

伊東市および小田原市に定着した外来種 ハリネズミのミトコンドリア DNA 多型解析

岡 孝夫*・長谷川洋子*・鉄谷龍之**・安藤元一*・石井信夫***・
LEE Hang****・小川 博*・天野 卓*

(平成 22 年 2 月 25 日受付/平成 22 年 4 月 23 日受理)

要約: 本研究はミトコンドリア DNA (mtDNA) の塩基多型情報から伊東市と小田原市に生息するハリネズミの種を同定することを目的とした。両地域のハリネズミに加え、韓国産マンシュウハリネズミ *Erinaceus amurensis* の mtDNA D-loop 領域前半 450 bp の塩基配列を決定し、既報のナミハリネズミ *E. europaeus* およびヒトイロハリネズミ *E. concolor* の配列を加えて解析を行なった。その結果、伊東市および小田原市のハリネズミではそれぞれ 1 つのハプロタイプしか認められなかった。一方、韓国産ハリネズミは 4 個体で 4 つのハプロタイプが認められた。このことから現在日本に定着しているハリネズミの遺伝的多様性は低く、また、両地域の個体群が異なる導入経路を持つ可能性も示唆された。系統樹において、伊東市および小田原市のハリネズミは韓国産 *E. amurensis* とクラスターを形成し、*E. europaeus* および *E. concolor* からは高いブートストラップ確率にて明確に区別された。また、伊東・小田原-*E. amurensis* 間の遺伝的差異は他の 2 種における種内変異レベルの遺伝的差異よりも小さかった。よって伊東市および小田原市のハリネズミは *E. amurensis* であることが明らかとなった。

キーワード: 外来種, 種同定, ハリネズミ, 分子系統, ミトコンドリア DNA

1. はじめに

日本では 2006 年に外来生物法によりハリネズミ属 (*Erinaceus*) が特定外来生物に指定された。ハリネズミ属にはナミハリネズミ *E. europaeus*, ヒトイロハリネズミ *E. concolor*, マンシュウハリネズミ *E. amurensis* の 3 種が属している¹⁾。*E. europaeus* は西ヨーロッパから中央ヨーロッパにかけて、*E. concolor* はヨーロッパ南東部からシリアにかけて、*E. amurensis* は朝鮮半島、中国北東部からロシアにかけて生息している。日本では現在、静岡県²⁾と神奈川県³⁾で生息が確認されている。日本では具体的な被害は報告されていないが、ニュージーランドでは *E. europaeus* により、地上に営巣する在来渉禽類の卵が捕食されるなどの被害が報告されており⁴⁾、日本でも同様の被害が懸念される。日本のハリネズミもこれまで *E. europaeus* とされていたが⁵⁾、石井^{6,7)}は頭骨の形態に着目し、底蝶形骨の形状から日本に生息するハリネズミを *E. amurensis* とした。しかしながら、日本のハリネズミの種同定に関して、分子遺伝学的観点からの研究は行なわれていない。

近年、多くの外来生物で核 DNA やミトコンドリア DNA (mtDNA) などの分子遺伝マーカーを用いて、侵入集団の種や起源、分散様式、侵入にともなう遺伝的構造の変化に

関する研究が行なわれている^{8,9)}。また、外部形態からは判別できない隠蔽種^{8,9)}の存在や複数回の侵入、在来種との交雑についても研究されている^{8,9)}。特に、種同定や移入経路の推定においては mtDNA が用いられてきた¹⁰⁾。本研究では静岡県伊東市および神奈川県小田原市で捕獲されたハリネズミの mtDNA D-loop 領域の塩基配列情報から、同地域のハリネズミの種を同定することを目的とした。

2. 材料および方法

1) 供試動物

伊東市のハリネズミは 2003~2009 年にかけて市内 12 か所で捕獲した 25 個体を用いた。サンプリングは市内の東西 8 km, 南北 12 km の範囲で行なった。小田原市のハリネズミは 2003~2009 年にかけて市内 2 か所で捕獲した 6 個体に神奈川県立生命の星・地球博物館が保管する 3 個体を加えた。サンプルは博物館の個体を含め、市内の東西 3 km, 南北 2 km の範囲で捕獲されたものを用いた。韓国産 *E. amurensis* は Conservation Genome Resource Bank for Korean Wildlife (CGRB) に保管されていた 4 個体 (CGRB 登録番号 3639, 3798, 4050, 6316) を用いた。詳細は表 1 に示した。

DNA は肝臓、筋肉、糞、仮剥製標本から標準的なフェ

* 東京農業大学農学部バイオセラピー学科

** 東京農業大学大学院農学研究科畜産学専攻

*** 東京女子大学現代教養学部数理科学科

**** ソウル大学獣医学部

表 1 本研究で分析したハリネズミの採取地

採取地	個体数	
伊東市	ゴールド川奈カントリークラブ	3
	サザンクロスカントリークラブ	3
	長田農園	3
	川奈ホテル	2
	ぐらんぱる公園	1
	さくらの里	4
	池	1
	小室山	2
	伊豆シャボテン公園	1
	国民宿舎	1
	天城霊園	1
	伊豆急分譲地	3
	小田原市	曾我別所
曾我谷津		3
曾我地域 (神奈川県立博物館)		2
沼代 (神奈川県立博物館)		1
韓国	全羅南道 (CGRB3639)	1
	江原道 (CGRB3798, 4050)	2
	京畿道 (CGRB6316)	1

韓国のサンプルには CGRB の登録番号を示した

ノール・クロロフォルム法¹¹⁾にて抽出した。得られた DNA 溶液は分光光度計 GeneQuant pro.C (Amersham Biosciences) にて濃度測定を行ない、20 ng/μl に調整し、実験に用いた。

2) 目的領域の増幅および塩基配列の決定

PCR 法による目的領域の増幅には既報¹²⁾のプライマー (Forward ; 5'-ATA CTC CTA CCA TCA ACA CCC AAA G-3', Reverse ; 5'-GTC CTG AAG AAA GAA CCA GAT GTC-3') を用いた。反応は PCR Thermal Cycler SP (TaKaRa Bio) を用いて 25 μl の反応系 (鋳型 DNA 20 ng, dNTP 各 0.2 mM, プライマー各 0.5 μM, TaKaRa Ex Taq Polymerase HS (TaKaRa) 1 unit および PCR Buffer) にて 94°C 3 分の予備変性の後、94°C 1 分、62°C 1 分、72°C 2 分を 35 サイクル、次いで 72°C 10 分の反応を行ない、目的領域を増幅させた。2% アガロースゲル電気泳動にて増幅を確認し、Wizard SV Gel & PCR Clean Up System (Promega) にて PCR 産物の精製を行なった。塩基配列の決定は MacroGen Japan に委託し、ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit および ABI 3730xl Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行なった。シーケンシングプライマーは PCR-Reverse プライマーを用いた。

3) データ解析

得られた塩基配列は BioEdit 7.0.9.0¹³⁾ にて確認を行な

い、ClustalX 1.83¹⁴⁾ にてアライメントを行なった。次に Kimura の 2 変数モデル¹⁵⁾ にもとづき、近隣結合法 (NJ 法)¹⁶⁾ にて無根分子系統樹を作成した。系統樹の作成には GenBank に登録されている *E. europaeus* (AF379703~AF379749) および *E. concolor* (AF379750~AF379766) の配列¹²⁾ を加えた。系統樹の分岐の信頼性はブートストラップ法¹⁷⁾ にて求めた。また、塩基配列間の相違の程度を示す P-distance (%) を算出し、比較を行なった。

3. 結 果

ハリネズミ 38 個体の D-loop 領域前半 450 bp の塩基配列を決定した。D-loop 領域の開始位置は既報^{12,18)} の配列および *E. europaeus* の mtDNA 全塩基配列¹⁹⁾ をもとに決定した。アライメントの結果、36 bp からの AT の反復数に高頻度 (31/38) で個体内多型が認められた。これは他の動物種においても報告されており^{20,21)}、系統遺伝学的な情報量は低いとされているため、解析から除いた。

得られた配列を既報の *E. europaeus* (GenBank Accession No. AF379703) と比較した結果を図 1 に示した。43 か所の塩基置換と 1 か所の挿入/欠損により、6 つのハプロタイプが認められた。本研究で認められた 6 ハプロタイプに共通の置換は 25 か所であった。また、得られた配列は国際塩基配列データベース GenBank/EMBL/DDBJ に登録した (図 1)。伊東市のハリネズミ 25 個体はすべて同じハプロタイプ (以下、伊東型) であった。小田原市のハリネズミ 9 個体も同じハプロタイプ (以下、小田原型) であり、伊東型とは 4 塩基の差異 (3 か所の塩基置換、1 か所の挿入/欠損) が認められた。対照的に韓国のハリネズミ 4 個体からは 4 つのハプロタイプ (以下、韓国 1~4) が認められた。

本研究で得られた 6 ハプロタイプ (伊東型、小田原型、韓国 1~4) に *E. europaeus* (AF379703~AF379749) および *E. concolor* (AF379750~AF379766) の配列¹²⁾ を加え NJ 系統樹を作成した (図 2)。系統樹において 3 つのクラスター、すなわち *E. europaeus* クラスター、*E. concolor* クラスターおよび伊東・小田原・韓国クラスターが認められた。いずれのクラスターも高いブートストラップ確率で他とは明確に区別された (それぞれ 100%, 98.8%, 98.9%)。伊東・小田原・韓国クラスターはさらに 2 つのサブクラスター、すなわち伊東・小田原サブクラスターと韓国サブクラスターに分かれた (ブートストラップ確率はそれぞれ 98.3%, 100%)。平均 P-distance は *E. europaeus* および *E. concolor* のクラスターに含まれた配列間でそれぞれ 2.47% と 1.87%、伊東型・小田原型-韓国型間で 1.89%、*E. europaeus*-*E. concolor* クラスター間で 6.36%、*E. europaeus*-伊東・小田原間、*E. concolor*-伊東・小田原間でそれぞれ 4.93% と 5.76% であった。

4. 考 察

これまで、ハリネズミ属 3 種の mtDNA 多型については主にヨーロッパに生息する 2 種、*E. europaeus* および *E. concolor* で報告されてきた^{12,18)}。一方、中国や韓国に生息

- a Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 12) SEDDON, J.M., SANTUCCI, F., REEVE, N.J. and HEWITT, G.M. (2001) DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology* **10**, 2187-2198.
 - 13) HALL, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.
 - 14) THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. and HIGGINS, D.G. (1997) The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.
 - 15) KIMURA, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111-120.
 - 16) SAITOU, N. and NEI, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biological Evolution* **4**, 406-425.
 - 17) FELSENSTEIN, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
 - 18) SANTUCCI, F., EMERSON, B.C. and HEWITT, G.M. (1998) Mitochondrial DNA phylogeography of European hedgehogs. *Molecular Ecology* **7**, 1163-1172.
 - 19) KRETTEK, A., GULLBERG, A. and ARNASON, U. (1995) Sequence analysis of the complete mitochondrial DNA molecule of the hedgehog, *Erinaceus europaeus*, and the phylogenetic position of the Lipotyphla. *Journal of Molecular Evolution* **41**, 952-957.
 - 20) GHIVIZZANI, S.C., MACKAY, S.L.D., MADSEN, C.S., LAIPIS, P. J. and HAUSWIRTH, W.W. (1993) Transcribed heteroplasmic repeated sequences in the porcine mitochondrial DNA D-loop region. *Journal of Molecular Evolution* **37**, 36-47.
 - 21) MIGNOTTE, F., GUERIDE, M., CHAMPAGNE, A.M. and MOUNOLOU, J.C. (1990) Direct repeats in the non-coding region of rabbit mitochondrial DNA, involvement in the generation of intra- and inter-individual heterogeneity. *European Journal of Biochemistry* **194**, 561-571.

Mitochondrial DNA Polymorphisms of Alien Hedgehogs in Ito and Odawara, Japan

By

Takao OKA*, Yoko HASEGAWA*, Tatsuyuki TETSUYA**, Motokazu ANDO*,
Nobuo ISHII***, Hang LEE****, Hiroshi OGAWA* and Takashi AMANO*

(Received February 25, 2010/Accepted April 23, 2010)

Summary : This study analyzed the mitochondrial DNA D-loop region of hedgehogs in Ito and Odawara to evaluate their genetic variation and taxonomic status. In addition, D-loop sequences of the Korean hedgehog *Erinaceus amurensis* as well as the reported sequences of the two European hedgehog species *E. europaeus* and *E. concolor* were investigated. Both populations from Ito and Odawara showed only one haplotype each with a difference of three substitutions and one indel of 450 bp between them. In contrast, four haplotypes were observed in four samples obtained from different regions of Korea. It is suggested that the genetic diversity of the hedgehog in Ito and Odawara were low but they have independent introduction routes. In the phylogenetic tree of genus *Erinaceus*, specimens from Ito and Odawara were clustered with the Korean hedgehog and were separated from the two European species with a high bootstrap value. Genetic variation between the Ito-Odawara species and *E. amurensis* was less than observed in 'inter' species of other two species. These results suggest that hedgehogs found in Ito and Odawara are actually *E. amurensis*.

Key words : Hedgehog, Invasive alien species, Mitochondrial DNA, Molecular phylogeny, Specific classification

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

** Department of Animal Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

*** Division of Mathematical Science, School of Arts and Sciences, Tokyo Women's Christian University

**** Seoul National University College of Veterinary Medicine