

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380139

研究課題名（和文） 水田水域における環境修復対策の総合的評価方法の構築

研究課題名（英文） Development of the integrated evaluation method of environmental rehabilitation measurers adopted in aquatic zones around rice paddies

研究代表者

水谷 正一（MIZUTANI MASAKAZU）

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：70093143

研究成果の概要：

本研究では、水田水域の環境修復対策に関わる 3 つの評価方法を検討した。その結果、①窒素・炭素安定同位体比法により生物種の栄養段階および食物連鎖長が把握可能なこと、②ホトケドジョウを対象としたマイクロサテライト DNA 解析により淡水魚の流域内遺伝的分化および遺伝構造が把握可能なこと、③HEP により各生物種の環境修復対策前後の環境価値の算出が可能なこと、などを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2007 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	15,800,000	4,740,000	20,540,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業土木学・農村計画学

キーワード：農業工学、環境技術、生物多様性、安定同位体分析、DNA 解析

1. 研究開始当初の背景

応用科学として展開が期待されている「水田生態工学」において、生物多様性の把握と保全に関する科学的方法論の確立は焦眉の課題である。本研究では、とくに水田水域で実施される環境修復対策の効果を評価する方法の確立をめざした。

2. 研究の目的

本研究では、次の 3 つの手法の確立を目的とした。

- (1) 水田・水路・ため池の食物網を把握するための窒素・炭素安定同位体比

による評価手法

- (2) 水田・水路・ため池に生息する動物集団の遺伝的多様性を把握するためのマイクロサテライト DNA 解析による評価手法
- (3) 水田・水路・ため池などに生息する動物の生息場環境を把握するための HEP（ハビタット評価手続き）による評価手法

3. 研究の方法

上記した評価手法に関する研究を、水田水域の特徴的な生物群集が存在し、それぞれの

種が複数の個体群（集団）を有し、かつ環境修復対策が実施済み、ないしは予定されている次の2カ所で行った。栃木県市貝町小貝川上流の谷津田群、栃木県日光市（旧今市市）小代地区の水田。

4. 研究成果

(1) 水田・水路・ため池の食物網を把握するための窒素・炭素安定同位体比による評価手法について

① 目的と方法

本研究では安定同位体比法を谷津の圃場整備前後の水路に適用し、生態系の安定同位体比の変化を把握し、その要因を考察する。そして、その結果から圃場整備事業は谷津内水路の生物群集にどのような影響を与えたかを解明することを目的とした。研究対象地は栃木県東部の谷津田を選定した。ここでは県営圃場整備として生態系保全工法を取り入れた圃場整備が実施された。工期は2005年12月から2006年5月末であった。試料は谷津の土水路より沈殿物、付着物、流下物、落葉、水草、ベントス、底生魚類を採集し、採取した試料を安定同位体比測定用質量分析計にて計測した。調査年は圃場整備前の2004年と整備2年目の2007年に行い、期間は水路内が最も種の多様性が高い早春期に行った。

② 結果

陸上植物、河床沈殿物、流下物の δ 値に変化は認められなかった。それに対し、付着物や藻類には変化が認められた。これはその構成物質の割合や藻類の生育環境条件に変化があったことを示していると考えられた。動物では複数のベントスで $\delta^{13}\text{C}$ の上昇、 $\delta^{15}\text{N}$ の下降が認められた。これは餌資源としていた藻類の変動の影響が考えられる。シマドジョウは $\delta^{13}\text{C}$ の上昇、 $\delta^{15}\text{N}$ の下降が認められた。この要因は餌資源の変化が考えられた。

整備前後の $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ マップ (Fig.1) をみると、破碎食水生昆虫、雑食・肉食ベントス、ドジョウ類といった主要な食物連鎖系が存在し、それらはC3植物である落葉やPOMを起点としている。 $\delta^{13}\text{C}$ が低い水生昆虫(4)群に至るサブの食物連鎖系が存在し、その起点はカワモズクなどの藻類であると考えられることが共通しており、基本的な食物連鎖構造に変化は少なかったと考えられた。また、圃場整備後に新たに水生昆虫(5)に至るサブの食物連鎖系が確認され、その起点は別の藻類であると推定された。栄養段階を推定した結果、2007年に栄養段階の低下傾向が8種中6種確認され、シマドジョウでは有意差が確認された。よって、圃場整備に伴う攪乱は栄養段階の低下という負の影響を起した可能性が高いことが示唆された。更に栄養段階が最も

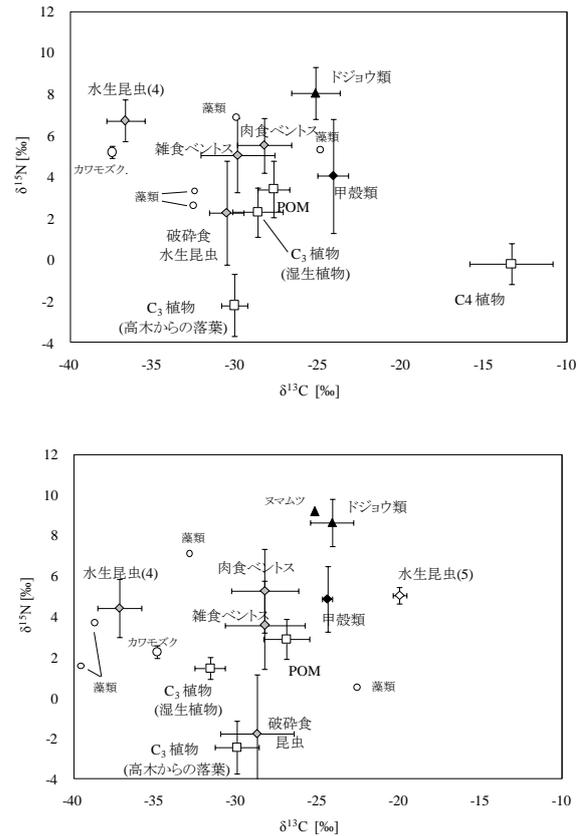


Fig. 1 圃場整備前後の谷津内水路における $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ マップの変化

高いと考えられる種は圃場整備前後ともにシマドジョウであり、その栄養段階は前項の結果より3.2から2.8に有意に低下したことが推定された。このことから、圃場整備による攪乱は食物連鎖長に負の影響を及ぼしたと考えられた。基本的な食物連鎖構造に変化はなかったことは生態系保全型圃場整備の効果と考えることもできる。しかし、圃場整備のかく乱は動物の栄養段階の低下、食物連鎖長の短縮といった一定の負の効果を与えたと考えられた。

(2) 水田・水路・ため池に生息する動物集団の遺伝的多様性を把握するためのマイクロサテライトDNA解析による評価手法

① 目的

ホトケドジョウは東北から近畿地方にかけて分布し、希少性が高いことから水田水域の環境指標や農業農村整備事業での保全対象種となりやすい。このような種は生息地域での個体数減少や移動経路の分断化等により、近親交配に伴う遺伝的多様性の低下が見られるようである。遺伝的多様性の低下は今や集団の存続を左右する要因として考えられ、ホトケドジョウについても同様のことが危惧されている。本課題ではこれまでに生息場特性等が明らかにされてきた栃木県南東

部（宇都宮市，高根沢町，芳賀町，市貝町，那須烏山市等）のホトケドジョウ集団を対象に，ミトコンドリア DNA とマイクロサテライト DNA による遺伝構造解析を実施した。

② ミトコンドリア DNA 解析

ホトケドジョウ集団を全国スケールでみた場合，集団は遺伝的に 6 地域クレードに分かれることが明らかにされている。ミトコンドリア DNA におけるシトクローム *b* 遺伝子（以下，「Cyt*b*」）と D-loop 調節領域（以下，「D-loop」）の塩基配列を用いた系統解析により，栃木県南東部の集団について既往の地域クレードとの関係を解析した。

流域の異なる栃木県南東部の 6 地点において，谷津田域の土水路から各 10～24 個体（計 126 個体）を採捕した。各個体の Cyt*b* と D-loop の塩基配列（それぞれ，1,026 と 819～820 塩基）を決定し，ハプロタイプ配列の特定，ハプロタイプ多様度と塩基多様度の推定，最節約法によるハプロタイプ配列の系統樹の構築を行った。

Cyt*b* と D-loop 共に 19 ハプロタイプ配列が特定され，1 地点あたり Cyt*b* では 4～7 配列，D-loop では 2～6 配列が確認された。Cyt*b* のハプロタイプ多様度は 0.85，塩基多様度は 0.52%，D-loop のハプロタイプ多様度は 0.87，塩基多様度は 0.33% と推定された。最節約法による系統樹の構造は Cyt*b* と D-loop 共に類似し，すべての配列が栃木県今市産と 1 つのクレードを形成した。クレード内の各分岐は浅く，今市産が北関東クレードの配列であることから，栃木県南東部集団は北関東クレードに属すると判断された。

③ マイクロサテライト DNA マーカー開発

ミトコンドリア DNA 解析ではハプロタイプ配列間の変異が少ないため，地点間の遺伝構造まで明確にできなかった。そこで，より詳細な構造を解析可能なマイクロサテライト DNA のマーカー開発を行った。開発には千葉県下田川と茨城県恋瀬川の個体を利用し，Takahashi 法と Hamilton 法を援用しながらマイクロサテライトを含む配列断片の濃縮ライブラリーを作成した。このライブラリーをクローニングし，計 19 個のマーカーを開発した。

各マーカーについては Lec01～19 までの遺伝子座名称を与え，それぞれの配列を GenBank に登録した（登録番号：AB286032～AB286048，AB439725，AB439726）。これらの遺伝子座のうち，Lec01，02，03，16 は CA，Lec06 と 13 は CT，Lec05，10，11，14，15，17～19 は GT，Lec04，08，09 は GA，Lec12 は CA と CT，Lec07 は CT と GT をそれぞれ繰り返し配列にもっている。

④ マイクロサテライト DNA 解析

栃木県南東部の中から小貝川上流域に焦点をあて，流域内における集団の遺伝構造を

解析した。小貝川上流域から 22 地点，近隣の桜川，大川，五行川，荒川から各 1～2 地点（計 26 地点）を対象とし，それぞれ 7～30 個体（計 580 個体）を解析に使用した。

マイクロサテライト DNA のマーカーとして 11 遺伝子座を利用し，個体ごとに各遺伝子座の遺伝子型データを取得した。遺伝子型データから各地点の遺伝的多様性について 1 遺伝子座あたり対立遺伝子数，ヘテロ接合度の観察値と理論値を推定した。遺伝構造解析としてサンプル間の遺伝距離 D_A を推定し，それに基づく近隣結合法の系統樹を作成した。

各地点の遺伝的多様性として，1 遺伝子座あたり対立遺伝子数は平均 4.45～8.00，ヘテロ接合度の観察値は平均 0.42～0.67，期待値は 0.51～0.67 となった。これらの値は世界的に知られている絶滅危惧種よりも高く，各サンプルに遺伝的多様性の劣化は認められなかった。また，ヘテロ接合度の観察値と期待値に大きな差はなく，すべての地点にハーディ・ワインベルグ平衡が仮定された。

D_A による近隣結合法の系統樹において，小貝川の各地点は 1 つのクレードに集約され，他の河川とは遺伝的に異なることが支持された。クレード内には上・中・下流に相当するサブクレードの存在が推察されるが，どれも分岐は浅いことから，流域内での遺伝的分化はあまり進んでいないと考えられた。総じて，小貝川の集団は遺伝的に健全なことが推察され，河川流程が集団の遺伝構造を支配する要因になり得ることが示唆された。今後はこのような集団の遺伝的特徴が地域または種特異的なのか，事例蓄積を踏まえた比較評価が期待される。

- (3) 水田・水路・ため池などに生息する動物の生息場環境を把握するための HEP（ハビタット評価手続き）による評価手法

圃場整備事業が計画中の水田水域に HEP（ハビタット評価手続き）を適用し，事業前における評価種のハビタット適性を評価するとともに，事業で実施する予定のミティゲーション（環境緩和）効果の予測評価を行った。HEP の評価種にはこの地区の水田水域を代表する生物種であるホトケドジョウ、シマドジョウ、シモツケコウホネを採用した。

まず HEP を適用するにあたり，HSI モデルを作成した。すなわち，現地調査データを用いて繁殖期（植物体期）、非繁殖期（根茎期）に関する SI モデルを作成し（Fig.2）、HSI 式の選定では幾何平均法（Table 1-①）、限定要因法（Table 1-②）、既往の知見より重み付けした幾何平均法（Table 1-③）の 3 種について検討し，HSI モデルの妥当性を明らかにした（Table 2）。

次に、事業実施前における現況のHU及びHSIを算出した結果、HEP適用対象区はホトケドジョウにとって非繁殖期の生息・越冬の場として高い適性を示し、シマドジョウにとっては繁殖期の繁殖場や仔稚魚の生育場として高い適性を示した。シモツケコウホネでは、HEP適用対象区の水路は植物体期では植生管理を行うことでより適したハビタットとなることが分かった。一方、根茎期では適性の高いハビタットであることが分かった。

最後に、ホトケドジョウとシマドジョウを対象に事業後の環境価値を予測評価した。評価対象にはミティゲーションが施される水路区間を選定し、さらにこの区間を3つのルートに分け、各ルートのHUを算出することとした。ルート1は事業前も事業後も同じ位置に水路があるルート、ルート2は水路が元々無かった場所に水路を創出するルート、ルート3は現在の水路を現況のまま保存するルートである。その結果、ミティゲーションによる環境価値の改善効果を確認することができたが、ルート2では非常にHUが低い値となった(Fig.3, 4)。特に、ホトケドジョウではルート2繁殖期においてHUがゼロを示し、繁殖期の生息場として全く適さず、事業後には具体的な管理が必要であることが考えられる。このHUが低い値を示した大きな原因は植生被度が低いためであり、HSI式において重み付けしたこのSIが低い値(平均植生被度SI=0.06)を示した。そこで、ルート2において事業実施後の順応的管理として水生植物の植栽を行い、植生被度を水路面積の10%増加させたと仮定し、ホトケドジョウ繁殖期のSI、HSI、HUを算出した。その結果、Table 3のようにそれぞれの値が大きく上昇し、植生被度を増加させることで生息場としての環境価値を大きく高めることが可能であることがわかった。

Table 2 各式を用いて算出したHSIと個体数密度(沈水葉被度)の相関係数

	ホトケドジョウ	シマドジョウ	シモツケコウホネ
① 繁殖期	0.918	0.974	0.858
① 非繁殖期	0.962	0.988	0.737
② 繁殖期	0.8	0.658	0.911
② 非繁殖期	0.6	0.774	0.889
③ 繁殖期	0.984	0.453	-
③ 非繁殖期	0.999	0.358	-

※色が付いているところが今回採用した統合式

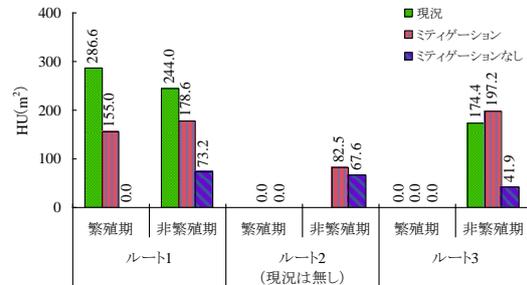


Fig.3 ホトケドジョウの各ルートのHU

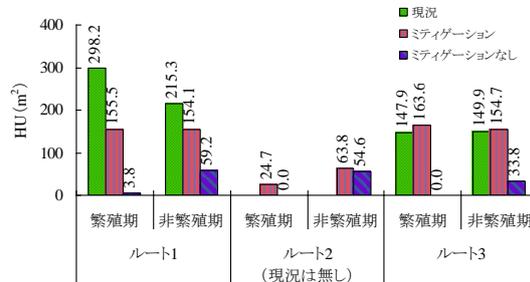


Fig.4 シマドジョウの各ルートのHU

Table 3 ホトケドジョウのルート2 繁殖期における各値の変化

	植生被度SI	HSI	HU(m²)
ミティゲーション	0.06	0.00	0.00
ミティゲーション+植生被度10%	0.55	0.63	91.44

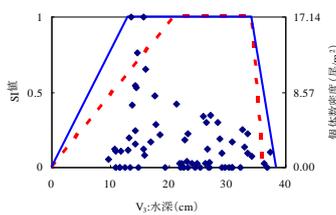


Fig.2 SIモデルの例

Table 1 HSI算出のためのHSI式

	ホトケドジョウ	シマドジョウ	シモツケコウホネ
① 繁殖期	$(SI_1 \times SI_2 \times SI_3 \times SI_4 \times SI_5 \times SI_6)^{1/6}$	同左	$(SI_1 \times SI_2 \times SI_3)^{1/3}$
① 非繁殖期	$(SI_1 \times SI_2 \times SI_3 \times SI_4 \times SI_5 \times SI_{10})^{1/6}$	同左	$(SI_1 \times SI_2)^{1/2}$
② 繁殖期	$\min(SI_1, SI_2, SI_3, SI_4, SI_5, SI_6)$	同左	$\min(SI_1, SI_2, SI_3)$
② 非繁殖期	$\min(SI_1, SI_2, SI_3, SI_4, SI_5, SI_{10})$	同左	$\min(SI_1, SI_2)$
③ 繁殖期	$(SI_1 \times SI_2 \times SI_3 \times SI_4 \times SI_5 \times SI_6)^{1/6}$	$(SI_1 \times SI_2 \times SI_3 \times SI_4 \times SI_5 \times SI_6)^{1/6}$	-
③ 非繁殖期	$(SI_1 \times SI_2 \times SI_3 \times SI_4 \times SI_5 \times SI_{10})^{1/6}$	$(SI_1 \times SI_2 \times SI_3 \times SI_4 \times SI_5 \times SI_{10})^{1/6}$	-

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① 小出水規行, 渡部恵司, 高 振麗, 水谷正一, 森 淳, 竹村武士, マイクロサテライト DNA を用いた栃木県小貝川上流域のホトケドジョウ集団の予備遺伝解析、農業農村工学会論文集、256、55-61、2008、査読有り
- ② 森淳, 水谷正一、高橋順二、水田生態系の特徴と変質—水田生態工学の視点から—、農業農村工学論文集、254、127-137、2008、査読有り
- ③ Koizumi, N., Takahashi, H., Minezawa, M., Takemura, T., Okushima, S. and Mori, A., Isolation and characterization of polymorphic microsatellite DNA

markers in the Japanese eight-barbel loach, *Lefua echigonia*. *Molecular Ecology*, Notes, 7, 836-838, 2007, 査読有り

- ④ 森 淳、水谷正一、松澤真一、炭素安定同位体比を用いた谷津内クモ類の炭素起源の推定、農業農村工学論文集、251、565-571、2007、査読有り

[学会発表] (計 8 件)

- ① 小出水規行、渡部恵司、竹村武士、森 淳、高 振麗、水谷正一 (2008) : 小貝川上流域におけるホトケドジョウの遺伝的構造の解明 : マイクロサテライト DNA マーカーを用いた予備解析、農業農村工学会、2008年8月28日、秋田県立大学
- ② 高 振麗、水谷正一、小出水規行、渡部恵司、竹村武士、森 淳、ミトコンドリア DNA による栃木県東部のホトケドジョウの系統分析、農業農村工学会、2008年8月28日、秋田県立大学
- ③ 小出水規行、竹村武士、森 淳、奥島修二、ミトコンドリア DNA の塩基配列分析による日本産ドジョウの遺伝的集団構造、農業農村工学会大会、2007年8月26日、島根大学
- ④ 南雄策、松本佑介、水谷正一、水田水域におけるタモロコとスナヤツメの HIS モデルの開発、農業農村工学会、2008年8月28日、秋田県立大学
- ⑤ 松本佑介、水谷正一、後藤章、HEP を用いた水田水域における生物種の生息地環境評価の方法、農業農村工学会、2008年8月28日、秋田県立大学
- ⑥ 森 淳、渡部恵司、小出水規行、竹村武士、安定同位体比を用いたニホンアカガエルの移動の推定、農業農村工学会、2008年8月28日、秋田県立大学
- ⑦ 森 淳、水谷正一、塩山房男、中荃元一、柿野亘、松澤真一、安定同位体比法による水田に生息するドジョウの餌の推定、農業農村工学会、2007年8月26日、島根大学
- ⑧ 森 淳、水谷正一、松澤真一 (2006) : 動物個体群の炭素安定同位体比分布は何を示すのか?、平成 18 年度農業土木学会講演要旨集

[図書] (計 1 件)

- ① 水谷正一、森 淳 (編著)、学報社、春の小川の淡水魚—その生息場と保全—、2009、190 ページ

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
なし

○取得状況 (計 0 件)
なし

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 正一 (MIZUTANI MASAKAZU)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号 : 70093143

(2) 研究分担者

小林 久 (KOBAYASHI HISASHI)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号 : 80292481

森 淳 (MORI ATSUSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

・農村工学研究所・農業環境部・室長

研究者番号 : 10414418

小出水 規行 (KOIZUMI NORIYUKI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

・農村工学研究所・農業環境部・主任研究員

研究者番号 : 60301222