

守れ！ ふるさとのカスミサンショウウオ ～GISと環境DNAを用いた新規生息地の発見～

岐阜県立岐阜高等学校自然科学部生物班

第1章 序論 (Introduction)

里山里海域では人口の減少や耕作放棄地の増加、外来種の侵入や生物多様性の喪失が深刻な問題となっている。減少する生物多様性を保全するためには、より簡便で迅速な絶滅危惧種などの生息地の把握が求められる。本研究では、水域における新しい生物モニタリング手法として、近年注目されている環境DNAとGISを併用する調査方法を開発し、迅速且つ効率的に希少生物の新規生息地を発見し、保護活動につなげていくことを目指した。また、博物館標本の調査や古い地形図などの情報を利用し、GISを用いて、生息地の環境推移を解析した。

カスミサンショウウオ (*Hynobius nebulosus*) は、西日本の代表的な小型の止水産卵性サンショウウオである。繁殖期には、夜間に1対の卵嚢を水中の木の枝、落ち葉などに産み付ける。卵から幼生の時期には水中で生活し、変態上陸後は陸上で生活する。そのため、水域と陸域に加えて、それらを繋ぐ水辺エコトーン (水陸移行帯) の全てが整った環境が必要な種である。非繁殖期は主に丘陵地や平野部を中心とした水田地帯などに生息しており、夜行性のため日中は落ち葉やがれきの下、腐葉土の中に潜んで生活しているため人目に触れる機会は少なく、広範囲の搜索は多大な時間と労力を要す。

カスミサンショウウオの岐阜県内での生息は、高木ら (1991) が報告し、分布域は岐阜県以西と広く認識されるようになった。岐阜県版レッドデータブックでは絶滅危惧I類に指定されており、県内の生息地は2ヶ所のみであったが、専門家による30年間の調査の結果、2016年3月に3ヶ所目の生息地が発見された。このことにより、岐阜県内にはまだ知られていない潜在生息地がある可能性が示された。

第2章 研究材料と研究方法 (Materials and Methods)

(1) GIS

GISとは、地理情報を重ね合わせて分析できるシス

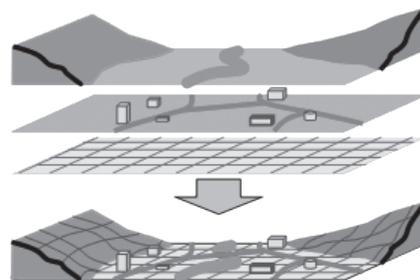
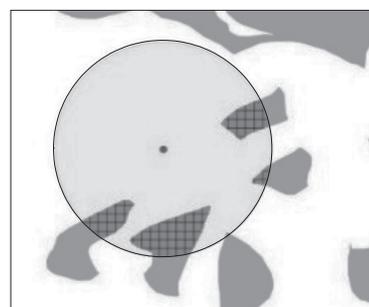


図1 GIS

テムである (図1)。本研究では、既知生息地3ヶ所 (岐阜市、揖斐川町、海津市) の環境をGISソフト (QGIS 2.14) 上で解析し、その分析結果を基に設定した岐阜県生息地条件を満たす地域を検索することで新規生息地を発見することを目指した。以下、手順を示す。

- ① 環境省生物多様性センターの岐阜県植生図 (vg_21a) の5つの植生 (「水田」、「水田雑草群落」、「休耕田」、「休耕田雑草群落」、「竹林」) を岐阜県の地図上にGISを利用して出力した。
- ② 生息地点の座標データを入力したExcelファイルを作成し、GIS上に表示、座標点を中心とした半径約500mの円を発生させた。
- ③ 作成した円内の5つの植生面積の割合を算出した (以下、植生割合) (図2)。



濃色部：5つの植生 網掛部：切り抜いた植生
図2 GISを用いた植生割合の算出

- ④ 生息地周辺の地形の様子を調査するため、同様に国土数値情報の標高傾斜度5次メッシュデータを出した。

⑤ ②の円でメッシュを切り抜き、平均標高、平均傾斜度、平均傾斜方向を算出した。

先行研究(高橋ら、2014)から、岐阜県のカスミサンショウウオは鈴鹿山脈を南に迂回し、濃尾平野南西部から分布を拡大したと考えられる。また、岐阜市、揖斐川町の両生息地は濃尾平野の外縁地域に存在している。そこで、今回は岐阜県西部の濃尾平野外縁地域12市町の地図上に半径約500mの円を規則的に発生させ、岐阜県生息地条件に該当する場所を植生割合±5%、±2%で検索した。さらに、地形条件として平均標高、平均傾斜度、平均傾斜方向を追加検索して生息候補地を特定した。

(2) 環境DNA

GISで絞り込んだ地点で採水し、環境DNA解析の結果を基に個体調査を展開することが新規生息地の迅速且つ効率的な発見につながると考えた。始めに岐阜市生息地で採水した水1Lを専用のガラスフィルターで濾過し、*Hynobius*属のmtDNA上の12S rRNAに共通のユニバーサルプライマー(富田、2016)を用いてPCRを行い、電気泳動解析にてカスミサンショウウオの環境DNAが検出可能かどうかを検討した。なお、検出は2系列で行った。ポジティブコントロール(PC)としてアクア・トトぎふのカスミサンショウウオの飼育水を、ネガティブコントロール(NC)として蒸留水を、環境水と同じ手順で処理し、コンタミネーションが起こっていないことを確認する方法(高原ら、2016)をとった。生息が確認されている岐阜市生息地内の3地点と岐阜市有地(高橋ら、2014)内の2地点で2016年1月中旬から約1週間おきに採水し、環境DNAによる調査の適正時期の特定を行った。さらに、調査地域には*Hynobius*属のサンショウウオが3種(カスミサンショウウオ、ヒダサンショウウオ(*Hynobius kimurae*)、コガタブチサンショウウオ(*Hynobius yatsui*))生息している可能性がある。これら3種のサンショウウオの脱皮殻からDNAを抽出し、12S rRNAとcytbの2座位についてPCR-RFLP法による簡便な種判別法を検討した。なお、cytbはカスミサンショウウオに特異的に開発されたプライマー(CBL181、CBH759 高橋ら、2014)を用いた。

海津市候補地の約500m円内の1地点で2016年10月に堆積物、2017年2月に環境水及び堆積物の環境DNA調査を行い、2017年2、3月に生態調査を行った。2017年8月にGISで絞り込んだ残りの4ヶ所の生息候

補地(岐阜市3地点、関市1地点)で環境水及び堆積物の環境DNA調査を行った。

(3) 標本の調査と地形図のGIS解析

過去の生息地で絶滅した理由を調べるため、岐阜県博物館の協力のもと、岐阜県内で捕獲されたカスミサンショウウオの標本を搜索し、過去に生息していた地点の特定を試みた。さらに、標本の産地と、1984年まで生息が確認されていた海津市羽沢(以下、絶滅生息地)の生息当時と現在の地形図等を岐阜県図書館で搜索した。その後、地形図をスキャニングし、専用のプラグイン(Georeferencer)を利用して地形図の画像データに座標情報(GCP:Ground Control Point)を付与し、GISソフトで対象区画上に地物を作成後、本文中第2章(1)①~③と同様の方法で植生割合を求め、生息していたと考えられる年代と現在の植生割合(水田、竹林)を比較した。

(4) 系統解析

2016年に発見された海津市の生息地、及び新規生息地の個体のハプロタイプ解析を行い、岐阜県のカスミサンショウウオの遺伝的多様性を検証した。なお、成体、幼生の脱皮殻からDNAを抽出し、高橋ら(2014)が開発したカスミサンショウウオcytbの特異的なプライマー(CBL656、CBH1070、CBH759、CBL181)を用いてPCRし、ダイターミネーター法で塩基配列の特定を行った。また、上記にて配列解析を行った岐阜県内の2地点のカスミサンショウウオの塩基配列情報を加えて、MEGA6を用いてNJ法により分子系統樹を作成し、高橋らの考察を検証した。なお、系統解析には、岐阜高校にて解析した岐阜県4地点(岐阜市3個体、揖斐川町2個体、海津市2地点1個体ずつ)、三重県2地点(松阪市2個体、津市2個体)、DDBJ(DNA Data Bank of Japan)上の三重県1地点(津市1個体)、滋賀県2地点(彦根市1個体、甲賀市2個体)、東山動植物園より提供して頂いた愛知県4地点(名古屋市3地点1個体ずつ、豊田市1個体)、長浜バイオ大学より提供して頂いた滋賀県2地点(米原市1個体、長浜市1個体)の塩基配列を利用した。

第3章 成果・考察 (Results and Discussion)

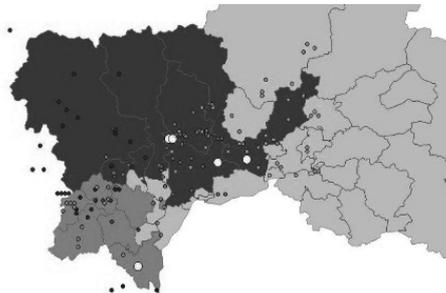
(1) GIS

GISを用いた既知生息地3ヶ所(岐阜市、揖斐川町、海津市)周辺の環境解析の結果(表1)、植生割合は岐

阜市生息地と揖斐川町生息地では約27%、海津市生息地では約12%、標高は約40~100m、傾斜度は約9~11°、傾斜方向は南東方向であると算出された。植生割合に2種類の傾向が見られたため、岐阜県生息地条件を地域ごとに設定し、植生割合については岐阜市、揖斐川町を含む岐阜県西部地域では27.1±5%、海津市を含む岐阜県南西部地域では11.9±5%とし、生息候補地を検索した。検索の結果、340ヶ所生息候補地が得られた。さらに詳しく候補地を絞るため、植生割合を岐阜県西部地域では27.1±2%、岐阜県南西部地域では11.9±2%と設定した。地形条件については全ての地域で標高100m以下、傾斜度7~13°、傾斜方向は南東と設定した。GIS解析の結果、生息候補地を岐阜市で3ヶ所、関市で1ヶ所、海津市で1ヶ所特定した(図3)。

表1 既知生息地3ヶ所の解析結果

	植生割合 (%)	標高 (m)	傾斜度 (°)	傾斜方向
岐阜市	27.27	55.88	9.79	南東
揖斐川町	27.00	98.96	11.00	南東
海津市	11.90	41.68	9.30	南東



白円：生息候補地 その他の円：植生割合を満たす円
 ■：岐阜県西部地域 ■：岐阜県南西部地域

図3 岐阜県生息候補地

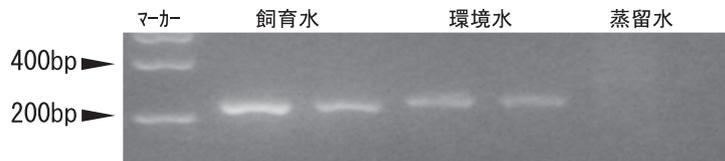


図4 電気泳動像(岐阜市生息地)

表2 調査適正時期の解析

	1/14	2/4	3/11	3/18	4/5	6/17	7/1	7/14	8/9
岐阜市有地①	-	-	-	-	+	++	+	-	-
岐阜市有地②	+	+	++	++	+	+	+	+	/
岐阜市生息地①	+	++	++	++	+	++	+	++	/
岐阜市生息地②	+	++	++	++	+	++	+	++	/
岐阜市生息地③	+	++	++	++	+	++	+	+	+

＋の数：電気泳動のDNAバンドの濃さ
 塗りつぶし枠：成体、卵囊、幼生のいずれかの発見を示す

(2) 環境DNA

環境DNAについては、PC、岐阜市生息地の環境水ともに約300bpのDNAバンドを確認し、NCからはバンドが検出されなかった(図4)。配列解析の結果、これらのバンドはカスミサンショウウオの12S rRNA(290bp)であった。

表2は採水した日付ごとに環境DNA中の12S rRNAの電気泳動解析のバンドの濃淡を示している。6月17日は各地点で濃いバンドが検出されているが、これは数日前の放流会(高橋ら、2014)により個体数が増加したためである。どの場所でも濃いバンドが検出された3月上旬~下旬が調査の最適期であることが判明した。

各遺伝子の制限酵素地図から12S rRNAについてはScaI、cytbについてはMspIで種判別が可能であると特定した(図5)。PCR-RFLP解析の結果、ScaIで処理した12S rRNAは、カスミサンショウウオ(290bp)では211bpと79bp、ヒダサンショウウオ(290bp)では212bpと78bpのバンドが確認され(図6)、MspIで処理したcytbはカスミサンショウウオ(615bp)で450bpと165bpのバンドが見られた(図7)。これらの結果の組み合わせを利用して、本研究で検出したHynobius属の環境DNAのバンドはカスミサンショウウオに由来するものであることが特定できた。

2016年10月、GISで特定した5ヶ所の候補地の1つである海津市候補地内で、堆積物を採取し、環境DNAの検出を試みた。その結果、岐阜市生息地と同様に約300bpのDNAバンドを確認した(図8)。環境水中よりも堆積物中の環境DNAは長期間にわたって検出できるといわれている(山中ら、2016)。2017年2月、同地

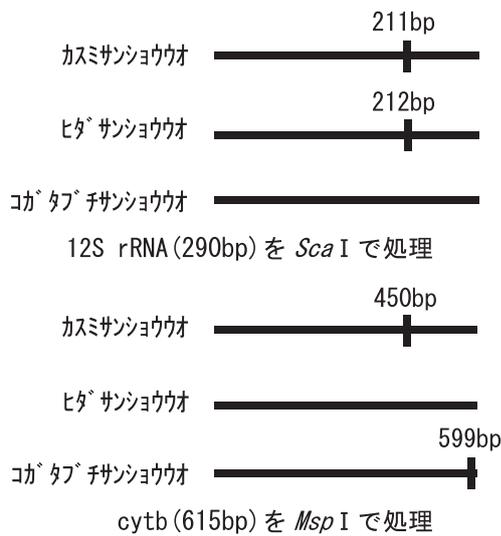
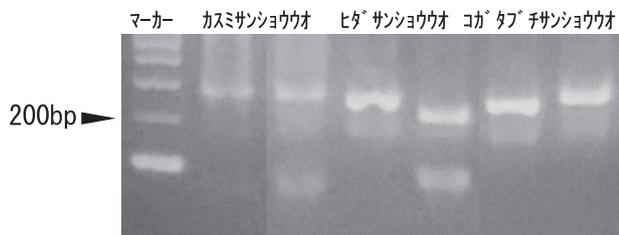
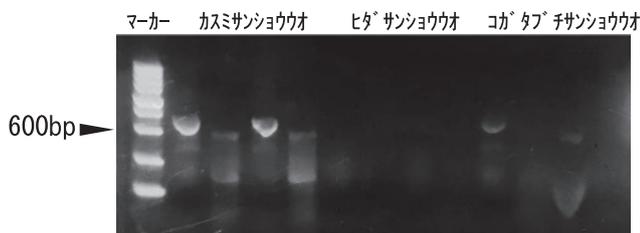


図5 制限酵素切断地図



左:未処理 右:処理済
図6 *Sca* I 処理結果 (12S rRNA)



左:未処理 右:処理済 解析を2系統で行った
図7 *Msp* I 処理結果 (cytb)

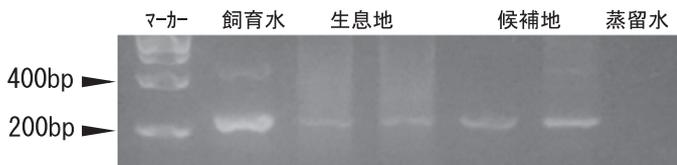


図8 電気泳動像 (海津市候補地)

点で調査を行い、採水した環境水より環境DNAの検出を試みたところ、約300bpのバンドが検出された(図は未掲載)。これらの結果は、候補地にカスミサンショウウオが生息する確かな証拠である。2017年3月、2月に採水し環境DNAを検出した地点で個体調査を行ったところ、カスミサンショウウオの卵囊1対を発見した(図9、10)。図13中の点線部は卵囊を示す。発見した卵囊は、岐阜高校で継続して11年間行われている保護活動(高橋ら、2014)の一環として2017年6月23日に、保護



図9 新規生息地

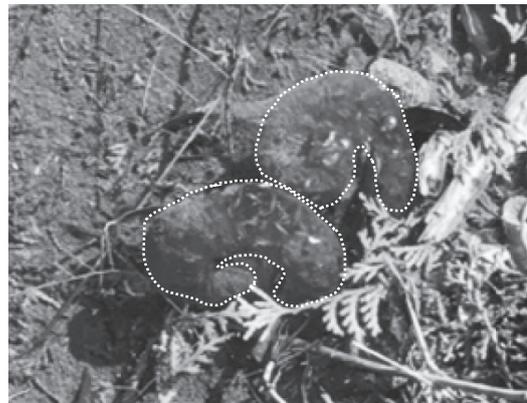


図10 発見された卵囊

した地点と同じ地点に上陸前幼生を151匹放流した。

2017年8月に採取した環境水では岐阜市1地点、関市1地点で約300bpのDNAバンドを検出した(図11)。

(3) 標本の調査と地形図のGIS解析

岐阜県博物館で標本調査を行った結果、1977年に各務原市、1988年に揖斐郡谷汲村(現揖斐川町)で捕獲された標本を発見した(図12、13)。

岐阜県図書館では各務原市、揖斐郡谷汲村、及び絶滅生息地(海津市羽沢)周辺の地形図などを検索し、1909~2016年の地形図、土地利用図を合計50枚発見した。このうち、標本捕獲の正確な場所が判明している揖斐川町の標本産地と、絶滅生息地について、GISを用いた地形図の植生割合の比較を行った。標本産地では1983年と2016年、絶滅生息地では1977年と2016年の地形図(図14上)を用いて解析を行った(標本が発見される以前の年代と最新のもの)。解析の結果、植生割合は標本産地では33.86%(1983年)から26.04%(2016年)(揖斐川町の図は未掲載)、絶滅生息地では16.80%(1977年)から8.04%(2016年)に減少していた。また、同時期の航空写真(図14下)を

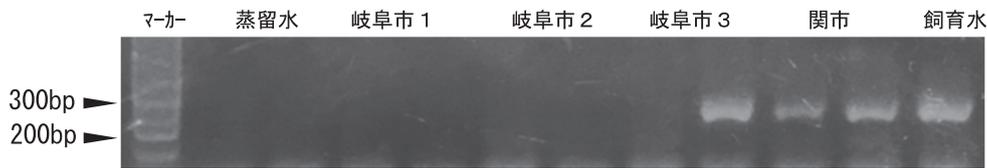


図11 電気泳動像（岐阜市候補地3地点、関市候補地1地点）



図12 各務原市標本



図13 揖斐川町標本



左上：1977年の地形図 右上：2016年の地形図
 左下：1964年の航空写真 右下：2009年の航空写真
 円：絶滅生息地を中心とした半径約500mの検索対象
 図14 海津市絶滅生息地周辺の地形図と航空写真

比較すると両地域とも水田が埋め立てられていることが分かった。今回の解析結果より、生息地周辺の水田は宅地化が進み、水路はU字溝になり、道路が舗装されたことなどにより土壌中の含水量が低下し、湿地全体が乾燥したことが絶滅の原因だと考えられる。

(4) 系統解析

配列解析の結果、2016年に発見された海津市のカスミサンショウウオは岐阜市、揖斐川町とは異なるハプロタイプであることが分かった。また、解析した13個体は全て同じハプロタイプであった。さらに、今回発見した新規生息地のカスミサンショウウオを配列解析した結果、2016年に発見された海津市生息地の個体と同じ配列であった。両地点は直線距離で約4km離れていることから、元々は同じ個体群であったものが生息域の減少に伴い個体数を減らし、生息地が分断されたと考えられる。本研究により、海津市個体群の遺伝的多様性の低さが明らかとなった。

海津市個体群の塩基配列を加えて東海地方のカスミサンショウウオのcytb (909bp) の系統樹を作成した結果(図15)、海津市個体群のハプロタイプは岐阜市や揖斐川町個体群と近縁だとわかった。逆に彦根市や米原市個体群とは遺伝的に離れていることから、海津市個体群は三重県方面から侵入したと考えられる。この結果は、高橋ら(2014)の考察を確証に導くものとなった。

第4章 結論 (Conclusions)

本研究ではGISの候補地の絞り込みと環境DNA調査を併用した世界初の手法で、希少種であるカスミサンショウウオの新規生息地をごく短期間で発見した。本手法は従来の生態調査の経済的、物理的な問題点への対処を備える革新的なものである。また、水環境に関係する多くの生物に応用可能であり、幅広く活用できると考えている。この成果は希少種の保護を志す人々に大きな希望を与えるものとなった。しかし、新規生息地には卵嚢が1対しかなく、早急な保護活動の展開の必要性を感じた。また、山際にある産卵場の水路は、清掃活動の影響により、放流時には水たまりが消滅していた。そのため、今後、産卵場の整備だけではなく、非繁殖期に生息している森林や竹林とそれらをつなぐ水辺エコトーンなど周辺環境の保全にも着手し、海津市や周辺住民の方々へ啓発活動を行い、地域一体型の保護活動を進めていきたい。さらに、本研究の環境DNA調査は、岐阜市と関市にも潜在生息地が存在している可能性を示した。また、標本調査から、岐阜県内にはかつて多くの場所でカスミサンショウウオが生息していた可能性が示された。様々な人為的な影響により、生息に

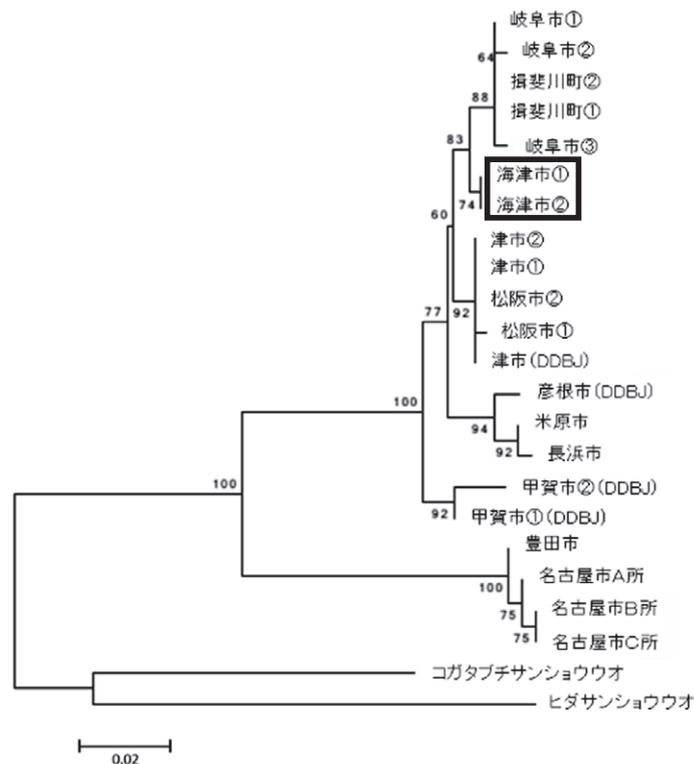


図15 分子系統樹

必要な水域、水辺エコトーン、陸域の荒廃や分断が起
こり、今日のような状況になってしまったと考えられる。
人知れず生息している希少生物を発見し、共生を図る
ことが生物多様性の維持と保全につながると考える。

また、本研究では、標本や地形図を用いて、過去と現
在の生息地周辺の環境の変化とカスミサンショウウオ
との関わりについて考察した。自然史標本は再現する
ことのない、ある時点での自然現象を記録した‘もの’
であって、新たな発見が見込まれる情報の塊である(斎
藤、2013)。歴史的価値のある標本、生物の存在を示
す標本が多く眠っている可能性が本研究により示唆さ
れた。また、GISを用いた地形図の解析より、過去の地
形図は植生の変遷を知るうえで価値があることが示さ
れた。今後、幅広い年代の地形図を用いて、カスミサン
ショウウオの生息環境の遷移をたどりたい。気象、人
間活動といった異なる要因をGISで総合的に解析する
ことで、カスミサンショウウオの個体群縮小や絶滅へ
の原因を追究していきたい。今後、調査対象を拡大し、
岐阜県内の希少生物の保護に役立て、地域の生物多様
性の保全に貢献していきたい。

第5章 参考文献 (References)

1) 高木雅紀ら (1991) 岐阜県止水性サンショウウオに
ついて、爬虫両棲類学雑誌14 (2) :91

- 2) 環境省生物多様性センター <http://gis.biodic.go.jp/webgis/sc-023.html>
- 3) 国土交通省国土数値情報 <http://nlftp.mlit.go.jp/ksj/gml/datalist/KsjTmplt-G04-d.html>
- 4) 高橋晃太郎ら (2014) 守れ! ふるさとのカスミサンショウウオ ~保護活動と遺伝的多様性の解析~, 2014日本ストックホルム青少年水大賞【優秀賞】:102-108
- 5) 富田勢(2016) 環境DNA分析手法を用いたサンショウウオ属の検出法の開発、神戸大学人間環境学科自然環境論コース卒業論文
- 6) 高原輝彦ら (2016) 環境DNA分析の手法開発の現状~淡水域の研究事例を中心にして~, 日本生態学会誌66 (3) :583-599
- 7) 須貝俊彦 (2012) 養老断層の断層活動に伴う断層崖麓扇状地の形成、2012年秋期学術大会日本地理学会発表要旨集
- 8) 山中裕樹ら (2016) 環境DNA分析の野外調査への展開、66 (3) :601-611
- 9) 斎藤靖二 (2013) 自然史標本の意義について、日本古生物学会誌 化石93:131-135