

機関番号：15401  
 研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20510216  
 研究課題名 絶滅危惧種イシカワガエルの保全と遺伝的多様性に関する研究  
 研究課題名 Studies on conservation and genetic diversity in an endangered frog species  
*Odorrana ishikawae*  
 研究代表者  
 住田 正幸 (SUMIDA MASAYUKI)  
 広島大学・大学院理学研究科・教授  
 研究者番号：10163057

研究成果の概要 (和文)：奄美大島と沖縄本島北部に分布イするシカワガエルは、環境省レッドリストで絶滅危惧 IB 類に、鹿児島県と沖縄県で天然記念物に指定されている。本研究では、本種の保全を目的に飼育下繁殖を試みたところ、実験室の人工繁殖個体から、完全飼育下で自然繁殖に成功した。また、奄美産と沖縄産を用いて形態計測、mtDNA 解析及び交雑実験を行ったところ、両者は遺伝的にも形態的にも分化しており、雑種致死による交配後隔離が成立していることから、別種とするのが妥当であると考えられた。奄美産を新種「アマミイシカワガエル」として記載した。

研究成果の概要 (英文)： *Odorrana ishikawae* is listed as a class BI endangered species on IUCN Red List and protected by law in Okinawa and Kagoshima Prefectures, Japan. In an effort to help preserve this endangered species, we tested a farming technique involving the artificial breeding of frogs and also promoted natural breeding in the laboratory. We also conducted morphological comparison, mtDNA analysis, and crossing experiment, with the purpose of clarifying the degree of differentiation between the Okinawa and Amami populations. The results showed that the Okinawa and Amami populations are clearly differentiated both genetically and morphologically, and also reproductively isolated by complete hybrid inviability or abnormal spermatogenesis. These two populations can be regarded as different species. Thus, we have described the Amami population as a new species *O. splendida*.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：両生類進化遺伝学

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：生物多様性保全、絶滅危惧種、飼育下繁殖、遺伝的多様性、交雑実験、種分化、イシカワガエル、新種

## 1. 研究開始当初の背景

イシカワガエルは、奄美大島と沖縄島北部に分布する日本で最も美しいとされるカエルで、鹿児島県と沖縄県では天然記念物に、環境省レッドリストでは絶滅危惧 IB 類に指定されるなど、早急な保護対策が求められてい

る。本種の飼育下繁殖は、その特殊な繁殖生態から、これまで困難とされていたが、予備実験によって、野外で成熟した個体についての人工繁殖に成功している。また、イシカワガエル種内の遺伝的多様性についての知見は全くなく、効率的な保全のためには、本種

の集団間及び集団内の遺伝的多様性の評価が急務となっている。一方、沖縄島と奄美大島のイシカワガエルについては、外部形態、鳴声、核型、mtDNA 遺伝子の塩基配列において、わずかながら明瞭な違いが報告されているが、両者の間にどの程度の繁殖隔離があるか、また分類学的にどのように位置付けるかについては、まだ明確でない。

## 2. 研究の目的

(1) 実験室での人工繁殖・飼育維持方法を確立し、効率的な保全に資する。(2) 集団間及び集団内の遺伝的多様性を調べ、人工繁殖下でも遺伝的多様性を評価する。(3) 種内の遺伝的及び形態的分化を解明するとともに、交配後隔離の程度を明らかにすることによって、各集団の分類学的な位置付けを明確にする。

## 3. 研究の方法

(1) 奄美大島と沖縄島からイシカワガエルを採集し、人工受精法による人工交配系を確立する。(2) 実験室での人工繁殖と飼育維持を試みるとともに、野外から採集した沖縄、奄美大型、奄美普通の各集団の個体を用いて、集団間で交雑実験を行ない、雑種の生存率と繁殖能力を調べ、集団間の繁殖隔離の有無とその程度を調べる。(3) 野外集団について、mtDNA 解析を行ない、本種の各集団における遺伝的多様性と集団間の遺伝的分化の程度を把握する。(4) 外部形態計測を行ない、集団間の形態的な差異を明らかにする。

## 4. 研究成果

2010年の繁殖期には、人工繁殖によって生まれた6年齢の人工繁殖個体から、完全飼育下での自然繁殖によって、多数の2代目を得ることに成功した。また、形態計測に基づく主成分分析の結果、奄美産と沖縄産とは形態的に明瞭な相違があること、アロザイム分析、mtDNA 解析及びマイクロサテライト解析から、両集団は遺伝的にも明瞭に分化していることがわかった。さらに、交雑実験の結果、沖縄産雌と奄美産雄との雑種は発生初期ですべて致死になること、奄美産雌と沖縄産雄の雑種は正常に発育するが、成熟期に達した雑種の雄は精子形成が異常であることがわかった。以上、奄美産と沖縄産は遺伝的にも形態的にも明瞭に分化しており、生殖的にも明確な交配後隔離が成立していることから、両集団は別種とするのが妥当であると考えられる。イシカワガエルの基準産地は沖縄本島であることから、奄美産のイシカワガエルを新種「アマミイシカワガエル」*Odorrana splendida*として記載した。

## 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] (計18件) (すべて査読有り)

1. Kurniawan, N., T. H. Djong, M. M. Islam, T. Nishizawa, Daicus, M. B., H. S. Yong, R. Wanichanon, I. Yasir and M. Sumida (2011) Taxonomic status of three types of *Fejervarya cancrivora* from Indonesia and other Asian countries based on morphological observations and crossing experiments. *Zool. Sci.*, 28: 12-24.
2. Kuramoto, M., N. Satou, S. Oumi, A. Kurabayashi and M. Sumida (2011) Inter- and intra-island divergence in *Odorrana ishikawae* (Anura, Ranidae) of the Ryukyu Archipelago of Japan, with description of a new species. *Zootaxa*, 2767: 25-40.
3. Nishizawa, T., A. Kurabayashi, T. Kunihara, N. Sano, T. Fujii and M. Sumida (2011) Mitochondrial DNA diversification, molecular phylogeny, and biogeography of the primitive rhacophorid genus *Buergeria* in East Asia. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 59: 139-147.
4. Iwakoshi-Ukena, E., K. Ukena, A. Okimoto, M. Soga, G. Okada, T. Fujii, Y. Sugawara and M. Sumida (2011) Identification and characterization of antimicrobial peptides from the skin of the endangered frog *Odorrana ishikawae*. *Peptides*, 32: 670-676.
5. Igawa, T., M. Okuda, S. Oumi, S. Katsuren, A. Kurabayashi, T. Umino and M. Sumida (2011) Isolation and characterization of twelve microsatellite loci of endangered Ishikawa's frog (*Odorrana ishikawae*). *Conservation Genet. Resour.*, 3: in press (DOI 10.1007/s12686-010-9370-7).
6. Sumida, M., Satou, N., Yoshikawa, N., Kurabayashi, A., Islam M. M., Igawa T., Oumi, S., Katsuren, S., Ota, H., Shintani, N., Fukuniwa, H., Sano, N. and Fujii, T. (2011) Artificial production and natural breeding of the endangered frog species *Odorrana ishikawae*, with special reference to fauna conservation in the laboratory. *Zool. Sci.*, 28: in press.
7. Kurniawan, N., M. M. Islam, T. H. Djong, T. Igawa, Daicus, M. B., H. S. Yong, R. Wanichanon, M. M. R. Khan, D. T. Iskandar, M. Nishioka and M. Sumida (2010) Genetic divergence and evolutionary relationship

in *Fejervarya cancrivora* from Indonesia and other Asian countries inferred from allozyme and mtDNA sequence analyses. Zool. Sci., 27 : 222-233.

8. Kotaki, M., A. Kurabayashi, M. Matsui, M. Kuramoto, T. H. Djong and M. Sumida (2010) Molecular phylogeny for the diversified frogs of genus *Fejervarya* (Anura: Dicroglossidae). Zool. Sci., 27 : 386-395.

9. Kurabayashi, A., N. Yoshikawa, N. Sato, Y. Hayashi, S. Oumi, T. Fujii, and M. Sumida (2010) Complete mitochondrial DNA sequence of the endangered frog *Odorrana ishikawae* (family, Ranidae) and unexpected diversity of mt gene arrangements in ranids. Mol. Phylogenet. Evol., 56 : 543-553.

10. Alam M. S., A. Kurabayashi, Y. Hayashi, N. Sano, M. M. R. Khan, T. Fujii and M. Sumida (2010) Complete mitochondrial genomes and novel gene rearrangements in two dicroglossid frogs, *Hoplobatrachus tigerinus* and *Euphlyctis hexadactylus*, from Bangladesh. Genes Genet. Syst., 85: 219-232.

11. Joshy, S. H., M. S. Alam, A. Kurabayashi, M. Sumida and M. Kuramoto (2009) Two new species of the genus *Euphlyctis* (Anura: Ranidae) from Southwestern India as revealed by molecular and morphological comparisons. Alytes, 26: 97-116.

12. Kurabayashi, A. and M. Sumida (2009) PCR primers for the neobatrachian mitochondrial genome. Curr. Herpetol., 28: 1-11.

13. Igawa, T., A. Kurabayashi, C. Usuki, T. Fujii and M. Sumida (2008) Complete mitochondrial genomes of three neobatrachian anurans: A case study of divergence time estimation using different data and calibration settings. GENE, 402: 116-129.

14. Islam, M. M., M. M. R. Khan, T. H. Djong, M. S. Alam and M. Sumida (2008) Genetic differentiation of *Fejervarya limnocharis* complex from Bangladesh and other Asian countries elucidated by allozyme analyses. Zool. Sci., 25: 261-272.

15. Kotaki, M., A. Kurabayashi, M. Matsui, W. Khonsue, T. H. Djong, M. Tandon, and M. Sumida (2008) Genetic divergences and phylogenetic relationships of the *Fejervarya limnocharis* complex in

Thailand and neighboring countries revealed by mitochondrial and nuclear genes. Zool. Sci., 25: 381-390.

16. Kurabayashi, A., M. Sumida, H. Yonekawa, F. Glaw, M. Vences and M. Hasegawa (2008) Phylogeny, recombination, and mechanisms of stepwise mitochondrial genome reorganization in mantellid frogs from Madagascar. Mol. Biol. Evol., 25: 874-891.

17. Alam, M. S., T. Igawa, M. M. R. Khan, M. M. Islam, M. Kuramoto, M. Matsui, A. Kurabayashi and M. Sumida (2008) Genetic divergence and evolutionary relationships in six species of genera *Hoplobatrachus* and *Euphlyctis* (Amphibia: Anura) from Bangladesh and other Asian countries revealed by mitochondrial gene sequences. Mol. Phylogenet. Evol., 48: 515-527.

18. Islam, M. M., N. Kurose, M. M. R. Khan, T. Nishizawa, M. Kuramoto, M. S. Alam, M. Hasan, N. Kurniawan, M. Nishioka and M. Sumida (2008) Genetic divergence and reproductive isolation in the genus *Fejervarya* (Amphibia: Anura) from Bangladesh inferred from morphological observations, crossing experiments, and molecular analyses. Zool. Sci., 25: 1084-1105.

[学会発表] (計 29 件)

1. Sumida, M. "Attempt at artificial breeding for conservation and analyses of genetic divergences and postmating isolation mechanisms in an endangered frog *Odorrana ishikawae* from Japan" BioSystematics Berlin 2011. (25 February, 2011. Berlin, Germany)

2. Hasan, M., M. M. Islam, T. Igawa, M. M. R. Khan, M. S. Alam, T. H. Djong, N. Kurniawan, M. Kuramoto and M. Sumida "Genetic divergences and phylogenetic relationships in the frogs from South to East Asia" BioSystematics Berlin 2011. (25 February, 2011. Berlin, Germany)

3. 住田正幸, 西谷拓磨, 菅原弘貴, 倉林敦, 勝連盛輝, 大海昌平 「絶滅危惧種イボイモリの飼育下繁殖の試みとミトコンドリアゲノムの解析」日本動物学会第81回大会 (2010年9月25日, 東京)

4. Islam, M. M., M. M. R. Khan, M. Kuramoto, and M. Sumida "Reproductive isolating mechanisms among frogs of genus *Fejervarya* elucidated by crossing experiments, histological and spermatogenesis

- observations” 日本動物学会第81回大会 (2010年9月25日, 東京)
5. 井川武, 奥田優, 大海昌平, 勝連盛輝, 倉林敦, 海野徹也, 住田正幸「マイクロサテライトマーカーを用いた絶滅危惧種および天然記念物イシカワガエルの遺伝的集団構造の解明」日本遺伝学会第 82 回大会 (2010年9月22日, 札幌)
6. 住田正幸, 佐藤直樹, M. M. Islam, 井川武, 吉川夏彦, 倉林敦, 大海昌平, 勝連盛輝, 福庭博子, 新谷望, 藤井保, 倉本満「絶滅危惧種イシカワガエルにおける飼育下繁殖の試みと交配後隔離機構の解明」日本遺伝学会第82回大会 (2010年9月22日, 札幌)
7. Hasan, M., M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. S. Alam, T. Igawa, M. Kuramoto and M. Sumida “Species diversity and phylogenetic relationships among frogs from Bangladesh revealed by nucleotide sequences of mitochondrial 16S rRNA gene” 日本遺伝学会第82回大会 (2010年9月21日, 札幌)
8. Alam, M. S., A. Kurabayashi, Y. Hayashi, N. Sano, M. M. R. Khan, T. Fujii and M. Sumida “Complete mitochondrial genomes and novel gene rearrangements in two dicroglossid frogs, *Hoplobatrachus tigrinus* and *Euphlyctis hexadactylus*, from Bangladesh” 日本遺伝学会第82回大会 (2010年9月21日, 札幌)
9. Kurabayashi, A., N. Yoshikawa, N. Sato, Y. Hayashi, S. Oumi, T. Fujii and M. Sumida “Mitochondrial genome of the endangered frog *Odorrana ishikawae* and unexpected diversity of mt genomic arrangements in the family Ranidae” International Symposium on Biodiversity Sciences (ISBDS) 2010, “Genome, Evolution and Environment”. (1 August, 2010. Nagoya, Japan)
10. Sumida, M. (2010) Artificial breeding and genetic diversity in an endangered frog *Odorrana ishikawae*: Case study of fauna conservation from Japan. 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation, (21 July, 2010. Bali, Indonesia)
11. Igawa, T., M. Okuda, S. Oumi, S. Katsuren, A. Kurabayashi, T. Umino and M. Sumida “Development of microsatellite markers and population genetic analysis of the endangered frog, *Odorrana ishikawae* (Anura: Ranidae)” 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation (20 July, 2010. Bali, Indonesia)
12. Kurniawan, N., T. H. Djong, T. Igawa, M. Kotaki and M. Sumida “Geographic distribution and phylogenetic relationship of genus *Fejervarya* from Indonesian Sunda Land inferred from 16S rRNA gene” 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation (20 July, 2010. Bali, Indonesia)
13. Alam, M. S., 林陽子, 佐野尚, M. M. R. Khan, 倉林敦, 藤井保, 住田正幸 “Complete mitochondrial genomes and gene rearrangements in two Bangladesh frog species *Hoplobatrachus tigrinus* and *Euphlyctis hexadactylus* (Family Dicroglossidae)” 日本爬虫両生類学会第 47 回大会 (2009年11月8日, 天理)
14. 西谷拓磨, 住田正幸, 倉林敦, 勝連盛輝「絶滅危惧種・イボイモリ (沖縄産) の飼育下繁殖」日本爬虫両生類学会第 47 回大会 (2009年11月8日, 天理)
15. 岩成美紀, 藤井保, 井川武, M. M. Islam, 住田正幸, 大海昌平, 勝連盛輝「沖縄産と奄美産の準絶滅危惧種リュウキュウアカガエルにおける遺伝的分化」日本爬虫両生類学会第 47 回大会 (2009年11月7日, 天理)
16. Hasan, M., M. M. Islam, M. S. Alam, 井川武, M. M. R. Khan, T. H. Djong, 倉本満, 住田正幸 “Species diversity and phylogenetic relationship in the frogs from Bangladesh and other Asian countries revealed by nucleotide sequences of mitochondrial 16S rRNA gene” 日本爬虫両生類学会第 47 回大会 (2009年11月7日, 天理)
17. Kurniawan, N. and M. Sumida (2009) “Genetic divergence and speciation in *Fejervarya cancrivora* from Indonesia and other Asian countries by morphological observation, crossing experiments, allozyme analysis and molecular techniques” Sunda Amphibian Conference (26 September, 2009. Kalimantan Barat, Indonesia)
18. 倉林敦, 住田正幸, 米川博通, F. Glaw, M. Vences, 長谷川政美「動物ミトコンドリアゲノムの分子進化メカニズム: マダガスカルガエル科で観察された大規模なゲノム再編成に基づく新たなモデルの提唱」第 11 回日本進化学会大会 (2009年9月20日, 札幌)
19. 住田正幸, 佐藤直樹, 倉林敦, 大海昌平, 勝連盛輝, 太田英利, 福庭博子, 菅原芳明, 藤井保「絶滅危惧種イシカワガエルにおける飼育下繁殖の試みと交配後隔離機構の解明」日本動物学会第 80 回大会 (2009年9月19日, 静岡)

20. 住田正幸, 佐藤直樹, 倉林敦, 大海昌平, 太田英利, 勝連盛輝, 福庭博子, 菅原芳明, 藤井保「沖縄島産と奄美大島産イシカワガエルにおける遺伝的分化と繁殖隔離機構」日本爬虫両生類学会第47回大会(2008年10月25日, 宇都宮)

21. 住田正幸, 小瀧学, M. M. Islam, T. H. Djong, M. S. Alam, 倉林敦, 西岡みどり, M. M. R. Khan, 松井正文, 太田英利, 倉本満「アジアに広範に分布するヌマガエル種群における繁殖隔離機構と系統進化-交雑実験およびミトコンドリアDNA遺伝子の塩基配列からの推定」日本動物学会第79回大会(2008年9月6日, 博多)

22. 曾我美幸, 岩越-浮穴栄子, 浮穴和義・藤井保, 菅原芳明, 住田正幸「絶滅危惧種イシカワガエルの皮膚に存在する抗菌ペプチドの前駆体cDNA解析」日本動物学会第79回大会(2008年9月5日, 博多)

23. Sumida, M. and M. Nishioka “See-through frogs created by breeding” 6th World Congress of Herpetology (19 August, 2008. Manaus, Brazil)

24. Kurabayashi, A. and M. Sumida “Primers for neobatrachian mtDNAs, mt genomic structures in afrobatrachians, and ranoid phylogeny” 6th World Congress of Herpetology (19 August, 2008, Manaus, Brazil)

25. Sato, N., N. Yoshikawa, Y. Hayashi, A. Kurabayashi, S. Oumi, Y. Sugawara, T. Fujii and M. Sumida “Attempts at artificial breeding and analysis of complete mitochondrial genome in an endangered species *Rana ishikawae* from Amami Oshima, Japan” 6th World Congress of Herpetology (19 August, 2008. Manaus, Brazil)

26. Alam, M. S., T. Igawa, M. M. R. Khan, M. M. Islam, M. Kuramoto, M. Matsui, A. Kurabayashi and M. Sumida “Genetic divergence and evolutionary relationships in six species of genera *Hoplobatrachus* and *Euphlyctis* (Amphibia: Anura) from Bangladesh and other Asian countries revealed by mitochondrial gene sequences” 6th World Congress of Herpetology (19 August, 2008. Manaus, Brazil)

27. Islam, M. M., N. Kurose, M. M. R. Khan, T. Nishizawa, M. S. Alam, M. Kuramoto, M. Hasan, N. Kurniawan, M. Nishioka and M. Sumida “Genetic divergence in the frogs of the genus *Fejervarya* from Bangladesh and other Asian countries revealed by morphometric data, crossing experiments, and allozyme and mtDNA gene sequence

analyses” 6th World Congress of Herpetology (19 August, 2008. Manaus, Brazil)

28. Kotaki, M., A. Kurabayashi, M. Matsui, W. Khonsue, T. H. Djong, M. Tandon and M. Sumida “Genetic divergences and phylogenetic relationships of the *Fejervarya limnocharis* complex in Thailand and neighboring countries revealed by mitochondrial and nuclear genes” 6th World Congress of Herpetology (19 August, 2008. Manaus, Brazil)

29. Kurniawan, N., D. M. Belabut, H.-S. Yong, R. Wanichanon, M. M. Islam, M. M. R. Khan, T. H. Djong, D. T. Iskandar, M. Nishioka and M. Sumida “Genetic divergence and speciation patterns in *Fejervarya cancrivora* from Indonesia and other Asian countries inferred from allozyme and mtDNA sequence analyses” 6th World Congress of Herpetology (19 August, 2008. Manaus, Brazil)

〔その他〕

「絶滅危惧種イシカワガエル青い体色を確認」が日本経済新聞他国内8紙(2010年4月3-4日)で報道された。「生きた化石イボイモリ人工繁殖成功」が読売新聞(2010年9月25日)に掲載された。「イシカワガエル奄美と沖縄は別種」が朝日新聞(2010年9月16日)に、さらに「イシカワガエル奄美大島産新種認定」が朝日新聞(2011年2月18日)に掲載された。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

住田 正幸 (SUMIDA MASAYUKI)  
広島大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 10163057

### (2) 研究分担者

倉林 敦 (KURABAYASHI ATSUSHI)  
広島大学・大学院理学研究科・助教  
研究者番号: 00327701

### (3) 連携研究者

( )