

第 12 章

兵庫県に生息するツキノワグマの遺伝子解析

森光由樹・中村幸子・横山真弓

要 点

- ・兵庫県に生息しているツキノワグマの核 DNA マイクロサテライト 10 遺伝子座について分析をおこなった。
- ・10 遺伝子座の平均のヘテロ接合度の観察値 (H_o) と期待値 (H_E) は、東中国地域個体群では 0.422 と 0.450、近畿西地域個体群 では 0.485 と 0.499 であり、過去の報告と同様に、遺伝的多様性が低かった。
- ・個体群間の遺伝的な分化をあらわす遺伝的分化係数 (F_{st}) は 0.233 であり、過去の報告による分析結果と同様に、遺伝的に孤立していた。
- ・地域個体群の絶滅を回避し、安定的に維持してゆくには、遺伝的多様性について引き続きモニタリングを行ない、遺伝的なデータを蓄積していくことが重要である。

key words : 遺伝的多様性 マイクロサテライト ヘテロ接合度 アレリックリッチネス
遺伝的分化係数

1. はじめに

種内の遺伝的変異は、野生動物の保全や管理を進めるうえで、重要な意味をもっている(鷲谷・矢原 1996)。遺伝的な変異は、それ自体が生物多様性の重要な要素として保全の対象になるだけでなく、個体群の絶滅可能性や存続可能な個体群の大きさを推定するための手がかりともなる。

地域個体群内の遺伝的多様性が低いと、絶滅の可能性が高くなることは、多くの研究で指摘されている。分断化によって集団内で近親交配が進むと、遺伝的多様性が低下し、劣性遺伝子が発現することによって病気や奇形などが発生しやすくなる (Frankham *et al.* 2002; Saccheri *et al.* 1998)、環境変動への抵抗性が低くなるなど、負の影響が現われ、絶滅する可能性が高くなる。

遺伝的多様性を回復するには、繁殖可能な個体数の増加、あるいは分断化した集団間の遺伝的交流が重要だと考えられている (Frankham *et al.* 2002)。個体数が増加すると、集団内での突然変異が蓄積されやすくなり、それによって遺伝的多様性は高くなる。また、遺伝的分化が進んだ集団間で遺伝子の交流が起これば、それによって各集団内の遺伝的多様性が高くなる。これらのいずれかのメカニズムが働けば、遺伝的多様性は回復してゆくことが期待される。

兵庫県に生息しているツキノワグマ (*Ursus thibetanus*) の分布は、円山川を境に東中国個体群、北近畿個体群に分けられている。両個体群とも生息個体数が少なく、環境省が発表

した絶滅が危惧されている地域個体群のリストに含まれており、存続が危ぶまれている（環境省 2000）。

近畿地方及び中国地方に生息しているツキノワグマを対象とした遺伝学的な研究によれば、西中国・東中国・北近畿西部・北近畿東部の4つの地域個体群では、地域個体群内の遺伝的多様性が低いことが明らかとなっている（Ohnishi *et al.* 2007; Saitoh *et al.* 2001）。また、地域個体群間の遺伝的分化については、集団間の遺伝子の交流が少なく、分化が進んでいることも報告されている（Ohnishi *et al.* 2007; Saitoh *et al.* 2001）。したがって、兵庫県に生息しているツキノワグマについては、Ohnishi *et al.* (2007) が報告した時点では、遺伝的多様性が低く、地域個体群間の遺伝的分化が進んでいたと考えられる。

一方、坂田ほか（2011）は、県に生息するツキノワグマの個体数は、2010年の時点で徐々に回復していることを報告している。もし、個体数の回復により突然変異の蓄積が進んでいけば、東中国地域個体群及び北近畿西地域個体群の遺伝的多様性は回復していることが期待される。また、個体数の回復によって、両個体群間において個体の移出入による遺伝子交流が起こっていれば、それによる遺伝的多様性の回復も期待できる。

そこで本研究では、東中国地域個体群及び北近畿西地域個体群において、1991・2004年の14年間に収集された試料の分析結果と、2007・2008年の2年間に収集された試料の分析結果を比較することにより、遺伝的多様性に回復傾向がみられるのかどうかを調べた。具体的には、マイクロサテライトDNAを分析することによって、集団内の遺伝的変異の指標であるヘテロ接合度の観察値 (H_o) と期待値 (H_e)、アレリック・リッチネス (A_R)、集団間の遺伝的な違いを表す指標である遺伝的分化係数 (F_{st}) という3つの指標を求め、過去の研究結果と比較した。

2. 材料と方法

2-1. 個体からの試料収集

分析対象は、2007年から2008年にかけて捕獲された、東中国地域個体群（兵庫県新温泉町、香美町、養父市）に属する30個体と、北近畿西地域個体群（兵庫県豊岡市）の25個体である（図1）。捕獲したクマから血液を採取し、遠心分離機で白血球を分離（5000回転で15分間）してから -20°C で冷凍保存し、分析試料とした。

2-2. 試料からのDNA抽出とPCRによる増幅

遺伝的多様性を調べるために、核DNAの中でとくに個体間変異の多い遺伝子座（数個の塩基の繰り返しからなるマイクロサテライトDNA領域）の変異を分析した。マイクロサテライトとは、数塩基単位の反復配列のことであり、その反復数がきわめて変化しやすいという性質がある。

白血球からのDNA抽出は、QIAamp DNA Micro Kit（QIAGEN）を用いて、添付のプロトコールに従って行った。分析するために標的とした10個のマイクロサテライトDNA領域（G1A, G10B, G10C, G1D, G10M, G10X, MSUT-1, MSUT-2, MSUT-6, MSUT-7, Kitahara



図1 分析対象とした地域個体群

東中国地域個体群、北近畿西地域個体群からサンプルを採取し分析を行った。

et al. 2000; Paetkau & Strobeck 1994) を、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を用いて増幅した。PCR 法とは、細胞内で行われている DNA 複製システムをモデルにした、試験管内で DNA を増やす方法である。PCR 法による DNA の増幅は DNA サーマルサイクラー (Applied Biosystems) を使用した。その過程は、最初に二本鎖 DNA を入れた反応液を 94°C で 2 分間加熱し熱変性させた後、①94°C で 15 秒間加熱 (二本鎖 DNA を一本鎖 DNA に分離)、②48~60°C で 20 秒間加熱 (アニーリング: それぞれの一本鎖 DNA にプライマーとよばれる DNA 増幅に使う塩基の断片を結合)、③72°C で 15 秒間加熱 (伸張反応: プライマーを起点として相補的な DNA 鎖を合成)、という三つの過程を 1 サイクルとして 30 回繰り返す、最後に 72°C で 30 秒間加熱 (最終伸張反応) することにより、マイクロサテライト DNA 領域を大量に増幅した。PCR は 2 μ l の DNA 溶液、10 \times PCR Buffer を 2 μ l、2mM dNTP を 2 μ l、10 μ M のプライマーを Forward、Reverse それぞれ 0.8 μ l ずつ、0.2unit PyrobestDNAPolymerase (Takara) に滅菌水を加え、合計 20 μ l にして反応を行った。プライマーは、Paetkau & Strobeck (1994) 及び Kitahara *et al.* (2000) にしたがって設計し、この後の解析時に DNA 検出できるように、5'末端に NEDVIC FAM を蛍光ラベルした。最後に、Genetic Analyzer MODEL3130 (Applied Biosystems) と GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems) を使って、増幅したマイクロサテライト DNA 領域の長さを読み、それぞれの遺伝子座において、何種類の対立遺伝子があるかを決定した。

2-3. データ解析

ヘテロ接合度の解析

ヘテロ接合とは、2本の相同染色体の同一遺伝子座を、異なる2つの対立遺伝子が占めている状態のことであり、ある遺伝子座におけるヘテロ接合の割合をヘテロ接合度という。ヘテロ接合度の観察値 (H_o) は近親交配の程度などによって変化するが、ランダム交配のもとでの期待値は一定であるため、その集団の遺伝的変異の大きさを表す指標になる。そこで対立遺伝子の数と頻度から、ヘテロ接合度の期待値 (H_e) を求めた。また、観察値 (H_o) がハーディ・ワインベルグ平衡から乖離しているかどうかを、遺伝子座ごとに χ^2 検定を用いて検定した (Guo & Thompson 1992)。

アレリック・リッチネス (A_R) の解析

遺伝子座あたりの対立遺伝子の数は、その集団の遺伝的変異の大きさを表す指標となる。ただし、分析対象となる個体数の多さによって、遺伝子座あたりの対立遺伝子数は影響を受けるため、Petit *et al.* (1998) の方法で、FSTAT ver.2.9.3.2 (Goudet 2001) を用いて、アレリック・リッチネス (A_R) という指標を算出した。

遺伝的分化係数 (F_{st}) の解析

集団間の遺伝的分化を評価するため、Weir & Cockerham (1984) の方法により、集団間の遺伝的な違いを表す指標である遺伝的分化係数 (F_{st}) を算出した。遺伝的分化係数が統計的に有意に異なるかどうかは、二つの地域個体群の対立遺伝子を5000回の無作為抽出した後、exact G-test (Goudet *et al.* 1996) を用いて検定した。

3. 結果

東中国地域個体群と北近畿西地域個体群のアレリック・リッチネス (A_R) と、ヘテロ接合度の期待値 (H_e) と観察値 (H_o) を、それぞれ表1と表2に示した。分析した10遺伝子座の期待値 (H_e) と観察値 (H_o) については、すべての組み合わせで期待値 (H_e) のほうが観察値 (H_o) より高かったが、ハーディ・ワインベルグ平衡から統計的に有意に乖離している組み合わせはなかった。

アレリック・リッチネス (A_R)、ヘテロ接合度の期待値 (H_e) と観察値 (H_o) のそれぞれについて、10遺伝子座の平均値を Ohnishi *et al.* (2007) と本研究で比較したところ、東中国地域個体群では、アレリック・リッチネス (A_R) については本研究のほうが低く、ヘテロ接合度の期待値 (H_e) と観察値 (H_o) については、ほぼ同じ値を示していた。北近畿西地域個体群でも、アレリック・リッチネス (A_R) については本研究のほうが低く、ヘテロ接合度の期待値 (H_e) と観察値 (H_o) についてはほぼ同じ値を示していた。

東中国地域個体群と北近畿西地域個体群の間の遺伝的分化係数 (F_{st}) は0.233であり、Ohnishi *et al.* (2007) とほぼ同じ値 ($F_{st} = 0.230$) であった。

表1 東中国地域個体群におけるアレリック・リッチネス(A_R)とヘテロ接合度の期待値(H_E)及び観察値(H_O)の比較($n=30$)

遺伝子座	本研究			Ohnishi et al., 2007		
	A_R	H_E	H_O	A_R	H_E	H_O
G1A	6.80	0.702	0.700	6.96	0.723	0.700
G10B	3.05	0.505	0.500	3.00	0.540	0.500
G10C	2.00	0.420	0.389	2.00	0.499	0.500
G1D	2.00	0.499	0.481	5.95	0.420	0.366
G10M	4.00	0.492	0.490	4.00	0.482	0.561
G10X	4.00	0.610	0.501	4.00	0.607	0.500
MSUT-1	3.89	0.112	0.089	3.92	0.113	0.093
MSUT-2	2.00	0.163	0.152	2.00	0.155	0.167
MSUT-6	2.85	0.415	0.399	2.93	0.475	0.395
MSUT-7	3.00	0.580	0.515	3.00	0.599	0.500
平均	3.36	0.450	0.422	3.78	0.461	0.428

表2 北近畿西地域個体群におけるアレリック・リッチネス(A_R)とヘテロ接合度の期待値(H_O)及び観察値(H_E)の比較($n=25$)

遺伝子座	本研究			Ohnishi et al., 2007		
	A_R	H_E	H_O	A_R	H_E	H_O
G1A	6.90	0.704	0.700	6.93	0.766	0.837
G10B	6.35	0.723	0.702	6.45	0.606	0.633
G10C	2.00	0.475	0.440	2.00	0.481	0.380
G1D	3.00	0.530	0.503	3.00	0.453	0.429
G10M	4.00	0.642	0.630	5.76	0.681	0.680
G10X	3.80	0.560	0.556	4.00	0.602	0.540
MSUT-1	3.00	0.519	0.501	3.80	0.618	0.600
MSUT-2	2.00	0.271	0.267	3.00	0.236	0.220
MSUT-6	2.83	0.415	0.405	2.99	0.413	0.440
MSUT-7	3.00	0.148	0.146	2.00	0.132	0.140
平均	3.69	0.499	0.485	3.99	0.499	0.490

4. 考察

マイクロサテライト領域の解析から、東中国地域個体群および北近畿西地域個体群における遺伝的多様性は、Ohnishi *et al.* (2007) が報告した 1991-2004 年時点から、ほとんど変化していない（ヘテロ接合度の期待値 (H_E) と観察値 (H_O)）か、減少している（アレリック・リッチネス (A_R)) ことが明らかとなった。本研究の結果は、生息個体数が回復してきている（坂田ほか 2011）にもかかわらず、遺伝的多様性は依然として回復していないことを示唆している。

Ohnishi *et al.* (2007) は、東中国地域個体群および北近畿西地域個体群のヘテロ接合度の観察値 ($H_O=0.428$ および $H_O=0.490$)、すなわち個体群内の遺伝的変異の大きさが、西中国地域個体群（島根・鳥取： $H_O=0.513$)、北近畿東地域個体群（京都： $H_O=0.596$)、中部地域個体群（長野・新潟： $H_O=0.643$) にくらべ低いことを報告している。また、森光（未発表）は、長野県北アルプス地域個体群に比べて低いことを指摘している。

このようなヘテロ接合度の低下の原因の一つとして、島嶼分離がもたらした遺伝的隔離の研究が参考になる (Paetkau & Strobeck 1994)。アメリカクロクマ (*U. americanus*) の 2 つの地域個体群を対象とした研究によれば、北米大陸に生息しているウエストスロープの集団では、ヘテロ接合度の観察値 (H_O) は 0.799 であったのに対し、12,000 年間大陸と離れているニューファンドランド島の島嶼個体群のヘテロ接合度の観察値 (H_O) は 0.360 であった。他地域に比べて東中国地域個体群および北近畿西地域個体群のヘテロ接合度が低いことは、島嶼集団と同等の遺伝的隔離が起きている可能性を示唆しているかもしれない。

東中国地域個体群と北近畿西地域個体群間の遺伝的分化は、Ohnishi *et al.* (2007) とほぼ同様の高い値となっていた。この結果は、両地域個体群では遺伝的交流が起こっていないことを示唆している。

Ohnishi *et al.* (2007) は、上記 2 個体群に加えて、西中国地域個体群、北近畿東地域個体群、中部地域個体群を含む 5 地域個体群間の遺伝的分化は、いずれも統計的に有意に 0 より高く、地理的距離が比較的近いにもかかわらず、東中国個体群と北近畿西地域個体群でもっとも高い ($F_{st}=0.230$) ことを報告している。一方、中部地域個体群をのぞく 4 地域個体群間でもっとも遺伝的分化が進んでいないのは、距離的にもっとも近い北近畿東地域個体群と北近畿西地域個体群 ($F_{st}=0.105$, Ohnishi *et al.* 2007) だが、同様に隣接している北アルプス地域個体群と中央アルプス地域個体群間の遺伝的分化係数は、この値に比べて非常に低い（森光、未発表）ことが明らかとなっており、近畿中国地方全体で地域個体群間の遺伝的分化が進んでいることが示唆された。

遺伝的多様性の回復には、長い期間が必要である。今回は、個体数が回復し始めた初期段階の個体のサンプルを分析していることから、回復傾向が得られなかった可能性もある。今後は、個体数の回復のレベルと回復経過期間などの時間的スケール、個体群間の個体の移動情報を合わせて遺伝的多様性の状況との関係を把握することが必要である。

5. まとめ

本研究から、アレリック・リッチネス (A_R) と、ヘテロ接合度の期待値 (H_E)・観察値 (H_o)、および遺伝的分化係数 (F_{st}) を見る限り、東中国地域個体群および北近畿西地域個体群の遺伝的多様性は、Ohnishi *et al.* (2007) による 1991-2004 年当時とくらべて回復しているとはいえないこと、遺伝的に孤立した状態が続いていることが明らかとなった。

孤立した個体群は、遺伝的浮動や、近親交配による遺伝的変異の消失や近交弱勢のために絶滅の可能性が高くなる (Frankham *et al.* 2002; Saccharin *et al.* 1998)。現在、兵庫県のツキノワグマについては、妊娠率の低下などの繁殖障害は報告されていない(中村ほか 2011)が、今後さらに長期間孤立し、個体群内で近親交配が進むと、繁殖障害が起こる可能性はありと考えられる。また、東中国地域個体群および北近畿西地域個体群の個体において、骨の異常が認められている(横山ほか 2011)。現時点では、骨の異常が遺伝的多様性の低下に起因するという知見は得られていないが、今後さらに試料を収集して検討する必要がある。

地域個体群の絶滅を回避し、安定的に維持してゆくには、個体数の増減や繁殖状況などとともに遺伝的多様性についてモニタリングを継続し、個体群の健全性の把握に努めることが重要である。

謝辞

本稿を終えるにあたり、サンプル収集において多大な援助をいただいた野生動物保護管理事務所関西分室のみなさまに厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Guo S, Thompson E 1992 Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
- Goudet J, Raymond M, Demeus T, Rousset F 1996 Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144:1933-1940.
- Goudet J 2001 FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3 Available from: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat>.
- 環境省 2000 特定鳥獣保護管理計画技術マニュアル(クマ類編), pp.55-56. 自然環境研究センター.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA 2002 *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, pp.640.
- Kitahara E, Isagi Y, Ishibashi Y, Saitoh T 2000 Polymorphic microsatellite DNA markers in the Asiatic black bear *Ursus thibetanus*. *Molecular Ecology* 9:1661-1662.
- Ohnishi N, Saitoh T, Ishibashi Y, Oi T 2007 Low genetic diversities in isolated populations of the Asian black bear (*Ursus thibetanus*) in Japan, in comparison with large stable populations. *Conservation Genetics* 8: 1331-1337

- Paetkau D, Strobeck C 1994 Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* 3:489-495.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O 1998 Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12:844-855.
- 中村幸子・横山真弓・森光由樹 2011 兵庫県におけるツキノワグマの繁殖状況. 「兵庫県におけるツキノワグマの保護管理の現状と課題」, 兵庫ワイルドライフモノグラフ 3号, pp.102-106. 兵庫県森林動物研究センター.
- Saccharin I, Kuussaari M, Kankare M, Vikman P, Fortelius W, Hanski I 1998 Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392:491-494.
- Saitoh T, Ishibashi Y, Kanamori H, Kitahara E 2001 Genetic status of fragmented populations of the Asian black bear *Ursus thibetanus* in western Japan. *Population Ecology* 43:221-227.
- 坂田宏志・岸本康誉・関香菜子 2011 ツキノワグマの生息動向と個体数の推定. 「兵庫県におけるツキノワグマの保護管理の現状と課題」, 兵庫ワイルドライフモノグラフ 3号, pp.26-38. 兵庫県森林動物研究センター.
- 鷺谷いずみ・矢原徹一 1996 保全生態学入門—遺伝子から景観まで. 文一総合出版, 270pp.
- Weir BS, Cockerham CC 1984 Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- 横山真弓・斎田栄里奈・中村幸子・森光由樹 2011 東中国及び北近畿個体群のツキノワグマに認められた骨異常の出現頻度. 「兵庫県におけるツキノワグマの保護管理の現状と課題」, 兵庫ワイルドライフモノグラフ 3号, pp.125-138. 兵庫県森林動物研究センター.