

## 戦-17. 在来魚種保全のための水系の環境整備手法の開発

研究予算：運営費交付金

研究期間：平18～平22

担当チーム：水環境研究グループ（河川生態）

研究担当者：三輪準二(上席)、村岡敬子

### 【要旨】

本研究は、在来魚集団維持のために必要な水系内の空間配置や連結性の考え方を示し、現在の水系の中で効果的に水域環境を保全・修復するための考え方や手法の提案を行うために実施しているものである。平成21年度は、遺伝的かく乱の存在が推定される在来イワナ集団をモデルに、遺伝情報を用いた在来個体群の保全策を検討した。その結果、AFLP手法とベイズ推定法による個体の帰属性解析をくみあわせることにより、隣接した地域においても堰堤等による移動阻害の状況を検出できるとともに、少数の外来種の移入の履歴も検出できた。これまで一般に用いられてきた他の遺伝子解析法と異なり、特定領域の配列情報などを必要としないAFLP手法の実用性が確認できたことは、今後他の在来魚種に対しても本手法が適用できることを示す。

キーワード：在来魚種、仔稚魚、地域集団、遺伝情報

### 1. はじめに

河川に生息する魚類の中には、その生活史の中で河川だけでなく周辺の小水路やそこにつながる湿地・水田地域などを利用するものが多く、これらの魚種は個々の移動能力に応じてこれらの水域が適切に連続することを必要とする。こうした魚類における個体の移動は水系内に広く分布する個体同士の交流にもつながり、水系内の在来魚の集団としての存続にも大きく関わっている。このような水系を面的に捉えた河川環境の整備は在来魚種を中心とした健全な生態系の保全のためにも必要であり、国土交通省で重点的に取り組みつつある課題のひとつでもある。しかしながら、河川周辺の水域が人間活動によって大きく改変されている現状の下、在来魚種の保全を目的とした事業の効果を高めるためには、現在の河川および周辺の水環境と魚種が必要とする水域の条件を的確に把握し、魚種の移動能力と結びつけた評価を行うとともに、必要な水環境を保全・復元していくことが重要である。

本研究では、在来魚集団維持のために必要な水系内の空間配置や連結性の考え方を示し、現在の水系の中で効果的に水域環境を保全・修復するための考え方や手法の提案を行うために実施しているものである。

平成21年度は、山間地の溪流部に広く分布するイワナを指標魚種とした調査を実施した。ニッコウイワナ (*Salvelinus leucomaenis*) およびエゾイワナ

(*Salvelinus leucomaenis leucomaenis*) はサケ科イワナ属に属する陸封型の溪流魚で、形質に変異が認められる地域特有の集団＝在来集団が存在する<sup>1)</sup>。溪流地域に建設される河川の横断工作物が近隣の沢間におけるイワナの自由な移動を阻害する場合には、在来集団の孤立を招くことが指摘されており、近年では横断工作物に本種を含む溪流魚を対象とした魚道等の整備が積極的に進められている。本種は溪流釣の対象魚でもあり、昭和40年代から日本各地で積極的に放流がなされており、他地域由来の個体や異なる亜種由来の個体、あるいはこれらの交配種(以下移入個体)の放流・移殖による遺伝的攪乱の問題が指摘されている<sup>1)</sup>。

河川横断工作物による生息区域の移動阻害は、地域間の個体との交流を阻害するため在来集団の保全上好ましくないが、周辺水域に移入個体がある場合、これらとの接触を防ぎ、結果的に貴重な在来魚集団が遺伝的攪乱を免れる場合もあり、むしろ移動阻害状況の維持が、上流域の環境保全に効果的である場合もある。

このような人為的に持ち込まれる移入種による遺伝的攪乱は、全ての在来淡水魚において起こりうる問題である一方で、それを検出するためのマーカーは必ずしも既知ではない。本研究では、比較的簡便にマーカーを得られるAFLPに着目し、イワナの放流が継続的になされている河川において、在来集団が存続する可能性が高いといわれる沢を対象に、簡便かつ確実に

在来集団と交雑集団を検出することを試みた。

## 2. 移入個体による遺伝的かく乱の検証

### 2.1 調査地区の概要

本調査対象であるC川では、イワナの放流が継続的になされており、放流歴のある地域に生息するイワナが、既に移入個体との交雑集団であることが報告されている。このような状況はC川上流域の複数の沢でも同様であるが、漁協等のヒアリングではA沢、B沢を含む一部の沢には放流履歴がなく、さらに沢内に複数の横断工作物があることから、本沢に生息するイワナの集団が在来集団である可能性が高いとされている。河川事業に伴う改変の可能性がある本地域において、本沢に生息するイワナ集団が在来集団であるか否かを確認すると共に、保全対象となる集団を抽出し、保全計画に資するために、遺伝情報を用いた解析を行った。

### 2.2 材料と方法

#### 2.2.1 分析対象サンプル

本研究で遺伝子分析のために用いたサンプルは、図-1に示す2沢および両沢をつなぐ河川内の11地点において採捕したイワナのアブラビレ、計192個体分である。このうち、本川と分断されたエリアのサンプル数は126個体分であり、これは同沢においてピータセン法により算出した推定個体数の約45%にあたる。採取したヒレサンプルは、95%エタノールに浸した状態で実験室内に持ち帰り、Qiagen社製ProtenazeKによるたんぱく質分解処理の後、フェノール・クロロホルム法によりDNAを抽出した。

#### 2.2.2 mtDNA cyt-bによる移入種の判定

Yamamotoら<sup>2)</sup>の方法により、採取した全サンプルのmtDNA-Cyt-b領域の配列情報(557b)を得た。得られた配列情報は、山本ら<sup>3)</sup>が示す在来イワナ集団の配列情報およびGEDIMAP (<http://gedimap.zool.kyoto-u.ac.jp>)により取得した他地域のイワナの配列情報と比較し、調査対象水系由来か否かを判断した。

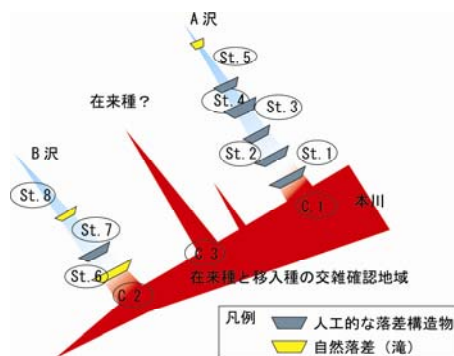


図-1 C川における調査地点の概要(ニッコウイワナ)

#### 2.2.3 マイクロサテライトによる判定

利根川水系のイワナを対象にマイクロサテライト分析をおこなった Kubota<sup>4)</sup>らの方法に沿って、9領域についてマイクロサテライト情報を取得した。また、これより集団間距離を Arlequin ver3.11 によって求め、PHYLIP Version 3.68 によって系統樹を作成した。また、191個体9領域について Structure(Ver.2.3.1)<sup>5)</sup>を用いた遺伝的要素の解析を行った。

#### 2.2.4 AFLP

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Eco AAC-Mse I CAA(以下同じ)、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、191個体に対し30allele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<sup>7)</sup>によって系統樹を作成した。また、191個体・全alleleの情報をを用いて、Structureによる遺伝的要素の解析を行った。

### 2.3 結果

#### 2.3.1 mtDNA Cyt-bを用いた移入履歴の探索

イワナ192個体において、Yamamotoらの報告する5つのハプロタイプおよび、未確認の1ハプロタイプが確認され、そのうち85%の個体が、調査対象水系内の在来集団とされるHap N1(163個体)およびHap N2(11個体)を示した(図-2)。この2ハプロタイプのうち全域に分布するHap N1が、当該地域の在来集団のハプロタイプである可能性が高いと考えられた。本川(C1, 2, 3)及びA沢の最下流端(St.1)では、調査対象水系での報告が無いハプロタイプ4タイプ(Hap A1~3, Hap(?) Unknown: 未確認のハプロタイプ)が確認され、St.1への人為的な移入個体の導入が確認された。

#### 2.3.2 遺伝的要素の比較による移入履歴の推定

Structureによる遺伝的要素の比較に先立ち、安定した結果が得られるよう、AFLPの計算条件の最適化を行った。その結果、AFLPでは想定要素数(K)が5を境に評価値のバラツキが大きくなった。このばらつ

きは1回の計算(1RUN)内での繰り返し計算回数(N)を200,000回以上と大きく設定することによって若干の改善はされるものの、完全な解消には至らなかった。一方、マイクロサテライトのデータはN=10,000回程度で十分であった。AFLPの計算結果のばらつきの原因として、AFLPのデータの中には、自動解析の設定上、alleleの有無を特定できない双方の境界値が多数存在していることや、データ数(allele数)が多いことが考えられる。

AFLP、マイクロサテライトのStructureによる遺伝的要素の解析結果を図-3に示す。計算結果で得られる4種の要素は、河川横断工作物や滝などの移動阻害の位置やmtDNAを用いた遺伝的交雑の状況に基づき、“当該地域全体に共通する要素”、“それぞれの沢を起源とする要素”と、“本川に由来する要素”の三つに分類することができた。

AFLPの結果では本川に由来すると考えられる要素が、わずかではあるがA沢、B沢双方の最上流地点で確認されていること、この要素が下流域では出現していないことなどから、本川あるいはこれと同様の交雑集団から沢の上流域への人為的な個体の持ち込み履歴の可能性が示唆された。一方、マイクロサテライトでは、A沢最上流地点およびB沢上流3地点において遺伝的かく乱が小さいことが示された。

これらの結果から、生息域内に複数の人為的な移動阻害のある本ニッコウイワナ在来集団の保全のためには、魚道等移動環境の整備を行うよりも、上流域の集団を保全するための生息環境の整備が重要と考えられる。

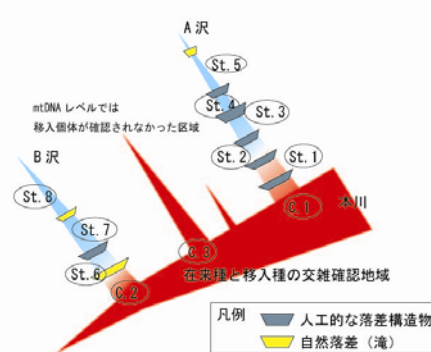
### 3. 遺伝子を用いた移動阻害状況の探索

#### 3.1 調査地点および調査の概要および手法

調査を行ったのは、寒地土木研究所寒地農業基盤研究グループ水利基盤チーム(以下寒地土研)が調査フィールドとしている北海道内の農業排水路約6Kmの区間である。エゾイワナ、フクドジョウ、ハナカジカな

mtDNA Cyt b 遺伝子型の出現状況

河川名	地点名	mtDNA Cyt b 遺伝子型
A 沢	St.1	HapN2(6), Hap N1(4), HapA1(1)
	St.2	Hap N1(14)
	St.3	HapN1(11)
	St.4	Hap N1(17)
	St.5	HapN1(20)
B 沢	St.6	HapN1(13)
	St.7	HapN1(20)
	St.8	Hap N1(20)
本川	C1	HapN1(13), HapN2(5), HapA1(3)
	C2	HapN1(20), HapN2(2), HapA2(1), Hap 2(Unknown)(1)
	C3	HapN1(10), HapA3(2)



各遺伝子型のうち、アンダーラインがあるものは、文献やデータベースにおいて他の地域での報告があるものや未報告の遺伝子型であることを、( )内の数字は、それぞれの遺伝子型をもった個体数を示す。他地域での報告がある遺伝子型 Hap A1 および Hap A3 が、調査地域内において確認されたことは、この遺伝子型を持つ移入個体の存在を示す。A 沢の下流となる St.1 において Hap A1 がみつかったことから、少なくとも St.1 まで既に移入個体が侵入していると考えられる。

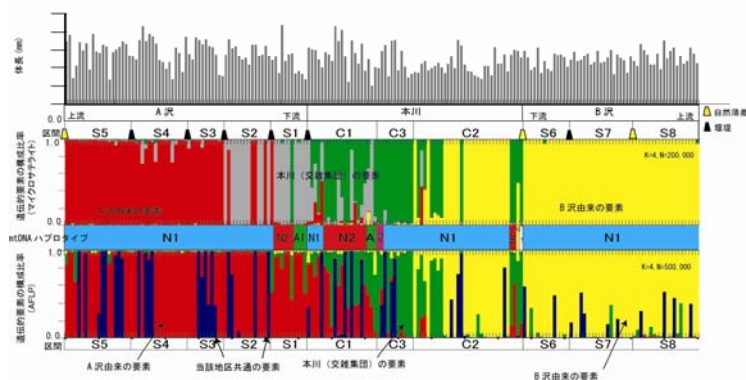


図-3 AFLP とマイクロサテライトの遺伝的要素解析結果の比較(ニッコウイワナ)

帯グラフ中の縦棒1本は1個体をあらわし、色毎に異なる遺伝的要素を示す。A 沢の個体に多く見られる赤色●の要素はA 沢由来の要素、同●はB 沢由来の要素と考えられ、隣接した地域であっても沢間の違いを検出することができた。また、ミトコンドリアの結果とあわせて考えると、本川の集団に多く見られる要素●は交雑集団を示すと考えられ、微量ながらも両沢の上流域にも要素●が出現していることから、両沢とも遺伝的かく乱の履歴があることが検出される結果となった。

どが生息している本区間には、農業用の落差工が14基設置されている。落差工の高さは0.75~1.5mで、全ての落差工には魚道が設置されている。今年度は寒地土研と連携し、遺伝情報を用いたエゾイワナ集団の移動環境の推定を試みた。

分析に用いたサンプルは、寒地土研の調査により採捕されたエゾイワナ108個体のヒレの一部で、遺伝子の抽出~解析は前述のニッコウイワナの AFLP と同様の方法で実施し、6組のプライマーで406alleleを得た。

Structureによる解析の結果を図-4に示す。いずれの要素共に調査区間全域に分布しているが、その構成比は地点毎に異なっており、調査区間全域を通じてエゾイワナが活発に交流している状況ではないことがうかがえた(図-4)。また、AFLP-SURVによる個体間

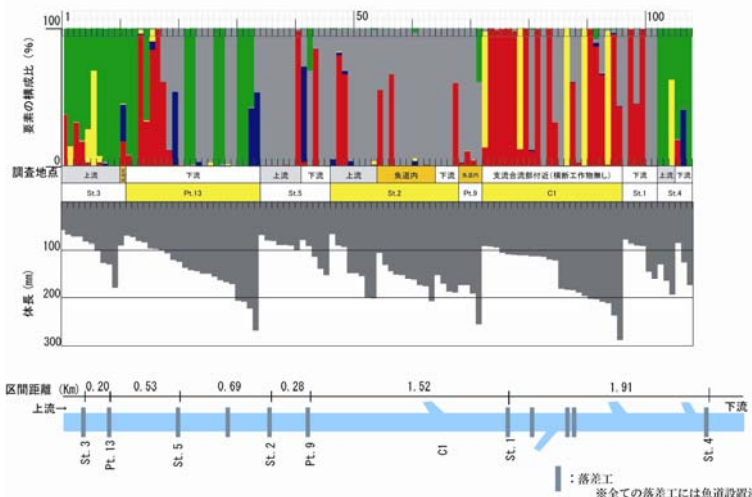


図-4 横断工作物の分布とエゾイワナの遺伝的要素の関係

5つの要素とも、上流地点から下流地点まで全域に分布するが、地点毎にその比率が異なる。

遺伝的距離を無根の系統樹からは、3つの小グループがみられた(図-5)。このうち、グループAに属する個体はPt. 13~St. 4の区間で出現し、遺伝的な距離が短く、位置関係も地理的關係を反映せず、この区間においては遺伝的な交流ができていたと考えられた。しかしながら、グループAに属する個体が最上流調査地点で確認できていないことからSt. 3とPt. 13~St. 4の間に移動障害があることが推定された。さらに、地理的な関係や個体の採取場所などから、グループBはSt. 3を起源にもつ集団であること、グループCは流入支川などを起源にもつ集団であることが推定された。

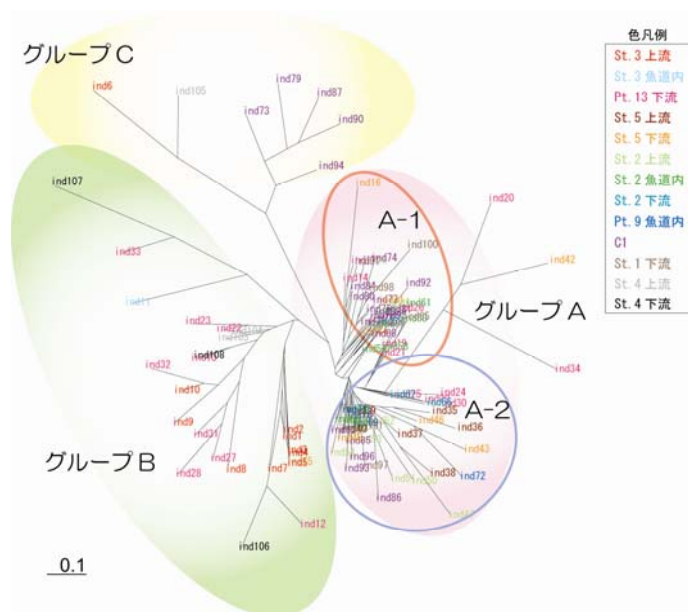


図-5 エゾイワナの個体間遺伝的距離にみられる集団内小グループ

#### 4. 考察

今回の調査対象としたニッコウイワナの集団は、調査地点同士が隣接し、上流から下流への個体の移入が十分想定されるため、遺伝的な平衡状態にはなっておらず、厳密には集団同士を比較することが困難な集団である。また、本川では他地域の個体の人為的な導入が、複数回にわたり繰り返されており、世代交代も経ていると考えられる。今回、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で、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、交雑の履歴を推定することができた。

また、エゾイワナの例では、上下流の位置関係にある集団においても個体間距離と位置関係などから、河川横断工作物による移動障害を推定できる結果を得た。

遺伝情報に基づく分布情報は、今後河川横断工作物上下流における移動障害の影響評価や、水系内に広く分布する在来魚集団を効果的に維持・保全するための地点選定など、具体的な事業に展開できると考えられる。

#### 参考文献

- 1) 中村智幸,イワナをもっと増やしたい!「幻の魚」を守り、育て、利用する新しい方法,平成19年12月
- 2) Shoichiro Yamamoto, Kentaro Morita, Satoshi Kitano, Katsutoshi Watanabe, Itsuro Koizumi, Koji Maekawa and Kenji Tkamura(2004) Phylogeography of White-Spotted Charr(*Salvelinus leucomaenis*) inferred from Mitochondrial DNA Sequences. ZOOLOGICAL SCIENCE 21:229-240
- 3) 山本祥一郎,中村智幸,久保田仁志,他:ミトコンドリア DNA 分析に基づく関東地方産イワナの遺伝的集団構造. 日本水産学会誌 74(5),861-863,2008
- 4) Hitosh KUBOTA, Takahide DOI, Shoichiro YAMAMOTO, et al.: Genetic identification on native population of fluvial white-spotted charr *salvelinus leucomaenis* in the upper Tone River drainage, *Fish Sci.*73:270-284,2007
- 5) Version 3.68, August, 2008 by Joseph Felsenstein Department of Genome Sciences and Department of Biology University of Washington
- 6) Laboratoire d'Ecologie végétale et Biogéochimie, ULB-Campus de la plaine CP244 C5 oulevard du Triomphe, B-1050 Bruxelles
- 7) Department of Genome Sciences and Department of Biology, University of Washington, USA

## A STUDY OF ENVIRONMENTAL PLANNING METHOD FOR CONSERVATION OF NATIVE FISH SPECIES

**Budget:** Grant for operating expenses  
General account

**Research Period:** FY2006-2010

**Research Team:** Water Environment  
Research Group (River  
Restoration Research)

**Author:** MIWA Junji  
MURAOKA Keiko

**Abstract** : In order to conserve environmental conditions for native fish, it is important to assess their habitats on larger spatial scale. The Salmonid fish (*Salvelinus leucomaenis*, *Salvelinus leucomaenis leucomaenis*) were selected for this study. STR and AFLP method were used on this study, and sufficient genetic differences for analysis the group in narrow area could be found. The actual conditions of genetic contamination of native salmonoid fishes were detected by Bayesian estimation method. These can be used to estimate the breeding habitats conditions and its continuity.

**Key words** : native fish, native population, weir, salmonoid fish