

研究成果報告書

- ・機関及び学部, 学科等名: 富山大学 理工学教育部
- ・所属ゼミ: 山崎研究室ゼミナール
- ・指導教員: 山崎 裕治 准教授
- ・代表学生: 佐藤 真
- ・参加学生: 岩岡優真, 清水大輔

【研究題目】北アルプス立山の山岳環境における生物多様性の保全 : 遺伝的多様性から解き明かす絶滅リスク

1. 課題解決策の要約

富山県東部に位置する北アルプス立山連峰は、標高 3000m に至る急峻な山岳地を有し、冬季の豪雪に代表される多様な気象条件や、原生ブナ林やラムサール条約登録湿地などの日本でも稀な環境が展開する。近年の温暖化などの気候変化は、特に高山環境に深刻な影響を与え、生物多様性や遺伝的多様性を減少させる原因となりうる。日本の高山環境は強風や多雪、強い紫外線や複雑な地形、そして特有の植生によって特徴づけられる。高山環境に生息する動物は生理学的・生態学的・遺伝学的に固有の性質をもつことが示されており、気候変化や人為的要因による生物多様性への影響が懸念される。しかしながら、本地域における生物多様性の評価は十分になされていない。そこで本研究では、本地域の山岳環境に生息する複数の分類群を対象にし、生態学的・遺伝学的解析を通して、北アルプス立山における生物多様性を評価するとともに、種の絶滅リスクについての理解を深めることを試みた。

本研究の結果、ミヤマモンキチョウの個体数および分布域、ヤマナメグジ、クロイワマイマイ、アズマヒキガエル、タゴガエルの遺伝的多様性の一部を明らかにした。ミヤマモンキチョウは調査期間中に標高 1700m 以上の地点で成虫を延べ 489 個体発見した。ヤマナメグジおよびクロイワマイマイの遺伝的多様性について、いずれも相対的に高い遺伝的多様性(ハプロタイプ多様度)を示し、系統解析から遺伝的固有性が高いことを明らかにした。アズマヒキガエルおよびタゴガエルでは立山における遺伝的多様性が低いことが示唆された。また、アズマヒキガエルの遺伝的固有性は低いことが示唆され、他地域との遺伝的交流が現在も生じているあるいは、近年に高山帯まで分布域を広げた可能性がある。

これらの種でみられる遺伝的多様性の低さは環境変化への脆弱性が高いことを意味する。また、遺伝的固有性の高さは他地域との遺伝的交流の制限が生じていると考えられ、将来的な種分化が生じる可能性を高めるが、環境変化による生態系バランスの崩壊が生じると、種の地域絶滅を引き起こす可能性が高まる。本研究は北アルプス立山における生物多様性の解明を通じて、山岳環境保全のための基礎情報を提供し、生物資源・観光資源としての北アルプス立山の情報発信に寄与する。

2. 調査研究の目的

本研究は、亜高山・高山動物の保全をおこない、立山における生物資源としての価値を維持・向上させるために、複数の分類群における遺伝的多様性の解明を通して、種の絶滅リスクを評価することを目的とした。

3. 調査研究の内容

本研究では、ミヤマモンキチョウ *Colias palaeno*, ヤマナメクジ *Meghimatium fruhstorferi*, クロイワマイマイ *Euhadra senckenbergiana*, アズマヒキガエル *Bufo japonicus formosus*, タゴガエル *Rana tagoi tagoi* を対象として標本採集をおこない(図 1), 分子遺伝学的手法に基づく多様性の評価をおこなった。ミヤマモンキチョウは環境省レッドリスト(2019)では準絶滅危惧種, 2012 年富山県版レッドデータブック(2012)では絶滅危惧 II 類に指定されている希少種であり, 非侵襲的な DNA 採取方法が確立されていないことから, 個体の捕獲はおこなわず, 目視による個体数調査のみ実施した。調査は 2019 年 6 月 3 日から 2019 年 10 月 11 日の間に実施し, 北アルプス立山の弥陀ヶ原～室堂平において採集および個体数観測を環境省の許可を得ておこなった(環中中国許第 1906101 号及び富山森林管理署平成 31 年 4 月 4 日許可)。陸産腹足類については, 個体全体を採集し, カエル類については繁殖に影響の少ない右後肢の第 5 指を採取し, 99.5%エタノールで保存した。

遺伝子解析には Mitochondrial DNA の *Cytb* または *COI* 遺伝子を対象とした。得られた標本から DNA を抽出し, PCR 法および cycle sequencing 法によって塩基配列を決定した。決定した配列から, TCS ver. 1.12 によるハプロタイプネットワークの構築または MrBayes ver.3.2 によるベイズ系統樹の探索をおこなった。



図 1 本研究における対象種 5 種。

左からミヤマモンキチョウ, ヤマナメクジ, クロイワマイマイ, アズマヒキガエル, タゴガエルを示す。

4. 調査研究の成果

ミヤマモンキチョウ

調査期間内に発見したチョウ類の成虫は, 延べ 1140 個体, 27 種類であった。優占種として, ベニヒカゲ (20.8%), コヒョウモン (16.7%), ミヤマモンキチョウ (15.3%) がみられた。ミヤマモンキチョウの成虫は, 7 月 17 日から 8 月 18 日までの間に 489 個体を発見した。発見地点は, 1700m 以上の草原地帯で 90%を発見し, 溪谷や森林地帯では見られなかった(図 2)。また, 発見した雌雄の比率は, オス 73%, メス 27%であった。さらに, 発見時の行動として, オスの飛行は 75%であり, メスのそれ(32%)と比べて高かった。発見時の静止や吸蜜行動は, メスではそれぞれ 21%, 26%であるのに対し, オスでは 6%, 16%とそれぞれ低かった。成虫の出現開始日から終了日までに, 発見時の飛行の比率の変化, オスは出現初期から 42%程度が飛行し, ピーク時には, 84%が飛行していた。一方, メスの出現初期は, 確認個体数が少なかったこともあり, 飛行は確認できなかったが, ピーク時においても 56%程度となっていた。オスはメスよりも活発に活動することが考えら

れ、オスの発見数が結果的に高くなったことが考えられる。

緯度経度 1 秒メッシュ単位でミヤマモンキチョウの発見場所を記録し、分布様式の分析を行った結果、集中分布であった(森下の I_h 指数=3.96)。さらに、ミヤマモンキチョウの成虫が発見されたメッシュの平均斜度は、調査地の草原全体のメッシュの平均斜度よりも有意に高かった(片側 t 検定, $p < 0.05$)。一般にミヤマモンキチョウの生息場所は、高山の稜線付近や湿原と言われているが、弥陀ヶ原におけるミヤマモンキチョウの成虫は、湿地となっている池塘周辺より、水はけが良く、斜度の高い草原を主に利用していることを示唆する。

立山連峰においてミヤマモンキチョウは、弥陀ヶ原などの高層湿原や、薬師岳などの稜線付近に生息することが知られているが、本種の生息数や生活環は不明であり、その保全の実施が困難な状況となっていた。本調査では、ミヤマモンキチョウの個体数および分布様式の一部を明らかにし、これらの情報は、本種の保全や、その生息環境である弥陀ヶ原の自然環境を維持する上で最も基盤となるだろう。

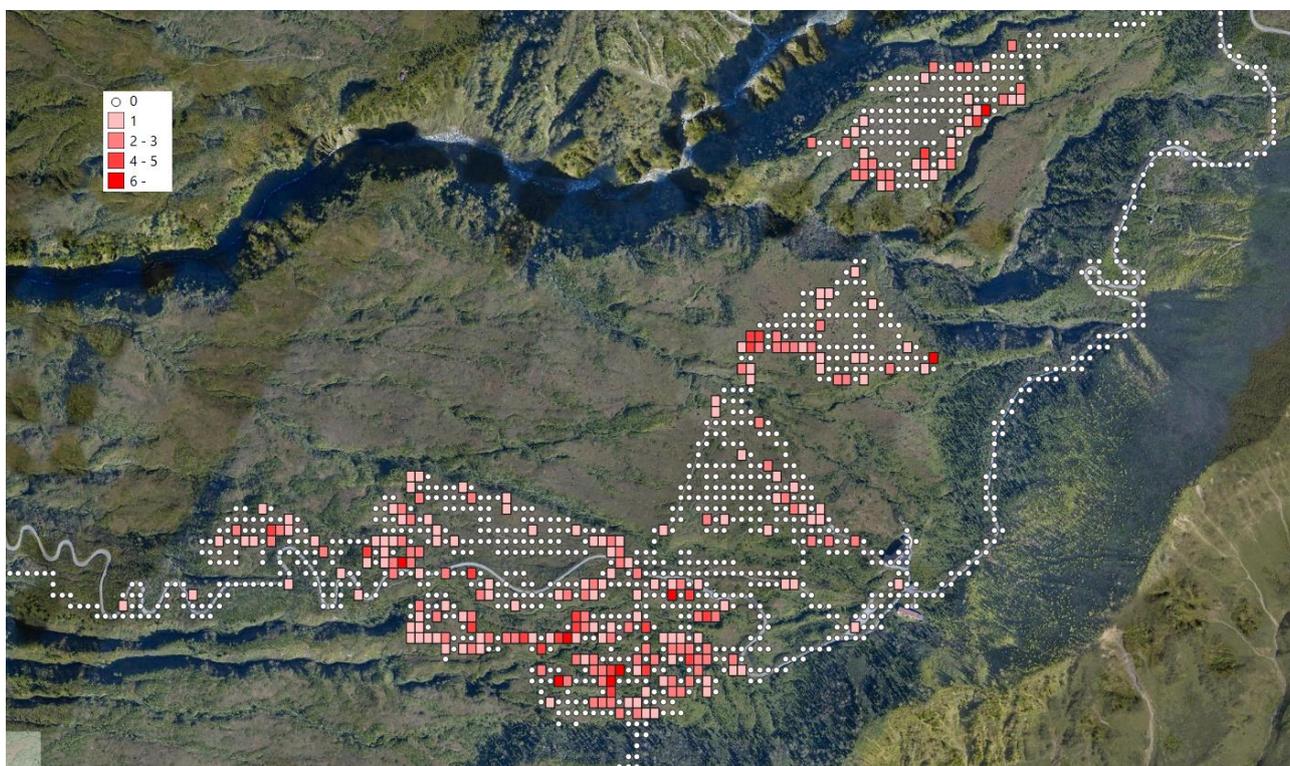


図 2 標高 1900m の弥陀ヶ原周辺におけるミヤマモンキチョウの発見個体数。

QGIS を用いて国土地理院からの地理情報から作図した。各プロットの色は観察した個体数を示す。

ヤマナメクジ&クロイワマイマイ

ヤマナメクジは標高 1000m-2450m の地点で 27 個体、クロイワマイマイは標高 1900m の地点で 2 個体を発見した。採集した個体のうち、17 個体のヤマナメクジ、2 個体のクロイワマイマイの COI 遺伝子の塩基配列(それぞれ 519bp, 591bp)を決定することができた。

ヤマナメクジについてベイズ系統樹を探索した結果、亜高山帯から高山帯の個体群は 3 つのクレードに分岐することを示唆した(図 3)。室堂(標高 2450m)の個体は、天狗平(標高 2300m)の一部の個体と同一クレード内に含まれ(Alpine clade 1)、弥陀ヶ原(標高 1900m)の個体は単一のクレードを形成した(Sub-Alpine clade)。天狗平の 3 個体は単一クレードを形成した(Alpine clade 2)。このことは高山帯と亜高山帯との間で

遺伝子流動の制限があることを示唆し、高山帯の集団間においても複数の遺伝的系統が存在することを示唆する。また、立山の高山帯に分布するヤマナメクジは、他県の低地のヤマナメクジと遺伝的に異なり、北アルプス立山の亜高山帯・高山帯における遺伝的固有性が高いことを示唆する。遺伝的多様性の指標として、ハプロタイプ多様度を算出した結果、0.919 であり、高い値を示した。各標高帯のハプロタイプ多様度は、弥陀ヶ原集団および天狗平集団で 1.000、室堂で 0.476 という値を示した。これらの結果は、本種の遺伝的多様性が高く、将来的な環境変化に対して潜在的な適応力が高いことを示唆する。一方で、立山における本種の遺伝的固有性が高いことから、高山環境特有の生態系バランスを支えている保全すべき生物の一種であると判断されるだろう。

次に、クロイワマイマイについて、採集した 2 個体は同一ハプロタイプを持ち、亜種であるノマイマイ (AB024891) と 6% の変異を示した。個体数が少ないため多様性の評価は難しいが、雌雄同体である陸産貝類では、交配相手と出会えない場合に自家交配をおこなうことがあるため、集団内の遺伝的多様性が低くなりやすく、環境変化に適応できない可能性が高くなることが予想できる。

立山における陸産貝類の調査はこれまでに十分に行われておらず、種数や形態的特徴、遺伝的多様性についての体系的な報告はなされていない。本研究は、これまでに注目されてこなかった山岳域における陸産貝類の遺伝的多様性の一部を明らかにした。昆虫に次いで大きな分類群である貝類の生態的地位を理解することは、高山環境における生態系バランスの維持や保全の上で今後欠かせない知見となる。陸産貝類は、一般的に分散能力が低く、地域ごとに高い遺伝的固有性を示すことが知られているため、高山帯のみに限らず、山岳における異なる標高帯ごとの保全や自然環境の維持が必要である。

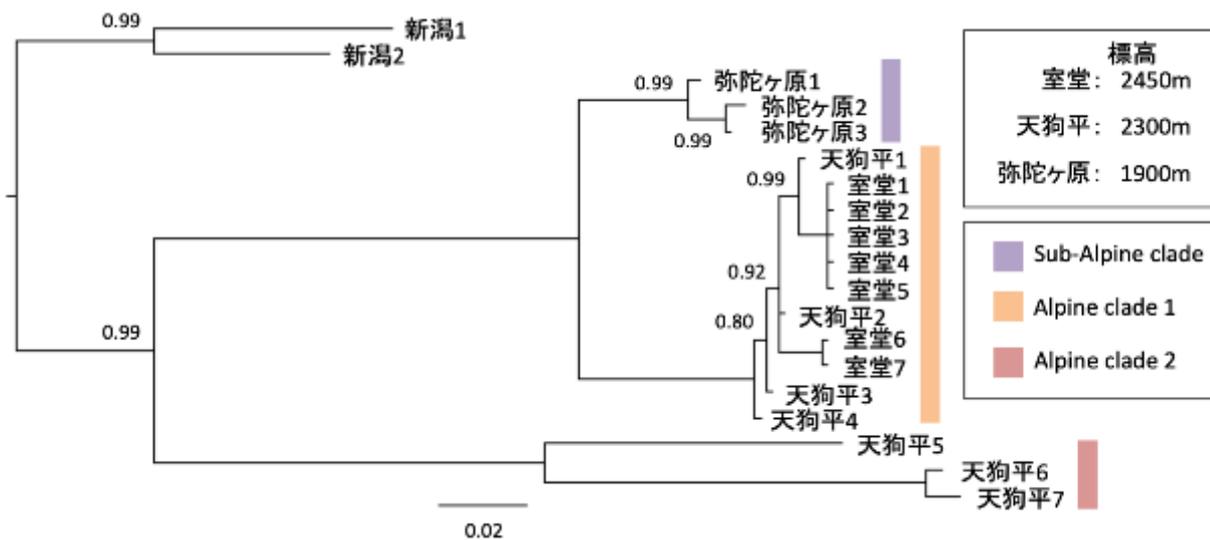


図 3 立山におけるヤマナメクジのベイズ系統樹。

下線は遺伝的距離を示す。ベイズ推定に基づく事後確率は枝上に示し、数値がない枝の事後確立は 1.00 である。外群として新潟県のヤマナメクジの塩基配列を使用した。

アズマヒキガエル & タゴガエル

アズマヒキガエルは標高 1900m~2450m までの範囲で 17 個体、タゴガエルは標高 1000m, 1500m, 1900m で計 5 個体を採集した。また、野外調査において、標高 1900m 付近でアズマヒキガエルの幼生が生息する繁殖池を発見した。Cytb 遺伝子はアズマヒキガエルで 7 個体 354bp, タゴガエルで 2 個体 393bp を決定し

た.

アズマヒキガエルの遺伝子解析の結果、立山における 7 個体からは 2 ハプロタイプが検出された。先行研究における他地域のアズマヒキガエルの配列を加えて構築したハプロタイプネットワークを図 4 に示した。4 県で検出されたハプロタイプを中心に各地域のハプロタイプが派生しており、本調査で得た個体と塩基配列から、地域集団ごとの遺伝的固有性は高くないことが考えられる。次に、立山のアズマヒキガエルのハプロタイプ多様度を算出した結果、0.476 であった。富山県全体でのハプロタイプ多様度は 0.709 であり、立山の集団の遺伝的多様性が低いことが考えられる。アズマヒキガエルは回帰性を持ち、自身が孵化した池で繁殖すると言われている。本研究では 1900m 付近で幼生を発見したことから、立山におけるアズマヒキガエルは、低地から亜高山帯に分散してきたのではなく、亜高山帯においてその生活史を完結させている可能性が高い。

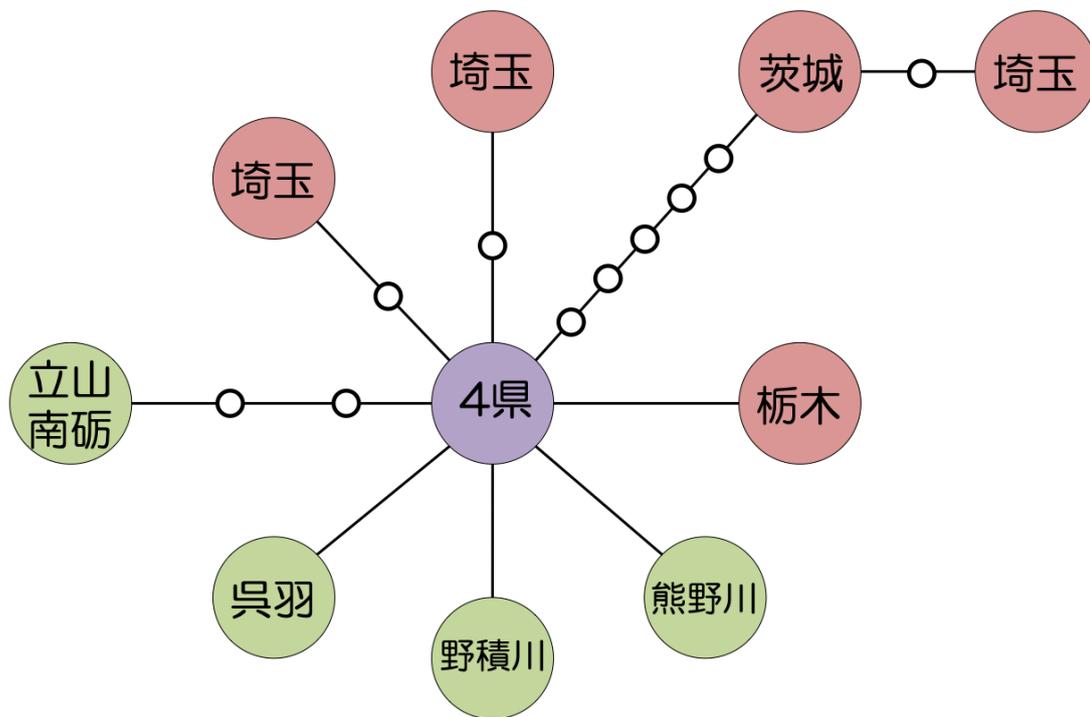


図 4 アズマヒキガエルにおける *Cytb* 遺伝子 (247bp) のハプロタイプネットワーク。

緑:富山県内で採集した個体, 赤:他県で採集された個体, 紫:富山県の立山, 埼玉県, 静岡県, 栃木県で採集された個体のハプロタイプを示す。白丸は一塩基置換を示す。

タゴガエルに関する遺伝子解析では 3 個体からは同一ハプロタイプが検出された。タゴガエルは各地域で遺伝的分化が進んでいるとされており、地域集団ごとに固有の遺伝的特徴を示す可能性が高い。立山で捕獲した個体に加えて、富山県(野積川, 利賀川)の 2 個体, 神奈川県 1 個体の形態的特徴(脛長/標準体長)を比較したが、形態に有意差はみられなかった。2014 年にタゴガエルの亜種ネバタゴガエルが長野県において記載されており、本地域においても亜種レベルでの遺伝的分化が生じている可能性があり、形態的特徴だけではなく、近縁種および近隣地域のタゴガエルとの遺伝的特徴の比較が必要である。本種は、幼生の期間に餌を食べず、体内に残る卵黄の栄養を用いて変態することが可能と言われており、貧栄養が予想される高山の水辺環境での成長を可能にしていると考えられる。一方で、本種は他地域では標高 2000m 以上にも分布するが、調査期間を通して発見数が少なく、亜高山・高山環境における母集団の小ささが低い採集効率に反映されている可能性がある。

北アルプス立山における両生類の生態学的調査はこれまでに実施されてきたが、遺伝学的手法を用いた研究は初めてである。アズマヒキガエルは近縁種との異種間交雑を生じることが知られており、本種に限らず、立山連峰のカエル類の遺伝学的なモニタリングを継続して実施していく必要がある。カエル類は異なる標高の間での分散が可能と考えられるが、低標高地と高標高地における繁殖時期の差異が生じることで、遺伝的固有性の増加や、種分化が生じる可能性が高まる。特にカエル類は外気温によって繁殖や分散に影響を受けやすいと考えられるため、温暖化などによる標高間の気温差の減少は、そのような種分化の機会を消失させるとともに、生態学的変化を引き起こすことで、生態系バランスの変化を生じさせるだろう。

5. 調査研究に基づく提言

我々は、立山に生息する5種について生態学的・遺伝学的手法を用いた遺伝的多様性の解明をおこなった。その結果から、陸産貝類やカエル類のように分散能力が低い種において、北アルプス立山における遺伝的固有性が高いことを示唆した。遺伝的固有性の高さは新たな種の創出が生じる一方で、環境変化による地域固有の遺伝的多様性の消失や種の絶滅につながる恐れが高まる。各種の繁殖力や分散能力、それぞれ利用する微細環境の違いによって遺伝的多様性の程度や絶滅リスクは変化するが、本研究の結果は気候変化に脆弱な高山環境における生物多様性を保全する上で重要な基礎情報を提供する。温暖化などの気候変化や、観光客によるゴミの持ち込みなどの人為的要因は、山岳生態系のバランスを崩し、北アルプス立山を始めとする稀有な環境の喪失を引き起こし得る。現在の生態系が維持されている高山環境の種多様性および遺伝的多様性を維持するために、山岳全体の環境や野生生物に配慮した研究・普及啓発をおこない、観光資源そして後世に残すべき自然環境としての北アルプス立山の生物多様性をどのように保全していくか、多角的かつ早急に議論し、保全施策を実行する必要がある。

6. 課題解決策の自己評価

本研究は、北アルプス立山において繁殖生態や分散能力が異なる種を広く対象とし、将来的な環境変化が生物群ごとにどのような影響を与えるのか評価する上で不可欠となる遺伝的多様性の一部を解明した。本研究はライチョウのようなフラッグシップ種だけでなく、立山に生息する種の包括的な保全をおこない、生物多様性の価値を再発見することで、立山を始めとする山岳環境が、全球的な気候変動や人為的な環境攪乱に直面した際の指針の一つを提供する。北アルプス立山の生物多様性の価値を維持・向上するための情報を蓄積するとともに、今後の論文発表や普及啓発を通して立山の魅力を広く発信することで、山岳における環境教育に寄与するだろう。

今後、各種におけるより正確な遺伝的多様性の評価や絶滅リスクの推定をおこなうためには、十分な個体数の確保と、複数の遺伝子座や長い配列長を用いた遺伝子解析が必要である。さらに、他地域の標本や情報を比較対象として収集することで、当該地域における遺伝的多様性の変動について言及することができるようになるだろう。年変動や年ごとの季節変動の影響を考慮し、多くの情報に基づく多様性の把握と絶滅リスクの解明を進めるためにも、今後も継続した調査を実施していく必要がある。