

原 著

ミトコンドリアDNA解析から推定する香川県メダカの集団史

北里大学理学部

北里大学医学部

東京大学大学院新領域創成科学研究科

国立研究開発法人水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所

国立研究開発法人水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所

北里大学医学部

1※ Equally contributing authors 2※ Corresponding author

山下 佳 那^{1※}

勝 村 啓 史^{1※2※}

尾 田 正 二

今 井 正

吉 浦 康 寿

太 田 博 樹

Population history of medaka (*Oryzias latipes*) in Kagawa Prefecture inferred from mitochondrial DNA analysis. Kana Yamashita^{1*} (Kitasato University School of Science), Takafumi Katsumura^{1*2*} (Kitasato University School of Medicine), Shoji Oda (Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo), Tadashi Imai, Yasutoshi Yoshiura (National Research Institute of Fisheries and Enhancement of Inland Sea, Japan Fisheries Research and Education Agency) and Hiroki Oota (Kitasato University School of Medicine)

1* Equally contributing authors 2* Corresponding author

Medaka (*Oryzias latipes*) is one of the most familiar fresh water fish in Japan and it is also a widely known fact among the general public that medaka have abundant geographical genetic variation. About a decade ago, a high-precision medaka phylogeographic map was built based on polymorphisms of several allozymes and mitochondrial DNA (mtDNA) sequences. The Southern Japanese (S.JPN) group was one of the major genetic groups that were divided into 11 sub-groups based on their mtDNA phylogeny. Although most medaka populations are separated by geographical barriers such as mountain ranges, in several areas we cannot identify geographical barriers that might have divided them into sub-group. In this study, we focused on Kagawa Prefecture in Shikoku Island, in the western part of the Japanese Archipelago, which is known to have two sub-groups, the Higashi-Setouchi and the Nishi-Setouchi, though without any visible geographical barriers. We investigated mtDNA genetic diversity in seven rivers across Kagawa Prefecture. Population genetic analysis strongly suggests a genetic boundary between rivers located in the central coastal area. A paleomap of Seto Inland Sea, based on simulations, indicated that a divide ridge connected Kagawa Prefecture and Okayama Prefecture during the glacial period. These results suggest a possibility that the two sub-groups in Kagawa Prefecture, Higashi-Setouchi and Nishi-Setouchi, have gradually differentiated genetically in the east and west regions of the divide ridge, facing sea level fluctuations since late Pliocene.

Keywords: Medaka, Mitochondrial DNA, Population differentiation, Kagawa Prefecture

要旨: ニホンメダカ (*Oryzias latipes*) は、日本人にとって最もなじみ深い淡水魚の一つであり、地域変異が豊富であるという事実は一般にも広く知られている。約10年前、アロザイム分析やミトコンドリアDNA上の遺伝子配列解

析に基づいた野生メダカの高精度な系統地理マップが作られた。メダカの主要なグループの一つである南日本グループはmtDNA系統に基づいて11のサブグループに分けられ、その多くは山脈等の地理的障壁によって隔てられているが、サブグループを分ける地理的障壁が不明な地域も見出されている。そこで本研究では、東瀬戸内グループと西瀬戸内グループの2つのサブグループが生息するが、その生息域の境界に明確な地理的障壁が見出されない香川県に焦点を当てた。県内7河川においてmtDNAの遺伝的多様性を調査し集団遺伝学解析を行った結果、沿岸中央部に位置する河川間に遺伝的な境界線があることが示された。またシミュレーションにより得られた瀬戸内海の古地形図から、氷期には香川県と岡山県を結ぶ分水嶺が存在していたことが示唆された。これらの結果は、後期鮮新世以降、分水嶺の東側および西側において海水準の上昇と下降を繰り返し経験しながら、2つのサブグループ（東瀬戸内グループと西瀬戸内グループ）がそれぞれ遺伝的に分化してきた可能性を示している。

キーワード：メダカ、ミトコンドリアDNA、集団分化、香川県

はじめに

淡水魚では山脈域や海洋域が隔離要因となるため、その分布や拡散過程にはそれぞれの生息地の地史イベントとの関連が強くみられる。地理的障壁によりある集団において遺伝子交流が遮られることによって集団内の遺伝的分化が進む結果、水系毎に異なる遺伝的要素を有する分集団が誕生する。これまでに数多くの淡水魚において地理形成のイベントと絡めた分布域の形成史が議論されてきた（渡辺・高橋，2010）。

メダカ（*Oryzias*）属は、ダツ目メダカ科に属する硬骨魚類であり、東アジアおよび東南アジアに広く分布している（岩松，2006）。メダカ属の中には汽水域に生息する種もあるが、中国大陸沿岸や朝鮮半島、および北海道を除く日本各地に生息するメダカ（*Oryzias latipes*）は流れの緩やかな小川や用水路等に生息する淡水魚である。その特徴的な生息環境から日本の多様な地形や四季変化の影響を強く受け、地域群毎に大きな遺伝的な分化がみられる。これまでに鱗条数に着目した形態学研究（江上・吉野，1958）に加えてアロザイム解析およびmtDNA解析などの遺伝学研究（Sakaizumi et al., 1983；Matsuda et al.,

1997）から、各地域の野生メダカは集団間で遺伝的に高度に分化していることが報告されている。特に2003年に発表されたTakehana et al. (2003)の論文では日本各地303地点のメダカを用いた高精度な系統地理マップが作成され、mtDNA・cytochrome *b* 遺伝子の制限酵素断片長多型と配列情報をもとに15個のサブグループに分けられることが報告されている。さらには従来北日本集団と呼称されてきた3個のサブグループを別種（*O. sakaizumii*）とする研究結果も報告される（Asai et al., 2011）など、日本の野生メダカ集団が各地域で大きく遺伝的に分化していることが広く認識されるに至っている。

種内の集団の形成過程と地理形成については、前述の論文（Takehana et al., 2003）で議論され、遺伝的に分化したグループの分布域の境界のほとんどは山脈等の地理的要因で説明できた。しかし、明確な地理的障壁が認められない地域もあり、どのようにして集団分化したのか不明なサブグループが存在している。本研究で対象とする香川県のメダカは島嶼部を含め広く分布していることが知られ（須永ほか，1989；白井ほか，2008；白井・伊藤，2008；井藤・細谷，2013）、県の東側に東瀬戸内グループ、その西側に西瀬戸内グループ

プが存在し、南側には東日本グループとの境界がある（竹花，2010）。徳島県と県境にある讃岐山脈が東日本グループの分布域の北上を制限する地理的障壁であることは明白だが，東瀬戸内グループと西瀬戸内グループの境界を引く地理的障壁は不明である。

そこで私達は，香川県における両グループの遺伝的分化要因を明らかにすることを目的として，これまで集団レベルでの配列情報がデータベース等に蓄積しているmtDNAのD-loop領域を対象に，東瀬戸内および西瀬戸内グループの境界線を跨ぐように選定した香川県沿岸部の河川において，集団レベルでの高密度なサンプリングによる遺伝学的な調査を行った。そして，7つの集団内で得られた配列情報を元に集団間の遺伝的な類縁性の推定と古地形図の復元により，香川県における両サブグループの境界および両者を隔離する地理的要因を明らかにできたので報告する。

試料と方法

香川県メダカ集団の試料

集団レベルでの採集に問題ない個体数の存在が確認されている香川県内の7河川で1カ所ずつサンプリング場所（KSH, KEJ, KHT, KAO, KSY, KKB, KSM）を選定した（Fig. 1）。なお，本論文では採集場所の特定を避けるため，河川名をアルファベットで表した。2014年8月29～31日に上記の7カ所から，50個体前後を目安として計352個体を採集した（Table 1）。採集したメダカは100%EtOH（Wako）により固定し，DNA抽出を行うまで4℃にて保存した。なお，DNA抽出には尾ビレを用い，残りは再び100%EtOH（Wako）にて1個体ずつ-20℃にて保存した。

尾ビレからのDNA抽出

超純水，0.5M EDTA（Wako），10mg/ml Pro-

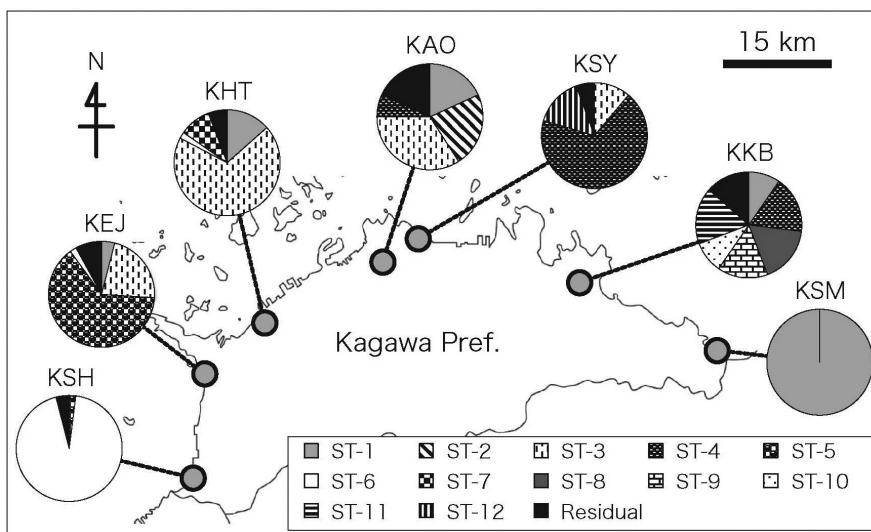


Fig. 1. Sampling sites and genetic structure of medaka in Kagawa Prefecture. Different patterns in the pie chart represent a difference in the sequence types of mtDNA D-loop region. "ST" is the abbreviation for sequence type. Black indicates the combined frequency of residual sequence type (<1% in all populations).

Table 1. Genetic diversity in each population of medaka in Kagawa Prefecture and the surrounding Prefectures.

Population names	lat(N)/long(E)	N	Number of sequence types ^a	Number of segregating sites ^b	Gene diversity (+/-SD)	Nucleotide diversity (+/-SD) × 10 ³	References
KSH	34°03'N/133°38'E	50	3 (1)	7 (501)	0.117 (+/-0.061)	1.02 (+/-0.61)	This study
KEJ	34°11'N/133°39'E	50	6 (2)	7 (501)	0.547 (+/-0.069)	2.39 (+/-0.40)	This study
KHT	34°15'N/133°44'E	52	6 (2)	10 (500)	0.501 (+/-0.077)	3.03 (+/-0.68)	This study
KA0	34°19'N/133°54'E	44	9 (5)	12 (500)	0.805 (+/-0.036)	5.84 (+/-0.35)	This study
KSY	34°21'N/133°58'E	54	4 (1)	7 (501)	0.502 (+/-0.072)	2.96 (+/-0.52)	This study
KKB	34°18'N/134°13'E	52	12 (6)	18 (501)	0.882 (+/-0.017)	4.77 (+/-0.70)	This study
KSM	34°12'N/134°25'E	50	1 (0)	0 (501)	0	0	This study
all		352	28 (12)	33	0.872 (+/-0.008)	5.33 (+/-0.18)	This study
OY ^c	34°39'N/134°07'E	95	14	15	0.767 (+/-0.038)	2.93 (+/-0.35)	Katsumura et al.,2012
HSf ^d	34°26'N/132°46'E	48	9	15	0.705 (+/-0.065)	7.28 (+/-0.90)	Katsumura et al.,2012
HSs ^d	34°28'N/132°44'E	48	2	1	0.042 (+/-0.040)	0.08 (+/-0.08)	Katsumura et al.,2012

a: The number in parentheses shows the number of sequence types of less than 1% in all population.

b: The number in parentheses shows the number of sites used for the analysis.

c: OY was sampled in Okayama Prefecture.

d: HSf and HSs were sampled in Hiroshima Prefecture.

teinase K (Wako), 10%SDS (Nacalai Tesque) を, 100 : 40 : 1 : 20 の比で混合し Lysis Buffer を調製した。解剖用ハサミを用いてメダカから切り取った尾ビレを Lysis Buffer に浸漬し, 55°C で 1 時間, その後 37°C で 16 時間転倒混和して細胞・組織を溶解した。その後, フェノール・クロロホルム抽出法によりゲノム DNA を抽出精製し, TE バッファーに溶解した。

mtDNA D-loopのPCR-direct sequencing

メダカゲノム DNA を鋳型とし, TaKaRa ExTaq[®] HotStart Version (TaKaRa) を用いて mtDNA D-loop 領域を増幅した。プライマーとして, Medaka_D-loop_F1 (5'-CCC AAA GCC AGG ATT CTA A-3'), Medaka_D-loop_R1 (5'-AAC CCC CAC GAT TTT TGT C-3') を使用した。TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を用いて, 95°C ・ 2 分の熱変性の後, 95°C ・ 30 秒 → 60°C ・ 30 秒 → 72°C ・ 45 秒のシーケンスを 40 サイクル行い, 最後に 72°C で 5 分間反応させ, mtDNA D-loop 領域を増幅した。1.5% アガロースゲル (Wako) で電気泳動し, エチジウ

ムブロマイド (Bio-Rad) を用いて染色後, UV 照明により増幅産物のバンドを可視化して PCR による増幅を確認した。得られた PCR 産物を超純水で 20 倍に希釈し, これをシーケンス反応の鋳型とした。それぞれのプライマーに対し, 96°C ・ 3 分の熱変性の後, 96°C ・ 15 秒 → 50°C ・ 15 秒 → 60°C ・ 2 分を 40 サイクル行い, シーケンス反応を行った。エタノール沈澱により精製した後, ABI3500xL Genetic Analyzer (Life Technologies) を用いて塩基配列を決定した。SeqMan Pro 10.1.2.20 (DNASTAR) を用いて, 個体ごとのコンセンサス配列を決定した。得られた塩基配列は, MEGA 5 に実装されている ClustalW を用いてアラインメントを行った (Tamura et al., 2011)。塩基配列中にみられたリピート配列の扱いは, Katsumura et al. (2009) に従った。なお, 得られた塩基配列データは, 国際 DNA データベースである DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録した (アクセッション番号: LC073341-LC073692)。

集団遺伝学解析

塩基配列情報を元に、DnaSP 5.10.1 (Librado & Rozas, 2009) を用いて河川ごとの配列タイプ頻度、遺伝子多様度、塩基多様度、各集団間の遺伝距離 (d_A distance) を計算した。 d_A distanceは、Katsumura et al. (2009) と Katsumura et al. (2012) のデータを含め計算した。各集団間の遺伝的な近縁性を図示するために、R (3.1.1) を用いて古典的多次元尺度法により d_A distance を 2 座標平面に投影した。

遺伝的障壁を検出するために、SAMOVA (Spatial Analysis of MOlecular VAriance) 解析を行った (Dupanloup et al., 2002)。解析に必要なパラメーターは、以下の通りに設定した； $S=10000$, $A=0.915811421$, Number of initial condition=100。そして、 $K=2$ から $K=4$ の 3 パターンでシミュレーションし、グループ間の遺伝的分化の程度を示す F_{CT} が最大となる K を決定した。

香川県メダカ集団の分岐年代を推測するために、7 集団でみられた mtDNA D-loop 配列の共通祖先までの時間 (Time to Most Recent Common Ancestor: $T_{MRC A}$) を棄却サンプリング法により推定した (Tavaré et al., 1997; Katsumura et al., 2014)。 $T_{MRC A}$ 推定に用いた有効集団サイズ N_e は集団突然変異率 Watterson's θ および、サイトあたり世代あたりの突然変異率 μ から求めた。1 世代を 1 年、有効集団サイズ一定、突然変異率 $\mu = 2.8 \times 10^{-8}$ を仮定した。

古地形図の復元

海水準が低下した瀬戸内海を復元するために、National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) が提供する地形データ ETOPO1 Ice Surface ([\[registered/binary/etopo1_ice_g_f4.zip\]\(#\) 2015.3 参照\) \(Amante & Eakins, 2009\) を使用した。ArcGIS 10.1 \(ESRI\) を用いて展開し、海水準を -30m まで低下させた地図を作成した。古河川の分布は桑代 \(1959\) を参照し、作成した地図にイラストレーター CS 5 \(Adobe\) を用いて書き加えた。](http://www.ngdc.noaa.gov/mgg/global/relief/ETOPO1/data/ice_surface/grid_</p></div><div data-bbox=)

結果

7 河川の集団で観察された配列タイプの分布と頻度

香川県内でサンプリングされたメダカの mtDNA D-loop 領域の配列タイプを地図上に示す (Fig. 1)。全部で 28 タイプが観察され、そのうち 12 タイプが 1 % 以上の頻度で存在した (Table 1)。また、少なくとも 2 つ以上の河川で共有する配列タイプは 5 タイプ (ST-1, ST-3, ST-4, ST-5, ST-6) あり、調べた個体の約 77% (271 個体/352 個体) がいずれかの配列タイプを保持していた。残りの 23 タイプは河川特異的であった。近接する河川間以外でも配列タイプの共有がみられ、KSM 集団で観察された配列タイプ (ST-1) は、地理的に離れている集団 (KEJ, KHT, KAO, KKB) においても観察された (Fig. 1)。なお、観察された配列タイプは全て南日本グループのタイプであり、北日本グループを示す配列タイプは全く観察されなかった。

それぞれの河川において配列タイプ頻度パターンの違いがみられた。観察された配列タイプ数は、香川県中央部の集団と比べて、東端や西端の集団 (KSM, KSH) で少ない傾向がみられた。配列タイプ数をもっとも多く観察されたのは KKB 集団で、その次に KAO 集団が続いた (Table 1)。その一方で、KSM 集団では調べた 50 個体全てにおいて全く同一の配列タイプしか検出されなかった。このように、隣接する河川間で頻度パターンが似

かよる傾向はみられず、河川の異なる集団毎に遺伝的に分化している様子がみられた。

各集団内の遺伝的多様性

各集団の遺伝的多様性を評価する為に、得られたmtDNA D-loop 配列情報から、遺伝子多様度および塩基多様度を算出した (Table 1)。各集団内の遺伝子多様度の範囲は0–0.882と幅広く、塩基多様度の範囲は0– 5.84×10^{-3} であった。香川県瀬戸内海沿岸の中心部に位置するKAO集団で遺伝的多様性が高く、東側および西側に行く程、遺伝的多様性が低いことが示された。

香川県メダカ集団間のmtDNAの遺伝的類縁性

本研究で扱った7集団と近隣の集団との遺伝的な関連を調べるために、岡山の集団と広島 の2集団を含むmtDNA配列データを用いて、集団間のnet-nucleotide diversityである d_A distance (Nei, 1987) を算出し、古典的多次元尺度法により2次

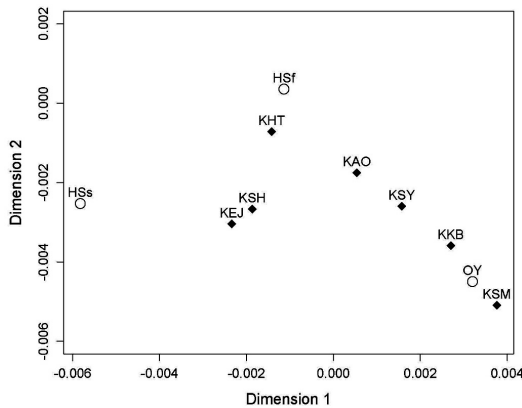


Fig. 2. Genetic relationship among nine populations based on d_A distance calculated from mtDNA D-loop region. Black diamonds and open circles represent the populations examined in this study and reported in Katsumura et al. (2012), respectively.

Table 2. Comparison of three fixation indices among K values by SAMOVA analysis.

Number of Groups(K)	Group composition	F_{SC}	F_{ST}	F_{CT}
K=2	G1: KSH, KEJ, KHT	0.315*	0.594*	0.407*
	G2: KAO, KSY, KKB, KSM			
K=3	G1: KSH, KEJ	0.288*	0.573*	0.400*
	G2: KHT			
	G3: KAO, KSY, KKB, KSM			
K=4	G1: KSH, KEJ	0.243*	0.535*	0.386*
	G2: KHT			
	G3: KAO, KSY			
	G4: KKB, KSM			

F_{SC} : a degree of genetic differentiation within groups
 F_{ST} : a degree of genetic differentiation among all populations
 F_{CT} : a degree of genetic differentiation among groups
*: $p < 0.05$

元展開した (Fig. 2)。その結果、香川県集団は集団間の地理距離を反映するようにプロットされた。そしてSAMOVA解析の結果、 $K = 2$ が支持され、KAO, KSY, KKB, KSMとKHT, KEJ, KSHに遺伝的に分かれることが示された (Table 2)。また、それら香川県7集団で観察されたmtDNA D-loopの T_{MRCA} は684,145年 (95%信用区間: 304,919年–1,288,491年) であると推定された。さらに興味深いことに、岡山集団 (OY) は香川県東部集団 (KAO, KSY, KKB, KSM) の中にプロットされ、広島集団 (HsF, HsS) は地理的に離れている香川県西部集団 (KHT, KEJ, KSH) と近い位置にプロットされた。

古地形図の復元

瀬戸内海の平均海深は約30mであることから、海水準が現在の–30mである9000年前の瀬戸内海 (井内, 2008) を復元すれば、海底の起伏を検出できると考えた。そこで、陸地と海底地形データセットを用いて、海水準を現在の–30mとした地図を作成した。その結果、香川県と岡山県に挟まれる領域において瀬戸内海は陸地となることを確認できた。さらに、作製した地図上に桑代 (1959) の

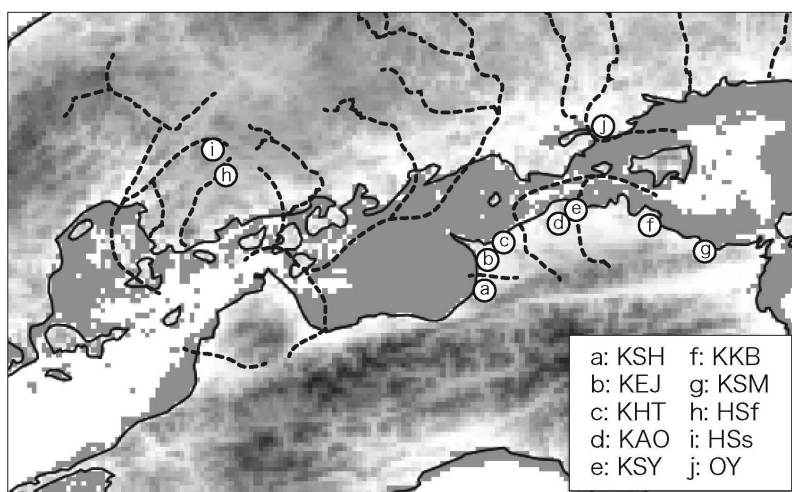


Fig. 3. Simulated map of Seto Inland Sea approximately 9,000 years ago. Individual letters of the alphabet indicate sampling locations. Grey in Seto Inland Sea represents the land, and dashed lines indicate the flow path of paleo-rivers estimated by Kuwashiro (1959).

研究において復元された古河川の流路をプロットすると、KAOの西側を流れる川は瀬戸内海の東側に流れ、KHTやKEJ、KSHの周辺の川は瀬戸内海の西側に流れ出ていた可能性が示された (Fig. 3)。

考察

今回私達が香川県内の7河川において採取したメダカ352個体のmtDNA D-loop 領域を集団解析したことにより、香川県メダカの集団史の一端が明らかになった。第一に、調査した個体の8割近くのmtDNAが河川特異的な配列タイプでなく、2つ以上の河川で共有される配列タイプを示した。これは、現生香川県メダカ集団の遺伝的多様性がそれぞれの集団分化過程で蓄積されたのではなく、祖先集団で存在していた多様性（祖先多型）がそれぞれの河川でランダムに配分されたことを示唆する。第二に、集団の遺伝的多様性を測る遺伝子多様度および塩基多様度の2つの指標は、各集団

間で遺伝的多様性に大きなバリエーションがあることを示した。これは、地理的に近接していても川ごとに異なる集団構造を持つことを示唆する。第三に、得られた塩基配列情報から各集団間の遺伝距離を計算すると、香川県集団が東部集団と西部集団に分かれることが示された。これは近接する河川間で配列タイプを共有し、系統的に近い個体でこれらの集団が構成されていることを反映し、かつおそらくは東西を分ける地理的障壁があることを示唆する。さらに、東部集団は岡山集団に遺伝的に近縁であり、西部集団は広島集団に近縁であることが示された。これは、香川県東部の集団は岡山集団と祖先集団を共有し、香川県西部の集団は広島集団と祖先を共有する可能性を強く示唆し、東部集団と西部集団の形成史が異なる可能性を示している。最後に、復元した古地形図から、瀬戸内海が陸地であった時代に香川県と岡山県を結ぶ分水嶺が、KHTとKAOの間に存在していた可能性が示唆される。

現在の瀬戸内海が現れたのは、海水準が現在と

同じ状況になった約6000年前とされている（井内, 2008）。瀬戸内海は平均海深が30mのかなり浅い海であることから、海水準が低下する氷期では、香川県は本州側の岡山県や広島県と陸続きになっていたと考えられている。海底地形の詳細な調査（桑代, 1959）から古河川の流路推定がなされており、KAOの西側に位置する河川が東に流れ出ていたことが示唆されている（Fig. 3）。そして、岡山集団の近傍を流れる吉井川も東に位置する現在の播磨灘あたりに流れ込んでいたとされる。つまり、瀬戸内の形成史を考慮すると、岡山集団と香川県東部集団は地理的に完全に隔離されていたとは考えにくく、むしろ播磨灘周辺において河口域を共有し、岡山集団と香川県東部集団は過去に遺伝的な交流があった可能性が高い。一方、香川県西部集団の近傍を流れる河川は、瀬戸内海西に位置する備後灘を通り、広島集団の生息域近傍を流れる河川と同じ沿岸域に流れ出ていた可能性が示唆される（Fig. 3）。このため、西側においても遺伝的な交流が可能な地理的条件が整っていた可能性が高く、地理距離が離れている香川県西部集団と広島集団の間で遺伝的な近縁性が維持されてきたものと考えられる。従って、今現在海面下に隠されているが、KHTとKAOとの間に香川県と岡山県を結ぶ分水嶺が存在し、それが東瀬戸内グループと西瀬戸内グループとを分けた地理的障壁であったと考えられる。

本研究で明らかになった地理的条件の下で、東瀬戸内および西瀬戸内グループの誕生シナリオを次のように考えて矛盾が無いものと考えられる。まず、メダカの南日本グループのサブグループを形成する遺伝的多様性が誕生したとされる後期鮮新世を経て（竹花, 2010）、およそ70万年前にコアレッセンスする祖先集団由来のmtDNA D-loopの遺伝的多様性が、瀬戸内海周辺において間氷期および氷期に伴う複数回の海水準の上昇低下

を受けるうちにランダムに分配される。次に香川県と岡山県を結ぶ分水嶺によって、現在の播磨灘に相当する東側と備後灘に相当する西側で集団分化が始まる。そして、河川ごとに集団分化が進み、現在のmtDNA D-loopの配列頻度パターンを示す、というシナリオである。Sakaizumi et al. (1988) もアロザイムが示すアレルの地域分化パターンと、氷期における古水系の分布とが一致することを指摘している。遺伝様式の異なる常染色体上の遺伝子とmtDNAにおいて同様のパターンが観察されたことは、前述のシナリオが強く支持されるものと考えられる。また、本結果より、香川県において分水嶺の東側および西側それぞれへメダカの生息域が広がったことが示唆される。先行研究により水田の伝播とメダカの拡散との関連が示唆されているが（Katsumura et al., 2012）、香川県においても水田の伝播によりメダカが生息できる新たな環境が出現し、それが現生香川県メダカ集団の東西への拡散のドライビングフォースになった可能性も考えられる。今後、この可能性に関して、香川県における水田の伝播の歴史と合わせた検証が必要であろう。

本研究によって、香川県における2つのサブグループ（東瀬戸内グループと西瀬戸内グループ）への遺伝的分化要因としては、後期鮮新世以降、分水嶺の東側および西側で海水準の上昇と下降を繰り返して受けたことによる影響が考えられた。さらに、今回私達が実行した集団ベースのサンプリングによって、少数個体のサンプリングでは捉えにくい河川ごとの集団構造がみえてきた。わずか15kmしか離れていないのにもかかわらず、配列タイプの頻度パターンが河川間で異なることや、集団を構成する配列の頻度にバリエーションがあることも分かった。これらのことから河川ごとに独自のメダカの集団構造があることが推察される。香川県のメダカは、近年でも各地で確認されてい

るが（白井ほか，2008；白井・伊藤，2008），減少傾向にあり，香川県のレッドデータブックでは準絶滅危惧種に指定されている（大高・植松，2004）。メダカの地域性や多様性を単に特徴的な配列タイプの有無だけで議論するのではなく，集団ベースで調査し議論することは，今後，メダカをどのような規模で保護していくべきなのかを考える上でも重要な知見になると考えられる。

上記の保全問題に加え，メダカの人為的な放流による遺伝子汚染も問題として挙げられる。他地域ではヒメダカの体色遺伝子を保持するメダカが観察されている調査結果（横田ほか，2014）も報告されていることから，本研究で採集されたメダカ集団も人為的な放流の影響を受けている可能性は否定できない。しかしながら，遺伝距離と地理距離がほぼ一致したことや北日本グループの配列タイプが検出されなかったことを考慮すると，本調査河川において本研究方法で検出できるレベルの最近の人為的な放流があったとは言えないであろう。

最後に，本研究は母系遺伝する組換えのないmtDNA配列のみで議論している。そのため，母系の進化史や偶然の一致を見ているだけである可能性が残ることは否定できない。今後は，父系遺伝するY染色体上の遺伝子と常染色体上の様々な位置にある遺伝子を解析対象に含め，本研究で提示した集団分化のシナリオを検証していく必要があるだろう。

引用文献

- Amante, C. & B. W. Eakins. 2009. ETOPO1 1 arc-minute global relief model: procedures, data sources and analysis. p. 19. NOAA Technical Memorandum NESDIS NGDC-24, USA.
- Asai, T., H. Senou & K. Hosoya. 2011. *Oryzias sakaizumii*, a new ricefish from northern Japan (Teleostei: Adrianichthyidae). Ichthyological Exploration Freshwaters, 22 : 289-299.
- Dupanloup, I., S. Schneider & L. Excoffier. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. Molecular Ecology, 11 : 2571-2581.
- 江上信雄・吉野道仁. 1958. メダカの臀鰭軟条数の変異に関する研究. 魚類学雑誌, 7 : 83-88.
- 井藤大樹・細谷和海. 2013. 香川県小豆島における淡水魚相と現状. 地域自然史と保全, 35 : 141-148.
- 井内美郎. 2008. 瀬戸内海の成立と海底地形. 「瀬戸内海の海底環境」(柳哲雄編), pp. 5-15, 恒星社厚生閣, 東京.
- 岩松鷹司. 2006. 新版メダカ学全書. 473pp. 大学教育出版, 岡山.
- Katsumura, T., S. Oda, S. Mano, N. Suguro, K. Watanabe, H. Mitani... & S. Kawamura. 2009. Genetic differentiation among local populations of medaka fish (*Oryzias latipes*) evaluated through grid-and deme-based sampling. Gene, 443 : 170-177.
- , ——, K. Tsukamoto, Y. Sekiya, T. Yamashita, M. Aso... & H. Oota. 2012. A population genetic study on the relationship between medaka fish and the spread of wet-rice cultivation across the Japanese archipelago. Anthropological Science, 120 : 81-89.
- , ——, S. Nakagome, T. Hanihara, H. Kataoka, H. Mitani, S. Kawamura & H. Oota. 2014. Natural allelic variations of xenobiotic-metabolizing enzymes affect sex-

- ual dimorphism in *Oryzias latipes*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 281 : 20142259. (Electronic Supplementary Materials).
- 桑代 勲. 1959. 瀬戸内海の海底地形. 地理学評論, 32 : 24-35.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25 : 1451-1452.
- Matsuda, M., H. Yonekawa, S. Hamaguchi & M. Sakaizumi. 1997. Geographic variation and diversity in the mitochondrial DNA of the medaka, *Oryzias latipes*, as determined by restriction endonuclease analysis. Zoological Science, 14 : 517-526.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. 512pp. Columbia University Press, Columbia.
- 大高裕幸・植松辰美. 2004. メダカ. 「香川県レッドデータブック 香川県の希少野生生物」(香川県希少野生生物保護対策検討会編), p. 270. 香川県環境森林部環境・水政策課, 高松.
- Sakaizumi, M., K. Moriwaki & N. Egami. 1983. Allozymic variation and regional differentiation in wild populations of the fish *Oryzias latipes*. Copeia, 1983 : 311-318.
- , A. Kikuta & K. Tsuchiya. 1988. Genetic differentiation of medaka *Oryzias latipes* and history of the water system in the seto inland sea area. Zoological Science, 5 : 1224.
- 白井康子・伊藤英夫. 2008. 香川県における淡水魚類の分布(2) —主な魚種の出現状況—. 香川県環境保健研究センター所報, 7 : 73-80.
- ・——・大津和久・白坂涼子. 2008. 香川県における淡水魚類の分布(1) —調査結果の概要—. 香川県環境保健研究センター所報, 7 : 65-72.
- 須永哲雄・植松辰美・川田英則. 1989. 香川県における淡水魚研究の現状について. 香川生物, 15・16 : 95-113.
- Takehana, Y., N. Nagai, M. Matsuda, K. Tsuchiya & M. Sakaizumi. 2003. Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in Japanese wild populations of medaka, *Oryzias latipes*. Zoological Science, 20 : 1279-1291.
- 竹花佑介. 2010. メダカの高精度系統地理マップをつくる. 「淡水魚類地理の自然史」(渡辺勝敏・高橋洋編), pp. 105-122. 北海道大学出版会, 札幌.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28 : 2731-2739.
- Tavaré S., J. D. Balding, C. R. Griffiths & P. Donnelly. 1997. Inferring coalescence times from DNA sequence data. Genetics, 145 : 505-518.
- 横田弘文・桑原なつき・中野瑛子・江口さやか. 2014. 武庫川水系に生息する野生メダカの遺伝子型分布及びヒメダカ遺伝子の移入実態. 地域自然史と保全, 36 : 53-58.
- 渡辺勝敏・高橋 洋. 2010. 淡水魚類地理の自然史; 多様性と分化をめぐる, 283pp. 北海道大学出版会, 札幌.