関東地方に生息するモツゴ地域個体群内の遺伝的多様性の評価 及びそれに対するストレスの推定に関する研究

亀田 豊^{*,**} 益永 茂樹^{*}

Evaluation of Population Genetic Structure of *Pseudorasbora Parva* in Kanto Region and Main Stressor Effects on Genetic Variability and Genotype

Yutaka KAMEDA^{*,**} and Shigeki MASUNAGA^{*}

* Graduate School of Environmental and Information Sciences, Yokohama National University, 79-7 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama, 240-8501, Japan

** Public Works Research Institute, 1-6 Minamihara, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken, 305-8516, Japan

Abstract

There is growing awareness of the need to evaluate the long-term effects of wildlife populations, not only in terms of the level of short-term effects on individuals, but also in terms of much subtler, multigenerational effects particularly for long-term conservation of ecosystems. Here, we show population genetic structure of *Pseudorasbora parva* in the Kanto region and estimate the main stressors to influencing genetic variability and genotype. Genetic diversity within a population was significant among sampling sites, but no significant relationship was detected between genetic diversity and contaminants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals, because of many types of stress effects and random genetic drift. On the other hand, cluster analysis of the fluorescence intensity of individual DNA fragment profiles measured by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis identified five genotypes: two existed in many sites in the Kanto region, and three existed in only a few sites. Genetic diversity or genotype proportion in a population at the sites where these two genotypes was dominant were also significantly related to dissolved PAH, dissolved fluoranthene, dissolved benzo[k]fluoranthene and benzo[k]fluoranthene concentrations in sediments. Finally, the population genetic structure in eight sites along the Nogawa river was evaluated. These results showed genetic diversity and genotype proportion changed discontinuously in some sites, because of changes in PAH concentration and limited migration.

Key words : *Pseudorasbora parva*, AFLP, genetic diversity, genotype, PAH

1. はじめに

2003年に水生生物の保全を目的として、全亜鉛の水質環境基準¹⁾が設定されるなど、ここ数年わが国では「生態系保全」をより前面に出した環境保全政策が打ち出されており、今後このような動きはさらに継続するものと考えられる。しかし、ここでの「生態系保全」はどの程度の時間スケールを考えるべきであろうか。おそらく、多くの人々がイメージする生態系保全の時間的スケールあるいは政策的に考える時間スケールは、自分を中心とした数世代かもしれない。しかし、従来の水環境保全施策、特に化学汚染物質をはじめとする汚染物質管理施策が、試験期間を数ヶ月から数年とした慢性毒性試験や多世代試験に基づいていることを考えると、この時間スケールは非常に長い。したがって、長期暴露による個体や個体群に悪影響を及ぼす微細なストレスの毒性評価が困

難である可能性がある。

海外においても、生態系保全の現場レベルでは、現在の毒性評価手法では評価しきれないほど非常に微細で、多世代にわたって作用する個体群レベルの影響を評価する必要性が示唆されている^{2~8)}。

このような長期的な個体群レベルの影響を評価しうる有効な方法の一つに、遺伝的多様性の評価が挙げられる。これは地域集団内の遺伝的構造が水環境中の化学汚染物質により、選択、ボトルネック、適応という形で影響を受けるほか、遺伝子流動、遺伝的浮動、突然変異による遺伝的多様性の変化が環境変動への回復力や可塑性、絶滅リスクに影響を与えるというメカニズムに基づく^{3~5,9)}。遺伝的多様性の測定方法にはアロザイムなどの酵素の多型を用いた手法やRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 手法など多数¹⁰⁾ある。その中の一つであるAFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)手法は、キ

* 横浜国立大学環境情報研究院 〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-7

** (現所属：(独) 土木研究所 〒305-8516 つくば市南原1番地6)

ットとして試薬が販売され、さらに分析方法もマニュアル化しているため、操作が比較的容易であるとともに、塩基配列情報が未知でも多型情報を得ることができるメリットがある。したがって、多くの研究者による塩基配列情報が未知の生物に対しての応用が期待される。ただし、一般にAFLP手法は広いDNA領域を一度に解析するため、特定の化学物質の遺伝子への影響を推定することは難しいとされていた。そこで筆者らはAFLP手法とクラスター分析によるジェノタイプ分類を併用した遺伝的多様性評価手法により、遺伝的多様性に影響を与える主要な環境因子のスクリーニング的な評価を試みた¹¹⁾。その結果、野生に生息するモツゴ(*Pseudorasbora parva*)個体群の遺伝的多様性が生息環境によって大きく異なることを報告した。また、遺伝的多様性の減少に影響を与えていると考えられる主要なストレスとして、下水及び下水処理水、水田排水が抽出できる可能性を明らかにした。これらの結果はモツゴを例にした魚類個体群の長期的な地域個体群絶滅リスクアセスメントに応用できる可能性を示唆している。しかし、この生態リスクアセスメントへの応用には、地域集団内の遺伝的多様性の空間分布の把握やストレスやジェノタイプのより網羅的な把握、さらには移入・移出率等の物理学的なストレスの影響の大きさを把握する必要がある。

そこで、本研究では筆者らが開発した手法を用いて関東地方の異なる河川水系に生息するモツゴ地域個体群の遺伝的多様性を測定しその分布を把握した。さらに、遺伝的多様性の測定結果とジェノタイプ分類結果を統合することで、影響を与えると考えられるストレスをより網羅的に推測した。一方で、東京都を流れる野川を対象に、同一河川における遺伝的多様性及びジェノタイプの流下方向分布を把握することで、遺伝的多様性に与えるモツゴの移入・移出の影響と遺伝的多様性に与える河川環境の影響を比較検討した。

2. 方法

2.1 調査概要

2.1.1 調査地点

調査地点をFig. 1に示すとともに以下に各調査地点の環境特性の概要を示す。それぞれの調査地点は特徴的なストレスが強く影響している地点と想定して選定された。

- (1) 入江川(H)、多摩川(F)、手賀沼(D)、ビン沼川(C)、小合溜(E)

入江川(神奈川県鶴見区馬場付近)は神奈川下水処理場の高度処理水で作られた人工的なせせらぎで、下水処理水の混入率がほぼ100%の河川である。したがって、下水処理水の影響が大きい生息域と想定された。

多摩川(ニヶ領上河原堰付近)は下水処理水の混入率が約50%(灌漑期)であり、付近に大規模な水田地帯は存在しない。したがって、本調査地点も下水処理水の影響のある生息域と想定された。

手賀沼(千葉県上沼田付近)は付近が流域別下水処理場区域のため、下水処理水は流入していない。したがって、未処理の生活排水をはじめとする下水処理水以外の様々な影響のある生息域と想定された。

びん沼川(埼玉県富士見市付近)は下水処理水が流入している新河岸川河川水が流入する河川である。ただし、

貯水池的な機能を果たしており、流速はほとんどなく、大量の降雨時のみ新河岸川と合流する。周囲に水田もあるため、調査地点は下水処理水や農薬等を含む水田排水の影響が想定された。

小合溜(埼玉県三郷市)は全長3.5 km、幅100 mの遊水池で流入する大きな河川はなく、中川と合流する。付近に放流する下水処理場や水田は確認できなかった。したがって、人為的なストレスはほとんど存在しない生息域と想定された。

なお、これらの調査地点は既往の報告¹¹⁾と同じ地点である。

- (2) 鳩川(G: 一之沢橋及び諏訪ヶ谷戸橋付近)

鳩川は神奈川県相模原市を流れる河川で上流部に工場地帯がある。岩下ら¹⁶⁾の調査では1996年頃にモリブデンやタリウムが非常に高濃度で検出されており、重金属汚染が過去にあった河川と考えられる。しかも、1999年には奇形魚が数多く生息することが確認されており、神奈川県がその原因調査¹²⁾を行っている。このような観点から、鳩川は重金属と考えられる著しく大きなストレスが過去に魚類に影響を与えた可能性のある生息域と想定された。

- (3) 赤堀川下流(B: 埼玉県蓮田市高虫付近)及び赤堀川上流(B: 埼玉県桶川市五丁台付近)

赤堀川下流調査地点は周囲が水田に囲まれており、水田排水が流入する地点である。調査地点は水田排水が多量に流入する水田用水路と赤堀川の合流地点とした。なお、調査地点周辺に排水を放流する工場は確認されなかった。したがって、水田排水の影響が大きい生息域と考えられる。

赤堀川上流調査地点は赤堀川下流調査地点よりも約1km上流に位置する水田の用水路である。したがって、赤堀川下流調査地点よりも水田排水の影響がより大きいものと想定された。

- (4) 水田用水路(A: 埼玉県北埼玉郡北川辺町)

本調査地点は利根川や渡良瀬第一貯水池等の水を灌漑用水として使用した広大な水田地帯の用水路である。し

Fig. 1 Map of study area showing *Pseudorasbora parva* collection sites (●) in Kanto region.

たがって、水田排水が主に流入する地点であり、周囲にストレスを与える可能性のある下水処理場や工場などは確認できなかった。したがって、水田排水の影響が大きい生息域と想定された。

(5) 八鶴湖(I: 千葉県東金市)

本調査地点は周囲800m程の小さな湖であり、水源は周囲の湧水のみであり、流入する河川は存在しない。そのため、人為的操作を除けば他の水域からの魚類の移動は不可能と考えられる。したがって、本調査地点は移入の影響が非常に小さい生息域と仮定した。なお、本湖に下水処理水や生活排水等はほとんど流入していない。

(6) 野川(Site 1~8: 東京都)

野川は東京都国分寺市に水源があり、小金井市、三鷹市等流れ、多摩川に合流する約20kmの一級河川である。合流する河川として仙川及び入間川があるが、入間川は流量が非常に少ない。また、野川自体も水源は湧水のみであるため、流量が少なくしばしば河川水が干上がり不連続化し、問題になっている。一方で降雨時になると短時間で野川に道路排水が流入するため、流量が急激に増大する。水質はD類型に指定され、2004年度の東京都の公共用水域及び地下水の水質測定結果によれば、BOD年平均値が4.9であった。原因として流量が少ないことに加え、生活排水の流入や道路排水等が考えられる。特に、山根ら¹³⁾の報告によればPAHsを含む石油系炭化水素の野川への主要な負荷源は生活排水と道路排水であると評価している。以上の観点から、野川は水質面で生活排水や道路排水の影響が強い一方で、河川の不連続化や流量の増大など、モツゴの河川内の移動性に大きな影響を与える生息域と想定された。

Fig. 1に示すように調査地点は野川上流から下流まで8地点とした。調査地点の特徴的な情報を以下に示す。Site 1は野川においてモツゴが生息する最も上流域であり、さらに上流部からの移入が考えにくい調査地点と考えられた。また、Site 1からSite 6の間は調査時が夏季の少雨期間であったため、河川水が干上がり、不連続化しており、ほとんどの調査地点間でモツゴの移動が困難であった。ただし、Site 6以降は河川水が連続的に流れていたが、Site 6とSite 7の間では橋脚工事のために河川幅は1m程度に狭められ、人為的にポンプで河川水を流す形になっていた。この工事は約1年続いた。つまり、Site 6とSite 7の間は、河川水の連続性は保たれていたがモツゴの移動は不連続であったと考えられた。

2.1.2 調査項目

各調査場所において、2004年7月~9月にモツゴを採捕するとともに、採捕した場所の河川水、底泥を採取した。採取後ただちにモツゴの全長を測定するとともに、ヒレを-80℃で保存した。ただし、入江川、多摩川、手賀沼、ビン沼川、小合溜については既往の報告¹⁹⁾で使ったデータを用いた。また、鳩川については奇形発生が多かった1999年時のモツゴ個体群について評価を行うため、神奈川環境科学センターに保存されていた、1999年3月に行われた奇形魚に関する原因調査で採捕されたモツゴを使用した。しかし、当時の河川水や底泥は手に入れることはできなかった。したがって、モツゴ採捕地点は合計18地点(鳩川は二箇所で採捕されたものを一つにプールした)となった。

河川水はPAHs測定及び重金属測定のためにそれぞれ採取され、ただちに孔径0.3 μ mのガラスメンブレン(ADVANTEC社製)及び孔径0.5 μ m PTFE製メンブレン(ADVANTEC社製)を用いてろ過し、溶存態及び懸濁態のPAHs濃度及び重金属濃度を測定した。懸濁態濃度は全体濃度から溶存態濃度を差し引くことで求めた。また、電気伝導度(EC)、SS、E₂₆₀、TOC、DOC、pHも測定した。

底泥は凍結乾燥後2 mmメッシュのふるいにかけて、河川水と同様にPAHs濃度及び重金属濃度を測定した。なお、河川水及び底泥中のPAHs濃度及び重金属濃度測定は一回しか行えなかった。そのため、調査場所の年間の平均的な濃度が評価できるように、採取日前1週間は降雨の無かった日を選択日とした。なお、河川水及び底泥調査地点は、鳩川を除く合計17地点となった。

2.1.3 分析方法

(1) AFLP

PCR条件、バッファー組成、蛍光標識等の詳細は陶山の方法¹⁴⁾に従った。以下に分析の概略を示す。モツゴの尾ヒレをDNA抽出キットDneasy Tissue Kit(QIAGEN製)を用いてDNAを抽出した後、EcoRI及びMseIを含むAFLP Core Reagent Kit(Invitrogen社製)を加え、制限酵素処理及びアダプターのライゲーションを行った。次に生成したDNA断片に対してAFLPプレセレクトティブプライマーペア(Applied Biosystem社製)を添加し、マニュアル所定の条件でPCR処理し予備増幅を行った。さらに、増幅産物にAFLP Selective Amplification Start-Up Module (Applied Biosystem社製)を添加し、所定の条件でPCRを再度行い選択的に増幅した。使用した選択的増幅用のプライマーはEcoRI-AG/MseI-CTT、EcoRI-AC/MseI-CTT 及びEcoRI-AC/MseI-CTGの計3ペアとした。この最終増幅産物をDNAシーケンサー(ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer)により電気泳動し、増幅したフラグメントの長さ及び蛍光強度を3100 GENE SCAN ver 3.7を用いて分析した。なお、フラグメントの検出範囲は50~450 bpであり、この結果多型及び共有フラグメント合わせて727本の非常に多くのフラグメントが得られた。

(2) PAHs

ろ液及び河川水水中のPAHsは、ジクロロメタンを用いた液/液振とう方法により抽出された。底泥中PAHsは1M KOHによる1時間の加熱還流により抽出された。検出は蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーHP1100series(Hewlett Packard社製)により行った。測定条件はKamedaらの方法¹⁵⁾を使用した。測定物質は既往の報告¹¹⁾と同じ14物質であり、添加回収試験における回収率はすべて89~105%であった。

(3) 重金属

ろ液、河川水、底泥中の重金属は、生物への分解性を考慮し、Total recoverable metals濃度とした。Digestion方法はGroussetらの方法¹⁶⁾に従い、ICP/MS HP4500 series(Hewlett Packard社製)により内部標準法で分析を行った。測定物質は既往の報告¹¹⁾と同じ6物質とした。回収率はMnにおいて約65%であったほかは70~100%であった。

2.1.4 解析方法

(1) 遺伝的多様性の解析手法

本研究ではSokal¹⁷⁾らによるSimple matching coefficient

(SM)を遺伝的多様性の指標として解析を行った。計算式を以下に示す。

$$SM_{xy} = \frac{N_{xy}}{N_{xy} + N_x + N_y}$$

ここで N_{xy} は個体 x , y がフラグメントのバンドを共有した遺伝子座数と両者ともバンドのない遺伝子座数の和を示す。 N_x , N_y は個体 x , y における固有なバンドが現れた遺伝子座数を示す。次に SM_{xy} を集団内のすべての2個体間の組み合わせで計算し、それらの平均を取ることでSMが計算された。

また、調査地点間の遺伝的多様性の違いについてはShapiro-Wilkの検定の結果、正規分布と判断できなかったため、Kruskal-Wallis検定を行った。

(2) ジェノタイプ分類手法

モツゴ個体のジェノタイプの分類は、各モツゴ個体のフラグメントの蛍光強度のプロファイルを利用した。ただし、既往の報告で解析したとおり、蛍光強度の変動を少なくするため、蛍光強度の総和を1とした相対蛍光強度のプロファイルに変換し、相対蛍光強度が1%未満のフラグメントを0とした。ジェノタイプの分類は変換後の個々の相対蛍光強度を変数としてクラスター分析(ウォード法)を行うことで、DNAのフラグメントパターンの類似性からグループ分けを行った。

なお、クラスター分析、Kruskal-Wallis検定はSTATISTICA2000 (StatSoft社製)を用いて行った。

3. 結果及び考察

3.1 関東地方におけるモツゴ個体群内の遺伝的多様性の分布と主要なストレスの推定

調査地点18地点におけるSM(値が1に近づくほど集団内の遺伝的多様性が低いことを表す)をFig. 2に示す。本解析では解析に利用したバンド数が727と多かったため、いずれの地点のSMも1に近い値を示しているが、Kruskal-Wallis検定の結果、調査地点によるSMの違いは有意であった($\chi^2 = 267$, $df = 17$, $p < 0.0001$)。SMが最も小さかった、つまり個体群内の遺伝的多様性が最も高かったのは、小合溜やビン沼川であった。一方、SMが最も高く、個体群内の遺伝的多様性が最も低かったのは、野川

の最上流地点St. 1であった。農薬の濃度が著しく高くなると予想される水田用水路の赤堀川上流及び下流でも遺伝的多様性は低かった。しかし、重金属汚染の著しかった鳩川や個体の移入が小さいと考えられた八鶴湖では、遺伝的多様性が他地点よりも著しく低いという結果は得られなかった。

次に、水中及び底質中のPAH濃度及び重金属濃度とSMの関連性を検討した。過去に筆者らは入江川、多摩川、手賀沼、ビン沼川、小合溜の5地点について同様の調査を行い、主要なストレスの推定を試みている¹¹⁾。その結果、溶存態のbenzo[k]fluorantheneや鉛、マンガン及び底質中のニッケルがSMと有意な関係であったことを報告している。しかし、本調査の関東地方17調査地点においては、水質、底質中のPAH及び重金属とSMとの間に有意な関連性は見られなかった(5%棄却率)。この原因として、今回の調査では個体の移動の阻害といった物理的因子の影響が大きいと想定した八鶴湖、農薬等を含む水田排水といったPAHや重金属以外の汚染物質が主要なストレスと考えられる水田用水路などPAHや重金属以外の影響が大きい生息環境も調査地点としたために、SMと有意な関連性のある物質が抽出されなかったと考えられた。

以上のように、AFLPデータから計算したSMではAFLP分析が広範囲なDNA領域を対象とする結果、さまざまな

Fig. 3 Genotype Classification by cluster analysis of DNA fragment profile of 252 *Pseudorasbora parva*.

Fig. 2 Genetic diversity index at all sampling sites.

Error bars indicate standard deviation calculated simple matching coefficient. () indicate numbers of sampled *Pseudorasbora parva*. Bars labeled with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Fig. 4 Sampling sites constitutions in 5 genotypes.

() indicate numbers of *Pseudorasbora parva* in each genotype.

ストレスの影響を反映してしまい、遺伝的多様性に大きな影響を与える主要なストレスの直接的な推定が困難になることが確認された。

3.2 各調査地点におけるモツゴ個体のジェノタイプ分布

PCBやPAH等の汚染物質と魚類個体群の遺伝的多様性との関連性の低さはRoarkら^{18,19)}も報告している。しかし、彼らは汚染物質以外のストレスの影響を分離できれば、汚染物質と遺伝的多様性の関連が高くなる可能性を報告している。そこで、各調査地点に生息する個体をDNAのフラグメントパターンの類似性からジェノタイプとして分類し、汚染物質が主要なストレスとして作用している生息地の抽出を試みた。

今回解析したモツゴ252全個体について、DNAフラグメントの蛍光強度プロファイルを変数としたデンドログラムをFig. 3に示す。さらに、距離2付近で分類した5つのグループ(ジェノタイプ)の調査地点組成をFig. 4に示す。この結果を見るとG1は野川の上流部の個体のみで構成されていた。したがってG1の遺伝的分化に影響を与えていた因子として、野川上流に特異的なストレスによる選択、他地域からの遺伝子流動の低下、そして遺伝的浮動等の変動が考えられた。

G2も赤堀川上流部の個体のみであったことからG1に類似した地域特異性の高いジェノタイプと考えられた。しかし、G1とは異なるタイプとクラスター分析により分類されたことから、遺伝的浮動や遺伝子流動の変動のほかに、野川には存在しない農薬等の水田排水に関係するストレスも関与している可能性も考えられた。

G3は鳩川、八鶴湖及び水田用水路に生息する個体で構成されていた。さらに、G3は水田用水路の個体群で優占したことから、水田排水と関連のある因子が遺伝的分化に大きな影響を与えている可能性が考えられた。事実、鳩川周辺には現在水田があり、八鶴湖周辺も過去に水田があった。

これらのジェノタイプに対し、G4,G5は地理的に非常に離れた数多くの生息地の個体で構成されていた。したがって、遺伝子流動や遺伝的浮動の地域的な変動に加え、非常に広域的なストレスの影響を受けた結果、選択されたジェノタイプと推測された。さらに手賀沼や入江川などの下水処理水や下水が大量に流入している生息地の個体群では、共通してG4もしくはG5が優占していた。以上のことから、G4, G5は主要なストレスとして地理的に広域に存在し、かつ下水処理水や下水に含まれる汚染物質の影響を受けて選択されたジェノタイプである可能性が考えられた。

3.3 PAHと遺伝的多様性の関連性

下水や下水処理水にはPAHsや重金属類が大量に含まれており、Mulveyら²⁰⁾は底質中のPAHの地点間の差は*Fundulus heteroclitus*の遺伝的距離と有意な関連性があったことを報告している。そこで、G4, G5が個体群中で優占している10調査地点(入江川、びん沼川、多摩川、手賀沼、小合溜、St. 2,4,5,7,8)を対象として、PAH及び重金属と遺伝的多様性との関連性を検討した。なお、St. 6も該当調査地点であったが、橋梁工事によるモツゴの移動障害が考えられたため除いた。

Fig. 5にSMと底質中及び溶存態Benzo[k]fluoranthene濃

度との関係を示す。今回測定したPAHや重金属の中で、SMと有意な線形回帰関係があったものは、底質中濃度(対数変換した値)としてBenzo[a]anthracene ($r^2 = 0.52$; $F_{1,8} = 7.49$; 傾き0.021; $p = 0.028$), Chrysene ($r^2 = 0.52$; $F_{1,8} = 7.45$; 傾き0.019; $p = 0.029$), Benzo[k]fluoranthene ($r^2 = 0.46$; $F_{1,8} = 5.99$; 傾き0.014; $p = 0.044$), Benzo[a]pyrene ($r^2 = 0.41$; $F_{1,8} = 5.65$; 傾き0.012; $p = 0.044$), Benzo[ghi]perylene ($r^2 = 0.45$; $F_{1,8} = 6.74$; 傾き0.019; $p = 0.031$)及びZn ($r^2 = 0.40$; $F_{1,8} = 5.49$; 傾き0.052; $p = 0.047$)であった。ただし、これらのPAH間にも有意な関連性が見られた。また、ZnについてもChrysene, Benzo[k]fluoranthene及びBenzo[ghi]peryleneとの間に正の関連性が見られた。一方、溶存態として有意な物質はbenzo[k]fluoranthene ($r^2 = 0.39$; $F_{1,8} = 5.34$; 傾き9.9; $p = 0.049$)のみであった。さらに、これら有意な関係のあったPAHはBarronら²¹⁾の報告によればAryl hydrocarbon receptorの誘導性が非常に高いものであった。以上のことから底質中及び溶存態中のPAHがモツゴの個体群内の遺伝的多様性を低下させるストレスの一つである可能性が示唆され、異なる魚種においてMulveyら²⁰⁾と類似の結果が得られた。

3.4 PAHとジェノタイプの関連性

PAHが個体群内の遺伝的多様性を低下させている可能性がある場合、G4やG5のジェノタイプが優占する調査地点では、これらのジェノタイプとPAHとに耐性等といった生理学的な関連性が予想された。つまり、既往の研究によるとMeyerら²⁰⁾は汚染度の異なる生息地から採取した*Fundulus heteroclitus*を室内で飼育し得られた稚魚2世代に溶存態Fluorantheneを暴露させ、汚染度の高い生息地の個体は有意に生存率が高いことを報告している。さらにSchlueterら²²⁾はFathead minnowにFluorantheneを底質経由で暴露させ、96時間後に生き残った個体群と死んだ個体群間の酵素の遺伝子座を比較し、3つの酵素の遺伝子座の多型パターンと個体の生死に有意な関連性があることを報告している。本解析では、Fig. 6で明らかのようにジェ

Fig. 5 Relation of benzo[k]fluoranthene concentrations to genetic diversity.

Fig. 6 Relation of dissolved PAH concentration to genotypes ratio.

ノタイプの個体数割合と溶存態PAH合計濃度($r^2 = 0.42$; $F_{1,8} = 5.83$; 傾き0.064; $p = 0.042$)及び溶存態Fluoranthene濃度($r^2 = 0.52$; $df = 1$; $F_{1,8} = 8.57$; 傾き0.16; $p = 0.019$)との間に有意な相関関係があった。

これらの解析結果とMeyerら²⁰⁾やSchlueterら²²⁾の報告を統合すると、G4が溶存態PAHや溶存態Fluorantheneに耐性のあるジェノタイプである可能性が示唆された。一方、G5はG4と相反する挙動を示していることから、PAHに感受性の高いジェノタイプであることが推測された。

以上のように、DNAの多型パターンの類似性からモツゴ個体をジェノタイプに分類し、地域的なストレッサーが小さく広域的なストレッサーの大きい地点について解析した結果、底質中の複数のPAHやZn、溶存態Benzo[k]fluorantheneが遺伝的多様性と関連していることが明らかとなった。さらに、溶存態のPAH合計濃度と溶存態Fluorantheneは、個体群中のジェノタイプの組成とも相関関係があることも明らかになった。

従来、本研究のように環境中の化学物質と野生生物個体群内の遺伝的構造の関連性を明確にした研究事例は少ない。その原因の一つは各遺伝子座の遺伝変異を多型か否かのバイナリーデータに集約して計算される遺伝子多様性が主要な評価手法であったためと考えられる。この評価手法では分析座数が多くない場合には、遺伝的多様性に差のある集団に対して同程度の評価を与えてしまいかねず、遺伝的多様性指標としての精度が低下してしまうことがある。一方で、一般に生態学分野ではミトコンドリアDNAのマイクロサテライト領域や特定の酵素に該当する遺伝子座の多型データを使用することが多く、その数は多くても数十が多い。その結果、従来の研究では環境中の化学物質と野生生物の遺伝的多様性の関連性が明確に出にくかったのではないかと考えられた。さらに、遺伝的多様性を評価する従来の評価方法が、フラグメントの変動パターンを考慮できない点も、大きな原因の一つであると考えられた。しかし、本解析では新たにジェノタイプを評価手法とした新しい解析手法を利用した。この手法は、フラグメントの相対蛍光強度を変数としているため、バイナリーデータよりも大量のデータを所有する。さらにそのデータをクラスター解析で情報を集約することで、フラグメントの変動パターンの評価も可能となり、遺伝的多様性の分離精度がより高くなるメリットを持つ。このメリットの結果、従来把握が困難であった環境中のPAHといった化学物質と地域個体群内の遺伝的構造の間に有意な関連性が見られたものと考えられ、本解析手法の更なる有効性が明らかとなった。しかし、今回の結果は環境中での相関やジェノタイプ組成からの解析に基づくものである。今後はこれらジェノタイプ間において、PAHに対する耐性や致死濃度、解毒代謝に係るたんぱく質や酵素、mRNAの誘導量等に差があるか室内実験で確認し、ジェノタイプが反映する情報を明らかにする必要がある。

3.5 野川における遺伝的多様性及びジェノタイプの分布

遺伝的多様性やジェノタイプの分布に対する個体の移動性を中心とした物理的因子の影響を評価するため、野川の調査地点について解析を行った。

Fig. 7に野川の各調査地点のPAHの濃度結果を示す。底

Fig. 7 PAH concentrations in the water and sediment at all sampling sites in Nogawa river.

Fig. 8 Genetic diversity and genotype proportions within *Psedorashora parva* population in Nogawa river.

Error bars indicate standard deviation calculated simple matching coefficient. () indicate sampling site distance from St. 1. Bars labeled with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Fig. 9 Migration rates at all sampling sites in Nogawa river.

質中濃度と溶存態濃度ともに地点間で大きく異なった。また、組成も地点間で大きく異なった。この原因は流量低下に伴う河川水の長期的な不連続化の影響が大きいと考えられた。

Fig. 8に野川におけるモツゴ個体群内の遺伝的多様性とジェノタイプの分布を示す。調査地点間のSMの差はKruskal-Wallis検定の結果、有意であった($\chi^2 = 182, df = 8, p < 0.0001$)。しかし、SMは流下方向に傾向は見られず、0.875から0.936の値で大きく変化した。一方、野川におけるジェノタイプ分布は、G1, G4, G5の3タイプで構成されていた。また、調査地点間のジェノタイプ分布はSMと同様に不連続であった。特に、上流部ではSt. 1とSt. 3で地域特有のジェノタイプが優占化していた。また、St. 6ではPAHに耐性を持つジェノタイプが優占している一方で、その下流の調査地点では感受性の強いジェノタイプが優占していた。

そこで遺伝的多様性やジェノタイプ組成が不連続に変化した原因を推定した。Fig. 9にAFLPからのフラグメントデータをバイナリー化し、平均ヘテロ接合度から計算した移入速度（有効サイズと移入率の積）を地点ごとに示す。この結果からSt. 1やSt. 6は移入速度が他地点に比べ小さいことが明らかとなった。この原因はSt. 1が野川のモツゴ生息地点の最上流部にあり、上流からの個体の移入量が小さく、下流からの移入も河川の不連続化により困難であったためと考えられた。また、St. 6に関してはSt. 6とSt. 7の間で橋梁工事による人為的な河川の不連続化が約一年間生じていたこと及び水深が浅いことによる上流部への移動の困難さが考えられた。したがって、このような個体の移動障害による遺伝子流動の低下が遺伝的多様性やジェノタイプの個体群割合の不連続化の原因の一つと考えられた。

一方でSt. 7, 8でSt. 6とは相反して感受性の高いジェノタイプが優占した原因は、St. 6とSt. 7の間では支流が合流しており、その結果による溶存態のPAHの低下 (Fig. 7) や支流からの個体の移入ではないかと考えられた。このことはSt. 7の溶存態PAH濃度及び移入速度がSt. 2とほぼ同じであり、さらにジェノタイプ組成も類似していることから推定できた。

その他の地点についてはSt. 3を除き、生息域の溶存態PAH濃度と関連した遺伝的多様性やジェノタイプ組成 (Fig. 5, 6) であった。St. 3の個体群でG1が優占していた原因は明らかではないが、移入率やPAH濃度以外の因子の影響、例えば遺伝的浮動による遺伝子構造の変動や地域特有なストレスの影響ではないかと考えられた。

以上の議論から、野川におけるモツゴ個体群の遺伝的多様性やジェノタイプ組成に大きな影響を与えている因子の一つとして、モツゴの移動障害や溶存態PAH濃度が考えられた。したがって、野川におけるモツゴの個体群保全では、溶存態PAH濃度の削減や流量や水深の改善によるモツゴの移動性の向上が重要であると考えられた。

3.6 個体群内の遺伝的多様性から見た河川における魚類個体群の保全に向けた考察

本解析から野川におけるモツゴ個体群内の遺伝的多様性やジェノタイプ組成は、河川の不連続化及び人為活動が原因の遺伝子流動の障害によって大きな影響を受けていることが明らかとなった。さらにこのような物理的河

川環境要因のみでなく、PAHといった汚染物質による遺伝的多様性の低下も示唆された。特に今回のPAHの影響は、個体レベルの急性・慢性毒性試験では影響が検出できない濃度レベルでも、個体群には影響を与えていることが示唆された。これはフルライフステージ及び数世代を通じたPAHの影響が検出されたものと考えられる。今後、レジリエンスの低下や脆弱性評価の指標として生態リスクアセスメントの際に、遺伝的多様性を使用することは有効な手段の一つと考えられる。しかし、Meyerら²⁰⁾がPAHに耐性を持つ*Fundulus heteroclitus*は感受性の高い個体よりもDOやPAHの光分解産物の毒性に対して感受性が高くなる、いわゆるFitness costを室内実験で報告している。遺伝的多様性の減少により個体群の脆弱性が増加するメカニズムはこのfitness costが一つの原因と考えられているが、遺伝的多様性の減少とレジリエンスの低下による脆弱性増加を定量的に評価した研究事例は限られている。今後更なる研究の発展を期待したい。

4. まとめ

関東地方に生息するモツゴ個体群内の遺伝的多様性を把握するとともに、個体をジェノタイプとして分類し、遺伝的多様性に作用する主要なストレスや個体群内の遺伝的構造との関連性を評価した。さらに東京の野川をケーススタディとして、モツゴ個体群内の遺伝的構造とPAHs濃度及びモツゴ個体の移動性との関係を分析した。以下に得られた知見を記す。

1) 水田地帯、都市河川、汚染の少ない河川、移入が小さいと考えられた湖沼等、さまざまな生息地のモツゴ個体群の遺伝的多様性を把握した。しかし、それらの遺伝的多様性とPAH及び重金属との関連性は見られなかった。

2) モツゴ個体のDNAフラグメントの相対蛍光強度を変数としてクラスター分析した結果、5つのジェノタイプに分類できた。そのうち、三つは地域特異的なジェノタイプであったが、残りの二つは広域的に分布した。

3) 広域的に分布する2つのジェノタイプが優占する生息地では遺伝的多様性と生息地の溶存態PAHや底質中PAH、亜鉛との間に有意な関連性が検出された。また、個体群中のジェノタイプの組成も、生息地の溶存態PAHや溶存態Fluoranthene濃度と明らかな関連性があった。これらのことからこれら二つのジェノタイプはPAHの耐性に関連している可能性が示唆された。

4) 野川のモツゴ個体群内の遺伝的多様性やジェノタイプの組成は流下方向に傾向は見られず、不連続であった。さらにその大きな原因として、遺伝的浮動による遺伝子構造の変動のほか、溶存態のPAH濃度や流量不足及び人為活動による個体の移動障害が推測された。

謝辞

本研究の遂行にあたり、神奈川県環境科学センター石渡様から貴重なサンプルを提供していただいた。なお、本研究は平成16年度の文部科学省科学研究費補助金基盤研究(B)「遺伝的指標を用いた魚類個体群に対するストレスの同定と生態影響評価に関する研究」の補助を受けて行ったものである。ここに記して感謝の意を表す。

(原稿受付 2006年3月3日)

(原稿受理 2006年7月12日)

参考文献

- 1) 水質汚濁に係る環境基準の一部を改正する件 (2003), 平成15年11月5日, 環境省告示第123号.
- 2) Anderson, S., W. Sadinski, L. Shugart, P. Brussard, M. Depledge, T. Ford, J. Hose, J. Stegeman, W. Suk, I. Wirgin, and G. Wogan (1994) Genetic and molecular ecotoxicology: a research framework, *Environ. Health. Perspect.*, 102 (supplement 12), 3-8.
- 3) LeBlanc, G. (1994) Assessing deleterious ecosystem-level effects of environmental pollutants as a means of avoiding evolutionary consequences, *Environ. Health. Perspect.*, 102, 266-267.
- 4) Fox, G. (1995) Tinkering with the tinkerer: pollution versus evolution, *Environ. Health. Perspect.*, 103, 93-100.
- 5) Herbert, P. D. N. and M. M. Luiker (1996) Genetic effects of contaminant exposure-towards an assessment of impacts on animal populations, *Sci. Total. Environ.*, 191, 23-58.
- 6) Newman, M. C. (1998) Fundamentals of ecotoxicology. Sleeping Bear/Ann Arbor press, Chelsea, Michigan, USA.
- 7) Forbes, V. E. (1999) Genetics and ecotoxicology-insights from the interface, in "Genetics and ecotoxicology: current topics in ecotoxicology and environmental chemistry" (Ed. V. E. Forbes), pp.1-8, Taylor and Francis, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- 8) Nacci, D., L., Coiro, D. Champlin, S. Jayaraman, R. McKinney, T. R. Gleason, W. R. Munns, Jr., J. L. Specker, and K. R. Cooper (1999) Adaptation of wild populations of the estuarine fish, *Fundulus heteroclitus* to persistent environmental contaminants, *Mar. Biol.*, 134, 9-17.
- 9) Gillespie, R. B., and S. I. Guttman (1999) Chemical-induced changes in the genetic structure of populations: effects on allozymes, in "Genetics and ecotoxicology: current topics in ecotoxicology and environmental chemistry" (Ed. V. E. Forbes), pp.55-77, Taylor and Francis, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- 10) J. W. Bickham, S. Sandhu, P. D. N. Hebert, L. Chikhi, and R. Athwal (2000) Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology, *Mutat. Res.*, 463, 33-51.
- 11) 亀田豊, 鍵谷澄絵, 益永茂樹 (2004) AFLP手法を用いた *Pseudorasbora parva* に影響する実環境中のストレスー同定手法の開発, 水環境学会誌, 27(11), 699-705.
- 12) 鳩川水系行政連絡会議 (2002) 鳩川の奇形魚に関する水質等調査結果, 27pp.
- 13) 山根晶子, 長島一郎, 泉川碩雄, 岡田光正, 村上昭彦 (1993) 野川流域における石油系炭化水素の雨天時流出, 水環境学会誌, 16(4), 251-260.
- 14) 種生物学会 (2001) 森の分子生態学, pp.251-262, 文一総合出版, 東京.
- 15) Y. Kameda, J. Shirai, T. Komai, J. Nakanishi, and S. Masunaga (2005) Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: size distribution, estimation of their risk and their depositions to the human respiratory tract, *Sci. Total. Environ.*, 340, 71-80.
- 16) F. E. Grousset, J. M. Jouanneau, P. Castaing, G. Lavaux, and C. Latouche (1998) A 70 year record of contamination from industrial activity along the Garonne river and its tributaries (SW France), *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 48, 401-414.
- 17) Sokal, R. R. and Michener, C. D. (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships, *University of Kansas Scientific Bulletin*, 38, 1409-1438.
- 18) S. A. Roark, D. Nacci, L. Coiro, D. Champlin, and S. I. Guttman (2005) Population genetic structure of a nonmigratory estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) across a strong gradient of polychlorinated biphenyl contamination, *Environ. Toxicol. Chem.*, 24(3), 717-725.
- 19) S. A. Roark, M. A. Kelble, D. Nacci, D. Champlin, L. Coiro, and S. I. Guttman (2005) Population genetic structure and tolerance to dioxin-like compounds of a migratory marine fish (*Menidia Menidia*) at polychlorinated biphenyl-contaminated and reference sites, *Environ. Toxicol. Chem.*, 24(3), 726-732.
- 20) M. Mulvey, M. C. Newman, W. Vogelbein, and M. A. Unger (2002) Genetic structure of *Fundulus heteroclitus* from PAH-contaminated and neighboring sites in the Elizabeth and York Rivers, *Aquat. Toxicol.*, 61, 195-209.
- 21) Barron, M. G., Heintz, R., and Rice, S. D. (2004) Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish, *Mar. Environ. Res.*, 58, 95-128.
- 22) M. A. Schlueter, S. I. Guttman, Y. Duan, J. T. Oris, X. Huang, and G. A. Burton (2000) Effects of acute exposure to fluoranthene-contaminated sediment on the survival and genetic variability of fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(4), 1011-1018.