

# 多摩川上流域に生息するニホンジカの 遺伝構造・遺伝的多様性の評価

2017年

溝口 康  
明治大学 准教授

共同研究者 新井 一司 東京都農林総合研究センター  
畑 尚子 東京都農林総合研究センター  
小西 清夏 明治大学大学院 学生  
松田彩友美 明治大学 学生

## はじめに

ニホンジカ (*Cervus nippon*) は、豊かな森の象徴として都民にとって多摩川上流域でかけがえのない存在であり、数少ない大型鳥獣の代表種である。近年、ニホンジカは増殖に伴う生息地域の拡大を引き起こしている。本研究対象の多摩川流域である御岳山周辺においてもニホンジカの食害が確認され、東京都八王子市のようなこれまでニホンジカが未確認な地域においてもその生息が報告されている(東京都, 2015)。ニホンジカは、樹木の樹皮剥ぎ、ワサビ等の農作物や希少植物の食害、枝葉摂食による森林の裸地化や土砂流出を引き起こす等大きな問題を引き起こしている(東京都, 2015)。現在ニホンジカは山林・里山・農村等における捕獲対象の筆頭動物であるが、無闇な捕獲はニホンジカを絶滅に追いやりヒトとしてのエゴを追求するものである。ヒトとニホンジカが共存するにはどうしたら良いのだろうか? この問題を解決するため、これまでに生態学的手法等による個体群の把握やその動態、侵入防止柵による防除、捕獲等、様々な研究や取り組みが大学・自治体・NPO・猟友会等において精力的に取り組まれてきた。しかしながら、抜本的な手法というのは未だ見つかっていないのが現状であろう。おそらくたった一つの画期的な手法はない。知恵を絞り、様々な手法を試すことによってヒトとニホンジカにおいてより良い付き合い方が見つかるのではないか? 本申請研究は、これまでに積み重ねてきた様々な研究や取り組みへの新たな一助になることを願い、DNA 情報を用いて多摩川上流域を含めた関東山地およびその周辺に生息するニホンジカ集団の構造・多様性・動態を把握し、ニホンジカ管理計画の策定に貢献することを目的とした。

## 緒言

日本に生息するニホンジカは、北は北海道のエゾジカから、南は慶良間諸島のケラマジカまで全国域に広がっている。また、内陸部の山々が連なっている土地は生息密度が 50.0 頭/k m<sup>2</sup>以上と高密度で示されている（環境省 2014a）。1978 年に個体を観測した地点のメッシュ数は 70 箇所以南日本に集中して見られたが、約 40 年間にメッシュ数は増加し、その観測地点も日本列島を覆い尽くすほどの数となった（環境省 2014b）。ロシアや中国、台湾に生息しているニホンジカは個体数の減少や絶滅を経験しているのに対し、近年日本に生息するニホンジカは個体数を増加させ、生息域を拡大している。その要因として、狩猟者の減少、過疎化や高齢化に伴う中山間地域の放棄、地球温暖化による積雪の現象などによる個体数増加が挙げられる（三浦 2007）。一方で、江戸時代の頃は平野部にも広く分布していたことから（古林と篠田 2001; Kaji *et al.* 2000）現在の分布はかつての生息域が回復していると考えられる（Kaji *et al.* 2000）、近年は高標高への分布拡大も見られている（泉山と望月 2008）。

林野庁が平成 27 年度に報告した「野生鳥獣による森林被害対策について」（林野庁 2015）では、全国で約 9 千 ha の面積の森林被害が報告され、その内訳ではニホンジカによる枝葉の食害、剥被害が約 8 割を占めていた。これまでの森林被害は、造林地における植栽木の食害が主であったが、近年では成林したヒノキ等の樹皮の食害も目立つようになってきている。このような被害の発生は、林業生産コストの増大や森林所有者の経営意欲の低下を招きかねない。例えば東京都西多摩郡奥多摩町およびその周辺の地域では、スギなどの人工林を皆伐した後に植林したスギやヒノキがニホンジカによる食害を受けている。2004 年には、裸地化が進み、土砂流出など甚大な被害も発生している（真田 2004）。植生が失われることによる土砂被害以外にも、林床植生が消失すること

で、森林の貴重な遺伝資源も損なう恐れが考えられる。

これらの森林被害を低減するには、原因となるニホンジカ集団の個体数削減が挙げられる。しかし、無作為に捕獲を行うことで集団ごとの多様性の減少、それによる種の根絶の可能性が考えられる。これらのことを踏まえ、国内の各地方自治体において森林被害および農作物被害の減少を目指し、且つニホンジカの捕獲を提案していくことが今後の最重要課題となっている。

また、近年になりニホンジカの生息域の拡大も問題視されている。多摩川上流域を有している東京都でも例外ではない。東京都は花粉症対策として、スギ人工林を伐採し、花粉の少ないスギやヒノキ、広葉樹を植栽するスギ花粉発生源対策事業（現 森林循環促進事業）を 2006 年に開始している。ニホンジカは、このような伐採により明るくなった林地に生育する植物を採食するために移動することが知られている。そこで、東京都農林総合研究センターでは、スギ花粉発生源対策事業地において糞粒法を実施した。糞粒法とは、林地で得られたニホンジカの糞粒数からニホンジカの個体数を推定する手法である（新井ら 2006）。調査の結果、20 年以上ニホンジカが生息していなかった東京都多摩の森林の東南部に位置する八王子市においても、伐採後、ニホンジカが出没しており、生息域が拡大していることが明らかとなった。また、生息域が拡大した地域において植栽木の幹部が剥皮害を受けており、オスジカの角こすりであることが明らかとなっている（新井 2014）。このように、ニホンジカは個体数が増加するだけでなく、生息域も拡大し、その被害も拡大していた。また、ニホンジカは県境を跨ぐように存在する関東山地、丹沢山地に生息することから、どのような道筋を辿って都県を移動しているかが解明されていない。地方自治体でニホンジカの個体数を管理していくにあたって、各都県に生息するニホンジカの移動経路や遺伝構造の解明が重要となる。

分子遺伝マーカーに基づく集団遺伝解析は、生物の起源推定、分散様式の解明、遺伝的多様性の評価において有効であるとともに、遺伝子浸透の程度把握が可能であり、これらの知見から生態系管理に活用することができる (Avice 2004)。また、遺伝的多様性の評価 (Miura 2007)、侵入経路の把握 (Miller *et al.* 2005 ; Uwai *et al.* 2006 ; 川井ら 2009) などにも効果的であることが様々な分類群で証明されている。生物の遺伝的多様性やその構造を明らかにするための手段として、DNA 多型が挙げられ、その主要なものとして、ミトコンドリア DNA 及び、核 DNA に存在するマイクロサテライトマーカーがある。

マイクロサテライトは核 DNA に散在し、数塩基からなる繰り返し配列である。一般に、マイクロサテライトの多くは遺伝子をコードしていないため、自然選択では中立であると考えられている。そのため、遺伝学において集団の遺伝的多様性や遺伝的構造、系統関係を解明するうえで有用なマーカーとされる。これまでに、イノシシや家畜豚品種間における遺伝的多様性の比較 (Thuy *et al.* 2006; Luetkemeier *et al.* 2010) やイノシシにおける家畜豚による遺伝的移入の検証に用いられてきた (Scandura *et al.* 2010; Frantz *et al.* 2012; Murakami *et al.* 2014)。また、マイクロサテライトマーカーは塩基置換率が高いことから比較的近年の遺伝的現象が反映されることが知られている。

ミトコンドリア DNA は塩基置換速度が速く、高い変異性を示すことから、近縁種において家系や移住パターンを示すことが可能である。特に、コントロール領域 (CR region) 内に位置する D-loop 領域は、タンパク質をコードしないため塩基の置換を保存し易く、大きな進化速度を示す。また、制限領域とミトコンドリア DNA の異なる領域であるチトクロム *b* (以下、*cyt b*) 遺伝子では変異率が異なることが報告されているため (Douzery and Randi 1997; Randi *et al.* 1998)、より有益な知見を得るために2つの領

域を実験に使用した。

多摩川上流域に生息するニホンジカの管理計画策定に際し、貢献、提案していくうえで、地域に生息するニホンジカの各集団の遺伝的な構造の解明が非常に重要となる。そこで本研究では、関東地方およびその周辺地域に生息するニホンジカを研究対象として、3種の遺伝子マーカー（ミトコンドリア DNA D-loop 領域および *cyt b* 遺伝子、核 DNA である 10 種のマイクロサテライトマーカー）を用いて、①ニホンジカの遺伝的多様性、②ニホンジカの遺伝的特性、の解明を試みることにした。

## 材料および方法

解析対象サンプルは、神奈川県（丹沢山地）47 頭、東京都 20 頭、埼玉県 28 頭、栃木県 16 頭、長野県 19 頭、山梨県 44 頭、愛知県 13 頭、合計 187 頭を用いた。本サンプルは 2013 年から 2015 年にかけて各県の研究者、地方自治体の関係者、狩猟者の協力のもと採取されたものである。各サンプルの採取位置は、5 キロメッシュコードを参考にメッシュ地図（図 1）に落とし込み、各セルに示された数字が捕獲頭数となっている。全てのニホンジカの肉片は、 $-30^{\circ}\text{C}$  で凍結保存をした。DNA 抽出は常法であるプロテアーゼ K 処理後、フェノール・クロロホルム法を用いて行った。

ミトコンドリア DNA D-loop 領域については、NCBI に登録されている塩基配列（Accession No. KF141945）を参照し解析に用いた。目的の領域の PCR 増幅反応に用いたプライマーは、Nagata *et al.* (1998) の報告を参照した。また、塩基配列決定が不十分である場合は本研究で新規に作成したプライマー（F1）（5' - ATGCTTGGACTCTAGCAATGG - 3'）を使用して増幅させた。PCR 反応は、KOD-Plus-（TOYOBO, Japan）プロトコルに従った。PCR の反応条件は、 $94^{\circ}\text{C}$  で 2 分間反応させた後、 $94^{\circ}\text{C}$  30 秒、 $60^{\circ}\text{C}$  30 秒（状態により  $55^{\circ}\text{C}$  から  $63^{\circ}\text{C}$  に変更させた）、 $68^{\circ}\text{C}$  1 分を 40 サイクルとし、その後、最終伸長反応を  $68^{\circ}\text{C}$  で 2 分間反応させた。PCR 増幅産物を ExoSAP-IT（Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany）を用いて精製し、Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems, USA）によるサイクルシーケンス反応を行った。反応条件は、 $96^{\circ}\text{C}$  で 2 分間反応させた後、 $96^{\circ}\text{C}$  30 秒、 $50^{\circ}\text{C}$  20 秒、 $60^{\circ}\text{C}$  4 分を 35 サイクルとした。シーケンス反応産物はエタノール沈殿により精製した。その後、精製物を  $20\mu\text{l}$  Hi-Di Formamid（Applied Biosystems, USA）に溶解し、3130xl Genetic Analyzer（Applied Biosystems, USA）を用いてキャピラリー電

電気泳動し、塩基配列を決定した。ニホンジカのミトコンドリア DNA の D-loop 領域には、約 37~40bp のよく似た塩基配列からなるタンデムリピート配列が存在しており、生息地域および個体により繰り返し回数が異なる (Nagata *et al.* 1999; Yamada *et al.* 2006)。今回の解析では、タンデムリピート領域は除外した。

ミトコンドリア DNA *cyt b* 遺伝子については、NCBI に登録されている塩基配列 (Accession No. AB021095) を参照し解析に用いた。目的の領域を増幅させるための PCR 反応には、今回、新規に作成したプライマー (forward : 5' - TTATTCTCACATGGAATCTA - 3'、reverse : 5' - CTATGGCTTCTTCCTTGAGT - 3') を使用した。実験方法に関しては D-loop 領域と同様の条件で行った。サイクルシーケンス反応の際、補助プライマーとして forward : 5' - TGGATCTGAGGGGGCTTCTC - 3'、reverse : 5' - AGGATGGAAGGGGATTTTGT - 3' を追加して行った。MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013) を用いて得られた配列をマルチプルアライメントし、DnaSP Ver. 5.10 (Librado and Rozas 2009) を用いてハプロタイプを再構成した。

本研究では 10 種のマイクロサテライトマーカー [ETH225, BM5004, BL42, BM6438, BMC1009, BM203, BM888, TGLA53 (Bishop *et al.* 1994), BOVIRBP (Bancroft *et al.* 1995), OarFCB193 (Talbot *et al.* 1996)] を使用した。マイクロサテライトマーカー多型解析には、東京都のサンプルについて、上述した 20 頭に加えて新たに 6 頭を追加した (図 1 には示していない)。PCR 反応後、Genescan 350 ROX size standard (Applied Biosystems) と共に 3130xl Genetic Analyzer でキャピラリー電気泳動した後、Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems, USA) を用いて DNA 型判定を行った。Cervus version 3.0.3 (Marshall *et al.* 1998) を用いてアليل数 ( $N_A$ )、有効アليل数 ( $N_E$ )、ヘテロ接合度の観察値 ( $H_O$ )、期待値 ( $H_E$ ) を算出した。Arlequin version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer 2010) を用い、

Wright の F-統計量 ( $F_{ST}$ ) を算出した。アليلリッチネス ( $P_R$ ) とプライベートアليل数 ( $P_A$ ) は HP-RARE 1.1 (Kalinowski 2005) を用いて算出した。マイクロサテライトマーカー型情報に基づき、個体を集団分けするために、Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) を用いた。STRUCTURE 解析は、まず  $K=1\sim 5$  のそれぞれの  $K$  に対し、50,000 回の慣らし (burn-in) の後、100,000 回のマルコフ連鎖モンテカルロシミュレーションを独立して 10 回試行した。その後、Structure Harvester version 0.6.94 (Evanno *et al.* 2005) を用いて対数尤度の変化率 ( $\Delta K$ ) を算出し、 $\Delta K$  が最も高いクラスター数 ( $K$ ) を本研究のデータセットを最もよく説明する集団数とした。さらに、CLUMPP version 1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg 2007) を用い、STRUCTURE 解析による独立した 10 回の結果を平均化した。その後、Distruct version 1.1 (Rosenberg 2004) を用いて、平均化された結果を描画した。主座標分析 (Principal Coordinate Analysis; PCoA) では、視覚的に遺伝的差異を表すために遺伝的距離に基づいて GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse 2012) を用いて実施した。Populations 1.2.32 (Langella 2002) を及び、MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013) を用いて無形根系統樹を作成した。

## 結果と考察

### ミトコンドリア DNA 領域を用いた多型解析

本研究は、遺伝学的に地域特性があるか否かを明らかにする目的で、母性遺伝するミトコンドリア DNA 多型に着目し、研究を遂行した。D-loop 領域を用いた解析対象配列は、NCBI に登録されているニホンジカ (*Cervus nippon*) の塩基配列 (Accession No. KF141945) を参照した。本研究ではタンデムリピートを除外し、その前後を組み合わせた 854bp を解析対象配列とした。854bp のうち 51 箇所に変異が見られ、全集団 (187 頭) において 17 のハプロタイプ (HT) を検出した (図 2)。

神奈川県で 5 種、東京都で 3 種、埼玉県で 4 種、山梨県で 5 種、長野県で 5 種、栃木県で 1 種、愛知県で 8 種の HT を検出した (図 4)。最も多くの個体が属していた HT1 が過去に報告されている栃木県の配列と一致していた (Accession No. AB500008)。神奈川県宮ヶ瀬札掛に生息していた 2 頭の HT8 (図 2、図 4) は、過去に報告された南日本生息のニホンジカ配列 (Accession No. AB757723) と一致した。その他の HT は本研究で新たに検出した。各都県で共有している HT は 5 種類検出した。最も頻度が高かった HT1 は全体の 49.2% が属しており、その内訳は神奈川県 (47 頭中 25 頭、53.2%)、東京都 (20 頭中 10 頭、50.0%)、埼玉県 (28 頭中 17 頭、60.7%)、山梨県 (44 頭中 15 頭、34.1%)、長野県 (19 頭中 8 頭、42.1%)、栃木県 (16 頭 100%)、愛知県 (13 頭中 1 頭、0.08%) であった (図 4)。HT2 は関東山地サンプルに多く存在しており、神奈川県 (丹沢山地) サンプルには含まれていなかった。一方で多くの HT3 は、神奈川県 (丹沢山地) サンプルが保持していた。即ち、地域によるハプロタイプの頻度分布にある程度の違いがあった。

cyt *b* 遺伝子を用いた解析対象配列は、NCBIに登録されているニホンジカ (*Cervus nippon*) の塩基配列 (Accession No. AB021095.1.) を参照した。1140bp のうち 46 箇所に変異が見られ、全集団において 12 のハプロタイプを検出した (図 3)。神奈川県で 4 種、東京都で 2 種、埼玉県で 3 種、山梨県で 6 種、長野県で 2 種、栃木県で 2 種、愛知県で 3 種、のハプロタイプを検出した (図 5)。全 12 種のハプロタイプの内、過去に報告された配列と一致したものが 3 種あり (JF893486、JF893477、AB021094) (Barančková *et al.* 2012; Kuwayama and Ozawa 2000)、9 種は新規に検出した配列である。12 種の内 4 種は複数の都県でハプロタイプを共有しており、最も頻度の高かった HT1 は全体の 51.9% が属しその内訳は栃木県 (16 頭中 15 頭、93.8%)、埼玉県 (28 頭中 18 頭 64.3%)、東京都 (20 頭中 11 頭、55.0%)、神奈川県 (47 頭中 26 頭、55.3%)、山梨県 (44 頭中 17 頭、38.6%)、長野県 (19 頭中 10 頭、52.6%) であった (図 5)。HT2 は関東山地サンプルに多く存在しており、神奈川県サンプルには含まれていなかった。一方で多くの HT3 は、神奈川県サンプルに含まれていた。即ち D-loop 領域の多型解析と同様に、地域によるハプロタイプの分布にある程度の違いがあった。

ミトコンドリア DNA D-loop 領域、および cyt *b* 遺伝子の両マーカーを用いたハプロタイプ分布地図を作成した結果、東京都、埼玉県、長野県、山梨県を跨ぐ関東山地と神奈川県 (丹沢山地) において、その頻度分布が異なることを示唆した。過去の知見において、D-loop 領域の多型解析の結果、丹沢山地特異的なハプロタイプ、関東山地特異的なハプロタイプが存在していることを示しており (Yuasa *et al.* 2007)、本研究も同様の結果となった。

神奈川県 (丹沢山地) 2 個体の D-loop 領域と cyt *b* 遺伝子の配列は、過去に報告された (Nagata *et al.* 1999; Kuwayama and Ozawa 2000) 南日本のシカサンプルと、高い相同

性が認められた。即ちこの2頭の個体は、南日本地域からの遺伝移入が起きていることが強く考えられる。古くから丹沢においてニホンジカが生息している正式な記録が残っているのは、1921年の県の保護管理施策に始まる（田村 2013）。その施策は、明治時代から盛んに行われていた国土開発、狩猟人口の増加に伴う野生動物減少を止めるために制定された1918年の狩猟法を受けて丹沢山地で大山禁猟区と鳥屋猟区が設定されたものである。また、1935年神奈川県丹沢山地札掛地区ではニホンジカの増殖を目的として県営丹沢鳥獣飼養所が開設され、宮城県金華山の個体6頭、広島県宮島産の2頭、奈良県春日大社産の6頭を飼育した歴史がある（飯村 1965; 田村 2013）。また、戦時中の食糧事情が悪化し丹沢山地に放逐した。したがって、現在の丹沢山地のニホンジカ個体群には丹沢山地由来の個体と、過去に南日本から移入してきた個体が存在している可能性があると考えた。

#### マイクロサテライトマーカー多型を用いた解析

本研究は、遺伝的多様性および各地域における遺伝特性があるか否かを明らかにする目的で、核DNA内の散在反復配列であるマイクロサテライトに着目し、研究を遂行した。表1に、10座位のマイクロサテライトマーカーを用いて算出した遺伝的多様性を評価するための指標を集団ごとに示した。本研究で用いたニホンジカにおける各集団のサンプル数は、愛知県に属する13個体から神奈川県に属する47個体と解析個体数にはばらつきが見られた。そのため、サンプルサイズに影響されず平均値を取る $N_E$ 値および $H_E$ 値を比較することによって遺伝的多様性を評価した。 $N_E$ 値は神奈川県の2.823から長野県の4.00の間で推移しており、 $H_E$ 値では神奈川県の0.595から長野県の0.679の間で推移していた（表1）。過去の研究において、9座位のマイクロサテライトマーカー

を用いた丹沢山地 (n=59) と富士山麓 (n=36) の各々の  $H_E$  は、0.58 および 0.54 であり (湯浅 2007)、丹沢山地において、本研究とほぼ同様の結果であった。本研究結果における各地域の  $H_E$  値を比較すると、神奈川県は最も高い値である長野県と 0.1 近くの差が見られたが、 $N_A$  値、 $N_E$  値の両者を踏まえてこの 7 集団で比較すると遺伝的多様性にあまり差がないことを示唆した。 $P_R$  値は、各集団が保持する固有のアリルの頻度を表す指標である。この数値も  $N_E$  値および  $H_E$  値 同様にサンプルサイズに影響を受けない数値を算出することが可能である。この数値が高い集団ほど、固有のアリルを持ち保全遺伝学の観点から保護していくべき個体が多いことが考えられ、数値が低い集団は固有のアリルを持たない、即ち他の集団と類似した遺伝子を持つことから、遺伝交流が多く行われていることが考察できる。 $P_R$  値の結果は、埼玉県の 0.11 から愛知県の 1.12 の間で推移しており、この結果も  $N_E$  および  $H_E$  同様に集団ごとで大きな差を示さなかった。しかし、地理的に関東地方から大きく離れている愛知県は比較的高い値をもつことから、地理的分断による遺伝交流が起きていないことによる結果であると示唆した。また、埼玉県は周囲を東京都、山梨県、長野県に囲まれていることから個体が移動しやすい環境下であるため遺伝交流が多く、高い値を示したと考察した。

集団間の分化の程度を表す  $F_{ST}$  を、それぞれの集団間において算出した (表 2)。埼玉県と東京都間では有意な分化はなかった ( $0.180 \pm 0.038$ ) が、それ以外の集団間では有意な分化が見られた ( $P < 0.01$ )。埼玉県と東京都で有意差が得られなかった理由としては、図 1 でも示すようにサンプル採取地点が隣接していること、同じ関東山地に属しており県境に影響されていないことが挙げられる。最も  $F_{ST}$  の値が低かったのは、埼玉県と東京都であり、0.007 であった (表 2)。一方、最も高い値を示したのは、神奈川県 (丹沢山地) と愛知県で 0.162 であり (表 2)、地理的影響の結果であると考察し

た。神奈川県（丹沢山地）とその他の集団の  $F_{ST}$  値が 0.117 から 0.162 で推移しているのに対し神奈川県（丹沢山地）を除いた 6 集団での  $F_{ST}$  値は 0.1 以下を示していた。このことから、本研究の集団分化結果は、神奈川県（丹沢山地）におけるボトルネックの経験と地理的要因が深く関わっていると考察した。

ニホンジカは野生種であり、県境を跨いで生活していることを考慮し、個体の主座標分析を実施した（図 6）。各軸の説明能力は X 軸で 27.15%、Y 軸で 17.51%を示しており、2 次元での説明能力は 44.66%を示した。X 軸において、神奈川県の個体はその他の個体と緩やかに分断された。一方でその他の 6 集団に属する個体は集団ごとのクラスターを形成することなく分散した。各集団、各個体の系統関係を表すために、近隣接合法を用いて無根形系統樹を作成した（図 7）。無根形の系統樹は有根形と異なり共通祖先を考慮せずに作成することが可能であり、現存種の系統関係を示す。神奈川県の個体は独自のルートから派生しているが他の 6 県はルートを共有していることを示唆した。

マイクロサテライトマーカー 10 座位を用いた遺伝構造に関する解析の結果、神奈川県（丹沢山地）集団が、他の都県からは分化していた。全集団における、STRUCTURE 2.3.4 による遺伝的構造解析を実施した。最尤値は  $K=2$  を示したことから、本解析を最も適切に説明するクラスター数 ( $K$ ) は 2 として集団を区別した（図 8）。また、 $K=3$  は、 $K=2$  に次いで大きな値を示していたことから、参考として  $K=3$  も図 8 に合わせて示した。 $K=2$  において、神奈川県（丹沢山地）とその他 6 県に分類された。これは、過去のボトルネックと地理的要因により神奈川県（丹沢山地）が分化したことが考えられる。一方、 $K=3$  では神奈川県と関東山地に属する山梨県、埼玉県、東京都のクラスターと関東山地に属さない、または距離的に大きく離れている 3 県（愛知県、栃木県、長

野県) に分類された。この知見からも過去のボトルネックと地理的要因が神奈川県の変化の要因であると考察した。

遺伝構造解析より、神奈川県は他集団から離れていることを示唆した。これらの結果から、神奈川県は他の集団と交流をせず個体数を増加させていることが考えられる。神奈川県は 1950 年代に個体数が急激に減少するボトルネックを経験している。個体数が減ることは集団のアリル数の減少、つまり  $N_E$  もしくは  $H_E$  の値がボトルネックを受けていない集団と比較して低下することが考えられる。しかし、本研究で算出した遺伝指標では神奈川県は、 $N_E$  (2.823) もしくは  $H_E$  (0.595) であり、他の集団と比較して同等の数値を保っていた。一般的に、ボトルネックによる遺伝的多様性の消失の程度はボトルネックの程度および期間によって左右される (Hedrick 2011)。丹沢山地のニホンジカは 1950 年にボトルネックを経験したが、1960 年代には森林伐採による生息域の拡大とニホンジカの保護政策により、個体数を回復させ、分布も拡大させている (古林ら 1997)。これらのことより、神奈川県は遺伝指標の値が下がらなかった原因はボトルネックによる個体数の軽減の程度が小さかったか、もしくは減少後にすぐに個体数が回復したと考察した。一方で、神奈川県以外の集団の遺伝多様性は同等の値を示した。また、遺伝分化を表す  $F_{ST}$  値で算出された値は 0.007~0.097 で推移しており神奈川県との値と比較すると低い。また、遺伝構造を明らかにするために実施した STRUCTURE 解析 (図 8)、PCoA 解析 (図 6)、無根系統樹 (図 7) 結果より、愛知県、栃木県、山梨県、埼玉県、東京都、長野県の集団は分化せず分散していたことから、遺伝的交流が行われていると考察した。

## 総合考察

以上の解析結果と考察を踏まえて、多摩川上流域に生息するニホンジカの管理における総合考察について示す。

- ① 多摩川上流域に生息するニホンジカは、関東山地に属しておりその中での集団遺伝構造の分離はなかった。即ち、多摩川上流域に生息するニホンジカの移動は、関東山地全体に及んでいた。よって、東京都、埼玉県、群馬県、長野県、山梨県を統括した関東山地全体でのニホンジカ管理計画の実施が望ましいと考察した。
- ② 多摩川上流域に生息するニホンジカ集団の遺伝的多様性は中程度であることが明らかとなった。よって、これまでの捕獲方法に問題はないと考察した。
- ③ 関東山地と丹沢山地の間では、集団遺伝構造に違いがあることが明らかとなった。これは、丹沢山地のニホンジカ集団における過去のボトルネックに由来していることが大きく、相模川などの地理的障壁なども関与していると考察した。
- ④ しかしながら、各地域に生息しているニホンジカの明確な識別可能 DNA マーカーを開発することはできなかった。即ち現時点では、DNA マーカーを用いたニホンジカの移動を正確に且つ詳細に把握することは難しい。今後は、更なる DNA マーカーの開発が必要であると考察した。

表1 マイクロサテライトマーカーを用いた各集団における遺伝多様性の比較

集団	No.	$N_A$	$N_E$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$	$P_R$
神奈川県 *	47	6.0	2.823	0.528	0.595	0.528	0.27
東京都 *	26	5.8	3.249	0.473	0.597	0.473	0.29
埼玉県	28	5.9	3.382	0.611	0.626	0.611	0.11
山梨県	44	6.4	3.533	0.518	0.665	0.518	0.39
長野県	19	6.4	4.00	0.368	0.679	0.368	0.73
栃木県	16	5.6	3.380	0.638	0.627	-0.018	0.91
愛知県 *	13	5.6	3.159	0.531	0.642	0.179	1.12

No. : 個体数  $N_A$  : アリル多様度  $N_E$  : 平均有効アリル数  
 $H_O$  : 平均ヘテロ接合度(観察値)  $H_E$  : 平均ヘテロ接合度(期待値)  
 $F_{IS}$  : WeigtのF統計量  $P_R$  : プライベートアリル多様度  
 \* : ハーディ・ワインベルグからの逸脱 (  $P < 0.05$  )

表 2 マイクロサテライトマーカーを用いた各集団における  $F_{ST}$  値の比較

	神奈川県	東京都	埼玉県	山梨県	長野県	栃木県	愛知県
神奈川県	-	+	+	+	+	+	+
東京都	0.126	-	0.180 ± 0.038	+	+	+	+
埼玉県	0.130	0.007	-	+	+	+	+
山梨県	0.117	0.046	0.038	-	+	+	+
長野県	0.158	0.079	0.059	0.084	-	+	+
栃木県	0.153	0.057	0.064	0.074	0.097	-	+
愛知県	0.162	0.092	0.073	0.085	0.077	0.068	-

population : 集団の名称

+: 集団間に有意な分化があることを示す (  $P < 0.01$  ) 。

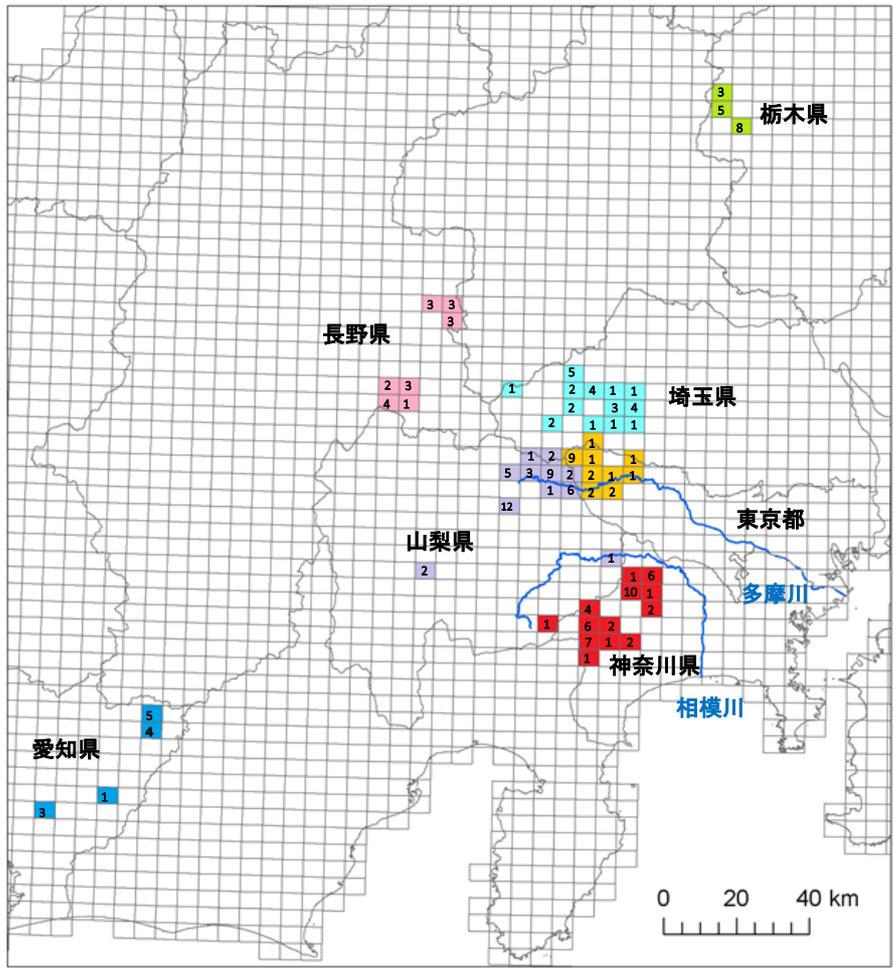


図1 関東地方および周辺地域のサンプル位置図

本研究で使用した全頭の捕獲位置を5キロメッシュ地図に表した。セル内の数字は捕獲頭数となっている。捕獲位置が把握できていない神奈川県の4個体はこの地図上からは除外している。

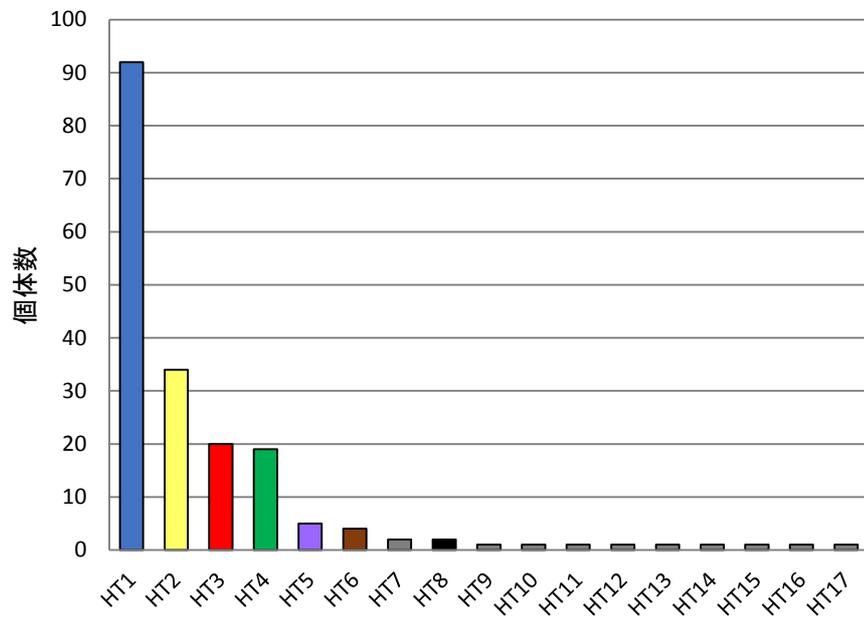


図 2 ミトコンドリア DNA における D-loop 領域のハプロタイプ (HT) 頻度

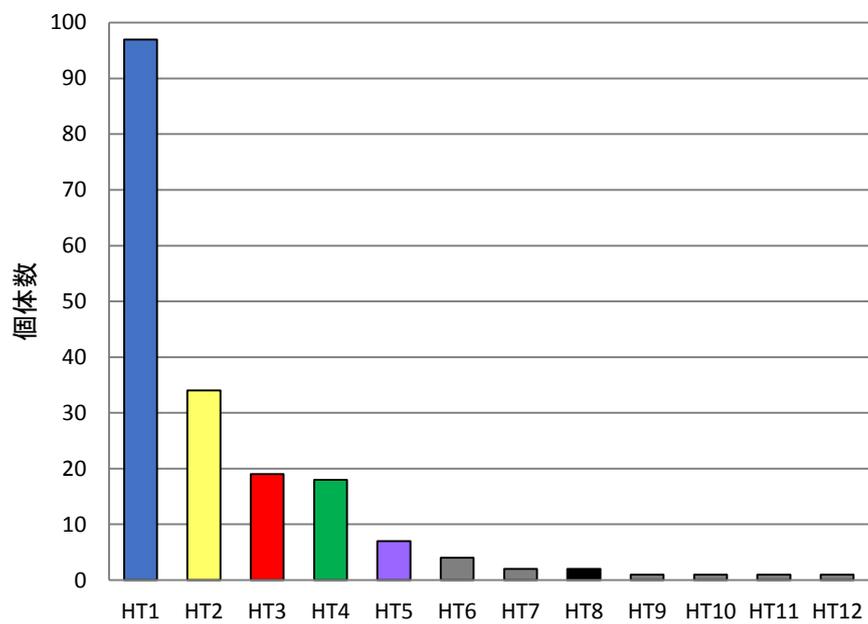


図3 ミトコンドリア DNA における *cyt b* 領域のハプロタイプ (HT) 頻度

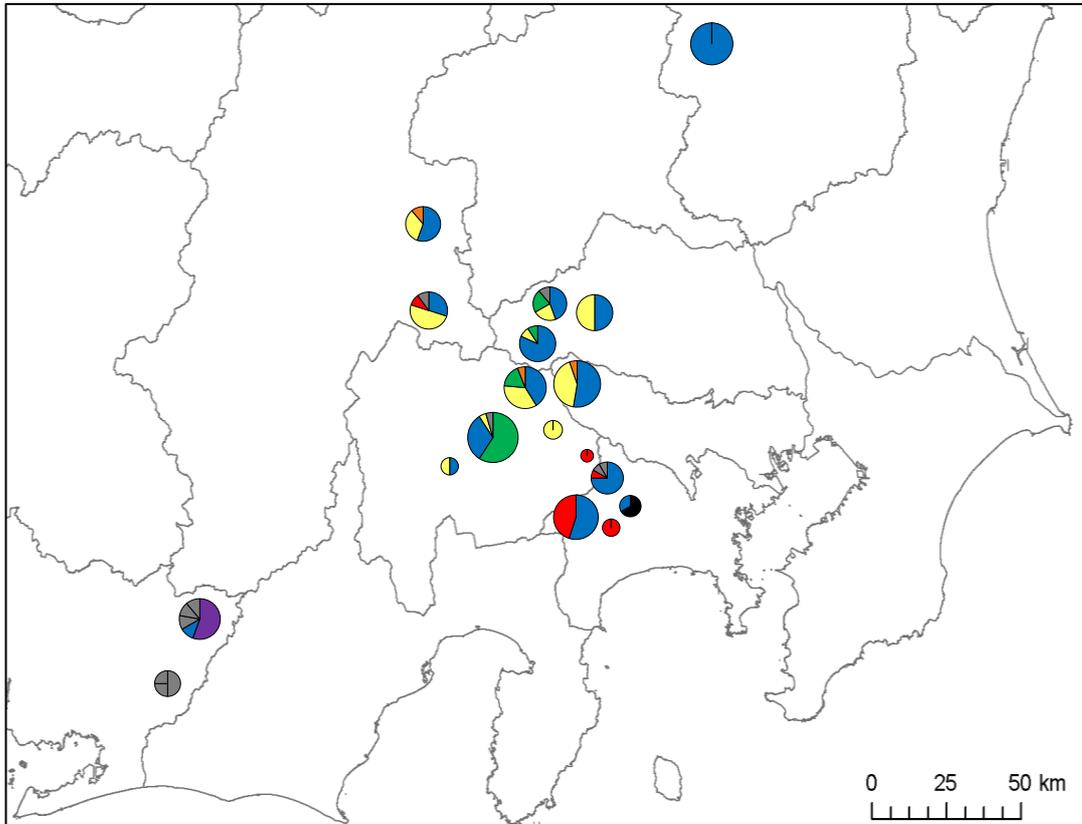


図4 ミトコンドリア DNA D-loop 領域を用いたハプロタイプ分布地図

色は、図2のハプロタイプに対応し（青：HT1、黄：HT2、赤：HT3、緑：HT4、紫：HT5、茶：HT6、黒：HT8、灰：その他）、市町村ごとの円グラフでハプロタイプの割合を示している。

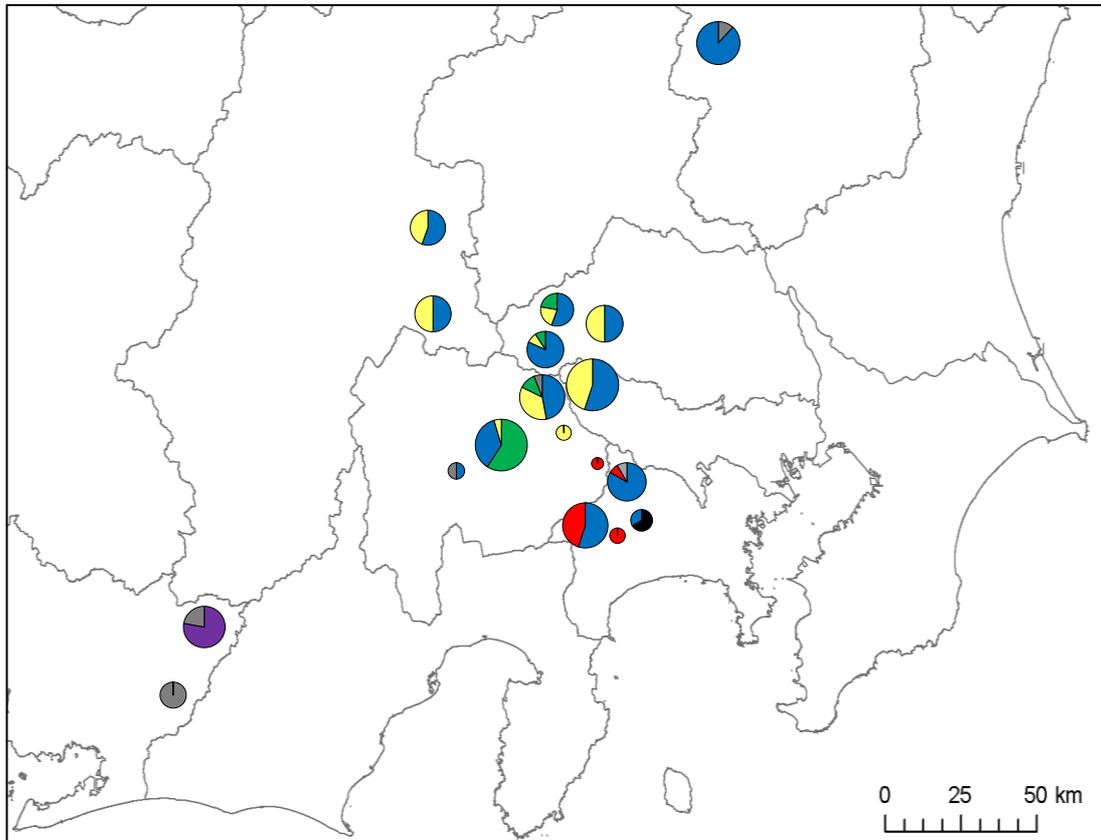


図5 ミトコンドリア DNA *cyt b* 領域を用いたハプロタイプ分布地図

色は、図3のハプロタイプに対応し（青：HT1、黄：HT2、赤：HT3、緑：HT4、紫：HT5、黒：HT8、灰：その他）、市町村ごとの円グラフでハプロタイプの割合を示している。

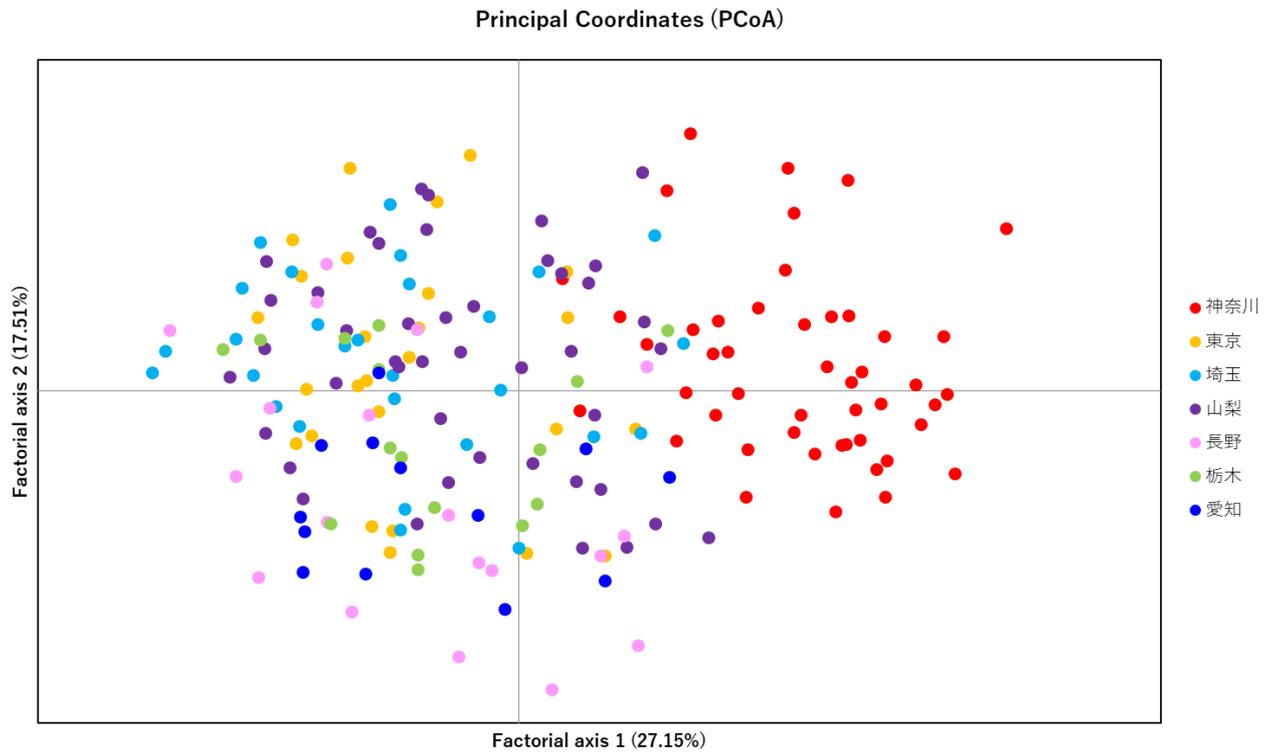


図 6 個体間を用いた主座標分析

ドットは使用した個体を表す。

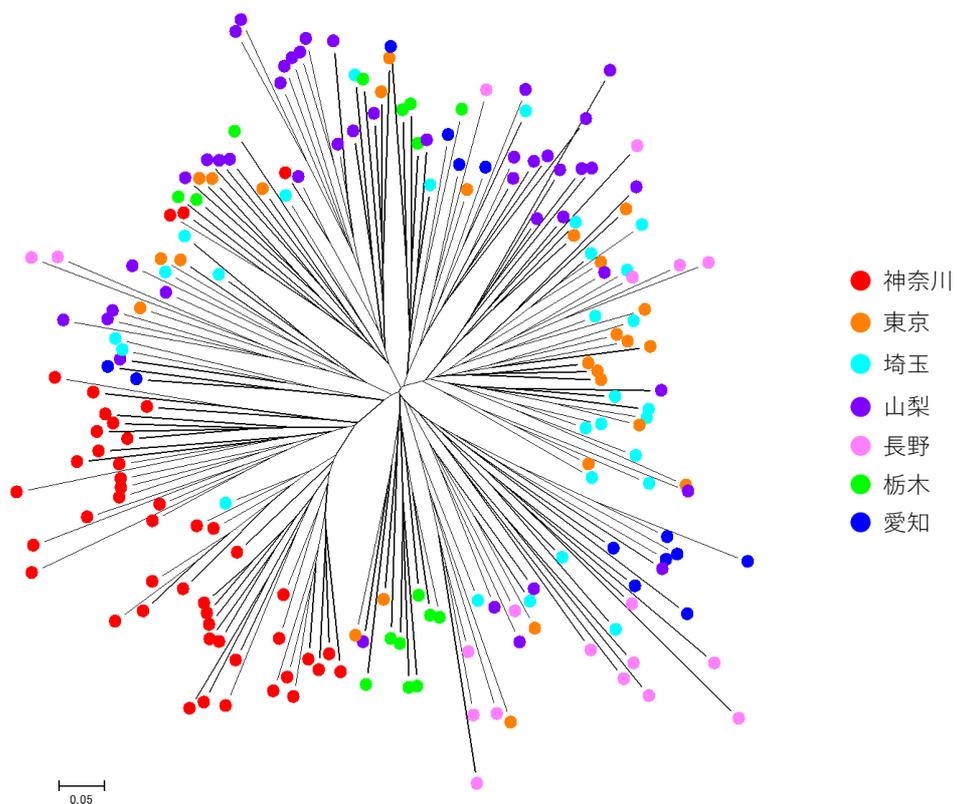


図7 近隣接合法を用いた無根系統樹

枝の長さは遺伝距離を表す。

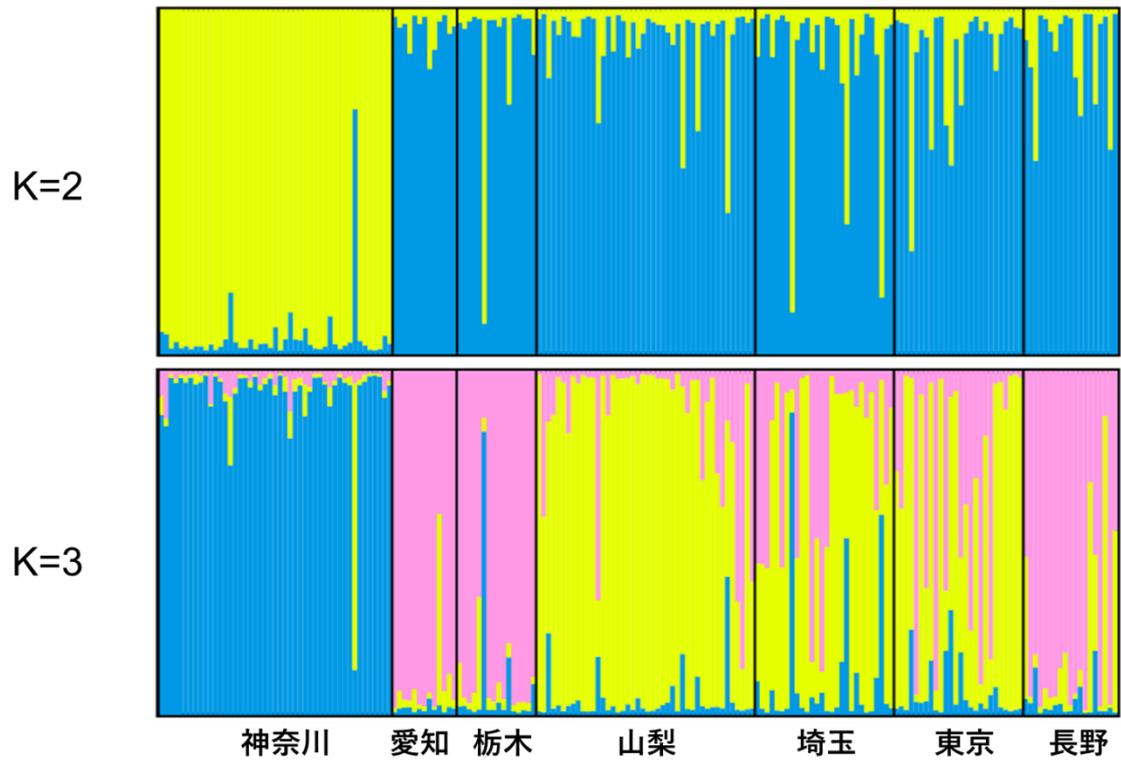


図 8 STRUCTURE 解析 (K=2, 3)

本報告書は、明治大学大学院博士前期課程 2 年の小西清夏が作成した修士論文「関東地方およびその周辺地域に生息するニホンジカの遺伝特性の評価」の一部において、加筆・修正を加えたものです。また、本報告書の研究データの一部は、投稿予定の学術論文に使用します。

## 謝辞

サンプルを提供してくださいました、神奈川県自然環境保全センターの谷脇徹様、山梨県森林総合研究所の飯島勇人様、埼玉県農林総合研究センターの大河原睦様、長野県林業総合センターの岡田充弘様、群馬県林業試験場の坂庭浩之様、栃木県林業センターの丸山哲也様、愛知県森林・林業技術センターの江口則和様および瀬戸隆之様、東京都水道局水源管理事務所および奥多摩町の担当職員の皆様、東京都奥多摩町および上記各地域の狩猟者の皆様、ならびに神奈川県猟友会百瀬様に心より感謝申し上げます。本研究は、公益財団法人とうきゅう環境財団（平成 27・28 年度）の御支援により遂行致しました。心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- 新井 一司, 遠竹 行俊, 久野 春子. 2006. 糞粒法による東京のシカ生息密度分布の実態. *東京都農林総合研究センター研究報告* **1**, 21-25.
- 新井 一司. 2014. 東京都におけるシカによる森林被害に対する研究. *山林* **1560**, 35-40.
- Awise JC. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition)*. Sinauer, Sunderland, MA. 541pp.
- Bancroft DR, Pemberton JM, King P. 1995. Extensive protein and microsatellite variability in an isolated, cyclic ungulate population. *Heredity* **74**, 326–336.
- Barančėková M, Krojerová-Prokešová J, Voloshina I V, Myslenkov A I, Kawata Y, Oshida T, Koubek P. 2012. The origin and genetic variability of the Czech sika deer population. *Ecological research* **27**, 991-1003.
- Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SL, Hawkins GA, Toldo SS, Fries R, Grosz MD, Yoo J, Beattie CW. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics* **136**, 619–639.
- Douzery E, Randi E. 1997. The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 1154-1166.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611–2620.
- Excoffier L, Lischer HE. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* **10**, 564-567.
- Frantz A C, Massei G, Burke T. 2012. Genetic evidence for past hybridisation between domestic pigs and English wild boars. *Conservation Genetics* **13**, 1355-1364.

- 古林 賢恒, 山根 正伸, 羽山 伸一, 羽太 博樹, 岩岡 理樹, 白石 利郎, 皆川 康雄, 佐々木 美弥子, 永田 幸志, 三谷 奈保, ヤコブ・ボルフスキー, 牧野 佐絵子, 藤上 史子, 牛沢 理. 1997. ニホンジカの生態と保全生物学的研究. 神奈川県公園協会・丹沢大山自然環境総合調査団調査企画委員会編, 丹沢大山自然環境総合調査報告書, 319-421. 神奈川県環境部, 横浜.
- 古林 賢恒, 篠田 寧子. 2001. 江戸近郊におけるニホンジカ (*Cervus nippon*) の生息状況. *Wildlife conservation Japan* **7**, 1-24.
- Hedrick PW. 2011. Genetics of populations. Jones & Bartlett Learning.
- 飯村 武. 1965. 丹沢山塊のシカに関する調査. 神奈川県林業指導所報告 **13**, 1-44.
- 泉山 茂之, 望月 敬史. 2008. 南アルプス北部の亜高山帯に生息するニホンジカ (*Cervus nippon*) の季節的環境利用. 信州大学農学部AFC 報告 **6**, 25-32.
- Jakobsson M, Rosenberg NA. 2007 CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**, 1801–1806.
- Kaji K, Miyaki M, Saitoh T, Ono S, Kaneko M. 2000. Spatial distribution of an expanding sika deer population on Hokkaido Island, Japan. *Wildlife Society Bulletin* **28**, 699-707.
- Kalinowski S. T. 2005. hp - rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* **5**, 187-189.
- 環境省. 2014a. [homepage on the Internet], 改正鳥獣法に基づく指定管理鳥獣捕獲等事業の推進に向けた全国のニホンジカの密度分布図の作成について, 環境省, 千代田区; [cited February 2017]. Available from URL: <http://www.env.go.jp/press/101522.html>
- 環境省. 2014b. [homepage on the Internet], 改正鳥獣法に基づく指定管理鳥獣捕獲等事業

の推進に向けたニホンジカ及びイノシシの生息状況等緊急調査事業の結果について，環境省，千代田区；[cited February 2017]. Available from URL: <http://www.env.go.jp/press/100922.html>

川井 浩史, 上井 進也, 羽生田 岳昭, 畠田 智, Broom J, Nelson W, Viard F. 2009. 遺伝子マーカーを用いた褐藻ワカメ移入集団の起源・動態解析と緑藻アオサ類移入集団の検出. *日本生態学会誌* **59**, 145–152.

Kuwayama R, Ozawa T. 2000. Phylogenetic relationships among european red deer, wapiti, and sika deer inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **15**, 115-123.

Langella O. 2002. POPULATIONS 1.2.28. Population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees). Available from URL: [http://bioinformatics.org/\\*tryphon/populations/](http://bioinformatics.org/*tryphon/populations/)

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451-1452.

Luetkemeier E S, Sodhi M, Schook L B, Malhi R S. 2010. Multiple Asian pig origins revealed through genomic analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**. 680-686.

Marshall TC, Slate J, Kruuk LE, Pemberton JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**, 639–655.

Miller N, Estoup A, Toepfer S, Bourguet D, Lapchin L, Derridj S, Kim K S, Reynaud P, Furlan L, Guillemaud T. 2005. Multiple transatlantic introductions of the western corn rootworm. *Science* **310**, 992 –992.

- 三浦 慎吾. 2007. シカ保護管理計画制度の評価によせて. *哺乳類科学* **47**, 81-83.
- Miura O. 2007. Molecular genetic approaches to elucidate the ecological and evolutionary issues associated with biological invasion. *The Ecological Society of Japan* **22**, 876–883.
- Murakami K, Yoshikawa S, Konishi S, Ueno Y, Watanabe S, Mizoguchi Y. 2014. Evaluation of genetic introgression from domesticated pigs into the Ryukyu wild boar population on Iriomote Island in Japan. *Animal genetics* **45**, 517-523.
- Nagata J, Masuda R, Kaji K, Kaneko M, Yoshida M C. 1998. Genetic variation and population structure of the Japanese sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido Island, based on mitochondrial D-loop sequences. *Molecular Ecology* **7**, 871-877.
- Nagata J, Masuda R, Tamate H B, Hamasaki S I, Ochiai K, Asada M, Tatsuzawa S, Suda Kazuki, Tado Hiroyuki, Yoshida M C. 1999. Two genetically distinct lineages of the sika deer, *Cervus nippon*, in Japanese islands: Comparison of mitochondrial D-loop region sequences. *Molecular phylogenetics and evolution* **13**, 511-519.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multi-locus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959.
- Peakall R, Smouse P. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: an update. *Bioinformatics* **28**, 2537–2539.
- Randi E, Mucci N, Pierpaoli M, Douzery E. 1998. New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **265**, 793-801.
- 林野庁. 2015. [homepage on the Internet], 平成 26 年度 森林・林業白書, 林野庁, 千代田

区 ; [cited February 2017]. Available from URL:

[http://www.rinya.maff.go.jp/j/kikaku/hakusyo/26hakusyo\\_h/all/a20.html](http://www.rinya.maff.go.jp/j/kikaku/hakusyo/26hakusyo_h/all/a20.html)

Rosenberg A. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure.

*Molecular Ecology Notes* **4**, 137–138.

真田 勉. 2004. 東京・多摩地域のシカ森林被害緊急調査 *森林技術* **753**, 12-17.

Scandura M, Iacolina L, Cossu A, Apollonio M. 2010. Effects of human perturbation on the

genetic make-up of an island population: the case of the Sardinian wild boar. *Heredity*

**106**, 1012-1020.

Talbot J, Haigh J, Plante Y. 1996. A parentage evaluation test in North American elk (wapiti)

using microsatellites of ovine and bovine origin. *Animal genetics* **27**, 117-119.

田村 淳. 2013. 神奈川県丹沢山地におけるシカ問題の歴史と森林保全対策. *水利科学*

**333**, 52-66.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary

genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* **30**, 2725-2729.

東京都 2015, 第4期第2種シカ管理計画, 東京都, 新宿区, 43pp

Thuy N T, Melchinger-Wild E, Kuss A W, Cuong N V, Bartenschlager H, Geldermann H.

2006. Comparison of Vietnamese and European pig breeds using microsatellites.

*Journal of Animal Science* **84**, 2601-2608.

Uwai S, Nelson W, Neill K, Wang W D, Aguilar-Rosas L E, Boo S M, Kitayama T, Kawal H.

2006. Genetic diversity in *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) deduced

from mitochondria genes – origins and succession of introduced populations.

*International Phycological Society* **45**, 687–695.

Yamada M, Hosoi E, Tamate H B, Nagata J, Tatsuzawa S, Tado H, Ozawa S. 2006. Distribution of two distinct lineages of sika deer (*Cervus nippon*) on Shikoku Island revealed by mitochondrial DNA analysis. *Mammal Study* **31**, 23-28.

湯浅 卓. 2007. 丹沢山地のニホンジカ地域個体群の遺伝的構造と遺伝子流動について. *丹沢大山総合調査学術報告書* 146-152.

Yuasa T, Nagata J, Hamasaki S, Tsuruga H, Furubayashi K. 2007. The impact of habitat fragmentation on genetic structure of the Japanese sika deer (*Cervus nippon*) in southern Kantoh, revealed by mitochondrial D-loop sequences. *Ecological Research* **22**, 97-106.

多摩川上流域に生息するニホンジカの遺伝構造・遺伝的多様の  
評価

(研究助成・学術研究VOL. 46—NO. 327)

著者 溝口 康 小西 清夏

発行日 2017年11月

発行者 公益財団法人とうきゅう環境財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141

<http://www.tokyuenvironment.or.jp/>