

ヘアトラップを用いた木曽地域のツキノワグマの集団遺伝学的構造

筑波大学山岳科学センター

○小井土 凜々子

EAC環境アセスメントセンター

柳生 将之

EAC環境アセスメントセンター

中村 明日加

長野県環境保全研究所

黒江 美紗子

筑波大学山岳科学センター

津田 吉晃

要旨

個体識別や密度推定など、ツキノワグマの基本的なモニタリング手法として活用されてきたヘアトラップが地域内の集団遺伝学的構造の評価にどこまで有用かについて評価することを目的に、木曽地域35地点にヘアトラップを設置し、サンプリング・遺伝解析に取り組みました。その結果、調査地内には、ミトコンドリアDNAの3つのハプロタイプ、両性遺伝する核DNAの遺伝グループが複数分布しており、それぞれの分布に明確な地理的パターンが検出され、木曽地域内のツキノワグマの詳細な遺伝構造が明らかになりました。継続的なモニタリングにより、時空間的な遺伝構造の変化も検証できると考えます。

はじめに

ツキノワグマは本州全域に分布する大型哺乳類であり、日本の森林生態系の重要な構成種です。しかし近年、森林の管理放棄や人間の土地利用の変化によって本種の生息域は全国的に拡大しており、それに伴う農林業被害や人との遭遇事故が深刻化しています。こうした被害の増加を背景に、本種の捕獲・捕殺頭数は年々増加傾向にあります。ツキノワグマの適切な保護管理策を考える上で、クマ集団のモニタリングや地域的な遺伝構造を評価することは非常に重要な課題です。

捕獲作業が危険で難しく遺伝子試料の獲得が難しい本種においては近年、安全且つコストのかからないヘアトラップを用いた非侵襲的な体毛のサンプリング手法が普及してきました。しかしDNAの収量の少ない体毛試料のみを用いて詳細な遺伝構造が評価された研究例はこれまでなく、多くの研究は個体識別・密度推定への活用に留まっているのが現状です。本研究は、収集した体毛から獲得した遺伝情報解析により、ヘアトラップからどの程度詳細に遺伝構造評価が可能であるかを検証しました。

1 調査地・調査内容

(1) 調査地・サンプリング

調査地は長野県の南西部、木曽郡(きそぐん)南木曽町(なぎそまち)・大桑村(おおくわむら)の間に位置する国有林を含む約70km²地域です(図1～図2)。2020年の8-9月に、ヘアトラップ間がコンスタントに約1km間隔になるように、調査地域内35地点(K-1～K-35)に有刺(ゆうし)鉄線(てっせん)によるヘアトラップを設置しました(図2)。また、各トラップにはツキノワグマの捕獲率を高めるため、地表からおおよそ2メートルの高さにハチミツを補充したハチの巣を入れたコンテナを設置しました(図3)。さらに、15地点にはモーションセンサーカメラを設置し、トラップに集まった個体の写真を撮影しました(図4)。有刺鉄線にかかった体毛は、8～11月にかけて10～14日の間隔で定期的に収集し、DNA抽出まで-25℃で冷凍保存しました。



図1 調査地の概要

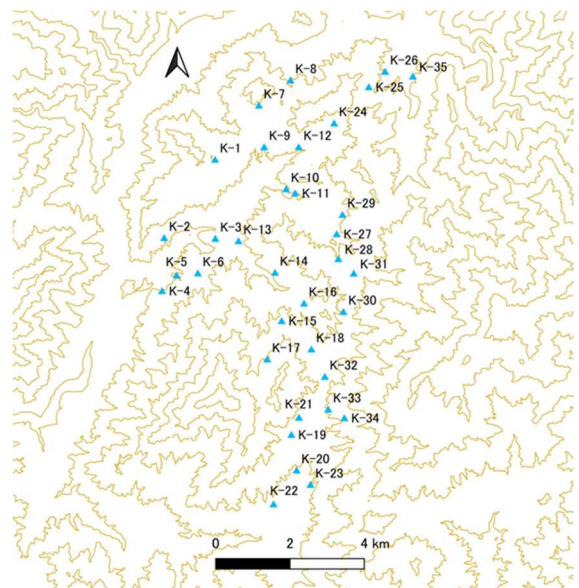


図2 ヘアトラップ設置地点



図3 ヘアトラップ設置箇所風景図



図4 カメラトラップ撮影個体

(2) 遺伝実験

DNA Extractor FM kit (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Tokyo, Japan) とDNeasy Tissue and Blood Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)を用いて、1試料につき5-6本の体毛からDNAを抽出しました。抽出したDNA試料から、両性遺伝する核DNAのマイクロサテライト16座(Ohnishi et al. 2019)のフラグメント解析を行い、増幅に成功したサンプルについて、母性遺伝するミトコンドリアDNAの調節領域の塩基配列(Ohnishi et al. 2009)も決定しました。また同サンプルについて雌雄情報の決定の為、SE47およびSE48のプライマー(Yamamoto et al. 2002)を用いてXとY染色体上にそれぞれ存在するアメロゲニン遺伝子を増幅し、1×TAEバッファーを用いた電気泳動を行いました。

(3) 遺伝情報解析

核DNAのマイクロサテライト16座のうち、波形の綺麗な12座を用いて個体識別を行いました。識別個体の遺伝情報を用いて、核DNAにおいてはSTRUCTURE解析(Prichard et al. 2000)を行い、個体内のクラスター頻度をバープロット・パイチャートで図示しました。各クラスター間についてはNJ樹で評価を行い、GenGISを用いて系統関係を地図化しました。ミトコンドリアDNAにおいても、ハプロタイプの分布を地図上にプロットし、ハプロタイプ間の関係についてNeighbor-netで評価しました。また、雌雄・ハプロタイプグループ内の遺伝的多様性について、対立遺伝子多様度(アレリックリッチネス)・遺伝子多様度(Gene diversity)・近交係数(FIS)を用いて、評価を行いました。個体総当たりの遺伝的距離と地理的距離の相関については、GenAlexを用いて計算しました。

2 結果と考察

(1) 個体識別・雌雄決定

210の体毛サンプルのうち、71サンプルにおいて遺伝情報の取得に成功し、56個体を識別しました。識別された個体の雌雄決定の為、各DNA使用に対しX染色体・Y染色体上の遺伝子を増幅し電気泳動を行ったところ、19個体の雄、26個体の雌を検出し、残りの11個体については性別を決定できませんでした。DNAの質が原因と考えられます。

(2) ミトコンドリアDNAの遺伝構造

識別された56個体に対し、ミトコンドリアDNAの調節領域の配列を増幅したところ、調査地内からE01, E07, E17の3種類のハプロタイプが検出されました(図5, 6)。また、これらハプロタイプの分布は比較的明確に分かれおり、北部にE17・南部にE01が分布するようなパターンが見られました(図5)。E01は東日本に広く分布するハプロタイプであることが知られている一方、木曾など長野県南西部周辺に局所的に分布するE17も検出され、先行研究と一致するパターンが見られました。E07については、先行研究では富山県や南東北地方で発見されているハプロタイプであり、E07を持つ個体が調査地付近で検出されたのは初めてとなりました。このハプロタイプを持つ2個体は雄・雌が1個体ずつであり、検出されたトラップ間の距離は約5 kmです。このタイプが個体の移動分散によりこの地域に広がってきているのか、元々この地域にいて検出されてこなかったのかについては分かりません。しかし、今回高密度・高頻度の体毛収集によって未検出のハプロタイプを検出できたことは、非常に有益な結果であるといえます。

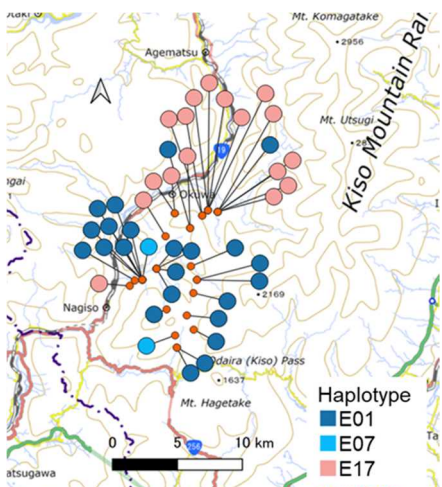


図5 調査地内のハプロタイプの分布

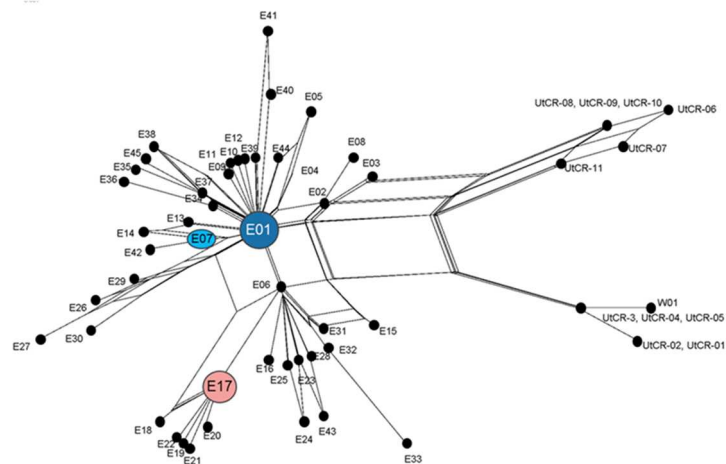


図6 ツキノワグマのハプロタイプネットワーク

(4) 核 DNA の遺伝構造

(ア) 空間的パターン

検出された56個体について核SSRの16座を用いた遺伝構造解析を行ったところ、調査地内におよそ8つの遺伝的グループが存在していることが分かりました(図7, 8)。個体内のクラスター頻度は低く、クラスターの分布は地点ごとに比較的明確に分かれているパターンが見られました(図8)。

(イ) クラスター間の関係

それぞれのクラスター間の遺伝的な関係についてNJ樹をもちいて評価を行ったところ、ミトコンドリアDNAとは異なる箇所(より南部)で南北に分かれるパターンが見られました(図9)。この遺伝構造の違いは、核・ミトコンドリアDNAの領域の突然変異率の違いや、ツキノワグマの雌雄の移動分散パターンの違いによるものであると考えられます。

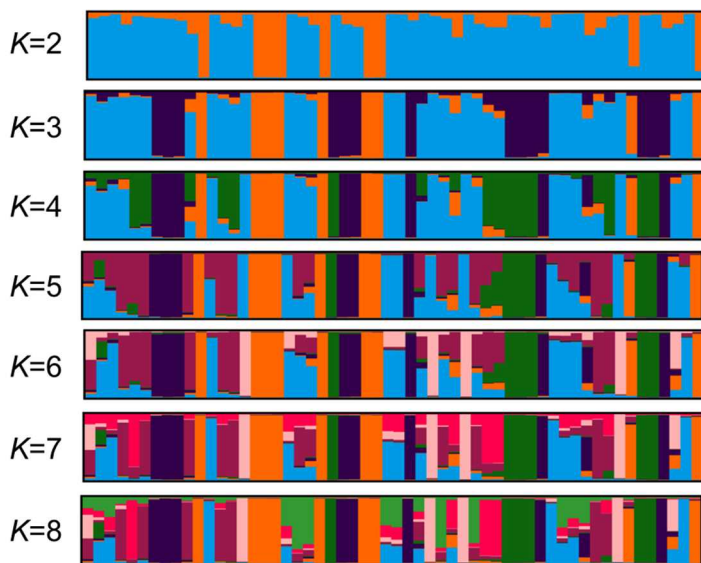


図7 56個体のバープロット
(1つのバーが1個体のクラスター頻度を表す)

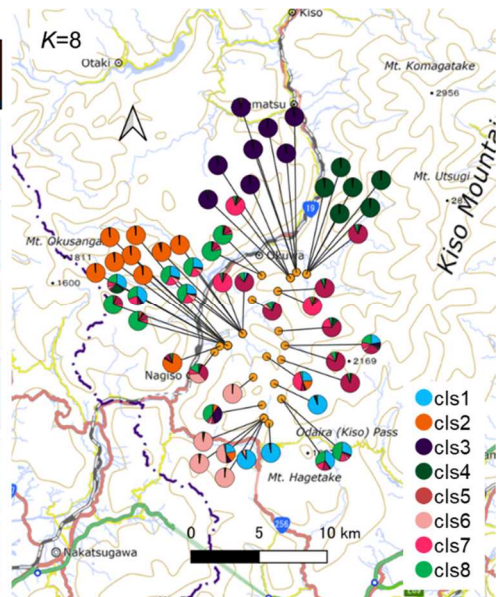


図8 核DNAのクラスターの分布
(K=8)

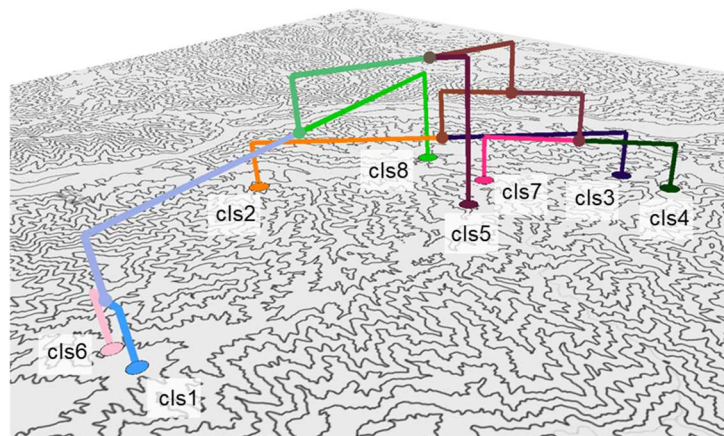


図9 クラスター間の遺伝的な関係(K=8)

(ウ) 雌雄・ハプロタイプグループ内の遺伝的多様性

性別の分かっている雄・雌グループ、E01・E17グループ内の遺伝的多様性を評価したところ、それぞれのグループ間で、遺伝的多様性の値に明確な違いは見られませんでした(表1)。

表1 各集団(グループ)の遺伝的多様性の統計量

Group	Allelic richness (アレルリッチネス)	Gene diversity (遺伝子多様度)	F_{IS} (近交係数)
雄 (n=22)	4.39	0.61	-0.022
雌 (n=29)	4.64	0.63	0.225*
E01 (n=23)	4.35	0.63	0.220*
E17 (n=17)	4.23	0.64	0.004

* 0からの有意な逸脱

(エ) 遺伝的距離と地理的距離の相関

56個体総当たりの遺伝距離と地理的距離の相関解析では、0-2 kmの階級に遺伝的に近い個体が分散している傾向が見られました(図10)。このことから、木曾地域という局所スケール内において形成されている明確な遺伝構造は、家系的な近い血縁要素によって形作られている可能性が高いと考えられました。

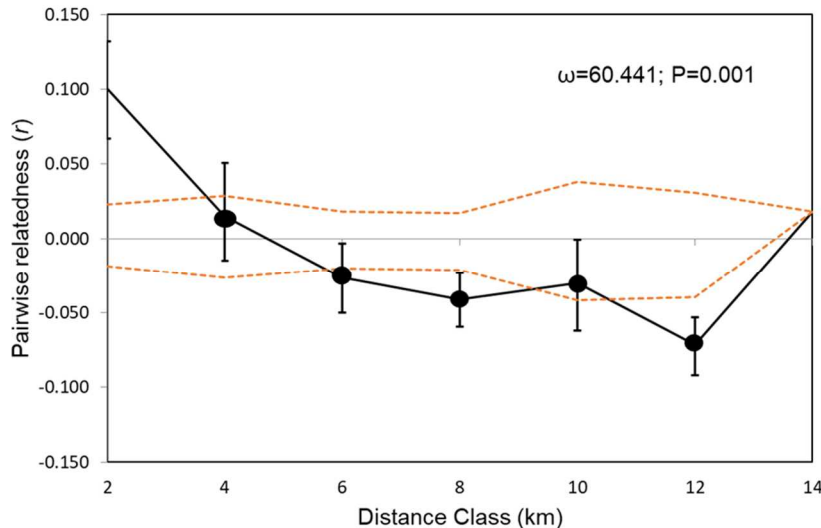


図10 距離階級ごとの空間自己相関係数 r のコレログラム

おわりに

これまで、ヘアトラップは個体識別や密度推定などのモニタリングに用いられてきましたが、体毛のみを用いて地域内の遺伝構造は詳細に評価されてきませんでした。今回、調査地内に高密度にヘアトラップを設置し、2週間おきという高頻度で体毛を収集したことから、木曾地域内のツキノワグマの遺伝構造を評価することができました。この成果は、ツキノワグマに対する非侵襲的なモニタリングの可能性拡大において重要な成果になると考えています。

今回の結果からツキノワグマの保全に向けて、地域内の遺伝的系統を失わないような保護管理策の策定ができると考えられます。また、ヘアトラップによりモニタリングを継続することで、時間的な遺伝構造の変化についても評価できる可能性があります。

今回の調査について、体毛のサンプリング調査を実施していただいた環境アセスメントセンターの方々、また、研究にご協力いただいたすべての方々に厚くお礼を申し上げます。

参考文献

1. El Mousadik, A. and Petit, R. J. (1996). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor Appl Genet*, 92, 832-839.
2. Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics, *Journal of Heredity*, Volume 86, Issue6, Pages485-486, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>
3. Langella, O. (2007). Populations 1.2.30: Population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees)
4. Nei M, and Chesser RK. (1983). Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann Hum Genet* 47: 253-259.
5. Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, United States of America.
6. Ohnishi, N., Uno, R., Tamate, HB., and Oi, T. (2009) The influence of climatic oscillations during the Quaternary Era on the genetic structure of Asian black bears in Japan. *Heredity*. 102, 579-589.
7. Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
8. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000 Jun;155(2):945-59.
9. Smouse, P. E., & Peakall, R. (1999). Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity*, 82(5), 561-573. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6885180>