

# 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平成 24 年度から 3 カ年間、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 社との共同研究を行っている。さらに、平成 25 年度は、遺伝情報を用い、外来種であるハリエンジュの供給源の推定を試みた。

キーワード：AFLP、マイクロサテライト、ハリエンジュ、高水敷樹林化

## 1. はじめに

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、遺伝情報の活用を目指し、平成 25 年度は、外来種の繁殖状況の推定のための適用を試み見た。近年、日本の多くの河川において河道内に樹木が繁茂し樹林が形成される樹林化が進行している。河道内の樹林は出水時に洪水を安全に流下させる妨げや流木発生の一因でもあり、また出水かく乱に適応した河川固有の生物種の減少につながるなど、治水安全上・生態系保全上双方において問題となっている。河川管理者らは、河道内樹木を伐採・除根するなどの管理を行っているが、再び樹林化することも少なくない。本研究で対象としたハリエンジュ（ニセアカシア *Robinia pseudoacacia*）は、北アメリ

カ原産の落葉高木で、外来種でもある。外来種である本種は種子からの繁殖だけでなく、株や根、枝などから萌芽する特性をもつ。そのため、出水時などに上流から種子や枝・根などの形で流下してきたものが定着し、拡大していると考えられるものもあり、樹林化が問題となっているエリアだけでなく、上流域における主たる供給源の当該樹種に対しても適切な措置をおこなうことにより、下流域の樹林化の速度を低減できる可能性がある。そこで、本研究では遺伝情報を用いて流域内におけるハリエンジュの動向を推定することを試みた。ここに、ハリエンジュが外来種であること、株や枝などから萌芽するクローンが存在すること、対象地域が同一水系内という限られた範囲であることから、対象とする集団内の遺伝的差異が小さいことが想定されたため、分析においてはマイクロサテライト解析および AFLP 解析の双方を用い比較した。

また、本研究では平成 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（株建設環境研究所・株建設技術研究所・中電技術コンサルタント株）と土木研究所との共同研究を行っている。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。平成 25 年度は、図-1 に示す範囲において、初年度の結果を踏まえながらサンプリン



図-1 調査対象地 (太田川水系太田川)

グ・分析を行った。また、分析にあたっての留意点等を随時まとめながら、手引きの素案を作成した。

## 2. 材料と方法

### 2.1 調査地点およびサンプリング

本研究では、長野県を流れる一級河川天竜川本川約50Kmの区間の2地点およびそこにつながる7支川、計9地点において、2011年11月にサンプリングを行った(図-2)。なるべく隣接しない個体を選定し、各地点30サンプルについて葉のついた枝を採取し、冷蔵状態で実験室に持ち帰り-80℃にて冷凍保存した。DNA抽出にはQiagen社製DNeasy Plant Mini Kitを用いた。また、アウトグループとして、岐阜県内の木曾川において7サンプル、土木研究所敷地内(茨城県つくば市)において8サンプルを採取した。

### 2.2 マイクロサテライト解析

本研究ではLian<sup>1</sup>らの方法に従い、A~F地点の172個体6領域についてマイクロサテライト情報を取得し、1セット(3プライマーペア×2回)のPCRにより145サンプルに対して有効なデータを得た。分析の結果、6領域において最大186Alleleが検出された。これより地点間の遺伝的距離をGenepop ver4.2<sup>2,3)</sup>によって求め、PHYLIP Version 3.68<sup>4)</sup>によって系統樹を作成した。また、Structure<sup>5)</sup>による個体の帰属性解析を行った。

### 2.3 AFLP解析

AFLP解析はABI社製AFLP®Ligation and Preselective Amplification Module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

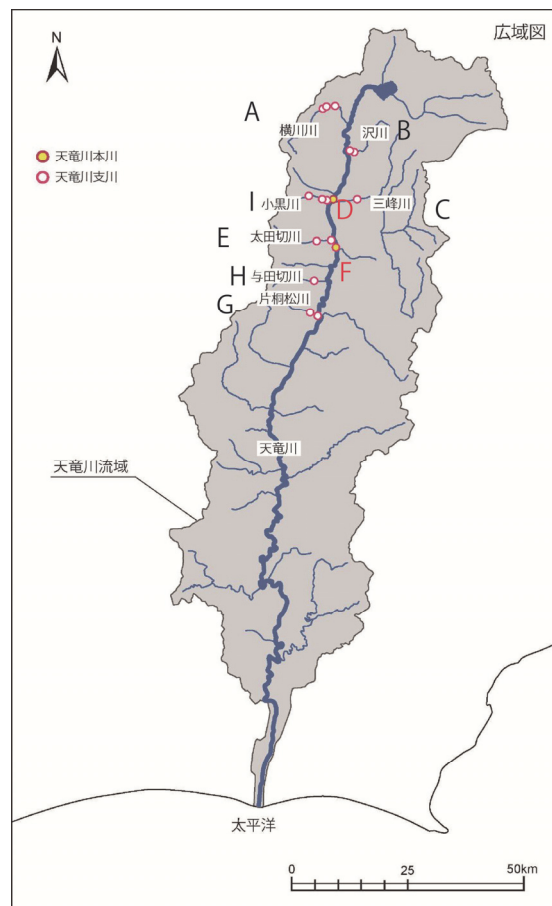


図-2 サンプリング地点

よび無標識のMSE-Iプライマーを組み合わせ、ハリエンジュに対して、EcoACT-MseI-CAT, (同)AAC-CAA, (同)ACG-CTCの計3通りのプライマー組み合わせにより分析を行った。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結果、2組のプライマーペアから計195Allele (EcoACT-MseI-CAT 73Allele, AAC-CAA122Allele)が検出された。得られたAFLPデータから、AFLP SURV<sup>6)</sup>を用いて各地点間、個体間の遺伝的距離を求め、PHYLIP Version 3.68によって系統樹を作成した。また、Structureによる個体の帰属性解析を行った。分析は、得られた全サンプリングを3つの96wellプレートにて実施し、1セット(2プライマーペア)のSelectiv PCRにより、168サンプルについて有効

## 3. 結果

### 3.1 分析方法の比較

筆者らは、これまでの検討により、遺伝的差異が極めて小さい集団に対して AFLP を適用する場合、分析の再現性が影響を与えることを示してきた<sup>7)</sup>。今回のケースにおいても同様に、Structure による解析結果において、Plate1 と Plate2,3 の間に明瞭な差が表れた。複数回の泳動結果の比較から、この差異は Ligation もしくは Preselectiv PCR のステップに起因するとともに、試薬類の影響ではないと考えられるものの、原因は特定できなかった。以降の比較・分析はこの再現性の影響がない Plate1, Plate2,3 に分けて実施することとした。

マイクロサテライト手法では、6 領域についてそれぞれ 5, 12, 8, 18, 8, 6 Allele を得るとともに、1 塩基違いの Allele を複数含む領域が 2 つみられた。これらの結果から、本流域のハリエンジュに対して、マイクロサテライトを適用できると考えられた。

得られたデータをもとに、AFLP、マイクロサテライトそれぞれについて得られた地点間の遺伝的距離の関係は同様の結果を示した(図-3)。また、アウトグループである 2 つの地点も天竜川流域の地点の間に混在する結果を示しており、当該種が人為的に広く拡大されてきたことを追認させる結果となった。

### 3. 2 マイクロサテライト情報に基づく検討

マイクロサテライトの 144 サンプルのうち、43 サンプル (14 個体) の遺伝情報が地点内において一致し、こ

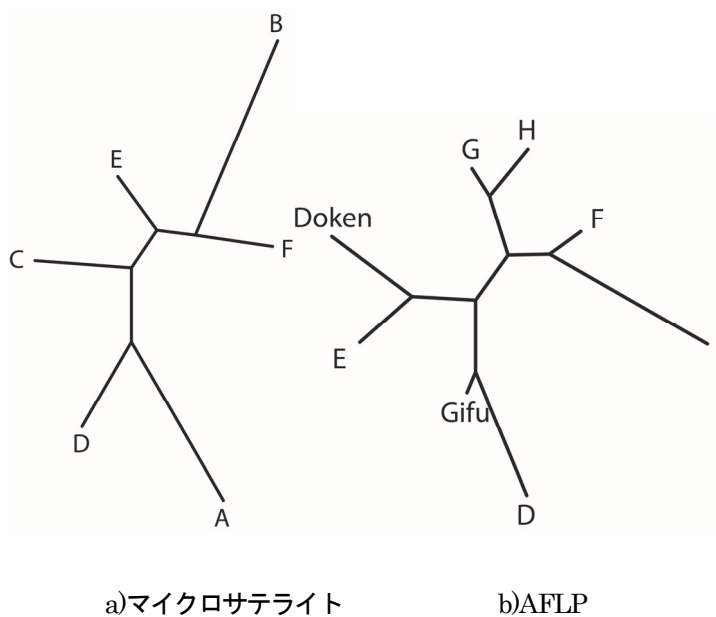


図-3 遺伝情報に基づく各地点の遺伝的距離

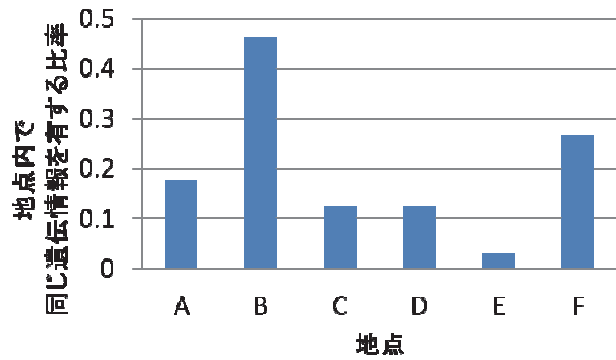


図-4 各地点内で同じ遺伝情報を有する比率

れらが地点内における同一個体あるいはクローンであると考えられた。その比率は地点によってばらつきが大きく、支川 B では半数が同じ遺伝情報を有していた(図-4)。本川では、下流に位置する地点 F の率が上流の D の倍の値を示した。サンプリング地点の物理環境・サンプリング数の適正化等の追加検討を行う必要があるものの、各地点の繁殖のしやすさを推定する目安とし利用できる可能性がある。尚、AFLP の場合には”同一の遺伝情報”の指標として Structure 計算により得られる各要素の比率を用いることにより、マイクロサテライトに準じる結果を推定可能と考えられる。

地点内で同一の遺伝情報を有するデータを削除した後、地点間の遺伝的距離を再度計算した結果を図-5 に示す。本川 D・F とともに、他の地点に比較して上流の支川 B から遠い関係を示した。

同一支川内の Sub 地点間と本川地点の比較(支川 B-本川 D, 支川 E-本川 F) では、いずれも支川上流域では上下流の地理的環境を反映させる結果を示したが、下流域では本川と絡み合う結果となった。上流域では他の地域からの種子等の移入が少なく流下により拡散するが、下流域では上流域からだけでなく他からの侵入がある可能性がしめされた。

### 4. 河川事業への遺伝情報活用を目指した共同研究

平成 25 年度のサンプリングは、土木研究所および共同研究参画 3 社の協力のもと、①昨年度の分析結果の追認、②堰堤の無い区間や分断された地点を含めた総合的な評価、③他魚種における移動環境の評価 を目的に平成 25 年 9 ~10 月にかけて実施された。本調査ではカワム

ツ・カワヨシノボリの他、9種のサンプルを得た。これらのサンプルは、順次分析されるとともに、引き続き本研究課題においても分析される予定である。本共同研究の取り組みの経過は、積極的な学会活動を通じて、官・民・学の意見や助言を得ることにより、より適用性の高いものとなるよう努力を行っている。

## 5. 考察

本研究により、同一流域ないしにおけるハリエンジュに対してマイクロサテライト分析により得られる情報を用いることにより、繁殖や拡散に関するいくつかの仮説を設定できた。今後、追加調査・分析や流域や地点の特性、人為的要因等を含めて精査をしていくことにより、河川内の樹林管理に資することができると考えられる。また、今回の調査対象とした天竜川においては、ハリエンジュに対してマイクロサテライトによる多型が得られたが、他の水系においてどの程度の多型が得られるかは不明である。AFLP分析手法については、再現性等においていくつかの課題はあるものの、マイクロサテライトに準じるデータをどの程度得られるものであるか、引き続き比較検討を予定している。

## 参考文献

- 1) Lian, C., Hogetsu, T., Development of microsatellite markers in black locust (*Robinia pseudoacacia*) using a dual-suppression-PCR technique C. LIAN and T. HOGETSU, *Molecular Ecology Notes* (2002), 2, 211-213
- 2) Raymond M. & Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86:248-249
- 3) Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources* 8: 103-106. Laboratoire d'Ecologie végétale et Biogéochimie, ULB-Campus de la plaine CP244 C5 oulevard du Triomphe, B-1050 Bruxelles
- 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
- 6) 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.
- 7) 村岡敬子, 篠塚由美 et.al. AFLP を用いた魚類の移動環境評価の試み, DNA 多型 Vol.20, 132-137

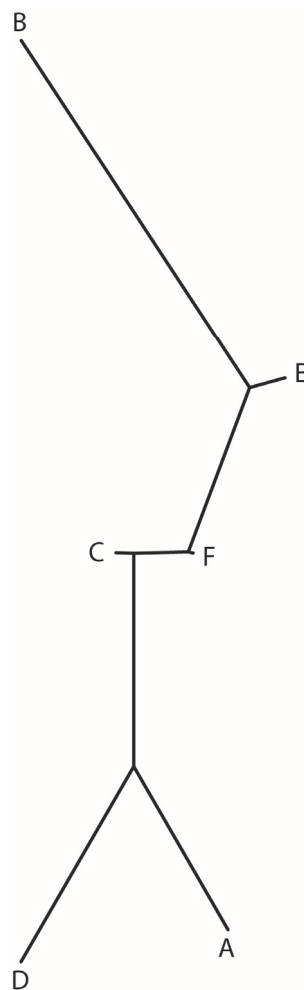


図-5 各地点同じ胃炎情報を有するサンプルを除いた、マイクロサテライト情報に基づく各地点の遺伝的距離

# 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** : KAYABA Yuichi

MURAOKA Keiko

## **Abstract** :

The woody vegetation on floodplains poses several problems for river management, such as flood control, in Japan. Willow, bamboo, and black locust trees are dominant species, which proliferate with high reproductive abilities in river environments. Therefore river administrators need to establish methods to limit the spread of riparian forests in order to maintain sufficient river flow capacity to reduce the risk of flooding. On this study, Genetic information of *Robinia pseudoacacia* were compared through the river to estimate the main origin of supply of seeds or branches. Treatment of black locust trees was conducted in a forest 182 km from the mouth of the Tenryu River (Nagano Prefecture). The 30 leaves samples per sites were collected on 11 sites, and preserved in -80° 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 individuals were similar throughout the river, but several hypothesis of luxuriate are build.

**Key words** : AFLP, STR, *Robinia pseudoacacia*, woody vegetation on floodplain