

河川事業への遺伝情報の活用による効率的・効果的な河川環境調査技術と改善技術に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 27

担当チーム：水環境研究グループ（河川生態）

研究担当者：三輪準二、村岡敬子

【要旨】

本研究は、これまでの戦略研究を通じて現場適用の効果が示唆された遺伝情報を用い、これまで困難であった魚類集団と空間の関わりの把握と、それに基づいた調査や事業計画の方法を提案することを目的に、平成 23 年度を初年度として実施するものである。今年度は、魚道の評価に遺伝情報を適用することを試みた。実地における調査の結果、AFLP 手法を用いることにより、魚類の移動状況を推定できることを示した。一方、河川上下流の遺伝的に極めて近い集団に対して本手法を適用する場合には、AFLP 手法の再現性が問題となる場合があり、それを解消するためには Ligation のステップから再実験をする必要があると考えられた。

キーワード：AFLP, 魚道, 評価, エゾイワナ, ハナカジカ

1. はじめに

河川に生息する魚類の多くは、その生活史あるいは成長段階に応じて必要な環境を求め、河川の上流や周辺の水域を移動する。治水あるいは利水を目的に設置された堰堤による魚類の移動環境への影響を緩和するため、国土交通省や農林水産省等では各種事業により、魚道の整備をおこなっている。さらに、これらの事業では、サケやアユなど水産的価値の高い魚種だけでなく、底生魚を含むさまざまな魚種を対象とした魚道の研究や計画時の検討がなされるようになってきている。一方、こうして設置されてきた魚道が十分に機能しているか評価するための様々な調査や研究もなされているものの、非回遊魚を中心として「当該魚道においてどれだけの尾数が遡上・降下するべきか」が明らかではないため、魚道が十分な機能を維持しているか否かを判断することが困難であった。

ここに、魚道を設置する目的を、「当該河川に生息する魚類地域個体群の維持」と定義すれば、魚道に求められる機能；「どれだけの尾数が魚道を行き来するべきか」を「魚道上下流に分布する同魚種の集団が、ひとつの地域

個体群として維持されるために必要なレベルの個体数が行き来できること」と考えることができる。そこで本研究では、魚道の評価に遺伝情報を適用することを試みた。

2. 材料と方法

2.1 材料

本研究で調査を行った北海道内の農業排水路約 6Km の区間には、高さ 0.75～1.5m の農業用の落差工が 14 基設置され、全ての落差工には魚道が設置されている(図-1)。本区間の下流端には高さ 10m 以上の天然の滝があるため、魚類は主として滝より上流の本川・支川と沢の範囲を行き来していると考えられた。調査区間には、エゾイワナ、フクドジョウ、ハナカジカおよびヤマメが生息しており、このうちヤマメは放流履歴が確認されている。2009 年 9 月および 2010 年 7 月に、図-1 に示す区間において、定置網および電気ショッカーにより採取されたエゾイワナ、ハナカジカ、フクドジョウを採取し、採取個体の大部分にあたる全 257 個体のヒレの一部を採取した。採取したヒレは 95%エタノールに浸した状態で実験室内に持ち帰り、Qiagen 社製 ProtenazeK によるた

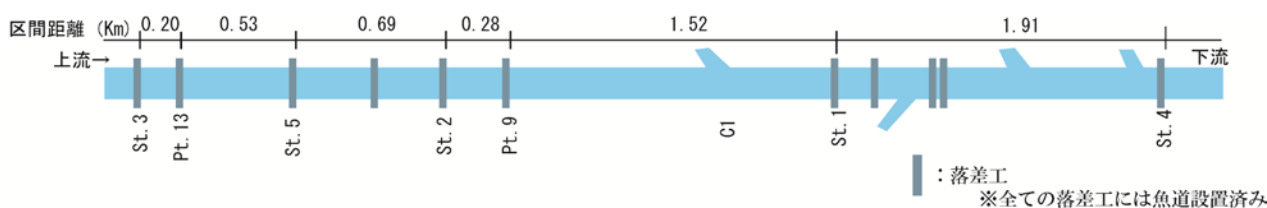


図-1 調査地点の概況

んぱく質分解処理の後、フェノール・クロロホルム法によりDNAを抽出した。

2. 2 解析方法

AFLP解析はABI社製AFLP®Ligation and Preselective Amplification Modelを用いてアダプター配列に3塩基付加し、蛍光標識したEcoRIプライマーおよび無標識のMse Iプライマーを組み合わせ、エゾイワナ・ヤマメ(164個体)、ハナカジカ(62個体)、フクドジョウ(18個体)に対して、EcoAAC-Mse I CAA(以下同じ)、ACT-CAC, ACG-CAG, AGC-CAT, ACA-CTG, AGG-CAGの計6通りのプライマー組み合わせにより行った。さらに、AFLPの再現性を検証するために2009,2010年に採取したエゾイワナ・ヤマメ(96個体)に対してAGC-CAT, ACA-CTG, AGG-CAGの計3通りのプライマー組み合わせによる再分析を行った。

PCR増幅産物は、ABI社製3100を用いて電気泳動した後、同社Gene-mapperR(ver.3)を用いて自動解析した。今回用いたサンプルでは、エゾイワナ106個体に対し406allelが検出された。

得られたAFLPデータから、AFLP SURV2,3)を用いて各地点間、個体間の遺伝的距離を求め、PHYLIP Version 3.684)によって系統樹を作成した。また、Structure5)による個体の帰属性解析を行った。

3. 研究方法

3. 1 2009年に採取されたエゾイワナの遺伝子構造と地理的情報

2009年に採取されたエゾイワナを対象としたStructureによる解析の結果を図-2に示す。いずれの要素共に調査区間全域に分布しているものの、調査区間の上流域、中流域、下流域において構成比が異なる小集団の存在が認められ、エゾイワナの個体が本調査区間の上流から下流の広い範囲を活発には移動していないことがうかがえた。また、AFLP-SURVによる個体間遺伝的距離の無根系統樹からは、3つの小グループがみられた(図-3)。このうち、グループAに属する個体はPt.13~St.4の区間で出現し、遺伝的な距離が短く、位置関係も地理的關係を反映せず、この区間においては遺伝的な交流ができていていると考えられた。しかしながら、グループAに属する個体が最上流調査地点で確認できていないことからSt.3とPt.13~St.4の間で交流の頻度が低いことが推定された。さらに、地理的な関係や個体の採取場所などから、グループBはSt.3を起源にもつ集団であること、グループCは流入支川などを起源にもつ集団であることが推定された。このように、わずか6kmに分布する、上下流の位置関係にある集団においても、遺伝情報から求めた個体間距離から位置関係を明確にすることができるとともに、魚道の評価への遺伝情報の適用の可能性が示された。

3. 2 2010年に採取されたエゾイワナ・ヤマメの遺伝子構造

2010年に採取されたエゾイワナ・ヤマメの遺伝子構造の結果を図-4に示す。新たにサンプリング対象とした最下流の地点を中心にヤマメ(図中赤丸印の個体)が確認さ

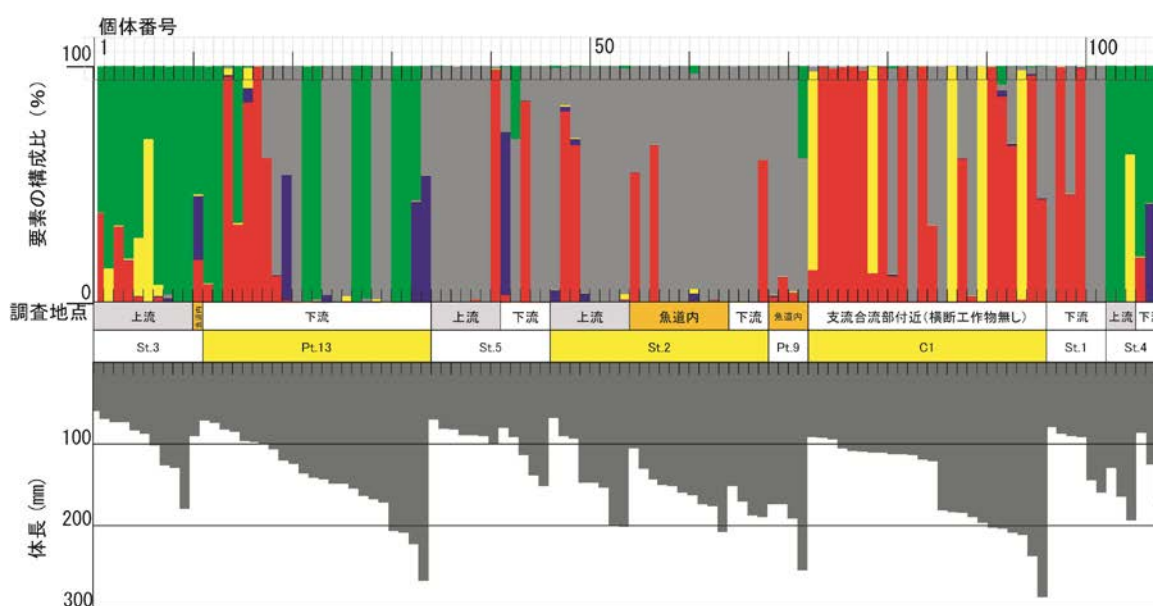


図-2 横断工作物の分布とエゾイワナの遺伝的要素の関係

れているが、これと類似した遺伝子構造を有するエゾイワナや、エゾイワナ・ヤマメ双方の遺伝子構造を有する個体があり、当該地域においてエゾイワナとヤマメの交雑が起きている可能性が考えられた

3.3 ハナカジカ・フクドジョウにおける結果

ハナカジカの遺伝子構造を図-5に示す。ハナカジカでは2009年、2010年の結果共に、堰堤を含む本川の上下流において遺伝子構造に明瞭な違いはみられず、カジカ集団は、現段階においては堰堤の影響を受けていないと判断された。一方、2010年に新たに追加した支川との間には明瞭な違いがみられ、双方の区間に堰堤は存在しないものの、支川-本川間での個体の交流は本川上下流に比べ小さいと考えられた。また、フクドジョウにおいても、確認地点・個体数が少ない条件下ではあるが、移動阻害を受けている状況は確認できなかった。

本排水路は土水路であり、降雨時などに植生もある河岸の水際を遡上できていることも考えられた。

3.4 AFLPデータの再現性の検証

AFLPの再現性を検証するために、2009,2010年に採取されたエゾイワナ計96個体を他対象に、
①当時抽出したDNAを用いてLigation処理から全て再分析したもの、②2009年、2010年（分析は2011年）それぞれの分析時に使用したLigationサンプルを用い、Preselectiveのステップ以降を再分析したもの、③当時の分析サンプルを再度同じプレートで分析したものの、の3段階について比較した(図-6)。

③では2009年と2010年の分析結果に明瞭な違いが見られ、本研究で取り扱っている遺伝的距離と比較して、本手法の再現性（誤差）が大きく、結果に影響を与えて

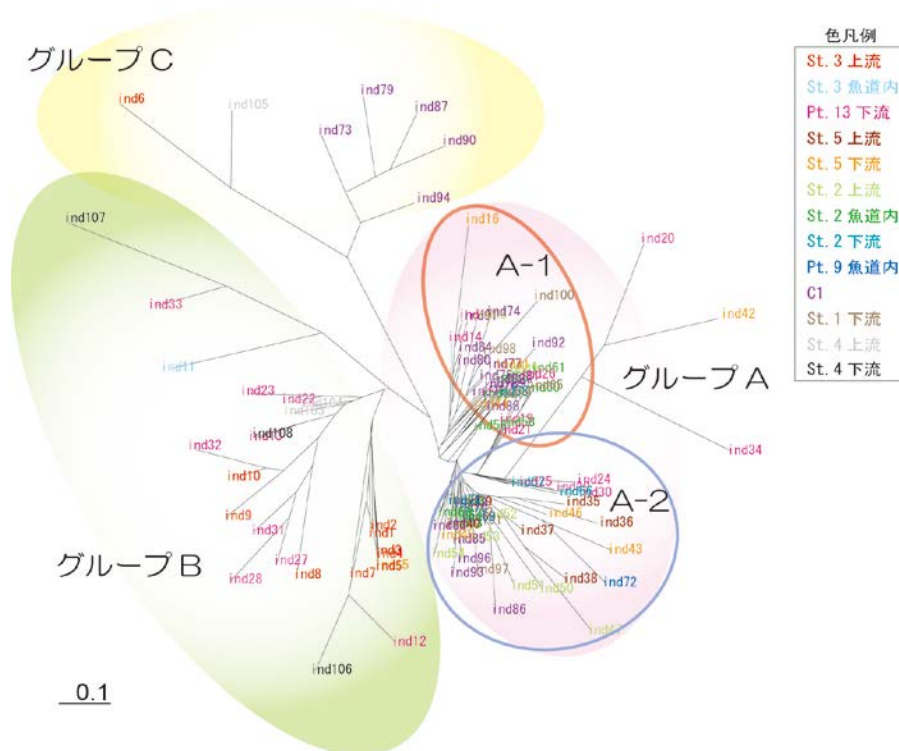


図-3 エゾイワナの個体間遺伝的距離にみられる集団内小グループ

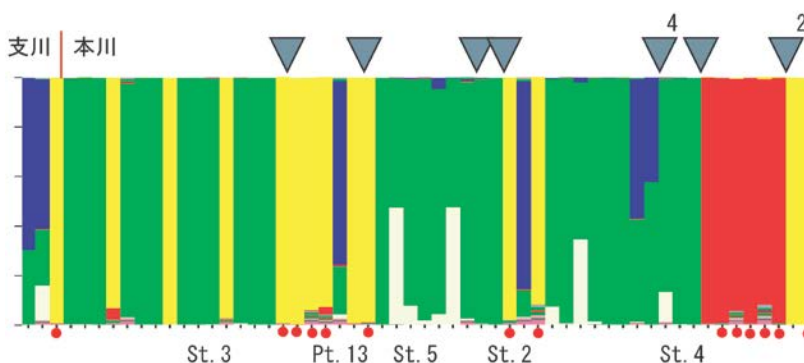


図-4 2010年に採取されたエゾイワナ・ヤマメの遺伝子構造

左右は堰堤の上下流の位置を示し、右側が上流。各個体の下の赤丸は現地でヤマメと判断された個体を示す。図上部の▼印はその上下流に堰堤があることを示すと共に、▼上の数字はその区間内の堰堤の数(複数の場合のみ)を表す。



写真-1 魚道周辺の河岸状況

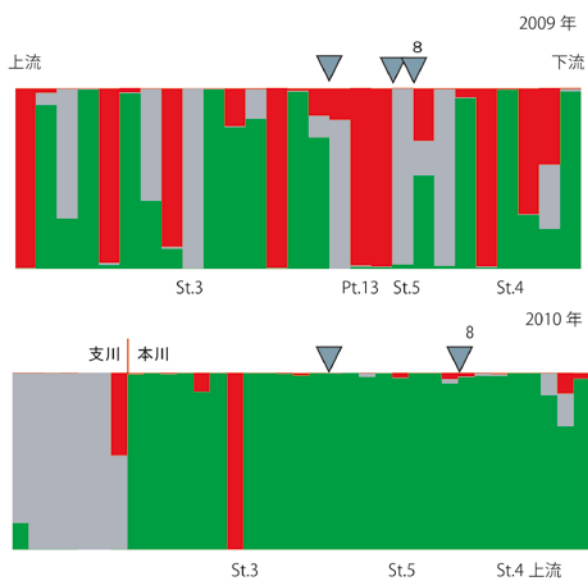


図-5 ハナカジカの遺伝子構造

いると考えられた。この傾向は②ではほとんどみられない。比較しているのが1集団2回の結果であるため、今後のさらなる検証が必要であるが、当該地区のように限られた生息域に対して AFLP を適用する場合は、手法の再現性への配慮が必要と考えられる。

4. まとめ

本研究においても AFLP とベイズ推定法による個体の帰属性解析を組み合わせることにより、このような近接した集団間においても遺伝的な差異を検出することができ、さらにこれを用いた要素解析により、本河川におけるエゾイワナ、カジカの集団構造と堰堤の関係を比較することができた。このうちエゾイワナでは一部の堰堤において交流の頻度が小さい状況があることが推察された。一方ハナカジカでは、本川の広い範囲においてこのような状況はみられなかった。エゾイワナ・ヤマメと比べて魚道の遡上能力が低く、また移動範囲も狭いと考えられるカジカにおいて、堰堤の上下流の違いが検出されなかったのは、本排水路は土水路であり、降雨時などに植生もある河岸の水際を遡上できていることも考えられる。

以上、これまで困難であった魚道の評価に遺伝情報を展開できる可能性が示された。一方で、情報の正確さを高めるためには長期的な調査が必要となるが、その際には分析結果の再現性などにも配慮した考察や場合によっては過年度サンプルの再分析が必要と考えられる。

参考文献

- 1) 環境省：レッドデータブック汽水淡水魚編，平成 15 年 5 月
- 2) Laboratoire d' Ecologie végétale et Biogéochimie,

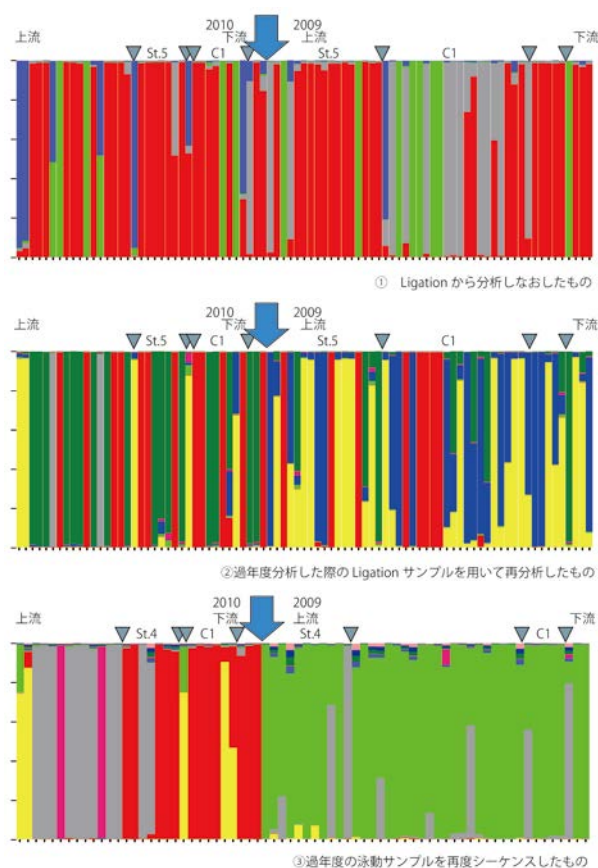


図- 6 AFLP の再現性の比較

ULB-Campus de la plaine CP244 C5 oulevard du Triomphe, B-1050 Bruxelles

3) Vekemans X., T. Beauwens, M. Lemaire and I. Roldan-Ruiz, 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*, 11, 139-151.

4) Version 3.68, August, 2008 by Joseph Felsenstein Department of Genome Sciences and Department of Biology University of Washington

5) Department of Human Genetics University of Chicago and Department of Statistics University of Oxford, USA

APPLICATION OF MOLECULAR BIOLOGICAL METHOD ON ASSESSMENT OF RIVER

Budgeted : Grants for operating expenses

General account

Research Period : FY2011-2015

Research Team : Water Environment Research
Group(River Environment)

Author : MIWA Junji

MURAOKA Keiko

Abstract : In Japan, many fishways have been designed and constructed on facilities which impede the movement of fishes, to facilitate their migration. Although the numbers of fishes migrating across fishways have been examined to evaluate fishways, such data is insufficient to verify the functions of fishways, because the number of migrating fish required in the ecosystem is not known. In this study, the objective of a fishway was defined as “preservation of the local population of fishes”, and the molecular biological method was used to evaluate fishways. Only three natural species of fish, White spotted char (*Salvelinus leucomaenis leucomaenis*), Wrinklehead sculpin (*Cottus nozawae*) and Stone loach (*Barbatula barbatula*), and one terminator species, Seema (*Oncorhynchus masou masou*), were found in a small drainage channel in Hokkaido along which there are 14 weirs over a 6-km length of the channel. Fin samples from 250 individuals of these species were collected over two years and preserved in 95% ethyl alcohol until DNA extraction using a phenol-chloroform extraction protocol after proteolysis by Proteinase K. The amplified fragment length polymorphisms (AFLP) method was applied. To estimate the genetic differentiation between populations in each area and between different generations, the genetic diversity and population genetic structure were estimated using AFLP SURV1, 2 and STRUCTURE3. The Phylip software package4 was used to generate a minimum spanning tree. The genetic structures of each species were similar throughout the river; only white spotted char showed some differences. It is suggested that this difference is not significant for the local population of White spotted char, because the difference disappeared after flooding. Furthermore, population differences between the dredge channel and branch could be detected for Wrinklehead sculpin and White spotted char. These results show that the molecular biological method can be used to evaluate fish migration, especially across fishways.

Key words : AFLP, Fishway, Evaluation, Sculpin, Char