

山形県内に生息する野生メダカにおける 種内分化の分子遺伝学的解析

高山-渡辺絵理子^{1,2}, 辻徹³, 佐藤政則⁴, 土井寅治⁴,
八鍬拓司⁵, 佐々木隆行⁶, 渡辺明彦⁷, 鬼武一夫⁸

(2005年6月1日 受理)

Abstract

We studied genetic variations at the mitochondrial *cytochrome b* (cyt b) gene in wild populations of the Medaka fish (*Oryzias latipes*) from 58 sites of Yamagata prefecture by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLPs). In addition, we determined the nucleotide sequences of cyt b from 13 specimens and reconstructed a phylogenetic tree. Our results showed that, in Yamagata prefecture, the wild populations of the Medaka fish were mainly divided into two groups: One group distributed in the northern coastal area and another distributed in the inland area. The boundary between those areas was detected in Mamurogawa-machi, Sakekawamura and Tozawa-mura.

Key words

Geographic variation, *Oryzias latipes*, mitochondrial DNA, Yamagata prefecture.

¹山形短期大学 (Yamagata Junior College, Yamagata, Japan) 現所属)

²山形大学理学部物質生命化学科 (Department of Material and Biological Chemistry, Faculty of Science, Yamagata University, Yamagata, Japan)

³山形城北高等学校 (Yamagata Johoku High School, Yamagata, Japan)

⁴山形県めだかの学校 (MEDAKA School of Yamagata Prefecture, Yamagata, Japan)

⁵山形県立博物館 (Yamagata Prefectural Museum, Yamagata, Japan)

⁶山形県立北村山高等学校 (Kita-murayama High School, Yamagata, Japan)

⁷山形大学理学部生物学科 (Department of Biology, Faculty of Science, Yamagata University, Yamagata, Japan E-mail address: watan@sci.kj.yamagata-u.ac.jp)

⁸山形大学 (Yamagata University, Yamagata, Japan)

1 序論

メダカ (*Oryzias latipes*) は日本、韓国、及び中国に広く分布する小型淡水魚である。日本国内では北海道から沖縄まで広い範囲で生息が確認されてきた。しかし、近年、生息する環境の変化等により生息地の減少が報告され、平成 15 年刊行の環境省レッドデータブックでは絶滅危惧 II 類 (絶滅の危険が増大している種) に分類されている (林、2003)。

メダカの種内分化に関しては、形態の違いと遺伝子多型の違いを用いた研究が行われてきた。これらの研究の結果から、日本に生息するメダカは、青森県東部から丹後半島にかけて日本海側に分布する北日本集団と、それ以外の南日本集団に大きく分けられることが示されている (Sakaizumi、1984; 酒泉、1990; 岩松、1993)。

ミトコンドリア遺伝子は、DNA サンプルが得やすいことや核遺伝子に比べて塩基置換の速度が速いことなどの利点を持つため、近縁種間または種内における系統関係を調べるために使用されている。中でもチトクローム b 遺伝子 (cyt b) はタンパク質をコードする構造遺伝子であり、魚類を含む多くの生物種において系統解析に最もよく用いられている遺伝子の一つである (Brito *et al.*、1997; Meyer *et al.*、1990; Zardoya and Doadrio、1999)。Matsuda ら (1997) と Takehara ら (2003) は、ミトコンドリア DNA 及びこれに含まれる cyt b の塩基配列を用いて、RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法による解析と塩基配列の比較を行い、北日本集団が遺伝的変異が少ない単一の系統群 (クレード) であることを明らかにした。

山形県に生息するメダカは北日本集団に分類される。北日本集団は、cyt b を用いた RFLP 法による解析からさらに 20 種類のハプロタイプに分類することができるが、山形県内 6 地点で採集された個体はこのうちの 3 種類のいずれかに分類されることが Takehara ら (2003) によって報告されている。しかし、山形県内ではこれまでに 143 カ所 (消滅した場所を含む) の生息地が、山形県めだか情報センター* によって確認されており、6 地点からの採集では県内に生息するメダカのハプロタイプの分布を明らかにすることは困難である。山形県内に生息するメダカのハプロタイプの分布を明らかにすることは、山形県の野生動物相の成り立ちを検討するために有用な情報となり、また、人為的なメダカの放流による他地域の集団からの遺伝子流入を検証するためにも有用である。

今回我々は、山形県内 58 地点から採集した野生メダカ 65 個体をサンプルとして cyt b の PCR (polymerase chain reaction)-RFLP 解析を行い、ハプロタイプを決定した。更に、13 個体について cyt b 塩基配列の比較を行った。これらの結果から明らかになった県内メダカの種内分化の状況を報告する。

* (<http://www.johoku.ed.jp/medaka/index.html>)

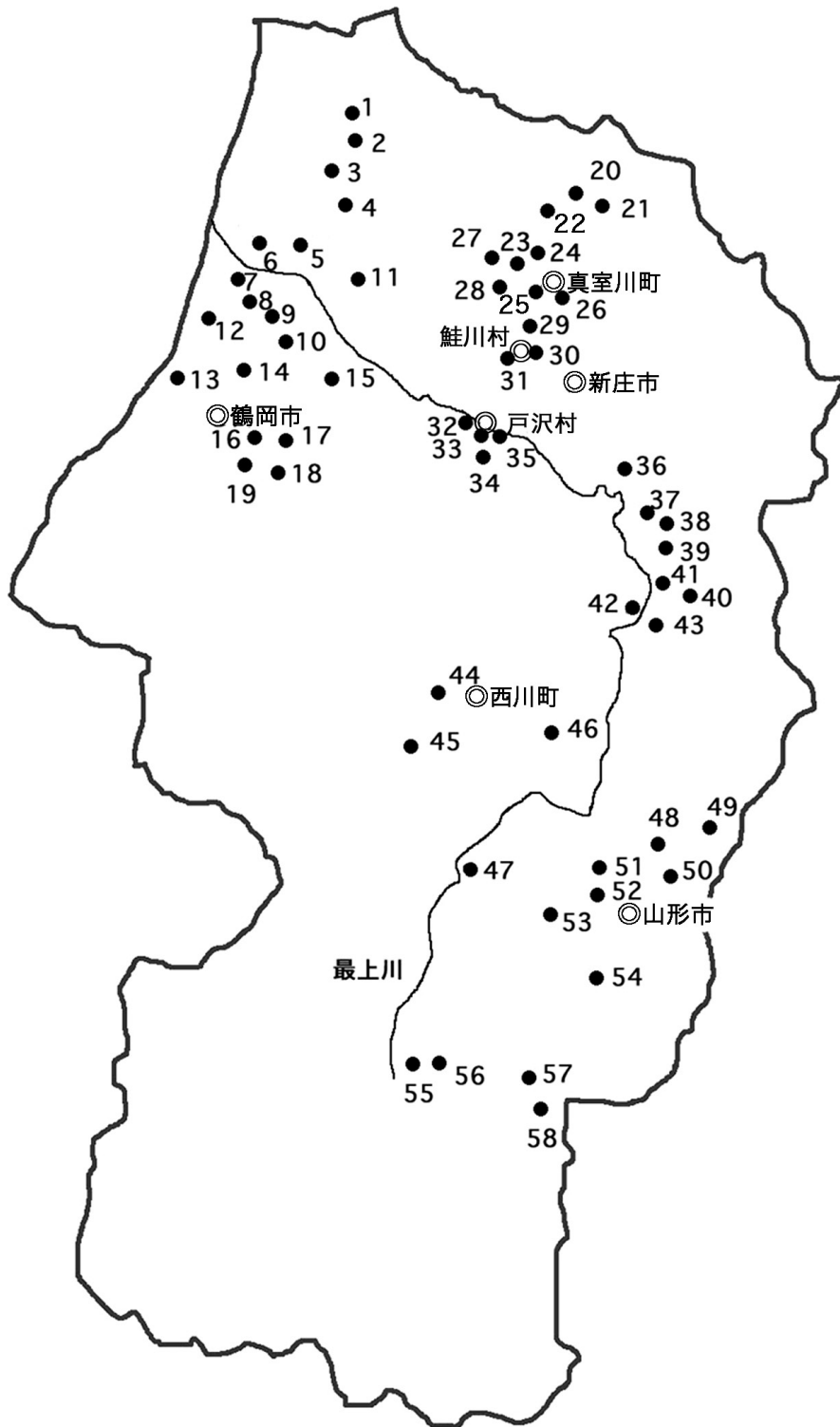


図 1. 野生メダカの採集地点。各地点の市町村名は表 1 に示す

表 1. 野生メダカの採集地点と cyt b 遺伝子ハプロタイプ

番号	採集地	サンプル数	ハプロタイプ	番号	採集地	サンプル数	ハプロタイプ
1	遊佐町	1	A1*	30	鮭川村	1	A5
2	遊佐町	1	A1	31	戸沢村	1	A5*
3	遊佐町	1	A1	32	戸沢村	1	A1*
4	平田町	1	A1*	33	戸沢村	1	A5
5	平田町	1	A1	34	戸沢村	1	A5*
6	酒田市	1	A1	35	戸沢村	1	A5
7	酒田市	1	A1	36	尾花沢市	1	A5
8	余目町	1	A1	37	尾花沢市	1	A5
9	余目町	1	Y1*	38	尾花沢市	1	A5
10	余目町	2	A1・Y1*	39	尾花沢市	1	A5
11	松山町	1	A1	40	尾花沢市	1	A5
12	鶴岡市	1	A1	41	大石田町	1	A5*
13	鶴岡市	1	A1	42	村山市	2	A5
14	鶴岡市	2	A1	43	村山市	1	A5
15	藤島町	2	Y1**	44	西川町	1	A5
16	羽黒町	1	Y2*	45	西川町	2	A5*
17	羽黒町	1	A1	46	寒河江市	1	A5
18	羽黒町	1	A1	47	朝日村	2	A5
19	羽黒町	1	A1	48	天童市	1	A5
20	金山町	1	A1	49	天童市	1	A5
21	金山町	1	A1	50	天童市	1	A5
22	真室川町	1	A1	51	山形市	1	A5
23	真室川町	1	A1	52	山形市	1	A5
24	真室川町	1	A1	53	山形市	1	A5
25	真室川町	1	A1	54	上ノ山市	1	A5
26	真室川町	2	A1*	55	長井市	1	A5
27	鮭川村	1	A1	56	長井市	1	A5
28	鮭川村	1	A1	57	南陽市	1	A5
29	鮭川村	1	A1	58	高畠市	1	A5

各番号の採集地点は図1に示した。

* は cyt b 遺伝子の塩基配列解読を行った個体を示す。

2 材料と方法

メダカ (*Oryzias latipes*)

2004年に山形県内の58地点より、65個体の野生メダカを採集した(図1、表1)。採集したメダカは100%エタノールを用いて固定した。

DNAの抽出

メダカの尻びれを眼科ハサミで切断し、液体窒素中で凍結した。これをドライアイス上でメスを用いて細断し、DNA Isolation Kit、G NOME (Qbiogene)を用いて総DNAを抽出した。

PCR法による cyt b の増幅

抽出した総DNAを鋳型として、PCR法により cyt b を含むDNA断片(1241bp)の特異的な増幅を行った。プライマーは、Cytb Fa (5'-AGG ACC TGT GGC TTG AAA AAC CAC -3')と Cytb Rva (5'-TYC GAC YYC CGR WTT ACA AGA CCG -3')を用いた(Takehara *et al.*, 2003)。PCRは全量を40 μ lとする反応系で行い、dNTPs 0.67 mM、1 \times LA Taq バッファー (TaKaRa)、LA Taq ポリメラーゼ 2.5 unit (TaKaRa)、それぞれのプライマー 0.25 μ M、鋳型DNA約400 ngを混合し、94°C 2分間の熱変性を行なった後、94°C 1.5分、55°C 2分、72°C 2分の反応を30サイクル行なった。

PCR-RFLP法による解析

PCR-RFLP法による cyt b の多型の解析はTakeharaら(2003)の方法を改変して行なった。

各個体からPCR法により増幅された cyt b を含むDNA断片を4種類の制限酵素 (*Hae* III、*Mbo* I、*Msp* I、*Rsa* I)を用いて切断した。その後、3%アガロースゲルを用いた電気泳動により、各制限酵素によって切断されたDNA断片の分離を行なった。断片化パターンは1%エチジウムブロマイドによる染色の後、UV光のもとで観察、確認した。DNA断片の長さは電気泳動の結果と塩基配列を照合して決定した。4種類の酵素の切断により得られた断片化パターンの組み合わせによりハプロタイプを決定した(表2、3)。

塩基配列の決定

PCR-RFLP法による解析を行ったメダカのうち13個体について、cyt b 塩基配列の決定を行った(表1)。

塩基配列は、DYEnamic ET Terminator cycle sequencing premix kit (Amersham Pharmacia Biotech.)を用い、PCR産物のダイレクトシーケンシングにより決定した。塩基配列の解読にはABI-PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystem)を使用した。プライマーは以下の5種類を使用した。CytbFa、CytbFb (5'-CAA ATA TCA TTT TGA GGG GCC ACT GT-3')、CytbFd (5'-CCC TAT TCT ACA CAC CTC TAA ACA ACG -3')、

表 2. 増幅された *cyt b* 遺伝子を含む DNA 断片 (1241bp) の制限酵素による断片化パターン

制限酵素	<i>Hae III</i>		<i>Mbo I</i>				<i>Msp I</i>	<i>Rsa I</i>
断片化パターン	A	Y	A	B	C	Y	A	A
断片のサイズ (bp)	563	563	659	730	537	659	542	1241
	284	284	348	348	348	348	318	
	202	202	163	163	163	234	259	
	173	120	71		122		98	
	19	53			71		13	
		19					11	

表 3. 増幅された *cyt b* 遺伝子を含む DNA 断片 (1241bp) の制限酵素による断片化パターンと *cyt b* 遺伝子ハプロタイプ

ハプロタイプ	<i>Hae III</i>	<i>Mbo I</i>	<i>Msp I</i>	<i>Rsa I</i>
A1	A	A	A	A
A4*	A	B	A	A
A5	A	C	A	A
Y1	A	Y	A	A
Y2	Y	A	A	A

*本研究ではA4は検出されなかった。

CytbRva、*CytbRvd* (5'-GCA TGT ATA TTC CGG ATT AGT CAG CCG TA-3')(Takehara *et al.*, 2003)。

系統解析

13 個体のメダカ *cyt b* の塩基配列は、ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) を用いて多重アラインメントを行った。その後、塩基置換率より遺伝的距離 (p-distance) を求め、PHYML version 3.57c (Felsenstein, 1995) を用いて Neighbor-joining 法 (NJ 法, Saitou and Nei, 1987) による系統解析を行った。各ノードについて、1000 回の繰り返しによるブートストラップ確率を求めた。

最節約法による系統解析は、PAUP* version 4.0 (Swofford, 2000) を用いて行った。ブートストラップ確率は 100 回の繰り返しにより求めた。

3 結果

本研究では山形県内の 58 地点から採集した野生メダカ 65 個体について、*cyt b* を含む DNA 断片 (1241bp) を用いて解析を行った。採集地点は図 1 及び表 1 に示す。

PCR-RFLP 法による解析

今回採集された山形県内の野生メダカは、*Hae III*、*Mbo I*、*Msp I* 及び *RsaI* を用いた PCR-RFLP 解析によりハプロタイプを決定した。各制限酵素による断片化パターンとそこから決定されたハプロタイプは表 2 及び 3 に示す。採集された 65 個体は、A1、A5、Y1 及び Y2 の 4 つのハプロタイプに分類された (表 1)。A1 と A5 は、Takehara ら (2003) により山形県内での存在が報告されたハプロタイプであり、Y1 と Y2 は、山形県内外を含めて今回初めて確認されたハプロタイプである。Takehara ら (2003) により鶴岡市での存在が報告されている A4 に分類される個体は、今回確認されなかった。

A1 には 27 地点から採集された 28 個体、A5 には 28 地点から採集された 31 個体、Y1 には 3 地点から採集された 4 個体、Y2 には 1 地点から採集された 1 個体がそれぞれ分類された。図 2 は各ハプロタイプの地理的な分布を示す。

A1 は、鮭川村、戸沢村以北及び以西にあたる山形県の北部日本海側の地域で採集された個体において検出された。一方 A5 は、鮭川村、戸沢村以南及び以東の県の内陸部で採集された個体において検出された。この 2 つのハプロタイプの分布域は上記の地域を境界としてほぼ完全に分離しており、県北部日本海側地域での A5 または県内陸部での A1 の存在は確認されなかった。

Y1 または Y2 に分類された個体は、主に A1 が分布する県北部日本海側地域で確認された。Y1 は余目町と藤島町の 3 地点 (図 1、図 2、表 1: 番号 9、10、15) から 4 個体が採集され、Y2 は羽黒町の 1 地点 (図 1、2、表 1: 番号 16) から 1 個体が採集された。Y1 の個体が採集された 3 地点はそれぞれ隣接する採集地点であった。また、Y1 の個体が採集された余目町の 1 地点 (図 1、2、表 1: 番号 10) では A1 に分類された個体も採集された。

山形県外から持ち込まれたと考えられるハプロタイプの個体は確認されなかった。

系統解析

県内各地点で採集された個体間の系統類縁関係をさらに検討するために、*cyt b* の全塩基配列 (1141bp) を用いて系統解析を行った。解析にはハプロタイプ A1 の個体として 4 地点 (番号 1、4、26、32) から採集された 4 個体、A5 の個体として 4 地点 (番号 31、34、41、45) から採集された 4 個体、Y1 の個体として 3 地点 (番号 9、10、15) から採集された 4 個体及び Y2 の個体として 1 地点 (番号 16) から採集された 1 個体を用いた。各個体の *cyt b* の全塩基配列を決定し、Gene Bank に登録されている新庄 (A1)、鶴岡 (A4) 及び山形 (A5) で採集された個体の *cyt b* 塩基配列 (accession number: AB084673、

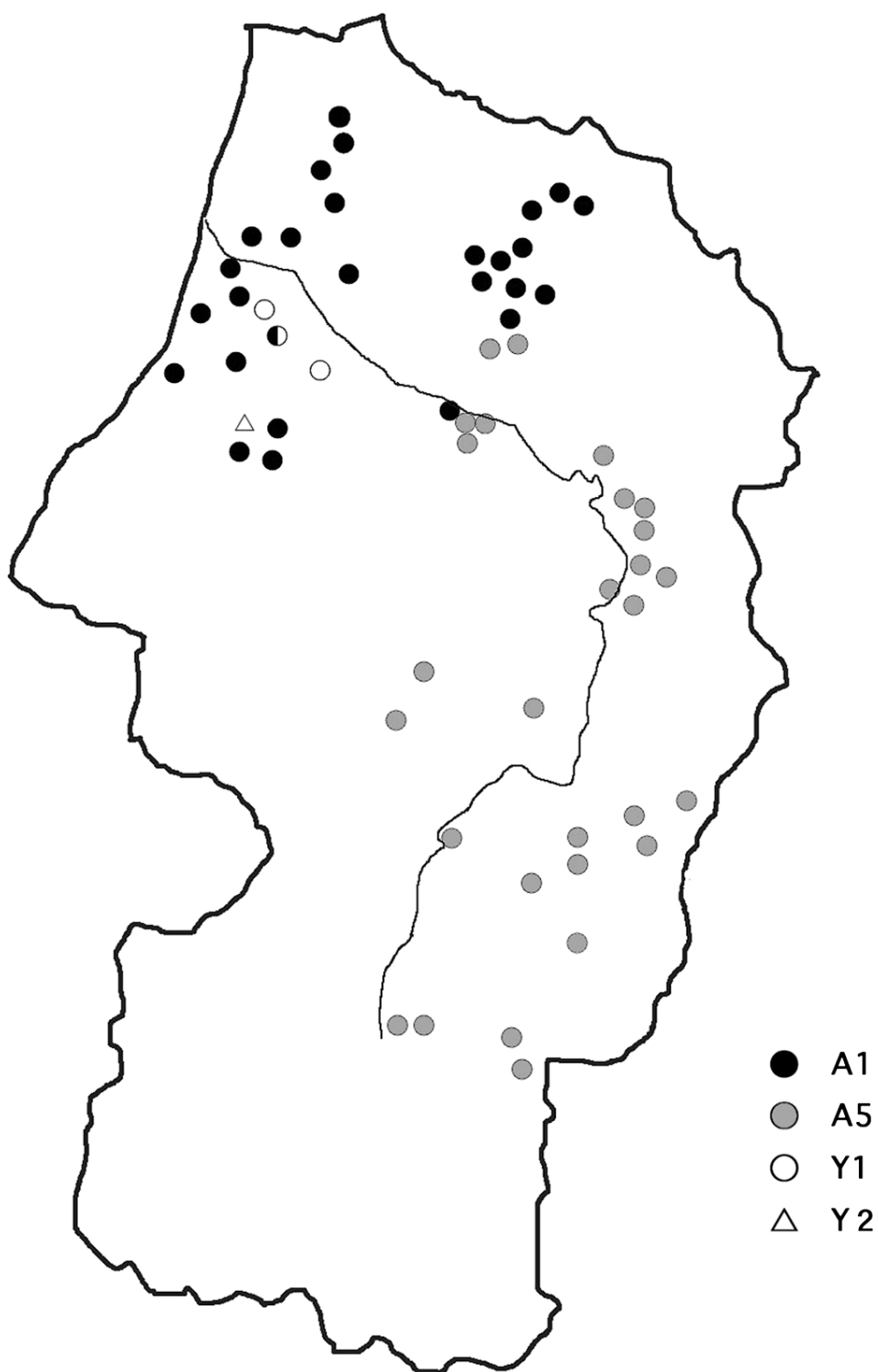


図 2. cyt b 遺伝子ハプロタイプの地理的な分布

AB084676、AB084677)(Takehara *et al.*、2003)を加えた67個体の塩基配列を用いて、N-J法及び最節約法により系統樹を作成した。また、外群としてGene Bankに登録されている仙台で採集された個体の塩基配列(accession number:AB084728)を用いた。このメダカは、山形県の個体と異なり、南日本集団に属している(Takehara *et al.*、2003)。

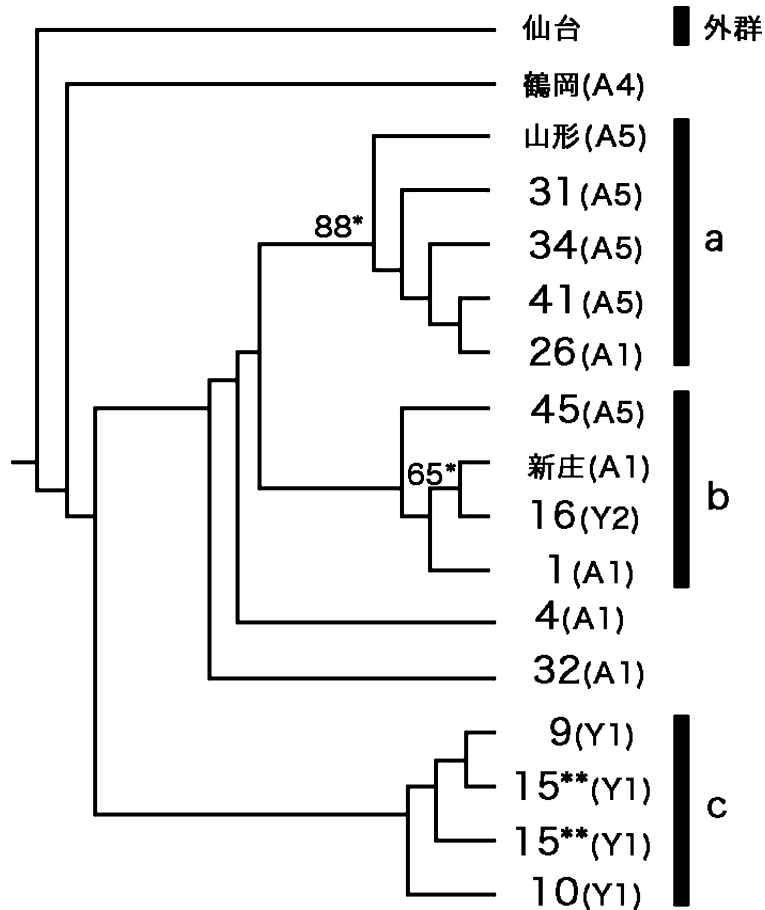


図3. 山形県産野生メダカの *cyt b* 遺伝子ハプロタイプ間の類縁関係を示す NJ 法系統樹。() 内は PCR-RFLP 法により決定されたハプロタイプを示す。a、b、c はクラスターを示す。* ブートストラップ値は、50%以上の値が得られたものについて示した。** 番号 15 の地点からは 2 個体を解析した。

N-J 法による *cyt b* の遺伝子系統樹を図3に示す。山形県内で採集されたメダカ16個体のうち13個体がクラスターa、クラスターb及びクラスターcの3つのクラスターを形成した。特に、クラスターaは88%のブートストラップ値で他のクラスターとの分岐が支持された。

クラスターaには、ハプロタイプがA5である4地点(番号31、34、41、山形)で採集された4個体とA1である1地点(番号26)で採集された1個体が含まれた。これらは、ハプロタイプがA1である番号26の地点(真室川町)で採集された個体も含めて、A1とA5の分布の境界領域と考えられる地

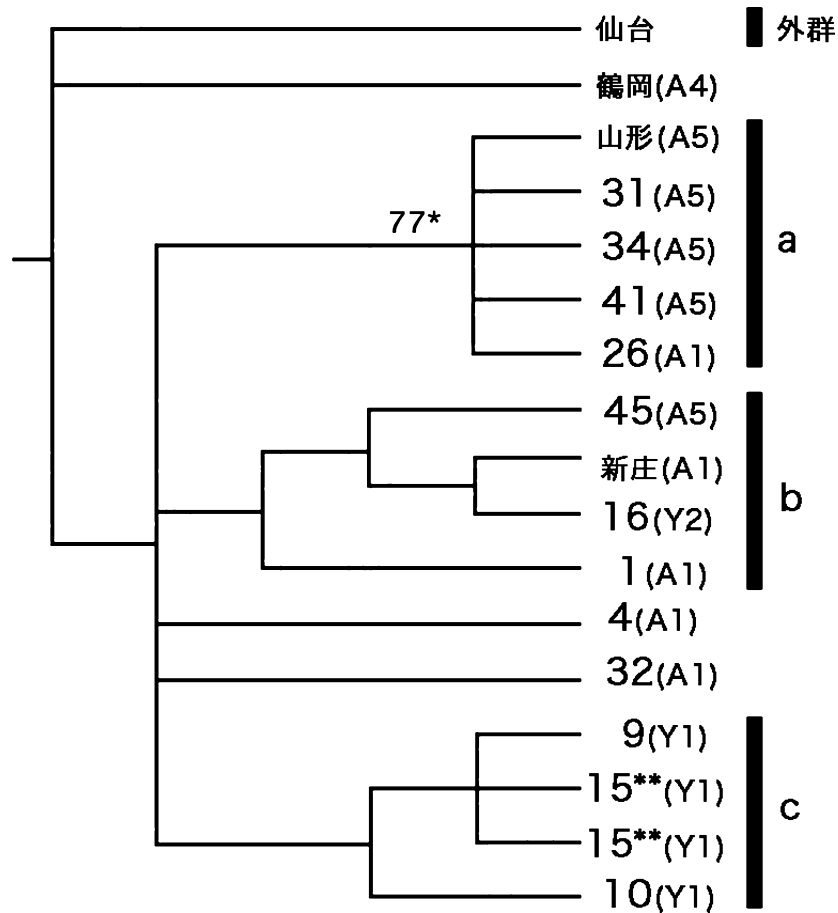


図4. 山形県産野生メダカの *cyt b* 遺伝子ハプロタイプ間の類縁関係を示す最節約法系統樹。()内はPCR-RFLP法により決定されたハプロタイプを示す。a、b、cはクラスターを示す。* ブートストラップ値は、50%以上の値が得られたものについて示した。** 番号15の地点からは2個体を解析した。

域より内陸部側で採集された個体であった。

クラスター b には4個体が含まれた。これらの個体のハプロタイプは、A1 (番号1、新庄)、A5 (番号45) または Y2 (番号16) のいずれかであり、採集地点は日本海側 (番号1、16) から新庄市 (新庄)、西川町 (番号45) と広範囲にわたった。

番号4と32の地点で採集された個体は、共にハプロタイプがA1であり、クラスター a またはクラスター b には含まれなかったが、これらの2個体とクラスター a と b に含まれる個体を全て含む大きなクラスターの存在が示唆された。

クラスター c にはハプロタイプが Y1 である4個体が全て含まれた。これらの個体は、県北部日本海側で隣接して存在する3地点 (番号9、10、15) から採集されたものであった。このクラスターはクラスター a とクラスター b が分岐するよりも早い時期に分岐したことが示唆された。

A4(鶴岡)は、3つのクラスターのいずれにも含まれず、クラスター a、b 及び c を一つのクラスターとして仮定するとその外部に位置することが示唆された。

最節約法による系統樹でも、16個体のメダカのうち13個体がN-J法による系統樹において形成したのと同じ3つのクラスターを形成した(図4)。特にクラスター a は77%のブートストラップ値で分岐が支持された。

4 考察

本研究では、山形県内で採集した野生メダカの種内分化について、cyt b を用いたPCR-RFLP法、N-J法及び最節約法による解析を行った。その結果、県内のメダカは、県北部日本海側に生息する集団と県内陸部に生息する集団の2つに大きく分けられることが明らかになった。両者の生息域の境界は真室川町、鮭川村及び戸沢村近辺にあることが推定された。また、県北部日本海側の地域には、生息地が限局されてはいるが、独自の遺伝的クラスターを形成するハプロタイプ Y1 が存在することが明らかとなった。

今回の解析では、明らかに他地域から流入したと考えられる個体は確認されなかった。

県北部日本海側に生息する集団と県内陸部に生息する集団

PCR-RFLP法を用いた解析により、県北部日本海側には主にハプロタイプ A1 が、県内陸部には A5 が生息することが示された。鮭川村及び戸沢村では A1 および A5 の両方のハプロタイプが確認された。この領域を越えて A1 が内陸側で、または A5 が日本海側で確認されることはなく、両ハプロタイプの生息域の境界は鮭川村及び戸沢村に明瞭に存在した。A1 は、青森県から京都府にかけ日本海側での分布が確認されており、北日本集団の中ではもっとも広範囲に観察されるハプロタイプの一つである。これに対して、A5 は山形県以外ではこれまでに確認されていない(Takehara *et al.*, 2003)。本研究の結果は、A5 が山形県内陸部にのみに生息する集団に特有のハプロタイプであることを示唆する。

この結果は、cyt b を用いたN-J法及び最節約法による系統樹からも支持された。これらの系統樹では3つのクラスターが確認された。特にクラスター a はN-J法では88%、最節約法では77%のブートストラップ値で分岐が支持された。このクラスターには A5 の4個体と A1 の1個体が含まれた。A1 の1個体は、前述の鮭川村及び戸沢村の北部に位置する真室川町で採集された。クラスター a に含まれた A5 の4個体は、全てこの3町村の領域より以東または以南の県内陸部で採集された。このことから、県内陸部にはこの地域に特有の集団が生息していると考えられる。また、この地域内においても、クラスター a に属さない A1 の個体(新庄、accession number: AB084673)が採集されている(Takehara *et al.*, 2003)ことから、県北部日本海側の地域

に生息する集団と県内陸部に生息する集団は、境界領域付近では混在している可能性が示唆される。

西川町の番号 45 の地点で採集された個体は、ハプロタイプが A5 であったがクラスター b に属していた。西川町は、前述の 3 町村と同様に複数の集団が混在する境界領域である可能性が考えられる。トウホクサンショウウオを対象として行われた *cyt b* を用いた集団の遺伝的分化の研究では、西川町を含む月山周辺で、他地域の個体とは遺伝的に大きく異なるハプロタイプと県内に広く分布するハプロタイプを示す個体とが共に確認されている（青木、私信）。これらのことから、月山周辺の地域には、移動性が低い野生動物において複数の集団が混在するための地理的地史的条件が存在する可能性もある。これを検証するためには、この地域で採集された複数のメダカの解析とともに、異なる動物種での解析や地形及び地史との関係の検討が必要である。

PCR-RFLP 法を用いた解析の結果は、北部日本海側集団を主に構成するのは A1 のハプロタイプであることを示したが、系統樹では A1 全体で明確なクラスターを形成しなかった。A1 は日本海沿いに広く分布するハプロタイプであることから、ハプロタイプ内での遺伝的な多様性が存在すると考えられる。

また、1 地点（番号 16）でのみ確認されたハプロタイプ Y2 は、A1 とともにクラスター b を形成し、更に新庄で採集された A1 である個体とともに N-J 法により 65% のブートストラップ値で分岐が支持されたサブクラスターを形成した。これらのことから、Y2 は A1 から派生したハプロタイプである可能性が示唆される。

ハプロタイプ Y1 集団

Y1 は、本研究で初めて見いだされたハプロタイプであり、山形県に固有の集団を形成することが予想される。本研究の結果では、ブートストラップ値が 50% 以下という低い支持率ではあるが、Y1 の個体は独自のクラスター c を形成した。このクラスターは、クラスター a とクラスター b とが分岐する以前に分岐したことが示唆された。このことからクラスター c を形成する Y1 の個体は、他の 2 つのクラスターを形成する A1、A5、Y2 の個体とは、遺伝的に離れた系統であると考えられる。しかし、Y1 に分類された個体の採集地点は、A1 が広く生息する日本海側に存在する隣接した 3 地点であり、A1 の個体が同時に採集された地点も存在した（番号 10）。Y1 の個体は、生息域が限定されていることから県外から持ち込まれた集団である可能性も考えられるが、Y1 に相当するハプロタイプは他県では報告されていない。Y1 は比較的早い時期に分岐し、元々限られた分布域に生息してきた集団の個体か、または早い時期に分岐し、生息域を広げた後大部分は絶滅し、限られた地域で生き残った集団の個体である可能性がある。

今回の解析により、山形県内のメダカは遺伝的に分化した 3 つの集団からなり、各集団は一定の分布域に生息することが示唆された。今後、詳細な集

団遺伝学的な解析を行い地史との関連性を論じることにより、各集団の形成過程について考察が可能となるであろう。また、山形県各地に生息するメダカの遺伝的集団構造の研究は、メダカの保護はもちろん、メダカ以外の山形県野生動物相全体の理解と保全を行う上で、有用な情報となることが期待される。

謝辞

本研究は、山形県めだか情報センターの皆様の長年にわたる調査を基に行われたものです。貴重な情報と試料を提供いただきましたことにお礼を申し上げます。また、研究の遂行についてご助言をいただきました山形県立中央高等学校の鹿野秀司先生、系統解析手法についてご指導いただきました山形大学理学部生物学科の玉手英利教授、研究の機会を与えてくださいました山形大学理学部物質生命化学科の長谷川典巳教授にお礼を申し上げます。

本研究は、独立行政法人日本学術振興会平成16年度科学研究費補助金奨励研究の援助を受けて行われました。

References

- [Brito *et al.*, 1997] Brito R.M., Briolay J., Bouvet Y. and Coelho M.M., Phylogenetic relationships within genus *Leuciscus* (*Pisces, Cyprinidae*) in Portuguese fresh waters, based on mitochondrial DNA cytochrome b sequences. *Mol Phylogenet Evol* 8: 435-442, 1997.
- [Felsenstein, 1995] Felsenstein, J., PHYLIP - phylogeny inference package version 3.57c.
- [林, 2003] 林 公義、メダカ「改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物4 レッドデータブック 汽水淡水魚類」環境省野生生物課編、自然環境研究センター、162-163、2003.
- [岩松, 1993] 岩松鷹司、「メダカ学」岩松鷹司、サイエンティスト社、34-37、1993.
- [Matsuda *et al.*, 1997] Matsuda M., Yonekawa H., Hamaguchi S. and Sakaizumi M, Geographic variation and diversity in the mitochondrial DNA of the medaka, *Oryzias latipes*, as determined by restriction endonuclease analysis. *Zool Sci* 14: 517-526, 1997.
- [Meyer *et al.*, 1990] Meyer A., Kocher T.D., Basasibwaki P. and Wilson A.C., Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* 347: 550-553. 1990.

- [Saitou and Nei, 1987] Saitou N. and Nei M., The neighbor – joining method: A new method for reconstructiong phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 11:441-458, 1987.
- [Sakaizumi, 1984] Sakaizumi M., Rigid isolation between the Northern Population and the Southern Population of the medaka, *Oryzias latipes*. *Zool Sci* 1: 795-800, 1984.
- [酒泉, 1990] 酒泉 満、遺伝学的に見たメダカの種と種内変異「メダカの生物学」江上信雄・山上健次郎・嶋 昭紘編、東京大学出版会、141-161、1990.
- [Swofford, 2000] Swofford D. L. PAUP* phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4.0b8a. Sinauer Associates, Sunderland, MA., 2000.
- [Takehana, 2003] Takehana Y., Naga N., Matsuda M., Tsuchiya K., Sakaizumi M. Geographic Variation and Diversity of the Cytochrome b Gene in Japanese Wild Populations of Medaka, *Oryzias latipes*. *Zool Sci* 20: 1279-1291, 2003.
- [Thompson *et al.*, 1997] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG., The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882, 1997.
- [Zardoya, 1999] Zardoya R., Doadrio I., Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *J Mol Evol* 49: 227-237, 1999.

山形県内に生息するメダカにおける種内分化の分子遺伝学的解析

補遺 論文中の採集地点の番号と、山形県産めだか情報センターにより公表されている山形県めだか生息地マップの番号との対応を示す

採集地点	生息地マップ	採集地点	生息地マップ
1	138	30	141
2	137	31	55
3	136	32	113
4	70	33	—
5	124	34	114
6	88	35	—
7	89	36	23
8	120	37	—
9	90	38	61
10	91	39	—
11	111	40	15
12	53	41	21
13	30	42	7
14	72	43	16
15	68	44	7
16	76	45	6
17	77-81	46	3
18	77-81	47	10
19	77-81	48	13
20	108	49	129
21	112	50	64
22	132	51	43
23	96	52	65
24	—	53	42
25	—	54	134
26	59	55	46
27	140	56	45
28	139	57	47
29	95	58	48