

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：萱場祐一、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しているものであり、昨年度は魚道の評価に遺伝情報が適用できることを試験区間において明らかとするとともに、実用化のためには分析の再現性等について検証が必要であることを示した。

これらの結果を踏まえ今年度より、実際の直轄河川の規模において”魚類の移動環境の評価”を行う際の各種課題を整理することを目的に、民間コンサルタント 3 社との共同研究を開始した。また、再現性の高い分析手法の開発を進めた。

キーワード：AFLP、魚道、評価、マイクロサテライト、次世代シーケンサー

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、河川の上下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。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が対象となっている。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。土木研究所のこれまでの調査では、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、堰堤上下流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、

魚類の集団構造と堰堤の関係を比較することができた。一方で、本研究で使用した AFLP 解析手法は、マーカーが未知の魚種に対しても比較的容易に適用可能であるものの、同一水系内の隣接地点に分布する魚種間の比較においては本手法の再現性が影響を及ぼす可能性があることが示された。

遺伝情報の分析・解析技術は急速に発展しており、さまざまな分野において実用化がなされている。生物学の分野においても、種間や地域間、あるいは個体間において遺伝情報が異なる部位を利用し、当該種の分布域の調



図-1 調査対象地（太田川水系太田川）

査や個体数管理など、具体的な保全策にも活用されている。河川環境分野では、魚類や植物の“遺伝子”に関わる地先の具体的な課題を解決しようとする調査事例がある。しかしながら、実際の流域スケールにおいて同様の調査を適用する場合、目的に応じた適切なサンプリング計画（魚種・地点の選定、調査時期・頻度等）、分析計画（解析手法・分析手法）、組み合わせる環境情報の種類など、まだ未解明な部分も多いのが実情である。そこで、平成 24 年度から 3 カ年の計画で本民間コンサルタント会社 3 社（㈱建設環境研究所・㈱建設技術研究所・中電技術コンサルタント㈱）と土木研究所との共同研究を開始した。本共同研究では、太田川水系の直轄区間のスケールにおいて、遺伝情報を用いた魚道の評価を試み、実用化にあたっての問題点を精査しようとするものである。

また、遺伝的距離の近い集団を比較することを可能とするために、AFLP 解析手法と同様に隣接した小集団間の遺伝的な差異を検出可能であるとともに、AFLP 解析手法よりも再現性の高いマイクロサテライト手法のマーカーの開発を試みた。

2. 材料と方法

2. 1 調査地点の概要

共同研究の対象とした太田川は、流域面積 1,710Km²、流路延長 103Km の一級河川で、直轄区間の最上流には平成 13 年に竣工された温井ダムが位置する。本河川は、国土交通省が平成 3 年より実施した「魚ののぼりやすい川づくり」の一次指定モデル河川に選定され、直轄区間における 12 基の河道横断施設のうち、落差が 0.3m 未満の施設を除く 10 基には全て魚道が整備されている。このうち、13.6K に設置されている高瀬堰では、平成 24 年度より、底生魚等の遡上環境を改善するために既設開門の運用方法の見直しを行っている。

本共同研究では、国土交通省中国地方整備局太田川河川事務所の協力を得ながら、①堰堤の魚道改善効果のモニタリングへの遺伝情報の活用、②複数の堰堤を対象とした、魚類移動環境調査への遺伝情報の活用の 2 課題について検討を行った。

2. 2 サンプリング

①堰堤の魚道改善効果のモニタリングへの、遺伝情報の活用（テーマ①）

魚道改善などの事業評価のために、事前・事後の何らかの値をもとに効果の有無を比較する方法がある。本課題では、高瀬堰の魚道運用改善の評価のために遺伝情報を適用することを試みた。しかしながら、本堰堤の運

用改善は、本研究の初年度にあたる平成 24 年度より実施されているため、本課題では世代間の遺伝情報を比較することにより、これを補うことを試みた。高瀬堰周辺に広く分布することが確認され、また複数年の寿命をもつ魚類のなかから、カワムツを選定し、事前の現地踏査により、高瀬堰上下流の中からカワムツの分布状況を考慮して 5 地点を抽出した。調査は、魚道運用改善後の春（H24）に生まれた稚魚と、それ以前に生まれた同種を容易に分別できる時期となる 7 月に設定した。

②複数の堰堤を対象とした、魚類移動環境調査への遺伝情報の活用（テーマ②）

魚道の設置目的を、「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ているか」と考えることができ、堰堤の上下流に分布する同種の集団間における遺伝的差異の有無により、機能が不十分な魚道の抽出を行うことができる。そこで、本課題では、太田川の直轄区間に広く分布する魚種の地点間の遺伝情報を比較し、その遺伝子構造を比較することとした。水辺の国勢調査の情報をもとに太田川の広い範囲に分布する魚種を拾い上げ、魚道の遡上能力に劣るといわれる底生魚（カマツカ、カワヨシノボリ）および一般的な遊泳魚（カワムツ、ウグイ、ムギツク）を想定した。さらに、事前踏査の結果、移動環境に課題を有する可能性のある区間（複数の堰が存在する場合もある）を選定した。それぞれの地点の集団を代表させるために必要な 10～20 個体以上/地点を確実にサンプリングできるよう、投網および潜水によりサンプリングを併用することとし、調査区間において投網の使用が可能となる 9 月下旬に調査を実施した。

2. 3 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、テーマ①では、Eco ACA-Mse I CTG(以下同じ)、AGG-CAG, AAC-CAC の計 3 通りのプライマー組み合わせ、テーマ②では AAC-CAA, 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。

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、①カワムツ 114 個体の集団に

対して 261allele、②ではカワムツ 98 個体に対して 593allele、カワヨシノボリ 77 個体に対して 530allele 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. 概略検討の結果および課題

本地域の一次分析として、テーマ①においては 1 地点あたり 30 個体を分析対象とし 5 地点において、②においては 1 地点あたり 10 個体を分析対象とし、10 地点において分析した。

テーマ①のカワムツにおいては、地点間の集団構造に遺伝的な差異があるものの、高瀬堰上下流での差異は検出されず、世代間の遺伝情報の比較を行うことができなかった。極めて隣接し、かつ放流量も多い高瀬堰上下流においては、流れを通じて上流から下流への個体の移動が常に想定されることから、遺伝的な差異があったとしても極めて微小である可能性が考えられた。

テーマ②のカワムツの集団系統樹は、2 つのグループに分けることができるものの、集団構造には違いが見られなかった。一方、カワヨシノボリでは、遺伝子構造は、緩やかに上流と下流に分かれる結果を示した。

これらの結果から、遺伝情報を用いた調査の実用化にあたり、以下の課題が抽出された。

① 高瀬堰堰堤上下流のように、比較しようとする集団同士の遺伝的差異が小さい場合には、プライマー数を増やす、あるいは低いピークも分析対象とするなどし、対象 allele を増やす必要がある。しかしながら、前者では費用面での、後者では再現性の面での問題があることから、双方の観点から最適な組み合わせについて検討する必要がある。

② テーマ②のカワヨシノボリの結果では、移動環境に問題を有する可能性のある堰堤が抽出されるとともに、解析対象とする集団を分けることにより、その次のレベルの移動環境についても比較することができた。このことは移動環境の有無の確認だけでなく、改善する際の順位付け等にも遺伝情報が適用できる可能性を示した。一方で、カワムツでは差異の現れ方が異なっており、分析対象魚種の選定が大きな課題であると考えられる。今後分析対象魚種数を増やしていくとともに、魚種の遊泳能力や生活史、物理環境情報との関係等についても検討を行っていく必要がある。

③カワヨシノボリを対象としたテーマ②では、各地点のサンプル数 10 個体でも結果を得ることができた。一般には、もっと多くのサンプルを分析することが多いが、総分析サンプル数 (=分析費用) を抑えるためには、目的に応じてサンプル数・地点を選びながら少量ずつ分析することが有効と考えられる。今後、事例を増やしつつ経済的な計画方法について検討を行う必要がある。

さらに、過年度に指摘されている、分析の再現性、得られた現象の普遍性 (毎年同じ状況であるか、年変動を伴うのか)、得られた遺伝的差異のレベルをどのように判断するのか、といった点についても引き続き検討する必要がある。

4. 再現性を高めるための手法の検討

昨年度に引き続き、本研究においては、遺伝子を用いて、機能が不十分な可能性のある魚道の抽出や、改善の効果を評価しようとしている。これは、堰堤を挟んだ上下流の集団が、互いにその個体数や繁殖状況に応じて必要となる頻度で上下流間の個体の交流が保たれているかを抽出しようとするものである。違いを検出しようとする集団が、もともと同一集団であること、河川の上下流の間では、出水時などに上流から下流へと魚が移動することから、魚道評価のためには近縁の個体間の遺伝的な違いを検出できる必要がある。

人間や競走馬、犬などのにおいては、このような血縁間の遺伝的な違いも検出できる方法として、核 DNA を対象としたマイクロサテライトや SNP など複数の手法が実用化されている。これら、実用化に至っている手法の多くは、対象とする事象に対して十分な再現性を有することが必要である。一方で、これらの手法は開発までに時間を要するため、既に手法が確立していない (マーカーの無い) 種に対して適用する場合には、準備に多くの労力を要する。

本共同研究および昨年度までの調査においては、既往の研究事例において堰堤上下流の集団間においても遺伝的な差異を検出できることが既に確かめられている AFLP 解析を用いた。AFLP 解析は、核 DNA 上に 100 ~ 数 100 のターゲットを探し、比較するもので、対象生物の詳細な遺伝情報がわかっていない場合でも適用が可能な手法である。これまでの検討を通じ、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、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た。一方で、実河川のスケールにおいて、より小さな差異を検出しようとしたときに、集団内の差異

に対して再現性が問題となることが、本研究において指摘された。

そこで、再現性が高いとされるマイクロサテライトマーカーを、近年比較的安価に利用できるようになってきた次世代シーケンサーのデータを用いて簡便に開発することを試みた。使用したサンプルは、本研究課題を通じて対象としている河川性のカジカ 1 個体である。QIAGEN 社製 Dneasy Blood & Tissue Kit DNA により抽出・精製した DNA に対し、数百 bp 程度となるよう、サンプルを物理的に断片化し、DNA 二本鎖 DNA の両末端にアダプターを付加し、シーケンスの鑄型となる DNA ライブラリーを作成した。さらに、断片化されたサンプルを Roche 454 GS FLX Titanium を用いてシーケンスを行い、シーケンサー付属のソフトウェアにより塩基配列（リード配列）を得た。解析は 16 万リード相当（1/4 プレート）を行った。これにより、500bp 以上の Contig Metrics が 468（計 467,467bp）、100bp 以上の Contig Metrics が 1,379（計 719,748bp）を得ることができた。

300bp 以上の配列 700 本に対して、日立ソフト社製 DNASIS[®] Pro Ver3 により配列中の 12-20bp のタンデムリピート検索を行い、抽出されたリピート領域の分布状況および配列情報からマイクロサテライト領域を抽出した。検索の結果、116 箇所のマイクロサテライト領域を抽出できた。尚、300bp 以下の配列からはマイクロサテライト領域の情報はほとんど得られなかった。

得られた領域が本集団内において多型を有するかについては、平成 25 年度にかけて検討を行っているところである。

4. まとめ

実河川の大きなスケールにおいても、昨年度の農業排水路を対象とした実験結果と同様、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、本河川におけるカワヨシノボリの移動環境に関する情報を得ることができた。一方、カワムツでは、集団系統樹では差異が得られるものの、構造解析では顕著な差異はみられなかった。同じ区間であっても、移動・交流状況には魚種の移動能力・特性や生活史などの影響を受けているためと考えられ、今後の実用化のためには他の魚種や新たな地点を設定することにより、引き続き情報を積み重ねていく必要がある。

また、再現性や、異なる機器で分析した結果を同列で精度よく比較するための手法など、マイクロサテライトとも併用しながら引き続き検討を行っていく必要がある。

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, 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

Budget : Grants for operating expenses

General account

Research Period : FY2011-2015

Research Team : Water Environment Research
Group(River Environment)

Author : KAYABA Yuichi

MURAOKA Keiko

Abstract :

Key words : AFLP, Fishway, Evaluation,

The joint research with three private sector consultancies started this year in order to organize various challenges to the “evaluation of fish migration environments” on the scale of an actual government-managed river. As a result of the study, as in the results of tests of agricultural drainage channels done last year, it is possible to detect genetic differences between populations which are in such close contact by combining attribute analyses of individual organisms based on AFLP and the Bayesian estimation method in the large actual river scale, and it was also possible to obtain information about the migration environment of freshwater goby (*Rhinogobius flumineus*) in the main river based on element analysis using this analysis method. In the case of dark chub (*Nipponocypris temminckii*) on the other hand, although differences in the population genealogical tree were found, structural analysis revealed no remarkable differences. Assuming that these results are, even in one section, a consequence of the state of their migration and interactions being impacted by the migration capability, characteristics, and life history of the fish species, for future practical application, it will be necessary to continue to accumulate new information by setting other fish species and new locations.