

機関番号：13101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510219

研究課題名 (和文) 集団遺伝解析に基づく外来ザリガニの管理手法の開発

研究課題名 (英文) Developing management methods for invasive crayfish based on population genetic analysis

研究代表者

西川 潮 (NISIKAWA USIO)

新潟大学・超域学術院・准教授

研究者番号：00391136

研究成果の概要 (和文)：

特定外来生物シグナルザリガニ (*Pacifastacus leniusculus*) は、近年、急速に北海道や本州で分布を拡大している。本研究では、ミトコンドリア DNA 解析 (16SrRNA) に基づき、シグナルザリガニの起源、遺伝的変異、ならびに侵入先における分散パターンを明らかにした。その結果、1) 国内のシグナルザリガニは複数起源由来のハプロタイプが混ざり合っていること、2) 侵入集団は遺伝的多様性が高いこと、3) 侵入集団は主に人為移植によって国内で分布を拡大していることが示された。

また、シグナルザリガニに特異的な核DNAマイクロサテライト・マーカーを新規に5座開発し、これらを用いて、国内のシグナルザリガニの地域構造と遺伝的多様性を検討した。その結果、4) 侵入集団は主に北海道、長野、滋賀の3クラスターに分かれること、5) 北海道集団は長野、滋賀集団に比べ遺伝的多様性が高いこと、6) 近年発見された利根川水系の集団は北海道由来であること、7) ミトコンドリアDNA解析で多型が認められなかった集団でも、核レベルでは十分に高い多様性を示すことが分かった。これらのマイクロサテライト・マーカーはシグナルザリガニの分布拡大パターンの解明や駆除ユニット設定の際に有用である。

研究成果の概要 (英文)：

In recent decades, the invasive signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) has been rapidly expanding its distribution range in Japan. Based on 16S mtDNA analysis, we clarified its origin, genetic variability and dispersal in Japan. We found that the invasive signal crayfish: 1) have undergone genetic admixture following transportation from multiple locations in the native range, 2) have high genetic variability and 3) likely increasing their distribution range through unintended human-mediated introductions.

We subsequently developed five polymorphic microsatellite markers for signal crayfish, after which the population structure and genetic variability were analysed. Consequently, 5) the invasive signal crayfish populations were grouped into three clusters (Hokkaido, Nagano and Shiga) 6) the newly found population in Tone River drainage appeared to have originated from Hokkaido and 7) the populations with low genetic variability in 16S mtDNA have high genetic variability in microsatellite DNA. These microsatellite markers are useful in identifying dispersal pathways and defining eradication units for the invasive signal crayfish.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：保全生物，外来生物

1. 研究開始当初の背景

北海道でウチダザリガニ、滋賀県でタンカイザリガニと呼ばれる北米北西部原産のシグナルザリガニ (*Pacifastacus leniusculus*) は、2006年2月に環境省の「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律」(外来生物法)の特定外来生物第二次指定種に選定された。

シグナルザリガニは、体長15cmほどに達する冷水性の大型ザリガニで、1926年から1930年にかけて食用目的で北米のコロンビア川流域から輸入された。移入当時は北海道や本州の一部にのみ放流されたが、人間活動の増大に伴い、2000年代になって急速に、北海道はもとより本州でも分布を拡大している。本種はこれまでヨーロッパや日本に移植され、侵入先の湖沼や河川において多大な生態系被害をもたらしている。ヨーロッパでは、シグナルザリガニは移入後約100年の間に、IUCNの世界のワースト100外来生物にも選定されている卵菌類(アファノマイシス菌：*Aphanomyces astaci*)の媒介を通じて、大陸各地でヨーロッパザリガニの局所絶滅をもたらし、漁業関係者に深刻な経済被害を与えている(Ackefors 1999)。日本の侵入個体群のアファノマイシス菌の保菌状況については、今後の研究成果を待つ状況だが、野外実験や室内実験から、シグナルザリガニは、沈水植物の摂食破壊や底棲動物の捕食、落葉の分解、底泥攪拌、栄養塩の排泄などを通じて食物網構造や生態系機能を大きく改変させることが明らかとなっている(西川ほか2005; Usio et al. 2006)。沈水植物は水質の浄化や底泥の安定化の役割を担うため、水草が大幅に減少すると、水草が優占する透明な水の系から植物プランクトンが優占する濁った水の系に移行し、生態系のレジームシフトをもたらす(Scheffer et al. 2001)。また、北海道東部では、捕食や競争を通じて日本唯一の在来ザリガニ種かつ固有種のニホンザリガニ (*Cambaroides japonicus*) が駆逐され、ザリガニ種が置き換わっている(Usio et al. 2001)。陸水域の生物多様性の保全のためには、シグナルザリガニの効果的な管理手法を開発することは急務である。本研究では、マイクロサテライト・マーカーに基づく集団遺伝解析を通じて、特定外来生物シグナルザリガニの管理手法を開発することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、特定外来生物シグナルザリ

ガニの予防管理を念頭において、1) 集団解析に有用なシグナルザリガニのマイクロサテライト・マーカーを開発すること、2) ミトコンドリアDNA解析およびマイクロサテライト解析を通じて、在来・侵入集団の遺伝的変異、集団構造、ならびに分散を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリアDNA解析

シグナルザリガニの在来生息域と国内侵入先から20集団ずつ(合計約600個体)標本を収集し、ミトコンドリアDNA解析(16SrRNA)に基づいて、これらの遺伝的変異と分散を明らかにした。

(2) マイクロサテライト・マーカーの開発

制限酵素で切断したシグナルザリガニのゲノムライブラリーから、磁気ビーズ濃縮法により繰り返し配列を含む断片を選んだ後、クローニングを経て塩基配列を解読した。これにより、約500クローンより、マイクロサテライト・マーカーが設計可能な31配列を得た。この31配列に対してPCRプライマーの設計を行い、PCR増幅に最適な条件を探した。PCR増幅ができたプライマーセットについては、蛍光プライマーによって標的領域を増幅し、ジェネティックアナライザー上で多型の有無を確認した。選抜されたマーカーを用いて、北海道(3集団)、長野、滋賀の集団で予備解析を試みた。

(3) マイクロサテライトDNA解析

新規に開発したシグナルザリガニの核DNAマイクロサテライト・マーカー5座を用いて、国内のシグナルザリガニ集団(北海道4地域、本州3地域から採集した計212個体)の地域構造と遺伝的多様性を検討した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアDNA解析

ミトコンドリアDNA解析(16SrRNA)の結果、侵入域では、複数起源由来のハプロタイプが混ざり合っており、少なくとも国内3地域(北海道、長野、滋賀)に移植され、そのうち、北海道由来のハプロタイプが近年急速に分布を拡大していることが示唆された。また、在来集団と侵入集団の遺伝的多様性の比較から、侵入集団は遺伝的多様性が高いことが明らかになった。在来集団に見られる遺伝構造は侵入集団では認められないことから、自力拡散ではなく、主に、人為移植によって国

内で分布を拡大していることが示された。

(2) マイクロサテライト・マーカーの開発
使用可能なマーカー候補として遺伝子座を6座決定した。

予備解析の結果、6座のうち5座のマーカーはヘテロ接合度が0.3-0.9、観察された対立遺伝子数が4-29で、集団構造を推定するのに有用であり、対立遺伝子頻度の違いから、

集団の遺伝的特性を区別できることがわかった。1座についてはハーディーワインベルク平衡からの著しい逸脱が見られ、ヌルアレルの存在が示唆されたのでマーカーとして使用することは難しいと判断した。

集団解析に使用した5座のマーカーの属性を表1に示す。

表1. 新規開発されたマイクロサテライト・マーカーの属性

| マーカー名 | プライマー 塩基配列(5'-3') | 対立遺伝子 サイズ幅 (bp) | GenBank 登録番号 |
|---------------|---|--------------------|-----------------|
| <i>Scop1</i> | F: gccctctgcttactttctcac R: ctcatggagtagcagtgccaga | 120-164 | AB610897 |
| <i>Scop9</i> | F: gctgaaatggagggatga R: tgtgccttttctaagctgt | 145-151 | AB610898 |
| <i>Scop13</i> | F: tccaggtgagtacatctaggt R: gtttgagtacattactttaagc | 109-119 | AB610899 |
| <i>Scop19</i> | F: ataacaggttaaggaagatgt R: gagaaaaagtatttcgaga | 255-265 | AB610900 |
| <i>Scop31</i> | F: gatctggacgtcgacgtctt R: ccctgtaccattcatgattg | 160-216 | AB610901 |

(3) マイクロサテライト DNA 解析

F_{ST} 分析や個体アサインメント法によると、北海道・長野・滋賀の3クラスターで遺伝的な違いがあることがわかり(図1)、これはmtDNAの解析と一致した。また、北海道が長野・滋賀に比較して遺伝的多様性が高いことがわかった。さらに、近年発見された利根川水系の個体群が北海道由来であることも確認できた(図1)。なお、mtDNAで多型が認められなかった個体群でも、核レベルでは十分に高い多様性を示した。この相違は、分子進化の速さの違いとともに、繁殖形態の影響や侵入過程でオスとメスの有効集団サイズが異なることに由来する可能性も考えられる。今後、本種の繁殖および侵入形態の詳細な調査が望まれる。

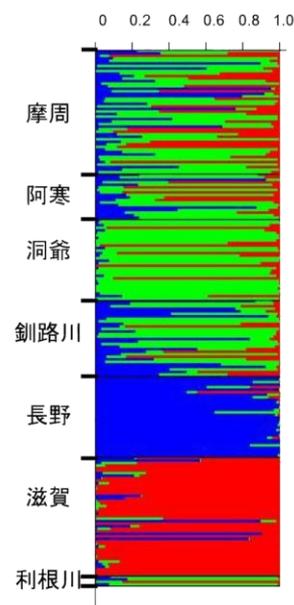


図1. 個体のアサインメント法による地域集団解析。赤・青・黄のバーの長さは、3つの仮想集団へ各個体が帰属する確率を表す。北海道の各集団と利根川集団の類似性、長野と滋賀の独自性がわかる。

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 2 件)

1. 西川潮, 米倉竜次, 岩崎敬二, 西田睦, 河村功一, 川井浩史 (2009) 分子遺伝マーカーを用いて外来生物の侵入生態を調べる: 生態系管理への適用可能性. 特集「生物学的侵入の分子生態学」**日本生態学会誌** 59: 161-166【査読あり】.
2. 米倉竜次, 河村功一, 西川潮 (2009) 外来生物の小進化: 遺伝的浮動と自然選択の相対的役割. 特集「生物学的侵入の分子生態学」**日本生態学会誌** 59: 153-158【査読あり】.

[学会発表] (計 1 件)

1. 西川潮, 東典子, 高村典子, 高村健二 ミトコンドリア DNA 解析に基づく外来ザリガニ類の遺伝的変異と分散様式 第 55 回日本生態学会大会企画集会 福岡市 (3/2008).【口頭発表】

[公開シンポジウム等発表] (計 4 件)

1. 西川潮, 東典子, 高村典子, 高村健二 分子遺伝マーカーを用いて外来ザリガニ類の侵入生態を調べる 国立環境研究所公開シンポジウム 2008 東京都 (6/2008).【ポスター発表】
2. 西川潮, 東典子, 高村典子, 高村健二 分子遺伝マーカーを用いて外来ザリガニ類の侵入生態を調べる 国立環境研究所公開シンポジウム 2008 札幌市 (6/2008).【ポスター発表】
3. 西川潮 侵入種ウチダザリガニとどう向き合うか? 美幌博物館ザリガニフォーラム, 北海道美幌町 (8/2009)
4. 西川潮 ザリガニから外来種問題を考える 桑袋ビオトープ公園公開型講座, 東京都 (9/2009)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

西川 潮 (NISIKAWA USIO)

新潟大学・超域学術院・准教授

研究者番号: 00391136

(2)研究分担者

小泉 逸郎 (KOIZUMI ITSURO)

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号: 50572799

(3)連携研究者

東 典子 (AZUMA NORIKO)

東京農業大学生物資源開発研究所・博士研究員

研究者番号: 20374704