

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：84202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340096

研究課題名(和文) 遺伝情報に基づいた侵略的外来種ソウシチョウの駆除管理ユニットの策定

研究課題名(英文) Development of the management unit for an invasive alien species, the Red-billed Leiothrix based on genetic information

研究代表者

天野 一葉(榎永一葉)(AMANO, Hitoha)

滋賀県立琵琶湖博物館・その他部局等・特別研究員

研究者番号：50526316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：特定外来生物ソウシチョウの効果的な管理計画策定のため、5つのマイクロサテライトDNA座について国内12地点計409個体の集団の遺伝的構造を調べた。ヘテロ接合度は全個体群で高く、対立遺伝子数は四国を除く西日本の集団で概ね多く、愛知、高知、筑波の個体群で少なかった。愛知や高知個体群は各々他の個体群と遺伝的な違いが大きかった。プログラムSTRUCTUREによる解析では国内のソウシチョウは9つのクラスターに分けられる可能性が示された。高知や愛知個体群では特定のクラスターに属する個体が多かった。暫定的結果だが、他の個体群と遺伝的交流がまだ少ない高知や愛知個体群は、駆除の優先順位が高いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To effectively manage an invasive alien species, the red-billed Leiothrix, in Japan, we investigated the genetic structure at 5 microsatellite loci in 12 populations (N= 409 individuals). All populations showed relatively high heterozygosity. The numbers of alleles were larger in western populations, except Shikoku, and smaller in Aichi, Kochi and Tsukuba populations. The Aichi and Kochi populations differentiated greater from other populations. The analysis using the program STRUCTURE implied that the birds were divided into nine clusters and each of Kochi and Aichi populations was mainly consisted of individuals belonging to a specific cluster. The present preliminary study suggests that Kochi and Aichi populations have higher priority for elimination because they showed less gene flows among other populations.

研究分野：生態学 保全生態学

キーワード：外来種 特定外来生物 外来鳥類 マイクロサテライト 遺伝的多様性 遺伝的分化 管理ユニット

### 1. 研究開始当初の背景

ソウシチョウは、1970～80年代から茨城県筑波山、兵庫県六甲山、福岡県英彦山、鹿児島県霧島など孤立した状態で野外に定着している集団が見られるようになった。ウグイスなど、類似した生態を持つ在来種への影響が懸念され、特定外来生物に指定されている。

原産地は中国南部からヒマラヤにかけてだが、これまでの形態および mtDNA の分析から中国各地から国内へ持ち込まれたと考えられている。

中国ではそれぞれの地域個体群が様々な生息環境、異なる生態系で適応進化を遂げてきたことにより様々な遺伝的背景を持つことだろう。したがって、日本国内には様々な地域由来の遺伝的組成の異なる個体が放たれたことになる。それらが交配することで、元の集団には見られない遺伝的変異の新しい組み合わせが生じているに違いない。そのことは日本の環境により適した新しい遺伝子の組み合わせをもたらすおそれがある。

### 2. 研究の目的

本研究では、ソウシチョウ用のマイクロサテライト DNA の PCR プライマーを開発して、国内におけるソウシチョウの空間的な遺伝構造の現状を把握し、現在遺伝的多様性が最大で他の集団の増加を助長する恐れのある地域個体群、あるいは今後増加するおそれのある地域個体群を特定する。また、どのような場所で集中的な取り除きを行えばよいのか検討するための資料とする。

### 3. 研究の方法

(1) 茨城県以南の国内 12 地点 (図 1) において、カスミ網を用いてソウシチョウを捕獲し、血液または組織をサンプリングした。血液は注射針 (27 ゲージ) 及びヘパリン処理毛細管を用いて、翼下静脈からおよそ 100 マイクロリットルを採取し、組織 (筋肉または肝臓) はおよそ 100 マイクログラムを採取して、ライシスバッファーに入れた後、室温保存した。捕獲およびサンプルの採取は、それぞれの地方自治体からの許可を得て行った (環国地野許第 120719001-1、環国地野許第 1408051、10-0085、環国地野許第 1408011、環国地野許第 1508101、第 1508244、10-0094、環中地野許第 150971、環国地野許第 1608184-1)、キアゲン DNeasy Blood & Tissue Kit を用いてサンプルから DNA を抽出した。

(2) 次世代シーケンサー Illumina HiSeq を用いて重複のある 2,227 百万塩基対分のソウシチョウのゲノム DNA のドラフトデータを得て、その中から CA、GA、または GAA が 10 回以上繰り返しているマイクロサテライト DNA 領域を含むものを抽出することで、延べ 841 座分の情報を得た。オートシーケンサー (ABI PRISM 3130) を用いた分析を行うため、その情報を元に 20 座について PCR 増幅

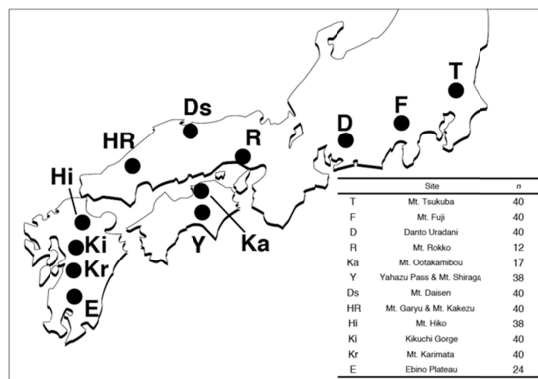


図 1 調査地点とサンプル数

するための蛍光および非蛍光 PCR プライマー対を作成した。

(3) 予備実験として、1つの地域に由来する 32 個体分の DNA サンプルを対象に PCR 酵素 (KOD FX Neo、東洋紡) を用いた増幅を行い、対立遺伝子 (アリル) のサイズや増幅パターンを確認することにより、作成した 20 セットのプライマー対について、PCR を行う際の適切な温度条件と反復数を検討して、PCR の条件を確定した。また、得られた PCR 産物の泳動パターンを検討したところ、検出されるアリルのサイズが大きすぎるもの (2 座)、染色体上の他の領域も同時に増幅するプライマー対 (2 座)、増幅することのできないアリル (ヌルアリル) を多数保持するもの (4 座) や多型性の無いもの (1 座) があつたため、これら 9 つの座については分析から除外することにした。

(4) 残りの 11 座 (表 1) について、1 地点あたり最大 40 個体を対象に PCR 増幅を行い、オートシーケンサーを用いて遺伝子型を分析した (合計 409 個体)。その後、得られた遺伝子型のデータを元に、各種ソフトウェアを用いて、それぞれの地域個体群における遺伝的多様性の程度、個体群間の遺伝的分化の程度、国内における空間的な遺伝構造に関する解析を行った。

表 1 調べた座の特徴と PCR の条件

Loci	Repeat motif	Forward primer の蛍光色素	Annealing temp (°C)	サイクル数	Product size (bp)
P001	GA	FAM	60	27	294-353
P003	CA	VIC	64	25	295-331
P004	CA	PET	58	32	301-351
P005	CA	VIC	64	25	254-317
P008	GA	NED	60	27	292-420
P011	CA	PET	64	30	244-295
P015	GA	FAM	58	32	307-353
P017	GAA	FAM	58	29	189-285
P018	CA	FAM	60	27	166-200
P019	CA	NED	62	30	100-156
P020	GAA	PET	58	29	244-686

### 4. 研究成果

国内 12 地点で得られた 409 個体のサンプル (以下、12 個体群) を対象に遺伝子型のデータを解析したところ、調べた 11 座

のうち6座には塩基の挿入・欠失が原因と思われる他のアリルと1塩基対違いのアリルが多数存在することがわかった。増幅サイズが大きいことで今回用いたシーケンサーでは、1塩基対違いのアリルを正確に分離することができなかったため、これら6つの座において得られたデータは以降の解析には用いなかった。

残りの5つの座で得られた遺伝子型のデータを解析した。個体群毎に座の間の連鎖不平衡の検定を行ったところ、幾つかの個体群では有意に連鎖不平衡を示す2つの座の組み合わせが見られたが、その組み合わせが個体群間で共通して見られないことから、調べた5つの座は同じ染色体上の近接した位置にはないと思われた。

また、これらの座において、観察されたヘテロ接合度は全ての個体群において高かった(平均値 0.788-0.917; 表2)。さらに遺伝子型の観察値と任意交配を仮定した場合の期待値の違いについてプログラム Genepop ver. 4.6 を用いて検定したところ、幾つかの個体群においてヘテロ接合度が期待値よりも有意に低い座が見られたが、個体群の間で共通してはいなかった(表2)。

表2 各個体群におけるヘテロ接合度の期待値/観察値

Locus	N =	Location				
		Tsukuba T	Mt. Fuji F	Aichi D	Hyogo R	Kagawa Ka
P003G	40	0.878/0.950	0.871/0.850	0.819/0.75	0.909/0.750	0.875/0.824
P004R	40	0.860/0.850	<b>0.913/0.675*</b>	0.871/0.925	0.815/0.917	0.897/0.765
P008Y	40	0.940/0.900	0.950/0.950	0.917/0.875	0.953/1.000	0.906/0.765
P019Y	40	0.912/0.950	0.896/0.875	0.896/0.950	0.917/1.000	0.834/0.823
P017B	40	0.911/0.875	0.931/0.80	0.912/0.900	0.917/0.917	0.938/0.765

Locus	N =	Location						
		Hiroshima HR	Mt. Hiko Hi	Mt. Karimata Kr	Kikuchi Ki	Ebino E		
Kochi Y	38	0.880/0.895	0.900/0.950	0.853/0.825	0.891/0.868	0.876/0.900	0.906/0.875	<b>0.896/0.792*</b>
Daisen Ds	40	0.865/0.842	<b>0.922/0.850*</b>	0.886/0.825	0.860/0.816	0.905/0.775	<b>0.918/0.795*</b>	0.880/0.917
Hiroshima HR	40	0.925/0.947	0.937/0.875	0.943/0.950	0.925/0.895	0.946/0.850	0.947/0.925	0.936/0.917
Mt. Hiko Hi	38	0.877/1.000	<b>0.915/0.875*</b>	0.899/0.850	0.857/0.789	0.934/0.950	0.906/0.850	0.880/0.917
Mt. Karimata Kr	40	<b>0.923/0.789</b>	0.919/0.775	<b>0.924/0.850*</b>	0.917/0.868	0.929/0.850	0.928/0.850	<b>0.934/0.792*</b>

\* Hardy-Weinberg平衡下の期待値と比べて観察値のHeterozygoteが有意に低い。P < 0.05/5 = 0.01 (多重比較のため) ; Genepopによるheterozygote deficitの検定。

各個体群において、調べた座に関しては任意交配の状態にあると思われるが、ヘテロ接合度の低い観察値を示す座には低頻度でヌルアリルが存在しているおそれがある。

サンプル数の違いを考慮した対立遺伝子の数 (Allelic richness) は、四国を除く西日本の集団の方が概ね高い値を示した(表3)。高知個体群(Y)が最も低い値(10.1)を示し、次に愛知個体群(D)が低い値(10.4)を示した。えびの(E)を除いて、古い個体群(筑波山 T、六甲山 R、英彦山 Hi)は比較的低い遺伝的多様性を示した。これらの中間地点において遺伝的多様性が高くなっている個体群(富士山 F、菊池 Ki、雁俣 Kr)があった。2000年代以降に新しく定着した個体群において、ある特定の遺伝的要素が優占するために多様性が低くなっている個体群(愛知 D、高知 Y)と多様性が比較的高い個体群(広島 HR、大山 Ds)があった。

個体群間の遺伝的分化の程度を調べるため、2つの個体群の全ての組み合わせにおけ

る  $F_{ST}$  値をプログラム FSTAT ver. 2.9.3 によ

表3 マイクロサテライトDNAの座・個体群あたりのAllelic richness. Fstatを用いて計算した。

Locus	Population					
	Tsukuba T	Mt. Fuji F	Aichi D	Hyogo R	Kagawa Ka	Kochi Y
P003	9.0	9.7	7.2	9.0	11.7	9.2
P004	9.7	11.2	9.7	8.0	9.7	8.3
P008	13.7	14.6	12.6	15.0	10.6	12.3
P019	10.7	10.7	10.6	9.0	9.1	9.0
P017	10.8	12.7	12.0	12.0	13.5	11.9
Mean	10.8	11.8	10.4	10.6	10.9	10.1

Locus	Population						
	Daisen Ds	Hiroshima HR	Mt. Hiko Hi	Mt. Karimata Kr	Kikuchi Ki	Ebino E	All
10.3	9.5	9.7	9.5	10.9	10.3	10.6	
11.5	9.9	11.5	11.0	11.5	10.4	11.9	
13.1	13.6	12.0	13.7	14.0	13.5	15.7	
10.9	10.7	8.6	12.4	10.5	10.5	11.4	
11.8	11.9	12.3	12.6	13.2	13.1	14.3	
11.5	11.1	10.8	11.8	12.0	11.6	12.8	

り求め(表4) MEGA ver. 7.0.25 で近隣結合合法による系統樹を作成した(図2)。

表4 プログラムFstatで求めた $F_{ST}$ の値 (Weir & Cockerham (1984)) とその有意性の検定

Population	Population						平均
	Mt. Fuji F	Aichi D	Hyogo R	Kagawa Ka	Kochi Y	Daisen Ds	
Tsukuba T	0.0181	0.033	0.0257	0.0391	0.039	0.0181	
Mt. Fuji F		0.0217	0.0246	0.0219	0.0355	0.0057	
Aichi D			0.0491	0.0377	0.0474	0.0301	
Hyogo R				0.0394	0.0408	0.0191	
Kagawa Ka					0.0433	0.0187	
Kochi Y						0.0212	
Daisen Ds							
Hiroshima HR							
Mt. Hiko Hi							
Mt. Karimata Kr							
Kikuchi Ki							
Ebino E							

	Hiroshima HR	Mt. Hiko Hi	Mt. Karimata Kr	Kikuchi Ki	Ebino E	平均
Tsukuba T	0.0221	0.0232	0.0232	0.0219	0.0264	0.0263
Mt. Fuji F	0.0078	0.0203	0.0133	0.009	0.0176	0.0178
Aichi D	0.0236	0.0354	0.0251	0.0273	0.0377	0.0335
Hyogo R	0.023	0.0169	0.037	0.0231	<b>0.0196*</b>	0.0289
Kagawa Ka	0.0209	0.0307	0.0271	0.0305	0.023	0.0302
Kochi Y	0.0342	0.0314	0.0247	0.0223	0.0242	0.0331
Daisen Ds	0.0065	0.0145	0.0086	0.0059	0.0113	0.0145
Hiroshima HR		0.0234	0.0126	0.0155	0.0241	0.0194
Mt. Hiko Hi			0.0278	<b>0.0103*</b>	0.0119	0.0223
Mt. Karimata Kr				0.0113	0.0216	0.0211
Kikuchi Ki					0.0103	0.0177
Ebino E						0.0208

\*p < 0.000758 (= 0.05/66 ; 多重比較)

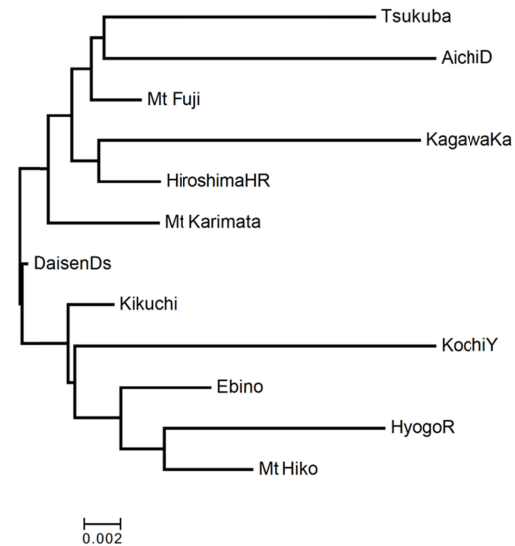


図2 近隣結合合法による集団間の無根系統樹

他の個体群との  $F_{ST}$  値の平均は愛知個体群で最も高く(0.0335)、次いで高知個体群で高かった(0.0331)。富士山(F)・大山(Ds)・

広島(HR)・菊池(Ki)・雁俣(Kr) 個体群は、それぞれの個体群間の  $F_{ST}$  の値が低く、遺伝的組成が似ていた。さらに「距離による隔離」の有無を明らかにするため、個体群間の地理的距離と  $F_{ST}$  値の間の相関関係をプログラム GenAlEx ver. 6.501 の Mantel 検定により調べたところ、有意な関係性は見られなかった ( $r = 0.019$ ,  $p = 0.448$ ; 図3)

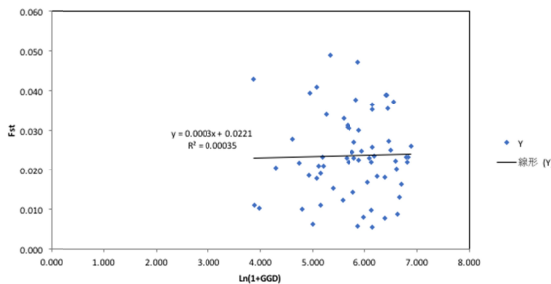


図3  $F_{ST}$  と地理的距離の関係。「距離による隔離」は見られなかった。

各個体群における遺伝子型の組成を分布することにより空間的遺伝構造を明らかにするプログラム STRUCTURE ver. 2.3.4 を用いて解析を行った。その結果、国内のソウシチョウは9つのクラスターに分けられたことから、中国国内の9つの個体群に由来している可能性が示唆された(図4)

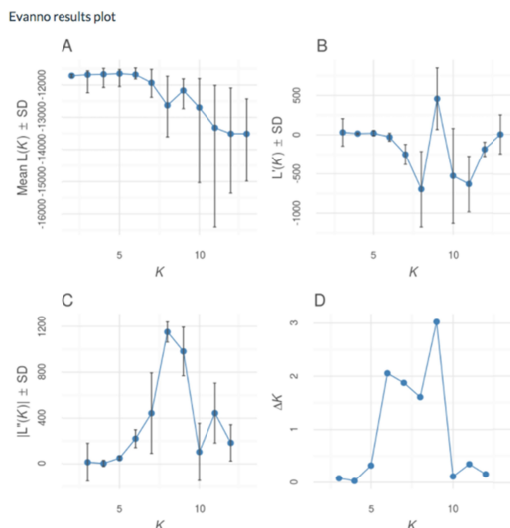


図4 STRUCTURE により  $K=2$  から13までの分析をそれぞれ10試行ずつ行った結果のまとめ。図Dから  $K = 9$  を選択した。

また、ほとんどの個体群は多数のクラスター成分が混じった状態であることが示されたが、高知個体群(Y)や愛知個体群(D)では多くの個体が特定のクラスターに由来する遺伝的成分を多く持つことが示された(図5)

さらに、大山(Ds)・広島(HR)・香川(Ka)の間、英彦山(Hi)・菊池(Ki)・六甲山(R)

の間、そして雁俣(Kr)・えびの(E)の間では、それぞれクラスター成分の構成が類似しているように見えた。

今回の結果はマイクロサテライトDNA 5座を用いた分析の結果であるが、さらに調べる座の数を増やすことができれば、より明瞭なクラスター分けが可能になるだろう。

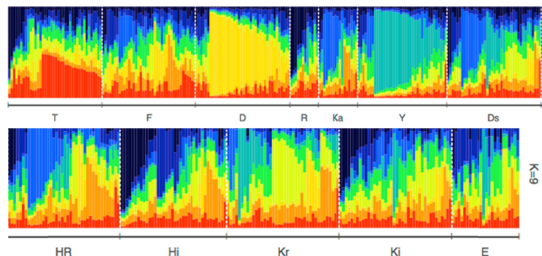


図5 STRUCTURE  $K=9$  での10試行の解析結果をプログラム CLUMPP を使って一つにまとめて描いた barplot 図。

外来種の管理計画の策定にはソウシチョウの生息範囲や密度等とあわせて考える必要があるが、今回の解析結果からは、高知や愛知個体群は他の個体群と遺伝的交流がまだ少ないと考えられ、このような個体群において、優先的に駆除を行う必要があると思われる。

より詳細な駆除の単位を設定するため、今後さらに調べる遺伝子座の数を増やすとともに、サンプル数の少なかった地域(六甲山、香川、えびの)や新規に定着しつつある東北地方等においてサンプルを増やす必要がある。

## 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 1 件)

天野 一葉、ヒガシヒゲガビチョウ *Garrulax cinereiceps* の四国への侵入と分布拡大、山階鳥類学雑誌、査読有、印刷中、  
[http://www.yamashina.or.jp/hp/kankobutu/kenkyu\\_hokoku/yamashina\\_mokujii.html](http://www.yamashina.or.jp/hp/kankobutu/kenkyu_hokoku/yamashina_mokujii.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

天野 一葉 (AMANO, Hitoha)  
滋賀県立琵琶湖博物館・特別研究員  
研究者番号：50526316

### (2)研究分担者

石橋 靖幸 (ISHIBASHI, Yasuyuki)  
国立研究開発法人森林総合研究所・北海道支所・チーム長(野生動物管理担当)  
研究者番号：80353580