

河川環境調査への遺伝情報の活用

村岡 敬子¹・萱場 祐一¹

¹独立行政法人 土木研究所 水環境研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6)

魚類を始めとする生物の体内には、親世代から子世代へと綿々と伝えられてきた遺伝情報が記録されている。近年、遺伝情報分析・解析技術は急速に発展しており、河川環境調査の分野においても移入種の侵入や外来種との交雑状況調査などへの応用事例が多くみられるようになってきた。このような種レベルの比較だけでなく、遺伝情報の中には親子間のような微細な差異を表現する部位もあり、その情報の活用により、魚類を始めとするさまざまな生物の移動・繁殖環境などへの応用が期待される。河川環境調査への遺伝情報の活用を視野に入れた土木研究所における取り組みを紹介する。

キーワード 遺伝的距離、魚類移動環境、魚道、外来種、ハリエンジュ

1. はじめに

地球に生きるほとんどの生き物の細胞内に存在するDNA(*deoxyribo nucleic acid*, デオキシリボ核酸)はわずか4種類の塩基の並びで表現され、ヒトの核DNAを例にとると、200Mb(メガ塩基対、1メガ=10⁶)にのぼる¹⁾。この情報は親世代から子世代へと驚くべき正確さで複写されるが、稀に偶発的な変異が生じ、その変異もまた親世代から子世代へと継承される。長い時間をかけてこのような変異はDNA中に蓄積されており、塩基配列の違いを統計的に解析することによって、個体同士あるいはその集団同士の遺伝的な違いや類似性を求めることができる。

近年、遺伝子解析技術の高度化と共に、生物調査の分野でも遺伝情報が積極的に用いられるようになってきている。例えば、その魚類集団がもともとその水系に生息していた在来集団か、他水系から人為的に持ち込まれた移入種かの判定や、外見では判断がつかない外来・移入種との交雑状況の判定などにも利用されている。この場合、同じ「種」や「地域集団」であれば概ね共通である遺伝情報、すなわち同じ集団内では世代が変わっても変化が生じにくい部位が利用される。一方、遺伝情報には親子や兄弟間など血縁見解にある個体間においても差異を検出できる部位があり、既に、犯罪捜査における犯人の特定や競走馬の系統管理などで実用化されている²⁾。また、生物学の分野においても、人類・哺乳類・鳥類・魚類・植物等幅広い生物を対象とした多くの研究事例がある^{3,4)}。

河川に生息する生物等においても、同一集団内の遺伝

的な差異を比較することにより、その集団の移動・拡散状況や再生産に関わった個体数規模などの情報を得ることができる。このような遺伝情報から得られる情報と既往の河川環境調査手法を組み合わせることにより、効果的な保全対策や対応策の計画が可能となる可能性がある⁵⁾。一方、今後の河川環境調査での具体的な活用のためには、河川のように調査範囲が広い場合のサンプリング計画・分析手法の選択・解析方法など、様々な課題を整理していく必要がある。本報では、遺伝情報の河川環境調査への活用を目指し、土木研究所が行ってきた取り組みについて紹介する。

2. 魚類移動環境の評価

(1) 概要

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、魚道の整備を行い、魚類の移動環境の確保に努めている。これらの事業の対象は、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含まれている。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。これまでの土木研究所の基礎研究においては、閉ざされた水路内において、遺伝情報の活用により移動環境の評価が可能であることが示されてきた^{6,7)}。しかしながら、実際の河川においては、複数の支川や利水のための水路網が周辺に存在すること、そもそも河道全域を広域にわたり移動しない魚種も存在する可能性があること、異なる分析者がこれを行った時も同等の結果が得られるのか、などの課題が想定された。

そこで、土木研究所と公募によって選ばれた民間コンサルティング3社との共同研究により、実際の河川において遺伝情報を用いた魚類の移動環境評価を試みた。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単独堰堤の魚類移動環境のモニタリング（高瀬堰を対象）、②水系全体における魚類移動環境調査（太田川直轄区間全域）2課題について検討を行った。太田川は、国土交通省が1992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、2006年には本川の直轄管理区間にある14基の河道横断工作物のうち落差が0.3mを超える全堰堤（10基）に魚道が整備されており、良好な魚類移動環境が形成されていると考えられる。

(2) 調査方法

検討の対象とする魚種は、課題①の「単独堰堤の移動環境のモニタリング」では高瀬堰の周辺に広く分布する魚種としてカワムツを選定し、高瀬堰近傍上下流の5地点において各地点30個体のカワムツを複数の世代が含まれるよう採取した。課題②の「水系全体における魚類移動環境調査」では複数の河川横断工作物が魚類の移動を阻害する可能性を検証するために、河川横断工作物が連続する太田川中流域（8地点）と、太田川本川間との魚類の移動が明らかに阻害されている支川の滝山川の1地点を調査範囲とした。調査対象魚種は、この範囲内に広く生息するカワムツ及びカワヨシノボリ（底生魚）とし、各地点それぞれ15個体を目標に採捕した。採捕された個体は、体長を

測定した後、分析サンプルとしてヒレの一部を採取し、実験室内に持ち帰り分析を行った。

本調査地点のように上下流に連続した集団間では、堰堤による移動阻害があった場合でも上流から下流への流下による交流は想定される。そのため、個体間の遺伝的な違いを検出可能な手法を用いる必要があった。しかしながら、分析対象として選定したいずれの魚種においても集団解析が可能となるマーカー等は存在しない。そこで、遺伝情報が未知の種に対しても適用可能で、微細な差異も検出できるとともに、再現性も高いとされるAFLP法⁸⁾を適用することとした。得られた情報は遺伝子統計解析ソフト（AFLP SURV⁹⁾・帰属性解析ソフト（Structure¹⁰⁾ 2.3.4）等を用いて遺伝間の距離等の基本的な解析を行い、個体間・集団間の違いや集団構造の推定を行った。

(3) 結果

本調査を通じ、同一水系内に生息する同一魚種においても、移動環境が著しく乏しい地点においては、遺伝的にも明瞭な差異を得ることができた。一方で、移動環境がある程度確保されている区間においては、遺伝的差異が極めて微細であり、調査地点の選定・再現性を高めるための分析時の配慮・現象を適切に捉えるための解析法の選定等が必要であることが示された。尚、本調査で用いたAFLP法では、異なる分析者によっても同じ結果を得ることが示された^{11, 12, 13)}。



図-1 太田川における調査地点

○は課題①、●は課題②のサンプリング地点を示す

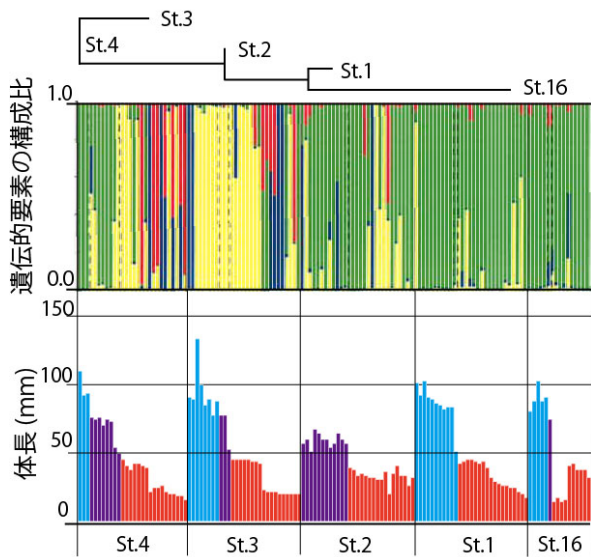
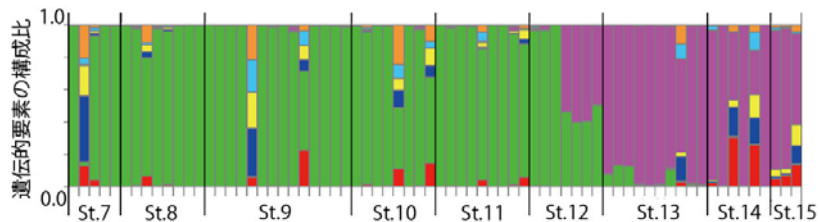


図-2 高瀬堰上下流におけるカワムツの遺伝子構造および遺伝的距離 (2013年サンプル)

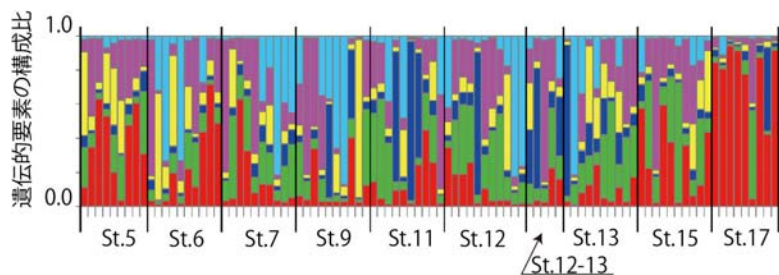
課題① 単独堰堤の移動環境のモニタリング

初年度となる2012年の調査では、高瀬堰上下流にまたがる特異的な遺伝子構造が観察され、その原因としてサンプルの年級群の偏りが結果に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、2013年は体長に偏りが生じないよう、再度同一地点にてサンプリングを実施するとともに、同水系のカワムツの体長組成をもとに年級群の区分を求めた。AFLP法により得られた遺伝情報に対し、Structureを用いた帰属性解析を行った結果、高瀬堰の上下流に遺伝子構造の構成比が変化する明瞭な境界が観察された(図-2)。一方で、各要素は全地点に分布して



a. 2012年サンプルの結果

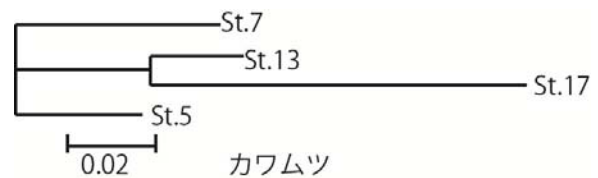
St. 12とSt. 13の間で遺伝子構造に明瞭な差異が観察された



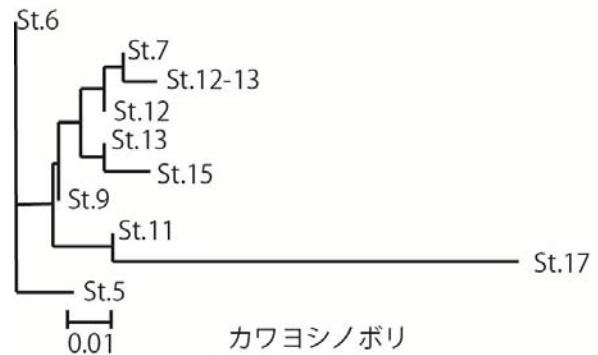
b. 2013年サンプルの結果

St. 12-13は、St. 12と13の中間地点を示す。移動環境の無いSt. 17は他地点と明瞭に分かれるが、それより下流では大きな差異は見られなかった。

図-3 カワヨシノボリの遺伝子構造



カワムツ



カワヨシノボリ

図-4 各地点の遺伝的距離 (2013年サンプル)

おり、高瀬堰の上下流間をカワムツは移動していると考えられる。堰上流地点付近において遺伝子構造に偏りがみられるのは、合流する支川の影響も想定され、サンプリングには年級群に地点間の偏りが無いよう配慮する必要があるとともに、魚の移動分散に配慮したサンプリング地点の選定が必要と考えられた。

課題②水系全体における魚類移動環境調査

2012年に堰堤連続区間において採取したサンプルのAFLP法により得られた遺伝情報に対し、Structureを用いた帰属性解析を行った結果、カワムツは堰堤連続区間全域において差異が見られないのに対し、カワヨシノボリでは1堰堤を挟む上下流において遺伝子構造の違いがみられる結果となった(図-3a)。堰堤の無い区間との比較および50年以上前に設置された魚道の無い堰堤上流の集団と比較するため、2013年は当該区間だけでなく高瀬堰より上流の直轄管理区間全域を対象にサンプリングを行った。2012年と同様の分析を行った結果、カワムツ・カワヨシノボリ双方とも帰属性解析の結果に明瞭な差異は見られず、2012年に観察された差異は一過性のものである可能性が考えられた(図-3b)。一方、2013年の採取サンプルについてAFLP法により得られた遺伝情報から、AFLP SURVを用いて地点間の遺伝的な関係を求めた(図-4)。カワムツ・カワヨシノボリ共、滝山川のSt.17以外の地点では、地点間の遺伝的距離は極めて小さい結果を示し、本川区間では堰堤の有無に関わらず良好な移動環境が保たれている結果を示した。一方、差異は小さいものの、双方の魚種

ともにSt.7と下流地点が異なるクレードを示していることから、本区間の移動環境にに何らかの課題があることも考えられる。一方で取り扱っている遺伝的差異は微細であることから、今後分析手法・サンプル数も含め、精査が必要と考えられた。

3. 外来植物ハリエンジュの分布拡大履歴の推定

(1) 概要

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¹⁴⁾。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るため、微細な差異を検出できる分析方法を適用することが必要と考えられた。

(2) 調査方法

本調査では、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-5）。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。遺伝情報の分析には、本流域の由来の推定にはAFLP法を、水系内の動態の解析にはLian¹⁵⁾らの方法に従ったマイクロサテライト法を適用した。マイクロサテライト法は、マイクロサテライト領域と呼ばれる、変化の生じやすい部位を対象とした手法で、再現性も高く、マーカーが既知（分析方法が確立済）の



図-5 天竜川水系におけるサンプリング地点
D, Fは本川を、それ以外は支川を示す

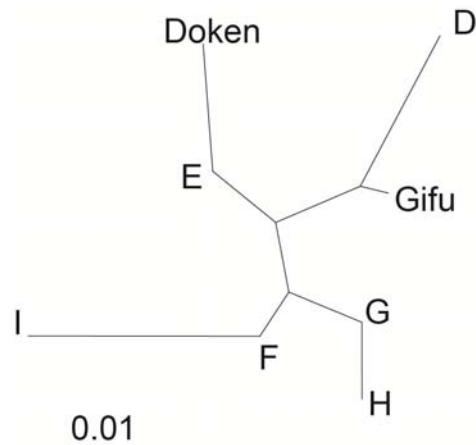


図-6 AFLP分析法に基づく比較

天竜川水系内のハリエンジュとアウトグループとなるGifu(各務原市)・Doken(つくば市)が入り乱れており、天竜川水系内には複数の起源をもつ集団が存在していることが推定される。

種を対象に分析する場合、集団解析を行ううえで有効な手法である。

(3) 結果

AFLP法により得られた遺伝情報をもとに、AFLP SURVにより遺伝的距離を求め、Phylip3.67により地点間の関係を無根系統樹として示した(図-6)。天竜川以外アウトグループサンプル2地点と各地点の関係は入り組んでおり、複数の起源をもつハリエンジュ集団が水系内に存在していることがわかる。

マイクロサテライト分析の結果からは、分析対象となる地点A～Fの144サンプルのうち、43サンプルの遺伝情報が各々の地点内において完全一致する遺伝情報を有する個体が存在し、これらは地点内における同一個体あるいはクローンである可能性が高いと判断された。地点内で同じ遺伝情報を有する比率(クローン率)は地点によってばらつきが大きく(図-6)、本川Dは0.12、支川Eは0.03と低い値を示すのに対し、支川Bでは半数が同じ遺伝情報を有していた。地点内のクローン率が高い地点は、他地域からの移入が小さく当該地点でクローン樹林帯を形成しやすく、早期にクローン個体が優先的な樹林を形成した可能性が考えられる。本川では上流域からの侵入頻度が高いと考えられるF地点においてもクローン率が高いことは、ハリエンジュが新規に侵入しにくい、もしくは短期間に樹林を形成できる何らかの要因がある可能性が考えられ得た。これらの情報と物理環境を組み合わせることで検討することにより、ハリエンジュの繁殖・拡大適地の条件の絞りこみなど、より効果的な対策につながるものと考えられる。

4. 今後の課題

本報では、土木研究所が検討を行っている事例のうち2件を取り上げ、その概要を紹介した。魚類の移動環境調査への適用では、長期にわたり移動が困難な地点は明らかに分離できるものの、何らかの交流が想定される地点間については、地点間の遺伝的な違いが微細であるため、調査地点の選定を含む調査計画の立案や再現性に配慮した分析が重要であると考えられた。一方、ハリエンジュのような植物は、同一個体がその地点に留まるため、侵入の履歴等を遺伝情報が反映する結果を得ることができた。いずれの場合においても、生物学の分野で行われている研究レベルの成果を求めるとなると、サンプル数の増加などにより費用がかさみ、非現実的なものとなる場合もある。既往の調査と組み合わせ、どの程度の情報を目標とするのかあらかじめ想定し、調査計画を立てる必要がある。

遺伝情報を用いるメリットとして、以下のような事項

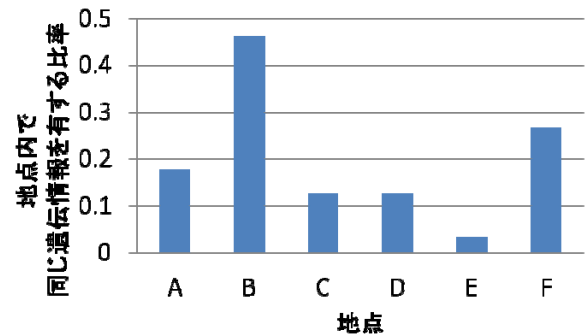


図-7 各地点内におけるハリエンジュのクローン比率

が考えられる。

- ・分析に用いるサンプルが微量ですむため、魚体へのダメージが小さく、希少魚種への適用も可能である。
- ・サンプル(DNA)を保存しておけば、年月を経た後にも異なる分析手法の適用も可能であり、過去と現在を比較することができる。
- ・広範囲にわたる移動環境を調査する場合、全ての地点を網羅的に調査する必要が無い。最初にいくつかの区間に分けて、各区間1地点の調査を行う事により、課題のある区間を一次検討し、課題がある可能性が示された箇所を重点的に調査することにより、調査の簡素化が図れる。

一方、調査計画等、また精査すべき事項があり、これらの課題は、引き続き土木研究所においても検討を行っていく予定である。現在土木研究所が行っている共同研究については、「魚類移動環境編(仮題)」として、共同研究報告書を取りまとめつつあり、今年度をめどに、配布を行う事を予定している。

参考文献

- 1) 村松正實監訳, T.A. Brown, Genoms Second Edition, (株)メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2003
- 2) J. M. Butler著, 福島弘文・五条堀孝監訳, DNA鑑定とタイピング-遺伝学・データベース・計測技術・データ検証・品質管理, 共立出版, 2009
- 3) 例えば Bryan Sykes著, 大野晶子訳, イブと7人の娘たち, ヴィレッジブックス, 2001
- 4) 例えば 池田清彦, 新しい生物学の教科書, 新潮社, 2001
- 5) DNA多型分析応用技術研究会ら(2010), 河川におけるDNA多型分析技術の活用事例集
- 6) 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, 2012.6
- 7) 村岡敬子, 須藤勇二 他, 遺伝情報を用いた魚道機能の検証, 応用生態工学会第14回研究発表会講演集, pp75-76, 2010.9
- 8) S. Karudapuram et al.(2005), Identification of Hedysarum

Varieties Using Amplified Fragment Length Polymorphism on a Capillary Electrophoresis System, Journal of Biomolecular Techniques 16:316-324

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

10) Laboratoire d'Ecologie végétale et Biogéochimie, ULB-Campus de la plaine CP244 C5 oulevard du Triomphe, B-1050 Bruxelles

11) 安形ら(2012), 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

12) 増本ら(2013), 河川事業の影響評価等における遺伝情報の活用に向けた研究, 応用生態工学会第17回大会発表講演要旨集

13) 太田ら(2014), 河川事業の影響評価等における遺伝情報の活用に向けた研究, 応用生態工学会第18回大会発表講演要旨集

14) 村岡敬子, 池田茂 et.al. 河川事業への遺伝情報活用の試み, DNA多型 Vol.22, 77-79

15) 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

参考： 遺伝情報の伝達と遺伝的差異の出現

