

日本動物園水族館協会の管理する ユーラシアカワウソの遺伝的多様性と繁殖計画

和久大介*†・穴田美佳**・小川 博*・安藤元一****・佐々木剛*

(平成 27 年 5 月 20 日受付/平成 27 年 7 月 24 日受理)

要約：ユーラシアカワウソ (*Lutra lutra*) はユーラシア大陸に広く分布する中型食肉目である。本種には 11 の亜種があり、欧州亜種 *L. l. lutra*, 東南アジア亜種 *L. l. barang*, 中国亜種 *L. l. chinensis* などが国内外の動物園や水族館で飼育されている。欧州の動物園や水族館には A-line (*L. l. lutra*) と B-line (*L. l. lutra* と *L. l. barang* が交雑した可能性がある系統) という 2 つの line が存在し、日本の動物園や水族館にも導入されている。本来は同じ亜種内で繁殖がおこなわれるが、日本では本種の個体数が少ないため A-line と B-line で繁殖がおこなわれている。実際に B-line が東南アジア亜種の遺伝子を持っているか評価がおこなわれ、B-line と A-line の間に違いがあることが示された。ただし先行研究では、解析配列が 307 bp と短いことが問題として上げられる。本研究ではミトコンドリア (mt) DNA Cytochrome *b* の全長配列 (1140 bp) を A-line, B-line 各 1 個体, 中国亜種 2 個体から決定し、先行研究で決定された B-line の配列を含む 4 配列を加えて配列比較、系統解析をおこなった。その結果、A-line, B-line それぞれが特徴的な変異サイトを示し、系統解析では先行研究と同じように B-line は中国亜種とクレイドを形成し、A-line は欧州亜種独自のクレイドを形成した。よって解析した B-line の mtDNA は東南アジア亜種に由来する可能性がある。2015 年現在、日本の B-line 個体は全て本研究で解析した B-line の子や孫である。亜種間交雑が示唆された国内の B-line は、本種の繁殖・維持に活用できるが、A-line や中国亜種の系統維持に活用することはできない。

キーワード：ユーラシアカワウソ, Cytochrome *b* 遺伝子, 亜種, 動物園, 水族館

1. 緒 言

ユーラシアカワウソ (*Lutra lutra*) はイギリスから北アフリカ, イスラエル, そして極東まで広く分布するカワウソ亜科 (Lutrinae) に属する中型食肉目である¹⁾。本種には 11 の亜種が存在し、国内外の動物園や水族館では欧州に広く生息する欧州亜種 (*L. l. lutra*), タイやインドネシアに生息する東南アジア亜種 (*L. l. barang*), 中国に分布する中国亜種 (*L. l. chinensis*) などが飼育されている。今日、本種は CITES (ワシントン条約)²⁾ で付属書 I に、IUCN レッドリスト³⁾ では準絶滅危惧に記載されている絶滅の恐れのある種であり、実際に西ヨーロッパでは地域絶滅が起きている⁴⁾。日本でもユーラシアカワウソの 1 亜種とされた *L. l. whiteleyi* が北海道に生息していたが^{5,6)}、2012 年に環境省が絶滅を宣言している⁷⁾。

絶滅の危機を鑑み、欧州動物園水族館協会 (EAZA) は European Endangered species Programme (EEP) に基づき本種の繁殖を積極的におこなっている。現在、EEP では A-line と定義された純粋な欧州亜種のユーラシアカ

ワウソのみを用い繁殖計画が進められている。その一方で、1970 年代にイギリスのノーフォークワイルドライフパークで飼育されていたユーラシアカワウソは欧州亜種と東南アジア亜種が同居飼育されていた。そのため同施設で出生した個体は欧州亜種と東南アジア亜種が交雑してできた子孫である可能性があり、EEP は B-line と定義している⁸⁾。B-line は、現在の A-line のみの繁殖計画が実施されるまで欧州の園館に広がり、個体数を増やした。しかしながら、B-line では亜種間交雑の可能性が残っているため、亜種を考慮した繁殖ができない。現在、日本動物園水族館協会 (JAZA) 所属園館で飼育されているユーラシアカワウソは全て国外に由来する。現在飼育されている個体数はユーラシアカワウソ国内血統登録⁹⁾を確認すると 22 個体と非常に少ない。これらのうち EAZA から導入された個体は、富山市ファミリーパークのメス 2 個体と、アクアマリンふくしまに導入されたオス、メス各 1 個体の計 4 個体だが、メス個体は全て B-line かつ姉妹で、A-line はアクアマリンふくしまのオス 1 個体のみである。A-line のメスが飼育されておらず、A-line を国内で系統維持することはできない

* 東京農業大学大学院農学研究科バイオセラピー学専攻

** 富山市ファミリーパーク

*** 公益社団法人日本動物園水族館協会生物多様性委員会ユーラシアカワウソ計画管理者

**** ヤマザキ学園大学動物看護学部動物看護学科

† Corresponding author (E-mail: daisuke.w.nodai@gmail.com)

表 1 本研究で用いた試料のサンプル名、出生場所、提供園館、由来組織及び EEP における血統登録扱い (EEP line).

サンプル名	出生場所	提供園館	由来試料	EEP line
<i>L. lutra</i> #12	日本, アドベンチャーワールド	日本, 高知県立のいち動物公園	冷凍筋組織	無し
<i>L. lutra</i> #24	日本, アドベンチャーワールド	日本, よこはま動物園ズーラシア	白血球	無し
<i>L. lutra</i> #59	ドイツ, ヘラブルン動物園	日本, アクアマリンふくしま	血液	A-line
<i>L. lutra</i> #60	スイス, インスブルック アルペン動物園	日本, 富山市ファミリーパーク	冷凍筋組織	B-line

サンプル名の#番号は国内血統登録番号を示す。

ため, JAZA は A-line のメス個体を導入できないか模索中である。しかし, JAZA は国内のユーラシアカワウソを途絶えさせないための苦肉の策として, A-line と B-line を交配させて繁殖をおこなっており, 2014 年 6 月時点累計で 10 頭の子どもを得ている。

一方で, 1980 年代から JAZA 所属園館で飼育されてきたユーラシアカワウソはほとんどが中国に由来し, 中国亜種 (*L. l. chinensis*) に分類されている。しかし, 2015 年 4 月時点でその多くの個体が死亡し, 生存している個体は 8 個体のみで, 母系統から見ると国内血統登録番号 #7 (四川省の野生個体) に由来する 1 系統 7 個体しか残っていない。残りの 1 個体は国内血統登録番号 #9 (四川省の野生個体) のオス個体だが, 25 歳ととても高齢のため今後繁殖できるか分からない。さらに, 今後は中国からの新個体導入は非常に難しいと考えられ, 中国亜種の系統維持も難しくなっている。

飼育頭数が少ないため, 国内の園館でユーラシアカワウソの繁殖をおこなっていかなければ, 日本の園館からユーラシアカワウソが姿を消してしまう可能性がある。本来であれば亜種を考慮した繁殖をおこなうべきだが現状は難しい。加えて A-line と B-line, 中国亜種の遺伝的な差異は EAZA や JAZA により調べられたことはなかったため, 各個体の遺伝的背景を考慮した繁殖計画の具体策はない。以上のような問題を踏まえ IWATA ら⁸⁾ は, アクアマリンふくしまで飼育されている A-line, B-line の各個体から SUZUKI ら¹⁰⁾ で決定されたミトコンドリア DNA (mtDNA) の Cytochrome *b* (*cytb*) 遺伝子 307 bp と同じ領域の配列を決定し比較した。その結果, A-line と B-line の間にわずかだが差異が認められた。さらに系統解析では A-line と B-line が別のクレイドを形成し, B-line は中国亜種とクレイドを形成した。しかし, B-line は 1 個体の解析であり B-line にも異なる遺伝子型が含まれている可能性があること, 比較対象の中国亜種が 1 個体と少ないこと, 塩基配列の長さが短いことを理由に, B-line の分子系統学的な結論は未だ得られていない。

そこで, 本研究では mtDNA の *cytb* 全長配列を A-line, B-line の各 1 個体と中国亜種の 2 個体から新たに決定し, SUZUKI ら¹⁰⁾ で決定された配列及び GenBank に登録されている韓国のユーラシアカワウソの配列と比較する。これにより B-line のもつ mtDNA の由来を明らかにすることと

もに, JAZA としてどのようにユーラシアカワウソを繁殖させるべきか検討した。

2. 材料と方法

(1) DNA 標本

本研究では JAZA 所属園館で飼育されている A-line, B-line 各 1 個体と, 天津動物園もしくは済南動物園に由来する中国亜種死亡個体 2 個体を用いた。本研究で用いた試料のサンプル名, 出生場所, 提供園館, 由来組織及び EEP における血統登録扱い (EEP line) を表 1 に示す。*L. lutra* #59 は IWATA ら⁸⁾ で mtDNA *cytb* の 307 bp が決定された A-line 個体と同じである。また, *L. lutra* #60 は IWATA ら⁸⁾ で配列決定された B-line 個体の母親である。DNA 抽出は, 冷凍筋組織では 5 mm 角程度を, 白血球では 10 mg 程度を用いて, フェノール・クロロホルム法¹¹⁾ でトータル DNA を抽出した。抽出した DNA を 50 ml の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) に溶解し, 4°C で冷蔵保存した。*L. lutra* #59 の血液試料は IWATA ら⁸⁾ で抽出されたゲノム DNA を用いた。

(2) *cytb* 遺伝子領域の増幅と塩基配列決定

MtDNA の *cytb* 領域の増幅には既知のユーラシアカワウソ配列から設計したプライマー, IL38-11-23 (5'-CCT CAA CCT CAA TAT CAT CAG CC-3') と IH1-12-20 (5'-GCA CCG CCA AGT CCT TTG AG-3') を用いた。PCR 反応液の組成はトータル DNA 50 ng, 1 mM 各プライマー, 1× Ex *Taq* Buffer, 0.2 mM dNTP, 0.5 U Ex *Taq* DNA polymerase (TaKaRa Inc.) である。PCR の温度条件は 94°C で 20 秒, 60°C で 30 秒, 72°C で 2 分 30 秒を 1 サイクルとして 30 サイクルで行った。PCR 反応後, 増幅断片を電気泳動し, 目的の約 3000 bp が増幅されていることを確認した。*cytb* の塩基配列決定にはプライマー IL38-11-23, IL40-9-18 (5'-TCT TCA TCT GGC TGT TCC-3'), IH40-11-20 (5'-ATT AGG GCT AGG AGT AGG GC-3'), IH42-11-20 (5'-GTG CGC GGA ATA CAT ACT GG-3') を用い, ABI Applied Biosystems 3500 Genetic analyzer でダイデオキシ法により配列決定をおこなった。得られた塩基配列の波形を GENETYX ver.12 (GENETYX CORPORATION) を用いて目視で注意深く確認し, 最終的な決定配列を得た。

(3) 塩基配列比較解析及び系統類縁関係の推定

本研究で決定した配列に、GenBankに登録されている韓国個体配列 (FJ236015) の *cytb* 領域と、SUZUKI ら¹⁰⁾ で決定された3配列 (*L. lutra* (China), *L. lutra* (Europe), *L. lutra* (Latvia)) を加え、解析をおこなった。SUZUKI ら¹⁰⁾ で解析された個体は、それぞれ試料を提供した動物園と試料の種類、その個体の由来が論文中に記載されている。試料を提供した動物園と、1996年当時該当する動物園で飼

育されていた個体の由来をユーラシアカワウソ国内血統登録で照らし合わせ、解析された個体を推定した。その結果、*L. lutra* (Latvia) が #85 または #86、*L. lutra* (China) は #7, #8, #9, #16 のいずれか、*L. lutra* (Europe) が #17, #18, #31, #32, #94, #95 のいずれかと推定された (表2)。アライメントはMEGA6¹²⁾ の Clustal W でおこない、目視で注意深く確認した。最尤法による系統解析では、配列からスタート/ストップコドンを除いた。解

表 2 SUZUKI ら¹⁰⁾ で配列決定された個体とその国内血統登録番号と由来。

サンプル名	試料を提供した動物園	試料の種類	試料と考えられる個体の国内血統登録番号	試料の由来と、試料と考えられた理由
<i>L. lutra</i> (Latvia)	日本, 神戸市立王子動物園	筋肉	#85 または #86	ラトビア, リガ動物園から導入されたラトビア産の野生個体。ラトビアに由来する個体は国内血統登録されているものでは王子動物園で飼育されていたこの2個体のみ。1993年にどちらの個体も死亡していたため筋肉組織が提供されたと考えられる。
<i>L. lutra</i> (China)	日本, 広島市安佐動物公園	体毛	#7, #8, #9, #16	#7, #8 および #9 はすべて中国, 成都動物園から導入された四川省産の野生個体。#16 は #8 の子。国内血統登録されている個体で、1996年まで安佐動物園で飼育されていた個体は上記4頭以外にいない。子個体の #16 が使用されていても、mtDNA は #8 と同一の遺伝子型である。
<i>L. lutra</i> (Europe)	日本, 高知県立のいち動物公園	体毛	#17, #18, #31, #32, #94, #95	スイス, ベルン動物園から導入された個体 (#17 と #18) と #18 の子 (#31, #32, #94 および #95)。1996年までのいち動物公園で飼育されていた個体は上記6個体と中国亜種 #12 (オス) である。標本の取り扱いが Europe であることから #12 の可能性は排除した。残り6個体は全て特定の1個体 (B-line) の mtDNA 遺伝子型を有している。

			コドン位置																			
			III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	I	III	I	
			1	1	2	2	2	3	3	4	5	5	5	8	8	9	9	9	0	1	9	0
			6	0	1	0	3	8	0	4	3	0	6	9	9	9	0	1	9	6	6	6
			3	8	7	7	1	2	6	5	2	1	1	4	1	2	6	0	6	6	6	6
A-line	<i>L. lutra</i> #59	本研究	A	A	T	C	G	G	G	T	C	A	C	A	C	A	T	A	C	A	A	
欧州亜種	<i>L. lutra</i> (Latvia)	Suzuki et al. (1996)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B-line	<i>L. lutra</i> #60	本研究	G	G	C	T	.	.	A	.	.	.	G	.	C	.	G	T	.	.	.	
	<i>L. lutra</i> (Europe)	Suzuki et al. (1996)	-	G	C	T	.	.	A	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
中国亜種	<i>L. lutra</i> #12	本研究	.	.	C	T	.	.	A	.	.	.	G	.	.	.	G	T	G	.	.	
	<i>L. lutra</i> #24	本研究	.	.	C	T	A	A	A	C	T	G	T	.	T	.	C	.	T	.	.	
	<i>L. lutra</i> (China)	Suzuki et al. (1996)	-	G	C	T	.	.	A	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
韓国産	<i>L. lutra</i> _FJ236015	Jang and Hwang (unpublished)	.	.	C	T	A	.	A	C	.	G	.	.	T	.	C	.	T	.	.	

図 1 Cytochrome *b* 遺伝子全長配列 (1140 bp) で検出されたユーラシアカワウソの変異サイト。 *L. lutra* #59 の配列を基準とし、それと同じである場合ピリオド (.) で示し、異なる場合だけその塩基組成を示す。配列情報が無い場合は、ハイフン (-) で示す。塩基サイト番号は *L. lutra* #59 に基づいた。黒色でハイライト表示されている塩基サイトは欧州亜種に特徴的な変異サイトを示す。灰色でハイライト表示されている塩基サイトは B-line に特徴的な変異サイトを示す。太線で表示した領域は SUZUKI ら¹⁰⁾ と IWATA ら⁸⁾ で用いられた 307 bp において B-line と中国亜種の 1 配列で同一だった配列を示す。

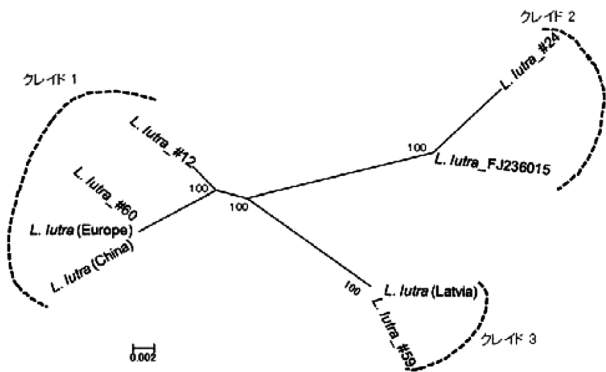


図2 ユーラシアカワウソのCytochrome *b* 配列 (1134 bp) に基づいた無根系統樹。ノードの数値はブートストラップ確率を示す。

析はRAxMLプログラム v8.1.1^{13,14)} を用い、塩基置換モデル GTR+ Γ +I¹⁵⁻¹⁷⁾、ブートストラップ1000回で推定した。塩基配列におけるコドンの1番目、2番目、3番目の進化速度の違いを考慮し、それぞれにパーティションを設定し、枝の長さを個別に推定し最終的な系統樹を推定した。配列の欠損は全てミッシングデータとして扱った。

3. 結 果

(1) *cytb* 遺伝子配列の比較解析

4頭のユーラシアカワウソ(表1)からmtDNAの*cytb*全長配列(1140 bp)を決定した。*L. lutra* #59 (A-line)と*L. lutra* #60 (B-line)の決定配列はそれぞれIWATAら⁸⁾で得られたA-lineとB-lineの塩基配列(307 bp)と一致した。本研究で決定した配列と、SUZUKIら¹⁰⁾で決定された3配列及びGenBankに登録されている韓国個体配列を多重アライメントした結果、1140 bpの配列から18の塩基サイトで変異を検出した(図1)。本研究で決定したA-lineの個体である*L. lutra* #59の配列はSUZUKIら¹⁰⁾で決定されたラトビア産個体の配列*L. lutra* (Latvia)と一致した。さらに、*cytb*全長配列でA-line(*L. lutra* #59)を他の配列(*L. lutra* #60, *L. lutra* #12, *L. lutra* #24 および FJ236015)と比較すると4つの塩基サイトで特徴的な変異を示した(図1, 黒色ハイライトで表示)。SUZUKIら¹⁰⁾とIWATAら⁸⁾の解析で用いられた*cytb*領域307 bpではB-lineの個体(*L. lutra* #60)とSUZUKIら¹⁰⁾による*L. lutra* (Europe)ならびに中国亜種の*L. lutra* (China)で配列に違いは認められなかった(図1, 太線で表示した領域)。しかしながら、*cytb*全長配列で比較すると欧州亜種と東南アジア亜種が交雑した可能性のあるB-line(*L. lutra* #60)から2つの特徴的な変異サイトが見出された(図1, 灰色ハイライトで表示)。この変異サイトは東南アジア亜種の特徴の可能性はある。以上より、本研究でA-lineとB-lineのそれぞれに特徴的と考えられる変異サイトを見出すことができた。その一方で、同じ中国亜種に属する*L. lutra* #12と*L. lutra* #24では変異の程度が大きく、むしろ*L. lutra* #24は*cytb*全長配列を決定した4個体の中で独特の変異サイトを数多く示しており、これにより中国亜種を特徴づける

ような変異サイトは確認されなかった。

(2) ユーラシアカワウソ種内の系統解析

本研究で決定した配列とSUZUKIら¹⁰⁾で決定された3配列及び韓国個体配列(FJ236015)を用いて系統解析をおこなった。系統解析によって得られた無根系統樹を図2に示す。クレイドは3つに分けられ、IWATAら⁸⁾の結果と同様にA-lineとB-lineは異なるクレイドを形成した(図2)。B-line(*L. lutra* #60)は中国産個体*L. lutra* (China)と中国亜種(*L. lutra* #12)と欧州産個体*L. lutra* (Europe)とともにブートストラップ(BP)値100%でクレイド1を形成した。A-line(*L. lutra* #59)はラトビア産個体*L. lutra* (Latvia)とBP値100%でクレイド3を形成した(図2)。一方で、韓国個体(FJ236015)と中国亜種(*L. lutra* #24)がBP値100%でクレイド2を形成した(図2)。

4. 考 察

(1) A-line について

系統解析において欧州亜種のA-lineはSUZUKIら¹⁰⁾で決定された*L. lutra* (Latvia)とクレイド3を形成した(図2)。本研究ではSUZUKIら¹⁰⁾で決定された配列を用いて系統解析をおこなうことでIWATAら⁸⁾では示されなかった欧州亜種が独自の系統である可能性を示唆することができた。KOEPLIら¹⁸⁾は、ユーラシアカワウソをイギリスからロシア、イスラエルまでの欧州から35個体、韓国から6個体、計41個体の*cytb*全長配列(1140 bp)と*NADH5*の部分配列(692 bp)を決定し、系統解析を行っている。その結果、欧州産と韓国のユーラシアカワウソはそれぞれ独自のクレイドを形成し、姉妹群関係となっている。本研究の結果もKOEPLIら¹⁸⁾と同様に欧州亜種が韓国のユーラシアカワウソが含まれるクレイド2と異なるクレイド3を形成した。

(2) B-line とアジアのユーラシアカワウソについて

SUZUKIら¹⁰⁾およびIWATAら⁸⁾の解析で用いられた*cytb*領域307 bpでは、B-line(*L. lutra* #60)と*L. lutra* (Europe)および*L. lutra* (China)の配列に差異は見出されなかった(図1, 太線で表示した領域)。SUZUKIら¹⁰⁾で解析された個体はそれぞれ、*L. lutra* (Latvia)が#85または#86、*L. lutra* (China)は#7, #8, #9, #16のいずれか、*L. lutra* (Europe)が#17, #18, #31, #32, #94, #95のいずれかと推定された(表2)。我々がEAZAからの情報とユーラシアカワウソ国内血統登録を精査し、*L. lutra* (Europe)の試料とされた可能性のある個体は全て特定の1個体(B-line)のmtDNA遺伝子型を有していると分かった(図3アスタリスク, 表2)。よって、*L. lutra* (Europe)はB-lineであると考えられる。一方で、*L. lutra* (China)は配列決定された307 bpにおいてB-line(*L. lutra* #60及び*L. lutra* (Europe))と共有する変異をサイト番号108(図1)で示した。しかし、*L. lutra* (China)として可能性がある試料(国内血統登録番号#7, #8, #9, #16)はいずれも四川省の動物園から導入された四川省産の野生個体とそ

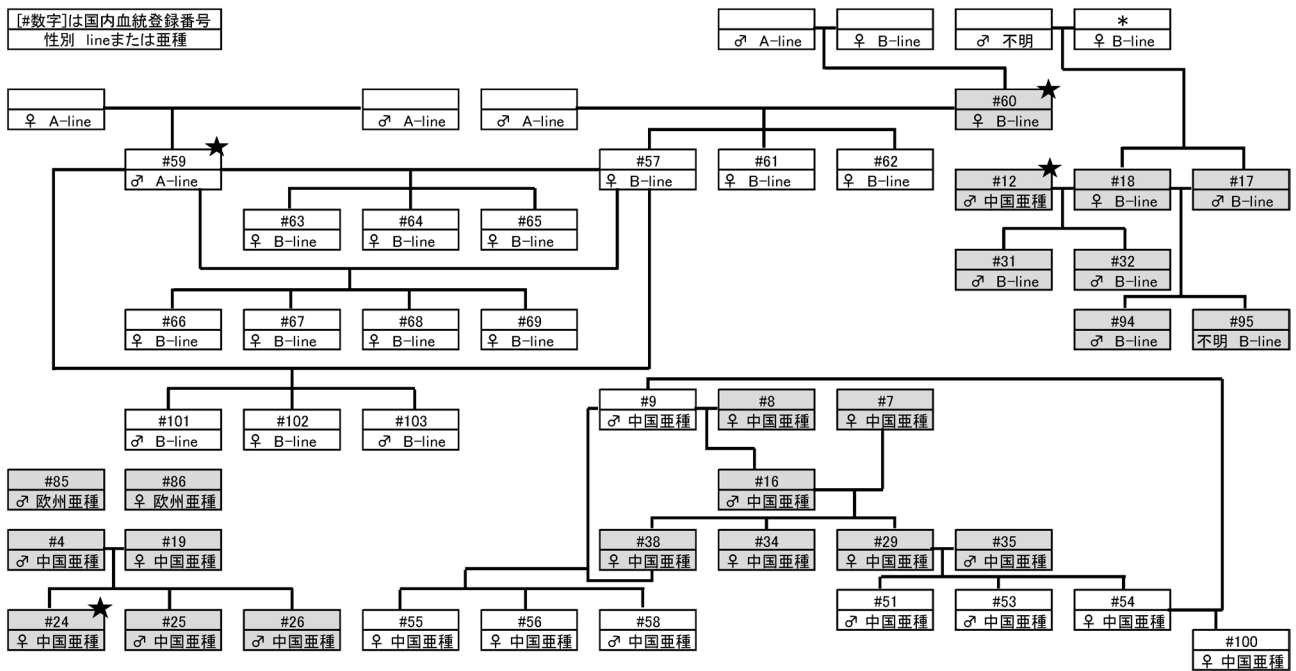


図3 国内で飼育されている個体と本研究で解析された個体の家系図。死亡が確認されている個体は灰色でハイライト表示されている。血統登録番号が表示されていない個体は日本の園館に導入されていない個体を示し、国内血統登録番号が表示されている個体は日本の園館で死亡したか飼育されている個体を示す。性別不明個体は生後まもなく死亡した個体である。#85と#86はA-lineが定義される前の個体である。星印で示されている個体を本研究で解析した。アスタリスクはSUZUKIら¹⁰⁾の*L. lutra* (Europe)として解析された可能性のある個体のもつmtDNA遺伝子型のもととなった個体を示す。

の子である。よって、*L. lutra* (China) は中国亜種と考えられる。本研究で決定した *cytb* 全長配列を比較することで、B-line (*L. lutra* #60) から特徴的な変異サイトを2つ見出すことができた(図1, 灰色ハイライトで表示)。この2つの変異サイトはB-line, A-line, 中国及び韓国のユーラシアカワウソを識別できる可能性がある。この変異サイトはIWATAら⁸⁾で決定された307bp以外の領域から示された。系統解析においてB-line (*L. lutra* #60及び*L. lutra* (Europe)) は*L. lutra* (China) 及び*L. lutra* #12とクレイド1を形成し、A-line (*L. lutra* #59) は*L. lutra* (Latvia) とクレイド3を形成した(図2)。IWATAら⁸⁾は*cytb* 領域の部分配列に基づき、B-lineとA-lineの遺伝的分化について示唆した。本研究は*cytb*の全長配列を解析することで情報量を増やし、さらにユーラシアカワウソ亜種の分類を考慮した系統解析を行うことで、B-line (*L. lutra* #60)のmtDNAは欧州亜種であるA-line (*L. lutra* #59)と系統的に異なる可能性を示唆した。アジア地域には東南アジア亜種と中国亜種が生息している。図3に示すように、*L. lutra* #60及び*L. lutra* (Europe)の繁殖にこれまで中国亜種のみは関わっていないため、本研究で決定されたB-line (*L. lutra* #60)のmtDNA配列は東南アジア亜種に由来すると考えられる配列である。これまで東南アジア亜種のmtDNA配列として報告されたものは無いが、本研究では*cytb*全長配列を解析することで東南アジア亜種に特徴的な可能性のある変異サイトを2つ見出すことに成功した(図1, 灰色ハイライトで表示)。一方で、中国亜種の遺伝的多様性には精査の余地が残されている。本研

究では2個体の中国亜種の*cytb*全長配列を解析に用いた。*L. lutra* #12は山東省の動物園から日本に導入された中国亜種であり、*L. lutra* #24の母親は中国・天津の動物園に由来する。系統解析の結果、*L. lutra* #12はB-line (*L. lutra* #60)とクレイド1を形成し(図2, 100%BP)、*L. lutra* #24は韓国個体(FJ236015)とクレイド2を形成した(図2, 100%BP)。このように同じ中国亜種とされる分類群でも遺伝的に異なる2つの系統の存在が示唆された。本研究の系統解析では外群を用いていないが、KOEPLIら¹⁸⁾によりユーラシアカワウソは単系統群で、欧州亜種と韓国個体がそれぞれクレイドを形成し、姉妹群関係となることがわかっている。よって本研究の結果は中国亜種が単系統群を形成しない可能性を示唆している。しかしながら、亜種の系統分類解明のために韓国産ユーラシアカワウソの分類学的位置づけを明らかにする必要もある。中国のユーラシアカワウソは中国亜種*L. l. chinensis*に分類されているが、韓国のユーラシアカワウソに亜種名は現在割り当てられていない。本研究の結果は、中国亜種の一部と韓国のユーラシアカワウソの遺伝的な近縁性を示唆した。中国と韓国、そして東南アジアのユーラシアカワウソの亜種分類と系統類縁関係を解明するために、アジアの広域にまたがる多くの地域個体群から形態学的、分子系統学的な検証が必要である。

(3) 国内動物園のユーラシアカワウソ繁殖に向けて

本研究はIWATAら⁸⁾よりさらに多くの配列情報を得て行った解析であり、その結果先行研究で示唆されたA-line

と B-line の間の遺伝的差異をさらに強く示した。この違いは B-line (*L. lutra*#60) の mtDNA が欧州亜種のものではなく、東南アジアに由来する可能性が考えられる。JAZA 所属園館で飼育されていたユーラシアカワウソは非常に少なかったが、本種を国内の園館で維持するために A-line と B-line を交配し、2012 年から 3 年間で 10 頭の子孫を得て、現在は 22 頭となっている。しかし、依然として国外から新個体が多く導入される見込みも低い。そのため、B-line を組み込んだ繁殖計画で個体数を増やし展示動物として本種を国内で維持することが必要である。しかし、B-line は亜種間交雑したと考えられるため、B-line が関わる繁殖は特定の亜種を系統維持する保全目的には適していない。

遺伝学的背景を考慮した繁殖に取り組むことは、保全遺伝学の観点から重要である。2015 年 5 月現在、国内で飼育されている中国亜種の母系統は、四川省産の野生個体 #7 の母系統のみでこれに該当する個体は #51, #53, #54, #55, #56, #58, #100 である (図 3)。この母系統は、四川省の野生個体に由来する mtDNA である *L. lutra* (China) がクレイド 1 を形成することから、クレイド 1 に属すると考えられる。本研究で中国亜種に 2 つの系統があることが示唆されたが、クレイド 2 の系統は国内の園館では絶えている (図 3)。よって中国亜種の母系統が単一である現在は、中国亜種の現存個体同士で繁殖させ、クレイド 1 に属する中国亜種の系統を維持することが本亜種の保全に貢献すると考えられる。また、今後新たに中国亜種が国外から導入された場合、中国亜種の 2 系統 (クレイド 1 と 2) を考慮した繁殖を行うため、事前に分子系統学的評価をおこなう必要がある。

謝辞：富山市ファミリーパークの村井仁志氏、アクアマリンふくしまの平治隆氏、のいち動物公園園長の多々良成紀氏、よこはま動物園ズーラシアの植田美弥氏をはじめ、本研究の遂行においてサンプル提供と情報収集に助力をくださいました JAZA 所属園館の方々に感謝いたします。また、欧州におけるユーラシアカワウソの取り扱いについて情報提供をしていただいた EAZA の方々に感謝いたします。解析した試料を提供していただいた、いわき明星大学の岩田恵理教授に感謝申し上げます。そして、本研究の実験を手伝ってくれた東京農業大学野生動物学研究室の井上アンさんに感謝いたします。

引用文献

- 1) KRUIK H (2006) Otters: ecology, behaviour and conserva-

- tion. Oxford University Press, New York.
- 2) The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, The CITES Appendices, <<http://www.cites.org/eng>> (最終アクセス 2015 年 5 月 11 日)
- 3) The International Union for Conservation of Nature, The IUCN Red List of Threatened Species, <<http://www.iucnredlist.org>> (最終アクセス 2015 年 5 月 11 日)
- 4) CONROY J W H, YOXON P, GUTLEB A C (2000) Proceedings of the First Otter Toxicological Conference. IOSF, Broadford.
- 5) 安藤元一 (2008) ニホンカワウソ：絶滅に学ぶ生物保全学。第一版。東京大学出版。東京。
- 6) SASAKI H (2009) The Wild Mammals of Japan. Shoukadoh Book Sellers, Kyoto, pp.254-255.
- 7) 環境省 (2012) 第四次レッドリスト。環境省。東京。
- 8) IWATA E, TAIRA H, ABE Y (2014) Identification of Two Tentative Strains of Eurasian Subspecies of the Eurasian River Otter *Lutra lutra lutra* (Linnaeus, 1758) from the Partial Mitochondrial Cytochrome b Gene. *Jpn. J. Zoo. Wildl. Med.* **19** : 137-142.
- 9) 富山市ファミリーパーク (2014) ユーラシアカワウソ国内血統登録。富山市ファミリーパーク。富山。
- 10) SUZUKI T, YUASA H, MACHIDA Y (1996) Phylogenetic position of the Japanese river otter *Lutra nippon* inferred from the nucleotide sequence of 224bp of the mitochondrial cytochrome b gene. *Zool. Sci.* **13** : 621-626.
- 11) SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATUS T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 12) TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30** : 2725-2729.
- 13) STAMATAKIS A (2006) RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics.* **22** : 2688-2690.
- 14) STAMATAKIS A, HOOVER P, ROUGEMONT J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Syst. Biol.* **57** : 758-771.
- 15) HASEGAWA M, KISHINO H, YANO T (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22** : 160-174.
- 16) RODRIGUEZ F, OLIVER J L, MARIN A, MEDINA J R (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* **142** : 485-501.
- 17) YANG Z (1996) Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Trends. Ecol. Evol.* **11** : 367-372.
- 18) KOEPFLI K P, KANCHANASAKA B, SASAKI H, JACQUES H, LOUIE K D Y, HOAI T, DANG N X, GEFFEN E, GUTLEB A, HAN S, HEGGERGET T M, LAFONTAINE L, LEE H, MELISCH R, RUIZ-OLMO J, SANTOS-REIS M, SIDOROVICH V E, STUBBE M, WAYNE R K (2008) Establishing the foundation for an applied molecular taxonomy of otters in Southeast Asia. *Conserv. Genet.* **9** : 1589-1604.

Genetic Variation and Breeding Program of Eurasian Otters in Japanese Zoos and Aquariums

By

Daisuke WAKU^{*†}, Mika ANADA^{**,**}, Hiroshi OGAWA^{*},
Motokazu ANDO^{****} and Takeshi SASAKI^{*}

(Received May 20, 2015/Accepted July 24, 2015)

Summary : Eurasian otter (*Lutra lutra*) is a mid-sized species belonging to the order Carnivora and is distributed across a wide area of the Eurasian continent. This species comprises 11 subspecies. The European subspecies (*L. l. lutra*), the Southeast Asian subspecies (*L. l. barang*), and the Chinese subspecies (*L. l. chinensis*) are reared in European and Japanese zoos and aquariums. Among these, the European facilities rear two lines, which were named A-line (*L. l. lutra*) and B-line (this is likely a crossbreed of *L. l. lutra* and *L. l. barang*); the Japanese facilities introduced these two lines. The mitochondrial (mt) DNA partial cytochrome *b* (*cytb*) sequence (307 bp) of the A- and B-lines detected previously have shown slight but characteristic differences between the two lines. However, the previous study had limitations, as only one sample of the B-line was considered and the sequence was found to be short. Although, typically, breeding involves mating of individuals within the same subspecies, the A- and B-lines were crossbred in the Japanese facilities, which is likely because only small numbers of the Eurasian otter were reared in these facilities, thereby making cross-breeding imperative to the conservation of Eurasian otter in this country. In this study, we determined the complete *cytb* sequence (1140 bp) from one individual each of the A- and B-lines, and two individuals of the Chinese subspecies. These sequences were compared and subjected to phylogenetic analysis, along with four individuals of Eurasian otter (which includes one B-line individual). The B-line individual showed diagnostic nucleotides at two positions, whereas the A-line individual showed diagnostic nucleotides at four positions. In the phylogenetic tree, two B-line individuals formed a monophyletic group with the two individuals of Chinese subspecies, and an A-line individual formed another monophyletic group with the other European individual. These results suggest that mtDNA sequence of B-line was derived from some Asian subspecies, and it differed from the A-line sequence (European subspecies). Moreover, because these results suggest that hybridization between the European subspecies and some Asian subspecies occurred in the B-line, the breeding program involving B-line individuals is not appropriate to the conservation of subspecies-specific strains.

Key words : Eurasian otter, Cytochrome b gene, Subspecies, Zoo, Aquarium

* Department of Human and Animal-Plant Relationships, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Toyama Municipal Family Park Zoo

*** Japanese Association of Zoos and Aquariums, Species Coordinator for Eurasian Otter

**** Faculty of Animal Health Technology, Yamazaki Gakuen University

† Corresponding author (E-mail : daisuke.w.nodai@gmail.com)