

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、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方の把握と、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実施しているものである。本研究では平成 24 年度より年度に引き続き、魚類の移動環境の評価に遺伝情報を適用する技術を確立することを目的に、実際の直轄河川の規模において”民間コンサルタント 3 社との共同研究を実施しており、今年度は昨年度までの 2 年間に得られたデータを精査するとともに、データの再現性や経済性について比較検討を行った。また、昨年度に引き続き本研究のモデル魚種である淡水カジカについて、遺伝情報と既存の調査手法を組み合わせ、空間の生態的機能に関する調査を実施した。

キーワード：遺伝子、AFLP、DNA、魚類地域個体群、移動環境の評価

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つつある。河川環境分野においても、種間や地域間、あるいは個体間の遺伝的差異を用いて、当該種の分布域の調査や在来種と外来種との交配種の同定など、具体的な保全策立案のために遺伝情報を利用した事例が増えつつある。同一水系内に生息する淡水魚の場合には、水系という閉ざされた空間の中に分布する同一魚種の個体同士は交流の機会があるため、個体間の遺伝的な差異は極めて小さいと考えられる。このような集団を対象に遺伝情報を適用しようとする場合、親子間においても差異を検出できる、例えばマイクロサテライトのような検出感度の高い手法を用いる必要がある。

日本に自然分布する淡水魚は、115 種内外とされるが、必ずしもすべての魚種に検出感度の高いマーカーがあるわけではない。また、淡水魚はそれぞれの水系単位で長期間独立した集団を維持しているため、他水系の同種で開発されたマーカーが必ずしも利用できるわけではない。さらに、実際の流域スケールの調査において遺伝情報を適用しようとする場合、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（分析手法・解析手法）、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。

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（㈱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。今年度は、昨年度までの 2 年間に得られたデータを精査するとともに、データの再現性や経済性について比較検討を行った。また、本研究のモデル魚種である淡水カジカについて、遺伝情報と既存の調査手法を組み合わせ、空間の生態的機能に関する調査を実施した。

2. 魚類移動環境への遺伝情報の適用

2.1 調査の概要

本研究では、遺伝情報を用いた河川環境調査の実用化を念頭に、一級河川太田川水系をモデル河川として以下の 2 テーマを設定した^{1,2,3)}。

テーマ 1 単一堰堤における魚類の移動環境の評価

テーマ 2 河川縦断連続性を阻害している工作物の抽出

事前踏査の結果を踏まえ、テーマ 1 では太田川河口から 13.6km の地点にある高瀬堰周辺に着目し、堰上下流

の6kmの区間を調査範囲とした。テーマ2では国土交通省管理区間における10基の河川横断工作物が設置された区間(約20km)、堰堤が無い区間(約30km)および複数のダムの上流で魚類の移動が50年以上無いことが想定される1地点を調査対象とした。これらのテーマは、河川環境調査の実務に携わる民間コンサルタント会社3社との共同研究調査において実施し、計画から解析までの一連の作業を連携して行うとともに、相互に情報を共有しながら問題点の精査を行った。また、データの再現性を検証するために、同じサンプルを土木研究所において分析し、クロスチェックを行った。

また、2005年度から継続的にサンプリングしている九州内における淡水カジカを対象に、サンプルの経年劣化による分析結果への影響について検討を行った。あわせて、淡水カジカの分布域南限付近に分布する本カジカ集団が、空間をどのように利用しているのか遺伝情報と物理環境を組み合わせた継続調査を実施した。

2.2 DNAの抽出および分析方法

各調査において魚類を捕獲した後、個体のヒレの一部を切除し、95%エタノールにて持ち帰った。DNAの抽出は、①Qiagen社製ProtenazeKによるたんぱく質分解処理の後フェノール・クロロホルム法、②QIAGEN社製Dneasy Blood & Tissue Kit、③DNA自動抽出装置のいずれかを実施した。分析法は、遺伝情報が未知の生物にも適用が容易で検出感度の高いAFLP解析を用い⁴⁾、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プライマーおよび無標識のMSE-Iプライマーを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-mapper[®](ver. 3)を用いた自動解析を行った。

2.3 サンプリング

魚類の移動能力は魚種によって異なることから、調査対象魚種は遊泳魚と底生魚双方を設定することとした。国土交通省が実施した水辺の国勢調査に基づく各魚種の分布情報や事前踏査の結果をもとに、調査対象区間に分布する魚種の中からテーマ1では遊泳魚としてオイカワ・カワムツを、底生魚としてカマツカを調査対象魚種として選定し、2012年8月、2013年9月にそれぞれ6

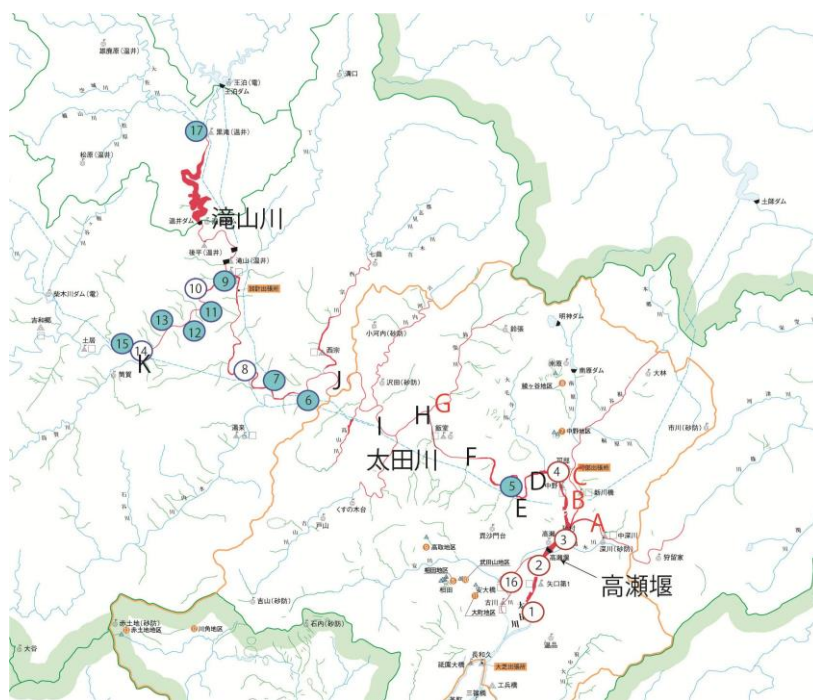


図-1 調査地点

地点においてサンプリングを行った。テーマ2においても同様に遊泳魚としてカワムツを、底生魚としてカワヨシノボリ・カマツカ・アカザを選定し、2012年9月に9地点、2013年9月に10地点においてサンプリングを実施した。尚、2回のサンプリングの間には、出水を経験している。

調査対象魚種や調査地点は事前踏査を踏まえて決定したものであったが、実際のサンプリングにおいては必ずしも計画通りにサンプリングを行う事ができなかった。双方のテーマにおいて対象魚種として設定したカマツカを必要数確保できなかった地点が多く、テーマ1では調査対象魚種から除外せざるを得なかった。生息場として砂地を好むカマツカが利用するハビタットは、太田川本川下流域においては支川等の流入部周辺等を中心に局所的に分布しており、これがサンプリングに影響したものと考えられた。

2.4 解析結果

2.4.1 単一堰堤における魚類の移動環境の評価(テーマ1)

Gene-mapperRにより得られたデータを用いて、2012、2013年に採取したカワムツのStructure6)による個体の帰属性解析を行った(図-2)。堰を挟んだ上下流において同じ色で示される同様の遺伝的要素が分布し、堰上下流における集団の交流はなされているものと判断された。一方、堰水域(地点3,4)と堰直下(地点2)および支川Cでは、共通する要素(図中ピンク色)が他の地点よりも

多く観察される結果となり、連続している地点間においても地先の物理場の違い等の影響を受けている可能性も考えられた。

2.4.2 河川縦断連続性を阻害している工作物の抽出(テーマ2)

テーマ1と同様に、2012、2013年に採取したカワムツ・カワヨシノボリのStructure[®]による個体の帰属性解析をそれぞれ行った。また、AFLP SURVにより、地点間の遺伝的距離を求めた。カワムツでは、複数のダムの上流にあたるSt. 17を除き2012年、2013年共に明瞭な差異を示す地点は観察されなかった。また、地点間の遺伝的距離は、カワムツではダム上流の地点を除き、いずれも0.1以下であった。これらのことから、カワムツでは複数の堰堤を通して、魚類の移動環境が確保されているものと考えられる。一方、遺伝的距離の値は小さいものの、いくつかの地点で遺伝的距離が他の地点と比べて大きい地点が観察された(図-5)。このうち、St. 9は調査時に魚道内に水が流れておらず、St. 12は魚道の一部が破損し流況が不安定な地点で合った。また、St. 8は落差が小さく魚道が無い堰堤であった。

カワヨシノボリの個体の帰属性解析結果では、2012年は明瞭な差異を検出できたものの、2013年には差異が観察されなかった。帰属性解析の結果を地点間としてみると、ダムより上流の地点を除き、下流から上流に向けて緩やかに変化した(図-3)。隣り合う地点間の遺伝的距離は、2012年と2013年が、双方合致する結果を示したものの、2012年には0.2を超える地点があったのに対し、2013年には0.04以下と減少していた。2012年と2013年の各地点のカワヨシノボリのヘテロ接合度を比較すると、地先の環境が変化したSt. 14以外の地点間では、ヘ

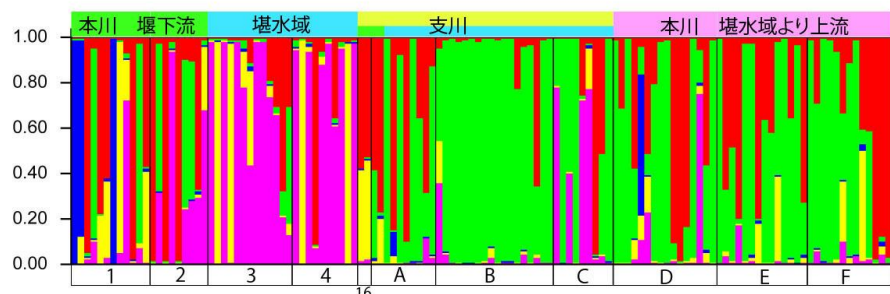


図-2 堰上下流におけるカワムツの個体別遺伝子構造(384well PCRによる結果)

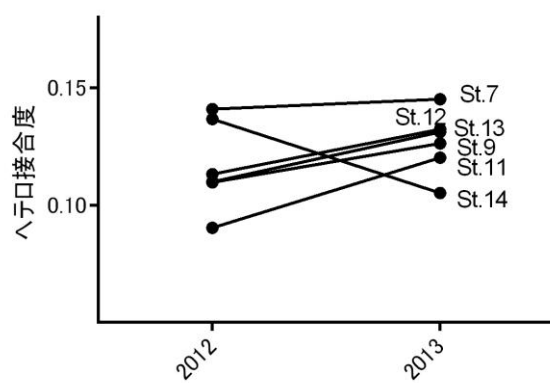


図-4 各地点のヘテロ接合度の変化(カワヨシノボリ)

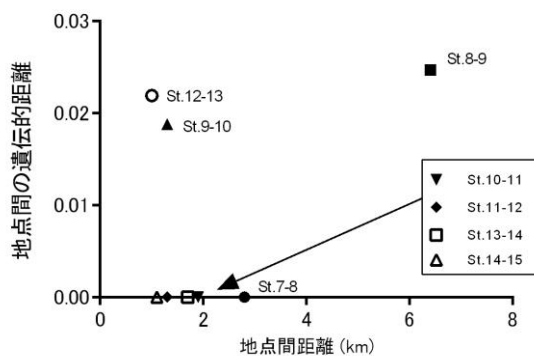


図-5 カワムツにおける地点間の遺伝的距離(2012) 各地点間には1基の堰堤が存在する

テロ接合度は2013年の方が大きくなった。カワヨシノボリはカワムツに比べて移動範囲が小さく、同祖集団が、堰堤で区切られた狭い範囲にとどまりやすいため、短期的に堰堤の影響が出やすい一方で、出水等により容易に回復しているのではないかと推察された。

生物学的にみれば極めて小さい地点間の差異においても、地点間の均質性に再現性のある差異＝地点間の移動環境に何らかの課題が推定される地点を反映しているのではないかと考えられた。

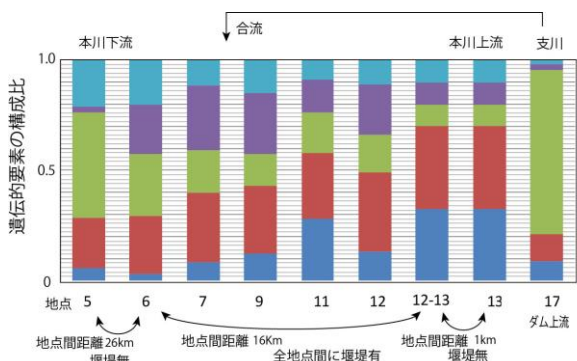


図-3 流程に沿ったカワヨシノボリの地点内遺伝子構造

3. 共同研究を通じて得られた、本技術の適用にあつ

ての留意点

3. 1 サンプルングにおける留意点

複数の地点においてまとまったサンプル数が必要となる遺伝子サンプルの採取にあたっては、調査対象域を主たる分布域とする魚種のなかから複数の魚種を想定するとともに、現地の流況や出水履歴などをにらみながら調査時期を設定する必要があると考えられる。

また、テーマ1における2012年のサンプルング調査時には、河川流量が少なく、カワムツの大きな個体が捕獲できなかった。小さい個体を用いた2012年の分析・解析の結果、連続する淡水域内においても地点間の遺伝子構造に大きな差異が観察された。2013年に再度同じ地点で、体長組成から複数世代のカワムツを選択し、サンプルングを行った結果、この差異は検出されなかった。2012年のサンプルング時には、何らかの影響で十分に分散していなかった支川の同胞集団を捕えた可能性も否定できなかった。このような問題を避けるために、直接の調査対象では無い場合であっても、魚の移動が想定される範囲を対象に、サンプルを確保しておく必要があると考えられた。また、経年的な調査が想定される場合には、個体の体長分布にも留意したサンプルングが必要といえる。

3. 2 分析における留意点

複数回の分析の結果、DNAの抽出方法やPCR装置が異なる場合であっても、同じサンプルを同じプライマーセットを用いて分析した場合の再現性が確認された。一方、本研究のように同一水系内の個体間の遺伝的差異を対象とする場合、個体間の遺伝的な差異は小さく、分析誤差が結果に影響することが既に報告されている⁵⁾。本研究においても、アカザを96wellプレート2枚に分けて分析を行った際、プレートの境目において顕著な差異が検出された。サンプル数が多く、1枚のプレートに収まらない場合には、各プレートに同一サンプルを用意し標準化を行うなどの配慮が必要と考えられた。また、分析の精度を上げることを目的にAllele毎にピークの有無を判断する方法を比較したが、Gene-mapper^Rによる自動解析の最適化を行った結果と大きな違いは見られなかった。

2005年から継続サンプルングしているカジカのサンプルでは、分析後7年間冷凍庫(-20℃)に保管していたDNAを再度AFLP法にて分析した際に、DNA抽出直後に得られた良好なピークが得られなかった。これらとは別種のサンプルの例ではマイクロサテライト法で分析した場合には9年間保存の後も、サンプル量を増やすことで対

応が可能であった。経年的なモニタリングが必要な場合や、劣化が心配されるサンプルと比較する必要がある場合には、他の方法も視野に入れて比較検討を行う必要がある。

4. まとめ

本研究により、短期的に回復する程度の違いではあるが、地点間の移動環境を遺伝情報により捉えることができると考えられた。遺伝情報を用いることにより、

同一水系内においても遺伝情報を用いた魚類の動態を評価することが可能である一方で、調査対象地域だけでなく、面的な河川の環境や地先の物理環境を加味した考察が必須である。本研究により、水系内の魚類集団という遺伝的に近い集団の動態を把握することを目的に、AFLP法を適用する際の留意点がサンプルング・分析・解析それぞれの段階において整理するとともに、サンプル数や調査対象エリアによっては適用が困難な場合があることが示された。

一方、淡水魚に必ずしもマイクロサテライトマーカーが無いことを考えると、マーカーが無い魚種に対しても簡便に適用できる手法について、引き続き検討を行っていく必要がある。

参考文献

- 1) 安形仁宏, 瀬口雄一, 安形 et.al : 事業に伴う河川環境調査における生物の遺伝情報活用に関する方向性～生物の遺伝情報を河川事業の影響評価へ活用する計画について～, ELR2012 発表講演要旨集, 2012
- 2) 増本育子, 山原康嗣 et.al : 河川事業の影響評価等における遺伝情報の活用化に向けた研究, 応用生態工学会第17回大会発表講演要旨集, 2013
- 2) 太田宗宏, 飛鳥川達郎 et.al : 河川事業の影響評価等における遺伝情報の活用化に向けた研究, 応用生態工学会第18回大会発表講演要旨集, 2014
- 4) S. Karudapuram et al : Identification of Hedysarum Varieties Using Amplified Fragment Length Polymorphism on a Capillary Electrophoresis System, Journal of Biomolecular Techniques 16:316-324, 2005
- 5) 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
- 6) 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 : KAYABA Yuichi

MURAOKA Keiko

Abstract : In this study, molecular methods were used to evaluate fish migration in the Ota River in Hiroshima, Japan. Study sites included a 55-km reach with 9 weirs and a 10-km reach of a tributary that had 3 dams. Although small differences were detected between populations upstream and downstream of several weirs, these patterns were not consistent between years. Genetic relationships between populations also revealed different patterns for each species. Based on these results, we concluded that both fish species migrate throughout the Ota River with no significant changes in population genetics. We also demonstrated that molecular techniques could be used to evaluate fish migration, particularly in rivers where fish passages have been constructed.

Key words : rotary snow removers, automatic steering