

# DNA多型分析技術の河川環境への適用について

## 【中間報告】

Application of DNA polymorphism analysis technology to the river environment  
(interim report)

研究第一部 主任研究員 城戸 和寿  
研究第三部 研究員 後藤 勝洋  
技術普及部 部長 佐合 純造  
東北大学大学院工学研究科 大村 達夫  
東北大学大学院工学研究科 渡辺 幸三

平成9年の河川法改正に伴い、従来の河川整備の柱である「治水」、「利水」に「環境」が加えられ、新たな河川行政の方針が示された。また、平成15年には、過去に失われた生態系その他の自然環境を取り戻すことを目的とした「自然再生推進法」が施行されており、我が国の河川、湿原、干潟、藻場、里地、里山、森林、サンゴ礁などの自然環境を保全・再生・創出することが求められている。

一方、平成4年(1992)の国連環境開発会議(地球サミット)で調印された生物多様性条約では、生物多様度を「生態系」、「種」、「遺伝子」の3つのレベルで捉え、それらの保全等を行うことが明記されている。

これまで、河川生物の生物多様性は、種の多様性を対象とした評価およびそれに基づく河川整備が行われてきたが、生物多様性の保全をより適切に進めていくためには、種多様性の尺度からだけでなく、種の中の個体間の遺伝的な違いである「遺伝的多様性」という尺度も必要と考える。この遺伝的多様性は、「DNA多型分析」を実施することで可能になると考える。今回は、この遺伝的多様性を評価するため、DNA(デオキシリボ核酸)多型分析に焦点をあて、その具体的な適用方法等について提案することを目的としたものである。

本報告は、適用方法の具体化に先だって基礎的な調査・分析を行ったものであり、結論を導き出すには至っていないため、途中経過を報告する。

キーワード：DNA、ヘテロ接合度、遺伝的多様性、遺伝距離、河川環境、ウルマーシマトビケラ

The amendment of the River Act in 1997 added a new objective, namely, environmental conservation, to the two main objectives, "flood control" and "water utilization," of river improvement, and a new policy for river administration was indicated. In 2003, the Nature Restoration Promotion Act was enacted with the aim of restoring lost ecosystems and other natural environments. The new law calls for the conservation, restoration and creation of natural environments in Japan including rivers, wetlands, seaweed beds, rural areas, forests and coral reefs.

The Convention on Biological Diversity signed at the United Nations Conference on Environment and Development (Earth Summit) in 1992 views biological diversity at three levels, namely, ecosystem, species and genetic, and calls for conservation efforts at those levels.

The conventional practice in river improvement is to evaluate biological diversity at the species level and plan and implement river improvement accordingly. For better conservation of biological diversity, however, it is necessary to take into consideration genetic diversity, which is the genetic variety among individuals within a species, as an indicator of biological diversity, as well as the variety of species. Genetic diversity can be evaluated by conducting a DNA polymorphism analysis. Focusing on this DNA (deoxyribonucleic acid) polymorphism analysis as a means of genetic diversity evaluation, this study aims to propose a concrete method of application and other specifics.

Prepared as an interim report, this paper reports on the basic studies and analyses conducted before developing a concrete method of application and, because a conclusion has not yet been drawn, on what has been achieved thus far.

*Key words : DNA, heterozygosity, genetic diversity, genetic distance, river environment, Hydropsyche orientalis*

## 1. はじめに

平成9年の河川法改正に伴い、従来の河川整備の柱である「治水」、「利水」に「環境」が加えられ、新たな河川行政の方針が示された。また、平成15年には、過去に失われた生態系その他の自然環境を取り戻すことを目的とした「自然再生推進法」が施行されており、我が国の河川、湿原、干潟、藻場、里地、里山、森林、サンゴ礁などの自然環境を保全・再生・創出することが求められている。

一方、平成4年（1992）の国連環境開発会議（地球サミット）で調印された生物多様性条約では、生物多様度を「生態系」、「種」、「遺伝子」の3つのレベルで捉え、それらの保全等を行うことが明記されている。

これまで、河川生物の生物多様性は、種数（分類群数）や多様性指数などの種多様性を対象に評価され、それらを保全・再生するための河川環境整備が実施されてきた。しかし、生物多様性の保全をより適切に進めていくためには、種多様性の尺度からだけでなく、種の中の個体間の遺伝的な違いである「遺伝的多様性」という尺度も必要と考える。この遺伝的多様性は、「DNA多型分析」を実施することで可能になると考える。今回は、この遺伝的多様性を評価するため、DNA（deoxyribo nucleic acid：デオキシリボ核酸）多型分析に焦点をあて、その具体的な適用方法等について提案することを目的としたものである。

本報告は、適用方法の具体化に先だって基礎的調査・分析を行ったものであり、結論を導き出すには至っていないため途中経過を報告する。

## 2. 河川における DNA 多型技術の適用

河川における生物多様性の保全は、その重要性が以前にも増して認識されつつある。河川管理上においても生物多様性を保全するための適切な対応が求められている。

現在、遺伝的多様性として同種内に蓄積されている個体間の遺伝的差異は、将来起こる新種の発生（種分化）のために欠くことのできない原動力となっている。遺伝的多様性が極端に低い種は、近交弱勢により生存率や繁殖力が低下して絶滅しやすい。このため、遺伝的多様性が低下他した地域集団は、長い目で見ると、将来に河川環境が大きく変わった時に、変化後の環境下で遺伝子を存続させる可能性が低くなる。

PCR法などの分子生物学的手法の発達によりDNA多型分析が従前より格段に身近なものになった今、河川分野でのDNA多型分析技術の積極的な導入が期待される。この技術を今後、河川のどのような場面で適

用していくかについて、その可能性を簡単に述べる。

### ① 多自然川づくりや自然再生事業の効果検証

近年、全国各地で実施されている多自然川づくりや自然再生事業において、種数、個体数の変化に対する検証は行われている。しかし、種数や個体数調査は、その方法や時期等の差異や洪水等のフラッシュによる一時的な個体量の低下により、正確な把握・検証とまらない可能性もある。DNA多型分析を併用することによって、外的要因に左右されない遺伝子レベルの把握が可能となり、より精度の高い事業効果の検証を行うことが可能である。

### 自然再生事業等の実施

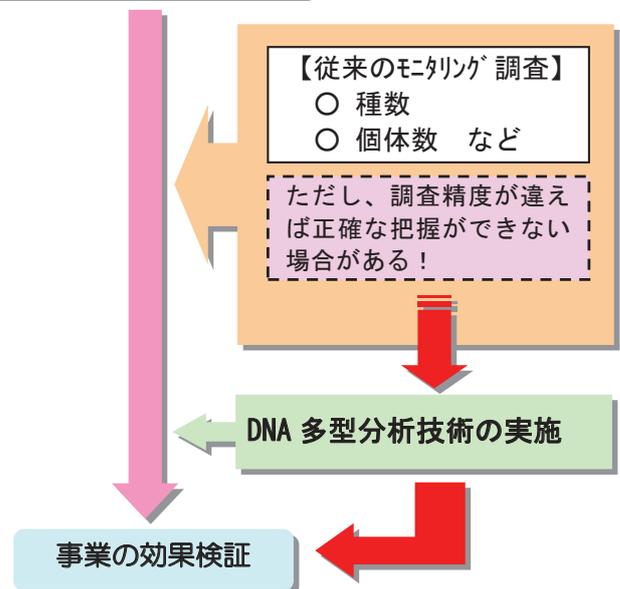


図-1 DNA多型分析技術の適用イメージ

### ② ダム・堰等の横断工作物による河川分断化に伴う遺伝的多様性の評価

ダムや堰等の横断工作物により、平常時の河川流下方向の生物移動が阻害される場合、分断された集団間に起こる遺伝的变化を把握する。また、遺伝子レベルでの差異を把握しておくことで、人為的な種の移入によって生じる遺伝的汚染を防止することも可能である。

### ③ 代替生息地等における遺伝的多様性の評価

河川改修等により、やむを得ず代替生息地の生物を移入・定着させる場合が考えられる。このとき、単純な定量把握・評価だけでなく、遺伝的多様性を把握することで、遺伝子レベルで保全されているかについての検証が可能となる。

### 3. DNA 多型分析技術活用のための現地調査

#### 3-1 DNA多型の分析方法

##### (1) 調査地点

サンプリング調査は、2006年9月19日から10月24日にかけて、宮城県中南部地域の位置する名取川水系、七北田川水系等の6水系73地点にて実施した。このうち、今回対象としたウルマーシマトビケラの生息が確認されたのは、名取川水系40地点、七北田川水系12地点、砂押川水系、増田川水系、川内沢川水系、五間堀川水系各1地点の計58地点であり(図-2)、非生息地(n=15)は各水系の下流域に存在した。したがって、DNA多型分析は生息が確認された58地点を対象として行った。

6水系の中で最も流域面積が大きい名取川水系(=939km<sup>2</sup>)は、奥羽山脈を源として、丘陵地、仙台平野を貫流して太平洋へ注ぐ水系である。流域面積が2番目に大きい七北田川水系(=229km<sup>2</sup>)、も奥羽山脈を源として太平洋へ注ぐ水系である。他の4水系は、標高が比較的低い丘陵を源としており、名取川水系や七北田水系に比べると規模が小さい。調査地域には5つのダム(釜房、大倉、七北田、樽水、忽の関ダム)と一つの自然沼(サイカチ沼)がある。調査地点は、上流から下流にわたり、幅広い河川環境を有している。

##### (2) 対象種

今回、調査対象としたウルマーシマトビケラは、日本列島の溪流等によく見られる水生昆虫である。宮城県中南部において最も分布範囲が大きく、また生態系ピラミッドにおいて魚類よりも下層に位置することから、対象種として選定した。



ウルマーシマトビケラの幼虫は、石の下や礫間に分泌絹糸で作った荒い目の巣網を張って営巣し、巣網にかかる河川水中の粒状性有機物を摂食する造網型トビケラに分類される。網は石の上面、特にコケ類の付着した場所に多く、流れの速い場所に作られることが多い。<sup>1)</sup> 成虫の大きさは8~15mmで、メスは産卵期に600~700個程度の卵を産む。<sup>2)</sup> 羽化は春から秋にかけて水面で行われる。1日あたりの羽化量が少なく、羽化後も舞い上がらずに水面上を滑ってそのまま岸際の茂み等に入り込むことが多い。<sup>1)</sup> ただし、成虫の飛行距離に関する知見はないため、ウルマーシマトビケラの正確な行動範囲は明確でない。

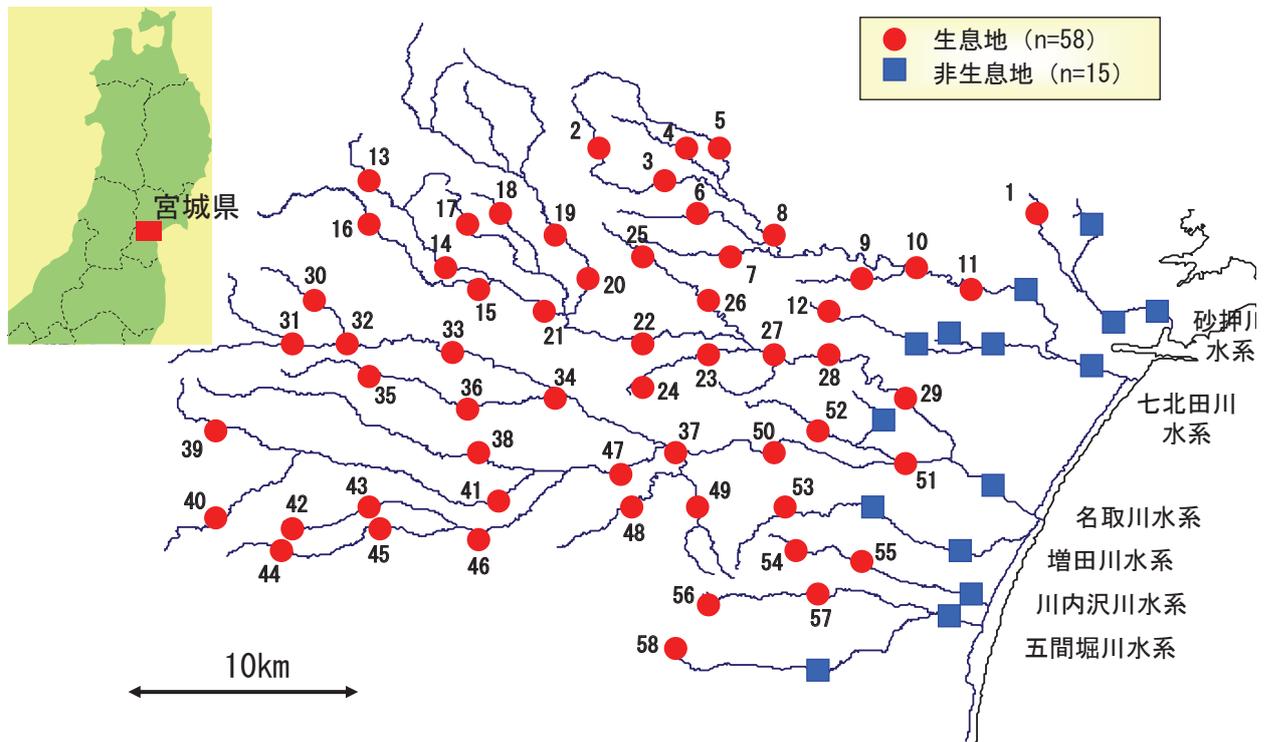


図-2 宮城県中南部6水系の調査地点

(3) サンプリング

サンプリングは平水時に行い、DNA多型分析の検出に十分な個体数(20個体程度)を確保するために、同一地点において、キックネット法(メッシュサイズ:250m)による定性的なサンプリングを繰り返し行った。採取したウルマーシマトビケラは99.5%エタノールで保存し、実体顕微鏡(150x)を用いて同定を行った。生物採取の他に、各地点の川幅、水深、流速、石礫等の環境変数についても調査を行った。

(4) AFLP分析

DNA分析はAFLP法にて実施した。AFLP分析はDNAを制限酵素で断片化し、その中から特定の断片を選択的にPCR増幅して多型を検出する手法である。<sup>3)</sup>本調査では、合計1129個体の幼虫サンプルのAFLP分析を行った。地点当たりの平均サンプル数は19.5であった。既報の方法<sup>4)</sup>に従って、各幼虫個体からDNAをフェノール抽出し、AFLP分析を行った。

(5) データ解析

得られたフラグメント波形データを、各遺伝子座においてピークが検出された場合を1、されなかった場合を0とした0-1データに変換した。全地点の個体をプールした集団の劣性遺伝子頻度が0.05-0.95となる遺伝子座を多型遺伝子座としてデータ解析に用いた。I番目の遺伝子座の劣性遺伝子頻度(qi)は、LynchとMilligan<sup>5)</sup>の方法により算出した。優性遺伝子頻度(pi)は、pi=1-qiより算出した。各地点の遺伝的多様性を評価するために平均ヘテロ接合度(He)を、 $He = (1/r) \sum 2piqi$ より算出した。ここで、rは遺伝子座の総数を表す。Heは0より大きくなるにつれ、遺伝的多様性が増すことを示す。

また、地点間の遺伝的分化の大きさを $\theta$ <sup>6)</sup>で評価した。 $\theta$ は地点間の遺伝的分化がまったく同じである場合に0を示し、0よりも大きいほど遺伝的分化が大きいことを示す。 $\theta$ を連関測度とするUPGMAによるクラスター分析をPHYLP3.6 bのneighborおよびdrawgramで行い、58地点の遺伝系統樹を作成した。作成された遺伝系統樹に基づいて、遺伝構造が類似する地点をグループあるいは各グループ内のサブグループに分類した。

58地点のHeの出現頻度分布について、一様分布および正規分布との適合性をコルモゴロフ・スミルノフ検定でそれぞれ調べた。各地点のHeと20つの環境変数(標高、河口からの距離、緯度、経度、川幅、水深、流速等、石礫の平均粒径等)との相関関係を単相関分

析で調べた。

3-2 分析結果

(1) 遺伝的多様性

全1129サンプルから計135遺伝子座が検出された。このうち65が多型遺伝子座だった。平均ヘテロ接合度(He)の範囲は0.111-0.287で、全地点のHeの平均値は0.193(標準偏差=0.049)だった。

58地点のHeの出現頻度分布を図-3に示した。Heの頻度分布は一様分布との適合性はなく(P<0.01)、正規分布との適合性はあった(P>0.05)。Heの頻度分布には0.15と0.24付近に2つのピークが見られた。Heの出現頻度に基づいて、累積出現確率20%、40%、60%、80%を境界として各地点のHeを、図-4に示すように5段階の相対評価を行った。この評価基準では次のように評価される。

○ 非常に低い	: He < 0.136	【0 - 20%】
○ 低い	: 0.136 < He < 0.171	【20 - 40%】
○ 中程度	: 0.171 < He < 0.213	【40 - 60%】
○ 高い	: 0.213 < He < 0.244	【60 - 80%】
○ 非常に高い	: 0.244 < He	【80 - 100%】

また、各地点の5段階評価の結果を地図上にプロットすると、図-5に示すようになる。

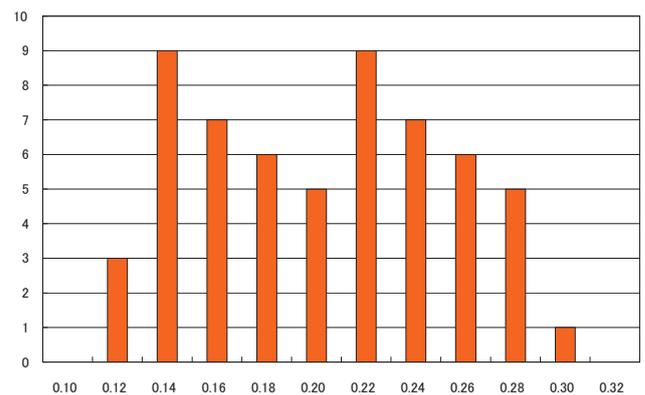


図-3 各地点の平均ヘテロ接合度 He の頻度分布



図-4 平均ヘテロ接合度 He の頻度分布に基づく相対区分

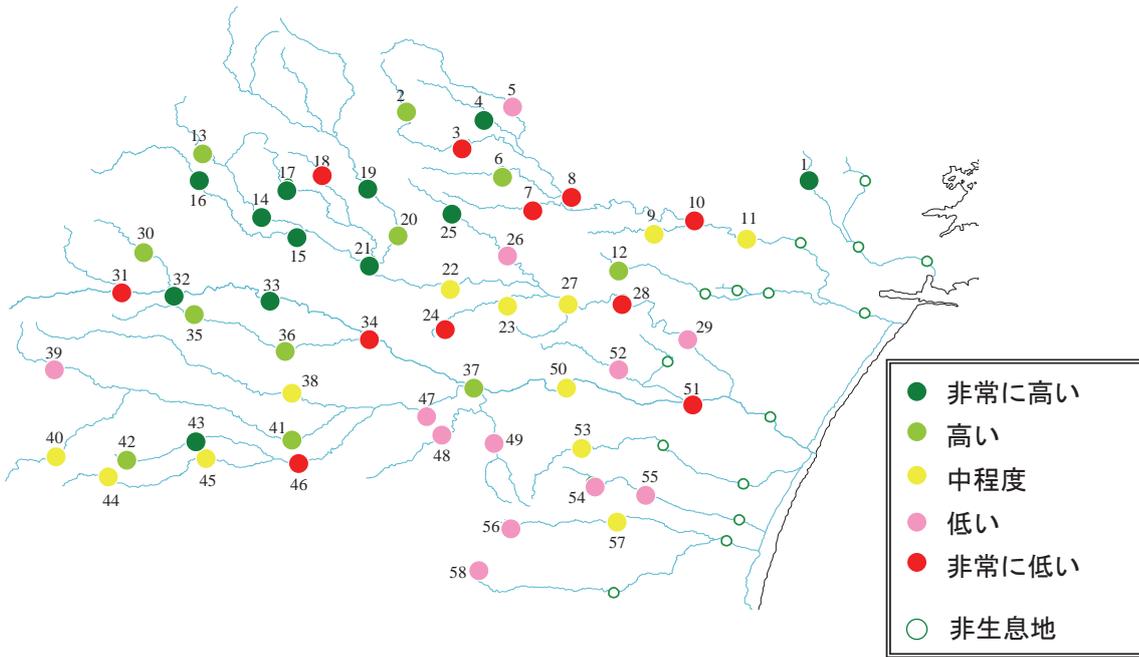


図-5 平均ヘテロ接合度Heの地理的分布

(2) 遺伝的多様性と環境変数との相関

遺伝的多様性と環境変数との相関について、前に示した平均ヘテロ接合度 (He) を用いて検証を行った結果を表-1 及び図-6 (一例としてpHとの相関) に示す。これらを見ると、Heと相関が見られるのは、「緯度」、「経度」、「標高」、「河口からの距離」、「付着藻類量」、「pH」、「SS」、「微細粒状性有機物」、「クロロフィルa濃度」の9変数であった。その他の変数について、有意な相関は見られなかった。

表-1 平均ヘテロ接合度Heと環境変数との相関

環境変数	単位	相関係数	有意確率
平均川幅	m	-0.028	
平均水深	cm	0.006	
平均流速	cm/s	0.172	
礫平均粒径	cm	0.194	
緯度	rad	0.291	*
経度	rad	-0.313	*
標高	m	0.358	**
Stream order	-	-0.104	
河口からの距離	km	0.390	**
付着藻類量	Chla mg/cm2	-0.301	*
FBOM	g AFDM/cm2	-0.232	
電気伝導度	μs/m	-0.144	
pH		-0.419	**
BOD	mg/L	-0.211	
SS	mg/L	-0.265	*
FPOM	mg AFDM/L	-0.261	*
クロロフィルa	mg/L	-0.301	*
TIN	mg/L	-0.204	
PO4-P	mg/L	-0.203	
堆積土砂平均粒径	mm	0.216	

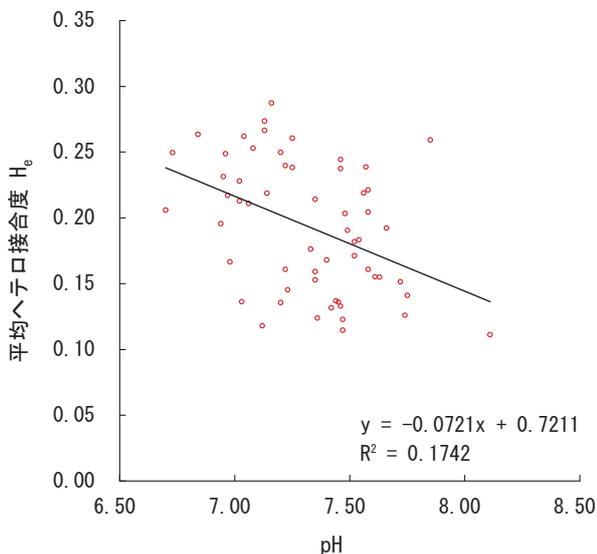


図-6 平均ヘテロ接合度HeとpHとの相関(一例)

◆凡例 (相関の検定)  
 \* : 5%有意水準  
 \*\* : 1%有意水準

(3) 遺伝的分化

地点間の $\theta$ は、0.004～0.405(平均=0.105)の範囲で測定された。 $\theta$ に基づいて作成した遺伝的系統樹を図-7に示す。 $\theta > 0.25$ を境界として各地点を遺伝的に区分すると、宮城県中部のウルマーシマトビケラ地域集団は3つの遺伝的グループ(図-7のA～Cグループ)に分かれる。

グループ内を細かく見ると、グループAとBの中には遺伝構造が特に類似したサブグループ(A-1, B-1, B-2)が存在し、階層的な遺伝構造が形成されていた。

グループA(n=14)は、11地点のサブグループA-1とそれ以外の3地点で構成されていた。また、グループB(n=42)は、11地点のサブグループB-1と30地点のサブグループB-2とそれ以外の1地点(St.44)で構成されていた。グループCはSt.1とSt.58の2地点で構成される小グループであった。

図-8に各グループおよびサブグループの地理的分布を示した。グループAの生息地の標高は270～590mであり、グループBは2～350mであり、グループAとBの分布は、標高270～350mを境界として地理的に明瞭に分かれていた(図-9)。サブグループB-1はグループbの中の上流側に、サブグループB-2は下流側に分かれた。グループCは、自然湖(サイカチ沼)に流入する短い小河川の源流端(St.61)と河川の大部分が灌漑水路化された影響で生息域が源流のみに残された小河川の源流端(St.6)の2地点であった。

図-10にサブグループごとに各地点の平均ヘテロ接合度(He)を示した。サブグループA-1およびサブグループB-1のHeの各平均値は、グループAその他(サブグループA-1以外の3地点)、サブグループB-2、グループCのそれよりも有意に高かった。

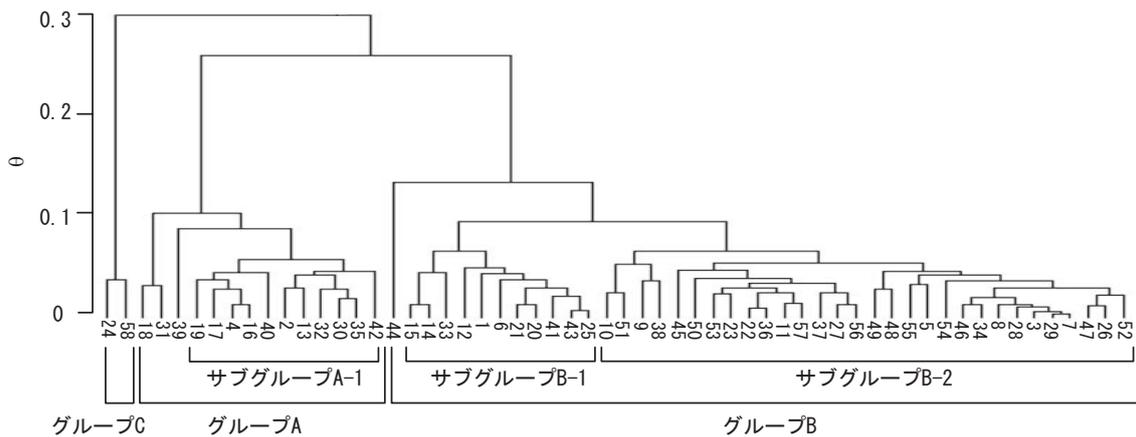


図-7 地点間の $\theta$ に基づいた遺伝系統樹(数字は図-1に示した地点番号)

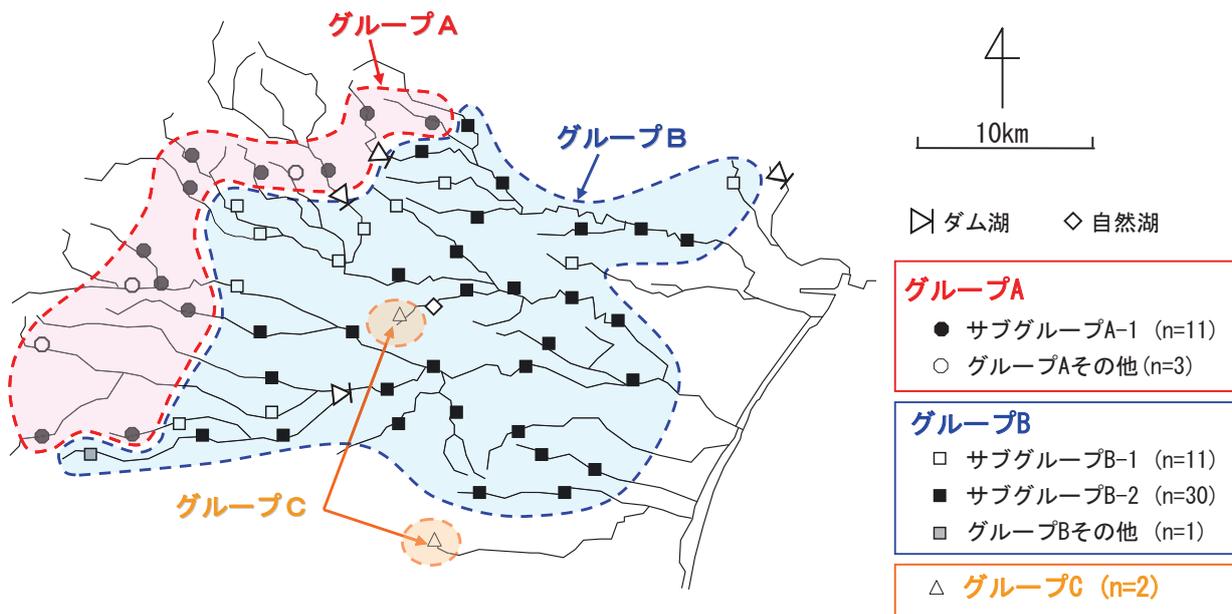


図-8 宮城県中南部6水系における遺伝的グループの地理的分布

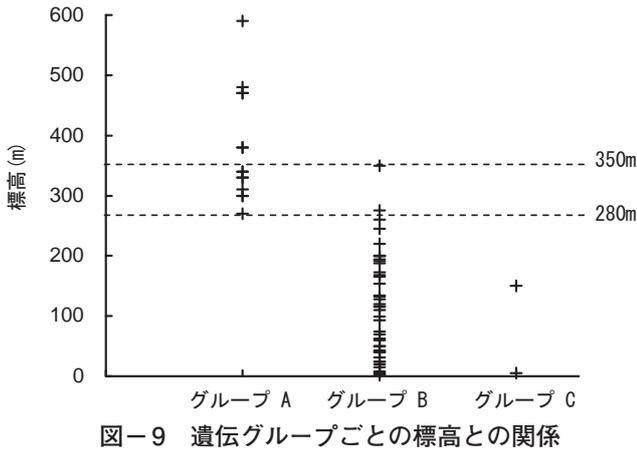


図-9 遺伝グループごとの標高との関係

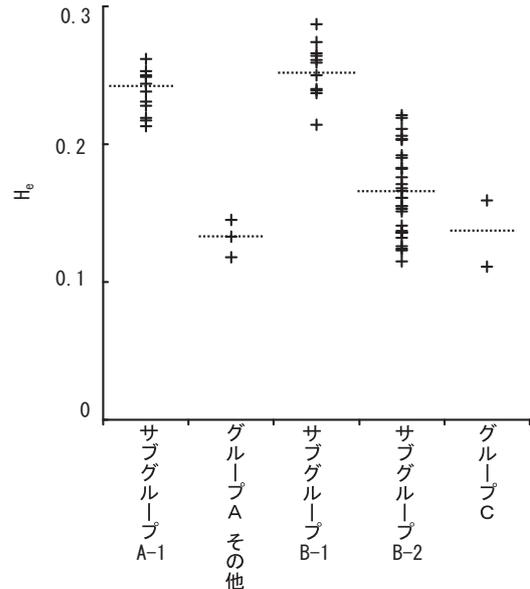


図-10 サブグループごとの平均ヘテロ接合度

#### 4. まとめ

今回は、ウルマーシマトビケラを対象として、名取川水系等の6水系において大規模なDNA分析を行った。これにより得られた成果は以下のとおりである。

- 名取川水系を中心とする6水系において、多数のヘテロ接合度 (He) を測定し、標本数が大きいHeの統計分布に基づいて、各地点の遺伝的多様性を相対的に5段階で評価するHeの基準を提案した。
- 平均ヘテロ接合度 (He) は標高、緯度と有意な正の相関があり、経度と負の相関があった。
- 宮城県中南部のウルマーシマトビケラの地域集団は、3つの遺伝的グループに分けられた。各グループは水系ごとに分かれるのではなく、複数の水系に跨って分布しており、本分析による遺伝構造の近似性を考慮すると、河川に沿って移動するだけでなく、他の河川間も飛行して移動している可能性が高いと推測される。

#### 5. 課題と今後の展開

今後、河川環境へDNA多型分析技術を適用していくに当たり、今回の成果をもとに更なる検討が必要であると考えられる。また、地先での生息環境の評価において、既往の定量調査とDNA多型を組み合わせることによる多角的な評価も有効的であると考えられる。

DNA多型分析技術を河川環境へ適用するに当たっての課題と今後の展開について、以下に述べる。

- ① DNA多型分析技術の適用事例の広報と有効性の周知  
河川分野におけるDNA多型分析技術の適用事例を目的や手法、効果等の観点から整理し、その有効性を河川実務者へ広く周知していくことが重要と考える。

##### 【DNA多型分析適用事例整理の観点】

- DNA適用目的
- 対象生物種
- 分析手法
- 対象フィールド
- 得られた知見

- ② 河川水辺の国勢調査等と連携させた環境評価の検討  
既往の河川水辺の国勢調査結果(生物標本)を用いた生物の遺伝的多様性の変化を把握するとともに、遺伝的多様性を評価するための指標とすべき対象種の選定方法や、生息環境に応じた適切な評価方法(定量的評価及び遺伝的多様性)を検討していく。さらに、生息場の類型化を行い、遺伝的多様性との相関について検証し、河川管理の実務上の目安となるような定量的判断基準を検討していく必要があると考える。

- ③ 遺伝的多様性を表す指標 (He) の精度向上

一般に個体数や生息域が限られて絶滅に瀕した野生集団の遺伝的多様性は小さい。<sup>7)</sup> 絶滅に瀕した野生生物のHeをAFLPマーカーで調査した過去の研究において、オヤマノエンドウの一種のHeは0.145～0.189<sup>8)</sup>であり、貝類ミズシタダミ科の一種のHeは0.166～0.242<sup>9)</sup>と報告されている。

本研究で測定したウルマーシマトビケラのHeの範囲0.111～0.287は、これらの絶滅危惧種のHeの下限值(0.145, 0.166)よりもさらに低い範囲を含んでおり、

今回のHeが特に低かった地点は、絶滅危惧種よりもHeのレベルが低かったことになる。ただし、DNA塩基配列が異なる種間での値を一概に比較できないため、今回の調査で特にHeが低かった地点でのウルマーシマトビケラが局地的絶滅に瀕していると単純に考えることはできない。今後は、シマトビケラ属あるいはシマトビケラ科の近縁種に対しても同様の調査を行い、その的確性を検証していく必要があると考える。

【謝辞】本研究は、東北大学大学院工学研究科大村達夫教授、渡辺幸三氏の研究成果に基づいて作成したものである。ここに記して謝意を表します。

#### <参考文献>

- 1) 刈田敏：フライフィッシャーのための水生昆虫小宇宙 Part I, 株式会社つり人社, 2000
- 2) 水野信彦, 御勢久右衛門：河川の生態学, 築地書館, p.32 - 99, 2000
- 3) Vos, P., Hogers, R., Reijans, M., Lee, T., Hoenes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, pp.4407 - 4414, 1995.
- 4) 渡辺幸三, 大村達夫：ヒゲナガトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 地域集団のRAPD解析によるダム上下流間の遺伝的分化の評価, 土木学会論文集, No.790, VII - 35, pp.49 - 58, 2005
- 5) Lynch, M., and B.G. Milligan.: Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3, pp.91 - 99, 1994
- 6) Weir, B.S., Cockerham, C.C.: Estimating F - statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, pp.1358 - 1370, 1984
- 7) Saccheri, I., Muussari, K., Kankare, M., Vikman, P., Fortelius, W., and Hanski, I.: Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*, 392, pp.491 - 494, 1998.
- 8) Chung, M., Gelembiuk, G., Givnish, T. J.: Population genetics and phylogeography of endangered *Oxytropis campestris* var. *chartacea* and relatives: arctic - alpine disjuncts in eastern North America. *Molecular Ecology*, 13, pp.3657 - 3673, 2004.
- 9) Miller, M.P., D., Weigel, and K.E. Mock.: Patterns of genetic structure in the endangered aquatic gastropod *Valvata utahensis* (Mollusca : Valvatidae) at small and large spatial scales. *Freshwater Biology*, 51, pp.2362 - 2375, 2006.