

# 博士學位論文

全国のメダカ種群におけるヒメダカによる遺伝的攪乱に関する研究

**A study on genetic disturbance in medaka *Oryzias latipes* species complex**

**caused by orange-red commercial variety “himedaka” in Japan**

平成 28 年 1 月 8 日

近畿大学大学院

農学研究科 環境管理学専攻

中尾 遼平



全国のメダカ種群におけるヒメダカによる遺伝的攪乱に関する研究

近畿大学大学院 農学研究科

環境管理学専攻

中 尾 遼 平

(指導：細谷和海教授，北川忠生准教授)

A study on genetic disturbance in medaka *Oryzias latipes* species complex  
caused by orange-red commercial variety “himedaka” in Japan

Ryohei Nakao

January, 2015

Graduate School, Kinki University

Division of Agricultural Science

Major: Environmental management

(Advisor: Prof. Kazumi Hosoya and Assoc. Prof. Tadao Kitagawa)

---

Submitted to the Graduate School, Kinki University, to fulfill the requirement  
for the Doctorate Degree.



## 目次

I. 諸言	3
II. ヒメダカによる遺伝的攪乱の発生メカニズムの解明	
i. 本章の目的	7
ii. 供試魚の作製	7
iii. 大和川水系における生物調査および野生メダカの捕食者の選定	8
iv. 野生型メダカとヒメダカの捕食圧の差の検証	9
v. 野生型メダカとヒメダカによる配偶者選択	10
vi. 野生型メダカとヒメダカによる群れ形成	12
vii. ヒメダカによる遺伝的攪乱発生の考察	14
III. 全国のメダカ種群におけるヒメダカによる遺伝的攪乱の現況の把握	
i. 本章の目的	17
ii. 供試魚の収集	17
iii. 2種類のDNAマーカーを用いた野生メダカの遺伝解析	18
iv. 全国におけるヒメダカによる遺伝的攪乱の現況と傾向	21

IV. 単一流域におけるヒメダカ型遺伝子の拡散動態の把握	
i. 本章の目的	28
ii. 材料と方法	29
iii. 野川における遺伝的攪乱の現況	30
V. 全国のメダカ種群における遺伝的多様性の保全	
i. ヒメダカによるメダカ種群への遺伝的攪乱の発生と拡散	33
ii. 全国のメダカ種群における進化的に重要な単位の設定	36
iii. メダカ野生集団の保全にむけた管理単位の設定	45
iv. MU内のメダカ野生集団の保全の優先度の決定	50
v. メダカ種群を事例とした魚類における遺伝的多様性の保全	53
VI. Summary	56
VII. 引用文献	59
VIII. 謝辞	
IX. 図表	

## I. 諸 言

遺伝的攪乱は、同一種内において他の地域由来の集団が在来の集団に人為的な影響を介して侵入することによって、在来集団のもつ遺伝子レベルの固有性の低下や喪失を引き起こす現象である。本現象は、生物多様性の基本単位である「種」が長期的に存続していく上で重大な問題を引き起こすとされており、地域集団間の遺伝的分化が大きい淡水魚では、特に影響が大きいと考えられている (Frankham et al., 2002; Allendorf et al., 2013)。近年、ゼゼラ *Biwia zezera* (堀川ほか, 2007), ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* (清水・高木, 2010), シロヒレタビラ *Acheilognathus tabira tabira* (梅村ほか, 2012) など多くの魚種で国内における遺伝的攪乱の報告がされている。しかし、これらは、特定の魚種で生じた遺伝的攪乱を事例として報告しており、集団の具体的な対処や予防策については説明されていない。遺伝的攪乱に対処するためには、本現象の実態を解明し、外来の遺伝子が移入される原因の特定や、移入を防止するための方策を立てていく必要がある。そのためには、遺伝子移入の実態を把握するための遺伝学的な知見だけでなく、生態学、行動学などさまざまな知見を総合する必要がある。そこで、本研究では実験モデル生物として利用され、これまでに幅広い知見が蓄積されているメダカに着目した。またメダカにおいても、近年改良品種であるヒメダカが主要因であると思われる遺伝的攪乱が確認されていることから (小山・北川, 2009), 遺伝的攪乱の実態を解明していくための最適な魚種である。

メダカ種群 *Oryzias latipes* species complex (sensu Asai et al., 2011)は、ダツ目メダカ科に属する小型の純淡水魚類である。国内における本種群は、青森県から福井県にかけての日本海側に生息するキタノメダカ *Oryzias sakaizumii* と、本州の太平洋側から沖縄島にかけて生息するミナミメダカ *Oryzias latipes* の2種に大別される (Asai et al., 2011)。また、ミナミメダカは遺伝的に異なる9種類の地域集団に細分される

(Sakaizumi et al., 1983 : 酒泉, 1990 : Takehana et al., 2003)。本種群は、水田等の氾濫原環境を好むことから、水田のシンボルフィッシュとして親しまれており、日本人にとって非常に馴染み深い魚類である。しかし、圃場整備による生息場の減少やオオクチバス等の外来種による捕食などの影響から全国的な個体数は減少し、環境省版レッドリストにおいて絶滅危惧II類に指定されている (環境省, 2013)。以降、本研究においては国内に生息する2種を総じて「メダカ」と称していく。

近年メダカでは、在来集団から他地域由来と考えられる遺伝子が検出される事例がみられている。mtDNAでメダカの系統地理マップを作製した Takehana et al. (2003) では、関東地方や新潟県において関西地方や中国地方で在来型とされている遺伝子型が検出された。これらは、他地域のメダカが関東地方へ人為的に移入されたことで生じたと考えられている。このことから、国内では以前からメダカの人為的な移動が頻繁に行われていたことを示しており、その結果として遺伝的攪乱が生じていたことが推測される。

メダカは、絶滅危惧種に指定されている一方で観賞魚としても人気が高く、愛好家



などの手によって多種多様な形態をもつ改良品種が作出されている。近年、メダカの改良品種数は爆発的に増加しており、白メダカや青メダカといった体色の異なる一般的な品種から、ダルマメダカ、ヒカリメダカといった体型の変異を固定した品種まで、多様である（内山，2015）。改良品種の代表例として、メダカの黄色変異を固定したヒメダカがあげられる（Yamamoto, 1975）。本品種は、観賞魚としてだけでなく大型肉食魚の餌魚としても利用されていることから各地で大規模に養殖され、全国の観賞魚店などで販売されている。ヒメダカの黄体色は、単一の劣性対立遺伝子（*b* 対立遺伝子）に支配されていることが知られている（Aida, 1921）。さらに近年の研究により、第 12 番染色体上にある体表面の黒色素の発現にかかわる遺伝子（*slc45a2* 領域）が変異することで、体表面の黒色素胞の発現が抑制され、ヒメダカが生じると報告されている（Fukamachi et al., 2001, 2008）。

ヒメダカは、養殖現場からの逸出によって野外環境へ流出しており、野生メダカとの交雑による遺伝的攪乱が問題となっている（竹花・北川，2010；北川，2013）。近年の報告によると、奈良県下の大和川水系で実施された遺伝解析では、野生メダカからヒメダカ型と考えられる遺伝子が検出されており、ヒメダカによる遺伝的攪乱が確認されている（渡部，2000；小山・北川，2009；中井ほか，2011）。また、野外でヒメダカ自体がみかけられる事例も報告されている（瀬能，2000，2013）。

ヒメダカによる野生メダカへの遺伝的攪乱は、養殖現場からの逸出だけでなく誤った保護活動や教育活動による影響もあげられる。メダカは絶滅危惧種に指定されたこ

とから、日本各地でメダカの保護活動が展開されている（佐原・細見，2003；竹花・北川，2010）。また，小学校等の教育機関において，メダカは理科の教材として利用されていることも多い（岩松・森，1994；文部科学省，2008）。しかし，これらの活動において，ヒメダカが利用されている場合がほとんどである。また教材として利用された個体は，近隣の河川へ放流活動と称して放されている可能性がある。

以上のことから，国内のメダカ野生集団において，ヒメダカ等の人為的な移入による遺伝的攪乱が全国で生じていると予想される。遺伝的攪乱が進行すると，野生メダカの有する遺伝子構成が均一化し，過去から維持されてきた遺伝的多様性の喪失につながると考えられる。従って，メダカ野生集団の遺伝的多様性を保全していくうえで，遺伝的攪乱に関する知見の蓄積は急務となっている。そこで本研究では，メダカ野生集団の保全にむけて，生態学的・遺伝学的なアプローチによって，遺伝的攪乱の実態の解明を行なった。さらに，得られた情報に基づいて，メダカ野生集団のもつ遺伝的多様性の保全にむけた保全単位や優先順位の設定に関する提言を行なった。

## II. ヒメダカによる遺伝的攪乱の発生メカニズムの解明

### i. 本章の目的

近年、遺伝学的な調査によって野生メダカ集団においてヒメダカによる遺伝的攪乱が生じていることは報告されている（小山・北川，2009；横田ほか，2014）。しかし、遺伝的攪乱のリスクを詳細に評価するために重要となる遺伝的攪乱がどの程度生じるのか、実際に起こりやすい現象なのか、どのように生じるのか、といった報告はなかった。そこで本章では、これらの内容を把握し、ヒメダカによる遺伝的攪乱の発生メカニズムを解明するために、ヒメダカの特徴である黄体色に着目した。この黄体色が、ヒメダカのうける捕食圧や繁殖に関連する配偶者選択・群れ形成にあたる影響の解明を目的として、本章ではヒメダカと野生型メダカを用いた各種の飼育実験により、その影響を検証した。

### ii. 供試魚の作製

実験に使用する供試魚の個体の遺伝的背景を可能な限り同一にするため、大和郡山市で購入した野生型メダカ（通称：クロメダカ）とヒメダカを交配させて作出した雑種第2世代のメダカ（ $F_2$ メダカ）を使用した。実験に使用する際には体色の違いのみを考慮し、野生型（ $B/B$ ,  $B/b$ , Fig. 1A）とヒメダカ型（ $b/b$ , Fig. 1B）に大別した。 $F_2$ 野生型メダカおよび $F_2$ ヒメダカには、水温  $27^\circ\text{C}$ ，明暗条件（明期：暗期 = 14 h: 10 h）

の 60 l ガラス製水槽 (600 × 300 × 360 mm) の環境下で, 1 日 2 回 10 時と 17 時に飽食量の人工餌料 (ヒカリメダカのエサ, キョーリン社製) を与えた.

### iii. 大和川水系における生物調査および野生メダカの捕食者の選定

捕食実験に使用する最適な捕食者を選定するために, 過去にヒメダカによる遺伝的攪乱が報告されている奈良県大和川水系を調査地として, 野生メダカの生息地調査を実施した. 2010 年 5 月から 11 月を調査期間として, 大和川水系の 18 地点で投網とタモ網 (目合 1 mm) を用いて生物採集を行なった (Fig. 2). 得られた生物は計数および種の同定後即座に放流し, 識別不可能な個体に関しては研究室に持ち帰った. 今回は実験の関係上, 特に魚類に絞って捕食者を決定した. また, 各地点で採集された特定外来種については, 同定・計数後にその場で駆除した.

採集調査では, 全 17 種の魚類が採集された (Table 1, 2). 調査地 18 地点のうち, ミナミメダカは 10 地点で生息が確認された. 本調査の結果から, 6 種の捕食者となりえる種 (カワムツ *Candidia temminckii*, ヌمامツ *Candidia sieboldii*, ナマズ *Silurus asotus*, ヨシノボリ類 *Rhinogobius* sp. , オオクチバス *Micropterus salmoides*, ブルーギル *Lepomis macrochirus*) を選定した. これらのうち, もっともミナミメダカと同所的に生息していた種はカワムツ (5 地点) であったことから捕食実験に使用する捕食者をカワムツに決定した.

#### iv. 野生型メダカとヒメダカがうける捕食圧の差の検証

ため池に放流したメダカとヒメダカのうち、ヒメダカがより捕食されていたという例が報告されている（江上，1989；児玉，2006）．これらについては，鳥類による捕食が考えられるが，本来，メダカと同所的に生息している潜在的な魚類の捕食者については把握されていない．そこで捕食実験では，ヒメダカの黄体色が捕食圧にどのような影響を与えているのかを検証するため，F<sub>2</sub>メダカと生息地調査によって決定したカワムツを用いて飼育実験を行なった．

捕食実験は，2010年12月と2011年8月から9月に，計30回実施した．カワムツの成魚（標準体長121.8–153.8 mm）を捕食者とし，使用する1個体を60 lガラス製水槽（実験水槽）へ移し，馴致飼育を行なった．実験前に，F<sub>2</sub>メダカのうち，野生型メダカの雌雄とヒメダカの雌雄各1個体（計4個体）を，水を張ったプラスチックケース（200×150×180 mm）に移し，実験水槽の水面に浮かべて捕食者にメダカを認識させた．その後メダカを実験水槽内へ投入し，カワムツの捕食行動を最大で30分間観察した（Fig. 3）．観察は，捕食対象の体色や捕食した個体の順番を記録した．しかしながら，捕食による個体数変動を考慮し，最初に捕食者に狙われた，または捕食された個体について検証した．

捕食実験30回のうち最初に狙われた野生型とヒメダカ型の回数は，それぞれ6回と24回であった（Fig. 4， $\chi^2$ 検定， $P < 0.01$ ）．このうち，捕食された個体数は，野生型メダカ1個体（16.7%），ヒメダカ10個体（41.7%）であった．従って，ヒメダ

カの体色は目立ち、捕食者に狙われやすい傾向にあることが明らかとなった。

#### v. 野生型メダカとヒメダカによる配偶者選択

配偶者選択実験は2010年11月から2011年4月にかけて実施した。水槽は配偶者の選択側の個体を馴致飼育するための選択者用水槽 (Fig. 5A, 450 × 300 × 300 mm) と実験を観察するための実験水槽 (Fig. 5B, 300 × 200 × 250 mm) の2種類を設置した。実験水槽の環境条件は、水温 25°C, 明暗条件 (明期 : 暗期 = 14 h : 10 h) とした。また古屋・恩地 (2002) を参考にして、任意の時間に産卵行動を観察できるように、選択者用水槽には、外側を黒色のビニールで覆い、一時的な暗条件を作出した。選択者側の水槽の内側には、ウォーターバスに浸したプラスチックケース (200 × 150 × 180 mm) を設置し、選択者を馴致するための容器とした。

実験の供試魚には、産卵行動を観察するために、成熟した F<sub>2</sub> 野生型メダカおよび F<sub>2</sub> ヒメダカを使用した。成熟の条件は、雄では前日に産卵行動を行っていた個体、雌では前日に産卵していた個体とした。また、個体差を考慮し、実験毎に個体を入れ替えて行なった。

雌個体の配偶者選択実験では、実験開始前日に選択者 (野生型) 1 個体を選択者用水槽へ移動させ、暗条件下に馴致した。実験水槽には体色の異なる雌の配偶者 (野生型メダカおよびヒメダカ型) 各 1 個体を投入した。実験当日の 9:30 から 11:00 の間に選択者を実験水槽へ移動させ、目視による産卵行動の観察を 30 分間行なった。ま

た，雌雄の両視点からの選択を考慮し，選択者と配偶者の雌雄を入れ替えた実験も実施した．実験は，雌雄各選択者の視点で 25 回反復した．

ヒメダカと野生メダカの間には，産卵行動の違いがないことは既に報告されている（小林ほか，2012），雄メダカは，ちかづき（approaching），したがい（following），求愛定位（positioning），求愛円舞（quick circle），浮き上がり（floating），交叉（contact），抱接（wrapping），ふるわせ（quivering），の流れで雌との産卵を行なう．本研究では，これらの行動を産卵行動とし，雄メダカが雌メダカに対して行った行動の回数を計数した．また，それぞれの雌に対してとった産卵行動の合計数が多かった雌個体を，雄メダカが選択した配偶者とした．雄メダカの配偶者選択において，産卵行動がみられなかった場合は“選択なし”とした．

雌メダカの配偶者選択においては，雄メダカの受入れを示す抱接およびふるわせ行動の回数を計数し，成功した雄メダカを選択された配偶者とした．産卵行動がみられなかった場合，産卵が確認されなかった場合は“選択なし”とした．

雄メダカの配偶者選択では，野生型メダカとヒメダカは，それぞれ 9 回と 8 回配偶者として選択され，選択なしは 8 回であった（Fig. 6）．雌メダカの配偶者選択では，野生型メダカとヒメダカはそれぞれ 7 回と 11 回選択され，選択なしは 7 回であった．

実験の結果では，雌雄どちらにおいても，有意差はみられなかった [ $\chi^2 = 0.059$  (雄),  $\chi^2 = 0.053$  (雌),  $P > 0.05$ ]．従って本結果は，ヒメダカの黄体色が野生メダカとの産卵行動や配偶者選択において，ほとんど影響を与えていないということを示している．

## vi. 野生型メダカとヒメダカによる群れ形成

日本産メダカ 2 種間の群れ行動の違いについて報告した魚野ほか (2011) の手法を参考にし, 2011 年 5 月から 2011 年 7 月にビデオ撮影と画像解析による群れ形成実験を実施した. 魚類の群れは, 進行方向と速度を一定に保った 3 個体以上のグループであると定義されている (Partridge, 1982). この定義に基づき, 本実験ではグループの個体数を 8 個体 (雌雄各 4 個体) に設定した. また, ヒメダカの黄体色による影響を調査するために, 野生型メダカとヒメダカの個体数割合が異なる 3 種類のグループ (野生型 : ヒメダカ = 6: 2, 4: 4, 2: 6) を設計した. 実験前日に, 水温 25–27°C に保ったウォーターバス内 (直径 750 mm, 深さ 350 mm) に設置した実験用の円形水槽 (直径 450 mm, 深さ 170 mm, 水位 100 mm) へ各グループを移動した (Fig. 7). 実験水槽の照明は, 実験中のみ点灯した. 実験の観察では, 実験水槽上部に設置したビデオカメラ (GZ-MG275, JVC 社製) を使用し, 群れ行動を 40 分間録画した. 群れ行動の観察は, 各グループで 2 反復行なった.

録画した動画をパソコンに取り込み, 画像処理ソフト (Free HD converter version 2.0, Koyote Lab 社製および Virtual Dub-MPEG2 ver. 1.6.19, <http://www.virtualdub.org>) によって以下の処理を施した. ビデオカメラの設置など, 人為的な操作によるグループへの影響を考慮し, 実験の開始直後と終了間際の 5 分間を解析から排除した. 残った 30 分間の動画を 10 分ごとのパートに 3 分割し, 各パートから 1 分間の動画をさらに抽



出した。1 分間の動画を 0.5 秒ごとにコマ割りし（計 120 コマ/分）、画像解析ソフト Image J ver. 1.45 を用いて各個体の座標を記録した。計測した座標点の中から、10 コマ・60 コマ・110 コマの地点を抜き取り、各コマ内での計 28 個の個体間距離（mm）を算出した。すべての個体間距離を算出後、各数値を  $\alpha$  : 野生型メダカ-野生型メダカ間 ( $B-B$ )、 $\beta$  : 野生型メダカ-ヒメダカ間 ( $B-b$ )、 $\gamma$  : ヒメダカ-ヒメダカ間 ( $b-b$ ) の 3 カテゴリーに大別し、カテゴリー間での差異を多重比較解析により分析した。解析には、統計解析ソフト R (Ver 2.62; Ihaka and Gentleman, 1996) を用いて、統計処理には Steel-Dwass の方法による多重比較を選択した。

Partridge (1982) では、群れ (school) について定義されていた。他方で、魚類の群れには群がり (aggregation) と魚団 (pod) が存在する (有元, 2007)。有元 (2007) は、群ガリを「方向性をもたないゆるやかなまとまり」とし、魚団を「互いが身を寄せ合うようなあつまり」として定義している。本実験において、実験を実施したすべての群集は、Partridge (1982) で定義された群れの条件を満たしていた。従って、本実験で観察したグループは、群がり (aggregation) や魚団 (pod) ではなくすべて群れ (school) であった。実験により、各グループにおいて、計 504 個 (2 反復×3 パート×3 コマ×28 個体間距離) の個体間距離データを得た。各カテゴリーにおける個体間距離の結果は、箱髭図に示した (Fig. 8)。各グループにおけるカテゴリー間 ( $\alpha$ - $\beta$ ,  $\beta$ - $\gamma$ ,  $\alpha$ - $\gamma$ ) の個体間距離の平均を算出し、統計処理を行なったが、有意差はみられなかった (Fig. 8, Steel-Dwass multiple comparison,  $P > 0.05$ )。もし野生型メダカとヒメダカが

同じ群れを形成する場合，カテゴリー $\alpha$ および $\gamma$ の個体間距離が，カテゴリー $\beta$ の個体間距離の範囲にある程度内包されることになる．すべてのグループにおいて，3カテゴリー間の数値に統計的な差異はみられなかった（Steel-Dwass multiple comparison,  $p > 0.05$ ）．この結果は，ヒメダカのもつ黄体色が群れ形成において影響していないことを示している．

#### vii. ヒメダカによる遺伝的攪乱発生の考察

本研究では，捕食圧・配偶者選択・群れ形成について，ヒメダカのもつ黄体色があたえる影響を検証するために，実験環境下における3種類の飼育実験を実施した．捕食実験では，野生型メダカに比べてヒメダカのほうが捕食者に狙われやすく，捕食されやすい傾向がみられた（Fig. 4）．本実験は実験環境下での検証ではあるが，少なくとも体色の違いによる捕食圧の差は明らかであり，恐らくヒメダカが目立ちやすく，捕食者により狙われやすいことに起因すると考えられる．従って，ヒメダカが野外へ放流された場合，野生メダカに比べてより高い捕食圧を受け，淘汰されやすくなる可能性がある．本研究の結果は，グッピー*Poecilia reticulata*を用いた過去の研究（Endler, 1980）では，目立つ体色（赤系統・青系統）をもつ個体のほうが地味な個体（黒系統）よりも個体捕食されやすくなるという，本研究の捕食実験の結果と同様の傾向を示している．またヒメダカは野外で負の選択圧をうけているという従来の推測を支持する結果となった（江上，1989；北川，2013；児玉，2006）．

一方で、配偶者選択実験と群れ形成実験においては、野生型メダカとヒメダカの間で差はみられなかった。配偶者選択における体色の重要性については、シクリッド類やトゲウオのような魚種で報告されている (Milinski and Bakker, 1990; Seehausen and Alphen, 1998)。また、メダカのトランスジェニック変異個体を用いた Fukamachi et al. (2009) は、雌雄において黄色素胞の少ない個体が配偶者に選ばれにくいと報告している。しかし本章の結果は、黒色素胞の欠損により発現するヒメダカ型の体色は、配偶者選択に影響をあたえず、群れへの参加も容易であったことも示した (Fig.6, 8)。これは、野生メダカとヒメダカが互いを同類であると認識していること、繁殖においても雌雄に関係なく同様であることを示している。また、魚類の繁殖・性行動において、嗅覚は非常に重要な要素となる。嗅覚は、外界に存在する化学物質を認識する感覚の1つであり、特に繁殖行動において性フェロモンを認識する役割を有する (橋田・西田, 2007; 山家, 2009)。すでに、魚類においてはキングヨ *Carassius auratus* などで性行動における嗅覚の関与が報告されている (Sorensen, 1988)。メダカ種群においては、早川ほか (2012) で、配偶者選択においてヒメダカと野生メダカで嗅覚の機能に違いがないことを示している。これらの結果から、野外で野生メダカとヒメダカが同所的にいる場合、両者は容易に交雑してしまうことを示唆している。

本研究の成果から、放流等によって野外へ放たれたヒメダカは、目立つ黄体色から野生メダカに比べ捕食圧が高く、ある程度の個体数は淘汰されると考えられる。しかし、すべての個体が淘汰されるわけではなく、捕食者から逃れ、生残した個体が現れる。

生残した個体は野生メダカの群れに混じり、群れの中で繁殖に参加する。繁殖に参加することでヒメダカの遺伝子が野生集団に移入され、遺伝的攪乱が生じると考えられる。たとえ生残したヒメダカの個体数がきわめて少数であったとしても、ほぼ毎日産卵するというメダカの繁殖生態であれば、遺伝子移入が起こる可能性は非常に高くなると思われる。そして、繁殖によって出現する子孫は野生型の体色 ( $B/b$ ) をもっていることから、ヒメダカ由来の遺伝子を有しているにもかかわらず、高い捕食圧からも解放される。この子孫がさらに繁殖に参加していくことで、ヒメダカによる遺伝的攪乱は眼に見えない形で進行していくと予想される。

### Ⅲ. 全国のメダカ種群におけるヒメダカによる遺伝的攪乱の現況の把握

#### i. 本章の目的

メダカ野生集団のもつ遺伝的多様性を保全するためには、現在全国のメダカ種群においてどの場所でどの程度遺伝的攪乱が生じているのかを把握する必要がある。近年、メダカにおける遺伝的攪乱に関する報告は徐々に蓄積されてきている（小山・北川，2009；中井ほか，2011；横田ほか，2014）。しかし、現在は関西地方の2水系（奈良県大和川水系・兵庫県武庫川水系）のみと調査範囲が限られており、遺伝的攪乱の全体的な現況を把握しきれていない。Takehana et al. (2003) では、全国のメダカ種群における mtDNA の集団構造の把握が行なわれ、各地域集団が有する遺伝子型が定義された。そのなかで、西日本からの個体の移入による関東地方での遺伝的攪乱が示唆されている。しかし、移入の事実のみ議論しており、その要因については触れられていない。そこで本章では、全国レベルでメダカ種群における遺伝的攪乱の現況を把握するために、全国に生息する野生メダカを対象として遺伝解析を実施した。また、全国で生じている遺伝的攪乱において、特にヒメダカによる影響に着目して検証を行なった。

#### ii. 供試魚の収集

供試魚には、2006年から2015年に採集された105地点で採集された野生メダカ計965個体（キタノメダカ7地点49個体，ミナミメダカ97地点916個体）を使用した。

(Fig. 9). また、非在来地域である北海道帯広市で採集された 9 個体についても、供試魚とした。これらの個体にはすべて 70 %エタノール固定を施し、標本とした。各標本の筋組織または鱭組織からフェノール・クロロホルム法 (Asahida et al., 1996) によって全 DNA を抽出し、TE 緩衝液中に保存した。

### iii. 2 種類の DNA マーカーを用いた野生メダカの遺伝解析

#### 1. ミトコンドリア DNA 解析 (Takehana et al., 2003)

Takehana et al. (2003) で確立された mtDNA *cytb* 領域を用いた PCR-RFLP 法は、メダカ種群における地域集団のグルーピングが可能な手法である。従って、各地域に固有の遺伝子構成から、地域集団に在来の遺伝子型であるかどうかを判別することができる。また、小山ほか (2011) で、ヒメダカを構成する mtDNA 構成が明らかとなっていることから、他地域集団だけでなくヒメダカによる遺伝的攪乱の検出も可能である。

ミトコンドリア DNA では、チトクローム *b* 領域を対象として設計されたプライマーセット (Forward: 5'-AGG ACC TGT GGC TTG AAA AAC CAC- 3', Reverse: 5'-TYC GAC YYC CGR WTT ACA AGA CCG- 3') を使用して PCR (94 °C 120 秒間の熱変性の後、94 °C 90 秒間、55 °C 120 秒間、72 °C 120 秒間を 30 サイクル、その後 72°C 60 秒の最終伸長) を行ない、目的領域を増幅した。5 種類の制限酵素 (*Hae III*, *Mbo I*, *Msp I*, *Afa I*, *Taq I*) を使用して、各 PCR 産物に 37 °C 90 分間 (*Taq I* のみ 65 °C 90 分間)

の制限処理を施した。その後、3%アガロースゲル上で35分間電気泳動し、ミドリグリーン染色およびUV写真撮影によって形成されたバンドの位置を比較した。本研究では、Takehana et al. (2003)の各地域型に合致したミトタイプを「野生型」、合致しないミトタイプを「移入型」とした。また市販されているヒメダカのみトコンドリアDNAは、主にミトタイプB1aとB27で構成されている(小山ほか, 2011)。従って、移入型のうちミトタイプB1a, B27を「ヒメダカ型」とし、それ以外のミトタイプを「他地域型」とした。

## 2. ヒメダカ体色原因遺伝子マーカー (*b*-marker; 中井ほか, 2011)

ヒメダカの黄体色は、表皮の黒色素胞発現を調節する単一の遺伝子座 (*B* 遺伝子) における劣性遺伝子 (*b* 遺伝子) によって発現する (Aida 1921; Fukamachi et al. 2001, 2008)。*b* マーカーは、この *B* 遺伝子を標的として作製された遺伝子マーカーであり、野生メダカとヒメダカを判別することが可能である。また、*b* マーカーは核DNAを対象とした遺伝子マーカーであることから、交雑個体であるヘテロ個体 (*B/b*) を検出できる点で、mtDNAとは異なる利点を有している。

抽出された全DNAを鋳型として、核DNA第12番染色体上の体色原因遺伝子を対象として設計されたプライマーセット (Forward: 5'-GGA GCA GCM TCT GTG AGA ACA-3', Reverse: 5'-GGT CCT CTG ACA GCA GGG TC-3') を用いてPCR (94°C 120秒間の熱変性の後、94 °C 30秒間、70 °C 30秒間、72 °C 60秒間を30サイクル、そ

の後 72 °C300 秒の最終伸長)を行ない, 目的領域を増幅した. PCR 産物を 3% アガロースゲル上で 35 分間電気泳動した後, ミドリグリーン染色 (日本ジェネティクス社製) および UV 写真撮影によって形成されたバンドの位置を比較した. *b* マーカーの結果について, 以降野生型を *B* 遺伝子, ヒメダカ型を *b* 遺伝子とした.

### 3. 遺伝解析結果

本研究では, 黄体色をもつヒメダカ個体が 10 地点から 20 個体採集され, すべての個体から *b* 遺伝子のホモ型とヒメダカ型が検出された.

キタノメダカでは, 6 地点 49 個体を解析に供した. ミトコンドリア DNA では, すべての個体が野生型を有していた. しかし, 山形県の 1 集団 (St. 2, Fig. 9) でのみ, 1 個体から *b* マーカーで *b* 遺伝子が検出された (Table 3). ミナミメダカでは, 遺伝解析を行なった 98 地点 925 個体のうち, 35 地点 205 個体からヒメダカ型と考えられる遺伝子型が検出された (Fig. 10, Table 3). 他地域型が検出された個体は, 3 地点 15 個体確認された. *b* マーカーでは, 16 地点 41 個体から *b* 遺伝子のみが検出され, ミトコンドリア DNA 解析では, 25 地点 118 個体からヒメダカ型のマイトタイプのみが検出された. *b* 遺伝子およびヒメダカ型の両方を有していた個体は, 15 地点 31 個体であった. 非在来地域である北海道では, マイトタイプ B1a および B11 が検出されたが, *b* 型は確認されなかった.



本研究では、マイトタイプ B15・B1a が関東地方で頻繁に検出された (Fig. 9, アスタリスク)。マイトタイプ B15 は山陰および北部九州地方で頻繁に確認され、それらの地域の在来型とされている (Takehana et al., 2003)。また、マイトタイプ B1a は、ヒメダカ型の 1 つであると同時に、関西および山陽地方東部の在来型でもある。Takehana et al. (2003) の報告でも関東地方でこれらのマイトタイプは確認されているが、遺伝子移入であると判断されている。しかしながら、本研究でみられたこれらのマイトタイプは、関東地方の広範囲で見られる型であり、さらに他のヒメダカ型遺伝子 (*b* 型・マイトタイプ B27) とは同時に検出されなかった。現段階で正確な判断は不可能であることから、本研究では関東地方におけるマイトタイプ B15 および B1a を未確定とした。

#### iv. 全国におけるヒメダカによる遺伝的攪乱の現況と傾向

##### 1. メダカ野生集団における遺伝的攪乱の主要因

遺伝解析の結果、野生メダカ 105 地点 974 個体のうち 36 地点 (34%) 206 個体からヒメダカ型遺伝子 (*b* 遺伝子およびヒメダカ型) が検出された。ヒメダカ型遺伝子を各領域別にみると、25 地点 73 個体 (24%) から *b* 遺伝子が見つかり、ミトコンドリア DNA 解析のみの結果では、29 地点 164 個体 (28%) からヒメダカ型が検出された。また、*b* 遺伝子とヒメダカ型の両方が確認された個体は、15 地点 31 個体であった。またマイトタイプの割合に着目すると、ヒメダカ型が 29 地点 149 個体 (91%) 検出され、3 地点 15 個体 (9%) が他地域型であった。遺伝的攪乱が仙台の

集団 (St.12, Fig. 9) では, ミナミメダカの分布域にキタノメダカが移入されていた。しかし, 人為環境下での移入であり, 自然下で生じることがきわめて稀であると考えられる。遺伝解析の結果, 遺伝的攪乱がみられたすべての地点でヒメダカ型 (*b* 遺伝子およびヒメダカ型) が検出された。従って, 全国のメダカ野生集団における遺伝的攪乱の主要因は, やはりヒメダカであると裏付けられた。

## 2. メダカ野生集団における遺伝的攪乱の現状

遺伝解析により, 全国で遺伝的攪乱が確認された。遺伝的攪乱の傾向としては, 大阪府や東京都のような都市部周辺や, メダカの主要な養殖産地である愛知県・奈良県の周辺で頻繁に検出された。

今日, ヒメダカは多様な用途で利用されている。たとえば本品種は, 観賞魚として人気が高く, 多くの人に飼育されている。また, アロワナやガーパイクといった魚食性の熱帯魚の餌魚として用いられることから, 観賞魚だけでなく餌魚としての需要も大きい。このような目的にも対応して, 都市部ではヒメダカ等の養殖個体を容易に購入することができる。

さらに, ヒメダカは教育施設における理科の生物教材としてよく利用される。特に小学校では, 理科のカリキュラムのなかに「生命の誕生」と呼ばれる生物の飼育・繁殖を学ぶ単元がある (文部科学省, 2008)。その教材として, 安易に繁殖でき, 顕微鏡で卵発生の確認ができるメダカが授業で多く使用されており, 特に教材としてヒメ

ダカが多く利用されている。しかし、教材目的で利用されたヒメダカは、単元の学習を終えたあと、学生や指導者によって近隣の河川へ放流されている可能性が高い。

都市部周辺では、同時に開発によって野生メダカの生息地そのものが減少していることが多い。近年、都市部周辺に生息する希少な野生メダカを保全するための活動が各地で行なわれている。しかし、これらの活動では個体や集団のもつ地域性・固有性があまり考慮されておらず、利用される個体の多くが購入されたヒメダカである。これらの個体が放流・遺棄された結果として、野外の河川やため池でヒメダカを目撃する事例が報告されている（瀬能，2000）。これらの個体が都市部での大規模な遺伝的攪乱につながったと考えられ、実際に駆除活動が行なわれた事例もみられる（瀬能，2013）。以上のことから、ヒメダカの放流によるリスクや遺伝的攪乱の発生は、教育施設や団体の数、観賞魚店の数といった人間活動のレベルと需要に比例して増加していると考えられる。

愛知県や奈良県には、金魚やメダカの主要な養殖産地である弥富市と大和郡山市が含まれている。メダカの養殖池は、水田等を改修して作られたものが多く、個体が容易に流出できる構造になっている（小山・北川，2009）。雨天時の増水などが生じると養殖池から水が溢れ、周囲の用水路や河川へ流れ込む。これと同時に養殖されていたメダカが流出し、野生メダカと交雑することで遺伝的攪乱が生じたと考えられる。

ヒメダカによる遺伝的攪乱は、九州地方南部にある屋久島などの島嶼部（St. 100, 101, Fig. 9）でも生じていた。また同地点では、在来型・ヒメダカ型と同時にマイト

タイプ B11 が検出された。マイトタイプ B11 は、本来関東地方に在来のマイトタイプである。従って、これら島嶼部での攪乱は、近隣の地方からの個体の移入ではなく、関東地方からすでに遺伝的攪乱を経験したメダカが 2 次的に移入された結果、遺伝的攪乱が生じたと考えられる。島嶼部の人間活動は、都市部に比べて小さいと考えられるが、このようなレベルでも遺伝的攪乱を引き起こす十分な影響力を持っていることが示唆された。また、北海道の帯広周辺 (St. 1, Fig. 9) でも、島嶼部と同様にマイトタイプ B11 が検出され、島嶼部と同様の移入が関東地方からもたらされていると推察された。このような事例は江上・酒泉 (1981) においてもみられており、北海道函館市で採集されたメダカが東日本型を有していた、と示している。従って、このような移入はかなり昔から行なわれていたと考えられる。

一方で、57 地点の集団は在来の遺伝子型のみを有しており、現在のところ、ヒメダカによる遺伝的攪乱が生じていないことが確認された。これらの集団は全国各地に分散しており、遺伝的攪乱がみられた地点とは異なっていた。従って、保全の対象となる全国の野生メダカは十分に残っており、この先十分な保全活動が行なわれることで、これら野生メダカのもつ遺伝的多様性が保全または復元されることが考えられる。

### 3. 各解析手法における検出力の違いとマーカーとしての有用性

本研究では、遺伝的攪乱を検出するために mtDNA の *cytb* 領域と核 DNA の *b* マーカーを使用した。*b* マーカーはメダカの表現型を表す遺伝子である *B* 遺伝子 (ヒメダ

カの *b* 遺伝子) を対象として開発された手法である (中井ほか, 2011). 従って, *b* マーカーによって *b* 遺伝子が検出された場合, それはヒメダカによる遺伝的攪乱であると直接的に決定できることが利点である. しかし, ヒメダカの体色を示す *b* 遺伝子は野外で目立ち, 捕食者に捕食されやすいことから, 負の選択圧を受けている可能性が高い (Nakao and Kitagawa, 2015).

mtDNA 分析は, 野生集団の野生型を詳細に判別することが可能である (Takehana et al., 2003). これは, *b* マーカーにはない利点であり, 他地域型の移入についても判別が可能であることも示している. しかしながら, 母系遺伝の様式をとる mtDNA であることから, 雄メダカからの遺伝子移入を過小評価してしまう. 加えて, 本章で定義したヒメダカ型 (B1a と B27) は, ヒメダカそのものを示すマイトタイプではなく, 厳密には市販のヒメダカを構成する地域型を示しているにすぎない (小山ほか, 2011). つまり, この 2 種類のマイトタイプを在来型にもつ地域では, 在来か移入かの判別をすることができない.

本章において, mtDNA で 189 個体, *b* マーカーで 36 個体と, 検出個体数に約 5 倍程度の差がみられた. このことから, *b* マーカーに比べて mtDNA 解析によるヒメダカ型遺伝子の検出力が高いように見える. しかしながら, *b* マーカーのみで検出されている個体もみられていることから, 小山・北川 (2009) で実施されたような mtDNA のみの解析だけではなく, *b* マーカーと合わせて解析を行なうことで, ヒメダカによる遺伝的攪乱の現況をより正確に把握することができると考えられる. しかし, どちら

らのマーカーにも欠点がみられることから、遺伝的攪乱をより高い感度で検出できる新規の DNA マーカーの開発が求められる。

#### 4. メダカ野生集団を保全していくための課題

本章の遺伝解析により、保全の対象となる野生メダカが全国に存在していることが明らかとなった。一方で、遺伝解析によりヒメダカによる遺伝的攪乱の現状とその広がりを把握することができた。

ヒメダカは、現在さまざまな用途で利用されており、野外へ放流された個体がメダカ野生集団における遺伝的攪乱の主要因となっている。従って、野外へのヒメダカの流出を防ぐことができれば、ヒメダカによる遺伝的攪乱の拡散を大幅に抑制することができると考えられる。そのため、現在ヒメダカを利用している人々（教育機関・観賞魚店・養殖業者など）にヒメダカによる遺伝的攪乱のリスクと影響について説明していく必要がある。

一方で、近年、ヒメダカと同様にクロメダカと呼ばれる品種も多く利用されている。クロメダカは、野生メダカの体色をしている品種である。しかし、体色以外の遺伝子構成はヒメダカと同様である。また、養魚場等で飼育されているメダカは、青メダカや白メダカなどヒメダカ以外にも多数存在する。そのような品種は、ヒメダカと同様の環境で養殖・販売されていることから、同様に野外へ流出し、遺伝的攪乱を引き起こしている可能性がある。従って、今後は、クロメダカを含めた他の改良品種による

遺传的攪乱についても，評価していく必要がある。

## IV. 単一流域におけるヒメダカ型遺伝子の拡散動態の把握

### i. 本章の目的

本研究では、第Ⅲ章で全国に生息するメダカ野生集団の遺伝解析を行ない、全国における遺伝的攪乱の現況とその主要因を明らかにすることが出来た。一方で、全国規模の全体像を把握するための調査であることから、第3章の結果は各河川の特定地点の遺伝子構成のみを表している。淡水魚であるメダカの潜在的な移動・分散範囲は水系に含まれる河川が及ぶ範囲、すなわち水系や流域が単位となる。従って、移入した外来遺伝子についても潜在的にその広がりをもつことになり、移入された遺伝子が、現状においてどの程度拡散しているのか、どのように進行するのかを把握しておくことが重要である。そのため、第Ⅲ章で遺伝的攪乱が確認された地点については、単一の流域の中での移入現況を調べる必要がある。特に、単一の河川における上流から下流までを含めた一連の流れ（流程）を追い、流程各地点におけるヒメダカ型遺伝子の割合を調査する必要がある。単一の水系を対象とした報告として、小山・北川（2009）で行なわれた奈良県大和川水系と、横田ほか（2014）の兵庫県武庫川があげられる。しかし、報告されたこれらの水系は、ヒメダカの養殖産地の1つである奈良県と同一のミトタイプ構成をもつ地域に含まれる（sub-clade BVII ; Takehana et al., 2003）。従って、両水系ともに野生型とヒメダカ型の一部（B1a）が同一であることから、遺伝子の拡散力など遺伝的攪乱の動態を正確に把握しきれていない。従って、これを把握



するためには、ヒメダカ型遺伝子が野生集団に移入された際に容易に判別できる河川を選定する必要がある。本章では、単一河川におけるヒメダカ型遺伝子の動態を把握するために、東京都多摩川水系の支流である野川に着目した。

野川は、東京都を流れる多摩川水系支流の一級河川 (Fig. 11) であり、過去の調査でミナミメダカの生息が確認されている (東京都建設局, 2015)。また野川は、第III章の結果からヒメダカによる遺伝的攪乱が確認されており、加えて野生型の遺伝子構成のなかにヒメダカ型遺伝子が含まれていないことから、遺伝的攪乱の判別が正確に行える流域である。本章では、東京都多摩川水系野川におけるヒメダカによる遺伝的攪乱の拡散範囲を把握することで、その動態について考察した。なお、本章の調査は、国際基督教大学教養学部の小林牧人教授および周 翔瀛氏との共同研究である。

## ii. 材料と方法

### 1. 供試魚の収集および遺伝解析

本章では、2014年から2015年にかけて、野川本流の8地点で採集された野生メダカ215個体を供試魚とした。各地点で採集された詳細な個体数は、Fig. 12に示した。個体からのDNA抽出および遺伝解析の領域については、第III章と同様の手法を用いた。本章においても、Takehana et al. (2003)と一致したマイトタイプおよび*b*マーカーの*B*遺伝子を野生型、マイトタイプB1a・B27をヒメダカ型および*b*マーカーの*b*遺伝子、それ以外の地域型を他地域型とした。

## 2. 野川における堰等の障害物調査

現地調査と並行して、野川における障害物調査を実施した。調査の流域は、野川の上流となる鞍尾根橋 (St. 1, Fig. 12) から最下流の採集地点である喜多見大橋 (St. 8, Fig. 12) までとし、各採集地点の間に存在する堰等の障害物の有無を調査した。堰は、河川を分断する一般的な堰ではなく、メダカの移動を阻害する可能性があるものを定義した。従って、河川の水深が極端に浅い地点や、石組み等により流速の大きい地点についても対象とした。

### iii. 野川における遺伝的攪乱の現況

遺伝解析の結果、215 個体のうち 119 個体 (55 %) からヒメダカ型が検出された (Fig. 13)。また、St. 2 では 2015 年にヒメダカ個体が 1 個体採集され、両遺伝子座でヒメダカ型を有していた (Table 4)。マーカー別に個体数をみると、mtDNA 分析で 113 個体 (52 %)、*b* マーカーで 21 個体 (10 %) からヒメダカ型が検出された。野生型は、mtDNA 分析で 95 個体 (44 %)、*b* マーカーで 194 個体 (90 %) であった。また St. 5 (Fig. 12) では、キタノメダカを示すマイトタイプ A13 が検出された。ヒメダカ型は 8 地点すべてで確認され、野川全体でヒメダカによる遺伝的攪乱が生じていることが明らかとなった。また本調査では、Takehana et al. (2003) で決定されたマイトタイプと一致しない遺伝子型が 6 個体みられた。

各地点間の障害物調査では、各地点間に存在する堰の数を計数し、計 19 個の障害物を確認した。各地点間の障害物の数は、St. 1-2 : 5 個, St. 2-3 : 2 個, St. 3-4 : 0 個, St. 4-5 : 5 個, St. 5-6 : 3 個, St. 6-7 : 3 個, St. 7-8 : 1 個であった。障害物によるメダカの移動障害を検証するために、本研究では各地点の *b* マーカーおよび *cytb* 分析により得られた遺伝子型を用いて多重比較による統計処理を行なった。多重比較には Steel-Dwass の方法を用い、各地点で得られた遺伝解析の結果を群として、地点間の比較を行なった。各地点間における遺伝子頻度の差を検定したところ、すべての地点間で検定結果に有意差はみられなかった (Steel-Dwass multiple comparison,  $p > 0.05$ )。従って、野川において地点間にみられた障害物による遺伝子構成への影響はみられないことが明らかとなった。

ヒメダカ型遺伝子が流域全体に拡散していることから、野川におけるヒメダカの詳細な移入源について、本研究では特定するまでに至らなかった。しかし、障害物のなかには、流路が狭くメダカが遡上するには困難な箇所が多く見受けられる。これらの障害物を乗り越え、下流部から上流部までメダカが遡上していくのは非常に困難であると推測される。従って、少なくとも上流部付近で、ヒメダカの放流が過去に行なわれていた可能性は高い。また、各地点の遺伝子構成が類似していることから、野川の複数地点でヒメダカが放流されていた可能性も考えられるが、メダカにおける遺伝子流動の高さ、つまり、外来の遺伝子が移入した場合の拡散能力の高さを示している。

本章の成果から、野川における流域全体を通じた遺伝的攪乱の現況とヒメダカ型遺

伝子の動態を把握することができた。本章の結果は、1流域である東京都野川を調査地として得られたものである。野川は、上流から下流まで連続して野生メダカが生息する比較的良好な生息環境であることが、今回の結果をもたらした要因であると考えられる。従って、河川の構造や勾配、その他多くの環境条件が異なる河川においては、本調査とは異なる可能性があり、魚類の移動を完全に阻害する堰などが存在する河川や、生息環境が良好ではない区間を挟む場合は、遺伝子移入がより制限される可能性もある。

しかし、今後メダカ野生集団の保全にむけて、具体的な方策を検討していく際には、予防原則的には野川でみとめられた高い分散能力の可能性を、1つの基準にして考えていかなければならない。

野川の野生集団は、遺伝的攪乱が大規模に進行している一方で、完全にヒメダカ型遺伝子に置き換わってしまったわけではない。現在残されている野生型の遺伝子をこれ以上喪失させないためにも、ヒメダカ放流防止にむけた啓発や対策をとっていく必要がある。

## V. 全国のメダカ種群における遺伝的多様性の保全

### i. ヒメダカによるメダカ種群への遺伝的攪乱の発生と拡散

本研究の第II章により、ヒメダカによる遺伝的攪乱が発生する実態について明らかとなった。また、第III章では遺伝的攪乱の主要因がヒメダカであることを裏付け、第IV章ではヒメダカ型遺伝子の拡散力の強さを示した。以上の結果より、野外の水環境へ移入されたヒメダカがどのようにして遺伝的攪乱を発生させ、どのように拡散していくのか、その実態を Fig. 14 に示した。

ヒメダカが野外へ移入される要因には、①飼育放棄による放流、②教育・保全活動による放流、③養殖池・野外池からの漏えいなどがあげられる（北川，2013）。これらの要因によって侵入したヒメダカは、その目立つ体色から野生メダカにくらべ捕食者となる魚類や鳥類により捕食されやすいことが明らかとなっている（Nakao and Kitagawa, 2015；児玉，2006）。これにより、放流されたヒメダカの個体数は、大幅に減少すると予想されるが、すべての個体が捕食圧により淘汰されることはなく、ある程度の個体は生残する。このヒメダカは、逸出した野外で生息する野生メダカの群れに参加し、繁殖に参加する（Nakao and Kitagawa, 2015）。繁殖期になると、メダカはほぼ毎日産卵を行なうことから、たとえ生残したヒメダカの個体数が少数であったとしても、高い確率でヒメダカと交配してしまう。誕生する子の世代ではヒメダカ型遺伝子を有する野生メダカが誕生し、メダカ野生集団における遺伝的攪乱が発生する。

子世代の個体は、野生メダカと同様の体色をもつことから、ヒメダカのような高い捕食圧をうけることなく生残する。これらの個体によって流域全体へとヒメダカ型遺伝子が拡散していくことで、遺伝的攪乱が進行し、野生集団がもつ遺伝子構成が徐々にヒメダカ型遺伝子に置き換わっていく。このような事態が全国で発生することで、全国のメダカ種群の有する遺伝的多様性が喪失し、将来的には第IV章でみられた野川のような河川が全国に広がってしまうことになる。

一方で、第III章の成果から、遺伝的攪乱の主要因がヒメダカであることが結論付けられている。従って、遺伝的攪乱のリスクを全国へ啓発し、将来的なヒメダカの移入・放流を予防することが可能となれば、メダカ野生集団における遺伝的攪乱の進行は、大幅に抑制されると推測される。また、第III章では、野生集団が多く存在していることが明らかとなっている。これらの集団は、メダカ種群の遺伝的多様性を保全していくために必要不可欠である。また、すでに遺伝的攪乱をうけている集団の取り扱いや、野生集団との区別をつけるための手法についても取り決めていく必要がある。

メダカ種群は、青森県から沖縄県まで広く生息する広域分布種である。基本的には全国に生息するすべての野生メダカの生息地を、生息地ごとに保全していくことが望ましいが、保全にかけることのできる努力量が限られていることから、現実的な案ではない。生息地単位から範囲を広げた場合の基準の1つとして、水系・流域単位があげられる。これは、水系・流域単位で集団をグループ化し、各水系で独立して保全を行っていくことになる。魚類において、移動が可能な河川の連続的なつながりであ

る水系および流域は、グループ化の1つの基準として妥当であるように思われる。しかしながら、第IV章の成果から、移入されたヒメダカ型遺伝子は、その流域内にすみやかに拡散していくことが示された。従って、水系・流域を単位とした場合や、水系内で単位を分けた場合には、その中に遺伝的攪乱が生じた集団が含まれる場合に、リスクが非常に高いものとなる。また、国内における水系の数は膨大であり、その水系1つ1つを単位とした場合、保全にかかる努力量もまた多くなると考えられる。

そこで、本研究ではメダカ種群のもつ遺伝的差異とその多様性に着目し、遺伝学的情報に基づいた集団のグループを全国レベルで作製していく。このグループは、全国レベルでメダカ種群の遺伝的多様性を保全していくための1つの単位となる。メダカ種群においては、Takehana et al. (2003) および酒泉 (1990) で遺伝的差異に基づく地域集団が示されており、これを単位の基準として地理的隔離などの要素を加えていくことが妥当であると考えられる。

Takehana et al. (2003) や酒泉 (1990) で決定された地域集団は、各集団レベルでも広範囲にわたる。たとえば、東日本型と呼ばれる地域集団は、東北地方の太平洋側から紀伊半島東部までの非常に広い範囲を占める。この広範囲を占める東日本型を1つの単位として保全していくには、集団の選定や努力量の配分を決定する点できわめて困難である。従って、メダカ種群のより効率的な遺伝的多様性の保全を行なうためには、遺伝学的情報を用いて各地域集団をさらに細分化し、保全努力を配分できる単位の制定が必要となる。そこで本研究では Takehana et al. (2003) で示されたミトタイ

プに着目した。Takehana et al. (2003) では、全 64 種類のマイトタイプによって各地域集団を構成しており、地域集団内には複数のマイトタイプが含まれている。地域集団内で単位を細分化する際には、この多様なマイトタイプを指標として使用することが妥当であると考えられる。また、野生集団のより実践的な保全にむけて、決定された単位の中からどの集団に保全努力をかけるのか、攪乱を受けた集団をどのように取り扱うのか、といった優先度の提案を行なう必要がある。

そこで第 ii 節以降では、メダカ種群の遺伝的多様性保全にむけた単位の設定について、保全単位 (Conservation Unit) の指標である「進化的に重要な単位 (ESU)」および「管理単位 (MU)」の考え方にあてはめて提案していく。さらに、設定した保全単位内における優先度決定の手法について提言することで、より実践的な遺伝的多様性保全の手法の確立を目指す。

## ii. 全国のメダカ種群における進化的に重要な単位の設定

### 1. 進化的に重要な単位 (Evolutionary Significant Unit, ESU)

現在明確にされている種は、それぞれを別々の単位として管理していく必要がある。しかし、種内における集団についても、現在分化の途中であると考えられることができる。もし集団内で顕著な適応的分化や遺伝的分化がみられる場合、それぞれを個別の進化的系列として管理することが保全上妥当である (Frankham et al., 2002)。また、Moritz (1994) において、進化的に分化した種内集団は、個別の遺伝的管理が必要であるとさ



れている。このような集団は、進化的に重要な単位 (ESU: Evolutionary Significant Unit) と呼ばれる (Moritz, 1994)。Moritz (1994)は ESU を遺伝子マーカーによって決定することを提案している。集団間ではっきりとした分化を示し、かつ mtDNA で単系統性を示し、核遺伝子座でアレル頻度に明瞭な分化がみられる場合、それらの集団は個別の ESU に相当するとしている。また、ESU を設定することは、各集団の進化的背景や集団のもつ遺伝子構成の在来性の重視、すなわち遺伝的多様性の保全における風土性の原則を遵守することにつながる。

## 2. 全国のメダカ種群における ESU の設定

全国に生息するメダカ種群は、現在絶滅危惧Ⅱ類に指定されており、その保護が急務となっている。国内に生息するメダカ種群において、種群内で遺伝的に分化した集団に細分されることが明らかとなっている。酒泉 (1983, 1990) は、アロザイム分析によりミナミメダカを 9 種類の地方集団 (東日本型・東瀬戸内型・西瀬戸内型・山陰型・北部九州型・有明型・大隅型・薩摩型・琉球型) に細分した (Fig. 15)。一方、Takehana et al. (2003) および竹花 (2010) は、キタノメダカ (系統 A) ・ミナミメダカ (系統 B ・ C) に分け、キタノメダカで 3 種類 (A-I - A-III)、ミナミメダカの系統 B で 11 種類 (B-I - B-XI) のサブクレードに細分している (Fig. 16)。このように、メダカ種群は遺伝的に異なる多くの集団を含んでおり、豊富な遺伝的多様性を有している。遺伝的に異なる各集団は個別の遺伝的管理が必要である。しかし、現在メダカ種群に

において ESU のような保全に向けた明確なグルーピングは定義されておらず、遺伝的な差異のみが認識されている。そのため、メダカ種群のもつ遺伝的多様性の保全にむけた明確な指標は現在のところ存在していない。このことはメダカ種群を保全していくうえで重要な問題であり、早急な解決が望まれる。そこで本章では、酒泉（1990）で決定された地域集団に基づいて、Takehana et al. (2003)・竹花（2010）によって定義された集団の分化パターンを加えていくことで、メダカ種群における保全単位を決定した。また本章では、メダカ種群の保全単位のうち、ESU に相当する単位を Takehana et al. (2003) の系統樹から Fig. 17 のように、分布としては Fig. 18 のように設定した。

### 3. キタノメダカ（系統 A）

キタノメダカの分布域は、青森県から若狭湾までとされている。竹花（2010）で決定されたパターンのうち、系統 A は酒泉（1990）のキタノメダカ（旧北日本集団）の生息域とよく一致している。竹花（2010）の mtDNA 系統樹でも単系統性、すなわち 1 つの共通祖先からなる系統群を示しており、A-I および A-II で明確な違いがないことから、キタノメダカはこの系統 A を 1 つの ESU（キタノメダカ）としてみなすことが妥当である。

兵庫県北部では、キタノメダカとミナミメダカのハイブリッド集団がみられ、マイトタイプではサブクレード A-III が分布している（Fig. 16）。しかし、このハイブリッド集団の取り扱いについて、現在のところ明確な指標がないことから、今回この地域

についてはハイブリッド集団の地域として独立させ、ESU の設定からは除外した。

#### 4. ミナミメダカ (系統 B)

次に、竹花 (2010) の系統 B は、ミナミメダカの生息域に対応している。ミナミメダカは 9 種類の地域集団に細分されるが、酒泉 (1990) で決定された地域集団のうち、東日本型が系統 B-I – B-VI, 東瀬戸内型と西瀬戸内型が系統 B-VII, 大隅型が系統 B-VIII, 北部九州型と山陰型西部が系統 B-IX, 山陰型東部が系統 B-X, 有明型・薩摩型・琉球型が系統 B-XI とそれぞれ一致している。

##### 4-1. ミナミメダカ 東日本型 (系統 B-I – B-IV)

東日本型は、系統 B-I – B-VI まで含んでおり、東日本型の中で単系統性を示している。酒泉 (1990) で設定された東日本型は、岩手県から三重県まで、および土佐湾周辺と非常に広範囲を占めていた。しかし、Takehana et al. (2003) の結果で三重県南部 (系統 B-VI) と土佐湾周辺 (系統 B-V) の集団については遺伝的な固有性がみられたことから、本研究ではこの東日本型からこの 2 集団を除外した。残りの東日本型である系統 B-I – B-IV は 1 つの単系統群を構成しており、また幅広い地域で B-I が共有されていることから、総合して 1 つの ESU (東日本型) としてまとめることが妥当である。

#### 4-2. ミナミメダカ 紀伊型 (系統 B-VI)

系統 B-VI は、熊野灘に面した紀伊半島南東部にみられる系統である。Takehana et al. (2003) の結果では、東日本型の系統 (系統 B-I) が系統 B-VI の地域ではほとんどみられていない。青柳 (1957) は、中央構造線によって分断された四国の太平洋沿岸や九州の一部を含めた本区を黒潮区とし、周囲とは異なる独特の地理区であるとしている。また、この中央構造線を境界とした三重県伊勢湾地方と熊野地方の間には純淡水魚類相に大きな差があり、熊野地方の純淡水魚類相がきわめて貧弱であることが指摘されている (山下ほか 1997 ; 淀ほか, 2000)。これらのことから、熊野地方は古くから隔離された地域であり、この地方でのみ確認される系統 B-VI は固有性の高い系統であることが示唆される。従って、本研究では、三重県銚子川以南から和歌山県新宮川までの地域を 1 つの ESU (紀伊型) とし、東日本型から分離した。

#### 4-3. ミナミメダカ 高知型 (系統 B-V)

系統 B-V は、土佐湾および豊後水道四国側の周辺で確認される系統である。系統 B-V は、他の東日本型の分布する東海地方以東から地理的に大きく隔離されている。本地域は、紀伊型と同様に、中央構造線によって瀬戸内地域とは隔離されている。またこのような分布は、シマドジョウ種群 *Cobitis biwae* species complex (中島ほか, 2012) でみられており、高知グループ (トサシマドジョウ *Cobitis* sp. BIWAE type D) は、東日本グループ (ヒガシシマドジョウ *Cobitis* sp. BIWAE type C) と近縁である (北川,

2010). 近年では、シマドジョウ種群の中で上記のように標準和名が新しく提唱されるなど、高い固有性を有していることが示されている。従って本研究では、ミナミメダカ内でも遺伝的・地理的な分化がみられていることから、高知地域を東日本型から分離し、系統 B-V を 1 つの ESU (高知型) とした。

#### 4-4. ミナミメダカ 瀬戸内型 (系統 B-VII)

系統 B-VII は、本州の滋賀県琵琶湖-淀川水系から山口県東部安芸灘周辺、および四国地方の紀伊水道地域から伊予灘までの瀬戸内海地域、大分県国東半島南部まで広く分布している。また系統 B-VII は、酒泉 (1990) における東瀬戸内型・西瀬戸内型を含んでいる。一方で、Takehana et al. (2003) では東西の遺伝子構成に差はみられず、瀬戸内地域では、東日本型と同様に代表的なミトタイプが広範囲に分布している。従って、本研究では酒泉 (1990) の東西の瀬戸内型をまとめ、1 つの ESU (瀬戸内型) とした。

#### 4-5. ミナミメダカ 大隅型 (系統 B-VIII)

Takehana et al. (2003) の結果に基づき、宮崎県一ツ瀬川水系以南から大隅半島および馬毛島、種子島に生息する集団を 1 つの ESU (大隅型) とした。Takehana et al. (2003) の系統樹においても、大隅型は単系統性を示しており、酒泉 (1990) の大隅型ともよく一致している。一方、酒泉 (1990) で琉球型とされていた種子島・馬毛島で、大隅

型のマイトタイプのみが検出されている。従って、本研究ではこの2島を大隅型に加えた。

#### 4-6. ミナミメダカ 北部九州型 (系統 B-IX)

Takehana et al. (2003) の結果に基づき、瀬戸内海側の山口県柳井市平生町以西から国東半島北部、日本海側の島根県田万川以西から対馬および佐賀県唐津市までの地域に生息する集団を1つの ESU (北部九州型) とした。山口県および島根県の一部で北部九州型のマイトタイプが検出されていることから、北部九州型は、酒泉 (1990) の西瀬戸内型および山陰型を一部含んでいる。このような分布は、Watanabe (1998) で示された九州北東部と中国・四国地方の魚類相の類似性や一部魚類 (ヤマトシマドジョウ種群 *Cobitis* sp. 'Yamato' species complex ・カワヨシノボリ *Rhinogobius flumineus*) における遺伝的な類似性ともよく一致しており (北川ほか, 2008 ; Shimizu et al., 1993), メダカにおいても同様の分布を示すことは妥当であると考えられる。

#### 4-7. ミナミメダカ 山陰型 (系統 B-X)

Takehana et al. (2003) の結果に基づき、丹後・但馬地域以西から田万川以東の日本海側に生息する集団を山陰型とした。山陰型は、酒泉 (1990) の山陰型と一致している。本地域は、ハイブリッド集団、瀬戸内型、北部九州型と隣接しているが、瀬戸内型とは中国山地で明確に分断されている。一方で、ハイブリッド集団および北部九州

型との境界については、今後明確にしていく必要がある。

#### 4-8. ミナミメダカ 有明型 (系統 B-XI)

Takehana et al. (2003) の結果から、長崎県および五島列島から有明海周辺にかけて生息する集団を1つの ESU (有明型) とした。有明型は、酒泉 (1990) の北部九州型の一部と有明型を含んでいる。一方で、Takehana et al. (2003) では、有明型・薩摩型・琉球型でのマイトタイプ構成に差異がみられなかった。同様のパターンに、向井・杉本 (2006) によって調査されたトビハゼ *Periophthalmus modestus* の遺伝的集団構造解析があげられる。トビハゼの集団構造は、沖縄島で固有のハプロタイプを検出しており、また階層クレード分析においても地理的な分断が示されたことから、他地域との有意な分化を示唆された。しかし、構築されたハプロタイプネットワークでは、沖縄島のグループは他地域のグループに内包された。これをうけて、向井・杉本 (2006) は、地理的隔離の期間が短いものの、遺伝的に独立していることから、沖縄島のグループを1つの保全単位として認識した。本研究においても、アロザイム分析で地域型が分かれていること、地理的な要因として北部九州型とは筑紫山地で、瀬戸内型とは九州山地で、後述の薩摩型とは国見山地で明確に分断されていることから、有明型を1つの ESU として扱った。

#### 4-9. ミナミメダカ 薩摩型 (系統 B-XI)

Takehana et al. (2003) の結果から、国見山地以南の鹿児島県から屋久島にかけて生息する集団を1つのESU（薩摩型）とした。薩摩型は、酒泉（1990）の薩摩型と一致しており、屋久島などの一部琉球型も含んでいる。薩摩型についても、有明型と同様に地理的隔離を考慮して、1つのESUとして扱った。

#### 4-10. ミナミメダカ 琉球型（系統 B-XI）

Takehana et al. (2003) の結果に基づき、奄美大島以南から沖縄島にかけて生息する集団を1つのESU（琉球型）とした。琉球型は、酒泉（1990）の琉球型と一致している。一方で、Takehana et al. (2003) における琉球型は、系統 B-XI、すなわち上記で定義した有明型・薩摩型に含まれている。琉球型を分離した基準については、有明型・薩摩型と同様である。また、琉球列島には、固有種であるリュウキュウアユ *Plecoglossus altivelis ryukyuensis* や、琉球列島在来とされるタウナギ *Monopterus albus* およびフナ *Carassius auratus* など、本土とは異なる地域特異性が示される。これらを考慮し、本研究では奄美大島以南の集団を南部九州型から分離した。

#### 4-11. ミナミメダカ C型（系統 C）

ミナミメダカ C型は関東地方の一部でみられ、その分布域は東日本型に含まれている。C型はミトコンドリア DNA のみに遺伝情報を残す遺存的な系統であり、従来関東地方に生息していた集団の名残であるとされている（竹花，2010）。C型は現在東



日本型による遺伝子浸透をうけたことで、その分布域がかなり不明瞭となっている。また、C型は酒泉（1990）によるアロザイム分析の結果からは、検出されなかった。従って、本研究ではC型をESUの1つである東日本型に含めることが妥当であるとした。しかしながら、C型の存在は、東日本型内で管理単位（MU）を決定していく際に、非常に重要な情報となると考えられる。

### iii. メダカ野生集団の保全にむけた管理単位の設定

#### 1. 管理単位（Management Unit, MU）

Moritz (1994)では、ESUのほかに管理単位（Management Unit）についても述べている。ESUが進化的な背景をもつ集団を重要視する一方で、MUはミトコンドリアまたは核DNAにおけるアليل頻度の差異・分岐を有する集団を重視している。この差異は、アليلにおける系統的な独自性は不要である。従って、進化的な背景を伴う必要がないことから、集団間でみられる遺伝子構成の差異によってMUを設定することが可能である。また、Moritz (1994)によると、ESUは歴史的な集団の構成（clade）に着目し、長期的な集団の保全に活かしていくのに対し、MUは現在の集団の構成（grade）を重視し、短期的な保全・管理の問題に取り組む際に利用できるとしている。

本研究では、前述の内容からメダカ野生集団におけるESUを設定した。しかし、設定したESUの中には、多様な遺伝子型が多く含まれており、この多様性をひとまとめにできるものではない。また、メダカ野生集団の保全に取り組む際、ESUの区分

は広大であり, ESU 内でのより遺伝的な地域性を考慮した詳細な区分が必要となってくる. また, 希少種であるメダカ種群の遺伝的多様性を保全していくためには, すぐに利用可能な短期的な保全のための基準が必要となる. そこで, ここではメダカ野生集団における分子分散分析 (Analysis of Molecular Variance, AMOVA) (Excoffier, et al., 1992) を用いた MU の設定について実際に第 III 章で解明した野生集団の現状から事例を抽出して述べていく.

## 2. ESU 内のメダカ野生集団を対象とした MU の設定

MU は現在の集団の構成を重視して設定する. そこで, 各集団に含まれる遺伝子構成を用いる必要がある. 本研究では, 第 III 章で得られた遺伝解析結果のうち, mtDNA 分析の結果である集団のミトタイプ構成を用いて MU の設定を試みた. MU の設定には, 関西地方 (奈良県・滋賀県・大阪府・京都府・和歌山県・兵庫県) の集団 (13 集団) および関東地方 (茨城県・千葉県・東京都) の集団 (17 集団) を使用した. 集団を選定する際に, 在来の遺伝子型から MU を設定するために, すでに遺伝的攪乱が生じていると判断された集団については除外した. 関西地方では, 集団における攪乱の程度が大きく, 野生集団と考えられる集団が少なかったことから, Takehana et al. (2003) より不足地域を補完する 5 集団を選出し, 解析に加えた. 本研究では,  $F$  統計量 (固定指数) のうち, 分集団間の遺伝的分化の尺度である  $F_{ST}$  を採用した.  $F_{ST}$  は 0 から 1 の値をとり, 0 に近づくほど集団構造がなく, 1 に近づくほど各分集団で異な

る遺伝子型が固定されている，つまり集団構造が存在することを示す．MU を設定するために，まず  $F_{ST}$  を算出し，集団間の遺伝子構成の違いや類似度を判別した後，集団間の類似度から算出した  $F_{ST}$  で有意差がでた集団ごとにグループ分けを行なうことで，メダカ野生集団における MU として設定した．その後 AMOVA を用い，設定した MU の妥当性について検証した． $F_{ST}$  の算出および AMOVA には，解析ソフト Arlequin Ver. 3.52 (Excoffier and Lischer, 2010) を用いた．AMOVA および  $F_{ST}$  の算出における有意差の検定は，それぞれ 10000 回の permutation test を行なった． $F_{ST}$  および AMOVA によって各 ESU 内に設定された MU は，ESU のなかに遺伝的分化を示す集団構造が存在することを示す指標となる．また，1 つの MU に含まれる各集団は，似通った遺伝子構成を有していることになる．従って，メダカ種群の有する遺伝的多様性および各地域集団のもつ遺伝的固有性を保全していくうえで，設定された MU を基準とするのが妥当である．たとえば，地点間の距離が近い 2 集団があったとしても，その地点間に MU の境界が引かれているのであれば，それらは別の MU に属する集団であり，1 つにまとめて保全されるべきではない．

関西地方における  $F_{ST}$  の結果を Table 5 に示した．ミトタイプ構成をもとに，各地点間での固定指数  $F_{ST}$  を計算した結果，関西地方の集団は，大きく 2 つの MU (MU1, MU2 および MU3, Table 6) に分かれた (Fig. 19)．MU1 は奈良県，大阪府の南部から和歌山県の集団を含む．MU1 では，瀬戸内型を代表するミトタイプである B1a によって特徴づけられている．これらの集団に対し，琵琶湖淀川水系の集団は，MU1

に対して有意に分化していた ( $F_{ST}=0.640-1.000$ ). 従って, 琵琶湖・淀川水系の集団を総じて MU2 と設定した. MU2 の集団では, マイトタイプ B22 や B38 といった琵琶湖・淀川水系特有のマイトタイプが多く検出されている. また, MU の妥当性を検証するために, 各集団を MU1 と MU2 にまとめ, MU 間で AMOVA を行なったところ, MU 間での変異が全体の 87.26 % と大部分を占めた (Table 7). MU3 は, MU1 と同様の遺伝子構成であったが, 中間である琵琶湖・淀川水系が独立した MU をもつことから, 地理的な要素を考慮して MU1 と分離した. 従って, 本研究では, 関西地方におけるメダカ野生集団を 3 つの MU に分けることが妥当であると考えられた. 一方で, 八尾市 (No. 9, Fig. 19) の集団は, MU 内で不明瞭な集団となっており, 淡路島や和歌山市との間に有意差が見られなかった. しかし, 八尾市を MU1 に含めた場合, 変異の占める割合が低下したことから, 八尾市の集団を MU1 から除外し, 上記の MU2 へ再編成した. 関西地方においては, 遺伝的攪乱の影響が大きな地域があり, 今回の解析ではそのような地点を除外している. 瀬戸内型には, 徳島県・愛媛県などの四国瀬戸内海側地域や国東半島の一部なども含まれている. 今回は調査範囲から除外したが, 地理的な隔離を含めた同様の解析を実施することで, 瀬戸内型における全体の MU の設定が可能となる. なお, 淡路島については今回徳島県を含めていなかったことから, 今回兵庫県側の MU3 に含めた. この集団については, 全体像を把握した際に属する MU が決定されると推察した. 関西地方については, 境界が曖昧な八尾市や貝塚市の周辺に生息する集団を中心にサンプル数を増加していくことで, より明確な

境界線を作ることが可能になる。また、瀬戸内型に含まれる集団のサンプル数を増加させ、関西地方が含まれる瀬戸内型とのマイトタイプ構成の類似度を調査していくことで、今回設定した3つのMUの位置付けや瀬戸内型全体におけるMU間の境界線を明らかにすることができると考える。

関東地方でも同様の解析を実施し、結果をTable 8に、各集団の採集地点をFig. 20に示した。解析の結果、霞ヶ浦の西側地域 (No. 2, 3) や房総半島の東側地域 (No. 17) で、遺伝子構成が大きく異なる集団がみられた。霞ヶ浦周辺については、第III章で関東地方在来の可能性が高いとされたB1aで構成される集団であり、東日本型の代表的なマイトタイプであるB11を持たないことから、大きくわかれたと推測された。房総半島の集団については、遺存型であるC型で構成される集団であったことが要因であると考えられる。

一方で、関西地方と異なり $F_{ST}$ の値に地域性がみられなかった。また、関東地方においては遺伝的攪乱が進行していることが第III章で明らかとなっており、解析に在来型ではなくヒメダカ型のB1aを含んでいる可能性がある。加えて、B1a自体の在来性についても今後検証の余地が残されている。そのため、本研究では関東地方における詳細なMUの設定は控えた。今後、関東地方におけるB1aの存在が明らかになることで、遺伝的攪乱の詳細な現況が把握できるとともに、MUの設定が可能になると考えられる。また、MUの設定に必要な在来の遺伝子型をもつ集団の地点数を増加させていくことで、関東地方のMUが設定できると考える。

本研究では、事例として関西地方および関東地方の野生集団を対象とした MU の設定を行なった。この手法については、他地域の野生集団にも同様に適用でき、各地域で設定を行なっていくことで、メダカ野生集団における遺伝的多様性保全の区分を明確にすることができる。本研究では現在得られている情報から MU を設定していることから、限られた地点数や個体数から保全単位の設定を行なっている。今後、解析地点数や領域数が増加していくことで、より詳細な MU の設定が可能になると予想される。

#### iv. MU 内のメダカ野生集団の保全の優先度の決定

本章では、メダカ野生集団における 2 種類の保全単位 (ESU・MU) の設定について言及した。これらの保全単位は、メダカ野生集団の有する遺伝的多様性を保全していくうえで、重要な指標になると考えられる。特に MU は、野生メダカの現状を把握し、集団の保全を行なっていくために重要である。しかし、第 III 章でも述べたように、現在メダカ野生集団ではヒメダカ等の人為的な放流による遺伝的攪乱が生じていることから、今後各地で移入された遺伝子型が多く確認されると予想される。メダカ野生集団の保全は、基本的には MU 内の生息地ごとに維持し、保全されることが望ましい。しかしながら、MU 内に含まれるすべての集団を生息地単位で保全していくには多大な労力が必要である。また、活動を展開している主体の規模によっては、すべての集団を保全していくことが困難な場合も起こりえる。

Bottrill et al. (2008) は、保全の優先度 (Conservation triage) を提唱し、限られた資源・努力量のなかで保全目標にむけて最大限の成果を達成するために、生物資源の優先度を決定していくことであると述べた。また、優先度の決定による現況や目標の具体化は、効果的な保全対策に結びつくと考えられる。この手法は、希少種であるシナイモツゴ *Pseudorasbora pumila pumila* の保全にも適用されている (小西, 2010)。シナイモツゴについて、集団数が少ないような地域は、保全の重要性は明確であるとしている。一方で、大規模な生息地については、保全主体の負担を考慮して、池の管理状況や外来種の有無、遺伝的多様性などを判断基準として優先度を決定し、主体の意見を取り入れていくことで明確な目標を示していくことができると述べている。この手法は、各地域の遺伝的な多様性が把握されており、遺伝解析により集団のもつ在来性・非在来性の判断が可能なメダカ種群にも適用できると考えられる。そこで本研究では、保全の優先度 (Conservation triage) をメダカ野生集団にあてはめることで、MU内のメダカ野生集団をより効率的に保全していくための手法について述べていく。

本研究では、メダカ野生集団における保全の優先度を決定していくために、第1に野生集団であるかどうかを重視した (Fig. 21)。ヒメダカ等による遺伝的攪乱をうけた集団は、その程度にかかわらず野生集団の要素が薄くなる。そのため、野生集団であると判断されたものを優先度高 (High Triage) とし、攪乱をうけているものを優先度低 (Low Triage) とした。たとえば、MUを設定した関西地方では、設定に使用した野生集団以外に、すでに遺伝的攪乱をうけた集団が多く存在している。従って、

MU の設定に使用した野生集団の優先度は高くなり、他の攪乱をうけている集団は優先度を低くすることで、MU 内でのおよその優先度を決定できる。

次に、優先度の低い集団では、さらに各集団における遺伝的攪乱の進行程度から、順位付けをしていく。遺伝的攪乱の程度が大きい集団（10 個体中 8 個体でヒメダカ型遺伝子が検出）と攪乱の程度が低い集団（10 個体中 1 個体でヒメダカ型遺伝子が検出）であれば、程度が低い集団の優先度をあげるべきである。

優先度を設定した集団には、①生息地の現況（外来種の有無など）、②生息地周辺の環境（交通アクセス）、③生息地の希少性、④生息地の重要度（周辺の生息地の有無、社会的なニーズなど）の要素を考慮していくことで、優先度が同様とされた集団などの順位わけをしていく。これらの要素による順位わけは、優先度低の集団だけでなく、優先度高とされた集団にも適用できると考えられる。

各 MU において、優先度のもっとも高い集団は、属する MU 内の固有性をもっともよく反映していると考えられる。たとえば関西地方の例であれば、MU1-3 の各 MU 内で、優先度のもっとも高い 3 つの集団があてはまる。この 3 集団を優先的に保全していくことで、関西地方における遺伝的固有性の維持が可能になる。また、遺伝的攪乱を受けた集団のみで構成される MU についても同様であり、固有性をもっとも残されている集団にこの優先度が当てはめられる。

関西地方の MU を事例とすると、野生集団を保全するうえで、およそ 3 集団を保全できる努力量があるとする。関西地方の遺伝的多様性および固有性を保全するために



は、各 MU の遺伝的多様性の保全がもっとも望ましいことである。その場合、たとえば MU1 に純粋な野生集団が多数残されており、MU2 や MU3 で攪乱された集団しか確認されなかったとしても、その努力量は MU1 に集中させず、各 MU のもっとも優先度が高い集団に分配されるべきである。仮に MU1 に努力量を集中してしまった場合、MU1 の固有性は保全されるが、MU2 および MU3 については、固有性の喪失につながる可能性が高い。最終的に各 MU 内に存在するメダカ野生集団の保全の優先度を決定していくことで、より効率的な野生集団の保全が展開できると考えられる。

#### v. メダカ種群を事例とした魚類における遺伝的多様性の保全

現在、日本産の淡水魚類では、多くの種で遺伝的攪乱が確認されている。この“みえない脅威”と呼ばれる遺伝的攪乱は、集団の遺伝子構成を人為的に変化させ、野生集団のもつ遺伝的多様性を喪失させてしまう現象であると考えられている。しかし、これまでの報告では遺伝的攪乱に対する具体的な対処や、在来遺伝子型の保全にむけた提言はなされていなかった。

本研究によって得られた成果から、メダカ種群を事例として淡水魚類における遺伝的攪乱の発生メカニズムから全国における現状の把握手法など、幅広い知見が蓄積された。また、野生集団において生じた遺伝的攪乱に対応し、集団のもつ遺伝的多様性を保全していくための手法として、メダカ種群における ESU および MU の設定を行った。さらに、MU に含まれる集団のもつ遺伝的多様性を最大限保全していくため

の手法として、MU 内での保全の優先度を設定に関する手法を述べた。関東地方のように、遺伝的攪乱が大規模に進行している地域や、在来・非在来の判断ができない遺伝子型が検出される地域などの取り扱いといった課題はあるが、今後解析領域や地点数を増加させていくことで解明でき、その成果から詳細な MU の設定が可能になると考えられる。

現在、近畿大学農学部環境管理学科の 1 研究室である水圏生態学研究室では、魚類の保全活動を展開している団体等から野生メダカの遺伝解析を依頼される機会が増えてきている。今までの依頼では、解析依頼をうけた集団単位で結果を出し、取り扱いについて議論を行なってきた。従って、地点ごとの評価や依頼者単位での評価にとどまっていた。しかし、本研究の成果から上記のような集団全体に対する判断基準が確立されたことで、今後同様の解析依頼を受けた際に集団がどの ESU・MU に属しているかを提示することができる。加えて、MU 内での集団の取り扱いについて、本研究で用いた優先度という指標に基づいていくことで、より明確な提案が可能となる。また、MU 内に複数の主体が存在する場合、互いにコンタクトを取りあい集団の優先度を決定したうえで、連携して保全活動を展開するといった提案も行なうことができる。

本研究では、全国のメダカ種群を事例として遺伝的攪乱の実態解明や、遺伝的多様性の保全にむけた提案を行なってきた。これらの内容は、遺伝的攪乱の課題を抱えている他魚種にも適用できるものである。今後、本研究で得られた成果を知見として、

他魚種へと転用していくことで、魚類における遺伝的多様性の保全にむけた研究の一助となることが期待される。

## VI. Summary

Genetic disturbance, mainly caused by artificial animal introductions, has caused serious problems on loss of genetic diversity of wildlife populations, and is especially serious in freshwater fishes that have higher level of genetic differentiations among local populations.

The medaka (*Oryzias latipes* species complex) is a small freshwater fish inhabiting marshes, ponds, and irrigation canals of rice paddies in eastern Asia, including the Japanese Archipelago. In Japan, 2 distinct species of medaka, Kitano-medaka (*O. sakaizumii*) and Minami-medaka (*O. latipes*) are recognized. Recently, wild populations of medaka in Japan have been rapidly decreasing because of some environmental pressures, and listed as “Vulnerable”. On the other hand, the orange-red body color variety called “himedaka” is the most popular and easily available in markets. It has been considered that himedaka artificially released in natural environment might cause genetic disturbance to wild medaka populations.

In this study, in order to understand mechanism, current status and impact of genetic disturbance caused by himedaka in wild medaka populations, the ecological and genetic analyses were conducted, and the conservation strategy for genetic diversity of wild medaka populations was suggested.

### **1. Ecological experiments to clarify mechanism of genetic disturbance in medaka**

To examine whether survival, reproduction and species recognition would be influenced by

this difference in body coloration of himedaka, we conducted 3 laboratory experiments (predation pressure, mate choice and schooling) using wild-type medaka and himedaka. The results indicated that himedaka received higher predation pressure but were able to easily mate with wild-type medaka.

## **2. Current status of genetic disturbance caused by himedaka in Japan**

In order to reveal the current status of genetic disturbance in the whole of Japan, genetic analyses using 2 kinds of DNA marker (*cytb* gene and *b*-marker) were conducted for 104 wild medaka populations. The results revealed that himedaka genotypes were detected from all introgressed populations that would be 34.6 % (36 populations) of wild medaka populations. These results indicate that genetic introgression was primarily caused by artificial introduction of himedaka. On the other hand, the native populations remaining original genetic compositions of each locality that can be significant conservation targets were existed throughout Japan.

## **3. Genetic analysis of wild medaka population within a single river**

To estimate the spreading ability of himedaka genotypes, wild medaka populations in Nogawa River, Tokyo Prefecture, were analyzed by using *cytb* gene and *b*-marker analysis. Himedaka genotypes were highly found in all sampling sites throughout the river. This intimated the high dispersal ability of himedaka gene and the high risk of genetic disturbance within a single river.

#### **4. Conservation of genetic diversities of medaka species complex**

In this study, the primary cause of genetic introgression was concluded as the artificial introduction of himedaka into the wild. If the escape and spreading of himedaka into the wild is prevented, the expansion of genetic introgression in wild populations could be reduced considerably. Therefore, people who use himedaka need to be aware of the impacts and risks of genetic introgression by himedaka

To effectively conserve genetic diversities of medaka species complex that is remaining throughout Japan, conservation unit consisting of evolutionary significant unit (ESU) and management unit (MU) in wild populations of medaka were suggested. It was also suggested that the conservation triage among and within the conservation units should be determined by environmental condition of each habitat (existence of alien species, current status of population, and demand in local society) to maximize conservation goals under constrained resources.

This study using medaka species complex can be a model case and be also applied for conservation of genetic diversity in other fish species.

## VIII. 引用文献

- Aida, T. 1921. On the inheritance of a color in a fresh water fish, *Aplocheilus latipes* Temmink and Schlegel, with special reference to sex-linked inheritance. *Genetics* 6: 554–573.
- Allendorf F. W., Luikart G., Aitken S. N. (2013) Conservation and the genetics of populations. 602pp. Wiley-Blackwell Publication
- 青柳兵司. 1957. 日本列島淡水魚総説. pp251–272. 大修館書店, 東京.
- 有元貴文. 2007. 魚はなぜ群れで泳ぐのか. 232pp. 大修館書店, 東京.
- Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh and T. Nakayama. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Sci.*, 62: 727–730.
- Asai, T, H. Senou and K. Hosoya. 2011. *Oryzias sakaizumii*, a new ricefish from northern Japan (Teleostei: Adrianichthyidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 22: 289–299.
- Bottrill, M. C., L. N. Joseph, J. Carwardine, M. Bode, C. Cook, E. T. Game, H. Grantham, S. Kark, S. Linke, E. McDonald-Madden, R. L. Pressey, S. Walker, K. A. Wilson and H. P. Possingham. 2008. Is conservation triage just smart decision making? *TREE*, 23: 649–654.
- 江上信雄. 1989. メダカに学ぶ生物学. pp210–212. 中央公論社, 東京.
- 江上信雄・酒泉 満. 1981. メダカの系統について. *系統生物*, 6: 2–13.

- Endler, J.A. 1980. Natural selection on color patterns in *Poecilia reticulata*. *Evolution*, 34: 76–91.
- Excoffier, L. and H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analysis under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resources*, 10: 564–567.
- Excoffier, L., P. E. Smouse and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479–491.
- Frankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. 617pp. Cambridge Univ. Press, Cambridge. (西田 睦 (監訳). 高橋 洋・山崎裕治・渡辺勝敏 (訳). 2007. 保全遺伝学入門. 751pp. 文一総合出版, 東京)
- Fukamachi, S., M. Kinoshita, K. Aizawa, S. Oda, A. Meyer and H. Mitani. 2009. Dual control by a single gene of secondary sexual characters and mating preferences in medaka. *BMC Biol.*, 7: 64.
- Fukamachi, S., M. Kinoshita, T. Tsujimura, A. Shimada, S. Oda, A. Shima, A. Meyer, S. Kawamura and H. Mitani. 2008. Rescue from oculocutaneous albinism type 4 using medaka *slc45a2* cDNA driven by its own promoter. *Genet.*, 178: 761–769.
- Fukamachi, S., A. Shimada and A. Shima. 2001. Mutations in the gene encoding *B*, a novel transporter protein, reduce melanin content in medaka. *Nat. Genet.*, 28: 381–385.



早川洋一・瀧田真平・菊池一也・吉田彩夏・小林牧人. 2012. メダカ *Oryzias latipes*

の産卵行動における嗅覚の関与. 魚類学雑誌, 59: 111–124.

堀川まりな・中島 淳・向井貴彦. 2007. 九州北部のゼゼラにおける在来および非在

来ミトコンドリア DNA ハプロタイプの分布. 魚類学雑誌, 54: 149–159.

橋口康之・西田 睦. 2007. 魚類における嗅覚系の適応および進化の分子機構：嗅覚

受容体遺伝子ファミリーに着目して. 魚類学雑誌, 54: 105–120.

早川洋一・瀧田真平・菊池一也・吉田彩夏・小林牧人. 2012. メダカ *Oryzias latipes*

の産卵行動における嗅覚の関与. 魚類学雑誌, 59: 111–124.

Ihaka, R. and R. Gentleman. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *J. Comput.*

*Graphic Statist.*, 5: 299–314.

岩松鷹司・森 隆. 1994. 生物教材としての野生メダカとヒメダカの体色遺伝の研究.

愛知教育大学教育センター研究報告, 18: 199–210.

北川えみ・中島 淳・星野和夫・北川忠生. 2008. 九州北東部におけるシマドジョウ

属魚類の分布パターンとその形成過程に関する考察. 魚類学雑誌, 56: 7–19.

北川忠生. 2010. 第6章温帯性淡水魚類の成立—シマドジョウ類を中心として. 渡辺

勝敏・高橋 洋 (編著), 87–103. 淡水魚類地理の自然史—多様性と分化をめぐっ

て. 北海道大学出版会, 札幌.

北川忠生. 2013. 大和川水系で認められたヒメダカによる遺伝的攪乱. 日本魚類学会

自然保護委員会 (編), 101–117. 見えない脅威 “国内外来魚” どう守る地域の生物

多様性. 東海大学出版会, 秦野.

小林牧人・頼経知尚・鈴木翔平・清水彩美・小井土美香・川口優太郎・早川洋一・江

口さやか・横田弘文・山本義和. 2012. 野外池における野生メダカ *Oryzias latipes*  
の繁殖行動. 日本水産学会誌, 78: 922–933.

児玉伊智郎. 2006. 放流されたヒメダカによる野生メダカの遺伝子汚染に関する生態  
学的研究. TaKaRa ハーモニストファンド研究助成報告, 21: 33–47.

小西 繭. 2010. シナイモツゴ: 希少になった雑魚をまもる. 魚類学雑誌, 57: 80–83.

古屋康則・恩地理恵. 2002. メダカの交接・産卵行動の観察法. 岐阜大学教育学部研  
究報告 自然科学, 26: 19–22.

小山直人・北川忠生. 2009. 奈良県大和川水系のメダカ集団から確認されたヒメダカ  
由来のミトコンドリア DNA. 魚類学雑誌, 56: 153–157.

小山直人・森 幹大・中井宏施・北川忠生. 2011. 市販されているヒメダカのミトコ  
ンドリア DNA 遺伝子構成. 魚類学雑誌, 58: 81–86.

環境省. 2013. 第4次レッドリストの公表について (汽水・淡水魚類) (お知らせ):

<http://www.env.go.jp/press/16264.html> (参照 2015-11-10).

Milinski, M. and T. C. M. Bakker. 1990. Female sticklebacks use male coloration in mate  
choice and hence avoid parasitized males. *Nature*, 344: 330–333.

文部科学省. 2008. 小学校学習指導要領解説 理科編. 東京, 86pp.

Moritz C. 1994. Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *TREE*, 10:

373–375.

向井貴彦・杉本真奈美. 2006. 日本産トビハゼのミトコンドリア DNA 多型に基づく

遺伝的集団構造の解析. 魚類学雑誌, 53: 151–158.

中井宏施・中尾遼平・深町昌司・小山直人・北川忠生. 2011. ヒメダカ体色原因遺伝

子マーカーによる奈良県大和川水系のメダカ集団の解析. 魚類学雑誌, 58: 189–193.

中島 淳. 2012. 日本産シマドジョウ属魚類の標準和名の提唱. 魚類学雑誌, 59: 86–95.

Nakao, R. and T. Kitagawa. 2015. Differences in the behavior and ecology of wild medaka

(*Oryzias latipes* complex) and an orange commercial variety (himedaka). J. Exp. Zool.,

323A: 349–358.

西村三郎. 1980. 日本海の成立—生物地理学からのアプローチ (改訂版). 230pp. 築

地書店, 東京.

Partridge, B. L. 1982. Structure and function of fish schools. Sci. Am., 246: 114–123.

酒泉 満. 1990. 遺伝学的にみたメダカの種と種内変異. 江上信雄・山上健次郎・嶋

昭紘 (編), 143–161. メダカの生物学, 東京大学出版会, 東京.

Sakaizumi, M., K. Moriwaki and N. Egami. 1983. Allozymic variation and regional

differentiation in wild populations of the fish *Oryzias latipes*. Copeia, 1983: 311–318.

佐原雄二・細見正明. 2003. 現代日本生物誌 10 メダカとヨシ. 192pp. 岩波書店, 東

京.

Seehausen, O. and J. J. M. Alphen. 1998. The effect of male coloration on female mate

choice in closely related Lake Victoria cichlids (*Haplochromis nyererei* complex). *Behav.*

*Ecol. Sociobiol.*, 42: 1–8.

瀬能 宏. 2000. 今, 小田原のメダカが危ないー善意?の放流と遺伝子汚染. *自然科学のとびら*, 6: 14.

瀬能 宏. 2013. 善意の放流が悪行に! ?ー神奈川県大井町における外来メダカの駆除事例. *日本魚類学会自然保護委員会 (編)*, 197–199. 見えない脅威 “国内外来魚” どう守る地域の生物多様性. 東海大学出版会, 秦野.

清水孝昭・高木基裕. 2010. ミトコンドリア DNA による愛媛県を中心としたドジョウの遺伝的集団構造と攪乱. *魚類学雑誌*, 57: 13–26.

Shimizu, T., N. Taniguchi and N. Mizuno. 1993. An Electrophoretic study of genetic differentiation of a Japanese freshwater goby, *Rhinogobius flumineus*. *魚類学雑誌*, 34: 329–343.

Sorensen, P., T. Hara, N. E. Stacey and F. W. M. Goetz. 1988. F-prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. *Bio. Reprod.*, 39: 1039–1050.

竹花佑介. 2010. 第7章メダカの高精度系統地理マップをつくる. 渡辺勝敏・高橋 洋 (編著), 105–122. *淡水魚類地理の自然史ー多様性と分化をめぐって*. 北海道大学出版会, 札幌.

竹花佑介・北川忠生. 2010. メダカ: 人為的な放流による遺伝的攪乱. *魚類学雑誌*,

57: 76–79.

Takehana, Y., N. Nagai, M. Matsuda, K. Tsuchiya and M. Sakaizumi. 2003. Geographic variation and diversity of the cytochrome *b* gene in Japanese wild populations of medaka, *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.*, 20: 1279–1291.

東京都建設局. 2015. 東京の川にすむ生きもの～河川水辺の国勢調査結果より～. 魚類. [http://www.kensetsu.metro.tokyo.jp/ikimono2/shousai.html#shousai\\_gyosui](http://www.kensetsu.metro.tokyo.jp/ikimono2/shousai.html#shousai_gyosui) (参照, 2015-11-10) .

内山りゅう. 2015. しぜんのひみつ写真館3 ぜんぶわかる! メダカ. 酒泉 満 (監), 68pp. ポプラ社, 東京.

梅村啓太郎・二村 凌・高木雅紀・池谷幸樹・向井貴彦. 2012. 岐阜県産シロヒレタビラにおける外来ミトコンドリア DNA の分布. *生物地理学会会報*, 67: 169–174.

魚野 隆・濱口昂雄・久米幸毅・細谷和海. 2011. 京都府由良川水系産メダカ南北集団の群れ行動の比較. *水環境学会誌*, 34:109–114.

Watanabe K. 1998. Parsimony analysis of the distribution pattern of Japanese primary freshwater fishes, and its application to the distribution of the bagrid catfishes. *Ichthyol. Res.*, 45: 259–270.

山家秀信. 2009. サケ科魚類における性フェロモンに関する研究. *日本水産学会誌*, 75: 648–651.

Yamamoto, T. 1975. *Medaka (killfish). Biology and Strains*. Keigaku-sha, Tokyo.

山下剛司・淀 大我・岡田 誠・廣瀬 充・木村清志. 1997. 三重県熊野地方の河川  
魚類相. 魚類学雑誌, 44: 107-111.

淀 大我・山下剛司・佐土哲也・武村 泉・木村清志. 2000. 三重県伊勢地方の河川  
魚類相. 魚類学雑誌, 48: 27-40.

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およびヒメダカ遺伝子の移入実態. 地域自然史と保全, 36:  
53-58.

## VII. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜った本学農学部環境管理学科水圏生態学研究室の北川忠生准教授, 細谷和海教授, 久保喜計准教授, 早坂太亮講師に深謝する。

また, 本学農学部の坂上吉一教授および池上甲一教授からは, 多忙の中本稿をご校閲いただき, 多くの有益なご助力を賜った。ここに記し, 厚く御礼申し上げる。国際基督教大学教養学部の小林牧人教授, いわき明星大学の岩田恵理教授, 九州大学の鹿野雄一准教授, 宮城教育大学の棟方有宗准教授, 霞ヶ浦環境科学センターの福井正人氏, 一般財団法人地球・人間環境フォーラムの萩原富司氏, 千葉県在住の依田彦太郎氏には, 研究材料となる供試魚の収集に多大な協力をいただいた。本学水圏生態学研究室の卒業生である小山直人氏からは, 本研究に対する多くの助言をいただいた。さらに, 入口友香氏, 宮本昌子氏, 浦野幸奈氏をはじめとする本学水圏生態学研究室の院生・卒業生・在校生諸氏からは実験補助や飼育管理に際して多大なご協力をいただいた。両親には終始研究活動に対する厚いご支援をいただいた。以上の方々に謝意を表する。

## 图 表



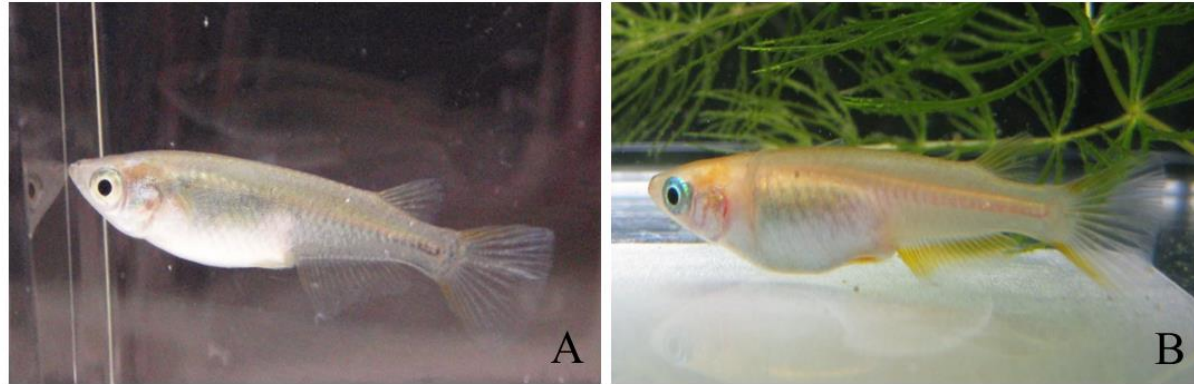


Fig. 1 Photograph of two varieties of medaka *Oryzias latipes*. Individuals with black coloration are the wild type cultured medaka, and orange-red individuals are the commercial variety called “himedaka”.

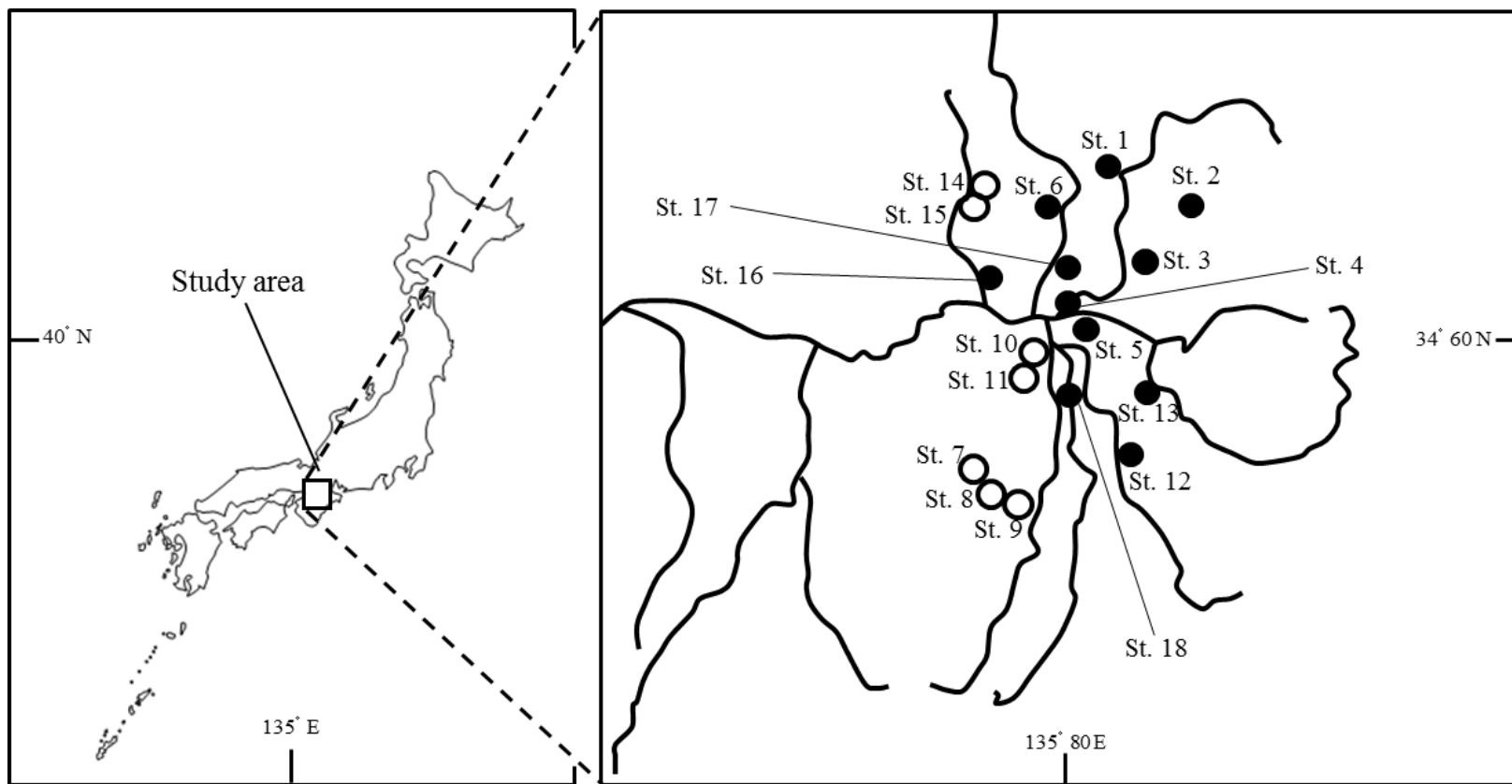


Fig. 2 Field survey sites used to select a representative predator of medaka *O. latipes* in Yamato river system in Nara Prefecture. Solid circles indicate the sites where medaka were observed. Open circles indicate the sites where medaka were not captured.

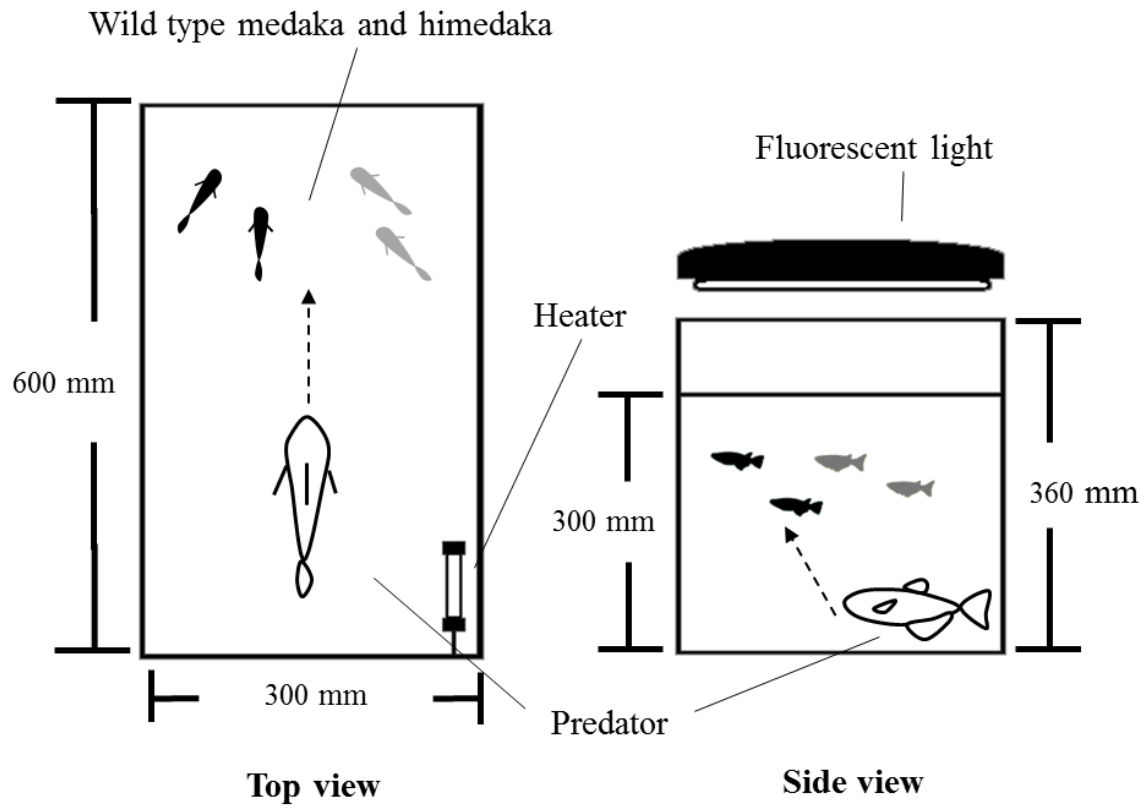


Fig. 3 The apparatus for the predatory pressure experiment in which a predator's preference for medaka coloration was tested. Black and gray fish indicate wild type medaka and himedaka, respectively. Large fish represent the predator, dark chub *Candidia temminckii*.

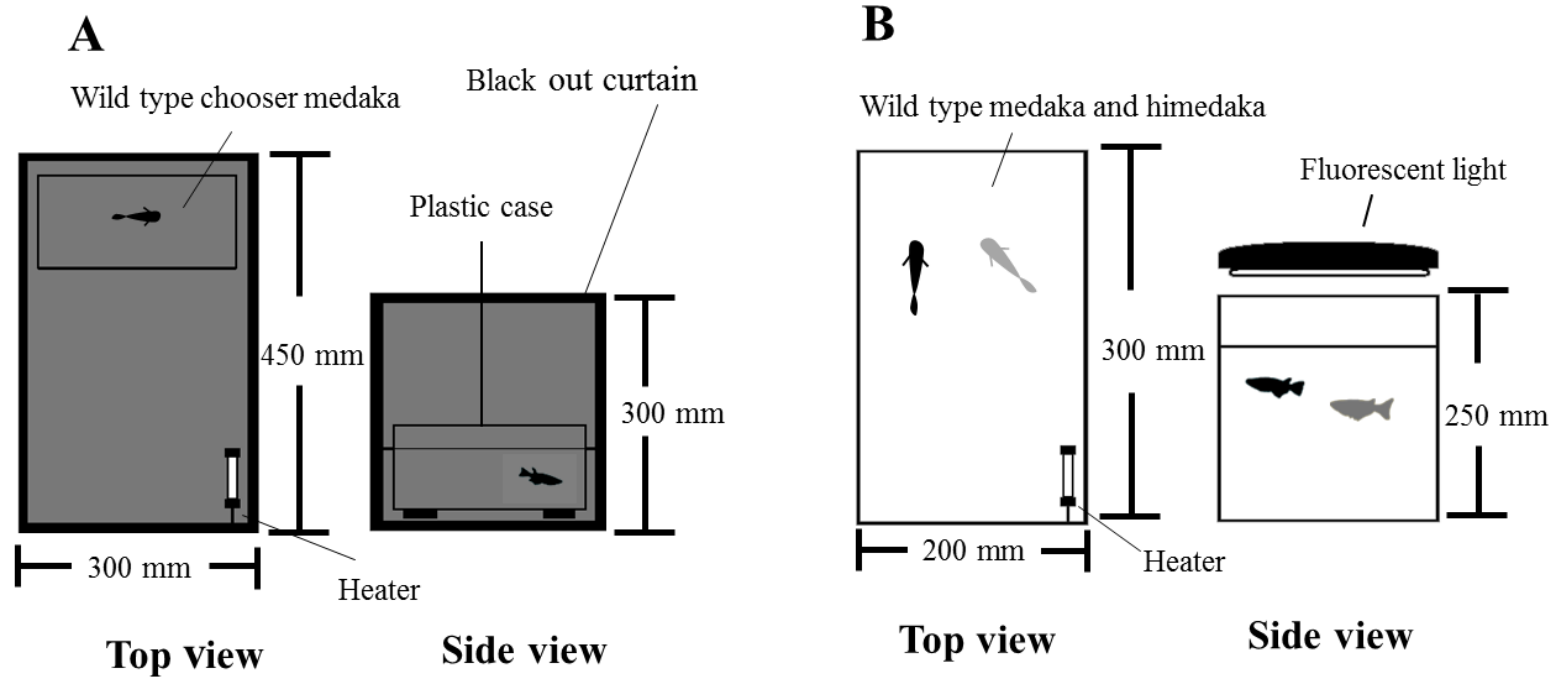


Fig. 4 The experimental apparatus for the mate choice experiment. (A) The tank for the chooser that was maintained in the dark condition. (B) The experiment tank that was maintained at a daily 14: 10 h light/dark cycle condition. One day before a trial, a chooser male (wild type medaka) was transferred into a plastic case inside an aquarium (A).

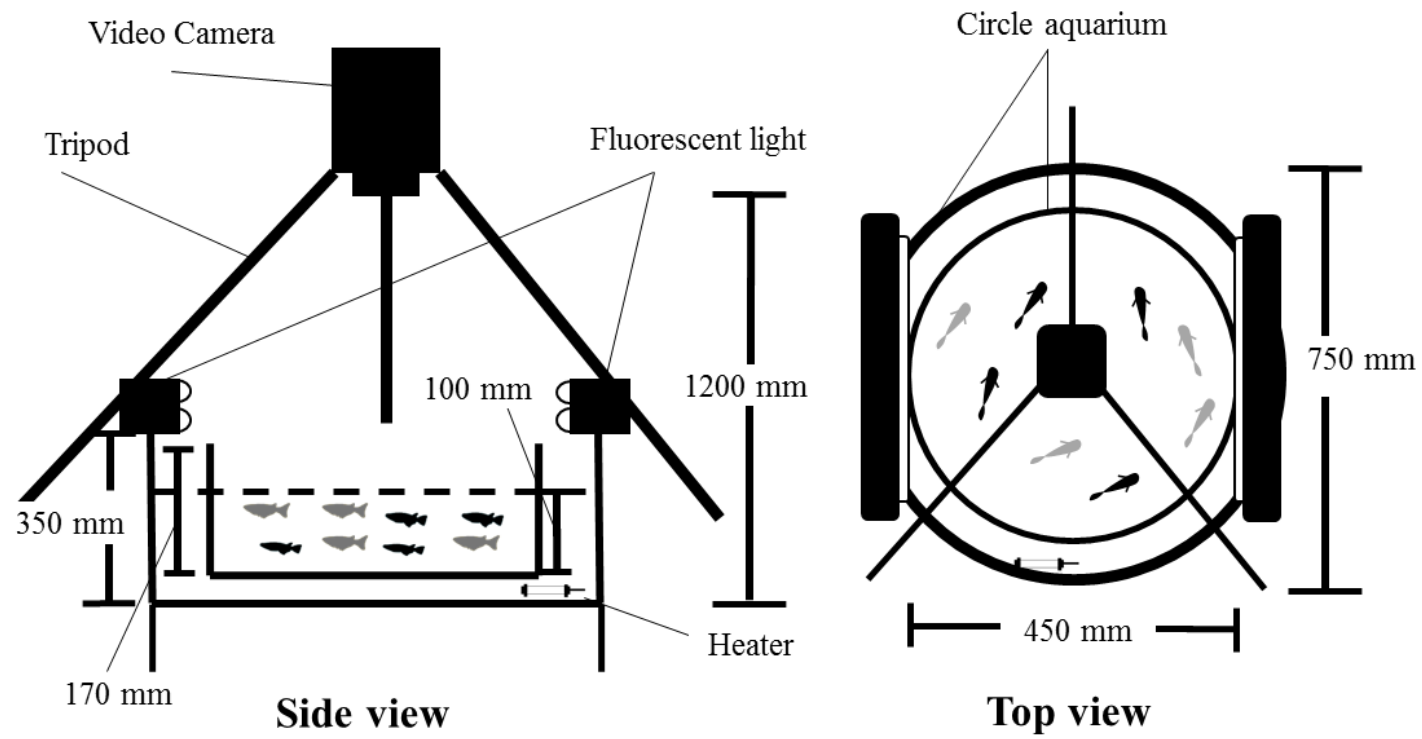


Fig. 5 The experimental apparatus used to examine schooling behavior of medaka. Black and gray fish represent wild type medaka and himedaka, respectively.

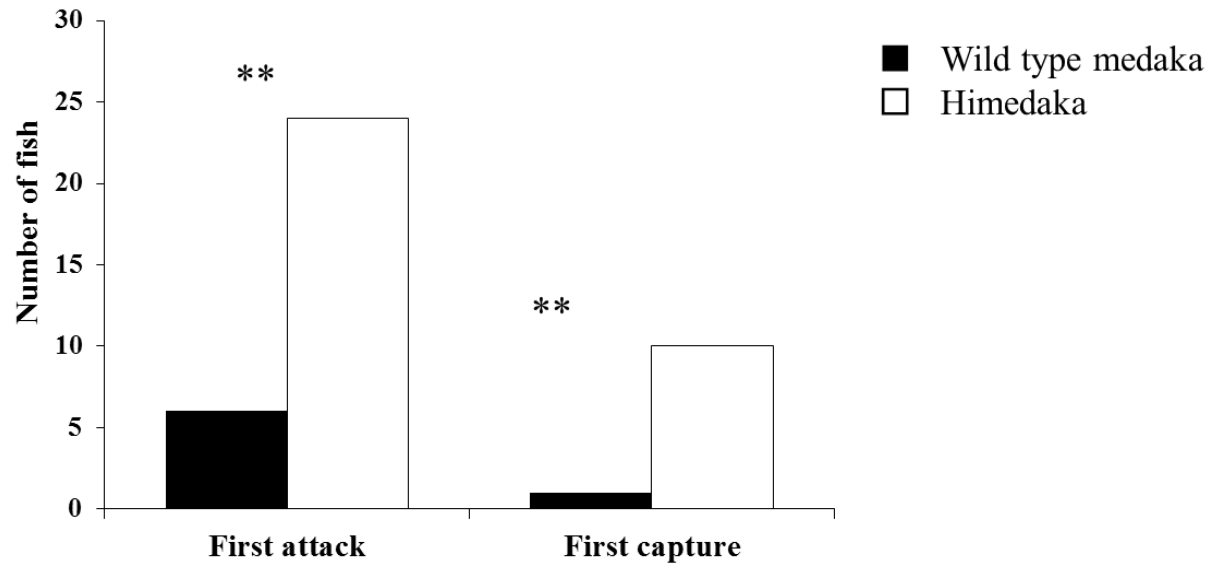


Fig. 6 Columns show the predation pressure of wild medaka and himedaka in the predatory pressure experiment. Solid and open columns show the number of wild type medaka and himedaka individuals. First capture indicates fish that were successfully predated upon by the first attack of the predator. Asterisks indicate statistically significant differences between the wild type and himedaka ( $\chi^2 = 10.8, P < 0.01$ )

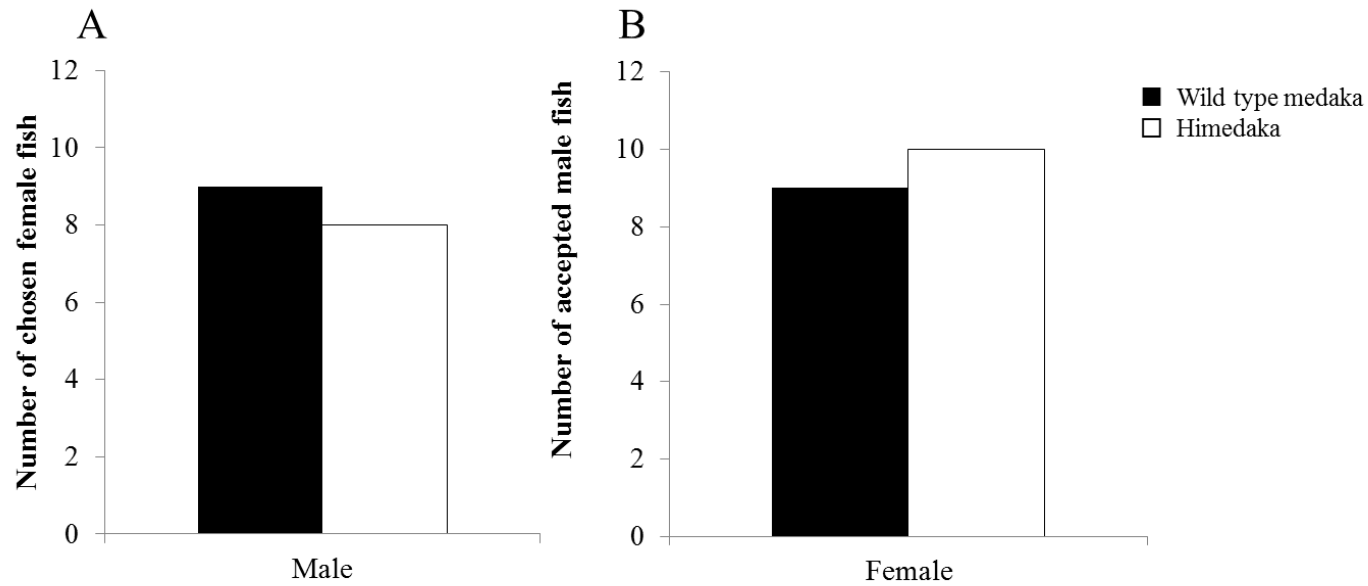


Fig. 7 Columns show the result of the mate choice experiment. Solid and open columns show the number of individuals of wild type and himedaka, respectively. (A) The result of male mate choice experiment. (B) The result of female mate choice experiment. In both experiments, there were no statistically significant differences between wild type medaka and himedaka ( $\chi^2 = 0.053, P > 0.05$ ).

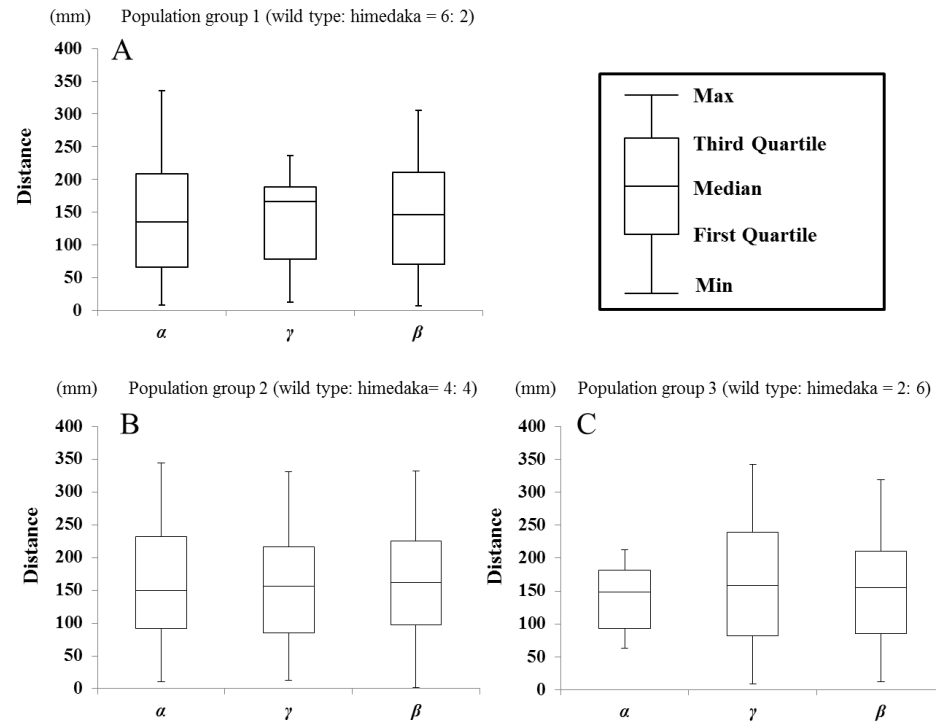


Fig. 8 Box plots show the distances between fish of the three groups in schooling behavior experiment, which determined differences in schooling behavior between wild type medaka and himedaka. Each box plot indicates the dispersion of three association categories based on pair type:  $\alpha$  (between two wild type medaka),  $\beta$  (between wild type medaka and himedaka),  $\gamma$  (between two himedaka). There were no statistically significant differences among box plots (Steel-Dwass multiple test,  $P > 0.05$ ).



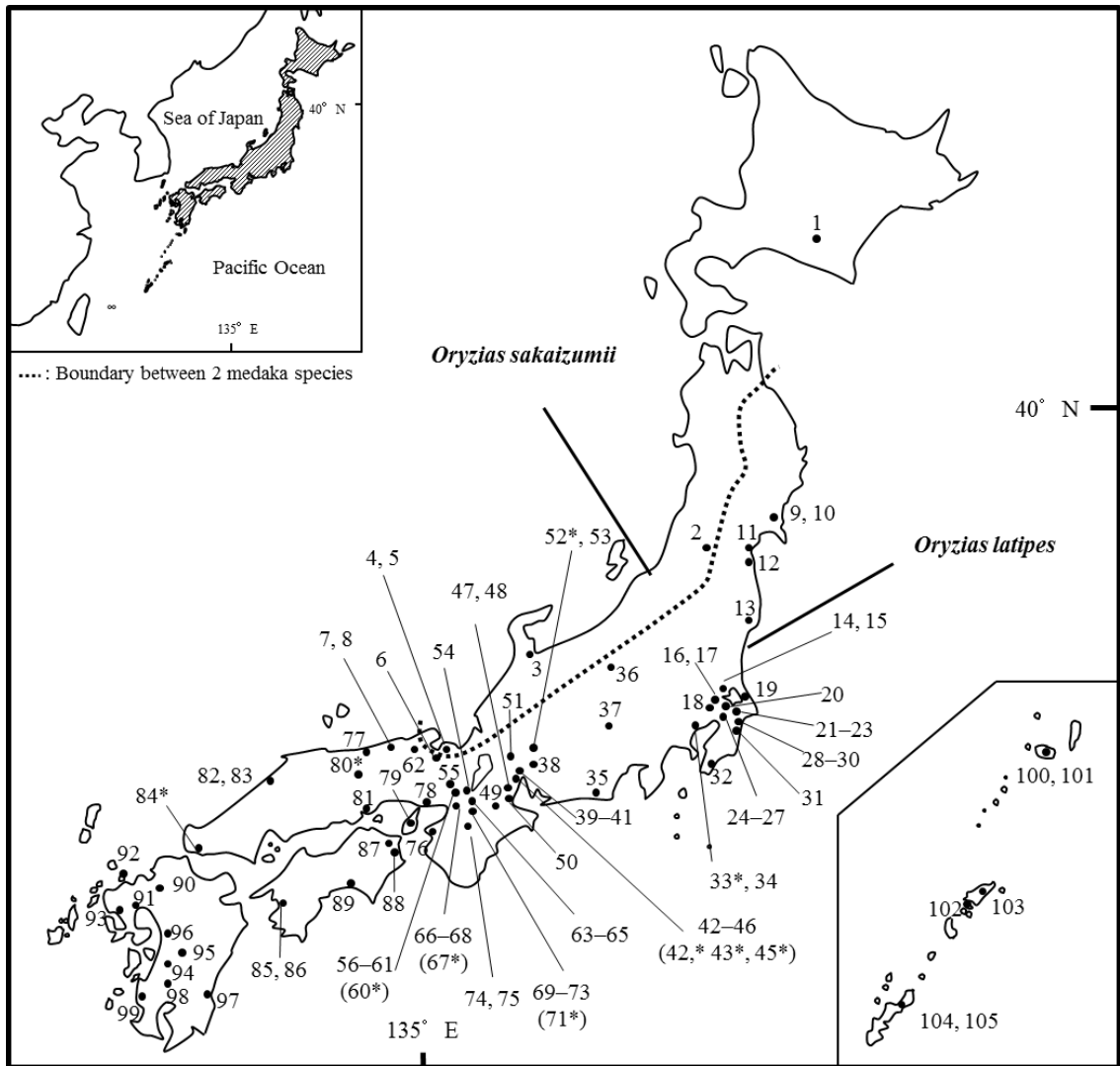


Fig. 9 Collection sites of wild medaka (*Oryzias latipes* species complex). Broken lines indicate the geographic boundary between the two medaka species. Details of each station are shown in Table 1. Asterisks correspond to collection sites of himedaka.

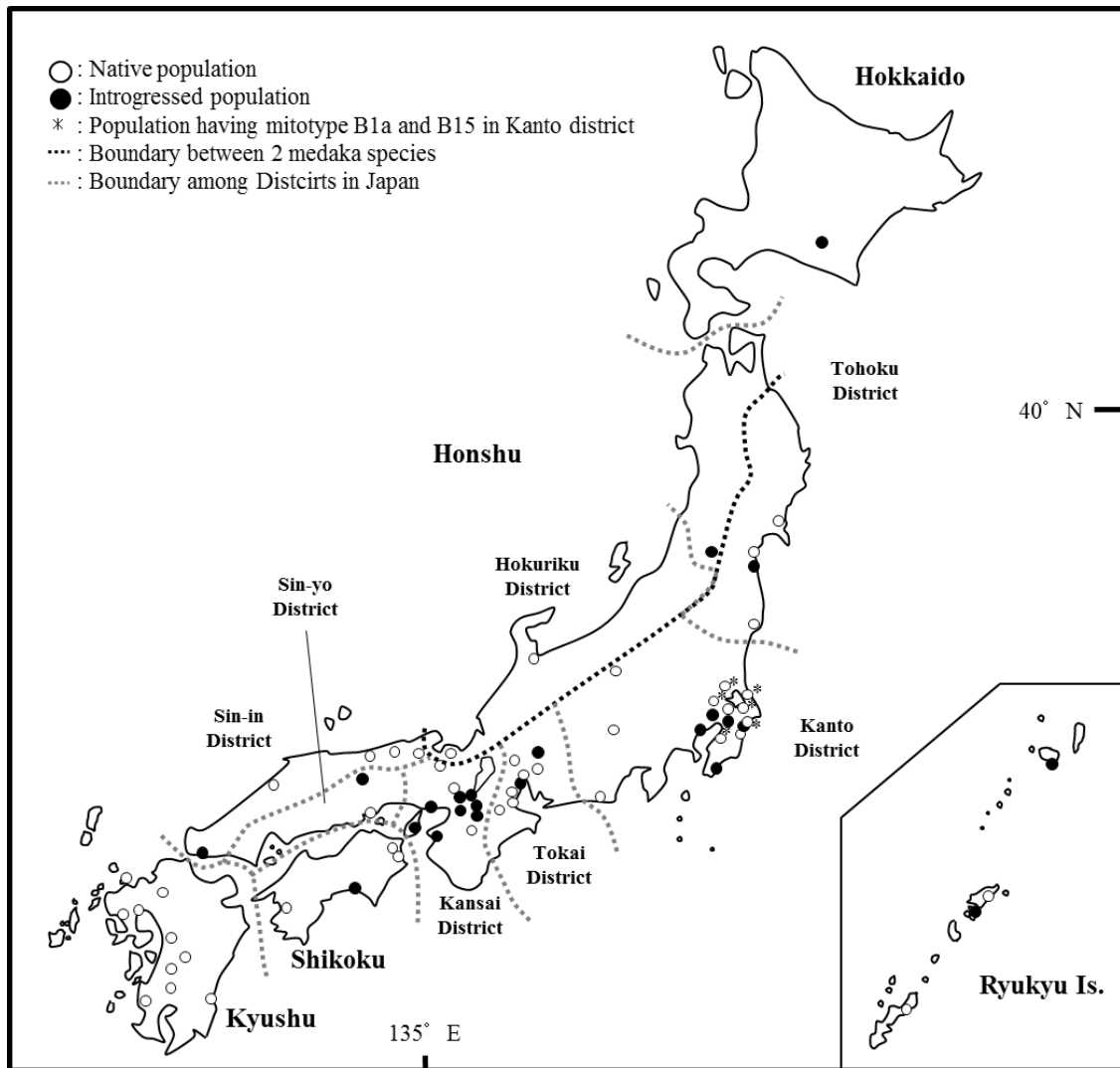


Fig. 10 Geographic distribution of native and introgressed populations of medaka (*Oryzias latipes* species complex). Open circles indicate native populations where only the *B* allele and native mitotypes were found. Solid circles indicate introgressed populations where the *b* allele, himedaka mitotypes, or both were found. Asterisks represent populations where the mitotypes B15 or B1a were found without other himedaka genotypes (*b* allele and mitotype B27) in Kanto District.

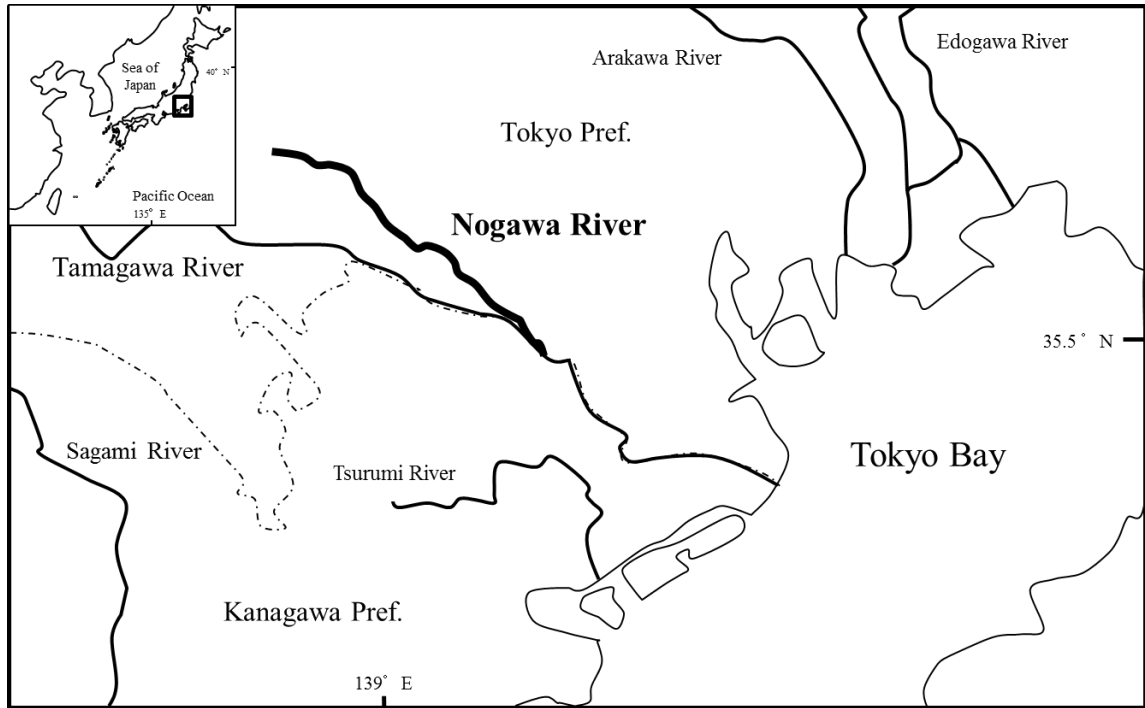


Fig. 11 The location of Nogawa River, Tokyo Prefecture. The Broken line indicates the boundary between Tokyo and Kanagawa Prefecture.

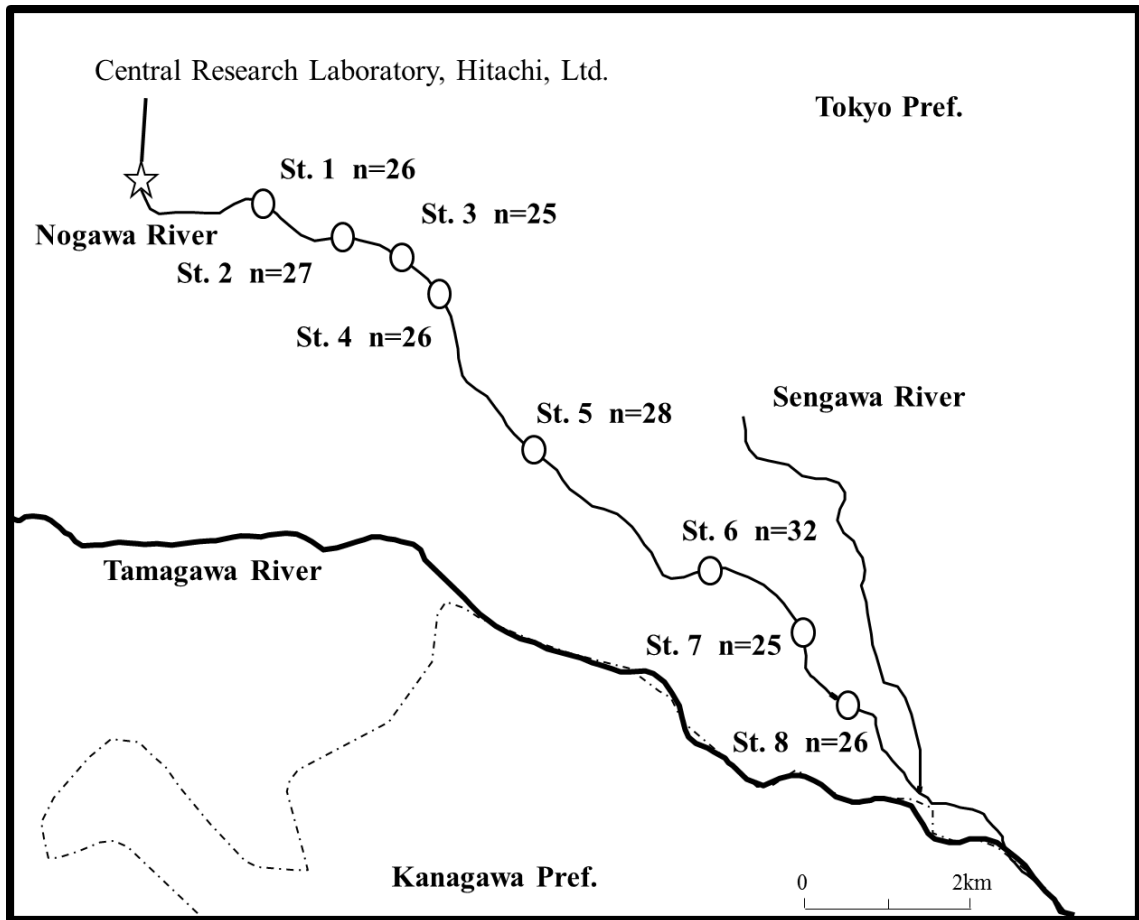


Fig. 12 Collection sites and number of individuals of wild medaka *O. latipes* in Nogawa River, Tokyo Prefecture. Details of collection sites show Table 4.

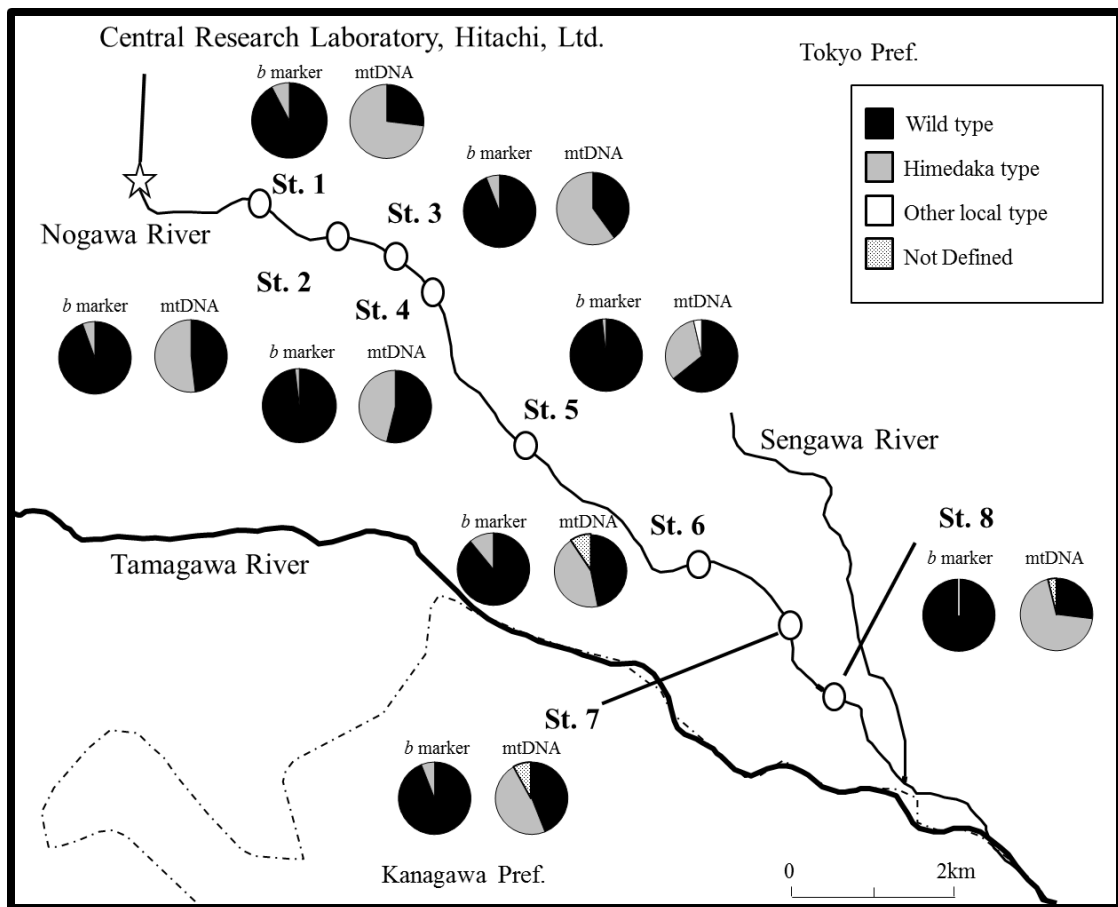


Fig. 13 The Circles indicates the results of each genetic analyses, *b*-marker and mtDNA. The Black, dark gray, white and gray colors show the rates of wild type, himedaka type, other local type and not defined type, respectively. Number of genotypes in each stations show in Table 4. There were no statistically significant differences of genetic composition among all stations (Friedman test,  $P > 0.05$ ).

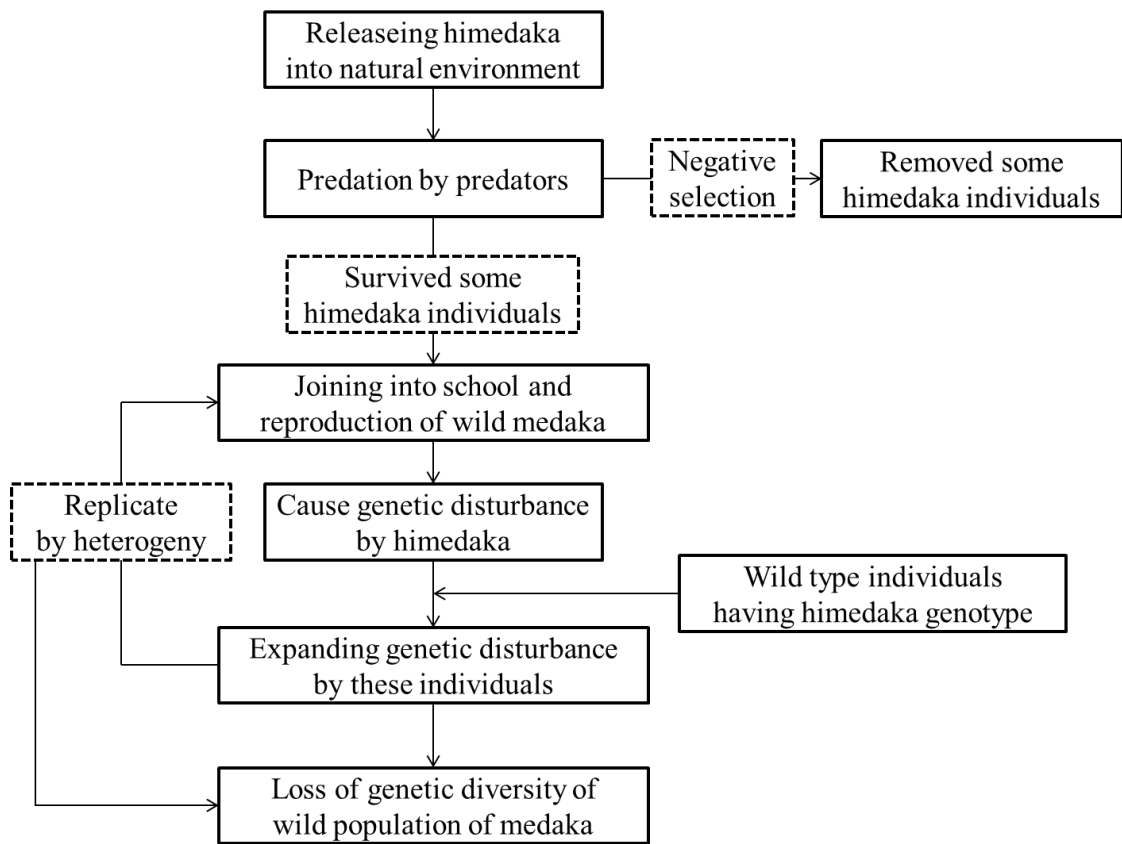


Fig. 14 The mechanism of genetic disturbance caused by artificially release of himedaka.

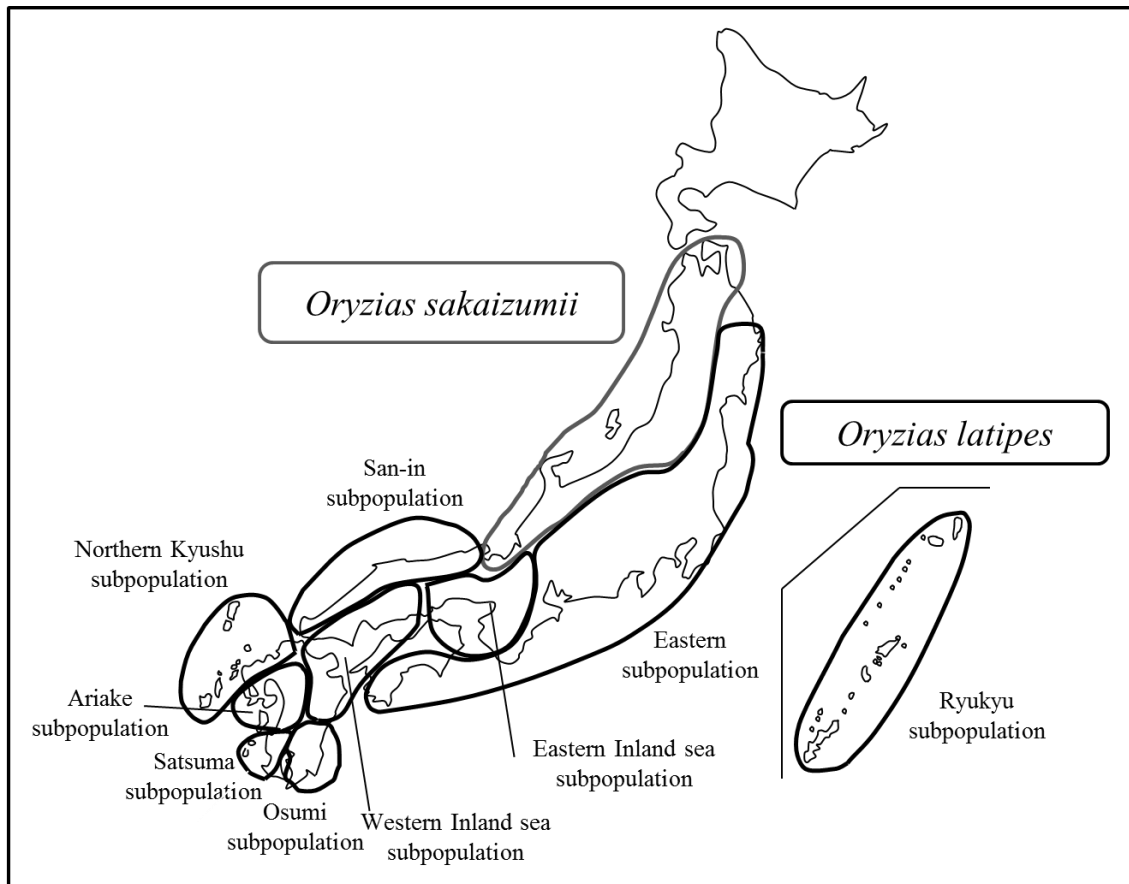


Fig. 15 Distributions of local populations of medaka *O. latipes* species complex in Japan.

These local populations are referred to subpopulation defined by Sakaizumi (1983).

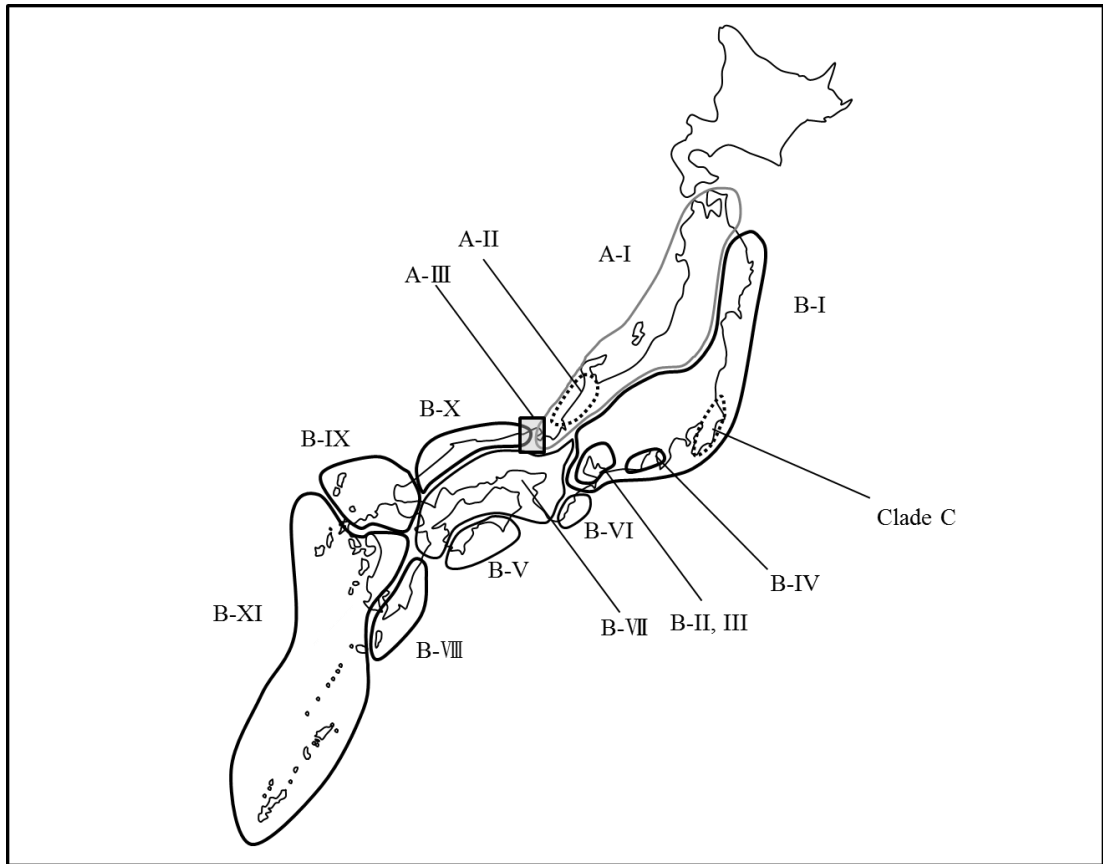


Fig. 16 Geographic distributions of mitotypes of wild populations of medaka *O. latipes* complex in Japan. This figure is referred from Takehana et al. (2003).



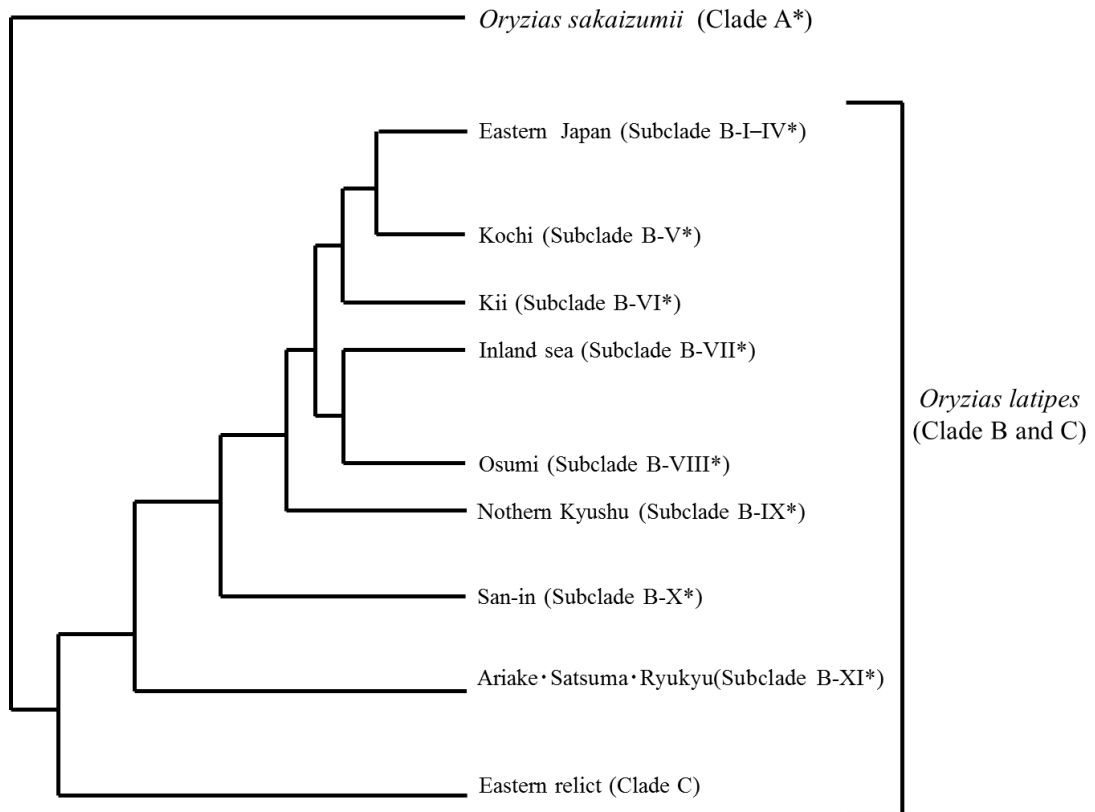


Fig. 17 Classification of evolutionary significant units (ESUs) of medaka *O. latipes* species complex determined from neighbor-joining tree of the entire *cytb* gene (1141-bp) constructed by Takehana et al. (2003).

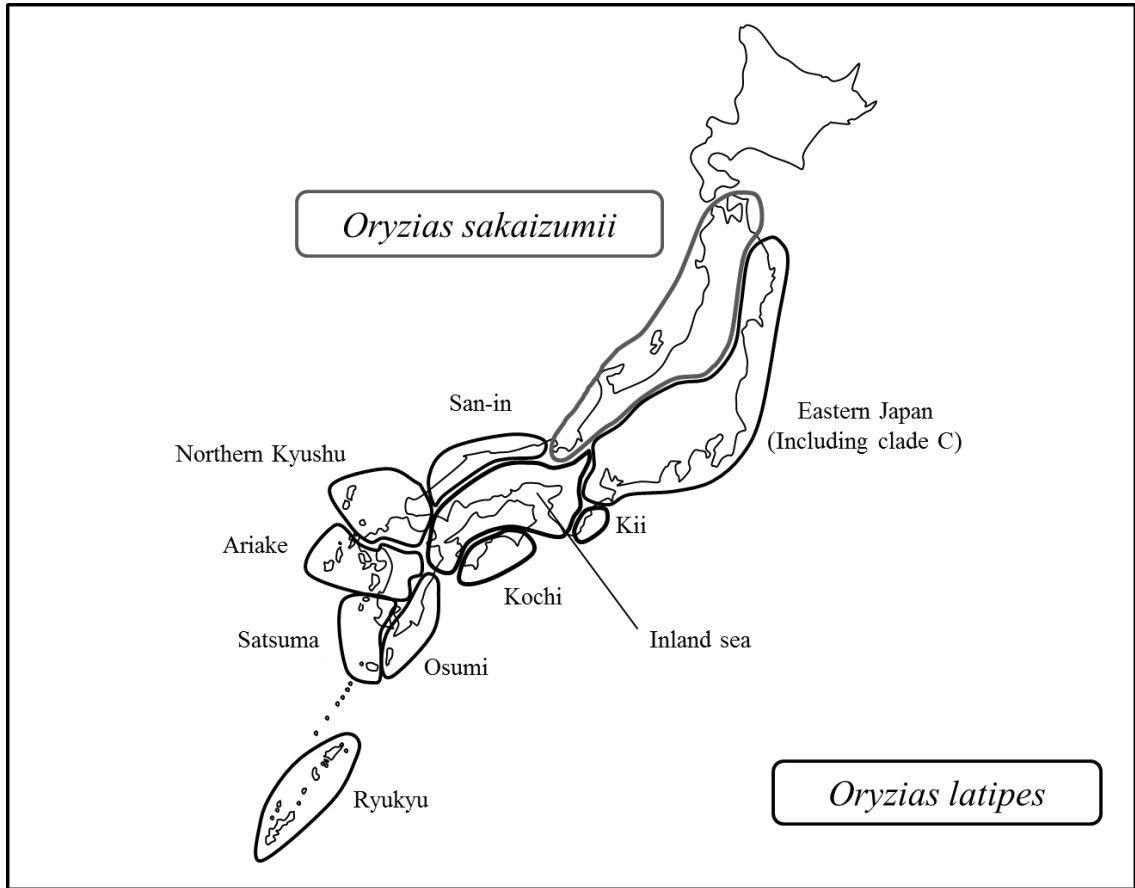


Fig. 18 Distributions of evolutionary significant units (ESUs) of medaka *O. latipes* species complex in Japan that is detected in this study.

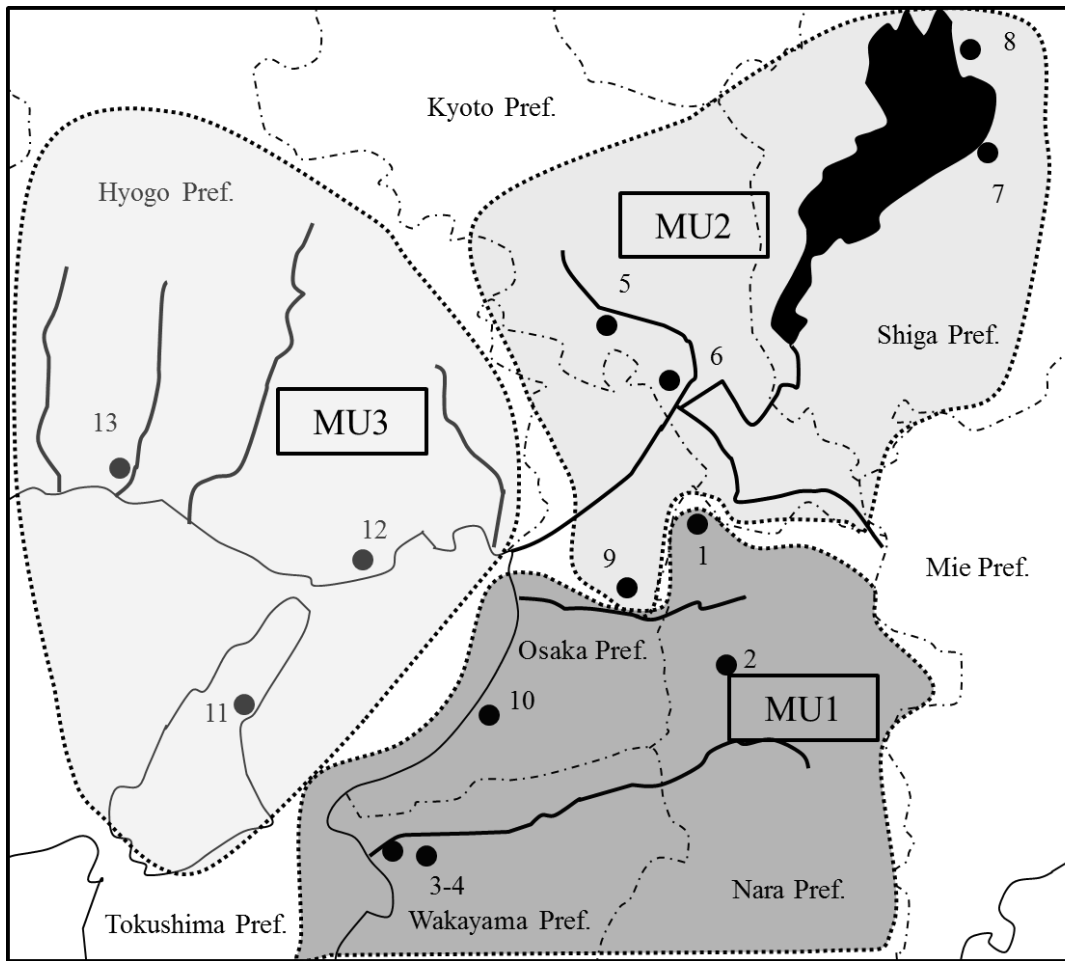


Fig. 19 The case study of defining management units (MUs) within ESUs in wild populations of Minami-medaka *O. latipes* in Kansai district. Black lines show rivers in Kansai district. Solid circles indicate the collection sites of wild populations of medaka. Rough broken lines show the boundaries of each Prefecture. In Kansai district where is distributed in eastern Inland sea ESU, these populations have been separated to 3MUs.

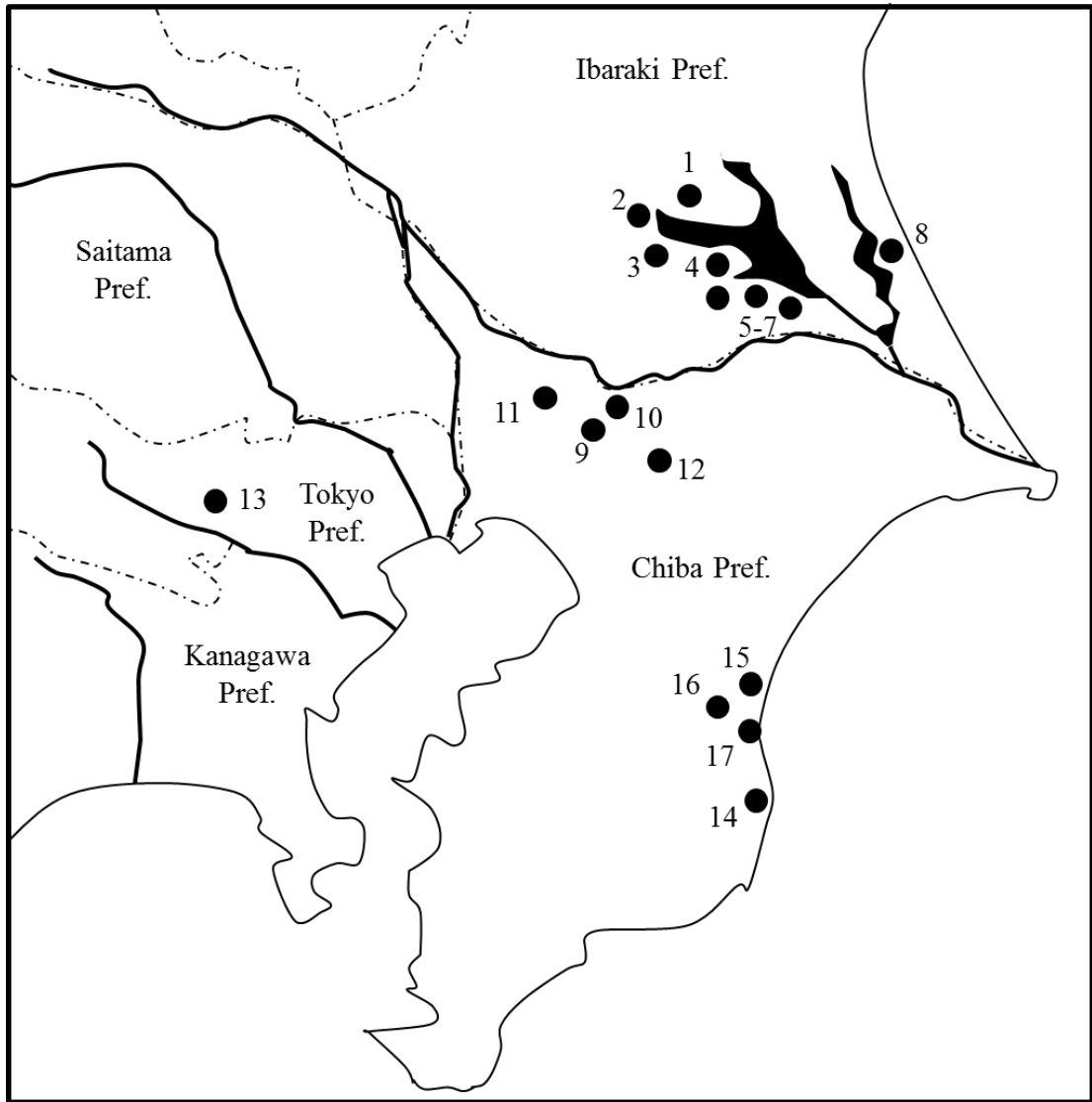


Fig. 20 Station details of Kanto district detecting management units (MUs) in wild populations of Minami-medaka *O. latipes* in Kanto district. Black lines show rivers in Kanto district. Solid circles indicate the collection sites of wild populations of medaka. Broken lines show the boundaries of each Prefecture. In Kanto district, MUs have not been detected in this study.

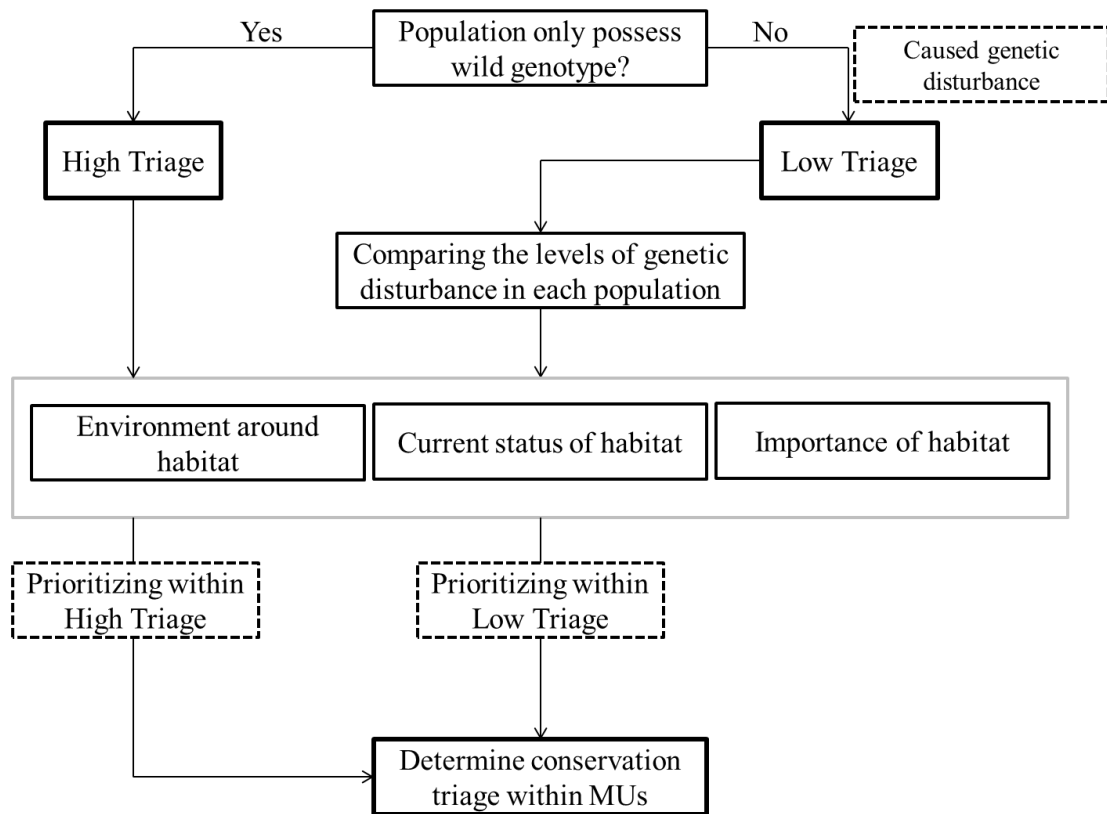


Fig. 21 The flow chart of determining the conservation triage within MUs in medaka *O.*

*latipes* species complex. Considering with environment around habitat (existence of other habitats and access to habitat), current status of habitat (population size and existence of alien species) and importance of habitat (social demand in each locality), conservation triage is finally determined within high triage and low triage, respectively.



Table 1. List of native fish species collected by field research in the Yamato River System.

Scientific Name	FH*	St. 1**	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 12	St. 13	St. 16	St. 17	St. 18	SR***
<b>Oryziatidae</b>													
<i>Oryzias latipes</i>	Omnivorous	10****	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	3	> 20	5	1	—
<b>Cyprinidae</b>													
<i>Cyprinus carpio</i>	Omnivorous											8	9.1%
<i>Carassius spp.</i>	Omnivorous	1	> 10	> 10			> 20		5		3	> 10	63.6%
<i>Tanakia limbata</i>	Omnivorous								> 20				9.1%
<i>Zacco platypus</i>	Herbivorous	5									> 20	> 20	27.3%
<i>Candidia temminckii</i>	<b>Carnivorous</b>	1	1	2					> 20	> 20			<b>45.5%</b>
<i>Candidia sieboldii</i>	<b>Carnivorous</b>								1				<b>9.1%</b>
<i>Pseudorasbora parva</i>	Omnivorous	1								> 20		> 20	27.3%
<i>Gnathopogon elongates</i>	Omnivorous						7					3	18.2%
<b>Cobitidae</b>													
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Omnivorous			1		1					1	> 10	36.4%
<b>Siluridae</b>													
<i>Silurus asotus</i>	<b>Carnivorous</b>						1					5	<b>18.2%</b>
<b>Gobiidae</b>													
<i>Rhinogobius sp.</i>	<b>Carnivorous</b>								2			5	<b>18.2%</b>

\*: Food habitat of each species.

\*\*: Refer to Fig. 2 for location details of stations.

\*\*\*: Sympatric rate of habitat with medaka in each species.

\*\*\*\*: The number of fish collected in each station.

Table 2. List of alien fish species collected by field research in the Yamato River System.

Scientific Name	FH*	St. 1**	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 12	St. 13	St. 16	St. 17	St. 18	SR***
<b>Native species</b>													
Oryziatidae													
<i>Oryzias latipes</i>	Omnivorous	10****	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	3	> 20	5	1	—
<b>Alien Species</b>													
Centrarchidae													
<i>Micropterus salmoides</i>	<b>Carnivorous</b>								1			> 10	<b>18.2%</b>
<i>Lepomis macrochirus</i>	<b>Carnivorous</b>										3	2	<b>18.2%</b>
Poeciliidae													
<i>Gambusia affinis</i>	Omnivorous						3			5			18.2%
Cyprinidae													
<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>	Omnivorous	> 10						> 20	> 20				27.3%
Synbranchidae													
<i>Monopterus albus</i>	Omnivorous		1										9.1%

\*: Food habitat of each species.

\*\* : Refer to Fig. 2 for location details of stations.

\*\*\* : Sympatric rate of habitat with medaka in each species.

\*\*\*\* : The number of fish collected in each station.



Table 3 Collection sites, sample size (N) and observed genotypes and mitotypes of medaka *Oryzias latipes* complex. Numbers in parentheses indicate number of individuals representing each mitotypes and genotypes. Refer to Fig. 9 for location details of stations. Bold letters show himedaka mitotypes. Underlined letters show introgressed mitotypes originated from other localities. Asterisks show that mitotype B1a and B15 found without himedaka genotype in Kanto district.

St. No.	Collection site	N	<i>b</i> marker	Mitotypes
Non-native area of medaka complex				
1	Obihiro, Hokkaido	9	<u>B/B</u> (9)	<u>B11</u> (7), <u>B1a</u> (2)
Kitano-medaka <i>Oryzias sakaizumii</i>				
2	Higashiokitama, Yamagata	7	B/B (6), <b>B/b</b> (1)	A19 (7)
3	Himi, Toyama	5	B/B (5)	A1 (5)
4	Maizuru 1, Kyoto	14	B/B (14)	A1 (3), A15 (6), A18 (5)
5	Maizuru 2, Kyoto	5	B/B (5)	A15 (4), A18 (1)
6	Hukuchiyama, Kyoto	3	B/B (3)	A1 (3)
7	Toyooka 1, Hyogo	10	B/B (10)	A14 (10)
8	Toyooka 2, Hyogo	5	B/B (5)	A14 (5)
Minami-medaka <i>Oryzias latipes</i>				
9	Kesenuma 1, Miyagi	30	B/B (30)	B11 (30)
10	Kesenuma 2, Miyagi	10	B/B (10)	B11 (10)
11	Sendai 1, Miyagi	10	B/B (10)	B11 (10)
12	Sendai 2, Miyagi	10	B/B (10)	<u>A1</u> (4), <u>A4</u> (4), <b>B27</b> (2)
13	Iwaki, Fukushima	10	B/B (10)	B11 (10)
14	Kasumigaura 1, Ibaraki	10	B/B (10)	B11 (9), B1a (1)*
15	Kasumigaura 2, Ibaraki	10	B/B (10)	B11 (8), B1a (2)*
16	Tsuchiura 1, Ibaraki	10	B/B (10)	B1a (10)*
17	Tsuchiura 2, Ibaraki	10	B/B (10)	B11 (7), B1a (3)*
18	Tsukuba, Ibaraki	12	B/B (8), <b>B/b</b> (4)	B1a (12)*
19	Kashima, Ibaraki	10	B/B (10)	B11 (5), B15 (2)*, B1a (3)*
20	Inashiki city, Ibaraki	11	B/B (11)	B11 (9), B15 (2)*
21	Inashiki country 1, Ibaraki	11	B/B (11)	B11 (7), B15 (1)*, B1a (3)*
22	Inashiki country 2, Ibaraki	12	B/B (12)	B11 (4), B15 (5)*, B1a (3)*
23	Inashiki country 3, Ibaraki	10	B/B (10)	B11 (6), B1a (4)*
24	Kashiwa, Chiba	12	B/B (10), <b>B/b</b> (2)	B1a (11)*, <b>B27</b> (1)
25	Inzai 1, Chiba	25	B/B (25)	B11 (14), B15 (1)*, B1a (10)*

Table 3 Continued

St. No.	Collection site	N	<i>b</i> -marker	Mitotypes
26	Inzai 2, Chiba	11	<i>B/B</i> (11)	B11 (6), B15 (1)*, B1a (4)*
27	Sakura, Chiba	5	<i>B/B</i> (5)	C2 (5)
28	Nagao 1, Chiba	11	<i>B/B</i> (10), <b><i>B/b</i></b> (1)	B11 (6), B1a (1)*, C1 (4)
29	Nagao 2, Chiba	5	<i>B/B</i> (5)	B11 (3), B1a (2)*
30	Nagao 3, Chiba	5	<i>B/B</i> (5)	C1 (5)
31	Isumi, Chiba	11	<i>B/B</i> (11)	B11 (11)
32	Minami-boso, Chiba	10	<i>B/B</i> (5), <b><i>B/b</i></b> (5)	B11 (7), <b>B27</b> (3)
33	Mitaka, Tokyo	11	<i>B/B</i> (10), <b><i>b/b</i></b> (1)	B11 (3), B1a (2)*, <b>B27</b> (6)
34	Komae, Tokyo	10	<i>B/B</i> (10)	B11 (3), B34 (1), B15 (1)*, B1a (4)*, <b>B27</b> (1)
35	Hamamatsu, Shizuoka	5	<i>B/B</i> (5)	B11 (5)
36	Nagano, Nagano	5	<i>B/B</i> (5)	B11 (5)
37	Iida, Nagano	5	<i>B/B</i> (5)	B11 (5)
38	Kasugai, Aichi	5	<i>B/B</i> (5)	B11 (3), B40 (1), B41 (1)
39	Tsushima, Aichi	4	<i>B/B</i> (4)	B11 (2), B40 (2)
40	Aisai 1, Aichi	5	<i>B/B</i> (4), <b><i>B/b</i></b> (1)	B11 (1), B12 (4)
41	Aisai 2, Aichi	5	<i>B/B</i> (5)	B11 (1), B12 (4)
42	Yatomi 1, Aichi	7	<i>B/B</i> (3), <b><i>B/b</i></b> (2), <b><i>b/b</i></b> (2)	<b>B1a</b> (6), B27 (1)
43	Yatomi 2, Aichi	3	<b><i>b/b</i></b> (3)	<b>B1a</b> (1), B27 (2)
44	Yatomi 3, Aichi	3	<i>B/B</i> (3)	B12 (3)
45	Yatomi 4, Aichi	19	<i>B/B</i> (14), <b><i>B/b</i></b> (1), <b><i>b/b</i></b> (4)	B40 (10), <b>B1a</b> (1), B27 (8)
46	Yatomi 5, Aichi	5	<i>B/B</i> (5)	B40 (4), B27 (1)
47	Matsusaka, Mie	10	<i>B/B</i> (10)	B1c (10)
48	Yokkaichi, Mie	12	<i>B/B</i> (12)	B1c (12)
49	Tsu, Mie	3	<i>B/B</i> (3)	<b>B1a</b> (1), <b>B27</b> (2)
50	Iga, Mie	5	<i>B/B</i> (5)	<b>B1a</b> (5)
51	Mizuho, Gifu	10	<i>B/B</i> (10)	B12 (6), B40 (4)
52	Kani 1, Gifu	4	<i>B/B</i> (3), <b><i>b/b</i></b> (1)	<b>B27</b> (4)
53	Kani 2, Gifu	5	<i>B/B</i> (5)	B40 (4), <b>B27</b> (1)
54	Otsu, Shiga	3	<i>B/B</i> (3)	B1a (3)
55	Kameoka, Kyoto	6	<i>B/B</i> (6)	B22 (6)

Table 3 Continued

St. No.	Collection site	N	<i>b</i> -marker	Mitotypes
56	Nishikyo-ku, Kyoto	29	<i>B/B</i> (16), <b><i>B/b</i></b> (13)	B22 (26), <b>B1a</b> (3)
57	Sakyo-ku, Kyoto	5	<i>B/B</i> (5)	<b>B1a</b> (5)
58	Minami-ku, Kyoto	5	<i>B/B</i> (5)	B22 (2), <b>B27</b> (3)
59	Keihoku, Kyoto	15	<i>B/B</i> (15)	<b>B1a</b> (15)
60	Fushimi 1, Kyoto	45	<i>B/B</i> (44), <b><i>b/b</i></b> (1)	B22 (41), B38 (3), <b>B1a</b> (1)
61	Fushimi 2, Kyoto	1	<i>B/B</i> (1)	B22 (1)
62	Kyotango, Kyoto	5	<i>B/B</i> (5)	B14 (5)
63	Kyotanabe, Kyoto	5	<i>B/B</i> (5)	<b>B1a</b> (5)
64	Seika, Kyoto	5	<i>B/B</i> (4), <b><i>B/b</i></b> (1)	<b>B1a</b> (4), <b>B27</b> (1)
65	Kizugawa, Kyoto	2	<i>B/B</i> (2)	B22 (2)
66	Takatsuki, Osaka	15	<i>B/B</i> (11), <b><i>B/b</i></b> (4)	<u>B5</u> (2), <b>B1a</b> (10), <b>B27</b> (3)
67	Suita, Osaka	9	<i>B/B</i> (7), <b><i>B/b</i></b> (1), <b><i>b/b</i></b> (1)	<b>B1a</b> (9)
68	Yao, Osaka	3	<i>B/B</i> (3)	B22 (3)
69	Nara, Nara	15	<i>B/B</i> (14), <b><i>B/b</i></b> (1)	B1a (12), <b>B27</b> (3)
70	Ikoma, Nara	10	<i>B/B</i> (10)	B1a (10)
71	Yamato-Koriyama, Nara	10	<i>B/B</i> (5), <b><i>B/b</i></b> (1), <b><i>b/b</i></b> (4)	B1a (5), <b>B27</b> (5)
72	Kitakatsuragi, Nara	5	<i>B/B</i> (3), <b><i>B/b</i></b> (2)	B1a (5)
73	Tenri, Nara	10	<i>B/B</i> (7), <b><i>B/b</i></b> (3)	B1a (5), <b>B27</b> (5)
74	Sakurai, Nara	5	<i>B/B</i> (5)	B1a (5)
75	Yamato-Takada, Nara	10	<i>B/B</i> (10)	B1a (10)
76	Wakayama, Wakayama	13	<i>B/B</i> (12), <b><i>B/b</i></b> (1)	B1a (13)
77	Mikata, Hyogo	5	<i>B/B</i> (5)	B29 (5)
78	Kobe, Hyogo	10	<i>B/B</i> (10)	B9 (2), B1a (8)
79	Awaji, Hyogo	4	<i>B/B</i> (4)	B1a (4)
80	Tsuyama, Okayama	15	<i>B/B</i> (13), <b><i>b/b</i></b> (2)	B1a (1), <b>B27</b> (14)
81	Okayama, Okayama	10	<i>B/B</i> (10)	B1a (10)
82	Gotsu 1, Shimane	10	<i>B/B</i> (10)	B15 (7), B29 (3)
83	Gotsu 2, Shimane	10	<i>B/B</i> (10)	B29 (10)
84	Shimonoseki, Yamaguchi	5	<i>B/B</i> (3), <b><i>B/b</i></b> (1), <b><i>b/b</i></b> (1)	B15 (5)
85	Uwajima 1, Ehime	10	<i>B/B</i> (10)	B1d (2), <b>B27</b> (8)

Table 3 Continued

St. No.	Collection site	N	<i>b</i> -marker	Mitotypes
86	Uwajima 2, Ehime	35	<i>B/B</i> (35)	B1d (35)
87	Itano, Tokushima	5	<i>B/B</i> (5)	B1a (5)
88	Tokushima, Tokushima	5	<i>B/B</i> (5)	B1a (5)
89	Nankoku, Kochi	5	<i>B/B</i> (5)	<b>B1a (5)</b>
90	Fukuoka, Fukuoka	10	<i>B/B</i> (10)	B23 (1), B15 (9)
91	Ureshino, Saga	19	<i>B/B</i> (19)	B23 (18), B24 (1)
92	Kakara, Saga	14	<i>B/B</i> (14)	B17 (14)
93	Sasebo, Nagasaki	5	<i>B/B</i> (5)	B24 (1), B26 (4)
94	Yatsushiro, Kumamoto	10	<i>B/B</i> (10)	B4 (10)
95	Kamimashiki, Kumamoto	3	<i>B/B</i> (3)	B23 (3)
96	Tamana, Kumamoto	8	<i>B/B</i> (8)	B23 (1), B24 (7)
97	Miyazaki, Miyazaki	14	<i>B/B</i> (14)	B4 (14)
98	Isa, Kagoshima	10	<i>B/B</i> (10)	B23 (10)
99	Ichiki-Kushikino, Kagoshima	5	<i>B/B</i> (5)	B24 (5)
100	Yakushima 1, Kagoshima	8	<i>B/B</i> (7), <b><i>B/b</i> (1)</b>	B24 (7), <b>B1a (1)</b>
101	Yakushima 2, Kagoshima	18	<i>B/B</i> (14), <b><i>B/b</i> (4)</b>	<u>B11 (5)</u> , <b>B27 (13)</b>
102	Kakeroma, Kagoshima	2	<b><i>B/b</i> (2)</b>	<b>B27 (2)</b>
103	Amami, Kagoshima	5	<i>B/B</i> (5)	B24 (5)
104	Ogimi, Okinawa	5	<i>B/B</i> (5)	B24 (5)
105	Kunigami, Okinawa	8	<i>B/B</i> (8)	B24 (8)
Total		974		

Table 4 Results of genetic analyses of Minami-medaka *O. latipes* in Nogawa River, Tokyo Prefecture. The ND in mitotype shows "Not Defined mitotypes" that mismatched the classification of mitotypes in Takehana et al. (2003).

No.	Collection site	n	<i>b</i> -marker			Mitotype							
			Wild	Hybrid	Himedaka	Wild type			Himedaka type		Other	ND	
			<i>B/B</i>	<i>B/b</i>	<i>b/b</i>	B11	B15	B34	B36	B1a	B27	A13	
1	Kuraone-bashi	26	22	4		2	1		4	17	2		
2	Nakamae-bashi	27	25	1	1	12	1			5	9		
3	Yamabe-bashi	25	22	3		10				3	12		
4	Izumi-bashi	26	25	1		14				4	8		
5	Otosaka-bashi	28	27	1		18				6	3	1	
6	Nogawa-bashi	32	25	7		9	3	3		4	10		3
7	Shinmei-hashi	25	22	3		9	2			7	5		2
8	Kitami-ohashi	26	26			3	1	3		10	8		1
		215	194	20	1	77	8	6	4	56	57	1	6

Table 5 Result of pairwise  $F_{ST}$  of wild populations of *Oryzias latipes* in Kansai district. Refer to Fig. 19 for location details of stations.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	—												
2	0.000	—											
3	0.000	0.000	—										
4	0.245	0.245	0.294	—									
5	<b>1.000*</b>	<b>1.000*</b>	<b>1.000*</b>	<b>0.805*</b>	—								
6	<b>0.835*</b>	<b>0.835*</b>	<b>0.849*</b>	<b>0.640*</b>	0.008	—							
7	<b>1.000*</b>	<b>1.000*</b>	<b>1.000*</b>	<b>0.781*</b>	0.000	-0.017	—						
8	<b>1.000*</b>	<b>1.000*</b>	<b>1.000*</b>	<b>0.781*</b>	0.000	-0.017	0.000	—					
9	<b>1.000*</b>	<b>1.000*</b>	<b>1.000*</b>	0.707	0.000	-0.111	0.000	0.000	—				
10	0.000	0.000	0.000	-0.091	<b>1.000*</b>	<b>0.759*</b>	<b>1.000*</b>	<b>1.000*</b>	1.000	—			
11	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>1.000*</b>	<b>0.775*</b>	<b>1.000*</b>	<b>1.000*</b>	<b>1.000*</b>	0.000	—		
12	0.111	0.111	0.137	-0.043	<b>0.780*</b>	<b>0.672*</b>	<b>0.765*</b>	<b>0.765*</b>	<b>0.728*</b>	-0.086	-0.026	—	
13	0.054	0.054	0.082	-0.069	<b>0.846*</b>	<b>0.704*</b>	<b>0.832*</b>	<b>0.832*</b>	<b>0.794*</b>	-0.167	-0.099	-0.125	—

\*: Statistically significant differences between each population ( $P < 0.05$ )

Table 6 Management Unit (MU) of *O. latipes* in Kansai district detected by pairwise  $F_{ST}$ -value.

---

Nara, Wakayama, Kobe group (MU 1)

- 1 Ikoma
- 2 Yamatotakada
- 3 Wakayama-1
- 4 Wakayama-2
- 5 Kaizuka
- 6 Awaji
- 7 Kobe
- 8 Himeji

Lake-Biwa, Yodo River group (MU 2)

- 1 Kameoka
  - 2 Fushimi
  - 3 Hikone
  - 4 Kinomoto
  - 5 Yao
-

Table 7 Result of analysis of molecular variance (AMOVA) of genetic structure among wild population of *Oryzias latipes* in Kansai district.

	d. f. *	Variance	% Total	$\phi$ -statistics	$P^{**}$
Between Mus***	1	0.437	87.25	$\phi_{CT}=0.873$	<0.01
Among populations	11	0.001	0.25	$\phi_{SC}=0.020$	> 0.05
Within populations	78	0.062	12.50	$\phi_{ST}=0.875$	< 0.01

\* d. f., Degree of freedom.

\*\*  $P$ , Probably of variance.

\*\*\* MUs, defined according to pairwise  $\phi_{ST}$ .



Table 8 Result of pairwise  $F_{ST}$  of wild populations of *Oryzias latipes* in Kanto district.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	—								
2	<b>0.612*</b>	—							
3	<b>0.630*</b>	<b>1.000*</b>	—						
4	-0.008	<b>0.802*</b>	<b>0.717*</b>	—					
5	0.040	<b>0.894*</b>	<b>0.865*</b>	-0.012	—				
6	<b>0.599*</b>	0.000	<b>1.000*</b>	<b>0.792*</b>	<b>0.889*</b>	—			
7	0.038	<b>0.836*</b>	<b>0.778*</b>	0.084	0.002	<b>0.829*</b>	—		
8	-0.090	<b>0.680*</b>	<b>0.697*</b>	0.020	0.020	<b>0.667*</b>	0.073	—	
9	-0.076	<b>0.524*</b>	<b>0.565*</b>	0.033	0.145	<b>0.508*</b>	0.088	-0.032	—
10	-0.100	<b>0.613*</b>	<b>0.630*</b>	0.008	0.040	<b>0.599*</b>	0.038	-0.090	-0.076
11	0.063	<b>0.512*</b>	<b>0.535*</b>	0.145	<b>0.308*</b>	<b>0.497*</b>	0.198	0.143	-0.038
12	-0.078	<b>0.571*</b>	<b>0.656*</b>	0.090	0.127	<b>0.555*</b>	0.158	-0.087	-0.054
13	-0.045	<b>0.447*</b>	<b>0.593*</b>	<b>0.111*</b>	0.137	<b>0.438*</b>	0.160	-0.042	-0.038
14	0.225	<b>1.000*</b>	<b>1.000*</b>	0.120	0.010	<b>1.000*</b>	0.100	0.238	<b>0.327*</b>
15	0.016	<b>0.680*</b>	<b>0.616*</b>	0.029	0.111	<b>0.667*</b>	0.093	0.030	0.038
16	0.004	<b>0.440*</b>	<b>0.700*</b>	0.252	0.384	0.417	<b>0.357*</b>	0.027	-0.046
17	<b>0.630*</b>	<b>1.000*</b>	<b>1.000*</b>	<b>0.717*</b>	<b>0.865*</b>	<b>1.000*</b>	<b>0.777*</b>	<b>0.697*</b>	<b>0.565*</b>

\*: Statistically significant differences between each population ( $P < 0.05$ )

Table 8 Continued

No.	10	11	12	13	14	15	16	17
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10	—							
11	0.063	—						
12	-0.076	0.107	—					
13	-0.045	0.105	-0.072	—				
14	0.225	<b>0.452*</b>	<b>0.350*</b>	<b>0.283*</b>	—			
15	0.016	<b>0.151*</b>	0.056	0.085	<b>0.266*</b>	—		
16	0.004	0.073	-0.084	-0.063	<b>0.662*</b>	0.143	—	
17	<b>0.630*</b>	<b>0.534*</b>	<b>0.656*</b>	<b>0.593*</b>	<b>1.000*</b>	<b>0.470*</b>	<b>0.700*</b>	—

\*: Statistically significant differences between each population ( $P < 0.05$ )