

ミトコンドリア DNA に基づいた
ユーラシアカワウソおよびニホンカワウソの
保全遺伝学的研究

2016 年

和久 大介

目次

第 1 章 序論

I.	生物の保全と遺伝学の貢献.....	3
II.	カワウソ亜科 <i>Lutrinae</i> および <i>Lutra</i> 属について.....	4
III.	遺伝子マーカーとしてのミトコンドリア DNA と近年の配列決定技術革新	5
IV.	本研究の内容.....	6
	表	7

第 2 章 日本動物園水族館協会が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

I.	序論.....	8
II.	材料と方法.....	11
1.	DNA 標本.....	11
2.	<i>cytb</i> 遺伝子領域の増幅と塩基配列決定.....	11
3.	塩基配列比較解析および系統類縁関係の推定.....	12
III.	結果.....	13
1.	<i>cytb</i> 遺伝子配列の比較解析	13
2.	ユーラシアカワウソ種内の系統関係	13
IV.	考察.....	15
1.	A-line について.....	15
2.	B-line とアジアのユーラシアカワウソについて.....	15
3.	国内動物園および水族館のユーラシアカワウソ繁殖に向けて	17
	図表	19

第3章 絶滅したニホンカワウソの系統類縁関係の評価

I.	序論.....	24
II.	材料と方法.....	27
1.	現存種の試料および塩基配列決定.....	27
2.	絶滅したニホンカワウソの試料および塩基配列決定方法.....	29
3.	ミトコンドリア DNA 全長配列のアノテーション.....	31
4.	配列の比較解析.....	32
5.	分子系統解析.....	32
6.	コアレセント解析.....	33
7.	分岐年代推定.....	34
III.	結果と考察.....	37
1.	先行研究で決定された配列との比較.....	37
2.	カワウソ亜科におけるニホンカワウソの系統学的位置づけ.....	40
3.	ニホンカワウソおよびユーラシアカワウソの詳細な系統関係.....	41
4.	ニホンカワウソの進化の時間的尺度と日本への移住.....	42
IV.	結論.....	45
図表	46
第4章 総論	72
謝辞	75
引用文献	77
摘要	89
Summary	95

第1章 序論

I. 生物の保全と遺伝学の貢献

地球上では無数の生物が共存し多様性を作り出している。もちろんのこと、我々ヒト *Homo sapiens* も地球上の生物の多様性を織りなす 1 要素であろう。今日、この生物の多様性を保全する取り組みが世界的に行われており、顕著な例として生物の多様性に関する条約（CBD）が挙げられる。CBD は 2015 年末現在で 196 ヶ国が批准する世界に広く受け入れられている条約である。Global Biodiversity Outlook 4 (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2014) によると、この条約は生物多様性の保全、生物多様性の構成要素の持続可能な利用、遺伝資源の利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分の 3 項目を目的としている。CBD により保全が必要とされる生物多様性は、生態系、種、種内集団の多様性および種内の遺伝的多様性を含む概念であり、その保全は 1) 生物資源の経済的価値、2) 生態系サービス、3) 賛美的価値、4) 生物が生存する権利の 4 点から正当化される (Frankham et al., 2002)。また、国際自然保護連合 (IUCN) は生物多様性の保全は遺伝的多様性、種多様性および生態系の多様性の 3 階層において必要だとしている。

今日、生物多様性の構成要素である遺伝的多様性を保全するための学問として保全遺伝学が発達してきた。この学問は種を「環境の変化に応じて進化しうる動的な実体」として保存対象とし、絶滅の危険性を可能な限り減少させるための遺伝学の応用分野である (Frankham et al., 2002)。保全遺伝学では絶滅リスクを減少させるために以下に示す項目において保全に貢献する：(1) 近交弱勢や遺伝的多様性の消失による絶滅リスク増大の予防、(2) 保全対象集団の決定、(3) 集団構造の解明、(4) 分類学的問題の解決、(5) 種内管理単位の決定、(6) 交雑の検出 (7) 非侵襲的な調査、(8) 再導入集団と地域の選定、(9) 違法取引された動植物の検出、(10) 種生物学の理解。保全遺伝学は野生下および飼育下にかかわらず適用され、対象生物の遺伝的なリスクの評価だけではなく、保全すべき集団を見極めるとともにその保全方法に道筋を与えている。本研究は保全遺伝学と題し、分子形質から系統樹を構築することで対象種の遺伝的背景を明

らかにし、上述した保全遺伝学における主要な項目 (4), (5) および (6) にあたる分類学的な問題の解決、種内管理単位の決定、そして交雑の検出において新たな知見を与える。

II. カワウソ亜科 *Lutrinae* および *Lutra* 属について

カワウソ亜科 *Lutrinae* の現存種は 7 属 13 種に分類され (IUCN, 2016 ; Wozencraft, 2005) (表 1-1), 4 つの大陸 (ユーラシア, アフリカ, 北米, 南米) に広く分布する半水生の中型哺乳類である。このうち *Lutra* 属はユーラシアカワウソ *Lutra lutra* およびスマトラカワウソ *Lutra sumatrana* の 2 種だが, 20 世紀以降に絶滅したニホンカワウソ *Lutra nippon* を含めるとかつては 3 種で構成されていたと考えられる。ニホンカワウソの絶滅はカワウソ亜科において特別な出来事ではなく, 現存しているカワウソ亜科 13 種においても何らかの絶滅の危険性がある。The IUCN Red List of Threatened Species (以下, IUCN Red List) (IUCN, 2015) はカワウソ亜科のうち 5 種を絶滅危惧 IB 類 (Endangered) に, 2 種を絶滅危惧 II 類 (Vulnerable) に, 5 種を準絶滅危惧 (Near Threatened) に, 1 種を軽度懸念 (Least Concern) にランク付けており, 集団の増減傾向に関してもカナダカワウソ以外は減少と評価している (表 1-1)。*Lutra* 属において, スマトラカワウソは生息が確認されている地域が局所的なため絶滅危惧 IB 類に, ユーラシアカワウソは欧州の複数の国や地域で地域絶滅が起きており (Conroy and Chanin, 2000) 準絶滅危惧にランク付けられている (表 1-1)。この状況から *Lutra* 属各種の生息域内保全および生息域外保全が進められている一方で, 保全上解決しなければならない問題が存在する。

Lutra 属の保全のために解決すべき具体的な問題として以下の 2 点が挙げられる。(1) 欧州においてユーラシアカワウソの地域絶滅が起きている現状を踏まえて欧州動物園水族館協会 (EAZA) および日本動物園水族館協会 (JAZA) は所属園館において本種の繁殖を実施し, 生息域外保全を行っている。しかしながら飼育個体に亜種間交雑が疑われる系統が欧州と日本の動物園および水族館に存在しており, 亜種を考慮した繁殖計画を立てる障害となっている。(2) 我が国で絶滅したニホンカワウソはカワウソ亜科内における系統学的位置づけが不明である。ニホンカワウソの分類は先行研究により日本固有種 *L. nippon* とされる一方で, IUCN Red List (2015)

ではユーラシアカワウソの異名（シノニム）として扱われており、分類は混乱している。上記に示した *Lutra* 属における問題は保全遺伝学的観点からも解決しなければならない。

III. 遺伝子マーカーとしてのミトコンドリア DNA と近年の配列決定技術革新

遺伝学的解析ツールとして、動物のミトコンドリア DNA (mtDNA) は分子系統学的研究や系統地理学的研究で広く用いられており、それらの研究結果は保全遺伝学に応用されている。この mtDNA の特徴として以下の 4 点が挙げられる：1) 子の性別に関係なく母親のみから受け継ぐ（母系遺伝）、2) 核 DNA (nDNA) と比べると進化速度が速いため種内変異の検出が可能である、3) 通常は nDNA で観察されるような遺伝的組み替えが起らない、4) 1 細胞中に 1 コピーの nDNA と比べて mtDNA は 1 細胞中に数十から数千のコピーが含まれている。上記に示した mtDNA の特徴は、種および種内集団を母系から認識でき系統解析に適している (Awise, 2000)。加えて、経年劣化や薬品処理の影響で DNA が断片化し減少している絶滅した動物の博物館標本試料などでも nDNA と比べて mtDNA はコピー数が多いことから比較的容易に DNA 配列を得ることが可能である。

遺伝子配列の解析技術における特筆すべき進歩として、2005 年以降に登場した次世代シーケンサー (NGS) がある。NGS は従来のダイデオキシ法 (Sanger et al., 1977) とは異なる解析技術 (NGS の製造会社によりそれぞれ技術が異なる) を用いた配列決定機器で、比較的短時間に大量の塩基配列を決定することが可能である。この機器の登場により、これまで莫大な時間と資金が必要であった古代 DNA (出土骨やミイラ、博物館標本から抽出された DNA) の解析が飛躍的に効率化した。特に脊椎動物の解析では NGS が登場した初期段階において有袋類の絶滅したタスマニアタイガー *Thylacinus cynocephalus* の仮剥製標本 1 個体とエタノール液浸標本 1 個体から mtDNA 配列が決定され、タスマニアタイガーとその他有袋類間の系統類縁関係に新たな知見を示した (Miller et al., 2008)。それ以降、奇蹄目ウマ科 *Equus* 属において絶滅したクアッガ *Equus quagga* の剥製標本のみならず後期更新世のウマ出土骨から mtDNA 配列を決定し系統類縁関係を解明した研究や (Vilstrup et al., 2013)、マダガスカルに生息していた飛ばない大型鳥類

エピオルニス Aepyornithidae の出土骨から mtDNA 配列の決定がなされ、エピオルニスはニュージーランドに生息するキーウィ *Apteryx* に近縁であることが解明された (Mitchell et al., 2014). 上記のように、NGS を用いた配列決定技術はその登場後も進歩を続け、博物館標本からの塩基配列決定も比較的容易となりつつある. このようにして得られた mtDNA 配列は遺伝的多様性の評価、系統解析および分岐年代推定が可能であるため上記に記した *Lutra* 属における保全遺伝学的課題の解決に貢献できると期待される.

IV. 本研究の内容

本研究は哺乳綱食肉目イタチ科カワウソ亜科の特に *Lutra* 属に着目し、mtDNA に基づいて分子レベルで個体の特徴を調べることにより、保全遺伝学上の問題を解決することを目標とした. 第2章では JAZA が管理するユーラシアカワウソから亜種間交雑の検出と遺伝学的背景を考慮した繁殖計画の提案をおこない、第3章では現生種とニホンカワウソの系統類縁関係を解明し、地理的な情報を加えることで系統地理学的な新しい洞察を与えることを目的とした.

表1-1. 現生するカワウソ亜科 (Lutrinae) 13種の絶滅リスクと増減傾向.

属	種名	和名	絶滅リスク評価	増減傾向
<i>Lutra</i>	<i>Lutra lutra</i>	ユーラシアカワウソ	準絶滅危惧	減少
	<i>Lutra sumatrana</i>	スマトラカワウソ	絶滅危惧IB類	減少
<i>Aonyx</i>	<i>Aonyx cinerea</i>	アジアコツメカワウソ	絶滅危惧II類	減少
	<i>Aonyx capensis</i>	ケープツメナシカワウソ	準絶滅危惧	減少
	<i>Aonyx congicus</i>	コンゴツメナシカワウソ	準絶滅危惧	減少
<i>Lutrogale</i>	<i>Lutrogale perspicillata</i>	ビロードカワウソ	絶滅危惧II類	減少
<i>Hydricteis</i>	<i>Hydricteis maculicollis</i>	ノドブチカワウソ	準絶滅危惧	減少
<i>Enhydra</i>	<i>Enhydra lutris</i>	ラッコ	絶滅危惧IB類	減少
<i>Lontra</i>	<i>Lontra canadensis</i>	カナダカワウソ	絶滅危惧IB類	安定
	<i>Lontra longicaudis</i>	オナガカワウソ	準絶滅危惧	減少
	<i>Lontra felina</i>	ミナミウミカワウソ	絶滅危惧IB類	減少
	<i>Lontra provocax</i>	チリカワウソ	絶滅危惧IB類	減少
<i>Pteronura</i>	<i>Pteronura brasiliensis</i>	オオカワウソ	絶滅危惧IB類	減少

絶滅リスクと増減傾向はIUCN Red List (IUCN, 2015) に従った.

第2章 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

I. 序論

ユーラシアカワウソ *L. lutra* はイギリスから北アフリカ、イスラエル、そして東アジアまで広く分布する (Kruuk, 2006). IUCN Red List (2015) によると本種には7亜種が存在しており、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* および中国や台湾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 The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (ワシントン条約) で付属書 I に, IUCN Red List (2015) では準絶滅危惧にランク付けられている絶滅の恐れのある種であり, 実際に地域絶滅も起きている (Conroy and Chanin, 2000). 日本にも本種の1亜種 *L. l. whiteleyi* が北海道に生息していたが斜里郡における1955年の捕獲情報を最後に道内で情報は無くなり (安藤, 2008 ; Sasaki, 2009), 環境省は第四次レッドリストで絶滅を宣言している (環境省, 2012).

欧州における本種の地域絶滅を鑑み, 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 *L. l. lutra* のみを用いた繁殖計画が進められている. その一方で, イギリスのノーフォークワイルドライフパークでは1970年代に欧州亜種 *L. l. lutra* と東南アジア亜種 *L. l. barang* が同居飼育されていたため, 同施設で出生した個体は亜種間交雑によりできた子孫の可能性があり, EEP は A-line と区別して B-line と定義している (Iwata et al., 2014). B-line は EAZA が現在取り組んでいる 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に活用することができない. 現在, 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 (富山市ファミリーパーク, 2014) 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、ふくしま海洋科学館に導入されたオス、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 はふくしま海洋科学館のオス 1 個体のみである。A-line のメスは国内で飼育されておらず、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 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、JAZA 内で中国亜種 *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 系統のみが現存し、7 頭が #7 の孫である。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。加えて、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困難に直面している。

国内で飼育されている A-line はオス 1 個体のみ、B-line は全てメス個体のため JAZA は A-line を B-line と掛け合わせる繁殖と中国亜種内の繁殖を試みており、国内における飼育頭数の増加を図りユーラシアカワウソの存続に尽力している。保全遺伝学的観点から亜種を考慮した繁殖が望まれるが、A-line と B-line および中国亜種の遺伝的な差異を EAZA や JAZA は調べておらず、各個体の遺伝的背景を考慮した繁殖計画の具体策は提案されていない。以上のような問題を踏まえ Iwata et al. (2014) は、ふくしま海洋科学館で飼育されている A-line、B-line の各個体から Suzuki et al. (1996) で決定された mtDNA の Cytochrome *b* (*cytb*) 遺伝子部分配列 307 bp と同じ領域の配列を決定し比較した。塩基配列比較の結果 A-line と B-line 間にわずかであるが差異を認め、さらに系統解析において A-line と B-line が別のクレイドを形成したことから A-line と B-line は遺伝的に分化している可能性を示唆した。しかし、B-line の解析個体は 1 個体であり B-line に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、亜種が精査されていない個体が比較と系統解析に用いられていること、そして塩基配列の

長さが短いことから、**B-line** の分子系統学的な結論は未だ得られていないと言える。

そこで、本研究では mtDNA の *cytb* 遺伝子全長配列 (1,140 bp) を **A-line**, **B-line** の各 1 個体と中国亜種の 2 個体から決定し、Suzuki et al. (1996) で決定されたユーラシアカワウソ配列および GenBank に登録されている韓国のユーラシアカワウソ配列と比較し系統樹を再構築した。これにより **B-line** のもつ mtDNA の特徴とその由来を明らかにすることともに、日本国内におけるユーラシアカワウソの繁殖方針を検討した。

II. 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 個体と中国亜種の死亡個体 2 個体の計 4 個体を解析に用いた。本研究で用いた試料名, 出生場所, 提供園館, 由来組織および EEP における血統登録扱い (EEP line) を表 2-1 に示した。A-line 個体 *L. lutra* #59 は Iwata et al. (2014) において *cytb* 遺伝子部分配列 307 bp が決定された A-line 個体と同一個体であり, B-line 個体 *L. lutra* #60 は Iwata et al. (2014) で配列決定された B-line 個体の母親にあたる。中国亜種の *L. lutra* #12 は高知県立のいち動物公園 (NZP) から提供していただいた中国・山東省の動物園に由来する個体であり, 同じく中国亜種の *L. lutra* #24 は横浜市立よこはま動物園から提供していただいた中国・天津の動物園に由来する個体である。DNA 抽出は, *L. lutra* #12, *L. lutra* #59 は冷凍筋組織を 5 mm 角程度, *L. lutra* #24 は白血球 10 mg 程度を用いて, フェノール・クロロホルム法 (Sambrook et al., 1989) によりトータルゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA を 50 μ l 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 の解析は Iwata et al. (2014) で血液試料から抽出されたトータルゲノム 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 (Accession No. FJ236015) 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') の 2 種を用いた。PCR 反応液の組成は 0.5 ユニットの Ex Taq ポリメラーゼ (TaKaRa Inc.), 1 \times Ex Taq Buffer, 0.2 mM dNTP, 1 μ M 各プライマー, および 50 ng のゲノム DNA を加え, 計 25 μ l になるよう適宜滅菌超純水を加え調節した。PCR 反応の温度条件は 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 サイクル行った。PCR 反応後, 増幅断片を 1% アガロース S (Nippon gene) ゲルで電気泳動し, ゲルはエチジウムブロマイド溶液で染色され UV トランスイルミネーターを使用して目的の約 3000 bp が増幅されていることを確認した。*cytb* 遺伝子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') および IH42-11-20 (5'-GTG CGC GGA ATA CAT ACT GG-3') の計 4 種を用い, ABI Applied Biosystems 3500 Genetic analyzer でダイデオキシ法により配列決定を行った. 得られたシーケンスデータから GENETYX ver.12 (Genetyx Corporation) を用いて mtDNA シーケンスの編集とアセンブルを行った後, 注意深く目視で確認し最終的な決定配列を得た.

3. 塩基配列比較解析およ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 (Accession No. FJ236015) の *cytb* 遺伝子全長配列と, Suzuki et al. (1996) で決定された *L. lutra* (China), *L. lutra* (Europe) および *L. lutra* (Latvia) の *cytb* 遺伝子部分配列, 合計 4 配列を加え塩基配列の比較と分子系統解析をおこなった. Suzuki et al. (1996) 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. この情報をもとに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 (富山市ファミリーパーク, 2014) で照らし合わせ, Suzuki et al. (1996) において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 2-2). *cytb* 遺伝子配列のアライメントは MEGA6.06 (Tamura et al., 2013) に実装されている Clustal W でおこない, その後目視で注意深く確認した. 最尤 (ML) 法による系統解析では, 配列から開始/終止コドンを除外しデータセットの最終的な配列長は 1,134bp となった. 系統解析は RAxML プログラム v8.1.1 (Stamatakis, 2006 ; Stamatakis et al., 2008) を用い, 塩基置換モデル GTR+ Γ +I (Hasegawa et al., 1985 ; Rodriguez et al., 1990 ; Yang 1996), ノードの信頼値はブートストラップ 1,000 回試行で推定した. 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て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合意系統樹を推定した. 配列の欠損は全てミッシングデータとして扱った.

III. 結果

1. *cytb* 遺伝子配列の比較解析

4 個体のユーラシアカワウソ（表 2-1）から mtDNA の *cytb* 全長配列（1,140 bp）を決定した。これら 4 配列の途中で終止コドンは含まれなかったため、配列決定は成功したと考えられる。*L. lutra* #59（A-line）と *L. lutra* #60（B-line）の決定配列はそれぞれ Iwata et al.（2014）が決定した A-line と B-line の *cytb* 遺伝子部分配列（307 bp）と一致した。本研究で決定した配列と、Suzuki et al.（1996）が決定した 3 配列および GenBank に登録されている韓国個体配列の合計 8 配列をアライメントした結果、1,140 bp の配列から 18 の塩基サイトで変異を検出した（図 2-1）。本研究で決定した A-line 個体 *L. lutra* #59 の配列は Suzuki et al.（1996）が決定したラトビア産個体 *L. lutra*（Latvia）の配列と一致した。さらに、*cytb* 遺伝子全長配列において A-line 個体 *L. lutra* #59 の配列を他の配列（*L. lutra* #12, *L. lutra* #24, *L. lutra* #60 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 2-1, 黒色ハイライトで表示）。Suzuki et al.（1996）と Iwata et al.（2014）の解析で用いられた *cytb* 遺伝子部分配列 307 bp の領域では B-line 個体 *L. lutra* #60 と Suzuki et al.（1996）により決定された *L. lutra*（Europe）および中国産個体 *L. lutra*（China）の 3 配列に違いは認められなかった（図 2-1, 太線で表示した領域）。しかしながら、*cytb* 遺伝子全長配列の比較から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 個体 *L. lutra* #60 から 2 つの特徴的な変異サイトが見出された（図 2-1, 灰色ハイライトで表示）。この変異サイトは A-line と中国亜種から検出されなかったため東南アジア亜種の特徴の可能性がある。以上の結果から、本研究で *cytb* 遺伝子全長配列を決定し比較したことにより 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 間では変異の程度が大きく、特に *L. lutra* #24 は *cytb* 遺伝子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、これにより中国亜種を A-line および B-line と区別できる特徴的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関係

本研究で決定した配列と Suzuki et al. (1996) が決定した 3 配列および韓国個体配列 (FJ236015) の合計 8 配列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 2-2 に示す。推定された系統樹においてクレイドは 3 つに分けられ、Iwata et al. (2014) 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 2-2)。B-line 個体 *L. lutra* #60 は中国産個体 *L. lutra* (China)、中国亜種個体 *L. lutra* #12 および *L. lutra* (Europe) とともに 100% のブートストラップ確率 (BP) 値でクレイド 1 を形成した。A-line 個体 *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 2-2)。一方で、韓国個体 (FJ236015) と中国亜種個体 *L. lutra* #24 が BP 値 100% でクレイド 2 を形成した (図 2-2)。

IV. 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 et al. (1996) で決定された *L. lutra* (Latvia) とクレイド 3 を形成した (図 2-2). 本研究は Suzuki et al. (1996) が決定した配列を用いて系統解析をおこなうことで Iwata et al. (2014) 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. Koepfli et al. (2008) 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, 合計 41 個体の *cytb* 遺伝子全長配列 (1,140 bp) と NADH dehydrogenase subunit 5 (*ND5*) 遺伝子部分配列 (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 Koepfli et al. (2008) と同様に欧州亜種は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 et al. (1996) と Iwata et al. (2014) が解析した *cytb* 遺伝子部分配列 307 bp の領域では, B-line 個体 *L. lutra* #60, *L. lutra* (Europe) および *L. lutra* (China) の 3 配列に差異は見出されなかった (図 2-1, 太線で表示した領域). Suzuki et al. (1996) 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 2-2). 本研究で 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 2-3 アスタリスク, 表 2-2). よって, *L. lutra* (Europe) は B-line であると考えられる. 一方で, *L. lutra* (China) は配列が決定された 307 bp の領域内で B-line [*L. lutra* #60 および *L. lutra* (Europe)] と共有する変異をサイト番号 108 (図 2-1) 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* 遺伝子全長配列を比較することで、B-line 個体 *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 2-1, 灰色ハイライトで表示)。この2つの変異サイトは B-line を A-line, 中国亜種および韓国のユーラシアカワウソと識別できる可能性がある。この変異サイトは Iwata et al. (2014) で決定された 307 bp の領域外から示された。系統解析において B-line [*L. lutra* #60 および *L. lutra* (Europe)] は *L. lutra* (China) および中国亜種個体 *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 2-2)。Iwata et al. (2014) は *cytb* 遺伝子部分配列 307 bp に基づき、B-line と A-line 間に遺伝的分化がある可能性を示唆した。本研究は *cytb* 遺伝子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の亜種分類を考慮した系統解析を行うことにより、B-line 個体 *L. lutra* #60 の mtDNA は欧州亜種である A-line 個体 *L. lutra* #59 と系統的に異なる可能性を強く示唆した。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 2-3 に示すように、*L. lutra* #60 および *L. lutra* (Europe) の繁殖にこれまで中国亜種のメス個体は関わっていないため、本研究で決定された B-line 個体 *L. lutra* #60 の mtDNA は東南アジア亜種に由来すると考えられる。これまで東南アジア亜種 *L. l. barang* の mtDNA 配列として報告されたものは無いが、本研究では *cytb* 遺伝子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 2-1, 灰色ハイライトで表示)。

一方で、本研究の系統解析により中国亜種が単一のクレイドを形成しなかったことから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個体の中国亜種から *cytb* 遺伝子全長配列を決定し解析に用いた。*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 2-2, 100%BP)、*L. lutra* #24 は韓国個体 (FJ236015) とクレイド 2 を形成した(図 2-2, 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、Koepfli et al. (2008) 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。すなわち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. 国内動物園および水族館のユーラシアカワウソ繁殖に向けて

本研究は Iwata et al. (2014) より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 間の遺伝的差異をさらに強く示した。この遺伝的な違いは B-line (*L. lutra* #60) の受け継いだ mtDNA が欧州亜種由来ではなく、東南アジア亜種由来の遺伝子型であることを示しているのかもしれない。A-line と B-line を掛け合わせる繁殖が日本で行われるまで 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、2012 年から 3 年間で A-line と B-line による子孫が 10 頭得られ、現在の全飼育頭数は 22 頭となっている（富山市ファミリーパーク, 2014）。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ための繁殖には適していない。

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 2-3）。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、*L. lutra* #24 と韓国産個体 (FJ236015) が形成したクレイド 2 の系統は国内の園館では絶え

ている（図 2-3, #4, #24, #25 および#26）。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性がある。

			コドン位置 III I III I																																			
			1																																			
			サイト番号																																			
			1	1	2	2	2	3	3	4	5	5	5	8	8	9	9	9	0	1	9	6																
			6	0	1	0	3	8	0	4	3	0	6	9	9	9	0	1	9	6	3	8	7	7	1	2	6	5	2	1	1	4	1	2	6	0	6	6
A-line	<i>L. lutra</i> #59	This study	A	A	T	C	G	G	G	T	C	A	C	A	C	A	T	A	C	A																		
欧州亜種	<i>L. lutra</i> (Latvia)	Suzuki et al. (1996)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B-line	<i>L. lutra</i> #60	This study	G	G	C	T	.	.	A	.	.	.	G	.	C	.	G	T	.																			
	<i>L. lutra</i> (Europe)	Suzuki et al. (1996)	-	G	C	T	.	.	A	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>L. lutra</i> #12	This study	.	.	C	T	.	.	A	.	.	.	G	G	T	G																		
中国亜種	<i>L. lutra</i> #24	This study	.	.	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	unpublished	.	.	C	T	A	.	A	C	.	G	.	.	T	.	C	.	T	.																		

図 2-1. Cytochrome *b* 遺伝子全長配列 (1,140 bp) から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 et al. (1996) と Iwata et al. (2014) で用いられた 307 bp の領域において B-line と中国亜種の 1 配列間で一致した配列を示す。

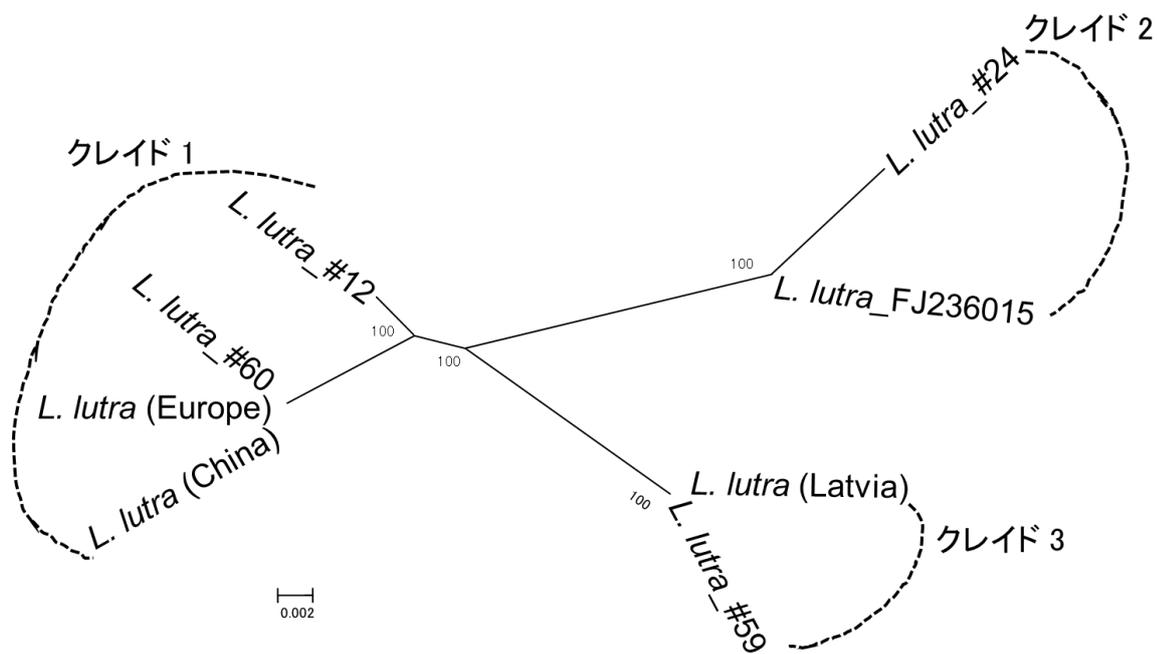


図 2-2. ユーラシアカワウソの Cytochrome *b* 配列 (1,134 bp) に基づいた無根系統樹. ノードの数値はブートストラップ 1,000 回試行によって推定されたノードの信頼度を示す.

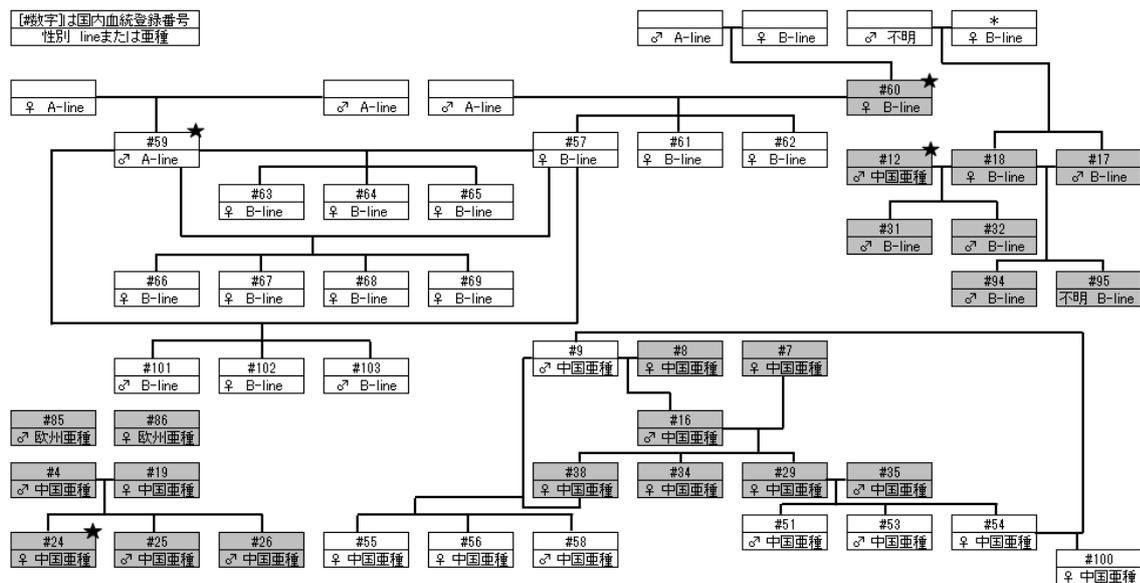


図 2-3. 国内で飼育されている個体と本研究で解析された個体の家系図. 死亡が確認されている個体は灰色でハイライト表示されている. 血統登録番号が表示されていない個体は日本の園館に導入されていない個体を示し, 国内血統登録番号が表示されている個体は日本の園館で死亡したか飼育中の個体を示す. 性別不明個体は生後まもなく死亡した個体である. #85 と #86 は A-line が定義される前の個体である. 星印で示されている個体を本研究で解析した. アスタリスク (*) で示された個体は Suzuki et al. (1996) の *L. lutra* (Europe) として解析された可能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.

表2-1. 本研究で用いた試料名，出生場所，提供園館，由来組織およびEEPにおける取り扱い（EEP line）

試料名	出生場所	提供園館	由来組織	EEP line
<i>L. lutra</i> #12	日本, アドベンチャーワールド	日本, 高地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, 横浜市立よこはま動物園	白血球	無し
<i>L. lutra</i> #59	ドイツ, ヘラブルン動物園	日本, ふくしま海洋科学館	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

表2-2. Suzuki et al (1996)で配列決定された個体とその国内血統登録番号と由来.

試料名	提供園館	由来 試料と考えられる個体 組織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. 残りの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.

第3章 絶滅したニホンカワウソの系統類縁関係の評価

I. 序論

1920年代まで日本の北海道、本州、四国および九州にニホンカワウソが生息していた (Sasaki, 1995). しかしながら, 1979年に高知県・新荘川での目撃情報を最後に確実な生息情報は無くなり[安藤, (2008), Sasaki, (2009)], 環境省は第四次レッドリストで絶滅を宣言した (環境省, 2012). 日本周辺のアジア地域にはユーラシアカワウソ *L. lutra*, スマトラカワウソ *L. sumatrana*, ビロードカワウソ *Lutrogale perspicillata* およびコツメカワウソ *Aonyx cinerea* の計4種が生息しているが, ニホンカワウソは *Lutra* に属することが先行研究で示唆されている. ニホンカワウソを初めて分類したのは Gray (1867) で, 北海道函館で捕獲されたニホンカワウソ2個体の頭骨に基づいて本種をユーラシアカワウソの1亜種 *L. l. whiteleyi* と分類した. 現在, IUCN Red List (2015) でこの亜種名は示されておらず, 欧州と北アフリカに生息する *L. l. lutra*, インドとスリランカに生息する *L. l. nair*, インド, ネパール, ブータンおよびミャンマーに生息する *L. l. monticola*, インド北部に生息する *L. l. kutab*, ネパールとインド北部に生息する *L. l. aurobrunnea*, タイ, マレーシアおよびインドネシアに生息する *L. l. barang*, そして中国南部と台湾に生息する *L. l. chinensis* の計7亜種が示されている. Gray (1867) による分類が行われた後, Imaizumi and Yoshiyuki (1989) はニホンカワウソ15個体の頭骨 (本州産7個体, 四国産6個体および北海道産2個体) とユーラシアカワウソの頭骨の形態形質に基づき本種の分類を再検討し, 本州と四国のニホンカワウソを日本固有種 *L. nippon*, 北海道のニホンカワウソをユーラシアカワウソの亜種 *L. l. whiteleyi* と分類した. 更に Endo et al. (2000) は新規解析個体5個体を含む四国産ニホンカワウソ7個体, 中国のユーラシアカワウソ5個体および台湾の中国亜種 *L. l. chinensis* 1個体の頭骨を形態形質に基づき比較し, ニホンカワウソはユーラシアカワウソと形態学的に明確に異なることから Imaizumi and Yoshiyuki (1989) の結果を支持した. しかしながら, 彼らの研究では本州産ニホンカワウソと中国亜種 *L. l. chinensis* 以外のユーラシアカワウソ6亜種と比較を行っていない.

分子系統学的研究では, Suzuki et al. (1996) により愛媛県産ニホンカワウソ 1 個体 (図 3-1B) から mtDNA の *cytb* 遺伝子部分配列 (224 bp) が決定され, ユーラシアカワウソ 4 個体 (ラトビア産の欧州亜種 *L. l. lutra* 1 個体, 中国・四川省産の中国亜種 *L. l. chinensis* 1 個体および亜種不明 2 個体) とコツメカワウソ 1 個体の配列とともに系統解析が行われた. 彼らの解析結果は, 愛媛県産ニホンカワウソはユーラシアカワウソ 4 個体の形成する単系統群と姉妹群関係で, 独立した系統である可能性を示した. この結果から, 彼らは Imaizumi and Yoshiyuki (1989) によって示された四国のニホンカワウソを日本固有種とする分類を支持した. しかしながら彼らの研究は, PCR 産物をサブクローニングすることで 1 個体のニホンカワウソ標本から 2 種類の *cytb* 遺伝子配列 (c4 と c5) と 1 種類の *cytb* 遺伝子に似た配列 (ph7) の計 3 配列を得ているが, 候補の 3 配列から *cytb* 遺伝子の相同配列を特定できていないため, ニホンカワウソと近縁種の系統類縁関係を正確に推定するには確かな相同配列を系統解析に用いる必要がある. また, 分子系統解析では mtDNA 全長 (mtgenome) 配列 (約 16,400 bp) などに基づき形質情報を増やすことで真の分子系統樹へ迫ることが有効だが (Ingman, 2000), Suzuki et al. (1996) で決定されたニホンカワウソの mtDNA 配列は 224 bp と短いため, より多くの遺伝的変異情報に基づいた分子系統解析が望まれる. Koepfli et al. (2008) は *cytb* 遺伝子全長配列 (1,140 bp) と *ND5* 遺伝子部分配列 (692 bp) に基づきカワウソ亜科 11 種の系統類縁関係を検討した. この研究では欧州と韓国から収集した合計 41 個体のユーラシアカワウソからも配列を決定し系統解析を行っているが, それにはニホンカワウソは含まれていない. 上記のようなニホンカワウソを日本固有種とする主張は Mammal Species of the World (Wozencraft, 2005) で採用されている一方で, IUCN Red List (2015) は *L. nippon* をユーラシアカワウソ *L. lutra* の異名として扱い, 日本の環境省も第四次レッドリスト (環境省, 2012) でユーラシアカワウソの亜種 *L. l. nippon* として扱っており, 本種の分類は現在も論争の最中である.

絶滅した動物の系統類縁関係にまつわる研究は NGS の登場により劇的に進歩した. 絶滅動物の分子系統学的研究では, 博物館標本から抽出した DNA を NGS で解析し, 得られたリードデータから mtgenome などの配列を効率的に得ている [例えば, Miller et al. (2009) や

Mitchell et al. (2014)]]. そのようにして得られた配列に基づいて分子系統樹を再構築することで絶滅した動物の進化史に新たな知見を提供している.

本研究では絶滅したニホンカワウソ 2 個体の博物館標本から NGS を用いて mtgenome 配列を決定し, カワウソ亜科 11 種の配列と比較することで遺伝的な特徴を見出した. そして, ニホンカワウソの系統分類学的位置づけを解明するため mtDNA 部分配列もしくは mtgenome 配列に基づき近縁種との分子系統樹を再構築するとともに, ニホンカワウソとユーラシアカワウソの進化の時間的尺度を推測するため, 分岐年代を推定した.

II. 材料と方法

1. 現存種の試料および塩基配列決定

本研究で mtgenome 配列を決定し解析に用いた 5 個体のユーラシアカワウソの試料名、系統登録番号もしくは標本番号、採取地もしくは由来、性別、採取年、提供機関、塩基配列決定方法および Accession No. を表 3-1 に示した。ユーラシアカワウソ 1 (EO1 ; 由来不明のオス個体) およびユーラシアカワウソ 4 (EO4 ; 中国から輸入された母親をもつメス個体) を NZP から、ユーラシアカワウソ 2 (EO2 ; 中国から輸入された母親をもつオス個体) を横浜市立よこはま動物園から、中国亜種 *L. l. chinensis* のユーラシアカワウソ 3 (EO3 ; 中国・四川省の野生個体を母親にもつオス個体) を富山市ファミリーパークから、そしてユーラシアカワウソ 5 (EO5 ; 1960–1977 年の間にサハリンで収集された性別不明の死亡個体) を国立科学博物館から提供していただいた。このうち EO1, EO2, EO4 および EO5 の亜種分類は不明である。EO1–EO4 の冷凍筋組織は 5mm 角程度、EO5 の乾燥組織は 20mg 程度からフェノール・クロロホルム法 (Sambrook et al., 1989) によりトータルゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA を 20–50 μ L 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。

EO1–EO3 および EO5 の計 4 個体からシーケンスの鋳型となる mtgenome を得るため、本研究では Multiplex PCR (MPCR) 法 (Krause et al., 2006) を採用した。MPCR 法で増幅断片を得るために、mtgenome を隣り合う断片と部分的にオーバーラップする 408–545 bp (プライマー含む) の 46 断片に分け、mtgenome 全体をカバーするよう設計した (図 3-2A)。46 断片を増幅するために既知の韓国産ユーラシアカワウソの mtgenome 配列 (Accession No. FJ236015) からアウタープライマー (MPCR 用) とインナープライマー (Simplex PCR 用) を各断片に設計し、その合計は 167 種となった (表 3-2)。MPCR はアウタープライマーを奇数番断片に対応する第 1 セット 46 種 (23 組) と偶数番断片に対応する第 2 セット 46 種 (23 組) に分けて使用した (図 3-3A, 表 3-2)。2 つの MPCR 反応液の組成は 1 ユニットの Ex Taq ポリメラーゼ (TaKaRa Inc.), 1 \times Ex Taq buffer, 0.2 mM dNTP, 1 μ M 各プライマーセット [46 種 (23 組)] および 1–50 ng のゲノム DNA を入れ、計 50 μ L になるよう適宜滅菌超純水を加え調節した。MPCR 反応の温度条件は

94°C で 20 秒, 50°C で 30 秒, 72°C で 1 分を 1 サイクルとして 27 サイクル行った. *mtgenome* のダイレクトシーケンスに用いる鋳型を得るため, MPCR 産物を鋳型として Simplex PCR を行った (図 3-3B). Simplex PCR では MPCR で用いたアウタープライマーより内側に設計されたインナープライマー (表 3-2) を使い, その反応液の組成は 0.5 ユニットの *Ex Taq* ポリメラーゼ, 1× *Ex Taq* buffer, 0.2 mM dNTP, 2 種 (1 組) の 1 μM 各プライマーおよび MPCR 産物を 1 μL 入れ, 計 25 μL になるよう適宜滅菌超純水を加えて調節した. Simplex PCR 反応は MPCR と同じ温度条件で 27 サイクルを 33 サイクルに変更し行った. MPCR および Simplex PCR の産物は反応後, 増幅断片を 1.5% のアガロース S (Nippon Gene) ゲルで電気泳動した後, ゲルはエチジウムブロマイド溶液で染色され UV トランスイルミネーターを使用して目的の約 400–500 bp が増幅されていることを確認した (図 3-3C). *mtgenome* のシーケンシングは Simplex PCR で用いたインナープライマーを使い, ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) と ABI Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いるか Macrogen Japan へ外注しダイデオキシ法により配列決定を行った. シーケンシング PCR 反応液の組成は 0.5 μL の BigDye ver. 3.1 terminator premix, 1× sequencing buffer, 1 μM のプライマーおよび 1 μL の Simplex PCR 産物を入れ計 5 μL になるよう適宜滅菌超純水を加え調節した. 反応の温度条件は 96°C で 15 秒, 50°C で 15 秒, 60°C で 2 分を 1 サイクルとして 25 サイクル行った.

本研究では EO4 から *mtgenome* 配列を得るために Long PCR 法 (Chang et al., 1994) を採用しシーケンスの鋳型を得た. 図 3-1 に示すように *mtgenome* を L1 と L2 の 2 断片に分けて増幅した (図 3-4B). L1 断片と L2 断片は互いの断片が部分的にオーバーラップする約 12,000–13,000 bp の増副産物となる. 本研究では L1 と L2 断片から *mtgenome* をカバーする 7 断片を増幅し, シーケンスの鋳型として用いた. Nested PCR では L1 断片を鋳型に異なる 4 断片 (L1-N1, L1-N2, L1-N3 および L1-N4) を, L2 断片を鋳型に異なる 3 断片 (L2-N1, L2-N2 および L2-N3) を増幅した (図 3-4C, 表 3-3). これら 7 断片は隣り合う断片と部分的にオーバーラップする約 3,100–4,300 bp の増副産物となる. Long PCR に用いる 4 種のプライマーおよび Nested PCR に用いる 14 種のプライマーはイタチ科 Mustelidae (Mammalia, Carnivora) の *mtgenome* において保存

性が高い領域に設計した (図 3-4B, C, 表 3-3). Long PCR 反応液の組成は 1 ユニットの KOD FX Neo (TOYOBO), 1× PCR Buffer for KOD FX Neo, 0.4 mM dNTP, 0.3 μM の各プライマー および 100 ng のゲノム DNA を加え計 50 μL になるよう適宜滅菌超純水を加えて調節した. Long PCR 反応の温度条件は 94°C で 1 分の後, 98°C で 10 秒, 68°C で 15 分を 1 サイクルとして 30 サイクル行った. Long PCR によって増幅した産物から残存プライマーを除去するため, ExoSAP-IT (Affymetrix/USB, USA) による処理を Nested PCR の前に行った. Nested PCR 反応液の組成は 0.5 ユニットの Ex Taq ポリメラーゼ, 1× Ex Taq buffer, 0.4 mM dNTP, 1 μM の各プライマーおよび 1 μL の Long PCR 産物を加え, 計 25 μL になるよう適宜滅菌超純水を加えて調節した. Nested PCR 反応の温度条件は 94°C で 45 秒, 50°C で 45 秒, 72°C で 3.5 分を 1 サイクルとして 30 サイクル行った. Long PCR 産物および Nested PCR 産物は反応後, 1.0%のアガロース S ゲルで電気泳動し, ゲルはエチジウムブロマイド溶液で染色され UV トランスイルミネーターを使用して目的の増幅断片 (Long PCR 産物では約 12,000–13,000 bp, Nested PCR 産物では約 3,100–4,300 bp) を確認した. ダイレクトシーケンシングでは Nested PCR 産物を鋳型として Simplex PCR 用プライマー (表 3-2, アスタリスク) を使用し行った. シーケンシング PCR 反応液の組成と温度条件は Simplex PCR 産物の場合と同様である.

MPCR 法と Long PCR 法で得られたシーケンスデータから Genetyx ver.12 (Genetyx Corporation) を使い mtDNA シーケンスの編集とアッセンブルを行った後, 注意深く目視で確認し最終的な決定配列を得た.

2. 絶滅したニホンカワウソの試料および塩基配列決定方法

ユーラシアカワウソの DNA からの汚染 (コンタミネーション) を防ぐため, ニホンカワウソの DNA を扱う実験室と, ユーラシアカワウソの DNA を扱う実験室は完全に分けた. さらに, DNA 抽出は東京農業大学のクラス 100 クリーンベンチ (MCV-B131F; Sanyo) 内で行い, シーケンシングライブラリーの構築は国立極地研究所のクラス 100 クリーンベンチ (MCV-131BNS; Sanyo) 内で行った. また, クリーンベンチ内は DNA 抽出とシーケンシングライブラリー構築前

に夜通し紫外線照射をして残存する DNA を破壊し、DNA 抽出に用いる実験器具は 5%の漂白剤もしくは DNA Away (Molecular BioProducts) を使って残存する DNA を除去してから使用した。加えて DNA 抽出からシーケンシングライブラリー構築の過程はサーマルサイクラーや PCR 産物が置かれている部屋から分けて行った。

本研究で NGS を用いてリードデータを得た 3 個体のニホンカワウソとその試料名、血統登録番号もしくは標本番号、採取地もしくは由来、性別、採取年、提供機関、塩基配列決定方法および Accession No. を表 3-1 に示した。神奈川県三浦市三崎町城ヶ島で 1915–1916 年の間に捕獲されたニホンカワウソ 1 (JO1) を横須賀市自然・人文博物館から、高知県幡多郡大月町赤泊で 1977 年に捕獲されたニホンカワウソ 2 (JO2) を NZP から、福島県須賀川で 1935 年に捕獲されたニホンカワウソ 3 (JO3) を静岡県森林・林業研究センターから提供していただいた (図 3-1, 表 3-1)。本研究では乾燥した筋組織を JO1 と JO3 から、肉球の内側の組織を JO2 から採取し、DNeasy Blood & Tissue kits (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。DNA 抽出の手順は試料の溶解と DNA の溶出以外は取扱説明書に従った。試料の溶解は、試料を 56°C で 6 時間インキュベートしたのち 20 µL のプロテナーゼ K 溶液を追加し、その後さらに 56°C で 6 時間インキュベートして試料を完全に溶解させた。また、DNA がストックされているスピンカラムへ 100 µL の AE バッファーを加え DNA を溶出する作業を 2 度おこなうことで 200 µL の DNA 溶液を得た。

NGS で解析を行う前に、ユーラシアカワウソの mtgenome 配列決定に用いた MPCR 法でニホンカワウソの mtgenome 配列決定を試みた。しかし、MPCR ではニホンカワウソ試料の抽出 DNA から僅かな断片しか増幅できなかった。そこで本研究はニホンカワウソの mtgenome 配列決定に MiSeq デスクトップシーケンサー (Illumina) を用いた。

ニホンカワウソ試料の抽出 DNA からシーケンシングライブラリーを構築し MiSeq で解析した。シーケンシングライブラリーの構築は NEBNext Ultra DNA Library Prep kit for Illumina (New England Biolabs) を用い、PCR サイクル数を 15 サイクルへ変更した以外は取扱説明書に従った。増幅されたシーケンシングライブラリー産物はアガロースゲルで電気泳動を行い、200–700 bp の増幅断片をゲルから切り出し NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (TaKaRa Inc.) を使って

収集した。収集した JO1-JO3 のシーケンシングライブラリーを等モルに希釈しペアエンドシーケンシングの鋳型として MiSeq reagent kit v3 (Illumina) の 1 レーンを使い MiSeq デスクトップシーケンサーで解析し、各試料からリードデータを得た。

リードデータを解析可能なファイルに変換するため、MiSeq Reporter software version 2.3.32 (Illumina) を用いてリードファイル (fastq.gz) を生成した。CLC Genomics Workbench version 7.5.1 (Qiagen) の “Remove Duplicate Reads” 機能を用いてリードファイルから重複したリードを除去した後、トリム機能を用いて各リードからプライマーやアダプターを取り除いた。トリムのパラメーターは *ambiguous limit = 3*, *quality limit = 0.01*, *remove 5' nucleotide = 1 bp*, *remove 3' nucleotide = 1 bp* と設定し、トリム後 30–200 bp のリードを収集した。

重複リードおよびアダプターとプライマーの除去後、リードから mtgenome 配列を決定するため、*de novo assembly* 機能を用いてリードのアッセンブルを行った。アッセンブルのパラメーターは *mismatch cost = 2*, *insertion cost = 3*, *deletion cost = 3*, *length fraction = 0.98*, *similarity fraction = 0.98* と設定した。アッセンブル後 1,000 bp 以上のコンティグから BLAST を使って mtgenome 配列 (約 16,400 bp) を探索した。加えて、CLC Genomics Workbench の Reference to Mapping 機能を用いてリードデータを *L. lutra* の mtgenome 配列を参照配列にマッピングし mtgenome の合意配列を得た。マッピングにおける参照配列は調節領域 (CR) を 5' 末端に移動したユーラシアカワウソの mtgenome 配列 (Accession No. LC049952) を用いた。マッピングのパラメーターは *mismatch cost = 2*, *insertion cost = 3*, *deletion cost = 3*, *length fraction and similarity = 0.9* と設定した。また、複数箇所にマッピングできるリードはランダムにマッピングされるように設定した。

3. ミトコンドリア DNA 全長配列のアノテーション

ニホンカワウソおよびユーラシアカワウソの mtgenome の遺伝子コード領域を特定するためアノテーションを行った。トランスファーRNA (tRNA) とリボソーマル RNA (rRNA) は MITOS web server (Bernt et al., 2013) を使いそのコード領域と 2 次構造を推定した。そして、タ

ンパクコード領域, CR, L-origin および非コード領域は既知のカワウソ mtgenome 配列 (EF672696 および FJ236015) を参考に識別した.

4. 配列の比較解析

本研究で決定したニホンカワウソとユーラシアカワウソの配列およびアジアに生息するカワウソ 4 種 (ユーラシアカワウソ, スマトラカワウソ, ビロードカワウソおよびコツメカワウソ) の配列を比較し, ニホンカワウソの遺伝的な特徴を見出した. Koepfli et al. (2008) はアジアに生息する 4 種の *ND5* 遺伝子部分配列 (692 bp) と *cytb* 遺伝子全長配列 (1,140 bp) から, その 4 種を識別する特徴的な塩基配列を見出している. そこで, 本研究で決定したニホンカワウソとユーラシアカワウソの配列を表 3-4 に示したカワウソ亜科 11 種の mtDNA2 領域の配列と比較し, アジアに生息するカワウソ 4 種とニホンカワウソが共有する特徴的な塩基配列を確認した (表 3-4). 更に *cytb* 遺伝子全長配列のデータから MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) で Kimura's 2-parameter (K2P) モデル (Kimura et al., 1980) を使い遺伝的距離を算出した.

Suzuki et al. (1996) が愛媛県産ニホンカワウソ 1 個体から決定した配列から *cytb* 遺伝子の相同配列を推定した. Suzuki et al. (1996) は愛媛県産ニホンカワウソ 1 個体から決定した 2 種の *cytb* 遺伝子配列 (c4 および c5) と 1 種の *cytb* に似た配列 (ps7) として報告している. そこで, これら 3 配列を表 3-1 および表 3-4 に示す配列と MEGA6.06 に実装されている ClustalW を用いてアライメントし比較することで *cytb* 遺伝子の相同配列を推定した.

5. 分子系統解析

本研究では以下に示す 2 つのデータセットから分子系統樹を再構築しニホンカワウソの系統類縁関係を推定した. カワウソ亜科におけるニホンカワウソの系統学的位置づけを解明するため, 1 つめのデータセットは表 3-4 に示したカワウソ亜科 11 種の *ND5* 遺伝子部分配列 (692 bp) と *cytb* 遺伝子全長配列 (1,140 bp) および本研究で決定した配列で構成した. また, このデータセットに Suzuki et al. (1996) が決定した愛媛県産ニホンカワウソの配列から *cytb* 遺伝子に相同と推

定された配列（後述）を加えた。ND5+cytb データセットの各配列から開始/終止コドンを除きデータセットの配列長は最終的に 1,826 bp となった。ND5+cytb データセットによる系統解析の外群はオオカワウソ *Pteronura brasiliensis* を用いた。もう一方のデータセットは *Lutra* 属におけるニホンカワウソの系統学的位置づけを詳細に検討するため、表 3-4 に示した mtgenome 配列と本研究で決定したニホンカワウソおよびユーラシアカワウソの mtgenome 配列で構成した。mtgenome データセットから非コード領域、開始/終止コドン、CR、L-origin、オーバーラップ領域[ATP6 と ATP8 間、ND4 と ND4L 間、ND5 と ND6 間、tRNA-Ile (AUY) と tRNA-Gln 間、tRNA-Leu (CUN) と ND5 間および tRNA-Thr と tRNA-Pro 間]、そして ND6 遺伝子を除外した。ND6 遺伝子は L 鎖にコードされている唯一のタンパクコード遺伝子で、その他の H 鎖にコードされている 12 のタンパクコード遺伝子と異なる進化の性質を持っている (Waddell et al., 1999)。上記の領域を除去した後、mtgenome データセットの配列長は最終的に 14,740 bp となった。Mtgenome データセットによる系統解析の外群はラッコ *Enhydra lutris* を用いた。

ND5+cytb データセットと mtgenome データセットから近隣結合 (NJ) 系統樹と ML 系統樹を推定した。各データセットを MAFFT ver.7.21 (Katoh and Standley, 2013) で G-INS-i オプションを用いてアライメントしたのち、注意深く目視で確認した。NJ 解析は MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) で塩基置換モデル K2P+ Γ モデルを用いて行い、ノードの信頼度をブートストラップ 1,000 回試行で推定した。ML 解析は RAxML v8.1.1 (Stamatakis, 2006 ; Stamatakis et al., 2008) で塩基置換モデル GTR+ Γ +I モデル (Hasegawa et al., 1985 ; Rodriguez et al., 1990 ; Yang, 1996) を用いて行い、ノードの信頼度をブートストラップ 1,000 回試行で推定した。ML 解析では遺伝子ごとの進化速度の違いを考慮し、ND5+cytb データセットではコドンの 1 番目、2 番目および 3 番目に合計 3 パーティションを、mtgenome データセットでは tRNA, rRNA, コドンの 1 番目、2 番目および 3 番目に合計 5 パーティションを設定した。全てのギャップはミッシングデータとして扱い合意系統樹を構築した。

6. コアレセント解析

本研究の系統解析のデータセットはユーラシアカワウソ欧州亜種 *L. l. lutra* を含んでおらず、ニホンカワウソと欧州亜種の系統類縁関係を解明することはできないが、mtDNA の CR 部分配列に基づき最も近縁な共通祖先 (time of the most recent common ancestor : tMRCA) を算出し、ニホンカワウソと *L. l. lutra* 集団および東アジア *L. lutra* 集団間の遺伝的分化の程度を推定した。本解析は Stanton et al. (2009), Finnegan et al. (2010), Honnen et al. (2010) により 500 個体以上の *L. l. lutra* から決定された CR 部分配列と本研究で決定した東アジア *L. lutra* 配列の CR 遺伝子部分配列に基づきデータセットを作成した。最終的なデータセットは欧州集団 557 個体、東アジア集団 7 個体、日本集団 2 個体の合計 566 個体で構成された。このデータセットに基づき BEAST ver. 1.7.4 (Drummond and Rambaut, 2007) によりコアレセント法で tMRCA を推定した。本解析ではユーラシア *L. lutra* 集団 (*L. l. lutra* + *L. l. chinensis* + JO1) とユーラシア + JO2 集団 (*L. l. lutra* + *L. l. chinensis* + JO1 および JO2) の 2 集団を仮定しそれぞれの tMRCA を算出した。このデータセットの分子時計の成立を検定したところ、分子時計は棄却されなかったため、この領域において推定された塩基置換率 1.91×10^{-8} /site/year を厳密な分子時計を仮定した tMRCA の推定に採用した。塩基置換モデルは HKY85+ Γ モデル (Hasegawa et al., 1985 ; Yang, 1996) を用い、集団サイズは常に一定と仮定して推定した。マルコフ連鎖モンテカルロ (MCMC) の総世代数は 500,000,000 とし、最初の 50,000,000 世代をバーンインとして切り捨て後、1,000 世代毎に樹形をサンプリングした。パラメーターの収束は TRACR ver. 1.5 プログラム (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) を用いて全効果サンプルサイズが 200 を超えることから確認した。

7. 分岐年代推定

mtgenome 配列のタンパクコード遺伝子配列に基づきニホンカワウソの分岐年代を推定した。しかしながら、*Lutra* 属の分岐年代推定で適切な時間の目盛りあわせ (キャリブレーション) ができるカワウソ亜科の化石がないため、食肉目 Carnivora におけるカワウソ亜科の分岐年代を推定し、算出された推定値を *Lutra* 属の分岐年代推定において時間の目盛り合わせとして用

いた。食肉目全体の分岐年代推定は表 3-5 に示した食肉目 73 種と有鱗目 1 種の *mtgenome* 配列およびカワウソ亜科 8 種の *cytb* 遺伝子全長配列を GenBank から得て、H 鎖にコードされている全 12 のタンパクコード領域からデータセットを作成した。データセットは MEGA 6.06 に実装されている MUSCLE プログラム (Edgar, 2004) でアライメントしたのち、目視で注意深く確認した。このデータセットから開始/終止コドンおよびオーバーラップ領域 (*ATP6* と *ATP8* 間, *ND4* と *ND4L* 間および *ND5* と *ND6* 間) を除去し、アライメントは最終的に 10,704 bp となった。このデータセットにおいてカワウソ亜科 8 種は *cytb* 遺伝子のみのため、残り 11 遺伝子はミッシングデータとして扱った。系統解析は RAxML 7.2.8 でコドンの 1 番目, 2 番目および 3 番目それぞれの進化速度の違いを考慮し合計 3 パーティションを設定し、GTR+ Γ +I モデルを用いて行った。ノードの信頼度をラピッドブートストラップ (Stamatakis et al., 2008) 1,000 回試行により推定し合意系統樹を得た。

食肉目全体の分岐年代は PAML 4.7 プログラムパッケージ (Yang, 2007) の MCMCTREE プログラムを使い、上記データセットから推定された系統樹に基づき推定した。このデータセットは 12 のタンパクコード遺伝子で構成されるが、カワウソ亜科の 8 種は *cytb* 遺伝子のみのため *cytb* 遺伝子と他の 11 遺伝子を異なるデータセットとして扱った。Sasaki et al. (2005) は GTR+ Γ +I モデルなどの塩基置換モデルと比べコドン置換モデル (Yang et al., 1998) が優れた性能を有していること明らかにしており、本解析ではコドン置換モデルを採用した。またベイズ因子に関して独立速度モデル (Independent rate model ; Rannala and Yang, 2007) は、分岐間で進化速度に関連があるとするモデル (Auto correlated model ; Kishino et al., 2001) より良い成績を納めることから、独立進化モデルを採用した。MCMC において根の進化速度の事前確率は (4, 0.588), σ^2 は (1 0.7) と設定した。MCMC の世代数は 4,000,000 とし、最初の 200,000 世代はバーンインとして切り捨てた後、200 世代毎に系統樹をサンプリングした。時間の目盛り合わせは Yonezawa et al. (2007) および Yonezawa et al. (2009) に従い化石記録を用いた。食肉目と有鱗目の分岐は最古の有鱗目種である *Pseudobasaaris* に基づき分岐年代の下限を 28.5 Mega annum (Ma) と設定した。アザラシ科クラウンの発生は最古のアザラシ科のクラウン種である *Monotherium wymani* に

に基づき分岐年代の下限を 14.5 Ma と設定した。鰭脚下目クラウンの発生は最古の鰭脚下目のクラウン種である *Desmatophoca brachycephala* に基づき分岐年代の下限を 21.5 Ma, 鰭脚下目のステム種である *Enaliarctos tedfordi* に基づき分岐年代の上限を 28.6 Ma と設定した。クマ下目クラウンの発生は最古のクマ下目である *Amphicyon* sp. に基づき分岐年代の下限を 39.6 Ma と設定した。そして食肉目クラウンの発生は最古の食肉目である *Tapocyon* に基づき分岐年代の下限を 43 Ma, 最古の食肉目のステム種であるミアキス *Miacis* に基づき分岐年代の上限を 63.8 Ma と設定した。パラメーターの収束は TRACR ver. 1.5 プログラム (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) を用いて全効果サンプルサイズが 200 を超えることから確認した。

Lutra 属の分岐年代も食肉目全体の分岐年代推定と同様に mtgenome データの H 鎖にコードされている 12 のタンパクコード遺伝子配列に基づいて推定した。Ho et al. (2005) は塩基配列の進化率が短期間 (<1–2 Ma) では高くなり、長期間 (>1–2) では低くなることを明らかにした。これは短期間では僅かに有害な変異が集団から完全に除去されないからと考えられ、この時間的尺度ではほぼ中立な進化を示す塩基サイトを用いて分岐年代を推定することが望ましい。Endicott and Ho (2008) はこの事例においてコドンの 3 番目が分岐年代の推定上良い性能を示すと示唆した。これらの先行研究に従い、本解析ではタンパクコード遺伝子からコドンの 3 番目を抜き出し *Lutra* 属における分岐年代の推定に用いた。本解析ではラッコ *E. lutris* とスマトラカワウソ *L. sumatrana* (*cytb* 遺伝子のみ) を外群として用いた。この解析は 10 配列と限られた OUT (操作上の分類単位) 数であるため、MCMC プロセスにおいて尤度関数は正確に推定された。根の進化速度の事前確率は (4, 1.42), σ^2 は (1 0.107) と設定した。MCMC の世代数は 5,000,000 とし、最初の 100,000 世代はバーンインとして切り捨てた後、50 世代毎に系統樹をサンプリングした。mtgenome タンパクコード遺伝子に基づいた食肉目全体の分岐年代推定により *Enhydra* 属と *Lutra* 属間の分岐年代は 9.0–12.5 Ma, *L. sumatrana* と *L. lutra* 間の分岐年代は 1.8–4.8 Ma と推定され、この推定値を *Lutra* 属の分岐年代推定において時間の目盛り合わせに用いた。

III. 結果と考察

1. 先行研究で決定された配列との比較

MPCR 法と Long PCR 法を用いてユーラシアカワウソ 5 個体からほぼ完全な mtgenome 配列を決定した (表 3-6). これら mtgenome 配列の CR は Ketmaier and Bernardini (2005) や Ki et al. (2010) により報告されている反復配列を有していた. このユーラシアカワウソにおける反復配列 (5'-CAC GTA CGY AYA CAC GCA CAC B-3') は 2-10 回の反復単位で構成されると先行研究で示された. 本研究において, ユーラシアカワウソ 5 個体から 8-10 回の反復範囲であることを確認したが, その反復回数をサンガー法により断定することはできなかった. これは PCR における複製スリップ (replication slippage) が原因と考えられる (Madsen et al., 1993). そのため, 本研究では mtgenome 全長配列において反復配列を不明の配列長として扱った. 反復配列を除いたユーラシアカワウソの mtgenome 配列長は EO1 (不明), EO4 (中国) および EO5 (ロシア・サハリン) は 16,316 bp, EO2 (中国) および EO3 (中国・四川省) は 16,317 bp となった (表 3-6).

本研究はニホンカワウソのリードデータから *de novo assembly* を用いて JO1 は 140 コンティグ, JO2 は 44 コンティグを得た. それぞれのコンティグ中に哺乳類の mtgenome に似た配列長 (約 16,400 bp) が含まれており, そのうち各 1 コンティグは BLAST 検索の結果 *L. lutra* および *E. lutris* に類似していると判明した. そこで本研究では *L. lutra* と *E. lutris* の mtgenome に類似したコンティグをニホンカワウソの mtgenome として扱った. しかし, JO3 のリードデータから 463 コンティグが得られたが, *L. lutra* や *E. lutris* に類似したコンティグは含まれていなかった. *de novo assembly* の結果, JO1 は 157,703 リードから 16,316 bp (反復配列を除く) の mtgenome コンティグが, JO2 は 22,187 リードから 16,319 bp (反復配列を除く) の mtgenome コンティグが生成された (表 3-7). 加えて, Mapping to reference 機能により得られた mtgenome 合意配列は反復配列を除いて, JO1 が 16,316 bp (172,071 リード), JO2 が 16,319 bp (23,410 リード) となった. JO1 および JO2 のコンティグと合意配列の被服度 (カバレッジ) は Ajay et al. (2011) により示された超深度 (ultra-deep) の基準 100×以上となり十分な被服度が得られた (表 3-7). その

一方で、JO3 のリードデータは *L. lutra* の mtgenome にわずか 146 リードがマッピングされたのみで、その被服度は 0.96×となり、本研究において JO3 標本から mtgenome 配列を決定できなかった。

本研究で決定したニホンカワウソおよびユーラシアカワウソの mtgenome 全 7 配列の構成は一般的な哺乳類の mtgenome の特徴（13 のタンパクコード遺伝子、22 の tRNA、2 つの rRNA、CR および L-origin）と一致した（表 3-6）。タンパクコード遺伝子の途中に終止コドンはなかったことから、本研究はこれら 7 個体（EO1–EO5, JO1 および JO2）の配列決定に成功したと考える。これらの mtgenome 配列データは GenBank に登録されている（Accession Nos. LC049377, LC049378, LC049952–LC049955 および LC050126）。

GenBank に登録されているユーラシアカワウソ（Accession Nos. EF672696 と FJ236015）およびラッコ（Accession No. NC_009692）の mtgenome 配列と本研究で決定したユーラシアカワウソおよびニホンカワウソの mtgenome 7 配列を比較した。配列を比較したところ、EF672696 の配列のみ COX3 で 5 アミノ酸、ND6 で 4 アミノ酸の欠失が確認された（図 3-5）。この欠失はラッコ、ニホンカワウソおよびその他のユーラシアカワウソ 6 配列では確認されなかった。このことから EF672696 の配列データは配列決定に重大な誤りがあると考えられる。そこで、本研究ではこれ以降の解析から EF672696 のデータを除外した。

ニホンカワウソ 2 個体の遺伝的特徴を見出すため、ニホンカワウソ（JO1 および JO2）とアジアに生息しているユーラシアカワウソ、スマトラカワウソ、コツメカワウソおよびビロードカワウソの配列と比較した。Koepfli et al. (2008) は上記 4 種を識別する ND5 遺伝子部分配列（692 bp）と *cytb* 遺伝子全長配列（1,140 bp）の遺伝的な特徴が明らかにしている。そこで本研究は、彼らの種判別領域を用いニホンカワウソ配列の特徴を見出すこととした。配列を比較したところ、ニホンカワウソ 2 個体（JO1 および JO2）は 26 の塩基サイトでユーラシアカワウソの特徴的な塩基配列と（図 3-6, 黒色ハイライトで表示）、JO1 はさらに 6 つの塩基サイトでユーラシアカワウソの特徴的な塩基配列と一致したことから、ニホンカワウソ、特に JO1 はユーラシアカワウソと遺伝的にとても近縁であることが示唆された（図 3-6, 灰色ハイライトで表示）。ま

た、JO2 はスマトラカワウソと 3 つの塩基サイト（図 3-6, サイト番号 11815, 12332 および 14244）、ビロードカワウソと 1 つの塩基サイト（図 3-6, サイト番号 12319）で特徴的な塩基配列を共有し、JO1 および JO2 はそれぞれ異なる単一の塩基サイトでコツメカワウソと特徴的な塩基配列を共有した[図 3-6, サイト番号 14277 (JO2) および 14740 (JO1)]。この結果から、ニホンカワウソはアジアに生息する 4 種のカワウソのうちユーラシアカワウソと多くの変異サイトを共有しており、近縁であることが示唆された。

Suzuki et al. (1996) が愛媛県産ニホンカワウソ 1 個体から決定した 3 配列（c4, c5, ph7）から *cytb* 遺伝子の相同配列を推定した。推定のため、本研究では上記 3 配列、本研究で決定した 7 配列、そして表 3-4 に示したカワウソ亜科 11 種の *cytb* 遺伝子配列と比較を行った。ps7 は塩基サイト番号 14389 が欠失しており（図 3-7, 黒色ハイライトで表示）、この欠失によりフレームシフトが起きて ph7 のアミノ酸番号 98 をバリリン（GTA）から終止コドン（TAG）に変異させる。このことから ps7 を *cytb* 遺伝子の相同配列ではないと結論した。c5 の配列は c4 の配列とほぼ一致するが、2 つのサイトで異なる塩基を示している（図 3-7, 灰色ハイライトで表示）。塩基サイト番号 14288 で c5 はチミン、c4 はシトシンを示すがユーラシアカワウソ、スマトラカワウソ、JO1 および JO2 はシトシンを示している。加えて、この塩基置換は c5 のアミノ酸番号 39 でスレオニン（ACC）からイソロイシン（ATC）へアミノ酸の変異を引き起こす。また、塩基サイト番号 14359 で c5 はアデニンを示すが、カワウソ亜科 11 種、JO1 および JO2 の *cytb* 遺伝子はチミンを示している。この塩基置換は c5 のアミノ酸番号 63 でフェニルアラニン（TTC）からイソロイシン（ATC）へアミノ酸の変異を引き起こす。以上のことから c5 は *cytb* 遺伝子の相同配列ではないと推定した。一方で、c4 と JO2 の配列間で変異は確認されなかった。c4 と JO2 の配列は 5 つの塩基サイトにおいてユーラシアカワウソ 8 配列と異なった（図 3-7, 太線で表示した領域）。しかしながら、これらの変異はアミノ酸の変異を引き起こさない同義置換であった。上記の配列比較結果から、c4 が *cytb* 遺伝子の相同配列であろうと推定した。本研究では c4 の配列を *Lutra nippon* (Ehime) として扱い、ND5+*cytb* データセットに組み込み系統樹を再構築した。

2. カワウソ亜科におけるニホンカワウソの系統学的位置づけ

カワウソ亜科クレイドにおけるニホンカワウソの系統学的位置づけを推定するため図 3-8 に示す系統樹を *ND5+cytb* データセットから再構築した。この解析ではオオカワウソを外群として用い、推定された系統樹の樹形は Koepfli et al. (2008) で示された結果と基本的に一致した。推定された系統樹でニホンカワウソは旧大陸クレイドに含まれ、ユーラシアカワウソと単系統群を形成し統計学的に高い支持を受けた (100%BP ; 図 3-8, ノード 6)。この結果から、ニホンカワウソが *Lutra* 属の 1 種もしくは 1 亜種であり、*Lutra* 属においてユーラシアカワウソと最も近縁であると明らかになった。本解析によって推定されたニホンカワウソの系統類縁関係は、先行研究の形態と分子の形質に基づいた系統類縁関係と一致する (Imaizumi and Yoshiyuki, 1989 ; Suzuki et al., 1996 ; Endo et al., 2000)。Imaizumi and Yoshiyuki (1989) はニホンカワウソの鼻鏡 (鼻の表面) は完全に毛が生えていないと報告しており、その特徴はユーラシアカワウソと一致するが、スマトラカワウソの鼻鏡には毛が生えている (Kruuk, 2006)。この形態的な特徴からもニホンカワウソが *Lutra* 属においてユーラシアカワウソに近縁であることを示していると考えられる。推定された系統樹の *L. lutra*+ニホンカワウソのクレイドにおいて、JO1 は *L. lutra* に対して種内群であり、*L. l. chinensis* (EO3) を含む中国由来 3 個体と由来不明 1 個体とともにサブクレイドを形成した (99% BP ; 図 3-8, ノード 8)。Koepfli et al. (2008) はユーラシアカワウソ種内の遺伝的距離を欧州、中東および東アジアから集めた 41 個体の配列比較から求め、その遺伝的距離を 0.05–1.15% と算出した。本研究では JO1 とユーラシアカワウソの遺伝的距離は 0.6–1.2% となり (表 3-8)、この遺伝的距離は Koepfli et al. (2008) が示したユーラシアカワウソ種内の遺伝的距離の範囲におおよそあてはまった。この結果から JO1 は *L. lutra* と同種であると考えられる。しかしながら、同じニホンカワウソの JO2 の系統学的位置づけは JO1 と異なり、JO2 系統は JO1 を含む *L. lutra* の単系統群と姉妹群関係となった (98% BP ; 図 3-8, ノード 7)。また、この姉妹群個体間の遺伝的距離は 2.4–3.3% (表 3-8) となり、Koepfli et al. (2008) が示したユーラシアカワウソ種内の遺伝的距離より大きい値を示した。その一方で、JO2 とスマトラカワウソの遺

伝的距離は 7.2%で、*L. lutra* (JO1 含む) とスマトラカワウソの遺伝的距離は 6.7–7.4%となった。これにより JO2 はスマトラカワウソからも明確に遺伝的な分化をしていると考えられる (表 3-8)。

本解析はユーラシアカワウソの欧州亜種 *L. l. lutra* の配列を含んでおらず、JO2 系統が欧州亜種系統である可能性が残る。そこで先行研究で 500 個体以上の *L. l. lutra* から決定された CR 部分配列に基づきコアセメント法でユーラシア *L. lutra* 集団 (*L. l. lutra* + *L. l. chinensis* + JO1) とユーラシア + JO2 集団 (*L. l. lutra* + *L. l. chinensis* + JO1 および JO2) の 2 集団を仮定し tMRCA を算出した。この結果、仮定されたユーラシア *L. lutra* 集団の tMRCA は 282,200 年前、ユーラシア + JO2 集団の tMRCA は 498,300 年前と推定された (図 3-9)。このことから、ユーラシア + JO2 集団の tMRCA はユーラシア *L. lutra* 集団よりも古い時代に存在したことが示唆された。仮定した 2 集団のコアセメントタイム 95%信頼区間は重複する領域があるが、二標本 t 検定によりユーラシア + JO2 集団のコアセメントタイムはユーラシア *L. lutra* 集団と比べて有意に古いことが示された ($P < 0.01$)。この結果は JO2 系統が欧州とアジアに現存する *L. lutra* 集団 (*L. l. lutra* および *L. l. chinensis*) と明確に異なることを示した。以上の結果から、JO2 は *Lutra* 属における独立種もしくは亜種に分類するべきだと考えられた。そこで mtgenome 配列に基づいてニホンカワウソとユーラシアカワウソのより詳細な分子系統解析を行った。

3. ニホンカワウソおよびユーラシアカワウソの詳細な系統関係

ニホンカワウソとユーラシアカワウソの詳細な系統類縁関係を解明するため、ラッコを外群として用い mtgenome に基づく ML 系統樹を再構築した (図 3-10)。この系統樹でもユーラシアカワウソと JO1 は 100% BP で単系統群を形成し (図 3-10, ノード 2)、さらにユーラシアカワウソは 2 つのリネージに分岐した (図 3-10, リネージ 1 およびリネージ 2)。JO1 は EO4 (中国) と単系統を形成し (図 3-10, ノード 7)、EO1 (不明)、EO2 (中国) および EO3 (中国・四川省; *L. l. chinensis*) とともにリネージ 1 に内包された (98% BP; 図 3-10, ノード 4)。リネージ 2 は韓国のユーラシアカワウソと EO5 (ロシア・サハリン) で構成された。この結果は東アジア

に生息しているユーラシアカワウソには遺伝的に分化した2つのリネージが存在することを示唆している。また、JO1が明確にリネージ1に内包されたことから、JO1を*L. lutra*と同定した。

一方で、JO2は*ND5+cytb*データセットから再構築した図3-8の系統樹と同様にJO1を含む*L. lutra*クレイドと姉妹群関係となった。このことから、JO2は*Lutra*属において独立した進化史を持つことが確認された(図3-10, ノード1およびノード2)。Suzuki et al. (1996)は1962年に愛媛県で採取されたニホンカワウソ(図3-1B)の*cytb*遺伝子部分配列(224 bp)を決定し、ユーラシアカワウソ4個体(*L. l. lutra*, *L. l. chinensis*および由来不明個体)と分子系統解析を行った。彼らの解析では、愛媛県産ニホンカワウソはユーラシアカワウソ4個体が構成する単系統群と姉妹群関係となり、本研究の結果と一致した。また、Suzuki et al. (1996)で決定された224 bpの*cytb*遺伝子部分配列*L. nippon* (Ehime)を本研究の*ND5+cytb*データに組み込み解析したところ、図3-8に示すように*L. nippon* (Ehime)はJO2とともに100% BPで単系統を形成した。さらに、*L. nippon* (Ehime)の採取地愛媛県とJO2の採取地高知県はどちらも四国に位置し、それぞれの採取地点は約20–30 kmの距離に位置する(図3-1B)。*L. nippon* (Ehime)の遺伝情報はmtDNAのごく短い配列のみであるが、愛媛と高知のカワウソは*Lutra*属内で明確に区別できる系統を形成する確率が高いと考えられる。

4. ニホンカワウソの進化の時間的尺度と日本への移住

ニホンカワウソにおける2系統(JO1系統およびJO2系統)の進化の時間的尺度を推定するため、まず食肉目78種のmtgenomeに基づきカワウソ亜科の分岐年代を推定した。食肉目全体で推定された分岐年代はnDNAに基づいた研究の結果と基本的に一致した(図3-11)(Sato et al., 2009; Eizirik et al., 2010)。しかしながら、GTR+ Γ +Iモデルのような一般的な塩基置換モデルを分岐年代推定に用いた場合の推定値はコドン置換モデルによって得られた推定値より古い時代を示した(図3-12)。塩基置換モデルにより推定値が過大評価された原因は、コドン置換モデルよりも単純な塩基置換モデルを用いることにより塩基置換数が過小評価されたためと考えられる。この結果は、より現実的なモデル(本研究におけるコドン置換モデル)は塩基置換モデルと

比べて有利であることを示唆する。

食肉目全体で推定したカワウソ亜科の分岐年代推定値を用いて *Lutra* 属におけるニホンカワウソの分岐年代を推定した。食肉目全体の分岐年代推定により *Enhydra* と *Lutra* + *Aonyx* + *Lutrogale* 間の分岐は 10.76 Ma (95% : 9.01–12.49), *L. sumatrana* と *L. lutra* 間の分岐は 3.24 Ma (95% : 1.80–4.81) と推定され (図 3-10), これら 2 つの推定値をニホンカワウソの分岐年代推定における時間の目盛り合わせとして用いた。JO2 系統はユーラシアカワウソの祖先系統から前期更新世 (カラブリアン : 1.80–0.78 Ma) の 1.27 Ma (95% : 0.98–1.59 Ma) に分岐したと推定された (図 3-13)。この推定値と似た分岐年代を示す陸生動物に日本固有亜種のニホンツキノワグマ *Ursus thibetanus japonicus* がおり, mtgenome に基づいた推定からニホンツキノワグマ集団は大陸集団から約 1.46 Ma に分岐したと推定されている (Wu et al., 2015)。また, 樽野 (2010) は日本に生息していた長鼻類の化石記録を調査し, トロゴンテリーゾウ *Mammuthus trogontherii* が約 1.2 Ma に陸橋を渡ってユーラシア大陸から日本へ移住してきたと示している。さらに地質学的研究から, カラブリアンにあたる 1.7–0.8 Ma の氷期に北緯約 32°に形成された陸橋により, 大陸と日本列島間が接続していたと示唆されている (北村・木元, 2004)。このことから, JO2 の祖先を含むこれらの動物の移住と集団形成は 1.7 Ma 以降に形成された陸橋に起因すると考えられ, JO2 の祖先集団はトロゴンテリーゾウやニホンツキノワグマの祖先集団と同様にユーラシア大陸から日本列島に同じ陸橋を経て日本に渡って来たと考えられる。

野嶋 (2002) は静岡県 の 0.3–0.4 Ma の地層から出土した *Lutra* sp. の化石記録を報告しており, これは日本列島における最古の *Lutra* 属の化石記録である。化石記録と分子形質から推定された分岐年代には約 100 万年の差があるが, カワウソ以外の哺乳類も前期更新世の化石記録は本州, 四国および九州において少ないことが知られている (Kawamura, 1991 ; Dobson and Kawamura, 1998)。日本の土壌は酸性で堆積した骨を分解しやすく (佐倉, 2007), 野嶋 (2002) により報告された *Lutra* sp. の化石より古い時代のカワウソ化石が発見されていない原因と考えられる。

JO1 系統の分岐年代は後期更新世 (タランティアン : 0.126–0.0117 Ma) の 0.10 Ma

(95% : 0.06–0.16) と算出された (図 3-13) JO1 系統と似た分岐年代を示す日本の陸生動物としてニホンイノシシ *Sus scrofa leucomystax* がおり, CR 部分配列に基づき大陸集団から 0.140–0.253 Ma に分岐したと推定されている (Watanobe et al., 2003). Watanobe et al. (2003) は推定された年代にニホンイノシシの祖先集団が朝鮮半島から日本へ移住してきたと示唆している. このことから, JO1 の祖先集団とニホンイノシシの祖先集団は同じ時期に移住したと考えられた. しかしながら, タラントリアンに西日本と日本列島が陸橋で接続していた地質学的証拠は現時点で確認されていない. その一方で, JO1 が採取された城ヶ島とその周辺地域は明治時代から遠洋漁業の基地であることが本研究の JO1 の解析結果に影響したとも考えられる. つまり, JO1 個体はアジア大陸に寄港した船員などによりアジア大陸から日本へ人為的に持ち込まれた個体という可能性がある. そのような個体が野外へ放たれた, もしくは逃走したことにより野生化して再度捕獲された可能性は十分に考えられる. 標本の記録上 JO1 は日本在来の個体と伝えられているが, 今後より多くのニホンカワウソ本州産個体を解析することで JO1 の由来を明らかにすることができる.

IV. 結論

本研究の解析結果から、ニホンカワウソは *Lutra* に属しユーラシアカワウソと最も近縁であると断定した。その一方で解析した2個体 (JO1 および JO2) は *Lutra* クレイドにおいて異なる進化史を示した。JO2 は前期更新世 (カラブリアン : 1.80–0.78 Ma) に日本列島に移住した古い祖先の子孫と推定され、ユーラシアカワウソとの遺伝的分化の程度は種もしくは亜種の違いに相当した。それに対して JO1 はユーラシアカワウソの種内群と推定され、JO1 は *L. lutra* の一員とみなされた。Imaizumi and Yoshiyuki (1989) はニホンカワウソを日本固有種 *L. nippon* として分類したが、IUCN Red List (2015) はニホンカワウソをユーラシアカワウソの異名として扱い、亜種名を指定せずに分類を再検討する余地があるとしている。ユーラシアカワウソの分布域に基づくニホンカワウソは中国亜種 *L. l. chinensis* に対応すると考えられるが、JO2 は欧州亜種 *L. l. lutra* や中国亜種 *L. l. chinensis* と遺伝的には大きく分化しており、独立種である可能性を示した。そこで本研究の結果から、四国に生息していたニホンカワウソを日本固有亜種 *L. l. nippon* もしくは日本固有種 *L. nippon* として分類の再検討を提案する。

分子系統学的視点からニホンカワウソの分類に関する問題の結論を導くため、本研究で解析したユーラシアカワウソ2亜種 (*L. l. lutra* および *L. l. chinensis*) のみならず *L. lutra* 集団全体の遺伝的多様性と系統類縁関係を解析するべきである。加えて、本研究はニホンカワウソの2系統各1個体かつ mtDNA のみの解析にとどまっており、ニホンカワウソ集団内の遺伝的多様性や nDNA に基づいた系統類縁関係を推定するため、各系統の複数個体から mtDNA および nDNA の配列を決定し分子系統解析を実施することが今後のより重要な方針となるだろう。

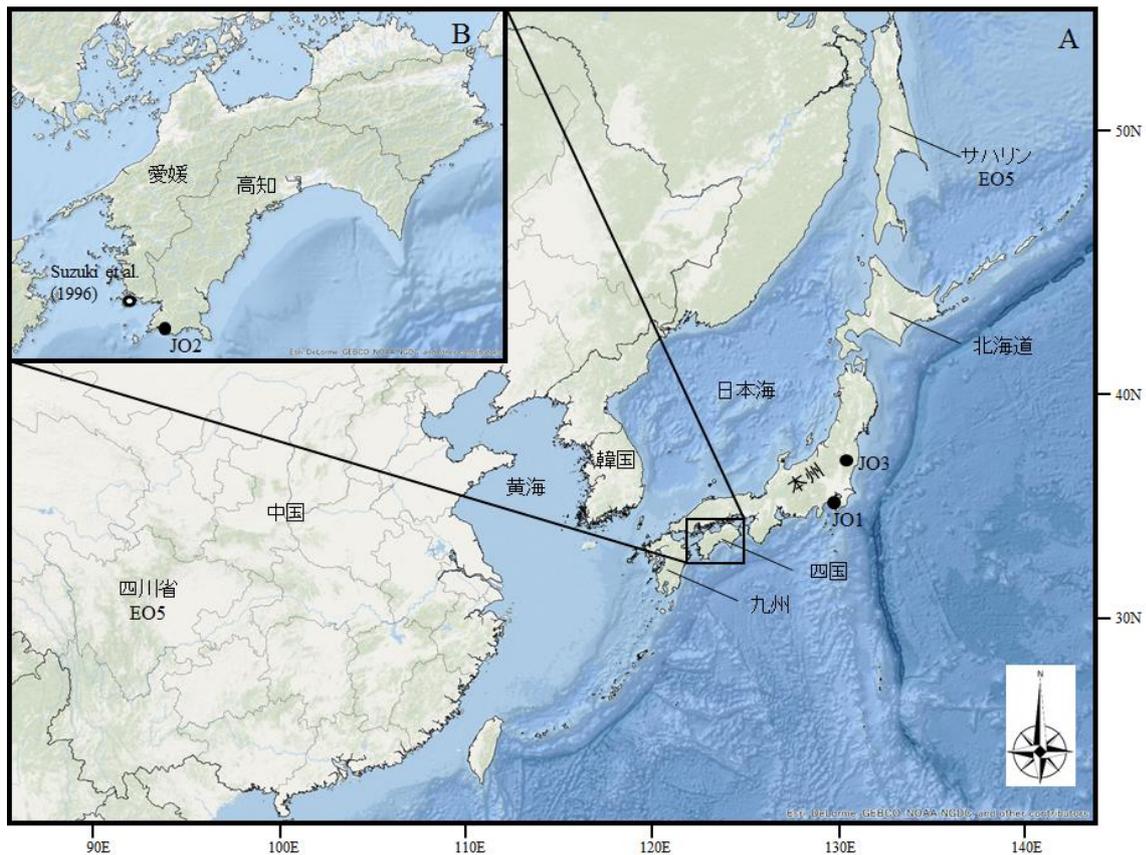


図 3-1. 本研究で使用了ニホンカワウソおよびユーラシアカワウソの産地および由来。(A) 東アジアの地図。(B) 四国の地図。本研究で解析したニホンカワウソ試料の捕獲地を黒丸(●)で示した(JO1, JO2, JO3)。Suzuki et al. (1996) が解析したニホンカワウソ試料の捕獲地を白丸(○)で示した。EO は本研究で使用了ユーラシアカワウソ試料の由来地を示す(EO3, EO5)。

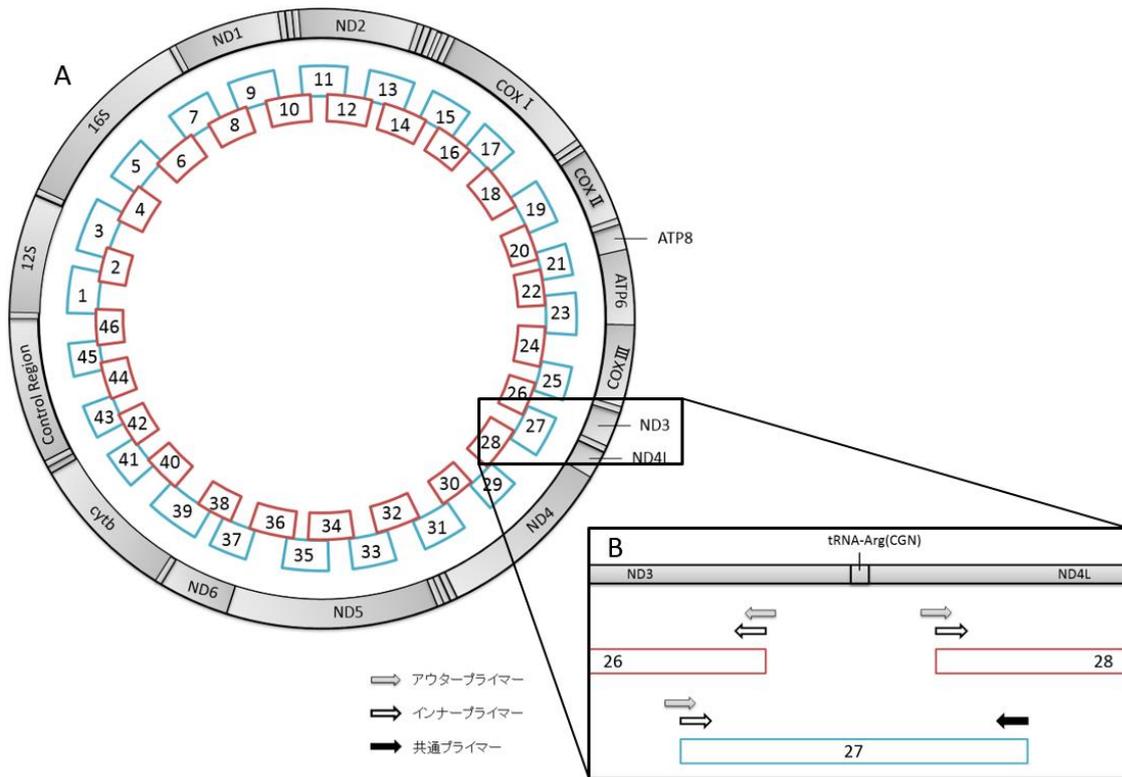


図 3-2. カワウソの mtgenome マップ. (A) カワウソの mtgenome マップ. (B) Simplex PCR で増幅される断片とアウタープライマー (MPCR 用), インナープライマー (Simplex PCR 用) および共通プライマー (MPCR および Simplex PCR 用) それぞれの位置の代表例とその対応領域. 灰色で示したカワウソの mtgenome は 2 つの rRNA, 22 の tRNA, 13 のタンパクコード領域および調節領域で構成される. 1-46 の番号が割り当てられている枠は Simplex PCR で増幅される 46 の断片を示し, 46 断片で mtgenome をカバーする. 奇数番の断片 (水色) と偶数番の断片 (赤色) はそれぞれ MPCR における第 1 セットと第 2 セットを示す.

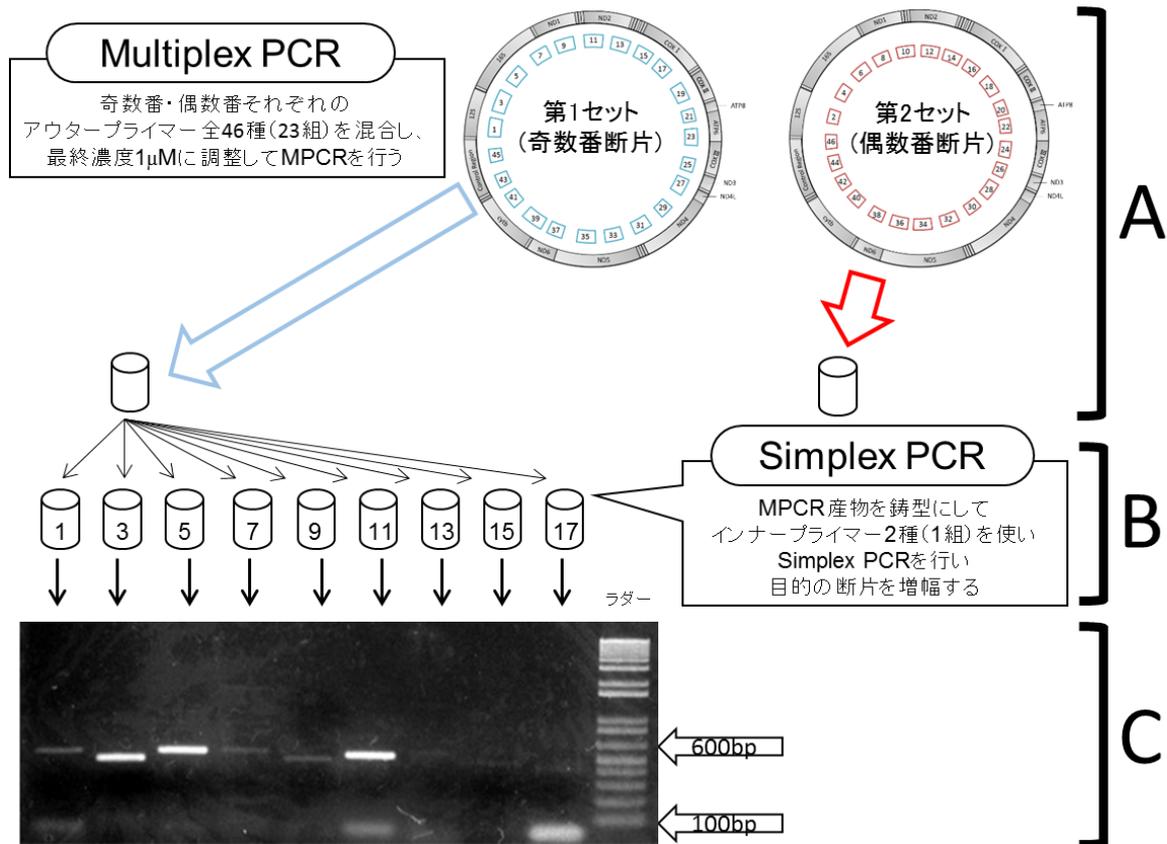


図 3-3. MPCR の手順と Simplex PCR 産物の電気泳動像の例. (A) MPCR の手順. (B) MPCR 産物を鋳型に Simplex PCR を行う手順. (C) Simplex PCR 産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動し UV トランスイルミネーターで観察した泳動像. ラダーは 1kb DNA Plus Ladder (Invitrogen) である.

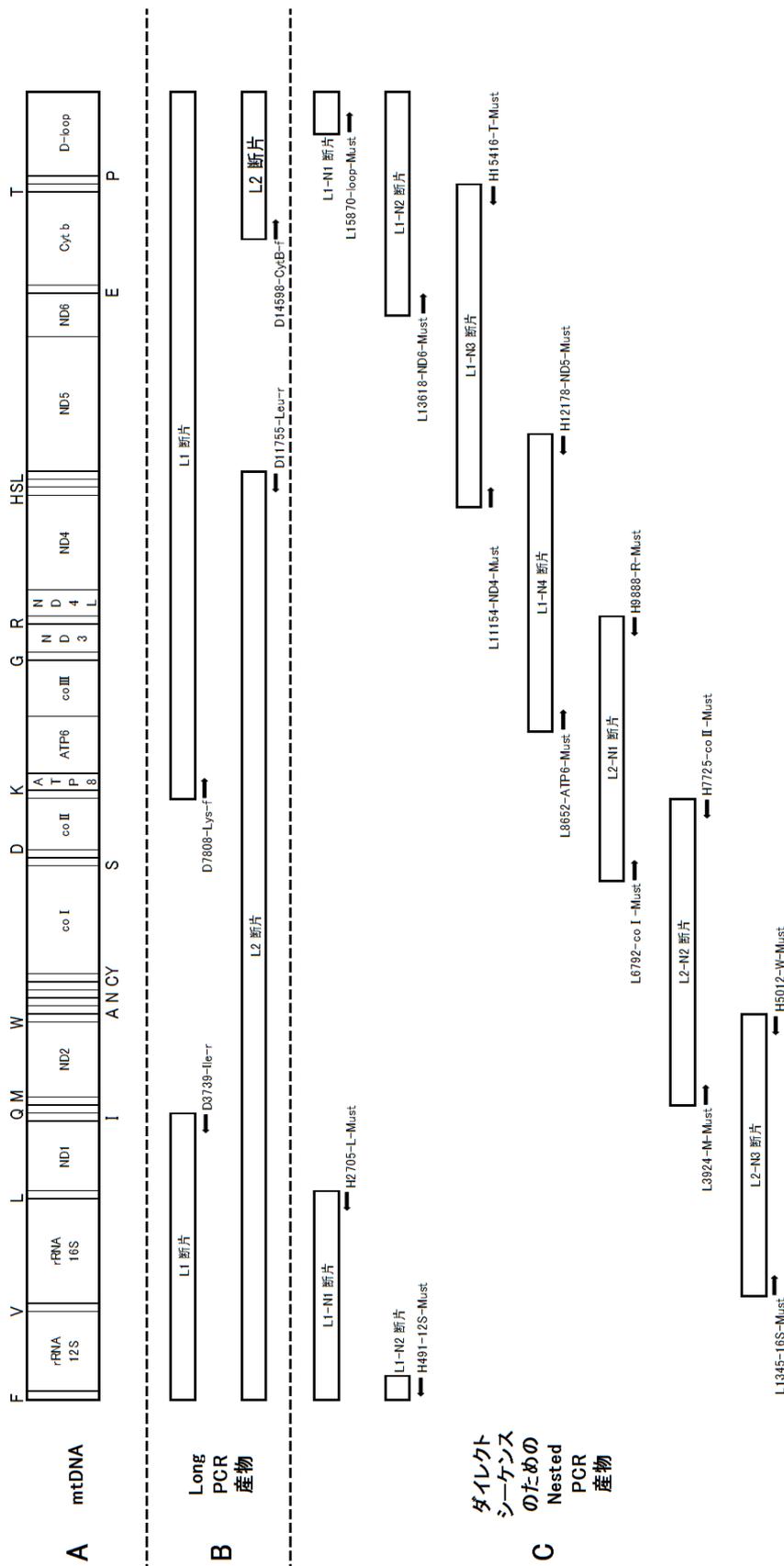


図3-4. イタ手科mtgenomeの増幅戦略とmtgenomeの構成。(A) 12のタンパクコード遺伝子はH鎖にコードされ、ND6のみL鎖にコードされている。22のtRNAはそれぞれ1つずつアミノ酸のコードにより指定されている。H鎖およびL鎖それぞれにコードされるtRNAはそれぞれmtgenomeマップ上部および下部へ表示した。(B) 2組のLong PCRプライマーにより増幅される2断片(L1およびL2断片)はmtgenomeをカバーする。(C) ダイレクトシーケンシングの鑄型を得るために、Long PCR産物を鑄型として増幅されるNested PCR産物。7組のNested PCRプライマーはmtgenomeをカバーする7断片(L1-N1, L1-N2, L1-N3, L1-N4, L2-N1, L2-N2, L2-N3)を増幅する。

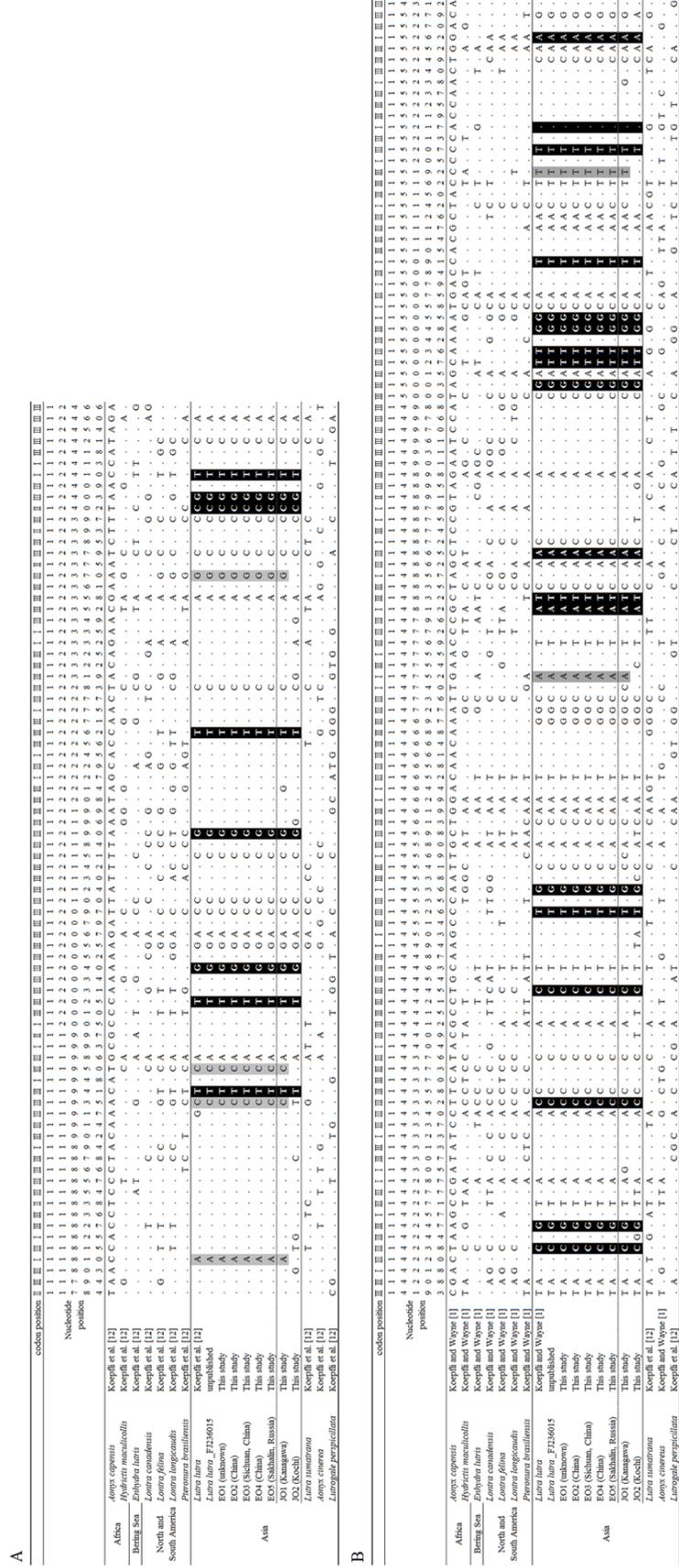


図3-6. 先行研究で決定された配列と比較したND遺伝子とcytb遺伝子配列の特徴的な配列。(A) NDが遺伝子部分配列 (692bp) . (B) cytb遺伝子全長配列 (1,140bp) . *Anonyx capensis*の配列を基準とし、それと同じである場合ピリオド (.) で示し、異なる場合だけその塩基組成を示す。塩基サイト番号はEO4 (中国) に基づいた。黒色でハイライト表示されている塩基サイトはJO1とJO2) がユーラシアカワウンと共有する特徴的な変異サイトを示す。灰色でハイライトされている塩基サイトはJO1 (神奈川県) とユーラシアカワウンが共有する特徴的な変異サイトを示す。

	codon position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1491	1492	1493
--	----------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

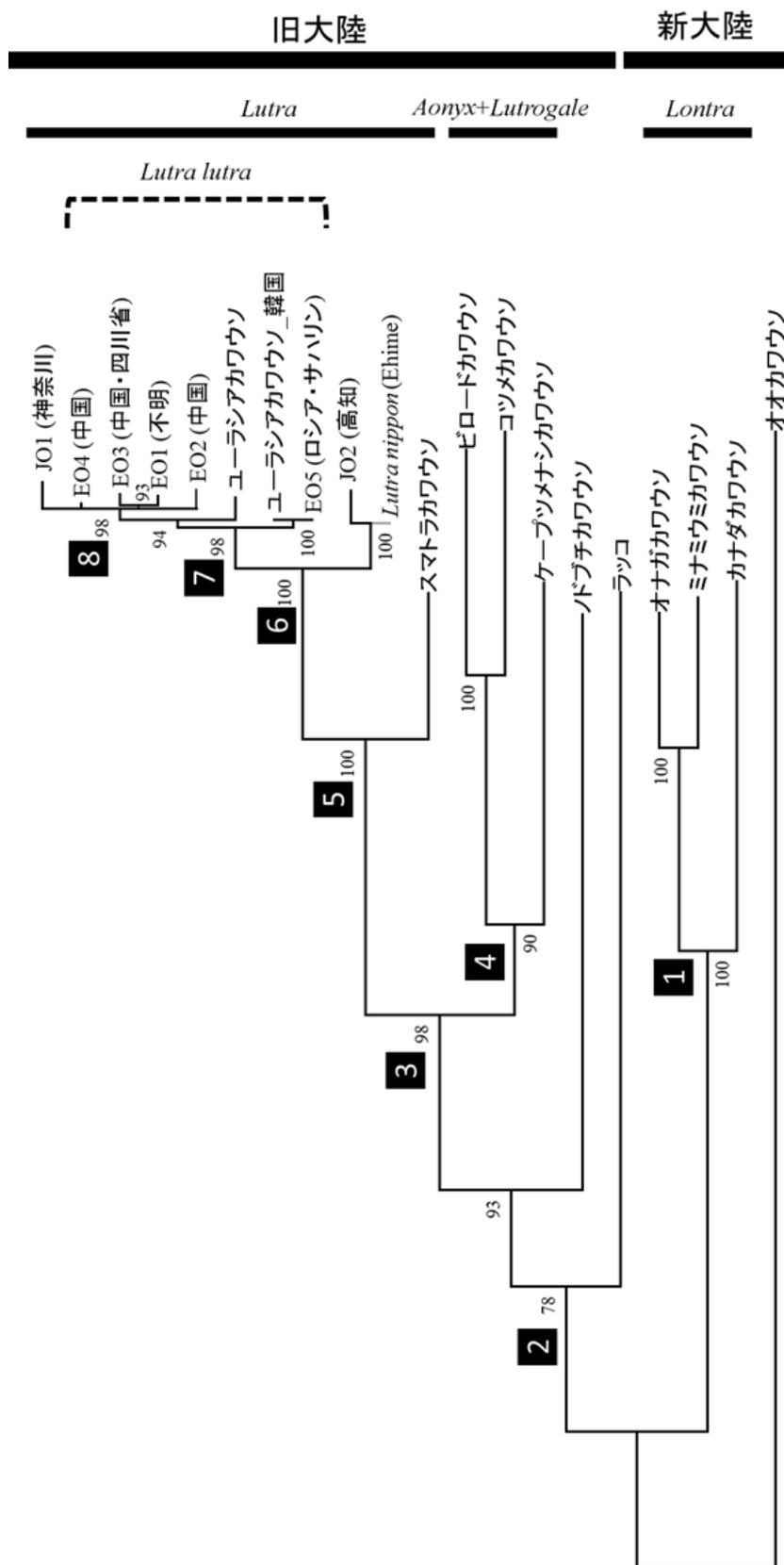


図3-8. *L. nippon* (Ehime) を含めたミトコンドリアDNA部分配列に基づいたカワウソ科Lutrinaeの最尤系統樹. この最尤系統樹はSuzukiet al. (1996) で決定された*L. nippon* (Ehime) の配列 (224 bp) を含む*ND5*遺伝子部分配列 (692 bp) および*cytb*遺伝子全長配列 (1,134 bp) を連結させたデータセットから再構築した. ノードの番号はブートストラップ値 (BP) を示す. この系統樹はGTR+G+Iモデルで, コドンごとの進化速度の違いを考慮しコドンの1番目, 2番目, 3番目へそれぞれパーセンションを設定して推定した. ノードの信頼度はブートストラップ1,000回試行でBPを推定した. ロカリティ非表示の操作上分類単位 (OTU) は先行研究で報告されているデータである (Koepli and Wayne, 1998 ; Koepli et al., 2008). ユーラシアカワウソ (韓国) のデータはAccession No. FJ236015である.

事後確率

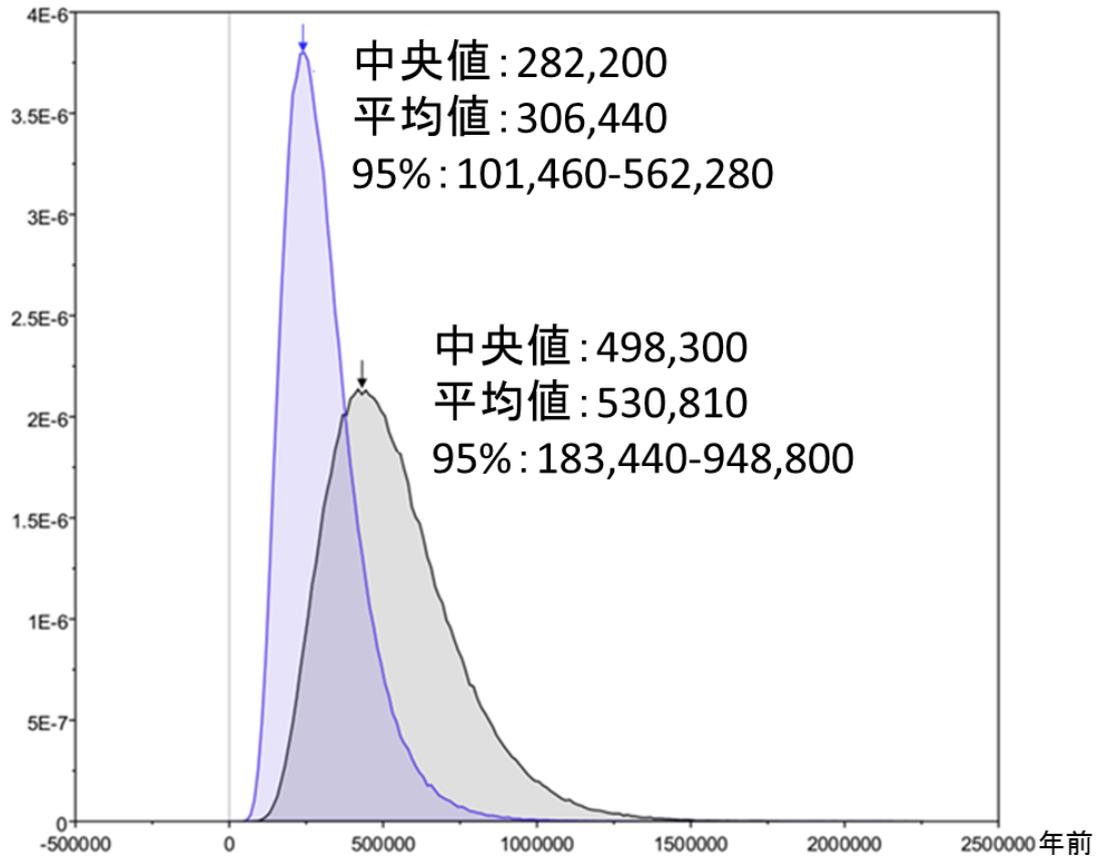


図 3-9. ユーラシアカワウソとニホンカワウソの tMRCA の個体群サイズ動態. BEAST プログラムでコアレセント法を用いて, mtDNA 調節領域の約 350 bp に基づき推測された tMRCA の事後確率分布. 縦軸は事後確率を示し, 横軸は tMRCA (年前) を示す. 青色で示した事後確立分布は JO2 を除いたユーラシア *L. lutra* 集団で, 灰色で示した事後確立分布は JO2 を含んだ *L. lutra*+JO2 集を示す.

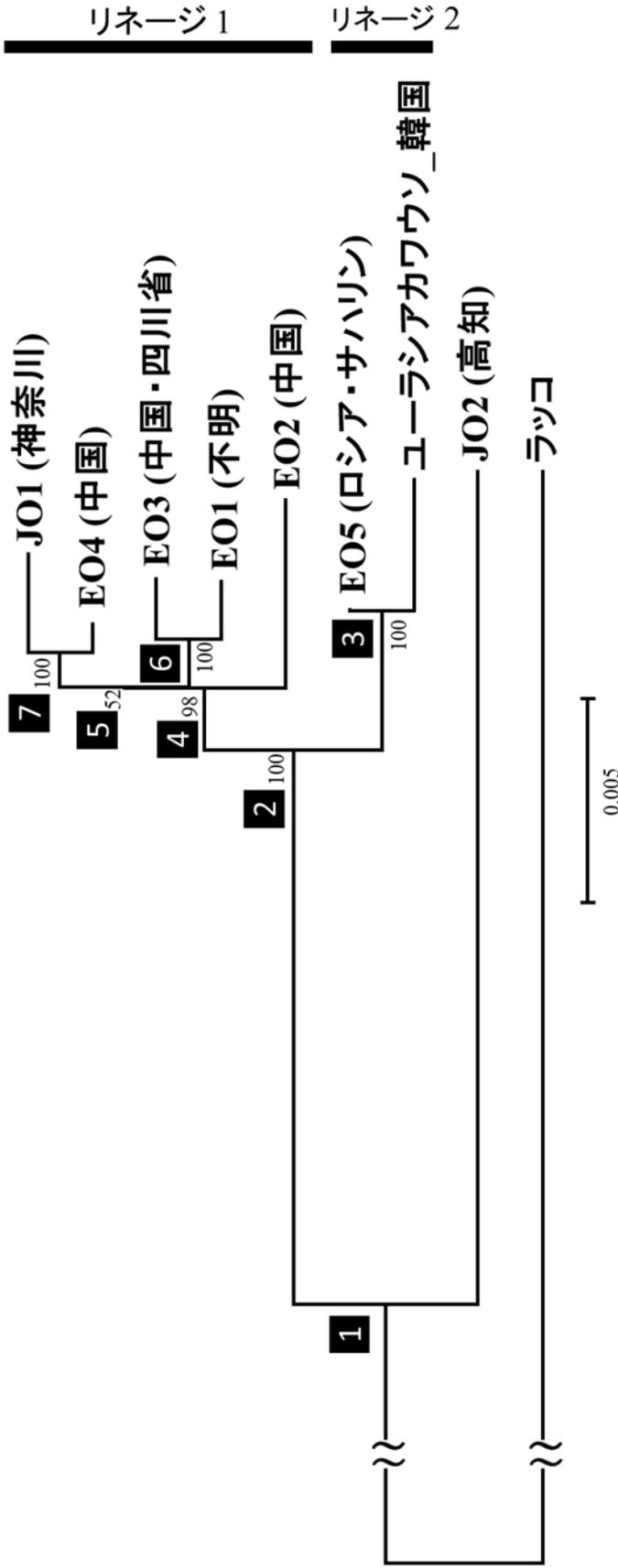


図3-10. mtgenome配列に基づいたニホンカワウンとユーラシアカワウンの最尤系統樹. この最尤系統樹は14,740 bp (tRNA = 1,488 bp, rRNA = 2,532 bp, タンパクコード遺伝子 = 10,720 bp) で構成されるmtgenomeデータセットから再構築した. ノードの番号はブートストラップ値 (BP) を示す. この系統樹はGTR+G+Iモデルで推定し, ノードの信頼度はブートストラップ1,000回試行でBPを推定した. コードの1番目, 2番目, 3番目, 加えてtRNAとrRNAごとの進化速度の違いを考慮しそれぞれパーセンションを設定した. ラッコとユーラシアカワウン (韓国) のデータはそれぞれNC_009692とFJ236015としてGenBankに登録されている配列である.

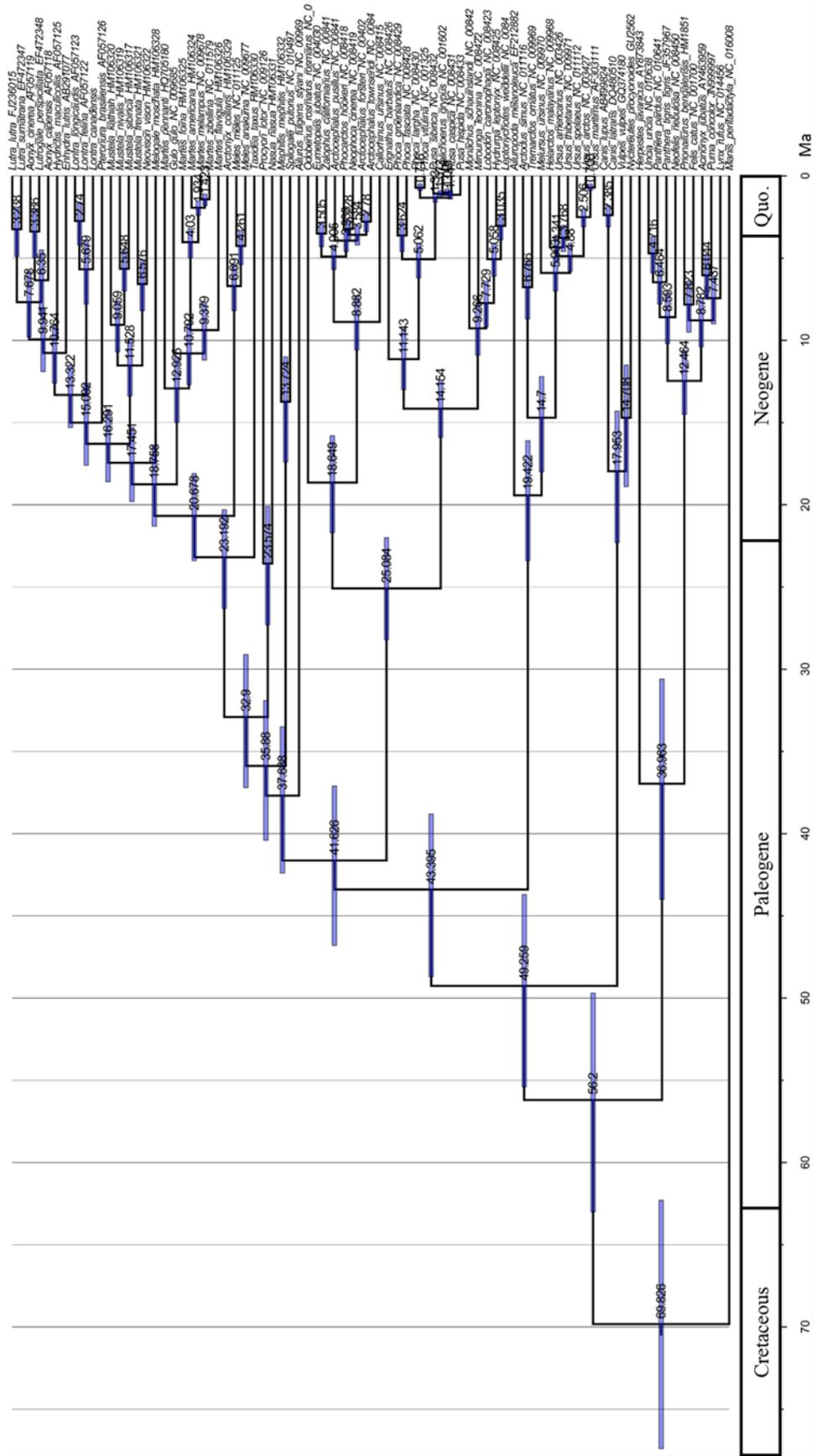


図3-11. コドンモデルで推定した食肉目の分岐年代推定値。この分岐年代はミトコンドリアDNAのH鎖にコードされている12のタンパクコード領域から推定された。ノードの数字は推定された分岐年代を示す。水平の灰色棒は分岐年代の95%信頼区間を示す。

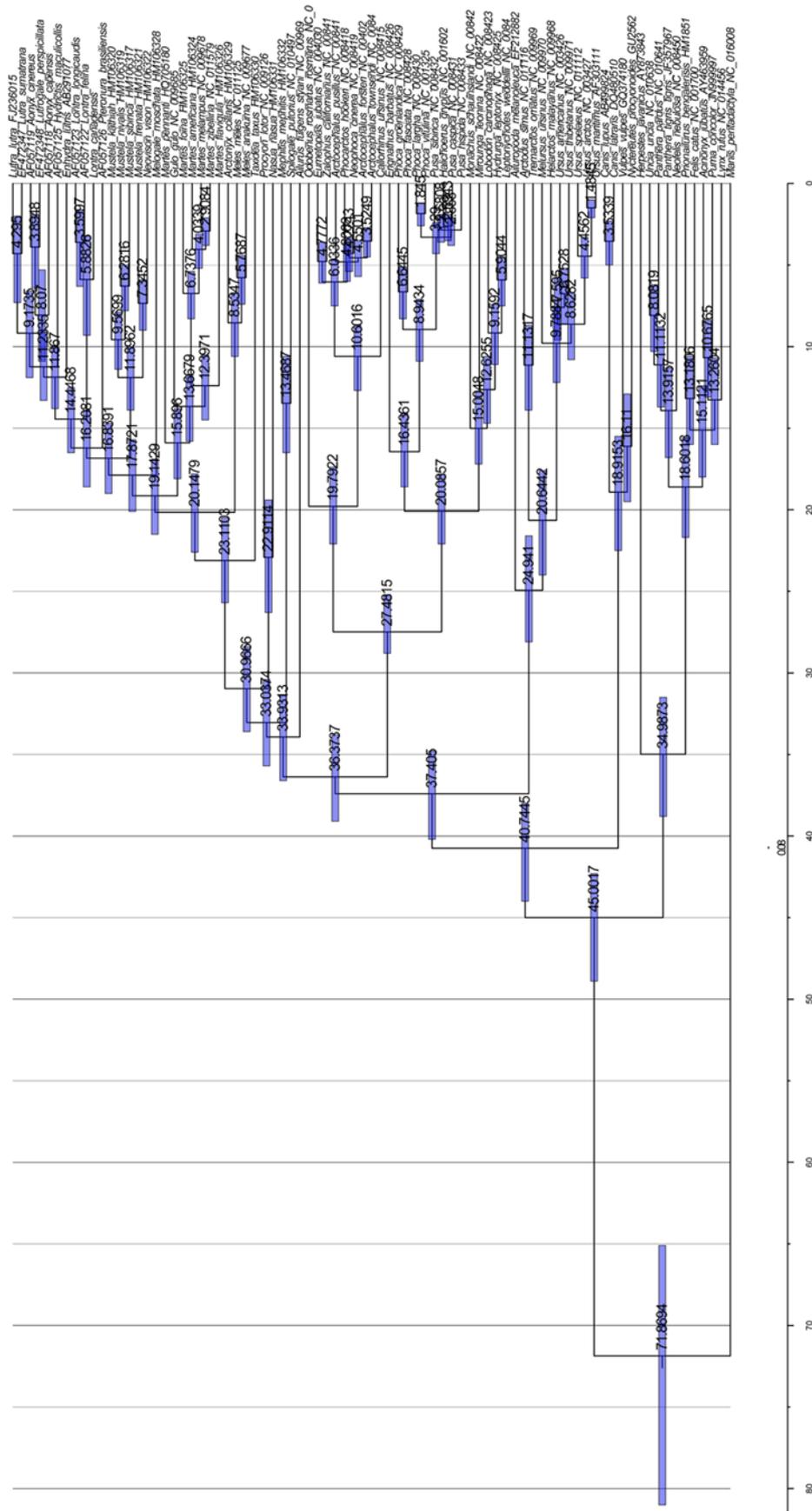


図3-12.塩基置換モデルで推定した食肉目の分岐年代推定値。この分岐年代はミトコンドリアDNAのH鎖にコードされている12のタンパクコード領域から推定された。ノードの数字は推定された分岐年代を示す。水平の灰色棒は分岐年代の95%信頼区間を示す。

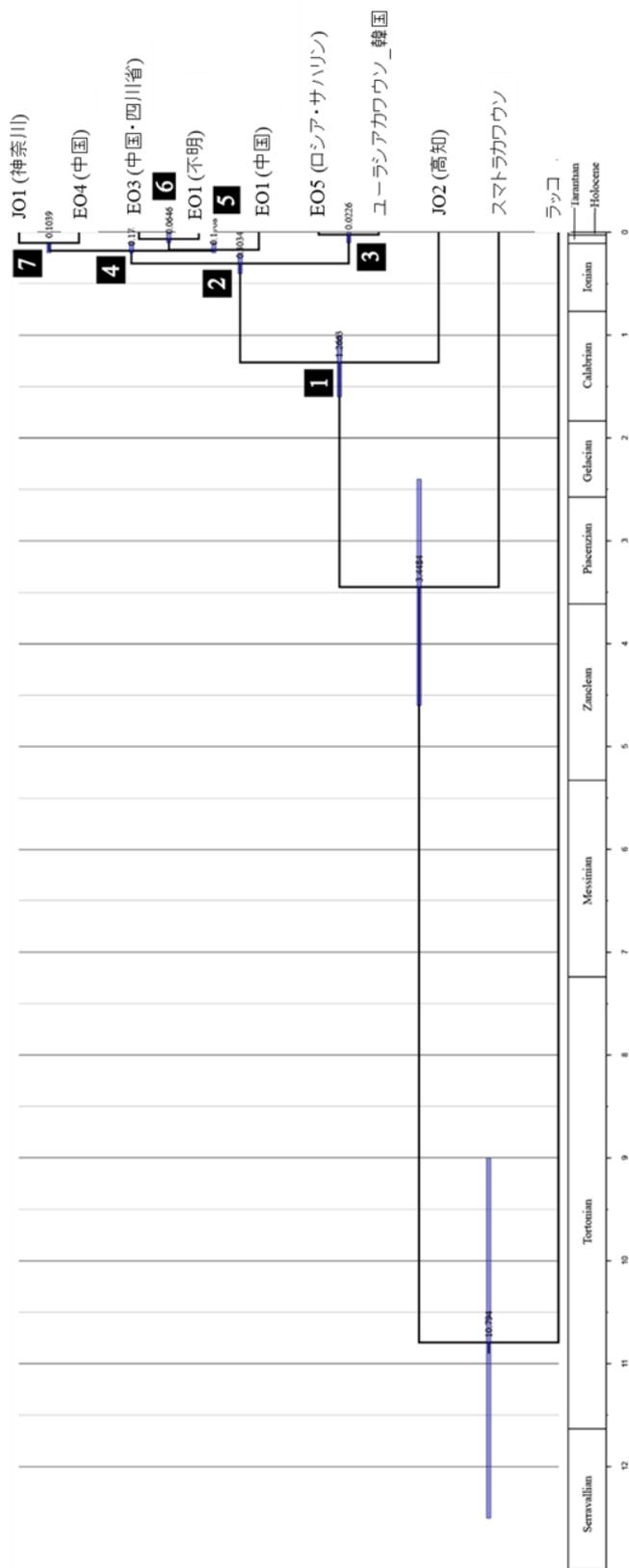


図3-18. ニホンカワウンおよびユーラシアカワウンの分岐年代推定値。この分岐年代はミトコンドリアDNAのH鎖にコードされている12のタンパクコード領域における同義置換を示す変異サイトを集めた配列で推定された。ノードの番号は推定された分岐年代を示す。水平の灰色棒は分岐年代の95%信頼区間を示す。番号を割り当てたボックスはノードの番号を示す。

表3-1. 本研究で用いたユーラシアカワウソとニホンカワウソ試料名, 系統登録番号もしくはは標本番号, 採取地もしくはは由来, 性別, 採取年, 提供機関, 塩基配列決定方法およびAccession No.

和名および学名	試料名	系統登録番号 もしくはは標本番号	採取地もしくはは由来	性別	採取年	提供機関	由来試料	塩基配列決定方法	Accession No.
ユーラシアカワウソ <i>Lutra lutra</i>	EO1	#32	不明	♂	-	高知県立のいち動物公園	冷凍筋組織	MPCR + ダイレクトシーケンシング	LC049953
	EO2	#35	中国	♂	-	横浜市立よこはま動物園	冷凍筋組織	MPCR + ダイレクトシーケンシング	LC049378
	EO3	#39	中国, 四川省	♂	-	高知県立のいち動物公園	冷凍筋組織	MPCR + ダイレクトシーケンシング	LC049952
	EO4	#52	中国	♀	-	富山市ファミリーパーク	冷凍筋組織	Long PCR + ダイレクトシーケンシング	LC049377
ニホンカワウソ	EO5	NMNS-CA.209	ロシア, サハリン	不明	-	国立科学博物館	乾燥筋組織	MPCR + ダイレクトシーケンシング	LC049954
	JO1	YCM-M0001	日本, 神奈川県	不明	1915-1916	横須賀市自然・人文博物館	乾燥筋組織	Illumina	LC049955
	JO2	NZP-SS-01	日本, 高知県	♂	1977	高知県立のいち動物公園	肉球内側の組織	Illumina	LC050126
	JO3	無し	日本, 福島県	不明	1935	静岡県森林・林業研究センター	乾燥筋組織	Illumina	未決定

系統登録番号は日本動物園水族館協会ユーラシアカワウソ国内系統登録(富山市ファミリーパーク, 2014)に従った。NMNS-CA: National Museum of Nature and Science, Comparative Anatomy collections. YCM-M: Yokosuka City Museum, Mammal. NZP-SS: Noichi Zoological Park, Stuffed Specimen.

表3-2. マルチプレックスおよびシンプレックスPCRで用いたプライマー

第1セット	アウタープライマー		断片長 (bp)
	forward 5'-3'	reverse 5'-3'	
1番断片	OL1-12-20 AGGTTTGGTCCTGGCCTTGC	OH1-11-20 TGTAAGCACCGCCAAGTCC	499
3番断片	OL3-10-20 GAGCTTAATTGAATGGGGCC	OH3-10-19 TGGTTTCGGGGGTTTACG	429
5番断片	OL5-9-20 GGGTACAACCTTACTTAGAG	OH5-10-20 CACGGGAAGGTCAATTTAC	496
7番断片	OL7-10-19 TACGCTAGGGATAACAGCG	OH7-11-20 CTGCGATTGGTTGTAGGAGG	501
9番断片	OL9-11-20 GAGCGGTAGCCCAAACAATC	OH9-10-19 GCTTGCTGTTATGATGGGC	500
11番断片	OL11-12-20 TCAAACCGCTCGTCCTCACC	OH11-10-21 CGTAGTTGAGTTTGGTTGAGG	485
13番断片	OL13-10-20 CTCCCGTCTCAGGATTTATC	OH13-11-20 GCGGCGGGAGAAGTAGATTG	472
15番断片	OL15-9-18 CGTTCTATTCCGGTGCATG	OH15-10-20 TACGGCTGTAAATTAGGACGG	485
17番断片	OL17-10-18 ATGGGAATAGTGTGGGCG	OH17-12-20 AGTCGGAATAGCGTCGAGGC	479
19番断片	OL19-10-19 TCGGTTTCAAGCCAATGCC	OH19-11-20 GCACCACTCGGTTGTCTACT	502
21番断片	OL21-11-20 CTCGAACTAGTGCGCCTATC	OH21-10-20 TTTGGTTGTGGATGGCTAGC	435
23番断片	OL23-10-20 CACTTCTTACGACAAGGGAC	OH23-12-20 AACGGTAGGAGTGTGGTGGC	487
25番断片	OL25-11-20 AGGGGACCGCAAACACATAC	OH25-10-19 GTTTAGCTGGGGGAGTCAG	441
27番断片	OL27-10-20 CGCATTACTTCTACCACTACC	OH27-9-19 GCATTGCAGTAGGTTCAAG	464
29番断片	OL29-11-20 TCGAAAGAAACCCTCAGCCG	OH29-11-20 CGCATTATTCCGTATCCGCC	442
31番断片	OL31-11-19 CCCACGGCCTAACATCATC	OH31-11-20 GGAGCACGAGTTAGCAGTTC	493
33番断片	OL33-9-20 CTCTATTGAGGCCAAGATACG	OH33-12-20 GACTTTCGGTGGCTGCTAG	468
35番断片	OL35-10-20 TCTACTTGAAGCCAACTGGG	OH35-10-19 GGTGGTGGGTGTAATGTTG	477
37番断片	OL37-10-20 CTACCAAAGTCCGTCCTGCC	OH37-9-18 ACTTAGGAGGCA TGTGG	440
39番断片	OL39-12-20 CGCGCCGTAGATAGGAGAAG	OH39-10-20 ATGCTGTTGCTATGGTTGCG	505
41番断片	OL41-10-22 CAATCCACGTGCTATTTCTCC	OH41-12-20 GTTCTACTGGTTGACCGCCG	415
43番断片	OL43-12-20 AAAGCCGACCATCAGGACC	OH43-9-19 ACCAAATGCATGACACCAC	423
45番断片	OL45-10-20 TACACACATAGATCCACCCC	OH45-9-18 TGAGATTAGCATGCCGTGG	473

表3-2. マルチプレックスおよびシンプレックスPCRで用いたプライマー（続き）

第2セット	アウタープライマー		断片長 (bp)
	forward 5'-3'	reverse 5'-3'	
2番断片	OL2-10-20 ATCCGACAACACGATAGGTG	OH2-11-20 CGACTTATCTCCTCTTGC	493
4番断片	OL4-11-20 TAGAGAGAGTACGGCAAGGG	OH4-9-19 GAATAGATTAGCCCGGTAG	466
6番断片	OL6-11-20 GCCGAGTGACGCTAGTTCAA	OH6-10-20 CTGAACTCAGATCACGTAGG	491
8番断片	OL8-9-20 CAGTAATCGTACGAATCCTG	OH-8-9-19 CATATTATAGCCAGGGGTC	493
10番断片	OL10-10-19 GAATCCGAGCATCATACCC	OH10-11-20 GTTGATGCTTCCATGGCTCG	483
12番断片	OL12-11-20 AAAAAATCGCCCCCTCTGC	OH12-10-20 GTTGAGGGGAATATGGTTAG	483
14番断片	OL14-10-20 CTTAACTCCTGACCCTACTG	OH14-11-20 ACAAATGCATGGGCGGTGAC	483
16番断片	OL16-10-19 GACAACTTTTCCGTGCAC	OH16-11-19 TAAACCCCGTGGGAATAGC	483
18番断片	OL18-12-24 CCACTGATTTCCACTATTCACGGG	OH18-12-21 CCTATTTGGAGAGGGTACGCC	481
20番断片	OL20-11-21 GGGGATCAATGGTACTGAAGC	OH20-10-20 GTTGAGGTGTCTAGTTGTGG	436
22番断片	OL22-9-18 CCGAGTATCATGTTTCCC	OH22-10-20 ATTAAAGCCAGGGTAGCTCC	429
24番断片	OL24-11-20 TCGGCCCTCCTCATAACATC	OH24-12-20 GTGGAGCCGTAAATCCCGTCG	481
26番断片	OL26-11-22 GTAGACGTCGTATGACTGTTCC	OH26-10-19 CATTCTAAGCCCTCTTCGG	419
28番断片	OL28-11-20 AGCCAGTATAGCCCGCATTG	OH28-11-20 AGTGTGGCATGAGTGTGGC	476
30番断片	OL30-9-18 TGCCACTATACGGTCTTC	OH30-10-20 AGTTAGGCTGGCGAGTAATC	438
32番断片	OL32-9-21 ACCCCAAATGATCCTAGGC	OH32-10-20 GGACCATGTAAACGAATAGCG	488
34番断片	OL34-10-20 TTCATCGTAGCCATAGGCTG	OH34-10-20 GTCGTCATTTAGGCTGTGG	477
36番断片	OL36-12-20 AGGAGAACCCCGCTTCAACC	OH36-10-19 AGTAAACTGAGGGCTAGGG	465
38番断片	OL38-11-23 CCTCAACCTCAATATCATCAGCC	OH38-10-20 GGCTAATGGGTGAGTTTTGC	402
40番断片	OL40-12-24 GCCTCCATATTCTTCATCTGGCTG	OH40-9-18 GTATTAGGGCTAGGAGTAGG	413
42番断片	OL42-9-20 GTATTGGCGCTAGTCCTATC	OH42-12-20 GCGGTGCGCGGAATACATAC	407
44番断片	OL44-10-20 GGCATCTGGTCTTACTTCAG	OH44-11-19 TGCGTACGTGGGTGTGCGTG	489
46番断片	OL46-11-20 AATCAAAGCCCCCTTACGCC	OH46-12-19 GGTGTGGTTGAGCAAGGCG	442

表3-2. カワウソのmtgenomeの増幅に使用するMPCRおよびSimplex PCRプライマー (続き)

	Inner primers		断片長 (bp)
	forward 5'-3'	reverse 5'-3'	
1番断片	IL1-11-20* GGTCCTGGCCTTGCTATTAG	IH1-12-20* GCACCGCCAAGTCCTTTGAG	487
3番断片	IL3-10-19* GAGCTTAATTGAATGGGGCC	IH3-10-20* GGGGGTTTTAGCTTAAGGTC	421
5番断片	IL5-9-18* GCGAAAACCATAGTAGGC	IH5-10-20* CGGGAAGGTCAATTTCACTG	494
7番断片	IL7-11-20 CGCTAGGGATAACAGCGCAA	IH7-12-20 CGATTGGTTGTAGGAGGCCG	495
9番断片	IL9-10-20 CGTAGCCCAAACAATCTCCT	IH9-10-20 CTGTTATGATGGGCAAGGCT	490
11番断片	IL11-9-19 CCTCACCACTTATAACC	IH11-10-19 AGTTGAGTTTGGTTGAGGCC	471
13番断片	IL13-11-20 CCCCTCTCAGGATTTATCCC	IH13-11-20 GCGGCGGGAGAAGTAGATTG	470
15番断片	IL15-10-20 CTTCTATTCGGTGCATGAGC	IH15-9-18 AGGACGGATCATACGAAC	471
17番断片	IL17-9-18 TCTATCGGTTTCTAGGC	IH17-12-20 CGTCGAGGCATACCCGATAG	444
19番断片	IL19-10-20 CAAGCCAATGCCATAACCAC	IH19-10-20 CCACTCGGTTGTCTACTTCT	492
21番断片	IL21-10-19 GTGCGCCTATCATAGTTCG	IH21-10-18 TGGTTGTGGATGGCTAGC	427
23番断片	IL23-10-20 TTCTTACGACAAGGGACACC	IH23-12-20 TAGGAGTGTGGTGGCCTTGG	479
25番断片	IL25-10-20* GGACCGCAAACACATACTTC	IH25-12-20 GCTGGGGGAGTCA GAATGCG	432
27番断片	IL27-10-20* CTTCTACCACTACCATGAGC	IH27-9-19* GCATTGCAGTAGGTTCAAG	458
29番断片	IL29-9-18* GAAACCCTCAGCCGAAA	IH29-10-20* TTATTCGGTATCCGCCTAGC	434
31番断片	IL31-12-20* CCACGGCCTAACATCATCCC	IH31-10-20* GCACGAGTTAGCAGTCTTG	488
33番断片	IL33-10-21* CTCTATTGAGGCCAAGATACG	IH33-12-20* GACTTCCGGTGGCTGCTAG	468
35番断片	IL35-10-20* TACTTGAAGCCAACTGGGAC	IH35-10-20* GGTGGGTGTAATGTTGTAGG	471
37番断片	IL37-10-20* CTACCAAAGTCCGTCTGCC	IH37-10-20* CTTAGGAGGCATGTTGGTTG	437
39番断片	IL39-12-20* CGCGCCGTAGATAGGAGAAG	IH39-10-20* ATGCTGTTGCTATGGTTGCC	505
41番断片	IL41-10-19* CCACGTGCTATTTCTCCAC	IH41-11-20* TACTGGTTGACCGCCGATTC	406
43番断片	IL43-12-20* CCACCATCAGGACCCAAAGC	IH43-10-20* CCAAATGCATGACACCACAG	415
45番断片	IL45-12-20* CACACATAGATCCACCCCGG	IH45-11-19* GAGATTAGCATGCGTGGCG	369

アスタリスク(*)はNested PCR産物を鋳型にしたシーケンスに使用したプライマーを示す。

表3-2. カワウソのmtgenomeの増幅に使用するMPCRおよびSimplex PCRプライマー (続き)

	インナープライマー		断片長 (bp)
	forward 5'-3'	reverse 5'-3'	
2番断片	IL2-11-20 CCGACAACACGATAGGTGAG	IH2-10-20 CGACTTATCTCCTCTTGC	491
4番断片	IL4-11-20 GAGAGAGTACGGCAAGGGAA	IH4-9-18 GCCCGGTAGTATATTAGG	455
6番断片	IL6-11-20* CAGTGACGCTAGTCAACGG	IH6-10-20 GAACTCAGATCACGTAGGAC	486
8番断片	IL8-11-20* ATCGTACGAAATCCTGCTGGC	IH-8-9-18* GGTCATGTGGGTAGGATT	474
10番断片	IL10-10-19* GAATCCGAGCATCATAACC	IH10-11-20* TGATGCTTCCATGGCTCGTG	481
12番断片	IL12-12-20* AATCGCCCCCTCTGCATTC	IH12-10-20* GAGGGGAATATGGTTAGTGC	476
14番断片	IL14-10-20* ACTCTGACCTACTGTAAG	IH14-11-20* GCATGGGCGGTGACAATAAC	473
16番断片	IL16-10-19* CCTTTTCCGTGCACTTAGG	IH16-10-18* CCCGTGGGAATAGCAATG	474
18番断片	IL18-12-24* CCACTGATTTCCAATAATCACGGG	IH18-12-20* TTGGAGAGGGTACGCCATGG	477
20番断片	IL20-11-21* GGGGATCAATGGTACTGAAGC	IH20-10-20* TTGAGGTGTCTAGTTGTGGC	435
22番断片	IL22-9-18* CCGAGTATCATGTTTCCC	IH22-12-20* AAAGCCAGGGTAGCTCCTCC	426
24番断片	IL24-11-20* CGCCCTCCTCATAACATCAG	IH24-10-18* CGTAAATCCCGTCGGAGA	474
26番断片	IL26-10-20 AGACGTCGATGACTGTTC	IH26-10-20* TTCTAAGCCCTCTTCGGTTC	416
28番断片	IL28-11-20 CAGTATAGCCCGCATTGTCC	IH28-11-20 GTTGGCATGAGTGTGGCTTC	469
30番断片	IL30-10-19 GCCACTATACGGTCTTCAG	IH30-10-20 TAGGCTGGCGAGTAATCATC	433
32番断片	IL32-9-18 ATGATCCTAGGCGCTATC	IH32-10-20 GGACCATGTAACGAATAGCG	482
34番断片	IL34-11-20 CGTAGCCATAGGCTGATTCC	IH34-10-20 GTTTCGTCATTTAGGCTGTGG	472
36番断片	IL36-11-20 AACCCCGCTTCAACCCTATG	IH36-10-19 AGTAAACTGAGGGCTAGGG	460
38番断片	IL38-11-23 CCTCAACCTCAATATCATCAGCC	IH38-10-20 GCTAATGGGTGAGTTTTGCG	401
40番断片	IL40-9-18 TCTTCATCTGGCTGTTC	IH40-11-20 ATTAGGGCTAGGAGTAGGGC	407
42番断片	IL42-9-19 GGCGCTAGTCTATCTATCC	IH42-11-20 GTGCGCGGAATACATACTGG	433
44番断片	IL44-10-20 TCTGGTCTTACTTCAGGGC	IH44-11-19 CGTGGGTGTGCGTGATAC	381
46番断片	IL46-9-18 CCCCCGTAACTTCAAAAAG	IH46-9-18 GAGCAAGGCGTTATAAGC	418

アスタリスク(*)はNested PCR産物を鋳型にしたシーケンスに使用したプライマーを示す。

表3-3. イタチ科のmtgenomeの増幅に使用するLong PCRプライマーおよびnested PCRプライマー.

primer set	Primer name	Sequence 5'-3'
L1*	D7808-Lys-f	CTCTCCTCAATGACATGCCACAACCTAGATAC
	D3739-Ile-r	TACTCTATCAAAGTAACTCTTTTGTTCAGAC
L2*	D14598-CytB-f	GCATTCATAGGTTACGTTTTACCATGAGGA
	D11755-Leu-r	GCACCAATTTTTTGGTTCCTAAGACCAATGG
L1-N1	L15870-loop-Must	CTAATCAGCCCATGATCACA
	H2705-L-Must	GCAATTAAGTGGGCTCTGCCA
L1-N2	L13618-ND6-Must	TTCCACGAGTAACCTCCAT
	H491-12S-Must	GGTATCTAATCCCAGTTTGG
L1-N3	L11154-ND4-Must	GGAGCAACAGCCCTAATA
	H15416-T-Must	CTTCCTTGAGTCTTAGGGAG
L1-N4	L8652-ATP6-Must	GACAACACTTAATGACCCACCA
	H12178-ND5-Must	GGGTCTGAGTGTATATATCA
L2-N1	L6792-coI-Must	TGAGAAGCCTTCGCATCCAAA
	H9888-R-Must	ATCTAATGAGTCGAAATCAT
L2-N2	L3924-M-Must	TATCCCCTTCCCGTACTAAT
	H7725-coII-Must	TATAGCATTGAGGGCGGATCATTT
L2-N3	L1345-16S-Must	CCCGAAACCAGACGAGCTAC
	H5012-W-Must	CTTACTTAGGGCTTTGAAGG

アスタリスク (*) はLong PCRに使用したプライマーを示す.

表3-4. 本研究の系統解析に用いたミトコンドリアDNAデータ.

属	種名	和名	全長配列	ND5	cytb
<i>Lutra</i>	<i>Lutra lutra</i>	ユーラシアカワウソ	FJ236015	EF472377	AF057124
	<i>Lutra sumatrana</i>	スマトラカワウソ	-	EF472380	EF472347
	<i>Lutra nippon</i>	ニホンカワウソ	-	-	-
<i>Aonyx</i>	<i>Aonyx cinerea</i>	アジアコツメカワウソ	-	EF472372	AF057119
	<i>Aonyx capensis</i>	ケープツメナシカワウソ	-	EF472371	AF057118
<i>Lutrogale</i>	<i>Lutrogale perspicillata</i>	ビロードカワウソ	-	EF472381	EF472348
<i>Hydricteis</i>	<i>Hydricteis maculicollis</i>	ノドブチカワウソ	-	EF472378	AF057125
<i>Enhydra</i>	<i>Enhydra lutris</i>	ラッコ	NC_009692	EF472373	AF057120
<i>Lontra</i>	<i>Lontra canadensis</i>	カナダカワウソ	-	EF472374	AF057121
	<i>Lontra longicaudis</i>	オナガカワウソ	-	EF472376	AF057123
	<i>Lontra felina</i>	ミナミウミカワウソ	-	EF472375	AF057122
<i>Pteronura</i>	<i>Pteronura brasiliensis</i>	オオカワウソ	-	EF472379	AF057126

表3-5. 本研究の分岐年代推定に用いたミトコンドリアDNAデータ.

目	科	学名	Accession No.	備考		
Carnivora	Mustelidae	<i>Lutra lutra</i>	FJ236015	complete mitochondrial genome		
		<i>Enhydra lutris</i>	AB291077	complete mitochondrial genome		
		<i>Lontra canadensis</i>	AH014077, AF057121	12 mitochondrial protein coding genes		
		<i>Lutra sumatrana</i>	EF472347	cytochrome <i>b</i>		
		<i>Hydriectis maculicollis</i>	AF057125	cytochrome <i>b</i>		
		<i>Aonyx cinerea</i>	AF057119	cytochrome <i>b</i>		
		<i>Aonyx capensis</i>	AF057118	cytochrome <i>b</i>		
		<i>Lutrogale perspicillata</i>	EF472348	cytochrome <i>b</i>		
		<i>Lontra felina</i>	AF057122	cytochrome <i>b</i>		
		<i>Lontra longicaudis</i>	AF057123	cytochrome <i>b</i>		
		<i>Pteronura brasiliensis</i>	AF057126	cytochrome <i>b</i>		
		<i>Mustela frenata</i>	HM106321	complete mitochondrial genome		
		<i>Mustela kathiah</i>	HM106320	complete mitochondrial genome		
		<i>Mustela nivalis</i>	HM106319	complete mitochondrial genome		
		<i>Mustela sibirica</i>	HM106317	complete mitochondrial genome		
		<i>Neovison vison</i>	HM106322	complete mitochondrial genome		
		<i>Martes americana</i>	HM106324	complete mitochondrial genome		
		<i>Martes flavigula</i>	HM106326	complete mitochondrial genome		
		<i>Martes foina</i>	HM106325	complete mitochondrial genome		
		<i>Martes melampus</i>	NC 009678	complete mitochondrial genome		
		<i>Martes pennanti</i>	HQ705180	complete mitochondrial genome		
		<i>Martes zibellina</i>	NC 011579	complete mitochondrial genome		
		<i>Gulo gulo</i>	NC 009685	complete mitochondrial genome		
		<i>Melogale moschata</i>	HM106328	complete mitochondrial genome		
		<i>Meles meles</i>	NC 011125	complete mitochondrial genome		
		<i>Meles anakuma</i>	NC 009677	complete mitochondrial genome		
		<i>Arctonyx collaris</i>	HM106329	complete mitochondrial genome		
		<i>Taxidea taxus</i>	HM106330	complete mitochondrial genome		
		Procyonidae	<i>Procyon lotor</i>	NC 009126	complete mitochondrial genome	
			<i>Nasua nasua</i>	HM106331	complete mitochondrial genome	
		Mephitidae	<i>Mephitis mephitis</i>	HM106332	complete mitochondrial genome	
			<i>Spilogale putorius</i>	NC 010497	complete mitochondrial genome	
		Ailuridae	<i>Ailurus fulgens styani</i>	NC 009691	complete mitochondrial genome	
		Odobenidae	<i>Odobenus rosmarus rosmarus</i>	NC 004029	complete mitochondrial genome	
		Otariidae	<i>Arctocephalus forsteri</i>	NC 004023	complete mitochondrial genome	
			<i>Arctocephalus pusillus</i>	NC 008417	complete mitochondrial genome	
			<i>Arctocephalus townsendi</i>	NC 008420	complete mitochondrial genome	
			<i>Callorhinus ursinus</i>	NC 008415	complete mitochondrial genome	
			<i>Eumetopias jubatus</i>	NC 004030	complete mitochondrial genome	
			<i>Neophoca cinerea</i>	NC 008419	complete mitochondrial genome	
			<i>Phocarcos hookeri</i>	NC 008418	complete mitochondrial genome	
			<i>Zalophus californianus</i>	NC 008416	complete mitochondrial genome	
			Phocidae	<i>Erignathus barbatus</i>	NC 008426	complete mitochondrial genome
				<i>Halichoerus grypus</i>	NC 001602	complete mitochondrial genome
				<i>Hydrurga leptonyx</i>	NC 008425	complete mitochondrial genome
<i>Leptonychotes weddellii</i>	NC 008424			complete mitochondrial genome		
<i>Lobodon carcinophaga</i>	NC 008423	complete mitochondrial genome				
<i>Mirounga leonina</i>	NC 008422	complete mitochondrial genome				
<i>Monachus schauinslandi</i>	NC 008421	complete mitochondrial genome				
<i>Phoca fasciata</i>	NC 008428	complete mitochondrial genome				
<i>Phoca groenlandica</i>	NC 008429	complete mitochondrial genome				
<i>Phoca largha</i>	NC 008430	complete mitochondrial genome				
<i>Phoca vitulina</i>	NC 001325	complete mitochondrial genome				
<i>Pusa caspica</i>	NC 008431	complete mitochondrial genome				
<i>Pusa hispida</i>	NC 008433	complete mitochondrial genome				
<i>Pusa sibirica</i>	NC 008432	complete mitochondrial genome				

表3-5. 本研究の分岐年代推定に用いたミトコンドリアDNAデータ(続き).

目	科	学名	Accession No.	備考
	Ursidae	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	EF212882	complete mitochondrial genome
		<i>Arctodus simus</i>	NC 011116	complete mitochondrial genome
		<i>Helarctos malayanus</i>	NC 009968	complete mitochondrial genome
		<i>Melursus ursinus</i>	NC 009970	complete mitochondrial genome
		<i>Tremarctos ornatus</i>	NC 009969	complete mitochondrial genome
		<i>Ursus americanus</i>	NC 003426	complete mitochondrial genome
		<i>Ursus arctos</i>	NC 003427	complete mitochondrial genome
		<i>Ursus maritimus</i>	AF303111	complete mitochondrial genome
		<i>Ursus spelaeus</i>	NC 011112	complete mitochondrial genome
		<i>Ursus thibetanus</i>	NC 009971	complete mitochondrial genome
	Canidae	<i>Canis latrans</i>	DQ480510	complete mitochondrial genome
		<i>Canis lupus</i>	AB499824	complete mitochondrial genome
		<i>Nyctereutes procyonoides</i>	GU256221	complete mitochondrial genome
		<i>Vulpes vulpes</i>	GQ374180	complete mitochondrial genome
	Felidae	<i>Acinonyx jubatus</i>	AY463959	complete mitochondrial genome
		<i>Felis catus</i>	NC 001700	complete mitochondrial genome
		<i>Lynx rufus</i>	NC 014456	complete mitochondrial genome
		<i>Neofelis nebulosa</i>	NC 008450	complete mitochondrial genome
		<i>Panthera pardus</i>	NC 010641	complete mitochondrial genome
		<i>Panthera tigris tigris</i>	JF357967	complete mitochondrial genome
		<i>Prionailurus bengalensis</i>	HM185183	complete mitochondrial genome
		<i>Puma concolor</i>	JN999997	complete mitochondrial genome
		<i>Uncia uncia</i>	NC 010638	complete mitochondrial genome
	Herpestidae	<i>Herpestes javanicus</i>	AY873843	complete mitochondrial genome
Pholidota	Manidae	<i>Manis pentadactyla</i>	NC 016008	complete mitochondrial genome

表3-6. ユーランシアカワウソおよびニホンカワウソのmitogenomeの構成.

gene	EO1			EO2			EO3			EO4		
	配列長: 16316bp			配列長: 16317bp			配列長: 16317bp			配列長: 16316bp		
	位置 開始	配列長 (bp)	終了 コドン									
tRNA-Phe	1	69	TAA									
SrRNA	70	1033		70	1033		70	1033		70	1033	
tRNA-Val	1034	1101	TAA									
LrRNA	1100	2669		1100	2669		1100	2669		1100	2669	
tRNA-Leu (UUR)	2670	2744	TAA									
ND1	2747	3703	TAA									
tRNA-Ile (AUY)	3703	3771	TAA									
tRNA-Gln	3769	3842	TAA									
tRNA-Met	3844	3912	TAA									
ND2	3913	4956	TAA									
tRNA-Trp	4955	5022	TAA									
tRNA-Ala	5032	5100	TAA									
tRNA-Asn	5102	5174	TAA									
rep_origin	5175	5210		5175	5210		5175	5210		5175	5210	
tRNA-Cys	5208	5274	TAA									
tRNA-Tyr	5275	5342	TAA									
COI	5344	6888	TAA									
tRNA-Ser (UCN)	6886	6954	TAA									
tRNA-Asp	6961	7027	TAA									
CO2	7028	7711	TAA									
tRNA-Lys	7715	7780	TAA									
ATPase8	7782	7982	TAA									
ATPase6	7943	8623	TAA									
CO3	8623	9406	TAA									
tRNA-Gly	9407	9476	TAA									
ND3	9477	9824	TAA									
tRNA-Arg (CGN)	9825	9892	TAA									
ND4L	9893	10189	TAA									
ND4	10183	11560	TAA									
tRNA-His	11561	11629	TAA									
tRNA-Ser (AGY)	11630	11691	TAA									
tRNA-Leu (CUN)	11692	11761	TAA									
ND5	11753	13582	TAA									
ND6	13566	14099	TAA									
tRNA-Glu	14100	14168	TAA									
Cyt b	14173	15312	TAA									
tRNA-Thr	15313	15380	TAA									
tRNA-Pro	15380	15446	TAA									
Control region	15447	16316		15447	16316		15447	16316		15447	16316	

表3-6. ユーランシアカワソノおよびニホンカワソノのmigenomeの構成(続き).

gene	EO5				JO1				JO2					
	配列長: 16316bp		配列長: 16317bp		配列長: 16317bp		配列長: 16319bp		位置		配列長 (bp)		開始 終了	
	開始	終了	開始	終了	開始	終了	開始	終了	開始	終了	開始	終了	開始	終了
tRNA-Phe	1	69	69	1	69	69	1	69	1	69	69	1	69	69
SrRNA	70	1033	964	70	1033	964	70	1033	70	1033	964	70	1033	964
tRNA-Val	1034	1101	68	1034	1101	68	1034	1101	1034	1101	68	1034	1101	68
LrRNA	1100	2669	1570	1100	2669	1570	1100	2669	1100	2669	1570	1100	2669	1570
tRNA-Leu (UUR)	2670	2744	75	2670	2744	75	2670	2744	2670	2744	75	2670	2744	75
ND1	2747	3703	957 ATG TAA	2747	3703	957 ATG TAA	2747	3703	2747	3703	957 ATG TAA	2747	3703	957 ATG TAA
tRNA-Ile (AUY)	3703	3771	69	3703	3771	69	3703	3771	3703	3771	69	3703	3771	69
tRNA-Gln	3769	3842	74	3769	3842	74	3769	3842	3769	3842	74	3769	3842	74
tRNA-Met	3844	3912	69	3844	3912	69	3844	3912	3844	3912	69	3844	3912	69
ND2	3913	4956	1044 ATC TAG	3913	4956	1044 ATC TAG	3913	4956	3913	4956	1044 ATC TAG	3913	4956	1044 ATC TAG
tRNA-Trp	4955	5022	68	4955	5022	68	4955	5022	4955	5022	68	4955	5022	68
tRNA-Ala	5032	5100	69	5032	5100	69	5032	5100	5032	5100	69	5032	5100	69
tRNA-Asn	5102	5174	73	5102	5174	73	5102	5174	5102	5174	73	5102	5174	73
rep_origin	5175	5210	36	5175	5210	36	5175	5210	5175	5210	36	5175	5210	36
tRNA-Cys	5208	5274	67	5208	5274	67	5208	5274	5208	5274	67	5208	5274	67
tRNA-Tyr	5275	5342	68	5275	5342	68	5275	5342	5275	5342	68	5275	5342	68
CO1	5344	6888	1545 ATG TAA	5344	6888	1545 ATG TAA	5344	6888	5344	6888	1545 ATG TAA	5344	6888	1545 ATG TAA
tRNA-Ser (UCN)	6886	6954	69	6886	6954	69	6886	6954	6886	6954	69	6886	6954	69
tRNA-Asp	6961	7027	67	6961	7027	67	6961	7027	6961	7027	67	6961	7027	67
CO2	7028	7711	684 ATG TAA	7028	7711	684 ATG TAA	7028	7711	7028	7711	684 ATG TAA	7028	7711	684 ATG TAA
tRNA-Lys	7715	7780	66	7715	7780	66	7715	7780	7715	7780	66	7715	7780	66
ATPase8	7782	7982	201 ATG TAA	7782	7982	201 ATG TAA	7782	7982	7782	7982	201 ATG TAA	7782	7982	201 ATG TAA
ATPase6	7943	8623	681 ATG TAA	7943	8623	681 ATG TAA	7943	8623	7943	8623	681 ATG TAA	7943	8623	681 ATG TAA
CO3	8623	9406	784 ATG T--	8623	9406	784 ATG T--	8623	9406	8623	9406	784 ATG T--	8623	9406	784 ATG T--
tRNA-Gly	9407	9476	70	9407	9476	70	9407	9476	9407	9476	70	9407	9476	70
ND3	9477	9824	348 ATA TAA	9477	9824	348 ATA TAA	9477	9824	9477	9824	348 ATA TAA	9477	9824	348 ATA TAA
tRNA-Arg (CGN)	9825	9892	68	9825	9892	68	9825	9892	9825	9892	68	9825	9892	68
ND4L	9893	10189	297 ATG TAA	9893	10189	297 ATG TAA	9893	10189	9893	10189	297 ATG TAA	9893	10189	297 ATG TAA
ND4	10183	11560	1378 ATG T--	10183	11560	1378 ATG T--	10183	11560	10183	11560	1378 ATG T--	10183	11560	1378 ATG T--
tRNA-His	11561	11629	69	11561	11629	69	11561	11629	11561	11629	69	11561	11629	69
tRNA-Ser (AGY)	11630	11691	62	11630	11691	62	11630	11691	11630	11691	62	11630	11691	62
tRNA-Leu (CUN)	11692	11761	70	11692	11761	70	11692	11761	11692	11761	70	11692	11761	70
ND5	11753	13582	1830 ATA TAA	11753	13582	1830 ATA TAA	11753	13582	11753	13582	1830 ATA TAA	11753	13582	1830 ATA TAA
ND6	13566	14099	534 ATG TAA	13566	14099	534 ATG TAA	13566	14099	13566	14099	534 ATG TAA	13566	14099	534 ATG TAA
tRNA-Glu	14100	14168	69	14100	14168	69	14100	14168	14100	14168	69	14100	14168	69
Cyt b	14173	15312	1140 ATG AGA	14173	15312	1140 ATG AGA	14173	15312	14173	15312	1140 ATG AGA	14173	15312	1140 ATG AGA
tRNA-Thr	15313	15380	68	15313	15380	68	15313	15380	15313	15380	68	15313	15380	68
tRNA-Pro	15380	15446	67	15380	15446	67	15380	15446	15380	15446	67	15380	15446	67
Control region	15447	16316	870	15447	16316	870	15447	16316	15447	16316	870	15447	16316	870

表3-7. NGSリード数, *de novo* assemblyの結果およびmapping to referenceの結果.

リード数	<i>de novo</i> assembly				Mapping				
	使用リード数 ^b	平均リード長 ^c	平均カバレッジ ^d	配列長 (bp) ^e	使用リード数 ^f	平均リード長 ^g	平均カバレッジ ^h	配列長 (bp) ^e	
JO1	6,389,056	157,703	59.79	584.39	16,374	172,071	60.34	626.82	16,536
JO2	6,750,212	22,187	76.22	103.55	16,377	23,410	76.12	107.45	16,539

a) CLC genomic workbenchでquality trim後のリード数

b) カワウソmtgenomeコンティグに用いられたリード数

c) カワウソmtgenomeコンティグに用いられたリードの平均配列長

d) カワウソmtgenomeコンティグの平均被服度(カバレッジ)

e) タンデムリピート配列長を含む

f) マッピング合意配列に用いられたリード数

g) マッピングされたリードの平均配列長

h) マッピング合意配列の平均被服度

表3-8. *cytb* 遺伝子 (1,140 bp) に基づいた個体間もしくはカワウソ科 (Lutrinae) の種間におけるペアワイズ遺伝的距離.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 <i>Aonyx capensis</i>																		
2 <i>Hydrictis maculicollis</i>	0.159																	
3 <i>Enhydra lutris</i>	0.135	0.150																
4 <i>Lontra canadensis</i>	0.181	0.182	0.177															
5 <i>Lontra felina</i>	0.167	0.181	0.180	0.110														
6 <i>Lontra longicaudis</i>	0.172	0.178	0.176	0.102	0.058													
7 <i>Pteronura brasiliensis</i>	0.190	0.198	0.170	0.202	0.202	0.193												
8 <i>Lutra lutra</i>	0.126	0.139	0.139	0.164	0.155	0.161	0.179											
9 <i>Lutra lutra</i> _FJ236015	0.124	0.141	0.139	0.161	0.158	0.164	0.178	0.009										
10 EO1 (不明)	0.128	0.143	0.146	0.170	0.158	0.166	0.185	0.009	0.009									
11 EO2 (中国)	0.126	0.141	0.141	0.170	0.163	0.169	0.182	0.012	0.012	0.008								
12 EO3 (中国・四川省)	0.127	0.142	0.145	0.169	0.160	0.165	0.184	0.008	0.008	0.003	0.007							
13 EO4 (中国)	0.124	0.139	0.141	0.168	0.161	0.164	0.184	0.007	0.007	0.004	0.006	0.003						
14 EO5 (ロシア・サハリン)	0.124	0.141	0.139	0.161	0.158	0.164	0.178	0.009	0.000	0.009	0.012	0.008	0.007					
15 JO1 (神奈川)	0.127	0.145	0.147	0.174	0.164	0.168	0.184	0.012	0.012	0.008	0.011	0.007	0.006	0.012				
16 JO2 (高知)	0.132	0.144	0.145	0.165	0.165	0.170	0.192	0.028	0.024	0.030	0.033	0.029	0.028	0.024	0.031			
17 <i>Lutra sumatrana</i>	0.121	0.143	0.135	0.173	0.161	0.162	0.193	0.067	0.067	0.071	0.069	0.070	0.067	0.067	0.074	0.072		
18 <i>Aonyx cinerea</i>	0.116	0.159	0.155	0.177	0.165	0.163	0.202	0.128	0.124	0.124	0.127	0.126	0.122	0.124	0.126	0.129	0.115	
19 <i>Lutrogale perspicillata</i>	0.113	0.156	0.152	0.177	0.165	0.162	0.196	0.112	0.111	0.107	0.111	0.108	0.107	0.111	0.112	0.118	0.107	0.081

この表はK2Pモデルで *cytb* 遺伝子全長配列から推定された配列間の距離 (遺伝的距離) を示す.

第4章 総論

本研究は *Lutra* 属における保全上解決すべき問題を mtDNA に基づき分子系統解析することで解明し、保全遺伝学へ応用することを目的とした。EAZA および JAZA に所属する動物園や水族館で飼育されているユーラシアカワウソの A-line (欧州亜種)、B-line (欧州亜種と東南アジア亜種の亜種間交雑が疑われる系統) および中国亜種の *cytb* 遺伝子全長配列 (1,140 bp) を決定し、亜種を考慮した配列比較と系統解析を行った。これらの解析の結果、これまで示されていなかった B-line の遺伝的特徴および A-line (欧州亜種) との系統の違いが示された。また、血統登録の精査により本研究で解析した B-line 個体の繁殖に中国亜種の関わりはないことが確認されたことから B-line の mtDNA は東南アジア亜種に由来すると考えられた。種内の保全単位については論争が続いているが (Frankham et al., 2002), Moritz (1995) が提唱した種内の管理単位として進化的に重要な単位 (ESU) がある。これは mtDNA および nDNA の複数遺伝子座を集団間で比較し、統計学的に明確な遺伝的分化を示した場合に各集団を ESU として扱う。ESU として扱われる集団は種内の管理単位として別々に管理されるべきとされている。本研究により mtDNA の *cytb* 遺伝子全長配列から A-line と B-line および A-line と中国亜種は別系統で遺伝的に分化することが示唆された。今後 nDNA の複数遺伝子座を調べる必要はあるが、EAZA と JAZA は A-line, B-line および中国亜種をそれぞれ別の管理単位とすることが保全上好ましいと考えられた。また、ニホンカワウソの系統類縁関係の評価では mtgenome 配列に基づき、近縁種との配列比較、系統解析、tMRCA の推定および分岐年代推定を行った。解析の結果、本研究で解析したニホンカワウソ 2 個体 [JO1 (神奈川県産) と JO2 (高知県産)] は *Lutra* クレイドにおいてそれぞれ異なる進化史を示した。JO1 系統はユーラシアカワウソが形成する単系統群に内包され、分岐年代は約 10 万年前と推定されたことから、本研究では JO1 をユーラシアカワウソ *L. lutra* と同定した。その一方で、JO2 系統は JO1 を含むユーラシアカワウソ単系統群と姉妹群関係となり、ユーラシアカワウソが欧州とアジアに分布を広げた時期よりも早い約 127 万年前に日本に移住した日本固有の系統と推定された。JO2 が示した分岐年代は前期更新世 (カラブリアン : 1.80–0.78 Ma) に

あたり、日本におけるトロゴンテリーゾウの化石出現開始年代とニホンツキノワグマの mtgenome 配列から推定された分岐年代に似た分岐年代だった。また、地質学的な証拠からカラブリアンにユーラシア大陸と日本列島が陸橋によって接続していたことが示唆されており、ニホンカワウソを含む上記の陸生動物の分岐年代および移住時期と矛盾しない。以上の結果から、JO2 系統の遺伝的分化の程度は日本固有種 *L. nippon* もしくは日本固有亜種 *L. l. nippon* として扱うことが適切と考えられた。保全遺伝学的観点から、現存するユーラシアカワウソ集団において JO2 と同じ系統がいれば重要な保全対象となりうるが、本研究ではその存在は示されなかった。本研究は本州と四国のニホンカワウソ各 1 個体を解析したものであり、ニホンカワウソ集団の遺伝的多様性を網羅していない。今後は北海道、本州、四国および九州それぞれの集団から複数個体を解析することにより、ニホンカワウソ集団の持つ遺伝的多様性を網羅した系統学的位置づけが解明されるだろう。加えて、ユーラシアカワウソの全 7 亜種を網羅し、mtDNA のみならず nDNA 配列から分子系統学的解析並びに集団遺伝学的解析を行うことで *Lutra* 属におけるニホンカワウソ集団とユーラシアカワウソ集団の進化史が解明されることだろう。

20 世紀後半以降、絶滅のおそれのある野生動植物の種の国際取引に関する条約（ワシントン条約）や遺伝資源の取得の機会およびその利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分（名古屋議定書）が制定されたように野生生物とその遺伝資源の国外流出を制限する条約が整いつつあり、動物園や水族館も国外からの新規個体導入に苦慮している（NHK, 2014, URL : <http://www9.nhk.or.jp/nw9/marugoto/2014/02/0210.html> ; 2016 年 2 月 6 日最終閲覧）。実際に、生物多様性条約名古屋会議が開催された 2010 年以降に国外から日本へ導入されたユーラシアカワウソ個体は国内血統登録（富山市ファミリーパーク, 2014）に従うと JAZA 所属園館全体でわずかに 5 頭と非常に少ないうえ、そのうち 4 頭が本研究で亜種間交雑の可能性が強く示唆された B-line 個体である。これら 2010 年以降 JAZA 所属園館に導入された個体とその子孫を除いた国内生存個体は全て 1991 年に中国の四川省から導入された野生個体とその子孫であり、個体数も 2016 年 1 月現在で 8 個体と非常に少ない。JAZA は 1988 年に協会内の種保全委員会を設置し、希少動物の保全と増殖事業を協会内における重要な事業とした（JAZA, 2010）。しかしながら国外から

の新規導入個体は非常に少なく、上述した ESU を考慮した繁殖にも限界がある。一方で、近親交配により誕生した子孫は次第に近交弱勢（繁殖力、生存力等の低下）を示し絶滅リスクが増大することが多い（Kalls et al., 1988 ; Crnokrak and Roff, 1999 ; Frankham, 2002）。このことから、国内飼育個体のユーラシアカワウソにおいて近親交配を続けると近交弱勢を示す個体が誕生する可能性がある。近親交配を可能な限り低下させ、国内飼育個体を維持するためにも新規導入が強く望まれるとともに、現存個体内で近親交配度を最小化する繁殖計画を立案する必要がある。

我が国において 20 世紀以降に絶滅した陸生および海生の哺乳類は、本研究で解析したニホンカワウソの他にニホンアシカとニホンオオカミがいる。Ishiguro et al. (2009) は本州、四国および九州のニホンオオカミの出土骨を解析し、ニホンオオカミは日本独自の亜種の可能性を示している。また、Toyoda et al. (2015) は北海道で出土したニホンアシカの化石から mtDNA の調節領域部分配列を決定し、ニホンアシカは *Zalophus* 属の一員と示唆している。しかしながら、これらの研究は通常の PCR 法を用いて mtDNA の CR 領域部分配列を決定しているのみである。本研究では、絶滅したニホンカワウソの系統学的位置づけをより多くの分子情報から推定するため、NGS により mtgenoem 配列を決定し、分子系統解析と分岐年代を推定することでその進化史に迫り、四国に生息していたニホンカワウソ集団が日本固有種もしくは日本固有亜種に相当すると解明した。本研究でも MPCR によるニホンカワウソの配列決定が困難であることが示された通り、PCR+ダイデオキシ法による配列決定は莫大な時間と労力そして資金がかかるが、今後は NGS を使いより多くの配列情報を得ることで、上記絶滅動物の分類学的位置づけが詳細に解明されるであろう。しかしながら、将来において野生動植物が絶滅するのを防ぐためにも、現存集団を遺伝的に解析し、生態系、種および遺伝的な多様性を保全する方法を選定・実施して生物の進化を妨げないことが非常に重要だろう。

謝辞

大学院の5年間ご指導していただいた佐々木剛教授には何事においても至らない私に幾度となく叱咤激励をかけていただき、科学者になるための基礎をたたき込んでいただいた。また、最前線で研究に励む方々が集う場に連れ出していただき一人の大学院生にはもったいない経験を山のように積ませていただいた。この場を借りて深く感謝の意を申し上げます。

加えて、野生動物学研究室の小川博教授ならびに松林尚志准教授、そして退官された現ヤマザキ学園の安藤元一教授ならびに天野卓教授にも多大なるご協力をいただいた。大学院生の道を志し、研究室員として7年間生活できたのも先生方から受けたご指導の賜物であるとともに、先生方の研究や活動から興味をより広い視野に広げさせていただきました。大変にありがとうございました。

また、系統解析や分岐年代推定に関して多大なご協力とご指導をくださった中国・復旦大学の米澤隆弘副教授、次世代シーケンサーによる解析をご指導していただいた国立極地研究所の瀬川高弘特任助教ならびに秋好歩美博士、農大ゲノム解析センターの石毛太一郎氏、試料の提供と古生物に関してご教示いただいた国立科学博物館の甲能直樹研究主幹、そして無知な学部生の頃からカワウソに関連してご指導していただいた筑紫女学園大学の佐々木浩教授、以上の共同研究者とともに分岐年代推定のアドバイスをいただいた福山大学の佐藤淳准教授と地質学に関する知見を説いてくださった静岡大学の北村晃寿教授に深く感謝の意を申し上げます。

そして、貴重な試料と情報の提供など様々なご配慮をいただいた日本動物園水族館協会のみなさま、とりわけ富山市ファミリーパークの村井仁志氏、穴田美佳氏、秋葉由紀氏、高知県立のいち動物公園の多々良成紀氏、金川弘也氏、絹田俊和氏、ふくしま海洋科学館の平治隆氏、横浜市立よこはま動物園の植田美弥氏、東京動物園協会の小林和夫氏の皆様に感謝を申し上げますとともに、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、横須賀市自然・人文博物館学芸員の萩原清司氏、静岡県森林・林業研究センターの大場孝裕氏および西南学園中等・高等学校の松澤一寛氏に感謝申し上げます。

7年間過ごした野生動物学研究室の皆様がいたからこそ、至らない私ですが研究に取り組

むことができました。特に学部3年生のときからカワウソについてご指導していただいた山本佳代子氏、キムヒョンジン氏には大変お世話になりました。大変にありがとうございました。上記2名のほかにも数多くの先輩方、同期、そして後輩に恵まれました。そして最終学年の2015年度に数え切れないほどの終夜を共にした学部4年生の皆さまや修士2年生の皆さま、ほか研究室と関係者の方々がいたからこそ最後の1年間を乗り切ることができました。皆様と同じ年に学生として学べたことを幸運だったと感じております。ありがとうございました。

そして、博士後期課程において奨学金をいただけたことは、心にゆとりを持って研究に励む原動力となりました。公益信託萬谷記念かながわ奨学基金を設立された故・萬谷富子様と故・萬谷廣様そして関係者の皆様には感謝の念に堪えません。また、公益財団法人山階鳥類研究所からは山階武彦助成事業、東京農業大学からは大学院博士後期課程研究支援制度により研究費の助成を受けた。ここに厚く御礼申し上げます。

また、直接研究に関係は無いものの他の研究分野で活躍されている友人たちや、研究のことを知らずとも温かく見守り、励ましてくれた友人たちにも感謝申し上げます。

そして最後に、家計が非常に厳しいにも関わらず就職せずに大学院生を5年間やらせてくれた両親と家族には感謝に堪えません。今後も研究に励んでゆくことがこのご恩に報いることと思います。家族のみならず、支えてくださった上記の皆様のためにも、今後も研究に精進してまいります。

引用文献

[第 1 章 序論]

Avice, A. C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. pp. 447. Harvard University Press, Cambridge.

Conroy, J. W. H. and Chanin, P. R. F. 2000. In (J.W.H. Conroy, P. Yoxon and A. C. Gutleb eds.) *Proceedings of the First Otter Toxicology Conference*. pp. 728. International Otter Survival Fund, Broadford.

Frankham, R., Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.

International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. *The IUCN Red List of Threatened Species* (<http://www.iucnredlist.org>) (最終アクセス 2016 年 2 月 7 日)

Leakey, R. and Lewin, R. 1995. *The sixth Extinction: Biodiversity and its Survival*. Phoenix, London.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5463-5467.

Secretariat of the Convention on Biological Diversity. 2014. *Global Biodiversity Outlook 4*. Montréal, 155 pp.

Vilstrup, J. T., Seguin-Orlando, A., Stiller, M., Ginolhac, A., Raghavan, M., Nielsen, S. C., Weinstock, J.,

Froese, D., Vasiliev, S. K., Ovodov, N. D., Clary, J., Helgen, K. M., Fleischer, E. C., Cooper, A., Shapiro, B. and Orland, L. 2013. Mitochondrial phylogenomics of modern and ancient equids. PLoS One 8: e55950.

Wozencraft, W. C. 2005. Order Carnivora. In (D. E. Wilson, D. E. Reeder, eds) Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference, pp. 532–628. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.

[第 2 章 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]

Conroy, J. W. H. and Chanin, P. R. F. 2000. In (J.W.H. Conroy, P. Yoxon and A. C. Gutleb eds.) Proceedings of the First Otter Toxicology Conference. pp. 728. International Otter Survival Fund, Broadford.

Hasegawa, M., Kishino, H., and Yano, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of Molecular Evolution 22: 160–174.

Iwata, E., Taira, H. and 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. Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine 19:137–142.

Koepfli, K. P., Kanchanasaka, B., Sasaki, H., Jacques, H., Louie, K. D. Y., Hoai, T., Dang, N. X., Geffen, E., Gutleb, A., Han, S., Heggberget, T. M., Lafontaine, L., Lee, H., Melisch, R., Ruiz-Olmo, J., Santos-Reis, M., Sidorovich, V. E., Stubbe, M. and Wayne, R. K. 2008. Establishing the foundation for an applied molecular taxonomy of otters in Southeast Asia. Conservation Genetics 9: 1589–1604.

Kruuk, H. 2006. Otters: ecology, behaviour and conservation. Oxford University Press, New York.

- Rodriguez, F., Oliver, J. L., Marin, A. and Medina, J. R. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal Theoretical Biology* 142: 485–501.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatus, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sasaki, H. 2009. *Lutra lura* (Linnaeus, 1758). In (S. D. Ohdachi, Y. Ishibashi, M. A. Iwasa, T. Saitoh, eds.) *The Wild Mammals of Japan*, pp. 254–255. Shoukadoh Book Sellers, Kyoto.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 22: 2688–2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P. and Rougemont, J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic Biology* 57: 758–771.
- Suzuki, T., Yuasa, H. and 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. *Zoological Science* 13: 621–626.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- 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)

International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. The IUCN Red List of Threatened Species (<http://www.iucnredlist.org>) (最終アクセス 2016 年 2 月 7 日)

Wozencraft, W. C. 2005. Order Carnivora. In (D. E. Wilson, D. E. Reeder, eds) Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference, pp. 532–628. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Yang Z. 1996. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 367–372.

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, 233 pp.

環境省. 2012. 第四次レッドリスト, 環境省, 東京.

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.

[第 3 章 絶滅したニホンカワウソの系統類縁関係の評価]

Ajay, S. S., Parker, S. C., Abaan, H. O., Fajardo, K. V. F. and Margulies, E. H. 2011. Accurate and comprehensive sequencing of personal genomes. *Genome research* 21: 1498-1505.

Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritsch, G., Pütz, J., Middendorf, M. and Stadler, P. F. 2013. MITOS: Improved *de novo* metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 313–319.

- Cheng, S., Higuchi, R. and Stoneking, M. 1994. Complete mitochondrial genome amplification. *Nature Genetics* 7: 350–351.
- Dobson, M. and Kawamura, Y. 1998. Origin of the Japanese land mammal fauna: allocation of extant species to historically-based categories. *Quaternary Research* 37: 385–395.
- Drummond, A. J. and Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 214.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–97.
- Eizirik, E., Murphy, W. J., Koepfli, K. P., Johnson, W. E., Dragoo, J. W., Wayne, R. K. and O'Brien S. J. 2010. Pattern and timing of diversification of the mammalian order Carnivora inferred from multiple nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 49–63.
- Endicott, P. and Ho, S. Y. 2008. A Bayesian evaluation of human mitochondrial substitution rates. *The American Journal of Human Genetics* 82: 895–902.
- Endo, H., Ye, X. and Kogiku, H. 2000. Osteometrical study of the Japanese otter (*Lutra nippon*) from Ehime and Kochi prefectures. *Memoirs of the National Science Museum, Tokyo* 33: 195–201.
- Finnegan, L. A. and Neill, L. O. 2010. Mitochondrial DNA diversity of the Irish otter, *Lutra lutra*, population. *Conservation Genetics* 11: 1573–1577.

Gray, J. E. 1867. Notice of *Lutronectes whiteleyi*, an otter from Japan. Proceedings Zoological Society of London 35: 180–182.

Hasegawa, M., Kishino, H. and Yano, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of Molecular Evolution. 22: 160–174.

Ho, S. Y., Phillips, M. J., Cooper, A. and Drummond, A. J. 2005. Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. Molecular Biology and Evolution 22: 1561–1568.

Honnen, A. C., Petersen, B., Kaßler, L., Elmeros, M., Roos, A., Sommer, R. S. and Zachos F. E. 2010. Genetic structure of Eurasian otter (*Lutra lutra*, Carnivora: Mustelidae) populations from the western Baltic sea region and its implication for the recolonization of north-western Germany. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 49: 169–175.

Imaizumi, Y. and Yoshiyuki, M. 1989. Taxonomic status of the Japanese otter (Carnivora, Mustelidae), with a description of new species. Bulletin of the National Science Museum. Series A, Zoology 15: 177–188.

Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S. and Gyllensten, U. 2000. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. Nature 408: 708–713.

Katoh, K. and Standley, D. M. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Molecular Biology and Evolution 30: 772–80.

- Kawamura, Y. 1991. Quaternary Mammalian Faunas in the Japanese Islands. *Quaternary Research* 30: 213–220.
- Ketmaier, V. and Bernardini, C. 2005. Structure of the mitochondrial control region of the Eurasian otter (*Lutra lutra*; Carnivora, Mustelidae): patterns of genetic heterogeneity and implications for conservation of the species in Italy. *Journal of Heredity* 96: 318–328.
- Ki, J. S., Hwang, D. S., Park, T. J., Han, S. H. and Lee, J. S. 2010. A comparative analysis of the complete mitochondrial genome of the Eurasian otter *Lutra lutra* (Carnivora; Mustelidae). *Molecular Biology Reports* 37: 1943–1955.
- 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.
- Kishino, H., Thorne, J. L. and Bruno, W. J. 2001. Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution. *Molecular Biology and Evolution* 18: 352–361.
- Koepfli, K. P. and Wayne, R. K. 1998. Phylogenetic relationships of otters (Carnivora: Mustelidae) based on mitochondrial cytochrome *b* sequences. *Journal of Zoology* 246: 401–416.
- Koepfli, K. P., Kanchanasaka, B., Sasaki, H., Jacques, H., Louie, K. D. Y., Hoai, T., Dang, N. X., Geffen, E., Gutleb, A., Han, S., Heggberget, 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. *Conservation Genetics* 9: 1589–1604.

- Krause, J., Dear, P. H., Pollack, J. L., Slatkin, M., Spriggs, H., Barnes, I., Lister, A. M., Ebersberger, I., Pääbo, S. and Hofreiter, M. 2006. Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature* 439: 724–727.
- Kruuk, H. 2006. *Otters: ecology, behaviour and conservation: ecology, behaviour and conservation*. New York: Oxford University Press.
- Madsen, C. S., Ghivizzani, S. C. and Hauswirth, W. W. 1993. *In vivo* and *in vitro* evidence for slipped mispairing in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Science* 90: 7671–7675.
- Miller, W., Drautz, D. I., Janecka, J. E., Lesk, A. M., Ratan, A., Tomsho, L. P., Packard, M., Zhang, Y., McClellan, L. R., Qi, J., Zhao, F., Gilbert, M. T. P., Dalén, L., Arsuaga, J. L., Ericson, P. G. P., Huson, D. H., Helgen, K. M., Murphy, W. J., Götherström, A. and Schuster, S. C. 2009. The mitochondrial genome sequence of the Tasmanian tiger (*Thylacinus cynocephalus*). *Genome Research* 19: 213–220.
- Mitchell, K. J., Llamas, B., Soubrier, J., Rawlence, N. J., Worthy, T. H., Wood, J., Lee, M. S. Y. and Cooper, A. 2014. Ancient DNA reveals elephant birds and kiwi are sister taxa and clarifies ratite bird evolution. *Science* 344: 898–900.
- Rodriguez, F., Oliver, J. L., Marin, A. and Medina, J. R. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142: 485–501.
- Rannala, B. and Yang, Z. 2007. Inferring speciation times under an episodic molecular clock. *Systematic Biology* 56: 453–466.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatus, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sasaki, H. 1995. History of river otters in Japan. In (Proceedings of Korea-Japan Otter Symposium) pp. 16–17.
- Sasaki, H. 2009. *Lutra lutra* (Linnaeus, 1758). In (S. D. Ohdachi, Y. Ishibashi, M. A. Iwasa, T. Saitoh, eds.) *The Wild Mammals of Japan*, pp. 254–255. Shoukadoh Book Sellers, Kyoto.
- Sasaki, T., Nikaido, M., Hamilton, H., Goto, M., Kato, H., Kanda, N., Pastene, L. A., Cao, Y., Fordyce, R. E., Hasegawa, M. and Okada, N. 2005. Mitochondrial phylogenetics and evolution of Mysticete whales. *Systematic Biology* 54: 77–90.
- Sato, J. J., Wolsan, M., Minami, S., Hosoda, T., Sinaga, M. H., Hiyama, K. Yamaguchi, Y. and Suzuki, H. 2009. Deciphering and dating the red panda's ancestry and early adaptive radiation of Musteloidea. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 907–922.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology* 57: 758–771.
- Stanton, D. W. G., Hobbs, G. I., Chadwick, E. A., Slater, F. M. and Bruford, M. W. 2009. Mitochondrial

- genetic diversity and structure of the European otter (*Lutra lutra*) in Britain. *Conservation Genetics* 10: 733–737.
- Suzuki, T., Yuasa, H. and 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. *Zoological Science* 13: 621–626.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Waddell, P. J., Cao, Y., Hauf, J. and Hasegawa M. 1999. Using novel phylogenetic methods to evaluate mammalian mtDNA, including amino acid invariant sites-LogDet plus site stripping, to detect internal conflicts in the data, with special reference to the positions of hedgehog, armadillo, and elephant. *Systematic Biology* 48: 31–53.
- Watanobe, T., Ishiguro, N. and Nakano, M. 2003. Phylogeography and population structure of the Japanese wild boar *Sus scrofa leucomystax*: mitochondrial DNA variation. *Zoological Science* 20: 1477–1489.
- Wozencraft, W. C. 2005. Order Carnivora. In (D. E. Wilson, D. E. Reeder, eds) *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, pp. 532–628. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Wu, J., Kohno, N., Mano, S., Fukumoto, Y., Tanabe, H., Hasegawa, M. and Yonezawa, T. 2015. Phylogeographic and Demographic Analysis of the Asian Black Bear (*Ursus thibetanus*) Based on Mitochondrial DNA. *PLOS ONE* 10: e0136398.

- Yang, Z. 1996. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 367–372.
- Yang, Z. 2007. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1586–1591.
- Yang, Z., Nielsen, R. and Hasegawa, M. 1998. Models of amino acid substitution and applications to mitochondrial protein evolution. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1600–1611.
- Yonezawa, T., Nikaido, M., Kohno, N., Fukumoto, Y., Okada, N. and Hasegawa M. 2007. Molecular phylogenetic study on the origin and evolution of Mustelidae. *Gene* 396: 1–12.
- Yonezawa, T., Kohno, N. and Hasegawa, M. 2009. The monophyletic origin of sea lions and fur seals (Carnivora; Otariidae) in the Southern Hemisphere. *Gene* 441: 89–99.
- 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, 233 pp.
- 環境省. 2012. 第四次レッドリスト, 環境省, 東京.
- 北村晃寿, 木元克典. 2004. 3.9Ma から 1.0Ma の日本海の南方海峡の変遷史. *第四紀研究* 43: 417–434.
- 樽野博幸. 2010. 哺乳類化石の変遷から見た日本列島と大陸間の陸橋の形成時期. *第四紀研究* 49: 309–314.

佐倉朔. 2007. 沖縄の人類化石-日本列島住民の由来を求めて. 老年歯科医学 21: 384-386.

野嶋宏二. 2002. 更新世谷下石灰岩裂罅堆積物 (静岡県引佐町) の脊椎動物化石. 静岡大学地球科学研究報告 29: 1-11.

[第4章 総合考察]

Crnokrak, P., and Roff, D. A. 1999. Inbreeding depression in the wild. *Heredity* 83: 260-270.

Frankham, R., Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.

Ishiguro, N., Inoshima, Y., and Shigehara, N. 2009. Mitochondrial DNA analysis of the Japanese wolf (*Canis lupus hodophilax* Temminck, 1839) and comparison with representative wolf and domestic dog haplotypes. *Zoological Science* 26: 765-770.

Ralls, K., Ballou, J. D., & Templeton, A. 1988. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. *Conservation biology* 2: 185-193.

Toyoda, A., Eda, M., Sato, T. and Masuda, R. 2015. In Vth International Wildlife Management Congress. Sapporo, Japan.

日本動物園水族館協会. 2010. 社団法人日本動物園水族館協会. In 生物多様性条約第10回締約国会議. ブース展示.

摘要

第1章. 序論

カワウソ亜科 Lutrinae (Mammalia, Carnivora) の現存種は 7 属 13 種に分類されており, 4 大陸 (ユーラシア, アフリカ, 北米, 南米) に広く分布する半水生の中型哺乳類である. このうち *Lutra* 属の現存種は 2 種 (ユーラシアカワウソ *Lutra lutra* およびスマトラカワウソ *Lutra sumatrana*) だが, 20 世紀以降に絶滅したニホンカワウソ *Lutra nippon* を含めるとかつては 3 種で構成されていたと考えられている. 現在, *Lutra* 属のこれらの種は複数の国や地域で絶滅が危ぶまれ, その保全に向けた対策が急がれているが, その一方で種内地域集団およびカワウソ亜科内での種の系統類縁関係が未だ解明されていないことが問題としてあげられる.

Lutra 属の保全のため解決すべき具体的な問題として以下の 2 つが挙げられる. (1) ユーラシアカワウソの地域絶滅が起きている現状を踏まえて動物園や水族館は本種の繁殖を実施し域外保全を行っている. しかしながら飼育個体に亜種間交雑が疑われる系統が欧州と日本の動物園および水族館に存在しており, 亜種を考慮した繁殖計画を立てる障害となっている. (2) 我が国で絶滅したニホンカワウソはカワウソ亜科内における系統的位置づけが不明である. ニホンカワウソは先行研究により日本固有種 *L. nippon* とされる一方で, 国際自然保護連合 (IUCN) Red List (2015) ではユーラシアカワウソの異名 (シノニム) として扱われ分類は混乱している.

上記問題の解決手段として分子レベルで系統類縁関係を明らかにする方法がある. その解析ツールとしてミトコンドリア DNA (mtDNA) は分子系統学的研究や系統地理学的研究で広く用いられており, それらは保全遺伝学に応用されている. mtDNA は核 DNA (nDNA) と比べると進化速度が早いいため種内変異の検出が可能である. また, 1 細胞中に 1 コピーの nDNA と比べて mtDNA は 1 細胞中に数十から数千のコピーが含まれているため, DNA が断片化し減少している絶滅した動物の博物館標本試料などでも比較的容易に DNA 配列を得ることが可能である. このようにして得られた mtDNA 配列は遺伝的多様性の評価, 系統解析および分岐年代推定が可能であるため上記に示した *Lutra* 属に関する問題の解決に活用できる.

そこで本研究は mtDNA を用いてユーラシアカワウソおよびニホンカワウソを分子レベル

で解析し、上記に示した *Lutra* 属に関する問題の解決を試みた。分子レベルで個体の特徴を調べることにより、日本動物園水族館協会（JAZA）の管理するユーラシアカワウソの遺伝的背景を考慮した繁殖計画の提案と、現生種およびニホンカワウソの系統類縁関係を解明し、地理的な情報を加えることで系統地理学的な新しい洞察を与えることを目標とした。

第2章. 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

欧州と日本の動物園や水族館ではユーラシアカワウソの欧州亜種 *L. l. lutra*, 東南アジア亜種 *L. l. barang*, 中国亜種 *L. l. chinensis* などが飼育されている。欧州動物園水族館協会（EAZA）に所属する園館には 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、JAZA 所属園館にもこの 2 つの line が導入されている。保全遺伝学的観点から繁殖を行う際は地域絶滅が起きている欧州亜種内で繁殖を行うべきであるが日本では本種の個体数が少ないため A-line と B-line を掛け合わせる繁殖がおこなわれている。Iwata et al. (2014) は B-line の遺伝的特徴を評価し、B-line と A-line 間の Cytochrome *b* (*cytb*) 遺伝子部分配列 (307 bp) に違いがあることを示した。しかし Iwata et al. (2014) では解析配列が短く配列情報が少ないこと、比較に用いた配列の亜種を精査していないことが問題として挙げられる。そこで本研究では B-line の由来を明らかにするために A-line, B-line 各 1 個体と中国亜種 2 個体の計 4 個体から mtDNA の *cytb* 全長配列 (1140 bp) を新たに決定し、先行研究で決定された欧州産, 中国産, B-line および韓国産各 1 個体の *cytb* 配列の計 4 配列を加えて亜種を考慮した配列比較と系統解析をおこなった。

A-line および B-line それぞれの特徴的な塩基配列を見出すため上記に示した 8 配列の比較を行った。その結果、A-line および B-line それぞれが特徴的な塩基配列を示したが、中国亜種を A-line および B-line と識別できる特徴的な塩基配列は確認されなかった。

A-line と B-line の系統を明らかにするため最尤法により無根系統樹を構築した。その結果、先行研究と同様に A-line と B-line は異なるクレイドを形成した。B-line は先行研究で決定された中国産および B-line とクレイドを形成し、A-line は欧州産とクレイドを形成し欧州亜種独自のクレイドとして示された。JAZA がまとめたユーラシアカワウソ国内血統登録を精査したところ、本

研究で解析した B-line 個体の繁殖に中国産個体は関わっていないことが確認された。すなわち本研究で解析した B-line の mtDNA は東南アジア亜種に由来する可能性が考えられる。

本研究では先行研究よりも多くの配列情報を得て亜種を考慮した配列比較と系統解析を行い、A-line と B-line の遺伝的差異および B-line における亜種間交雑をさらに強く示唆した。2015 年現在、日本で飼育されている B-line 個体は全て本研究で解析した B-line 個体の子や孫で、中国亜種も A-line と異なるクレイドを形成し遺伝的な分化を示唆した 1 系統が残るのみである。日本の園館では A-line, B-line および中国亜種それぞれを識別し、国内の B-line は本種の繁殖と維持に活用しつつ、A-line および中国亜種の純系統を維持することで域外保全への貢献が期待される。

第3章. 絶滅したニホンカワウソの系統類縁関係の評価

ニホンカワウソは日本の主要 4 島（北海道、本州、四国、九州）に生息していたが 1979 年以降に野生下で目撃されておらず、2012 年に環境省が絶滅を宣言した。形態と分子の形質に基づく系統分類学的研究でニホンカワウソは日本固有種 *L. nippon* とされ、Mammal Species of the World (2005) の中で Wozencraft はこの分類を採用している。一方、IUCN Red List ではニホンカワウソをユーラシアカワウソの異名とし、環境省も日本の Red List (2012) でユーラシアカワウソの亜種 *L. l. nippon* として扱い、本種の分類は現在も論争の最中である。本研究ではニホンカワウソとされる神奈川県産 1 個体 (JO1) および高知県産 1 個体 (JO2) の合計 2 個体を用い、次世代シーケンサー (NGS) により mtDNA ゲノム (mtgenome) 配列 (約 16,400 bp) を決定した。さらに、中国やサハリンに由来するユーラシアカワウソ 5 個体から MPCR 法やロング PCR 法を用いて mtgenome 配列を決定した。そして、本研究で決定した配列と先行研究 (Koepfli and Wayne, 1998; Koepfli et al., 2008) で報告されたカワウソ亜科 mtDNA 配列とともに以下の解析をおこなった: 1) mtDNA 部分配列を用いたカワウソ亜科 11 種との系統解析, 2) mtgenome に基づいたニホンカワウソとユーラシアカワウソの系統解析と分岐年代推定。

ニホンカワウソに近縁な種を明らかにするため、ニホンカワウソとカワウソ亜科 11 種の mtDNA 部分配列に基づき系統解析をおこなった。解析の結果、ニホンカワウソはユーラシアカワウソと単系統群を形成し、ユーラシアカワウソと最も近縁であることが判明した。ニホンカワウ

ソとユーラシアカワウソの近縁性は、先行研究で形態と分子の形質から示唆された結果と一致する。

ニホンカワウソとユーラシアカワウソの詳細な系統関係を推定するため、*mtgenome* に基づき系統解析を行った。解析の結果、神奈川県産の JO1 はユーラシアカワウソの単系統群に内包され、中国産ユーラシアカワウソと単系統となった (100% BP)。このことから JO1 はユーラシアカワウソの一系統と判明した。その一方で、高知県産の JO2 は JO1 を含むユーラシアカワウソ単系統群と姉妹群関係となり、日本独自の系統であると示された。この結果は愛媛県産ニホンカワウソの *cytb* 遺伝子部分配列 224 bp に基づきニホンカワウソが独立した系統とする Suzuki et al. (1996) で示唆された結果と一致する。以上のことから JO2 は日本固有種もしくは日本固有亜種として扱うことが妥当と思われる。

JO1 および JO2 それぞれの系統における進化の時間的尺度を推測するため、分岐年代を推定した。推定の結果、JO2 の祖先は前期更新世にあたる約 127 万年前、JO1 の祖先は後期更新世にあたる約 10 万年前に分岐したと推定された。JO2 系統に似た分岐年代を示す動物では、*mtgenome* 配列に基づく解析でツキノワグマが約 146 万年前 (Wu et al., 2015) に日本へ移住したと推定されている。地質学の研究から、前期更新世 (170–80 万年前) の氷期に陸橋で大陸と日本列島が接続していたと示唆されている (北村・木元, 2004)。このことから JO2 系統は前期更新世に陸橋を渡って日本列島に移住したと考えられる。JO1 系統が分岐した年代は JO2 系統が示した分岐時期と比べ比較的最近の出来事であると分かった。JO1 系統と似た分岐年代を示す動物はイノシシがおり、14–25 万年前に陸橋を渡って移住してきたと示唆され (Watanobe et al. 2003)、JO1 系統も同じように移住してきたとも考えられる。しかしながら地質学的に後期更新世に大陸と日本列島が接続していた証拠はない。JO1 が採取された神奈川県城ヶ島は明治時代から遠泳漁業の基地で、漁師により国外 (ユーラシア大陸) から持ち込まれた個体である可能性もある。

本研究により、日本産のカワウソ標本 2 個体は *Lutra* 属であると再確認された。しかし、同じ日本産の JO1 と JO2 でもそれぞれ異なる進化史を示した。高知県産 JO2 はユーラシアカワウソとは遺伝的に異なる日本独自の系統で日本固有種 *L. nippon* もしくは日本固有亜種 *L. l. nippon* とし

て扱うことが妥当であった。それに対し、神奈川県産 JO1 はユーラシアカワウソと同種レベルの系統類縁関係を示した。

第4章. 総論

本研究は mtDNA に基づいて *Lutra* 属における問題を解決し保全遺伝学へ応用することを目的とした。欧州と日本の動物園および水族館で飼育されているユーラシアカワウソの A-line (欧州亜種), B-line (欧州亜種と東南アジア亜種の亜種間交雑が疑われる系統) および中国亜種の *cytb* 遺伝子全長配列に基づき亜種を考慮した配列比較と系統解析を行った。解析の結果、これまで示されなかった B-line の遺伝的特徴と欧州亜種 (A-line) との系統の違いが示され、B-line の mtDNA は東南アジア亜種に由来することが示唆された。保全遺伝学では mtDNA が集団間ではっきりとした分化を示し、集団がそれぞれ単系統で、また nDNA の遺伝子座でもアレル頻度に明確な分化を示す場合、それらの集団を進化的に重要な単位 (ESU) として扱う (Moritz, 1995)。それら ESU は種内の管理単位として別々に管理されるべきとされる。本研究では mtDNA により A-line と B-line および A-line と中国亜種は別系統で遺伝的に分化することが示唆された。今後 nDNA の遺伝子座を調べる必要はあるが、A-line, B-line および中国亜種をそれぞれ別の管理単位とすることが保全上好ましいと考えられた。また、ニホンカワウソの系統類縁関係の評価では mtgenome 配列に基づき系統解析と分岐年代推定を行った。解析した JO1 (神奈川県産) と JO2 (高知県産) のニホンカワウソはそれぞれ異なる進化史を示した。JO1 系統はユーラシアカワウソが形成する単系統群に内包され、分岐年代も約 10 万年前と非常に若いことが判明した。その一方で、JO2 系統はユーラシアカワウソがアジアと欧州に広がった時期よりも早い約 127 万年前に日本へ移住した日本固有の系統であることが判明した。JO2 が示した分岐年代は他の陸生動物で推定された分岐年代や日本列島への移住時期に一致するとともに、地質学的な証拠とも矛盾しない結果であった。以上の結果から、JO2 系統は日本固有種もしくは日本固有亜種として扱ることが妥当であろう。保全遺伝学的観点から、大陸に JO2 系統と同じ系統の集団が現存していれば重要な保全対象となりうるが、本研究ではその存在は示されなかった。本研究は本州と四国のニホンカワウソ各 1 個体を解析したものであり、ニホンカワウソ集団の遺伝的多様性を網羅しておらず今後は北海道、

本州，四国および九州それぞれの集団から複数個体を解析することにより，ニホンカワウソ集団の持つ遺伝的多様性をある程度網羅した系統学的位置づけが解明されるだろう．

Summary

Conservation Genetics of the Eurasian Otter and the Japanese Otter on the Basis of Mitochondrial DNA

Analysis

Daisuke Waku

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

Tokyo University of Agriculture

1. Introduction

Species of Lutrinae (Mammalia, Carnivora) are known as otters, which are mid-sized and semi-aquatic animals. There are seven genera and 13 species of Lutrinae, and they are distributed on four continents (Eurasia, Africa, North America, and South America). One of the genera, *Lutra* is composed of two species, namely, the Eurasian otter (*Lutra lutra*) and hairy-nosed otter (*Lutra sumatrana*). However, up to the 20th century, it was thought that *Lutra* included three species, when the Japanese otter (*Lutra nippon*) became extinct. Today, the two extant species of *Lutra* are threatened in more than one country and region. Therefore, a conservation plan for *Lutra* should be made quickly. However, phylogenetic relationships at the population and species levels in *Lutra* remain unresolved and are vital for determining conservation priorities.

Two problems to be solved for *Lutra* are as follows: (1) zoos and aquariums implement a plan of ex-situ conservation for the Eurasian otter because this species has become extinct in many regions (Conroy and Chanin, 2000). However, there is suspected hybridization between the European subspecies *L. lutra lutra* and Southeast Asian subspecies *L. lutra barang* in Japanese zoos and aquariums. That is a matter of concern because it may fail to conserve either subspecies as they exist in nature. (2) The taxonomic status of the extinct *L. nippon* remains controversial. *L. nippon* was considered a distinct species on the previous

morphological and molecular studies. However, the IUCN Red List (2015) treated this species as synonym of *L. lutra*.

Molecular phylogenetics and phylogeography provide the solution for these problems. Mitochondrial DNA (mtDNA) is an effective tool for molecular phylogenetics and phylogeography for these taxa, and these data were applied to conservation genetics. It is possible to infer intraspecific patterns from mtDNA, because the evolutionary rate of mtDNA is faster than that of nuclear DNA (nDNA) in Mammalia. Moreover, mtDNA is present in tens to thousands of copies in one cell, but there is only one copy of nDNA. Therefore, it is relatively easy to determine mtDNA sequence from museum specimens, despite deterioration of DNA due to age and chemical treatments. Therefore, mtDNA sequences can be used to estimate phylogenetic relationships, and divergence time. Hence, mtDNA sequences can help to solve the problems of *Lutra* described above.

In this study, we determined mtDNA sequences from the Eurasian otter and the Japanese otter. Based on the molecular analyses, we propose a breeding plan for Eurasian otter, which are reared in Japanese zoos and aquariums, and provide insights about the phylogenetic relationships and phylogeography of the Japanese otter.

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

European and Japanese zoos and aquariums rear the Eurasian otter, which include a European subspecies (*L. l. lutra*), a Southeast Asian subspecies (*L. l. barang*), and a Chinese subspecies (*L. lutra chinensis*). The European facilities rear two lines of this species, which were named A-line (*L. l. lutra*) and B-line (based on the information from European zoo, this is likely a crossbreed of *L. l. lutra* and *L. l. barang*). The Japanese facilities introduced these lines. From a viewpoint of conservation genetics, the breeding program should give high priority to the European subspecies, because this subspecies is highly threatened. However, Japanese facilities crossbred the A- and B-lines, likely because only small numbers of *L. lutra* were reared in Japanese facilities, thereby making cross-breeding imperative to its conservation in this country. The mtDNA partial cytochrome *b* (*cytb*) gene sequence (307 bp) of the A- and B-lines previously showed

slight but characteristic differences between the two lines (Iwata et al., 2014). However, the previous study had limitations, as only one sample of the B-line was considered, the sequence was found to be short, and they did not make consideration for subspecies of sequences deposited in GenBank. To determine the ancestry of mtDNA in the B-line, we sequenced the complete *cytb* gene (1,140 bp) from one individual each of the A- and B-lines and two individuals of *L. l. chinensis*. We added four other *cytb* gene sequence of Eurasian otter (including an additional B-line individual) and compared these sequences to identify diagnostic nucleotide characters and reconstructed a phylogenetic tree.

We compared the sequences noted above and collected the mutation site. The B-line individual showed diagnostic nucleotides at two positions, whereas the A-line individual showed diagnostic nucleotides at four positions. However, we could not find the diagnostic nucleotide of *L. l. chinensis*, which identifies with the A- and B-lines.

We reconstructed a phylogenetic tree using complete *cytb* gene sequences. The two individuals of B-line formed a monophyletic group with the two individuals of *L. l. chinensis*, and an A-line individual formed a monophyletic group with the other European individual. We searched the pedigree registry of Eurasian otters of the Japanese Association of Zoos and Aquariums (JAZA), and the B-line had not been bred with the Chinese subspecies. Hence, these results suggest that mtDNA origin of B-line was from *L. l. barang* and that it differed from the A-line sequence (*L. l. lutra*).

These results suggest that hybridization between the European subspecies and Southeast Asian subspecies occurred in the B-line. Today, each of the mother line of B-line and *L. l. chinensis* are reared only one in Japanese facilities. The breeding program involving B-line individuals is very important in Japanese facilities, because only few Eurasian otters (only 22 individuals) are maintained at zoos or aquariums in Japan. However, the breeding program is not appropriate for the conservation of subspecies-specific strains. Hence, JAZA should identify individuals as A-line, B-line, or *L. l. chinensis*, and structure the breeding program so that crosses within *L. l. lutra* (A-line) and within *L. l. chinensis* have priority rather than those that would hybridize the subspecies.

3. Evaluating the Phylogenetic Status of the Extinct Japanese Otter on the Basis of Mitochondrial Genome Analysis

The Japanese otter inhabited the four main Japanese islands (Hokkaido, Honshu, Shikoku, and Kyushu), but it has not been observed in the wild since 1979 and was declared extinct in 2012. Recent taxonomic (Imaizumi and Yoshiyuki, 1989; Endo et al., 2000) and molecular phylogenetic (Suzuki et al., 1996) studies suggest that it should be treated as an independent species, *L. nippon*. In Mammal Species of the World, Wozencraft (2005) introduced this classification. However, the IUCN Red List considers it a synonym of *L. lutra*, and the Ministry of the Environment of Japan (2012) treated it as subspecies, namely *L. l. nippon*, on the Red List of Japan. Therefore, the taxonomic status of this species needs to be resolved. In this study, we sequenced the entire mtDNA genome (mtgenome) of two Japanese otters (which were caught in Kanagawa and Kochi Prefectures) by using next generation sequencing (NGS) technology, and five Eurasian otters (which came from China, Sakhalin, and an unknown locality) by Sanger sequencing. We download the partial *ND5* and complete *cytb* gene sequences of the other 11 species of Lutrinae and entire mtgenome sequence of the Sea otter (*Enhydra lutris*) and *L. lutra* from NCBI. We inferred molecular phylogenetic trees inferred from each dataset (*ND5+cytb* or mtgenome), clarifying the placement of the Japanese otter in Lutrinae, resolving detailed phylogenetic relationships between the Japanese otter and the Eurasian otter, and estimating the divergence time of the Japanese otter lineage.

The partial mtDNA dataset (1,826 bp) of Lutrinae resolved the two Japanese otters and Eurasian otters as monophyletic (100% bootstrap probability, BP). This relationship is consistent with a previous study (Imaizumi and Yoshiyuki, 1989; Suzuki et al., 1996; Endo et al., 2000) that was based on morphological or partial mtDNA (224 bp) characters.

To elucidate detailed phylogenetic relationships among the Japanese and Eurasian otters, we reconstructed a phylogenetic tree with a mtgenome dataset (14,740 bp). This analysis deeply nested the Japanese otter 1 (JO1) from Kanagawa in the Eurasian otter clade (100% BP), specifically placing JO1 in a monophyletic group with three individuals of Chinese Eurasian otter. Hence, we conclude JO1 is *L. lutra*.

The Japanese otter 2 (JO2) collected in Kochi formed an independent lineage in the *Lutra* clade, sister to a monophyletic group that comprised the Eurasian otters. This result was consistent with the result of a prior molecular phylogenetic analysis (Suzuki et al., 1996) that was based on the partial *cytb* gene sequences (224 bp) of one individual of the Japanese otter (collected in Ehime Prefecture, which is adjacent to the Kochi Prefecture).

To estimate the evolutionary time scale of the two lineages of Japanese otters (JO1 and JO2), we estimated the divergence times among the Japanese otters and the Eurasian otters. The estimated molecular divergence time for the ancestral lineages of the Japanese otters was 0.10 Ma (95% confidence interval: 0.06–0.16 Ma) and 1.27 Ma (95%: 0.98–1.59 Ma) for the JO1 and JO2 lineages, respectively. The divergence time of JO2 is similar to the divergence time of the Japanese black bear *Ursus thibetanus japonicus* (1.46 Ma), which was based on mtgenome analysis (Wu et al., 2015). Furthermore, geological research suggest a land bridge formed between the Eurasian continent and the Japanese archipelago in the Calabrian age (1.80–0.78 Ma) (Kitamura and Kimoto, 2004). This result suggests that the ancestor of JO2 migrated to the Japanese islands via the land bridge during this period. The divergence time of JO1 is similar to the divergence time of Japanese wild boar *Sus scrofa leucomystax* (0.14–0.25 Ma), based on partial mtDNA sequences of control region (Watanobe et al., 2003). Therefore, it would appear that the ancestor of JO1 migrated to Japan in the Tarantian age (0.126–0.0117 Ma). However, there is no geological evidence that a land bridge was present between Japan and the continent during Tarantian age. JO1 was caught in Jogashima, which was a flourishing base for deep sea fishing for a long time. Therefore, it is possible that the JO1 individual was imported from the Asian continent in modern times.

In the present study, two otters from Japan were verified as belonging to the genus *Lutra*. However, JO1 and JO2 showed different evolutionary histories. JO2, collected in Kochi, formed a distinct lineage in *Lutra* clade, and it should be treated as a distinct species *L. nippon* or subspecies *L. l. nippon*. On the other hand, our analysis characterized JO1, collected in Kanagawa, as a member of *L. lutra*.

4. Conclusion

This study aimed to solve two problems for *Lutra*, and the results were applied to conservation genetics. We analyzed the complete *cytb* gene sequence of the Eurasian otter of A-line (*L. l. lutra*), B-line (likely a crossbreed of *L. l. lutra* and *L. l. barang*), and *L. l. chinensis*. Unrooted phylogenetic trees group B-line individuals with the Chinese subspecies rather than with an individual from the A-line. Those results suggest the possibility of mtDNA of B-line being derived from *L.l. barang*. In conservation genetics, arguments have been made that if two populations show genetic divergence in mtDNA and nDNA, they should be treated as evolutionarily significant units (ESUs; Moritz, 1995). An ESU is treated as a managerial unit for conservation. Here, our result suggests mtDNA divergence between A- and B-lines, and between A-line and Chinese subspecies. Although divergence of nDNA has not yet been shown, we propose that the A-line, B-line, and *L. l. chinensis* be treated as separate managerial units pending further evidence.

To evaluate the phylogenetic status of the Japanese otter, we used partial and entire mtDNA sequences, with focus on two Japanese otter individuals. We used these data to infer a phylogenetic tree and estimate divergence time. JO1 collected in Kanagawa and JO2 collected in Kochi showed different evolutionary histories. JO1 was nested within a Eurasian otter clade, and the divergence time of JO1 is 0.10 Ma. On the other hand, JO2 was sister to the Eurasian otter clade, and the divergence time of JO2 is 1.27 Ma, which is earlier than the confused stage of Eurasian otter population around the Eurasian continent. The divergence time of JO2 coincided with a proposed land bridge linking Eurasia and Japan. From these results, the JO2 lineage can be treated as a distinct species or subspecies. From the viewpoint of conservation genetics, if any extant individuals from the JO2 lineage are rediscovered, they would be treated as important for conservation. However, we know of no evidence that they remain in the wild. This study analyzed only two individual of the Japanese otter. Therefore, the broader genetic diversity of the Japanese otter populations was not covered in this study. Future sampling of more than one specimen of the Japanese otter from each region (Hokkaido, Honshu, Shikoku, and Kyushu) would further fully resolve the phylogenetic relationships and genetic diversity of Japanese otter.