様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２２年　５月　７日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2009
課題番号：19510238
研究課題名（和文）　イボイモリの遺伝的多様性の解明とその保全

研究課題名（英文）　Elucidation of genetic diversity of *Echinotriton andersoni* and its conservation

研究代表者
本多　正尚（HONDA MASANAO）
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：60345767

研究成果の概要（和文）：中部琉球の固有種で絶滅危惧種に指定されるイボイモリの分布状況を調べ，各個体群内および個体群間の遺伝的多様性をミトコンドリア DNA の変異から評価した。その結果，沖縄諸島と奄美諸島の個体群間での大きな遺伝的分化を示すこと，沖縄島北部，中部，本部半島の個体群では地域ごとに遺伝的なまとまりを示さないこと，沖縄島南部の個体群は，同島内より渡嘉敷島に近縁であること等が明らかになった。また，沖縄島南部個体群内では遺伝的多様性を欠落していた。

研究成果の概要（英文）：Distribution and intra- and inter-populational genetic diversities of the Anderson's crocodile newt, *Echinotriton andersoni,* were investigated by field observations and by variation of mitochondrial DNA genes, respectively. Results indicated a relatively large genetic differentiation between populations of Amami and Okinawa Groups, non-monophylies of northern, central and peninsular populations of Okinawajima, and a closer relationship of southern Okinawajima population with Tokashikijima population than with other Okinawajima populations. Our results also suggested a genetic uniformity of southern Okinawajima population.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総　計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：複合新領域
科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学
キーワード：環境保全，多様性，琉球列島，両生類，イモリ科，遺伝子

１．研究開始当初の背景

大陸から海峡によって隔てられた琉球の島嶼は，両生類や爬虫類等の陸棲生物にとって効果的な隔離の場となり，多くの固有生物が少数の小個体群として分布する保全上非

常に重要な地域である。その一方で，近年の開発よる生息地の減少，移入生物による生態的・遺伝的撹乱，違法な商取引等により多くの生物の存続が懸念されている。しかしながら，真の保全の対象となるべき個体群の検出やそれらの多様性の評価に関しては研究が非常に遅れていた。

このような状況の中，申請者らの研究で，中部琉球に固有のクロイワトカゲモドキが，同一亜種内の島嶼間で大きく遺伝的に分化していること，さらに単一島嶼内の個体群間でも遺伝的に大きく分化し，尚且それらが単系統群にならない場合があることが明らかになった（Ota et al., 1999; 太田・本多, 2000）。これは，同一種・亜種内あるいは単一島嶼内に保全の対象となるべき進化的に独立な個体群が複数存在することを強く示唆している。その一方で，リュウキュウヤマガメやセマルハコガメの分析では，島嶼個体群内・間の遺伝的変異が極めて低いことが明らかになった（Honda et al., 2002b; 太田他, 2003）。これは，両種が遺伝的多様性に乏しく，環境変動に対する抵抗性が個体数から予想される以上に弱いことを強く示唆している。さらに，類似した分布パターンと極めて高い遺存固有性を共に有するクロイワトカゲモドキとリュウキュウヤマガメが，全く異なる遺伝的分化のパターンを示したことは，ある１つの種内で見られた分化パターンが他種には全く当てはまらない場合があることを示している。すなわち，各種の各個体群ごとの詳細な遺伝的多様性の調査の必要性を強く示唆している。

そこで，こうして得られた知見や手法を琉球列島に分布する他の両生類や爬虫類に応用して研究を進めていたところ，沖縄県にて大規模な開発によりイボイモリの生息・繁殖場所が大きく失われる危険性が判明し，県全体での緊急調査が実施された。しかし，遺伝的な分析は行われず，またもう１つの主要な産地である鹿児島県では調査すら予定されてなかった。特に鹿児島県の奄美大島は個体数が非常に少ないことが報告されていたが，本種の天然記念部指定が遅れたため，個体群の存続の危機が懸念されていた。したがって，本種の適切な保全に必要な分布状況や個体群内あるいは個体群間の遺伝的多様性に関する情報を収集し，適切な保全対策を検討することは急務であった。

２．研究の目的

本研究の対象となるイボイモリ *Echinotriton andersoni* は，沖縄諸島の沖縄島，瀬底島，渡嘉敷島，奄美諸島の奄美大島，徳之島，請島だけに分布し，沖縄・鹿児島両県から天然記念物，環境省から絶滅危惧II類に指定されている。単に保全面ばかりでなく，極めて高い遺存固有性から，その存在は陸橋期以降の琉球列島の古地理，古環境と強く結びつき，琉球列島の地史を解明する上で，多くの情報を提供すると考えられている。同時に本種は，陸上に産卵し，産卵場所には雄がほとんどみられないという特異な繁殖生態をもつことから，有尾両生類の繁殖戦略を議論する上でも重要な資料を提供すると考えられている学術上きわめて貴重な種である。

しかしながら，森林伐採等による生息地の減少，産卵場所となる池等の埋め立てやティラピア・アメリカザリガニ等の放逐による卵や幼生の捕食，繁殖移動のため道路を横切る個体の交通事故死や側溝での落下死等，個体群の存続を脅かす要因はきわめて多い（e.g., 田中, 2005）。特に沖縄島南部個体群は，遺伝的な調査，それに基づく保全対策がなされないまま，近年の人為的な環境悪化のため，目撃例の減少・喪失が急激に減少し（太田・小原, 2004），このまま放置すれば個体群レベルでの絶滅や遺伝的多様性の消失が懸念されている。また，奄美大島についても，もともと個体数が少ないことが報告されていたが，天然記念物指定の遅れ，近年の開発，移入種の分布拡大等，極めて危機的な状況にある。近年分布が確認された請島に関しても，生息状況は不明だが（太田, 2003），島嶼の面積等から個体数が極めて少ないと予想され，保全上の調査・対策が急務である。

そこで，本研究では各島嶼個体群の多くの個体の DNA の変異を調べ，各個体群内・間の多様性や遺伝的分化，およびそれらの系統遺伝学的な関係を分析する。本研究が目的とする主な事項は，各島嶼個体群あるいは単一島嶼内の地域個体群を保全上１つの単位としてまとめて扱うべきか，それともそれぞれを個別の単位として扱うべきかを議論するため（e.g., Moritz, 1994; Karl and Bowen, 1998），各個体群間の遺伝的分化や系統関係を推定すること，それぞれの個体群において環境に対する適応力を予測するため（Loeschcke et al., 1994），各個体群内の遺伝的分化の程度や集団内構造を解析すること，本種も含めた琉球列島の両生類・爬虫類の生物地理や多様性の進化を解明することである。また，分布域や個体数等の基礎的なデータも不足しているので，野外調査の際にこれらの現状の把握にも努める。

３．研究の方法

イボリモリの沖縄諸島の 21 個体群合計 67 個体，および徳之島と奄美大島の 1 個体ずつを分析に用いた。比較のため，これまで公表されているイモリ類 37 種のデータも用いた。

ミトコンドリアDNAのチトクロームｂの全配列およびtRNAの一部約1,200塩基，および一部の個体については12S rRNAと16S rRNAの部分配列合計約800塩基対を，プライマープライマー L1091・H1478・L2606・H3056・L1401・L14707・H14778・ L14841・H15149・H15289（Kocher et al., 1989; Hedges et al., 1993; Matsui et al., 2007）を用いて， PCR−ダイレクトシークエンス法によって塩基配列を決定した。

系統推定に関しては，ベイズ法（MrBayes 3.12: Huelsenbeck and Ronquist, 2001）を用いた。モデルは，MrModeltest 2.2（Posada and Crandall, 1998）で最も高い尤度を与えたGTR+I+gammaモデルを用いて1,000,000回の計算を行い，最初の一割を分析から除いた。Nested Clade Analysis （NCA)を，AneCA（Panchal, 2007）を用いて行い，Templeton（2004）に従って解釈した。年代推定は，Weisrock et al.(2001)とRocha et al.（2005）に従い，1 MY=1.28-2.0%とした。尚，系統推定にはNCAの第二段階クレイドの中から他の同段階のクレイドから最も置換した1個体のみを使用した。

これと並行して，2010年春の繁殖シーズンに奄美大島と請島において，2月15日から2月18日，3月4日から3月8日，3月28日から3月30日，合計12日間の分布調査を行った。本種は陸棲傾向が極めて強く，繁殖シーズンに繁殖となる水場付近で観察する以外はほとんど目撃することができないため，短期の調査となった。沖縄県の調査については，2007年から2008年にかけて継続して成体の他に幼生の確認作業も行った。

尚，本研究にあたっては，沖縄県および鹿児島県からの現状変更許可に基づき適切に行われている。

４．研究成果

（１）奄美諸島と沖縄諸島の間での遺伝的分化

チトクロームｂとtRNAの一部合計1,211の塩基配列を決定した。同属他種間の遺伝的変異は，70塩基（*Pachytriton brevipes* vs. *P. labiatus*)から 182塩基（*Cynops ensicauda* vs. *C. orphicus*）となり，イボイモリとチンハイイボイモリ *Echinotriton chinhaiensis* の間では124-130塩基だった。これに対し，イボイモリの沖縄諸島と奄美諸島の個体群間の変異は，70-80 塩基となり，一部の種間の値より大きいことが示唆された。

この領域のベイズ法による系統解析では，原始的なイモリ類が単系統群を形成し，その中で *Echinotriton* とこの属を含めることがある *Tylototriton* （Zhao and Hu, 1984; Hayashi and Mastui, 1989）が姉妹群になった。*Echinotriton* 内では，イボイモリとチンハイイボイモリに二分岐した。これらの間の分化年代を推定すると，830-530 万年前となった。比較データのある 12S rRNA と 16S rRNA の中部琉球と大陸の同属他種間の遺伝的変異は，同じように遺存固有種と考えられているリュウキュウヤマガメで5.6%，クロイワトカゲモドキで 16.3%だったのに対し（Honda et al., unpubl. data)，本種では4.7%となった。

イボイモリ種内では，まず沖縄諸島と奄美諸島の個体群に分岐し，この分化年代は490-310 万年前と推定された。今回の年代推定では早めの分子時計も仮定しているが（2.0%: Rocha et al., 2005)，それでも沖縄諸島と奄美諸島の間の本種の分化は，アロザイム分析（Hayashi et al., 1992）が想定した更新世の諸島間での海峡形成に対応したものよりも古い可能性が高い。

奄美諸島内では，奄美大島と徳之島の個体群間は比較的小さな分化を示した。一方沖縄諸島内では，島嶼毎で必ずしも排他的にまとまらず，沖縄島中・北部（本部半島，瀬底島も含む）と沖縄島南部と渡嘉敷島の個体群に分かれ，前者内では遺伝的変異が大きかった。前者と後者の分化年代は，120-73 万年前と推定された。これらのことは，沖縄諸島内での分化が現在の海峡とは異なる障壁による分断に起因することを強く示唆している。

（２）沖縄諸島内での分化

沖縄諸島内では，島嶼毎で必ずしも排他的にまとまらなかった。ベイズ法による系統解析では，地域として 95%以上の確率でクラスターを形成したのは，沖縄島南部と渡嘉敷島の個体群であり，これらの地域の個体群はさらに姉妹群を形成した。Nested Clade Analysis（NCA）における上位クレイドでは支持されていないが，ネットワーク樹でも，同様の関係は支持され，沖縄島南部と渡嘉敷島の個体群とそれ以外の塩基置換数が最も大きくなっていた。この分化年代は上で述べたように 120-73 万年前と推定され，本種の沖縄諸島での最初の分化は，島嶼間で起こったのではなく，更新世に沖縄島中部以北で分化していたものの一部が南部へ侵入して分化することによって起こったと考えられる。また，沖縄島南部と渡嘉敷島の個体群の分化年代は約 52-33 万年と推定され，この時期まで，おそらく更新世に海面が下降して陸続きになったときに，沖縄島南部と渡嘉敷島で遺伝的交流が続き，その後二つ地域の集団に分化したと思われる。

沖縄島中部以北の地域は，ベイズ法による系統解析では，十分な支持確率は得られてい

ないが，本部半島，瀬底島，沖縄島中部は比較的近い関係にあったのに対し，ヤンバル北部は二群に大別された。これはヤンバルの個体群間での分化が比較的古く起こったこと，その後沖縄島中部，本部半島，瀬底島も含めた地域間での個体の移動が少なからず起こったことを示唆する。

（3）奄美大島および請島での分布

奄美大島の個体群については，宇都宮（1996）が主に 1979 年から 1983 年の調査を基に分布が確認された産地名を記載し，生息数が少ないことを述べている。しかし，宇都宮（1996）で記された 1993 年の 1 地点での幼生の確認以降，産地の公表された報告がなかった。その一方で，鹿児島県でのイボイモリの天然記念物指定の遅れ（沖縄県で 1978 年に県の天然記念物として指定されたのに対し，鹿児島県での指定は 2003 年），マングースの奄美大島での分布域の拡大，近年の開発等，陸棲小動物に壊滅的な影響が与えられており，本種についても深刻な個体数の減少が予想されていた。

また請島については，近年分布が証拠写真とともに私信として報告されているに過ぎず（太田，2003），島の面積から予測される環境収容力も少ないので，本種の個体数も極めて少ない，あるいは絶滅さえ予想されていた。

本調査では，幸運にも，奄美大島の 4 地点において，イボイモリの生体の分布を確認することができた。しかしながら，個体数に関しては，沖縄島や徳之島に対して，著しく少ないと判断され，極めて危機的状況にあることが推測された。

また，請島の調査では，3 個体の生体を採集することができた。分布地に詳細な情報に関しては，保全上の理由から割愛する。

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）

〔学会発表〕（計３件）

①本多正尚・富永篤・田中聡・松井正文・太田英利，沖縄諸島におけるイボイモリ（両生綱，イモリ科）の遺伝的変異: ミトコンドリア DNA の塩基配列にもとづく評価，第 46 回日本爬虫両棲類学会，2007 年 11 月 17-18 日，琉球大学（西原）．

②本多正尚・富永篤・田中聡・松井正文・太田英利，沖縄諸島におけるイボイモリ（両生綱：イモリ科）の系統地理，第 47 回日本爬虫両棲類学会，2008 年 10 月 25-26 日，栃木県総合教育センター （宇都宮）．

③本多正尚・富永篤・田中聡・松井正文・太田英利，沖縄諸島と奄美諸島の間でのイボイモリ（両生綱，イモリ科）の遺伝的分化，第 48 回日本爬虫両棲類学会，2009 年 11 月 7-8 日，天理大（天理）．

６．研究組織

(1)研究代表者

本多　正尚（HONDA MASANAO）

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：60345767