

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19310022
 研究課題名 (和文) 古座川水系七川ダムの放水が串本湾の底生生物群集に与えるインパクトに関する研究
 研究課題名 (英文) Research on the impact of water discharge from Shichikawa Dam in Kozagawa River system onto the benthic community in Kushimoto Bay
 研究代表者
 白山 義久 (SHIRAYAMA YOSHIHISA)
 京都大学・フィールド科学教育研究センター・教授
 研究者番号：60171055

研究成果の概要 (和文)：

和歌山県古座川水系にある七川ダムの放水が、河口域串本湾の底生生物群集に与える影響を調べた。ダムの放水と河川水あるいは河口海域の濁度の増加とには、関連のある場合とない場合があった。また河口域の海底環境や底生生物群集の状況は、河川からなんらかの影響があることを示唆したが、ダムの放水との直接的な関連は明らかにならなかった。分子生物学的手法による多毛類同定の試みは、ミトコンドリア CO1 領域を用いることによって基本的に可能であることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文) : The impact of water discharge from Shichikawa Dam build in Kozagawa water system of Wakayama Prefecture onto the benthic community in the river mouth region of Kushimoto Bay was analyzed. The relationships among water discharge and increase of turbidity in river water and sea water in the river mouth area were not always clear. The characteristics of benthic community and benthic environment indicated some influence by river but not directly related to the water discharge from dam. The trial to use molecular techniques for rapid identification of polychaetes was successful when mitochondrial CO1 region was used as a marker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野：海洋生物環境生態学

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：環境影響・ダムの放流・底生生物群集・森里海連環・串本湾

1. 研究開始当初の背景

海洋生態系と陸上生態系との密接な連環

に関する社会的な関心が近年高まって来ている。漁民が植林を積極的に行っていることは象徴的である。しかし、森林と海洋との河川を通した連環は科学的に十分明らかになっていないと言えない。京都大学では、地球環境問題の研究を推進する3本柱のひとつとして、平成15年度にフィールド科学教育研究センターを設立し、本センターではこの森里海の連環学に正面から取り組もうとしていた。

治水ダムは、水害の防止としての社会的役割を果たしてきたが、逆に河川の水量の減少とそれに伴う水質の変化が河口域生態系に負の影響を与えていると言われていた。また豪雨時に行われる放水は、河川から河口域への淡水の流入量の急速な増加につながり、河口域の水中および海底の海洋環境に深刻な影響を及ぼしていると考えられていた。このダム建設という陸域の人間活動と沿岸海域環境との連環について明らかにするは、緊急の科学的課題であった。

本研究では、古座川水系をモデルフィールドとして選定した。古座川は、紀伊半島の南東部を流れる河川で、本流と小川というほぼ同規模の支流を持つ。本流の上流域にある七川ダムは治水を主たる目的としているが発電も行っている。平時にダムのある本流の水と小川を流れる水とを比較すると、前者には大量の懸濁粒子が含まれ、明らかに濁りがあるのに対し、小川の水は清浄で濁りはほとんど見られない。この事実はダムの存在が河川水の水質に影響を及ぼしていることを示唆しており、ダム湖を含む古座川水系の水の分析もその可能性を強く支持していた。

古座川の集水域はしばしば集中豪雨に見舞われるため、七川ダムの治水機能は重要である。しかし、ダム施設を守るための緊急放流が原因となって、下流域および河口域（串本湾）の生態系に重大な影響を及ぼしたと考えられる事例が、過去に複数あった。例えば、平成13年には、串本湾において養殖されていた大量のマグロが七川ダムの放水の直後に死亡し、因果関係が強く疑われている。そこで、われわれは今回この七川ダムの放水というイベントが海洋環境へ及ぼす影響に注目することとした。

2. 研究の目的

七川ダムの放水は串本湾において海水の塩分低下と濁度の増加をもたらすと予想され、実際我々の予備調査でもその影響を捕捉していた。しかし、このような急激な海洋環境の変化が、生態系に与えるインパクトは定量的に調べられてはいない。そこで本研究では、定期調査によって底生生物群集を中心に海洋生態系のベースライン調査を行うと共に、現地施設の強みを活かしてダムの放水直

後に海域調査を機動的に実施して、そのインパクトを定量的に明らかにすることを第一の目的とした。

本研究ではさらに、分子生物学的な手法を用いて底生生物群集を解析することを試みることを、第2の目的とした。本研究で主要な材料とする予定の、線形動物・ソコムジコ類・多毛類はどれも形態に基づく分類同定のためには高度な専門的知識を必要とし、その作業は“余人を持って代えがたい”。そのため、従来の方法では、大量のサンプルを処理することは不可能である。本研究では特に多毛類の優占種について分子生物学的情報を収集し、それぞれに固有の情報を特定することによって各個体を同定する方法を開発することを目指した。これによって、専門家以外でも正確に主要な底生生物種を同定することができるようになり、サンプルの解析能力を飛躍的に向上させることができるようにしたいと考えた。

3. 研究の方法

(1) ダムの放水の影響調査

ダムの放水に伴って発生する沿岸域でのシルトの堆積が、沿岸底生生物群集に与えるインパクトを明らかにするために、下記の4種のフィールド調査を実施した。

- A. センサーによる古座川水系の常時モニタリング
- B. センサーによる串本湾の常時モニタリング
- C. 串本湾のベースライン調査
- D. 串本湾の七川ダム放水直後の機動的調査

AとBは、ダムの放水にともなって大量に輸送されてくるシルトを定量し、河川さらに沿岸域に与える影響を定量的に評価するために必須の観測項目である。またCは、シルトの堆積が底生生物群集に与えるインパクトを評価するために必須の基礎データである。またDは本研究で最も重要なフィールド調査となる。

Bのセンサーによる調査では、月に1回の割合でバッテリーを交換しデータを回収した。センサーは古座川中流域の潜水橋と河口域（串本湾）とに濁度計、また串本湾には、それに加えて水温塩分計を設置した。

Cの串本湾のベースライン調査は、次の項目の観測を実施した。

- ① 湾内に4点の定点を設定し、各点で表層から海底直上層までの採水をニスキン採水器を用いて行った。St.1は、古座川河口よりも湾外に位置する地点であり、概要の影響を強く受けることが想像される。St.2は、湾口に位置し、古座川の影響を最も強く受けるだろう

と想像される。またこの地点は、センサーを設置した場所でもある。St. 3は湾口よりも湾奥に向かった地点であり、もし古座川の影響が、湾奥に向かうなら、直接の影響を受ける可能背もある。St. 4 はもともと湾奥に位置している。この場所と古座川河口との間には、橋杭岩とその延長が横たわっており、古座川からの直接の影響はあまり受けることはないだろうと想定される地点である。

採水試料は、船上でろ過したのち、100mlのポリエチレン瓶に保存し、実験室においてオートアナライザを用いて硝酸・亜硝酸・アンモニア・燐・珪素の各種栄養塩濃度の測定をおこなった。またセンサーを用いて、現場で塩分・水温・濁度・クロロフィル濃度を測定した。本作業は、串本町にある和歌山県水産試験場の協力を受けて実施した。

② 上記4 定点においては、底質調査も行った。サンプリングにはスミスマッキンタイア型採泥器を使用した。採集した海底堆積物は船上で直ちにビニール袋に移し、冷凍保存した。試料から含水率、堆積物の粒度組成(特にシルト含量)、有機炭素・窒素含量を分析した。試料の分析は、諸般の事情から、外部に委託した。

③ 上記4 定点においては、さらに底生生物群集の調査を実施した。サンプリングには同じくスミスマッキンタイア型採泥器を使用した。採集した海底堆積物から、メイオベントス採集用にサブコア(内径34 mm)を用いてサブサンプルを採取し、残りの試料はマクロベントス分析用に、船上で0.5mmの篩で洗浄し、5%中性ホルマリン海水で固定して保存した。またメイオベントス分析用のコア試料は、実験室において厚さ1.0cmの層別に分け、各層の試料を5%中性ホルマリン海水で固定して保存した。マクロベントス・メイオベントスの保存試料から、それぞれ顕微鏡下でマクロベントスおよびメイオベントスの生物試料を分別し、各個体を分類同定して、群集構造を明らかにした。また、群集解析には、0.5mmの篩と1.0mmの篩の分画を区別した。

これらの現場作業では、船舶が必須であるが、和歌山県水産試験場が平成19年度は全面的に協力してくれた。平成20年度からは、新たに瀬戸臨海実験所が建造した海洋調査実習船「ヤンチナ」を活用してフィールド作業を実施した。

Dの串本湾の七川ダム放水直後の機動的調査については、Cと同じ内容で現場調査および試料の分析を実施した。

群集構造解析には、ソフトウェア PRIMER6

(PRIMER-E, 1td.)を用いた。優占種の影響を抑えるために、原則としてデータを平方根変換した。各サンプルにおける各種の個体数を元に、サンプル間の群集の類似度を、Bray-Curtis coefficientを用いて計算した。その結果を元に non-metric multidimensional scaling (MDS)を用いて各サンプルの群集構造の類似関係を平面上に視覚化した。それと同時に、月間および測点間(St. 1-4)で群集構造に有意な差があるかどうかを、Analysis of similarities (ANOSIM)を用いて検定した。

(2) 分子生物学的手法による多毛類同定法確立の試み

底生生物群集の調査を、研究期間の後半により効率的に行うため、優占種について分子生物学的な解析から分類同定が可能なシステムを特に多毛類に注目して、構築することを目指した。必要な試料として、さらにスミスマッキンタイア型採泥器を使用して海底堆積物を採取した。この試料は冷蔵保存して実験室に持ち帰り、直ちに0.5mmの篩による洗浄と動物の分別作業を行い、分別した優占種について、一部を分類同定用に固定したうえで、残りの個体を冷凍保存して、瀬戸臨海実験所に持ち帰り、ミトコンドリアCOI遺伝子をマーカーに分子生物学的な分析を行った。

実験室において、採集したゴカイは、同じ種ごとに取り分けた後、1種あたり1-10個体を個体ごとにグアニジン溶液、もしくは99%エタノールの入った2mlチューブに入れた。グアニジン溶液に入れたものについては、その溶液中で数日から数週間タンパク質を溶解した後、フェノール/クロロフォルム抽出法にてDNAを抽出した。エタノールで保存したものについては、一般のDNA抽出キットを用いてDNAを抽出した。

抽出したDNAを基にCOI遺伝子をCOIユニバーサルプライマー(Folmer et al. 1994, LCOI: 5'-ggcaacaatcataaagatattgg-3'、HCOI: 5'-taaacttcagggtgaccaaaaaatca-3')とTaq polymerase (TaKaRa)を用いてPCRにて増幅した。PCRの条件は、95°C 30秒の後、95°C : 30秒 - 55°C : 30秒 - 72°C : 90秒を30サイクル、最後に72°C : 4分である。増幅されたバンドの有無は、臭化エチジウムを含んだ寒天ゲル(1%)にて電気泳動することで確認した。バンドが確認できたものについては、Exonuclease I およびSAP (TaKaRa)による酵素処理を行い、ABI310を用いてダイレクトシーケンシングにてDNA塩基配列を決定した。

得られたCOIの塩基配列は、配列解析ソフトSeqencherを用いてアライメントし、系統推定ソフトPAUPを用いて分子系統関係の推

定を行った。分子系統樹は、近隣接合法によって作成した。また、ブートストラップは1000回行った。

4. 研究成果

(1) ダムの放水の影響調査

センサーによる古座川中流域の水温・抱く度の常時観測、および串本湾口における水温、塩分、濁度の常時観測、さらに古座川水系の降雨量、七川ダムの放水量の詳細なデータを、研究期間を通じて取得することができた。

その結果、次の点が明らかになった。

① 古座川水系に降雨が観測されると、必ず河川水の濁度が上昇した。しかし、河川水の濁度の上昇は、必ずしも河口域の海水の濁度の上昇と関連しておらず、河川水の濁度が上昇しても、河口域の濁度が上昇しない場合、あるいは、河川水の濁度の上昇がみられないにもかかわらず、河口域の濁度が上昇する場合があります。河川水の濁度の上昇が常に河口域の海水の濁度の上昇につながるわけではないことが明らかになった。

② 非常に高いレベルの河川水あるいは河口域の濁度の上昇は、ダムの放流に高い相関がみられた。またしばしばこの現象は、河川水の水温の低下を伴っており、ダムの放水と河川水（さらには河口域）の濁度の上昇とに何らかの関連があることが示唆された。しかし、ダムの放水がなくても、降雨があれば濁度は上昇し、ダムの放水は激しい降雨と連動しているため、降雨量の上昇が原因である可能性もあり、直接的な因果関係を明らかにするためには、ダムから放水された水を採取して分析するなどのさらなる研究が必要であることも明らかになった。

③ 非常に高いレベルの河口域の濁度の上昇は、塩分濃度の減少を伴っており、河川水の影響によるものであることが確認された。ただし、河川水の濁度の上昇はかなり長期間継続するが、河口域の濁度は速やかに平常時のレベルに戻り、海域での粒子の拡散速度が非常に速いことが明らかになった。

(2) 底生生物の群集構造の変動とダムの放水との関連

MDS解析の結果から、2008年度のマクロファウナの群集構造は、全体として、測点によって異なっており、同じ測点においても、月によってかなり異なる傾向が見られた。2wayANOSIMの結果、測点間および月間共に、群集構造に有意な差が検出された(測点間、月間共に $p < 0.01$)。

各測点のプロットを個別に見ていくと、同じ月に St. 2, 3 から採集されたサンプル間の群集構造は、他のサンプルに比べて類似度が高く、また季節間の差も相対的に小さかった。それに対して St.1 では、月によって群

集構造は大きく変化した。興味深いことに、河口から最も離れている St. 4 の群集構造の月変動も、St.1 同様に大きかった。

同じような傾向は、2009年度についても見ることができた。さらに、2008年度と2009年度を合わせて解析すると、各年ごとに比較的特徴が類似しているらしく、特に St.2,3 では年ごとの群集に高い類似度を見ることができた。

2年間にわたるデータを総合して、MDSの結果に、各サンプルの中央粒径、標準偏差、TOC、TON、C/Nを重ね合わせて解析すると、群集構造の時空間変動と計測された環境要因との強い関連性は、見いだされなかった。しかし、2008年度に限った解析をすると、中央粒径やTOC、TON、C/Nなどの堆積物のパラメータと、群集構造とは、何らかの関連性がみられた。

環境要因の測定を元に考えると、各測点の環境は、St.1は2年間を通して堆積物粒子が常に粗い海底であり、陸起源(おそらく河川からの流入)の有機物付加は予想通り少ないことが確認された。河口域の St.2 は、堆積物粒子が常に細かい海底で、陸起源の有機物の負荷を受けていることが確かめられた。St.3も、堆積物粒子が常に細かい海底であるが、陸起源の有機物付加は St.2 に比べて少ないという、これも予想通りの結果となった。しかし St.4 は予想と異なり、堆積物粒子や有機物量が月スケールでかなり変化しており、またこの変化は、季節的で周期性のあるものではないらしいことがわかった。そして地形的な要因から、2年間を通して、陸起源の有機物負荷が最も大きい場所であることが明らかになった。これらの結果を総合すると、環境要因の解析からは、底生生物の生息環境に対し、河川水はある一定の影響を与えているが、それは地形から決定されるものに比べて、支配的なものではないらしいことが明らかになった。

また群集構造に関しては、全体として、各測点における時間変異より、測点間の空間変異の方が大きいことがはっきりした。そして各測点ごとに見てゆくと、St.1の群集構造は他の測点と明確に区別でき、それは、明らかに堆積物環境を反映しているであろうと解釈された。一方 St.2,3の群集構造は類似していたが、この結果も、堆積物粒子の組成が似ていることと、測点間の距離が小さいことを考慮すると理解できる。またこの結果は、群集構造に、有機物供給量はあまり大きな影響を与えていないらしいことを示唆した。

St.4では、環境としてC/Nが常に高い。ことことは常に陸起源の有機物が大量に供給されていることを示唆する。また2009年を見てみるとTOC、TONは5月に比べて7月、11月に増加。逆に中央粒径は7月、11月に

減少した。7月、11月時期にダム放水により細かい粒子が海底面に堆積し、かつ陸起源の有機物量が増大したのだとすれば、これらの環境要因の変動は理解できる。しかし、2008年の場合、最もダム放水のインパクトが弱かったはずの6月に、最も小さい中央粒径が観察された。また、TOC、TONは、2009年度のような月による大きな変化は見られなかった。したがって St. 4 はダム放水の影響を受ける測点であるかどうかははっきりしない。しかし、最も環境が時空間的に不安定な場所ではあるだろう。このことが影響してか、St. 4 のマクロベントスは、もっとも月ごとの変動が大きかった。

以上の結果をまとめると、古座川の河口域では、河川水の影響が、海水、海底ともに認められるが、底生生物群集が河川水の影響によって大きく変動するという現象は認められなかった。

(3) 分子生物学的手法による多毛類同定法確立の試み

採集された多毛類の内、下記の14科21種についてCOI遺伝子の塩基配列が解析できた。*Spio* sp., *Spinoidae* sp. 1, *Spionidae* sp. 2, *Spionidae* sp. 3, *Prionospio sexoculata* (*Spinoidae*), *Inemonephtys japonica*, *Nephtyidae* sp. 1, *Nephtyidae* sp. 2 (*Nephtyidae*), *Praxillella pacifica* (*Maldanidae*), *Magelona* sp. (*Magelonidae*), *Aricidae foliate* (*Paraonidae*), *Tharyx* sp. (*Cirratulidae*), *Scalibregmidae* sp. 1 (*Scalibregmidae*), *Phyllodoce koreara* (*Phyllodocidae*), *Nonomastus* sp. (*Capitellidae*), *Sigambra phuketensis* (*Pilargidae*), *Hesionidae* sp. (*Hesionidae*), *Sigalion papilbsus*, *Thalenessa* sp. (*Sigalionidae*), *Glycera* spp. (*Glyceridae*), *Terebellidae* sp. 1 (*Terebellidae*)。

分子系統関係を推定した結果、基本的に多毛類はCOI遺伝子によって大部分の科が区別可能であることが判明した。ただ、多毛類の系統関係については、枝が長く科間のブートラップ推定値も低いことから、系統推定にはあまり向いていないことも明らかになった。

それぞれの科について見てみると、タケフシゴカイ科・カギゴカイ科・チロリ科が単系統となった。しかし、ノラリウロコムシ科とウロコムシ科は区別できなかった。一方、スピオ科とシロガネゴカイ科は多系統となった。特にシロガネゴカイ科はまったく系統としてまとまらず、多毛類全体に分散していた。ただ、スピオ科を見てみると *Spio* 属がきれいな単系統になっており、属レベルでは単系統である可能性が高い。

多毛類は形態から科を同定することも専門的知識が必要である。さらに属レベル、種

レベルになると、詳細な形態観察と時間が必要になってくる。今回の結果から、COIの塩基配列を決定することで、少なくとも串本湾で良く見られる多毛類の科を見分けることが可能であると結論できた。さらに属まで同定ができたものについては、COI遺伝子によって属まで決定することが可能となった。

このCOI遺伝子であるが、近年、遺伝子バーコードに使用されている遺伝子である。今回は467bpを解析したが、これをたった200bpまで短くしても系統樹の樹形が変わらなかった。このことから、上記2つのプライマーを用いてPCRで増幅した後に、一方のプライマーだけを用いて塩基配列を決定すれば、科を調べる指標として簡単に利用できることが明らかになった。

一方、約700bpの塩基配列を用いて、制限酵素の切断によるバンドパターンの違いを調べたが、変異が大きく科特異的なバンドパターンを見つけることができなかった。

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〕(なし)

〔学会発表〕(なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白山 義久 (SHIRAYAMA YOSHIHISA)
京都大学・フィールド科学教育研究センター・教授
研究者番号：60171055

(2) 研究分担者

深見 裕伸 (FUKAMI HIRONOBU)
京都大学・フィールド科学教育研究センター・助教
研究者番号：50402756

加藤 哲哉 (KATO TETSUYA)
京都大学・フィールド科学教育研究センター・技術職員
研究者番号：20397566

嶋永 元裕 (SHIMANAGA MOTOHIRO)
熊本大学・沿岸域環境科学教育研究センター・准教授
研究者番号：70345057