



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	河川生物の保全に向けた遺伝子流動評価に関する研究
Author(s)	中島, 颯大
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第7234号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7234
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99850
Type	doctoral thesis
File Information	NAKAJIMA_Souta.pdf, 全文



河川生物の保全に向けた遺伝子流動評価に関する研究
Study on gene flow evaluation for conservation of riverine organisms

中島 颯大
Souta Nakajima

目次

第 1 章 序論.....	1
1-1. 河川生態系の分断化.....	1
1-2. 遺伝子流動のパターンとその評価.....	2
1-3. 河川生物の遺伝子流動評価の課題.....	4
1-4. 冷水性魚類の遺伝子流動.....	5
1-5. 本研究の目的と構成.....	5
第 2 章 研究材料.....	7
2-1. 調査地.....	7
2-2. 調査対象種.....	9
第 3 章 景観遺伝学的解析を用いた集団遺伝構造と遺伝子流動パターンの解明.....	11
3-1. はじめに.....	11
3-2. 方法.....	13
3-2-1. 組織 DNA サンプルの採取.....	13
3-2-2. 水温観測.....	15
3-2-3. MIG-seq 法のライブラリ調整とシーケンス、SNP の検出.....	16
3-2-4. 集団遺伝構造、遺伝的多様性、および遺伝的分化.....	16
3-2-5. 地理的距離と夏季水温差が遺伝的分化に与える影響.....	19
3-2-6. 双方向的な遺伝子流動の推定.....	19
3-3. 結果.....	20
3-4. 考察.....	27
3-4-1. 集団遺伝構造.....	27
3-4-2. 遺伝子流動.....	28
3-4-3. 冷水性魚類保全への示唆.....	30
3-4-4. 遺伝子流動評価への示唆.....	31
第 4 章 環境 DNA 調査の景観遺伝学的解析への適用可能性の検証.....	32
4-1. はじめに.....	32
4-2. 方法.....	33
4-2-1. 組織 DNA (追加分) および環境 DNA サンプルの採取.....	33
4-2-2. 組織 DNA のシーケンスとプライマーデザイン.....	36
4-2-3. 環境 DNA サンプルのライブラリ調整とシーケンス.....	39

4-2-4. 集団遺伝構造、遺伝的多様性、および遺伝的分化.....	41
4-2-5. 環境DNA と組織DNA による遺伝的分化の比較.....	42
4-2-6. 追加のデータ処理による変化.....	43
4-2-7. 基本的な景観遺伝学への適用.....	43
4-3. 結果.....	43
4-4. 考察.....	51
4-4-1. 環境DNA データの妥当性.....	51
4-4-2. 環境DNA データに対する追加の処理の効果.....	52
4-4-3. 今後の課題と展望.....	53
第 5 章 河川景観遺伝モデルを用いた遺伝子流動の規定要因解明と気候変動下での将来予測	56
5-1. はじめに.....	56
5-2. 方法.....	58
5-2-1. 調査流域のグラフ化.....	58
5-2-2. 遺伝データ.....	60
5-2-3. 河川景観データ.....	60
5-2-4. 河川景観遺伝モデリング.....	61
5-3. 結果.....	65
5-3-1. 気候変動による流域環境の変化.....	65
5-3-2. ハナカジカの遺伝子流動を規定する要因.....	67
5-3-3. 気候変動下の遺伝子流動の将来予測.....	67
5-4. 考察.....	71
5-4-1. ハナカジカの遺伝子流動を規定する要因.....	71
5-4-2. 気候変動下の遺伝子流動の将来予測.....	72
第 6 章 総合考察	75
6-1. 気候変動下における冷水性魚類の保全方策.....	75
6-2. 河川生物の保全に向けた遺伝子流動の評価指針.....	77
摘要.....	82
謝辞.....	83
補足.....	84
引用文献.....	85

第 1 章 序論

1-1. 河川生態系の分断化

河川生態系は河川改修や流域の土地利用変化、気候変動など様々な脅威を受けている (Reid et al. 2019 ; Dudgeon 2019) 。これらの脅威は河川に生息する生物 (河川生物) の生息地環境の直接的な劣化だけでなく、生息地の分断化 (Woodward et al. 2010 ; 石山ほか 2017) も引き起こしている。河川生物は移動経路が樹状構造をもつ河川ネットワークに限られるため、横断工作物の設置によりある 1 箇所ですべて上下流間の移動が阻害されたり、気候変動により生息適地が高標高域へシフトしたりするだけで、生息地の連続性は簡単に途切れてしまう (Campbell Grant et al. 2007 ; Herrera-R et al. 2020) 。

生息地の分断化は、生息地の喪失とならび、生物種 (種) や、種内の大きな遺伝的まとまり (種内系統 ; 地域性に着目した場合、特に地域個体群と呼ばれる) の絶滅を導く主要因である (With et al. 1997 ; Ewers and Didham 2005) 。これは、生息地の分断化により、生物の移動分散に伴う生息地間の遺伝的な交流 (遺伝子流動) が阻まれると、孤立したそれぞれの生息地に存在する生物集団の有効集団サイズは小さくなり、偶然による出生率・死亡率や性比の変動 (人口学的確率性) や近親交配による適応度の低下 (近交弱勢) が顕著になっていくためである (Fahrig 2003 ; Frankham et al. 2019) 。逆に、生息地の連結性が確保されていれば、遺伝子流動を通して各集団の遺伝的多様性や存続可能性は維持される。このため、種を絶滅から防ぎ、減少傾向である生物多様性の状態を回復基調に乗せるネイチャーポジティブ (Mace et al. 2018) を実現させていくためには、質の高い生息地を増やすと同時にこれら生息地の連結性を確保することが河川では特に重要である (Fletcher et al. 2016) 。

なお、遺伝子流動は必ずしも正の効果のみを持つわけではなく、特に進化的に十分離れた集団間の遺伝子流動は遺伝的固有性の喪失にもつながる (Day et al. 2024) 。また、直接的な遺伝子流動の影響ではないが、遺伝子流動を促進するために生息地の連続性を確保することが、外来種や病気の拡大に貢献してしまう場合もある (Fausch et al. 2009 ; Nobert et al. 2016) 。それでも、遺伝子流動は地域個体群の存続のうえで正の効果を及ぼす場合がほとんどであり (メタ解析 : Frankham et al. 2015 ; Kottler et al. 2021) 、過去から現在まで連結性が保たれてきた集団では、種の特性や地域の課題を踏まえながら連結性を確保していくことが求められる。

1-2. 遺伝子流動のパターンとその評価

ある種や地域個体群に含まれる複数の集団間の遺伝子流動を評価することは、生息地の連結性について現状を把握し、確保していく指針を検討するうえで極めて有用である。なぜなら遺伝子流動は、個体が異なる生物集団に移住した先で実際に繁殖に参加することで実現する「移住の有効部分」であり、機能的連結性を示すからである (Cayuela et al. 2018)。集団間の遺伝子流動は、野生生物の遺伝子を調べる集団遺伝学的なアプローチを用いて直接評価することができる。複数の地点で生物個体をサンプリングし、進化上有利でも不利でもない中立的な遺伝的変異をいくつか調べる研究は数多く行われてきたが、そのなかで遺伝子流動に関する情報も得られる。とはいえ、移住により遺伝子流動が起こるプロセスは集団遺伝学が扱う領域のなかでは比較的小さい時空間スケール（ローカルスケール）の事象である (Cushman et al. 2015)。ローカルスケールの遺伝子流動の有無や強度は対象地域内における環境の不均質性（景観）に強く左右されるため、これらの評価には景観生態学的な視点も欠かせない。このため、遺伝子流動の評価に関する考え方や方法論の多くは、集団遺伝学を景観生態学に組み合わせた「景観遺伝学」(Manel et al. 2003) の枠組みで、主に陸上生物を材料として議論されてきた (Manel and Holderegger 2013)。

景観内における遺伝的変異の分布パターン（集団遺伝構造）は遺伝子流動の強弱と密接に関わっているため、集団遺伝構造と景観要素の関係を調べることは景観遺伝学の主要なテーマの 1 つである。景観遺伝学では、集団遺伝構造のパターンを述べる際に、遺伝子流動を制限する要因から「距離による隔離」(isolation by distance ; IBD)、「環境による隔離」(isolation by environment ; IBE)、「抵抗による隔離」(isolation by resistance ; IBR) などの表現が使われる (Fig. 1-1)。IBD は「地理的距離が離れた集団間ほど、遺伝的分化が大きくなる」パターンを表す概念であり (Wright 1943)、普遍的にみられる (Meirmans 2012)。IBE は「環境の違いが大きい地点の集団間ほど、遺伝的分化が大きくなる」パターンであり、異なるそれぞれの環境下で各集団の局所適応が進み、個体が異なる環境の地点に移動しにくい、あるいは移動しても子孫を残せないという状況になった場合に形成される (Sexton et al. 2014 ; Wang and Bradburd 2014)。なお、環境の違いに対しては適応的な遺伝的変異が先に応答するが、遺伝子流動のパターンが変化することで中立的な遺伝的変異でも IBE が観測されるようになる (Shafer and Wolf 2013)。IBR は「地点間の景観抵抗が大きい集団間ほど、遺伝的分化が大きくなる」パターンを表す (McRae 2006)。景観抵抗とは、特定の環境を横切る機会の多さ、

特定の環境を移動するための生理学的コスト、特定の環境を移動することによる生存率の低下といった要因で変化する、環境ごとの移動分散や遺伝子流動に対する抵抗度合いであり (Zeller et al. 2012)、IBR は移動経路全体の景観要素を捉えた概念といえる。このように、集団遺伝構造には景観要素による影響が様々な形で表れてくるため、集団遺伝構造のパターンを調べることで、景観内の遺伝子流動の概況を捉えることができる。

ただし、景観要素は集団遺伝構造には表れにくい形で遺伝子流動に効果を与えている場合もある。例えば、ある環境に生息する集団が個体供給源（ソース）として機能し、他の環境に生息する集団が個体の受け手（シンク）となっている「ソース・シンク構造」が成り立っている場合、環境の異なる地点の集団間で遺伝子流動が大きくなるといった IBE と反対のプロセスが起きているが (Sexton et al. 2014)、これを集団遺伝構造のパターンのみから判断することは難しい。景観内で様々な様相を呈している遺伝子流動のパターンを捉えるため、景観遺伝学を含む集団遺伝学分野では、集団遺伝構造と景観要素との関係や双方向的な遺伝子流動を推定する解析手法が多数開発・提案されてきており、景観遺伝学ではこれら解析手法を駆使して遺伝子流動の評価が行われてきた。

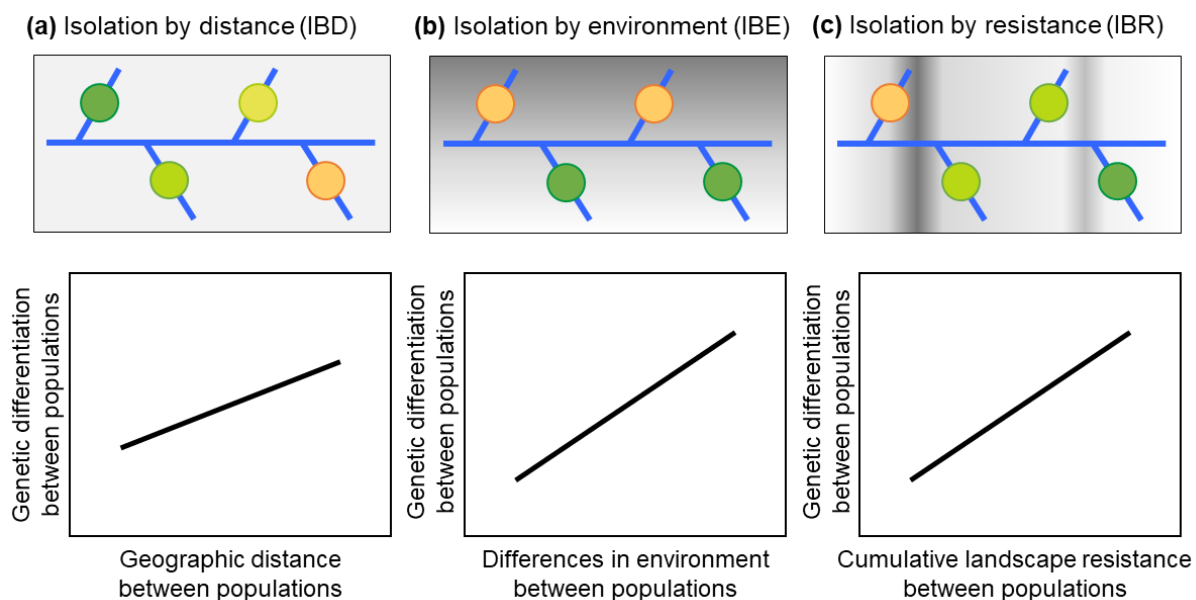


Fig. 1-1. Conceptual images of patterns and analysis of isolation by distance (a), isolation by environment (b), and isolation by resistance (c). Circles represent populations, and different colors of circles indicate less gene flow and greater genetic differentiation among populations. The background color indicates environmental gradients.

1-3. 河川生物の遺伝子流動評価の課題

景観遺伝学の理論が発展する一方で、河川生態系を対象に景観遺伝学的な研究を行った事例は少なく、現状、遺伝子流動の考え方をを用いた検討が実際の保全や河川管理の場で普及するには至っていない。これにはいくつかの理由が考えられる。第一に、景観遺伝学で開発された解析手法の多くは陸上生物を対象に立案されており、河川生物、とりわけ魚類のように水域内のみを移動経路とする種に対して使用できない、または使用事例がほとんどないことが挙げられる。河川生物の生態には、対象地域の景観全体ではなく、水域の内部、または内部およびその周辺における環境の不均質性が大きな影響を与える（Fausch et al. 2002）。さらに、河川生態系は上一下流の非対称性や生息地の特殊な構造（階層構造・樹状構造）など、陸上の生態系には無い特殊な性質をもつ（Blanchet et al. 2020）。このような背景から、河川生物の遺伝子流動の評価は景観遺伝学で開発された手法をそのまま用いることが最善とは限らない。近年、「河川景観遺伝学（riverscape genetics）」として河川生物に特化した議論がなされることも増えてきたが（Kanno et al. 2011 ; Davis et al. 2018）、その研究事例は多くはない。第二に、景観遺伝学的な検討を行うためには現地調査の労力が大きくかかることが挙げられる。景観遺伝学では多数の地点で多数の個体を採捕し、それらを遺伝子分析に供試するため、一般的に用いるツールとしては敷居が高い状態にあると考えられる。第三に、環境変化に対する予測手法が確立されていないことが挙げられる。河川生物の生息地の質・量に関しては、生息適地モデル（種分布モデルともいう）により気候変動や河川改修などの環境変化に対する応答を予測することが実務的にも普通に行われるようになってきている（国土交通省水管理・国土保全局 2021）。一方で、生息地の連結性に関しては環境変化に対する予測が行われることは稀であり、河川生物の場合は遺伝子流動が環境変化によってどの程度変わるのかを予測する手法は確立されていない。また、国際的には河川生物を対象にした景観遺伝学的研究は増加傾向にあるが（Grummer et al. 2019）、これらの多くは、前節で述べた集団遺伝構造のパターンのうち、特定の仮説（IBDの有無、IBEの有無、または着目する堰と分断化の関係など）を検証した事例である。実際に保全方策を考える基礎情報として遺伝子流動を評価する場合は、景観内において遺伝子流動が豊富である条件を明確に提供できることが望ましく、そのためには集団遺伝構造と景観要素との関係について、考えられる様々なパターンを包括的に調べる必要性も生じうるだろう。河川生物において景観遺伝学の知見を保全や河川管理で活用するための障壁を解消するためには、現地調査の簡便化、解析手法の高

度化とともに、河川生物の遺伝子流動を評価するための一連の調査・解析手法を整理する必要がある。

1-4. 冷水性魚類の遺伝子流動

河川生物の生息地の分断化を促進する要因のうち、今後影響の増大が避けられないものとして気候変動が挙げられる。気候変動による水温の上昇は、多くの河川生物の生息適地を上流側にシフトさせる。生息適地が上流側にシフトすると、これまで下流域を介して連結していた生息適地が支流ごとに断片化することとなり、結果として生息地の分断化を進行させる (Woodward et al. 2010)。なかでも河川上流部に生息する冷水性魚類は、水温上昇により生息適地が河川の源流部に縮小・断片化していくことが予測されており (Ishiyama et al. 2023)、気候変動下において生息地の連結性を評価し、確保していく必要性の高い生物群の 1 つである。冷水性魚類の生息や繁殖の主要な制限要因が水温であることはよく知られている (Mejia et al. 2023)。この水温は気温の影響を受けて変化するものの、地下水流出など局所的に変化する他の要因の影響も強く受けるため (Tague et al. 2007 ; García Molinos et al. 2022)、流域内というローカールスケールでも空間的な不均質性 (空間異質性) がみられる (Caissie 2006)。もし水温が遺伝子流動の強弱と密接に関わっている場合、地域個体群保全のための方策はこうした水温の空間異質性を考慮したものでなければならず、また、気候変動による遺伝子流動の変化を見据えて検討する必要も生じる。

1-5. 本研究の目的と構成

本研究では、冷水性魚類ハナカジカ (*Cottus nozawae*) を材料に、北海道の空知川上流域において複数仮説の検証を含む包括的な遺伝子流動の評価、および現地調査の簡便化と解析手法の拡張に資する検討を行う。これにより、(1) 気候変動下において冷水性魚類の長期的存続を実現するために保全優先度の高い区間を明らかにすること、(2) 河川生物の流域内スケールでの遺伝子流動を評価するための調査・解析フローを提案することを目的とした。

本論文は本章を含み全 6 章で構成される。第 2 章では、調査地と調査対象種を述べる。第 3 章では、本種の遺伝子流動を評価するために集団遺伝学的解析を行うとともに、遺伝子流動と水温の関係について景観遺伝学で現在用いられている解析手法を組み合わせる複数の仮説 (IBE やソース・シンク構造) を検証した。第 4 章では、第 3 章で行った評価をより簡便な

調査で実施できるようにすることを目指し、「現地では水を汲むだけで生物情報が得られる」環境 DNA 調査で同様の知見を得られないか検証した。第 5 章では、河川生物の遺伝子流動の評価を、陸上生物で適用の進んでいる景観抵抗の地図化や、環境変化に対する予測に活かせるように拡張するため、最新の解析手法を取り入れて河川区間単位で遺伝子流動をモデル化した。さらに、作成したモデルを用いて気候変動が進んだ 21 世紀末における遺伝子流動の変化を予測した。第 6 章では、第 3 章～第 5 章の内容を踏まえ、気候変動下で冷水性魚類の遺伝子流動を確保するような河川・流域管理方針を提示するとともに、一連の研究を総括し、河川生物の遺伝子流動を包括的に評価して保全に資する知見を得るための調査・解析フローを提案する。

第2章 研究材料

2-1. 調査地

本研究の調査は石狩川水系空知川流域で行った。石狩川は日本第二の流域面積 (14330 km²) をもつ一級河川であり、空知川は石狩川の最長の支流である (全長 194.5 km, 流域面積 2618 km²; 国土交通省北海道開発局, www.hkd.mlit.go.jp/sp/sorati_kasen/)。空知川流域の北東部には十勝岳などの火山活動により形成された第四紀火山岩層が分布する (Fig. 2-1)。表層地質が第四紀火山岩である流域 (以降「火山岩流域」という。) では地下水流出が豊富であり、流量や水温が安定している (Suzuki et al. 2022; Ishiyama et al. 2023)。十勝岳連邦の源流から火山岩流域を南下するシーソラプチ川と、トマム地区東側から非火山岩流域 (付加体、堆積岩など) を北上するルウオマンソラプチ川が南富良野市落合 (おちあい) で合流し、空知川となる。空知川上流域は 1966 年に完成した金山ダム (流域面積 470 km²) により下流域との河川の連続性は断たれているが、ほとんどが森林に覆われており (Fig. 2-1)、砂防ダムなどの横断工作物は比較的少ない。金山ダム下流の空知川は南富良野市金山 (かなやま)、富良野市山部 (やまべ) の山間部を流れ、耕作地・市街地 (富良野市街、芦別市) に展開していく (国土交通省北海道開発局 2018)。本研究では、人為的影響の少ない富良野市山部よりも上流域を主な調査対象とした。なお、当該流域は 2016 年の前線や台風 (北海道豪雨) により大きな攪乱を受けており、ルウオマンソラプチ川やその支流での流木堆積による氾濫や (JR 北海道 2017)、金山ダム上流の主要な市街地・南富良野市幾寅 (いくとら) での破堤による浸水被害 (土木学会 2016 年 8 月北海道豪雨災害調査団 2017) が発生した。本研究の調査を開始した 2019 年から今日にかけては、大規模な攪乱等は起きておらず、この間に魚類の集団遺伝構造は変化していないものとみなした。

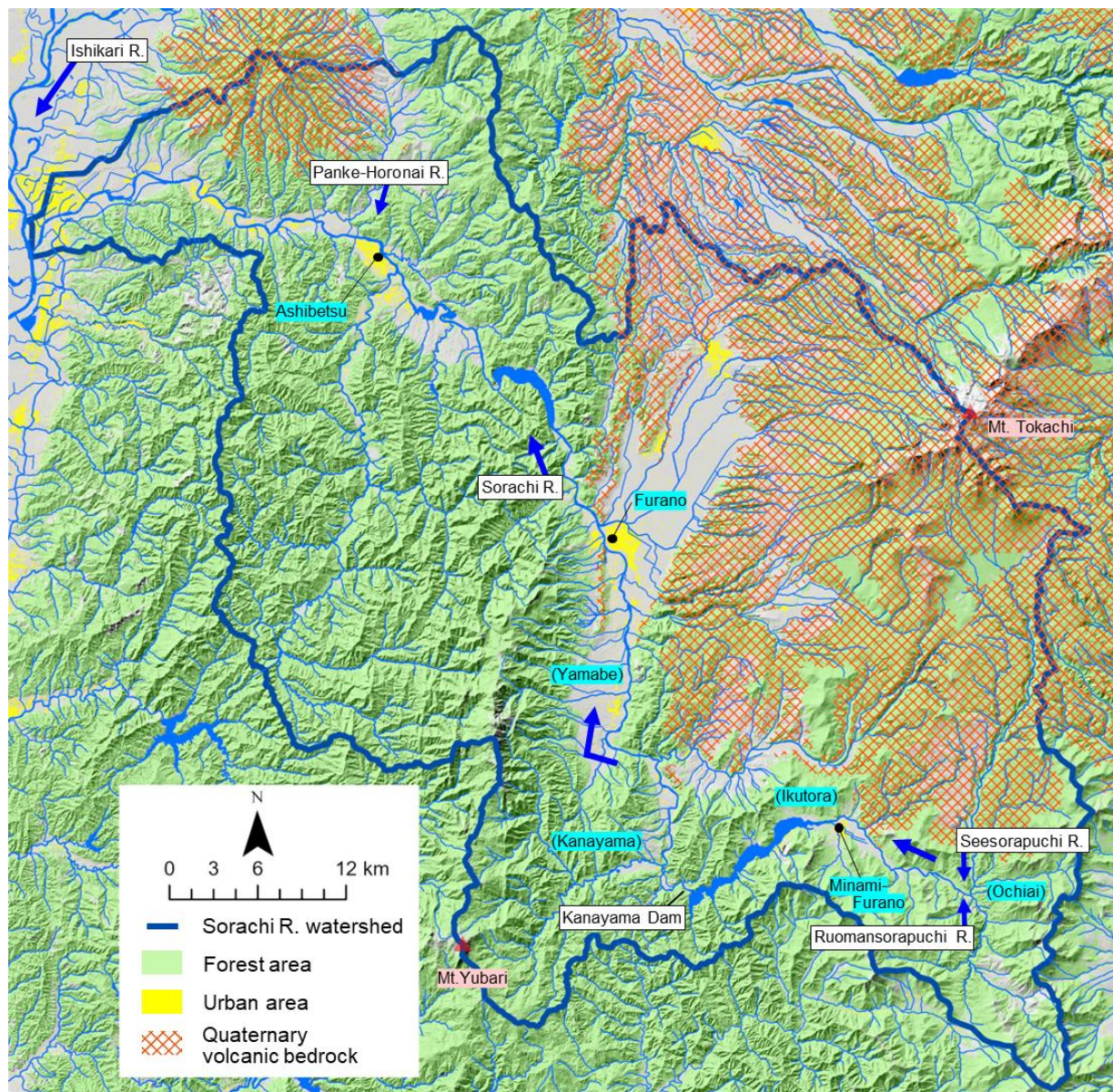


Fig. 2-1. Overview of the Sorachi River watershed. The blue arrow indicates the flow direction. Forest and urban areas are based on JAXA High-Resolution Land-Use and Land-Cover Map (www.eorc.jaxa.jp/ALOS/jp/dataset/lulc_j.htm).

2-2. 調査対象種

本研究では、淡水性カジカ（回遊しない生活史をもつ、カジカ属または類縁の底生魚）に着目した。世界中の冷水域に生息している淡水性カジカは、冷水域の河川生態系で伝統的に着目されてきたサケ科魚類と比較して移動性や遊泳能力が低い。そのため、環境変化による生息地の分断化の影響を特に受けやすく、その影響が集団遺伝構造にも表れやすい (Adams & Schmetterling 2007)。逆に、淡水性カジカの遺伝子流動が確保されている場合、他の冷水性魚類の遺伝子流動も十分確保されている可能性が高い。このことから、淡水性カジカの遺伝子流動を評価し、確保する方策を検討することは、気候変動下における冷水域の河川生態系保全において重要な知見を提供するものと考えられる。また、移動性の高い種よりも集団遺伝構造がみられやすいことから、景観遺伝学の調査・解析方法を試行するモデルとしても適する。さらに、淡水性カジカそのものも、遺伝的に多様化しており、地史を明らかにするうえでも重要な生物であることから遺伝資源としての価値が高い（後藤ほか 2002 ; Goto et al. 2015 ; Lucek et al. 2018）。

ハナカジカ (*Cottus nozawae*) は東北地方の一部と北海道の河川上流域に生息する淡水性カジカである (Fig. 2-2; Goto et al. 2001)。本種の分布域は夏季水温により規定されており (Yagami and Goto 2000)、気候変動による生息地の縮小および分断化が危惧されている (Suzuki et al. 2021)。東北地方での生息地は一部の山地溪流および湧水河川に限られており (Yagami et al. 2002)、環境省レッドリストの「絶滅のおそれのある地域個体群」に指定されている (環境省 2020)。北海道では現在は各河川の上流域に連続的に生息するものの、近い将来の水温上昇によって生息適地は大幅に減少すると予測されており (Ishiyama et al. 2023)、気候変動による地域個体群の応答には留意する必要がある。

なお、空知川上流域にはハナカジカとともに、オショロコマ (*Salvelinus curilus*)、アメマス (*Salvelinus leucomaenis leucomaenis*)、フクドジョウ (*Barbatula oreas*)、イトウ (*Parahucho perryi*) などが生息している。しかし、本流域においてオショロコマとアメマスの集団遺伝構造を調べた先行研究では流域内での強い集団遺伝構造は示されず、これらの種は支流間を活発に移動していると考えられている (Koizumi 2011 ; Nakajima et al. 2020)。成魚のハナカジカの移動性はこれらの種よりも低いため (Okumura and Goto 1996 ; Goto 1998)、流域内においてより明瞭な遺伝子流動の強弱がみられると予想でき、不均一的な遺伝子流動のパターンを考慮した保全戦略を要する可能性が高い。

以上から、空知川上流域のハナカジカは遺伝子流動を評価するモデルシステムとして最適と考えられ、本研究の材料とした。



Fig. 2-2. A photo of *Cottus nozawae*.

第3章 景観遺伝学的解析を用いた集団遺伝構造と遺伝子流動パターンの解明

3-1. はじめに

景観内で生物の集団遺伝構造がどのように形成されるかを明らかにすることは、進化生物学における重要なテーマであるとともに、野生生物の保全管理の基盤となる情報も提供する (Hohenlohe et al. 2021)。地理的距離が離れた集団間ほど遺伝的分化が大きくなる IBD は集団遺伝構造を説明する最も基本的なパターンであるが (Meirmans 2012)、遺伝的分化の形成には景観内の環境の違いも重要な役割をもつ (Nosil et al. 2005 ; Thorpe et al. 2008)。景観遺伝学分野で行われてきた集団間の遺伝的分化と環境との関係を調べた研究では、「環境の違い」が駆動する集団遺伝構造のパターンについて複数のものが記述されている。異なる環境間での遺伝子流動が局所適応などにより起こりにくくなると、環境の違いが大きい地点の集団間ほど遺伝的分化が大きくなる IBE のパターンが形成される (Wang and Summers 2010)。もう 1 つのパターンは、「環境傾度に対応した遺伝子流動 (Couter-gradient gene flow)」である (Sexton et al. 2014)。このパターンでは、異なる環境間での遺伝子流動が豊富で、景観内でソース・シンク構造を形成する。

環境の違いが集団遺伝構造のパターンに与える効果をレビューした既往文献では、IBD に加えて IBE が一般的にみられるパターンであることが指摘されている (Shafer and Wolf 2013 ; Sexton et al. 2014)。なかでも Sexton et al. (2014) は中立遺伝子で行われた環境の違いと集団遺伝構造の関係を扱った先行研究をレビューし、各研究で IBD、IBE、環境傾度に対応した遺伝子流動のどのパターンがみられていたかを整理した。その結果、調査された研究のうち 74% (脊椎動物では 85%) が IBE のパターンを示し、環境傾度に対応した遺伝子流動を示した事例はわずか (脊椎動物では 6%) であることが分かった。

しかし、真に IBE が一般的なパターンであるかには疑問が残る。IBD や IBE を評価する際には、一般的には Mantel 検定とその派生的手法 (偏 Mantel 検定など) が用いられる。しかし、環境傾度に対応した遺伝子流動は、環境に依存したソース・シンク構造として捉えられるため、これを特定するためには双方向的な遺伝子流動の推定など異なるアプローチをとる必要がある。Sexton et al. (2014) で示された研究の多くは IBD と IBE の効果のみを調べたものであり、ソース・シンク構造を含む複数の仮説を検証した事例は少ない。さらに、Mantel 検定による IBE の評価には偽陽性が多いという問題点もある。Mantel 検定は解析に用いる変数

の空間的自己相関の影響を強く受けるという特性があり、地点間の環境の違いと地理的距離に相関をもつ条件下では目的変数と環境の違いの相関について第 1 種過誤（偽陽性）が起きやすいことから頻繁に批判されている（Rousset 2002 ; Harmon and Glor 2010 ; Guillot and Rousset 2013）。一般に、環境は近い地点ほど似通っていて離れるほど大きくなるという空間的自己相関をもつため（Orsini et al. 2013）、IBE は過大に報告されている可能性が高い（Shafer and Wolf 2013）。

IBE が形成されていることは異なる環境間の遺伝子流動が妨げられるような自然選択がはたらいていることを示すため、IBE がみられた場合は景観内における過度な遺伝子流動は局所適応を阻害することとなる（Sexton et al. 2014）。一方で、ソース・シンク構造は景観全体の集団の存続に対してソース集団から他集団への遺伝子流動が重要な役割をもっていることを示すため（Fontoura et al. 2022）、この場合はソース集団そのものやソース集団と他集団との生息地の連結性を保全することが重要になるだろう。このように環境の違いの集団遺伝構造への効果の与え方が異なると、効果的な保全方策は変わってくる。解析手法に制約があるなか、効果的な保全方策を誤らずに判断するためには、(1) 偽陽性をできるだけ排除した調査・解析デザインとすること、(2) 相反する複数の仮説を検証すること、が有効と考えられる。前者について、Mantel 検定に代わる解析手法がいくつか提案されているものの、空間的自己相関に完全に対処して要素ごとの重要性をモデル化することは困難であると認識されている（Gilbert and Bennett 2010 ; Diniz-Filho et al. 2013 ; Zeller et al. 2016）。一方で調査デザインについてはほとんど着目されていないが（Meirmans 2015）、群集生態学の分野では、Gilbert and Lechowicz（2004）が環境の空間的自己相関を排除したサンプリングデザインを用いて、生物多様性の中立理論を否定した。このように空間と環境の相関を排除してサンプリングを行うことが、(1) の達成に有効だと考えられる。

上述のとおり、多くの先行研究では複数の遺伝子流動パターンがあり得る可能性を十分に検証できていなかった。対象種の遺伝子流動について、適切なサンプリングデザインのもとで複数の仮説を同時に検証し、その実態を正しく把握することは、効果的な保全方策を誤らずに判断するために不可欠である。本章では、これら観点を踏まえて河川生物における集団遺伝構造のパターンを明らかにし、効果的な保全方策を検討するための実践研究として、空知川上流域におけるハナカジカの集団遺伝構造と夏季水温の関係を、以下の複数仮説を立て検証した。夏季水温が本種の分布と生存を決定する主要因であること（Yagami and Goto 2000）、

既に当該流域で夏季水温が低い地点ほど個体群密度が大きくなる関係が確認されていること（Suzuki et al. 2021）を踏まえると、夏季水温が集団遺伝構造に影響を与えている可能性は高い。夏季水温は、気温、河畔林、地下水など複数の要因によって決まる（Nakamura and Yamada 2005 ; Caissie 2006）。なかでも地下水流出が水温に与える影響は気温に次いで大きいことが示されており（Arscott et al. 2001）、地下水流出量は流域内でも局所的に変化することから、地下水は流域内の環境の空間的不均一性（空間異質性）を生み出しているといえる。そのため、夏季水温の集団遺伝構造に与える効果を調べるにあたり、地下水がもたらす水温の空間異質性に着目することが有効と考えられる。一般に、生存や個体群密度に影響を与える生態学的に重要な環境変数は、それぞれの環境での局所適応を引き起こす場合があるため（Kawecki and Ebert 2004）、ハナカジカにおいても、地点間の夏季水温の違いが局所適応を引き起こしており、流域内で IBE のパターンがみられるという仮説を立てた。一方で、環境の空間異質性はソース・シンク構造の形成を引き起こす要因でもあるため（Dias 1996）、ソース・シンク構造がみられることも念頭に、同時にその有無を検証した。

3-2. 方法

3-2-1. 組織 DNA サンプルの採取

本研究では、集団遺伝構造と夏季水温との関係を捉えやすくするため、流域地質に着目したサンプリングを行った。流域地質は河川への地下水流出量に強く関連しており、水温に大きな影響を与えることが知られている（Caissie 2006 ; Tague et al. 2007 ; 長坂・杉山 2010）。特に空知川上流域を含む北日本では、表層が第四紀火山岩で覆われている火山岩流域で地下水流出が豊富にみられ、夏季水温が低くなることが示されている（Ishiyama et al. 2023）。そこで、サンプリング地点は、集水域が火山岩流域である地点と非火山岩流域である地点が空間的に入り混じるように設定した。このとき、サンプリング地点が空間的に偏りすぎないように、できるだけ流域全体に散在させるように注意した。流域地質は 20 万分の 1 日本シームレス地質図 V2（産総研地質調査総合センター, gbank.gsj.jp/seamless/index_en.html）に基づき判断した。最終的に、現地調査が安全に実施できることなども加味して Fig. 3-1 および Table 3-1 に示す 20 地点をサンプリング地点として設定した。このうち 12 地点は金山ダムの上流に位置し、これらの地点間は砂防ダムなどの横断工作物による明らかな生息地の分断は認められない。一方で下流側は人間活動の影響がやや大きく、Pop13 は砂防ダムの上流に位置し、

Pop19 は本流との間に農地の影響を強く受ける区間を挟む。

上述の 20 地点から、合計 531 個体のハナカジカを電気漁具 (Smith-Root 社; さで網を併用) またはたも網により 2019 年 7 月に採取した。採取したハナカジカは現地で腹びれまたは尾びれの小片を切除・回収したのち、放流した。組織片は 99.5%エタノールに液浸し、DNA 抽出まで実験室にて -20℃ で保管した。DNA 抽出は QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社) と Genomic DNA Extraction Column (FAVORGEN 社) を用いて、QIAGEN 社の標準プロトコルに沿って実施した。

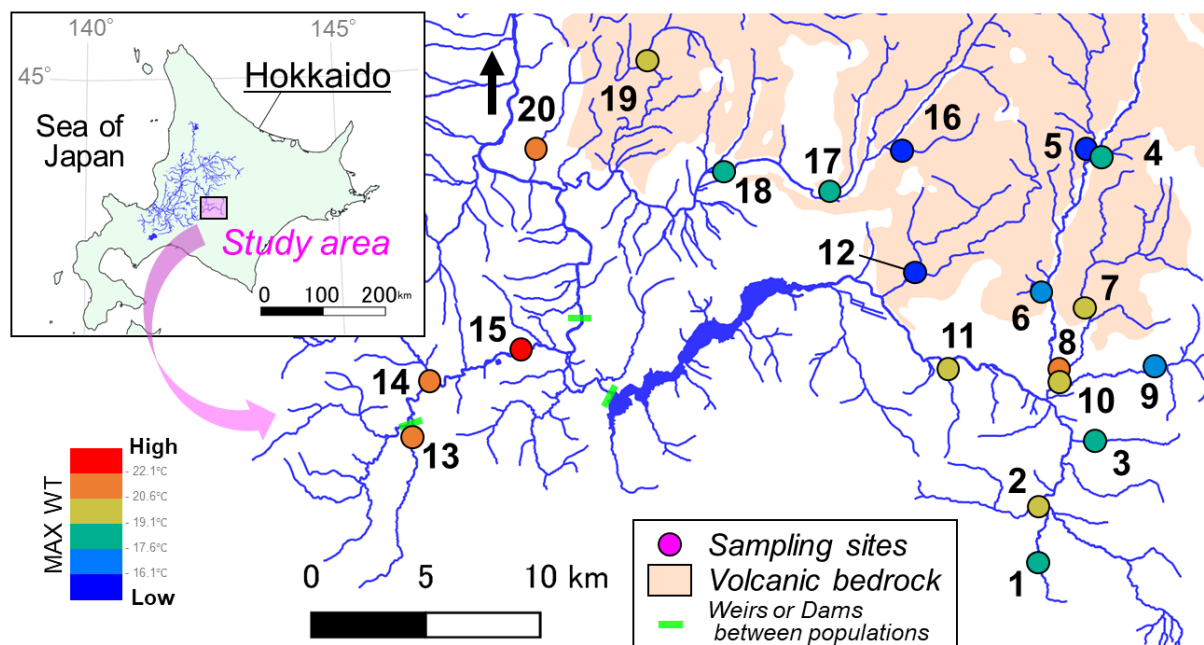


Fig. 3-1. Sampling localities in this chapter. The fill colors of the sampling site depend on the maximum water temperature. Site labels correspond to population IDs in the text and Table 3-1.

Table 3-1. Details of the sampling sites and genetic diversity of each population

Pop ID	Localities	Longitude (E°)	Latitude (N°)	Elevation (m)	N	H_E	F_{IS}
1	Tomamu River	142.670	43.057	526	32	0.121	0.016
2	Kinnosawa River	142.672	43.085	466	22	0.113	0.005
3	Shikerebenaizawa River	142.699	43.107	451	31	0.112	0.006
4	Ozawa River	142.703	43.218	511	30	0.113	0.004
5	Ehoroakanbetsu River	142.699	43.218	510	34	0.114	0.012
6	A tributary of the Seesorapuchi River	142.678	43.163	445	21	0.111	0.009
7	Pankeyara River (up)	142.699	43.155	450	32	0.112	0.007
8	Pankeyara River (down)	142.680	43.133	414	32	0.114	0.001
9	Peiyurushiebe River (up)	142.739	43.136	498	32	0.108	0.007
10	Peiyurushiebe River (down)	142.680	43.129	413	32	0.113	0.014
11	Ecchudantai-no-sawa River	142.624	43.137	387	32	0.113	-0.001
12	Ikutora River	142.603	43.173	376	32	0.113	0.009
13	Tonashibetsu River (up)	142.335	43.118	378	22	0.085	0.003
14	Tonashibetsu River (mid)	142.346	43.135	340	21	0.106	0.007
15	Tonashibetsu River (down)	142.393	43.149	289	22	0.113	0.014
16	Nishitappu River (up)	142.593	43.224	375	22	0.115	0.003
17	Nishitappu River (mid)	142.558	43.207	325	22	0.117	0.000
18	Nishitappu River (down)	142.501	43.216	292	19	0.112	-0.001
19	Roseppu River	142.463	43.260	336	21	0.101	0.002
20	Onkosawa River	142.403	43.218	239	20	0.108	0.038*

N, number of individuals; H_E , expected heterozygosity; F_{IS} , fixation index (significant deviation from zero is denoted by asterisks; * $p < 0.05$ after Bonferroni correction).

3-2-2. 水温観測

各調査地点にて、夏季期間における1時間おきの水温を水温記録ロガー(地点により ONSET 社または Gemini Data Loggers 社)により観測した。水温記録ロガーは流れがみられる水際部において、水面より 5 cm 以上下方に設置した。観測は 2020 年に行ったが、一部の地点では 2019 年の夏季にも行った。データの期間を合わせるために、2020 年 7 月 16 日から 2020 年 8 月 31 日までのデータを用い、外れ値がないことを確認したうえで当該期間の最高水温を特定した。ただし、1 地点 (Pop10) のみ一部期間の水温が測定できていなかったため、2019 年のデータを代用した。本章では、より冷水性魚類の生態に影響を与えられている最高

水温（Yagami and Goto 2000）を、夏季水温を代表する値として用いた。地点間の夏季水温差と河川に沿った地理的距離（以降、単に「地理的距離」という。）の相関を R 3.6.0（R Core Team 2019）のパッケージ *ecodist* 2.0.3（Goslee and Urban 2007）を用いた Mantel 検定（9999 回置換）により調べた。その後、夏季水温の空間的自己相関を調べるため、Mantel コレログラム（9999 回置換）により夏季水温差の空間構造の有無を距離階級ごとにプロットした。距離階級は等間隔の 10 階級とし、R のパッケージ *vegan* 2.5.6（Oksanen et al. 2019）により解析した。

3-2-3. MIG-seq 法のライブラリ調整とシーケンス、SNP の検出

遺伝データの取得には MIG-seq（multiplexed ISSR genotyping by sequencing；Suyama and Matsuki 2015）法を用いた。MIG-seq 法はあらゆる生物に多数存在するマイクロサテライト配列に挟まれた領域を PCR によって増幅させ、進化に対して中立と考えられる多数の一塩基多型（SNP）の情報を得るゲノムワイド SNP 解析手法である。Suyama et al.（2022）のプロトコルに基づき抽出 DNA から MIG-seq ライブラリを作成し、Illumina MiSeq および MiSeq Reagent Kit v3（150 cycles）（Illumina 社）を用いた次世代シーケンスに供試した。得られた多数の 80 bp の配列情報（生データ）は DDBJ Sequence Read Archive に登録した（アクセッションナンバー：DRA011249）。

生データの取得後、低クオリティリードおよびアダプター配列の除去を Trimmomatic 0.39（Bolger et al. 2014）によって行った。得られた 39,956,740 リードの配列情報から個体ごと・遺伝子座ごとの SNP を抽出する工程は STACKS 2.41（Catchen et al. 2013）を用いて実施した。STACKS では、（1）*ustacks*・*cstacks*・*sstacks*・*tsv2bam*・*gstacks* コマンドにより各配列情報を遺伝子座ごとに整理した後、（2）*populations* コマンドで SNP を抽出する。ステップ（1）におけるパラメーターは、Paris et al.（2017）の推奨にも準拠して $m=3$ 、 $M=2$ 、 $n=2$ 、 $N=4$ とした。ステップ（2）においては、ほとんどの解析（3-2-6 章の解析を除く）では全サンプルの 80%以上で共有されている遺伝子座のみを SNP の抽出対象とした（ $-R\ 0.8$ ）。その際、フィルタリングオプションとして最小対立遺伝子数は 3 とし（ $--min-mac\ 3$ ）、過剰なヘテロ接合度を示すサイトは除外し（ $--max-obs-het\ 0.6$ ）、各遺伝子座の 2 個目以降の SNP は抽出しないという条件を付加した（ $--write-single-snp$ ）。フィルタリングの結果、489 の SNP が得られた。

3-2-4. 集団遺伝構造、遺伝的多様性、および遺伝的分化

集団遺伝構造は STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) によって推定した。STRUCTURE 解析はベイズ推定に基づいたクラスタリング手法であり、 K 個の仮想的祖先集団 (クラスター) を仮定し、各個体のゲノムにおける各クラスターからの混合率を推定する。STRUCTURE 解析の設定はデフォルトの混合モデル、allele frequency correlated モデルとし、事前情報に集団情報を用いる LOCPRIOR オプション (Hubisz et al. 2009) を付加した。解析は K の範囲を 1 から 14 とし、各 K で独立した 20 回のランを行った。すべてのランは burn-in を 20000 回、その後の MCMC を 30000 回とした。プログラム CLUMPAK (Kopelman et al. 2015 ; clumpak.tau.ac.il/) を用いて各 K について 20 回のランの結果から主なパターンを特定・統合した後、STRUCTURE HARVESTER (Earl and vonHoldt 2012) を用いて各 K における事後確率 (LnP(D)) の平均と標準偏差を求めるとともに最適 K の目安となる ΔK (Evanno et al. 2005) を算出した。

各集団において、集団内の遺伝的多様性を示すヘテロ接合度期待値 (H_E) および観察されたヘテロ接合体とホモ接合体のバランスを示す固定指数 (F_{IS}) を、STACKS 内の *populations* コマンドにより求めた。各集団のハーディー・ワインベルグ平衡からの逸脱の有無は FSTAT 2.9.4 (Goudet 1995) にて F_{IS} のゼロからのズレを 1000 回反復の置換検定により評価することで判断した。

集団間の遺伝的分化は 2 つの統計量により評価した。1 つは、遺伝的分化の統計量として最も有名な (Holsinger and Weir 2009 ; Ma et al. 2015) F_{ST} である。 F_{ST} は Wright の定義 (Wright 1949) 、根井の定義 (Nei 1973 ; G_{ST} と呼ばれる)、Weir and Cockerham の定義 (Weir and Cockerham 1984 ; θ_{ST} と呼ばれる) など複数の計算方法があり、それぞれ仮定する集団モデルなどが異なるものの基本的にはいずれも近い値となる (Jenkins et al. 2010) 。本章での F_{ST} は Weir and Cockerham (1984) の定義に基づき、GenALEx 6.5 (Peakall and Smouse 2012) を用いて求めた。 F_{ST} の計算においては、以降の解析に用いる集団間のペアワイズ F_{ST} に加え、調査集団全体にわたる F_{ST} (グローバル F_{ST}) も求めた。本研究で F_{ST} に加えて着目した遺伝的分化の統計量は、対立遺伝子頻度距離 (allele frequency distance ; AFD) (Shriver et al. 1997 ; Sherwin 2022) と D_{PS} (1-共有対立遺伝子の割合) (Bowcock et al. 1994) である。 AFD は群集生態学の Bray-Curtis 非類似度と類似する非常にシンプルな統計量であるが、 F_{ST} 系列の統計量よりもローカールスケールの研究で重要な遺伝的分化が小さい範囲における感度が高いこと、集団間の最小対立遺伝子頻度やサンプル数の違いの影響を受けにくいことなどが実証的

に示されており (Berner 2019)、景観遺伝学において有用だと考えられる。また、保全方策を考えるうえで重要なのは現在進行中の遺伝子流動の多寡であるが (Cruzan & Hendrickson 2020)、シミュレーション研究などにより D_{PS} が最近 (概ね 10~20 世代未満) の遺伝子流動をよく反映する統計量であることが示されており (Landguth et al. 2010; Leroy et al. 2018; Savary et al. 2021)、実際に景観遺伝学的分野でしばしば使われてきている。このように、 AFD と D_{PS} はこれまで別々の文献やアプローチでローカールスケールの遺伝子流動の評価に有用であろう性質が示されてきた統計量であった。しかし、予備検討により、実際にはこれらは同一の統計量であり、前述した性質をすべて保持すると考えられることが分かった。なぜなら、ある遺伝子座における集団 A、集団 B における i 番目の対立遺伝子の頻度をそれぞれ p_{iPopA} 、 p_{iPopB} すると、集団 A と集団 B の AFD と D_{PS} はそれぞれ以下のように定義される。

$$AFD = \frac{1}{2} \left(\sum_i |p_{iPopA} - p_{iPopB}| \right) \quad (3.1)$$

$$D_{PS} = 1 - \sum_i \min(p_{iPopA}, p_{iPopB}) \quad (3.2)$$

ここで、

$$\begin{aligned} |p_{iPopA} - p_{iPopB}| &= \max(p_{iPopA}, p_{iPopB}) - \min(p_{iPopA}, p_{iPopB}) \\ \max(p_{iPopA}, p_{iPopB}) + \min(p_{iPopA}, p_{iPopB}) &= p_{iPopA} + p_{iPopB} \end{aligned}$$

なので、

$$|p_{iPopA} - p_{iPopB}| = p_{iPopA} + p_{iPopB} - 2\min(p_{iPopA}, p_{iPopB})$$

両辺をすべての対立遺伝子 i について足し合わせると、 $\sum_i p_{iPopA} = 1$ 、 $\sum_i p_{iPopB} = 1$ なので、

$$\sum_i |p_{iPopA} - p_{iPopB}| = 2 - 2 \sum_i \min(p_{iPopA}, p_{iPopB})$$

両辺を 2 で割ると

$$AFD = D_{PS} \quad (3.3)$$

となることが分かる。このことから、本研究 (以降の章を含む) では、この統計量を一貫して D_{PS} と表記し、 F_{ST} よりも最近の遺伝子流動を反映し、かつローカールスケールでの感度の高い遺伝的分化の統計量として、 F_{ST} と併せて用いることとした。なお、この統計量は式 3.1 および式 3.2 のように p_i (集団内における i 番目の対立遺伝子の遺伝子頻度) のみに依存するため、ミトコンドリア DNA (mtDNA) など得た 1 倍体データにおいても、それぞれのハプロタイプを 1 つの対立遺伝子とみれば適用可能と想定される。本章において D_{PS} は R のパッケージ

graph4lg (Savary et al. 2021) により計算した。

また、遺伝的変異の空間構造を調べるため、R のパッケージ *vegan* を用いて、Mantel コレログラム (9999 回置換) により F_{ST} または D_{PS} と地理的距離の相関を 10 個の距離階級ごとにプロットした。

3-2-5. 地理的距離と夏季水温差が遺伝的分化に与える影響

遺伝的分化と地理的距離および夏季水温の関係を調べるために、集団間の遺伝的分化 (F_{ST} 、 D_{PS}) と地点間の地理的距離および最高水温差との相関を Mantel 検定 (9999 回置換) により評価した。また、地理的距離と夏季水温の交絡がある可能性を鑑み、集団間の遺伝的分化を目的変数、「地理的距離+最高水温差」を説明変数とする行列における重回帰分析 (multiple regression on distance matrices ; MRM ; Lichstein 2007) (9999 回置換) を行った。Mantel 検定と MRM は R のパッケージ *ecodist* で行った。これらはすべての集団 (20 集団 ; 集団間の地理的距離 0.3~70.6 km) の他に、金山ダムの上流のみの 12 集団 (Pop1~12 ; 集団間の地理的距離 0.3~24.1 km)、および STRUCTURE 解析で概ね単一のクラスターに割り当てられた 9 集団 (Pop4~12) のみを対象とした解析も行った。12 集団での解析は、ハナカジカの移動性を考慮するとともに、金山ダムを挟むことにより生じるサンプリング地点の空間的偏りを避けるために行った。また、IBD の評価において遺伝的に離れた集団が含まれていると、その集団に解析結果が引っ張られ、全体的な傾向が見えにくくなる可能性も指摘されている (Koizumi et al. 2006) 。9 集団での解析は、そのようなバイアスを除いた場合の結果を確認するために行った。

3-2-6. 双方向的な遺伝子流動の推定

ソース・シンク構造などの非対称的な遺伝子流動のパターンを捉えるため、直近数世代の移住に伴う双方向的な遺伝子流動をベイズ法により推定する BayesAss (Wilson and Rannala 2003) の改造版である BA3SNP (Mussmann et al. 2019) を 20 集団に対して適用した。解析に先立ち、BayessAss の収束率を改善するため 3-2-3 章とは異なる基準により SNP を抽出した。STACKS のステップ (1) で得られたデータセットから、*populations* コマンドにて少なくとも 2 集団で 40%以上で共有されている遺伝子座にある SNP を抽出した (-p 2 -r 0.4)。他のフィルタリングオプションは 3-2-3 章と同様とした。フィルタリングの結果、1291 の SNP が得られ

た。BayesAss の設定は、burn-in 10,000,000 回を含む MCMC 20,000,000 回とした。Meirmans (2014) の提案に従い、seed 値を変化させた 10 回の独立したランを行い、最もベイズ偏差が低いランの結果を採用した。BayesAss で推定される移入率の 95%信頼区間がゼロを含まないものを有意な遺伝子流動とした。さらに、Pop A における Pop B からの「純移入率」を $Imm_{B \rightarrow A} - Imm_{A \rightarrow B}$ ($Imm_{i \rightarrow j}$ は Pop j における Pop i からの推定移入率) と定義し、各集団について、他の集団からの純移入率を平均した値である「平均純移入率」(Hänfling and Weetman 2006; Sexton et al. 2016) を推定値から算出した。高い平均純移入率をとる集団ほど個体の受け手(シンク)、低い値をとる集団ほど個体の供給源(ソース)としての役割を流域内で担っていると考えられる。一般に河川では上流から下流への非対称的な遺伝子流動がみられることが多いため(Blanchet et al. 2020)、夏季水温が上流から下流への遺伝子流動とは独立にどの程度影響を与えているかを確認するため、平均純移入率を応答変数、標高と最高水温を説明変数とする線形モデルを作成した。標高と最高水温の Pearson の相関係数は-0.39 であり、多重共線性の影響は低いと考えられた。夏季水温と標高のそれぞれが与える影響の大きさは偏回帰係数(β)と標準偏回帰係数($\text{std } \beta$)により評価した。また、各変数の有意性について R のパッケージ lmtest (Zeileis and Hothorn 2002) を用いた尤度比検定で確認した。

3-3. 結果

各サンプリング地点における最高水温は流域内で大きなばらつきがみられ、12.5~23.5°C の値をとった。地点間の最高水温差と地理的距離の相関は小さく (Mantel $r = 0.08$ 、 $p = 0.45$)、Mantel コレログラムにおいても最高水温差と地理的距離との相関はすべての距離階級において有意にはみられず (Fig. 3-2a)、夏季水温の空間的自己相関がほとんどみられないことが示された。

F_{IS} は 1 集団 (Pop20) を除きゼロからの有意な逸脱はみられず、ほとんどの集団がハーディ・ワインベルグ平衡に従うと仮定できた (Table 3-1)。集団内の遺伝的多様性を示す H_E は、砂防ダムの上流に隔離された 1 地点 (Pop13) を除いてほとんど同程度だった (Table 3-1 ; Fig. 3-3)。20 集団全体でのグローバル F_{ST} は 0.038 であり、流域内に弱い集団遺伝構造があることが認められた。集団間のペアワイズ F_{ST} は 0.001~0.127 の値をとった。Mantel コレログラムにおける Mantel r は、遺伝データとして F_{ST} 、 D_{PS} のどちらを用いた場合においても、2 つ目の距離階級 (約 15 km) までは有意に正の値を取り、27 km 付近でゼロに達した (Fig. 3-2b,

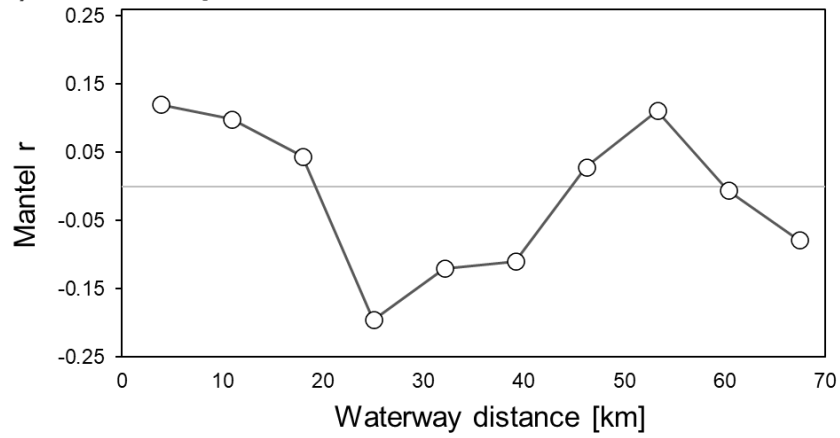
c)

STRUCTURE 解析では、 $K = 6$ までは河川の地理的構造に沿ったクラスターが推定された (Fig. 3-4a)。事後確率 (LnP(D)) は K を増加させるにつれ上昇していき、 ΔK は $K=4$ で最大値をとった (Fig. 3-4b)。 $K=2$ のとき、砂防ダムの上流にあたる Pop13 の個体が固有なクラスターに由来すると推定された。 $K=4$ では主に Pop1~3、Pop16~19 がそれぞれ異なるクラスターに割り振られた。Pop14・15・20 は $K=4$ のときは2つのクラスターの混合として推定されたが、 $K=6$ では固有のクラスターに由来すると推定された。 $K=6$ のときは Pop3 も固有のクラスターに割り振られた。また、Pop4~12 は K を大きくしてもほとんど単一のクラスターに割り当てられた。

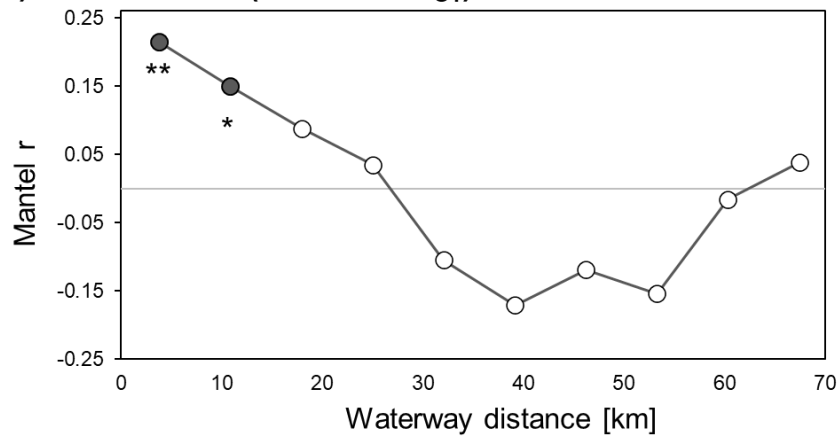
Mantel 検定は集団間の遺伝的分化 (F_{ST} 、 D_{PS}) と地理的距離の有意な相関を捉え (F_{ST} の場合 : Mantel $r = 0.27$, $p < 0.05$; D_{PS} の場合 : $r = 0.38$, $p < 0.001$; Fig. 3-5)、IBD の存在を示した。一方、遺伝的分化と最高水温差との相関はまったくみられなかった (F_{ST} の場合 : Mantel $r = -0.10$, $p = 0.56$; D_{PS} の場合 : $r = -0.08$, $p = 0.64$)。地理的距離と最高水温差の双方を説明変数にとった MRM は、モデルの有意な適合を示さず、 R^2 値も地理的距離のみを説明変数とした Mantel r の2乗とほとんど変わらなかった (F_{ST} の場合 : $R^2 = 0.087$, $p = 0.13$; D_{PS} の場合 : $R^2 = 0.156$, $p = 0.05$)。異なる空間スケールのデータセットを用いた場合でも基本的には似た結果となったが、金山ダム上流のみの12集団で解析した場合は遺伝的分化と地理的距離との相関に有意性はみられなかった (Table 3-2)。

BayesAss による遺伝子流動解析では、11 の有意な遺伝子流動が検出された (Table 3-3 ; Fig. 3-6)。そのすべてが夏季水温の低い地点 (平均 14.3°C [SD 2.90]) から高い地点 (平均 20.0°C [SD 1.84]) へ向かう方向の遺伝子流動であった。有意な遺伝子流動の多くは上流側から下流側への遺伝子流動であったが、一部に、より高標高側に位置する高水温地点への遺伝子流動 (Pop5→4、Pop12→11) もみられた (Table 3-3)。線形モデルは、夏季水温は有意に平均純移入率に影響を与えているが ($\text{std } \beta = 0.542$; $p < 0.05$)、標高の影響は有意ではない ($\text{std } \beta = -0.077$; $p = 0.70$) ことを示唆した (Table 3-4)。夏季水温の低い地点は平均純移入率が低く、相対的にソースとして機能している関係が示された (Fig. 3-7)。

(A) Water temperature



(B) Genetic data (based on F_{ST})



(C) Genetic data (based on D_{PS})

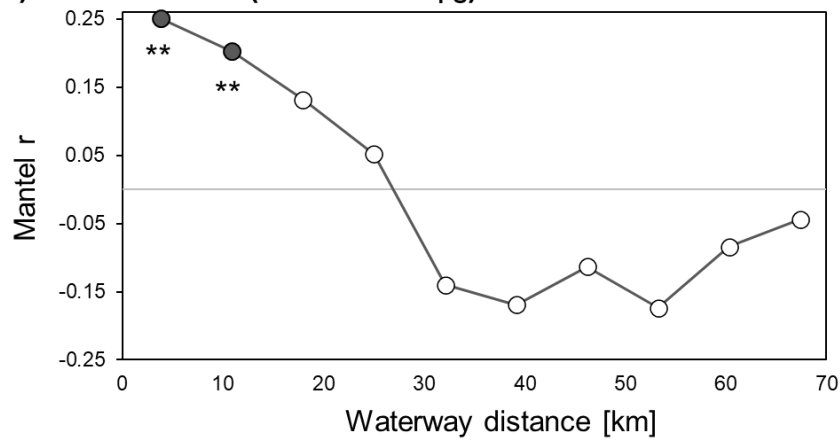


Fig. 3-2. Mantel correlograms showing spatial autocorrelation of summer water temperature (A) and genetic data (B, C). Filled circles indicate significant correlations from a null model of spatial structure (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

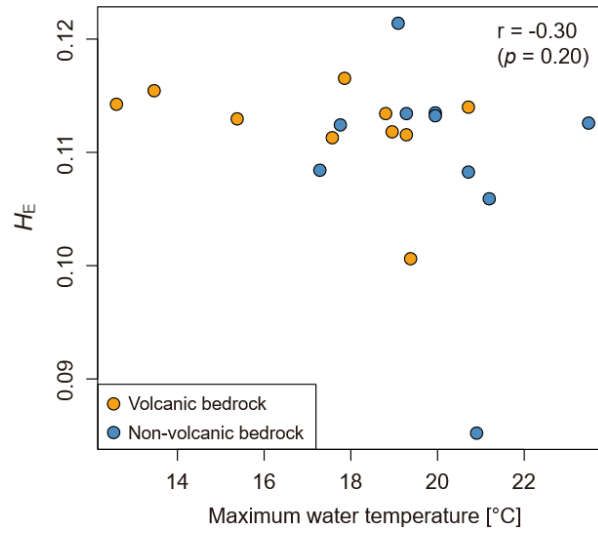


Fig. 3-3. Genetic diversity of each population. Scatter plots of H_E versus summer water temperature is displayed.

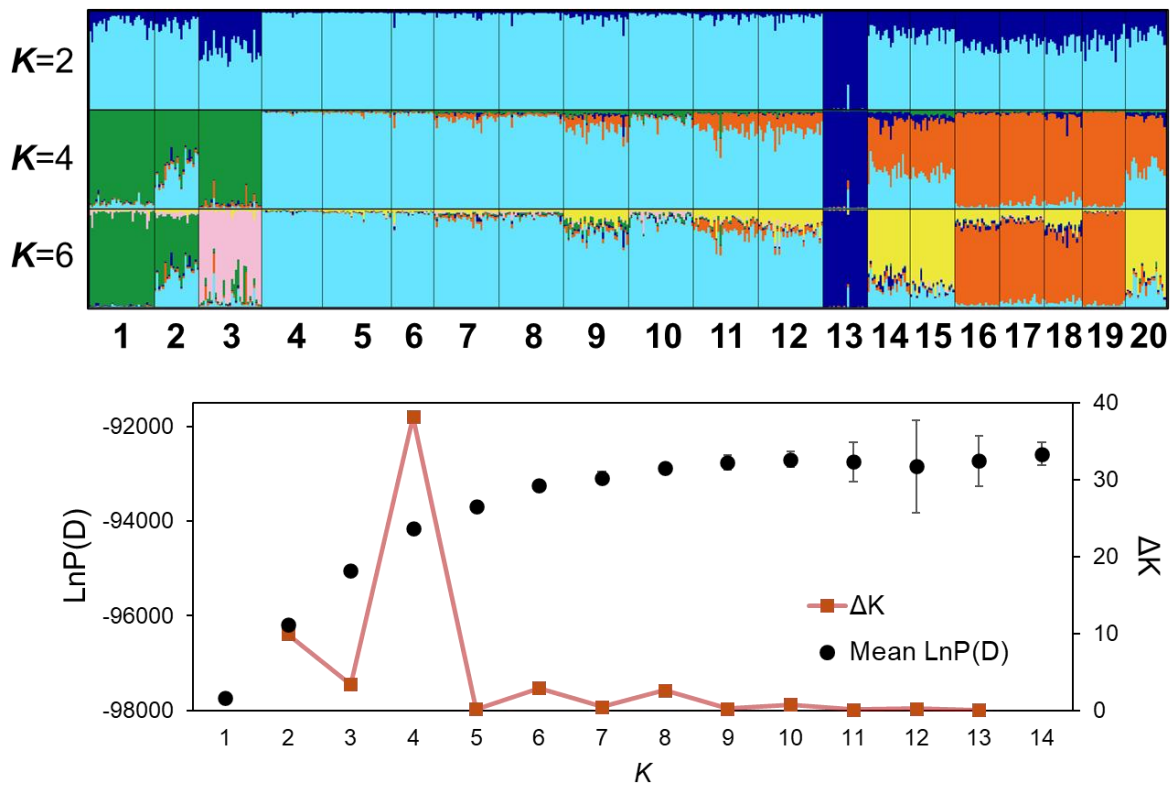


Fig. 3-4. Population structure inferred by STRUCTURE, assuming that all individuals are derived from K clusters ($K = 2, 4$, and 6). (A) Barplots displaying inferred population structure. The figure consists of thin barplots representing the proportion of assigned clusters of each individual. The number indicates the population IDs. (B) The values of posterior probability of the data ($\text{LnP}(D)$) from 20 runs for each value of K (left axis) and ΔK (right axis) in the STRUCTURE analysis.

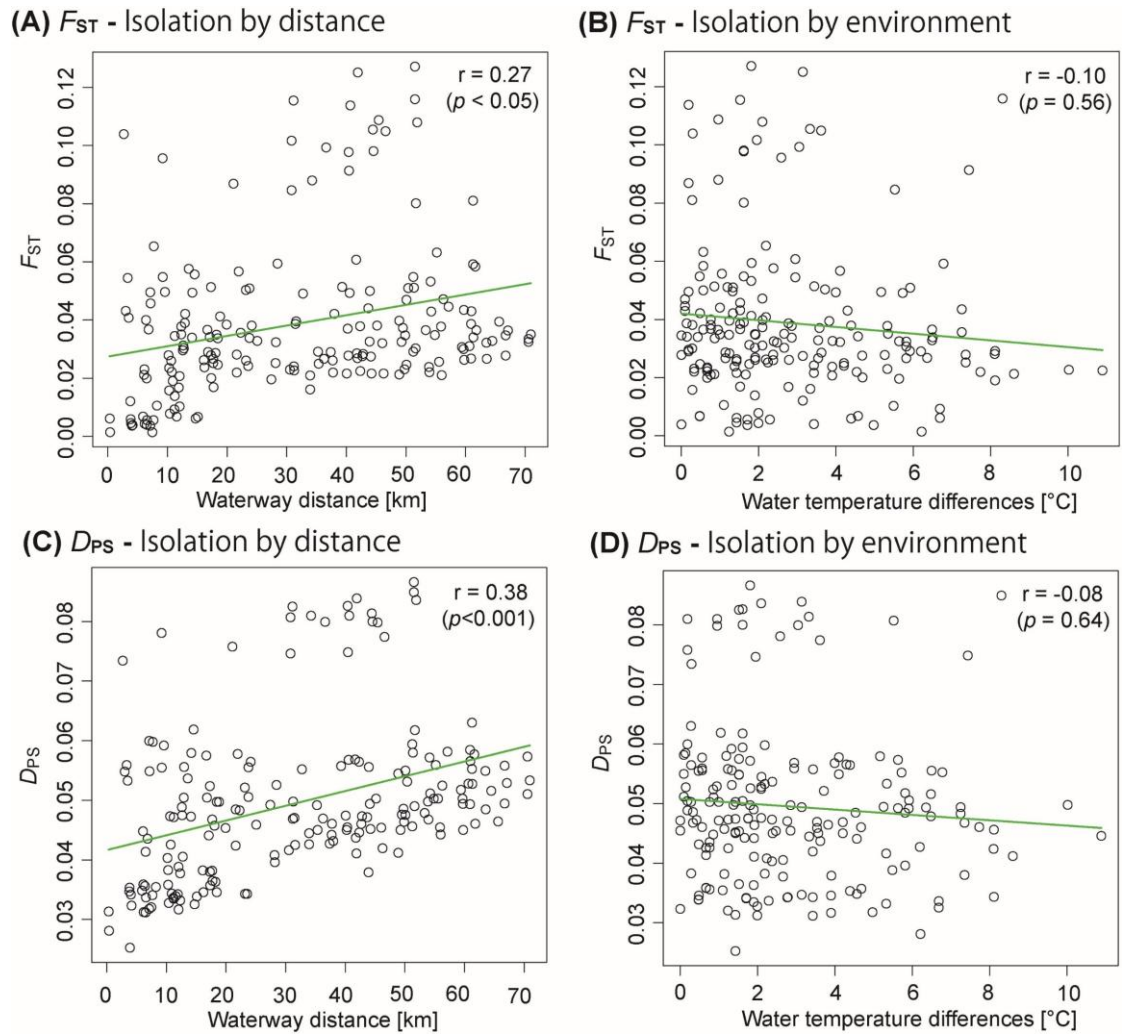


Fig. 3-5. Relationship of genetic differentiation with summer water temperature and geographic distance. Scatter plots of pairwise F_{ST} (A, B) or D_{PS} (C, D) versus geographic distance (A, C) and water temperature differences (B, D) are displayed.

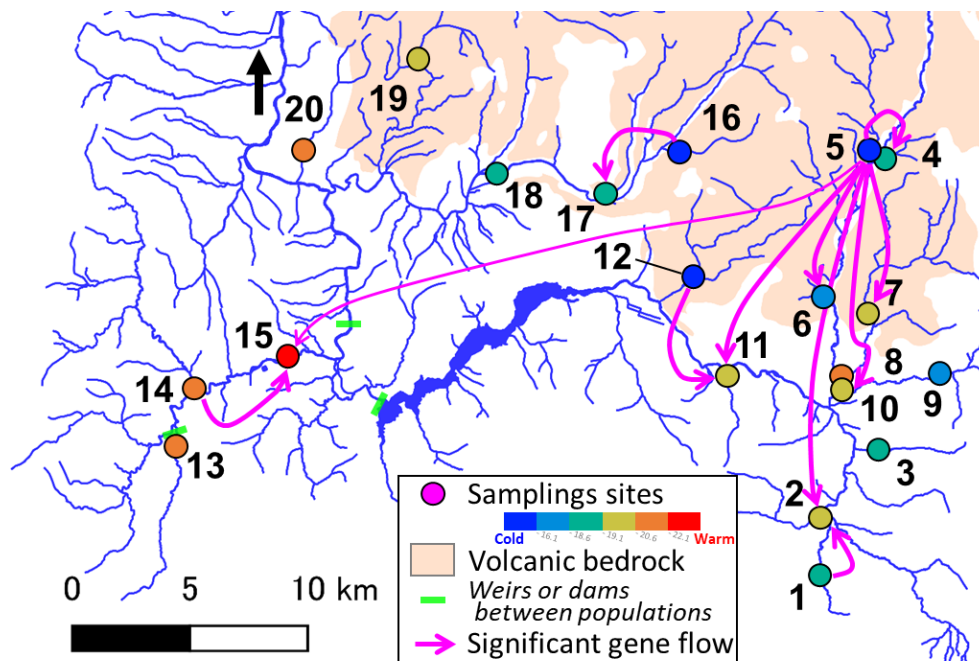


Fig. 3-6. Map displaying the significant gene flow (Table 3-3) estimated by BA3SNP (BayesAss).

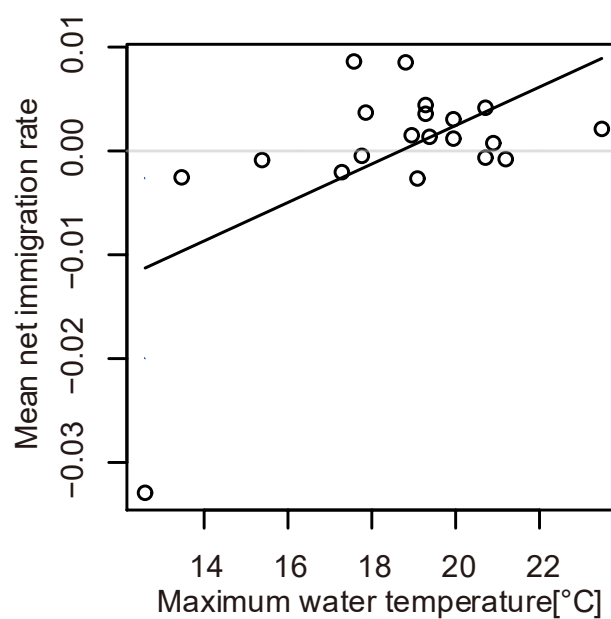


Fig. 3-7. Variation in the mean net immigration rate with maximum water temperature. Populations with negative net immigration (i.e., greater emigration) indicate relative source populations, whereas populations with positive values (i.e., greater immigration) indicate relative sink populations. The dashed lines indicate the 95% confidence interval.

Table 3-2. Summary of Mantel tests and multiple regression on distance matrices (MRM) on three spatial scales for examining the effect of space and water temperature on genetic differentiation (F_{ST} and D_{PS}).

Response matrices	Explanatory matrices	All 20 populations	Upstream 12 populations	Structured 9 populations
F_{ST}	Mantel test (r^2)			
	Water temperature differences	0.010 [†] ($p=0.56$)	0.023 [†] ($p=0.53$)	0.000 ($p=0.94$)
	Geographic distance	0.072 ($p<0.05$)	0.074 ($p=0.24$)	0.298 ($p<0.05$)
	MRM (R^2)			
	Geographic distance + Water temperature differences	0.087 ($p=0.13$)	0.116 ($p=0.32$)	0.304 ($p<0.05$)
D_{PS}	Mantel test (r^2)			
	Water temperature differences	0.006 [†] ($p=0.64$)	0.045 [†] ($p=0.35$)	0.013 [†] ($p=0.65$)
	Geographic distance	0.144 ($p<0.05$)	0.045 ($p=0.39$)	0.241 ($p<0.05$)
	MRM (R^2)			
	Geographic distance + Water temperature differences	0.156 ($p=0.05$)	0.111 ($p=0.35$)	0.275 ($p<0.05$)

Mantel r values were squared to compare MRM R^2 values. P -values were obtained by two-tailed tests.

Upstream 12 populations, Pop1-12; Structured 9 populations, Pop4-12. †: original r values were negative.

Table 3-3. Significant migration estimated by BA3SNP (BayesAss). The estimated immigration rate and its 95% creditable interval (95% CI) are shown.

Direction			Δ elev	Δ SWT	WD	Estimate	95% CI
Pop1	to	Pop2	-60	+0.9	6.1	0.033	0.003–0.063
Pop5	to	Pop2	-44	+7.4	17.7	0.040	0.007–0.072
Pop5	to	Pop4	+1	+6.2	0.4	0.201	0.156–0.246
Pop5	to	Pop6	-65	+5.0	7.1	0.155	0.105–0.205
Pop5	to	Pop7	-60	+6.7	14.7	0.084	0.045–0.123
Pop5	to	Pop10	-97	+6.7	11.2	0.064	0.029–0.098
Pop5	to	Pop11	-123	+7.4	17.3	0.038	0.010–0.066
Pop5	to	Pop15	-221	+10.9	42.3	0.032	0.003–0.060
Pop12	to	Pop11	+11	+4.6	5.9	0.026	0.002–0.050
Pop14	to	Pop15	-51	+2.3	6.5	0.045	0.010–0.080
Pop16	to	Pop17	-50	+4.4	3.8	0.071	0.031–0.112

Δ elev, changes in elevation along the direction of migration [m]; Δ SWT, changes in summer water temperature along the direction of migration [$^{\circ}$ C]; WD, waterway distance [km]

Table 3-4. The linear model explaining the mean net immigration rate. *P*-values were obtained by likelihood ratio tests.

Variable	β ($\pm$ SE)	std β	χ^2	<i>p</i>
(Intercept)	-2.97×10^{-2} ($\pm 1.85 \times 10^{-2}$)	--	--	--
elevation	-7.86×10^{-6} ($\pm 2.21 \times 10^{-5}$)	-0.077	0.15	0.70
Summer water temperature	1.76×10^{-3} ($\pm 6.97 \times 10^{-4}$)	0.542	6.35	<0.05

β , partial regression coefficient; std β , standardized partial regression coefficient

3-4. 考察

3-4-1. 集団遺伝構造

河川生物においては、上流から下流方向への偏った遺伝子流動などにより遺伝的多様性は上流ほど低く、下流ほど高いというパターンが一般的にみられると認識されている (Thomaz et al. 2016 ; Blanchet et al. 2020) 。しかし、本章の研究では、遺伝的多様性は流程を通して概ね一定であった (Fig. 3-3 ; Table 3-1) 。本種にとって上流の方が生息に適した環境が多いことや、上一下流方向だけではない遺伝子流動があること (Table 3-3) が、上流の遺伝的多様性の低下を抑制していたと考えられる。

調査地点全体におけるグローバル F_{ST} は 0.038 と低めであった。東北地方のハナカジカを扱った研究では、同一水系内での高い遺伝的分化が示されており (Ito et al. 2018) 、ハナカジカ以外の淡水性カジカでも 30~50 km² の規模で本研究よりも高い F_{ST} 値が複数報告されている (Hänfling and Weetman 2006 ; Junker et al. 2012 ; Ruppert et al. 2017 ; but see Peacock et al. 2016) 。本研究において遺伝的分化の統計量がやや低い値をとったのは、流域内の遺伝子流動の存在に加え、集団サイズが大きく共通祖先からの遺伝的浮動が小さかったことにもよると考えられる。

遺伝的分化は比較的小さかったものの、高解像度のゲノムワイド SNP 解析により、流域内において地理的構造に沿った明瞭な集団遺伝構造が観測された (Fig. 3-4) 。この集団遺伝構造が成り立つ要因として IBD・IBE の有無を調べた結果、遺伝的分化と地理的距離の間には有意な相関が認められたが、夏季水温の差が遺伝的分化を促進する傾向はみられなかった (Fig. 3-5) 。このことから、ハナカジカにおいて水温の違いが局所適応を介して遺伝的分化を引き起こしている可能性は低いと考えられた。

カジカ属の集団遺伝構造と環境の違いとの関連を調査した研究は少ない。Ruppert et al.

(2017) は、遺伝的分化と標高の違いとの関係进行分析し、標高による IBE のパターンを示した。別の研究では、異なる生息地タイプ（河口・本流と支流）間での遺伝的分化が示されている（Dennenmoser et al. 2014）。本章での IBE がみられなかった結果はこれら研究とは異なっていた。ほとんどの研究では環境と空間の相関を排除できていないため、カジカ属の IBE が野生集団で一般的であるかは慎重に検討すべきであろう。

本章の研究では遺伝的分化の形成要因について明らかにできていない部分が多い。例えば、STRUCTURE 解析でも 1 つのクラスターとして検出された Pop1~3 が Pop4~12 との高い遺伝的分化を形成している要因は本章で用いたアプローチからは分からない。本章の研究では各調査地点の夏季水温のみを環境要因として使用したが、遺伝的分化の要因は集団間の移動経路全体にもある可能性がある（第 5 章で検討する）。

3-4-2. 遺伝子流動

集団遺伝構造と環境の違いとの関係に関するもう 1 つの重要な知見は、双方向的な遺伝子流動の推定によって得られた。ほとんどの有意な遺伝子流動は 15 km 以内の集団ペア間で検出され、これは Mantel コレログラム（Fig. 3-2b, c）で遺伝的変異の空間的自己相関が有意に正であった空間スケールと一致する。有意な遺伝子流動のほとんどは上流から下流または下流の支流への方向（Table 3-3 ; Fig. 3-6）であり、これは上一下流のソース・シンク構造を示した先行研究（Hänfling and Weetman 2006 ; Junker et al. 2012）とも一致する。しかし、本章で特筆すべきは、下流の夏季水温の低い支流から上流の夏季水温の高い支流への遺伝子流動も検出されたことである。もちろん BayesAss の推定値の精度には注意が必要であるが（Meirmans 2014）、推定結果は明確な傾向を示しており、夏季水温が低い好適な生息地が流域内で本種の個体供給源として機能しているといえるだろう。夏季水温が平均純移入率に与える影響は標高の影響よりも大きく（Table 3-4）、夏季水温の低い地点は他地点への個体の供給がより活発であった（Fig. 3-7）。

夏季水温の低い支流は個体供給源として機能している可能性が示されたものの、遺伝的多様性が高いという傾向は認められなかった（Fig. 3-3 ; Table 3-1）。夏季水温の低い支流は、移入よりも移出が多いことから、他の支流からの遺伝的変異の流入は小さいと考えられる。一方で、これら支流は生息地としては好適で再生産は盛んに行われていることが想定され、集団内での新たな遺伝的変異の創出や遺伝的多様性の維持はなされやすいと考えられる。逆に、

夏季水温の高い支流では、集団内で遺伝的変異は創出・維持されにくい一方で、他の集団からの流入により遺伝的変異が保たれていると考えられる。これらは、遺伝的多様性と夏季水温に一貫した関係がみられなかったことを説明する。 F_{IS} がほとんどの集団でゼロに近かったことも、いずれの集団でも近親交配がみられず、各集団で多様な遺伝的変異が維持されていることを支持するだろう。

本研究では、異なる夏季水温を有する近接した集団間で有意な遺伝子流動が検出されたが、この結果は異なる環境間での遺伝子流動が豊富である「環境傾度に対応した遺伝子流動」のパターンに属する (Sexton et al. 2014)。IBE は、似た環境間での遺伝子流動が活発な場合に検出されるため、環境傾度に対応した遺伝子流動は IBE とは反対のプロセスにより生じるものであり、IBE を抑制する方向にはたらく。この遺伝子流動を駆動する生態学的プロセスは本研究からは特定できないが、少なくとも Suzuki et al. (2021) が本研究と同流域で報告した個体群密度の違い（夏季水温の低い地点で密度が高いこと）と関連している可能性がある。個体群密度が高い支流では、より多くの資源を求めて移動する個体や、洪水等で本流方向に受動的に流される個体は増加すると考えられ、これらが移出率の増加に繋がったと考えられる。

Goto (1998) は標識採捕法により、本種の成体のほとんどが 1 年以上同じ場所に留まることを報告した。標識採捕法が成体の移動のみを扱うのに対し、集団遺伝学的なアプローチは標識採捕法では容易に捉えられない幼生期の移動も反映する (Lamphere and Blum 2012)。受動的な遺伝子流動（幼体や卵の分散）が遺伝子流動の主な要因である場合、本研究で得られた一部の高い移住率は標識採捕法の結果と矛盾しない。さらに、淡水性カジカの遺伝的手法を用いた過去の研究では、本研究で得られた移住率と同程度の値や遺伝情報と標識採捕法で得られた推定値の相違が報告されており (Lamphere and Blum 2012 ; Junker et al. 2012)、検出された遺伝子流動の程度が理にかなっていることを示唆している。また、近年、淡水性カジカにおいても、生息地の状況によっては未占有の生息適地を求めて移動する個体がいることが、耳石解析や大量死後の追跡調査などにより示されてきている (Clarke et al. 2015 ; Mundahl 2024)。本研究は淡水性カジカにおいて流域内での移動分散がある程度みられる証拠を追加する事例ではあるが、推定された遺伝子流動の水準や、一部で検出された長距離の遺伝子流動が常に観測されるかどうかは、依然として不明である。例えば、BayesAss の推定結果はサンプル採取時から過去数世代（ハナカジカでは 10 年未満）の移住（複数世代をかけた移住を含

む)に伴う遺伝子流動のシグナルを強く拾う。本流域ではサンプリング年の3年前に生じた北海道豪雨により河川が大きく攪乱されており、このような洪水が一時的に分散を促進した可能性を排除できない点に注意が必要である (Natsumeda 2003 ; Blondel et al. 2021)。

3-4-3. 冷水性魚類保全への示唆

淡水性カジカの遺伝子には過去からの長期的な歴史が残っており、各水系の遺伝的多様性は維持されるべきである (Lucek et al. 2018)。空知川上流域のハナカジカは、流域内でも集団遺伝構造がみられ、支流ごとにそれぞれ特有の遺伝的組成を有していると同時に、遺伝子流動により支流間で緩やかな連結性が維持されていることが分かった。支流間の遺伝子流動は流域全体の遺伝的多様性の向上にはたらいていると考えられ、実際に砂防ダムにより孤立した集団である Pop13 は遺伝的多様性が低かった。遺伝的多様性を維持するための保全策について、空間自己相関係数 (Fig. 3-2b, c の r) が有意でなくなる距離が適切な保全単位の空間スケールであるという視点でみた場合 (Diniz-Filho and De Campos Telles 2002)、遺伝資源の保全のためには、通過不能な横断構造物等によって河川ネットワークを 15 km 未満に分断化すべきではないといえるだろう。しかし、集団遺伝構造の夏季水温との関連に着目することで、それだけでは十分ではないことが分かる。夏季水温が高い地点は生息適地度が低い (Suzuki et al. 2021)、より好適な生息地である夏季水温の低い河川からの個体の移入および遺伝子流動によって集団の遺伝的多様性が維持されていると考えられる。たとえ連続した生息地が長い区間で維持されているとしても、夏季水温の高い区間のみで構成される区間は個体の供給が不足し遺伝的多様性の低下や局所的な絶滅に繋がっていくと考えられる。したがって、現在進行中の気候変動下では、(1) 夏季水温の低い支流の保全、および (2) 個体供給源となる夏季水温の低い支流と他の支流との間に通行不可能な障壁を作らないことが、ハナカジカ集団を保全するうえで重要となるだろう。サケ科魚類に代表される他の冷水性魚類の研究事例は多く、本流域においてもオショロコマやアメマスにおいて支流間の移動性が高いことが明らかになっている (Koizumi 2011 ; Nakajima et al. 2020)。支流間の移動性が高い種では生息適地の保全が地域個体群の存続に重要なことを踏まえると、これらの指針はハナカジカを含む冷水性魚類全体の保全に効果的であると考えられる。流域地質は、潜在的なソース集団となる夏季水温の低い支流を特定するのに有用である。

3-4-4. 遺伝子流動評価への示唆

ローカルスケールの研究において、環境と空間の効果を分離することは競合仮説を評価するための強力なツールである (Gilbert and Lechowicz 2004)。このアプローチにより、本章では実際に属内でこれまで報告されてこなかった現象を明らかにすることができた。

本研究では、IBE ではなく、環境に依存したソース・シンク構造の可能性が示唆された。これまで、分布域の中心側にあるコア集団から周縁部にある集団へのソース・シンク構造については多く研究されてきた (Micheletti and Storfer 2015 ; Takahashi et al. 2016)。しかし、変動する環境下での集団遺伝構造を議論する際には、本章で対象としたような遺伝子流動と環境要因のパターンも重要であろう。ソース・シンク構造は保全や進化の観点から重要な洞察を提供するが (Iles et al. 2018)、過去のメタ解析では、ある環境から別の環境へのソース・シンク構造としてみられる環境傾度に対応した遺伝子流動は IBE に比べてはるかに報告頻度が低いことが示されている (Sexton et al. 2014)。これは、IBE がみられなかったという否定的な結果の研究は報告されにくい「出版バイアス」の影響に加え (Feder et al. 2012)、研究デザインとしてソース・シンク構造が扱われる頻度が少ないことにも起因すると考えられる。実際、遺伝子分析、デモグラフィ調査などの研究アプローチを問わず、ソース・シンク構造を調べた研究事例数は減少傾向にあるとされている (Heinrichs et al. 2019)。環境傾度に対応した遺伝子流動がプロセスの面で IBE と相反すること、IBE が近年発展している集団ゲノミクス研究 (適応遺伝子を含めた多数のマーカーを用いた集団遺伝学的研究) との親和性が高いことも、環境に依存したソース・シンク構造の検証事例が減っている理由かもしれない。遺伝子流動評価の際にサンプリング地点を戦略的に設定することは必ずしも行えない場合もあると考えられるが、少なくともソース・シンク構造の重要性を念頭に、複数の仮説を調べることとで、集団遺伝構造と遺伝子流動の現況をよりよく理解できるだろう。

第4章 環境 DNA 調査の景観遺伝学的解析への適用可能性の検証

4-1. はじめに

河川水などの環境中に含まれる生物由来の DNA を網羅的に検出し、生物情報を得る環境 DNA メタバーコーディング解析は、現地調査の負担が小さく非侵襲的に生物の種組成を把握できる手法として、河川管理の現場で急速に広がっている (Ruppert et al. 2019 ; Doi and Nakamura 2023 ; 中島 2024) 。さらに近年、環境 DNA メタバーコーディング解析が種を検出するだけでなく、遺伝的多様性の評価や系統地理学的解析など、種内変異の情報をを用いた集団レベルの解析にも有用である可能性が示されてきている (総説 : Adams et al. 2019 ; Sigsgaard et al. 2020 ; Andres et al. 2023 ; Couton et al. 2023) 。環境 DNA を用いて集団レベルの解析を行った先行研究では、環境 DNA のデータでは個体の情報が得られないことや偽陽性配列を真の配列と区別するのが難しいことなどの課題はあるものの、集団レベルの研究を行うために要するサンプリング労力を大幅に軽減できることを踏まえると、環境 DNA の適用可能性は高いであろうと結論付けられている (Tsuji et al. 2020a ; Adams et al. 2023) 。しかし、集団レベルの解析を行った先行研究のほとんどは、実験的に適用性を検証したものか、実際の野外を対象にしたものであっても、集団内の遺伝的多様性、系統地理学的な関係、または流域やダムを挟む大きな空間スケールでの集団遺伝構造を調べたものであり (Turon et al. 2020 ; Snyder and Stepien 2020 ; Weitemier et al. 2021 ; Tsuji et al. 2023) 、ローカールスケールの遺伝的変異を扱う景観遺伝学に焦点を当てた研究はなされていない。一般に景観遺伝学的研究を行うためには、多数の個体をサンプリングするのに多大な労力を要する。環境 DNA 技術は水域生態系における簡易な現地調査手法として確立されてきているため、環境 DNA の適用により河川生物の景観遺伝学的解析は大幅に簡便化できる可能性がある。

遺伝データの取扱いにおいて景観遺伝学での考え方は系統地理学のものとは本質的に異なる (Wang 2010) 。ローカールスケールでの遺伝子流動とその規定要因を調べるうえで重要なのは、遺伝子型間・個体間の系統関係ではなく、各集団の遺伝子プール内における遺伝子型の割合 (遺伝子頻度) である (Hudson et al. 1992 ; Bohonak and Roderick 2001 ; Bohonak and Vandergast 2011) 。遺伝子流動の解析手法のなかには家系解析やアサインメントテストのように個体の情報を要するものもあるが、遺伝子流動を評価する際に最もよく使用される遺伝的分化の統計量は遺伝子頻度に依存しており、個体に関する情報は必要ない。さらに、環境 DNA でしば

しば問題となる偽陽性や偽陰性は通常低い割合で存在するため、遺伝子頻度に基づく統計量の値にはほとんど影響しないはずである (Couton et al. 2023)。したがって、景観遺伝学で用いる統計量を環境 DNA から得られるかどうかは、各集団内の遺伝子頻度が実際の頻度をよく再現しているかという問いに集約される。環境 DNA メタバーコーディング解析では、遺伝子頻度はサンプル内の相対的なリード数 (シーケンサーで読まれた DNA 断片の数) として得られる。環境 DNA から得られるデータは個体から抽出された DNA (以降「組織 DNA」という。) を分析して得られるデータとは大きく性質が異なるものの、水槽実験や野外サンプルを用いた検証において、環境 DNA と組織 DNA から得た遺伝子頻度がよく一致したという報告が次々となされている (Sigsgaard et al. 2016 ; Marshall and Stepien 2019 ; Andres et al. 2021, 2023a ; Couton et al. 2023 ; Wakimura et al. 2023)。よって、遺伝子頻度に基づく遺伝的分化の統計量を環境 DNA から得ることは可能と考えられる。しかし、野外の環境 DNA サンプルから計算された遺伝的分化の統計量が実際の景観遺伝学的解析に耐えられる程度の精度をもつかは依然として不明である。同時に、これまで環境 DNA で集団レベルの解析を行った先行研究では、低リード配列の除去 (Tsuji et al. 2023) や相対リード数の半定量化 (Turon et al. 2020) など環境 DNA データに追加の処理を行うことが有効だと主張されているが、このような追加のデータ処理が景観遺伝学的解析でも有効かどうか不明であり、調べる必要がある。

本章の研究では、空知川上流域に生息するハナカジカを材料として、本種の mtDNA D-loop 領域をターゲットとした環境 DNA メタバーコーディング解析を行い、その結果を従来の組織 DNA の分析による解析結果と比較した。本章の目的は、(1) 環境 DNA で推論したローカルスケールの集団遺伝構造が組織 DNA に基づく推論結果と整合するかを明らかにすること、(2) 環境 DNA によって算出された遺伝的多様性と遺伝的分化の統計量が組織 DNA から得られた統計量とどの程度一致するか、さらにその結果は環境 DNA データに追加の処理を施すことによってどの程度変わるのかを明らかにすること、(3) 景観遺伝学への環境 DNA の適用可能性について議論することとした。

4-2. 方法

4-2-1. 組織 DNA (追加分) および環境 DNA サンプルの採取

最初に、第 3 章のサンプリング地点とは異なる 3 地点 (Fig. 4-1 の Pop12・20・21) で採取されたハナカジカから、3-2-1 章に示したものと同様の方法で DNA を抽出した。Pop12・21 で

使用した個体は、それぞれ 2019 年 7 月、2020 年 9 月に電気漁具（さで網と併用）またはたも網により採取したものである。Pop20 のサンプルは、鈴木（2021）で 2020 年に採取された個体の尾びれまたは腹びれを当該実験終了後に切除し、DNA の抽出に供試したものである。

環境 DNA のサンプリングは第 3 章または上記でハナカジカを採取した地点を原則として行った（Fig. 4-1 ; Table 4-1）。ハナカジカを採取した早瀬・平瀬の下流端において、2023 年 6 月に孔径 0.45 μm のステリベクスフィルター（Merck KGaA 社）および 100 mL シリンジ（JMS 社）を用いて 1 地点あたり 0.8 L の河川水を表層から採水・ろ過した。ただし、1 地点（Pop19）のみはハナカジカを採取した地点（第 3 章の Pop20）の約 500 m 下流での採水とした。Pop18 の 1 地点を除き、各地点の 0.8 L の河川水はそれぞれ 1 つのステリベクスフィルターでろ過することができた（Pop18 のみ 2 つを要した）。ステリベクスフィルターは 1.3 mL の RNeasy Lysis Buffer（Thermo Fisher Scientific 社）に浸し、冷凍下で実験室に輸送した。実験室で RNeasy Lysis Buffer（QIAGEN 社）と真空ポンプを用いて RNeasy Lysis Buffer を取り除いた後、RNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN 社）を用いて DNA を抽出した。DNA の抽出は Fukuzawa et al.（2023）に「ATL-S procedure」として掲載されているプロトコルに準拠したが、最初に加える ATL 溶液と proteinase K の容量はそれぞれ 400 μL 、40 μL とした。また、最後の溶出に用いる AE 溶液の容量は 120 μL とした。Pop18 の 2 つのステリベクスフィルターは、プロトコル中盤の、液体をスピンカラムにはじめて加える段階で 1 つのサンプルに統合した。また、Pop18 のみ、その後の PCR で良好な増幅がみられず、水質等に起因する PCR 阻害の影響が考えられたため、RNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit（QIAGEN 社）を用いて抽出 DNA を精製した。

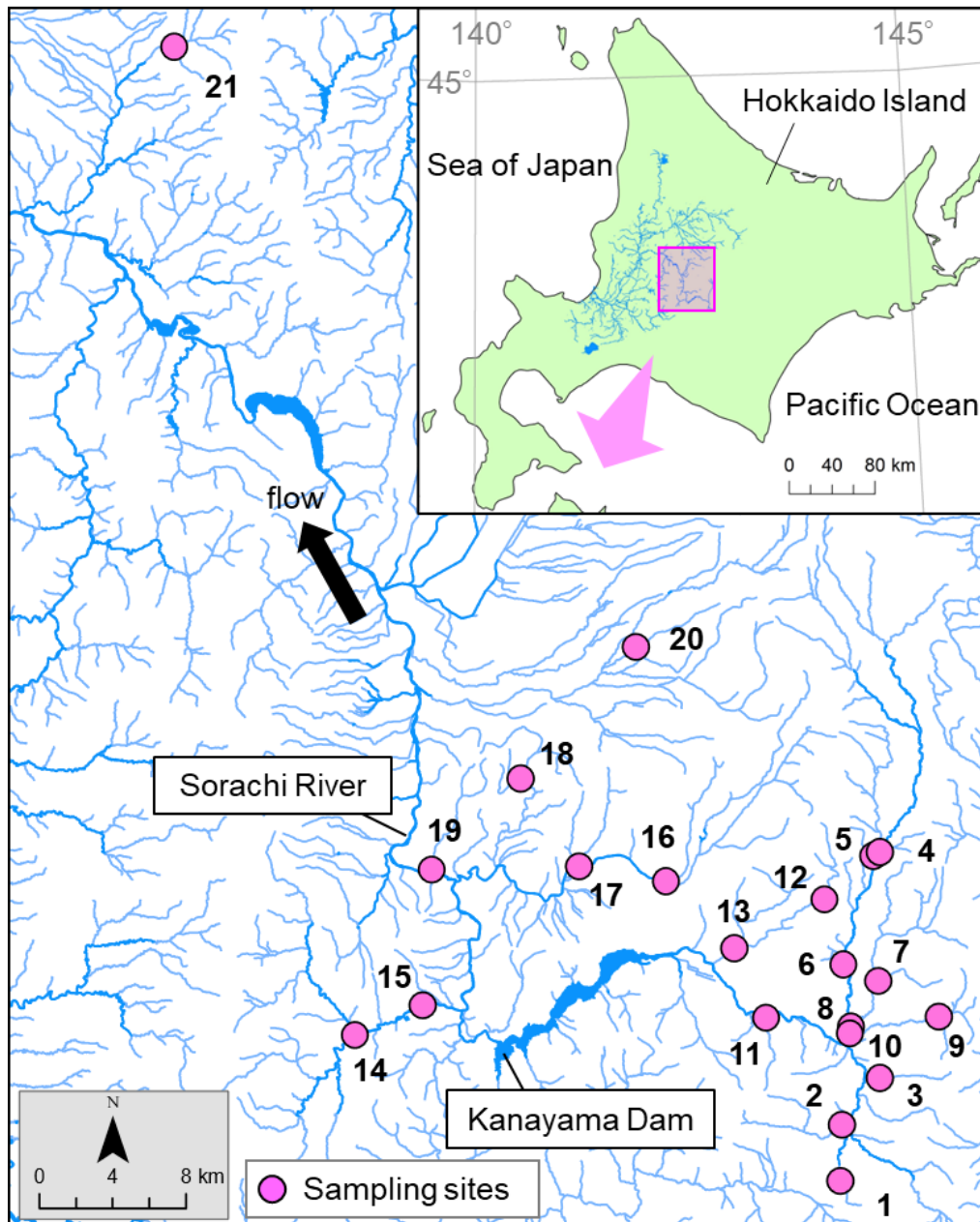


Fig. 4-1. Sampling localities. The number on the map indicates the population ID. Pop1–13 are located upstream of the Kanayama dam and can be particularly assumed to be within the local scale. The map was created using the National Land Numerical Information from the MLIT of Japan (nlftp.mlit.go.jp/).

Table 4-1. Details of sampling sites and data used in this section.

Pop ID	Longitude (E°)	Latitude (N°)	eDNA (D-loop)				Tissue (D-loop)			Tissue (SNP)	
			Cycles	Reads	<i>hr</i>	<i>h_s</i>	n	<i>hr</i>	<i>h_s</i>	n	<i>H_E</i>
1	142.670	43.057	35	2015	10.000	0.830	16	5.762	0.766	32	0.253
2	142.672	43.085	35	1044	8.998	0.706	16	6.681	0.859	22	0.257
3	142.699	43.107	35	1379	1.984	0.012	17	1.529	0.111	31	0.251
4	142.703	43.218	35	1997	6.000	0.683	16	5.412	0.813	30	0.262
5	142.699	43.218	35	1631	4.996	0.338	16	3.683	0.641	34	0.260
6	142.678	43.163	35	1278	6.000	0.756	16	5.274	0.781	21	0.255
7	142.699	43.155	35	3535	6.490	0.206	16	2.688	0.328	32	0.262
8	142.680	43.133	35	2290	9.983	0.406	16	5.874	0.797	32	0.265
9	142.739	43.136	35	3570	10.833	0.743	16	5.083	0.797	32	0.260
10	142.680	43.129	35	4024	16.968	0.747	16	5.724	0.797	32	0.259
11	142.624	43.137	38	2394	8.987	0.533	18	5.529	0.759	32	0.258
12	142.665	43.196	38	1404	2.000	0.091	14	1.000	0.000	14	0.243
13	142.603	43.173	40	2207	9.000	0.485	16	3.625	0.563	32	0.256
14	142.346	43.135	38	7422	16.679	0.782	16	5.913	0.813	21	0.244
15	142.393	43.149	38	3013	15.990	0.753	16	6.324	0.813	22	0.248
16	142.558	43.207	35	2730	6.000	0.747	16	4.305	0.742	22	0.258
17	142.501	43.216	38	3569	6.994	0.632	15	5.468	0.800	19	0.253
18	142.401	43.216	35	556	2.000	0.498	15	4.653	0.747	21	0.236
19	142.403	43.218	35	2201	15.990	0.778	16	7.350	0.891	20	0.238
20	142.543	43.323	38	7166	7.999	0.628	9	2.000	0.198	11	0.220
21	142.241	43.625	38	4382	5.995	0.552	9	3.000	0.494	9	0.157

Cycles, 1st PCR cycles; Reads, number of sequence reads assigned to each site and studied species after BLAST; n, number of individuals; *hr*, haplotype richness; *h_s*, haplotype diversity; *H_E*, expected heterozygosity

4-2-2. 組織DNA のシーケンスとプライマーデザイン

リファレンスとして、1 集団あたり 14–18 個体（ただし、Pop20・21 のみ 9 個体）の mtDNA 調節領域（D-loop 領域）のデータを得た（Table 4-1）。最初に、調節領域全体を含む概ね 1,150 bp の DNA 断片をプライマー L-Thr（5'-AGC TCA GCG YCA GAG CGC CGG TCT TGT AA-3'）および H12Sr5（5'-TGA TAA TAA AGT CAG GAC CAA G-3'）（Yokoyama and Goto 2002）により TaKaRa Ex Taq Hot Start Version（Takara Bio 社）を用いて増幅させた。PCR 反応液は 1 サンプルあたり 10×Ex Taq Buffer を 1.0 μL、dNTPs（各 2.5 mM）を 0.8 μL、10 μM プライマーを各

0.5 μ L、TaKaRa Ex Taq HS を 0.05 μ L、DNA を 1.0 μ L の計 10 μ L とした。PCR 条件は初期変性 94°C 2 分の後、{変性 98°C 10 秒、アニーリング 58°C 30 秒、伸長 72°C 1 分} の工程を 30 サイクルとした。PCR 産物は ExoSAP-IT Express PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific 社) により精製し、増幅配列の中間にあるリバーズ方向のプライマー H16498m (5'-CCT GAA RTA GGA ACC AAA TG-3') (Yokoyama and Goto 2002) による一方向のシーケンスをユーロフィンジェノミクス株式会社 (東京都) にて行った。得られたシーケンスデータは BioEdit (Hall 1999) 内の Clustal W (Thompson et al. 1994) を用いて整理し、DnaSP 6 (Rozas et al. 2017) を使用してハプロタイプを分類した。環境 DNA サンプルを増幅させるためのプライマーは、本研究で整理したハプロタイプと Yokoyama and Goto (2002) で報告されているハプロタイプの両方 (Table 4-2) を増幅できるようにするとともに、増幅配列が Illumina MiSeq で判読できる配列長 (400 bp 程度) となるように設計した。設計したプライマー配列は以下の通りである (Illumina MiSeq のアダプター配列を含めて表示)。

CNdlloopS1_F : 5'-ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GCT CAA AGA AAG GAG ATT YTA ACT C-3'

CNdlloopS1_R : 5'-GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TNN NNN NCC GTT GGC ATT AAG AAA TCA ACT G-3'

以降のデータ解析はこれらのプライマーで挟まれた領域を用いた。すなわち、組織 DNA から得られた配列データは環境 DNA サンプルの増幅配列と同じ配列長にトリミングされた。

さらに、組織 DNA のデータとして、環境 DNA サンプルと同じ D-loop 領域のデータだけでなく、より情報量が多いと考えられるゲノムワイド SNP 解析による SNP データも部分的なリファレンスとして用いた。SNP の取得には MIG-seq 法を用い、3-2-2 章で作製したライブラリに本章での Pop12・20・21 の組織 DNA を加えて Illumina MiSeq によるランを行った。ランは 2 回行い、低クオリティリードおよびアダプター配列の除去後に統合した。また、低クオリティリードの除去においては 5'末端の 6 塩基と 3'末端の 3 塩基を除去し、71 bp の配列情報を DDBJ Sequence Read Archive へ登録するとともに (アクセッションナンバー: DRA017315)、STACKS による SNP の抽出に進めた。STACKS の *populations* コマンドによる SNP の抽出においては、すべての集団で 80%以上共有する遺伝子座のみを SNP の抽出対象とし (-p 21 -r 0.8)、フィルタリングオプションとして最小対立遺伝子頻度は 5%とし (--min-maf 0.05)、過剰なヘテロ接合度を示すサイトは除外し (--max-obs-het 0.6)、1 遺伝子座あたり 2 個目以降の

SNP は抽出しない条件 (--write-single-snp) を付加した。フィルタリングの結果、169 の SNP が得られた。

Table 4-2. List of haplotypes in the *Cottus nozawae* D-loop region used as a reference library for eDNA analysis. The accession number in the DDBJ/EMBL/GenBank database and the literature that first reported each haplotype are displayed.

Haplotype name	Accession number	References	Haplotype name	Accession number	References
Hap1	LC591955	None	^ (Continue)		
Hap2	LC591956	This study	Hap44	LC790407	This study
Hap3	LC591957	This study	Hap45	LC790408	This study
Hap4	LC591958	This study	Hap46	LC790409	This study
Hap5	LC591959	This study	Hap47	LC790410	This study
Hap6	LC591960	This study	Hap48	LC790411	This study
Hap7	LC591961	This study	Hap49	LC790412	This study
Hap8	LC591962	This study	Hap50	LC790413	This study
Hap9	LC591963	This study	Hap51	LC790414	This study
Hap10	LC591964	This study	Hap52	LC790415	This study
Hap11	LC591965	This study	Hap53	LC790416	This study
Hap12	LC591966	This study	Hap54	LC790417	This study
Hap13	LC591967	This study	Hap55	LC790418	This study
Hap14	LC591968	This study	Hap56	LC790419	This study
Hap15	LC591969	This study	Hap57	LC790420	This study
Hap16	LC591970	This study	Hap58	LC790421	This study
Hap17	LC591971	This study	Hap59	LC790422	This study
Hap18	LC591972	This study	Hap60	LC790423	This study
Hap19	LC591973	This study	Hap61	LC790424	This study
Hap20	LC591974	This study	Hap62	LC790425	This study
Hap21	LC591975	This study	CN1	AB059329	Yokoyama & Goto (2002)
Hap22	LC591976	This study	CN2	AB059330	Yokoyama & Goto (2002)
Hap23	LC591977	This study	CN3	AB059331	Yokoyama & Goto (2002)
Hap24	LC591978	This study	CN4	AB059332	Yokoyama & Goto (2002)
Hap25	LC591979	None	CN5	AB059333	Yokoyama & Goto (2002)
Hap26	LC591980	None	CN6	AB059334	Yokoyama & Goto (2002)
Hap27	LC591981	This study	CN7	AB059335	Yokoyama & Goto (2002)
Hap28	LC632506	None	CN8	AB059336	Yokoyama & Goto (2002)
Hap29	LC790392	This study	CN9	AB059337	Yokoyama & Goto (2002)
Hap30	LC790393	This study	CN10	AB059338	Yokoyama & Goto (2002)
Hap31	LC790394	This study	CN11	AB059339	Yokoyama & Goto (2002)
Hap32	LC790395	This study	CN12	AB059340	Yokoyama & Goto (2002)
Hap33	LC790396	This study	CN13	AB059341	Yokoyama & Goto (2002)
Hap34	LC790397	This study	CN14	AB059342	Yokoyama & Goto (2002)
Hap35	LC790398	This study	CN15	AB059343	Yokoyama & Goto (2002)
Hap36	LC790399	This study	CN16	AB059344	Yokoyama & Goto (2002)
Hap37	LC790400	This study	CN17	AB059345	Yokoyama & Goto (2002)
Hap38	LC790401	This study	CN18	AB059346	Yokoyama & Goto (2002)
Hap39	LC790402	This study	CN19	AB059347	Yokoyama & Goto (2002)
Hap40	LC790403	This study	CN20	AB059348	Yokoyama & Goto (2002)
Hap41	LC790404	This study	CN21	AB059349	Yokoyama & Goto (2002)
Hap42	LC790405	This study	TAK	LC020472	Ito et al. (2018)
Hap43	LC790406	This study	OGN	LC020473	Ito et al. (2018)

4-2-3. 環境 DNA サンプルのライブラリ調整とシーケンス

環境 DNA サンプルの 1st PCR は設計したプライマーと KOD Plus Neo (Toyobo 社) を用いて行った。PCR 反応液は 1 ウェルあたり 10×PCR Buffer を 2.0 μ L、dNTPs (各 2 mM)、MgSO₄ (25 mM) を 1.2 μ L、10 μ M プライマーを各 0.5 μ L、KOD Plus Neo polymerase を 0.4 μ L、DNA を 2.0 μ L の計 20 μ L とした。PCR 条件は初期変性 94°C 2 分の後、{変性 94°C 15 秒、アニーリング 63°C 30 秒、伸長 68°C 30 秒} の工程を 35–40 サイクルとした (Table 4-1)。サイクル数は当初は 35 サイクルで行ったが、2nd PCR 後の電気泳動で目的長さのピークがみられなかったサンプルは、38 サイクル、40 サイクルで再度分析した。複製エラーに伴う偽陽性を低減するためサイクル数は控えめにしているが (Wakimura et al. 2023)、ハプロタイプの集積曲線はいずれのサンプルもシーケンス深度 (総リード数) はハプロタイプを特定するのに十分であることを示している (Fig. 4-2)。1st PCR は 1 サンプルあたり 8 反復で行い、同じサンプルの PCR 産物は 1st PCR 後にプールして PCR 産物と等量の VAHTS DNA Clean Beads (Vazyme Biotech 社) で精製した。2nd PCR はインデックス配列の付いたプライマーにて KOD FX Neo (Toyobo 社) を用いて行った。PCR 反応液は 2×PCR Buffer を 5.0 μ L、dNTPs (各 2 mM) を 2.0 μ L、プライマーを各 0.5 μ M、KOD FX Neo polymerase を 0.2 μ L、DNA を 1.0 μ L の計 10 μ L であり、PCR 条件は初期変性 94°C 2 分、{変性 98°C 10 秒、アニーリング 60°C 30 秒、伸長 68°C 30 秒} の工程を 12 サイクル、最終伸長 68°C 2 分とした。2nd PCR 産物は VAHTS DNA Clean Beads で再び精製し、Fragment Analyzer System と dsDNA 915 Reagent Kit (Agilent Technologies 社) で目的長さの配列が増幅されていることを確認した。作製したライブラリは Illumina MiSeq と MiSeq Reagent Kit v3 (2 × 300 cycles) (Illumina 社) による次世代シーケンスに供試した。1st PCR 産物の精製からシーケンスまでの工程は株式会社生物技研 (神奈川県) に委託した。シーケンスデータは DDBJ Sequence Read Archive に登録した (アクセッション番号 : DRA017646)。

シーケンスデータに対し、DADA2 1.18.0 (Callahan et al. 2016) によるデノイジングを実施した。DADA2 はエラー配列を確率的に除去するソフトウェアの 1 つであり、集団レベルの解析における正確性が高いことが知られている (Tsuji et al. 2020b ; Macé et al. 2022) 。DADA2 は Qiime2 2022.11 (Bolyen et al. 2019) のプラグインとして実行し、3 つのパラメーター (--p-trunc-len-f 240、--p-trunc-len-r 180、--p-min-overlap 20) 以外はデフォルト設定とした。得られた配列は、Yokoyama and Goto (2002)、Ito et al. (2018)、および本研究で得られている配列

(Table 4-2) をリファレンス配列とする BLAST 検索にかけ、リファレンス配列との相同性が 90.0%以上となった配列を抽出した（ただし、実際には抽出された配列の相同性はすべて 99.4%以上であった）。

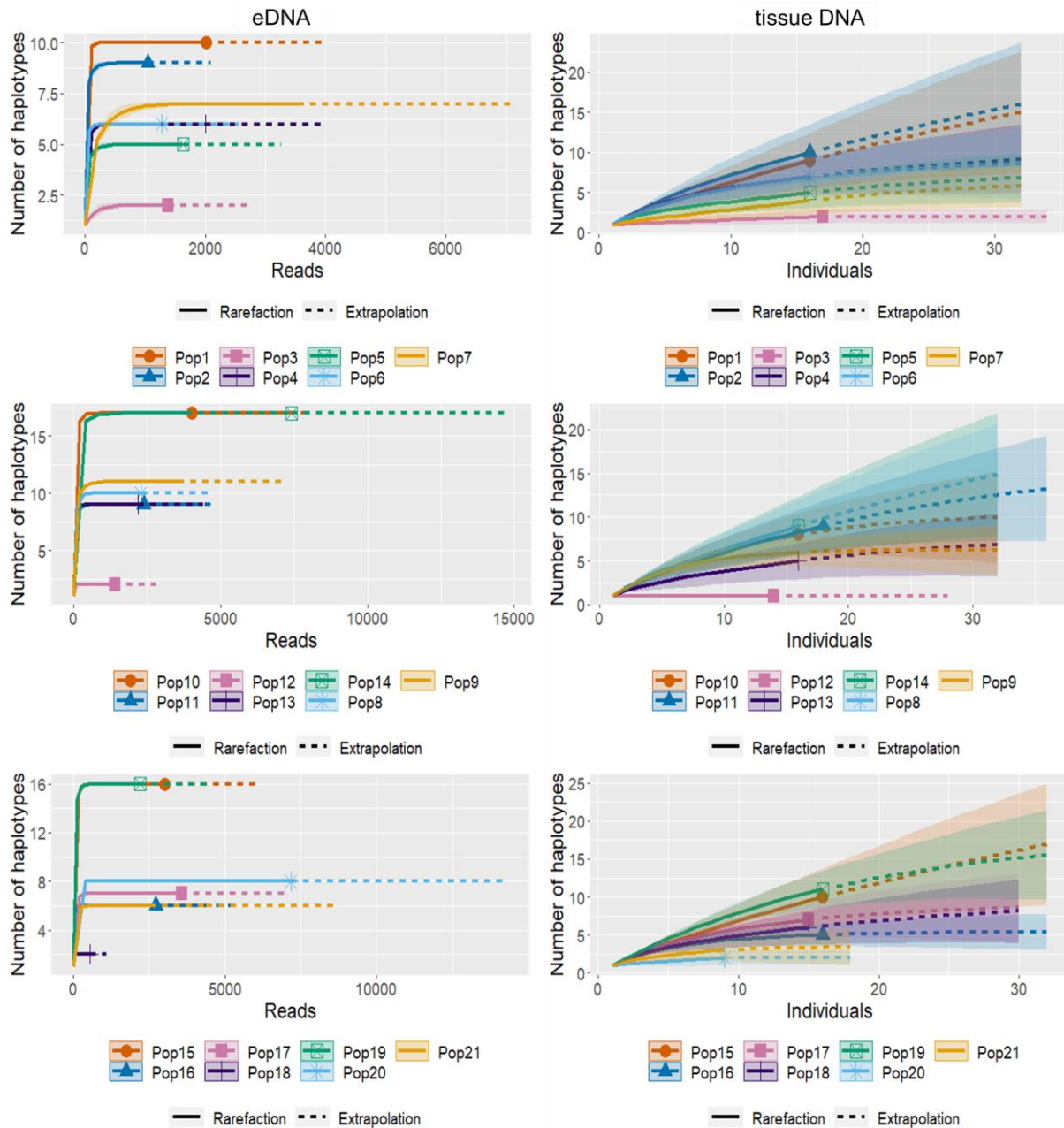


Fig. 4-2. Rarefaction (solid lines) and extrapolations (dashed lines) curves with 95% confidence intervals (shaded area) showing the increase in observed haplotypes at each site as the number of reads/individuals per site increases. Curves were fitted using the iNEXT package (Hsieh et al. 2016) in R based on abundance data. The left and right panels are from eDNA and tissue samples, respectively.

4-2-4. 集団遺伝構造、遺伝的多様性、および遺伝的分化

各地点のサンプル内における各ハプロタイプのリード数の相対頻度（環境 DNA）と各地点にて各ハプロタイプをもつ個体の割合（組織 DNA）を比較のためプロットした。さらに、これらハプロタイプ組成を、SNP データをもとに STRUCTURE 解析で推定した集団遺伝構造とも比較した。

次に、環境 DNA、組織 DNA それぞれのデータセットから、集団内の遺伝的多様性と集団間の遺伝的分化を計算した。集団内の遺伝的多様性としては、ハプロタイプ多様性 (h_s) とハプロタイプリッチネス (hr) を求めた。 h_s は遺伝子頻度に基づく統計量であり、対象集団内における i 番目のハプロタイプ頻度 p_i を用いて以下のように計算される (Nei 1973)。これは、第 3 章でも用いた共優性マーカーにおけるヘテロ接合度期待値と同様の計算式である。

$$h_s = 1 - \sum_i p_i^2 \quad (4.1)$$

hr は各集団のハプロタイプ数に基づく統計量であり、共優性マーカーで頻繁に用いられてきた allelic richness (El Mousadik and Petit 1996) の考え方にに基づき以下のように定義した。これは、集団間のサンプルサイズ（個体数または総リード数）の違いを補正したハプロタイプ数を示す。

$$hr = \sum_i \left(1 - \frac{\binom{n_s - n_i}{n_{smin}}}{\binom{n_s}{n_{smin}}} \right) \quad (4.2)$$

ここで、 n_s は対象集団の個体数または総リード数、 n_i は i 番目のハプロタイプの個体数またはリード数、 n_{smin} は扱ったすべての集団のなかで最も少ない n_s （定数）を示す。この統計量は n_{smin} をサブサンプルサイズとする希薄化の考え方に基づいている。集団間の遺伝的分化については、根井の F_{ST} (G_{ST} ; Nei 1973) と D_{PS} により評価した。 G_{ST} は以下のように計算した。

$$G_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T} \quad (4.3)$$

ここで、 H_S は対象とする集団の h_s の加重平均 (G_{ST} が 0~1 に収まるようにサンプル数に基づき加重)、 H_T は対象とする集団全体を 1 集団とみた場合の h_s である。 D_{PS} は式 3.3 を踏まえ、式 3.1 に基づき計算した。本研究は最近の遺伝子流動を反映したローカルスケールの遺伝的分化に着目しているため、主に D_{PS} を用いて以降の解析や考察を進めるが、よく知られた G_{ST} による解析も行う。以上の遺伝的多様性および遺伝的分化の統計量は、R 4.2.1 (R Core Team

2022) にて計算した。

集団間の遺伝的分化の大小に影響を与える要因として遺伝的浮動よりも遺伝子流動が支配的な空間スケールを特定するため、Mantel コレログラム (9999 回置換) により D_{PS} と地理的距離の相関を 60 km までは 7.5 km ごと、それ以降は 1 階級とした 9 個の距離階級ごとにプロットした。Mantel r が有意に正の相関を示す距離階級では、集団間の遺伝子流動が特に活発だと考えられる (Diniz-Filho and De Campos Telles 2002)。この解析は R のパッケージ `ecodist` で行った。

遺伝的分化の統計量は SNP データからも求めた。SNP データにおける G_{ST} と D_{PS} は R 4.2.1 のパッケージ `graph4lg` により計算した。一般に、集団内の遺伝的多様性や遺伝的浮動の強度は核 DNA とミトコンドリア DNA で異なる (Toews and Brelsford 2012 ; Morin et al. 2018 ; Saitoh 2021)。しかし、遺伝子流動と遺伝的分化の関係、すなわち遺伝的分化は移住個体数の関数に反比例するという古典的な理論は共通であり (Allendorf et al. 2022)、遺伝的浮動よりも遺伝子流動が支配的な空間スケールにおいては、遺伝的分化は性差がなければマーカーに関わらず同調すると考えられる。このことを踏まえ、空間スケールを明示したうえで、より情報量の多い SNP データの結果を真とみなして考察した。

4-2-5. 環境 DNA と組織 DNA による遺伝的分化の比較

環境 DNA から求めた統計量と組織 DNA から求めた統計量の相関を、遺伝的多様性と遺伝的分化の各統計量について調べた。遺伝的分化の統計量の相関は、すべての集団ペアに加え、金山ダム上流のみのデータセット (上流データセット)、および地理的距離が 15 km 未満の集団ペアのみを抜粋したデータセット (15-km データセット) でも調べた。上流データセットはサンプリング地点の空間的偏りやダムの影響を避けるため、15-km データセットは遺伝子流動が特に支配的な空間スケール (Fig. 3-2b, c) でのパターンを明らかにするために調べた。相関係数とその有意性、信頼区間について、全データセットおよび上流データセットの遺伝的分化については R のパッケージ `ecodist` の Mantel 検定 (9999 回置換および信頼区間を求めるためのブートストラップ 10000 回) により、行列形式ではないデータ、すなわち遺伝的多様性と 15-km データセットの遺伝的分化についてはパッケージ `CarletonStats` 2.2 (Chihara & Loy 2023) を用いた通常のブートストラップ (10000 回) により評価した。

4-2-6. 追加のデータ処理による変化

環境 DNA メタバーコーディングで得られるデータは組織 DNA から得られるデータとは性質が異なりエラー配列も含まれるため、先行研究では環境 DNA から得られたデータに対して低リード配列の除去や相対リード数の半定量化が種内レベルの解析に有効であることが示されている。ただし、それら研究のスコープは主に系統地理学である。このようなデータ処理が景観遺伝学的解析においても有効であるかを調べるため、以下の各処理を行った環境 DNA データセットから h_r 、 h_s 、 D_{PS} 、 G_{ST} を算出し、組織ベースの統計量と比較した。

《処理 1》：各集団内で低頻度でみられるハプロタイプ ($p_i < 0.01$) をデータから削除 (0 リードに置換) (Tsuji et al. 2023)

《処理 2》：各集団で最も高頻度でみられるハプロタイプの半分以下の頻度でみられるハプロタイプ ($p_i < \text{最大 } p_i / 2$) をデータから削除 (Tsuji et al. 2023)

《処理 3》：ハプロタイプ頻度を次の半定量化値に変換： $0 < p_i \leq 0.5$ なら「1」、 $0.5 < p_i \leq 0.75$ なら「2」、 $0.75 < p_i \leq 0.9$ なら「3」、 $0.9 < p_i$ なら「4」 (Turon et al. 2020)

4-2-7. 基本的な景観遺伝学への適用

最後に、環境 DNA が景観遺伝学的な仮説を検証できるかを確認するため、第 3 章で示された「集団間の遺伝的分化と地理的距離に有意な相関がみられる」「集団間の遺伝的分化と夏季水温差に相関はみられない」パターンが環境 DNA データを用いた解析でも表れるかを調べた。水温データのない Pop20・21 を除く 19 集団全体のデータ、およびローカルスケールでの研究を想定した上流データセットを用いて、 D_{PS} と地理的距離および最高水温差との相関を Mantel 検定 (9999 回置換) によって調べた。

4-3. 結果

平均 2848 リードがハナカジカのリファレンス配列に割り当てられた (Table 4-1)。環境 DNA からは合計 66 ハプロタイプが、組織 DNA からは 58 ハプロタイプが検出された。環境 DNA で検出された 66 ハプロタイプのうち、35 ハプロタイプは組織 DNA で検出されたハプロタイプと 100% の一致率を示し、他のハプロタイプは 99.4%~99.7% の一致率 (1~2 塩基の違いに相当) であった。1 集団あたりに検出されたハプロタイプ数は環境 DNA で 2~17 (平均 8.62)、組織 DNA で 1~11 (平均 6.43) であった。 h_s は環境 DNA では 0.01~0.83 (平均 0.57)、組織

DNA では 0.00~0.89 (平均 0.64) の値をとった。グローバル G_{ST} は環境 DNA では 0.33、組織 DNA では 0.29 であり、平均 D_{PS} は環境 DNA、組織 DNA とともに 0.86 であった。ペアワイズ G_{ST} は環境 DNA で 0.01~0.90、組織 DNA で 0.01~0.89 の値をとり、 D_{PS} は環境 DNA で 0.17~1.00、組織 DNA で 0.25~1.00 の値をとった。

ハプロタイプの空間分布は環境 DNA と組織 DNA で同様の傾向を示した (Fig. 4-3a, b)。図から推論できる主要な集団遺伝構造は共通であり、Pop3 に固有なハプロタイプが優占していること、Pop1~11 の多くの地点でみられるハプロタイプがあること、pop12 がほとんど 1 つのハプロタイプで構成され、そのハプロタイプは下流側 (Pop13~15) でもみられることなどはどちらからも読み取れた。一方で、環境 DNA では組織 DNA よりも低頻度のハプロタイプが多く検出されるという違いもみられた。これら D-loop 領域 (環境 DNA・組織 DNA) の結果を SNP データを用いた STRUCTURE 解析の結果と比較すると、河川ネットワークに応じた集団遺伝構造の存在や Pop3 の特異性などいくつかのパターンは共通していたが、SNP データでは Pop1~11 と Pop12~13 とで明確に構造化されていないことなど、D-loop 領域の結果とは異なる点もあった (Fig.4-3c)。

環境 DNA から計算された遺伝的多様性と遺伝的分化の統計量は、組織 DNA から計算されたものと正の相関を示した (Fig. 4-4)。遺伝的多様性の相関は、 hr で $r=0.68$ ($p<0.001$)、 h_s で $r=0.78$ ($p<0.001$) であり、遺伝的分化の相関は G_{ST} では $r=0.73$ ($p<0.001$)、 D_{PS} では $r=0.83$ ($p<0.001$) であった。散布図を用いて値そのものの大きさを比較すると、組織 DNA による統計量を横軸とした際の回帰直線の傾きは、遺伝子頻度をもとにした 3 つの統計量 h_s 、 G_{ST} 、 D_{PS} では 1:1 線よりもわずかに小さいか 1:1 線とほぼ同じであったが、遺伝子の数をもとにした統計量 hr では極めて大きかった。Mantel コレログラムによる空間的自己相関分析からは、環境 DNA と組織 DNA の両方で、 r 値は約 30 km まで一貫して正の値、少なくとも 15 km までは有意であり、遺伝子流動が 15~30 km 以内の集団ペアで特に強いと考えられた。環境 DNA と SNP データの間で計算された遺伝的分化の相関は、21 集団すべてのペアで計算した場合は低かったが、15 km 未満の集団ペアについて計算した場合のみ、ある程度の相関が見られた (Fig. 4-5 ; Table 4-4)。

環境 DNA データに追加のデータ処理を施しても、遺伝的多様性と遺伝的分化のどちらにおいても組織 DNA による統計量との相関は増加しなかった (Table 4-3, 4-4)。遺伝的分化では、低リード配列の大胆な除去である処理 2 ではほとんどのデータセットで有意に (95%CI

が重複しないほど) 相関が悪化した。処理 3 (半定量的アプローチ) は、有意差はないものの、組織 DNA との相関係数のみを見ると無処理のデータセットを上回ることがあった。

地理的距離と夏季水温差との関係を調べた基本的な景観遺伝学的解析では、環境 DNA データから得られたパターンは第 3 章の結果と一致しており、遺伝的分化と地理的距離の間には有意な相関がみられた一方で (全集団 : $r = 0.50$ 、 $p < 0.001$; 上流集団 : $r = 0.52$ 、 $p < 0.01$; Fig. 4-6)、遺伝的分化と夏季水温差の間には有意な相関はみられなかった (全集団 : $r = 0.20$ 、 $p = 0.16$; 上流集団 : $r = 0.32$ 、 $p = 0.06$)。

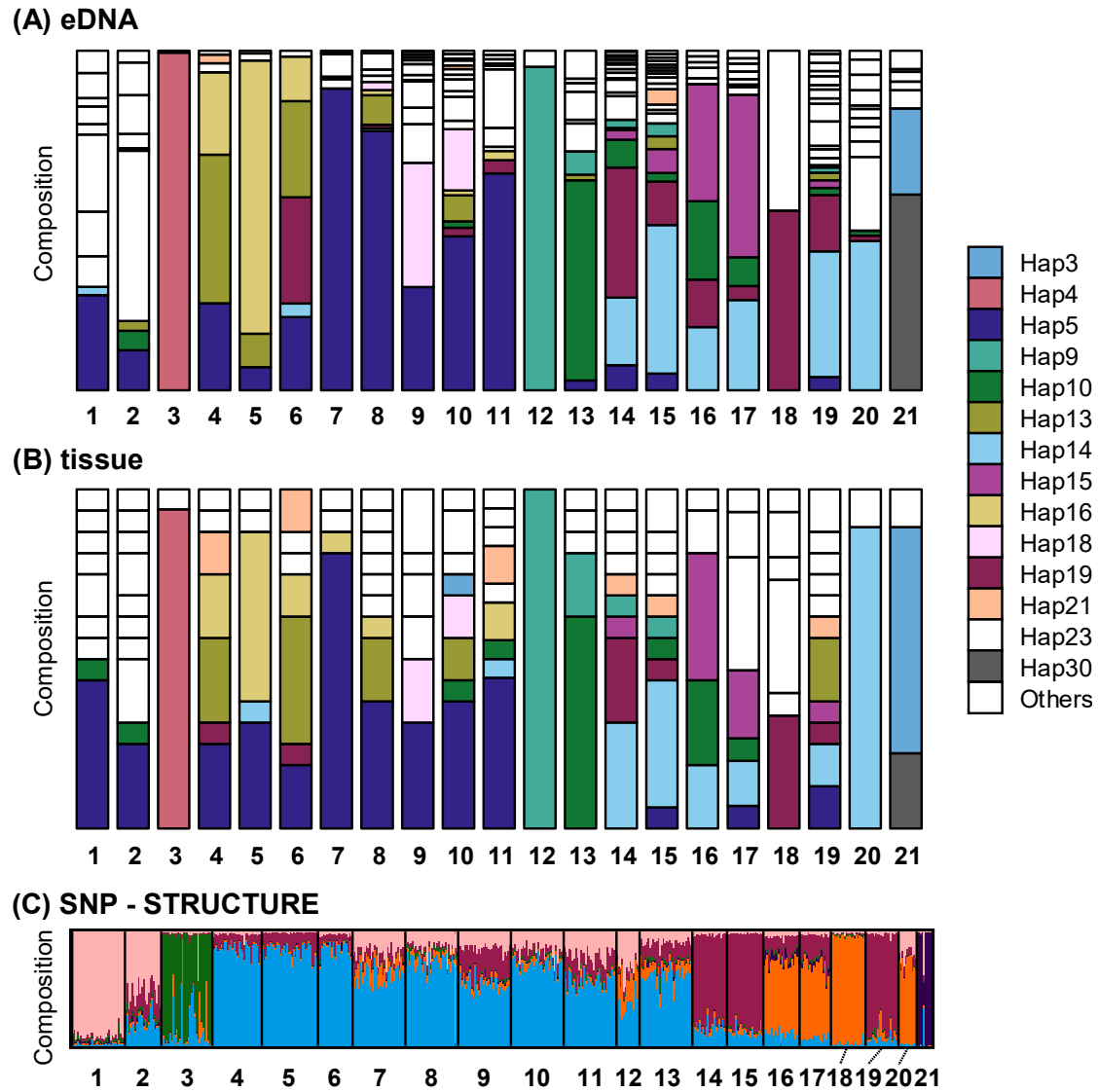


Fig. 4-3. Spatial population structure among 21 sites estimated by three types of markers. (A, B) The haplotype compositions in each site estimated by the D-loop region using eDNA-based (A) and tissue-based (B) approaches. Haplotype names correspond to Table 4-2. Within each site, boxes separated by black lines indicate different haplotypes, and the box size reflects haplotype frequency. Only the haplotypes with high frequency (the sum of $p_i \geq 0.5$ in either eDNA or tissue) are shown in a unique color (except white). Note that haplotypes shown in white include a variety of haplotypes, many of which are unique to each site. (C) Population structure inferred by the STRUCTURE analysis using SNP data obtained by MIG-seq. STRUCTURE setting is the same as in Chapter 3. Barplots display the proportion of the membership coefficients in the inferred subpopulations (clusters) at K = 6 for all individuals. The number indicates the population ID.

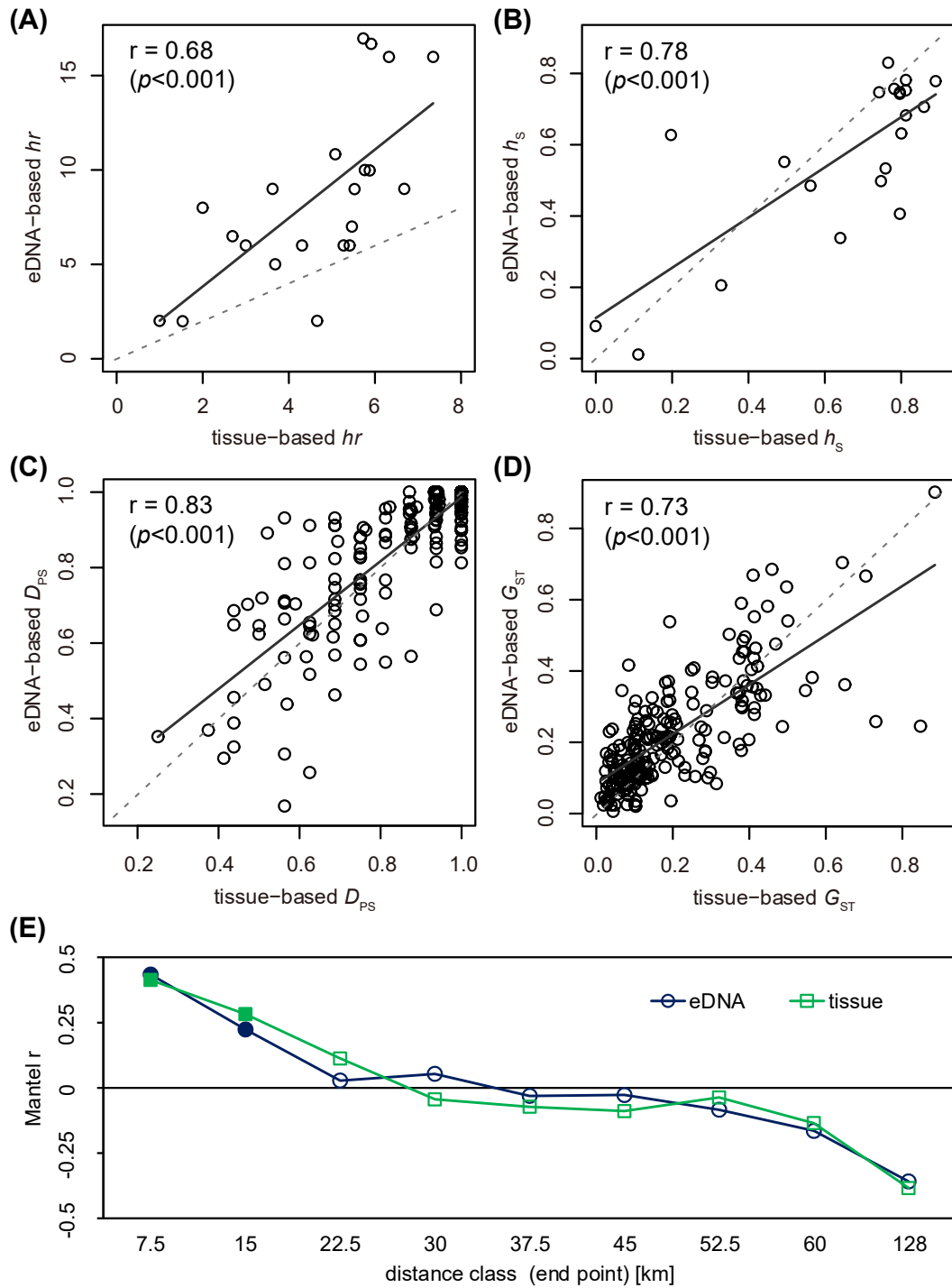


Fig. 4-4. Congruence of eDNA- and tissue-based genetic diversity and differentiation. (A, B) Correlation of genetic diversity statistics estimated from eDNA- and tissue-based approaches for statistics hr (A) and h_s (B). The dashed line represents a 1:1 correlation when eDNA- and tissue-based statistics are equivalent. (C, D) Correlation of genetic differentiation statistics calculated by haplotype frequencies estimated from eDNA- and tissue-based approaches for statistics D_{PS} (C) and G_{ST} (D). (E) Mantel correlograms showing the spatial autocorrelation of genetic data. The r values obtained from eDNA and tissue samples are displayed. Filled markers indicate significant correlations from a null model of spatial structure ($p < 0.05$).

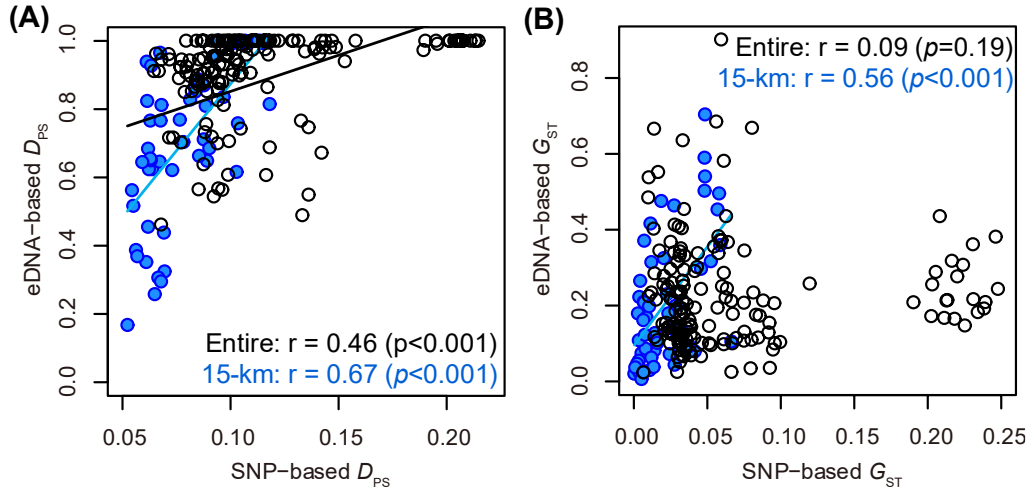


Fig. 4-5. Correlation of genetic differentiation statistics calculated by eDNA samples (D-loop) and genome-wide SNP data for statistics D_{PS} (A) and G_{ST} (B). Filled circles indicate the population pairs less than 15 km apart, and correlations in this 15-km dataset are also shown.

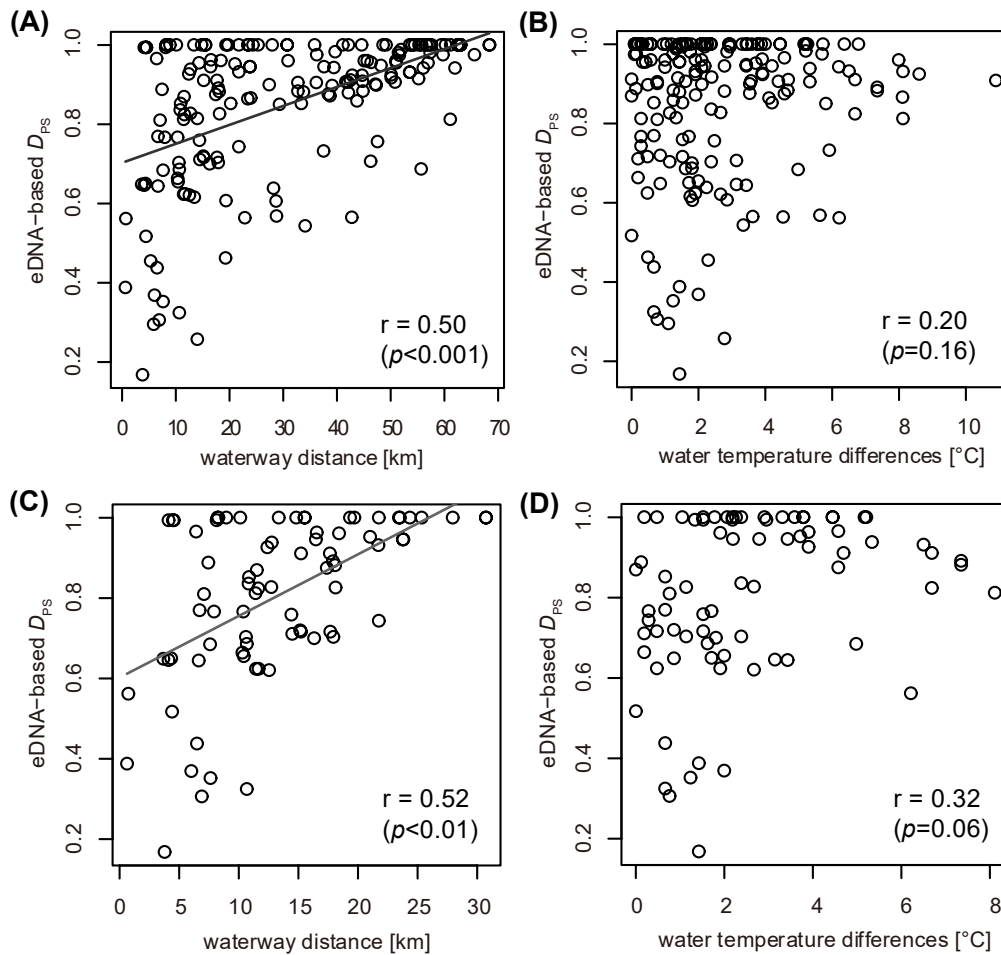


Fig. 4-6. Relationship of eDNA-based genetic differentiation with geographic distance and water temperature among the (A, B) 19 sites for which water temperature data are available, or (C, D) 13 sites upstream of the Kanayama dam. Scatter plots of D_{PS} versus waterway distance (A, C) and summer water temperature differences (B, D) between populations are displayed.

Table 4-3. Correlation between eDNA- and tissue-based genetic diversity statistics for the three treatments of the eDNA data.

Stat.	Treatment	Correlation [95% CI]
<i>hr</i>	No treatment	0.681 [0.449, 0.839]
	Treatment 1	0.696 [0.434, 0.861]
	Treatment 2	0.234 [-0.104, 0.547]
	Treatment 3	0.657 [0.215, 0.870]
<i>hs</i>	No treatment	0.781 [0.383, 0.942]
	Treatment 1	0.775 [0.386, 0.940]
	Treatment 2	0.415 [0.184, 0.653]
	Treatment 3	0.675 [0.078, 0.939]

Results calculated using eDNA datasets obtained after the three types of treatment are also displayed: Treatment 1, removal of low read frequencies; Treatment 2, bold removal of low read frequencies; Treatment 3, conversion to semi-quantitative rankings. The confidence interval (95% CI) was obtained by simple bootstrapping.

Table 4-4. Correlation between eDNA- and tissue-based genetic differentiation statistics for the three datasets and the three treatments of the eDNA data.

		Correlation [95% CI]		
Stat.	Treatment	Entire dataset	Upstream dataset	15-km dataset
(A) eDNA vs tissue (both D-loop)				
D_{PS}	No treatment	0.825 [0.791, 0.867]	0.842 [0.778, 0.905]	0.841 [0.758, 0.915]
	Treatment 1	0.823 [0.789, 0.864]	0.840 [0.777, 0.907]	0.839 [0.755, 0.914]
	Treatment 2	0.673 [0.622, 0.753]	0.654 [0.578, 0.730]	0.643 [0.520, 0.755]
	Treatment 3	0.784 [0.747, 0.825]	0.803 [0.721, 0.878]	0.829 [0.737, 0.902]
G_{ST}	No treatment	0.734 [0.643, 0.849]	0.888 [0.828, 0.934]	0.891 [0.798, 0.946]
	Treatment 1	0.728 [0.634, 0.843]	0.882 [0.821, 0.928]	0.887 [0.790, 0.944]
	Treatment 2	0.496 [0.439, 0.575]	0.558 [0.493, 0.655]	0.583 [0.416, 0.730]
	Treatment 3	0.757 [0.658, 0.841]	0.906 [0.857, 0.939]	0.930 [0.890, 0.963]
(B) eDNA (D-loop) vs tissue (SNP)				
D_{PS}	No treatment	0.456 [0.406, 0.523]	0.626 [0.500, 0.748]	0.671 [0.521, 0.789]
	Treatment 1	0.453 [0.403, 0.521]	0.626 [0.495, 0.750]	0.671 [0.521, 0.794]
	Treatment 2	0.287 [0.213, 0.371]	0.457 [0.326, 0.582]	0.520 [0.359, 0.658]
	Treatment 3	0.542 [0.498, 0.608]	0.681 [0.534, 0.758]	0.716 [0.584, 0.813]
G_{ST}	No treatment	0.091 [0.031, 0.183]	0.510 [0.125, 0.682]	0.561 [0.329, 0.742]
	Treatment 1	0.088 [0.025, 0.178]	0.501 [0.111, 0.673]	0.556 [0.318, 0.735]
	Treatment 2	0.299 [0.164, 0.372]	0.286 [0.077, 0.437]	0.400 [0.198, 0.584]
	Treatment 3	0.198 [0.160, 0.363]	0.675 [0.362, 0.808]	0.770 [0.622, 0.889]
(C) tissue (D-loop) vs tissue (SNP)				
D_{PS}	--	0.487 [0.446, 0.565]	0.536 [0.331, 0.708]	0.627 [0.433, 0.774]
G_{ST}	--	0.299 [0.248, 0.460]	0.544 [0.156, 0.716]	0.636 [0.425, 0.797]

Upstream dataset, only 13 populations upstream of the Kanayama dam; 15-km dataset, only between population pairs with a waterway distance of <15 km. The confidence intervals (95% CI) for the entire dataset and the upstream dataset were obtained by bootstrapping testing in Mantel tests, while the 95% CI for the 15-km dataset, which is not matrix-style, was obtained by simple bootstrapping. In the comparison of the same region, the results calculated using eDNA datasets obtained after the three types of treatment are also displayed: Treatment 1, removal of low read frequencies; Treatment 2, bold removal of low read frequencies; Treatment 3, conversion to semi-quantitative rankings.

4-4. 考察

4-4-1. 環境 DNA データの妥当性

本章の研究では、D-loop 領域を対象にした環境 DNA の分析から、ハナカジカのローカルスケールでの集団遺伝構造を調べ、組織 DNA から得られた結果と比較することで環境 DNA 調査の景観遺伝学への適用可能性に関する知見を得た。

環境 DNA と組織 DNA から得たハプロタイプの空間分布は概ね同様のパターンを示した。各地点のハプロタイプ数や各地点における個々のハプロタイプ頻度にある程度の違いはみられるものの、組織 DNA から推論できた遺伝的に離れた地点の存在や地理的構造に応じた集団遺伝構造は環境 DNA によっても捉えられた。

環境 DNA から計算した遺伝的多様性と遺伝的分化のすべての統計量は組織 DNA と有意に相関した。遺伝的多様性では、組織 DNA との相関はハプロタイプ数に基づく統計量である h_r で h_s よりも低かった (Fig. 4-4)。さらに、環境 DNA と組織 DNA から得た h_r の値は 1:1 の関係から大幅に逸脱していた。これは、遺伝子の数 (ハプロタイプや対立遺伝子の数) に基づく統計量は、遺伝子頻度に基づく統計量よりも次世代シーケンスで得られる潜在的なエラー配列の影響を受けやすいためと考えられる。この結果は、環境 DNA で得られた遺伝的多様性の統計量、とりわけ遺伝子の数に基づく統計量の値は組織 DNA から得られた値と比較すべきではないことを提起した Couton et al. (2021, 2023) とも整合する。本章で特に着目している遺伝的分化については、同じ D-loop 領域で比較した場合は環境 DNA と組織 DNA で高い相関を示した。得られた相関係数の値は、五大湖全域のハゼ科魚類を用いて環境 DNA と組織 DNA で求めた D_{PS} に $r=0.76$ の相関を報告した過去の事例 (Andres et al. 2023a) とも同様の水準である。本章の研究の新規性は、このような高い相関が流域や砂防ダムを跨がないローカルスケールでも確認されたことにあり、このことは上流データセットおよび 15-km データセットで行ったより小さいスケールを対象とした解析でも強調されている。本章の結果は、遺伝子流動が遺伝的分化の強さを形作る支配的な要因である空間スケールであっても、対象遺伝子領域が同じであれば、環境 DNA と組織 DNA ではほぼ同じ精度で遺伝的分化を計算できることを示している。反対に、調査地内で地理的距離の離れた一部の集団ペアではハプロタイプが共有されておらず (すなわち、 $D_{PS}=1$)、使用したマーカー・対象種および解析手法では数十 km 以上離れた空間スケールでは遺伝的分化の定量は難しいと考えられた。また、環境 DNA は水の流れによって運ばれ、上流のハプロタイプを捕捉すると集団遺伝構造の解釈に影響

響を及ぼす可能性があるため、近接しすぎたサンプリングも問題となることにも留意が必要である。本研究のサンプリング地点は主に支流にあり、同じ支流に複数地点がある場合も地点間の距離は 2 km（メタ解析により環境 DNA の 99%が消失するとされている距離；Jo and Yamanaka 2022）を超えているが、河川景観遺伝学の場合はサンプリング地点間の距離には注意を払うべきであろう。

集団遺伝学では、個体数×遺伝子座数が大きいほど、正確な推論が得られる。分析する遺伝子座数が少なく、個体数も少ない場合は選んだ個体によるバイアスが大きくなる。実際に、組織 DNA の推論で用いた 14~18 個体は、通常の集団遺伝学で用いられる個体数の一般的なオーダーであるが（Aguirre-Liguori et al. 2020）、1 個または数個の遺伝子座しか扱っていない場合は集団全体を表現するには不足する個体数である（Scaketti et al. 2025 ; Fig. 4-2）。環境 DNA では、現段階で使用可能な遺伝子座の数は少ないが、数十以上の個体に由来する情報が含まれる可能性があり（Tsuji et al. 2020a）、集団全体の「遺伝子プール」をより反映している可能性もある。環境 DNA サンプルにどの程度の個体の情報が通常反映されているかは研究途上であり（Couton et al. 2023）、今後比較研究を進める必要があるが、本研究の調査流域ではハナカジカの個体群密度が概ね 100m²に 50 個体と大きいことから（Suzuki et al. 2021）、多数の個体の情報が環境 DNA で得られている可能性がある。このことは、環境 DNA による遺伝的分化は、同じ領域の組織 DNA による遺伝的分化との相関よりも、高精度の SNP データによる遺伝的分化との相関の方が高い場合があるという結果にも一部反映されているのかもしれない（Table 4-4；特に、上流データセットおよび 15-km データセットの D_{PS} を参照）。

4-4-2. 環境 DNA データに対する追加の処理の効果

系統地理学の観点から地域特有のハプロタイプやハプロタイプの分布域を調べていく場合、偽陽性・偽陰性を最小化してハプロタイプの在・不在を明らかにすることが極めて重要である（Turon et al. 2020；Tsuji et al. 2023）。しかし、本研究で扱ったようなローカルスケールの集団遺伝構造の推論や遺伝的分化の計算は、基本的に各集団内の遺伝子頻度に依存しており、遺伝子頻度の空間パターンや環境との関係性が解析対象となる。低い遺伝子頻度で検出されたハプロタイプが統計量に与える影響は比較的小さいものの、複数の地点で同じハプロタイプが低頻度で共有されていることは、遺伝子流動の強さを比較する上で重要な情報となる場合がある（Slatkin and Barton 1989）。一方、デノイジングは主に正しい配列と同調して発生す

るエラー配列を除去するため (Callahan et al. 2016)、デノイジングで除去できずに残っている偽陽性は全サンプルに少量ずつランダムに分布しており、推論に大きな影響を与えない可能性がある。これらの理由から、景観遺伝学で使用される統計量を計算する際に、遺伝子頻度の低い配列を一括除去することは必ずしも有益な選択肢ではないのかもしれない。特に、低リード配列の大胆な除去 (処理 2) を経たデータセットは組織 DNA との相関を大幅に悪化させており (Table 4-3)、このような処理は系統地理学では有益であっても景観遺伝学では不適と考えられる。逆に、半定量的アプローチ (処理 3) において、組織 DNA による遺伝的分化との相関は低下せず、むしろ一部のデータセットでは相関が上昇したという結果は、考慮する価値があるかもしれない (Table 4-4)。連続的な数値として計算される値を 5 段階というラフな値に変換しても精度に大きな変化がなかったという事実は、算出された統計量は値のわずかな違いに意味を見出すのではなく、全体的な傾向を捉えるために使用すべきであることを示唆している。

4-4-3. 今後の課題と展望

本章の研究では、景観遺伝学における環境 DNA の適用可能性と有用性を明らかにした。ここで示された環境 DNA の精度が、実際の景観遺伝学的解析に適用できる水準であると判断されたとしても、環境 DNA 調査ではすぐには解決できないいくつかの限界がある。一つは、環境 DNA に含まれる短い DNA 断片の情報量が少ないことである。本研究では mtDNA 内の約 400bp の単一領域を用いて解析したが、環境 DNA は水中では分解されるため、より長い配列の増幅は困難を伴う (Jo et al. 2017)。さらに、環境 DNA 研究で一般的に用いられる mtDNA は、基本的に単一遺伝子座に相当する情報量しか持たない (Andres et al. 2023b)。2010 年代以降の景観遺伝学研究は、複数の独立した遺伝子座を解析することで行われるのが一般的である (Wang 2011)。実際、本研究では、D-loop 領域から得られる集団遺伝構造の強さは、昨今の組織 DNA を用いた研究で一般的に用いられるゲノムワイド SNP データから推定されるほど明確ではなかった (Fig. 4-3)。より正確な分析には、mtDNA と連鎖していない核 DNA 内の遺伝子座を用いることが不可欠である (Couton et al. 2023)。環境 DNA における核 DNA の使用は依然として困難であるが、現在開発が進められているマイクロサテライト解析および SNP 解析の実装によって、この問題は解決できる可能性がある (Andres et al. 2021 ; Manel et al. 2025)。また、分析において地点ごとの採水の繰り返し回数を増やすことや、採水量・採

水箇所を工夫することなどにより、分析できる遺伝子座数が少ないながらも、情報量の観点から精度をより向上させることも可能と考えられる。環境 DNA 調査の 2 つ目の制約は、環境 DNA 調査で捉える生物情報は面的なものであり、極めてローカルな環境と対応付けた解析は困難なことである。本研究のような空間スケールであれば、前述のようにサンプリング間隔を考慮することで概ね対応できるが、環境 DNA 調査ではより局所的な微細環境（左右岸、瀬淵など）と対応付けた解析は難しい。環境 DNA 調査の 3 つ目の制約は、環境 DNA からは個体情報を得られないことである。本章で計算された統計量は、遺伝子プール内の遺伝子頻度を扱っているため個体情報を必要とせず、むしろ環境 DNA の採水は集団内の一部の個体を選択することによるバイアスを減らしているとさえ考えられる。しかし、実際の生態系でより複雑な生物学的問題に対処するためには、個体情報を用いた解析が必要な場合もあるだろう（Couton et al. 2023）。実際、第 3 章で用いた双方向的な遺伝子流動を推定する BayesAss は、個体を集団に割り当てるアサインメントテスト（Paetkau et al. 1995）の拡張である。第 3 章ではこの解析により夏季水温の低い支流から高い支流へのソース・シンク構造が検出されたが、個体情報がなければこの推論は困難である。

それでも、本章の研究は、環境 DNA には遺伝的分化に基づく基礎的な景観遺伝学的解析を組織 DNA に近い精度で行うポテンシャルを示した。本章の結果を踏まえると、例えば、地域個体群内における IBD や主要な障壁を検出することは、環境 DNA によっても行えるといえるだろう。IBD の解析は遺伝子流動が活発な空間スケールや最低限保全すべき区間延長などを把握することにつながり、主要な障壁を特定することは生息地の連結性に関する概況をとらえ、連結性を維持すべき範囲（保全単位）を検討するのに有効である。最先端の景観・河川景観遺伝学は景観・河川景観ゲノミクスと呼ばれるほど高度な解析が普通に行われるようになってきたが（Grummer et al. 2019）、伝統的な方法論を用いた景観遺伝学的解析も依然として重要性は高く、また、河川景観遺伝学においては、遺伝的分化の統計量をインプットとした解析技術は現在でも開発が進められている（White et al. 2020 ; Chafin et al. 2023）。2000 年代に基礎的な景観遺伝学を行うために使用されていた短い遺伝子断片データを、多地点・高頻度でのサンプリングに適した調査手法で迅速に得られるという点で、環境 DNA 調査の有用性は明らかであろう。加えて、環境 DNA 調査は採水地点のすぐ上流の集団に関する情報を面として捉えることができ、サンプルには多くの個体の情報を含んでいる可能性もあるため、同様の分析手法のもとでは組織 DNA に対して優位性を持つ部分もあると考えられる。さら

に、環境 DNA は、実用的には重要だがこれまで困難ではあった、複数種の（河川）景観遺伝学の同時実施を容易にする可能性もある（Zbinden et al. 2023）。環境 DNA で利用できるマーカー数の増加と、環境 DNA 技術の様々な分類群の生物への展開に伴い、環境 DNA を用いた景観・河川景観遺伝学はより有用となり、環境変化下における生息地の連結性の評価を含めた様々な目的に活用されることが期待される。

第 5 章 河川景観遺伝モデルを用いた遺伝子流動の規定要因解明と気候変動下での将来予測

5-1. はじめに

気候変動は河川生物の生息に密接に関わる 2 つの要因である水温と流量を大きく改変し、河川生態系に重大な脅威をもたらす (Comte and Olden 2017 ; Barbarossa et al. 2021) 。生息適地のシフトにより、通過不能な空間が増加し生息適地が断片化すると、種や地域個体群の絶滅リスクは増大する (Woodward et al. 2010) 。多くの研究で、気候変動に伴う種の分布と生息適地の変化が予測されているが (Rahel et al. 1996 ; Elith and Leathwick 2009 ; Comte et al. 2013 ; Ishiyama et al. 2023) 、生息地間の移住の頻度と連結性がどの程度変化するかについては未解明な点が多い。

生息地の機能的連結性を表す遺伝子流動の強度は、前章までに行ったように通常は観察された集団遺伝構造から個別に推定・議論されるが、もし遺伝子流動を景観変数によってモデル化できれば、遺伝子流動に関する知見を一般化し、環境変化に伴う変化を予測するために使用できるようになると考えられる (McRae and Beier 2007) 。遺伝子流動を景観変数でモデル化する研究は、これまでも景観遺伝学の分野で精力的に取り組まれてきた (Balkenhol et al. 2015) 。しかし、遺伝子流動をモデル化するために現在使われているほとんどの解析手法は、主に陸上生物を対象に開発されており、樹状構造をもつ河川生態系では有効性が低く (Davis et al. 2018 ; Chafin et al. 2023) 、河川生物において遺伝子流動の将来変化を予測することは困難であった。河川生物においても、集団間の遺伝的分化を地理的距離や環境の違いで説明する行列ベースの回帰モデルを作成することは可能である (Lichstein 2007 ; Grummer et al. 2019) 。しかし、このアプローチでは、河川ネットワークの構造や、個体がサンプリング地点間を移動する際に通過するすべての空間 (河川区間) における景観要素を考慮できない (Davis et al. 2018 ; White et al. 2020 ; Escalante et al. 2020) 。陸上生物においてよく行われているアプローチは、環境または場所ごとに「景観抵抗」を定義し、集団間の遺伝的分化と累積景観抵抗との関係进行评估するものである (IBR ; McRae 2006) 。河川生態系でも IBR の検証が行われた事例はいくつかあるが (例えば、Inoue and Berg 2017 ; Landguth et al. 2017 ; Escalante et al. 2018 ; Oliveira et al. 2019) 、景観抵抗は専門家の意見や他の手法 (例えば、生息適地モデルの推定値の逆数) により事前に設定されている (Spear et al. 2015 ; Zeller et al. 2012) 。しかし、遺伝子流動そのものを理解するには、景観抵抗は遺伝データから直接特定する必要がある

(Wasserman et al. 2010 ; Sartor et al. 2022) 。幸いなことに、近年、グラフ理論の枠組みで河川生物の遺伝データから遺伝子流動をモデル化する手法が複数開発されている (White et al. 2020 ; Chafin et al. 2023) 。これらの「河川景観遺伝モデリング」の手法を環境変化下での予測に適用した事例はまだないが、気候変動による将来変化の予測を実現する有用なアプローチとなり得るだろう。

河川生物における景観遺伝学的解析を困難にしているもう 1 つの要因として、水温などの重要な景観要素に関するデータが入手しにくいことが挙げられる。陸上生物の場合、気候変動の影響を予測するために、世界的に利用可能な気候データ (例えば、WorldClim ; Hijmans et al. 2005) が一般的に使用されている。しかし、河川生物にとって重要な現在および将来の水温データは、流量データと同様に入手は困難である。一部の研究では気温データを水温データの代替として用いているが (Almodóvar et al. 2012) 、実際には水温の変化は気温の変化とは一致しない。特に、地下水流出や他の局所要因によって引き起こされる水温の空間異質性は、気候変動下での河川生態系のレジリエンスを育む源である (Nakamura 2022 ; Ishiyama et al. 2023) 。したがって、河川生態系の研究では、水文地形学的要因がもたらす空間異質性を考慮した水温データを利用することが重要である。

ハナカジカに関しては、夏季水温に対応した個体群密度の違い (Suzuki et al. 2021) やソース・シンク構造 (第 3 章) を踏まえると、気候変動による水温上昇・生息適地減少は本種の遺伝子流動を阻害し、生息地を断片化させていくと予想できる。一方で、前章までの結果により、流域内での遺伝子流動は地理的距離と夏季水温では説明できない要因にも影響を受けていると考えられ、様々な景観要素を含めたモデルを作成することで、より正確に遺伝子流動の実態を把握できるだろう。

以上より筆者は、河川景観遺伝学におけるデータ入手と解析面の課題を踏まえ、近年開発された河川景観遺伝モデリング手法と、流域全体で水温を推定することのできる物理水文モデルを活用することで、本種の遺伝子流動のモデル化と将来予測が可能になると考えた。本章の目的は、(1) 河川ネットワーク内においてハナカジカの遺伝子流動を規定する要因を明らかにすること、(2) 遺伝子流動の強度を景観変数でモデル化し、気候変動下における遺伝子流動の将来変化を予測することとした。

5-2. 方法

5-2-1. 調査流域のグラフ化

本章の研究は金山ダム上流域を対象とし、第4章で示したサンプリング地点 (Fig. 4-1) のうち、金山ダム上流の13地点の遺伝データを用い解析を行った。このエリアはサンプリング地点間に魚類の移動を完全に阻害する横断工作物はみられず、景観要素の影響を評価するのに適すると考えられる。河川景観遺伝モデリングのため、サンプリング地点を結ぶ河川ネットワーク全体を、24のノードと23のエッジからなるグラフに見立てた (Fig. 5-1, 5-2)。ノードは、サンプリング地点、サンプリング地点から下流側にたどっていったときに他のサンプリング地点を集水域にもつ支流と合流する地点、およびサンプリング地点から下流側にたどっていったときに自身よりも流域面積の大きい支流と合流する地点に設定した。ノードを結ぶそれぞれの河川区間をエッジとし、解析の単位とした。

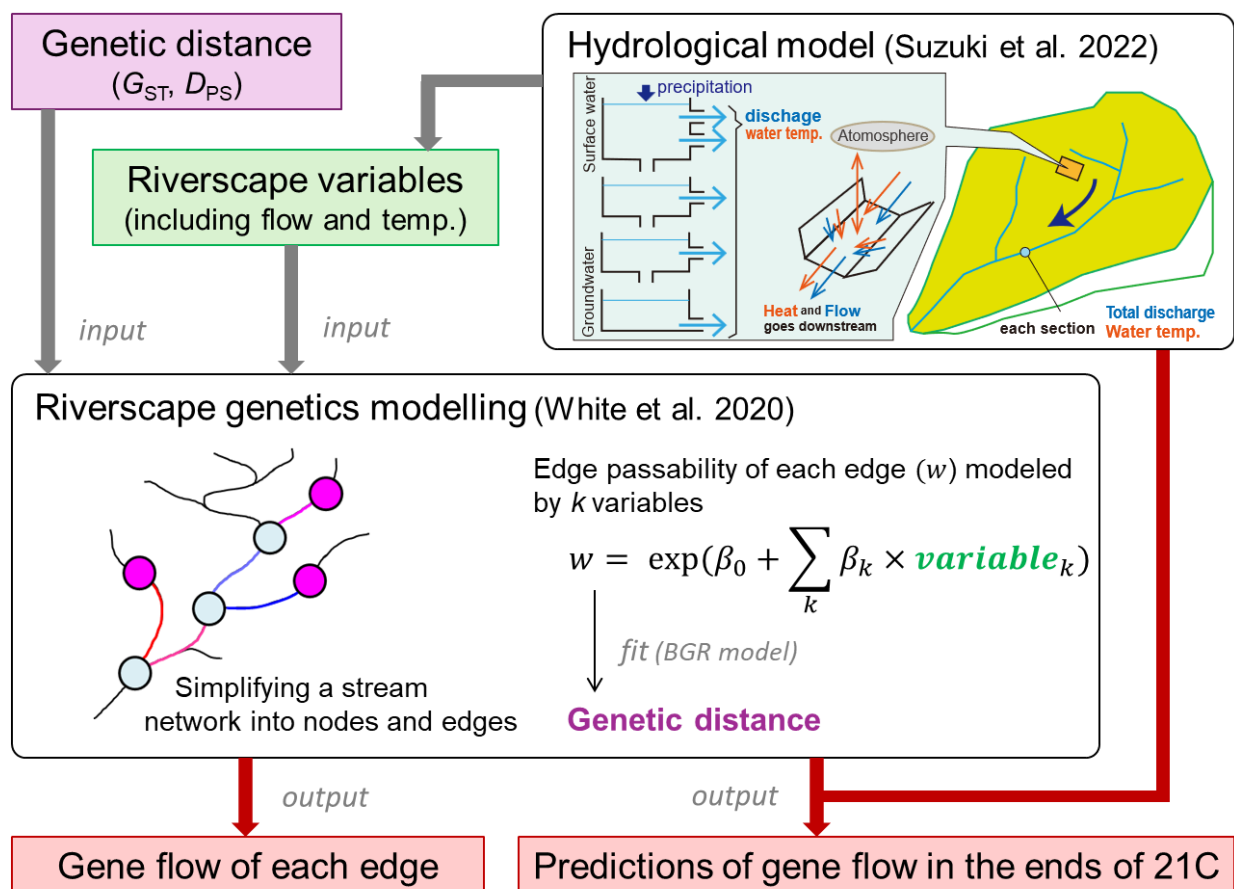


Fig. 5-1. Flow of the analysis.

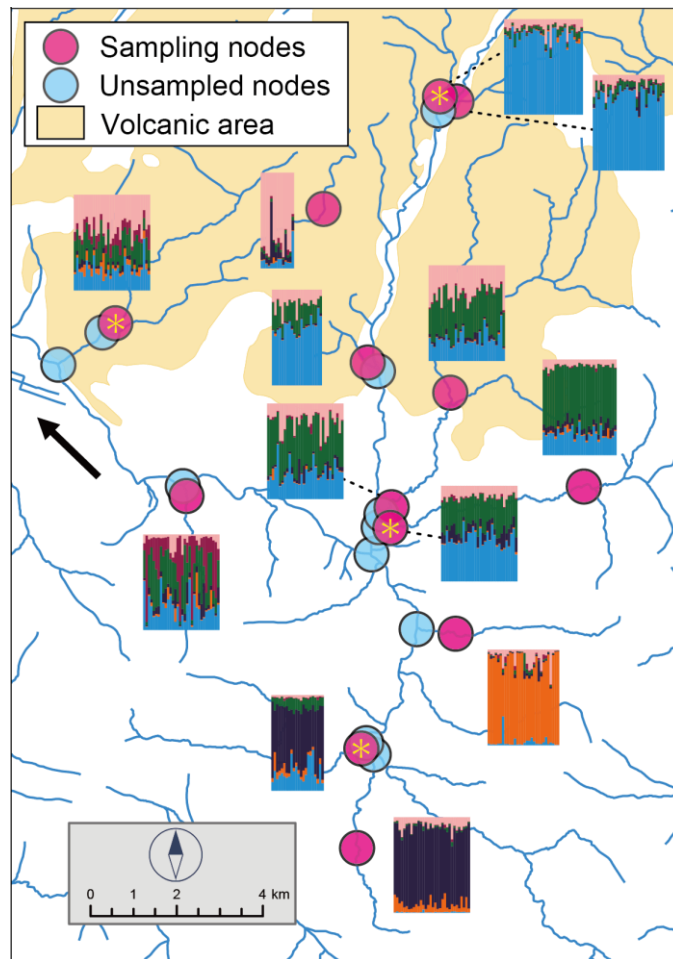


Fig. 5-2. Maps of the Sorachi River watershed showing the study area. Sampling nodes (sampling sites) and unsampled nodes (major confluences between them), which are delimitations of edges (stream sections), are denoted. Barplots with each sampling node indicate the population structure inferred by STRUCTURE ($K = 6$). Sampling nodes with asterisk (*) are the validation points for the hydrological model.

5-2-2. 遺伝データ

遺伝データは、第4章で取得した MIG-seq 法による SNP データを使用して解析を行った。遺伝データは 4-2-2 節に記載したものと同様だが、本章では金山ダム上流の 13 集団のみが対象となるため、*populations* コマンドでの「すべての集団で 80%以上共有する遺伝子座のみを SNP の抽出対象」とするためのコマンドが変化し (*-p 13 -r 0.8*)、使用した SNP 数は 212 となった。このデータセットで G_{ST} と D_{PS} を求め、3-2-3 章と同様の設定で STRUCTURE 解析を行った。 G_{ST} は長期的な遺伝子流動を反映する統計量として (Holsinger and Weir 2009)、 D_{PS} は最近の遺伝子流動を反映する統計量として用いた。 G_{ST} は GenAlEx 6.5、 D_{PS} は R 3.6.0 の *graph4lg* により求めた。

5-2-3. 河川景観データ

河川景観データは各エッジを単位として収集した。エッジの河川に沿った距離 (エッジ長)、勾配、河川次数、集水域面積は国土交通省の国土数値情報 (nlftp.mlit.go.jp) を使用して ArcGIS 10.7.1 (ESRI Inc.) で求めた。流量と水温は流域地質の違いを考慮した水文モデル (Suzuki et al. 2022) により推定した。水文モデルの詳細は Suzuki et al. (2022) のとおりだが、概要を以下に示す。

水文モデルは金山ダム上流域を対象としており、パラメーター調整および再現性検証においては、Fig. 5-2 に*印で示した 4 つの地点 (火山岩流域と非火山岩流域で各 2 地点) における 2018 年 3 月から 2019 年 9 月の流量・水温データ (石山 未発表) と、国土交通省水文水質データベース (www1.river.go.jp/) に掲載の金山ダム貯水池 (かなやま湖) 流入部 (太平橋) における流量・水温データを用いた。

まず、1 km メッシュごとの日融雪量と蒸発散量を大気・陸面過程モデル (LoHAS ; 臼谷ほか 2005) を用いて算出した。入力する気象データとして、現況の再現では日本気象協会北海道支部の空間補完データ、将来予測では上田ほか (2020) による 2080 年～2100 年の 1 km 単位の統計的ダウンスケーリングデータを使用した。上田ほか (2020) は、IPCC 第 5 次報告書 (IPCC 2014) で示されたシナリオのうち、温室効果ガス排出抑制などの気候変動緩和策を行わなかった場合を想定した RCP8.5 シナリオを採用している。このシナリオでは、世界平均気温は 21 世紀末までに約 4°C 上昇することが予測されており、考えられる最悪の場合を示すものである。本研究でも RCP8.5 シナリオを用いることで、気候変動の影響と想定されるリスク

をより明確に把握できるようにした。

各 1 km メッシュでの斜面流出量は、直列 4 段タンクモデル (Sugawara 1979) により求めた。このタンクモデルでは、有効降水量 (降水量 + 融雪量 - 蒸発散量) を入力し、表層流出 (1 段目) ~ 基底流出 (4 段目) を模した各タンクからの流出量を合計して斜面流出量とする。ただし、実態をより反映するため、火山岩流域でのみ、4 段目のタンクの底に穴を設け、この穴に浸透した水は本流 (流域面積 28 km² 以上に対応) ではじめて地表に流出することとした。流量は、斜面流出量を合計し、kinematic wave 式によって河道追跡を行った。水温については、各タンクからの流出成分ごとに異なる値を与えた。1 段目の流出成分は、積雪期は 0°C、非積雪期は日平均気温 (下限 0°C) に設定し、4 段目の流出成分は現在の年平均気温 + 1.5°C で、将来においても変化しないものとみなした。ただし、一部の研究では気温上昇に伴い地下水温も上昇する可能性を指摘しており (Suzuki et al. 2022)、本研究の仮定が単純化したものであることには留意する必要もある。2 段目と 3 段目の水温は、1 段目と 4 段目の水温を按分して与えられるものとした。流出成分の水温フラックスと、水面熱収支式から計算された大気 - 地表水温フラックスを合計し、kinematic wave 式により河道追跡を行った。タンクモデルのパラメーターは SCE-UA 法 (Duan et al. 1992) を用いて試行錯誤的に探索された。作成したモデルの再現性を示す Nash-Sutcliffe 係数は流量では中程度 ~ 高い値 (0.18 ~ 0.93)、水温では高い値 (0.78 ~ 0.92) を示した。重要な点は、これらパラメーター (按分係数を含む) に火山岩流域と非火山岩流域で異なる値を与えていることであり、これにより流量・水温の空間異質性を捉えている。

各エッジの流量・水温に関係する景観要素は、そのエッジの midpoint が属する 1 km メッシュで再現した 2018 年 9 月 ~ 2019 年 8 月の推定値から計算した。将来予測では、上述の RCP8.5 シナリオ下での気候データを水文モデルに入力し、2080 年 ~ 2099 年の変動をシミュレーションした結果を用いた。シミュレーションの最初の 1 年 (助走期間) である 2080 年を除いた 2081 年 ~ 2099 年の推定値 (すべて 9 月から翌年 8 月) の平均を将来の河川景観変数として用いた。

5-2-4. 河川景観遺伝モデリング

「BGR モデル」 (White et al. 2020) を用いて、各エッジの遺伝子流動の強度を景観変数の関数として確率的にモデル化した。この方法は近年開発された河川景観遺伝モデリング手法であり、遺伝的分化の統計量をインプットデータ (推定に用いる情報)、説明変数を景観要素

として各エッジの相対移住率（遺伝子流動の強度；通やすさ）を双方向的にモデリングする手法である。詳細は White et al. (2020) に詳しいが、隣接するノード i とノード j に結ばれたエッジの相対移住率 (w_{ij}) を k 個の景観要素 ($x_{ij1}, x_{ij2}, \dots, x_{ijk}$) と対応するパラメーター ($\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$) で以下のようにモデル化する：

$$w_{ij} = \exp(\beta_0 + \sum_k \beta_k x_{ijk}) \quad (5.1)$$

ここで、 β_0 は切片である。また、すべての景観要素は 0～1 に標準化されている。パラメーター $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_k$ の事後確率分布を、MCMC 法によって推定し、入力した遺伝的分化の統計量と合うような値を探索する。 w_{ij} と遺伝的分化の統計量を結びつけるための数学は、生物の移動パターンをもとにしたウィシャート分布および空間自己回帰モデルの理論が用いられており、Peterson et al. (2019) に詳しい。

BGR モデルは R 3.6.0 で実行した。 G_{ST} と D_{PS} を遺伝的分化の統計量として用い、10 個の景観要素 (Table 5-1 ; Fig. 5-3) を説明変数 x_{ijk} とした。BGR モデルは非対称的な景観変数を組み込むこともできるが、「上下流の方向」を除くすべての景観変数は対称的である。それぞれの統計量について、ベイズ情報量規準 (DIC) に基づくモデル選択を前進選択法によって行い、DIC が 7 以上減少しなくなるまで説明変数を追加した (Cain and Zhang 2019)。前進選択法のそれぞれの段階で、既にモデルに入っている変数およびそれらと相関が高い (Pearson's $r > 0.7$) 変数は、モデルに追加しなかった。予備解析で変数の個数とモデルの収束状況および計算時間との関係を確認し、説明変数が 4 個未満のモデルは、burn-in 25,000 回を含む MCMC 50,000 回、4 個以上含むモデルは burn-in 50,000 回を含む MCMC 100,000 回とした。最終モデルが定まった後、正確な β の推定値と 95%信頼区間を求めるための長いランを行った (burn-in 200,000 回を含む MCMC 500,000 回)。各エッジにおける w_{ij} の推定値の逆数を景観抵抗として地図上にプロットした。IBR の評価のため、集団間の遺伝的分化と経由するエッジの累積景観抵抗との関係を Mantel 検定 (9999 回置換) で調べ、集団間の遺伝的分化と地理的距離の関係と比較した。Mantel 検定は R のパッケージ *vegan* によって行った。将来の景観抵抗は、BGR モデルに水温の推定結果を代入することで予測した。将来変化の推定では、最近の遺伝子流動を反映する D_{PS} から作成したモデルを用いた。

Table 5-1. Riverscape variables considered in the present study.

Variable	Description	Hypothesis / Ecological importance	Ranges
Summer water temperature ^A	Mean water temperature from July to August (July 2019 to August 2019) [°C]	Streams with low summer water temperatures are suitable for <i>C. nozawae</i> occupancy/survival (Yagami & Goto 2000; Suzuki et al. 2021) and therefore migration may also occur frequently in these streams.	8.32–14.2
Water temperature fluctuation ^A	Standard deviation of the water temperature in one year (September 2018 to August 2019)	Thermally stable streams can be suitable for migration.	1.97–5.09
Drought water discharge ^{BC}	Flow rate on the day when the flow is 355th highest in one year [m ³ /s] (September 2018 to August 2019)	Drought water discharges, which particularly reflect the environmental heterogeneity created by groundwater (Nagasaka & Sugiyama 2010), ensure opportunities to colonize throughout the year.	0.07–6.24
Flow fluctuation ^{AB}	Coefficient of variation in the daily flow rate in one year (September 2018 to August 2019)	Hydrologically stable streams can be suitable for migration. Or, conversely, higher fluctuation may promote passive migration.	0.31–0.65
Edge length	Length of edges [km]	Isolation by distance (Wright 1943)	0.05–7.19
Slope	Mean gradient of the edge, i.e., the elevation range divided by edge length	Fish movement and migration are often impeded on steep slopes (Kanno et al. 2011).	4.15–56.5
Strahler's stream order ^C	Strahler's stream order of the edge	Even in cold-water fish, the mainstem may function as a corridor that facilitates connectivity among populations (White et al. 2020).	1–4
Shreve's stream order ^{BC}	Shreve's stream order (link magnitude), i.e., the numbers of confluence points upstream, at the midpoint of the edge	Given the dendritic arrangement and asymmetry of stream networks, sections with more confluence points upstream may increase the number of migrants passing through (Paz-Vinas & Blanchet 2015).	1–62
Catchment area ^{BC}	Cumulative area of the catchment calculated at the midpoint of the edge [km ²]	Sections with larger catchment areas may have more migrants passing through, based on the same principle as that of the stream order. Or, conversely, streams with larger catchment areas have been identified to have lower <i>C. nozawae</i> occupancies (Suzuki et al. 2021) and therefore it is also possible that less migration occurs in sections with larger catchment areas.	6.4–296.3
Direction	Whether the gene flow is toward the upstream (0) or downstream (1) direction	Most stream organisms have higher migration rates in the downstream direction than in the upstream direction (Lamphere & Blum 2012).	0 or 1

Variables with the same letters (A, B, C) have high correlations ($|r| > 0.7$); these variables were not included in the same model.

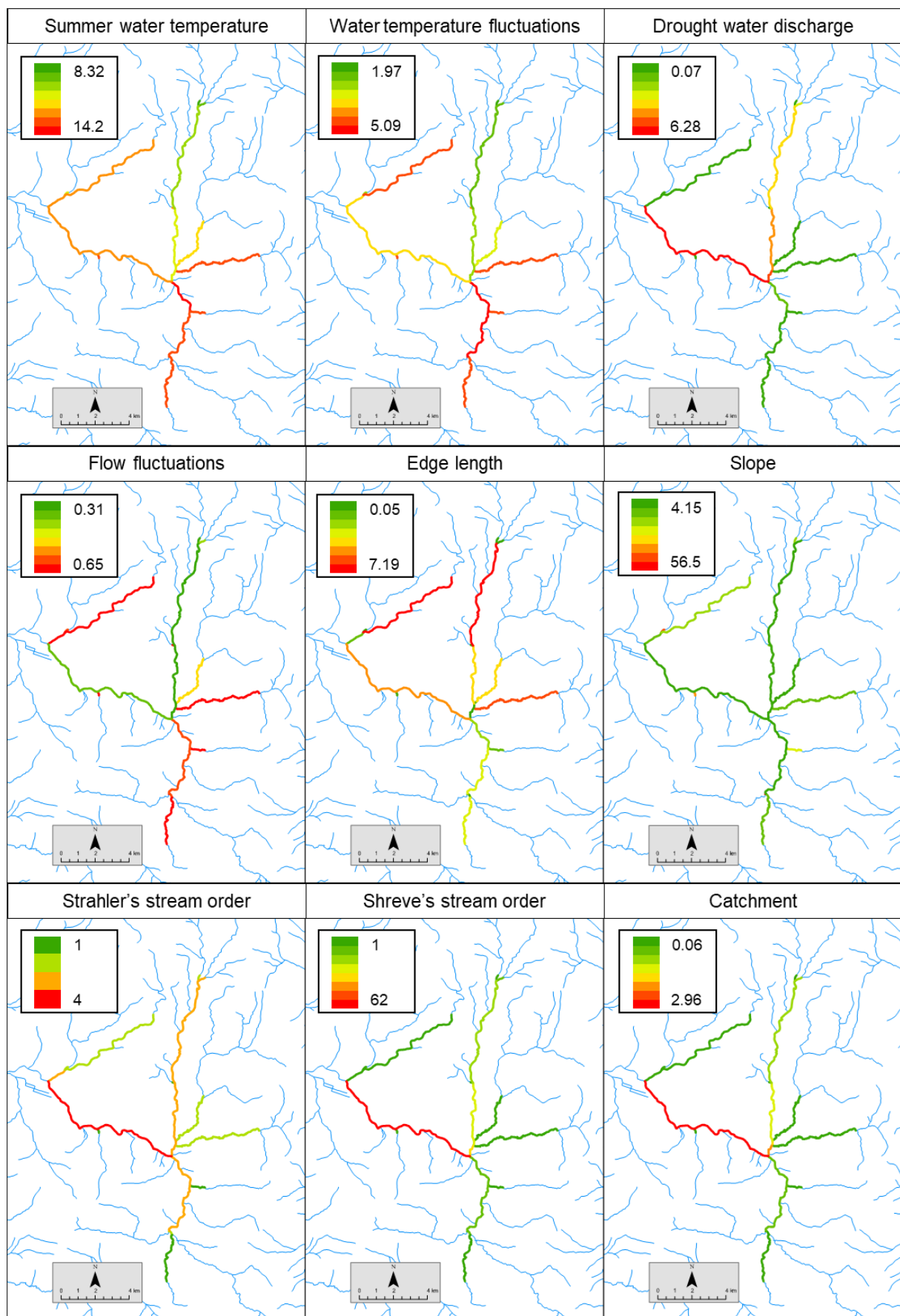


Fig. 5-3. Spatial distribution of riverscape variables. The edges are colored by the values of each variable.

5-3. 結果

5-3-1. 気候変動による流域環境の変化

水文モデルは、気温の上昇や降水パターンの変化を経験する 21 世紀末において、現在よりも年間の水温変動が大きくなり、夏季水温が上昇し、流量変動が増大し、渇水流量が減少することを示した (Table 5-2)。特に夏季水温は 21 世紀末までに流域全体で上昇し (Fig. 5-4a, b)、その上昇幅は本流で特に大きいと予測された (3 次以上の区間の平均値：現在 11.6°C、将来 18.1°C)。非火山岩流域および本流では、ハナカジカの生息に不適とされる 16.1°C を超える箇所も多数出現した (Fig. 5-4b)。ただし、北部の火山岩流域では、水温上昇の予測幅が 3°C 未満に抑えられる小支流も複数みられた (Fig. 5-4c)。

Table 5-2. Changes in riverscape variables associated with flow rate and water temperature under climate change. The minimum, average, and maximum values among all edges are listed. Details of each variable are described in Table 5-1.

	Summer water temperature [°C]		Water temperature fluctuation		Drought water discharge [m ³ /s]		Flow fluctuation	
	Current	Future	Current	Future	Current	Future	Current	Future
Min	8.32	9.55	1.97	2.19	0.07	0.07	0.31	0.59
Mean	11.97	16.23	3.82	5.15	1.57	0.98	0.51	0.88
Max	14.21	20.49	5.09	6.47	6.24	4.09	0.65	1.01

“Current” is based on a reproduced data from September 2018 to July 2019, while “Future” is based on a prediction from September 2082 to July 2100.

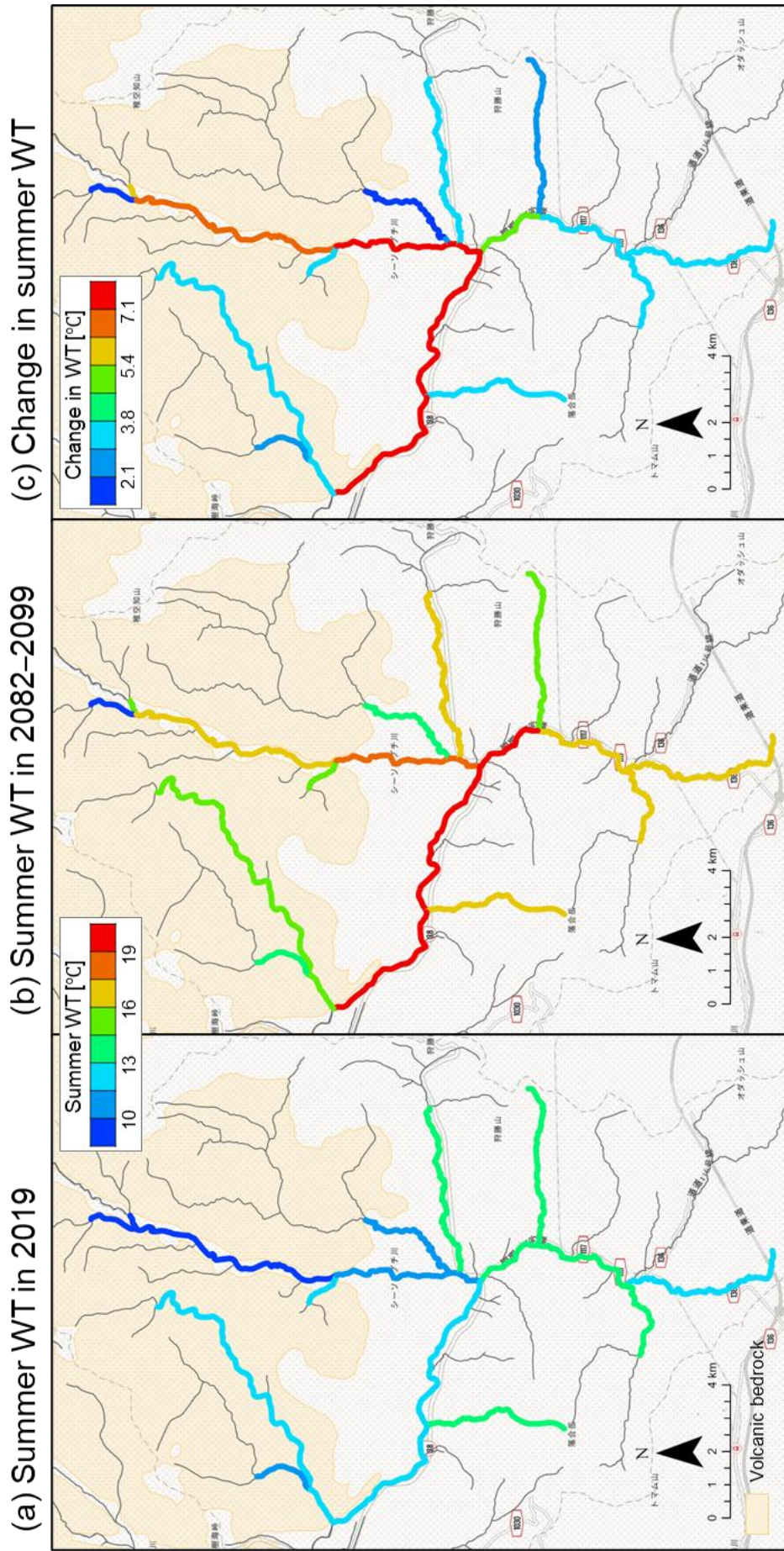


Fig. 5-4. Expected change in summer water temperature by the end of the 21st century. Mean summer water temperature in 2019 (a) and the end of 21st century (b) estimated by the hydrological model are displayed. Panel (c) shows difference between current and future summer water temperature. To improve readability, edges for which the sampling point is located in the lower part of a tributary are extended to the next upstream confluence point. The basemap is from ArcGIS (GSI, Esri, TomTom, Garmin, Foursquare, GeoTechnologies, Inc, METI/NASA, USGS).

5-3-2. ハナカジカの遺伝子流動を規定する要因

グローバル G_{ST} は 0.029、ペアワイズ G_{ST} は 0.000~0.047 の値をとり、 D_{PS} は全体の平均が 0.087、個別では 0.050~0.135 の値をとった。集団遺伝構造の強さが流域内で一様でないことは読み取れるが、STRUCTURE 解析だけではこの違いを規定する要因を推論することは困難であると分かる (Fig. 5-2)。河川景観遺伝モデリングのモデル選択では、 G_{ST} をもとにした場合には Shreve の河川次数、水温変動、勾配、エッジ長がこの順でモデルに取り込まれ、 D_{PS} をもとにした場合には Strahler の河川次数と夏季水温がこの順にモデルに取り込まれた (Table 5-3)。河川次数と水温に関係する変数は、使用した統計量によって異なるタイプ (Shreve か Strahler か、水温変動か夏季水温か) の変数に取り込まれたものの、どちらのモデルでも最初に取り込まれ、河川次数と水温が遺伝子流動に対して重要な役割をもつことを示す結果となった。河川次数は遺伝子流動の強度に対して正の効果を、水温変動または夏季水温は負の効果を示した。水温が遺伝子流動に与える効果量 (β) は D_{PS} によるモデルの方が G_{ST} によるモデルよりも大きかった。 G_{ST} によるモデルで取り込まれた勾配とエッジ長は遺伝子流動に対して負の効果を示し、これら変数が長期的な遺伝子流動に対して負の効果をもつことが示された。地理的には、南部の上流域で景観抵抗が本流よりも高く、北部の火山岩流域では上流であっても景観抵抗は抑えられていた (Fig. 5-5b, c)。Mantel 検定では集団間の遺伝的分化と推定した累積景観抵抗の間に非常に高い相関がみられ (G_{ST} : $r = 0.46$, $p < 0.05$; D_{PS} : $r = 0.60$, $p < 0.01$)、有意な IBR を示した (Fig. 5-6)。

5-3-3. 気候変動下の遺伝子流動の将来予測

遺伝子流動の将来予測では、景観抵抗は水温上昇に呼応して流域全体で現在よりも増加していくことが示された。21 世紀末において、本流や火山岩流域の上流部では現在の南部の上流域と同程度の景観抵抗をとるようになり、非火山岩流域である南部の上流域では、現在ではみられない程度の高い景観抵抗を示すと予測された (Fig. 5-5c)。

Table 5-3. Selected models explaining the strength of gene flow on the edges. Estimated β values (median) and their 95% credible intervals (95% CI) are displayed.

Variables	β	95% CI
(A) G_{ST}		
(Intercept)	5.84	5.65, 5.98
Shreve's stream order	4.51	3.96, 5.19
Water temperature fluctuation	-0.48	-0.61, -0.35
Slope	-0.94	-1.15, -0.67
Edge length	-0.42	-0.54, -0.32
(B) D_{PS}		
(Intercept)	6.06	4.94, 6.85
Strahler's stream order	2.50	1.72, 3.15
Summer water temperature	-1.42	-2.49, -0.38

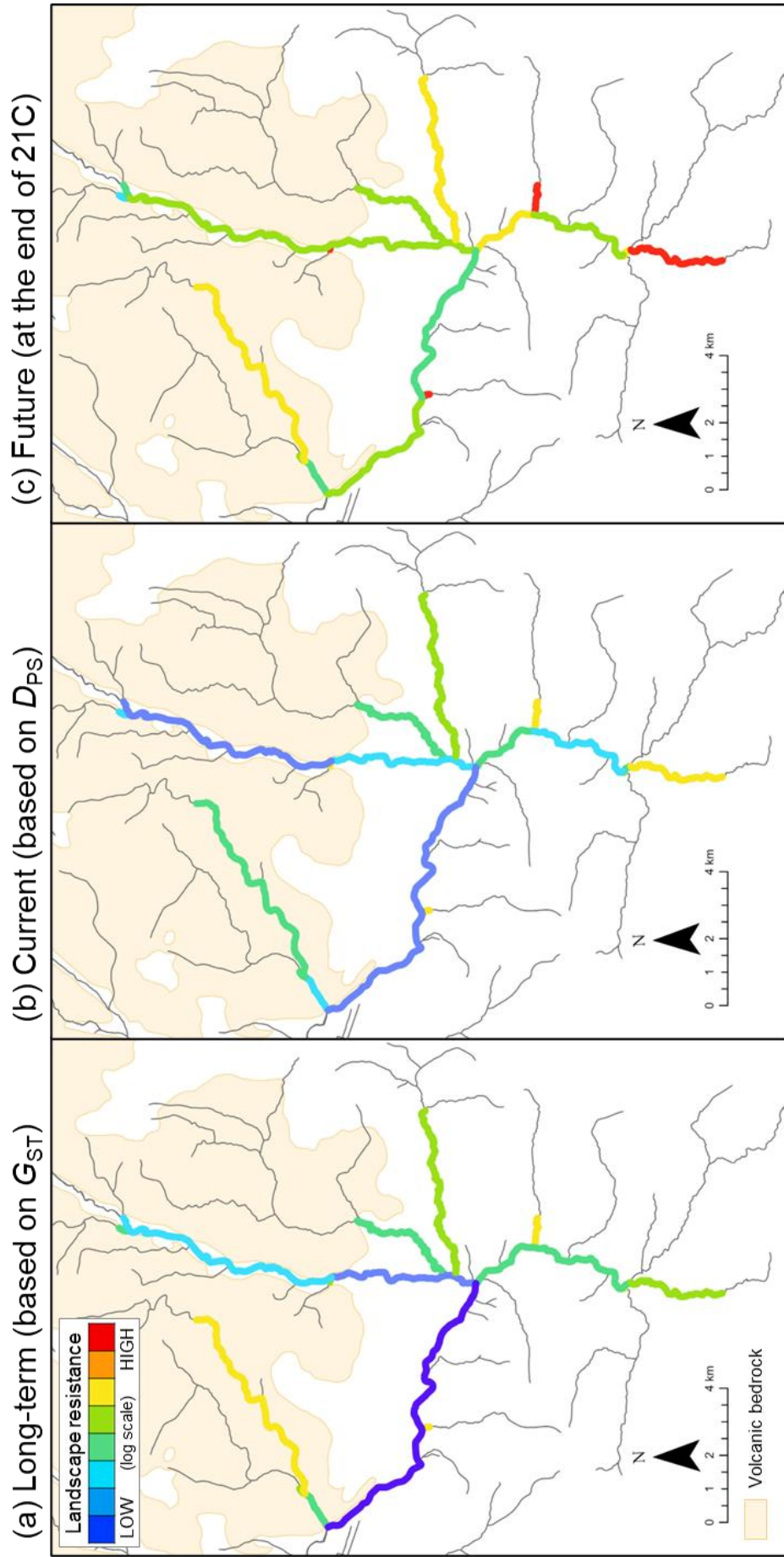
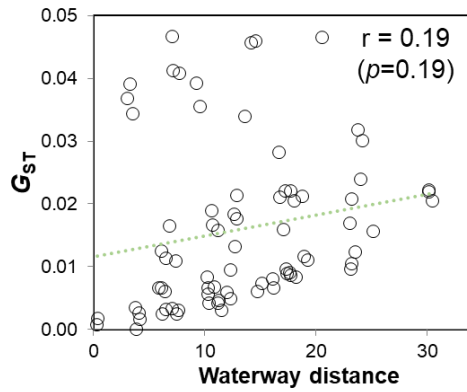
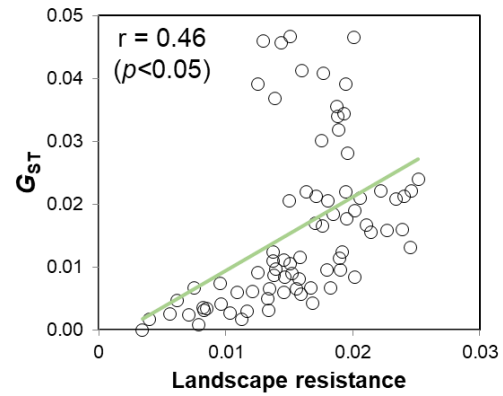


Fig. 5-5. Maps of the Sorachi River watershed showing landscape resistance estimated by BGR models (b–d). Landscape resistance is shown in three patterns: long-term gene flow modeled by G_{ST} (a), recent gene flow modeled by D_{PS} (b), predicted gene flow at the end of the 21st century derived by substituting future water temperatures into the model derived by D_{PS} (c).

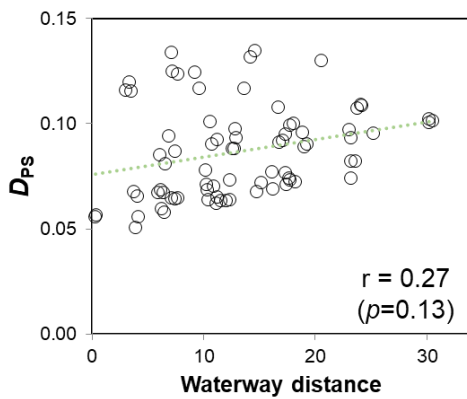
(A) G_{ST} - Isolation by distance



(B) G_{ST} - Isolation by resistance



(C) D_{PS} - Isolation by distance



(D) D_{PS} - Isolation by resistance

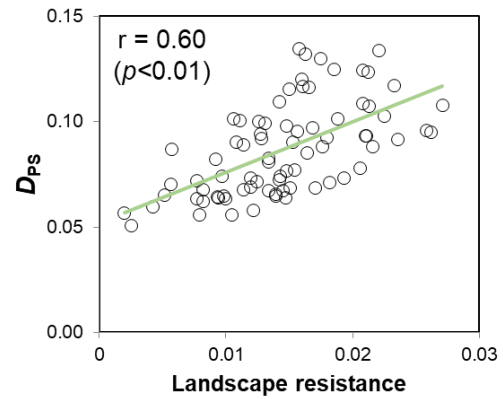


Fig. 5-6. Isolation by distance and isolation by resistance. Scatter plots of F_{ST} (A, B) or D_{PS} (C, D) versus simple geographic distance (A, C) and cumulative landscape resistance (B, D) are displayed.

5-4. 考察

5-4-1. ハナカジカの遺伝子流動を規定する要因

本章の研究では、河川ネットワーク内におけるハナカジカの遺伝子流動のモデル化と将来予測を行った。モデルの仮定が単純であること、精度の評価が難しいことなどの課題はあるものの、モデル化された景観抵抗は遺伝的分化をよく説明し (Fig. 5-6)、遺伝子流動の強度は環境変数によって概ね説明できることが分かった。

河川次数が遺伝子流動に最も強い影響を与える変数として特定されたことは、予想に反するものであった。冷水性魚類を対象にしたこれまでの研究では、河川次数と遺伝子流動の強度には正の関係をもつ場合と負の関係をもつ場合の双方が報告されている (Aunins et al. 2015 ; Escalante et al. 2018 ; White et al. 2020) 。本流は水温が高くなりやすく、冷水性魚類にとって適さない環境であることが多い。一方、本流は洪水により支流から流された個体が集積すると考えられ、また、本流では流量増加や生息場破壊が支流以上に極端にみられることも多い (Han et al. 2007 ; Koizumi et al. 2013) 。このため、特に能動的な移動分散の少ない本種では、2016 年の北海道豪雨も含めた洪水の影響を受け、下流に流される可能性が高い本流において遺伝子流動が増加した可能性がある。また、樹状の河川ネットワークにおいては、合流点がしばしば河川生物の安定的な個体や遺伝子の蓄積・供給源となることが知られている (Campbell Grant et al. 2007 ; Paz-Vinas and Blanchet 2015) 。実際に歴史的な変異が残りやすい mtDNA (組織 DNA) の分析結果 (第 4 章) でも、複数支流が集中的に合流する地点の近傍ではハプロタイプの数 (*hr*) が多い傾向にあり (Table 4-1 ; Pop2, 8, 10, 19 など)、合流点では複数の集団に由来する個体が集積していると考えられる。これらが下流へ移動することで、河川次数の高い河川での遺伝子流動が増加した可能性もある。

夏季水温または水温変動は、遺伝子流動に対して負の効果を与えていた。これは、夏季水温が高く、水温変動が大きい河川は本種にとって好適な生息環境ではなく (Suzuki et al. 2021)、移動分散が困難になるためと考えられる。冷水性魚類の研究では、遺伝子流動と水温に関連する変数 (気温や標高など) との関連が示唆されることは珍しくないが (Kanno et al. 2011 ; Hand et al. 2016 ; Escalante et al. 2018) 、本研究では空間異質性を加味して推定した水温そのものを景観要素に用いて、遺伝子流動との関連を評価することができた。 G_{ST} のモデルには勾配とエッジ長も含まれていたが、 D_{PS} のモデルには含まれていなかった。これらの結果より、多くの野生生物と同様に地形は長期的な集団遺伝構造の形成に影響を与えていると考えられ

るものの (Caldera and Bolnick 2008 ; Kanno et al. 2011)、現在の遺伝子流動の大部分は河川次数と水温によって説明できることが分かった。上一下流の方向は遺伝子流動に影響を与える変数として検出されなかったが、これは第 3 章で示唆された標高よりも夏季水温が遺伝子流動の方向に影響を及ぼしていること (Table 3-4) から支持される。

G_{ST} と D_{PS} により推定した景観抵抗の地図は視覚的に類似しており (Fig. 5-5)、これは区間ごとの景観抵抗の大小は長期間変化していないことを示している。全体的には、非火山岩流域である南部の小支流では景観抵抗が大きく、遺伝子流動が特に阻害されている傾向がある。非火山岩流域では地下水流出が豊富な火山岩流域と比較して水温変動が大きい (Ishiyama et al. 2023)、南部の遺伝子流動は主に水温の影響によって抑制されていると考えられる。この地理的パターンを STRUCTURE 解析のバープロット (Fig. 5-2) と比較すると、遺伝子流動が阻害されている非火山岩地域の上流域は、強い集団遺伝構造が観察された地域とほぼ一致している。集団遺伝構造の強度が不均一である理由は第 3 章の STRUCTURE 解析や第 4 章の mtDNA 分析では不明だったが、河川景観遺伝モデリングによりその要因を推論することができた。

5-4-2. 気候変動下の遺伝子流動の将来予測

水文モデルを用いた RCP8.5 シナリオ下における夏季水温の推定では、21 世紀末までに流域全体で夏季水温が上昇し、1~2 次の小流域においては非火山岩流域で上昇幅が大きい傾向にあることが分かった。3 次以上の本流では、夏季水温の上昇幅はさらに大きく、一部区間には気温の上昇量 (5.0 K ; Suzuki et al. 2022) を超える水温上昇も予測された。その結果、本流のほとんどの区間で夏季水温はハナカジカの生息適地度の指標である 16.1℃を超過する予測となった。なお、本流で水温上昇が顕著だったのは、河川規模が大きくなるほど大気から熱を取り込む機会が大きくなるためと考えられる。水文モデルは本章で対象としたエリアの最下流部 (本流) である太平橋でも再現性検証が行われているが、モデルのパラメーター調整 (現地観測データとのバリデーション) は主に 2 次河川で行われており、本流では小流域よりも誤差が大きくなる可能性にも留意すべきである。また、地下水温の上昇に関しては知見が限られているが、もし地下水温が速やかに上昇した場合は、特に小流域において予測以上に顕著な変化となることも否定できない。

遺伝子流動の将来予測では、21 世紀末までに流域全体で遺伝子流動が大幅に減少すると予

測された (Fig. 5-5c)。現在は金山ダム上流域のうち南部でのみ明確な集団遺伝構造がみられるため、北部が現在の南部と同程度の遺伝子流動の強度になるという予測は、流域全体の支流が遺伝的に断片化する可能性があることを示唆している。それでも、火山岩流域が優占する北部では遺伝子流動が豊富な支流がいくつか残ると予測された。第 3 章では、夏季水温の低い河川区間が流域内の個体供給源として機能することが示唆されたが、本章の結果により、これら区間が個体供給源としてだけでなく、流域における移動分散経路としても機能する可能性が示された。

既往のシナリオ分析では、Inoue and Berg (2017) は景観抵抗を生息適地モデル推定値の逆数とみなし、景観抵抗の増加が将来的に淡水二枚貝の遺伝子流動を減少させると予測した。これは、河川生物において遺伝子流動の将来変化を予測した重要な研究である。しかし、生息地選択で重要な景観要素は移住で重要な景観要素と異なることがあり、生息適地モデルで作成された景観抵抗は実際の移住とそれにとまなう遺伝子流動を十分反映しないことが知られている (Wasserman et al. 2010, 2012 ; Mateo-Sánchez et al. 2015 ; Sartor et al. 2022)。ハナカジカでも、遺伝子流動に正の効果を示した河川次数と非常に高い相関をもつ集水域面積に、本種の出現と負の関係がみられたことが本流域において報告されている (Suzuki et al. 2021)。これは、遺伝子流動の強度を生息適地度と分けて考える必要性を強調するものである。

本研究は、水温を含む河川景観変数を用いて遺伝データから遺伝子流動をモデル化した点で新しい。冷水性魚類の遺伝子流動が気候変動下で大幅に減少するという予測結果を踏まえると、気候変動下においては流域内の生息地の連結性を維持・向上させていくことが重要と考えられる。その際、流域地質に基づく水温の空間異質性を加味することは有効と考えられる。例えば、第四紀火山岩が分布していない南部では、支流でも夏季水温の上昇幅が大きく、火山岩流域よりも気候変動のリスクが高いことに留意する必要がある。また、本流は生息地としては必ずしも適してはいないが、移動経路 (コリドー) としては重要な役割を担っている。水流などで流された個体が速やかに支流の生息適地に移動できるよう、本流で移動分散を阻害する砂防ダムなどの構造物はできる限り設置せず、やむを得ず設置する場合も底生魚の移動経路が保たれる形にすることが望ましい。また、本流は気候変動による水温上昇が顕著であることが予測されているため、本流において休息できる生息場 (スポット的な湧水箇所や瀬淵) の保全・創出や、既存構造物 (護岸、床止め) の改善のようなポジティブな方策をとることも有効と考えられる。

一方、遺伝子流動を考慮した気候変動適応策の推進には実用上の課題も残る。本章で用いた手法（BGR モデル）は応答系が指数関数のみしか表現できないこと、モデルの数学的背景により解析する遺伝子座の数が 1 つだとうまく機能しないという問題点がある。いずれも変更には高度な数学的検討が必要だが、特に後者については第 4 章で示した環境 DNA 調査で得られたデータを用いる際の制約となるため、1～数個の遺伝子座であっても河川生態系で IBR の評価を行えるような手法を今後開発する必要がある。本研究の対象流域では、水温の空間異質性がみられ、水温のレンジはある程度広いものの、現在ハナカジカが生息できないほどの高水温区間は含まれていなかった。一方で、将来予測では生息が困難とされる 16.1℃ を超える区間が本流を中心に出現すると予測された。本流は遺伝子流動の観点からは重要であると考えられたが、生息ができないほど高水温になった場合に、遺伝子流動が完全に阻害されるのか、モデルのように単調な低下に留まるのかは不明である。これらを含め、今後は気候変動により冷水性魚類の遺伝子流動または移動分散が減少していることを実データから検証し、気候変動下の地域個体群のリスクについて確固な証拠を積み重ねていく必要もある。

第 6 章 総合考察

本研究では、自然度の高い空知川上流域に生息するハナカジカを材料とし、集団遺伝構造と遺伝子流動の包括的な評価、および現地調査の簡便化と解析手法の拡張に資する検討を行った。本章では、一連の研究を（1）冷水性魚類を長期的に存続させていくための河川・流域管理方針および（2）河川生物の保全に資する遺伝子流動の効果的な評価手法の観点から総括する。（1）に関しては、最初に第 3 章と第 5 章の結果を用いて、冷水性魚類の連結性を確保するために優先的に保全すべき箇所の環境特性を整理するとともに、保全優先度の高い箇所を例示する。その後、（2）に関して、第 3～5 章の検討内容を踏まえ、河川生物の遺伝子流動を包括的に評価して保全に資する知見を得るための調査・解析フローを提案する。

6-1. 気候変動下における冷水性魚類の保全方策

第 3 章では、ハナカジカは流域内で明瞭な集団遺伝構造がみられる一方で支流間ではある程度の遺伝子流動がみられること、夏季水温の低い支流が流域内で個体供給源として機能している可能性が高いことが示され、夏季水温の低い支流そのものや、これら支流と他の支流との河川の連続性を保全する重要性が高いことが示された。第 5 章では、河川ネットワーク内の遺伝子流動の強度をモデル化・地図化することで、遺伝子流動の維持には夏季水温の低い支流とともに本流が重要な役割を果たしていることや、気候変動によって遺伝子流動は流域全体で大幅に減少すると予測されることが分かった。

淡水性カジカの移動分散の程度には未解明な点が多い。生息適地においてハナカジカの成体を対象に標識採捕法を行った研究では本種の移動が極めて少ないことが確認された一方で（Goto 1998）、遺伝的手法を用いた他の淡水性カジカの研究では上流から下流の遺伝子流動が頻繁に起こっていることが複数回示されている（Hänfling and Weetman 2006 ; Junker et al. 2012）。さらに、最近の調査では上流方向への数百 m の移動や（Wells et al. 2017）、生息環境が悪い場合には未占有の支流にすぐに再移入することなども示されてきている（Mundahl 2024）。したがってハナカジカについても、水流などで受動的に流されることと、生息適地を求めた移動することの双方が移動分散の主要な原動力と考えられる。したがって、本研究から考えられる本種の遺伝子流動の主な形成プロセスは以下のように推定される。（1）流域地質の違いなどにより局所的にみられる夏季水温の低い支流では再生産が盛んであり、出水時

などに多くの個体が本流・下流方向に流される。(2) しかし、本流では生息適地度が低いため、近傍の支流に逃げ込み、生息地を見つけ定着する。(3) その際、一部個体が数百 m 以上の距離を遡上することもある。このことから、本種の生息地の連結性の保全のためには、本流において流下がスムーズに行われることや、流された個体が速やかに支流の生息適地に移動できることが遺伝子流動を担保する必要条件と考えられる。支流の生息適地に移動する際には、河川次数の高い区間を経由しなければならないこともある。したがって、本流内の河川の連続性および本流と生息適地となる支流との連続性を確保することが、流域内の利用可能な生息地を担保するうえで欠かせないだろう。

先行研究では、本研究で扱ったハナカジカ（底生魚）と同所的に生息し、異なる生活史を持つ冷水性魚類であるサケ科魚類（オショロコマ、アメマス）において支流間の移動性が高いことが示されている（Koizumi 2011 ; Nakajima et al. 2020）。これら種では繁殖可能な生息適地とそこからの回遊ルート、言い換えれば夏季水温の低い支流と金山ダムまでの本流について、連続性を確保することが重要と考えられる。また、本流域に生息する絶滅危惧種イトウについても、夏季水温の低い支流とかなやま湖を往復することから、保全のための条例が制定されている（南富良野町 2025）。これら種に対する基本的な保全方針は本研究で得られたハナカジカの保全に有効な方策と概ね同様であり、「夏季水温の低い支流と、これら支流と他の流域を結ぶ本流」は、北海道に生息する冷水性魚類の多くに対して保全優先度の高い箇所とといえるだろう。

本研究の調査流域には、上一下流で河川を分断する金山ダムが含まれていた。一般に大ダムは生息地の連結性の観点からは悪影響を及ぼすものであるが（Barbarossa et al. 2020）、金山ダムについては、現状、上流側にも下流側にも火山岩流域に代表される低水温区間が十分含まれており、実際に上流と下流での遺伝的多様性に差異がないことから（Fig. 3-2）、冷水性魚類への影響は小さいと考えられる。一方で、生息地が小流域または非火山岩流域のみに分断されるような横断工作物の影響は大きいと考えられ、本研究でも実際に非火山岩の小流域に分断化された地点（第 3 章の Pop13）では遺伝的多様性は低くなっていた。また、火山岩流域などの低水温河川が個体供給源となりうることで、本流は多くの個体の移動分散に寄与していることから、広い非火山岩流域につながる本流（「非火山岩流域の付け根」）では、横断工作物の設置などによる冷水性魚類への影響は甚大となるだろう。例えば、過去には JR 北海道によりルウオマンソラブチ川本流（シーソラブチ川との合流点の上流 ; Fig. 2-1）に堰堤を設

置する提案がなされていたが（JR 北海道 2017）、ルウオマンソラプチ川本流で冷水性魚類の移動ができなくなった場合、南部の広い延長の区間で火山岩流域からの個体供給を受けられなくなる可能性がある。流域内の広い区間への個体供給を支える区間にやむを得ず横断工作物を設置する必要がある場合は、地域的に重要性が謳われているサケ科魚類のみならず、カジカ類のような底生魚も遡上できるような措置を講ずることが望ましい。カジカ類などの底生魚が遡上できるようにする措置としては、例えば不透過型ダムの透過型化への改良（大浜・坪井 2009）や、魚道を設置したうえで、水際に粗石や鋭角の庇を設置して遡上失敗を防ぐことなどが考えられる（Muraoka et al. 2017）。

しかし、これらは遺伝子流動の視点からのみの検討であることに留意が必要である。RCP8.5 シナリオでの水温推定の結果、3 次以上の区間の平均は現在は約 12℃、将来は約 18℃であり、ほとんどの本流区間が生息の閾値である 16.1℃を上回っていた（第 5 章）。もし、将来の気温上昇を 2℃以下に抑えられれば（RCP2.6）、気温上昇が半分になると水温上昇も半分になるという単純な仮定の元では、本流でも夏季水温は 15℃前後に抑えられると考えられる。この場合、遺伝子流動は全体として低下はするものの、移動分散の成功率が急激に下がるなどの未知の問題は生じにくいだろう。Ishiyama et al. (2017) では生息地の質の観点からも、2061～2080 において RCP8.5 シナリオでは火山岩流域の 61%しか生息適地に収まらない一方で、RCP2.6 シナリオでは火山岩流域の 84%で収まることを示している。このため、気候変動の適応策のみでなく、緩和策を推進し気温と水温の上昇を抑えることが重要である。特に、前述のルウオマンソラプチ川本流は物理水温モデルによる推定夏季水温が推定区間内で最も高かったため（Fig. 5-3）、今後の気候変動の進み方によっては人為的改変がなくても移動経路としての機能が低下することも念頭に魚類相の変化を注視していく必要がある。

6-2. 河川生物の保全に向けた遺伝子流動の評価指針

本研究では、遺伝子流動の評価により生息地の連結性の面からハナカジカの保全優先度の高い区間の環境特性を捉えた。Suzuki et al. (2021) および Ishiyama et al. (2023) は、本研究の調査地と同じ空知川上流域において本種の在・不在および個体数を調査し、生息地の質・量の観点から夏季水温との関係を示すとともに、気候変動下での保全方策を提案した。これらの研究では、夏季水温の低い支流、特に 16.1℃ 以下の区間が本種の生息場として適しており、流域地質による水温の空間異質性は気候変動下の避難場（レフュジア）を形成するこ

とが提示されている。本研究より、このような夏季水温の低い区間は、生息適地として機能するのみならず、個体供給源として近傍の支流における遺伝的多様性や集団の存続を支えていることも分かった。また、支流間を結ぶ本流は遺伝子流動が豊富にみられ、生息地の連結性の観点から重要な役割をもつことが示された。生息場の質の観点から流域をみると、本流は夏季水温が高く生息適地度が低いことも多いため、その保全の必要性は見過ごされがちである。本研究で行った遺伝子流動評価の結果を合わせることで、本流等の保全が重要なことをはじめて明示することができた。さらに、気候変動下の将来変化を加味することで、将来生息適地の量が減少するだけでなく、遺伝子流動の強度も低下することを念頭に積極的な保全方策を検討しなければならないことが分かった。

このように、生息適地度だけでなく遺伝子流動を評価することは、景観内の種や地域個体群を長期的に存続させていくための基礎情報を提供し、実効性の高い保全方策を立案するために重要である。以降では、一連の研究から、河川生物の遺伝子流動評価に必要な遺伝データを取得し、生息地の連結性の観点から保全に有用な情報を得るための調査・分析の流れを提案する。

遺伝子流動を評価するためには、「調査地点の選定」「サンプリング・遺伝子分析」「データ解析」といった複数の工程を要する (Fig. 6-1)。

集団遺伝学において調査地点の選定は重要である (Meirmans 2015)。遺伝子流動を評価する景観遺伝学的解析を行う場合は、遺伝子流動は生物の移動分散によって起こることを念頭に、対象とする生物種の移動能力を加味したローカルスケール (淡水魚類の場合は、流域内など) でのサンプリング地点を検討すべきであろう。サンプリングする空間スケールが大きい場合は、保全単位を明らかにするなどの大きな方針を定めるうえでの意義はあるが、どのような箇所でも河川の連続性を確保すればよいかなどの保全方策の検討には結びつきにくい (Cruzan & Hendrickson 2020)。また、対象とする範囲内の個別の箇所の選定においては、第 3 章で試行したように、対象種に強く影響すると考えられる環境要因の異なる地点が入り混じるようにサンプリングをすることで、データ解析や結果を考察する際に有利になる。

サンプリングは遺伝子分析の方法とも関わる。本研究ではこれまで行われてきた各地点で対象種の組織片を数十個体収集する方法に加え、環境 DNA を採水するアプローチを提示した。第 4 章で検討したように、環境 DNA には基礎的な景観遺伝学的解析はできるポテンシャルがあり、特に集団遺伝構造の概況 (完全に分化しているか、多少の交流・IBD がみられる

かなど) や、流域内の主要な障壁の特定のみを目的とする場合には十分な情報が得られると考えられる。一方、遺伝子流動と景観要素の関係を調べる場合にはソース・シンク構造を含めた複数仮説の検証が重要であるが(第3章)、個体情報の得られない環境 DNA 調査では、アサインメントテストや家系解析など、ソース・シンク構造の特定に有効ないくつかの解析手法を適用できない。遺伝的多様性や遺伝子頻度を用いて遺伝子流動の方向性を推論するアプローチもあるが(例えば、Excoffier et al. 2013 ; Sundqvist et al. 2016)、対象とする時間スケールが長いことや、多くの条件を仮定する必要があることなどから、実務の現場で結果を解釈し、活用するにはハードルもあるだろう。そのため、生息地の連結性について景観要素と対応付けて評価する必要がある場合には、現時点では可能であれば組織 DNA から複数遺伝子座を捉えることのできるマーカー(ゲノムワイド SNP など)を分析することが理想的である。また、実務上の理由(コストなど)で対象地域全体での組織 DNA の取得が難しい場合は、環境 DNA 調査を基本に、一部地域で組織 DNA を併用することで補完的な情報を得られるだろう。例えば、主要な障壁の検出を環境 DNA 調査で網羅的に行い、特定されたある分集団内について、組織 DNA により景観要素との関係を詳細に評価するなどが想定される。ただし、一部の絶滅危惧種などで組織 DNA そのものの入手が困難な場合は、環境 DNA 調査を行ったうえで、一部仮説を遺伝子分析以外の調査(後述)で検証することも情報の補完に有効と考えられる。

データ解析については、集団遺伝構造の様々なパターンを捉えるためにも、各サンプリング地点(生息地)の位置や環境に着目した解析(第3、4章のアプローチ)と、各サンプリング地点を結ぶ空間全体(マトリックスを含む)に着目した解析(第5章のアプローチ)の両面からの評価が効果的だろう。河川ネットワークをグラフとして見れば、前者を「ノードベースの解析」、後者を「エッジベースの解析」といえる(Wagner & Fortin 2013 の表現を一部改変)。ノードベースの解析については、第3章で示したように、集団遺伝構造の特定、IBD、IBE の検証のほか、ソース・シンク構造の評価も行うことが重要である。また、IBDなどを解析するうえで必要な遺伝的分化の統計量として、最近の遺伝子流動をよく反映し、小さな遺伝的分化の違いをよく捉えられる D_{PS} は有用である。実際に第3章では D_{PS} の方が F_{ST} に比べてよく IBD を捉えられており、また、第4章では環境 DNA と組織 DNA、mtDNA と SNP データとの相関は D_{PS} の方が高かった。環境 DNA 調査で得られたデータからはソース・シンク構造の解析が難しいため、組織 DNA で一部補完するか、組織 DNA を分析できない場合には

繁殖調査のような生態学的な調査と組み合わせて考察することで、個体供給源となりうる重要な箇所の特定をスムーズに行えるだろう。

エッジベースの解析も、IBR の仮説を調べるために必要である。遺伝子流動を阻害する景観要素を特定することは、環境が変化した際の遺伝子流動の変化を予測するという点でも重要である。特に対象地域で人為的な環境改変が想定される場合や、気候変動の影響が危惧される場合は、河川景観遺伝モデリングを活用して変化予測を行うことで、効果的に対策を検討することができる。組織 DNA を分析できない場合は、対象地域で個体数調査などを行い、生息適地モデリングとグラフ理論を組み合わせて景観全体の連結性維持のために重要な区間を特定する手法 (Ishiyama et al. 2018) などが併用の候補として考えられる。なお、環境 DNA 調査のデータからでも簡易的な IBR の解析は STREAMTREE (Kalinowski et al. 2008) などを用いることで可能だが、景観要素との関連を捉えることは困難である。

今後、ネイチャーポジティブ実現のため生物の生息・生育・繁殖環境を保全・創出する河川整備や生態系ネットワーク形成を目指した施策が加速していくが (林 2024)、生息地の質・量だけでなく連結性にも着目し、整備内容等を検討していくことがより望ましい。なぜなら本研究でも示したとおり、好適な生息地と移動分散しやすい河川区間の環境特性は異なるからである。遺伝子流動の評価を実践することで、「質の高い生息地を増やす」アプローチと「生息地の連結性を向上させる」アプローチの両面から河川・流域管理指針を立てることが可能になるだろう。河川を含む水域では環境 DNA 技術も実務展開されてきていることから、現地調査の負担や関係者の「DNA」に対するハードルは低くなっていくと考えられる。河川において遺伝子流動評価の考え方をを用いた試行的な調査や新たな研究開発が進んでいくことが期待される。

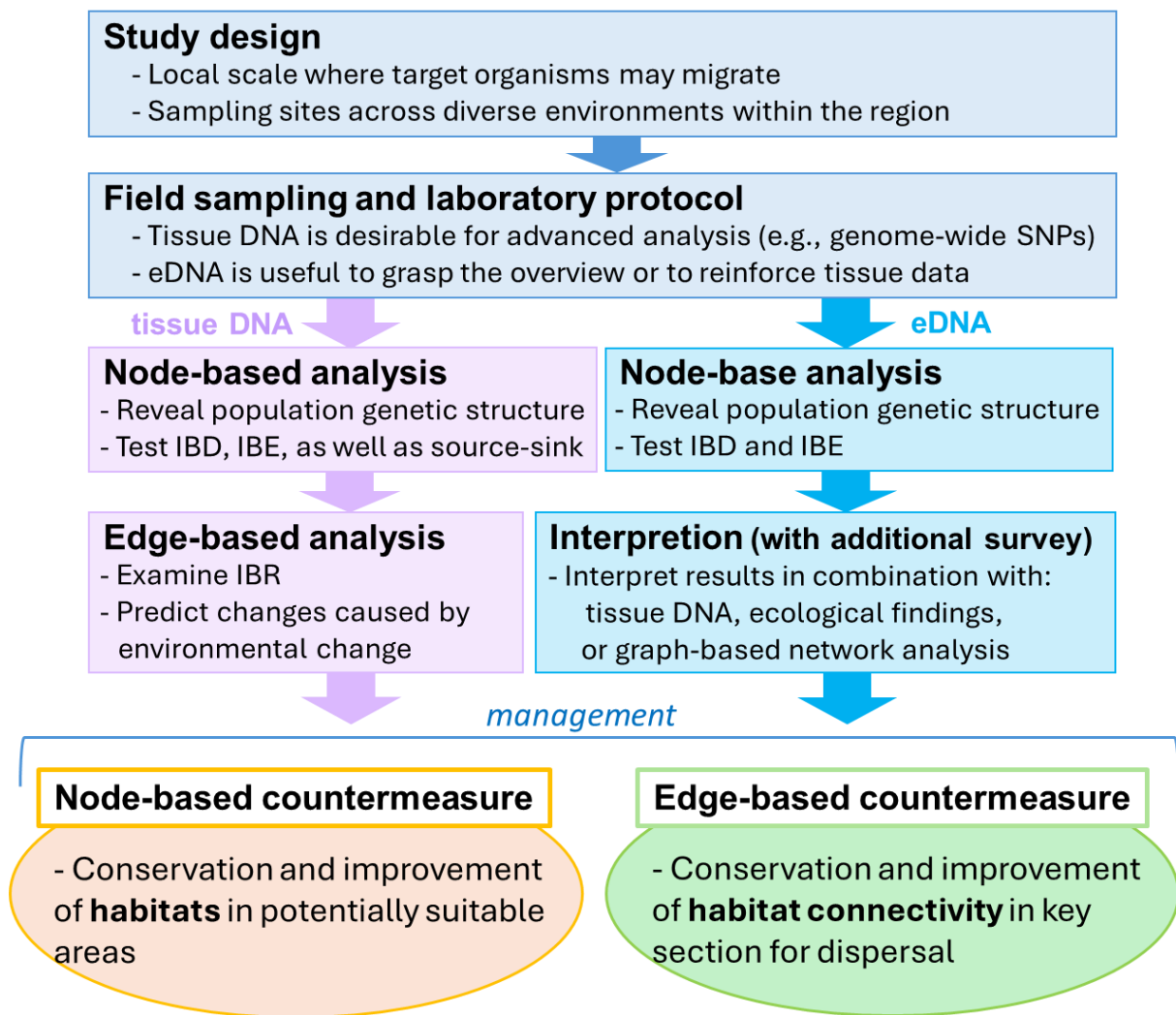


Fig. 6-1. Flow chart of gene flow estimation for conservation of riverine organisms.

摘要

本研究では、気候変動による影響が危惧される冷水性魚類（ハナカジカ）を材料として、生息地の機能的連結性を示す遺伝子流動と景観要素との関係を包括的に評価するとともに、遺伝子流動評価における現地調査の簡便化と解析手法の拡張に資する検討を行うことで、(1) 気候変動下において冷水性魚類の長期的存続を実現するために保全優先度の高い区間を明らかにすること、(2) 河川生物の流域内スケールでの遺伝子流動を評価するための調査・解析フローを提案することを目的とした。最初に、石狩川水系空知川上流域の多地点で採取したハナカジカの組織 DNA から、景観遺伝学的アプローチにより本種の生態に大きな影響を与える夏季水温が遺伝子流動に与える影響を調べた。その結果、流域内の夏季水温の違いは集団間の遺伝子流動を阻害する役割は持っていない一方で、ソース・シンク構造の形成に寄与していることが示され、特に夏季水温の低い支流が流域内の個体供給源として機能していることが分かった。次に、このような遺伝子流動評価に必要な現地調査の簡便化を図るため、近年生物相調査での活用が進んでいる環境 DNA 調査で得たデータから景観遺伝学的解析が可能かを検証した。環境 DNA と組織 DNA から得られた結果は概ね一致し、解析に個体情報が必要な一部の仮説検証を除き遺伝子流動評価に環境 DNA 調査を活用できる可能性が示された。最後に、これまで河川生物での解析が難しかった河川ネットワーク全体の様々な景観要素が遺伝子流動に与える影響、および気候変動による遺伝子流動の将来変化について、近年開発された河川景観遺伝モデリングの手法を取り入れて推定した。これにより、夏季水温が低い支流に加え河川次数の大きい本流で遺伝子流動が豊富であること、気候変動により 21 世紀末までに遺伝子流動が流域全体で大幅に減少することが示された。以上の結果は、冷水性魚類の保全において、流域内で局所的にみられる夏季水温の低い支流と、これら支流を他の支流に結びつける本流における河川の連続性を確保する重要性を示している。さらに、これまで保全管理での適用が進んでいなかった河川生物の生息地の連結性評価を推進するため、一連の成果を踏まえて河川生態系の保全に資する遺伝子流動評価の具体的な手順や留意点を提示した。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、多くの方々にご協力いただきました。北海道大学大学院農学研究院の中村太士名誉教授には、本研究の実施の機会を与えていただき、当初からご指導をいただきました。同研究院の石山信雄准教授は、調査地や研究の進め方の疑問点や相談について親身に対応いただき、さらに着任早々にもかかわらず本論文の主査を引き受けていただき、心から感謝しています。同研究院の森本淳子教授、山田孝特任教授、信州大学の東城幸治教授には本論文の副査を引き受けていただき、ご助言をいただきました。

各研究の論文共著者である、陶山佳久教授、松尾歩博士（東北大学）、廣田峻博士（福島大学）、中津川誠教授（室蘭工業大学）、鈴木啓明主査（北海道立総合研究機構）、末吉正尚博士（国立環境研究所）、釣健司氏（株式会社建設環境研究所）には研究中大変お世話になりました。

博士号の取得にあたり生態系管理学研究室、土木研究所流域水環境研究グループ流域生態チーム、国土交通省水管理・国土保全局河川環境課、北海道立総合研究機構林業試験場森林環境部機能グループの皆様にはご理解をいただき感謝申し上げます。

本研究の一部は国土交通省河川砂防技術研究開発公募の委託費（石狩川・十勝川研究グループ）および JSPS 科研費（基盤研究 C：課題番号 23K11515）の助成を受けたものです。

補足

本論文の一部（文章・図表）は、以下の通り公表済みである。出版社のライセンスに基づき転載している。

中島颯大 (2025) 河川生物の生息地の連結性を評価する河川景観遺伝学. *応用生態工学* (早期公開). <https://doi.org/10.3825/ece.25-00003> ※主に第 1 章

Souta Nakajima, Masanao Sueyoshi, Shun K. Hirota, Nobuo Ishiyama, Ayumi Matsuo, Yoshihisa Suyama, Futoshi Nakamura (2021) A strategic sampling design revealed the local genetic structure of cold-water fluvial sculpin: a focus on groundwater-dependent water temperature heterogeneity. *Heredity* 127(7): 413–422. <https://doi.org/10.1038/s41437-021-00468-z> ※主に第 3 章

Souta Nakajima, Kenji Tsuru (2024) Testing the applicability of environmental DNA metabarcoding to landscape genetics. *Molecular Ecology Resources* 24(6): e13990. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13990> ※主に第 4 章

Souta Nakajima, Hiroaki Suzuki, Makoto Nakatsugawa, Ayumi Matsuo, Shun K Hirota, Yoshihisa Suyama, Futoshi Nakamura (2023) Inferring future changes in gene flow under climate change in riverscapes: a pilot case study in fluvial sculpin. *Landscape Ecology* 38(5): 1351–1362. <https://doi.org/10.1007/s10980-023-01633-x> ※主に第 5 章

引用文献

- Adams CIM, Hepburn C, Jeunen G, et al (2023) Environmental DNA reflects common haplotypic variation. *Environmental DNA* 5:906–919. <https://doi.org/10.1002/edn3.352>
- Adams CIM, Knapp M, Gemmell NJ, et al (2019) Beyond Biodiversity: Can Environmental DNA (eDNA) Cut It as a Population Genetics Tool? *Genes* 10:192. <https://doi.org/10.3390/genes10030192>
- Adams SB, Schmetterling DA (2007) Freshwater Sculpins: Phylogenetics to Ecology. *Transactions of the American Fisheries Society* 136:1736–1741. <https://doi.org/10.1577/T07-023.1>
- Aguirre-Liguori JA, Luna-Sánchez JA, Gasca-Pineda J, Eguiarte LE (2020) Evaluation of the Minimum Sampling Design for Population Genomic and Microsatellite Studies: An Analysis Based on Wild Maize. *Frontiers in Genetics* 11:870. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00870>
- Allendorf F.W., Funk W.C., Aitken S.N., et al. (2022) *Conservation and the Genomics of Populations. Third Edition.* Oxford University Press, Oxford
- Almodóvar A, Nicola GG, Ayllón D, Elvira B (2012) Global warming threatens the persistence of Mediterranean brown trout. *Global Change Biology* 18:1549–1560. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02608.x>
- Andres KJ, Lodge DM, Andrés J (2023a) Environmental DNA reveals the genetic diversity and population structure of an invasive species in the Laurentian Great Lakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120:e2307345120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2307345120>
- Andres KJ, Lodge DM, Sethi SA, Andrés J (2023b) Detecting and analysing intraspecific genetic variation with eDNA : From population genetics to species abundance. *Molecular Ecology* 32:4118–4132. <https://doi.org/10.1111/mec.17031>
- Andres KJ, Sethi SA, Lodge DM, Andrés J (2021) Nuclear eDNA estimates population allele frequencies and abundance in experimental mesocosms and field samples. *Molecular Ecology* 30:685–697. <https://doi.org/10.1111/mec.15765>
- Arscott DB, Tockner K, Ward JV (2001) Thermal heterogeneity along a braided floodplain river (Tagliamento River, northeastern Italy). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58:2359–2373. <https://doi.org/10.1139/f01-183>
- Aunins AW, Petty JT, King TL, et al (2015) River mainstem thermal regimes influence population structuring within an appalachian brook trout population. *Conservation Genetics* 16:15–29. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0636-6>
- Balkenhol N., Cushman S.A., Storfer A., Waits L.P. (2015) Introduction to Landscape Genetics – Concepts, Methods, Applications. In: *Landscape Genetics* (ed. Balkenhol N., Cushman S., Storfer A., Waits L.), pp.1–8. John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken
- Barbarossa V, Bosmans J, Wanders N, et al (2021) Threats of global warming to the world’s freshwater fishes. *Nature Communications* 12:1701. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21655-w>
- Barbarossa V, Schmitt RJP, Hujibregts MAJ, et al (2020) Impacts of current and future large dams on the geographic range connectivity of freshwater fish worldwide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117:3648–3655. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912776117>
- Berner D (2019) Allele Frequency Difference AFD—An Intuitive Alternative to FST for Quantifying Genetic Population Differentiation. *Genes* 10:308. <https://doi.org/10.3390/genes10040308>
- Blanchet S, Prunier JG, Paz-Vinas I, et al (2020) A river runs through it: The causes, consequences, and management of intraspecific diversity in river networks. *Evolutionary Applications* 13:1195–1213. <https://doi.org/10.1111/eva.12941>
- Blondel L, Paterson IG, Bentzen P, Hendry AP (2021) Resistance and resilience of genetic and phenotypic diversity to “black swan” flood events: A retrospective analysis with historical samples of guppies. *Molecular Ecology* 30:1017–1028. <https://doi.org/10.1111/mec.15782>
- Bohonak AJ, Roderick GK (2001) Dispersal of invertebrates among temporary ponds: Are genetic estimates accurate? *Israel journal of zoology* 47:367–386
- Bohonak AJ, Vandergast AG (2011) The value of DNA sequence data for studying landscape genetics. *Molecular Ecology* 20:2477–2479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05122.x>

- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37:852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfrohde J, et al (1994) High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368:455–457. <https://doi.org/10.1038/368455a0>
- Cain MK, Zhang Z (2019) Fit for a Bayesian: An Evaluation of PPP and DIC for Structural Equation Modeling. *Structural Equation Modeling: A Multidisciplinary Journal* 26:39–50. <https://doi.org/10.1080/10705511.2018.1490648>
- Caissie D (2006) The thermal regime of rivers: a review. *Freshwater Biology* 51:1389–1406. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01597.x>
- Caldera EJ, Bolnick DI (2008) Effects of colonization history and landscape structure on genetic variation within and among threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) populations in a single watershed. *Evolutionary Ecology Research* 10:575–598
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, et al (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13:581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Campbell Grant EH, Lowe WH, Fagan WF (2007) Living in the branches: population dynamics and ecological processes in dendritic networks. *Ecology Letters* 10:165–175. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.01007.x>
- Catchen J, Hohenlohe PA, Bassham S, et al (2013) Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology* 22:3124–3140. <https://doi.org/10.1111/mec.12354>
- Cayuela H, Rougemont Q, Prunier JG, et al (2018) Demographic and genetic approaches to study dispersal in wild animal populations: A methodological review. *Molecular Ecology* 27:3976–4010. <https://doi.org/10.1111/mec.14848>
- Chafin TK, Mussmann SM, Douglas MR, Douglas ME (2023) Quantifying isolation-by-resistance and connectivity in dendritic ecological networks. *BioRxiv* (doi: 10.1101/2021.03.25.437078)
- Chihara, L., & Loy, A. (2023). CarletonStats: Functions for statistics classes at Carleton College
- Clarke AD, Telmer KH, Shrimpton JM (2015) Movement patterns of fish revealed by otolith microchemistry: a comparison of putative migratory and resident species. *Environmental Biology of Fishes* 98:1583–1597. <https://doi.org/10.1007/s10641-015-0384-6>
- Comte L, Buisson L, Daufresne M, Grenouillet G (2013) Climate-induced changes in the distribution of freshwater fish: observed and predicted trends. *Freshwater Biology* 58:625–639. <https://doi.org/10.1111/fwb.12081>
- Comte L, Olden JD (2017) Climatic vulnerability of the world’s freshwater and marine fishes. *Nature Climate Change* 7:718–722. <https://doi.org/10.1038/nclimate3382>
- Couton M, Baud A, Daguin-Thiébaud C, et al (2021) High-throughput sequencing on preservative ethanol is effective at jointly examining infraspecific and taxonomic diversity, although bioinformatics pipelines do not perform equally. *Ecology and Evolution* 11:5533–5546. <https://doi.org/10.1002/ece3.7453>
- Couton M, Viard F, Altermatt F (2023) Opportunities and inherent limits of using environmental DNA for population genetics. *Environmental DNA* 5:1048–1064. <https://doi.org/10.1002/edn3.448>
- Cruzan MB & Hendrickson EC (2020) Landscape Genetics of Plants: Challenges and Opportunities. *Plant Communications* 1:100100. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100100>
- Cushman SA, McRae BH, McGarigal K. (2015) Basics of landscape ecology: an introduction to landscapes and population processes for landscape genetics. In: *Landscape Genetics* (ed. Balkenhol N, Cushman S, Storfer A, Waits L), pp.11–34. John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken
- Davis CD, Epps CW, Flitcroft RL, Banks MA (2018) Refining and defining riverscape genetics: How rivers influence population genetic structure. *WIREs Water* 5:e1269. <https://doi.org/10.1002/wat2.1269>
- Day CC, Alò D, Simmons RK, et al (2024) Disentangling effects of dispersal, environment and anthropogenic barriers on functional connectivity in aquatic systems. *Molecular Ecology* 33:e17500
- Dennenmoser S, Rogers SM, Vamosi SM (2014) Genetic population structure in prickly sculpin (*Cottus asper*) reflects isolation-by-environment between two life-history ecotypes: Isolation-

- by-Environment. *Biological Journal of the Linnean Society* 113:943–957.
<https://doi.org/10.1111/bij.12384>
- Dias PC (1996) Sources and sinks in population biology. *Trends in Ecology & Evolution* 11:326–330.
[https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10037-9](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10037-9)
- Diniz-Filho JAF, De Campos Telles MP (2002) Spatial Autocorrelation Analysis and the Identification of Operational Units for Conservation in Continuous Populations. *Conservation Biology* 16:924–935. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.00295.x>
- Diniz-Filho JAF, Soares TN, Lima JS, et al (2013) Mantel test in population genetics. *Genetics and Molecular Biology* 36:475–485. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000400002>
- Doi H, Nakamura K (2023) Special issue: Environmental DNA as a practical tool for aquatic conservation and restoration. *Landscape and Ecological Engineering* 19:1–2.
<https://doi.org/10.1007/s11355-022-00534-6>
- 土木学会 2016 年 8 月北海道豪雨災害調査団 (2017) 2016 年 8 月北海道豪雨災害調査団報告書
- Duan Q, Sorooshian S, Gupta V (1992) Effective and efficient global optimization for conceptual rainfall-runoff models. *Water Resources Research* 28:230–244.
<https://doi.org/10.1029/91WR02985>
- Dudgeon D (2019) Multiple threats imperil freshwater biodiversity in the Anthropocene. *Current Biology* 29:R960–R967. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.002>
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetic Resources* 4:359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92:832–839. <https://doi.org/10.1007/BF00221895>
- Elith J, Leathwick JR (2009) Species Distribution Models: Ecological Explanation and Prediction Across Space and Time. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40:677–697.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120159>
- Escalante MA, García-De León FJ, Ruiz-Luna A, et al (2018) The interplay of riverscape features and exotic introgression on the genetic structure of the Mexican golden trout (*Oncorhynchus chrysogaster*), a simulation approach. *Journal of Biogeography* 45:1500–1514.
<https://doi.org/10.1111/jbi.13246>
- Escalante MA, Perrier C, García-De León FJ, et al (2020) Genotyping-by-sequencing reveals the effects of riverscape, climate and interspecific introgression on the genetic diversity and local adaptation of the endangered Mexican golden trout (*Oncorhynchus chrysogaster*). *Conservation Genetics* 21:907–926. <https://doi.org/10.1007/s10592-020-01297-z>
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE : a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611–2620.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Ewers RM, Didham RK (2005) Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. *Biological Reviews* 81:117. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006949>
- Fahrig L (2003) Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34:487–515.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132419>
- Fausch KD, Rieman BE, Dunham JB, et al (2009) Invasion versus isolation: trade-offs in managing native salmonids with barriers to upstream movement. *Conservation Biology* 23:859–870
- Fausch KD, Torgersen CE, Baxter CV, Li HW (2002) Landscapes to Riverscapes: Bridging the Gap between Research and Conservation of Stream Fishes. *BioScience* 52:483.
[https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2002\)052\[0483:LTRBTG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0483:LTRBTG]2.0.CO;2)
- Feder JL, Egan SP, Nosil P (2012) The genomics of speciation-with-gene-flow. *Trends in Genetics* 28:342–350. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.03.009>
- Fletcher RJ, Burrell NS, Reichert BE, et al (2016) Divergent Perspectives on Landscape Connectivity Reveal Consistent Effects from Genes to Communities. *Current Landscape Ecology Reports* 1:67–79. <https://doi.org/10.1007/s40823-016-0009-6>
- Fontoura L, D’Agata S, Gamoyo M, et al (2022) Protecting connectivity promotes successful biodiversity and fisheries conservation. *Science* 375:336–340.

- <https://doi.org/10.1126/science.abg4351>
- Frankham R (2015) Genetic rescue of small inbred populations: meta-analysis reveals large and consistent benefits of gene flow. *Molecular Ecology* 24:2610–2618
- Frankham R., Ballou J.D., Ralls K., et al. (2019) *A Practical Guide for Genetic Management of Fragmented Animal and Plant Populations*. Oxford University Press, Oxford
- Fukuzawa T, Shirakura H, Nishizawa N, et al (2023) Environmental DNA extraction method from water for a high and consistent DNA yield. *Environmental DNA* 5:627–633. <https://doi.org/10.1002/edn3.406>
- García Molinos J, Nobuo I, Sueyoshi M, Nakamura F (2022) Timescale mediates the effects of environmental controls on water temperature in mid- to low-order streams. *Scientific Reports* 12:12248. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16318-9>
- Gilbert B, Bennett JR (2010) Partitioning variation in ecological communities: do the numbers add up? *Journal of Applied Ecology* 47:1071–1082. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01861.x>
- Gilbert B, Lechowicz MJ (2004) Neutrality, niches, and dispersal in a temperate forest understory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:7651–7656. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400814101>
- Goslee S, Urban D (2007) The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software* 22:1–19
- Goto A (1998) Life-history variations in the fluvial sculpin, *Cottus nozawae* (Cottidae), along the course of a small mountain stream. *Environmental Biology of Fishes* 52:203–212. <https://doi.org/10.1023/A:1007347631573>
- 後藤晃・酒井治巳・山崎裕治 (2002) 希少淡水魚類の保全に必要な河川の環境構造とハビタット造成に関する研究. 公益財団法人河川財団調査研究助成摘要
- Goto A, Yokoyama R, Sideleva VG (2015) Evolutionary diversification in freshwater sculpins (Cottoidea): a review of two major adaptive radiations. *Environ Biol Fish* 98:307–335. <https://doi.org/10.1007/s10641-014-0262-7>
- Goto A, Yokoyama R, Yamazaki Y, Sakai H (2001) Geographic distribution pattern of the fluvial sculpin, *Cottus nozawae* (Pisces: Cottidae), supporting its position as endemic to the Japanese Archipelago. *Biogeography* 3:69–76
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* 86:485–486. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>
- Grummer JA, Beheregaray LB, Bernatchez L, et al (2019) Aquatic Landscape Genomics and Environmental Effects on Genetic Variation. *Trends in Ecology & Evolution* 34:641–654. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.02.013>
- Guillot G, Rousset F (2013) Dismantling the Mantel tests. *Methods in Ecology and Evolution* 4:336–344. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12018>
- Hall T (1999) BIOEDIT: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98
- Han C-C, Tew KS, Fang L-S (2007) Spatial and temporal variations of two cyprinids in a subtropical mountain reserve – a result of habitat disturbance. *Ecology of Freshwater Fish* 16:395–403. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2007.00227.x>
- Hand BK, Muhlfeld CC, Wade AA, et al (2016) Climate variables explain neutral and adaptive variation within salmonid metapopulations: the importance of replication in landscape genetics. *Molecular Ecology* 25:689–705. <https://doi.org/10.1111/mec.13517>
- Hänfling B, Weetman D (2006) Concordant Genetic Estimators of Migration Reveal Anthropogenically Enhanced Source-Sink Population Structure in the River Sculpin, *Cottus gobio*. *Genetics* 173:1487–1501. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.054296>
- Harmon LJ, Glor RE (2010) Poor statistical performance of the Mantel test in phylogenetic comparative analyses. *Evolution* 64:2173–2178. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.00973.x>
- 林田寿文・棟方有宗・大宮裕樹・中村圭吾 (2020) 既設河川横断構造物を改良した切欠き魚道設置の検討と実践. *河川技術論文集* 26:313–318
- 林利行 (2024) ネイチャーポジティブの実現に向けた今後の河川整備の進め方. *河川* 938:9–

- Heinrichs JA, Walker LE, Lawler JJ, et al (2019) Recent Advances and Current Challenges in Applying Source-Sink Theory to Species Conservation. *Current Landscape Ecology Reports* 4:51–60. <https://doi.org/10.1007/s40823-019-00039-3>
- Herrera-R GA, Oberdorff T, Anderson EP, et al (2020) The combined effects of climate change and river fragmentation on the distribution of Andean Amazon fishes. *Global Change Biology* 26:5509–5523. <https://doi.org/10.1111/gcb.15285>
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, et al (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25:1965–1978. <https://doi.org/10.1002/joc.1276>
- Hohenlohe PA, Funk WC, Rajora OP (2021) Population genomics for wildlife conservation and management. *Molecular Ecology* 30:62–82. <https://doi.org/10.1111/mec.15720>
- Holsinger KE, Weir BS (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews Genetics* 10:639–650. <https://doi.org/10.1038/nrg2611>
- Hsieh TC, Ma KH, Chao A. (2016) iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution* 7: 1451–1456. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12613>
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9:1322–1332. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>
- Hudson RR, Boos DD, Kaplan NL (1992) A Statistical Test for Detecting Geographic Subdivision'. *Molecular Biology and Evolution* 9:138–151
- Iles DT, Williams NM, Crone EE (2018) Source-sink dynamics of bumblebees in rapidly changing landscapes. *Journal of Applied Ecology* 55:2802–2811. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13175>
- Inoue K, Berg DJ (2017) Predicting the effects of climate change on population connectivity and genetic diversity of an imperiled freshwater mussel, *Cumberlandia monodonta* (Bivalvia: Margaritiferidae), in riverine systems. *Global Change Biology* 23:94–107. <https://doi.org/10.1111/gcb.13369>
- Ishiyama N, Ryo M, Kataoka T, et al (2018) Predicting the ecological impacts of large-dam removals on a river network based on habitat-network structure and flow regimes. *Conservation Biology* 32:1403–1413. <https://doi.org/10.1111/cobi.13137>
- 石山信雄・永山滋也・岩瀬晴夫ほか (2017) 河川生態系における水域ネットワーク再生手法の整理：日本における現状と課題. *応用生態工学* 19:143–164. <https://doi.org/10.3825/ece.19.143>
- Ishiyama N, Sueyoshi M, García Molinos J, et al (2023) Underlying geology and climate interactively shape climate change refugia in mountain streams. *Ecological Monographs* 93:e1566. <https://doi.org/10.1002/ecm.1566>
- IPCC (2014) Summary for policymakers. In: Field CB, Barros VR, Dokken DJ et al (eds) *Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability*. Cambridge University Press, Cambridge and New York, pp 1–32. <https://www.ipcc.ch/report/ar5/wg2/>
- Ito N, Gotoh RO, Shirakuma T, et al (2018) Genetic structure of glacial-relict populations of a freshwater sculpin, *Cottus nozawae*, in Yamagata area of the Tohoku district. *Biogeography* 20:96–102
- Jenkins DG, Carey M, Czerniewska J, et al (2010) A meta-analysis of isolation by distance: relic or reference standard for landscape genetics? *Ecography* 33:315–320. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2010.06285.x>
- Jo T, Murakami H, Masuda R, et al (2017) Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources* 17:e25–e33. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12685>
- Jo T, Yamanaka H (2022) Meta-analyses of environmental DNA downstream transport and deposition in relation to hydrogeography in riverine environments. *Freshwater Biology* 67:1333–1343. <https://doi.org/10.1111/fw.13920>
- JR 北海道 (2017) 根室線 東鹿越～上落合間の被災状況について.

- https://www.jrhokkaido.co.jp/press/2017/170712-3_1.pdf
- Junker J, Peter A, Wagner CE, et al (2012) River fragmentation increases localized population genetic structure and enhances asymmetry of dispersal in bullhead (*Cottus gobio*). Conservation Genetics 13:545–556. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0306-x>
- 環境省 (2020) 環境省レッドリスト 2020
- Kalinowski ST, Meeuwig MH, Narum SR, Taper ML (2008) Stream trees: a statistical method for mapping genetic differences between populations of freshwater organisms to the sections of streams that connect them. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 65:2752–2760
- Kanno Y, Vokoun JC, Letcher BH (2011) Fine-scale population structure and riverscape genetics of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) distributed continuously along headwater channel networks. Molecular Ecology 20:3711–3729. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05210.x>
- Kawecki TJ, Ebert D (2004) Conceptual issues in local adaptation. Ecology Letters 7:1225–1241. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x>
- Koizumi I (2011) Integration of ecology, demography and genetics to reveal population structure and persistence: a mini review and case study of stream-dwelling Dolly Varden. Ecology of Freshwater Fish 20:352–363. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2010.00480.x>
- Koizumi I, Kanazawa Y, Tanaka Y (2013) The Fishermen Were Right: Experimental Evidence for Tributary Refuge Hypothesis During Floods. jzoo 30:375–379. <https://doi.org/10.2108/zsj.30.375>
- Koizumi I, Yamamoto S, Maekawa K (2006) Decomposed pairwise regression analysis of genetic and geographic distances reveals a metapopulation structure of stream-dwelling Dolly Varden charr. Molecular Ecology 15:3175–3189. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03019.x>
- Kottler EJ, Dickman EE, Sexton JP, et al (2021) Draining the swamping hypothesis: little evidence that gene flow reduces fitness at range edges. Trends in Ecology & Evolution 36:533–544
- 国土交通省北海道開発局 (2018) 石狩川水系空知川河川整備計画【大臣管理区間】[変更]
- 国土交通省水管理・国土保全局 (2021) 河川事業における生態系保全に関する評価の手引き (実務者向け) (案) ～生態系ネットワーク形成に向けて～
- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, et al (2015) CLUMPAK : a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across *K*. Molecular Ecology Resources 15:1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
- Lamphere BA, Blum MJ (2012) Genetic estimates of population structure and dispersal in a benthic stream fish. Ecology of Freshwater Fish 21:75–86. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2011.00525.x>
- Landguth EL, Bearlin A, Day CC, Dunham J (2017) CDMetaPOP: an individual-based, eco-evolutionary model for spatially explicit simulation of landscape demogenetics. Methods in Ecology and Evolution 8:4–11. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12608>
- Landguth EL, Cushman SA, Schwartz MK, et al (2010) Quantifying the lag time to detect barriers in landscape genetics. Molecular Ecology 19:4179–4191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04808.x>
- Leroy G, Carroll EL, Bruford MW, et al (2018) Next-generation metrics for monitoring genetic erosion within populations of conservation concern. Evolutionary Applications 11:1066–1083. <https://doi.org/10.1111/eva.12564>
- Lichstein JW (2007) Multiple regression on distance matrices: a multivariate spatial analysis tool. Plant Ecology 188:117–131. <https://doi.org/10.1007/s11258-006-9126-3>
- Lucek K, Keller I, Nolte AW, Seehausen O (2018) Distinct colonization waves underlie the diversification of the freshwater sculpin (*Cottus gobio*) in the Central European Alpine region. J of Evolutionary Biology 31:1254–1267. <https://doi.org/10.1111/jeb.13339>
- Ma L, Ji Y-J, Zhang D-X (2015) Statistical measures of genetic differentiation of populations: Rationales, history and current states. Current Zoology 61:886–897. <https://doi.org/10.1093/czoolo/61.5.886>
- Macé B, Hocdé R, Marques V, et al (2022) Evaluating bioinformatics pipelines for population-level inference using environmental DNA. Environmental DNA 4:674–686. <https://doi.org/10.1002/edn3.269>
- Mace GM, Barrett M, Burgess ND, et al (2018) Aiming higher to bend the curve of biodiversity loss.

- Nat Sustain 1:448–451. <https://doi.org/10.1038/s41893-018-0130-0>
- Manel S, Gauthier J, Benestan L, et al (2025) An enrichment-based capture method from nuclear environmental DNA presents new opportunities for population genomics: A case study on the common frog. *Methods in Ecology and Evolution* 16:1106–1115. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.70039>
- Manel S, Holderegger R (2013) Ten years of landscape genetics. *Trends in Ecology & Evolution* 28:614–621. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.012>
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* 18:189–197. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00008-9)
- Marshall NT, Stepien CA (2019) Invasion genetics from eDNA and thousands of larvae: A targeted metabarcoding assay that distinguishes species and population variation of zebra and quagga mussels. *Ecology and Evolution* 9:3515–3538. <https://doi.org/10.1002/ece3.4985>
- Mateo-Sánchez MC, Balkenhol N, Cushman S, et al (2015) A comparative framework to infer landscape effects on population genetic structure: are habitat suitability models effective in explaining gene flow? *Landscape Ecology* 30:1405–1420. <https://doi.org/10.1007/s10980-015-0194-4>
- McRae BH (2006) Isolation by resistance. *Evolution* 60:1551–1561. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb00500.x>
- McRae BH, Beier P (2007) Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:19885–19890. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706568104>
- Meirmans PG (2012) The trouble with isolation by distance. *Molecular Ecology* 21:2839–2846. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05578.x>
- Meirmans PG (2015) Seven common mistakes in population genetics and how to avoid them. *Molecular Ecology* 24:3223–3231. <https://doi.org/10.1111/mec.13243>
- Meirmans PG (2014) Nonconvergence in Bayesian estimation of migration rates. *Molecular Ecology Resources* 14:726–733. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12216>
- Mejia FH, Ouellet V, Briggs MA, et al (2023) Closing the gap between science and management of cold-water refuges in rivers and streams. *Global Change Biology* 29:5482–5508. <https://doi.org/10.1111/gcb.16844>
- Micheletti SJ, Storfer A (2015) A test of the central–marginal hypothesis using population genetics and ecological niche modelling in an endemic salamander (*Ambystoma barbouri*). *Molecular Ecology* 24:967–979. <https://doi.org/10.1111/mec.13083>
- 南富良野町 (2025) イトウの保護区・保護期間について. <https://www.town.minamifurano.hokkaido.jp/イトウの保護区・保護期間について/>
- Morin PA, Foote AD, Baker CS, et al (2018) Demography or selection on linked cultural traits or genes? Investigating the driver of low mtDNA diversity in the sperm whale using complementary mitochondrial and nuclear genome analyses. *Molecular Ecology* 27:2604–2619. <https://doi.org/10.1111/mec.14698>
- Mundahl ND (2024) Recovery of a Population of Slimy Sculpin (*Uranidea cognata*) after an Autumn Fish Kill in the Headwaters of a Minnesota Trout Stream. *Water* 16:283. <https://doi.org/10.3390/w16020283>
- Muraoka K, Nakanishi S, Kayaba Y (2017) Boulder arrangement on a rocky ramp fishway based on the swimming behavior of fish. *Limnologia* 62:188–193. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.02.004>
- Musmann SM, Douglas MR, Chafin TK, Douglas ME (2019) BA3-SNPs: Contemporary migration reconfigured in BayesAss for next-generation sequence data. *Methods in Ecology and Evolution* 10:1808–1813. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13252>
- 長坂晶子・杉山(杉本)幸穂 (2010) 北海道内の小河川における夏期最高水温の推定と河畔林の効果. *北海道林業試験場研究報告* 47:35–43
- 中島颯大 (2024) 環境 DNA 調査で参照するデータベースに登録された魚類の塩基配列情報の充足度. *土木技術資料* 66:48–49
- Nakajima S, Hirota S, Matsuo A, et al (2020) Genetic Structure and Population Demography of

- White-Spotted Charr in the Upstream Watershed of a Large Dam. *Water* 12:2406.
<https://doi.org/10.3390/w12092406>
- Nakamura F (2022) Riparian Forests and Climate Change: Interactive Zone of Green and Blue Infrastructure. In: Nakamura F (ed) *Green Infrastructure and Climate Change Adaptation: Function, Implementation and Governance*. Springer Nature, Singapore, pp 73–91
- Nakamura F, Yamada H (2005) Effects of pasture development on the ecological functions of riparian forests in Hokkaido in northern Japan. *Ecological Engineering* 24:539–550.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2005.01.010>
- Natsumeda T (2003) Effects of a Severe Flood on the Movements of Japanese Fluvial Sculpin. *Environmental Biology of Fishes* 68:417–424.
<https://doi.org/10.1023/B:EBFI.00000005777.90560.90>
- Nei M (1973) Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70:3321–3323
- Nobert BR, Merrill EH, Pybus MJ, et al (2016) Landscape connectivity predicts chronic wasting disease risk in Canada. *Journal of Applied Ecology* 53:1450–1459.
<https://doi.org/10.1111/1365-2664.12677>
- Nosil P, Vines TH, Funk DJ (2005) Reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. *Evolution* 59:705–719. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01747.x>
- Oksanen JF, Blanchet G, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D et al. (2019) *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-6.
<https://CRAN.Rproject.org/package=vegan>
- Okumura N, Goto A (1996) Genetic variation and differentiation of the two river sculpins, *Cottus nozawae* and *C. amblystomopsis*, deduced from allozyme and restriction enzyme-digested mtDNA fragment length polymorphism analyses. *Ichthyological Research* 43:399–416.
<https://doi.org/10.1007/BF02347638>
- Oliveira JDA, Farias IP, Costa GC, Werneck FP (2019) Model-based riverscape genetics: disentangling the roles of local and connectivity factors in shaping spatial genetic patterns of two Amazonian turtles with different dispersal abilities. *Evolutionary Ecology* 33:273–298.
<https://doi.org/10.1007/s10682-019-09973-4>
- 大浜秀規・坪井潤一 (2009) 透過型堰堤における魚道として機能. *応用生態工学* 12:49–56.
<https://doi.org/10.3825/ece.12.49>
- Orsini L, Vanoverbeke J, Swillen I, et al (2013) Drivers of population genetic differentiation in the wild: isolation by dispersal limitation, isolation by adaptation and isolation by colonization. *Molecular Ecology* 22:5983–5999. <https://doi.org/10.1111/mec.12561>
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4:347–354. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00227.x>
- Paris JR, Stevens JR, Catchen JM (2017) Lost in parameter space: a road map for STACKS. *Methods in Ecology and Evolution* 8:1360–1373. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12775>
- Paz-Vinas I, Blanchet S (2015) Dendritic connectivity shapes spatial patterns of genetic diversity: a simulation-based study. *Journal of Evolutionary Biology* 28:986–994.
<https://doi.org/10.1111/jeb.12626>
- Peacock MM, Gustin MS, Kirchoff VS, et al (2016) Native fishes in the Truckee River: Are in-stream structures and patterns of population genetic structure related? *Science of The Total Environment* 563–564:221–236. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.056>
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Peterson EE, Hanks EM, Hooten MB, et al (2019) Spatially structured statistical network models for landscape genetics. *Ecological Monographs* 89:e01355. <https://doi.org/10.1002/ecm.1355>
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155:945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Rahel FJ, Keleher CJ, Anderson JL (1996) Potential habitat loss and population fragmentation for cold water fish in the North Platte River drainage of the Rocky Mountains: Response to climate

- warming. *Limnology and Oceanography* 41:1116–1123.
<https://doi.org/10.4319/lo.1996.41.5.1116>
- R Core Team (2019) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- R Core Team (2022) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Reid AJ, Carlson AK, Creed IF, et al (2019) Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews* 94:849–873.
<https://doi.org/10.1111/brev.12480>
- Rousset F (2002) Partial Mantel tests: Reply to Castellano and Balletto. *Evolution* 56:1874–1875.
<https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00204.x>
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, et al (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution* 34:3299–3302.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Ruppert JLW, James PMA, Taylor EB, et al (2017) Riverscape genetic structure of a threatened and dispersal limited freshwater species, the Rocky Mountain Sculpin (*Cottus* sp.). *Conservation Genetics* 18:925–937. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-0938-6>
- Ruppert KM, Kline RJ, Rahman MS (2019) Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17:e00547.
<https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Saitoh T (2021) High variation of mitochondrial DNA diversity as compared to nuclear microsatellites in mammalian populations. *Ecological Research* 36:206–220. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12190>
- Sartor CC, Wan HY, Pereira JA, et al (2022) Landscape genetics outperforms habitat suitability in predicting landscape resistance for congeneric cat species. *Journal of Biogeography* 49:2206–2217. <https://doi.org/10.1111/jbi.14498>
- Savary P, Foltête J, Moal H, et al (2021) Analysing landscape effects on dispersal networks and gene flow with genetic graphs. *Molecular Ecology Resources* 21:1167–1185.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13333>
- Scaketti M, Sujii PS, Alves-Pereira A, et al (2025) Sample Size Impact (*SaSii*): An R script for estimating optimal sample sizes in population genetics and population genomics studies. *PLoS ONE* 20:e0316634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316634>
- Sexton JP, Hangartner SB, Hoffmann AA (2014) Genetic isolation by environment or distance: Which pattern of gene flow is most common? *Evolution* 68:1–15. <https://doi.org/10.1111/evo.12258>
- Sexton JP, Hufford MB, C.Bateman A, et al (2016) Climate structures genetic variation across a species' elevation range: a test of range limits hypotheses. *Molecular Ecology* 25:911–928.
<https://doi.org/10.1111/mec.13528>
- Shafer ABA, Wolf JBW (2013) Widespread evidence for incipient ecological speciation: a meta-analysis of isolation-by-ecology. *Ecology Letters* 16:940–950.
<https://doi.org/10.1111/ele.12120>
- Sherwin WB (2022) BRAY-CURTIS (AFD) differentiation in molecular ecology: Forecasting, an adjustment (^A A), and comparative performance in selection detection. *Ecology and Evolution* 12:e9176. <https://doi.org/10.1002/ece3.9176>
- Shriver MD, Smith MW, Jin L, et al (1997) Ethnic-Affiliation Estimation by Use of Population-Specific DNA Markers. *The American Journal of Human Genetics*
- Sigsgaard EE, Jensen MR, Winkelmann IE, et al (2020) Population-level inferences from environmental DNA—Current status and future perspectives. *Evolutionary Applications* 13:245–262. <https://doi.org/10.1111/eva.12882>
- Sigsgaard EE, Nielsen IB, Bach SS, et al (2016) Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology & Evolution* 1:0004.
<https://doi.org/10.1038/s41559-016-0004>
- Slatkin M, Barton NH (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43:1349–1368. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb02587.x>
- Snyder MR, Stepien CA (2020) Increasing confidence for discerning species and population

- compositions from metabarcoding assays of environmental samples: case studies of fishes in the Laurentian Great Lakes and Wabash River. *Metabarcoding and Metagenomics* 4:e53455. <https://doi.org/10.3897/mbmg.4.53455>
- Spear S.F., Cushman S.A., McRae B.H. (2015) Resistance Surface Modeling in Landscape Genetics. In: *Landscape Genetics* (ed. Balkenhol N., Cushman S., Storfer A., Waits L.), pp.129–148. John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken
- Sugawara M (1979) Automatic calibration of the tank model / L'étalonnage automatique d'un modèle à cisterne. *Hydrological Sciences Bulletin* 24:375–388. <https://doi.org/10.1080/02626667909491876>
- Suyama Y, Hirota SK, Matsuo A, et al (2022) Complementary combination of multiplex high-throughput DNA sequencing for molecular phylogeny. *Ecological Research* 37:171–181. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12270>
- Suyama Y, Matsuki Y (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Scientific Reports* 5:16963. <https://doi.org/10.1038/srep16963>
- Suzuki H, Nakatsugawa M, Ishiyama N (2022) Climate Change Impacts on Stream Water Temperatures in a Snowy Cold Region According to Geological Conditions. *Water* 14:2166. <https://doi.org/10.3390/w14142166>
- 鈴木開士 (2021) 冷水性魚類の局所的な種内変異: 地下水流入がもたらす温度耐性の違い. 北海道大学農学院生態系管理学研究室
- Suzuki K, Ishiyama N, Koizumi I, Nakamura F (2021) Combined Effects of Summer Water Temperature and Current Velocity on the Distribution of a Cold-Water-Adapted Sculpin (*Cottus nozawae*). *Water* 13:975. <https://doi.org/10.3390/w13070975>
- Tague C, Farrell M, Grant G, et al (2007) Hydrogeologic controls on summer stream temperatures in the McKenzie River basin, Oregon. *Hydrological Processes* 21:3288–3300. <https://doi.org/10.1002/hyp.6538>
- Takahashi Y, Suyama Y, Matsuki Y, et al (2016) Lack of genetic variation prevents adaptation at the geographic range margin in a damselfly. *Molecular Ecology* 25:4450–4460. <https://doi.org/10.1111/mec.13782>
- 高岡広樹・原田守啓・大石哲也・萱場祐一 (2013) バープ工による河床変動特性と流れの多様性について. 第41回環境システム研究論文発表会講演集. 103–108
- Thomaz AT, Christie MR, Knowles LL (2016) The architecture of river networks can drive the evolutionary dynamics of aquatic populations. *Evolution* 70:731–739. <https://doi.org/10.1111/evo.12883>
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Thorpe RS, Surget-Groba Y, Johansson H (2008) The relative importance of ecology and geographic isolation for speciation in anoles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363:3071–3081. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0077>
- Toews DPL, Brelsford A (2012) The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21:3907–3930. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x>
- Tsuji S, Maruyama A, Miya M, et al (2020a) Environmental DNA analysis shows high potential as a tool for estimating intraspecific genetic diversity in a wild fish population. *Molecular Ecology Resources* 20:1248–1258. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13165>
- Tsuji S, Miya M, Ushio M, et al (2020b) Evaluating intraspecific genetic diversity using environmental DNA and denoising approach: A case study using tank water. *Environmental DNA* 2:42–52. <https://doi.org/10.1002/edn3.44>
- Tsuji S, Shibata N, Inui R, et al (2023) Environmental DNA phylogeography: Successful reconstruction of phylogeographic patterns of multiple fish species from cups of water. *Molecular Ecology Resources* 23:1050–1065. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13772>
- Turon X, Antich A, Palacín C, et al (2020) From metabarcoding to metaphylogeography: separating

- the wheat from the chaff. *Ecological Applications* 30:e02036.
<https://doi.org/10.1002/eap.2036>
- 上田聖也・中津川誠・臼谷友秀 (2020) 北海道を対象とした流域水収支の検証に基づく高解像度ダウンスケーリング気候情報の推定. 土木学会論文集 b1 (水工学) 76:I_25-I_30. https://doi.org/10.2208/jscejhe.76.2_I_25
- 臼谷友秀・中津川誠・工藤啓介 (2005) 石狩川流域における水循環の定量化について. 水工学論文集 49: 229–234. <https://doi.org/10.2208/prohe.49.229>
- Wagner HH, Fortin MJ (2012) A conceptual framework for the spatial analysis of landscape genetic data. *Conservation Genetics* 14:253–261. <https://doi.org/10.1007/s10592-012-0391-5>
- Wakimura K, Uchii K, Kikko T (2023) Evaluation of genetic diversity in an endangered fish *Gnathopogon caeruleus* using environmental DNA and its potential use in fish conservation. *Environmental DNA* 5:973–986. <https://doi.org/10.1002/edn3.408>
- Wang IJ (2010) Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. *Molecular Ecology* 19:2605–2608. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04715.x>
- Wang IJ (2011) Choosing appropriate genetic markers and analytical methods for testing landscape genetic hypotheses. *Molecular Ecology* 20:2480–2482. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05123.x>
- Wang IJ, Bradburd GS (2014) Isolation by environment. *Molecular Ecology* 23:5649–5662. <https://doi.org/10.1111/mec.12938>
- Wang IJ, Summers K (2010) Genetic structure is correlated with phenotypic divergence rather than geographic isolation in the highly polymorphic strawberry poison-dart frog. *Molecular Ecology* 19:447–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04465.x>
- Wasserman TN, Cushman SA, Schwartz MK, Wallin DO (2010) Spatial scaling and multi-model inference in landscape genetics: *Martes americana* in northern Idaho. *Landscape Ecology* 25:1601–1612. <https://doi.org/10.1007/s10980-010-9525-7>
- Wasserman TN, Cushman SA, Shirk AS, et al (2012) Simulating the effects of climate change on population connectivity of American marten (*Martes americana*) in the northern Rocky Mountains, USA. *Landscape Ecology* 27:211–225. <https://doi.org/10.1007/s10980-011-9653-8>
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 38:1358–1370. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1984.tb05657.x>
- Weitemier K, Penaluna BE, Hauck LL, et al (2021) Estimating the genetic diversity of Pacific salmon and trout using multigene eDNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 30:4970–4990. <https://doi.org/10.1111/mec.15811>
- Wells WG, Johnson TC, Gebhard, et al (2017) March of the sculpin: measuring and predicting short-term movement of banded sculpin *Cottus carolinae*. *Ecology of Freshwater Fish* 26:280–291. <https://doi.org/10.1111/eff.12274>
- White SL, Hanks EM, Wagner T (2020) A novel quantitative framework for riverscape genetics. *Ecological Applications* 30:e02147. <https://doi.org/10.1002/eap.2147>
- Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian Inference of Recent Migration Rates Using Multilocus Genotypes. *Genetics* 163:1177–1191. <https://doi.org/10.1093/genetics/163.3.1177>
- With KA, Gardner RH, Turner MG (1997) Landscape Connectivity and Population Distributions in Heterogeneous Environments. *Oikos* 78:151. <https://doi.org/10.2307/3545811>
- Woodward G, Perkins DM, Brown LE (2010) Climate change and freshwater ecosystems: impacts across multiple levels of organization. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365:2093–2106. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0055>
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28:114–138. <https://doi.org/10.1093/genetics/28.2.114>
- Wright S (1949) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323–354. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>
- Yagami T, Goto A (2000) Patchy distribution of a fluvial sculpin, *Cottus nozawae*, in the Gakko River system at the southern margin of its native range. *Ichthyological Research* 47:277–286. <https://doi.org/10.1007/BF02674251>
- Yagami T, Yokoyama R, Goto A (2002) Genetic fragmentation of populations of the fluvial sculpin

- Cottus nozawae* (Pisces: Cottidae) at the southern margin of its native range. Canadian Journal of Zoology 80:873–881. <https://doi.org/10.1139/z02-052>
- Yokoyama R, Goto A (2002) Phylogeography of a freshwater sculpin, *Cottus nozawae*, from the northeastern part of Honshu Island, Japan. Ichthyological Research 49:147–155. <https://doi.org/10.1007/s102280200019>
- Zbinden ZD, Douglas MR, Chafin TK, Douglas ME (2023) Riverscape community genomics: A comparative analytical approach to identify common drivers of spatial structure. Molecular Ecology 32:6743–6765. <https://doi.org/10.1111/mec.16806>
- Zeileis A, Hothorn T (2002) Diagnostic checking in regression relationships. R News 2:7–10
- Zeller KA, Creech TG, Millette KL, et al (2016) Using simulations to evaluate Mantel-based methods for assessing landscape resistance to gene flow. Ecology and Evolution 6:4115–4128. <https://doi.org/10.1002/ece3.2154>
- Zeller KA, McGarigal K, Whiteley AR (2012) Estimating landscape resistance to movement: a review. Landscape Ecology 27:777–797. <https://doi.org/10.1007/s10980-012-9737-0>