

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510324

研究課題名(和文) 表現型と遺伝子型特性に基づく外来ザリガニの危険度評価手法の開発

研究課題名(英文) Ranking the priority for invasive crayfish control based on phenotypic and genetic characteristics

研究代表者

西川 潮(Nisikawa, Usio)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・准教授

研究者番号：00391136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本に定着しているシグナルザリガニ侵入集団を対象として、攻撃行動や、外部形態、遺伝子型、そしてそれらの多型を説明する要因を解析し、優先的に管理すべき侵入集団を考察した。これまでのマイクロサテライトDNA解析から、国内で急速に分布を拡大しているのは、3つの創始集団(北海道摩周湖、長野県明科、滋賀県淡海)のうち、摩周湖集団であることが明らかになっている。また、今回の実験で摩周湖由来の侵入集団でも、侵入地への導入年代や同種の生息個体数によってシグナルザリガニの攻撃性が異なることが示された。今後、摩周湖由来の、侵入年代の新しい侵入集団を優先的に、低密度管理や駆除を進めて行くことが望ましいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied behavioural, morphological and genetic differences and factors that explain such phenotypic and genetic variations among invasive signal crayfish populations in Japan. A previous microsatellite DNA analysis has indicated that invasive signal crayfish populations in Japan can be classified into three groups (Lake Mayu in Hokkaido Shiga Prefecture, Akashina in Nagano Shiga Prefecture, Tankai in Shiga Prefecture), and newly discovered invasive populations originate from Lake Masyu. Even among invasive populations that originate from Lake Masyu, aggressiveness differed according to the year of invasion or crayfish abundance. From these results we conclude that newly invaded populations that originate from Lake Masyu should be prioritized for crayfish control or eradication.

研究分野：保全生物学

キーワード：ウチダザリガニ 形態多型 行動多型 行動シンドローム 遺伝子型多型 ミトコンドリアDNA マイクロサテライトDNA

## 1. 研究開始当初の背景

北米原産のシグナルザリガニ (*Pacifastacus leniusculus*; ウチダザリガニ、タンカイザリガニ) は、絶滅危惧種ニホンザリガニ

(*Cambaroides japonicus*) の駆逐や水草の摂食・破壊を介した湿地・湖沼生態系の安定平衡状態の変化を通じて、淡水生態系に甚大な生態系被害をもたらす。このことから、本種は、2006年2月に「外来生物法」の規制対象である「特定外来生物」に選定され、飼養や放流、生きたままでの運搬・移動が厳しく制限されている。

一般に、ザリガニ類にとって、攻撃行動は、捕食や共食いを回避するために重要な表現形質であるが、海外で行われた研究からは、同種他個体の生息密度が高い、または餌資源が不足していると、そのザリガニ集団は攻撃的になる(攻撃行動に強い選択圧がかかる)ことが示されている(Pintor et al. 2008, Hayes et al. 2009)。さらに、原産地における研究から、シグナルザリガニで攻撃性、活発さ、大胆さといった行動が互いに相関する「行動シンドローム」の存在が明らかとなっている(Pintor et al. 2008)。しかし、日本のシグナルザリガニ集団の行動特性は未解明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、日本のシグナルザリガニ侵入集団間で行動等の形質が異なることを仮説とし、以下を明らかにした。

1. シグナルザリガニ侵入集団の攻撃性、外部形態、遺伝子型の特性
2. シグナルザリガニの攻撃性を説明する要因(外部形態、遺伝子型、生息個体数)
3. 1,2に基づく危険度ランク

## 3. 研究の方法

### (1) 野外調査

これまでの申請者らの研究から、国内の多くのシグナルザリガニ集団で、生息個体数(単位努力量当たりの捕獲量; CPUE)と侵入年代が明らかになっている(Usioら2007)。行動実験に使用するシグナルザリガニのサンプリングを行うため、北海道の4水域(釧路川下流部、屈斜路湖、おけと湖、江丹別川)と長野県1水域(松川湖)の計5水域においてカゴ網を設置し、各水域からシグナルザリガニを10-16個体ずつ捕獲した。捕獲したシグナルザリガニは金沢大学の実験室に持ち帰った。野外調査は、特定外来生物の飼養許可(許可番号14000045)および採捕許可(ホク内水面第1号)に基づき実施した。

### (2) 行動解析

実験1 - シグナルザリガニ侵入集団ごとに、個体の攻撃性を定量化することを目的として、同じ集団の体サイズが似た2個体(頭胸甲長 $\pm$ 1mm)のシグナルザリガニを1ペアとした実験を行った。最初に、中央を板で仕切られた45L水槽に2個体のシグナルザリガニを別々に入れ、環境に慣れさせるため15分間静置した。シグナルザリガニの攻撃行動は、Pintor et al. (2008) 基に分類した。静置後、仕切りの板を外し、各ペアにつき、5秒ごと10分間攻撃行動の観察を行い、個体ごとに攻撃スコアを記録した。シグナルザリガニは、個体ごとに120回の平均スコアを求め、その個体の攻撃性の高さの指標とした。集団間の攻撃性の比較は、攻撃性の大小の差をより顕著に検出するために対戦した際のペアで攻撃性が高い方のデータのみを用いた。

実験2 - シグナルザリガニ侵入個体群ごとに、個体の大胆さを定量化することを目的として、捕食者存在下でどれだけ早くシグナルザリガニが採餌を行うかを観察した。捕食者としてはニジマス *Oncorhynchus mykiss* を用いた。ニジマスは、シグナルザリガニの原産地である北アメリカでは長年シグナルザリガニと同じ環境で共存しているため、シグナルザリガニに捕食者として認識されていると考えられる。実験区として、シグナルザリガニの入った水槽にニジマスを飼育していたタンクの水を100ml加えた処理区(捕食者区)と、塩素抜きした水道水100mlを加えた処理区(対照区)の2処理区を設けた。ニジマスの匂いのついた水または脱塩素水を添加した直後にシグナルザリガニの水槽にミミズを5匹入れ、シグナルザリガニがミミズを捕食しはじめるまでの時間を記録した。ニジマスの匂いのついた水を添加した処理区において、シグナルザリガニがミミズを捕食するまでの時間を大胆さの指標とした。実験後、水槽を清掃し、水を取り替えた。

実験3 - シグナルザリガニの活発さを定量化することを目的として、初めて見るエサに対してシグナルザリガニがどれだけ捕食行動を行うかを測定した。シグナルザリガニを個別に飼育している水槽に水を十分に吸収させたニンジン(金属でできた小さな筒でくり抜いたもの(直径5mm))を8個、重量を量った後入れ、12時間後に再びニンジンの重量を量り何g消費されたかを記録した。この実験では消費されたニンジンの量を活発さの指標とした。

### (3) 形態解析

ノギスを用いて、行動実験に用いたシグナルザリガニの左鉗脚(ハサミ)のサイズの計測を行った。鉗脚は最大長と最大幅を計測し、三角形に近似して鉗脚面積を求め、頭胸甲長

当たりの面積（鉗脚面積 / 頭胸甲長）を算出した。

#### (4) 遺伝解析

これまでに収集した、日本全国におけるシグナルザリガニ標本計 21 集団、約 600 個体から DNA を抽出し、mtDNA (440bp 16SrRNA 領域) および核 DNA (マイクロサテライト 10 遺伝子座) を PCR により増幅した。マイクロサテライト遺伝子座は次世代シーケンサーを用いて新たに 10 座を開発した。mtDNA については、アメリカ原産地の集団と比較することにより大まかな起源を推定すると同時に、ハプロタイプ数、塩基多様度などの遺伝的多様性を算出した。マイクロサテライト DNA については、ハーディーワインベルグ平衡、アリル多様度、ヘテロ接合度、近交係数など基礎統計量を把握し、集団間の分化の程度 ( $F_{ST}$ ) も定量化した。

#### (5) 相関分析

行動実験で用いたシグナルザリガニ 5 集団を対象として、攻撃性と、侵入年代、生息密度、外部形態、攻撃性、および遺伝的多様性との相関を調べた。

標本を用いた解析では、シグナルザリガニ 21 集団を対象に、侵入年代、生息密度、外部形態、攻撃性、および遺伝的多様性について相関分析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 行動特性

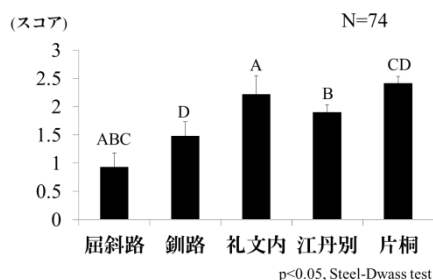


図 1. 各集団の攻撃性。縦軸は攻撃スコアの集団平均を表す。集団平均は対戦した際のペアで攻撃性が高い方の攻撃スコアのみを用いてだした。スコアが大きいほど攻撃性が高い。(スティールドワース検定:  $p < 0.05$ )

実験 1 より、5 つのシグナルザリガニ侵入集団間で攻撃性（攻撃スコアが高いほど攻撃性が高い）に統計的に有意な差が認められた（スティールドワース検定:  $p < 0.05$ ; 図 1）。また実験 2 より、大胆さ（餌を捕獲するまでの時間が短いほど大胆）は、ニジマスの匂いの存在の有無においては有意な差が認められなかった（二元配置分散分析:  $F = 0.02$ ,  $p = 0.89$ ）

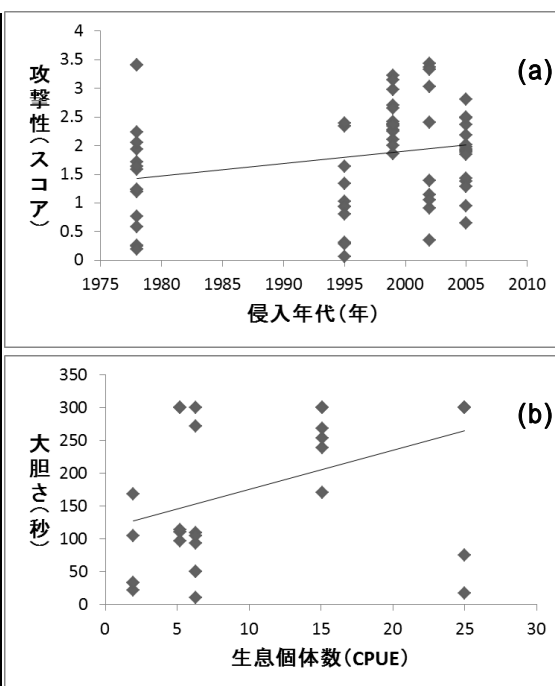


図 2. 侵入年代と攻撃性(a)、生息個体数と大胆さ(b)の相関。

が、シグナルザリガニ集団間では有意な差が認められた ( $F = 3.03$ ,  $p = 0.02$ )。実験 3 より、活発さ（捕食した量が多いほど活発）はシグナルザリガニ集団間で有意な差は認められなかった（クラスカル・ウォリス検定:  $p = 0.25$ ）。

攻撃性、大胆さ、活発さと侵入年代、生息個体数との相関を見ると、攻撃性と侵入年代（スピアマン順位相関分析:  $r_s = 0.25$ ,  $p = 0.04$ ）、大胆さと生息個体数（スピアマン順位相関分析:  $r_s = 0.42$ ,  $p = 0.01$ ）に有意な正の相関がみられた。つまり侵入年代が新しい集団の個体ほど攻撃性が高く、また、生息個体数の多い環境に生息する個体ほど大胆であった。そして行動シンドロームの存在の有無を明らかにするため、実験で扱った 5 集団全体でこれら 3 つの行動の相関を調べたところ、統計的に有意な相関は認められなかった。しかし集団ごとに複数の行動間の相関を調べた結果、屈斜路湖集団の攻撃性と活発さ（スピアマン順位相関分析:  $r_s = 0.94$ ,  $p = 0.03$ ）、片桐ダム湖集団の活発さと大胆さ（スピアマン順位相関分析:  $r_s = 0.92$ ,  $p = 0.005$ ）において有意な正の相関が認められた。すなわち、集団によって行動シンドロームの存在が認められた。

#### (2) 遺伝的特性

日本に定着したシグナルザリガニ 21 集団において mtDNA の多様性を調べたところ集団内で全く多型がないものから、ハプロタイプを 9 つ持つものまで多様性に大きな地域変異が認められた。ハプロタイプ多様度も 0 から 0.86 までの幅広い値を示した。SAMOVA による解析から、日本の侵入集団は、北海道

摩周湖、滋賀県淡海、長野県明科の3グループに分かれることが明らかとなった。

一方、16 集団群においてマイクロサテライト DNA を調べたところ多くの集団で多型的であった。平均ヘテロ接合度 ( $H_E$ ) は概ね 0.6-0.7 であり集団間で大きな変異はみられなかった。mtDNA が単型的にも関わらず、多くの対立遺伝子をもつ集団も存在した。ただし、2 つの集団ではヘテロ接合度が 0.31-0.46 と低い値をとった。これらの集団は mtDNA の多様性も低かった。

今回新たに開発したマイクロサテライト遺伝子座は対立遺伝子が多く、多様性が高かったものの、ほぼ全てでハーディーワインベルグ平衡からのずれが見つかった。全てヘテロ接合度の観察値が期待値よりも低くなっており、Null allele の存在が示唆された。ただし、近交係数  $F_{IS}$  は集団間でほぼ同じような値を持っていたため (0.2-0.3) 全ての集団、全ての遺伝子座でランダムに Null allele が出現しているようであった。また、mtDNA の多様性とマイクロサテライトの多様性は一部比較的高い相関を示しており (ハプロタイプ多様性とアリル多様性  $r = 0.4-0.5$ )、Null allele は存在するが、大まかな傾向を調べるためには本マイクロサテライトが有用であると判断した。

集団間の分化を測る指標  $F_{ST}$  値は多くの集団ペアで 0.05-0.10 と適度な分化を示した。一方、マイクロサテライトの多型が低かった 2 集団は 0.2-0.4 と非常に大きく分化していた。

### (3) シグナルザリガニの侵入生態と危険度ランク

以上の野外調査、行動解析、形態解析、遺伝解析を総合的に検討した。

摩周湖は、国内で最もシグナルザリガニの導入の歴史が古い水域の一つである。摩周湖では遺伝的多様性も高い値を示していた。この摩周湖由来の集団が過去数十年の間に急速に分布を拡大しているが、形態解析から侵入年代の新しい集団ほど鉗脚 (鉗脚面積 / 頭胸甲長) が大きい傾向が認められた ( $r_s=0.68$ ,  $P<0.05$ )。さらに行動実験でも侵入年代が新しい集団ほど攻撃性が高かった。また、全体としてみると侵入年代と生息密度の間に相関は認められなかったが、侵入年代が比較的新しい 1990 年以降の集団に絞って解析を行うと両者の間には強い正の相関が認められた ( $r=0.79$ ,  $P<0.05$ )。新しい侵入地では集団増殖率が高く、資源の奪い合いが起きるため攻撃性が高い個体が選択されたのかもしれない。

侵入年代と mtDNA のハプロタイプ数の間には負の相関が検出された ( $r=-0.58$ ,  $P<0.05$ )。新しい集団では創始者効果あるいはボトルネックにより多様性が減少しているものと考えられる。一方、鉗脚と遺伝的多様性の有意な相関関係は認められなかったが、これら

の結果は興味深い。つまり、侵入年代が新しくなるにつれ、遺伝的浮動で中立遺伝子の多様性が減少しているにもかかわらず、攻撃性といった適応形質には正の選択が働いているのかもしれない。

通常、外来種は少数の創始者から集団が形成されるため遺伝的多様性が低い。したがって、なぜ外来種は遺伝的多様性が低いにもかかわらず集団成長率が高く侵略性が高いのかは「外来種の遺伝的パラドックス」として注目を集めていた。Koskinen et al. (2002) は非常に小さく多様性が少ない集団でさえ、急速な適応進化が起こり得ることを示した。さらに、Kolbe et al. (2004) は系統の違う創始者集団が混ざることによって新たな高い多様性が生み出されることを示唆している。摩周湖は侵入の歴史が長く、ミトコンドリア DNA 解析からは、導入当初に原産地の複数の集団からシグナルザリガニが移植されている可能性が高いことが示唆されている。これが新たな多様性に貢献しているのかもしれない。この多様性を基盤として、新たな地域に侵入する過程において中立遺伝子座の多様性は減少させつつも、適応分化を引き起こすだけの十分な多様性を保持しているのかもしれない。

これまでのマイクロサテライト DNA 解析からは、国内で急速に分布を拡大しているのは北海道摩周湖由来の侵入集団であることが明らかになっている (Azuma et al. 2011)。また、今回の実験で北海道摩周湖由来の侵入集団でも、侵入地への導入年代や同種の生息個体数によってシグナルザリガニの攻撃性が異なることが示された。以上を踏まえ、今後、北海道摩周湖由来の侵入年代の新しい集団の低密度管理や駆除を優先的に進めて行くことが望ましいと考えられる。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Larson ER, Abbott CL, Usio N, Azuma N, Wood KA, Herborg L-M, Olden JD (2012) The signal crayfish is not a single crayfish: cryptic diversity and invasions in the Pacific Northwest range of *Pacifastacus*. *Freshwater Biology* 57: 1823-1838. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2012.02841.x (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

Usio N, Azuma N, Larson E, Abbott C, Olden J, Takamura N, Takamura K.: "Home and away: comparison of genetic and morphological variability between native and invasive signal crayfish." The Crustacean Society Summer Meeting / 10th Colloquium Crustacean Decapoda Mediterranean. (20120605). Athens, Greece

〔図書〕(計 2 件)

西川 潮 (2012) 淡水生態系 - 多様性, 変動性, 閾値に配慮したマネジメント. 『エコシステムマネジメントー包括的な生態系の保

全と管理へー』(森章 編著著). 共立出版,  
東京都 (分担執筆) pp.218-237. ISBN  
978-4-320-05776-0

西川 潮 (2012) 外来生態系エンジニアによる淡水生態系のレジームシフト. 『淡水生態学のフロンティア』シリーズ現代の生態学 9 卷(吉田丈人,鏡味麻衣子,加藤元海 編著). 共立出版, 東京都, pp.184-194. ISBN 978-4-320-05737-1

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

西川潮 (NISIKAWA Usio)  
金沢大学・環日本海域環境研究センター・  
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・地球環境科学研究科・准教授  
研究者番号: 50572799