

岐阜県に生息する溪流性サンショウウオの生息適地モデルの作成と系統解析

岐阜県立大垣北高等学校 自然科学部サンショウウオ班

竹内啓太・綴喜美慧・白木瑛翔・篠原菜々華・田中遼・川瀬幸貴・浅野公聖・鹿野龍浄
・長沼大雅・小林祥大・瀬口大翔

1. はじめに

大垣北高校自然科学部サンショウウオ班は、これまで大垣市に生息するマホロバサンショウウオの生活史や、同所的に生息するヒダサンショウウオとのハビタット特性の違いなどを、大垣市内の生息地を中心に研究を行ってきた。

さらに、私たちは調査範囲を岐阜県内全域に広げて、両種の分布状況や生息環境について、詳細に知りたいと考えた。

そこで、マホロバサンショウウオとヒダサンショウウオの岐阜県内の分布状況の調査を行い、MaxEnt モデル (Niwa et al. 2022) を用いて、生息適地モデルの解析とそれぞれの種の分布の特性を決定する環境要因についての予測を行った。また、マホロバサンショウウオについては、分布調査の際に得られた微量組織切片から DNA を抽出し、地理的な遺伝集団構造の解明を試みた。



図 1: 上段はマホロバサンショウオ、下段はヒダサンショウウオ (いずれも大垣市)

2. 分布調査

2-1. 目的

2 種のサンショウウオの分布状況や生息環境を調べるために、どこに生息しているかを実際に生息が予想される場所を踏査して生息を確認し、生息地の位置情報を得る分布調査を行った。

分布調査で見つかった個体から、尾部の微量組織サンプルを採取して、DNA の解析にも利用した。

2-2. 方法

マホロバサンショウウオは夏の高温時や冬の低温時は、地中深く潜っていて発見が難しいため、春と秋を中心に生息の可能性がある山地を中心に踏査をし、成体または幼体の発見に努めた。ヒダサンショウウオについては、成体は繁殖期以外での発見が困難なため、2~3 月の繁殖期と溪流中に幼生が見られる 5~8 月に、生息の可能性がある山地の溪流周辺を踏査した。

学校の近隣地域はできるだけ私たち生徒で手分けをして調査を行ったが、遠方地域については、顧問の先生の手を借りて分布調査を行った。生息確認地点の緯度経度情報を記録して分布図を作成するとともに、生息確認地点の地理情報や環境情報は後の MaxEnt モデルを使った研究に使用した。

2-3. 結果

マホロバサンショウウオとヒダサンショウウオの生息確認地点を図 2 に示す。マホロバサンショウウオは 36 地点で、ヒダサンショウウオは 89 地点で確認した。

2-4. 考察

マホロバサンショウウオは県の中央部よりも南で確認され、ヒダサンショウウオは県の南部（平野部）を除いた全域で確認された。また、マホロバサンショウウオに比べて、ヒダサンショウウオはより寒冷的な地域、標高の高い地域で発見される傾向があったが、生息場所の地理的要因や環境要因については、MaxEnt モデルを使った生息適地の解析に使用し、そちらで詳しく記述する。

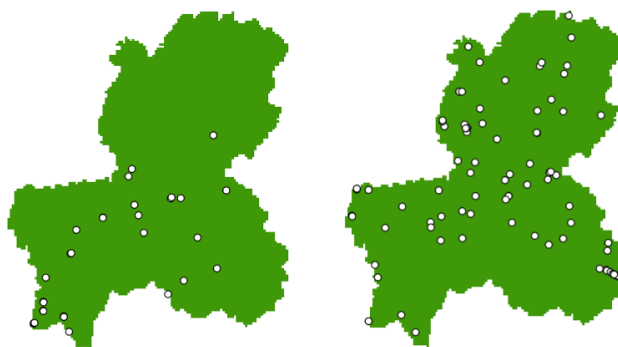


図 2:2 種のサンショウウオの岐阜県内での分布
(左がマホロバサンショウウオ, 右はヒダサンショウウオ)

3. MaxEnt を用いた生息適地の解析

3-1. 目的

マホロバサンショウウオは岐阜県版レッドリストで『絶滅危惧Ⅱ類』, ヒダサンショウウオは『準絶滅危惧』に指定されているが, 分布情報だけではなく, どういった環境に生息しているかという基礎的な情報が岐阜県内では皆無である。そのため, 保全活動を行おうとしても, その方針を立てることができない。そこで, 分布調査の結果で得られた生息地点の位置情報の地理的要因や環境要因を MaxEnt モデルを使用して解析し, 2 種のサンショウウオがどういった環境に生息するのかを予測した。

3-2. MaxEnt モデルについて (Phillips, S. J, Anderson. R. P et al. 2006)

MaxEnt モデルは生物の分布を, その生物が確認された場所の位置データ (在 データ) を基に, その場所に関するさまざまな地理的要因, 環境要因の値から, その生物 が存在する確率を環境要因ごとに評価する統計学的手法である。マホロバサンショウウオとヒダサンショウウオの生息適地モデルを作成し, 比較することで両者の好む環境要因がより鮮明に予測できると考える。

3-3. 方法 (Niwa K, Tran DV, Nishikawa K. 2022)

3-3-1. 位置情報 (在データ)

前章 (2. 分布調査) で得た生息地点の緯度経度情報を位置情報 (在データ) として使用した。

3-3-2. 環境要因と地理的要因

用いた環境要因と地理的要因のデータは, 2 種のサンショウウオの生息に影響を与えと考えられる年平均降水量, 年最深積雪, 年平均気温, 平均傾斜角度, 平均標高, 1 km²内森林面積の 6 つを用いた (表 1)。これらはすべて国土数値情報気象 3 次メッシュ情報を使用した (国土数値情報ダウンロードサイト <https://nlftp.mlit.go.jp/ksj>)。

表 1:解析に用いた環境要因と地理的要因

呼称	調査データ	最小単位
降水量	年合計降水量	0.1mm
積雪量	年最深積雪	1cm
気温	年平均気温	0.1℃
傾斜	平均傾斜角度	1°
標高	平均標高	1m
森林面積	森林面積	1m ²

3-3-3. QGIS を用いた解析

6 つの要因と分布情報の関係を地理情報システムの QGIS (QGIS ダウンロードサイト <https://qgis.org/ja/site>) と重ね合わせた。

3-4. 結果

6 つの要因と分布情報を重ね合わせた図を図 3 に示す。また、2 種のサンショウウオの生息適地モデルを図 4 に、6 つの各要因の寄与率を示すグラフを図 5 に示す。図 3, 4, 5 からマホロバサンショウウオでは年平均気温と平均標高の寄与率が高く、ヒダサンショウウオでは平均傾斜角度の寄与率が他の要因に比べて高いことがわかる。

3-5. 考察

マホロバサンショウウオは、平野部と山地の間の丘陵帯（標高約 700m 以下）に生息し、高標高と相関が高いと考えられる低温の地域（標高と気温の間の相関係数は 0.95）では生息確率が低いと考えられる。また、マホロバサンショウウオは溪流中で産卵するのではなく、伏流水中で産卵するため、低標高の場所で湧き出る伏流水の中に入って繁殖するという生活史を営んでいると考えられる。

ヒダサンショウウオは、高標高、低温、多積雪（標高と気温の相関係数は 0.95、標高と積雪の相関係数は 0.53）である地域に生息している傾向が強く、マホロバサンショウウオに比べて、より寒冷地に適応した種であることが推測できる。また、傾斜が大きな寄与率を示しているのは、流れが急な溪流中で繁殖するという生活史を営んでいるためだと考えられる。森林面積が高い寄与率を示さなかったことは、今回の調査の生息確認地点がすべて繁殖が行われている溪流周辺であったためではないかと考えられ、成体の生息には良好な森林は必要である。

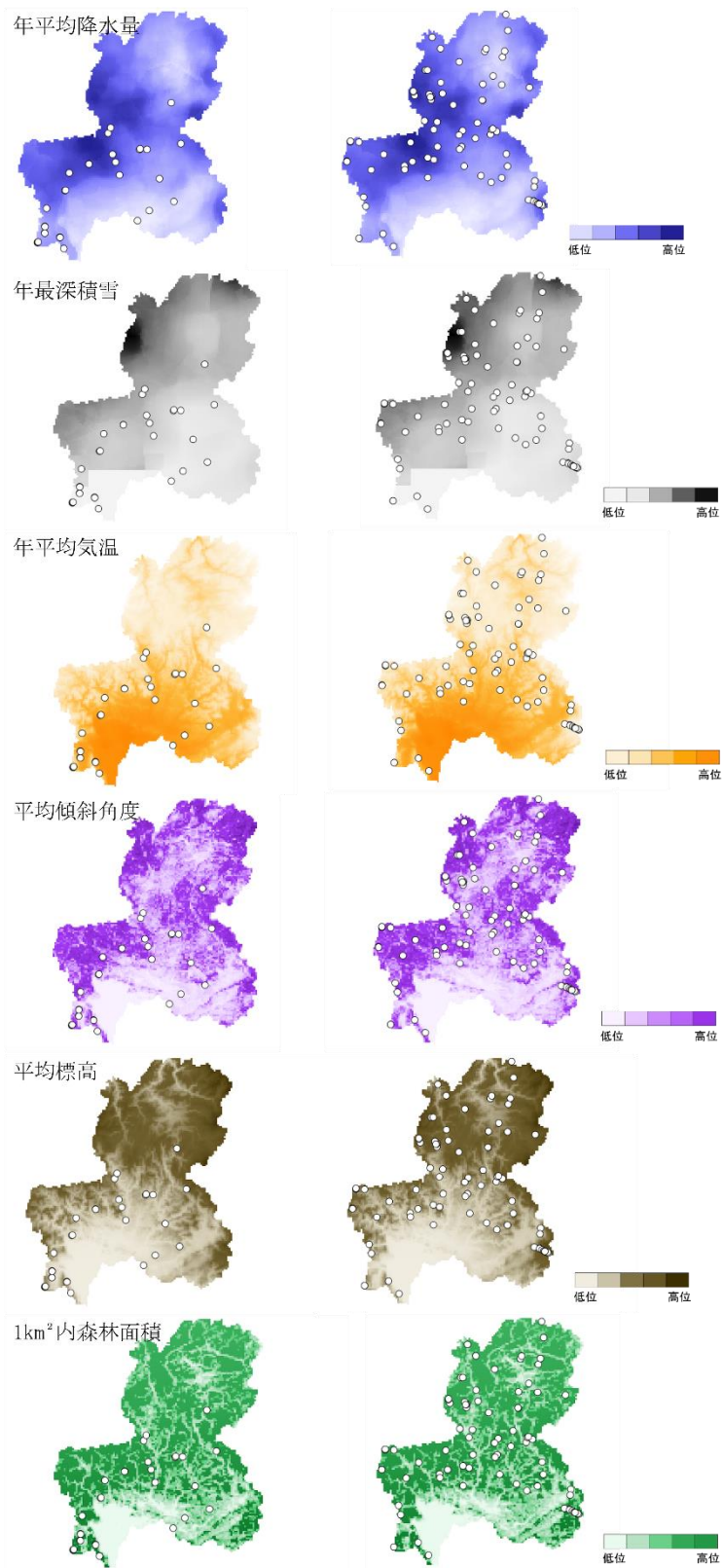


図 3: 6 つの各要因と分布情報（左がマホロバサンショウウオ、右がヒダサンショウウオ）

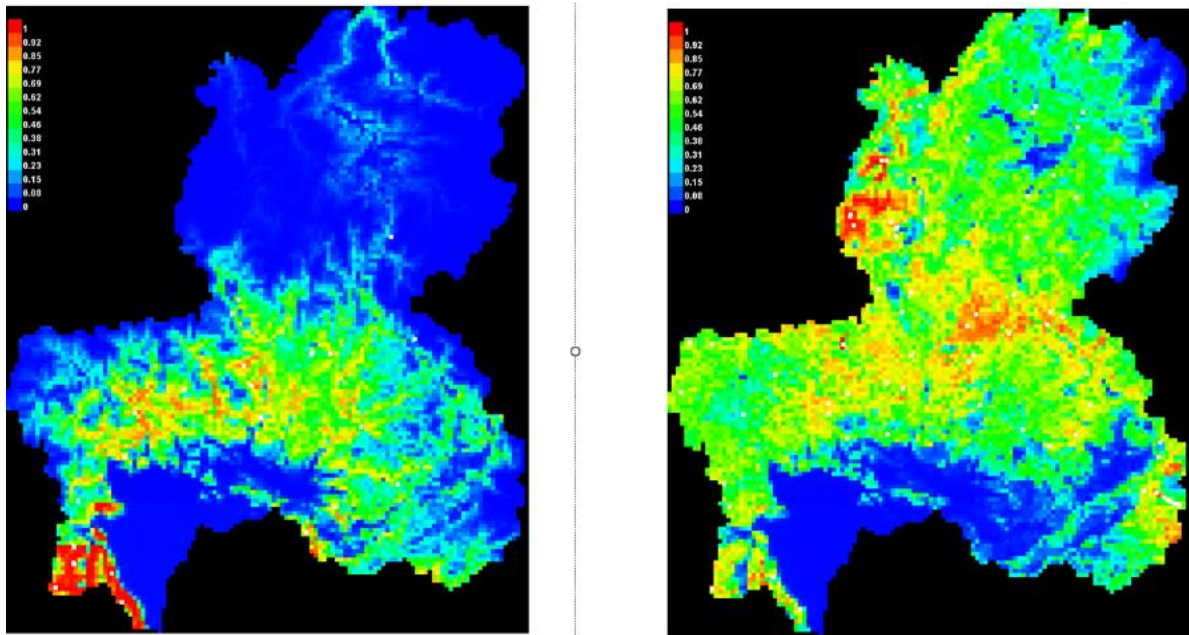


図4：MaxEent による生息適地モデル
 左がマホロバサンショウウオ、右がヒダサンショウウオ
 色がより赤い程生息に適している地域（生息確率の高い地域）

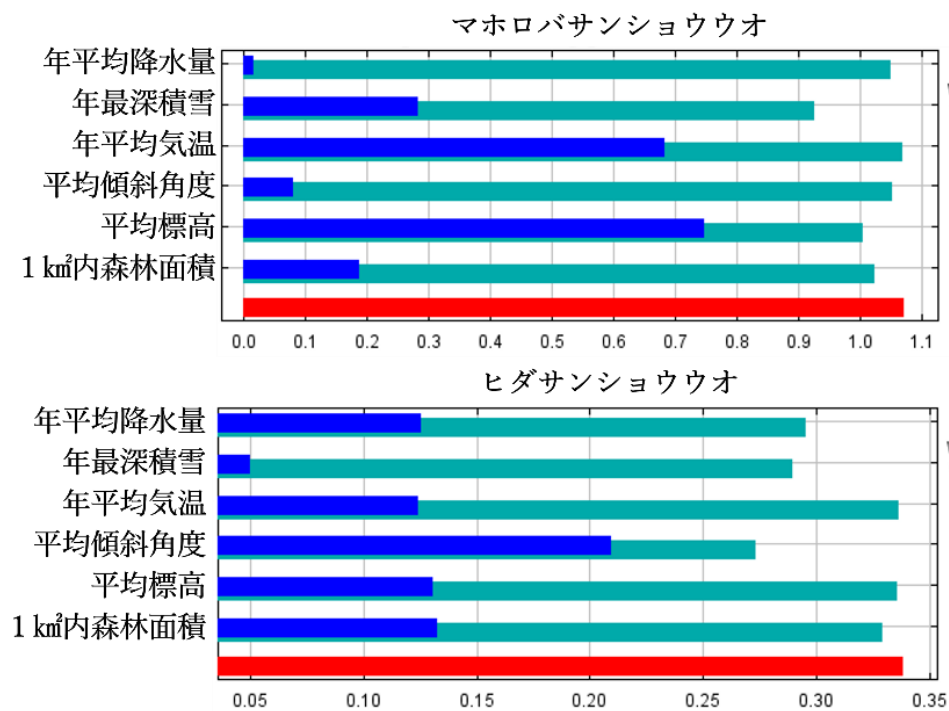


図5:6つの要因が各サンショウウオの生息確率に及ぼす寄与率

5. マホロバサンショウウオの生物系統地理学的な集団構造の解明

5-1. 目的

マホロバサンショウウオは中部地方と近畿地方にまたがって分布しているが、各地の遺伝的な特性などの詳細な調査は行われていない。そこで、今回現地調査で得た微量組織サンプルを用いて、岐阜県の地域個体群の遺伝的な特性や近畿地方の集団との関係を明らかにすることに取り組んだ。

5-2. 方法

- ① 現地調査で捕獲した個体の尾部から生息に影響がないと考えられる約2mm²の組織サンプルを採取し、99.5%エタノール中で、-20℃で保管をした。
- ② DNeasy Blood & Tissue Kit,を用いて、29 サンプルからDNAを抽出した。
- ③ プライマーはHYD-Cytb-F1 5-CYAAYCCTAAAGCWGCAAAATA-3 (Matsui et al. 2008)とHida_cytb_R2 5-ACTCCGCCTAGTTTATTAGG-3 (Mukai unpublished)を使用し、Cytochrome (シトクローム) b領域の一部の572bpの塩基配列を決定した。
- ④ PCRはプロメガ社のGoTaq® Green Master Mix,を使用して95℃2分間の初期変性の後に95℃60秒、55℃60秒、72℃120秒のサイクル(Mukai Lab)を30回行った。
- ⑤ PCR産物の精製はニューイングランドバイオラボのExo-CIP Rapid PCR Cleanup Kitを用いた。
- ⑥ 塩基配列の決定はBigDye ver 3.1を使用したサンガー法で、ABI 3130を用いた。

5-3. 結果

岐阜県内のマホロバサンショウウオは4つのハプロタイプ(A, B, C, D)に分けられるものの、各ハプロタイプ間には1塩基のみの違いしか見られなかった。さらに、ハプロタイプAは29個体中21個体と全体の73%を占め、生息域全体で見られた。一方、ハプロタイプB, C, Dはそれぞれ5個体、2個体、1個体と少数であり、岐阜県西部と岐阜県の西側に隣接する滋賀県・三重県でのみしか見られなかった。

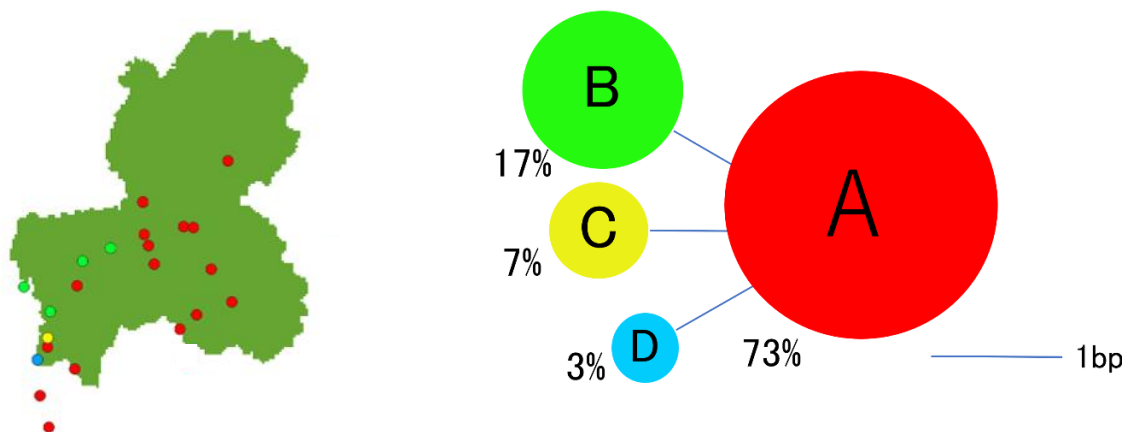


図 6:岐阜県内のマホロバサンショウウオに見られたハプロタイプの分布とその頻度

5-4. 考察

岐阜県内のマホロバサンショウウオは遺伝的にほぼ均一な集団であり、ファウンダー効果やボトルネック効果が起こっていることが考えられる。西部でB, C, Dのハプロタイプが見られるため、西日本から岐阜県に侵入し、東に向けて分布を拡大中であることが推測される。今後は、近畿地方をはじめとした岐阜県以西のサンプルを今回より長い範囲で解析して塩基配列を決定することで、精度を高めていきたい。

6. 謝辞

国立研究開発法人土木研究所 菅野一輝研究員には MaxEnt の操作のご教示, 岐阜大学地域科学部 向井貴彦教授には系統解析の手法についてのご教示, 岐阜大学大学院自然科学技術研究科 山下凌氏にはサンプリングに関する情報提供など, 多くの方々にご協力いただいた。厚く御礼申し上げます。

7. 参考文献

1. Matsui M, Yoshikawa N, Tominaga A, Sato T, Takenaka S, Tanabe S, Nishikawa K, Nakabayashi S. 2008. Phylogenetic relationships of two *Salamandrella* species as revealed by mitochondrial DNA and allozyme variation (Amphibia: Caudata: Hynobiidae) *Phylogenetics and Evolution* 48:84-93
2. Niwa K, Tran DV, Nishikawa K. 2022. Differentiated historical demography and ecological niche forming present distribution and genetic structure in coexisting two salamanders (Amphibia, Urodela, Hynobiidae) in a small island, Japan. *PeerJ* 10:e13202
3. Phillips, S. J, Anderson. R. P, Schapire R. E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modeling* 190 :231-259
4. 国土数値情報ダウンロードサイト <https://nlftp.mlit.go.jp/ksj>
5. QGIS ダウンロードサイト <https://qgis.org/ja/site>