

遺伝的・形態的分析から推定された ニホンイシガメとクサガメの頻度依存的一方向性交雑

松田悠之介

305-0047 茨城県つくば市

Density-dependent unidirectional hybridization between the Japanese pond turtle, *Mauremys japonica*, and the exotic Reeves' pond turtle, *Mauremys reevesii*, in Japan, inferred from molecular and morphological analyses.

By Yunosuke MATSUDA

Tsukuba, Ibaraki, 305-0047, JAPAN

本稿は、著者らが発表したニホンイシガメ (*Mauremys japonica*)とクサガメ(*M. reevesii*)の交雑に関する論文(Matsuda et al., 2024)を紹介するものである。この論文では、ニホンイシガメとクサガメの交雑状況を明らかにすることを目的とし、さらに形態的特徴を用いて交雑個体の識別を試みた。

はじめに

種間交雑は進化に多様な影響を与える現象として知られている(Barton, 2001)。これは集団の拡大(Johnson et al., 2015)や人為的な生息地の改変(Kimura and Munehara, 2010)、外来種の導入(Rhymer and Simberloff, 1996; Walters et al., 2008; Okamoto et al., 2024)など多様な要因によって引き起こされる。このような交雑は種の遺伝的多様性や遺伝子の組み換えを促進する(Dowling and Secor, 1997)一方で、交雑個体が優占する雑種群(hybrid swarm)の形成リスクを高め、最終的に在来種の絶滅を引き起こす可能性がある(Rhymer and Simberloff, 1996)。さらに、交雑を引き起こす要因となる繁殖干渉は、2種の頻度によって非線形的に強化されることが知られている(Kuno, 1992; Yoshimura and Clark, 1994)。Wirtz(1999)は、この非線形性が非優占種メスにおける配偶者選択の縮小によるものであると主張している。この現象は、捕食や餌資源をめぐる種間競争よりも集団の絶滅を生じやすいと考えられている(Westman et al., 2002; Dame and Petren,

2006)。したがって、絶滅の危機に瀕している在来種を保護するためには、特に外来種が近縁な場合、その生態学および遺伝学的関係を解明することが重要である(Kawamura et al., 2001)。

日本固有種であるニホンイシガメは近年、アカミガメ(*Trachemys scripta elegans*)との競合やアライグマ(*Procyon lotor*)による捕食、生息環境の悪化によって個体数が減少している。また、近縁種であるクサガメとの競合や交雑もニホンイシガメの保全において深刻な問題となっている。文献調査によると、これまで在来種とされてきたクサガメ日本集団は、大陸から移入された可能性が指摘されている(疋田・鈴木, 2010)。Suzuki et al.(2011)は、日本のクサガメには、日本全域に分布する韓国系統(Clade A)と、九州と本州東部の一部に分布する中国系統(Clade B, Clade C)が存在することを報告している。また、韓国系統は18世紀末頃に(疋田・鈴木, 2010)、中国系統は1970年代(青木, 2014)に導入されたと推測されている。ニホンイシガメとクサガメは、野生下での交雑個体が確認され、さらに交雑個体に妊性があることから(Suzuki et al., 2014)、クサガメによるニホンイシガメへの遺伝子浸透が懸念されている。

これまで形態的特徴に基づいて交雑個体の識別が行われてきた(Haramura et al., 2008; Suzuki et al., 2014)。しかし、使用されている形態形質の数が限定的であり、客観的な評価が難しいため、正確な同定は困難であった。この問題を解決する

ために、遺伝情報に基づく客観的な形態的判別手法が必要である。カメ類の甲羅はその縫合部がランドマークとして客観的に定義でき、いくつかの先行研究において多変量解析に用いられている(例えば, Valenzuela et al., 2004; Rivera and Claude, 2008)。しかし甲羅の座標情報を用いた交雑個体の検出はまだ試みられていない。以上のことを踏まえ本研究では、まずミトコンドリアDNA(mtDNA)とマイクロサテライト(MS)マーカーを用いて、ニホンイシガメとクサガメの交雑状況を明らかにすることを目的とした。さらに形態的特徴から交雑個体を識別するためにmorphological hybrid index(MHI)とrelative warp analysis(RWA)を用いた多変量解析を行った。遺伝情報はニホンイシガメの保全戦略を立案するうえで重要な貢献を果たすことが期待でき、形態情報は交雑個体の検出に重要な知見を提供することが期待される。

材料および分析法の概要

本研究では、2018年から2021年にかけて、千葉、伊勢湾周辺域(伊勢)、瀬戸内海島嶼域(瀬戸内)の21地点で採集した計409個体を分析に用いた(図1)。

母系遺伝であるmtDNAのCytb領域を対象としたallele-specific PCR(AS-PCR)により、採集個体の親種(母系)を推定した。本手法では、特定の遺伝子の特異的に増幅するプライマーを用いて、ニホンイシガメとクサガメを識別した。クサガメはさらに、韓国系統(Clade A)と中国系統(Clade B, Clade C)を識別した。

11遺伝子座のMSマーカーを用いて、遺伝的集団構造解析および、交雑個体の検出と分類を行った。遺伝的集団構造解析にはSTRUCTURE解析を実施した。STRUCTURE解析では、集団の数(k)が1から10の間に存在

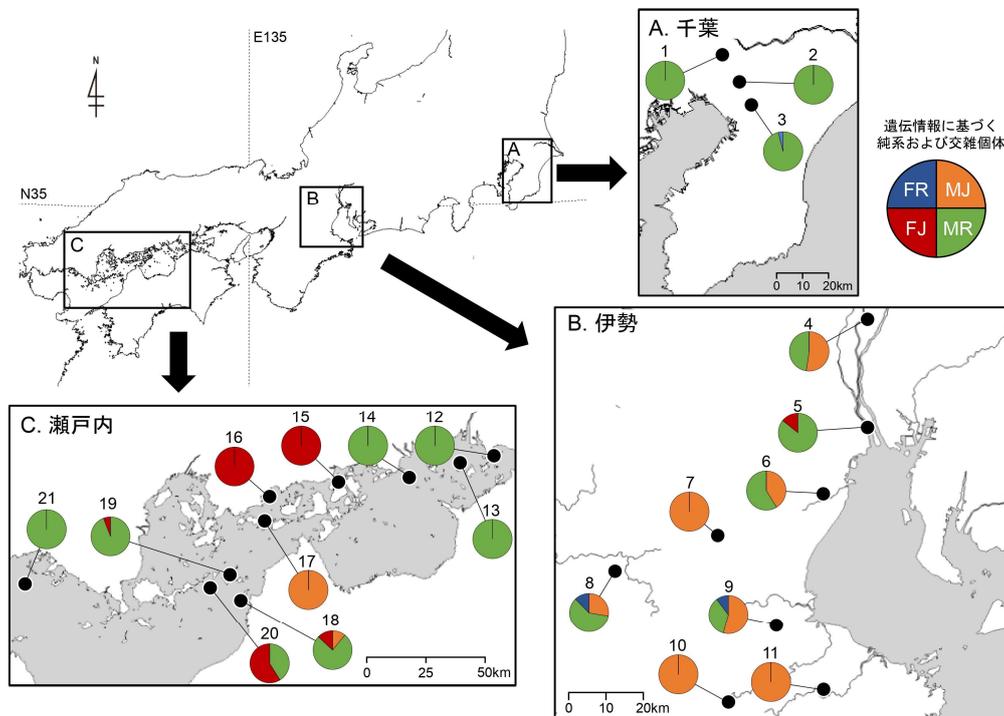


図1. 本研究における採集地点。円グラフはmtDNAおよびMS情報に基づき、純系(ニホンイシガメ, クサガメ)および交雑個体(mtDNAとnDNAの不一致個体も含む)の割合を示す。交雑個体はさらに、mtDNAの種に基づいて2つに分類した。それぞれのラベルは、ニホンイシガメ(MJ), クサガメ(MR), ニホンイシガメのmtDNAを有する交雑個体(FJ), クサガメのmtDNAを有する交雑個体(FR)を表す。Matsuda et al. 2024を一部改変。

すると仮定し、各個体がどの集団にどれくらいの確率で所属するか(所属確率)を算出した。最適な集団の数(k)は、Evanno et al.(2005)の方法により推定した。交雑個体の検出と分類にはNewHybridsを用い、各個体を純系(ニホンイシガメ、クサガメ)、F1雑種、F2雑種、ニホンイシガメとの戻し交雑個体、クサガメとの戻し交雑個体の6クラスに判別した。STRUCTUREおよびNewHybridsにおける交雑個体の検出ならびに判別にはシミュレーション解析により最適化した閾値を用いた。なお、いずれのクラスにも割り当てられないが、全交雑個体クラスの合計事後確率が0.5を超える個体は「その他の雑種」として分類した。

形態的特徴を用いた交雑個体の識別のため、外部形態の数値化と腹甲形状解析を行った。外部形態の数値化では、虹彩の模様(PI)、頭部側面の模様(PH)、側頭部の鱗の状態(SCT)、四肢の模様(PLB)、肋甲板の隆起の有無(KCS)、および腹甲の模様(PP)の6つの形態形質を評価した。これらの形態形質について、ニホンイシガメ、クサガメ、または中間形質のいずれかに分類し、それぞれの形質数を順に j_i , r_i , h_i として集計した。これらの集計値を用い、次の式によりMHIを算出した。 $MHI = (j_i \times 0 + r_i \times 2 + h_i \times 1) / (j_i + r_i + h_i)$ なお、MHIは形態的にニホンイシガメの純系を0、クサガメの純系を2として算出される。

腹甲形状解析では、モルフオメトリーによる幾何学解析であるRWAを用いた。この手法では、基準形状をもとに形状の歪みを表すスコア(部分歪みスコア)を算出する。その後、主成分分析を適用し、個体間の形態差が最も大きくなる方向に沿って合成変数(主成分軸)を算出する。この解析により、集団内の表現型のばらつきの程度を明らかにするとともに、各軸が示す形状変化を視覚化できる。

さらに交雑個体については、腹甲形状と交雑の進行度との関係を見るため、横軸にRWAの第1主成分、縦軸にSTRUCTUREにより推定された各個体のクサガメへの所属確率(クサガメのゲノム割合)をとり、相関の有無を確認した。

結果

mtDNAおよびマイクロサテライトの遺伝的構造

AS-PCR(母系の親種推定)の結果、409個体のうち、138個体がニホンイシガメ、271個体がクサガメのmtDNAを有していた。クサガメのmtDNAを有する271個体において、194個体が韓国系統(Clade A)、77個体が中国系統(Clade B)であった。Clade Aは伊勢で67%、瀬戸内で97%を占めたのに対し、Clade Bは千葉で94%を占めた。Clade Cはいずれの地域においてもみられなかった。

MSマーカーを用いた遺伝的集団構造解析では、STRUCTURE解析において、最適な集団の数は $k=2$ 、次いで $k=3$ であった。 $k=2$ では、2つの集団はmtDNAのニホンイシガメとクサガメにほぼ対応していた(図2)。 $k=3$ では、クサガメがさらに2つの集団に分かれた。薄緑で示した集団は主に千葉の個体から構成され、濃緑で示した集団は瀬戸と伊勢で多くみられたが、多くの個体で2つの集団が混ざりあってみられた。

純系と交雑個体の判別

NewHybrids(MSマーカーによる交雑の検出と判別)により409個体のうち、114個体がニホンイシガメの純系、264個体がクサガメの純系として判別され、これはSTRUCTUREの結果とも一致した(図2)。残りの31個体は交雑個体と判別され、その内訳はF1雑種が4個体、F2雑種が20個体、ニホンイシガメとの戻し交雑個体が3個体、クサガメとの戻し交雑個体が2個体、「その他の雑種」が2個体であった。交雑個体と判別された31個体のうち、16個体がニホンイシガメのmtDNAを、15個体

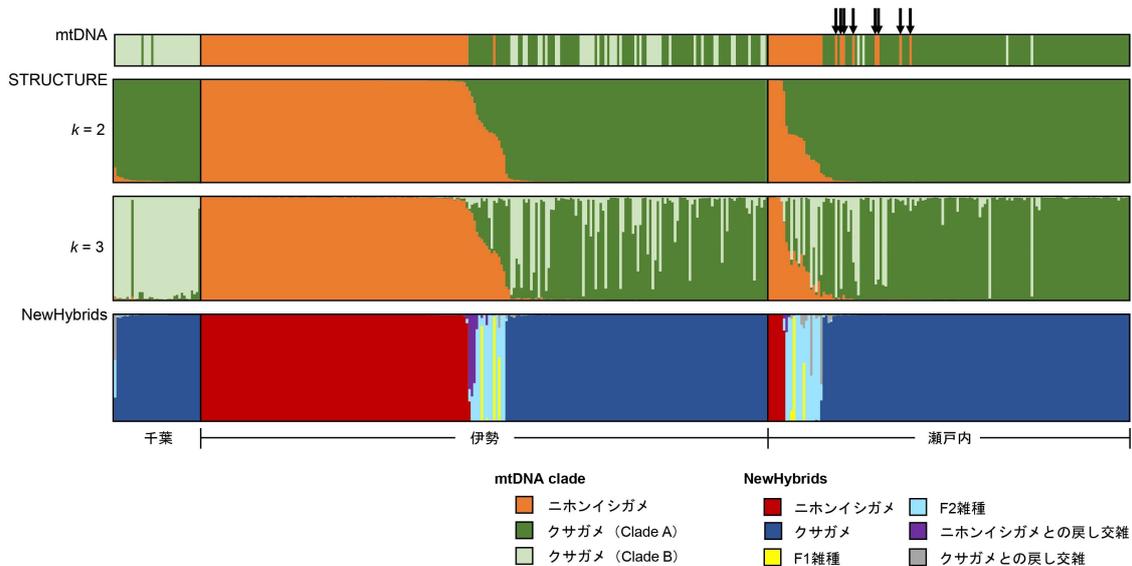


図2. STRUCTURE解析($k = 2$, $k = 3$)とNewHybridsによる交雑個体の検出. 上からmtDNAの種および系統, STRUCTURE解析の $k = 2$, $k = 3$ およびNewHybridsの結果を示す. なお, STRUCTURE解析の色分けはmtDNAの種および系統とは独立して割り当てられており, 必ずしも対応関係を示すものではない. 黒の矢印はmtDNAとnDNAの不一致個体を示している. Matsuda et al. 2024を一部改変.

がクサガメのmtDNAを有していた. NewHybridsによりクサガメと判別された8個体はニホンイシガメのmtDNAを有し, mtDNAとnDNAが不一致であった.

形態的特徴と遺伝的特徴の関係

409個体について算出したMHI (外部形態の数値化による判別) により, 114個体がニホンイシガメ, 278個体がクサガメ, 17個体が交雑個体であると判定された. 遺伝子分析で純系と判定された個体のうち, 99.7%がMHIと一致した. 一方で15個体の交雑個体と, mtDNAとnDNAが不一致の8個体は, MHIにおいてクサガメと判定された.

腹甲が観察可能であった404個体において, RWA (腹甲形状解析) の結果, 第1主成分が全変異の54.81%, 第2主成分が11.15%を説明した (図3). ニホンイシガメとクサガメは第1主成分でほぼ分離し, 交雑個体はその中間に位置した. 第1主成分の得点が小さい個

体は, 喉甲板長が短く, 胸甲板が腹甲縦方向に対して垂直に近づき, 腹甲板が長くなる傾向がみられた. 第2主成分の得点が小さい個体は胸部が短い個体であった. また交雑個体において, RWAの第1主成分とSTRUCTUREにより推定されたクサガメへの所属確率(クサガメのゲノム割合)に有意な相関がみられた($r = 0.61$, $P < .001$).

考察

日本におけるクサガメ移入の実態

Suzuki et al.(2011)は本州東部(千葉を含む)および九州中部からクサガメ中国系統(Clade B)の存在を報告している. 本研究では, 伊勢と瀬戸内の多くの地点でクサガメClade BのmtDNAが確認され(図2), 中国からクサガメが繰り返し移入されたことが示唆された. さらに富田・富田(2004)において, クサガメの密度がニホンイシガメよりも低いと報告されていた伊勢の1地点(St.8)で, クサガメ韓国系統(Clade A)のmtDNAが高頻度でみられた(Matsuda et al., 2024のFigure S3を参照). 以

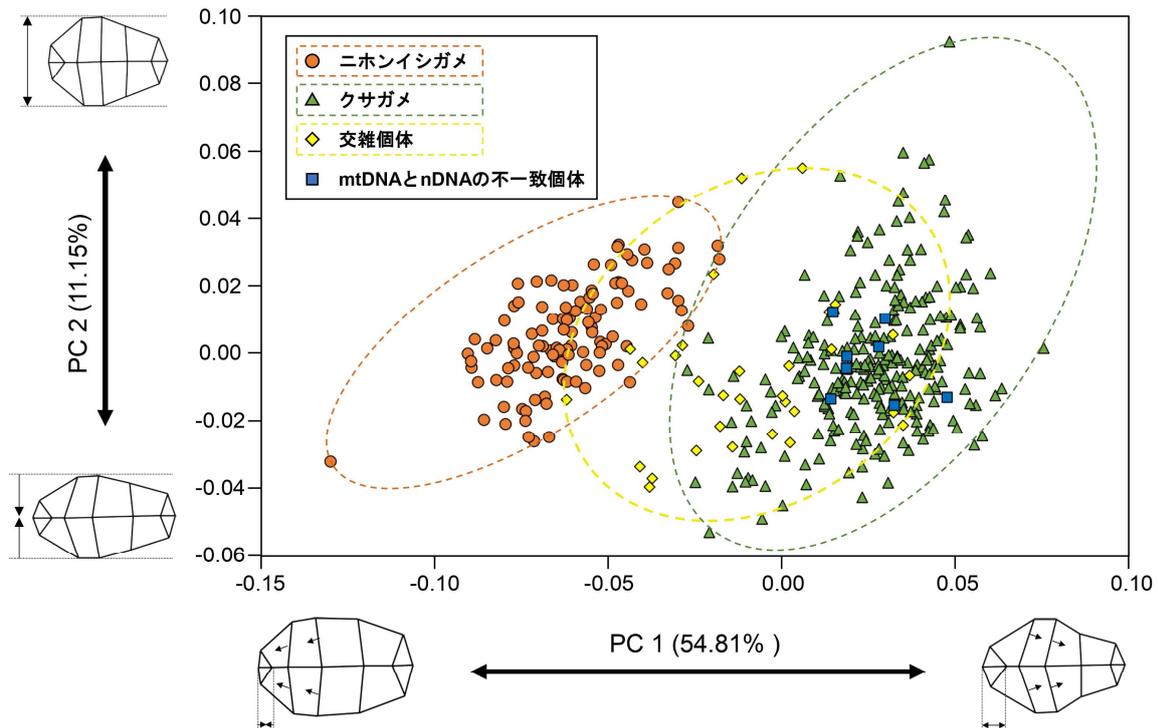


図3. ニホンイシガメとクサガメおよび交雑個体におけるRWAに基づく腹甲形状の違い。各色は遺伝情報に基づき推定された種(ニホンイシガメ, クサガメ), 交雑個体および, mtDNAとnDNAの不一致個体を示す。散布図は, 形態変異の第1および第2主成分に沿った変動を示しており(括弧内は全変動に占める割合), 各軸の終端には腹甲形状の潜在的な変化を示している。Matsuda et al. 2024を一部改変。

上の点を考慮すると, クサガメClade AおよびClade Bの両系統は, 近年, 人間活動によって個体数が拡大した可能性が高いと推測される。

k=2でのSTRUCTURE解析では, 2つのクラスターがニホンイシガメとクサガメのmtDNAとほぼ一致した(図2)。k=3の場合, クサガメはさらに2つのクラスターに分かれた。これらの2つのクラスターはmtDNAに基づくClade AおよびClade Bと一致しなかった(図2)。この不一致は2つの系統間での交雑に起因すると考えられる。

ニホンイシガメとクサガメの交雑メカニズム

本研究で検出された交雑個体はmtDNAから見て正逆共にいずれの配偶パターンも見られたことから, 両種の間で非方向性の交雑が示唆された。しかし, 地域レベルでは, 交雑個

体は特定の種のmtDNAのみを持っていた(図1)。この結果は, 両種間の交雑が生息地レベルでは方向性を持つことを示している。このような地域特異的な方向性交雑は, 他の脊椎動物でも報告されている(例えば, Dowling et al., 1989)。

Wirtz(1999)は, 方向性交雑のメカニズムとして, (1) 相互交配後の種特異的mtDNAの消失と(2) 非相互交配の2つの可能性を示している。前者は, 特定のmtDNAを持つ交雑個体が致死となることを意味する。本研究で両種のmtDNAを持つ交雑個体が確認されたことから, 前者の可能性は低いと考えられる。後者の非相互交配は多くの分類群において報告されており, 非優占種のメスが優占種のオスと交雑する傾向がみられるWirtz(1999)。この現象の原因として, 非優占種におけるア

リ一効果の低下と優占種による繁殖干渉が挙げられる(Kyogoku and Nishida, 2012). 本研究で確認された方向性交雑も、優占種による非優占種への繁殖干渉が生息密度の偏りによって生じ、これにより両種間の交配前隔離が消失し、結果として非相互交配が引き起こされたと考えられる。このメカニズムは、各地域で交雑個体が非優占種のmtDNAを有する傾向を十分に説明できる(図1)。

Suzuki et al.(2014)は、ニホンイシガメとクサガメのF1雑種の適応度が親種よりも低い可能性があることを示唆している。一方、本研究ではF2以降の交雑個体(純系個体との戻し交雑を含む)およびmtDNAとnDNAの不一致個体の数が、F1雑種の数を上回った。Arnold(2006)は、F1雑種の適応度が低い場合でも、親種との遺伝的交流によりF2以降に適応度が回復する可能性を指摘している。このことから、本研究でF2以降の交雑個体が多数確認されたのは、交雑が継続および拡大していることを示唆している。特にmtDNAとnDNAの不一致個体の存在は、交雑個体の適応度が回復していることを示している(Wilson and Bernatchez, 1998)。

交雑個体における形態的及び遺伝的特徴からの示唆

交雑個体において、RWAの第1主成分とSTRUCTURE解析によるクサガメへの所属確率(クサガメのゲノム割合)との間に相関関係($P < .001$)が見られたことから、腹甲形状は交雑の進行度を反映していることが示された。この結果は、腹甲形状がニホンイシガメとクサガメの交雑個体を検出するうえで有用であることを示している。

本研究では、ニホンイシガメとは対照的に、MHIにおいてクサガメと交雑個体の判別が困難であった。同様の特徴は腹甲形状解析において

もみられた。これはクサガメとの戻し交雑が原因であると考えられ、mtDNAとnDNAの不一致個体の存在はこの可能性を支持する。

最後に

本研究では、先行研究(Suzuki et al., 2011; Suzuki et al., 2014)とは異なり、クサガメ中国系統の全国的な分布拡大と、F1雑種を上回る数のF2以降の交雑個体が確認された。これらの結果は、クサガメ中国系統が急速に分布拡大し、それに伴いニホンイシガメとの交雑が進行していることを示唆している。加えて、中国系統は従来から全国的に分布していた韓国系統と比べて遺伝的(Suzuki et al., 2011; Oh et al., 2017)および形態的な特徴(矢部, 2002)だけでなく、交雑個体の適応度や侵略性といった生態学的特徴でも相違があることが示唆される。このような中国系統の特徴は、ニホンイシガメの保全において深刻な脅威となることが懸念される。さらに、本研究で示唆された繁殖干渉は、その頻度依存的な性質から、クサガメの個体数増加に伴って非線形的に強化されるリスクがある。その結果、アカミミガメとの競合やアライグマによる捕食よりも、ニホンイシガメの絶滅を生じやすい可能性が高い。

また、本研究では腹甲形状が交雑の進行度を推定する上で有効な指標となる可能性も示された。今後は腹甲形状を用いた形態分析の精度向上と遺伝子分析の統合的活用を進めることで、ニホンイシガメとクサガメの交雑状況をより広範に把握し、早急に保全策を講じる必要があると考えられる。特にクサガメ中国系統は、その侵略性や交雑によるリスクの高さを踏まえ、ニホンイシガメの保全において、より一層の注意が必要であると思われる。

謝辞

本稿作成にあたりご指導いただいた三重大学生物資源学部 河村功一教授に御礼申し上げます。また、本稿の元となるMatsuda et al(2024)の共著者の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- 青木良輔. 2014. クサガメ流通管見. 亀楽 8:4-7.
- Arnold, M.L. 2006. Evolution Through Genetic Exchange. Oxford University Press, NY. 272p.
- Barton, N. H. 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* 10:551-568.
- Dame, E. A. and K. Petren. 2006. Behavioural mechanisms of invasion and displacement in Pacific island geckos (*Hemidactylus*). *Animal Behaviour* 71:1165-1173.
- Dowling, T. E. and C. L. Secor. 1997. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28:593-619.
- Dowling, T. E., G. R. Smith, and W. M. Brown. 1989. Reproductive isolation and introgression between *Notropis cornutus* and *Notropis chrysocephalus* (family Cyprinidae): comparison of morphology, allozymes, and mitochondrial DNA. *Evolution* 43:620-634.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.
- Haramura, T., M. Yamane, and A. Mori. 2008. Preliminary survey on the turtle community in a lotic environment of the Kizu River. *Current Herpetology* 27:101-108.
- 足田努・鈴木大. 2010. 江戸本草書から推定される日本産クサガメの移入. 爬虫両棲類学会報2010(1):41-46.
- Johnson, B. B., T. A. White, C. A. Phillips, and K. R. Zamudio. 2015. Asymmetric introgression in a spotted salamander hybrid zone. *The Journal of Heredity* 106:608-617.
- Kawamura, K., T. Ueda, R. Arai, Y. Nagata, K. Saitoh, H. Ohtaka, and Y. Kanoh. 2001. Genetic introgression by the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*, into the Japanese rose bitterling, *R. o. kurumeus* (Teleostei: Cyprinidae). *Zoological Science* 18:1027-1039.
- Kimura, M. R. and H. Munehara. 2010. The disruption of habitat isolation among three *Hexagrammos* species by artificial habitat alterations that create mosaic-habitat. *Ecological Research* 25:41-50.
- Kuno, E. 1992. Competitive exclusion through reproductive interference. *Population Ecology* 34:275-284.
- Kyogoku, D. and T. Nishida. 2012. The presence of heterospecific males causes an Allee effect. *Population Ecology* 54:391-395.
- Matsuda, Y., S. Kaburagi, N. Kamezaki, H. Ohta, H. Takahashi, T. Imazu, S. Kagayama, and K. Kawamura. 2024. Density-dependent unidirectional hybridization between the Japanese pond turtle, *Mauremys japonica*, and the exotic Reeves' pond turtle, *Mauremys reevesii*, in Japan, inferred from molecular and morphological analyses. *Zoological Journal of the Linnean Society* zlae070.
- Oh, H-S., S-M. Park, and S-H. Han. 2017. Mitochondrial haplotype distribution and phylogenetic relationship of an endangered species Reeve's turtle (*Mauremys reevesii*) in East Asia. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity* 10:27-31.

- Okamoto, K., A. Tominaga, and M. Toda. 2024. Demographic imbalance in the hybrid zone led to asymmetric gene flow between two closely related geckos, *Gekko hokouensis* and *Gekko yakuensis* (Squamata: Gekkonidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 141:118-132.
- Rhymer, J.M. and D. Simberloff. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27:83-109.
- Rivera, G. and J. Claude. 2008. Environmental media and shape asymmetry: a case study on turtle shells. *Biological Journal of the Linnean Society* 94:483-499.
- Suzuki, D., H. Ota, H-S. Oh, and T. Hikida. 2011. Origin of Japanese populations of Reeves' pond turtle, *Mauremys reevesii* (Reptilia: Geoemydidae), as inferred by a molecular approach. *Chelonian Conservation and Biology* 10:237-249.
- Suzuki, D., T. Yabe, and T. Hikida. 2014. Hybridization between *Mauremys japonica* and *Mauremys reevesii* inferred by nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Journal of Herpetology* 48:445-454.
- 富田靖男・富田傑. 2004. 爬虫類相. p.554-576. 上野市(編)上野市史 自然編. 上野市, 上野.
- Valenzuela, N, D. C. Adams, R. M. Bowden, and A. C. Gauger. 2004. Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: a powerful alternative for detecting subtle sexual shape dimorphism. *Copeia* 2004:735-742.
- Walters, D.M., M. J. Blum, B. Rashleigh, B. J. Freeman, B. A. Porter, and N. M. Burkhead. 2008. Red shiner invasion and hybridization with blacktail shiner in the upper Coosa River, USA. *Biological Invasions* 10:1229-1242.
- Westman, K., R. Savolainen, and M. Julkunen. 2002. Replacement of the native crayfish *Astacus astacus* by the introduced species *Pacifastacus leniusculus* in a small, enclosed Finnish lake: a 30-year study. *Ecography* 25:53-73.
- Wilson, C.C. and L. Bernatchez. 1998. The ghost of hybrids past: fixation of arctic charr (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial DNA in an introgressed population of lake trout (*S. namaycush*). *Molecular Ecology* 7:127-132.
- Wirtz, P. 1999. Mother species–father species: unidirectional hybridization in animals with female choice. *Animal Behaviour* 58:1-12.
- 矢部隆. 2002. 爬虫綱 Reptilia・カメ目 Testudines. p.723-727. 千葉県史料財団(編)自然史 本編6 千葉県の動物1 陸と淡水の動物. 千葉県, 千葉.
- Yoshimura, J. and C.W. Clark. 1994. Population dynamics of sexual and resource competition. *Theoretical Population Biology* 45:121-131.