

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。本研究の達成目標は、①遺伝情報を用いた、魚類集団の水系内の空間利用実態調査技術の開発、②魚類等の利用実態に基づいた空間の生態的機能の解明と河川環境改善技術の提案、③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の提案の三点である。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た、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、地域個体群、移動環境

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(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。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た、空間の生態的機能に関する調査を実施した。

2. 調査の概要

2.1 魚類移動環境評価手法の開発

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。

- ・単一堰堤における魚類の移動環境の評価

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。

・河川縦断連続性を阻害している工作物の抽出

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。

いずれのテーマも、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 分布域南限域付近に生息する淡水カジカの調査

九州地方の本明川中流域のカジカ集団は、回遊性の中卵型でありながらも河川陸封個体群とされる。本カジカの生息域が、河川事業により受ける影響を回避するために、他の生息地への移殖実験が行われている。これまで本地域において、カジカの生息域が横断工作物により移動が阻害されていることを利用し、それぞれの地点のカジカ集団を仮想上の“地域集団”として扱い、生息環境を現地調査と遺伝情報を組み合わせて評価するための手法の開発を行ってきた。本研究では、引き続き本地域において、各地域の遺伝的な環境を調査するとともに、得られた情報と既往の調査手法を組み合わせた、空間の利用実態を調査した。

2. 3 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



図-1 太田川における調査地点

地点凡例 赤枠：2012、2013年に調査、青枠：2012年のみ調査、黄色：2013年のみ調査

社製 Dneasy Blood & Tissue Kit、③DNA 自動抽出装置の利用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、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。

3. 達成目標 1 遺伝情報を用いた、魚類集団の水系内の空間利用実態調査技術の開発

3. 1 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实

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。

また、テーマ1における2012年のサンプリング調査時には、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、サンプリングを行った結果、この差異は検出されなかった。2012年のサンプリング時には、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リ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。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、384well plateを活用する、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[®]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年から継続サンプリ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. 達成目標2 魚類等の利用実態に基づいた空間の生態的機能の解明と河川環境改善技術の提案

4. 1 単一堰堤における魚類の移動環境の評価

Gene-mapper[®]により得られた分析データを用いて、2012、2013年に採取したカワムツの地点間の遺伝的距離を求めた。高瀬堰を挟む本川の3地点(A, B, C)間の遺伝的距離は、いずれも0.10以下と小さい値を示すとともに、それぞれ連続する支川との遺伝的距離の値(A, B-D, C-E)と比較しても、十分に小さい値であった。また、5地点の遺伝的な関係(無根系統樹)は、地点の位置関係を反映するものとなった(図-2)。同様に、Structureによる個体の帰属性解析の結果においても、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するとともに、上下流に顕著な

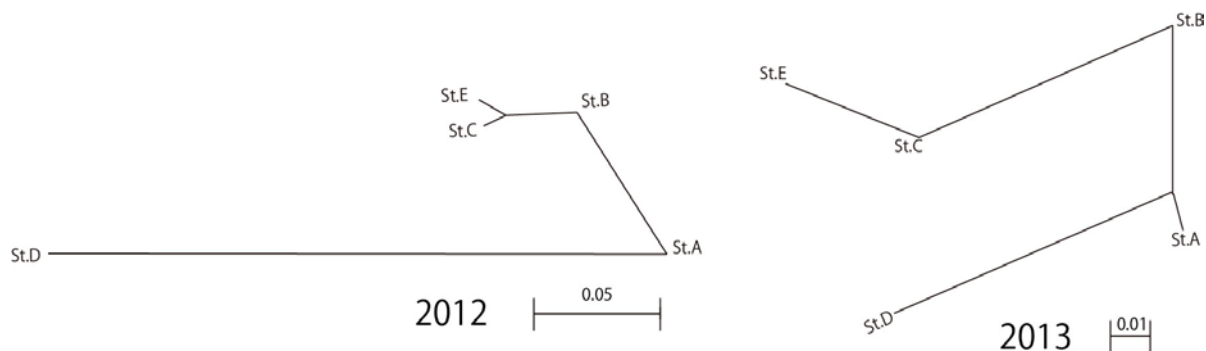


図-2 高瀬堰上下流におけるカワムツの遺伝的な関係

差異は観察されなかった。これらのことから、高瀬堰を挟んだ上下流において、カワムツの集団の交流はなされているものと考えられる。

4. 2 河川縦断連続性を阻害している工物の抽出

ここでは、2012、2013年に採取したカワムツ・カワヨシノボリ・アカザ・カマツカを対象に検討を行った。このうちカワムツのStructureによる個体の帰属性解析の結果では、複数のダムの上流にあたる St.12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、St.1からSt.11の区間において、魚類の移動環境が確保されているものと考えられる(図-3)。

カワヨシノボリの個体の帰属性解析結果では、2012年はSt.8前後に差異が検出されたが、2013年には観察されなかった。同様に、2012年には地点間の遺伝的距離が0.1を超える地点(地点間に10%以上の変異が認められる地点)がいくつか観察され、遺伝的に分化している状況が考えられたが、2013年には地点間の遺伝的距離はダムの上流であるSt.12を除き、全て0.1未満であった。2013年の地点間の帰属性解析の結果は、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。また、隣接する地点ながら、St.9とSt.8(魚道内)の遺伝子構造はほぼ一致しているのに対し、St.8とSt.8(魚道内)の遺伝子構造に差異がみられた。

2012年と2013年の各地点におけるカワヨシノボリのヘテロ接合度は、地先の環境が変化していたSt.10を除き2012年よりも2013年が高いとともに、有意な関連性が認められた。このことは、両年の間にカワヨシノボリの交流状況が、調査区間を通じて改善されたことが示唆された。カワヨシノボリはカワムツに比べ

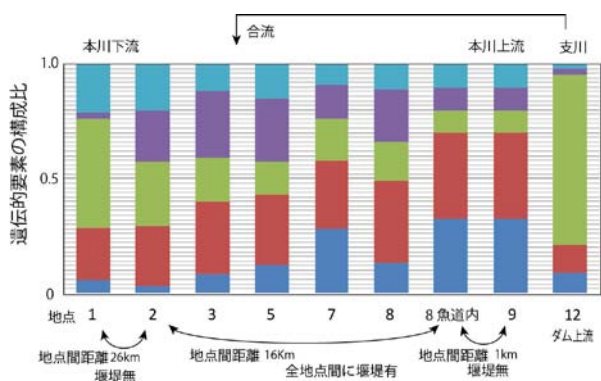


図-3 流程に沿ったカワヨシノボリの地点内遺伝子構造(2013)

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内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。

一方、カワムツ・カワヨシノボリ共に極めて小さい遺伝的距離ながら、隣接地点の遺伝的距離が他の地点と比べて大きい地点がいくつか観察された(図-4、5)。特に、2012年のカワヨシノボリの結果では、途中で堰堤の無いSt.1とSt.2の遺伝的距離は0であった。生物学的にみれば極めて小さい地点間の差異であるが、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。隣接地点の遺伝的距離が他の地点と比べて大きな地点、遺伝系統樹から他の地点と分岐している地点、帰属性解析の結果等を取りまとめ、総合的に移動環境を評価した結果、極めて小さい遺伝的距離であるものの、カワムツではSt.4、5、8が、カワヨシノボリではSt.3、7、8、9が要観察地点として抽出された。

抽出された地点の課題を現地の状況から推察すると、

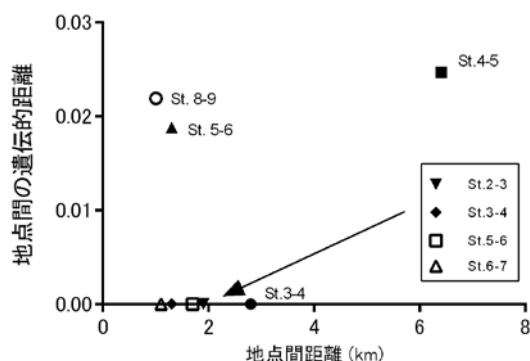


図-4 カワムツにおける地点間の遺伝的距離(2012) 各地点間には1基の堰堤が存在する

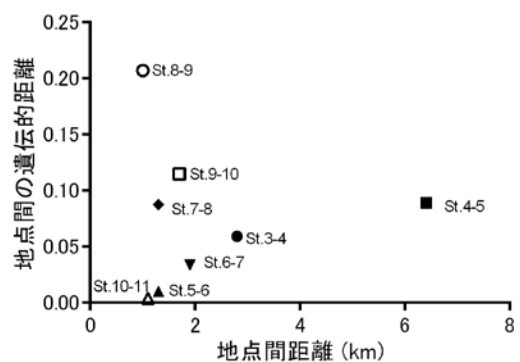


図-5 カワヨシノボリにおける地点間の遺伝的距離(2012) 各地点間には1基の堰堤が存在する

以下のとおりである。

St.4 : 魚道が無い堰堤で、右岸側には落差がなく浅い流れが、主流が流れる左岸側には30cm程度の落差があった。遡上してきたカワムツは主流側に集まり、右岸側の落差が無いエリアを見つけにくい状況にある可能性が考えられる。

St.5 : 魚道内に水が流れていなかった。左岸側に粗石の無い斜路があり、カワヨシノボリはこの領域を遡上している可能性がある。

4. 3 分布域南限域におけるカジカの生息適地

本研究の対象とした分布域南限付近に生息するカジカは、堰堤等でいくつか区分された、わずか1 kmの区間に分布する。これら生息域下流端の取水堰より下流では、出水後に流下個体とみられるカジカを確認することがあるものの、冬季の繁殖は確認されていない。また、過去に移植実験を行った3地点のうち2地点はその後順調に個体数を増やしてきた一方で、1地点では、翌年の繁殖は確認されたが、その後の繁殖は確認されていない。

河川事業による影響を低減させるための移植を計画する際には、長期にわたり生息が可能な地点を選定する必要がある。本研究では、遺伝情報と物理環境情報等を組み合わせ、移植の成否に影響を与える要素を抽出し、移植適地を選定するための条件を求める事を試みた。

堰で区切られた地点別に、世代間の遺伝的距離から、繁殖効率の指標である有効集団サイズを求めた。さらに、地点の推定個体数と有効集団サイズの比率から、繁殖適地を、地点間の遺伝的距離等から現生息地における個体の動態を推定した。また、河床材料、水温、カジカの餌となる底生昆虫、河道内の植生や礫の分布など、各地点の物理環境情報を調査し、比較した。さらに、春先から冬季に至る当歳魚の肥満度を月別に求め、経年的な変化を求めた。5カ年にわたる調査の結果、夏季の高水温が生息に、冬季の高水温が繁殖に影響を与えることが示唆された。

5. 達成目標3 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の提案

本研究の取り組みにより、魚類の移動や生息に関わる事項を客観的に評価し、具体的な提案につながる遺伝情報の活用法を提案することができた。これらの成果は、「共同研究報告書478号 河川事業における遺伝情報の活用に関する共同研究報告書～魚類移動環境評価の新たな手法として～(H27.12)」として取りまとめた。

6. まとめ

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リング・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) K. Muraoka, S. Yamashita, et.al. "Ensuring Effective Rehabilitation and Translocation : Genetic Diversity of Freshwater Sculpins (*Cottus pollux*)", 34th IAHR, 2011.6
- 2) K.Muraoka, J.Miwa, et.al. "Translocation of white-spotted charr-Identification of hybrid population from its molecular record", ICOLD 2012, 2012.6
- 3) K. Muraoka, Y. Shinoduka, Y. Suto, et.al, "The Applications of Genetic Diversities to River Environmental Preservation", IAHR APD, 2012,8*
- 4) K. Muraoka, Y. Shinoduka, Y. Suto, et.al, "Evaluation of the migration of fishes in rivers by a molecular biological method", IAHR 2012, 2012.9*
- 5) K. Muraoka, Y. Kayaba, I. Masumoto, M. Oota, Y. Agata, et.al.: "Molecular Biology-based Evaluation of Fish Migration in Rivers", 36th IAHR World Congress, 2015.6
- 6) 村岡敬子,三輪順二他: ,遺伝情報を用いたダム周辺に生息する希少魚種の保全計画, ダム技術,2012.2
- 7) 村岡敬子, 萱場祐一: 河川環境調査への遺伝情報の活用, 平成26年度国土交通省技術研究会 一般部門(活力), 2014.11
- 8) 村岡敬子, 篠塚由美, 須藤勇二 他: AFLPを用いた魚類の移動環境評価の試み", DNA多型 Vol.20, 2012.6
- 9) 村岡敬子, 池田茂, 赤松史一 他, 河川事業への遺伝情報活用の試み, DNA多型 Vol.22, 2014
- 10) 村岡敬子, 萱場祐一, 他: 同一水系内魚類集団の動態調査にAFLP法を適用する際の留意点, DNA多型 Vol.23, 2015
- 12) 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

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

- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 瀬口祐一, 安形仁宏, 増本育子, 村岡敬子 : 遺伝情報から淡水魚の河川内隔離を把握する試み, 2015 年度日本魚類学会年会, 2015.9
- 17) 増本育子, 山原康嗣, 安形仁宏, 村岡敬子: 遺伝情報を活用した河川事業に関する評価法の研究, 応用生態工学会第 19 回大会, 2015
- 18) 村岡敬子 : 遺伝情報を用いた魚類移動環境の評価, 第 13 回環境研究シンポジウム, 2015.11
- 19) 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
- 20) 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