているクレード J-D を構成するチラカゲロウのメス成虫が旭川水系の上流域(A3 地点)まで遡上飛翔をし、分散・定着した可能性が高いと考えられる。つまり、クレード J-D を構成するチラカゲロウは潜在的に A3 地点を含めた上流域まで遡上飛翔し得るだけの分散能力を有している可能性が考えられる。しかしながら、クレード J-D を構成するチラカゲロウは A3 地点以外の上流域には定着できていないことや A3 地点にはクレード J-U を構成するチラカゲロウが検出されず、他の上流域の地点ではクレード J-U を構成するチラカゲロウが分布していたことを考慮すると、両系統間で直接的あるいは間接的な競争が生じている／あるいは過去に競争が生じていた可能性も示唆される。

各クレードを構成するチラカゲロウ(クレード J-U, J-D)間での遺伝子流動(生殖的隔離)の可能性

本研究では、旭川水系から採集されたチラカゲロウ 173 個体を対象に、mtDNA COI 領域および nDNA ITS2 領域の解析を行い、クレード J-U, J-D のどちらに位置づけられるのかを識別した。その結果、検出される遺伝子系統に関し、mtDNA と nDNA 間での齟齬(i.e., mtDNA ではクレード J-D, nDNA ではクレード J-U となること、あるいはその逆の組み合わせ)は一斉認められなかった。真核生物では、一般的に mtDNA などのオルガネラ DNA は片親から、nDNA は両親から遺伝することが知られており、このような遺伝様式の異なる DNA 構造を比較することは、系統間における生殖隔離の有無を検討する上で非常に有効であると考えられる(佐藤, 2012; Schield et al., 2015)。本研究の結果、両系統間では、遺伝子流動が生じていないことが明確に示され、生殖的隔離機構が確立されている可能性も示唆された。

異なる生態・形態形質を適応進化させた系統では、他系統の集団との間で生じる

遺伝子交流は、適応を妨げる要因となり、その結果、独立した集団が生じ、集団ごとに異なる進化へと向かっていく(河田, 2003). 本研究で対象としたクレード J-U, J-D を構成するチラカゲロウ間においても、系統ごとに、ハビタット構成要素に強く依存した分布特性が認められたことから、他系統の集団間(クレード J-U と J-D 間)で遺伝子交流することは適応を妨げる可能性が考えられる.

また、本研究において、クレードレベルでの明瞭な流程分布の傾向が認められたことから、仮に系統間(クレード J-U と J-D 間)での交配が生じていたとしても、両系統の環境適応能力の違い等により、卵や幼生期において淘汰されている可能性も考えられる.

生殖的隔離機構には、元の集団から地理的に隔離された生物がその地域に環境適応するうちに、以前とは異なる種へと分化する異所的種分化と、地理的集団内の遺伝的変異に基づく微妙な形態や行動、棲息場所、生活の差異による同所的種分化などが知られる(浅見, 2004). 同所的種分化のメカニズムの基盤については、未だ明確となっていないものの、同所的に棲息する集団間で、ニッチ分化が生じることが生殖的隔離に寄与しているという考えもある(Clowers et al., 2015). 冒頭でも述べた通り、新規環境への進出や適応は、生態学的種分化を考える上で重要な現象である. また、異所的種分化が起きた集団間においても、異所的に分布していた集団が、その後、二次的な接触をしながらも、各集団が異なるハビタットへ適応・進出することもある.

また、生殖的隔離機構を考える上で重要となるのが、「交配前隔離」と「交配後隔離」である. 2 つの集団(系統)間での生殖器形態(交尾器形態)や配偶行動、生活史サイクルが異なっている場合、系統間での交配は生じず、交配前隔離が成立する. 一方で、生存に重要な役割を果たす遺伝子に決定的な違いが生じている場合や、交配後、発生が十分に進まなかった場合は、たとえ交配しても健全な子孫を残すことはできず、淘汰され、交配後隔離が生じると考えられる. 本研究の結果からは、両系統を構成するチラカゲロウ間における生殖的隔離機構のメカニズムについては依然として明らかとなっていない.

本研究により、両系統間のハビタット選択性が明確に示されたことを受け、次なる課題としては、①両系統間の生活史に違いはあるか：両系統を構成するチラカゲロウそれぞれにおける成虫の出現時期を調査し、季節的な生殖隔離機構(季節的棲みわけ)が生じているか、②メス成虫における移動・分散スケールの追究：幼虫の分布域と成虫期における分布域は一致するかどうか、メスの産卵地の選択性の有無を詳細に調査し、成虫期における無効分散が生じているのか、③幼虫期における何らかの生態学的な適応または淘汰により河川流程に沿った2系統間の棲みわけが生じているのか、等を詳しく追究することが挙げられる。さらには、生存に重要な役割を果たす遺伝子(e.g., 生理的特性に強く関わるような遺伝子)に決定的な違いが生じているのか、生理的特性の有無についても興味深い。

本研究の結果から、本種チラカゲロウの2系統(クレード J-U, J-D)は、異なるハビタットへの適応・進出を成し遂げたことで分化した系統群である可能性が強く支持された。本種のハビタット特異性や分布特性は、生態学的種分化にも繋がるとても興味深いものである。生態学的種分化は、種分化の初期段階であるともされ、このような段階にある種は、種分化のメカニズムを究明するモデルとしても有用である(Drew et al., 2015)。

今後、本種チラカゲロウにおける系統間の生殖隔離機構について詳細に追究することで、「種分化のメカニズム」究明にも繋がる重要な知見が得られるものと考えている。

表III-1. 旭川水系における調査地点情報. 地点番号は図III-1と対応する

河川名	地点番号	採集地	県/市/町/村	地点名	緯度(N), 経度(E)	
旭川	A1	岡山県	真庭市	蒜山下徳山	35°18'26.11"	133°37'19.64"
	A2	岡山県	真庭市	蒜山西茅部	35°16'33.60"	133°39'22.60"
	A3	岡山県	真庭市	蒜山下見	35°16'10.50"	133°43'33.60"
	A4	岡山県	真庭市	禾津	35°10'33.48"	133°43'43.52"
	A5	岡山県	真庭市	勝山	35°04'42.24"	133°41'42.52"
	A6	岡山県	真庭市	中島	35°04'22.20"	133°45'09.00"
	A7	岡山県	真庭市	落合垂水	35°01'06.01"	133°45'11.00"
	A8	岡山県	岡山市	建部	34°52'59.30"	133°53'50.10"
	A9	岡山県	岡山市	御津宇垣	34°47'08.88"	133°55'57.21"
	A10	岡山県	岡山市	三野本町	34°41'36.81"	133°56'34.23"
新庄川	S1	岡山県	真庭市	神代	35°06'22.07"	133°38'51.01"
	S2	岡山県	真庭市	荒田	35°04'17.40"	133°40'11.90"
目木川	M1	岡山県	鏡野町	鏡野	35°08'24.69"	133°49'40.75"
	M2	岡山県	真庭市	余野下	35°06'28.50"	133°48'30.00"
	M3	岡山県	真庭市	目木	35°04'35.80"	133°46'50.60"
宇甘川	U1	岡山県	吉備中央町	湯山	34°51'04.60"	133°44'06.20"
	U2	岡山県	吉備中央町	美原	34°52'08.13"	133°46'01.93"
	U3	岡山県	真庭市	御津虎倉	34°49'36.80"	133°50'29.10"
	U4	岡山県	真庭市	御津高津	34°48'18.50"	133°54'56.90"

表 III-2. 本研究で使⽤したプライマー情報

遺伝子領域	F/R	配列 (5'→3')	引用文献
COI	Forward	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC	Simon et al. (1994)
	Reverse	GTAAATATATGRTGDGCTC	Prendini et al. (2005)
ITS2	Forward	GAATTGCAGGACACATGAAC	本研究
	Reverse	TCCTCCGCTTACTAATATGC	本研究

表III-3. 各調査地点における環境データ(標高, 集水域面積, 川幅, 河床勾配, 底質粗度, Chl.a量, FPOM量, 早瀬の流速, 平瀬の流速, 開空率), mtDNA COI領域およびnDNA ITS2領域の塩基配列解析の結果, 得られた各系統の区分(クレードJ-D, クレードJ-U)とそれぞれの系統に位置づけられるチラカゲロウが検出された個体数

地点番号	標高		集水域面積 (km ²)	川幅 (m)	河床勾配	底質粗度		Chl.a量(g/m ²)		FPOM量 (µg/L)		早瀬の流速 (m/S)		平瀬の流速 (m/S)		開空率	遺伝子解析				
	(m)	(m)				Mean ± SD	SD	Mean ± SD	SD	Mean ± SD	SD	Mean ± SD	SD	Mean ± SD	SD		mtDNA (COI)	nDNA (ITS2)	解析個体数	J-U	J-D
A1	556	9	17	2.86	3.87 ± 0.38	0.084 ± 0.098	239 ± 88.0	1.17 ± 0.22	0.57 ± 0.15	0.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A2	454	73	33	0.88	3.74 ± 0.31	0.132 ± 0.051	399 ± 46.1	1.14 ± 0.07	0.54 ± 0.08	1.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A3	409	131	84	0.27	3.34 ± 0.04	0.111 ± 0.010	328 ± 61.6	1.59 ± 0.20	0.90 ± 0.10	1.00	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	
A4	312	339	100	0.63	3.86 ± 0.38	0.188 ± 0.149	485 ± 30.4	1.03 ± 0.22	0.52 ± 0.04	1.00	10	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
A5	190	548	79	0.34	4.10 ± 0.33	0.195 ± 0.094	247 ± 18.9	1.09 ± 0.06	0.42 ± 0.11	1.00	10	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
A6	142	600	137	0.34	3.32 ± 0.28	0.079 ± 0.036	203 ± 29.1	1.52 ± 0.29	0.36 ± 0.10	1.00	10	6	4	6	4	6	4	6	4	6	4
A7	123	776	152	0.20	3.80 ± 0.19	0.108 ± 0.033	236 ± 7.2	1.34 ± 0.09	0.66 ± 0.19	1.00	11	2	9	2	9	2	9	2	9	2	9
A8	65	1184	199	0.23	3.91 ± 0.21	0.193 ± 0.047	300 ± 21.8	1.11 ± 0.02	0.31 ± 0.04	1.00	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
A9	31	1332	216	0.16	3.43 ± 0.25	0.008 ± 0.004	35 ± 15.3	1.03 ± 0.16	0.33 ± 0.03	1.00	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
A10	16	1495	501	0.11	3.02 ± 0.22	0.035 ± 0.012	520 ± 39.7	1.14 ± 0.20	0.30 ± 0.05	1.00	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
S1	318	112	18	2.01	3.85 ± 0.32	0.143 ± 0.042	117 ± 10.3	1.26 ± 0.12	0.69 ± 0.15	0.29	10	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
S2	205	183	36	0.68	3.94 ± 0.50	0.253 ± 0.009	121 ± 16.0	1.30 ± 0.27	0.58 ± 0.10	0.85	10	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
M1	320	40	21	2.26	3.83 ± 0.47	0.013 ± 0.002	297 ± 38.2	0.84 ± 0.02	0.48 ± 0.09	0.64	10	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
M2	232	49	39	1.31	3.79 ± 0.35	0.065 ± 0.031	395 ± 13.2	1.06 ± 0.14	0.43 ± 0.03	0.65	11	11	0	11	0	11	0	11	0	11	0
M3	158	119	66	0.78	3.56 ± 0.16	0.268 ± 0.177	293 ± 15.3	1.20 ± 0.02	0.44 ± 0.07	1.00	10	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
U1	249	6	12	2.10	3.58 ± 0.39	0.068 ± 0.018	222 ± 34.0	0.90 ± 0.08	0.61 ± 0.04	1.00	10	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
U2	198	68	25	1.31	4.25 ± 0.17	0.037 ± 0.043	148 ± 86.1	0.99 ± 0.06	0.52 ± 0.15	1.00	11	11	0	11	0	11	0	11	0	11	0
U3	90	191	57	0.27	4.06 ± 0.32	0.187 ± 0.097	288 ± 2.9	1.16 ± 0.07	0.82 ± 0.09	1.00	10	3	7	3	7	3	7	3	7	3	7
U4	41	229	159	0.30	3.34 ± 0.26	0.023 ± 0.002	262 ± 16.1	1.06 ± 0.12	0.56 ± 0.09	1.00	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10

表III-4. 旭川水系の調査地点において採集されたチラカゲロウを対象として遺伝子解析（mtDNA COI領域およびnDNA ITS2領域）した結果，クレードJ-U，クレードJ-Dを構成するチラカゲロウが採集された地点における各環境項目の平均値と標準偏差

	両クレードが検出されたA6, A7, U3 地点を除いた場合				両クレードが検出されたA6, A7, U3 地点も含めた場合			
	クレード J-U		クレード J-D		クレード J-U		クレード J-D	
	Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD
標高(m)	242	± 61	112	± 167	258	± 85 *	115	± 127 *
集水域面積 (km ²)	163	± 175 **	874	± 644 **	253	± 255 *	742	± 544 *
川幅 (m)	44	± 31	232	± 159	62	± 47	188	± 137
河床勾配(%)	1.27	± 0.71 **	0.21	± 0.21 **	1.02	± 0.76 **	0.24	± 0.24 **
底質粗度	3.86	± 0.34 **	3.41	± 0.20 **	3.83	± 0.32 **	3.53	± 0.22 **
Chl.a量(g/m ²)	0.14	± 0.06	0.07	± 0.02	0.13	± 0.06	0.09	± 0.03
FPOM量(μg/L)	258	± 29	289	± 31	254	± 25	272	± 24
早瀬の流速(m/s)	1.07	± 0.16	1.19	± 0.23	1.14	± 0.20	1.24	± 0.2
平瀬の流速(m/s)	0.52	± 0.09	0.48	± 0.26	0.54	± 0.13	0.53	± 0.24
開空率	0.82	± 0.25	1.00	± 0.00	0.86	± 0.22	1.00	± 0.00

*: P<0.05, **: P<0.01 (一元配置分散分析, one-way ANOVA)

表III-5. 各環境項目を説明変数, 各系統(クレードJ-D, クレードJ-U)に位置づけられるチラカゲロウの在/不在を目的変数とした一般化線形モデル(GLM)による解析結果

両系統が確認された地点 (A6, A7, U3) を含む, クレードJ-Uに位置づけられるチラカゲロウの在/不在を目的変数とした場合		両系統が確認された地点 (A6, A7, U3) を含む, クレードJ-Dに位置づけられるチラカゲロウの在/不在を目的変数とした場合		両系統が確認された地点 (A6, A7, U3) を除き, クレードJ-D (もしくはクレードJ-U) に位置づけられるチラカゲロウの在/不在を目的変数とした場合														
モデル	AIC	逸脱度	X ²	自由度	P-value	モデル	AIC	逸脱度	X ²	自由度	P-value	モデル	AIC	逸脱度	X ²	自由度	P-value	
Null	25.5	20.6				Null	28.4	23.5				Null	23.3	18.3				
標高	25.5	17.6	2.96	1	0.085	標高	25.1	17.2	6.26	1	0.012 *	標高	22.5	14.1	4.16	1	0.041 *	
川幅	17.8	10.0	10.58	1	0.001 **	川幅	18.0	10.1	13.30	1	0.000 **	川幅	14.4	6.0	12.28	1	0.001 **	
集水域面積	22.4	14.6	5.98	1	0.015 *	集水域面積	23.5	15.7	7.82	1	0.005 **	集水域面積	20.0	11.6	6.64	1	0.010 **	
河床勾配	19.1	11.3	9.32	1	0.002 **	河床勾配	13.5	5.6	17.90	1	0.000 **	河床勾配	13.1	4.7	13.59	1	0.000 **	
底質粗度	21.9	14.1	6.52	1	0.011 *	底質粗度	26.3	18.5	5.02	1	0.025 *	底質粗度	19.3	10.9	7.32	1	0.007 **	
Chl.a量	26.5	18.6	1.92	1	0.166	Chl.a量	30.1	22.3	1.21	1	0.272	Chl.a量	25.0	16.6	1.66	1	0.197	
FPOM量	28.2	20.4	0.25	1	0.614	FPOM量	31.3	23.5	0.04	1	0.828	FPOM量	26.5	18.1	0.15	1	0.696	
早瀬の流速	28.3	20.4	0.17	1	0.681	早瀬の流速	27.9	20.0	3.49	1	0.062	早瀬の流速	25.4	17.0	1.20	1	0.272	
平瀬の流速	27.9	20.1	0.52	1	0.473	平瀬の流速	31.3	23.5	0.01	1	0.923	平瀬の流速	26.4	18.0	0.21	1	0.646	
開空率	26.6	18.8	1.80	1	0.179	開空率	26.7	18.8	4.64	1	0.031 *	開空率	23.8	15.4	2.85	1	0.091	

*: P<0.05

***: P<0.01

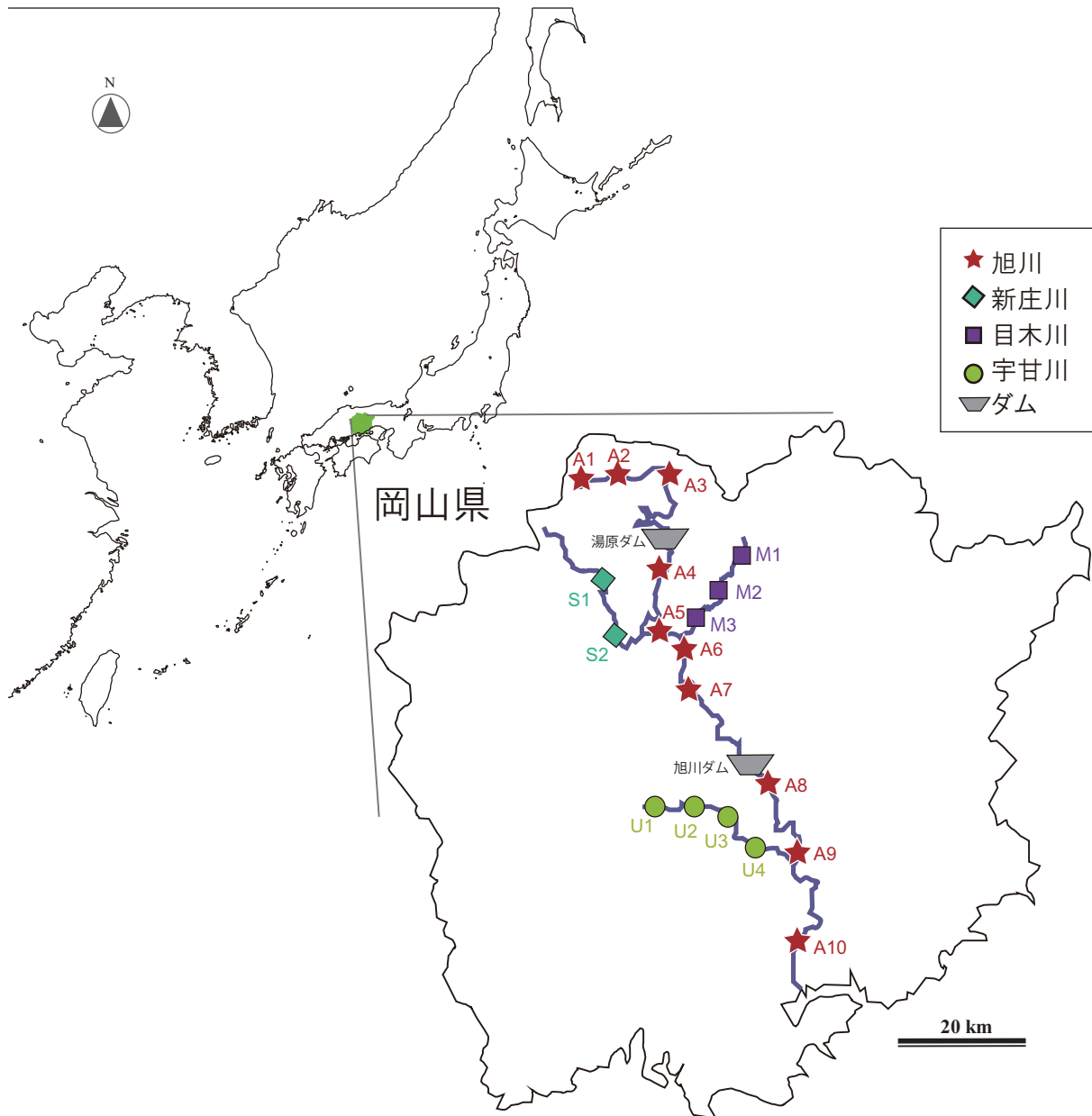


図 III-1. 旭川水系におけるチラカゲロウのサンプリング地点（旭川本川 10 地点，A1-10；新庄川 2 地点，S1-2；目木川 3 地点，M1-3；宇甘川 4 地点，U1-4）

地点番号は，表 III-1 と対応する。

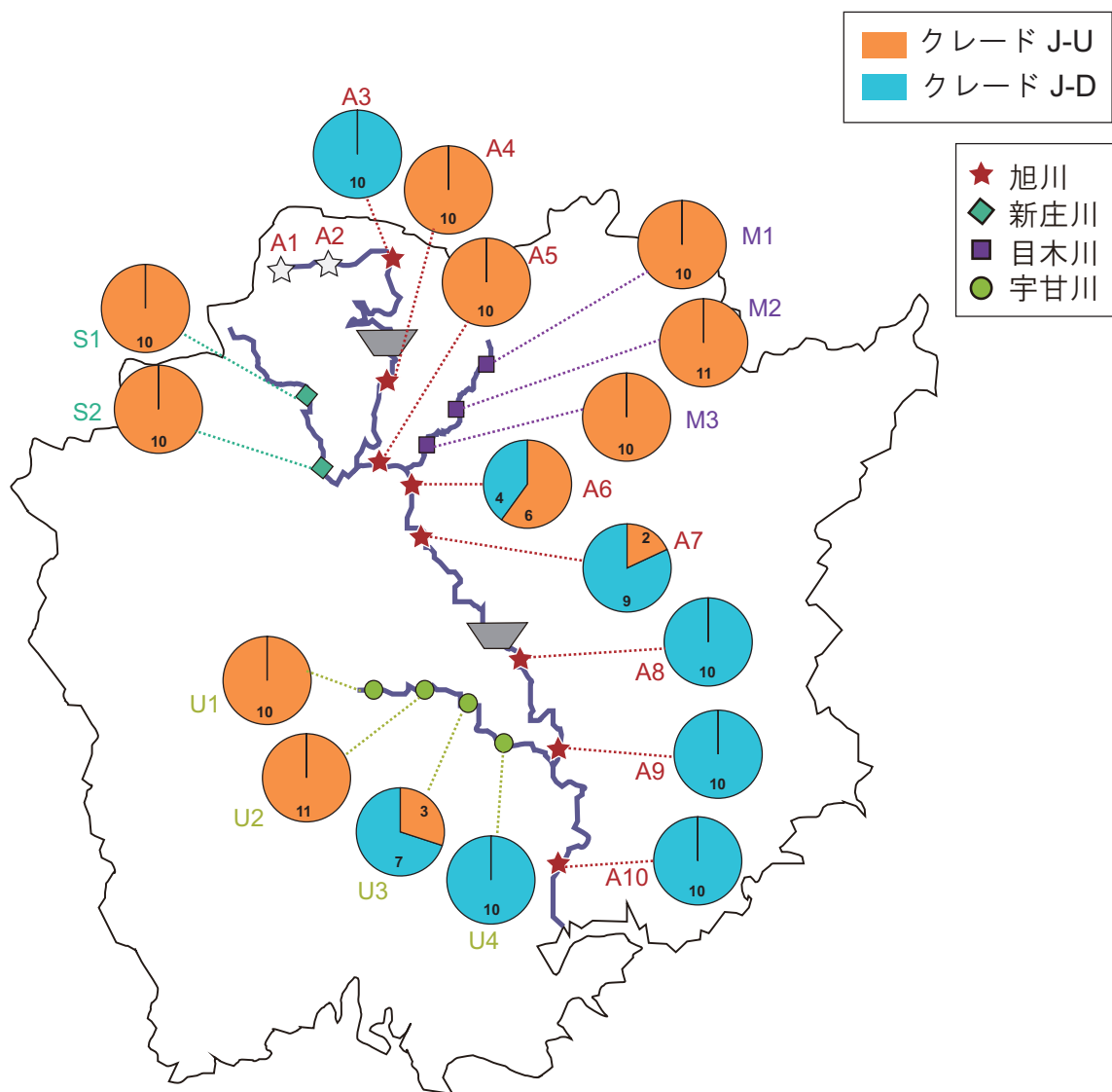


図 III-2. 旭川水系内の各調査地点におけるチラカゲロウの遺伝的構造

円グラフの各色は、各地点で採集されたチラカゲロウ遺伝子解析 (mtDNA COI領域) の結果、検出された系統 (クレード J-U, J-D) の割合を示しており、円グラフ内の数字はそれぞれの系統が検出された個体数を示している。A1, A2 地点ではチラカゲロウが採集されなかった。

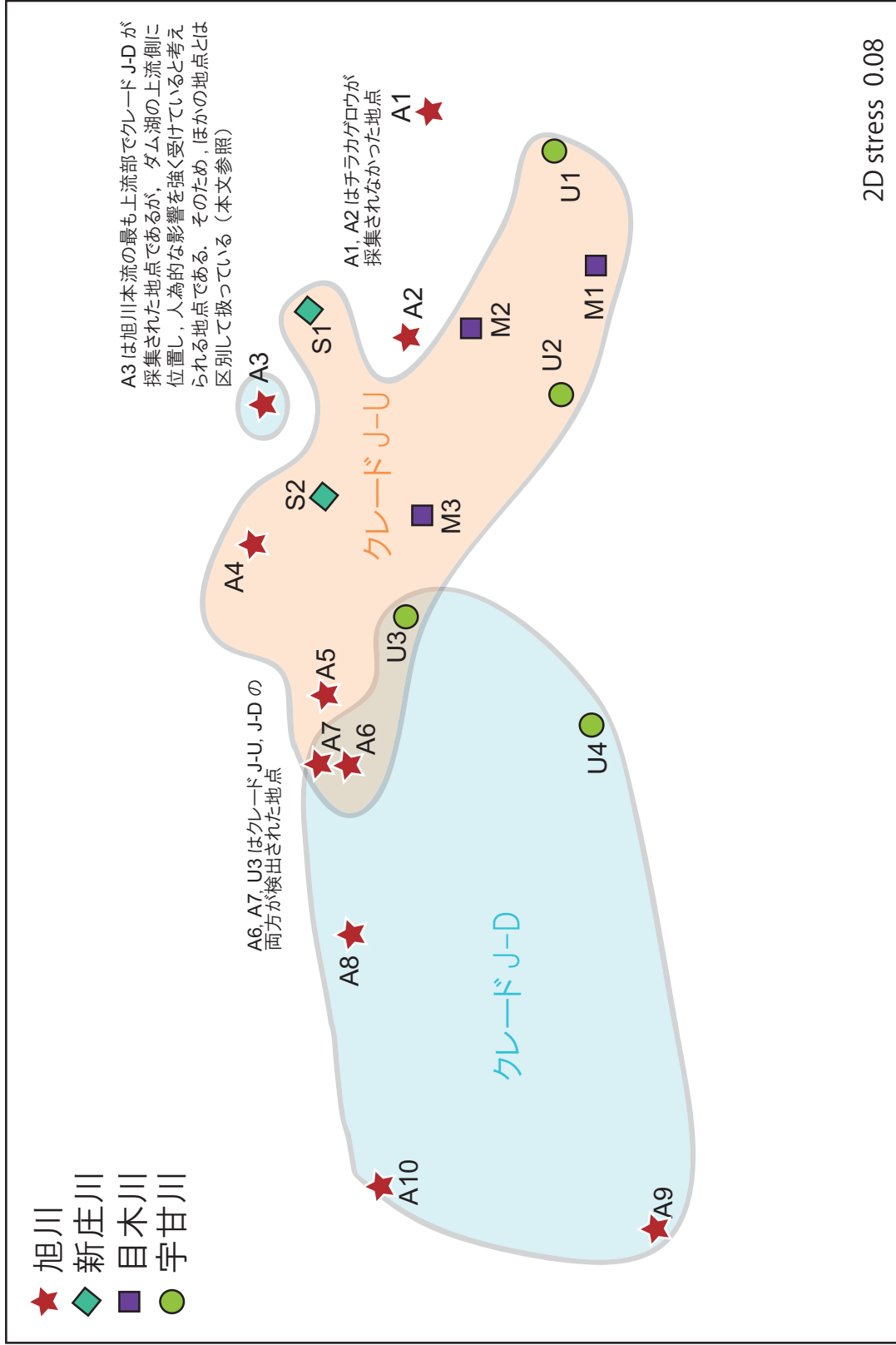


表 III-3. 旭川水系内の各調査地において計測した各環境特性データを基に、Bray-Curtics 類似度指数を尺度として非計量多次元尺度構成法（NMDS: Non-metric multidimensional scaling）により解析した結果
 それぞれのプロットは各地点のデータを示している。クレードJ-D, クレードJ-U が検出された地点をそれぞれ線で囲んでいる。各調査地点における環境特性の素データに関しては表 III-3 を参照のこと。

第 IV 章 日本列島内最長の河川・千曲-信濃川水系内における
標高傾度に沿ったチラカゲロウの集団構造と遺伝的構造

IV-1. はじめに

「河川系 (river system)」とは線的な繋がりをもつ流水ネットワークからなる系であり、源流域では小さな流れ同士が接続し、これらの接続を繰り返しながら下流域に向かうにつれて徐々に大きな樹状系のネットワークとなっていく (Bohonak and Jenkins, 2003; Hughes, 2007; Tojo, 2010). さらに、河川は様々な要素のハビタットが空間的に配置されたネットワーク構造として捉えられ、上流から下流にかけて河川ハビタットの環境や質は階層的に、かつ、劇的に変化する (Campbell, 2013; Miyazono et al., 2013). また、河川ハビタットの環境下における水生生物種群の分布や種レベルでの集団構造は、このような河川の樹状のネットワーク構造とその河川景観に伴う物理的な環境に大きく影響される (Kindlman and Bruel, 2008; Tojo, 2010; Alp et al., 2012; Hughes et al., 2013). 河川景観の空間的な変化として、標高傾度に沿った源・上・中・下流域といった流程におけるマクロスケールやセグメントスケール、そして瀬・淵環境の繰り返しといったリーチスケール、さらには河床の砂礫サイズやその組み合わせといったマイクロハビタットスケールなどが挙げられ、いずれも生物種群の集団構造と遺伝子流動の変遷を決定する上で重要な役割を担っている (Bohonak and Jenkins, 2003; Hughes, 2007). さらに、これらの空間的配置以外にも、地史などの歴史性や、水質などの環境要因、そして他の生物種群の存在などといった生物学的要因も生物種の分布を決定する上で重要な役割を担っている. 加えて、水生生物種の生活史や潜在的な分散能力も集団間の接続性や集団構造を決定する上で重要な要因となる (Hughes et al., 2009, 2013; Öckinger et al., 2010). このような階層的に変化する河川景観において、河川に棲息する生物種群の集団間の接続性 (生物種群の移動・分散) を解明することは、河川生態系をより深く理解する上で、重要な課題である (Bohonak and Jenkins, 2003; Wilcock et al., 2007; Krosch et al., 2011).

流域景観スケールにおける集団の接続性 (ネットワーク構造) の全容を解明する上で、分子マーカーを利用した分子生物学的手法は、非常に有効である (Slatkin, 1987; Hughes, 2007; Elbrecht et al., 2014). 分子マーカーを用いることで、各集団間の共有された遺伝子型の出現

頻度や遺伝的構造の類似性から、集団間の遺伝子流動や分散のスケールの評価が可能となる (Slatkin, 1993). 従来、分子マーカーを利用し、様々な分類群における流域内・流域間といった異なる河川階層スケール、および系統地理学的観点から、集団の遺伝的構造や遺伝子流動のスケールについて比較・検討がなされてきた [e.g., カゲロウ類 *Atalophlebia* spp. (Baggiano et al., 2011) と *Epeorus* spp. (Ogitani et al., 2011); エビ類 *Atya* spp., *Xiphocaris elongata* と *Macrobrachium faustinum* (Cook et al., 2008); 魚類 *Pseudochondrostoma polylepis* (Aboim et al., 2013)].

このような分子マーカーを用いた水生生物の研究結果をもとに、Hughes (2007) や Hughes et al. (2013) では、淡水棲の生物種のハビタット特性と種の生態学的特性 (分散能力やライフサイクルなど) を考慮した遺伝子流動スケールのモデルを提唱している [e.g., “Stream Hierarchy Model (SHM)”, “Death Valley Model (DVM)”, “Headwater Model (HM)”]. とりわけ、これらの分類群のうち、河川に棲息する水生生物種群としては、河川源流域や飛沫帯といった特異的な環境に適応した生物種群 (いわゆる「ハビタット・スペシャリスト」種群) においては、より下流域に棲息する生物種群と比較して、集団が孤立・分断化、局在化し、それぞれの集団サイズは小さくなる傾向や、その結果としての集団内での遺伝的固定化や遺伝的多様性の低下などが議論されてきた (東城, 2005; Hughes, 2007; Tojo, 2010; Ogitani et al., 2011; Hughes et al., 2013; Kato et al., 2013). すなわち、河川源流域に棲息する水生生物種群においては、地理的に近い距離に位置づけられる集団間においても、遺伝子流動が制限されるため、遺伝的な分化が生じやすいことが考えられる. 実際に、いくつかの源流域・飛沫帯といった河川水系内の限定的なハビタットに棲息するスペシャリスト種群においては、集団レベルで遺伝的に大きく分化する傾向、そして集団内での遺伝的固定化傾向が認められている [e.g., カゲロウ類 *Dipteromimus tipuliformis* (東城, 2005; Tojo, 2010), *Ameletus inopinatus* (Taubmann et al., 2011); カワゲラ類, *Cryptoperla* spp. (Kato et al., 2013); トビケラ類 *Drusus croaticus* (Previšić et al., 2009), *Hydropsyche tenuis* と *Drusus discolor* (Lehrian et al., 2009),

Chaetopterygopsis maclachlani (Lehrian et al., 2010); ザリガニ類 *Euastacus* spp. (Ponniah and Hughes, 2004), *Austropotamobius* spp. (Fratini et al., 2005), *Cherax destructor* (Nguyen et al., 2004), *Cambaroides japonicas* (Usio, 2007; Koizumi et al., 2012); 魚類 *Salvelinus leucomaenis* (Yamamoto et al., 2004)]. 従来の研究では, このような特異的な集団構造を有するハビタット・スペシャリスト種や稀少種などに焦点が当てられ, 多くの知見が蓄積されてきた.

その一方で, 河川の上流域から下流域までの幅広い環境に適応している生物種群, (いわゆる「ハビタット・ジェネラリスト」種)においては, 餌や好適な環境を求めての能動的な流下や, 長い流程にわたる卵や幼生の受動的(非意図的)な流下, さらにはこれを補償するための遡上行動(e.g., メス成虫における産卵のための遡上飛翔)などにより集団サイズが大きく維持され, 遺伝子流動が生じる規模は大きくなると考えられる(Bohonak and Jenkins, 2003; Hughes et al., 2013). 実際に, 成虫時期に飛翔可能となる水生昆虫種のうち, 高い分散能力をもつ種群においては, 成虫期における広域な分散により, 集水域間や河川間で遺伝的分化が認められないことを示唆するような遺伝的証拠が報告されている [e.g., カゲロウ類 *Baetis alpinus* (Monaghan et al., 2002); トビケラ類 *Plectrocnemia conspersa* (Wilcock et al., 2001) と *Gumaga griseola* (Miller et al., 2002)].

このように, 従来の研究においては, 河川水系内の支流間や水系間における遺伝的分化の程度, 交流の有無といった指標に基づき, 水生昆虫の「分散」プロセスに焦点を当て, その遺伝的構造について議論がなされてきた. しかし, 河川流程に広域分布する種群において, 同一河川の上流域から下流域にかけての集団構造および遺伝的構造の変化や(e.g., 個体密度と遺伝的多様度の関係性: 流程内にクラインがあるのか否か), 流程内における個体密度と遺伝的多様度の関係性といった, 流程内における集団構造と遺伝子流動のスケールに着目した研究はわずかである(e.g., Krosch et al., 2011).

このような背景から, 本研究では一つの水系内の上・中・下流域間さらには支川も含めた水系内広域において広域分布する種(ハビタット・ジェネラリスト種)であるチラカゲロウ *Isonychia*

japonica (カゲロウ目 Ephemeroptera, チラカゲロウ科 Isonychiidae) に焦点を当て、「河川」という「線」的ネットワーク経路に限定されるような環境下における集団構造と遺伝的構造を追究した。加えて、第 II 章における結果を基に、調査河川(千曲-信濃川水系)におけるチラカゲロウの定着や、現状で分布に至るまでの歴史的側面についても考察する。

IV-2. 材料と方法

調査地

本研究では、千曲-信濃川水系を調査対象とした。千曲-信濃川水系は幹川流路長 367 km, 流域面積は 11,900 km² であり、日本最長の河川および最大規模の水系である(国土交通省, 2008)。本研究においては、千曲-信濃川の本川全流程と、水系内の最大支流である犀川、および同様に大規模な支川のひとつである魚野川を調査対象とした(図 IV-1)。

千曲-信濃川本川と主要 2 支川において、約 10 km 間隔に調査地点を設け、全 42 地点(千曲川で 13 地点, CH1-13; 千曲-信濃川で 11 地点, CS1-11; 犀川で 12 地点, SA1-12; 魚野川で 6 地点, UO1-6; 表 IV-1, 図 IV-1)において、チラカゲロウの集団構造および遺伝的構造を調査した。なお、本稿内では、千曲-信濃川水系における最大規模の支流である犀川合流地点よりも上流側を「千曲川」、犀川合流点よりも下流側を「千曲-信濃川」として扱うこととした。チラカゲロウの幼生は河川の早瀬や平瀬における石礫底の流水部に棲息するため(石綿・竹門, 2005)、本調査においても河川の早瀬や平瀬を対象にチラカゲロウの採集地点を設けた。また、千曲-信濃川の下流域および犀川の一部区間では、ダム湖の存在などにより瀬環境が存在しないことや、河原へのアプローチの困難さなどから、10km 間隔での調査地選定ができなかった流程箇所も部分的に含まれている(千曲-信濃川では 2 地点, 犀川で 2 地点; 図 IV-1)。各調査地におけるチラカゲロウの集団構造(個体密度や現存量)を調査するため、チラカゲロウの羽化期前にあたる冬季から早春季に定量調査を実施した(2011 年 11 月-2012 年 4 月)。

チラカゲロウの集団構造解析

千曲-信濃川水系における各調査地点において、D フレーム型ハンドネット(間口 0.3m, メッシュ径 1mm)を用いて、採集の努力量を一定とする(採集時間を一定とした)定量的な水生昆虫採集(5分間×3反復)を実施した。現地では、ネット内に採集されたサンプルの中から、全てのチラカゲロウを抽出し、100% EtOH で固定した。固定試料を基に実験室内で個体数を計数するとともに、個体ごとの湿重量を計測した。これらの計数・計量値をもとに、全流程におけるチラカゲロウの相対的な個体密度と相対的な現存量(バイオマス)を算出した。

遺伝子解析

本研究では、千曲-信濃川水系の26地点において採集された330個体サンプルのチラカゲロウを遺伝子解析試料とした。基本的には各地点あたり15個体程度のチラカゲロウを遺伝子解析に用いた。ただし、低密度の調査地点の中には、定性採集の実施においても15個体に達しない地点もあり、その場合には、供試できる限りの試料を解析した。

抽出・精製したゲノム DNA を鋳型にミトコンドリア DNA (mtDNA) cytochrome c oxidase submit I(COI)領域の部分配列を解析した。PCR 反応の酵素には rTaq(TOYOBO, 大阪)を用い、また PCR 増幅には Program Temp Control System PC350 サーマルサイクラー (Astec, 福岡)を用いた。各遺伝子領域における PCR には、Simon et al. (1994) および Prendini et al. (2005) に従い C1-J-1718 (5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3') と HCOoutout (5'-GTAAATATATGRTGDGCTC-3')のプライマーセットを利用した。この mtDNA COI 領域の PCR において、94°C 1分間のプレヒート後、「94°Cで1分間の熱変性、50°Cで1分間のアニーリング、72°Cで1分30秒間の伸長」を1サイクルとする反応を35サイクル行った後、72°Cで7分間の伸長反応を行い、4°Cで保存した。

PCR 産物の精製には ExoSAP IT (GE Healthcare, Buckinghamshire)または Illustra ExoStar (GE Healthcare, Buckinghamshire)を用い、シーケンス反応においては BigDye

Terminator v1.1 Sequencing Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire)を用いて蛍光ラベリングを行った。これらの反応には Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, California)を用いた。その後、ABI3130, または ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, California)を用いて塩基配列を解析した。シーケンス後の塩基配列については、ソフトウェア CLC Genomics Workbench (Filgen, 名古屋)を用いて、アセンブリとアライメント作業を行った。解析サンプル間の塩基配列のアライメントにはソフトウェア Clustal W (Thompson et al., 1994)およびソフトウェア MEGA ver. 5.02 (Tamura et al., 2011)を用いた。整列した塩基配列を基に、ソフトウェア DnaSP v4.0 (Rozas et al., 2003) を用いてハプロタイプを決定した。

ハプロタイプ多様度・塩基多様度(ヌクレオチド多様度)の算出とハプロタイプ・ネットワーク

ハプロタイプ多様度 (h : Nei, 1973)および塩基多様度 (ヌクレオチド多様度, π : Nei and Tajima, 1981)については、ソフトウェア DnaSP v4.0. (Rozas et al., 2003)を用いて算出した。ハプロタイプ・ネットワークの作成においては、ソフトウェア TCS v.1.21 (Clement et al., 2000)を用いた。

底質粗度

河床の砂礫は河川の上流から下流にかけてその形態と大きさが変遷する。また、底生生物にとって河川の底質環境は棲み場としてとても重要な要素となっており(沖野, 2005), 河床の砂礫構成は河川流程の環境および生物の棲息環境を評価する指標となり得る。本研究では、各調査地の棲息環境の指標として河床状態の評価を行った。0.6m×0.6m のコドラート内に0.1m 間隔の格子構造をつけ、各格子点 (25 交点)に位置する礫サイズを、砂 (<2mm), 小礫 (2-16mm), 中礫 (16-64mm), 大礫 (64-256mm), 巨礫 (>256mm)あるいは岩盤の6つのカテゴリーに区分して記録し、これらのデータを基に河床の状態を評価した。各調査地点において5コドラート分の河床状態を判定し、以下の計算式を用いて底質粗度を算出した (Bain et

al., 1985; Inoue and Nakano, 1998).

底質粗度=砂被度×1+小礫被度×2+中礫被度×3+大礫被度×4+巨礫×5

(各砂礫サイズ区分の被度=各区分の検出格子数/全格子点数)

分子分散分析 (AMOVA)

ソフトウェア Arlequin 3.5 (Excoffir and Lischer, 2010) を用いて、千曲-信濃川水系内におけるチラカゲロウの遺伝的分化に関する分子分散分析 (AMOVA) を実施した。比較対象とする階層に関しては、各調査地点を「集団」として設定し、千曲-信濃川水系のうち、最大支流である犀川の合流点よりも上流側 (千曲川 7 地点)、下流側 (千曲-信濃川 11 地点) と犀川 (犀川 7 地点) をそれぞれの「グループ」として区分し、解析した。

ソフトウェア Migrate-n を用いた移動分散の方向性と強度の解析

各集団間における個体の移動分散について検討するため、AMOVAと同様に、千曲-信濃川水系のうち、最大支流である犀川の合流点よりも上流側 (千曲川 7 地点)、下流側 (千曲-信濃川 11 地点) と犀川 (犀川 7 地点) をそれぞれの「グループ」として区分し、グループ間における遺伝子流動の割合を推定した。解析には、ソフトウェア MIGRATE-n v3.6.11 (Beerli, 2010) を用い、最尤 (ML) 法による解析を行った。“10 short chains” を 500 ステップ行い、20 世代ごとにサンプリングした。また“3 long chains” は、5,000 ステップ行い、100 世代ごとにサンプリングした。これらを 2 反復繰り返した。初めの 10,000 世代を定常状態に達していない世代と仮定して解析から除いた。“heating scheme” は 4 段階とし、1.0, 1.5, 3.0, 10000 に設定した (Beerli, 2010)。

非計量多次元尺度構成法 (NMDS)

チラカゲロウが採集された (1 地点 1 個体のみ採集された魚野川を除く) 全 25 地点におけ

る各地点の伝的構造の類似性を、各地点の遺伝子型の検出数の 4 乗根を算出した後、Bray-Curtis 類似度指数 (Bray and Curtis, 1957) を尺度として非計量多次元尺度構成法 (NMDS: Non-metric multidimensional scaling) を用いて解析した。解析にはソフトウェア PRIMER v.6 (Clarke and Gorley, 2000) を用いた。

IV-3. 結果

千曲-信濃川水系におけるチラカゲロウの集団構造

定量採集により、千曲-信濃川水系の流程に沿って設定した調査地点全 42 地点のうち 24 地点においてチラカゲロウが採集された (i.e., 千曲川 6/13 地点; 千曲-信濃川 10/11 地点; 犀川 7/12 地点; 魚野川 1/6 地点; 表 IV-2, 図 IV-1)。千曲-信濃川本川のうち、チラカゲロウが採集された最上流地点は、CH8 地点であった。この地点よりも下流側では、徐々に個体密度が高まり、CH12 地点で最も高い個体密度となった (図 IV-2)。その後、チラカゲロウは CS10 地点まで採集された。本川においては、長い流程 (CH8-CS10 間: 流路距離 約 300km) にわたりチラカゲロウの流程分布が確認された。また、これらの地点の中には個体密度や湿重量が低い地点も確認された (e.g., CH8, CS3, CS9, CS10; 図 IV-2)。犀川では SA6 地点からチラカゲロウが採集され、下流にかけて密度が高まっていった。千曲川との合流点付近である SA12 地点で、最大個体密度となった (図 IV-2)。魚野川では、千曲-信濃川本川の合流付近である UO5 の 1 地点のみでチラカゲロウが採集された (図 IV-2)。

千曲-信濃川水系におけるチラカゲロウの遺伝的構造

千曲-信濃川水系の 26 地点から採集されたチラカゲロウ 330 個体について、mtDNA COI 領域の塩基配列 (610-bp) を解析した。mtDNA COI 領域の配列において、1 塩基以上の置換が認められた場合には全て別ハプロタイプとして区別して扱ったところ、計 127 ハプロタイプが検出された。千曲-信濃川流程全体のハプロタイプ多様度は 0.899、塩基多様度は 0.0078 であ

った。各調査地点におけるチラカゲロウの解析個体数、検出されたハプロタイプ数、ハプロタイプ多様度、塩基多様度を表 IV-2 および図 IV-2 に示した。いずれの地点においても高いハプロタイプ多様度を有することが示された（表 IV-2, 図 IV-2）。また、採集地点あたりの個体密度と遺伝的多様度の比較を行ったところ、有意な相関は認められなかった（ピアソンの相関係数の有意性検定, $r=0.20$, $P=0.33$ ）。

mtDNA COI 領域の解析において検出された全 127 ハプロタイプ間の遺伝的関係性をハプロタイプ・ネットワークとして示した（図 IV-3）。この結果、ネットワークは大きく 2 つのグループに区分された。また、これら 2 つのハプロ・グループの分化は、第 II 章における、日本列島産チラカゲロウのうちのクレード J-DN とクレード J-DS の分化に相当するものである（図 IV-3）。これらのうち、クレード J-DN 内においては、114 ハプロタイプが検出され、このうち優占ハプロタイプの存在（ハプロタイプ H1; $n=102$ ）も認められた（表 IV-2, 図 IV-3）。また、この H1 ハプロタイプからは 1 塩基置換の関係にある 23 ハプロタイプが検出された（図 IV-3）。H26 と H124 ハプロタイプは、H1 からの塩基置換数が最も多く、H1 と H26 および H124 のハプロタイプ間では、13 塩基置換が認められた（図 IV-3）。一方、クレード J-DS は、13 ハプロタイプから構成された（図 IV-3）。クレード J-DS で検出されたハプロタイプ間の塩基置換数は 1-17 塩基であった。各調査地点におけるクレード J-DN, J-DS を構成するチラカゲロウの検出個体数を図 IV-4 に示した。

AMOVA の結果では、グループ間（千曲川, 千曲-信濃川, 犀川）、および集団間（各地点間）において遺伝的分化は認められず、同一地点内（集団内）で多様な遺伝的構造を有するものと評価された（表 IV-3）。また、NMDS における解析結果からも、検出されるハプロタイプの構成には、それぞれの河川や地点間での遺伝的分化や、特徴的な遺伝的構造は認められなかった（図 IV-5）。

ソフトウェア MIGRATE-n を用いた各グループ間の遺伝子流動の推定では、各グループ間での高い移入・移出の割合（移動・分散）が認められた（表 IV-4）。とりわけ犀川から千曲信濃

川へ、および、千曲-信濃川から千曲川への移入が高い傾向にあった(i.e., 河川本流の下流域から上流域への移動・分散; 表 IV-4). さらに, 各調査地点から検出された 127 ハプロタイプを個々に概観すると, 上流側の地点と下流側の地点間で同一のハプロタイプが検出されるなど (e.g., CH7 と CS10 で共有されるハプロタイプ H3 や, CH9 と CS7 で共有されるハプロタイプ H17; 表 IV-5, 図 IV-5), 離れた地点間においてもハプロタイプの共有性が認められた.

千曲-信濃川水系における底質粗度の変遷

千曲-信濃川水系におけるチラカゲロウの河川棲息環境の指標として, 各調査地点における底質環境の相違を底質粗度を尺度として比較・検討した. 一般には, 上流域から下流域にかけて河床材料は小さくなる(底質粗度は小さくなる)ことが予想されるが, 本研究の結果においては, このような傾向が示されたのは, 魚野川だけであった(表 IV-2). また, 千曲-信濃川本川においては, 中・下流域に位置する CS3 から CS6 地点間で, 礫サイズの大きな支流の合流により, 底質粗度の値が大きくなるといった傾向がみられた. また, 各調査地点における底質粗度分布と, チラカゲロウの集団構造(個体密度)との間に相関関係は認められなかった(ピアソンの相関係数の有意性検定, $r=-0.27$, $P=0.19$).

IV-4. 考察

本研究では, 河川流程に沿った水系内広域分布種・チラカゲロウにおける集団構造(個体密度と湿重量)と遺伝的構造の変遷を追究した. 千曲-信濃川水系の流程に沿って設けた調査地点における定量採集では, 全 42 地点のうち 24 地点にからチラカゲロウが採集された(図 IV-2). またチラカゲロウは 300km 以上にもおよぶ広域的な流程分布をしていることも明らかとなった(図 IV-2). 採集されたチラカゲロウ(26 地点, 330 個体)において, mtDNA COI 領域の解析を行ったところ, 各地点(各集団)の個体密度によらず, いずれの地点においても高いハプロタイプ多様度を有し, また, 上流側の地点と下流側の地点間といった地理的に離れた地

点間においてもハプロタイプの共有性が認められた(表 IV-5). さらには, 千曲-信濃川の上-下流域, および支流である犀川にいたる水系内広域において検出される優占ハプロタイプ(H1ハプロタイプ; $n=102$)の存在が明らかとなった(表 IV-5, 図 IV-3).

本研究の結果より, 低い個体密度や湿重量の流域や適さないハビタット環境が存在するにも関わらず, チラカゲロウでは千曲-信濃川水系において広域的なスケールでの遺伝子流動が生じていることが示唆された. また AMOVA により, 千曲-信濃川本川に流入する最大支水系である犀川支水系の合流地点より上流側(千曲川), 下流側(千曲-信濃川), および犀川支水系でグループ化を図り, 解析を行ったが, 有意な傾向は認められなかった(表 IV-3). さらに, 各調査地点の遺伝子構造における NMDS 解析の結果からも, 各地点間および各グループ間での, 遺伝子型の出現頻度(類似性)に特徴的な遺伝的構造の傾向は認められなかった(図 IV-5).

これらの結果より, チラカゲロウは千曲-信濃川水系内全体において一つの大きな集団を形成していることが示唆された. 本研究では, 低い個体密度の地点においても遺伝的多様度が高く, さらには千曲-信濃川水系内全体においてもハプロタイプ多様度が高い($h=0.899$)といった結果が示されており, 水系内広域的な遺伝子流動が生じることで遺伝的多様性が維持されているものと考えられる.

さらには, mtDNA COI 領域の解析結果に基づくハプロタイプ間の関係性は, 優占ハプロタイプ H1 を中核とし, ほとんどがこのハプロタイプからわずかに1塩基から数塩基置換の関係にあった(図 IV-3). また, 全流程内において高いハプロタイプ多様度($h=0.899$)を示した一方で, 塩基多様度(ヌクレオチド多様度)は低い値($\pi=0.0078$)を示した. 以上の結果から, 千曲-信濃川集団には H1 ハプロタイプをもつ祖先系統が存在し, 水系内での遺伝的分化と集団拡大が生じた可能性が示唆される.

Hughes et al.(2013)では, ハビタット特性と生物種群の生態学的特性から河川における遺伝子流動のスケールについてモデルを提唱しており, これらのうち, 河川流程に沿って分布す

るような種群においては、同一河川内の集団間の接続性が高いと考えられ、次いで同一集水域の別河川、別水系といった順に、徐々にその集団間の接続性は低くなる（モデル: SHM）としている。東城ほか（2012）は、千曲川流程広域から採集されたハビタット・ジェネラリスト種であるマツムラヒラタカゲロウ *Epeorus l-nigrus*（昆虫綱, カゲロウ目）を対象に、mtDNA COI 領域の解析を行った。その結果、千曲川水系内には中核となる優占ハプロタイプが存在し、千曲川流域内における広域遺伝子流動の可能性が示唆された（東城ほか, 2012, 2015）。本研究におけるチラカゲロウの結果においても、マツムラヒラタカゲロウと同様の傾向が得られている。チラカゲロウ、マツムラヒラタカゲロウともに、Hughes et al.（2013）におけるモデル SHM に該当する分布様式をしており、その遺伝的構造において、河川内における集団間の接続性が高い傾向が認められた。

一方で、Krosch et al.（2011）は、同様にモデル SHM に該当する分布様式をもつ双翅目の *Echironocladus martini* において、河川および流入支川の流程沿いにサンプルを採集し、mtDNA COI 領域の解析を行った結果、チラカゲロウのようなひとつの中核となるハプロタイプの存在は認められず、検出されるハプロタイプは、河川（河道間）、さらには河道内の地点間においても異なる傾向が認められた。この種においては、移動分散、遺伝子流動のスケールが非常に制限されていることが示唆された。このような地理的に近い距離に位置づけられる集団間においても遺伝的に大きく分化する傾向や、集団内での遺伝的固定化が生じる傾向は、*Echironocladus martini*（Krosch et al., 2011）だけでなく、アミカの 1 種 *Elporia barnardi*（Wishart and Hughes, 2003）や、双翅目の *Archaeochlus* sp.（Martin et al., 2002）といった非常に限られた移動分散能力を有する水生昆虫類においても認められている。

Kovats et al.（1996）によれば、大型のカゲロウでは、高い分散応力を有する（ $\leq 1.8\text{km}$ ）という観察結果が得られている。また Takenaka et al. (in prep.) では、チラカゲロウが高密度で棲息する天竜川からチラカゲロウが棲息しないこの支川の約 10km 上流域において、遡上飛翔した多数のチラカゲロウのメス成虫を観察しており、チラカゲロウは個体レベルでも 10km 以上の長

距離飛翔を行うことが明らかになりつつある。実際、チラカゲロウの亜成虫・成虫は河川からやや離れた灯火にも飛翔する様子がよく確認されている。

以上より、チラカゲロウにおいても、比較的高い移動分散を有することが示唆される。これにより、Krosch et al. (2011) とは異なり、水系内広域的な遺伝子流動の傾向が認められたのではないかと考えられる。ソフトウェア MIGRATE-n を用いた移動分散の方向性や強度に関する解析結果からもこのことを示唆するような結果が得られている（表 IV-4）。

また、ソフトウェア MIGRATE-n の解析結果では、千曲川および犀川から千曲-信濃川といった河川内の流下方向への移動分散、ならびに、千曲-信濃川といった下流域から上流域にあたる千曲川および犀川へとといった、河川の上-下流両方向への移動分散が生じていることが示された（表 IV-4）。つまり、千曲-信濃川水系におけるチラカゲロウ集団において、卵や幼虫期における河川内の流下だけでなく、これらのステージでの流下を補償する遡上行動や、成虫期における遡上飛翔、上流への産卵（i.e., コロナイゼーション・サイクル）が健全に行われていることを支持するような結果が示された。このような遺伝子流動の結果は、チラカゲロウのコロナイゼーション・サイクルを通じた何世代における平均的な分散により生じたものであると考えられ（Lowe and Allendorf, 2010; Hughes et al., 2013）、比較的長期的な時間スケールにおいて移動分散がなされていた（もしくは現在もなされている）ことが示唆された。集団構造の観点において重要であるのは、世代を超えた結果としての総合的な分散である。そのため、密度や現存量の大小はありながらも、長い流程に渡って連続分布していることの意義はたいへん大きい。チラカゲロウは、このような長い流程を生活の場として利用し、世代を重ね、水系内全体における広域的な遺伝子流動が生じることで千曲-信濃川水系内において一つの大きな集団構造を維持していると考えられる。

加えて、千曲-信濃川水系内において、クレード J-DN とクレード J-DS に位置づけられる遺伝的に大きく離れた 2 系統が検出された（図 IV-3）。第 II 章でも述べたように、日本列島産チラカゲロウは、異なる地理的分布傾向を示す 2 系統 [糸魚川-静岡中央構造線を介して北東系

統 (クレード J-DN), 南西系統 (クレード J-DS); 図 IV-3] から構成されることが明らかとなっている. よって, 千曲-信濃川で検出された 2 系統間の遺伝的分化は, 本水系内で生じたものではなく, 異なる進化プロセスを経た 2 系統群が二次的な接触により, 水系内に存在していることに由来すると考えられる.

千曲-信濃川水系に注ぎ込む支川の中には, 糸魚川-静岡構造線を介して南西域に位置する河川も存在する (e.g., 犀川水系の支川の奈良井川や梓川, 高瀬川). さらに, 奈良井川の上流域の地形に注目してみると, 木曾川が標高 1,100m 前後の分水嶺を太平洋側に向かって流れている. とりわけ, 奈良井川と木曾川それぞれの源流部は, 木祖村の鳥居峠付近でわずかに約 2km しか離れていない. さらに, 木曾川と同じく太平洋側に向かって流れている天竜川と, 奈良井川の分水嶺である善知鳥峠は標高が 890m と低く, かつこの峠を境とする分水嶺周辺はなだらかな地形をしている. このように, 上流域においては, 異なる水系に属する河川同士であっても比較的近接することもあるため, 稀に河川集水域を超えて (i.e., 水系を超えて), 遺伝子流動が起きている可能性も考えられる. このことから, 本来クレード J-DS を構成する個体は, フォッサマグナの西縁 (糸魚川-静岡構造線) よりも西側に位置する河川 (支水系) を介して千曲-信濃川水系内に移動, 定着した可能性も考えられる.

以上より, 本研究では, 河川流程に沿ったチラカゲロウの集団構造と遺伝的構造の変化を追究することで, 従来の水生昆虫の遺伝子解析で議論されてきたような遺伝子流動スケールだけでなく, 流程内における集団サイズと遺伝的多様度の関係, さらに, 河川水系内における分散, 集団拡大の歴史を明らかにした. また, 本研究の結果からは, チラカゲロウがいずれの地点においても高い遺伝的多様度を示すことが明らかとなった. 本研究の結果から, 上流域から下流域に至る流程内に広域分布種するハビタット・ジェネラリスト種であるチラカゲロウにおいて, 水系内における広域的な遺伝子流動が生じている (あるいは生じていた) 可能性, および水系内におきいてひとつの大きな集団構造も大きく受けていることが明らかとなった.

本研究の定性調査では, 千曲-信濃川のチラカゲロウは, 定性採集により中込 (CH6) 地点

から、越路（CS10）地点までの約 330km にもおよぶ長い流程に分布していることが明らかとなった（図 IV-2）。このような長い流程内において、短い時間スケールでの（e.g., 1 世代あたり）移動分散や遺伝子流動スケールがどの程度あるのかについては、興味深い課題であるが、チラカゲロウにおける、短期的な時間での遺伝子流動のスケールについては、本研究の結果からは判断できない。今のところ、チラカゲロウにおいては、このようなことを検証するのに適当とされる高感度な遺伝子マーカー（e.g., 個体識別も可能とされるマイクロサテライト・マーカー等）は開発されていない。今後、遺伝子開発の技術の発達に伴って、河川の階層スケール（河川間、河川内）だけでなく、時間スケール（過去、現在）における分散、およびソース（Source）集団やシンク（Sink）集団の推定といったより詳細な遺伝子流動のスケールについても究明できることが期待される。

表IV-1. 調査地点情報

河川名	地点名	地名	採集地 市/町/村, 県	緯度, 経度	標高(m)
千曲川					
	CH1	毛木平	南佐久郡川上村	長野県 35° 57.228' 138° 42.817'	1512
	CH2	大深山	南佐久郡川上村	長野県 35° 58.442' 138° 34.822'	1183
	CH3	海ノ口	南佐久郡南牧村	長野県 36° 00.749' 138° 29.502'	1048
	CH4	小海	南佐久郡小海町	長野県 36° 05.559' 138° 28.977'	852
	CH5	海瀬	南佐久郡佐久穂町	長野県 36° 08.951' 138° 28.597'	752
	CH6	中込	佐久市中込	長野県 36° 13.681' 138° 28.498'	670
	CH7	塩名田	佐久市塩名田	長野県 36° 16.233' 138° 25.123'	614
	CH8	布引	小諸市大久保	長野県 36° 19.913' 138° 23.298'	550
	CH9	生田	上田市常田	長野県 36° 23.479' 138° 15.080'	441
	CH10	鼠	埴科郡坂城町	長野県 36° 25.680' 138° 11.339'	405
	CH11	戸倉	千曲市若宮	長野県 36° 29.713' 138° 08.268'	367
	CH12	岩野	長野市松代	長野県 36° 34.073' 138° 09.746'	350
	CH13	若穂牛島	長野市若穂牛島	長野県 36° 37.322' 138° 14.665'	337
千曲-信濃川					
	CS1	山王島	上高井郡小布施町	長野県 36° 42.445' 138° 17.962'	322
	CS2	蓮	飯山市蓮	長野県 36° 48.303' 138° 21.351'	314
	CS3	平林	下高井郡野沢温泉村	長野県 36° 56.140' 138° 25.310'	300
	CS4	東大滝	下水内郡栄村	長野県 36° 58.740' 138° 30.236'	297
	CS5	上郷上田	中魚沼郡津南町	新潟県 37° 00.196' 138° 37.590'	235
	CS6	中里	十日町市小原	新潟県 37° 03.890' 138° 41.995'	155
	CS7	下条	十日町市下条	新潟県 37° 11.658' 138° 46.301'	95
	CS8	川合	小千谷市川井	新潟県 37° 15.330' 138° 48.807'	73
	CS9	ヒ生	小千谷市穉生	新潟県 37° 18.477' 138° 48.172'	45
	CS10	越路	新潟県長岡市釜ヶ島	新潟県 37° 23.377' 138° 48.481'	20
	CS11	本町	新潟県三条市本町	新潟県 37° 37.974' 138° 56.934'	4
犀川					
	SA1	上高地 明神	松本市安曇	長野県 36° 15.161' 137° 39.962'	1526
	SA2	上高地	松本市安曇	長野県 36° 14.947' 137° 38.276'	1516
	SA3	安曇 沢渡	松本市安曇	長野県 36° 09.881' 137° 39.401'	1004
	SA4	安曇 島々	松本市波田	長野県 36° 11.004' 137° 47.201'	725
	SA5	梓川倭	松本市梓川倭	長野県 36° 12.425' 137° 51.309'	661
	SA6	松本 新村	松本市新村	長野県 36° 13.557' 137° 53.911'	615
	SA7	安曇野 豊科	安曇野市豊科	長野県 36° 17.951' 137° 56.041'	543
	SA8	生坂	東筑摩郡生坂村	長野県 36° 26.012' 137° 55.407'	510
	SA9	信州新町	長野市信州新町	長野県 36° 32.305' 137° 57.925'	454
	SA10	信更	長野市新更町	長野県 36° 36.051' 138° 03.354'	409
	SA11	小市	長野市大字	長野県 36° 37.267' 138° 08.169'	364
	SA12	落合	長野市市場	長野県 36° 37.053' 138° 13.379'	338
魚野川					
	UO1	湯沢	南魚沼郡湯沢町	新潟県 36° 52.428' 138° 51.951'	599
	UO2	関	南魚沼市関	新潟県 36° 59.238' 138° 48.798'	237
	UO3	坂戸	南魚沼市坂戸	新潟県 37° 03.733' 138° 52.921'	159
	UO4	九日町	南魚沼市九日町	新潟県 37° 08.199' 138° 55.498'	129
	UO5	魚沼	魚沼市小出島	新潟県 37° 13.933' 138° 57.314'	88
	UO6	長岡	長岡市西川口	新潟県 37° 15.914' 138° 51.729'	60

表IV-2. 各調査地点における底質粗度, 個体群構造と遺伝的構造

地点名	底質粗度		個体密度 (N/5min) ^{*2}		湿重量 (g/5min) ^{*2}		検出された ハプロタイプ数 / 解析個体数	ハプロタイプ 多様度 ^{*3}	塩基 多様度 ^{*4}	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F_s</i>
	Mean	± SE	Mean	± SE	Mean	± SE					
千曲川											
CH1	4.37	± 1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH2	3.78	± 0.09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH3	4.37	± 0.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH4	4.46	± 0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH5	4.18	± 0.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH6	3.66	± 0.10	-	-	-	-	2 Hp / 2 N	1.000	0.005	0.00	1.09
CH7	3.69	± 0.23	-	-	-	-	5 Hp / 6 N	0.933	0.017	0.59	0.82
CH8	3.75	± 0.29	1.3	± 0.7	0.006	± 0.003	6 Hp / 12 N	0.758	0.007	-1.75 *	-0.67
CH9	4.17	± 0.20	12.7	± 4.6	0.355	± 0.133	14 Hp / 18 N	0.935	0.011	-1.52 *	-4.45 *
CH10	3.37	± 0.23	14.7	± 5.2	0.130	± 0.012	11 Hp / 15 N	0.905	0.004	-1.52	-6.42
CH11	4.06	± 0.17	37.0	± 7.8	0.346	± 0.086	15 Hp / 17 N	0.978	0.005	-2.19 **	-12.44 **
CH12	3.07	± 0.07	347.7	± 55.4	2.271	± 0.279	9 Hp / 15 N	0.886	0.009	-1.62 *	-0.73
CH13	3.06	± 0.24	21.3	± 4.5	0.139	± 0.038	9 Hp / 18 N	0.758	0.007	-2.09 **	-0.98
千曲-信濃川											
CS1	3.32	± 0.20	82.7	± 15.2	1.048	± 0.277	14 Hp / 19 N	0.936	0.001	-1.51 *	-4.17 *
CS2	3.16	± 0.13	9.7	± 2.6	0.257	± 0.034	15 Hp / 20 N	0.942	0.007	-2.25 **	-7.49 **
CS3	4.79	± 0.13	1.7	± 1.0	0.008	± 0.005	2 Hp / 5 N	0.400	0.003	-1.12	2.63
CS4	4.43	± 0.20	94.7	± 51.3	1.971	± 1.188	9 Hp / 16 N	0.850	0.003	-2.11 **	-4.02 **
CS5	4.76	± 0.20	48.3	± 18.7	0.885	± 0.311	15 Hp / 15 N	1.000	0.010	-1.93 *	-10.63 **
CS6	4.71	± 0.12	2.3	± 0.3	0.021	± 0.005	6 Hp / 7 N	0.952	0.012	-1.31	-0.35
CS7	4.27	± 0.13	150.3	± 17.9	2.875	± 0.389	12 Hp / 20 N	0.811	0.004	-2.16 **	-6.48 **
CS8	3.97	± 0.16	10.0	± 1.2	0.189	± 0.050	15 Hp / 16 N	0.992	0.002	-1.38	-7.29 **
CS9	3.74	± 0.15	0.3	± 0.3	0.008	± 0.006	1 Hp / 1 N	0.000	0.000	-	-
CS10	4.76	± 0.06	3.7	± 1.2	0.065	± 0.027	6 Hp / 8 N	0.893	0.005	-1.54 *	-1.66
CS11	2.92	± 0.09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
犀川											
SA1	3.42	± 0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA2	3.34	± 0.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA3	3.93	± 0.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA4	4.09	± 0.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA5	3.71	± 0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA6	3.83	± 0.15	0.3	± 0.3	0.014	± 0.011	1 Hp / 1 N	0.000	0.000	-	-
SA7	3.80	± 0.10	11.7	± 4.2	0.319	± 0.159	12 Hp / 17 N	0.890	0.007	-2.15 **	-4.22 *
SA8	3.93	± 0.12	5.7	± 2.1	0.068	± 0.019	11 Hp / 18 N	0.889	0.007	-2.17 **	-3.13
SA9	3.79	± 0.06	19.0	± 6.7	0.658	± 0.239	12 Hp / 15 N	0.971	0.010	-2.13 **	-3.95 *
SA10	4.00	± 0.18	1.7	± 0.7	0.047	± 0.027	11 Hp / 15 N	0.905	0.009	-1.95 *	-2.96
SA11	4.22	± 0.28	10.0	± 3.4	0.286	± 0.093	10 Hp / 17 N	0.794	0.008	-2.12 **	-1.61
SA12	3.34	± 0.13	72.7	± 11.3	2.582	± 0.341	12 Hp / 16 N	0.942	0.010	-1.70 *	-3.47 *
魚野川											
UO1	4.29	± 0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UO2	4.12	± 0.57	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UO3	3.44	± 0.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UO4	3.81	± 0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UO5	3.55	± 0.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UO6	3.58	± 0.10	0.7	± 0.3	0.008	± 0.004	1 Hp / 1 N	0.000	0.000	-	-

*1 25格子点/コドラート×5 反復

*2 3反復

*3 mtDNA COI 領域 (610-bp)の解析に基づくハプロタイプ多様度.

*4 mtDNA COI 領域 (610-bp)の解析に基づく塩基多様度.

*: P<0.05, **: P<0.01

表 IV-3. 千曲-信濃川全流程において採集されたチラカゲロウの階層的遺伝構造に関する分子分散解析 (AMOVA)

	d.f.	偏差 平方和	分散	%	固定 指数
グループ間	2	3	0.006	-0.3	-0.008
グループ内の個体群間	22	48	-0.019	-0.8	-0.011
個体群内	304	735	2.417	101.1	-0.003

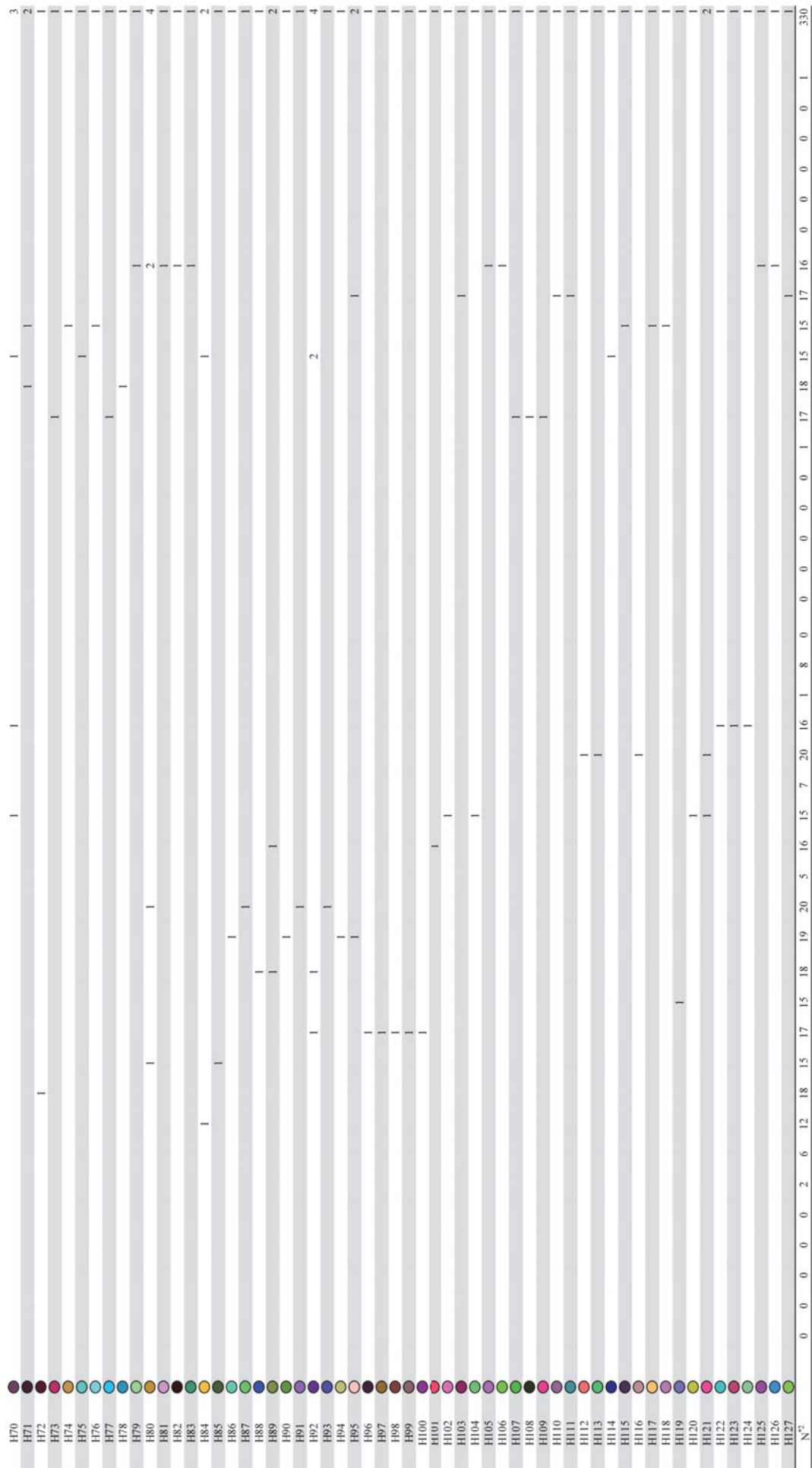
AMOVA におけるグループ区分: (1)千曲川の 8 地点 (CH6-13), (2)千曲-信濃川の 11 地点 (CS1-11), (3) 犀川の 7 地点 (SA6-12). このグループ区分は図 III-4 の NMDS と対応している.

表 IV-4. MIGRATE-n ソフトウェアを用いた千曲信濃川水系内における個体群サイズと遺伝子流動スケールの推定

	2.50%	97.50%	Mode	
θ : Mutation-scaled population sizes				
千曲川 (CH)	0.0263	0.0537	0.0318	
千曲-信濃川 (CS)	1.6234	5.1877	2.1749	
犀川 (SA)	0.0177	0.0122	0.0134	
M : Mutation-scaled immigration rates				
	2.50%	97.50%	Mode	Nm
Migration CH→CS	903	1090	956	2079
Migration CS→CH	10600	12600	11200	3562
Migration CH→SA	190	341	223	3
Migration SA→CH	3570	4760	3890	123
Migration CS→SA	190	341	223	81
Migration SA→CS	5910	6380	6040	13136

AMOVA と同様の階層分け: 千曲川 (CH 6-13); 千曲-信濃川 (CS1-11); 犀川(SA 6-12).

Nm : 1 世代あたりの移住個体数.



*1: mtDNA COI 領域 (610-bp) の解析結果に基づく
 *2: 各地点における解析個体数

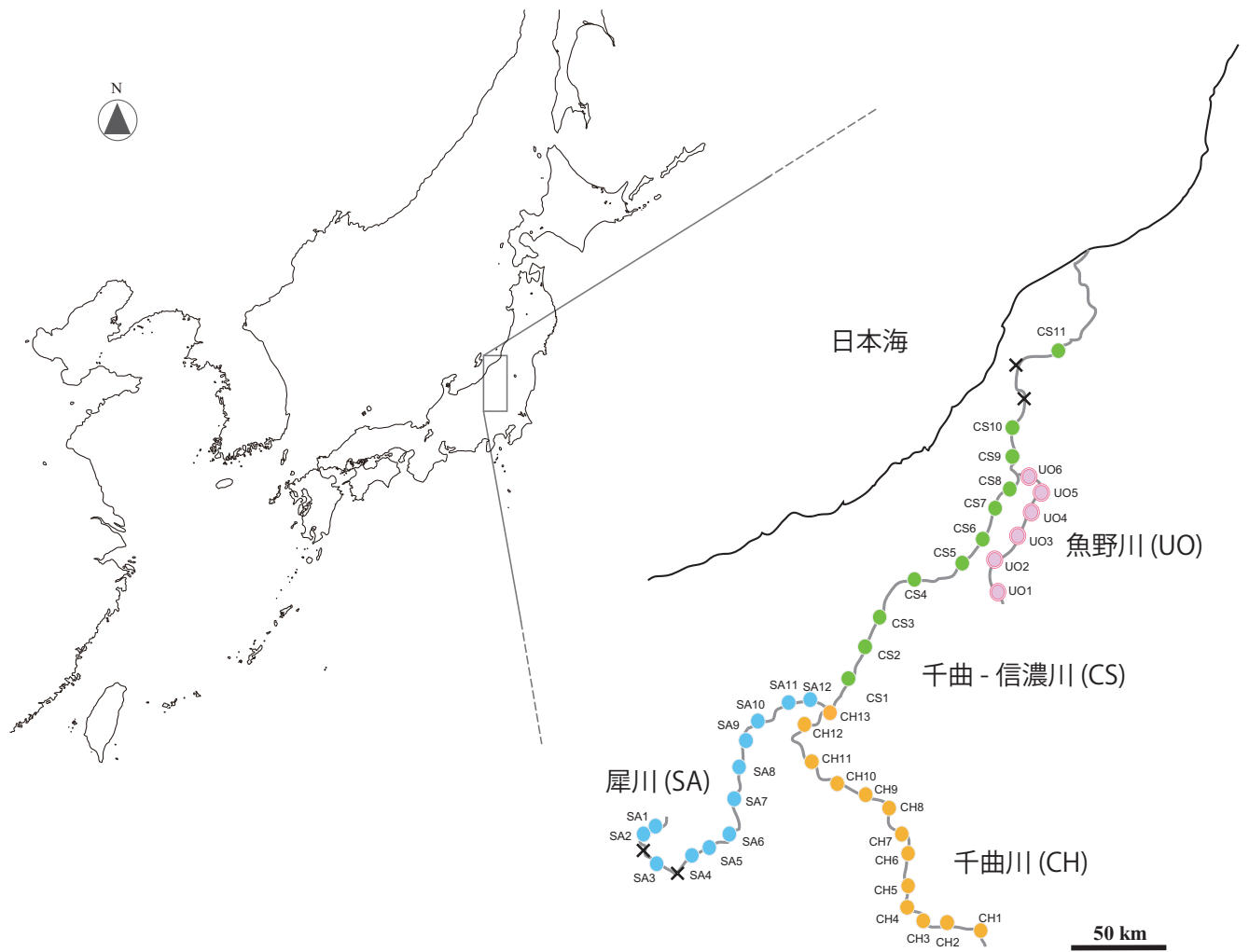


図 IV-1. 千曲 - 信濃川水系におけるサンプリング地点 (千曲川 13 地点, CH1-13; 千曲 - 信濃川 11 地点, CS1-11; 犀川 12 地点, SA1-12; 魚野川 6 地点, UO1-6)

地点番号は, 表 IV-1 と対応する. 円(●)はサンプリング地点を表わし, バツ印(×)は, ダム湖(止水域)の存在などの影響により, サンプリングが行えなかった地点を表す.

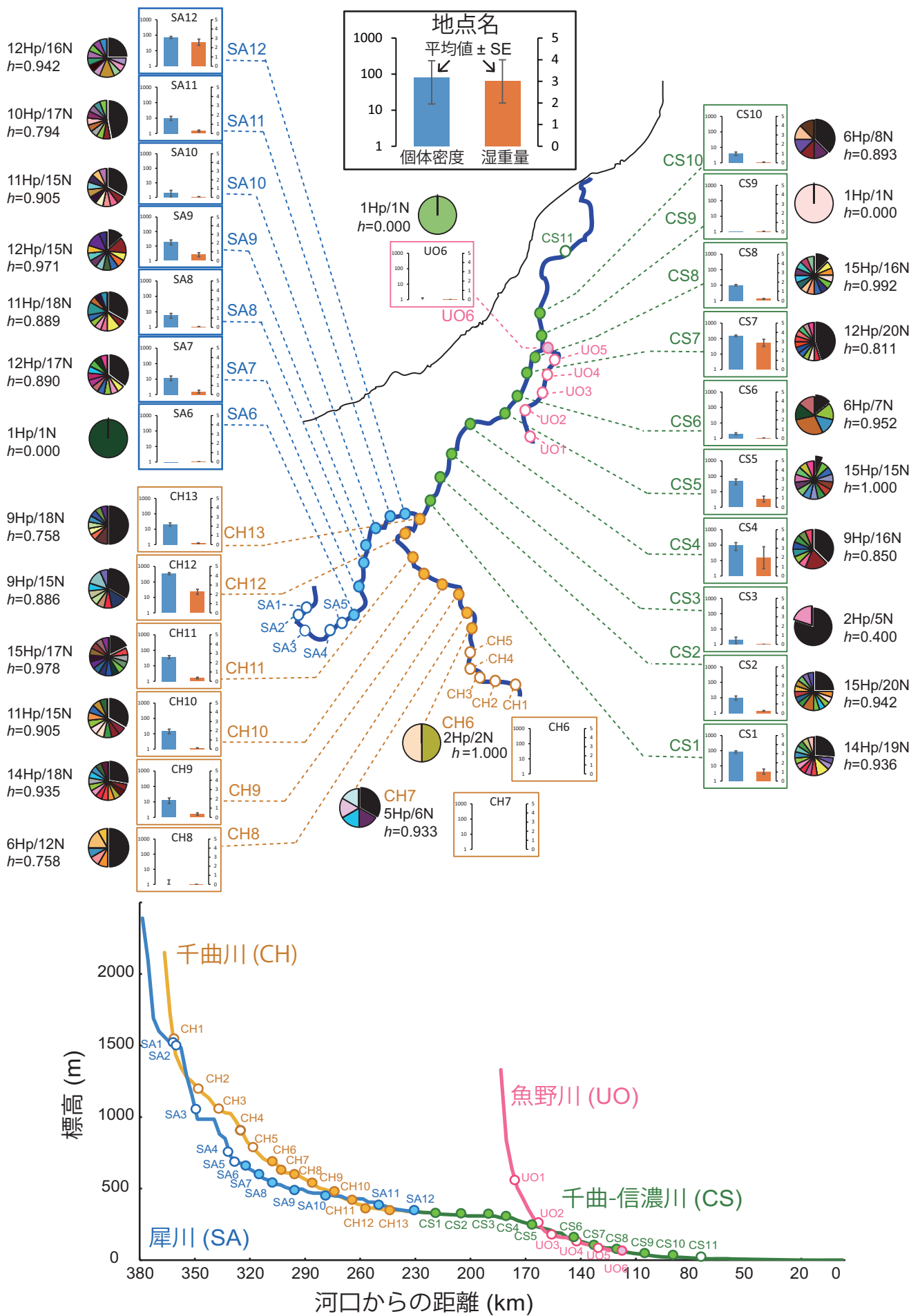
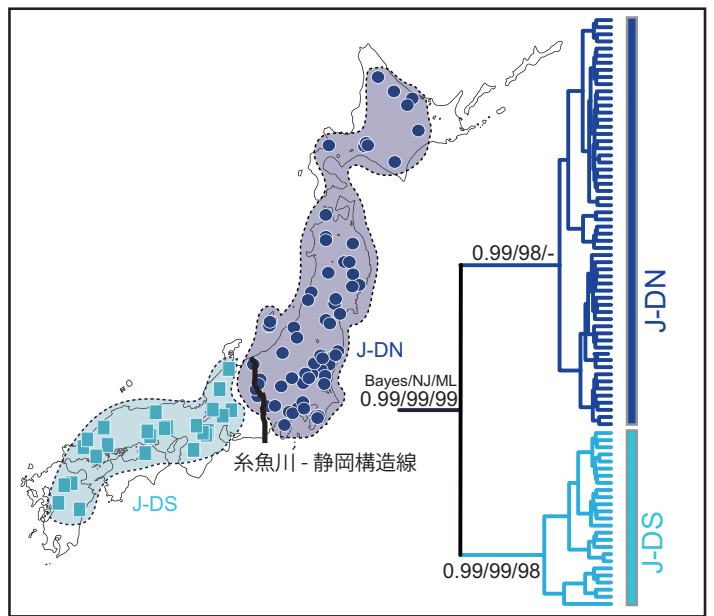
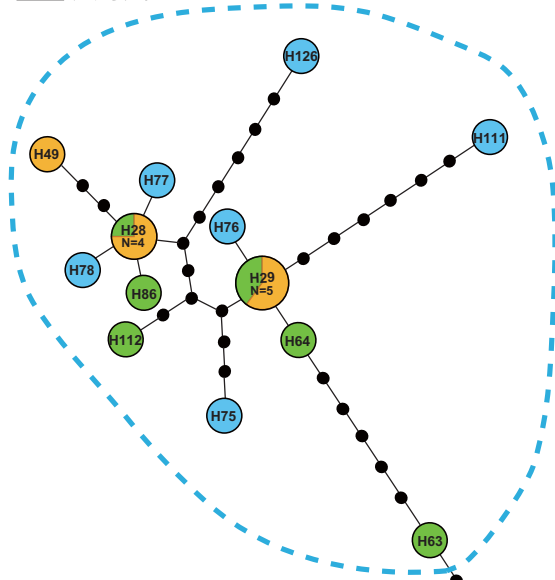


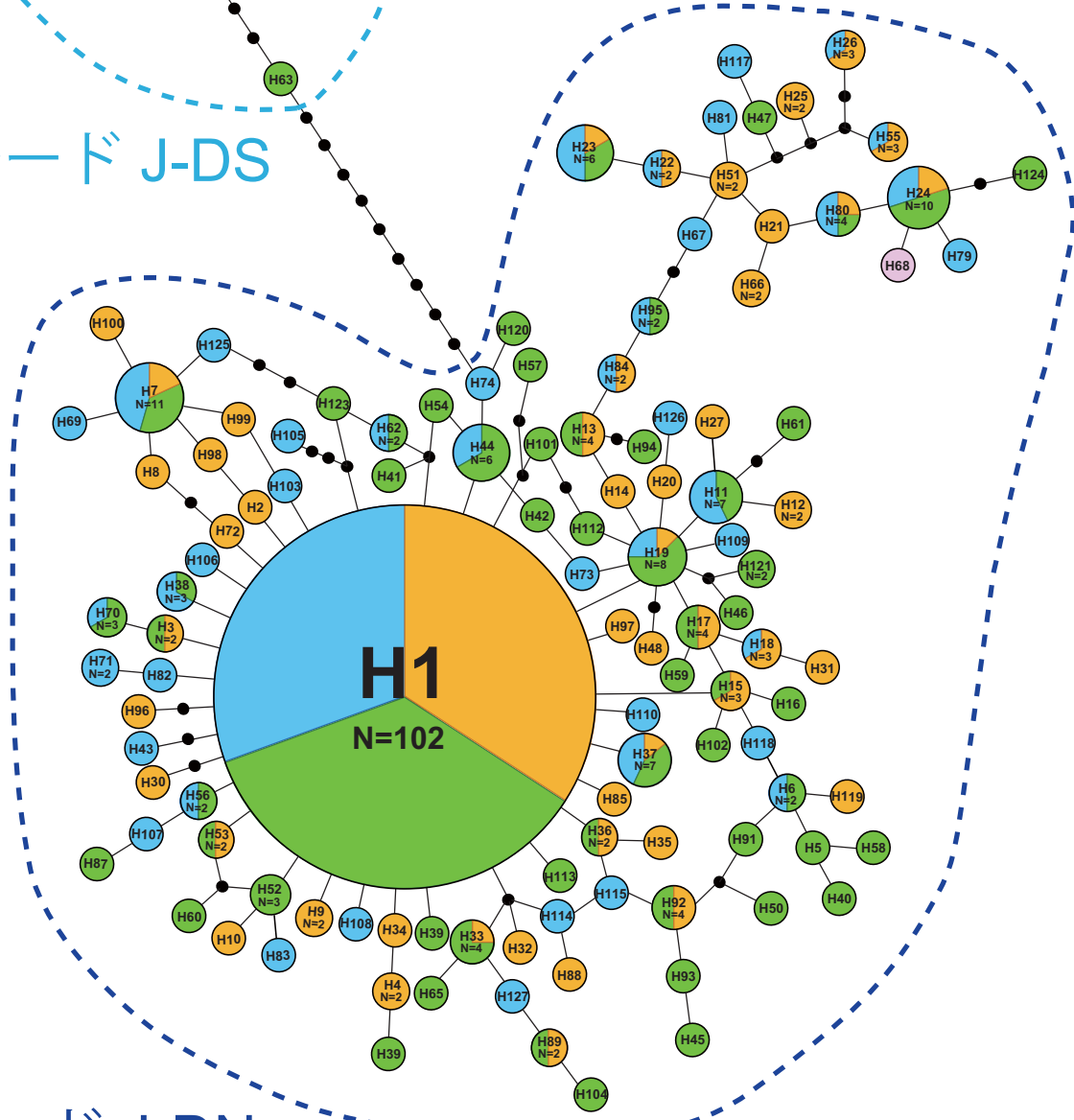
図 IV-2. 各調査地点におけるチラカゲロウの集団構造と遺伝的構造 (上) と千曲 - 信濃川水系のサンプリング地点における河口からの距離と標高の関係性 (下)

棒グラフは、各調査地点における定量採集により得られたチラカゲロウの個体密度 (青)、湿重量 (赤) の平均値および標準偏差を示している。円グラフは、各地点で採集されたチラカゲロウから検出された mtDNA COI 領域のハプロタイプ構成を示している。各色は表 IV-5 の検出されたハプロタイプの一覧と対応する。円グラフ横には、各地点で検出されたハプロタイプ数/解析個体数およびハプロタイプ多様度 (h) を示した。

- 千曲川
- 千曲-信濃川
- 犀川
- 魚野川



クレード J-DS



クレード J-DN

図 IV-3. 千曲 - 信濃川水系で採集されたチラカゲロウ (24 地点, 330 個体) の mtDNA COI 領域 (610-bp) において検出された全 127 ハプロタイプのネットワーク図

各色は、ハプロタイプが検出された河川の違いを示している。ハプロタイプ番号は、表 IV-5 での検出されたハプロタイプの一覧と対応する。円サイズは検出されたハプロタイプ数を反映している。右上の図は、東アジア広域を対象としたチラカゲロウの系統地理学的研究の結果において検出された複数クレードのうち、第 IV 章の結果に關係する 2 系統群の遺伝的分化パターンと、日本列島内における分布を示している (クレード J-DN とクレード J-DS; 第 II 章参照)。

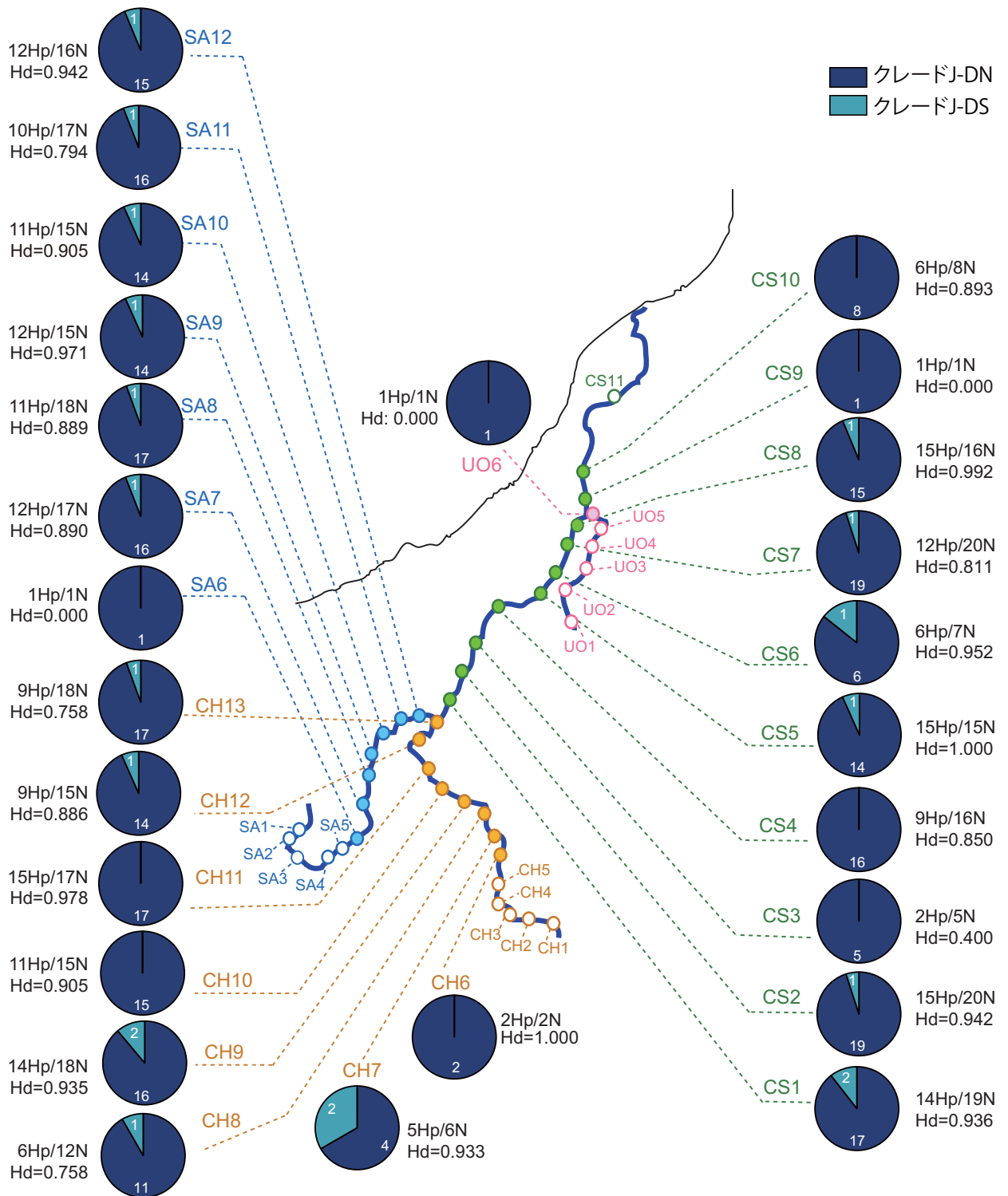


図 IV-4. 各調査地点におけるチラカゲロウの集団構造と遺伝的構造 (上) と千曲 - 信濃川水系のサンプリング地点における河口からの距離と標高の関係性 (下)

円グラフの色は、各地点で採集されたチラカゲロウの遺伝子解析の結果、検出された系統 (クレード J-DN, J-DS) の割合を示している。円グラフの数字はそれぞれの系統が検出された個体数を示している。円グラフ横には、各地点で検出されたハプロタイプ数/解析個体数およびハプロタイプ多様度 (h) を示した。

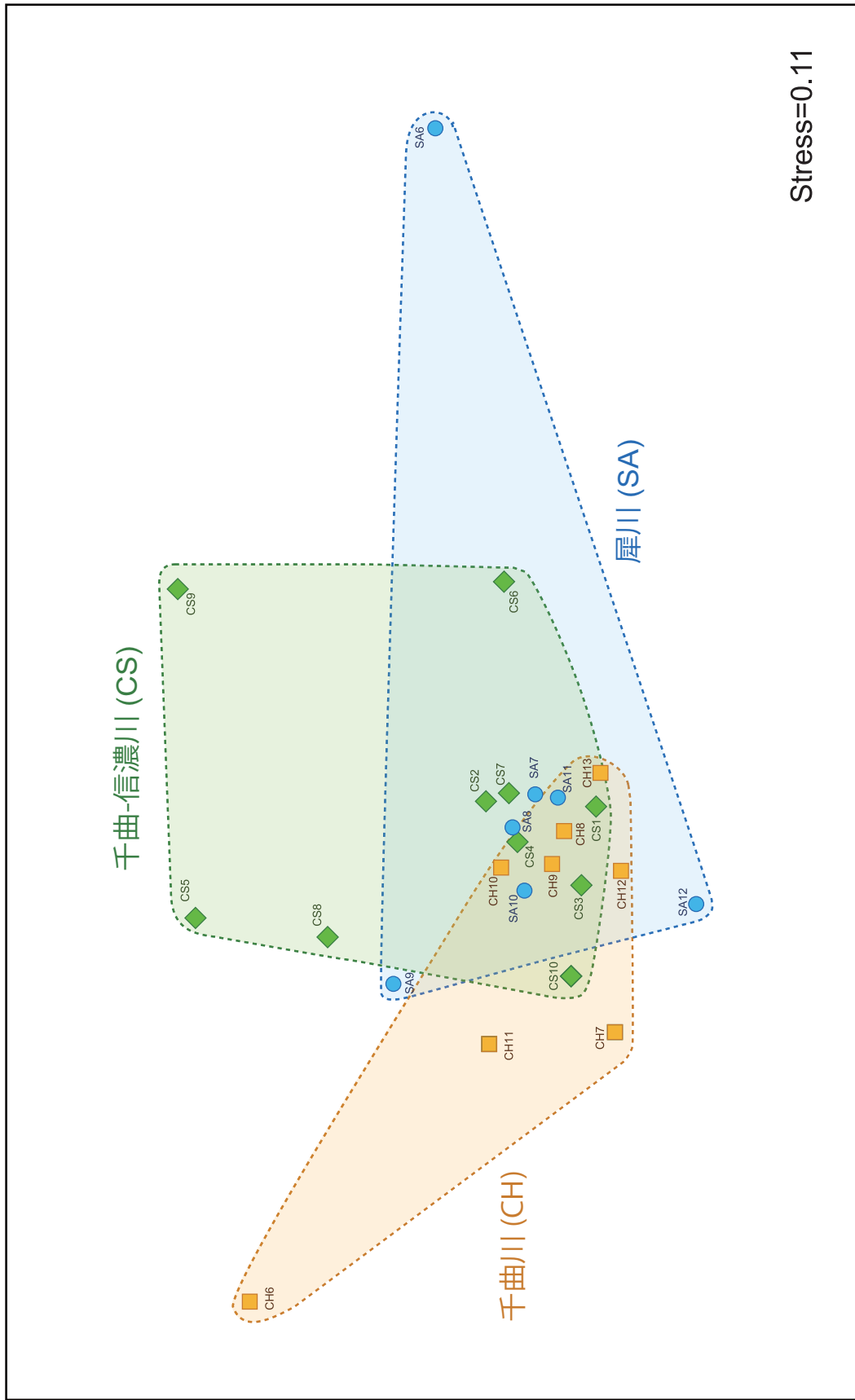


図 IV-5. Bray-Curtis 類似度指数を尺度として非計量多次元尺度構成法 (NMDS: Non-metric multidimensional scaling) による千曲 - 信濃川水系の各調査地における遺伝構造の比較
それぞれのプロットは各地点 (集団) のデータを示している。

総合考察

「緒言」で述べた通り、生物種群の分布域は、対象とする種群における系統進化的要因などにより決定されるが、この要因に、地史的要因、環境要因、対象種群における生理・生態学的要因や、他の生物種群との相互作用、さらには偶然性なども含めたあらゆる要因が複雑に絡み合うことで決定される。種レベルでの分布域の実態を把握することや、それを規定している要因を理解することは、種多様性の創出機構を理解する上で、とても重要である。本研究では、生物種群の種分化機構や種多様性の創出における進化・生態学的要因を究明する上で重要と考えられるハビタット・ジェネラリスト種であるチラカゲロウ *Isonychia japonica* に着目し、ハビタット・ジェネラリスト種が広域的に分布し得る背景について、分子系統解析を用い、究明を試みた。

東アジア地域広域に分布するチラカゲロウは、とりわけ日本列島においては、河川の上流から下流にいたる流程広域に分布する。本稿ではハビタット・ジェネラリスト種であるチラカゲロウ *Isonychia japonica* の集団構造および遺伝的構造について、「水平(平面)方向(系統地理学)」的視点と「垂直(縦断)方向(集団遺伝学)」的視点からの追究を試みた。

東アジア地域に分布するチラカゲロウ類 4 種(チラカゲロウ *I. japonica*, *I. ussurica*, *I. ignota*, シマチラカゲロウ *I. shima*)を対象とした系統解析の結果、各種の単系統性は強く支持された。チラカゲロウにおいても種の単系統性は強く支持された一方で、種内に遺伝的に分化した複数系統が存在することが明らかとなった。

東アジア広域における水平(平面)方向のアプローチから、チラカゲロウ種内の遺伝的分化とその分布特性を究明したところ、大陸と日本列島のチラカゲロウ間では大きな遺伝的分化が認められること(大陸クレード C vs. 日本列島クレード J)、さらには日本列島産チラカゲロウ内においても遺伝的に分化した 2 大系統(クレード J-D vs. クレード J-U)の存在が明らかとなった。すなわち、ハビタット・ジェネラリスト種であるチラカゲロウには、複数の隠蔽系統が包含され、隠れた多様性 *cryptic diversity* を有するという興味深い結果が示された。つまり、チラカゲロウにおいては、ハビタット・ジェネラリスト種といえども、幅広い環境適応力や、高い飛翔能力を

有して広域的な遺伝子流動が行われているわけではなく、それぞれの地域における複雑な地史的プロセスを経験したチラカゲロウの各系統群が、各々の環境に適応しながら系統を維持してきたことで、種のレベルでは(種全体としては)、多様で幅広い環境への適応がなされてきたものとする。また、前述のように遺伝的に分化したチラカゲロウの種内系統群同士が二次的に接触したり、それらの分布域がオーバーラップするなどして、結果的に、ハビタット・ジェネラリスト的な分布状況を維持しているものと考えられる。

一方で、千曲-信濃水系を対象にしたひとつの河川内(垂直方向の視点)に着目した研究において、チラカゲロウ(クレード J-D 系統内において)は、流域広域な遺伝子流動が生じている(もしくは生じていた)ことが示唆された。チラカゲロウは上流域から下流域にかけて広域的な流程分布をしているものの、連続した河川環境下においては、チラカゲロウの棲息には適さない緩流的環境や止水的環境が部分的に存在する(e.g., 淵や瀬, ダム湖などの止水域)。さらに、1世代スケールでは水系内広域にわたるような規模の大きな分散が生じている可能性はそれほど高くはないと考えられる。すなわち、水系内には様々な段階でのチラカゲロウの棲息適合環境や不適環境がともに配置されており、仮に、出水などの攪乱が生じた場合には、好適な瀬ハビタットが長く連続し、チラカゲロウの現存量の高いような流域のうちダメージが弱い流域のチラカゲロウが供給源(Source)となることで、強いダメージを受けた流域(Sink)への再分散がなされるような集団構造が維持されているものと考えられる。さらに、ソフトウェア Migrate-n を用いた水系内における移動・分散の方向性や強度に関する推定結果からも、上流から下流にかけて、さらには下流から上流、本流と支流間といった水系内広域で移動分散が生じていることを支持する結果も得られている。これらのことから、餌やより好適な環境を求めて生じる能動的な流下や、長い流程にわたる卵や幼生の受動的(非意図的)な流下、さらにはこれを補償するための能動的な遡上行動(e.g., メス成虫における産卵のための遡上飛翔; Müller, 1982)といった集団内での「コロナイゼーション・サイクル(colonization cycle)」が流域広域スケールで生じており、これにより遺伝子流動が生じる規模も大きくなり、流域全体とした大きな集

団構造が維持されていることが示唆された。このような河川水系内全体でひとつの集団構造が維持されることや集団構造の規模が大きいため、ひとつの連続した河川環境下においても遺伝的な均質化が引き起こされず、遺伝的多様性が維持されていると考えられる。

また、本研究において千曲-信濃川水系で認められたような水系レベルでの集団構造が、どの水系のチラカゲロウにおいても当てはまるような場合、それぞれの水系における遺伝的多様度は、水系内の集団サイズ(i.e., 水系の地理的規模)や他の水系により異なることが考えられる。つまり、本邦最大クラスの千曲-信濃川と比較して、より小規模な集団サイズの水系では、遺伝的多様度が低いことが予想される。このようなことから、集団サイズと遺伝的多様度の関係性について着目し、今後はより小規模河川も対象に加えた集団構造と遺伝的構造に関する研究を展開することで知見を深めていきたいと考えている。

また、水平方向視点の研究成果と垂直方向視点の研究成果を互いに照らし合わせて考察すると、同一系統(i.e. クレード J-D 系統)内においては、水系内の広域的な遺伝子流動は生じているものの、日本列島での大規模な分散による遺伝子流動までは生じていないと考えられる。よって、隣接する水系間での遺伝子流動がどの程度生じているのかを検討することも重要である。今後、千曲-信濃川に近い水系を対象とした集団構造と遺伝的構造を明らかにし、それらを比較することで、さらなる知見が深まるものと考えられる。

西村(1974)による生物の「分布の段階法則」によれば、ある生物種が発生してから死滅するまでの分布域の変遷を辿ると、「初期固有」段階、「連続(広域)分布」段階、「不連続分布」段階、そして「遺存固有」段階という 4 つの段階を踏んで、順次、時空間的に進展していくとされる(cf., 北川, 2010)。本研究で注目するチラカゲロウの場合、種のレベルで見れば「連続(広域)分布」を成しているように見えるが、系統間で比較すると、「不連続分布」段階にあるともいえる。一般に、ハビタット・ジェネラリスト種は、遺伝的に均質な個体の集合体が広域にわたって分布しているように受けとられている[e.g., 汎世界的分布(コスモポリタン分布)]。しかしながら実際には、連続分布しているように見える種にも、「隠蔽系統」が存在しており、ハビタット・ジ

ジェネラリスト種として考えられていたものが、その実態としては複数の隠蔽系統からなる複合系統種として広域分布を成していた、といった事例も多い(Lohman et al., 2010). 本研究におけるチラゲロウの事例では、大陸系統と日本列島系統間では遺伝的にも大きく分化していること、日本列島内においても複数系統の存在が確認され、複数系統群の集合体として広域分布を成し遂げていると考えられる. このようなチラカゲロウにみられた遺伝的分化やハビタット選択性は、種分化の途中にある状態であることを示しているのかもしれない. 本研究で検出されたクレード J-D, J-U を構成するチラカゲロウにおいては、同一水系内における「繁殖干渉に伴うニッチ分割」および「生殖的隔離」が生じている可能性も示唆された. チラカゲロウが棲息する「河川」系は、上流から下流へ流下する中で、物理・化学的な環境をはじめ、共存する生物種群の組成も劇的に変化する系である. さらに、降雨による突発的な出水や季節的出水などによる攪乱のもとに成立している系であり、季節や時間的な環境変動も大きい. すなわち、空間的に大きな変動を伴う攪乱環境系であるといえる. このような環境下において、チラカゲロウを構成する主要クレード間で、形態形質 (e.g., 体サイズや体型), 生態的形質 (e.g., 餌資源やライフサイクル, 化性), 行動的形質 (e.g., 飛翔行動やそのスケール), あるいは生理学的形質 (e.g., 温度適応性や成長速度) などにおいて、すでに種レベルにも相当するような分化が生じている可能性も十分に考えられる. しかしながら、本研究においてはこれらの遺伝的分化した系統間での生殖隔離の有無に関しては、生物学的種概念 (Mayer, 1942) に直接迫り得る実験データや分子マーカーによる間接的データも十分ではないことや、従来の種レベルでの分類学的鍵形質において、不連続的な差異が認められなかったことから、種分化に関する扱いについては今後の課題と考えている. 仮に、ハビタット・スペシャリスト種がすでに種分化を終えた、あるいは種多様性を創出した最終段階にあるならば、本種、ハビタット・ジェネラリスト種チラカゲロウは、これから種分化・種多様性の創出をもたらす可能性を強く秘めたハビタット・ジェネラリスト種群であるといえる. いずれにせよ、チラカゲロウ内で検出されたクレード J-D, クレード J-U をはじめとする主要系統群間での遺伝的分化の知見から、それぞれの系統群は、

種分化の進行途中にある系統群である可能性が高く、チラカゲロウは種分化機構を究明する上での鍵分類群(Key taxon)にもなり得ると考えている。

本研究により、一見すると「どこにでもいる」そして「たくさんいる」と称されるような広域分布するハビタット・ジェネラリスト種が、多様かつ複雑な進化プロセスのもとで現在のような広域分布を維持しているという興味深い結果を得られた。本研究におけるハビタット・ジェネラリスト種であるチラカゲロウの分布特性、およびその生態・進化的背景の究明は、「ハビタット・ジェネラリスト種は、多くの種が分布の制限を受ける中で、どのような系統進化的背景のもとに広域的分布を成し遂げたのか、いかにして様々な環境に適応しているのか」という問いへの部分的な答えを導き出せたとともに、生物の分布や種多様性創出の背景を知る上で重要な知見をもたらしたと考える。

謝辞

本研究は、たくさんの方のご指導、ご協力をもとに成し遂げることができました。心から感謝申し上げます。信州大学学術研究院理学系の東城幸治准教授には、研究の全過程を通してご指導をいただきました。国際学会や研究会といったたくさんの発表・交流の機会をいただき、さらには観察会や講演会などのイベントに積極的に携わらせていただいたことで、学外においても幅広く交流・活動をすることができました。心からお礼を申し上げます。奈良女子大学自然科学系の佐藤宏明准教授、信州大学学術研究院理学系の市野隆雄教授、浅見崇比呂教授、高田啓介准教授には、博士論文をとりまとめるにあたりご助言とご協力をいただきました。貴重なご意見を寄せてくださりありがとうございます。また信州大学学術研究院理学系の戸田任重教授、朴虎東教授、山本雅道助教には河川環境の測定を中心とした研究内容に関して、アドバイスをいただきました。二木功子氏には河川環境の測定や日頃の研究活動にあたり、ご意見・ご協力をいただきました。信州大学学術研究院理学系の鈴木啓助教授からは研究活動発表の機会をいただき、研究活動をすすめる上でご協力をいただきました。自然共生研究センターの末吉正尚博士、Korea University の関根一希博士、Wisconsin-Madison University の Sean D. Schoville 助教、Griffith University の Jane M. Hughe 教授には研究にあたり、多くのご助言をいただきました。また、信州大学学術研究院理学系の佐藤利幸教授、柴田直樹准教授、藤山静雄教授、伊藤建夫教授、久保浩義教授、伊藤靖夫准教授、高橋耕一准教授、高梨功次郎助教にも研究にあたり多くのご助言やご指導をいただきました。

卒業生のみなさまも含めた信州大学の東城研究室の鈴木智也博士、小林建介氏、加藤慎也氏、Jo JaeIck 氏、久米あずさ氏、加藤雄登氏、早川美波氏、塚野真生氏、新井谷梨鈴氏、村田拓也氏、三上賢司氏、大西央士郎氏、竹中將起氏には、いつもセミナーや日頃の研究活動にあたり、ご意見・ご協力をいただきました。とりわけ、鈴木智也博士からは、研究を進める上での解析方法等を丁寧に教えていただきました。また、信州大学山岳科学研究所の江田慧子助教、大阪府立大学の上田昇平助教、玉川大学の服部充博士、北海道大学の井坂友

一博士，信州大学の小西繭博士，氏家由利香博士には研究遂行のアドバイスをいただき，また研究者として生きていくための進路相談に応じていただきました．また，信州大学総合工学系研究科の内記慧氏，鈴木大地氏には日々の研究活動をすすめる上でご協力をいただきました．北海道水生生物研究所の伊藤富子博士，千歳市教育委員会の久原直利博士，神奈川県環境科学センターの野崎隆夫博士，京都大学の竹門康弘准教授，大阪府立大学の谷田一三教授，愛知工業大学の内田臣一教授，千葉県立中央博物館の倉西良一氏，神奈川県環境科学センターの石綿進一氏，東京大学の加賀谷隆助教，新潟大学の福原晴夫教授にはたいへん意義深いご議論やご意見をいただきました．とりわけ，伊藤富子博士には研究遂行のアドバイスをたくさんいただきました．また，信州大学の中村浩志教授，平林公男教授，豊田政史助教，独立行政法人土木研究所の傳田正利博士，千曲川河川事務所の浮田博文氏をはじめとする河川生態学術研究会千曲川グループの皆様にも貴重なご意見をいただきました．

池竹弘旭氏，一柳英隆博士，伊藤富子博士，稲葉崇氏，井上泰江氏，久原直利博士，倉西良一氏，小林草平博士，坂田啓三氏，佐藤大樹博士，司村宜祥氏，富樫繁春氏，塘忠顕教授，大平創氏，野崎隆夫博士，藤谷俊仁博士，向山創一郎氏，吉成暁博士，Yeon Jae Bae 教授，Jo Jae Ick 氏，Oh Min Woo 氏，には貴重なチラカゲロウ標本をご提供いただきました．また，新井谷梨鈴氏，伊藤富子博士，大西央士郎氏，加藤慎也氏，加藤雄登氏，久米あずさ氏，倉西良一氏，小林建介氏，斎藤義幸氏，佐藤大樹博士，篠田健太氏，柴田幸紀氏，鈴木智也博士，関根一希博士，竹内希氏，竹中將起氏，塚野真生氏，林裕美子氏，三上賢司氏，村田拓也氏，谷澤崇氏，吉鷹一郎氏，Tatyana Vshivkova 氏，Yura Tshistyakov 氏にはサンプリングに同行いただき，協力いただきました．おかげさまで日本列島・東アジア広域におよぶチラカゲロウのサンプルを解析することができました．中嶋すみ子氏には，日頃の研究活動を補助していただき，自然環境マイスターの宮下哲則氏には観察会等の自然実習活動参画への機会をいただきました．また，大学院生活を送る上でも，大きな支えとなってくださいました．

本研究を進めるにあたり直接的あるいは間接的にサポート、ご支援をいただきました家族、友人、先輩、信州大学の先生方、学生支援室や学生支援グループの職員のみなさま、自然環境マイスターのみなさま、信州大学山岳友の会の皆様に心から感謝申し上げます。

お世話になった皆様に、深く感謝いたします。最後に、5年間をともに過ごしてきたチラカゲロウへ感謝の意を表します。

引用文献

- 阿部永. 2006. 日本の動物地理. 動物地理の自然史. 増田隆一・阿部永(編)北海道大学出版会, 札幌. pp.1–12.
- Aboim, N. A., N. Mesquita, M. Drago, M. M. Coelho, and M. J. Alves. 2013. Assessing inter-drainage connections: patterns of genetic diversity in an Iberian cyprinid fish. *Biological Journal of the Linnean Society* 109:656–669.
- Alp, M., I. Keller, A. M. Westram, and C. T. Robinson. 2012. How river structure and biological traits influence gene flow: a population genetic study of two stream invertebrates with differing dispersal abilities. *Freshwater Biology* 57:969–981.
- 浅見崇比呂. 2004. 第3章 進化から見た生態. 生態学入門. 日本生態学会(編)東京化学同人, 東京. pp.23–28.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history, and evolution*. Chapman and Hall, New York.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Baggiano, O., D. J. Schmidt, F. Sheldon, and J. M. Hughes. 2011. The role of altitude and associated habitat stability in determining patterns of population genetic structure in two species of *Atalophlebia* (Ephemeroptera: Leptophlebiidae). *Freshwater Biology* 56:230–249.
- Bain, M. B., J. T. Finn, and H. E. Booke. 1985. Quantifying stream substrate for habitat analysis studies. *North American Journal of Fisheries Management* 5:499–506.
- Bajkova, O. Y. 1970. New and little-known species of mayflies (Ephemeroptera) from the basin of the Amur River. *Entomologicheskoe Obozrenie* 49:146–55 [In Russian]
- Barnes, G. L. 2003. Origins of the Japanese islands: the new “big picture”. *Japan Review*

15:3–50.

- Beerli, P. 2001. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics* 185:313–326.
- Bohonak, A. J., and D. G. Jenkins. 2003. Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. *Ecology Letters* 6:783–796.
- Bray, J. R., and J. T. Curtis. 1957. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27:325–349.
- Brown, B. L., C. M. Swan, D. A. Auerbach, E. H. C. Grant, N. P. Hitt, K. O. Maloney, and C. Partrick. 2011. Metacommunity theory as a multispecies, multiscale framework for studying the influence of river network structure on riverine communities and ecosystems. *Journal of the North American Benthological Society* 30:310–327.
- Campbell, R. E., and A. R. McIntosh. 2013. Do isolation and local habitat jointly limit the structure of stream invertebrate assemblages? *Freshwater Biology* 58:128–141.
- Clarke, K. R., and R. N. Gorley. 2000. PRIMER version 6: user manual/tutorial. PRIMER-E Ltd, Plymouth.
- Clement, M., D. Posada, and K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657–1659.
- Clowers, K. J., J. Heiberger, J. S. Piotrowski, J. L. Will, and A. P. Gasch. 2015. Ecological and genetic barriers differentiate natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Ecology and Evolution*.
- Cook, B. D., C. M. Pringle, and J. M. Hughes. 2008. Molecular evidence for sequential colonization and taxon cycling in freshwater decapod shrimps on a Caribbean island. *Molecular Ecology* 17:1066–1075.
- Dowle, E. J., M. Morgan-Richards, F. Brescia, and S. A. Trewick. 2015. Correlation between

shell phenotype and local environment suggests a role for natural selection in the evolution of *Placostylus* snails. *Molecular Ecology* 24:4205–4221.

Drummond, A. J., M. A. Suchard, D. Xie, and A. Rambaut. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29:1969–1973.

Elbrecht, V., C. K. Feld, M. Gies, D. Hering, M. Sondermann, R. Tollrian, and F. Leese. 2014. Genetic diversity and dispersal potential of the stonefly *Dinocras cephalotes* in a central European low mountain range. *Freshwater Science* 33:181–192.

Ellis, J. S., M. E. Knight, B. Darvill, and D. Goulson. 2006. Extremely low effective population sizes, genetic structuring and reduced genetic diversity in a threatened bumblebee species, *Bombus sylvarum* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology* 15:4375–4386.

Eto, K., M. Matsui, T. Sugahara, and T. Tanaka-Ueno. 2012. Highly complex mitochondrial DNA genealogy in an endemic Japanese subterranean breeding brown frog *Rana tagoi* (Amphibia, Anura, Ranidae). *Zoological Science* 29:662–671.

Excoffier, L., and H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resource* 10:564–567.

Farris, J. S., M. Källersjö, A. G. Kluge, and C. Bult. 1995. Constructing a significance test for incongruence. *Systematic Biology* 44:570–572.

Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17:368–376.

Fratini, S., S. Zaccara, S. Barbaresi, F. Grandjean, C. Souty-Grosset, G. Crosa, and F. Gherardi. 2005. Phylogeography of the threatened crayfish (genus *Austropotamobius*) in Italy: implications for its taxonomy and conservation. *Heredity* 94:108–118.

Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth,

- hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.
- Garnier, S., P. Alibert, P. Audiot, B. Prieur, and J. Y. Rasplus. 2004. Isolation by distance and sharp discontinuities in gene frequencies: implications for the phylogeography of an alpine insect species, *Carabus solieri*. *Molecular Ecology* 13:1883–1897.
- Hayashi, F., S. Dobata, and R. Futahashi. 2005. Disturbed population genetics: suspected introgressive hybridization between two *Mnais* damselfly species (Odonata). *Zoological Science* 22:869–881.
- Hershey, A. E. 1993. Stable isotopes resolve the drift paradox for *Baetis* mayflies in an arctic river. *Ecology* 74:2315–2325.
- Hewitt, G. M. 2004. The structure of biodiversity - insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology* 1:4.
- Hughes, J. M. 2007. Constraints on recovery: using molecular methods to study connectivity of aquatic biota in rivers and streams. *Freshwater Biology* 52:616–631.
- Hughes, J. M., D. J. Schmidt, and D. S. Finn. 2009. Genes in streams: using DNA to understand the movement of freshwater fauna and their riverine habitat. *BioScience* 59: 573–583.
- Hughes, J. M., J. A. Huey, and D. J. Schmidt. 2013. Is realised connectivity among populations of aquatic fauna predictable from potential connectivity? *Freshwater Biology* 58:951–966.
- Hwang, J. M., T. J. Yoon, K. I. Suh, and Y. J. Bae. 2013. Molecular phylogeny evidence of altitudinal distribution and habitat adaptation in Korean *Ephemera* species (Ephemeroptera: Ephemeridae). *Entomological Research* 43:40–46.
- Iijima, A., and R. Tada. 1990. Evolution of Tertiary sedimentary basins of Japan in reference to opening of the Japan Sea. *Journal of the Faculty of Science* 22:121–171.
- Inoue, M., and S. Nakano. 1998. Effects of woody debris on the habitat of juvenile masu salmon (*Oncorhynchus masou*) in northern Japanese streams. *Freshwater Biology* 40:1–16.

- 石綿進一・竹門康弘. 2005. カゲロウ目 Ephemeroptera. 日本産水生昆虫 –科・属・種への検索-. 川合禎次・谷田一三(編)東海大学出版会, 秦野. pp.31–128.
- Jeratthitikul, E., T. Hara, M. Yago, T. Itoh, M. Wang, S. Usami, and T. Hikida. 2013. Phylogeography of Fischer’s blue, *Tongeia fischeri*, in Japan: evidence for introgressive hybridization. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66:316–326.
- Kano K., H. Kato, Y. Yanagisawa, and F. Yoshida. 1991. Stratigraphy and geological history of the Cenozoic of Japan. *Geological Survey of Japan* 274:1–114.
- Kato, Y., Y. Morii, and K. Tojo. 2013. Molecular phylogeographic analysis of East Asian cryptoperlan stoneflies (Insecta: Plecoptera, Peltoperlidae). *Limnology* 14:179–194.
- 河村善也. 1998. 第四紀における日本列島へのほ乳類の移動. *第四紀研究* 37:251–257.
- 河田雅圭. 2003. 種分化機構の解明と生物多様性進化. *日本進化学会ニュース* 3:14–18.
- Kellermann, V., B. Heerwaarden, C. M. Sgrò, and A. A. Hoffmann. 2009. Fundamental evolutionary limits in ecological traits drive *Drosophila* species distributions. *Science* 325:1244–1246.
- Kindlmann, P., and F. Burel. 2008. Connectivity measures: a review. *Landscape Ecology* 23:879–890.
- 北川忠夫. 2010. 温帯性淡水魚成立. 淡水魚類地理の自然史. 渡辺勝敏・高橋洋 (編)北海道大学出版会, 札幌. pp.98–99.
- Kitamura, A., and K. Kimoto. 2006. History of the inflow of the warm Tsushima Current into the Sea of Japan between 3.5 and 0.8 Ma. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 236:355–366.
- Knopp, M., and R. Cormier. 1997. *Mayflies: an Angler’s study of trout water Ephemeroptera*. Greycliff Publishing Company, Helena.
- Koizumi, I., N. Usio, T. Kawai, N. Azuma, and R. Masuda. 2012. Loss of genetic diversity

means loss of geological information: the endangered Japanese crayfish exhibits remarkable historical footprints. PLOS ONE 7:e33986.

国土交通省. 2008. 千曲川らしさを求めて. 国土交通省河川整備局 千曲川河川事務所, 長野.

Kovats, Z., J. A. N. Ciborowski, and L. Corkum. 1996. Inland dispersal of adult aquatic insects. *Freshwater Biology* 36:265–276.

Krosch, M. N., A. M. Baker, P. B. Mather, and P. S. Cranston. 2011. Spatial population genetic structure reveals strong natal site fidelity in *Echinocladius martini* (Diptera: Chironomidae) in northeast Queensland, Australia. *Freshwater Biology* 56:1328–1341.

Lehrian, S., S. U. Pauls, and P. Haase. 2009. Contrasting patterns of population structure in the montane caddisflies *Hydropsyche tenuis* and *Drusus discolor* in the Central European highlands. *Freshwater Biology* 54:283–295.

Lehrian, S., M. Bálint, P. Haase, and S. U. Pauls. 2010. Genetic population structure of an autumn emerging caddisfly with inherently low dispersal capacity and insights into its phylogeography. *Journal of the North American Benthological Society* 29:1100–1118.

Lenz, T. L. 2015. Transcription in space—environmental vs. genetic effect on differential immune gene expression. *Molecular Ecology* 24:4583–4585.

Leppänen, J., K. Vepsäläinen, and R. Savolainen. 2011. Phylogeography of the ant *Myrmica rubra* and its inquiline social parasite. *Ecology and Evolution* 1:46–62.

Lowe, W. H., and F. W. Allendorf. 2010. What can genetics tell us about population connectivity? *Molecular Ecology* 19:3038–3051.

Lohman, D. J., K. K. Ingram, D. M. Prawiradilaga, K. Winker, F. H. Sheldon, R. G. Moyle, P. K. L. Ng, P. S. Ong, L. K. Wang, T. M. Braile, D. Astuti, and R. Meier. 2010. Cryptic genetic diversity in “widespread” Southeast Asian bird species suggests that Philippine

- avian endemism is gravely underestimated. *Biological Conservation* 143:1885–1890.
- Ma, C., P. Yang, F. Jiang, M. P. Chapuis, Y. Shali, G. A. Sword, and L. Kang. 2012. Mitochondrial genomes reveal the global phylogeography and dispersal routes of the migratory locust. *Molecular Ecology* 21:4344–4358.
- 町田洋. 2006. 後期鮮新世以降の山地と盆地の発達. 日本の地形5 中部. 町田洋・松田時彦・海津正倫・小泉武栄(編)東京大学出版会, 東京. pp.326-329.
- Martin, A. K. 2011. Double saloon door tectonics in the Japan Sea, Fossa Magna, and the Japanese Island Arc. *Tectonophysics* 498:45–65.
- Martin, J., V. Guryev, A. Blinov, and D. H. D. Edward. 2002. A molecular assessment of the extent of variation and dispersal between Australian populations of the genus *Archaeochlus* Brundin (Diptera: Chironomidae). *Invertebrate Systematics* 16:599–603.
- 松村松年. 1931. 日本昆蟲大圖鑑. 東京書院, 東京.
- McKay, B. D. 2012. A new timeframe for the diversification of Japan's mammals. *Journal of Biogeography* 39:1134–1143.
- Miller, M. P. 2005. Alleles In Space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96:722–724.
- Miller, M. P., D. W. Blinn, and P. Keim. 2002. Correlations between observed dispersal capabilities and patterns of genetic differentiation in populations of four aquatic insect species from the Arizona White Mountains, U.S.A. *Freshwater Biology* 47:1660–1673.
- Miyazono, S., and C. M. Taylor. 2013. Effects of habitat size and isolation on species immigration–extinction dynamics and community nestedness in a desert river system. *Freshwater Biology* 58:1303–1312.
- Monaghan, M. T., P. Spaak, C. T. Robinson, and J. V. Ward. 2002. Population genetic structure of three alpine stream insects: influences of gene flow, demographics, and habitat

- fragmentation. *Journal of the North American Benthological Society* 21:114–131.
- Moyle, P. B., and B. Vondracek. 1985. Persistence and structure of the fish assemblage in a small California stream. *Ecology* 66:1–13.
- Müller, K. 1982. The colonization cycle of freshwater insects. *Oecologia* 52:202–207.
- Múrria, C., and J. M. Hughes. 2008. Cyclic habitat displacements during Pleistocene glaciations have induced independent evolution of *Tasimia palpata* populations (Trichoptera: Tasimiidae) in isolated subtropical rain forest patches. *Journal of Biogeography* 35:1727–1737.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:5269–5273.
- Nguyen, T. T. T., C. M. Austin, M. M. Meewan, M. B. Schultz, and D. R. Jerry. 2004. Phylogeography of the freshwater crayfish *Cherax destructor* Clark (Parastacidae) in inland Australia: historical fragmentation and recent range expansion. *Biological Journal of the Linnean Society* 83:539–550.
- Nishizawa, T., A. Kurabayashi, T. Kunihara, N. Sano, T. Fujii, and M. Sumida. 2011. Mitochondrial DNA diversification, molecular phylogeny, and biogeography of the primitive rhacophorid genus *Buergeria* in East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59:139–147.
- Nosil, P., and J. L. Feder. 2012. Genomic divergence during speciation: causes and consequences introduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367:332–342.
- Öckinger, E., O. Schweiger, T. O. Crist, D. M. Debinski, J. Krauss, M. Kuussaari, J. D.

- Petersen, J. Pöyry, J. Settele, K. S. Summerville, and R. Bommarco. 2010. Life-history traits predict species responses to habitat area and isolation: a cross continental synthesis. *Ecology Letters* 13:969–979.
- Ogden, T. H., and M. F. Whiting. 2005. Phylogeny of Ephemeroptera (mayflies) based on molecular evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37:625–643.
- Ogitani, M., K. Sekiné, and K. Tojo. 2011. Habitat segregation and genetic relationship of two heptageniid mayflies, *Epeorus latifolium* and *Epeorus l-nigrus*, in the Shinano-gawa River basin. *Limnology* 12:117–125.
- 沖野外輝夫. 2005. 河川の生態学. 共立出版, 東京. pp.13–15.
- Otofujii, Y., T. Matsuda, and S. Nohda. 1985. Opening mode of the Japan Sea inferred from paleomagnetism of the Japan arc. *Nature* 317:603–604.
- Papadopoulou, A., I. Anastasiou, and A. P. Vogler. 2010. Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the Mid-Aegean Trench calibration. *Molecular Biology and Evolution* 27:1659–1672.
- Papazian, M., G. Masselot, and M. Brulin. 1999. Rediscovery of *Isonychia ignota* for the Ephemeroptera fauna of France (Ephemeroptera: Isonychiidae). *Ephemera* 1:35–39. [In French].
- Pauls, S. U., H. T. Lumbsch, and P. Haase. 2006. Phylogeography of the montane caddisfly *Drusus discolor*: evidence for multiple refugia and periglacial survival. *Molecular Ecology* 15:2153–2169.
- Ponniah, M., and J. M. Hughes. 2004. The evolution of Queensland spiny mountain crayfish of the genus *Euastacus*. I. testing vicariance and dispersal with interspecific mitochondrial DNA. *Evolution* 58:1073–1085.
- Prendini, L., P. Weygoldt, and C. W. Wheeler. 2005. Systematics of the *Damon variegatus*

- group of African whip spiders (Chelicerata: Amblypygi): evidence from behaviour, morphology and DNA. *Organisms, Diversity and Evolution* 5:203–236.
- Previšić, A., C. Walton, M. Kučinić, P. T. Mitrikeski, and M. Kerovec. 2009. Pleistocene divergence of Dinaric *Drusus* endemics (Trichoptera, Limnephilidae) in multiple microrefugia within the Balkan Peninsula. *Molecular Ecology* 18:634–647.
- Pullium, H. R. 1988. Sources, sinks, and population reigration. *American Naturalist* 132:652–661.
- Rambaut, A. 2009. FigTree, Version 1.3.1.
Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rambaut, A., and A. J. Drummond. 2007. *Tracer, Version 1.5. MCMC Trace Analysis Tool*.
Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Ratnasingham, S., and P. D. N. Hebert. 2007. Barcoding BOLD: the barcode of life data system (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7:355–364.
- Rozas, J., J. C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer, and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496–2497.
- Satoh, A., T. Sota, T. Ueda, Y. Enokido, J. C. Paik, and M. Hori. 2004. Evolutionary history of coastal tiger beetles in Japan based on a comparative phylogeography of four species. *Molecular Ecology* 13:3057–3069.
- 佐藤博俊. 2012. 核 DNA とミトコンドリア DNA の比較による生殖的隔離の検出. 種間関係の生物学 共生・寄生・捕食の新しい姿. 種生物学会(編)文一総合出版, 東京. pp. 42–245.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406–425.

- Savolainen, V., R. S. Cowan, A. P. Vogler, G. K. Roderick, and R. Lane. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360:1805–1811.
- Schild, D. R., D. C. Card, R. A. Adams, T. Jezkova, J. Reyes-Velasco, F. N. Proctor, C. L. Spencer, H-W. Herrmann, S. P. Mackessy, and T. A. Castoe. 2015. Incipient speciation with biased gene flow between two lineages of the Western Diamondback Rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 83:213–223.
- Schmidt, J., L. Opgenoorth, S. Höll, and R. Bastrop. 2012. Into the Himalayan exile: the phylogeography of the ground beetle *Ethira* clade supports the Tibetan origin of forest-dwelling Himalayan species groups. *PloS One* 7:e45482.
- Schoville, S. D., T. Uchifune, and R. Machida. 2013. Colliding fragment islands transport independent lineages of endemic rock-crawlers (Grylloblattodea: Grylloblattidae) in the Japanese archipelago. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66:915–927.
- Schwarz, G. 1978. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* 6:461–464.
- Sekiné, K., F. Hayashi, and K. Tojo. 2013. Phylogeography of the East Asian polymitarcyid mayfly genus *Ephoron* (Ephemeroptera Polymitarcyidae): a comparative analysis of molecular and ecological characteristics. *Biological Journal of the Linnean Society* 109:181–202.
- Sekiné, K., K. Tojo, and Y. J. Bae. 2015. Distribution and genetic characteristics of *Ephoron shigae* (Ephemeroptera: Polymitarcyidae) in Korea. *Entomological Research* 45:150–157.
- Seno, T., S. Stein, and A. E., Gripp. 1993. A model for the motion of the Philippine Sea plate consistent with NUVEL-1 and geological data. *Journal of Geophysical Research* 98:17941–17948.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Evolution,

- weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87:651–701.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787–792.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47:264–279.
- Sota, T., and M. Hayashi. 2007. Comparative historical biogeography of *Plateumaris* leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) in Japan: interplay between fossil and molecular data. *Journal of Biogeography* 34:977–993.
- Strahler, A. N. 1957. Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Transactions American Geophysical Union* 38:913–920.
- Su, Y. C., J. F. Wang, R. J. T. Villanueva, O. M. Nuñez, and C. P. Lin. 2014. Hopping out of Mindanao: miocene-Pliocene geological processes and cross-island dispersal as major drivers of diversity for Philippine treehoppers. *Journal of Biogeography* 41:1277–1290.
- 杉本智彦. 2002. カシミール 3D GPS 応用編. 実業之日本社, 東京.
- 杉本智彦. 2010. 改訂新版 カシミール 3D 入門編. 実業之日本社, 東京.
- 杉本智彦. 2012. 改訂新版カシミール 3D パーフェクトマスター編. 実業之日本社, 東京.
- Suzuki, H., Y. Sato, and N. Ohba. 2002. Gene diversity and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the Genji firefly, *Luciola cruciata* (Coleoptera: Lampyridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22:193–205.
- Suzuki, T., T. Kitano, and K. Tojo. 2014. Contrasting genetic structure of closely related giant water bugs: phylogeography of *Appasus japonicus* and *Appasus major* (Insecta: Heteroptera, Belostomatidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 72:7–16.

- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). version 40b. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA ver. 5.02: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731–2739.
- 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. *Molecular Ecology Notes* 7:962–964.
- Taubmann, J., K. Theissinger, K. A. Feldheim, I. Laube, W. Graf, P. Haase, and S. U. Pauls. 2011. Modelling range shifts and assessing genetic diversity distribution of the montane aquatic mayfly *Ameletus inopinatus* in Europe under climate change scenarios. *Conservation Genetics* 12:503–515.
- Theis, A., F. Ronco, A. Indermaur, W. Salzburger, and B. Egger. 2014. Adaptive divergence between lake and stream populations of an East African cichlid fish. *Molecular Ecology* 23:5304–5322.
- Theissinger, K., M. Bálint, K. A. Feldheim, P. Haase, J. Johannesen, I. Laube, and S. U. Pauls. 2013. Glacial survival and post-glacial recolonization of an arctic-alpine freshwater insect (*Arcynopteryx dichroa*, Plecoptera, Perlodidae) in Europe. *Journal of Biogeography* 40:236–248.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific

gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673–4680.

Tiunova, T. M., N. J. Kluge, and S. Ishiwata. 2004. Revision of the East Palaearctic genus *Isonychia* (Ephemeroptera: Isonychiidae). *Canadian Entomologist* 136:1–41.

東城幸治. 2005. 河川源流域に生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.

Tojo, K. 2010. The current distribution of aquatic insects in habiting river systems, with respect to their population and genetic structure. *In: Insect habitats: characteristics, diversity and management*. E. L. Harris, and N. E. Davies (editors) Nova Science Publishers, New York.

Tojo, K., and R. Machida. 1998. Egg structures of Japanese ephemerid species (Ephemeroptera). *Entomological Science* 1:573–579.

Tojo, K., and K. Matsukawa. 2003. A description of the second species of the family Dipteromimidae (Insecta, Ephemeroptera), and genetic relationship of two dipteromimid mayflies inferred from mitochondrial 16S rRNA gene sequences. *Zoological Science* 20:1249–1259.

東城幸治・伊藤建夫. 2015. 第 3 章 日本列島の形成史と昆虫の系統地理. 遺伝子から解き明かす昆虫の不思議な世界. 大場裕一・大澤省三. 昆虫 DNA 研究会(編) 悠書館, 東京. pp.106–150.

東城幸治・扇谷正樹・関根一希. 2012. 標高傾度と系統進化 —山岳溪流にすむ水生昆虫の標高傾度に沿った流程分布と遺伝的構造. 山岳科学ブックレット9 山に登った虫たち 山岳昆虫の多様性と保全. 中村寛志 (編) オフィスエム, 長野市. pp. 24–25.

Tojo, K., K. Sekine, T. Suzuki, R. Saito and M. Takenaka. 2016. Chapter 8. The species and genetic diversities of insects in Japan, with pecies reference to the aquatic insects. *In: Species diversity of animal in Japan*. Motokawa, M., and H. Kajihara. (editors). Springer,

Berlin. (in press).

- Tokuda, M., S. Tanaka, and D. H. Zhu. 2010. Multiple origins of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) in the Japanese Archipelago and the presence of two major clades in the world: evidence from a molecular approach. *Biological Journal of the Linnean Society* 99:570–581.
- Tominaga, A., M. Matsui, N. Yoshikawa, K. Nishikawa, T. Hayashi, Y. Misawa, S. Tanabe, and H. Ota. 2013. Phylogeny and historical demography of *Cynops pyrrhogaster* (Amphibia: Urodela): taxonomic relationships and distributional changes associated with climatic oscillations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66:654–667.
- Tominaga, K., J. Nakajima, and K. Watanabe. 2015. Cryptic divergence and phylogeography of the pike gudgeon *Pseudogobio esocinus* (Teleostei: Cyprinidae): a comprehensive case of freshwater phylogeography in Japan. The Ichthyological Society of Japan.
- Tungpairajwong, N., and B. Boonsoong. 2011. New records of *Isonychia formosana*, *Prosopistoma annamense* and *Prosopistoma sinense* (Ephemeroptera) from Thailand. *Entomological Research* 41:66–69.
- Ulmer, G. 1912. H. Sauter's Formosa-Ausbeute. Ephemeren. *Entomologische Mitteilungen* 1: 369–375.
- Ulmer, G. 1919. Neue Ephemeroptera. *Archiv fuer Naturgeschichte*. 85:1–80.
- Usio, N. 2007. Endangered crayfish in northern Japan: distribution, abundance and microhabitat specificity in relation to stream and riparian environment. *Biological Conservation* 134:517–526.
- Yamamoto, S., K. Morita, S. Kitano, K. Watanabe, I. Koizumi, K. Maekawa, and K. Takamura. 2004. Phylogeography of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Zoological Science* 21:229–240.

- Yamazaki, Y., A. Goto, and M. Nishida. 2003. Mitochondrial DNA sequence divergence between two cryptic species of *Lethenteron*, with reference to an improved identification technique. *Journal of Fish Biology* 62:591–609.
- 吉川貴浩・井出幸介・窪田康男・中村好宏・武部寛・草桶英夫. 2001. ミトコンドリアND5 遺伝子の塩基配列から推定されたゲンジボタルの種内変異と分子系統. *昆虫ニューシリーズ* 4:117–127.
- Walker, F. 1853. Catalogue of the specimens of neuropterous insects. *In*: the collection of the British Museum Part IV. British Museum Press, London. pp.477–585.
- Wilcock, H. R., A. G. Hildrew, and R. A. Nichols. 2001. Genetic differentiation of a European caddisfly: past and present gene flow among fragmented larval habitats. *Molecular Ecology* 10:1821–1834.
- Wilcock, H. R., M. W. Bruford, R. A. Nichols, and A. G. Hildrew. 2007. Landscape, habitat characteristics and the genetic population structure of two caddisflies. *Freshwater Biology* 52:1907–1929.
- Williams, H. C., S. J. Ormerod, and M. W. Bruford. 2006. Molecular systematics and phylogeography of the cryptic species complex *Baetis rhodani* (Ephemeroptera, Baetidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37:625–643.
- Wishart, M. J., and J. M. Hughes. 2003. Genetic population structure of the net-winged midge, *Elporia barnardi* (Diptera: Blephariceridae) in streams of the south-western Cape, South Africa: implications for dispersal. *Freshwater Biology* 48:28–38.