

機関番号： 14301

研究種目： 基盤研究（C）

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20510215

研究課題名（和文） 外来種チュウゴクオオサンショウウオの生態リスク評価

研究課題名（英文） Evaluation of ecological risks of alien Chinese giant salamander on native Japanese giant salamander

研究代表者

松井 正文（MATSUI MASAFUMI）

京都大学大学院人間・環境学研究科・教授

研究者番号： 40101240

研究成果の概要（和文）：

3年間にわたり、京都市賀茂川でオオサンショウウオ属を捕獲し、mtDNA、アロザイム、マイクロサテライトを分析し、結果を総合判定したところ、日本型、中国型、雑種第1代、戻し交雑による雑種第2代と推定される個体数は、それぞれ1（1.2%）、0（0%）、25（28.7%）、61（70.1%）となった。賀茂川におけるオオサンショウウオの遺伝的汚染は極限に達していて、純粋な日本産は絶滅寸前状態にある。

研究成果の概要（英文）：

Over three years, giant salamanders were captured at Kamogawa, Kyoto City, and studied for their genetic variation in mtDNA, allozymes, and microsatellite genes. When all results were combined, Japanese, Chinese, F1, and F2 or back-crossed individuals accounted for 1 (1.2%), 0 (0%), 25 (28.7%), and 61 (70.1%), respectively, in number. Genetic pollution of the Japanese species by alien Chinese species is at its maximum and the Japanese species is now immediately before extinction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：資源保全学

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：両生類、外来種、オオサンショウウオ、生態リスク

## 1. 研究開始当初の背景

オオサンショウウオ科 Cryptobranchidae のオオサンショウウオ類は東アジア産のオオサンショウウオ属 *Andrias* 2種、北米産のアメリカオオサンショウウオ属 *Cryptobranchus* 1種の現生3種を含む。オ

オサンショウウオ属の2種、中国産のチュウゴクオオサンショウウオと日本産のオオサンショウウオは、現存する最大の両生類として有名であり、それぞれ最大全長 200cm と 150cm に達すると言われる。

オオサンショウウオ属のこれら2種は日本、中国の両方において生息地の破壊による個体群の衰退が危惧され、国内のレッドリストに掲載され、国内法によって保護されている。それらはまた、IUCNのレッドリストに絶滅危惧II類(オオサンショウウオ)と絶滅危惧IA類(チュウゴクオオサンショウウオ)として掲載され、ワシントン条約付属書1にも掲載されている。

賀茂川は京都市北部の山地に始まり、市の東部を南へと流れる淀川水系の1支流である。賀茂川の上流部はオオサンショウウオの生息地として有名である。しかし、最近の我々の研究によって賀茂川上流部に導入されたチュウゴクオオサンショウウオが分布することが明らかになり、2種間で交雑の進んでいることが予想された。この状況は当初、濃褐色の体に、より淡い色の大きな斑紋をもつ異様な体色のオオサンショウウオの発見と、それに続くミトコンドリアDNAに基づく遺伝解析に端を発する。残念ながらチュウゴクオオサンショウウオをオオサンショウウオから外見だけで区別することは、極端な体色をもつ個体以外は困難であり、この状況を理解している者はいなかった。

## 2. 研究の目的

チュウゴクオオサンショウウオの導入は、生息場所と餌を巡っての競争、交雑による遺伝汚染を通して、賀茂川とその周辺の河川に生息するオオサンショウウオにとって、大きな脅威となっていることは間違いない。在来種と移入種の現況を把握し、オオサンショウウオの保全方策をたてるために、我々は賀茂川において野外調査と遺伝解析を行った。

## 3. 研究の方法

2009年6月から2010年10月にかけて、14回にわたり、賀茂川上流部(庄田橋から

厳島神社まで)において野外調査を行った。夜間に餌入りトラップを8箇所(雲が畑に5箇所、大岩、発電所、庄田橋に各1箇所)に設置し、2~4時間後に回収した。目視調査は主に、サンショウウオが活動する夜間に行い、河川内を踏査して成体を探した。同時に石起こしによって幼生を探した。2010年の1、2月には河床の落ち葉を掬うことによって新生孵化幼生を採集した。

幼生を除き、捕獲されたサンショウウオのすべてにPIT tagsを挿入し、計測(体各部の長さや体重)を行い、遺伝解析のための組織サンプル(尾鰭の小片)を採取した。これらに加え、京都市職員によって捕獲された6個体(2009年10月13日、2010年7月12、14、21日捕獲)についても調査を行った。遺伝解析が終了するまではサンショウウオを京都大学で飼育し、その後、純粋のオオサンショウウオは捕獲場所に放逐した。雑種は兵庫県の日本ハンザキ研究所に移送し、栃本所長の好意により、そこで飼育されている。

遺伝解析にはミトコンドリアDNA(mtDNA)、アロザイム、マイクロサテライトの3マーカ―を使用した。mtDNAは系統および個体群遺伝研究で広く用いられている。Matsui et al. (2008)は、オオサンショウウオとチュウゴクオオサンショウウオの間でミトコンドリアのチトクロームb(cytb)遺伝子の塩基配列分化度が6%に達することを明らかにしている。これら両種を区別することは容易である。しかし、ミトコンドリアDNAは母系遺伝するため、オオサンショウウオとチュウゴクオオサンショウウオの間での交雑を検出することができない。一方、アロザイムとマイクロサテライトは両親由来の核マーカ―であり、雑種検出に用いることができる。

DNAシーケンスに際しては、標準的なフェノールクロロホルム抽出法を用いて尾鰭

の組織からゲノム DNA を抽出した。チトクローム b 遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) によって増幅した。シーケンスには ABI 3100 ないし ABI 3130 自動シーケンサー装置を用いた。

アロザイム分析では冷凍された尾鰭組織について、標準的な水平澱粉ゲル電気泳動と染色法を用い、glucose-6-phosphate isomerase (GPI) と malate dehydrogenase (MDH) の 2 遺伝子座の遺伝型を調べた。

マイクロサテライト分析では、AJ034, AJ037, AJ044 の 3 遺伝子座を調べた。これらのマーカーは京都大学大学院農学研究科の井鷲教授によって開発されたものである。これらの遺伝子座を Qiagen Multiplex PCR キットを用いて特異的に PCR 増幅した。マイクロサテライト対立遺伝子を GENESCAN と GENOTYPER プログラムを用いて ABI3100 自動シーケンサー装置で解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 研究結果

賀茂川上流からサンショウウオ 87 個体 (56 変態個体と 31 幼生) を捕獲した。サンショウウオの全長は 4.4 cm から 131cm で変態個体の平均値は 85.5cm であった。

捕獲されたサンショウウオ全個体について、mtDNA のハプロタイプ、アロザイム 2 遺伝子型、マイクロサテライト 3 遺伝子座を決定した。mtDNA には賀茂川産に 2 型があり、1 つの型は 62 個体に見られ、近隣河川 (京都市桂川、三重県青山川) 産のオオサンショウウオのものと同様であった。他方、残りの 25 個体の型はチュウゴクオオサンショウウオのものと同じであった。

アロザイム解析では調査された 2 遺伝子座に 2 対立遺伝子が見られたにすぎなかった。Matsui et al. (未発表) はオオサンシ

ョウウオ属 2 種の間で、完全 (GPI) ないし、ほぼ完全に異質 (MDH) の対立遺伝子組成の存在を見出している。オオサンショウウオは GPI、MDH ともに 'a' 型で示される単一の対立遺伝子をもつ。一方、チュウゴクオオサンショウウオは GPI では 'b' 型のみを、MDH では 'a'、'b' 両型をもつ。ただし MDH(a) の頻度は低い。Contrasting to low genetic diversity in オオサンショウウオ属 2 種それぞれの遺伝的多様性の低さとは対照的に、賀茂川産個体群はオオサンショウウオのもつ対立遺伝子 (GPI[a] と MDH[a]) だけでなく、チュウゴクオオサンショウウオで優勢な対立遺伝子 (GPI[b] and MDH[b]) をもっており、高度のヘテロ接合を示した。

マイクロサテライト 3 遺伝子座の対立遺伝子頻度の解析では、オオサンショウウオ個体群 (三重、京都丹波、園部、桂川) は 3 遺伝子座すべてが単型で、単一の対立遺伝子 (AJ034 遺伝子座の対立遺伝子 205、AJ037 遺伝子座の対立遺伝子 111、AJ044 遺伝子座の対立遺伝子 148) を共有していた。例外的に三重産個体群では AJ044 遺伝子座が固有の対立遺伝子 144 に固定されていた。チュウゴクオオサンショウウオはオオサンショウウオに比べ、高度な多型性を示し、オオサンショウウオと共有する対立遺伝子頻度は低かった。賀茂川産個体群は高度に多型であり、オオサンショウウオ個体群に固有の対立遺伝子が優勢であったものの、チュウゴクオオサンショウウオに見られる対立遺伝子をもっていた。アロザイム解析の結果と同様に、賀茂川産個体群ではヘテロ接合度も高かった。

これらミトコンドリア DNA、アロザイム、マイクロサテライトのデータを総合して賀茂川産サンショウウオを純粋のオオサンショウウオ、純粋のチュウゴクオオサンショウ

ウオ、雑種に区分した。この際に、近隣河川のオオサンショウウオと同一の対立遺伝子組成（GPI[a], MDH[b], AJ034[205], AJ037[111], AJ044[144 または 148]）をもつものを純粋なオオサンショウウオ、一つでもチュウゴクオオサンショウウオのもつ対立遺伝子をもつものを雑種とした。純粋なチュウゴクオオサンショウウオと考えられる、オオサンショウウオのもつ対立遺伝子を欠く個体は検出できなかった。雑種サンショウウオはさらに、F1 雑種（オオサンショウウオとチュウゴクオオサンショウウオの子孫第一世代）と、F2 ないし戻し交雑個体（F1 どうしまたは F1 と親種間の子孫）に区分された。GPI とマイクロサテライト 3 遺伝子座でヘテロの個体を F1 雑種、残りを F2 ないし戻し交雑個体（F2/BC）と考えた。

遺伝解析の結果、純粋のオオサンショウウオと判定されたものはわずか 1 個体（1.2%）であり、純粋のチュウゴクオオサンショウウオは検出できなかった。残りの 86 個体（98.8%）は雑種と考えられ、25 個体（28.7%）は F1、61 個体（70.1%）は F2/BC と判断された。オオサンショウウオ、F1、F2/BC それぞれの変態後個体比率は 1（1.9%）、24（44.4%）、29（53.7%）、幼生の数と比率は 0、1（3.1%）、32（96.9%）であった。純粋のオオサンショウウオは賀茂川の支流である静原川で見つかったもののみであり、賀茂川本流産のオオサンショウウオはすべてが雑種であった。F1、F2/BC 雑種ともに賀茂川に広く分布していたが、F1 雑種成体は上流部に生息する傾向が見られた。

賀茂川産純粋オオサンショウウオは 75.5cm で変態個体全体の平均サイズよりも小さかった。F1 雑種は幼生 1 個体を除き、変態個体のみに見られた。他方、F2/BC 雑種はほぼすべてのサイズクラスに広く見られ

た。F1 雑種と F2/BC 雑種の間には大きさの違いは見られず、最大個体（131cm）は F2/BC 雑種だった。

## (2) 賀茂川におけるオオサンショウウオの現況

特異な体色をもつ個体の発見と、チュウゴクオオサンショウウオと同一の mtDNA ハプロタイプの確認によって、チュウゴクオオサンショウウオの賀茂川への移入のあったことが明確に示された。さらに、オオサンショウウオは極度に遺伝的多様性が低いにもかかわらず、この個体群のアロザイムとマイクロサテライトのマーカには広範な遺伝的多様性が見られ、それはチュウゴクオオサンショウウオのみに見られる alleles を共有することによることが解明された。これらの結果は、在来のオオサンショウウオと移入されたチュウゴクオオサンショウウオの間で交雑が生じ、雑種個体群が確立され、分布を拡大していることを強く示唆した。

発見された F1 および F2/BC 雑種の変態個体の大部分は全長 60-110cm の大きさを持ち、性的成熟に達していることは疑問がなかった。さらに、ほとんどの幼生は F2/BC と推定された。これらの結果は、賀茂川における毎年の繁殖は雑種によってなされていることを強く示唆している。F2/BC が性的成熟に達している可能性と、飼育下におけるオオサンショウウオの性的成熟年齢が約 10 年であることを考えると、サンショウウオ 2 種の交雑は数十年前の、たぶん 1970 年代の中国国交正常化後に始まったものと思われる。

賀茂川本流では導入された純粋のチュウゴクオオサンショウウオと思われる個体を確認できず、雑種のみが確認された。チュウゴクオオサンショウウオはこの河川に 1970 年代に導入されたと考えられるので、本来の

導入個体は死滅したものと思われる。確認された唯一の純粋オオサンショウウオは支流である静原川で発見された。このことから、賀茂川本流では純粋なオオサンショウウオの数は極度に少なく、絶滅に向っていることが推測される。

### (3) チュウゴクオオサンショウウオと雑種検出のための簡単で正確な手法

従来、我々はチュウゴクオオサンショウウオおよび雑種を検出するために mtDNA とアロザイムを用いてきた。しかし、遺伝子座が少なく、組織を入手することが困難な点（比較的少量の新鮮な組織が必要）に問題があった。本研究ではそれらに加えて、マイクロサテライト 3 遺伝子座マーカーを用い、これらのマーカーの組み合わせによって精度の高い結果を得ることができた。遺伝マーカーの組み合わせを雑種検出精度から見ると、mtDNA+アロザイム+マイクロサテライト、mtDNA+マイクロサテライト、mtDNA+アロザイム+、mtDNAのみ、の順で低下した。F1 と F2/BC の数は異なったものの、雑種と推定された個体数は、mtDNA+アロザイム+マイクロサテライトと mtDNA+マイクロサテライトで同じであった。この結果は、雑種を検出するだけなら mtDNA とマイクロサテライトの組み合わせで十分であり、アロザイム解析の手間を省くことができることを示すものである。F1 を F2/BC から区別するための検出度は低下するが、この簡便な方法は、非侵襲的なサンプリングが可能となり（ゲノム DNA を鱗、皮膚の小断片ないし粘液から抽出できる）、遺伝解析もより短時間でできるため、有利と考えられる。

### (4) オオサンショウウオの保全方策

本研究によってオオサンショウウオの賀茂川個体群が極度の脅威を受けていること

が解明された。移入されたチュウゴクオオサンショウウオとの雑種化を通しての遺伝子汚染により、支流には純粋なオオサンショウウオの個体群が残っている可能性はあるものの、賀茂川に生息する純粋なオオサンショウウオはほとんど消滅しつつある。賀茂川においてオオサンショウウオを保護するためには、できるだけ速やかに雑種サンショウウオを除去する必要がある。同時に 純粋のオオサンショウウオを捕獲し、域外保全するか、雑種の侵入していない他の河川に放逐する必要がある。それらに加えて、チュウゴクオオサンショウウオとその雑種の分布拡大を阻止することも重要である。それらは近隣の河川に人為的ないし、偶然に拡散する可能性が高いからである。

この研究から、賀茂川においてオオサンショウウオが明らかに危機的状況にあることが証明された。しかし、近隣河川における状況は未だ調査されておらず不明である。今後は賀茂川について、より詳細な野外調査を続けるとともに、雑種の分布拡大状況を把握するために、調査範囲を賀茂川支流、桂川など近隣生息地にまで広げていく必要がある。そのためには国（文化庁、環境省）および、京都府、京都市と連携していく必要がある。

### 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 3 件）

① Matsui M., Tominaga A., Liu W.Z., Tanaka-Ueno T., Reduced genetic variation in the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus* (Amphibia: Caudata), Mol. Phyl. Evol., 査読有、49 巻、2008、318-326

② 松井正文、西川完途、吉川夏彦、京都賀茂川産チュウゴクオオサンショウウオの現状 (I)、爬虫両棲類学会報、査読無、2010、2010、77-78

③ 吉川夏彦、松井正文、西川完途、京都賀茂川産チュウゴクオオサンショウウオの現状

(II)、爬虫両棲類学会報、査読無、2011、2011、  
65

〔学会発表〕(計5件)

①松井正文、京都市賀茂川に分布する外来種  
チュウゴクオオサンショウウオの実態、第79  
回日本動物学会大会、平成20年9月6日、  
福岡大学

②松井正文、西川完途、吉川夏彦、京都賀茂  
川産チュウゴクオオサンショウウオの現状  
(I)、日本爬虫両棲類学会、平成21年11月  
7日、天理大学

③吉川夏彦、松井正文、京都市賀茂川のチュ  
ウゴクオオサンショウウオの現状、第7回オ  
オサンショウウオの会、平成22年9月12日、  
岡山県真庭市

④吉川夏彦、松井正文、西川完途、京都賀茂  
川産チュウゴクオオサンショウウオの現状  
(II)、日本爬虫両棲類学会、平成22年10月  
9日、慶応大学

〔図書〕(計1件)

松井正文、小学館、外来生物クライシス、2009、  
254

〔その他〕

ホームページ等

<http://zoo.zool.kyoto-u.ac.jp/~hynobius/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松井 正文 (MATSUI MASAFUMI)

京都大学大学院・人間・環境学研究科・教  
授

研究者番号：40101240

