

小河川および農業水路網における 魚類の遺伝的多様性と希少種の生息環境 －長良川・犀川流域を対象として－

和田 清¹・渡邊 美咲²・寺町 茂³

¹正会員 (独)国立高専機構 岐阜工業高等専門学校 教授 (〒501-0495 岐阜県本巣市上真桑2236-2)

E-mail: wada@gifu-nct.ac.jp

²学生会員 (独)国立高専機構 岐阜工業高等専門学校 専攻科 建設工学専攻 (同上)

E-mail: 2014k17@edu.gifu-nct.ac.jp

³非会員 水圏環境研究会 (〒501-0417 岐阜県本巣市屋井936-1)

本研究は、長良川・犀川流域において、人工化が進む中小河川や農業水路、水田を往来し、生態系ネットワークの連続性を把握する上で指標となる在来種タモロコに着目し、マイクロサテライトDNA手法を用いて、世代を越えた移動の履歴から個体群の遺伝的分化状況を把握し、優先的に保全・整備すべき地点を選定した。また、本巣市内の水域の魚類生息分布の類似度は、4つのクラスターに分類され、犀川流域において、魚類の個体数・種類数が多く、遺伝的多様性が高い生息場と連結した流路網の上下流間で、遺伝的分化が著しく低下している地点が抽出された。さらに、絶滅危惧IA類指定のハリヨを対象にして、湧水、水中植生、河床材料などの生息場の環境要因が抽出され、ハリヨの生息適地には、水中植生の存在や、湧水により冬季でも水温が一定に保たれた区間に限定されることなどが明らかにされた。

Key Words : *genetic diversity, habitat, microsatellite DNA, agricultural channel network, Gnathopogon elongatus, Gasterosteus microcephalus*

1. 研究の背景と目的

近年、河川改修工事や農業水路の整備では、生物生息環境への配慮が不可欠となっており、治水安全度の向上や灌漑用水の安定供給などととも、魚類などの水生生物に適した生態系ネットワーク保全の具体策が求められている。そのネットワークの機能をより正確に把握するためには、現地調査により生息場の多様性および種の多様性を把握し、さらに、採捕された生物個体群をもとに遺伝的多様性を含めて総合的に検討する必要がある。

岐阜県郡上市の大日ヶ岳を源流に、伊勢湾へと注ぐ長良川の支流に、本巣市内を流れている犀川がある(図-1参照)¹⁾。また、犀川の支流の長護寺川は、過去の生物調査において、他の長良川支流に比べて生物の多様性が高いという調査結果が得られている。また、環境に配慮した河川改修工事を行うに当たり現状河川環境を詳細に把握するために、2006年より環境調査が実施され、岐阜県希少野生生物であるハリヨが確認されている。その要因として、根尾川・揖斐川に隣接する湧水や水中植生な

どの物理的環境のポテンシャルの高さが寄与しており、人為改変の圧力の中でも生息場の保全が生物多様性の維持に貢献していると考えられる。

さらに、この流域においても在来種タモロコの遺伝的多様性に関する予備的調査が行われている¹⁾。2012年、長良川水系で採捕された8個体のタモロコ属を遺伝子解析した結果、6個体がタモロコ、2個体が琵琶湖固有種のホンモロコのミトコンドリアDNAが混在しているとの報告がある。長良川に棲むタモロコは、長良川の支川である犀川に産卵し回遊する生活史である。このことより、犀川流域のタモロコにも遺伝的攪乱の影響が及んでいる可能性が考えられるが、詳細な解析は行われていないのが現状である。また、タモロコを保全するためには、過去から現在に至るにおける本種の減少過程を知るため、マイクロサテライトDNA手法などを用いて遺伝的情報を加味し、個体群の遺伝的多様性評価、将来的な存続性を検討していくことが求められる。

そこで本研究は、長良川・犀川における人工化が進む流域において、河川や農業水路、水田を往来し、生態系



図-1 対象流域

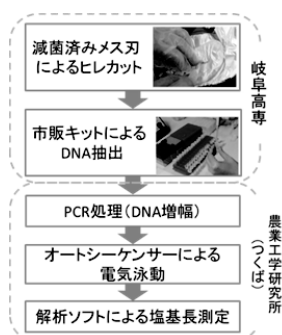


図-2 マイクロサテライトDNA分析手順

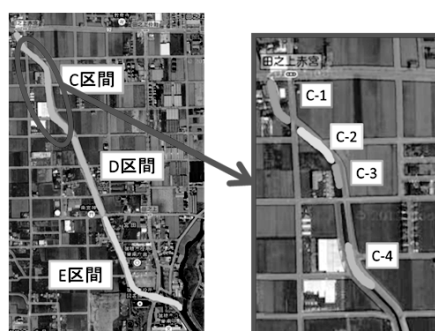


図-3 対象区間 (長護寺川)

ネットワークの連続性を把握する上で主要な在来種タモロコに着目し、マイクロサテライトDNA手法を用いて、世代を越えた移動の履歴から個体群の遺伝的分化状況を把握し、優先的に保全・整備すべき地点を選定する。さらに、絶滅危惧IA類指定のハリヨを対象にして、湧水、水中植生、河床材料などの生息場の環境要因を抽出する。

2. 研究方法

(1) 類似度指数評価 (本県市内の流域)

魚類数が多い夏期 (2014年7月16日～9月6日) に岐阜県本県市内にある水域のうち19地点 (池を含む) を対象に魚類生息調査を行った。調査は河川、農業用水路規模に応じて、投網、たも網、さで網で採捕し、36種2068個体 (在来種: 19種1788個体, 外来種: 2, 希少種: 15, 278) が確認された。各支川の魚類相の類似性を検討するため、その地点に生息する魚の種類・個体数をもとに、類似度指数を求めた。類似度指数の求め方は、Homの重複度指数を用いた (式(1))²⁾。

$$R_0 = \frac{\sum (x_i + y_i) \log(x_i + y_i) - \sum x_i \log x_i - \sum y_i \log y_i}{(X + Y) \log(X + Y) - X \log X - Y \log Y} \quad (1)$$

ここで、 x_i 、 y_i : それぞれの地点の*i*種の出現個体数、 X 、 Y : それぞれの地点の個体数の合計である。この結果より、デンドログラム (樹形図) を作成し、階層クラスター解析を行った。

(2) マイクロサテライトDNA分析 (犀川流域)

a) プライマーの選定

タモロコのマイクロサテライト遺伝子座については14遺伝子座が開発されている³⁾。そこで、14遺伝子座の中から犀川流域に生息するタモロコに適した遺伝子座の選定を行った。犀川流域の14流路32地点でタモロコ (約200尾) を採取した。プライマーの選定方法については、そのうちの16地点 (各1尾) のタモロコを用いた。DNA抽出には市販キット (QIAGEN製) を用い、図-2に示した手順で分析を行った。

b) 解析方法

標本内の遺伝的多様性については、各遺伝子座における対立遺伝子数およびヘテロ接合度を推定した⁴⁾。式(2)で示されるヘテロ接合度 H_E は遺伝子座におけるヘテロ接合型の遺伝子頻度に相当し、遺伝子多様度の指標として、0～1の値をとり、1に近いほど多様度が高いことを示している。複数の集団間の遺伝的分化 (分化) については、各集団にHardy Weinberg平衡を仮定した上で、遺伝的分化尺度 F_{ST} を式(3)より算出し、その値を用いて系統樹作成を行った。 F_{ST} の評価基準については、0～0.05で分化なし、0.05～0.15で中度、0.15～0.25で高度、0.25以上できわめて高度に分化していると判断した。

$$H_E = \frac{2N(1 - \sum a_i^2)}{2N - 1} \quad (2)$$

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T} \quad (3)$$

a) で得られたプライマーを用いて、犀川流域の18地点 (各4尾) と、サンプル個体数によるヘテロ接合度の変動を評価するための1地点 (10尾)、計19地点 (82尾) について解析を行った。サンプルの時期としては、越冬のため支川間の移動が少ないと考えられる冬期 (2013年12月4日～2014年1月22日) の個体を使用した。

c) 河川横断工作物の現地調査

マイクロサテライトDNA分析の結果から、遺伝的分化が異なる地点間について、河川横断工作物 (水門、堰、落差工) や水中植生等の現地調査を行った⁵⁾。河川横断工作物については、形式、落差や水路幅などの流れの不連続性に関連する要因に着目した。

(3) ハリヨの生息場の環境要因 (長護寺川)

a) 生物調査データ解析

2010年から2013年にかけて行われた長護寺川の生物調査データを用いて、6区間 (上流から C-1, C-2, C-3, C-4, D, E) の、季節ごと、区間ごとの魚類生息分布状況の把握をした (図-3 参照)⁶⁾。

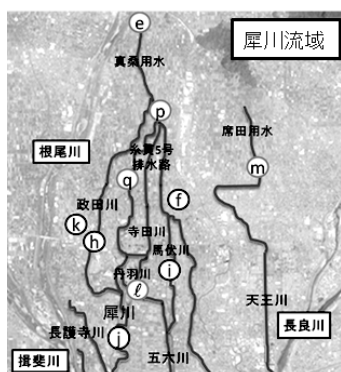


図-4 犀川流域の調査地点

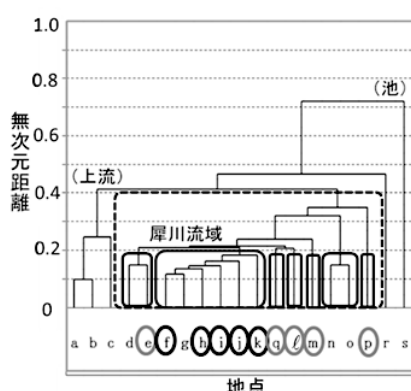


図-5 樹形図（クラスター分析）

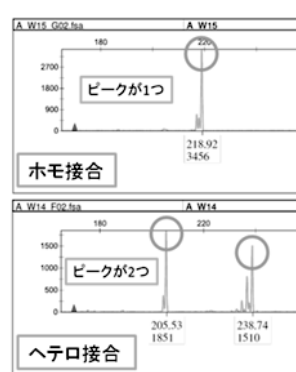


図-6 シーケンスデータの波形

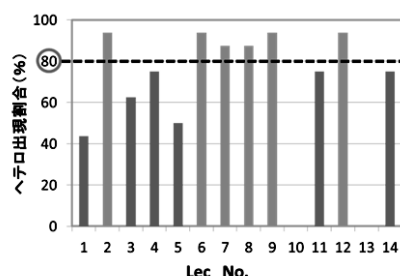


図-7 プライマーの選定結果

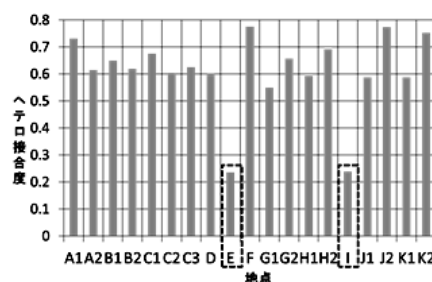


図-8 ヘテロ接合度

各区間の生物相の類似性を検討するために、類似度係数を求めた。その算定方法は、前述した Horn の重複度指数（式(1)）を用いて、デンドログラム（樹形図）を作成し、クラスター解析を行った。

b) 湧水などのモニタリング

希少種が生息する長護寺川の河川環境を把握するため、水温、湧水箇所、植生分布、河床材料などの調査を行った。長護寺川の C-1～E 区間に、湧水のある箇所と無い地点、計 10 個の温度データロガー（10 分間隔）を設置し計測した。湧水箇所、河床材料などは、著者の一人と岐阜県河川課による現地踏査の結果を参照した。植生分布は、2014 年 1 月 25 日に現地に出向き 2012 年の調査結果を照らし合わせながら追加調査を行った。

3. 結果および考察

(1) 類似度指数（本県市内水域）

図-4は犀川流域の調査地点を示したものであり、図-5は魚類の種類数と個体数からクラスター解析による樹形図を表したものである。同図から、閾値0.4で設定した場合、犀川流域にある調査地点が同じ1つのクラスターに属することがわかる。また、そのクラスターに対して、閾値0.2を設定した場合には、7つのクラスターに細かく分類された。犀川流域の10地点についてマッピングする

と、比較的近い地点間の魚類組成には類似性がみられる（図-4参照）。魚類相の類似性や差異は流路の環境条件や連続性に関連し、生態系ネットワークが機能していると考えられる。また、詳細に見ると、地点h, j, kについては、同一の合流点（犀川）が近いこと、魚類組成が類似している。地点elはコンクリート三面張り水中植生がなく、魚類に適した環境ではないため、最も種類数が少ない（4種）。地点lでは最も多くの種類数（24種）が生息しており、現地調査では湧水が確認されている。この地点には、湧水性であるスナヤツメや準湧水性のアブラボテ、タカハヤ、ドンコなども生息している。これらのことより、護岸の違いや湧水、水中植生の有無により、生息する魚類の組成が大きく異なっている。

(2) マイクロサテライトDNA分析（犀川流域）

14遺伝子座からのプライマーの絞り込みは、シーケンスにより得た波形グラムデータから判断した。図-6はその結果を示した一例であり、ピークが1つのホモ接合、2つの場合はヘテロ接合となる。図-7はプライマーのヘテロ出現割合を示したものである。Lec10とLec13の2遺伝子座は分析不可となったため、有効なプライマーは12遺伝子座である。さらに、ヘテロ接合度の出現割合を80%に設定し、プライマーを絞り込んだ。その結果、Lec01, Lec03, Lec04, Lec05, Lec11, Lec14の6遺伝子座

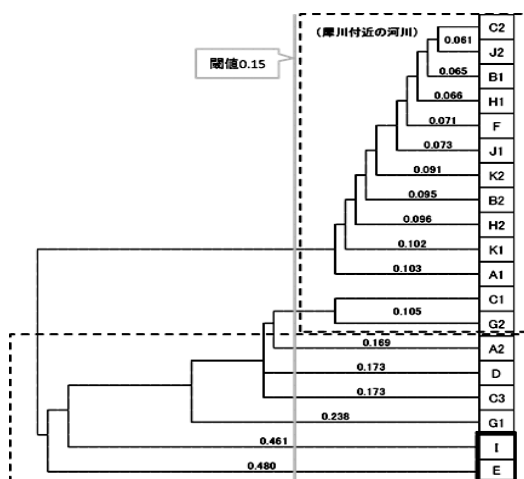


図-9 遺伝的分化尺度の類形化

に絞り込まれた。以下では、犀川流域のタモロコに有効なプライマーは、この6遺伝子座であるとして遺伝的多様性の解析を行った。

図-8は各地点のヘテロ接合度を示したものである。地点E、Iの2地点はヘテロ接合度が他に比べて低いため、遺伝的多様性が失われつつあることがわかる。さらに、両者の遺伝的分化尺度 F_{ST} を算出した結果、 F_{ST} が 0.40 以上と高く、極めて高度に分化していることがわかった。

図-9は F_{ST} を樹形図で類形化したものである。同図より、 F_{ST} の閾値0.15を境に、クラスターが大きく2つに分類され、犀川と直接連結されている上流側の河川、隣接する河川は同じクラスターに分類されていることがわかった。犀川とそれに隣接する河川間には、農業水路が配置されていることが確認され、これらの水路網により、各河川間に生息する魚類の交流が可能となり、遺伝的な類似性が近いものと考えられる。また、閾値0.15とした場合のクラスターについてマッピングした結果、同じ水路のネットワークにおいて、上下流で遺伝的分化が異なる地点が4箇所抽出された(図-10参照)。これらの地点は、流路間で分断されている可能性があると考えられる。

とりわけ、地点I、Fは遺伝的分化の進行が異なり、現地調査を行ったところ、数十cm程度の落差が確認され、遊泳力の弱い魚類にとっては、下流から上流への移動が困難な状況であった(図-11参照)。さらに、種の多様性と遺伝的多様性の関連をみるために、魚類の種類などに関連する図-5と遺伝的分化の図-10を比較すれば、魚類の個体数、種類数が多い地点Iと、遺伝的分化が小さい地点Fはほぼ同一地点である。上流Iは水路は単調な直線で幅が狭く(幅2.0m)、コンクリート3面張り、セキショウモとコカナダモが水路底面を覆っていた(図-12参照)。下流Fは水路幅が広く(6.2m)、砂礫河床、水中植生(セキショウモ、コカナダモ、ササバモ)や河畔

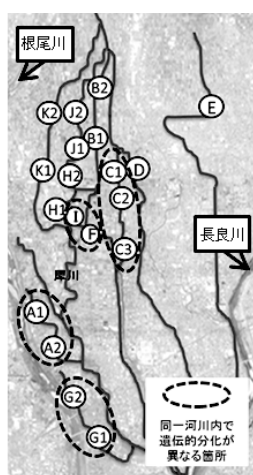


図-10 F_{ST} によるマッピング



図-11 落差工(I-F間)



図-12 地点I



図-13 地点F

林が存在しており、生息場の多様性は高い(図-13参照)。地点I、F間では落差工を境に、対照的な区間となっており、遺伝的分化が地点I、Fで異なるのは魚類の生息環境に直結する水路形態の差異が大きく影響している。また、河川横断工作物の設置は、魚類の生息域の分断化を加速させている要因の一つであると考えられる。

(3) ハリヨの生息場の環境要因(長護寺川)

図-14は、長護寺川の区間C、D、Eにおける個体数と種類数を季節ごとの経年変化で表したものである。同図から在来種や外来種は年や季節で大きく変化するが、定住型に分類されるハリヨやメダカなどの希少種については大きな変化は見られない。これらのデータをクラスター解析を行った結果、C-I、E区間は他の区間とはタイプが違う場合が多いことがわかった(表-1参照)。調査区間は全長1.5kmにも満たない短区間であり、生物相の類似度は生息環境条件の大きく依存すると考えられる。

そこで、湧水域に生息するハリヨに着目して、河川環境を把握し、ハリヨの生息場に及ぼす要因を抽出するために、まず、ハリヨの生息分布を表したのが図-15である。春季に産卵期を迎えるため、春季の個体数は多くなっているが、冬季でも確認され一年間を通して生息していることがわかる。また、区間ごとで比べるとC区間に多く分布している。特にC-Iに多いものの年々個体数は減り、C-2、C-3区間に多く確認されるようになった。2014年1月25日に長護寺川の湧水箇所を調査した結果、C-1区間11地点、C-2区間3地点、C-3区間1地点、C-4区間4地点、E区間15地点(D区間施工のため未調査)であった。図-16は湧水情報を得るためにデータロガーで水温を連続測定した結果の一例を示したものである。同図から、湧水がある場合の水温は14℃～16℃ではほぼ一定に保たれていること、湧水が無い場合には8℃～12℃で日

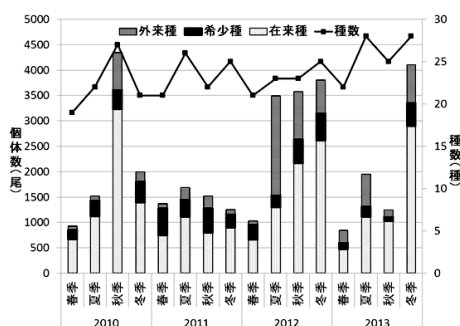


図-14 個体数・種数の経年変化（長護寺川）

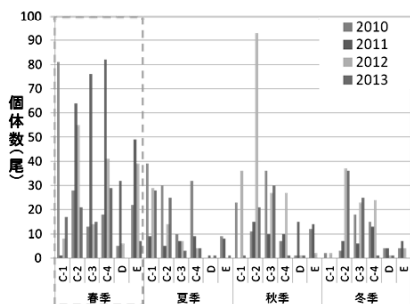


図-15 ハリオの生息量

変動が大きいことなどがわかる。一方、水中植生の分布を調べた結果では、コカナダモ、ササバモ、シャジクモ、セキシウモなどが生育し、2012年C-1区間に生えていた水草が2014年は減少していた。河床材料のシルトの堆積状況の結果と照らし合わせると、C-1区間は全体的にシルトが堆積し、多いところでは28cm堆積していたため、この影響により水草が埋まりなくなったと考えられる。ハリヨの生息数が少なくなったC-1区間は、湧水が11地点と他の区間に比べ多くあり水温が一定に保たれているものの生活排水によるヘドロ分やシルトの堆積により植生が生育していない状況である。また、ハリヨの生息数が多くなったC-2～C-4区間は、発見された湧水は少なかったが、水中植生が豊富に生育していた。最下流のE区間は、D区間で工事が行われているため、その影響で個体数が減少していると考えられる。これらより、長護寺川でのハリヨの生息適地としては、ヘドロやシルトがなく、水中植生があり、湧水により冬季や夏季の水温が一定に保たれたC-2～C-4区間が相対的に有利であることが示唆された。

4. 結論

本研究により以下のことが示された。

- 1) 本県市内水域の代表地点（19地点）の魚類生息分布の類似度は、詳細には4つのクラスターに分類された。また、犀川流域の10地点については同じクラスターに分類され、大局的には魚類の生態的ネットワークの機能が維持している。

表-1 類似度係数のクラスター化

		クラスター1	クラスター2	クラスター3	クラスター4	クラスター5
2010	春季	C-1, C-2, C-3, C-4, D	E			
	夏季	C-1, C-2, C-3	C-4	D, E		
	秋季	C-3, C-4	C-1	C-2	D	E
	冬季	C-4, D, E	C-1	C-2	C-3	
2011	春季	C-2, C-3, C-4	C-1	D, E		
	夏季	C-1, C-2, C-3, C-4	D	E		
	秋季	C-1, C-2, C-3, C-4	D	E		
	冬季	C-1, D, E	C-2	C-3	C-4	
2012	春季	C-1, C-2, C-3	C-4	D	E	
	夏季	C-2, C-4, E	C-1	C-3	D	
	秋季	C-1, C-2, C-4	C-3, D	E		
	冬季	C-2, C-3, C-4, D, E	C-1			
2013	春季	C-2, C-3	C-1	C-4	D	E
	夏季	C-2, C-3, C-4	C-1	D	E	
	秋季	C-3, C-4, D	C-1	C-2	E	
	冬季	C-4, D, E	C-1	C-2	C-3	

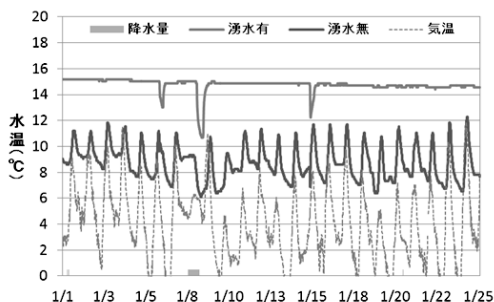


図-16 冬季水温の時系列変化

- 2) 在来種タモロコのプライマーについては、ヘテロ接合度の出現割合を80%に設定しプライマーを絞り込んだ結果、対象流域では6遺伝子座が犀川流域のタモロコに有効であることが示された。
- 3) 遺伝的分化状況を分析した結果、同じ流路ネットワークの上下流間で遺伝的分化が大きく異なる4ヶ所 (F_{ST} の最大値=0.43) が抽出された。また、この下流側の地点I (F) は魚類の種類数や個体数が多く（24種313個体）、タモロコの遺伝的多様性も高く ($H_E=0.78$)、魚類の生息環境のポテンシャルが高い地点であるため、今後も保全すべき区間である。
- 4) 犀川の支川長護寺川には、希少種ハリヨが年間を通して生息しており、洪水時などの避難場所としての水中植生（コカナダモ、ササバモ、シャジクモ、セキシウモなど）や河床材料に加えて、根尾川・揖斐川に隣接した湧水環境が大きく関連しており、冬季や夏季の水温環境を緩和していることなどが明らかにされた。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、タモロコのマイクロサテライトDNA分析においては、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 農村工学研究所・生態工学研究室の小出水規行博士、長護寺川の調査データについては岐阜県岐阜土木事務所河川砂防課、犀川流域における河川や農業用水における魚類調査では、水圏環境研究会の会員諸氏に多大なご協力をいただいた。最後に記して謝意を表します。

参考文献

- 1) 岐阜県：犀川圏域河川整備計画, pp.1-3, 2004.
- 2) 小椋将弘：Excel で簡単多変量解析, 講談社, pp.172-195, 2008.
- 3) NORIYUKI KOIZUMI : Fourteen polymorphic microsatellite loci in the field gudgeon, *Gnathopogon elongatus elongatus*, Molecular Ecology Notes 7, pp.240-242, 2007.
- 4) 水谷正一・森 淳：春の小川の淡水魚, その生息場と保全, 学報社, pp.121-148, 2009.
- 5) 渡邊美咲・和田 清・寺町 茂：小河川・農業用水ネットワークにおける魚類の多様性と環境要因, 土木学会中部支部研究発表会講演集, VII-30, pp.549-550, 2015.

(2015. 8. 28 受付)

GENETIC DIVERSITY AND HABITAT FOR NATIVE SPECIES OF FISHES IN A STREAMS AND AGRICULTURAL CHANNEL NETWORK - IN THE CASE OF NAGARA-SAI RIVER BASIN -

Kiyoshi WADA, Misaki WATANABE and Shigeru TERAMACHI

This study investigated habitat of genetic diversity and the rare species of fish in Nagara-Sai River. In the genetic diversity, the study using microsatellite DNA technique was conducted that focus on native species, *Gnathopogon elongatus* which came and went in a river and an agriculture irrigation system, a rice field. The following results were provided. The spots of the Sai River basin are classified in the same cluster, and in perspective the function of the network of the habits of fish maintains it. A primer of *Gnathopogon elongatus* was chosen to six. Four places of spots where greatly varied in a genetic divergence were extracted in the same river-channel network. It is clarified that rare species, *Gasterosteus microcephalus* inhabits Chogogi River through the year, some springs are greatly related and relaxes water temperature environment in the winter season in addition to underwater vegetation and riverbed materials.