

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710282

研究課題名(和文) 西南諸島に産する両生類絶滅危惧種の遺伝的多様性の解明と飼育繁殖における遺伝的管理

研究課題名(英文) Elucidation of genetic diversity and genetic management in captive breeding of endangered amphibian species endemic to Ryukyu Islands

研究代表者

井川 武(Igawa, Takeshi)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：00507197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：絶滅危惧種の遺伝的多様性を維持することは、その生物の進化の歴史を後世に残し、さらに将来の環境の変化に応じて存続するための能力を与える唯一の方策である。本研究では、西南諸島に固有な9種の絶滅危惧両生類について、集団・個体レベルの遺伝的解析に最適な指標であるマイクロサテライトマーカーを開発し、それらを用いて種内の遺伝的多様性を解明した。その結果、野外集団の効率的な保全、さらには域外保全における遺伝的管理が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Genetic diversity represents the evolutionary history of species and the essential evolutionary potential to respond to changing environments especially for endangered species. Microsatellites are currently the most practical and informative molecular marker for measuring genetic variation within populations. In this study, we developed microsatellite markers for nine endangered amphibian species endemic to Ryukyu Islands in Japan. By using these markers, fine scale population structures and genetic diversities of these species were revealed. These results have contributed to effective conservation and enabled genetic management of ex-situ conservation activities of these endangered amphibians.

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：集団遺伝学 保全遺伝学 景観遺伝学 両生類 絶滅危惧種 マイクロサテライト 西南諸島 GIS

1. 研究開始当初の背景

近年、生息域の破壊や地球温暖化、ツボカビ感染などにより、両生類が減少しており、IUCN (国際自然保護連合) によれば、約 6,200 種のうちの 3 分の 1 が絶滅の危機に瀕している。日本に生息する両生類についても半数以上が絶滅危惧種に該当し、その多くが西南諸島固有種に集中している。危急種である IUCN の絶滅危惧 B1 類 (Endangered B1) に限っても 6 種 (イシカワガエル・オットンガエル・ホルストガエル・ナミエガエル・コガタハナサキガエル・イボイモリ: 図 1) が該当し、さらに、これら (コガタハナサキガエルを除く) は鹿児島県あるいは沖縄県の天然記念物に指定されるなど、早急な保護が求められている。

ただし、生物を保全するということは、集団が一つでも残っていれば、それで事が足りるという簡単な話ではない。一つの種として分類されている生物種には、過去に分化した集団や、地理的に隔離された集団が存在する可能性がある。これらは、一般的に遺伝的多様性あるいは、集団構造と呼ばれ、生物が将来の環境の変化に適応して生存するための唯一の要素であり、しかも、一度失われると復元することは不可能である。

特に西南諸島は、過去に大陸と陸続きになった際に動物が移住し、その後、島嶼となった際に海を渡れない陸上動物はそれぞれの島で独自の進化を遂げている。そのため、西南諸島は進化のホットスポットでもあると言える。例えば、イシカワガエルの一部が形態的・遺伝的に異なることが分かってきており、他種でも遺伝的に異なる集団が存在する可能性が考えられた。また、島という限られた陸域に生息し、近年、生息域の縮小により一部の集団はすでに絶滅していることが分かっており、島内に残された集団構造は非常に貴重である。

さらに、研究代表者の所属する広島大学大学院理学研究科附属両生類類研究施設 (以下、両生類研) では、西南諸島に生息する絶滅危惧両生類の飼育繁殖を行ってきている。本研究課題申請時点においては、近親交配を避けるためにも、遺伝マーカーを用いて、計画的に繁殖を行うことが求められていた。

マイクロサテライトはゲノム中に散在する 2~6 塩基の単純なリピート配列であり、集団間及び個体間の遺伝的多様性と遺伝的関係を解明する上で最も有効な遺伝マーカーであると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、オキナワイシカワガエル (*Odorrana ishikawae*)、アマミイシカワガエル (*Odorrana amamiensis*)、ハナサキガエル (*Odorrana narina*)、アマミハナサキガエル (*Odorrana amamiensis*)、オオハナサキガエル (*Odorrana supranarina*)、コガタハナサキ

ガエル (*Odorrana utsunomiyaorum*)、オットンガエル (*Babina subaspera*)、ホルストガエル (*Babina holsti*)、イボイモリ (*Echinotriton andersoni*) の 9 種について、それぞれ、(1) マイクロサテライトマーカーを開発し、(2) それらを用いて野外集団の遺伝的構造及び、遺伝的多様性を解明すること、また、(3) 飼育集団における遺伝的管理を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マイクロサテライトマーカーの開発

それぞれの種のゲノムからクローニング及び、次世代シーケンサーを用いて、マイクロサテライト座位を単離し、個体および集団レベルで変異性のある遺伝子座を選抜した。

(2) 種内の集団構造の解明

マイクロサテライトマーカーを用いて、それぞれの種の分布域における集団間の遺伝的分化及び、遺伝子流動の程度を明らかにした。さらに、地理情報システム (以下、GIS) を利用し、それぞれの種の生態に依存した集団構造の形成要因を推定した。

(3) 集団内の遺伝的多様性の評価

それぞれの集団内における遺伝的多様性を、有効集団サイズなどの集団遺伝学的指標を用いて明らかにした。さらに、過去に採集された集団との比較を行い、遺伝的多様性の変動の有無を検証した。

(4) 人工繁殖個体群における近縁度の評価

(2) により遺伝的に区別される集団において、近縁度の低いペアを選抜した場合と、ランダムに交配した場合において、どの程度多様性が異なるか、コンピュータシミュレーションを行った。また、近親交配を行った際の実際の生活力の差異を検証した。

4. 研究成果

(1) マイクロサテライトマーカーの開発

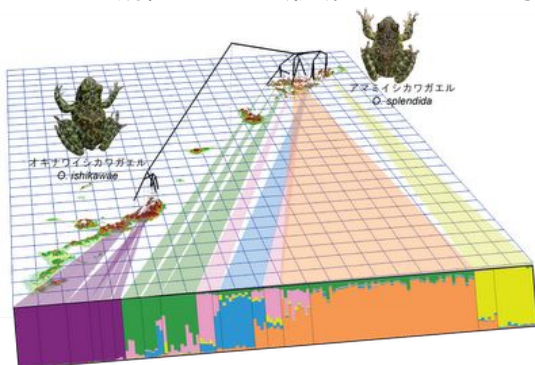
9 種すべてにおいて、多型性に富み、集団間及び、個体間の遺伝的差異の検出に有効なマイクロサテライトマーカーを開発した。特に、ハナサキガエル種群については、次世代シーケンサー Ion Torrent PGM を用いて、効率的にマーカー開発が可能であることを示した。さらに、それらのデータから、無尾両生類においてリピートモチーフに偏りがあることを見出した。

(2) 野外集団における遺伝的多様性及び集団構造

(1) において開発したマイクロサテライトマーカーを用いて、それぞれの種の残存個体群すべてを網羅した集団遺伝学的解析を行った。その結果、各種において独自の生態を反映した集団構造が見出され、さらにそれぞれの集団内における遺伝的多様性が明らかになった。

特にイシカワガエル種群においては、アマ

ミシカワガエルとオキナワイシカワガエルにおいて、対照的な集団構造が見られ、アマミシカワガエルには多様な遺伝的集団が見られるのに対して、オキナワイシカワガエルにおいてはほとんど差異が見られなかった。このことについて、植生、地形、流量などの環境変数に依存した移住に係るコストと遺伝距離を比較したところ高い相関が見られ、イシカワガエル種群における対照的な集団構造は地形とそれに依存した生息適地の連続性によって形成されたことが考



えられた (図1)。
図1 イシカワガエル種群における対照的な遺伝的集団構造

(3) 飼育集団における遺伝的管理

飼育集団を継代飼育した際の遺伝的多様性の低下の度合いを検証するため、ランダムに交配した場合と、近親度の最も低いペアを選抜して交配した場合 (Minimum Kinship 法) において、ペア数を現実的な数である 1、2、4、8 とした場合のコンピュータシミュレーションを行った。その結果、いずれのペア数においても MK 法によって継代された集団の方が遺伝的多様性が高く、飼育集団の継代維持において有効であることが分かった。

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 11 件)

Shohei Komaki, Takeshi Igawa, Masafumi Nozawa, Si-Min Lin, Shohei Oumi, and Masayuki Sumida. Development and characterization of 14 microsatellite markers for *Buergeria japonica* (Amphibia, Anura, Rhacophoridae). *Genes & Genetic Systems*. 89: 35-39, 2014.
DOI: 10.1266/ggs.89.35 査読有

Mahmudul Hasan, Mohammed Mafizul Islam, Mukhlesur Rahman Khan, and Takeshi Igawa, Mohammad Shafiqul Alam, HonTjong Djong, Nia Kurniawan, Hareesh Joshy, Yong Hoi Sen, Daicus M. Belabut, Atsushi Kurabayashi, Mitsuru Kuramoto,

Masayuki Sumida. Genetic divergences of South and Southeast Asian frogs : a case study of several taxa based on 16S ribosomal RNA gene data with notes on the generic name *Fejervarya*. *Turkish Journal of Zoology*, 38:1-22, 2014.
DOI: 10.3906/zoo-1308-36 査読有

Takeshi Igawa, Shohei Oumi, Sseiki Katsuren, and Masayuki Sumida. Population structure and landscape genetics of two endangered frog species of genus *Odorrana*: different scenarios on two islands. *Heredity*, 110:46-56, September 2013.
DOI: 10.1038/hdy.2012.59 査読有

DOI: 10.1038/hdy.2012.59 査読有

Takeshi Igawa, Hiroataka Sugawara, Miyuki Tado, Takuma Nishitani, Atsushi Kurabayashi, Mohammed Islam, Shohei Oumi, Seiki Katsuren, Tamotsu Fujii, and Masayuki Sumida. An Attempt at Captive Breeding of the Endangered Newt *Echinotriton andersoni*, from the Central Ryukyus in Japan. *Animals*, 3:680-692, July 2013.
DOI: 10.3390/ani3030680 査読有

DOI: 10.3390/ani3030680 査読有

Ryosuke Kakehashi, Takeshi Igawa, Noriko Iwai, Etsuko Shoda-Kagaya, and Masayuki Sumida. Development and characterization of new microsatellite loci in the Otton frog (*Babina subaspera*) and cross-amplification in a congeneric species, Holst's frog (*B. holsti*). *Conservation Genetics Resources*, 5(4):1071-1073, June 2013.
DOI: 10.1007/s12686-013-9981-x 査読有

DOI: 10.1007/s12686-013-9981-x 査読有

Kinya Yasui, Takeshi Igawa, Takao Kaji, and Yasuhisa Henmi. Stable aquaculture of the Japanese lancelet *Branchiostoma japonicum* for 7 years. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 320B:538-547, September 2013.
DOI: 10.1002/jez.b.22540 査読有

DOI: 10.1002/jez.b.22540 査読有

Mahmudul Hasan, Mohammed Mafizul Islam, Md Mukhlesur Rahman Khan, Mohammad Shafiqul Alam, Atsushi Kurabayashi, Takeshi Igawa, Mitsuru Kuramoto, and Masayuki Sumida. Cryptic Anuran Biodiversity in Bangladesh Revealed by Mitochondrial 16S rRNA Gene Sequences. *Zoological science*, 29(3):162-72, March 2012.
DOI: 10.2108/zsj.29.162 査読有

DOI: 10.2108/zsj.29.162 査読有

Hie Lim Kim, Mineyo Iwase, Takeshi Igawa, Tasuku Nishioka, Satoko Kaneko, Yukako Katsura, Naoyuki Takahata, and Yoko Satta. Genomic structure and evolution of multigene families: "flowers" on the human genome. *International journal of evolutionary biology*, 2012:917678, January 2012.

DOI: 10.1155/2012/917678 査読有

Hirota Sugawara, Takeshi Igawa, Masashi Yokogawa, Masaru Okuda, Shohei Oumi, Seiki Katsuren, Singo Kaneko, Tetsuya Umino, Yuji Isagi, and Masayuki Sumida. Isolation and characterization of ten microsatellite loci of endangered Anderson's crocodile newt, *Echinotriton andersoni*. *Conservation Genetics Resources*, 4(3):595-598, January 2012.

DOI: 10.1007/s12686-012-9600-2 査読有

Takeshi Igawa, Masaru Okuda, Shohei Oumi, Seiki Katsuren, Atsushi Kurabayashi, Tetsuya Umino, and Masayuki Sumida. Isolation and characterization of twelve microsatellite loci of endangered Ishikawa's frog (*Odorrana ishikawae*). *Conservation Genetics Resources*, 3(3):421-424, December 2011.

DOI: 10.1007/s12686-010-9370-7 査読有

Masayuki Sumida, Naoki Satou, Natsuhiko Yoshikawa, Atsushi Kurabayashi, Mohammed Mafizul Islam, Takeshi Igawa, Shohei Oumi, Seiki Katsuren, Hidetoshi Ota, Nozomi Shintani, Hiroko Fukuniwa, Naomi Sano, and Tamotsu Fujii. Artificial Production and Natural Breeding of the Endangered Frog Species *Odorrana ishikawae*, with Special Reference to Fauna Conservation in the Laboratory. *Zoological science*, 28(11):834-9, November 2011.

DOI: 10.2108/zsj.28.834 査読有

[学会発表](計 34 件)

井川武, 大海昌平, 勝連盛輝, 住田正幸 「絶滅危惧種イシカワガエルにおける集団構造とその景観要因」日本爬虫両棲類学会 第 50 回記念大会 (2011 年 10 月 9 日, 京都)(口頭発表)

井川武・菅原弘貴・本多正尚・富永篤・大海昌平・勝連盛輝・太田英利・松井正文・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ボイモリの遺伝的集団構造の解明」日本遺伝学会第 84 回大会 (2012 年 9 月 25 日, 福岡)(口頭発表)

徳増大輔, 井川武, Min Mi-Sook, 住田正幸 「ウシガエルはどこから来て、なぜ駆逐されないのか? : 侵入成功と個体群存続における遺伝的要因の調査」日本爬虫両棲類学会第 51 回大会 (2012 年 11 月 10 日, 愛知)(ポスター発表)

井川武・小巻翔平・Nasrin Sultana・長岡麻衣・野澤昌文・Islam Mohammed Mafizul・大海昌平・住田正幸「Ion PGM を利用した両生類 3 種におけるマイクロサテライトマーカー開発」NGS 現場の会 第三回研究会 (2013 年 9 月 4 日, 神戸)

井川武・長岡麻衣・野澤昌文・小巻翔平・藤井保・住田正幸「Ion Torrent PGM を用いたハナサキガエルにおけるマイクロサテライト遺伝子座の単離と集団構造解析」日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 (2013 年 11 月 2 日, 札幌)(口頭発表)

Igawa, T., Oumi, S., Katsuren, S., and Sumida, M. "Population structures and its causal landscapes of two endangered frog species of genus *Odorrana* - Different scenarios in two islands." *Molecular Biology and Evolution (SMBE)* (27th July, 2011, Kyoto, Japan) (Selected for oral presentation)

Igawa, T., Oumi, S., Katsuren, S., Sumida, M. "A case study of conservation genetics for endangered species in Japan: Population structures and its causal landscapes of two endangered frog species of genus *Odorrana*" Basic Science International Conference 2012 (25th February 2012, Malang, Indonesia) (Invited keynote presentation)

Igawa, T. "Conservation genetics of endangered amphibians in Ryukyu Archipelago towards sustainable conservation of the biodiversity hotspot of amphibians" International Symposium, "Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing" (28th March, 2014, Higashi-Hiroshima, Japan) (Invited oral presentation)

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/takeshi2igawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井川 武 (TAKESHI IGAWA)
広島大学・理学研究科・特任助教
研究者番号：00507197