

6. 南関東地域に生息するツキノワグマの遺伝子解析

森光由樹¹⁾

Genetic Analysis of Asiatic Black Bear of South Kanto Area.

Yoshiki Morimitsu

要 約

南関東地域に生息しているツキノワグマの核 DNA マイクロサテライト 5 遺伝子座について分析をおこなった結果、ヘテロ接合度は丹沢 0.529, 関東山地 0.628, 南アルプス 0.665 であった。丹沢は関東山地や南アルプスと比べて遺伝的多様性が低く、遺伝的に孤立している傾向が示された。丹沢地域個体群は、生息地である広葉樹林の伐採、道路網の発達や宅地造成、過去に行われた捕獲などによって生息地が分断もしくは縮小され個体数は減少した結果、遺伝的多様性が低下した可能性がある。今後も引き続き地域個体群の遺伝的多様性をモニターしデータを蓄積していくことが、丹沢地域のツキノワグマの保護管理に必要である。

(1) はじめに

ニホンツキノワグマ *Selenarctos thibetanus japonicus* はアジア東部に分布するツキノワグマの一亜種で、本州・四国の落葉広葉樹林に生息している。近年、クマによる樹木の皮剥ぎや農作物被害、人身被害が増加している。対策法として年に 1000 ~ 1500 頭が有害駆除されている (Horino & Miura, 2000)。一方でツキノワグマの生息地である広葉樹林が伐採され、道路網の発達や宅地造成などによって生息地が分断・縮小され個体数は減少し地域個体群の絶滅が危惧されている。九州ではすでに絶滅した可能性が高いとされ、四国についても生息頭数が既に 10 数頭の範囲であると考えられている (羽澄, 1992)。また、東中国山地、西中国山地、紀伊半島、下北半島地域個体群は孤立しており、絶滅が進行していると考えられている (環境庁自然保護局野生生物課編, 1998)。近畿、中国地方に生息しているツキノワグマの遺伝的多様性を評価した研究では、中国山地の二つの孤立集団で多様性は低く、北近畿東側の集団で高いことを明らかにしている (Saitoh *et al.*, 2001)。ツキノワグマを適切に管理するために、地域個体群の分布や生息状況に対応した保護管理ユニットが提案された。全国で 19 の地域に分けられたユニットの中で神奈川県の場合、富士丹沢地域個体群がある (環境省, 2000)。丹沢山地の個体群は関東山地個体群に隣接しているが、交通網の整備や周辺地域の観光開発、市街化によってレッドデータブックに掲載されている地域個体群と同様に分布域の孤立が危惧されている (羽澄, 1992)。さらに、この地域個体群は岐阜県白川村や東京都奥多摩町の地域個体群と比較して遺伝的多様性が失われている可能性があることも示唆されている (羽澄ほか, 1997)。もしこの地域と周囲の地域に個体の移動がなければ丹沢山地の地域個体群は孤立していることになる。他の地域個体群との個体の交流の有無が、この地域個体群を維持していくために重要であると考えられる (羽澄ほか, 1997)。南関東地域に生息するツキノワグマの遺伝学的研究で、先行した調査に 2002 年緑の回廊事業「南関東地域におけるツキノワグマの遺伝子構成解析の試み」がある。本調査では緑の回廊事業の資

料をもとに、丹沢周辺で収集された個体の遺伝データを加えてそれぞれの地域個体群間の遺伝子の解析を実施した。

(2) 材料と方法

2001 年から 2005 年まで新たに南関東地域 (神奈川県丹沢, 山梨県) で捕獲された個体 8 頭を分析した。分析結果は緑の回廊事業 2002 年のデータに加えて、新たに解析を実施した。今年度新たに分析を実施した個体について、表 1 に示した。

緑の回廊事業では、1991 年から 1998 年にかけて、調査対象個体群の 53 頭 (神奈川県西丹沢地区で生け捕り捕獲した 30 頭および山梨県で生け捕りあるいは有害駆除された 23 頭)、関東山地個体群の 32 頭 (東京都奥多摩町と檜原村で生け捕り捕獲した 19 頭および山梨県で有害駆除された 13 頭) および南アルプス個体群の 21 頭 (山梨県で有害駆除された 2 頭および静岡県静岡市で有害駆除された 19 頭) の血液あるいは肝臓などの組織標本を採取、このうちマイクロサテライト解析には、調査対象個体群 23 個体、関東山地個体群 15 個体および南アルプス個体群 19 個体が分析されている。

A. 試料からの DNA の抽出

調査地周辺で捕獲された 8 個体 (1 頭は交通事故死) から得られた筋肉の一部もしくは肝臓を分析の試料とした (表 1, 図 1)。試料は分析が実施されるまでの間、-20°C にて冷凍保存した。DNA 抽出は QIAGEN Micro KIT (QIAGEN) を使用した。

B. PCR による増幅

抽出した DNA を鋳型に、5 のマイクロサテライト領域 (遺伝子座) について PCR 法による増幅を試みた。プライマーの塩基配列は Paetkau & Strobeck (1994) より引用した。プライマーは 5' 末端に NED, VIC FAM VIC を蛍光ラベルしたものを用いた。また、ノンラベルプライマーはテイルドプライマーを使用した。5 種のマイクロサテライト G1D, G10B, G10C, G10L, G10X を増幅した。PCR はテンプレートとして 2ul の DNA 溶液, 0.2unit Pyrobest DNA Polymerase (Takara) を含む 20ul の反応液を用いた。94°C 2 分間加熱後、変性 94°C 15 秒間、アニーリング (48°C ~ 60°C) 20 秒間、伸長 72°C 15 秒間、最終伸長 72°C 30 秒を 30 サイクルの条件で行った。

1) 野生動物保護管理事務所 現) 兵庫県立大学 自然・環境科学研究所 森林動物研究センター

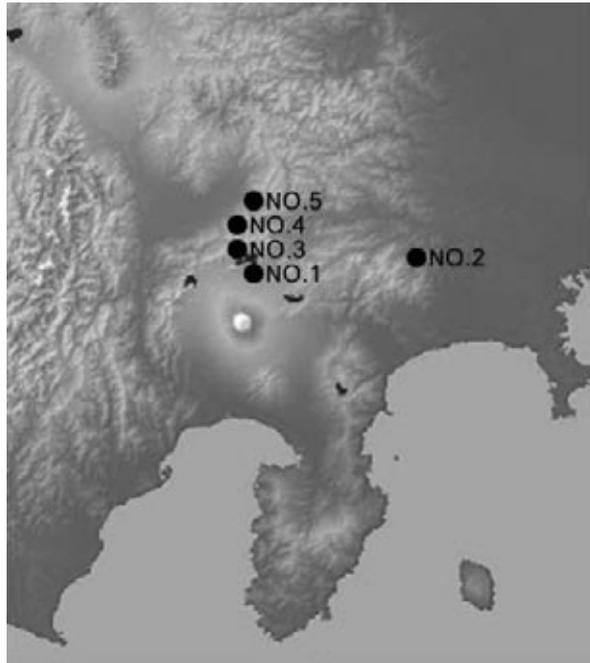


図 1. 材料採取場所

表 1. 分析を実施したサンプル

NO.	整理番号	捕獲年月日	捕獲場所			性別
1	B173	1997/8/27	山梨県	富士	天神山	オス
2	B174	1997/8/27	山梨県	富士		オス
3	B246	-	神奈川県	丹沢	高瀬入	オス
4	B247	-	神奈川県	丹沢	宮が瀬	オス
5	B458	2001/10/18	山梨県	武石村	二本木	オス
6	B508	2001/11/22	山梨県	御坂	大石	メス
7	B509	2001/11/22	山梨県	御坂	大石	オス
8	B510	2001/12/3	山梨県	大月	初狩町	メス

C. マイクロサテライトフラグメント解析

GENESCAN による解析

Genetic Analyzer MODEL3130 (Applied Biosystems) を用いて PCR 産物を分析した。Hi-Di Formamide 10ul GeneScan -500LIZ Size Standard 0.5ul に PCR 産物を適宜希釈し混合し分析を実施した。分析結果は GeneMapper v3.7 を用いてフラグメントサイズを決定した。

得られたデータをもとにヘテロ接合体頻度の期待値 (H_e) と観察値 (H_o) を行った。また、各地位個体群のヘテロ接合体頻度 (H_e) を雌雄別にわけて求めた。

(3) 結果

GENESCAN で得られた波形データから、調査対象地、関東山地および南アルプスの各個体群に属するツキノワグマについて、各遺伝子座における対立遺伝子数とそれぞれの対立遺伝子の頻度を求めた。緑の回廊の情報にさらにデータを加えた。ヘテロ接合体の比較では、G1D (実測値) で調査対象地が、G10B で調査対象地 (実測値) と関東山地 (推定値) が他の個体群より高い数値を示したが、その他 3 つの遺伝子座においては南アルプスで最も高い数値を示し、全体の平均でも最も高い数値であった (表 2)。各個体群のヘテロ接合体度をオス、メスにわけて求めたところどの個体群でもオスで高い数値を示した (表 3)。これは、前回報告のあった分析結果と同じ傾向を示した。

(4) 考察

今回行ったマイクロサテライト領域の解析からは、丹沢個体群においてヘテロ接合体度が低いという結果が得られた。他の個体群に比べて核 DNA における遺伝的多様性が低く、遺伝的に孤立している傾向がうかがえる。また、長野県のツキノワグマで今回解析を行った 5 つの遺伝子座を含む 11 つの遺伝子座について同じ解析を行ったところ、0.648 というヘテロ接合体度 (推定値) が得られた (野生動物保護管理事務所, 未発表データ)。この数値は今回得られた丹沢の 0.529 と比べて高く、長野県に生息している個体は遺伝的多様性が丹沢と比べて高いことが考えられる。海外の事例では、アメリカクロクマの 3 つの地域個体群 (カナダ) で、今回と同じ 2 つの遺伝子座を含む 4 つの遺伝子座について調べたところ、0.801, 0.783 および 0.360 というヘテロ接合体度が得られた。このうちニューファンドランド島の個体群で得られた数値 (0.360) は他の 2 つの地域個体群で得られた数値に比べ 2 分の 1 以下であったが、ニューファンドランド島が 12,000 年の間にわたって大陸と離れていることがその理由の一つとして考えられている。孤立した個体群は、遺伝的浮動や近親交配による遺伝的変異の消失、近交弱勢のために絶滅の可能性が高くなる (Saccheri *et al.*, 1998; Frankham *et al.*, 2002)。

丹沢地域個体群も市街地等により、クマの生息地が分断した結果、遺伝的多様性が低下した可能性がある。今後も

表 2. 3 つの地域におけるヘテロ接合度

遺伝子座	丹沢		関東山地	
	推定値	実測値	推定値	実測値
G1D	0.621	0.61	0.535	0.534
G10B	0.598	0.609	0.659	0.6
G10C	0.408	0.39	0.71	0.534
G10L	0.628	0.608	0.605	0.6
G10X	0.39	0.349	0.633	0.667
全遺伝子座	0.529	0.513	0.628	0.587

表 3. 3 つの地域における雌雄のヘテロ接合度 (推定値)

遺伝子座	丹沢		関東山地	
	オス (n=17)	メス (n=8)	オス (n=11)	メス (n=9)
G1D	0.599	0.664	0.54	0.53
G10B	0.585	0.555	0.65	0.664
G10C	0.422	0.43	0.767	0.5
G10L	0.582	0.695	0.587	0.623
G10X	0.483	0.219	0.665	0.542
全遺伝子座	0.5342	0.512	0.6418	0.5718

引き続き地域個体群の遺伝的多様性をモニターしデータを蓄積していくことが、丹沢地域のツキノワグマの保護管理に必要である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、北海道環境科学研究センターの釣賀一二三博士より、ご助言をいただきました。お礼申し上げます。

文 献

- Frankham R., J. D. Ballou & D. A. Briscoe, 2002. Introduction to conservation genetics. 617pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- 羽澄俊裕, 1992. 危機的状況にあるツキノワグマ地域個体群の保護管理計画の提案. WWFJ Science Report, 1: 293-333.
- 羽澄俊裕・小山克己・長縄今日子・釣賀一二三, 1997. III. ツキノワグマ. 神奈川県公園協会・丹沢大山自然環境総合調査団企画委員会編, 丹沢大山自然環境総合調査報告書. pp.453-469. 神奈川県環境部, 横浜.
- Horino, S. & S. Miura, 2000. Population viability analysis of

- a Japanese black bear population. *Population Ecology*, 42: 37-44.
- 環境庁自然保護局野生生物課編, 1991. 日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック 脊椎動物編. 340pp. 自然環境研究センター, 東京.
- 環境省, 2000. 特定鳥獣保護管理計画技術マニュアル (クマ類編). 139pp. 自然環境研究センター, 東京.
- Paetkau, D. & C. Strobeck, 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology*, 3: 489-495.
- Saitoh, T., Y. Ishibashi, H. Kanamori & E. Kitahara, 2001. Genetic status of fragmented populations of the Asian black bear *Ursus thibetanus* in western Japan. *Population Ecology*, 43 (3): 221-227.
- Saccheri, I., M. Kuussaari, M. Kankare, P. Vikman, W. Fortelius & I. Hanski, 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*, 392: 491-494.
- 野生動物保護管理事務所, 2002. 平成 13 年度 自然再生技術調査業務報告書. 186pp.