

平成17年度
自然公園等施設整備委託
ツキノワグマ遺伝子分析調査報告書

株式会社野生動物保護管理事務所

平成18年2月

目次

1. はじめに	．．． 2
2. 材料と方法	．．． 3
2-1. 試料からの DNA の抽出	．．． 3
2-2 PCR による増幅	．．． 4
3-3. マイクロサテライトフラグメント解析	．．． 5
2-4 個体群の遺伝的構造の解析	．．． 5
3. 結果	．．． 6
4. 考察	．．． 7
5. 引用文献	．．． 8

1. はじめに

ニホンツキノワグマ (*Ursus thibetanus japonicus*) はアジア東部に分布するツキノワグマの一亜種で、本州・四国の落葉広葉樹林に生息している。近年、クマによる樹木の皮剥ぎや農作物被害、人身被害が増加している。対策法として年に 1000~1500 頭が有害駆除されている (S. Horino and S. Miura 2000)。また、ツキノワグマの生息地である広葉樹林が伐採され、道路網の発達や宅地造成などによって生息地が分断・縮小され個体数は減少し地域個体群の絶滅が危惧されている。九州ではすでに絶滅した可能性が高いとされ、四国についても生息頭数が既に 10 数頭の範囲であると考えられている (羽澄, 1992)。また、東中国山地、西中国山地、紀伊半島、下北半島地域個体群は孤立しており、絶滅が進行していると考えられている (環境省 1991)。

近畿、中国地方に生息しているツキノワグマの遺伝的多様性を評価した研究では、中国山地の二つの孤立集団で多様性は低く、北近畿東側の集団で高いことを明らかにしている (T. Saitoh *et al.* 2001)。

南関東地域のツキノワグマ個体群は、富士川以西の南アルプス個体群、甲府盆地と中央高速道路以北の関東山地個体群と、これら 2 つの地域に挟まれた地域丹沢山系の大きく分けて 3 つの地域個体群に分けることができる。丹沢山地のツキノワグマ個体群は、山梨県の御正体山系を挟んで、御坂山地、さらに大菩薩嶺から秩父に連なる関東山地個体群に隣接しているが、交通網の整備や周辺地域の観光開発、市街化によってレッドデータブックに掲載されている地域個体群と同様に分布域の孤立化が危惧されている (羽澄, 1992)。さらに、この地域個体群は岐阜県白川村や東京都奥多摩町の地域個体群と比較して遺伝的多様性が失われている可能性があることも示唆されている (羽澄ほか, 1997)。もしこの地域と周囲の地域に個体の移動がなければ丹沢山地の地域個体群は孤立していることになり、30 頭前後と考えられている生息数からも、他の地域個体群との個体の交流の有無が、この地域個体群を維持していくために重要であると考えられる (羽澄ほか, 1997)。南関東地域に生息するツキノワグマの遺伝学的研究で、平成 13 年度自然再生技術調査「南関東地域におけるツキノワグマの遺伝子構成解析の試み」がある。

本調査では自然再生技術調査の資料をもとに、丹沢周辺で収集された個体の遺伝データを加えてそれぞれの地域個体群間の遺伝子交流の状況について推測を試みた。

2. 材料と方法

2001年から2005年までで新たに南関東地域（神奈川県丹沢、山梨）で捕獲された個体5頭を分析した（表-1）。分析結果は自然再生技術調査のデータに新たに加えて解析を実施した。自然再生技術調査では、1991年から1998年にかけて、調査対象個体群の53頭（神奈川県西丹沢地区で生け捕り捕獲した30頭および山梨県で生け捕りあるいは有害駆除された23頭）、関東山地個体群の32頭（東京都奥多摩町と檜原村で生け捕り捕獲した19頭および山梨県で有害駆除された13頭）および南アルプス個体群の21頭（山梨県で有害駆除された2頭および静岡県静岡市で有害駆除された19頭）が用いられている。

表-1 分析を実施したサンプル

No.	整理番号	捕獲年月日	捕獲場所	性別	組織	捕獲方法
1	B174	2001. 8. 28	山梨県 富士山	オス	皮膚	学術捕獲
2	B245	2001. 10. 19	神奈川県 丹沢	オス	肝臓	交通事故
3	B508	2005. 11. 23	山梨県 御坂市 大石	メス	肝臓	狩猟
4	B509	2005. 11. 23	山梨県 御坂市 大石	不明	肝臓	狩猟
5	B510	2005. 12. 4	山梨県 大月市 初狩町下初狩一ノ沢	メス	肝臓	狩猟

2-1. 試料からのDNAの抽出

調査地周辺で捕獲された5個体（1頭は交通事故死）から得られた皮膚の一部もしくは肝臓を分析の試料とした（表-1）。試料は分析が実施されるまでの間、-20℃にて冷凍保存した。DNA抽出はQIAGEN Micro KIT（QIAGEN）を使用した。

2-2 PCR による増幅

抽出した DNA を鋳型に、5 のマイクロサテライト領域（遺伝子座）について PCR 法（Polymerase Chain Reaction；酵素反応によって DNA を増幅する手法）による増幅を試みた（図-1）。プライマーの塩基配列は Peatkau et al. より引用した。プライマーは 5' 末端に NED、VIC FAM VIC を蛍光ラベルしたものを用いた。また、ノンラベルプライマーはテイルドプライマーを使用した。5 種のマイクロサテライト G1D、G10B、G10C、G10L、G10X を増幅した。PCR はテンプレートとして 2u1 の DNA 溶液、0.2unit Pyrobest_ DNA Polymerase (Takara) を含む 20u1 の反応液を用いた。94℃2 分間加熱後、変性 94℃15 秒間、アニーリング（48℃～60℃）20 秒間、伸長 72℃15 秒間、最終伸長 72℃30 秒を 30 サイクルの条件で行った。

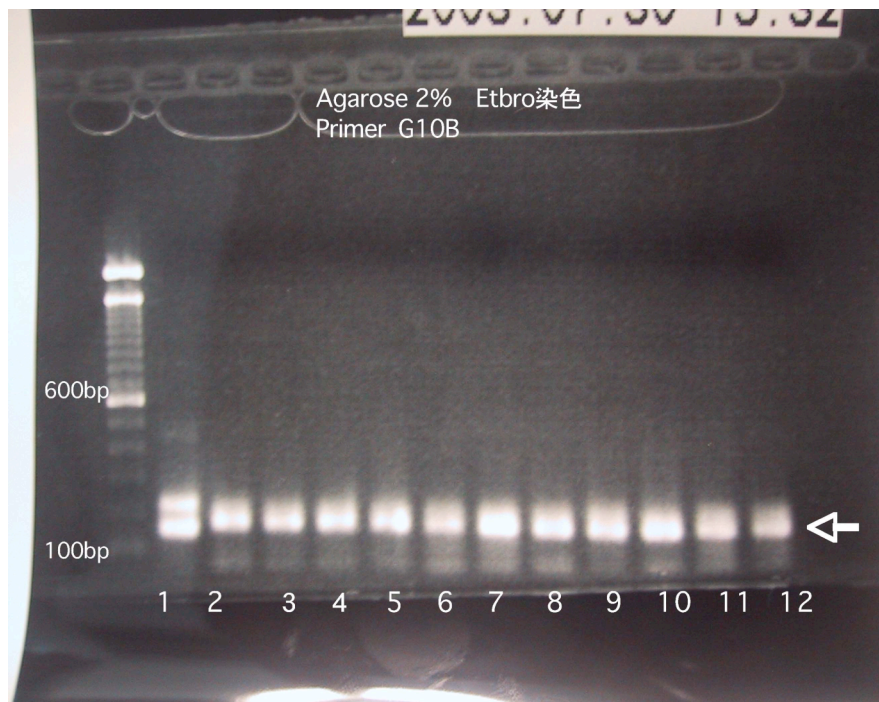


図-1 G10B 領域の PCR 産物の確認
(M はサイズマーカー)

2-3. マイクロサテライトフラグメント解析

GENESCAN による解析

Genetic Analyzer MODEL3130 (Applied Biosystems) を用いて PCR 産物を分析した。

Hi-Di Formamide 10ul GeneScan -500LIZ Size Standard 0.5ul に PCR 産物を適宜希釈し混合し分析を実施した。分析結果は GeneMapper v 3.7 を用いてフラグメントサイズを決定した (図 -2)。

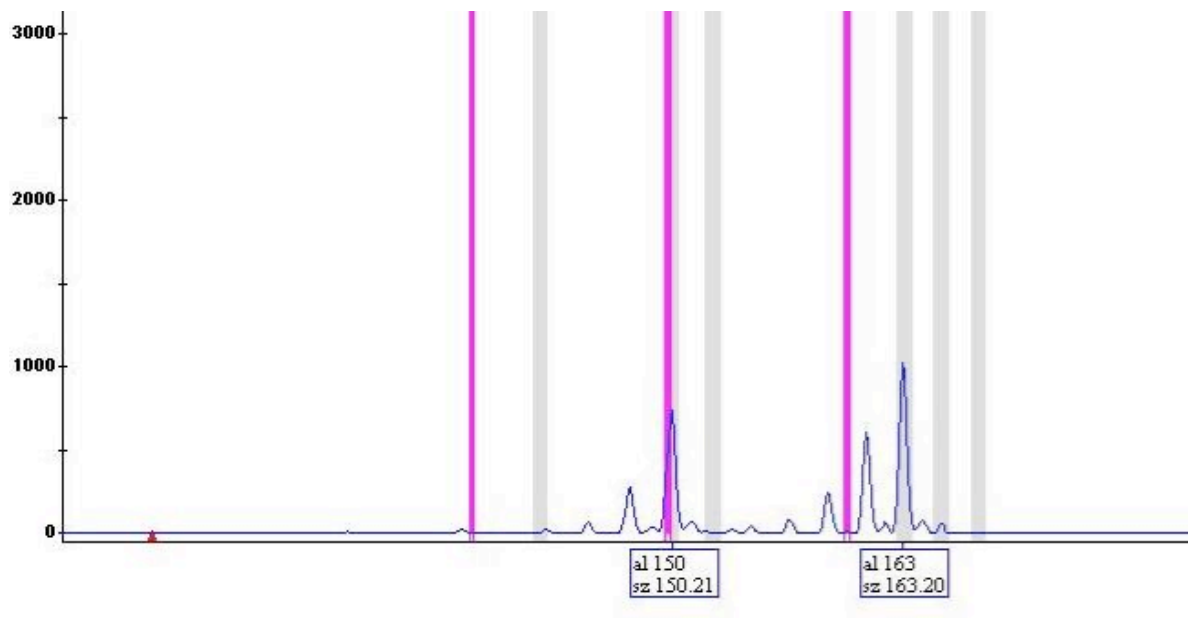


図-2 GeneMapper™ によるフラグメントの解析例

図は G10B 領域の 150bp と 163bp のヘテロを示す。

2-4 個体群の遺伝的構造の解析

個体群間で遺伝的構造を比較するため、得られたデータをもとに、各遺伝子座、各個体群における対立遺伝子頻度、対立遺伝子数 (N_a)、ヘテロ接合体頻度の期待値 (H_e) と観察値 (H_o) を解析した。

3. 結果

GENESCAN で得られた波形データから、丹沢地域、関東山地および南アルプスの各個体群に属するツキノワグマについて、各遺伝子座における対立遺伝子数とそれぞれの対立遺伝子の頻度を求めた。(表-2)。調べた5つの遺伝子座のうちG10B, G10C, G10Xの3つについては関東山地と南アルプスで調査対象地よりも多くの遺伝子座が、また、G1D, G10C, G10Xの3つでは、南アルプスで他の地域より多くの対立遺伝子が確認された。反対に調査対象地で多くの対立遺伝子が確認されたのはG10Lのみであった。求めたヘテロ接合度の比較では、G1D(実測値)で調査対象地が、G10Bで調査対象地(実測値)と関東山地(推定値)が他の個体群より高い数値を示したが、その他3つの遺伝子座においては南アルプスで最も高い数値を示し、全体の平均でも最も高い数値であった(表-3)。各個体群のヘテロ接合度をオス、メスにわけて求めたところ、個体群によっては十分な試料数が確保できなかったものの、どの個体群でもオスで高い数値を示した(表-4)。これは、前回報告のあった分析結果と変化はなかった。

4. 考察

今回行ったマイクロサテライト領域の解析からは、調査対象個体群の丹沢山地においてヘテロ接合度が低いという結果が得られた。今後検定を行う必要はあるが、この地域では、他の個体群に比べて核 DNA における遺伝的多様性が低く、遺伝的に孤立している傾向がうかがえる。また、長野県の北アルプスに生息しているツキノワグマで今回解析を行った 5 つの遺伝子座を含む合計 11 つの遺伝子座について解析を行ったところ、0.648 というヘテロ接合度（推定値）が得られた（野生動物保護管理事務所、未発表データ）。この数値は今回得られた丹沢の 0.542 に比べて高く、この地域における遺伝的多様性が丹沢と比べて高いことが考えられた。

5. 引用文献

環境省 1991. 日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック

羽澄俊裕. 1992. 危機的状況にあるツキノワグマ地域個体群の保護管理計画の提案. WWFJ Science Report 1:293-333.

羽澄俊裕, 小山克己, 長縄今日子, 釣賀一二三. 1997. III. ツキノワグマ. 「丹沢大山自然環境総合調査報告書」神奈川県. pp453-469.

野生動物保護管理事務所 平成 13 年度 自然再生技術調査業務報告書

Horino Shin-ichi and Miura Shingo : Population viability analysis of a Japanese black bear population. *Population Ecology* 42, 37-44
2000

Paetkau, D. and C. Strobeck, 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* 3:489-495.

Paetkau, D., W. Calvert, I. Stirling and C. Strobeck, 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4:347-354.

Saitou, N. and M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

Saitoh T, Ishibashi Y, Kanamori H, et al: Genetic status of fragmented populations of the Asian black bear *Ursus thibetanus* in western Japan. *Population Ecology* 43(3): 221-227, 2001