

水域エコロジカルネットワーク計画における 遺伝情報とコスト距離を活用した比較検討

A COMPARATIVE PROCEDURE OF AQUATIC ECOLOGICAL NETWORK
RESTORATION PLANS BY ANALYZING GENETIC INFORMATION AND
COST DISTANCE

山下慎吾¹・村岡敬子²・天野邦彦³

Shingo YAMASHITA, Keiko MURAOKA and Kunihiko AMANO

¹学博 土木研究所水環境研究グループ河川生態チーム (〒305-8516 つくば市南原1-6)

²正会員 土木研究所水環境研究グループ河川生態チーム (〒305-8516 つくば市南原1-6)

³工博 正会員 土木研究所水環境研究グループ河川生態チーム (〒305-8516 つくば市南原1-6)

The aim of this study is to propose a comparative procedure of aquatic ecological network restoration plans by analyzing genetic information and cost distance. Because ecological network restoration projects have not only benefits but also risks to biological diversity, it is very important to choose places where we restore the network path in fact. Therefore, we developed an evaluation method by analyzing genetic data and cost distance value to explore suitable network path that has high connectivity between native population patches and low connectivity from nonnative population patch. We proposed an index named cost index of ecological network (CIEN). The suitability of restoration plans can be compared by the index. We compared three virtual network plans on a small area (5*10km) covering from paddy field to Lake Kasumigaura as a case study. Our result suggests that the cost index of ecological network can show the difference between network restoration plans and that it is useful as a quantitative measure.

Key Words : Cost distance, DNA, Ecological network, GIS, Medaka, Paddy field, Risk- benefit

1. はじめに

水田や農業水路は、かつては河川周辺に多く存在していた一時的水域の重要な代替地として、多くの淡水魚の生息場所や繁殖場所となっていることが知られている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。また、水系延長の大部分を占める小河川は、広大な一時的水域である水田等に接続する恒久的水域として、生物の重要な生息域であるとともに、高移動性生物の移動経路としての役割を果たしている⁶⁾と考えられている。さらに、個体群の存続性という観点からみると、移動性の小さい水生生物にとっても水域の連続性は世代を超えた個体群交流にはかかせない要素である。ところが、近年では、農業水路の改修や圃場整備等によって生息環境が改変された結果、水田で確認される魚類が著しく減少したことが報告されている³⁾⁷⁾ほか、河川においても落差をもった河川横断構造物が縦断方向の不連続性をもたらし、生息域を分断する要因として問題視されている⁸⁾⁹⁾。

現在、上記のような身近な水域の連続性回復を目的として、水域エコロジカルネットワーク再生事業が実施さ

れようとしている。しかし、ここで、コンピュータなど他のネットワークと同様に、エコロジカルネットワークが構築される際においてはベネフィットだけではなく、リスクも同時に発生することに注意が必要である。つまり、地域個体群の絶滅確率の低下というベネフィットのほかに、すでに人為移入個体群が生息する場所と接続することによる遺伝的攪乱の促進や、侵略的外来種の生息地と連結することによるニッチ競合の激化といったリスクが発生する。そのため、現実問題としてネットワーク修復経路(パス)の選択には苦慮することが想定され、なんらかの評価手法が必要となる。

そこで、本研究では「水域エコロジカルネットワーク修復をどこに行うと効果的か?」という設問に対応する評価手法を提示することを目的として、在来個体群生息地間の連続性を拡大し、かつ、遺伝的攪乱を促進しにくいネットワークを選択するため、現実の水域において、指標生物の遺伝情報と、地形や土地利用の配置を考慮したコスト距離概念を活用した評価を行い、独自に設定した3つの水域エコロジカルネットワーク修復計画の比較を行った。

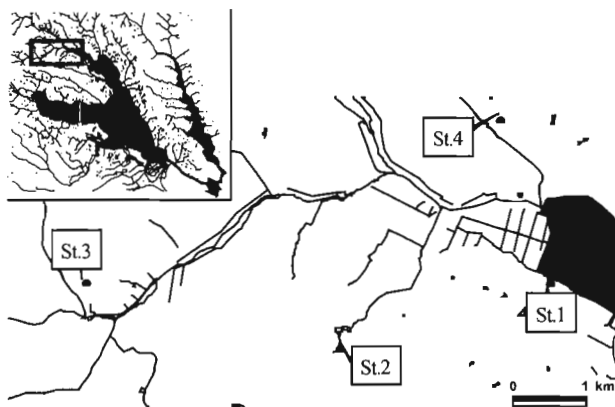


図-1 検討対象範囲

2. 方法

(1) 検討対象範囲

検討対象範囲は、霞ヶ浦北部の恋瀬川および天の川が流入する5km×10kmの区域である(図-1)。

(2) 遺伝解析

a) 供試魚

指標生物として、河川、水路、水田を主な生息場とするメダカ(*Oryzias latipes*)を選定した。日本の野生メダカは北日本集団と南日本集団に大別され、さらに南日本集団には多くの地域型が存在する⁹⁾ことが知られている。2004年7月から9月にかけて、検討対象範囲内の4地点で採取したメダカ成魚の尾鰭切片を99.5%エタノール標本として持ち帰り、各地点10個体について分析を行った。

b) DNAの抽出および分子系統解析

尾鰭切片からQIAGEN DNeasy Tissue Kit を用いてDNAを抽出した。次に、ミトコンドリアDNA (mtDNA) チトクローム*b* (*cytb*) 領域の塩基配列を解読するため、魚類を対象とした既知の手法とプライマー^{9) 10)}を用いた。まず、2種のプライマー CytbFa (AGG ACC TGT GGC TTG AAA AAC CAC)⁹⁾および S-LA-16S-H (TGC ACC ATT RGG ATG TCC TGA TCC AAC ATC)¹⁰⁾とTakara LA-Taq を用いたPCR処理を行った。PCR産物の精製にはQIAGEN PCR Purify Kitを用いた。シーケンス反応には、CytbFa, CytbFb (CAA ATA TCA TTT TGA GGG GCC ACT GT), CytbFd (CCC TAT TCT ACA CAC CTC TAA ACA ACG), CytbFe (CTC GTC AGT TGC ACA CAT CTG CCG), CytbRVa (TYC GAC YYC CGR WTT ACA AGA CCG), CytbRVb (ACT GAA AAT CCC CCT CAA ATT CAT TG), CytbRVc (CCT CCA AGT TTG TTT GGA ATT GAT CGT AG), CytbRVd (GCA TGT ATA TTC CGG ATT AGT CAG CCG TA) の計8プライマー⁹⁾とABI BigDye Terminator ver.3 を用い、

表-1 土地利用形態とセルあたりの相対的通過コスト値

土地利用形態	通過コスト
河川など水域	0.1
水田	0.2
浸水想定区域内の圃場整備水田	0.3
圃場整備水田	0.4
浸水想定区域内の耕作地	0.5
耕作地	0.6
浸水想定区域内の樹林地	0.7
樹林地やゴルフ場	0.8
浸水想定区域内の人工構造物	0.9
人工構造物	1.0

ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer とDNASIS Pro ver.2.0 を使用して塩基配列を決定した。最後に、今回用いた共試魚と日本全国および韓国のメダカのmtDNA *cytb*配列情報⁹⁾をあわせて、韓国の個体を外群とした近隣結合法による分子系統解析を実行することにより、移入個体群の推定を行った。分子系統解析にはCLUSTAL W ver.1.83¹¹⁾とTreeViewプログラムを用いた。

(3) コスト距離

コスト距離(もしくは加重コスト距離)とは、グリッド上の2点間を移動する場合において、最小コストとなるパスを抽出すると同時に、そのパス上に位置する各セルの通過コストの累積値を算出する概念で、移動が困難であるほど大きな値をとる。今回の指標生物について検討した移動コスト属性は、標高と土地利用形態である。これらの属性はセルサイズ25mのグリッドで整理した。

a) 標高のコード化

地理情報システム(GIS)のArcView ver.3.2とSpatial Analyst ver.2.0を用いて、数値地図(50mメッシュ標高)の標高値をIDW(Inverse Distance Weighted)補間により25mグリッドに整理した。そのうえで、検討対象範囲内の最高値が1.0になるように基準化したコードを各セルに付値した。

b) 土地利用形態のコード化

GISを用いて、数値地図(1/2,500空間データ基盤)を参照データとした空中写真の簡易幾何補正を行い、現地確認結果をあわせて、25mグリッドのセルごとに土地利用形態の判読を行った。また、霞ヶ浦河川事務所が公表している浸水想定区域図から、浸水想定区域内かどうかの識別を行った。それらの土地利用形態の区分と、今回任意に設定した1セルあたりの通過コスト値は表-1に示すとおりである。

c) 最小コストパスとコスト距離の算出

標高コードと土地利用コードをあわせた総合コスト値を各セルに付値し、PATHMATRIX ver.1.1¹²⁾を用いて、対象地点間の最小コストパスとコスト距離を算出した。

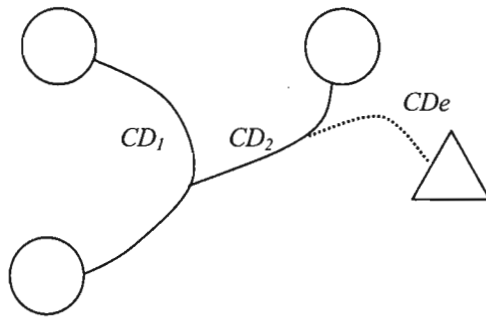


図-2 エコロジカルネットワーク計画比較のための概念図。
○：在来個体群生息地 △：最近傍移入個体群生息地
 CD_1, CD_2, CDe ：最小コスト距離

表-2 設定した水域エコロジカルネットワーク修復計画

名称	内容
プラン X	確認されたすべての在来個体群生息地について最小コスト距離となるネットワークパスを探索し、修復対象パスとする。
プラン Y	移入個体群生息地の付近に、拡散抑制対策を試みる。
プラン Z	在来個体群生息地のうち、移入個体群生息地に近い地点を除いて、他の地点間が最小コスト距離となるネットワークパスを探索し、修復対象パスとする。

表-3 霞ヶ浦周辺水域で確認されたメダカハプロタイプと塩基置換部位

塩基置換部位	1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3 3 4 4 4 4 4 5 5 5 5 6 6 6 7 7 7 7 7 8 8 9 9 9 9 0 0 0 0 0 0 1
	4 5 5 7 2 3 9 0 2 4 6 9 0 1 2 6 8 0 2 4 5 6 9 0 1 2 3 4 0 2 5 0 2 5 8 9 9 7 7 1 4 9 1 2 3 4 5 9 9 3
	8 4 7 5 6 5 2 4 2 0 1 7 0 2 4 0 1 8 0 7 6 2 8 7 0 5 1 9 9 7 4 0 6 3 7 2 5 0 3 5 8 6 7 0 2 7 3 2 6 4
参照配列(b11mito)	t a t a c c a c c g t g g c a c t a t t c t g a a t a c a c c g a a a t c a c c g a c a a t c t t a
Haplotype K1	
Haplotype K2	a g g
Haplotype K3	g a t c t a c g g g a g t g
Haplotype K4	g c g t a a g t g c c a t t g a g g g t a t g c t g g
Haplotype K5	c g c t t t a c a t t c g c c a g g t a g g c t g t t c t c g

(4) ネットワーク計画比較のための指標の提示

水域エコロジカルネットワーク修復経路の選択目標を「在来個体群生息地間の連続性を拡大し、かつ、遺伝的攪乱を促進しにくいこと」と想定すると、次のコスト距離指標 ($CIEN$: Cost Index of Ecological Network) の値が小さければよいことになる(図-2, 式-1a, 1b)。そこで、独自に設定した3つの水域エコロジカルネットワーク修復計画(表-2)について、コスト距離指標 $CIEN$ を用いた比較を実施した。

$$CIEN = \frac{a}{b} \quad (1a)$$

$$a = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n-1} CD_i, \quad b = CDe \quad (1b)$$

CD_i : 在来個体群生息地間のコスト距離(各地点からみて最小コストとなるパスを対象として算出)

CDe : 最近傍移入個体群生息地から在来個体群生息地間最小コストパスへの移動コスト距離

n : 検討対象とする在来個体群生息地数

3. 結果

(1) 移入個体群の識別

今回対象とした計40個体のmtDNA *cyt.b*領域(1141bp)の分析結果は表-3に示すとおりで、K1からK5までの5つのハプロタイプが確認された。Takehana *et al.* (2003) が茨城県の水戸で採集した個体のハプロタイプ(b11mito)を参照配列とすると、ハプロタイプK1はb11mitoとまったく同じ配列で、K2は3箇所、K3は14箇所、K4は27箇所、K5は31箇所の塩基置換が確認された。

分子系統解析の結果は図-3に示すとおりである(Cladeとは共通の祖先に由来する子孫生物群を示す)。ハプロタイプK1 ($n=32$) とK2 ($n=2$) はSubclade B-Iに、ハプロタイプK3 ($n=2$) はB-IIに区分された。また、ハプロタイプK4 ($n=2$) はSubclade B-VIIのB1a-maebashi⁹⁾やyoshimi⁹⁾と、ハプロタイプK5 ($n=2$) はSubclade B-IXのB15mooka⁹⁾やkitaku⁹⁾と同じ配列で、これらのタイプは放流などの人為影響によって西日本から関東地方に持ち込まれた可能性が強く示唆されており⁹⁾、移入個体群と識別された。

遺伝解析により、今回の調査地点4地点のうち、St.1における分析個体には東日本在来個体群と考えられるSubclade B-Iが4個体、Subclade B-IIが2個体のほかに、西日本からの移入個体群と考えられるSubclade B-VIIが2個体、Subclade B-IXが2個体含まれていることが明らかとなった。また、St.2, 3, 4における分析個体は在来個体群と考えられるSubclade B-Iに該当することがわかった。

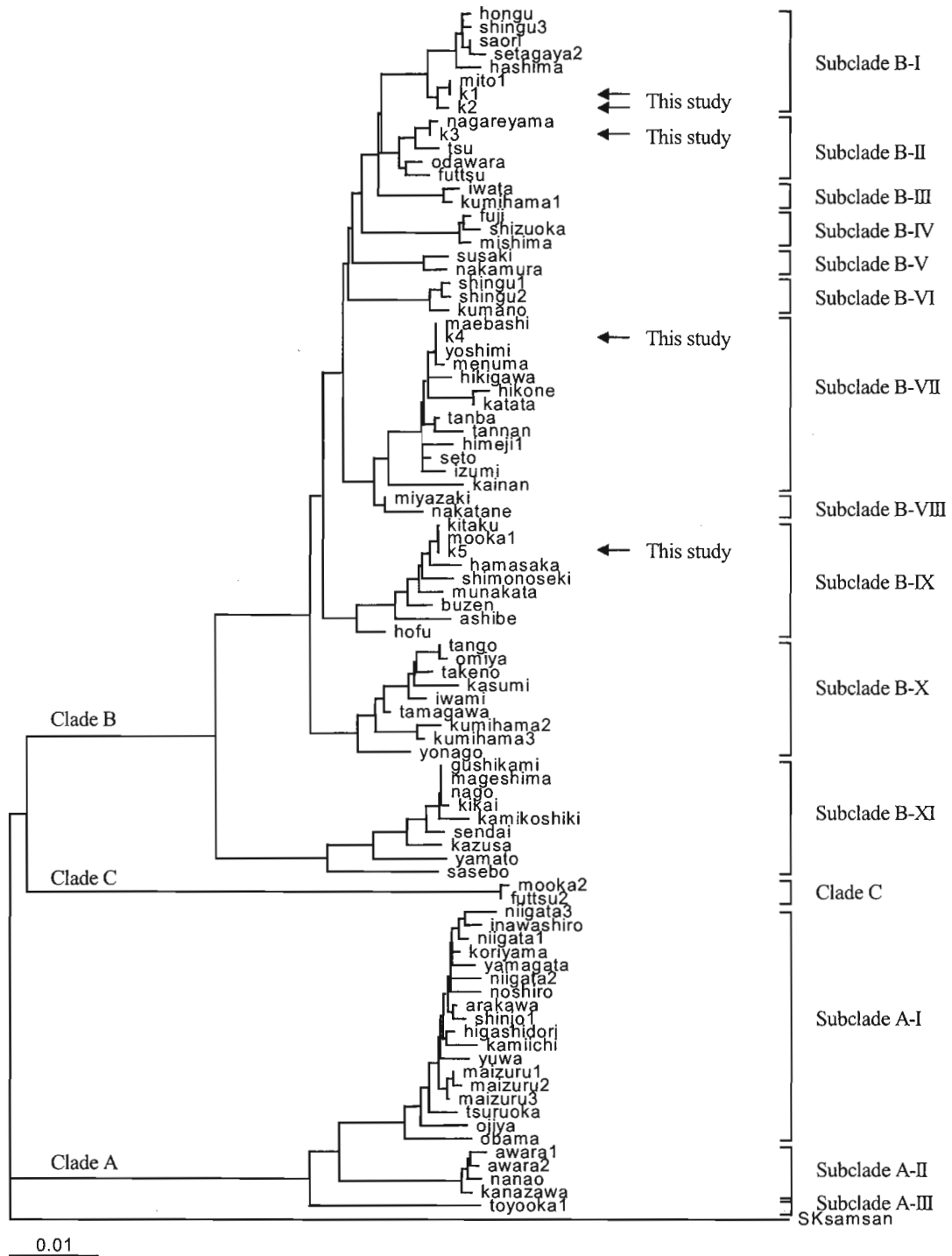


図3 チトクローム**b**遺伝子配列を用いたメダカ個体群の分子系統樹。今回の対象範囲では5つのハプロタイプ (K1, K2, K3, K4, K5) が確認された。その他のハプロタイプはTakehana *et al.* (2003)による分析結果である。

(2) 水域エコロジカルネットワーク修復計画の比較

3つの水域エコロジカルネットワーク計画について、最小コストパス、コスト距離およびCIEN値を算出した結果は図4に示すとおりである。今回用いたコスト属性は標高と土地利用のみであったが、算出された最小コストパスはほとんどが河川や水路をトレースしていた。

プランY (表-2, 図4) はプランXに加えて移入個体群

生息地 (St.1) 付近に拡散抑制対策を試みた計画であるが、St.1がすでに拡散容易な位置にあり、かつ、St.4と近傍関係にあるために、CIEN値の減少率は小さかった。それに対し、St.2とSt.3のみを対象とするプランZでは、CIEN値が14.72から5.37へと半分以下に減少し、プランXやYに比べて効果的なネットワークパス選択であることが数値として表現された。

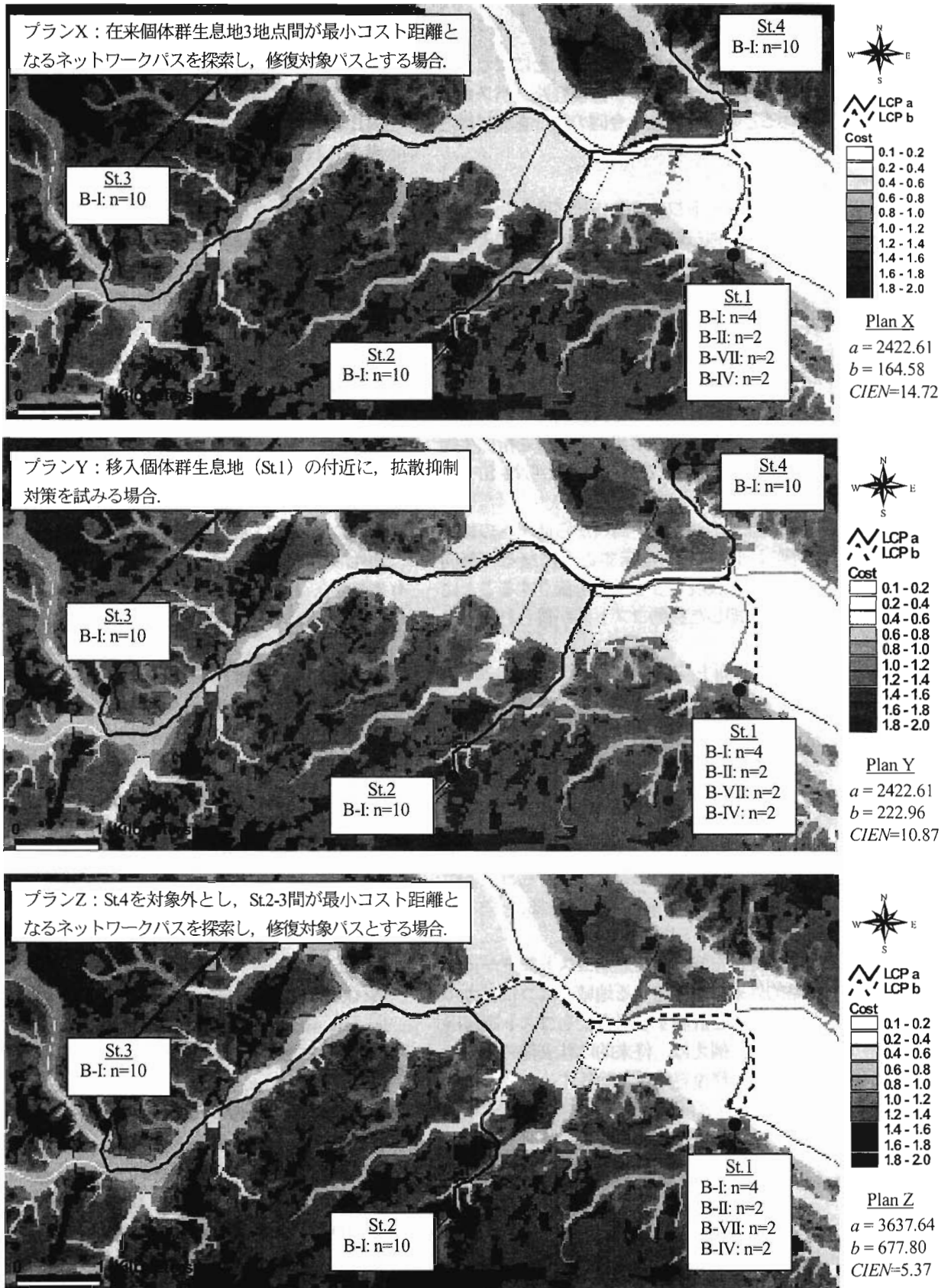


図4 独自設定した水域エコロジカルネットワーク計画(表-2)の比較。St.1-4：調査地点，B-I, B-II：在来個体群のSubclade，B-VII, B-IX：移入個体群と識別されたSubclade，n：遺伝分析個体数，LCP a：対象とする在来個体群間の最小コストパス，LCP b：最近傍移入個体群生息地から在来個体群生息地間最小コストパスへの最小コストパス，CIEN：式1a, 1bを参照。

4. 考察

遺伝情報とコスト距離概念を活用することにより、最適な水域エコロジカルネットワーク修復経路（パス）の選択が容易になると考えられた。今回の試行を経て得た知見は次の5点である。

1) 指標生物の選択

水域エコロジカルネットワークを指標する生物の選択は極めて重要である。遺伝解析を実行することにより、形態形質からでは識別困難な地域個体群を比較的容易に推定することができるが、そのためにはプライマーや分析プロトコルのほか、バックグラウンドデータとよばれる既往のDNA塩基配列情報の存在が不可欠である。現在、DDBJ/EMBL/GenBankといったDNAデータバンクが存在するので、対象生態系において代表的な種であると同時に、遺伝解析に関する既往情報がある種を指標生物として選定することが効果的であると考えられる。

2) 標高値の取り扱い

今回のコスト距離算出法では、高所から低所への移動とその逆の移動は同じコストを示すことになる（無向性）。今後は有向性を表現しうる手法を確立することにより、さらに実態に即した移動コスト値が得られるものと考えられる。

3) 通過コスト設定の向上

土地利用形態といった定性的情報のかわりに、例えば冠水頻度などの定量的情報があれば、より指標生物の生態特性にあわせた通過コスト値の設定が可能になると考えられる。

4) 対策評価指標としての活用

プランYとして示したように、移動障害となる人工構造物の除去や設置といった対策効果についてもコスト距離指標による評価が可能であると考えられる。

5) 侵略的外来種が存在する場合への活用

対象種毎に生態特性を考慮した通過コスト設定が可能であれば、侵略的外来種が存在する地域にエコロジカルネットワーク修復事業を計画する場合にもコスト距離指標は適用可能であり、例えば、将来的に外来種の侵入可能性が高い水域を予め修復経路から除外するといった応用例も考えうる。

5. 結論

通過コスト設定の向上や有向性の表現といった今後の検討項目はあるが、[指標生物の選定]—[生息分布状況の把握]—[遺伝解析による移入個体群の識別]—[地形や土地利用情報の整理]—[GISを用いたコスト距離指標の算出]という一連の手順により、最適な水域エコロジカルネットワーク修復経路の選択が容易になると考えられた。

自然再生事業には昔への視点が欠かせないが、近年では土地利用変化に伴って好適な生物生息場面積が減少し、侵略的外来種や移入個体群が存在するなかで、種や個体群の存続性や多様性を維持するためには、今回のような指標を用いて「場の配置」を重要視した計画案の定量的相対比較を可能にすることが現実的な解決策を導くものと考えられる。

謝辞：メダカ生息場所に関する基礎情報を提供して下さった茨城県自然博物館の中舘主任学芸主事やNPOアサザ基金の皆様、現地調査や測量情報提供などについてご協力くださった霞ヶ浦河川事務所の皆様に厚くお礼を申し上げます。

参考文献

- 1) 片野 修：ナマズはどこで卵を産むのか，創樹社，1998.
- 2) 片野 修，細谷和海，井口恵一郎，青沼佳方：千曲川流域の3タイプの水田間での魚類層の比較，魚類学雑誌，Vol.48，pp. 19-25，2001.
- 3) 田中正彦：水田・水路の魚類—淡水魚類からみた土水路の重要性，遺伝，Vol. 53，pp. 36-40，1999.
- 4) 斎藤憲治，片野 修，小泉顕雄：淡水魚の水田周辺における一時的水域への侵入と産卵，日本生態学会誌，Vol. 38，pp. 35-46，1988.
- 5) 湯浅卓雄，土肥直樹：岡山県における水田及び水田に類似した一時的水域で産卵する淡水魚群—アユモドキを中心として—，淡水魚保護，Vol. 2，pp. 120-125，1989.
- 6) 真田誠至，藤田裕一郎：小河川水系における魚類生息空間評価に関する研究，河川技術論文集，Vol. 9，pp. 97-102，2003.
- 7) 片野 修：水田・農業水路の魚類群集，pp.67-79，江崎・田中(編)，水辺環境の保全，朝倉書店，1998.
- 8) 真田誠至，藤田裕一郎：水系の連続性を考慮した魚類生息空間に関する調査，水工学論文集，Vol. 46，pp. 1157-1162，2002.
- 9) Takchana T., Nagai N., Matsuda M., Tsuchiya K. and Sakaizumi M.: Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in Japanese wild populations of Medaka, *Oryzias latipes*, *Zoological Science*, Vol. 20, pp. 1279-1291, 2003.
- 10) Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K., and Nishida, M.: A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol.20, pp.275-285, 2001.
- 11) Thompson, J.D. Higgins, D.G., Gibson, T.J.: CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 22, pp. 4673-4680.
- 12) Ray, N.: PATHMATRIX: a GIS tool to compute effective distances among samples, *Molecular Ecology Notes*, Vol. 5, pp. 177-180, 2005.

(2006. 4. 6受付)