

特集1 シンポジウム「在来種を脅かす近縁外来種の侵入ー水域の生物を中心にー」

チュウゴクオオサンショウウオが 在来のおオサンショウウオに与える影響

京都大学名誉教授 松 井 正 文

Effects of introduced Chinese giant salamander on native Japanese congener. Masafumi Matsui (*Professor Emeritus, Kyoto University*)

Japanese giant salamander, endemic to Japan and protected as a natural monument by Japanese Government, has been quickly driven away by the introduced Chinese congener through genetic pollution and niche segregation in the Kamo River, Kyoto City of western Japan. Presence in the river of the Chinese haplotype was confirmed through mitochondrial DNA analyses. Some individuals with the Japanese haplotype showed morphology not typical of Japanese one, but the occurrence of hybridization was not confirmed through mitochondrial analyses. Subsequent isozyme analyses confirmed presence of hybrids of the two species, and further genetic analyses using 15 microsatellite markers proved critical situation of Japanese species in the river. In the case of 2015, no Japanese haplotypes were detected but some Chinese ones were found widely in the river and seemed to continue breeding. As many as 84% of individuals examined proved to be hybrids or back-crossed ones. This case clearly indicates that pure Japanese species is completely inferior to pure Chinese ones or hybrids of the two species. Similar cases have been detected in other rivers of western Japan and urgent conservation measures for Japanese species are strongly required. However, many problems, such as selectively removing invaders and hybrids from the river, and management of removed individuals, are left unresolved.

Keywords : extinction, genetic pollution, giant salamander, hybridization, microsatellite analysis

要旨 : 日本固有種で国の特別天然記念物であるオオサンショウウオが、人為的に導入されたと考えられる中国産チュウゴクオオサンショウウオの遺伝子汚染を受け、生態的競争にも破れている実態を京都市賀茂川の例で紹介した。この河川に中国産に似た形態をもつ個体が生息することが30年ほど前から知られていたが、ミトコンドリアDNAの数遺伝子を調査したところ、中国産の遺伝子型をもつ個体が確認された。その一部は中国産の外部形態を示したが、多くは日本産と区別が付きにくかった。また日本産と判定された個体の多くも形態的に異様であった。細胞質由来のミトコンドリアDNAでは、雌親の判定しか出来ないため、個体間の交雑の有無は不明であった。そこで核DNAの代替としてアイソザイム（酵素蛋白）を調査したところ、ミトコンドリアDNAでは日本産と判定された個体の多くが雑種であることが確認された。その後、核DNAそのものの特定塩基の反復配列に注目するマイクロサテライト解析が可能になったので、特定15遺伝子の組成から両親の遺伝子型を推定した。その結果、京都市賀茂川では特別天然記念物が危機的状況にあることが分かってきた。2015年度の場合、日本産と判定された個体は皆無であり、分析された個体の84%が雑種であり、中国産も少数ながら広域に見られ、繁殖もしていると推定されたのである。賀茂川の例は日本産が中国産および、それとの雑種にくらべ、完全に劣勢で一方的に生態的地位を奪われ、遺伝子汚染を受けていることを顕著に示している。同様の交雑例が賀茂川以外でも見つかりつつあり、早急な日本産の保護対策が必要となっているが、純粋日本産以外の河川からの除去は困難で、除去後の処分も多くの課題を残している。

キーワード : 絶滅、遺伝子汚染、オオサンショウウオ、交雑、マイクロサテライト解析

はじめに

岐阜県と愛知県以西の本州と、九州・四国の一部に分布するオオサンショウウオ *Andrias japonicus* は、現生両生類の中では中国産のチュウゴクオオサンショウウオ *A. davidianus* とならび世界最大で全長 1.6 m ほどになる。オオサンショウウオ科の現生種の分布域は非常に狭く、オオサンショウウオ属は日本と中国大陸中南部、近縁のアメ리카オオサンショウウオ(ヘルペンダー)属はアメリカ東部に限られている。オオサンショウウオ属の現生種は、骨格形態がヨーロッパで見つかっている 3 千万年の化石種とよく似ていることもあって、生きた化石と言われている。

このように大きさ、分布、骨格形態が特異な日本固有種オオサンショウウオは、昭和 27 年(1952 年)に特別天然記念物に指定された。しかし、個体の保護は周知されてもその生息環境に関しては長い間ほとんど配慮されてこなかった。本種は河川の上・中流に生息し、主にサワガニや小魚を捕食する。8 月下旬～9 月中旬に岸边にある深い横穴で繁殖し、卵は雄に守られて 2 カ月ほどで孵化する。幼生は冬季に巣穴から河川に流出して約 3 年で変態した後も水中に留まる。このような生態を示すので、河川改修工事、圃場整備事業、道路拡幅工事、護岸工事等は本種の生息地の破壊、産卵場の消失を引き起こす。また堰堤やダム建設は、繁殖移動を阻害し、上中流の個体群の分断と交流に脅威となる。こうした問題が注目され出し、本種の生息環境の保全の研究・活動が進むようになったのはようやく 1980 年代の終になってからだが、今では各地で積極的に行われている。

一方、ここ 10 年ほどの間に新たに浮上してきたのが、外来種チュウゴクオオサンショウウオによる遺伝子汚染、生態的競合の問題である。本小文では特別天然記念物が危機的状況にある現状

を、その端緒となった京都市鴨川での 2015 年 4 月から 2016 年 3 月までの調査結果をもとに紹介したい。

なお、以下に紹介する研究の一部は文部科学省科学研究費、河川環境管理財団、文化庁、京都市の補助を受けて行われたものである。野外調査、室内実験に協力して下さった京都大学大学院人間・環境学研究科旧松井研究室の方々に深謝の意を表する。

賀茂川のオオサンショウウオ

京都北山の東に端を発する高野川と、西からの賀茂川が合流して京都市の中央を流れる鴨川にはオオサンショウウオがたくさんおり、大雨が降ったりすると街中にまで出てきてよく新聞に載る。発見の通報があると警官や動物園関係者などが緊急避難のために上流に持って行って放すといったことが、延々と続けられてきた。この鴨川の上流、とくに賀茂川に変な色模様のオオサンショウウオがいるという情報が 1980 年代からあり、確認のために遺伝的調査をしたいと考えていた。

一方、オオサンショウウオの調査研究を阻んできたのは、本種が特別天然記念物であるという事実である。調査の際には文化庁から現状変更の許可をもらわなければ何もできない。法律では個体を損傷するとか殺生するといったようなことは認められていないので、許可はなかなか得にくかったが、調査研究が進むにつれ、文化庁も個体に識別のためのチップを入れることなどに次第に理解を示された。しかし、最大の問題は、遺伝的な研究をする場合で、個体から組織をとり、場合によっては個体の殺生を伴うからである。1980 年代当時は遺伝的特性を調べようにも DNA 分析はまだ容易にはできず、許可がおりそうにもない酵素蛋白によって遺伝調査を行うしかなかったのでは

る。幸いにもその後、遺伝解析の技術が飛躍的に進展し、遺伝子の本体である DNA が比較的容易に調べられるようになり、以下に紹介するような調査結果を得ることができた。

オオサンショウウオ野外調査

オオサンショウウオは主に夜行性なので、生息確認調査は夜間に下流から上流に向けて踏査しながらの視認、棒による触認と、水深の深い場所では潜水ないし、蟹簗トラップを仕掛けることで行う。こうした調査には、事前に関係漁業共同組合の許可を得る必要もある。オオサンショウウオが発見された場合には、タモ網により捕獲し、個体ごとに、すでに半導体チップ（ドイツ、トロバン社製）が埋め込まれているかどうかを調べる。

また、冬期には、産卵巣穴から分散した幼生の確認を目的に、主に昼間に調査を行う。河川内を下流から上流に向けて踏査し、幼生の潜んでいそうな浅瀬の落ち葉溜まり、河畔の樹木の根際、岩石の隙間などを中心に、箱メガネを用いて視認し、発見された幼生は目の細かい網で捕獲する。

いずれの場合も個体の、体全長、尾長、尾高、両眼間距離、体重などを計測・記録し、同時に発見地点の水温、気温、川幅、岸からの距離、水深、隠れ家となる岩石の有無と大きさも記録する。オオサンショウウオの個体の識別のために、尾部左側面や頭部を中心に写真を撮影した後に半導体チップを埋め込む。

京都賀市茂川の調査では、明らかに日本産と思われた個体についてはただちに発見地点に放逐し、外見から明らかに中国産ないし雑種と判定された個体はすべて衣裳ケースに収容して持ち帰り、遺伝的調査を行い、その後、これらの個体は飼育施設で保管した。孵化幼生は半導体チップを埋め込むには小さすぎるため、遺伝子型の判定後、容器に分別して飼育保管した。

オオサンショウウオ遺伝調査

鴨川産について詳しい遺伝的調査を行うに先立って、日本産オオサンショウウオの変異と、チュウゴクオオサンショウウオとの関係を調べることにした。日本国内の分布域をほぼカバーするように組織資料を集め、チュウゴクオオサンショウウオは各地水族館などで飼育されていた個体を用いた。こうしてミトコンドリア DNA の合計 3753 塩基対の変異を調べた。その内容は、シトクロム *b* 遺伝子は 1141 塩基対全て、コントロールリジョンも 816 塩基対全て、ND1、ND3 についても 975、369 の塩基対全部、その他にその間を結ぶトランスファー RNA である。

その結果、日本産と中国産は遺伝的にかなり違い、3753 塩基対のうち、5.4% に違いがあった。しかし、日本国内ではあまり遺伝的違いが見られず、岐阜県とその他に約 1% の違いが見られたが、近畿以西ではわずか 0.1% しか違わなかった (Matsui et al., 2008)。

京都鴨川産オオサンショウウオ遺伝調査

ミトコンドリア DNA

日本産と中国産がミトコンドリア DNA によって明瞭に区別されることが分かったので、同様の手法を用いて京都鴨川産オオサンショウウオの遺伝調査を行うことにした。その結果、驚くべきことに、調査された京都市鴨川産全 18 個体中の 2 個体が他の日本産とは異なり、チュウゴクオオサンショウウオと同一の遺伝子型を示したのである。すなわち、外部形態からの懸念を裏付けるように、遺伝子の面から見てもチュウゴクオオサンショウウオと同定される個体が確実に鴨川に生息することが明らかになったのである。

これらの個体には、形態的に中国産と非常に良く似たものもいたが、日本産との中間型、日本産と良く似たものが含まれており、外見では簡単に

同定ができなかった。なお、中国産の由来については推定が難しいが、1973年に食用のため多量に輸入された個体の一部が絡んでいると思われる(図1)。

一方、ミトコンドリア DNA を用いたこの遺伝

調査の難点は、ミトコンドリアが細胞内で核の中ではなくて細胞質にあることであった。細胞質は雌由来で、雌の卵の中で雄の精子と融合してできる核 DNA と違って雌の性質しか受け継がない。従って、ここから得られるのは雌親由来のミトコンドリアだけであり、父親の判定はできないのだ。



図1. オオサンショウウオ(上), 日本産と中国産の雑種(中), チュウゴクオオサンショウウオ(下)。

京都鴨川産オオサンショウウオ遺伝調査

アイソザイムによる核 DNA の分析

核 DNA はミトコンドリア DNA にくらべ、はるかに解析が難しい。そこで昔から用いられてきた手法である酵素蛋白の解析を行った。核 DNA の指令によって生産されるアミノ酸の集まりであるアイソザイム(酵素蛋白)を電気泳動することによって、間接的に核 DNA の変異を調べようとしたのである。この手法では DNA 解析にくらべ大量の生組織を要するため、文化庁の許可を得て、自然損傷することのある尾鰭などのごく一部を集めた。これらの組織は肝臓や筋肉組織にくらべると、必ずしも明瞭な泳動像を示さなかったが、それまでミトコンドリア DNA 調査では、外見から日本産と判定されたものの大多数が雑種と思われるという結果をもたらした。京都鴨川では予想以上に大規模な交雑の生じていることが判明したのだ。

京都鴨川産オオサンショウウオ遺伝調査 核 DNA

アイソザイムを用いた調査は DNA にくらべ、はるかに困難で結果も明確でないことがあり、より容易に核 DNA を解析することが切望されていた。そして、日々進む技術の御陰で、この問題もその後数年の間に解決できることになった。両親由来の遺伝型の判定を可能にする核 DNA が扱えるようになったのだ。次世代シーケンサーという機械が開発され、それを使うことによって核 DNA 中の特定塩基の反復配列を拾うための道具

表 1. 2014, 2015 年度確認個体の内訳（幼生 *21 個体, ** 1 個体を含む）.

地域	2014 年度				2015 年度			
	捕獲数	日本	交雑	中国	捕獲数	日本	交雑	中国
賀茂川源流部	2	0	2	0	2	0	1	1
賀茂川上流部	7	0	7	0	40	0	32*	8
賀茂川中・下流部	11	0	8	3	10	0	10	0
鴨川	4	0	4	0	9	0	8**	1
高野川	1	0	1	0	11	0	10	1
	25	0	22	3	72	0	61	11

（プライマー）が設計可能になった。これにより特定の遺伝子 20 個以上を用いて、高い精度で両親の遺伝子型が分かるようになった。

核遺伝子由来のマイクロサテライト領域（単純反復配列：SSR）の解析は、過去に開発していた計 21 遺伝子座（Yoshikawa et al., 2011, 2012）のうち、特に判定に有効と思われる 15 遺伝子座を用いて行った。マイクロサテライトの解析に際しては、各個体から抽出した DNA を鋳型として PCR 反応で増幅し、PCR 産物のサイズを ABI3130 オートシーケンサーと GENEMAPPER ソフトウェアを用いて決定した。

京都鴨川産オオサンショウウオのマイクロサテライト解析

2015 年度のマイクロサテライト解析では、比較のために純粋なチュウゴクオオサンショウウオとして、各地の水族館等で飼育されていたチュウゴクオオサンショウウオ、純粋なオオサンショウウオとしては三重県伊賀市産と京都市右京区清滝川産の個体を用いた。

遺伝解析による個体の判定は、指定された 2 種の親種（純粋な日本産と純粋な中国産）の遺伝子型データを元に、対象とするサンプルが 2 つの親種のいずれか（日本産もしくは中国産）、雑種第 1 代（日本産と中国産との間の子）、雑種第 2

代（雑種第 1 代同士の子）、日本産との戻し交雑（日本産と雑種第 1 代の間の子）、中国産との戻し交雑（中国産と雑種第 1 代の間の子）の 6 つのカテゴリのどれに含まれるかをベイズ法に基づいて統計的に推定するソフトウェア NewHybrids を用いて行った。

マイクロサテライト 15 遺伝子座を使用した遺伝子鑑定の結果、日本産、雑種、中国産の 3 者は高い精度で判定された。ただし、中国産か交雑種か、または交雑種については何世代目かが明確でない個体、戻し交雑かどうかに関して判定精度の低い個体も一部見られ今後の課題として残された。

ともかく、遺伝子鑑定の結果、2015 年度には鴨川産のオオサンショウウオに、純粋な日本産と判定される個体を認めることができなかった（表 1）。これは 2013, 2014 年度と同様の恐るべき結果であった。その一方で、やはり前 2 年度と同様に、中国産と判定される個体が未だ存在することが分かった。そして賀茂川産のオオサンショウウオの多く（83.9%）は日本産と中国産の雑種であるという、前 2 年の結果が再確認されたのである。中国産と判定される個体は 2014 年度には賀茂川最下流部の市街地のみで見つかったが、2015 年度には流域全体から広く確認された。このことは、数 10 年前に移入されたと思われる中国産が

死に絶えることなく、未だに数多く生存している可能性を示唆する。また、上流で捕獲された小形個体は高い信頼度で中国産と判定され、賀茂川産まれの可能性が高いと推定された。

オオサンショウウオ問題の今後

以上に紹介したように、これまでの調査から京都賀茂川では特別天然記念物のオオサンショウウオは絶滅寸前ないし、すでに絶滅してしまった恐れがある。現在見られるオオサンショウウオはほとんどが雑種であり、雑種同士の繁殖によって個体群が維持されている可能性が高い。また、日本産が激減するまでの間に戻し交雑が頻繁に行われ、そのために交雑種は遺伝的に複雑な要素を持ち、交雑の内容についての判定が技術的にも難しい現状をもたらしていると考えられる。他方、移入されたチュウゴクオオサンショウウオは完全に絶滅することなく残っており、今も繁殖している可能性がある。日本固有の特別天然記念物が、人為的に導入された近縁の別種によって駆逐され、遺伝的純粋性を失っているという事実は、極めて重大な問題と受け止められねばならない。こうした事態を今後どう考え、純粋日本産のみを保護していけば良いのだろうか。

理想的には賀茂川に生息するすべてのオオサンショウウオを捕獲して遺伝子判定を行い、純粋種以外を河川に戻さないことである。しかし、これは現実的ではない。ある地域に生息する個体のすべてを除去するようなことはほとんどの動物で極めて困難だが、ことにオオサンショウウオのように隠遁性が強く、必ずしも毎日活動せず、しかも寿命が極めて長い動物ではほぼ不可能に近いと言える。

当面の問題は外来種チュウゴクオオサンショウウオと、中国産遺伝子をもつと判定された個体の

処置である。かつては街中で発見されたオオサンショウウオは、動物園などに引き取られたり、発見地点周辺の河川源流域に放逐されたりしてきた。しかし、それらのほとんどは純粋日本産でないことが明らかになった現在、安易にそうした処置をとる事はもはやできない。

少なくとも、諸悪の根源であり、外来種であることがはっきりしているチュウゴクオオサンショウウオを駆除すべきであるが、これはそれほど単純にはできない。それは日本産だけでなく、チュウゴクオオサンショウウオも特別な保護動物だからである。この種は1988年に中華人民共和国野生動物保護法で、1993年には中華人民共和国野生水生動物保護規制によって保護されている。さらに、チュウゴクオオサンショウウオは日本産のオオサンショウウオとともに、国際自然保護連合(IUCN)のレッドリスト2003年版で危急種とされ、サイテスの附属書Iに掲載されて商取引は禁止されている。こうした国際的な保護動物を撲滅させることには批判があるだろう。

それでは日本産と中国産の雑種および、その子孫はどうかと言うと、これまた厄介である。それはサイテスの附属書Iには、オオサンショウウオ類として日本と中国の2種ではなく、*Andrias* 属全体が掲載されているからである。すなわち、雑種および、その子孫も親種同様に国際保護動物の扱いを受けているのであり、単純に駆除し、撲滅させることには問題がある。少なくとも一時的には、逃走しないような施設で保護飼育しておく必要があり、そのための施設と人員が必要となっている。

こうした現実の問題を解決するためには、法的な問題を中心に関係諸機関で協議する必要があるが、チュウゴクオオサンショウウオ及び、日本産との雑種を特定外来種ないし、少なくとも生態系被害防止外来種に指定し、駆除を可能にすべきだ

と考える。すでに京都府市は文化庁と共同して日本産オオサンショウウオ保全のための対策委員会を立ち上げ、調査を行ってきたが、外来種問題を管轄する環境省にも同様の活動を早急に始められるよう希望する。

なお、京都市内では、水系の異なる上桂川でも賀茂川ほどではないが、雑種化が進んでいることが分かっている。さらにここ数年の間に隣接する三重県の一部でも同様の事態が確認されており、今後雑種問題は西日本の各地で増加することは間違いない。そして分布域全体で遺伝的点検が必要となり、外来種や雑種の存在が判明した場合にはそれらの処分が必要となるのである。しかもオオサンショウウオは、しばしば本来の分布域以外の地点でも発見され、多くの場合、外見から日本産と見られてきたことが多い。しかし、今後はこれらについても遺伝的点検が必要となるであろう。こうした事態に備え、少なくとも日本産かそれ以外かの遺伝子判定が現場で簡易的にできるような装置の開発が望まれる。

引用文献

- Matsui, M., A. Tominaga, W.-Z. Liu & T. Tanaka-Ueno. 2008. Reduced genetic variation in the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus* (Amphibia: Caudata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49 : 318-326.
- Yoshikawa, N., S. Kaneko, K. Kuwabara, N. Okumura, M. Matsui & Y. Isagi. 2011. Development of microsatellite markers for the two giant salamander species (*Andrias japonicus* and *A. davidianus*) . *Current Herpetology*, 30 : 177-180.
- , M. Matsui, A. Hayano & M. Inoue-Murayama. 2012. Development of microsatellite markers for the Japanese giant salamander (*Andrias japonicus*) through next-generation sequencing, and cross-amplification in its congener. *Conservation Genetics Resources*, 4 : 971-974.