

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24254003

研究課題名(和文) アルプス自然流域に残された生物多様性の大規模ゲノム解析による解明とその保全

研究課題名(英文) Genetic Assessment of Freshwater Biodiversity in The Alps in Relation to The Spatiotemporal Habitat Heterogeneity of Floodplain

研究代表者

大村 達夫 (Omura, Tatsuo)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授

研究者番号：30111248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヨーロッパアルプスの中で例外的に残された北東イタリアの自然流域を参照し、自然再生で目指すべき種多様性の目標像を示すことを目的とする。DNA種分類に基づいて、未記載種も含む河川底生動物群集の種多様性を評価し、生息場間の環境多様性や流倒木などの微笑生息場の生態学的な重要性が確認された。また、自然氾濫原における洪水攪乱による生息場地形の更新(生息場寿命)が種多様性を維持する機構も解明した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to indicate the target image of biodiversity and its formation mechanism for suitable river restoration in the European Alps through an intensive investigations of reference semi-natural basins remained in northeast Italy. We clarified the true species richness of stream invertebrate communities in the basins by addressing the potential problem of poor morphological taxonomy (e.g., many undescribed species) applying a new technique of DNA sequence based taxonomy. We found the ecological importance of spatial environmental heterogeneity among habitats and microhabitats (e.g. large woody debris) in sustaining the high biodiversity in the natural river system. In addition, satellite and mountain camera image analyses for tracing the temporal change of river geomorphology at reach scale allow us to understand significant role of large and frequent flood disturbances in sustaining the high species diversity in the natural floodplain system.

研究分野：環境水質工学

キーワード：生物多様性 DNA 洪水氾濫原 生息場 河川 進化 イタリアアルプス 種分類

1. 研究開始当初の背景

近年ヨーロッパアルプスを水源とする流域の多くは治水・利水を目的とするダムや灌漑取水等の開発が進み、淡水生物の種多様性低下、そして、それに伴う物質循環等の生態系機能の劣化が懸念されている。アルプスの中で、例外的に北東イタリアには原生的な流域が局所的に残されており、自然再生の目標となるモデル流域として注目されている。そこで広がる洪水氾濫原では、自然河川が本来有する激しい流量・河床変動が複雑な生息場地形を生みだし、生息場間の種間の棲み分けにより高い種多様性が維持されている。

開発が進むアルプス流域の種多様性の解明は急務であるが、小動物群の種分類の整備が遅れており、種を同定できない生物群(属、科レベルで記載する分類群)が多く残されている。また、従来の種多様性評価で行われる顕微鏡を使った形態種同定は、作業時間の長さや不正確性などの技術的問題を抱える。これら問題を解決するために DNA 塩基配列に基づく種多様性評価が有効と考えられる。これは塩基配列に基づいて系統間の進化関係を再現し、進化・絶滅モデルを適用して種の境界を決める手法である。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、アルプス自然流域を参照し、自然再生で目指す種多様性の目標像を示すことである。種数を未記載種も含めて迅速かつ正確に評価するために、従来の形態種同定に代わって DNA 分析を活用する。第二の目的は、自然流域の洪水攪乱による生息場地形の更新が種多様性を維持する機構を解明することである。河川地形画像から各種生息場の存続時間を数値化し、種多様性とこの定量関係を評価する。

3. 研究の方法

本研究は5つの課題から構成される(図1)。課題1は広域環境情報と現地調査から各流域の環境特性と物質循環に関わる生態系機能の評価した。課題2で種多様性の遺伝的評価の精度を高める手法を開発し、この手法を適用して課題3で流域の種多様性を評価した。課題4は、自然洪水氾濫原における出水による河道変動と生物相の関係を調べた。課題5は、上記研究成果を統合し、アルプス自然流域をモデルとした種多様性再生目標を

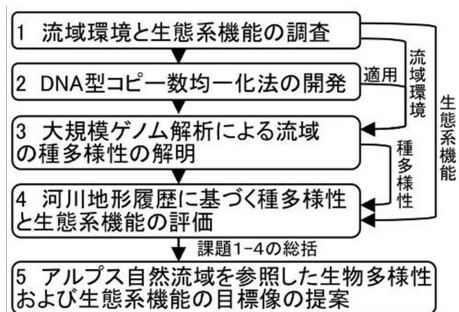


図1 本研究を構成する5つの研究課題

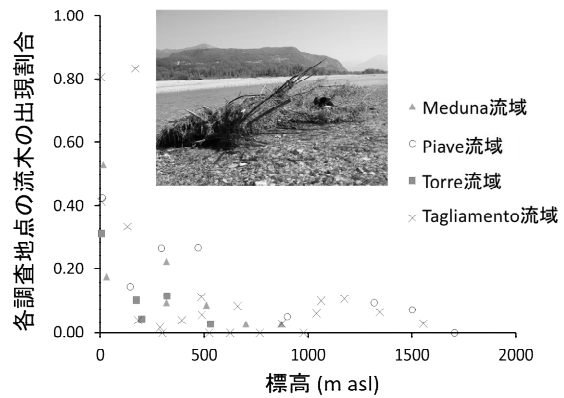


図2 イタリアアルプスの4流域の41地点における流木の出現割合の流程分布

提案した。

4. 研究成果

課題1「流域環境と生態系機能の調査」

イタリアアルプスの4流域において、流木と河川底生動物群集の種多様性の関係を調査した。調査した41リーチのうち、流木の出現頻度割合(=0-83%)は標高(=4-1704m)が低いリーチほど高まった(図2)。また、流木と流木が影響しない河床から別々に採取した水生昆虫ユスリカ群集の種数を比較した結果、流域内に出現した全225種のうち、41種は流木のみで特異的に出現した。また、種数と種の環境特異性に基づいて定量的に推定した流域全体の種多様性に対する流木の貢献度は29.7%に達した。さらに、流木の出現頻度が高いリーチやハビタットほど、流木の貢献度が高まった。

タリメント川の止水域13地点を対象として、堆積物脂肪酸組成におけるPielouの均等度と出現種数の関係を調べた(図3)。そして、堆積物中に含まれる脂肪酸が多様であるほど栄養要求が異なる様々な底生動物が共存可能になり出現種数が増加すると仮説を検証した。その結果、両者には有意な正の相関が見られ、堆積物脂肪酸の多様度の高い地点ほど出現種数が増加することが示さ

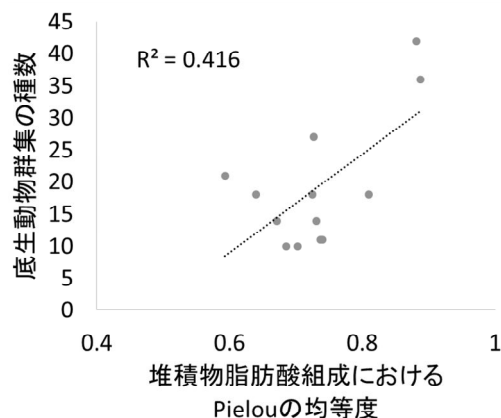


図3 タリメント川の止水性生息場13地点における堆積有機物の脂肪酸組成の多様性と底生動物群集の種数の相関

れた。堆積物の脂肪酸多様度が高かった地点は高水敷たまりであり、他の地点と比較して陸上植物由来の脂肪酸の含有率が高かった。陸上植物の供給があることで、餌のバリエーションが増え、底生動物種数が増加した可能性が考えられた。

#### 課題2 「DNA型コピー数平準化法の開発」

水生生物群集サンプルの次世代DNAシーケンシング解析 (Roche 454 Sequencer) を使ったアンプリコン解析を行い、当初の予想通り、DNA配列間でコピー数が最大1万倍以上異なる事実を確認した。このことは、希少種や体サイズが小さい分類群を含めて種数を正確に実施するには、次世代DNAシーケンシング解析の前に、群集PCR産物(アンプリコン)のDNA配列のコピー数の平準化が必要であること意味する。PCR産物を熱変性して一本鎖に乖離させた後、徐冷して一部を再会合させるDNA型コピー数の平準化に必要な「再会合温度」、「再会合時間」、「PCR産物濃度」の各条件の最適条件を実験的に見出すことに成功した(データ未発表)(図4)。

#### 課題3 「大規模ゲノム解析による種多様性の解明」

イタリア・タリアメント川流域の20地点の8つの生息場タイプから別々に定性的に採取した底生動物群集(ユスリカ科、カワゲラ目、トビケラ目)を使って、DNAシーケンサーによるアンプリコン解析(ミトコンドリアDNA COI)を行った。得られた大規模DNA塩基配列データベースに、GMYCモデルを活用したDNA種分類解析を適用し、種数を定量化した。その結果、ユスリカ科は解析した1852個体から1124ハプロタイプが検出

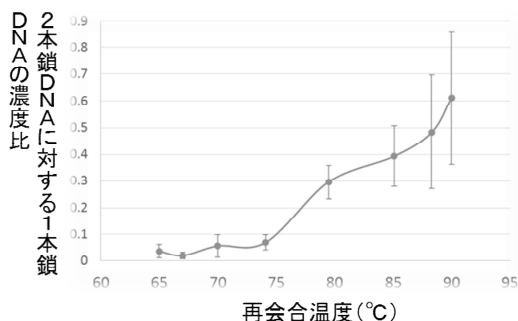
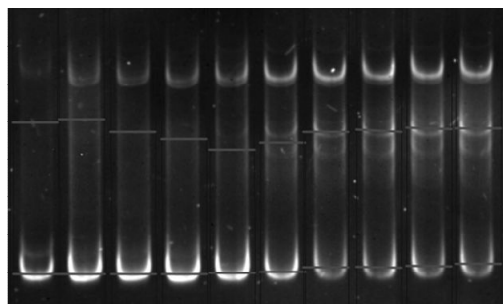


図4 PCR産物の熱変性・再会合実験後の1本鎖と2本鎖DNAのゲル分画実験(上)と各再会合温度条件における1本鎖DNA比

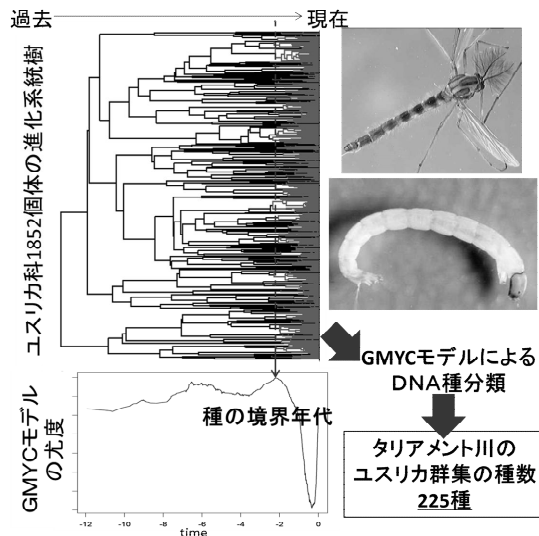


図5 DNA種分類法によるイタリア・タリアメント川におけるユスリカ群集の種多様性の評価

され、225種の生息が明らかになった(図5)。同様に、カワゲラ目450個体からは184ハプロタイプ・39種、トビケラ目597個体からは236ハプロタイプ・82種がそれぞれ確認された。自然状態が維持されたアルプス流域には極めて高い種多様性が形成されていることが明らかになった。

また、ユスリカ科、カワゲラ目、トビケラ目共に、DNA種分類とDNAバーコーディングで得られた種数を比較すると、約2倍差が見られた。これは、DNAデータベースの情報不足、分類群を正しく同定できなかったためである。一方でDNA種分類法では登録されていないDNA種も明らかにできたためにDNAバーコーディングと比べて多数の種を検出できたと考えられる。また、DNA種分類と形態分類群数を比較すると、約4-8倍差が見られた。DNA種分類とDNAバーコーディングは形態同定できない分類群も種分類できたが、DNA種分類の方が未記載種の種数の推定に有効であることが確認された。

#### 課題4 「河川地形履歴に基づく種多様性と生態系機能の評価」

タリアメント川中流域の時空間的な生息場構造の変遷を、高解像度衛星画像を用いて既存の手法および手法の開発により、明らかにした。各生息場構造の推定には、2010、2011、2012年の9月に撮影された空間解像度5mのRapidEye衛星画像を用いた。生息場構造としては、氾濫原内における地表面タイプ・水深・生息場タイプに着目した。

その結果、地表面タイプに関しては、既存の画像分類法に改良を加える事により簡易かつ精度の高い画像分類手法を提案できた(図6)。これまでの教師付き画像分類では経験的に教師データを設定する必要があったが、提案手法により教師データを設定せずとも90%以上の精度で地表面タイプを推定できる事が分かった。また、水深に関しては光学モデルの適用により、標準誤差約15cm内

で推定できた。これらの結果は他の類似研究と比較しても十分な精度であり、タリメント川における浮遊性土砂濃度が平均 1 mg/L 以下で透明度が高い事が要因の一つであると考えられる。さらに、地表面タイプの推定結果をもとに、中流域約 30km 内に位置する 3 つのリーチにおいて氾濫原内における生息場タイプを陸生 2 種、水生 3 種の計 5 種類に分類しその 3 年間の変遷を追った。その結果、どのリーチでも毎年約 15%~100%の割合で各生息場タイプが空間的な変化を遂げており、時には河畔林を大きく削る程の攪乱があることが示された。また、空間的な変化が激しい一方で氾濫原内に占める面積比の変化は 10%未満に留まりその構成は大きく変化しないことも明らかになった。

これらの成果から、高解像度衛星画像を用いる事により、タリメント川のように透明度が高い河川では精度良く生息場構造を推定できる事、そしてその時空間的な変遷の特徴を把握できることが示された。

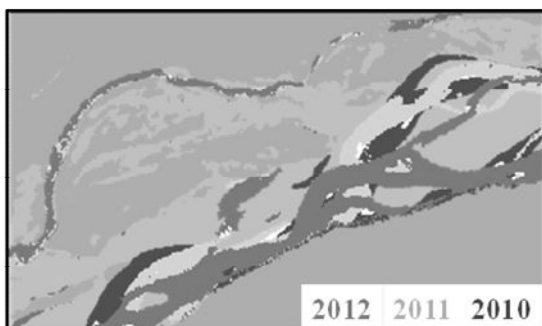


図6 タリメント川の氾濫原における水面の年変化

#### 課題5 「アルプス自然流域を参照した生物多様性および生態系機能の目標像の提案」

以上の研究課題の成果をまとめて、自然流域で生態学的に機能している流倒木や止水性生息場(ワンド、タマリ)の重要性を見出した。また、河川の生物多様性を高めるには、様々な齢期の生息場がパッチ上に混在する地形を目標とすることが効果的であると考察された。さらに、全球気候モデルにより、気候変動下の底生動物個体数密度の減少率を水温選好性に基づいて推定することにも成功した。

研究代表者・分担者らが発表と議論を通じて各研究課題の成果を集約し、さらに研究成果を社会に向けて発信することを目的として、以下の3つのワークショップを開催した。

- (1) 2014年1月31日「流域と生態系ワークショップ 2014- 水文生態学, 生息場学, 分子生物学の新しい研究アプローチ-」, 愛媛大学, 9件の発表, 参加者 48名
- (2) 2014年10月31日「International Workshop on River Ecology and Environment」, 愛媛大学, 6件の発表, 参加者 38名

- (3) 2015年3月27日「流域生態系評価手法の最近の動向」, 東北大学, 7件の発表, 参加者 22名

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

すべて査読あり

1. Nukazawa K, Kazama S, Watanabe K, A hydrothermal simulation approach to modelling spatial patterns of adaptive genetic variation in four stream insects. *Journal of Biogeography*, 42 (1), 103-113, 2015, DOI: 10.1111/jbi.12392
2. Watanabe K, S Yaegashi, H Tomozawa, S Koshimura, T Omura, Effects on River Macroinvertebrate Communities of Tsunami Propagation after the 2011 Great East Japan Earthquake, *Freshwater Biology*, 59 (7), 1474-1483, 2014, DOI: 10.1111/fwb.12359
3. Watanabe K, S Kazama, T Omura, and MT Monaghan, Adaptive Genetic Divergence along Narrow Environmental Gradients in Four Stream Insects, *PLoS ONE*, 9(3), e93055, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0093055
4. Ock, G, Y Takemon, Effect of reservoir-derived plankton released from dams on particulate organic matter composition in a tailwater river (Uji River, Japan): source partitioning using stable isotopes of carbon and nitrogen, *Ecology*, 95, 1172-1186, 2014, DOI: 10.1002/eco.1448
5. Yaegashi Y, K Watanabe, MT Monaghan, and T Omura, Inferring Fine-scale Dispersal in the Caddisfly *Stenopsyche marmorata* (Trichoptera: Stenopsychidae) Using Spatial Autocorrelation of Microsatellite Markers, *Freshwater Science*, 33(1), 172-180, 2014, DOI: 10.1086/675076
6. Tanaka A, Namba T, Tanida K, Takemon Y, Evaluation of a pump method for unbiased sampling of stream hyporheos, *Hydrobiologia*, Vol.730, 29-43, 2014, DOI: 10.1007/s10750-014-1820-x
7. 糠澤桂, 風間聡, 高瀬陽彦, 渡辺幸三, 水生生物の生息場適性度と遺伝的多様性の関係, 土木学会論文集 B1(水工学) Vol.70, I\_1405-I\_1410, 2014
8. 糠澤桂, 新井涼允, 風間聡, 竹門康弘, 複数の全球気候モデルを用いた源流域における底生動物個体数密度の将来変化, 土木学会論文集 G(環境), Vol.70,

- No.5, 2014, pp.I\_271-I\_276, 2014
9. 高瀬陽彦, 糠澤桂, 風間聡, 渡辺幸三, 分布型水文モデルと確率密度関数を用いた底生動物の生息環境および種多様性評価, 土木学会論文集 B1(水工学) Vol.70, I\_1297-I\_1302, 2014
  10. 新井涼允, 糠澤桂, 風間聡, 竹門康弘, 水温環境の変化に伴う源流域における底生動物群集の将来変化, 土木学会論文集 B1(水工学) Vol.70, I\_1303-I\_1308, 2014
  11. 兵藤誠, 竹門康弘, 角哲也, 粟津陽介・鄧朝暉, 洪水時の地形の浸食堆積履歴が河川生息場の好適性に及ぼす影響, 土木学会論文集 B1(水工学), 第 70 巻, 1345-1350, 2014
  12. Scharnweber K, K Watanabe, J Syvaranta, T Wanke, MT Monaghan and T Mehner, Effects of predation pressure and resource use on morphological divergence in omnivorous prey fish, BMC Evolutionary Biology, Vol.13, 132, 2013, DOI: 10.1186/1471-2148-13-132
  13. 糠澤桂, 風間聡, 渡辺幸三, HSI 種多様性に基づく流域の遺伝的多様性空間分布の予測, 土木学会論文集 B1(水工学), Vol.69, I\_1303-I\_1308, 2013
  14. 高橋真司, 竹門康弘, 大村達夫, 渡辺幸三, ダム下流河川の流水性・止水性ハビタット間に見られる微粒状有機物の起源の違い, 土木学会論文集 G(環境), Vol.69, No.7, III.547-III.555, 2013
  15. 高瀬陽彦, 糠澤桂, 風間聡, 渡辺幸三, 分布型流出・水温モデルを使用した水生昆虫の生息環境評価, 土木学会論文集 B1(水工学), Vol.69, I\_1255-I\_1260, 2013
  16. 八重樫咲子, 渡辺幸三, 大村達夫, 河川水生昆虫ヒゲナガカワトビケラの遺伝的多様性に及ぼす環境選択の影響, 土木学会論文集 G(環境), Vol.69, No.7, III.489-III.494, 2013
  17. 岡田紫恵奈, 伊藤潤, 吉村千洋, 増山貴明, 藤井学 河川・洪水氾濫原における微細堆積物の特性及び溶存酸素消費の関係, 土木学会論文集 G(環境), Vol.68, No.7, 205-215, 2012
  18. 糠澤桂, 風間聡, 渡辺幸三, 河川生物の HSI 種多様性と遺伝的多様性の関係性について, 土木学会論文集 G(環境), Vol.68, No.7, pp.III\_603-III\_610, 2012
  19. 高橋真司, 渡辺幸三, 竹門康弘, 大村達夫, 高精度 GPS を用いた河川ハビタット構造の定量化と底生動物の種多様性保全への活用, 応用生態工学, 15(1), 121-130, 2012
  20. 八重樫咲子, 渡辺幸三, 大村達夫, 河川ハビタット構造と水生昆虫モンカゲロウの遺伝的多様性の関係, 土木学会論文集 G(環境), 第 68 巻, 611-616, 2012
- 〔学会発表〕(計 18 件)
1. 近藤俊介, 八重樫咲子, Michael T. Monaghan, 竹門康弘, 渡辺幸三, イタリアアルプス自然河川のトビケラ群集の DNA 種分類法を用いた種多様性の解明, 土木学会四国支部第 21 回技術研究発表会, 香川大学(香川県・高松市), 2015.5.23
  2. 泉昂佑, Maribet Gamboa, 三宅洋, 渡辺幸三, 次世代 DNA シークエンシングと DNA 種分類法を用いた河川底生動物群集の種多様性評価技術の開発, 土木学会四国支部第 21 回技術研究発表会, 香川大学(香川県・高松市) 2015.5.23
  3. 福田航平, 加藤幹男, 渡辺幸三, 次世代 DNA 解析による種多様性評価の正確性向上を目的とした DNA 型コピー数標準化法の開発, 土木学会四国支部第 21 回技術研究発表会, 香川大学(香川県・高松市), 2015.5.23
  4. Matsumae H, Yoshimura C, Ryo M, Evaluating spatiotemporal pattern of riverine geomorphology based on satellite imageries, International Symposium on Environmental Flow and Water Resources Management, Bangkok (Thailand), 2014.10.30
  5. Arai R, Nukazawa K, Kazama S, Takemon Y, Thermal effects on benthic invertebrates within the headstreams, 19th Congress of the Asia and Pacific Division of the International Association for Hydro-Environment Engineering and Research (IAHR-APD), Hanoi(Vietnam), 2014.9.23
  6. Kondo S, XF Garcia, Y Takemon, K Tockner, MT Monaghan, K Watanabe, DNA Taxonomy Reveals Species Diversity of Chironomidae (Diptera) in a Semi-natural River in the Alps, The 2nd Symposium of Benthological Society of Asia Busan (South Korea), 2014.6.6
  7. Watanabe K, K Izumi, M Gamboa, Y Miyake, DNA-based assessment of species richness of stream macroinvertebrate community using next generation sequencing, The 2nd Symposium of Benthological Society of Asia, Busan (South Korea), 2014.6.6
  8. Gamboa M, K Watanabe, Y Takemon, MT. Monaghan, Assessing biodiversity of stoneflies (Plecoptera) using mitochondrial and nuclear DNA, The 2nd Symposium of Benthological Society of Asia, Busan (South Korea),

- 2014.6.6
9. Nukazawa K, Kazama S, Takase A, Watanabe K, Estimating habitat suitability of stream insects based on hydrological simulation and its connection to genetic diversity. Joint Aquatic Sciences Meeting (JASM), Portland (USA), 2014.5.23
  10. Okada S, Yoshimura C, Saavedra OCV, Ryo M. Estimation of land cover and water depth distribution of a river-floodplain system using high resolution satellite image, The International Conference on the Preservation and Rehabilitation of Urban Water Environment for Asian Core Program of NRCT, JSPS, and ERDT, Bangkok (Thailand), 2013.11.23
  11. Takase A, K Nukazawa, S Kazama, K Watanabe, Relationship between aquatic insects habitats and environmental factors using hydrological simulation model, 35th IAHR World Congress, Chengdu (China), 2013.9.11
  12. Nukazawa K, S Kazama, K Watanabe, Spatial prediction of adaptive genetic variation in stream caddisfly based on basin-scale hydraulic and thermal simulations, HydroEco2013, Rennes (France), 2013.5.14
  13. Ock G, Y Takemon, T Sumi, G Kondolf, Ecological significance of riverine gravel bars in regulated river reaches below dams. AGU2012, San Francisco (USA), 2012.12.3
  14. Ishida, Y. Takemon, Y: Faunal characteristics of bar-head wando and bar-tail wando, newly classified types of fluvial lentic habitat, ASLO Aquatic Sciences Meeting, Biwako Hall, Otsu, (Japan), 2012.06.10
  15. Kobayashi, S. Takemon, Y: Roles of floods on the habitat quality of riffles for benthic invertebrates in rivers, ASLO Aquatic Sciences Meeting, Biwako Hall, Otsu, Otsu, (Japan), 2012.06.10
  16. Terada M., K Watanabe, W Bertoldi, AM Gurnell, K Tockner, Y Takemon, Relations of species diversity of aquatic animal communities to the habitat age of floodplain pools in the Tagliamento River, 2012 Association for the Sciences of Limnology and Oceanography (ASLO) Aquatic Sciences Meeting, Biwako Hall, Otsu, (Japan), 2012.06.10
  17. Yaegashi S, K Watanabe, T Omura,

- Nuclear introgression between distinct mitochondrial lineages in stream caddisfly *Stenopsyche marmorata* populations inferred from bayesian admixture analysis, 2012 Association for the Sciences of Limnology and Oceanography (ASLO) Aquatic Sciences Meeting, Biwako Hall, Otsu, (Japan), 2012.06.10
18. Takahashi, S. Watanabe, K. Omura, T. Takemon, Y: Habitat-specific influence of discharge water from dam on trophic sources of stream invertebrates revealed by stable isotope analysis, ASLO Aquatic Sciences Meeting, Biwako Hall, Otsu, (Japan), 2012.06.10

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大村 達夫 (OMURA, Tatsuo)  
東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授  
研究者番号: 30111248

### (2) 研究分担者

吉村 千洋 (YOSHIMURA, Chihiro)  
東京工業大学・理工学研究科・准教授  
研究者番号: 10402091

竹門 康弘 (TAKEMON, Yasuhiro)  
京都大学・防災研究所・准教授  
研究者番号: 50222104

風間 聡 (KAZAMA, So)  
東北大学・工学研究科・教授  
研究者番号: 50272018

西村 修 (NISHIMURA, Osamu)  
東北大学・工学研究科・教授  
研究者番号: 80208214

渡辺 幸三 (WATANABE, Kozo)  
愛媛大学・理工学研究科・准教授  
研究者番号: 80634435

(3) 連携研究者  
なし