

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06938

研究課題名(和文) 関東甲信地域ニホンジカ個体群の分布拡大に伴う地理的遺伝構造の解明

研究課題名(英文) Dissecting the geographic genetic structure of sika deer (*Cervus nippon*) accompanying the expansion of their habitat in the Kanto Koshin area.

研究代表者

田中 和明 (TANAKA, Kazuaki)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50345873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：関東甲信地域のニホンジカ632個体(群馬県462, 長野県64, 山梨県106)の遺伝情報を解析した。母系遺伝するミトコンドリアDNAの解析から21種のハプロタイプを検出した。集団内のハプロタイプ構成は、利根川を挟んで東側と西側で大きく異なっていた。新興生息地である浅間山では26個体から8種類のハプロタイプが見つかり多様性が最も高かった。8個の常染色体性マイクロサテライトマーカーを用いた集団解析でも、mtDNAの解析と同様に2つの集団大別できた。しかし、2地域間の移入個体の可能性を示す個体が少数認められた。以上の結果から、赤城山・尾瀬地域と関東山地間で個体の交流が低レベルにおきている事が示された。

研究成果の概要(英文)：Population genetic analysis were done on the 632 specimens of Sika deer collected in the Kanto-Koshin area (462 in Gunma, 64 in Nagano, and 106 in Yamanashi prefectures). Twenty-one haplotypes were detected on the mitochondrial DNA (mtDNA) as a maternally inherited genetic marker. The mtDNA haplotype composition within the populations was greatly different between the east side and the west side across the Tone River. In Mount Asama, the emerging habitat of Sika deer, 8 different haplotypes were found in 26 individuals and genetic diversity was very high. The population analysis using 8 autosomal microsatellite markers also showed that the deer in this area could be roughly classified into two groups similarly to the result of mtDNA analysis. However, a small number of individuals showed the sign of migration between the two groups. Based on the above results, it was shown that the migration of individuals between the Akagi-Oze area and the Kanto mountainous area is at low level.

研究分野：集団遺伝学を利用した生物資源保全学

キーワード：ニホンジカ ミトコンドリアDNA マイクロサテライト Y染色体 地域集団 遺伝的多様性 関東甲信地域 遺伝的集団構造

1. 研究開始当初の背景

近年、ニホンジカは全国的に個体数が増加し、生息地も拡大している。これに伴い、農林業に甚大な被害をもたらしている。また、植生の破壊など生態系に大きな影響が及んでいる地域もある。このため駆除による個体数の抑制管理が必要となっている。

本研究の対象とした関東甲信地域は、ニホンジカの増加が著しい地域の一つである。例えば、1975年の調査では、長野県と群馬県の境に位置する浅間山には、ニホンジカがほとんど生息していなかった。しかし、近年、個体数が急激に増加し、希少な高山植物への深刻な食害が生じている。このような新興生息地でのニホンジカの増加は、周辺地域からの個体流入に由来すると予想される。また、生息地の拡大が続けば、分断されていた集団の接続および融合が進むと予想される。

ニホンジカの駆除は、地方自治体の計画に基づき比較的狭い地域ブロックごとに実施されることが多い。しかし、周辺地域から個体流入がある場合には、狭い地域に限定した駆除では個体数抑制に十分な効果が得られないと考えられる。個体数を効率的に抑制するためには、地域間での個体流動と寄与割合を明らかにし、侵入経路をコントロールすることが有効だと考えられる。また、我が国では20世紀初頭に、過度の狩猟圧によってニホンジカが激減し、地域的な絶滅すら経験している。このような教訓を踏まえると、ニホンジカの持続可能な管理を行うためには、個体数の抑制と個体群の遺伝的多様性の維持の両立を図る必要がある。

研究代表者は、野生動物と家畜の遺伝的多様性の保全に関わる研究を継続していた。その中で、群馬県ではニホンジカ適正管理計画に基づき捕獲駆除した個体から継続して組織試料を採取し保管している事に注目した。また、研究分担者である南正人は、継続して周辺地域で、ニホンジカの野外生態調査を行っていた。このため研究代表者の遺伝子解析および集団遺伝学に基づく専門性と、分担者のニホンジカに対する野外調査の能力を組み合わせることで、互いの専門性の不足を補完し、効率的な研究を行える体制にあると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、中部地域と関東地域との境界をなす南アルプス、関東山地、八ヶ岳中信高原、信越高原および赤城山地域にかけて分布するニホンジカ個体群に対する集団遺伝学的解析を行い、群内の遺伝的多様性および群間の遺伝的分化を解明することを目的とした。また、ニホンジカの地域集団の遺伝的特徴を明らかにすることで、DNA型判定から、捕獲駆除された個体の由来を追尾できるようにする事で、関東甲信地域北部のニホンジカの生息地域拡大に寄与している個体群を特定し、効率的な個体数管理を可能とする基礎情報を提供することを目的とした。さらに、本

邦産ニホンジカの集団構成解析に用いる遺伝子マーカーの最適化を行うことで、今後の研究における結果の互換性を高めることを追求した。

3. 研究の方法

(1)ニホンジカの組織試料収集とDNA抽出

群馬県のニホンジカは、県立自然史博物館との共同研究契約に基づき、県のニホンジカ適正管理計画によって駆除された個体の組織の提供を受けた。長野県ではNPO法人生物多様性研究所あーすわーむの協力により試料を収集した。山梨県では、一般の狩猟者の協力を得て、早川町や山中湖村で捕獲された個体の組織を収集した。組織からのDNA抽出は、QuickGene-Mini80核酸抽出装置(富士フィルム)を用いて行った。

(2)ミトコンドリアDNAのコントロール領域の配列決定と進化集団遺伝学的解析

プライマー(LD5: AAGCCATAGCCCCACTATCAA)と(HD2: CCTGAAAAAAGAACCAGATG)を用いたPCRにより、mtDNAのコントロール領域のレフトドメイン約600bpを増幅した。PCR産物を、High Pure PCR Product Purification Kit(ロッシュ)を用いて精製した。精製したPCR産物を、BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 Ready reaction kit (Thermo Fisher Scientific)を用いてシーケンス反応を行った。シーケンス反応後の産物をABI3130型 genetic analyzer で分析する事で配列を決定した。決定した配列をデータベースに登録されている配列と比較し、ハプロタイプに整理したうえで、コンピュータプログラムを用いて、分子系統樹の作成および集団遺伝学的分析を行った。

(3)マイクロサテライトマーカーの選択と集団遺伝学的解析

マイクロサテライトマーカーは、文献比較から、ニホンジカまたは近縁種であるアカシカ (*Cervus elaphus*) やオジロジカ (*Odocoileus virginianus*) に対して使用実績のあるものを選択した。マーカーのスクリーニングとして、未標識のプライマーを用いて、ニホンジカのDNAを鋳型にPCRを行い、約100bpから300bpまでの大きさのPCR産物が得られることを試験した。所定のPCR産物が得られたマーカーの中で、*BL42*、*BM203*、*BM4107*、*BMC1009*、*BOVIRBP*、*Cervid14*、*CSSM019*、*CSSM041*、*CSSM066*、*INRA128*、*OarFCB193*、*RM118* および *T172* について蛍光標識オリゴDNAを準備し、ABI3130型 genetic analyzer を用いたフラグメント解析を行うことで集団解析への適否を検討した。最終的に、*BL42*、*BM203*、*BM4107*、*CSSM019*、*CSSM041*、*CSSM066*、*BMC1009*、*T172* の8遺伝子座を有効性の高いマーカーとして選出し集団解析を行った。

集団解析では、遺伝子座あたりの対立遺伝子の平均数 (N_a)、ヘテロ接合度の期待値 (H_e)・観測値 (H_o) および対立遺伝子の豊富さ (AR)、個体群内の近交係数 (F_{is}) を求めた。分析には、Arlequin ver3.5.2.2 およ

び FSTAT ver2.9.3 を用いた。対立遺伝子頻度を利用した系統樹作成には Poptree 2 を用いた。複数の祖先集団の存在を仮定した時に、各個体のゲノムが、どの程度の割合で異なる祖先集団に由来するかの推定にはコンピュータソフトウェア STRUCTURE ver2.3.4 を用いた。

(4) Y 染色体性遺伝子マーカーの開発

Y 染色体上の遺伝子マーカーでは、ウシ由来の Y 染色体マイクロサテライトマーカー *INRA008*, *INRA057*, *INRA062*, *INRA124*, *INRA126* に対して、雄ウシのゲノム DNA を陽性コントロールに用い、ニホンジカの DNA を鋳型とした PCR 条件を検討した。

またニホンジカにおいて、Y 染色体上に存在する *SRK*, *AMLEY*, *DBY*, *ZFY* 遺伝子の部分配列を決定し多型マーカーの開発を試みた。*AMLEY* 遺伝子上に発見した一塩基多型 C/T (ATGGGTAAAGCTAAA-C/T-AGATGCTGACTTGTA) の遺伝型判定は、AGCTTCTCTGATACAAGGCCGA と TCCAGGTCCCATTTCTTGAT のプライマーを用いて、1 番目のイントロンの一部 346bp の断片を増幅した。PCR 産物を制限酵素 *AlmNI* (CAGNN↓CTG) で消化し電気泳動をすると、C 型対立遺伝子は 305bp と 41bp の 2 つの DNA 断片に切断されるが、T 型は切断されないため制限酵素切断断片長として遺伝子型を判定した。

(5) ニホンジカの野外生態調査

2016 年 10 月から 2017 年 11 月まで、ニホンジカの新興生息地である長野県小諸市の浅間山荘周辺に、20 台のセンサーカメラを設置し野生動物を撮影した。撮影データは 2017 年 12 月 5 日に研究分担者によって回収した。回収した撮影データを確認し、ニホンジカの撮影回数および個体の識別を行った。ニホンジカの長期的な生息が確認されている群馬県甘楽郡下仁田町にある神津牧場周辺と、新興生息地である長野県浅間山山麓でニホンジカの採食による植生への影響を調査し比較を行った。

4. 研究成果

(1) ニホンジカの組織試料収集

右の図 1 に示した 9 地域において合計 632 個体のニホンジカ試料を収集した。試料の内訳は、①群馬県尾瀬地域 306 個体、②赤城山地域 133 個体③桐生市 10 個体、④群馬県西南部 13 個体、⑤長野県軽井沢 29 個体、⑥浅間山地域 26 個体、⑦長和町 9 個体、⑧山梨県山中湖町 57 個体、⑨早川町 49 個体であった。これらニホンジカの試料に加えて、群馬県ではニホンジカと捕獲地の重複が認められるニホンカモシカの試料に



ついて、ニホンジカとの対比および錯誤捕獲等による試料の混入の可能性を排除するために少数の個体について解析を行った。ニホンカモシカの試料に関しては、群馬県立自然史博物館との共同研究契約に基づき、文化財保護法等の法令を遵守して取り扱った。

(2) ミトコンドリア DNA のコントロール領域の配列決定と進化集団遺伝的解析

ニホンジカ 634 個体の mtDNA コントロール領域の配列決定を行った。このうち尾瀬地域の 16 個体 (5.23%), 山中湖村 4 個体 (7.02%) 早川町 4 個体 (8.16%) では、AAATTAATGTATTAGGACATACTATGTATAATAGTACAT の 39 塩基を基本構造に持つ配列の反復回数において顕著なヘテロプラスミーの状態であったため正確な配列が決定できなかった。これら 24 個体を除く 608 個体の配列は表 1 に示す 21 種類のハプロタイプに分類できた。集団ごとのハプロタイプの出現頻度を表 1 に示した。

表 1 関東甲信地域のニホンジカにおける mtDNA ハプロタイプの分布

ハプロタイプ	群馬県			長野県			山梨県		
	尾瀬	赤城山	桐生市	西南部	軽井沢	浅間山	長和町	山中湖村	早川町
G1/Y1	270	126	10	1	0	0	0	22	0
G2/Y8	2	3	0	0	0	0	0	2	0
G3	13	1	0	0	0	0	0	0	0
G4/N1	3	2	0	10	25	12	4	0	0
G5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
G6/N5	0	0	0	2	1	3	0	0	0
G7	1	0	0	0	0	0	0	0	0
N2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N3	0	0	0	0	1	2	0	0	0
N4	0	0	0	0	1	1	0	0	0
N6	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N7	0	0	0	0	0	2	0	0	0
N8/Y2	0	0	0	0	1	4	4	3	25
N11/Y13	0	0	0	0	0	0	1	0	2
Y3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Y4	0	0	0	0	0	0	0	18	0
Y5	0	0	0	0	0	0	0	4	1
Y6	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Y9	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Y11	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Y12	0	0	0	0	0	0	0	0	12
個体数	290	133	10	13	29	26	9	53	45
ハプロタイプ数	6	3	1	3	5	8	3	6	5

ハプロタイプの出現頻度に基づいて集団間の *Fst* 値を求めて集団間の遺伝的距離の指標に用いた。*Fst* 値を使って近接接合法 (NJ 法) で作図した集団間の分岐関係を図 2 に示した。この結果から尾瀬・赤城山 (桐生市の 10 個体を含む) が、他の地域と大きく異なっていることが示された。

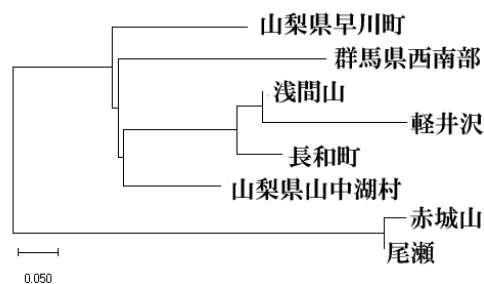


図 2. mtDNA のハプロタイプ頻度に基づく集団間の近縁関係

さらに、個々のハプロタイプに注目すると利根川東岸の尾瀬、赤城山、桐生市では G1/Y1 ハプロタイプの頻度が圧倒的に高く、それぞれの地域で 93.1%, 94.7%, 100%と優占していた。これに対して、同県西南部では、G1/Y1 型は、7.69%しか認められず、長野県軽井沢と浅間山で最頻ハプロタイプである G4/N1 型が 76.9%の高い頻度で分布していた。このため利根川の東岸（関東平野東側の山地）と、西岸（関東平野の西側に広がる山地）とで、ニホンジカの母系集団が大きく異なることが明らかとなった。

次に、集団内ハプロタイプ多様度を求めると、利根川西岸の 3 地域は 0.00 から 0.127 までの低い値を示した。これに対して、西岸側の地域は、最も低い軽井沢でも 0.261 であり最も高い値を示した浅間山では 26 個体から 8 種類のハプロタイプが見つかり多様度は 0.763 を示した。この結果から赤城尾瀬地域のニホンジカは関東山地に生息する集団と分断されており、遺伝子浮動の影響をうけて mtDNA の多様性が減少したことを示唆した。

(3) マイクロサテライトマーカーの選択と集団遺伝学的解析

BL42, BM203, BM4107, CSSM019, CSSM041, CSSM066, BMC1009, TI72 の 8 遺伝子座の遺伝子型が得られた 117 個体を、尾瀬（一之瀬、戸倉、丸沼）、赤城山（赤城山、富士見、前橋、桐生市）、利根（昭和村、利根町）、群馬県西南部、および浅間山の地域集団にわけて分析した。平均ヘテロ結合度の期待値 (H_e) は 0.53 から 0.77 であった。遺伝子座多対の対立遺伝子数の豊富さを表すアリルリッチネス (AR) は、2.09 から 2.73 であった。mtDNA の解析では、尾瀬-赤城地域の多様性が、利根川西岸に比べて明らかに低かった。しかし、常染色体性であるマイクロサテライトマーカーでは、多様性に大きな地域差は認められなかった。集団間の遺伝的分化を測定するために AMOVA 解析を行った結果、利根川の東岸地域と西岸地域間に相違によって、遺伝分散全体の 6.9%を説明できることが示された ($P < 0.001$)。また、対立遺伝子頻度に基づいて計算した遺伝的距離を使って構築した NJ 系統樹においても関東甲信地域のニホンジカが、大きく 2 集団に大別されることが示された。この結果から、mtDNA の解析で示された集団は、常染色体性遺伝子マーカーにも当てはまることが示された。

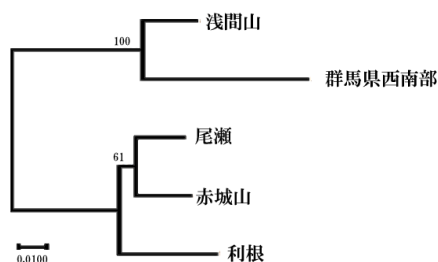


図 3. マイクロサテライトマーカーの対立遺伝子頻度に基づいた NJ 法による系統樹

コンピュータプログラム STRUCTURE を用いた解析で、分集団数が $K = 2$ で最も高い ΔK が得られた。このため関東甲信地域のニホンジカには、2 つの祖先集団が存在したことが示唆された。

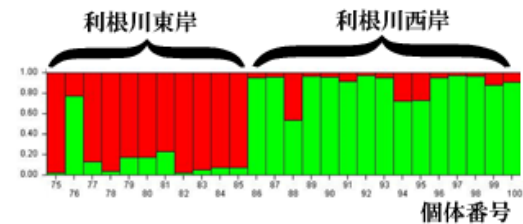


図 4. STRUCTURE を用いて推定した個体別の始祖集団由来のゲノム寄与割合

図 4 は、STRUCTURE を用いた結果の一部を抜粋したものである。推定される 2 つの祖先集団は、現在のニホンジカの集団に対応しており、大多数の個体は捕獲地域の遺伝的構成と一致していた。しかし図 4 の左から 2 番目の個体のように、捕獲された地域と真逆の特徴を持つ個体が少数存在していた。このような個体の存在により、集団間での個体の交流が存在することが示唆された。

(4) Y 染色体性遺伝子マーカーの開発

ウシ由来の Y 染色体マイクロサテライトマーカー INRA008, INRA057, INRA062, INRA124, INRA126 を対象に、ニホンジカの DNA を鋳型として、アニリング温度を 50°C から 65°C の範囲で条件を変更し、DNA ポリメラーゼには、プルーフリーディング活性を持つ KOD-FX（東洋紡）と TaKaRa Ex Taq（タカラバイオ）をそれぞれ用いた。しかし、試験した 5 つのプライマーにおいて、ニホンジカの雄に特異的な増幅産物を得ることができなかった。このためウシ Y 染色体由来マイクロサテライトマーカーからニホンジカに適応できるマーカーを得ることは困難と結論付けた。

Y 染色体性遺伝子の解析では AMLEY 遺伝子の第一イントロン内に存在する 1 つの SNP が検出できた。SNP : C>T を挟む前後 15 塩基の配列を以下に示した (ATGGGTAAAGCTAAA-C/T-AGATGCTGACTTGTA)。関東甲信地域では、C 型がメジャーアレルであった。T 型アレルは、長野県浅間山 (10 個体の中で 1 個体)、軽井沢 (15 個体中 1 個体) からのみ見つかり、他の集団 (山中湖 36 個体、早川町 15 個体、群馬県尾瀬 40 個体) からは検出されなかった。ニホンジカにおいて Y 染色体の遺伝子に多型を検出した報告は過去になく、新規の発見と考えられる。しかし、多型頻度が低いため集団の特徴を表す遺伝子マーカーとして利用できる見込みは低いと考えられた。このため研究計画で示したニホンジカの父系遺伝マーカーの開発には至らなかった。

(5) ニホンジカの野外生態調査

2016 年 10 月から長野県浅間山浅間山荘周辺に 20 台のセンサーカメラを設置し、2017 年

11月までの約1年間継続して撮影した。期間中のセンサーカメラの作動回数は、のべ7829回であった。画像を確認した結果、ニホンジカは、321回(4.1%)撮影されていた。また、同地域生息環境を調査した。下層植生が減少していることと、比較的新しい樹皮剥ぎが多いことを確認した。これを、ニホンジカの在来生息地である群馬県甘楽郡下仁田町の神津牧場周辺と比較すると、浅間山ではニホンジカの撮影頻度が低かった。また神津牧場周辺の林では、浅間山では、あまり見られない、樹皮剥ぎがから回復途中の樹木が認められた。センサーカメラによる調査から、浅間山では雄の体格は非常に大きく、長期間に環境収容力に達していることは考えにくかった。また、生息密度も高くなく、管理捕獲が多くないことから、この集団は、近年周辺地域から進出してきた個体群であることが強く示唆された。現地での聞き取り調査からも、浅間山麓は2000年代に入ってからニホンジカが増加してきた可能性が高いことが確認できた。

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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

- ①Riki Oouchi, Masato Minami, Kazuaki Tanaka and Tomoko Anezaki. 「Genetic diversity and population structure of the Japanese sorrow (*Capricornis crispus*) in Gunma Prefecture, based on mitochondrial D-loop sequences.」 The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan (国際学会) 2016年.
- ②田中和明, 渡部礼, 前島広平, 星明日香, 滝沢達也, 姉崎智子, 南正人 「ミトコンドリア DNA からみた群馬県および隣接地域のニホンジカの遺伝的多様性」日本畜産学会第122回大会 2017年.
- ③田中和明, 猪谷紗来, 前島広平, 渡部礼, 滝沢達也, 姉崎智子, 南正人 「ミトコンドリア DNA に基づいた群馬県におけるニホンジカの遺伝的多様性と集団構造」日本動物学会第88回大会 2017年.
- ④長友明, 田中和明, 大内力, 滝沢達也, 南正人, 姉崎智子 「群馬県におけるニホンカモシカのミトコンドリア DNA 多様性と地理的分布」日本畜産学会第123回大会 2017年.
- ⑤長友明衣, 田中和明, 滝沢達也, 猪谷紗来, 南正人, 姉崎智子 「マイクロサテライトマーカーを用いた群馬県産ニホンカモシカの集団解析」日本畜産学会第124回大会

2018年.

- ⑥猪谷紗来, 田中和明, 滝沢達也, 長友明衣, 南正人, 姉崎智子 「マイクロサテライトマーカーを用いた群馬県産ニホンジカの集団解析」日本畜産学会第124回大会 2018年.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

田中 和明 (TANAKA Kazuaki)
麻布大学獣医学部・准教授
研究者番号：50345873

(2) 研究分担者

南 正人 (MINAMI Masato)
麻布大学獣医学部・准教授
研究者番号：10548043

(3) 連携研究者

()
研究者番号：

(4) 研究協力者

姉崎 智子 (ANEZAKI Tomoko)
猪谷 紗来 (ITANI Sara)
長友 明衣 (NAGATOMO Mei)
前島 広平 (MAEZIMA Kouhei)
渡部 礼 (WATANABE AYA)