ダムおよび瀬切れによる河川分断化が エルモンヒラタカゲロウの地域間交流に 及ぼす影響の遺伝的評価

八重樫 咲子^{2*}・不破 直人¹・山崎 久美子²・三宅 洋²・渡辺 幸三²

¹愛媛大学工学部 (〒790-8577 愛媛県松山市文京町3番)

²愛媛大学大学院理工学研究科 (〒790-8577 愛媛県松山市文京町3番)

* E-mail: yaegashi@cee.ehime-u.ac.jp

本研究では、愛媛県重信川のエルモンヒラタカゲロウ (*Epeorus latifolium*) の流域内遺伝子流動を明らかにした。重信川は流域中で貯水ダム、堰・砂防ダム、自然環境下で存在する瀬切れによる河川分断化が発生している河川である。遺伝子流動の解析にはミトコンドリアDNAのCytochrome Oxidase subunit I 領域を対象としたDNA多型分析を用いた。その結果、貯水ダム、瀬切れによって分断された集団間では有意な遺伝的分化は認められなかった。一方で堰・砂防ダム分断区間では有意な遺伝的分化が認められた (遺伝距離=0.311-0.841, $P<0.001-0.01$)。これは短距離に多数存在している堰・砂防ダムによってエルモンヒラタカゲロウの移動が阻害された可能性を示す。ただし、堰・砂防ダムで分断された地点間は標高差が大きいことから、地点間の水温差が成長速度の違いを生み、生殖分離が発生していた可能性もある。また、本研究で対象とした貯水ダムは湛水面積0.5km²と比較的規模が小さいため、エルモンヒラタカゲロウの移動阻害が発生しなかったと考えられる。さらに、瀬切れ区間で遺伝的分化が見られなかったことは、重信川で恒常的に自然発生する瀬切れに適応して移動する生活史を地域個体群が有している可能性を示唆している。

Key Words : genetic differentiation, river fragmentation, intermittent river, aquatic insect, check dam

1. はじめに

水圏生態系は、治水や利水に伴う河川の分断化、流量制御、水質汚濁など人為的影響を受けやすい。ダムなどの大型河川横断構造物は、流況を変化させ、河床のアーマールコート化や生息場の消失を引き起こす¹⁾。また、大型の河川横断構造物により水生昆虫の流下・飛行阻害が起こり、生物の生息地分断と局所個体群の孤立化が発生する²⁾⁻⁶⁾。このように地域集団間の連続性が低下して孤立化が進行した生息地では、近親交配が発生し、近交弱勢により孤立個体群の絶滅リスクが高まる⁷⁾。河川流域内の生物多様性を保全するため、河川分断化が水生昆虫の地域間交流に及ぼす影響を評価する必要がある。

主な河川の流程分断の要因として、利水や治水を目的とした貯水ダム、貯水ダムよりは小さいが設置数が多い堰・砂防ダム、流路内の水が干上がる瀬切れが挙げられる。貯水ダムは大規模な湛水面積を持ち、下流の環境を著しく改変させる。また、このような貯水ダムにより水生昆虫の交流が阻害されることが報告さ

れている^{4)-6),8)}。堰・砂防ダムはダムと違って大規模な湛水域を持たないが、河道内の設置数は多く、飛翔能力の低い水生昆虫の交流を阻害することが予想される。瀬切れは、自然状態で土砂供給量の多い河川や、人為的な河川水の過剰取水が行なわれている河川で発生する。瀬切れが発生することで生息場が失われ、瀬切れ上下流の局所集団間の移動が妨げられる可能性がある。

愛媛県の重信川は貯水ダム、砂防ダム、瀬切れによる河川分断が発生している一級河川である。重信川流域は瀬戸内式気候のため雨量が少なく、急傾斜であるため降水が短時間で海に流出する。さらに土砂生産量が多いため、厚い堆積層が形成される中流部の扇状地部では古くから瀬切れが観察されてきた。支流の石手川には治水・利水を目的とした石手川ダムがある。また、流域には100基以上の堰・砂防ダムを有する。したがって、重信川を調査フィールドとすることで水生昆虫の移動分散に対する、貯水ダム、堰・砂防ダム、瀬切れの3種の河川分断の影響を評価することができる。

水生昆虫の流域内交流の解明にはDNA多型解析が有効である。この手法では同種内集団間の遺伝的類似度から遺伝子流動を明らかにし、移動分散を推定する。DNA多型解析を用いると全流域スケールで、水生昆虫のこれまでの交流動態を反映した移動分散を明らかにすることができる^{9)・12)}。また、従来の標識再捕法¹³⁾で得られた移動距離とDNA多型で推定された移動距離は十分に合致する例が報告されている^{10)・11)}。

以上の背景より本研究では、重信川を対象に貯水ダム、砂防ダムおよび瀬切れが水生昆虫の流域内交流に与える影響を、DNA多型解析を用いて明らかにする。本研究では重信川に広く生息しているエルモンヒラタカゲロウ (*Epeorus latifolium*) を対象とした。エルモンヒラタカゲロウは終齢幼虫の体長が15mm前後で、重信川流域に広くに生息する。1年2化以上で、成虫は晩春から初夏にかけてと秋に出現する。羽化時には水中羽化を行うことが知られている。幼虫は季節を問わず河川水中に存在しており、典型的な流水性の種であるため水位低下による止水化と干上がりによる乾燥の影響を受けやすいことが予想される。

2. 方法

2.1 調査地の概要とサンプル採取方法

2013年8月から9月にかけて愛媛県の重信川本支流でサンプリングを行った。重信川本流に4地点、支流の表川と砥部川に1地点ずつ、石手川の貯水ダム（石手川ダム、堤高87m、湛水面積0.50km²）の上流と下流に1地点ずつ、計8地点を調査地点として設定した（図1-(A)）。本流の水源は愛媛県東温市の東三ヶ森（標高1233m）にあり、瀬戸内海に注ぐ幹川流路延長約36km、流路面積約445km²の河川である。重信川本流ではSt4からSt8の間に断続的に瀬切れが見られる。また、堤高が50cm以上の河川横断構造物は、調査対象区に98基存在している。

各調査地点でキックネット法とエレクトロフィッシュャー（LR-24, Smith-Roots Inc.）を用いた定性サンプリングを行ない、エルモンヒラタカゲロウ112個体（各地点13-15個体、平均14個体）を採取した。採取にはDフレームネット（開口部25cm×25cm、ネット長40cm、目合い0.5mm、離合社）を用いた。採取したサンプルは即座に99.5%のエタノール中に保存した。その後、実験室に持ち帰り99.5%エタノールを

交換して、4°Cで保管した。採取した各個体は実体顕微鏡（×112.5）と日本産水生昆虫科・属・種への検索¹⁴⁾を用いて同定を行った。同定中はDNA分解酵素が促進しないようH₂Oは一切使わず99.5%エタノールを用いた。

2.2 DNA解析

同定した個体からDNAを抽出した。DNA抽出にはQIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kitsを使用した。次に抽出したDNAの濃度をNano Drop 2000（Thermo）を用いて測定した後、濃度を10-50 ng/mlに調整した。続いて、ミトコンドリアDNA（mtDNA）のCytochrome Oxidase subunit I（COI）領域をHCO2198（5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'）とLCO1490（5'-GGT CAA CAA ATC ATAAAG ATA TTG G-3'）を用いてPCR増幅した¹⁵⁾。PCR反応溶液は10xBuffer（TaKaRa）2μl、MgCl₂（25mM, TaKaRa）1.6μl、LCO（10μM）およびHCOプライマー（10μM）をそれぞれ0.5μl、dNTP（2.5mM, TaKaRa）1.6μl、TaKaRa EX Taq（TaKaRa）0.1μlにサンプルDNA1μlに、超純水で全量が20μlとなるよう調整した。PCR反応にはTM100™ Thermal Cycler（Bio-RAD）を用いた。温度条件は94°Cで2分加熱した。その後、94°Cで30秒の熱変性、42°Cで30秒間のアニーリング、72°Cで1分間の伸長反応のサイクルを30回繰り返した。最後に、72°Cで10分間の伸長反応を行い、12°Cで保持した。続いて、QIAGEN QIAquick PCR Purification Kitを用いてPCR産物の精製を行なった。その後、DNAシーケンス解析を行ない、CodonCode Aligner 2.0.6（CodonCode Corporation）でDNA塩基配列のアライメントを行なった。DNAシーケンス解析は北海道システム・サイエンス株式会社に委託して行った。

2.3 データ解析

まず採取したエルモンヒラタカゲロウの同定の正確さを確認するため、得られたDNA塩基配列と、DNAデータベースに登録されているデータとの相同性解析（BLAST解析）を行なった。対象種の幼虫はタニヒラタカゲロウと酷似し、それらの同定のキーも定量的でない。そのため誤同定が発生しやすい。以降の解析にはBLAST解析の結果、対象種である可能性が最も高いこと（相同性97-100%）を確認したサンプルのみを用いた。

次に、種内の遺伝的多様性を明らかにするため、ハプロタイプネットワーク図を作成した(図1-(B))。作図にはTCS v 1.21¹⁶⁾を用い、ハプロタイプの相同性が97%までのクレードを形成した。その後、クレードを結合したハプロタイプネットワーク図を作成した。また、地点毎のクレードの出現頻度とハプロタイプ数を算出した。

続いて地点間の遺伝的分化を明らかにするため、遺伝距離 Pairwise *Fst* を算出した。この指標は0-1の値を示し、0のときには全ハプロタイプの種数とその遺伝子頻度が等しく、集団間の分化が全く無い状態を表す。Pairwise *Fst* が1のときには、集団間で共有するハプロ

タイプが全くない完全な分化を表す。算出にはArlequin v3.5.1.2¹⁷⁾を用いた。帰無仮説を集団間には分化がない(Pairwise *Fst* = 0)とした無作為化検定を行った。検定に用いた Pairwise *Fst* の度数分布は10000パターンの個体の並べ替えにより作成した。その後、地点間の Pairwise *Fst* を用いて、非加重結合法で地点間系統樹を作成した。系統樹はPhylip v 3.695¹⁸⁾のNeighborを用いて作成し、drawgramで作図した。

最後に各種河川分断の影響を明らかにするため、貯水ダム、堰・砂防ダム、瀬切れそれぞれの Pairwise *Fst* を抽出した。また、堰・砂防ダムの数と Pairwise *Fst* の相関分析をRのTest for Association/Correlation Between

図1 (A) エルモンヒラタカゲロウの採取地点、ハプロタイプ数(丸括弧内の数字)、砂防ダムの位置と数、瀬切れ区間、各地点のクレード出現頻度。クレードの定義と凡例は(B)を参照。(B) ハプロタイプネットワーク図。楕円、四角は各ハプロタイプを表す。1ステップの差は1塩基置換に相当する。黒ドットと黒太線はハプロタイプが出現しなかったギャップを表す。塩基類似度97%を基準に5クラスターを定義。(C) 各地点の標高とPairwise *Fst*を用いた地点間系統樹。標高毎に分化したクラスターが形成されている。

堰・砂防ダムの有無にかかわらず、自然要因で発生している上下流地点で異なる生息環境への適応の結果である可能性もある。上流と下流では水温・流速・紫外線の強さ・樹冠・溶存酸素濃度など生息場の環境が異なる^{21) - 23)}。環境特性の異なる地点間では、個体群の進化過程の中で、それぞれの環境に適応進化して遺伝的に異なる地域個体群に分かれる場合がある。これまでに一部の水生昆虫で、地点間の生息環境の違いが適応的な遺伝的分化を起こしたことが報告されている^{10), 23) - 27)}。また、標高が異なる地点間のように水温が異なることが予想される地点間では、個体の成長速度が異なり、羽化時期がずれ、生殖分化が起こっている可能性もある^{9), 23) - 27)}。このように、エルモンヒラタカゲロウでも各地域集団がそれぞれ異なる標高環境へ適応した結果、遺伝的な隔離が発生した可能性もある。

貯水ダムは高い堤体と長い湛水区間を持つため、ダム上下流の集団間で最も大きい遺伝的分化を示すことが予想された。しかし、本研究では有意な遺伝的分化が見られなかった。これは本研究で調査した石手川ダムの大きさと関連すると考えられる。流域内分散を行なうことが知られているヒゲナガカワトビケラは3.3km²以上の湛水面積を持つダムで水生昆虫の移動阻害が発生する⁵⁾。石手川ダムは湛水面積が0.50 km²と小さく、貯水ダムによる交流阻害がみられたダムよりも遥かに小さい。したがってヒゲナガカワトビケラよりも体長の小さいエルモンヒラタカゲロウでも、石手川ダムを越えた移動ができたため、遺伝的分化が見られなかった可能性がある。

河川の分断の中で、最も地理的な範囲が広い瀬切れは水生昆虫の移動を大きく阻害することが予想された。しかし、瀬切れのみ、もしくは瀬切れと堰・砂防ダムで分断された全ての集団間で有意な遺伝的分化は見られなかった。また、瀬切れの影響を強く受ける下流域で、上流域よりもハプロタイプ数が高まっていた。これは、エルモンヒラタカゲロウ集団が瀬切れ区間を越えて広く移動しているためと考えられる。重信川の瀬切れは古くから発生していることが知られている。このため、エルモンヒラタカゲロウは、瀬切れ発生時期に流程に沿って充分に水量のある生息場へ移動したり、短期間の瀬切れ解消時に上下流間の積極的な交流を行ったり、または瀬切れしやすい夏期に羽化して飛翔移動をするなどして、瀬切れ環境に適応した生活史を持っていた可能性がある。また、水生昆虫の受動的移動分散の要因として風が挙げられる²⁸⁾ことから、地形による分散障害の少ない平地では、瀬切れ区間を越えた移動分散が可能であった可能性も

ある。

5. おわりに

ミトコンドリア DNA の Cytochrome Oxidase Subunit I 領域を用いて、3 種の河川分断（貯水ダム、堰・砂防ダム、瀬切れ）の影響を受けている愛媛県重信川で、エルモンヒラタカゲロウの流域内移動分散を明らかにした。この結果、堰・砂防ダムで分断された地点間では大きな分化が確認された。堰・砂防ダムは大きな湛水面積を持たないものの、河川内の短区間に数多く存在している。このため集団間交流を阻害した可能性がある。また、堰・砂防ダムで分断された地点間では大きな標高差が存在することから、上下流間の遺伝的分化は、堰・砂防ダムの有無を問わず、上下流の異なる環境へそれぞれの集団が適応した結果である可能性もある。貯水ダムと瀬切れによる遺伝的な分化は確認されなかった。本研究調査地にある貯水ダムは湛水面積0.50 km²と小さく、エルモンヒラタカゲロウの交流を阻害するに至らなかったと考えられる。また、重信川の瀬切れ現象は恒常的に発生している。したがって、この地域のエルモンヒラタカゲロウは既に瀬切れ環境に適応した生活史を獲得していたため、瀬切れは集団の分化要因になり得なかった可能性がある。今後、エルモンヒラタカゲロウに限らず、多くの水生昆虫に対する様々な河川分断に対する交流阻害が評価されることが望まれる。

謝辞：本研究は、科学研究費補助金（番号 25289172（代表：渡辺幸三）、26257304（代表：角哲也）、26630247（代表：渡辺幸三））、および河川環境管理財団河川整備基金（番号 26-1215-029（代表者：渡辺幸三））の資金的援助を受けました。また、本研究に際して野外調査・実験・データ解析など愛媛大学生態研究室のメンバーの補助を受けた。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) Strayer, D. L. and Dudgeon, D.: Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*, Vol.29, pp.344–358, 2010.
- 2) 高橋信司, 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*, Vol.15, pp.121-130, 2012.

- 3) Alp, M., Keller, I., Westram, A. M., and Robinson, C. T. : How river structure and biological traits influence gene flow a population genetic study of two stream invertebrates with differing dispersal abilities. *Freshwater Biology*, Vol.57, pp.969–981, 2012
- 4) Monaghan, M. T., Spaak, P., Robinson, C. T., & Ward, J. V. : Genetic differentiation of *Baetis alpinus* Pictet (Ephemeroptera: Baetidae) in fragmented alpine streams. *Heredity*, Vol.86, pp.395–403, 2001.
- 5) Watanabe K and Omura T : Relationship between reservoir size and genetic differentiation of the stream caddisfly *Stenopsyche marmorata*, *Biological Conservation*, Vol.136, pp.203–211, 2007.
- 6) Watanabe, K., Monaghan, M. T., Takemon, Y., & Omura, T. : Dispersal ability determines the genetic effects of habitat fragmentation in three species of aquatic insect. *Aquatic Conservation, Marine and Freshwater Ecosystems*, Vol.20, pp.574–579, 2010.
- 7) Frankham R, Ballou D.J. and Briscoe A.D. : *Introduction to Conservation Genetics*, Smithsonian Institution, 2002.
- 8) 林義雄, 谷田一三 : ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) の遺伝的集団構造に対するダム湖の影響, 神奈川県酒匂川水系での検討, 応用生態工学, Vol.11, pp.153–159, 2008.
- 9) Kozo Watanabe, So Kazama, Tatsuo Omura, and Michael T Monaghan : Adaptive Genetic Divergence along Narrow Environmental Gradients in Four Stream Insects, *PLoS ONE*, Vol.9, e93055, 2014.
- 10) Sakiko Yaegashi, Kozo Watanabe, Michael T Monaghan, and Tatsuo Omura : Inferring Fine-scale Dispersal in the Caddisfly *Stenopsyche marmorata* (Trichoptera: Stenopsychidae) Using Spatial Autocorrelation of Microsatellite Markers, *Freshwater Science*, Vol. 33, pp.172–180, 2014.
- 11) Watts, P. C., Rouquette, J. R., Saccheri, I. J., Kemp, S. J., & Thompson, D. J. : Molecular and ecological evidence for small-scale isolation by distance in an endangered damselfly, *Coenagrion mercurial*, *Molecular Ecology*, Vol.13, 2004.
- 12) Watts, P. C., Saccheri, I. J., Kemp, S. J., & Thompson, D. J. : Population structure and the impact of regional and local habitat isolation upon levels of genetic diversity of the endangered damselfly, *Coenagrion mercuriale* (Odonata: Zygoptera), *Freshwater Biology*, Vol.51, pp.193–205, 2006.
- 13) 西村登 : 円山川中流域におけるヒゲナガカワトビケラ科 2 種の分布, 金沢日本海研究報告, Vol.13, pp67-78, 1981.
- 14) 川合禎次, 谷田一三 : 日本産水生昆虫・科・属・種への検索, 東海大学出版会, 2005.
- 15) Folmer O, Black M, Hoeh w, lutz R, Vrijenhoek R : DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, Vol. 3, 294–299, 1994.
- 16) Clement, M., Posada, D. & Crandall, K. : TCS a computer program to estimate gene genealogies, *Molecular Ecology*, Vol.4, pp. 4407–4418, 2000.
- 17) Excoffier, L. and H.E. L. Lischer : lequin suite ver 3.5, A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, *Molecular Ecology Resources*, Vol.10, pp.564–567, 2010.
- 18) Felsenstein, J. : PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.7a, Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, 2009.
- 19) D. J. Best & D. E. Roberts : Algorithm AS 89, The Upper Tail Probabilities of Spearman's rho, *Applied Statistics*, Vol.24, pp.377–379, 1975.
- 20) Kei Nukazawa, So Kazama, Kozo Watanabe., Kang J. : Benthic communities and genetic structure of caddisfly *Stenopsyche marmorata* along a mountain stream fragmented by slit and unslit sabo dams, *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, Vol.146, pp. 263–276, 2011.
- 21) Keller, I., Alexander, J. M., Holderegger, R., & Edwards, P. J. : Widespread phenotypic and genetic divergence along altitudinal gradients in animals. *Journal of Evolutionary Biology*, Vol.26, pp.2527–43, 2013.
- 22) Keller, I., & Seehausen, O. : Thermal adaptation and ecological speciation, *Molecular Ecology*, Vol.21, pp.782–99, 2013.
- 23) Hodkinson, I. D. : Terrestrial insects along elevation gradients: species and community responses to altitude. *Biological Reviews*, Vol.80, pp.489–513, 2005.
- 24) Baggiano, O., Schmidt, D. J., Sheldon, F., & Hughes, J. M. : The role of altitude and associated habitat stability in determining patterns of population genetic structure in two species of *Atalophlebia* (Ephemeroptera: Leptophlebiidae), *Freshwater Biology*, Vol.56, pp.230–249, 2015.
- 25) 八重樫咲子, 渡辺幸三, 高橋真司, 永峯賢人, 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), Vol.68, pp.611–616, 2012.
- 26) 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, pp.489–494, 2013.
- 27) Coates, B. S., Sumerford, D. V., & Hellmich, R. L. : Geographic and voltinism differentiation among North American *Ostrinia nubilalis* (European corn borer) mitochondrial cytochrome c oxidase haplotypes, *Journal of Insect Science (Online)*, Vol.4, pp.35, 2004.
- 28) Bilton, D. T., Freeland, J. R., & Okamura, B. Dispersal in freshwater invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32, pp. 159–181, 2001.

(2015.5.22 受付)

Effect of habitat fragmentation by Dams and Intermittent River on Dispersal of Freshwater Insect *Epeorus latifolium*

Sakiko YAEHASHI^{1,2}, Kumiko YAMAZAKI¹, Naoto FUWA¹, Yo MIYAKE¹ and Kozo WATANABE¹

¹ Dept. of Civil and Environmental Engineering, Ehime University

² yaegashi@cee.ehime-u.ac.jp

We investigated gene flow of *Epeorus latifolium* in Shigenobu River (Ehime, Japan) fragmented by 3 types of barriers (i.e. one reservoir dam, 98 weir&check dam, intermittent flow). 112 individuals (13 - 15 individuals / population, average = 14) were collected from 8 populations and genotyped using Cytochrome Oxidase subunit I region in mitochondrial DNA. Among the 3 types of habitat barriers, the weir&check dams showed significant and the highest pairwise *Fst* between fragmented populations. In addition, the number of weir&check dams was significantly and positively correlated to the level of pairwise *Fst* ($R = 0.81, p < 0.05$), suggesting that gene flow of *E. latifolium* tends to be interrupted in sections with large number of weir&check dams (at least > 14). However, this genetic differentiation found in mountain area could be also explained by the potential process of local adaptation of the populations to the different environmental conditions associated to elevational variation between sites (e.g. water temperature, water flow velocity, UV, oxygen concentration). *E. latifolium* did not show significant genetic differentiation in the other barrier types of reservoir dam and intermittent flow. It suggests that *E. latifolium* adults fly over the small-size reservoir dam that we studied ($< 0.5 \text{ km}^2$) and have adapted life history strategy to migrate across the intermittent sections.