

様式 8

河川基金助成事業

「新規開発したカワネズミ糞を用いた非侵襲的
DNA解析手法を駆使した保全遺伝学的研究」

助成番号：2021-5211-035

信州大学大学術研究院理学系
教授 東城 幸治

2021年度

1. はじめに

本研究で対象とするカワネズミ *Chimarrogale platycephala* (トガリネズミ目 *Soricomorpha* のトガリネズミ科 *Soricidae*) は、和名に「ネズミ」とはつくものの、系統的にはネズミ類(齧歯目)よりもモグラ類(トガリネズミ目のモグラ科 *Talpidae*)に近縁な哺乳類である(図1)。日本固有種で本州と九州に生息している(四国では絶滅したと考えられている)。

カワネズミが記録されている41府県のうちの37府県では、レッドリストのいずれかのカテゴリーに登載されている(阿部, 2003)。山地溪流が主なハビタット(棲み場)であり、溪流岸や巨岩の隙間などに営巣し、溪流に(水中に)生息する魚類や両生類、底生動物(水生昆虫類やサワガニなどの甲殻類など)を餌とし



図1 水中を遊泳するカワネズミ。

て捕食する肉食性種である(Ichikawa et al., 2005; 阿部, 2011)。カワネズミの眼は退化的であることから、目視することで獲物を捕獲するのではなく、嗅覚と髭による触覚に頼る「狩り」を行っている。

本邦の河川においては、カワウソが既に絶滅したとされることから、カワネズミが溪流生態系におけるピラミットの最上位に位置づけられている。しかしながら、その希少さや情報の少なさ故に生態学的研究などは遅滞している状況にある。近年、溪流生態系は、砂防ダムの建設や営林業、逆に林業の衰退に伴う森林環境の荒廃などといった人為的な環境改変の影響を強く受けており、採餌を完全に溪流に依存しているカワネズミにとって、それらの影響は大きいと考えられる(阿部, 2003)。

また、カワネズミは捕獲ストレス等に極めて脆弱であり、一般的な生け捕り用の籠罠トラップで捕獲すると、ストレス死を招いたり、大きな損傷を与えてしまう。カワネズミは水中の餌を捕食することから、少なくとも誘引する餌が水中に浸かるような形で溪流の水際に捕獲トラップを設置する必要がある、濡れた状態で捕獲することはカワネズミの体温低下などの大きなストレスを付与することとなる。このようなことから、カワネズミの生け捕りには、通常の籠罠トラップではなく、籠罠に工作を加え、籠罠の外へと繋がるような移動経路を設けた上で、もう一つの容器を陸上に設置するなどの工夫が必要である(図2)。しかしながら、このような改良を加えたトラップを用いたとしても、1-2時間おきにこまめに見回りことが不可欠である(藤本ほか, 2011)。近年、小型哺乳類の行動・生態調査においても、小型・軽量のGPSセンサーの装着が盛んに試みられてはいるものの、カワネズミは水中生活を基本とすることや夜行性であることから太陽光発電による小型バッテリーの恩恵を受けることが困難である。このようなことから、カワネズミの行動・生態や集団遺伝学的研究が遅滞してきた。

このような背景下、我々はカワネズミの糞便試料に着目した。糞内に含まれる微量DNA

を解析することで、カワネズミの系統進化のプロセスや現状における集団遺伝構造を把握するとともに、マイクロサテライト（SSR）マーカーのような鋭敏な分子マーカーの開発により、カワネズミの行動や生態にも資するデータ取得を目指すものである。既に、カワネズミの糞便試料からのゲノム DNA 抽出については、我々の先行研究において確立し（Sekiya et al., 2017）、その後、2018 年（平成 30 年）度の河川基金の助成を受け、さ



図2 カワネズミ生捕り用の籠罠（トラップ）。カワネズミの進入口を溪流の水中に開け、パイプで陸上ケースと接続させてある。

らに手法を改善を進めてきた。加えて 2018 年（平成 30 年）度からは、より鋭敏な SSR マーカーの開発に着手し、21 座位のマーカーを設計した（Yamazaki et al., 2020）。本研究では、配列断片長が 150bp 程度とさらに短い 12 座位のマーカーを新規設計し、計 33 の SSR マーカーを設計した。これらの SSR マーカーのうち、（どのような組み合わせであっても）少なくとも 13 座位を解析することで、個体識別が可能となることを飼育個体を用いた実証実験で明らかにした（Yamazaki et al., 2020）。最少では 7 座位の解析でも個体識別が可能であり、ゲノム DNA が断片化しやすい糞便試料や、溪流内の水の飛沫がかかりやすく DNA の加水分解が危惧されるような山地溪流からの糞便試料を対象とした研究における有効性も示唆してきた（Yamazaki et al., 2020）。

カワネズミのような絶滅危惧種における保全策の検討においては、集団構造の把握や集団ごとの遺伝構造の理解といった基本的な知識の蓄積はとても重要な課題である。しかし、カワネズミに関する遺伝子解析を伴う系統地理学的な研究は依然として少なく（Iwasa and Abe, 2006）、集団遺伝学的な知見は依然として不十分なレベルにある。将来的には、生態学や集団遺伝学的研究への挑戦や知見の蓄積が望まれている（横畑ほか, 2008）。

2. 研究材料と方法

2.1. カワネズミ糞便試料のサンプリング・糞便試料からのゲノム DNA 抽出

カワネズミを直接観察すること自体は困難であるものの、糞の観察は比較的容易である。東城（2019）の報告書にも記したように、溪流内にはやや勾配があり小滝が形成されるような「ステップ」部分と、その丈夫には平面的な流れとなる「プール」が形成され、これらの「ステッププール」が連続するように配置されることが多い。これらのうち、カワネズミの糞は、このプール尻（ステップの上部）の岩や巨礫（直径 >256 mm）の上で見つかることが多い（図 3）。とくに、岸際ではなく、両側に流れがあるような流心部の岩や巨礫上で多く観察される。また岸際においては、岩と岩の間隙部分などで比較的良好に観察さ

れる（図4）。糞が多く溜められた状態、いわゆる「ため糞」状態で観察されることも多い（図3-4）。小型哺乳類での「ため糞」行動は報告がなく、極めて珍しい現象であるのかも知れないが、カワネズミにおいて、この「ため糞」にはどのような意味があるものなのか？ 依然としてよく解かっていないのが現状である。本研究の後半で述べるが、SSR マーカーを用いたカワネズミ糞の個体識別解析において、一つのため糞場を複数個体で利用している事例が、本州と九州の合計4箇所の地域集団において明らかとなったことから、特異な事例ではなく、カワネズミにとってはごく一般的な特徴であると考えられる（詳しくは後述する）。

また、水生生物を捕食するカワネズミの糞には独特の臭気があることから、臭いを探る



図3 カワネズミのため糞。カワネズミの典型的なため糞サイト。



図4 カワネズミ糞便試料のサンプリング。溪流の岸側の巨礫間隙のため糞サイト。独特の臭気を頼りに、塩化ビニル製パイプで臭いを嗅ぎながらカワネズミ糞を探索する。

ような探索法も効果的である。本調査研究においては、約 1.2 m の塩化ビニル製パイプを用い、臭いを嗅ぎながらの糞探索を実施した。とくに、岩の隙間などにパイプを挿入して臭い嗅ぐ行為は、かなり効果的であった（図 4）。カワネズミが生息する溪流には、時折、岩や巨礫上に鳥類（カワガラスやセキレイ類）の糞もよく観察され、時には同じ岩や巨礫上にカワネズミ糞と混在していることもある。ただし、鳥類の糞には尿酸が混じるために白色部分が目立つことから、比較的容易に目視識別が可能である。

このようにして探索したカワネズミ糞を遺伝子解析の試料として保管するにあたり、糞をプラスチック製容器に採取し、そのまま冷凍保存する方法や、100%エタノールに浸漬保存する方法なども試行してみたが、遺伝子解析を実施する上では、Lysis Buffer あるいは QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) に含まれる InhibitEX Buffer に糞を浸漬させ、糞の表層の物質からバッファーに溶出した懸濁物も含めたバッファー自体をテンプレートとして全ゲノム DNA 解析に用いた (Sekiya et al., 2017; Yamazaki et al., 2020)。Lysis Buffer あるいは InhibitEX Buffer のいずれにおいても、Buffer 2.5 ml に対し、糞を 1 つ浸漬させる程度の保存がよく、これらのバッファー保存は室温条件下で問題ないことも先の研究において確認済みである (東城, 2019)。

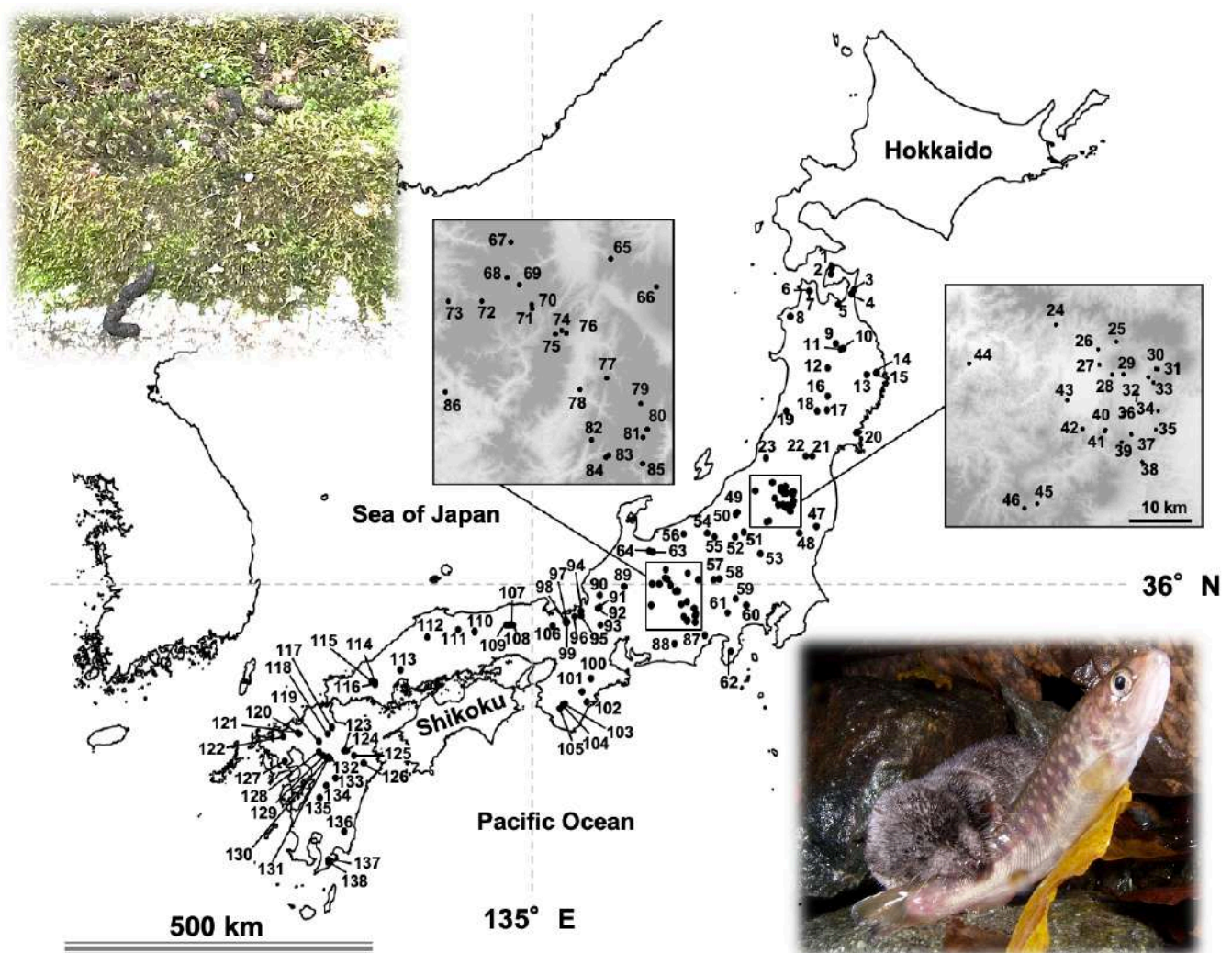


図5 カワネズミ糞のサンプリング地点.

続いて、これらのバッファー懸濁液を遠心分離して不純物を除去した。その後、プロテインエースK（分解タンパク質酵素処理液）を調製して添加し、カワネズミのゲノム DNA を含有する溶液中の DNA を洗浄するためにエタノールを添加し、次いでその溶液を QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit のフィルターを通過させることにより、ゲノム DNA をフィルター上に蓄積させた。さらに、洗浄剤を添加することによって、遠心分離プロセス中に不純物を除去した。最後に、エタノールを含まない TE バッファー液を用いてフィルター上の DNA を溶出させ、精製された全ゲノム DNA を得た。

このようにして抽出・精製した全ゲノム DNA を冷蔵保存しているが、その保存の前には、全ゲノム DNA 濃度を分光光度計により計測し、以降の PCR などにおける適度な濃度となるよう、濃度調製を行った上で保管した。糞便の保存に、Lysis Buffer や InhibitEX Buffer ではなくエタノールに保存した場合には、全ゲノム DNA の収量（濃度）が低くなることが多く、フィルター上に蓄積された DNA を TE バッファーにて溶出する行程での TE バッファー量を推奨される半分量で行うことで、抽出・精製後の DNA 濃度を高く保つことが効果的であった（エタノール保存糞便サンプル中に含まれる、より低い推定濃度の DNA を補償するため）（Sekiya et al., 2017; Yamazaki et al., 2020）。

2.2. 組織試料からのゲノム DNA 抽出

本研究では、希少種保全の観点から、主としてカワネズミ糞便試料からの遺伝子解析を実施したが、一部の試料として標本保存されている組織サンプルを用いた遺伝子解析についても補足的に実施した。対象としたのは、静岡県立ふじのくに地球環境史ミュージアム・NPO 静岡県自然史博物館ネットワークから提供頂いた静岡県内で捕獲されたカワネズミの冷凍標本や、アクアマリンいなわしろカワセミ水族館に保管されている福島県内のカワネズミの冷凍標本である。

組織からの DNA 抽出には DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN）を使用した。カワネズミの組織（尻尾）5.0mg を使用し、基本的には製品メーカーが推奨するプロトコルに従って抽出・精製した。proteinase K 20 μ l（QIAGEN）、ATL Buffer 180 μ l（QIAGEN）を混合し、55°Cでの温度条件下に約 1 日置くことで細胞を分解し、DNA を含むライセート（lysate）を得た。この液に AL buffer 100 μ l（QIAGEN）、100%エタノール 200 μ l を添加し、専用のフィルターを通すことで DNA のみをフィルターに吸着させた。さらに、AW1（洗浄液）500 μ l（QIAGEN）を加えて遠心、つぎに AW2（洗浄液）500 μ l（QIAGEN）を加えて遠心し、不純物を除去した。最後に AE buffer 200 μ l（QIAGEN）でフィルターから DNA を溶出することで全ゲノム DNA 溶液を得た。

全ゲノム DNA の濃度を分光光度計 Nano Vue Plus（GE Healthcare, Buckinghamshire）を用いて計測し、濃度が 20ng/ μ l 程度の濃度となるように溶出液を用いて調製した後に、4 °C で保存した。

2.3. PCR による mtDNA Cyt b 領域の DNA 断片増幅、および PCR 産物の精製

カワネズミ糞便試料から抽出・精製した全ゲノム DNA を用いて、ミトコンドリア DNA シトクロム b（Cyt b）領域の DNA 断片の PCR 法を用いた増幅を試みた。mtDNA Cyt b 領域の増幅プライマーセットとしては、L14734 / H15985（Ohdachi et al., 2001）および wcytb-f

/ wcytb-r (Yuan et al., 2013) を用いた。

PCR における DNA ポリメラーゼには Takara Ex Taq (Takara, 滋賀) を使用し、その製品プロトコルに従い PCR 反応液の調製をした。糞サンプルから抽出・精製したゲノム DNA には PCR 反応を阻害する物質が含まれているため、PCR における反応液には PCR 安定剤であるウシ血清アルブミン (BSA) を最終濃度が 90 μ g/ml となるよう添加した。PCR 条件は、プレヒーティングを 98 $^{\circ}$ C で 2 分実施した後、「変性を 98 $^{\circ}$ C で 10 秒、アニーリングを 60 $^{\circ}$ C で 30 秒、伸長を 72 $^{\circ}$ C で 1 分」を 1 サイクルとして 35-40 サイクルの反応を行なった後、72 $^{\circ}$ C で 7 分のファイナルエクステンションを行った。PCR には Program Temp Control System PC350 サーマルサイクラー (Astec, 福岡) を用いた。

2.4. 電気泳動による DNA 増幅の確認

PCR により増幅した DNA 断片のコピー (PCR 産物) をテンプレートとした電気泳動を行い、解析目的とする DNA 断片コピーの増幅の有無を確認した。電気泳動には 1.5% 中電気浸透アガロースゲル (ナカライテスク, 京都) を用い、PCR 産物 2.0 μ l と 5 $\times$ loading dye 2.0 μ l を混合したサンプルに、分子量マーカーとして 100bp Ladder One (ナカライテスク, 京都) を同一ゲル上で電気泳動した。電気泳動後、ゲルを臭化エチジウムで染色し、UV (320 nm) 照射により、解析目的とする DNA 断片のコピー増幅の有無を確認した。

2.5. PCR 産物の精製

PCR 産物の電気泳動により、DNA 断片のコピー増幅が確認されたサンプルについては、illustra ExoProStar (GE Healthcare, Buckinghamshire) を用いた酵素反応により精製をした。この反応には Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, California) を用いた。

2.6. DNA シーケンシング

Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, California) により蛍光ラベリングを伴うシーケンス反応を行った。この反応には Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, California) を用いた。反応条件はプレヒーティングを 96 $^{\circ}$ C で 30 秒実施した後、「変性を 96 $^{\circ}$ C で 10 秒、アニーリングを 50 $^{\circ}$ C で 5 秒、伸長を 60 $^{\circ}$ C で 4 分」を 1 サイクルとして 25 サイクル行なった。シーケンス反応後、エタノール沈殿により DNA 濃度を高め、Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, California) を添加し、ヒートショック (94 $^{\circ}$ C, 2 分) および急冷 (氷上, 2 分) を行うことで DNA を 1 本鎖に分離し、オートシーケンサー 3130xl Genetic Analyzers (Applied Biosystems, 東京) によって塩基配列を解析した。

この方法で 5' 側と 3' 側の両方から分析したヌクレオチド配列に基づいて、ソフトウェア CLC DNA Workbench (Filgen) を使用してコンセンサス配列を決定した。

2.7. コンセンサスシーケンスおよび生物の特定

このようにして解析された塩基配列データを基に、ソフトウェア CLC DNA Workbench (Filgen, 名古屋) を用いてコンセンサスシーケンスを作成した。その配列を GenBank の

BLAST 検索を行うことで既に登録されているカワネズミの塩基配列と比較し、本研究で解析された塩基配列がカワネズミの DNA であるかどうかを検証した。

2.8. 系統樹作成と分岐年代推定

遺伝子解析を実施した後、mtDNA Cyt b 領域 1,106bp の配列が得られたサンプルを用いて系統樹を作成した。また、解析には GenBank から取得した配列データも加えた。系統解析の外群として、GenBank に登録されているカワネズミと同属の近縁種 *Chimarrogale himalayica* の配列を使用した (Yuan et al., 2013)。解析の精度をより高めるため、同一ハプロタイプをもつ配列データが複数あった場合には、1 サンプル分のデータのみを解析に用いた。

MEGA6 (Tamura et al., 2013) を用いて、Clustal W (Thompson et al., 1994) によってアライメントを行った後、最尤法 (Maximum likelihood [ML] 法; Felsenstein, 1981) で系統樹を作成した。MEGA6 で解析を行う際の塩基置換モデルの選択では、HKY+G (Hasegawa-Kishino-Yano plus Gamma) モデルが最適と評価され、これを採用した。それぞれの系統群が単系統群である信頼性を評価するため、1,000 回反復のブートストラップ解析を実施した。

また、同じ配列データを用いて Bayes 樹の作成と分岐年代推定を行なった。Kakusan4 (Tanabe, 2011) を使用し、系統樹作成に最適なモデルの検索を行なった。Gammma+HKY モデルが最適との結果が得られたため、これを用いて Beauti (Drummond and Rambaut, 2007; Bouckaert et al., 2019) を使用し、パラメータ作成を行なった。分岐年代推定の較正のため、カワネズミの最古の化石記録 (中期更新世の後期, Kawamura et al., 1989; Yuan et al., 2013) と、近縁属の突然変異率 (100 万年当たり 5.5% の突然変異率, Hope et al., 2010) を使用した。Beast v2.5.0 (Drummond and Rambaut, 2007; Bouckaert et al., 2019) を使用し、50,000,000 世代反復の MCMC (マルコフ連鎖モンテカルロ法) を行い、1,000 世代に 1 回データをサンプリングした。その後、Tracer v1.6 (Rambaut et al., 2014) を用いて MCMC が収束していることを確認し、Tree annotator (Drummond and Rambaut, 2007; Bouckaert et al., 2019) を用いて、10% の Burn in を設定し tree ファイルを出力した。最後に Fig Tree v1.4.3 (Rambaut, 2007) を使用して樹形を確認した。

2.9. 祖先集団の推定

系統解析により得られた Bayes 樹を用いて、カワネズミの祖先集団の推定を行なった。解析には Rasp 3.2 (Yu et al., 2015) を使用し、各解析サンプルの位置情報を、①東北地方～関東地方、②中部地方～紀伊半島、③中国地方、④九州地方、そして⑤大陸 (外群) の 5 つに分類した後、デフォルト設定で Bayesian binary MCMC (BBM) analysis を実行した。

2.10. 生態ニッチモデル解析

カワネズミの現在の生息地における GPS 情報と気候変動データを用いた生態ニッチモデリングにより、現在と LGM (最終氷期最寒冷期) におけるカワネズミの潜在的な生息可能地域を推定した。生息地情報としては、本研究によりカワネズミの生息が確認された地点、および先行研究から生息が明らかとなっている地点の GPS 情報を csv ファイルとして

作成した。この際、在データのみを使用する解析では、生息地点の地理的な偏りが結果により強く影響してしまうため (Phillips et al., 2009)、QGIS 2.18 を用いて地図に地点情報を投影し、目視で生息地点の偏りを解消するよう生息地点情報を適宜補正した。その後、Maxent 3.4.1 (Phillips et al., 2017) を用いて解析を行なった。解析に用いた現在および過去の気候データについては、World Clim Version2 (Fick and Hijmans, 2017) および ENVIREM (Title and Bemmels, 2018) から取得した。全ての気候データを考慮して現在の潜在的な分布域を推定した後、とくに生息可能性に影響するとされた 5 つの気候データ (BIO14, embergerQ, minTempWarmest, PETColdestQuarter, BIO3) を用いて現在と LGM の潜在的な生息可能域を推定した。また、LGM における分布域推定には MIROC と CCSM4 の 2 つのモデルを使用した。

2.11. 集団サイズの変化

過去の有効集団サイズの変化を推定するベジアンスカイラインプロット (BSP) 解析を実施した。解析には Beast v2.5.0 (Drummond and Rambaut, 2007; Bouckaert et al., 2019) を使用し、分岐年代推定と同様のパラメータを用いて、計算を行なった。その後、Tracer v1.6 を用いて収束を確認し、デフォルト設定にて BSP 解析を行なった。

系統解析によって区分された各系統群を対象に、DnaSP 5.10 (Librado and Rozas, 2009) を用いて遺伝的多様度の指標である塩基多様度 (Nei and Li, 1979)、ハプロタイプ多様度 (Nei and Tajima, 1981)、ペアワイズ (系統群ペアの総当たり) F_{st} (Hudson et al., 1992) の値を算出した。さらに、Dnasp により arp ファイルを出力した後、Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) を用いて中立テストを行ない、Tajima's D (Tajima, 1989) および Fu's F_s (Fu, 1997) の値を算出した。

2.12. マイクロサテライト (SSR) 解析

2.12.1. PCR 反応による DNA 断片の増幅

我々の研究室で開発したマイクロサテライト (SSR) 解析用プライマーを用いて実際に PCR 反応を行い、PCR 産物を電気泳動することで DNA が増幅されたか確認した。PCR のテンプレート DNA にはカワネズミの組織サンプルから抽出・精製した全ゲノム DNA を使用した。組織サンプルの PCR には DNA ポリメラーゼとして KOD FX neo (TOYOBO) を使用した。この時、マイクロサテライト配列を検出するための蛍光を添加した。使用した蛍光はカスタム蛍光プライマー FAM、PET、NED、HEX (ABI) の 4 色である。PCR には Program Temp Control System PC350 サーマルサイクラー (Astec) を用いた。

PCR 条件は、プレーヒーティングを 94°C で 2 分間した後、変性を 98°C で 10 秒、アニーリングを 60°C で 30 秒、伸長を 68°C で 30 秒を 1 サイクルとして 28 サイクル、ファイナルエクステンションを 68°C で 5 分行った。

この PCR 産物をテンプレートとする電気泳動には 1.5% 中電気浸透アガロースゲル (ナカライテスク) を用い、PCR 産物 2.0 μ l と 5 $\times$ loading dye 2.0 μ l を混合したものと分子量マーカーとして 100bp Ladder One (ナカライテスク) を同時に電気泳動した。泳動後、臭化エチジウムでゲルを染色し、UV 照射により、解析目的とする DNA 断片のコピー増幅の有無を確認した。

2.12.2. シーケンシング

電気泳動によって DNA の増幅が確認されたプライマーセットを使用し、実際に塩基配列のシーケンスを行なった。PCR 産物に Hi-Di Formamide (ABI)、500bp size standard (ABI) を添加し、ABI 3130/3130xl Genetic Analyzers を用いてシーケンスを行なった。ソフトウェア Genemapper ver. 4.1 (ABI) を用いて、DNA 配列長のサイズ確認、アレル決定、ジェノタイピングを行なった。

2.12.3. カワネズミの広域集団を対象とした SSR 解析

野外から採取したカワネズミ糞を用いて SSR 解析を行なった。我々の先行研究 (Yamazaki et al. 2020) において開発した SSR マーカー 21 セットに加え、本研究にて追加作成した SSR マーカー 12 セットの計 33 セットを用いて解析を行なった。Vernesi et al. (2016) の研究を参考に、結果の再現性を確認するために全サンプルについて最低 2 回の解析を行なった。複数回の解析で異なるアリルが検出されてしまった場合には追加の解析を行い、多く検出されたアリルを採用した。4 回以上の解析をしても不安定な結果となった場合、以降の解析からそのサンプルを除外した。解析困難なサンプルが多かった場合には、以降の解析から当該座位を除外した。

シーケンスにて SSR の配列長を検出した後、Gene Mapper ver. 4.1 (Applied Biosystems) を用いて、配列長の確認・補正を行なった。うまく増幅できていないにも関わらず、アリルとして検出されてしまう場合や、正しい位置から 1 塩基ずれてしまう場合などを精査し補正・除外した。糞サンプルの状態や SSR 座位によっては解析できない場合があったため、以降の系統解析には、複数座位の解析が可能であった 49 サンプル、変異が多く確認された 12 座位を用いた。

また、集団遺伝構造解析を行なうために、解析するサンプルを地域ごとに区分した。まず、カワネズミの生息地である本州から九州までを、緯度帯ごとに 4 等分した。このうち、本州の関東～中国地方の同緯度帯に含まれるサンプルサイズが他地域区分と比較して著しく大きくなったため、この緯度帯については、サンプルサイズが均等となるよう、さらに 3 つの経度帯に機械的に区分した。これにより、計 6 地域 (①東北・北部、②東北・南部、③本州・中東部、④本州・中部西～紀伊半島、⑤中国地方、⑥九州) に区分し、それぞれにおいて解析・比較を行なった (cf. 図 13)。

2.12.4. SSR 領域におけるカワネズミの遺伝的多様性の算出

SSR 解析結果に基づき GenAlEx 6.5.03 (Peakall and Smouse, 2006) を用いて、機械的に区分した地域ごとの遺伝的多様性を評価した。地域ごとにペアワイズ (地域ペアの総当たり) D_a 値 (Nei の遺伝距離) およびペアワイズ F_{st} 値 (遺伝的分化係数: Wright, 1951) を算出した。また、地域ごとのヘテロ接合度期待値 H_e と F_{IS} (近交係数: Wright, 1951) を算出した。個体ごとにプライベートアリル数を算出し、それをもとに地域集団ごとの平均プライベートアリル数を計算した。Fstat v2.9.4 を用いて集団ごとのアレリックリッチネス A_r を算出した。また、Structure の解析結果から、 $K=6$ の場合の系統群ごとのヘテロ接合度期待値を算出した。

2.12.5. SSR 領域解析結果から推定される系統樹の作成

Poptree2 (Takezaki et al., 2009) を用いて、6 区分地域のペアワイズ遺伝距離 (D_a ; Nei, 1987)、および地域間のサンプルサイズを補正したペアワイズ F_{st} に基づきそれぞれ NJ 樹 (neighbor-joining 法: Saitou and Nei, 1987) を作成した。系統関係の信頼性を評価するために、1,000 回反復の Bootstrap 検定を計算した。

2.12.6. 近似ベイズ計算 (Approximate Bayesian Computation, ABC) 解析

diyabc 2.1.0 (Cornuet et al., 2008, 2014) を用いて、コアレセントシミュレーション (合祖理論) に基づき過去の集団動態を推定するため、ABC (Approximate Bayesian Computation) 解析を行なった。ABC 解析は、与えたシナリオからシミュレーションデータセットの構築を行い、シミュレーションデータセットと観察されたデータセット間で要約統計量の比較をして、観察データセットと近いシミュレーションデータセットのパラメータを事後分布として求める解析法であり、複数のシナリオについてこの解析を行うことで、直接尤度を求めることなく集団動態の最適なシナリオを推定することが可能となる解析手法である。

2.12.7. SSR 解析 6 地域区分を対象とした ABC 解析

機械的に区分した 6 地域を対象とした ABC 解析では、地域ごとのカワネズミ個体の分岐シナリオを 23 パターン作成した。これらのシナリオは以下の基準から作成された。

(1) SSR 解析結果を用いて算出された地域間の遺伝的多様性から推定された遺伝構造

SSR 解析結果から、カワネズミ集団を機械的に 6 地域区分に分けた場合、地域①の遺伝的多様性 (ヘテロ接合度期待値 H_e 、アレリックリッチネス A_r) が高かった。そこで、「地域 1 が祖先的である」シナリオを、細かい分岐を変えて 3 パターン作成した。また、Structure 解析結果 ($K=6$) から算出されたクラスターごとの H_e を参考に、「遺伝的多様性が高いクラスターの個体が含まれる地域⑤が祖先的である」シナリオを 1 パターン、「様々なクラスターに属する個体が含まれる地域④が祖先的である」シナリオを 1 パターン作成した。

(2) Structure 解析結果 ($K=6$) から推定された遺伝構造

Structure 解析結果 ($K=6$) から、6 地域区分における地域①・⑤・⑥の遺伝構造が類似し、地域②・③・④の遺伝構造が類似していたことを参考に、「九州集団 (6 地域区分における地域⑥) と本州が分岐した後、中国地方 (6 地域区分における地域⑤) からそれ以外が分岐し、最後に地域②-④間の分岐が起こった」シナリオを、細かい分岐を変えて 10 パターン作成した。

(3) カワネズミのミトコンドリア DNA Cyt b 領域から推定された遺伝構造

カワネズミのミトコンドリア DNA Cyt b 領域解析結果から推定された遺伝構造を参考に、「九州集団 (6 地域区分における地域⑥) が祖先的であり、本州に渡り中国地方～東北地方へと北上した後、氷期で生息地が分断され、氷期後に中部地方 (6 地域区分における地域③・④) への集団の分布拡大が生じた。また、ミトコンドリア DNA Cyt b 領域における

異なる系統群 I と II 間での交雑が存在すると仮定する」シナリオを、細かい分岐を変えて 6 パターン作成した。

(4) 複数の日本固有哺乳類の分子系統地理学的特徴から考えられる分散様式 (増田, 2017) から推定される遺伝構造

複数の日本固有哺乳類に共通してみられる最終氷期以降の分散様式を参考に、カワネズミ集団が「九州地方から本州へ渡り、中国地方～東北地方へと北上する」シナリオを、細かい分岐を変えて 2 パターン作成した。

以上の 4 つの基準からシナリオを 23 パターン作成した。ランダムに 4 シナリオを 1 組として解析を行い、最も可能性が高いと考えられるシナリオを次の組に含め、これらの解析を繰り返すことで、全シナリオの中で最も可能性が高いシナリオを選抜・推定した。

計算には哺乳類において一般的に用いられるマイクロサテライト突然変異率 ($10^{-3} \sim 10^{-5}$ / 1 世代: e.g., Ellegren, 2000) を使用し、それ以外のパラメータについてはデフォルト設定で行なった。各シナリオにつき 1,000,000 回反復シミュレーションを行なった。主成分分析 (PCA) を最初の 10,000 個のシミュレートされたデータセットで実行し、一連のシナリオとそのシミュレーションデータセットのパラメータに基づく事前分布の PCA から観察データセットの逸脱がみられるかを確認した。各シミュレーションデータセットと観察データセットから計算された要約統計量 (遺伝的多様性の指標) の比較により事後分布が算出され、複数のシナリオ間でこれを比較することで、各シナリオの相対事後確率 (PP) を推定した。用いた要約統計量は、①各集団の全座位におけるアليل数の平均 (NAL)、②ヘテロ接合度期待値の平均 (HET)、③アليلサイズレンジの平均 (VAR)、④2 地域におけるアليل数の平均 (N2P)、⑤2 地域におけるヘテロ接合度期待値の平均 (H2P)、⑥2 地域における *Fst* 値 (FST)、⑦地域 A からサンプリングされた個体における地域 B への割り当て尤度の平均 (LIK, Rannala and Moutain, 1997; Pascual et al., 2007)、の 7 つであり、これらを地域ごと、もしくは 2 地域ごとのペアワイズにより、合計で 93 個の指標を用いた。

その後、最適と推定されたシナリオのシミュレーションデータセットの事前分布と事後分布を含めた主成分分析 (PCA) から観察データセットが逸脱するか否かを確認するモデルチェックを行なった。

2.12.8. SSR マーカーを用いた遺伝子解析・個体識別

全ゲノム DNA 抽出・精製以降は、組織サンプルから抽出・精製した場合と同様に遺伝子解析を行った。ただし、糞サンプルには DNA 解析を阻害する物質が含まれているため、PCR 阻害物質 (PCR-inhibiting substances) に対する抵抗性・非特異的増幅やスミア抑制をすることができる MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 (Takara) を DNA ポリメラーゼとして使用して PCR を行なった。また、PCR 安定剤であるウシ血清アルブミン (BSA Bovine serum albumin) を添加した。

PCR 条件は、プレーヒーティングを 98℃で 2 分間した後、変性を 98℃で 10 秒、アニーリングを 60℃で 15 秒、伸長を 68℃で 1 分間を 1 サイクルとして 35-38 サイクル、ファイナルエクステンションを 68℃で 7 分間行った。

糞からの DNA 解析については結果の信頼性を担保するために少なくとも 2 回繰り返して行った。PCR にて 2 回とも増幅が確認できなかったサンプルについては解析から除外した。1 回目と 2 回目の結果が異なった場合やピークが小さかった場合には、さらに解析を行った。複数回繰り返して解析結果が安定しなかった場合には、これ以降の解析から除外した。GeneMapper ver. 4.1 (ABI) を用いて DNA 配列長のサイズ確認、アレル決定、ジェノタイピングを行なった。

2.12.9. GENEAP による解析

同一個体からの複数の糞サンプルが、マイクロサテライト解析により同一個体の糞であると確認できたかどうかを統計的に検証するために、ソフトウェア GENEAP version1.4 (Wilberg and Dreher, 2004) を用いて、サンプルごとのアレルのミスマッチの検出および個体識別確率 (PID Probability of Identity) の算出を行った。PID とは、同一でない 2 個体の遺伝子型が偶然に一致する確率であり、「sib-PID (sibling-PID) → 2 個体に血縁関係があると仮定した場合の確率」と、「HW-PID (Hardy-Weinberg-PID) → 血縁関係がないと仮定した場合の確率」に分けられる。実際の PID は HW-PID>PID>sib-PID となる。哺乳類では sib-PID < 0.01 が望ましいとされる (Waits et al., 2001) との先行研究があり、参考に識別確率を比較した。Match Probability は 0.05、method to use は sib で解析を行った。

異なる個体の糞サンプルでは座位により異なるアレルが確認された。解析できた全ての座位を比較して異なる個体同士では、座位により異なるが、少なくとも 13 座位用いることで個体識別確率が sib-PID<0.01 となった。7 座位用いた場合にも sib-PID=0.017 という値が得られた。哺乳類の識別確率は PID-sib < 0.01 が望ましい (Waits et al., 2001) ため、今回のマーカーを用いると少なくとも 13 座位で個体識別が可能であると考えられる。また、これらのうち変異が見られなかった座位が複数確認されたため、組み合わせによってはさらに少数の座位数で識別ができると考えられる。

マイクロサテライト解析では、アレルがヘテロであるのにも関わらず片方の遺伝子増幅に失敗するため、見かけ上はホモ的になってしまうアレルドロップアウト (allele dropout)

(Kirov et al., 2000; Buchan et al., 2005) が検出される場合があるが、糞サンプルでは特に顕著であった。多くのサンプルで複数回解析することでアレルのピークがホモ→ヘテロになるケースがみられた。糞サンプルに含まれる DNA 量が微量であることが原因であると考えられる。特に糞サンプルにおいてのマイクロサテライト解析では、より信頼性を高めるために複数回の繰り返し解析が必要である。

本研究により、捕獲などの侵襲的手段を用いることなく、糞からの個体識別が可能になったことの意義は大きい。開発したマーカーを用いて、希少種であるカワネズミの基礎的知見の蓄積や保全に貢献できるものと考えられる。

3. 結果

3.1. カワネズミの新規ハビタットの発見

カワネズミが生息している本州と九州を対象に、分布域をできる限り網羅するようなカワネズミ糞のサンプリングを行なった結果、59 地点で糞 97 サンプルを採集することがで

きた（図 5）。このうち先行研究（Iwasa and Abe, 2006）を参考に地点を選定したのは 14 地点であり、我々の研究室において新規に生息確認できた地点は 45 地点であった（東城, 2019 で報告した地点も含む）。これらのサンプリングのうち、東京都レッドリストでは「絶滅」として扱われている都内の 2 地点からもカワネズミ糞を採取することができた。遺伝子解析により、これらが間違いなくカワネズミの糞であることも検証できた。また、補足として実施した捕獲個体の組織標本からの解析では、新規 16 の生息地点（24 個体）のデータを追加することができた。

3.2. ミトコンドリア DNA Cyt b 領域の遺伝子解析

カワネズミの組織サンプルからの遺伝子解析では、失敗することなく遺伝情報を得ることができた。

一方、糞サンプルからの遺伝子解析においては、72 サンプルにて 1,106 bp の良好な DNA 増幅がみられ、塩基配列を解析することができた。22 サンプルでは 1 つのプライマーセットを用いた場合でのみ DNA 増幅が確認された。また、3 サンプルでは最も短い断片の DNA 増幅（300bp 程度）がみられた。解析ができなかった地点のサンプルは PCR にて DNA 増幅を確認することができない、もしくは目的の長さではない DNA 断片の増幅が多くみられ（マルチバンドやスメア状態）、以降の解析が不可能であった。

* 青森県内で採取された 1 サンプルにおいて目的の長さではない DNA の増幅がみられた。この PCR 産物の解析を行ない、BLAST にて配列を検索したところ、ニホンイタチ *Mustela itatsi* の配列が得られた。よって、本研究で用いたミトコンドリア DNA Cyt b 領域の DNA を増幅させるプライマーセットはニホンイタチの遺伝子解析においても有効であることが判明した。

3.3. 系統樹と分岐年代

カワネズミの系統解析については ML 樹と Bayes 樹において同様の樹形が得られ、先行研究と同様に 4 つの遺伝系統群が検出された（図 6-7）。Bootstrap 値や事後確率の値は高く、各系統群の単系統性における信頼性が高い結果となった。系統群間の遺伝的分化はいずれも大きく、一方各系統群内の遺伝的分化については分岐が浅かった。4 つの系統群は地理的に、Ⅰ 東日本-中部、Ⅱ 中部-紀伊半島、Ⅲ 中国地方、Ⅳ 九州地方、の 4 つに区分することができ、これは先行研究である Iwasa and Abe (2006) における EC 系統、KK 系統、CG 系統、KS 系統に相当した。系統群ⅠとⅡの分布域が重複する地域周辺のサンプリング・解析を充実させることにより、先行研究よりも広範囲にて両遺伝系統群の重複分布域が確認でき、新たに北方面では裏高尾（東京）までが含まれた（図 6-7）。遺伝系統群間の分岐年代は、系統群Ⅰ-Ⅲと系統群Ⅳの分岐が 0.82Ma、系統群Ⅰ-Ⅱと系統群Ⅲの分岐が 0.45Ma、系統群ⅠとⅡの分岐が 0.29Ma と推定された。

4 つの系統群の塩基多様度およびハプロタイプ多様度は、それぞれ 0.00243-0.00400、0.91429-0.97667 であり、系統群Ⅰで最も値が高く、系統群Ⅲが最も低かった。ペアワイズ *Fst* の値は 0.619-0.897 であり、最も遺伝的に近かったのは系統群Ⅰと系統群Ⅱ、最も大きく分化していたのは系統群Ⅲと系統群Ⅳであった。

また、中立テストの結果から、4 遺伝系統群は全てマイナスの値をとり、遺伝系統群ごとの集団サイズは拡大傾向にあることが示された。ベイズアンスカイラインプロットの結果

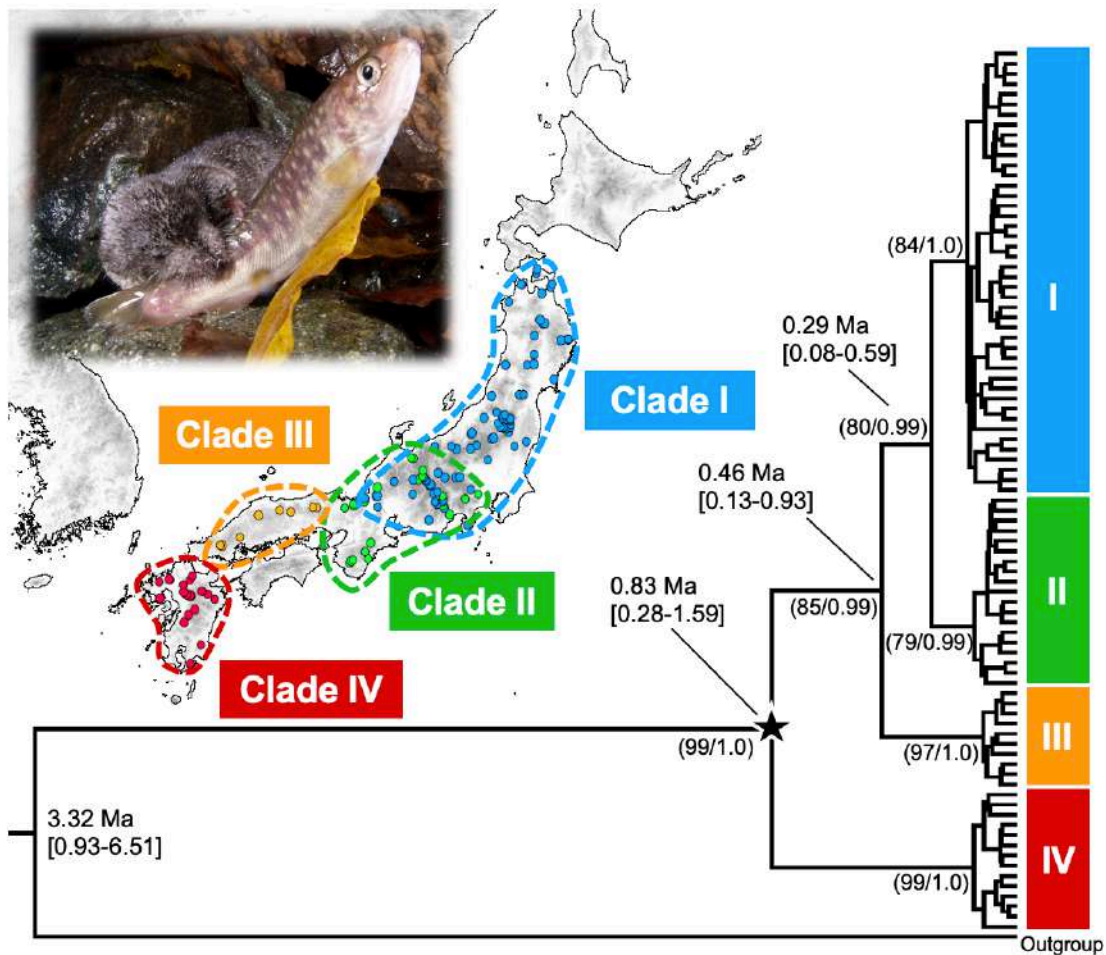


図6 カワネズミの系統解析と分岐年代の推定結果。ミトコンドリアDNA *Cyt b* 領域 1,106 bpから推定されたBayes樹。☆は化石記録（中期更新世の後期）を用いた較正点。近縁属の突然変異率（100万年当たり5.5%の突然変異率）を使用。

から、カワネズミの全遺伝系統群を合わせた場合の有効集団サイズも現在増加傾向にあることが示された（図8-9）。

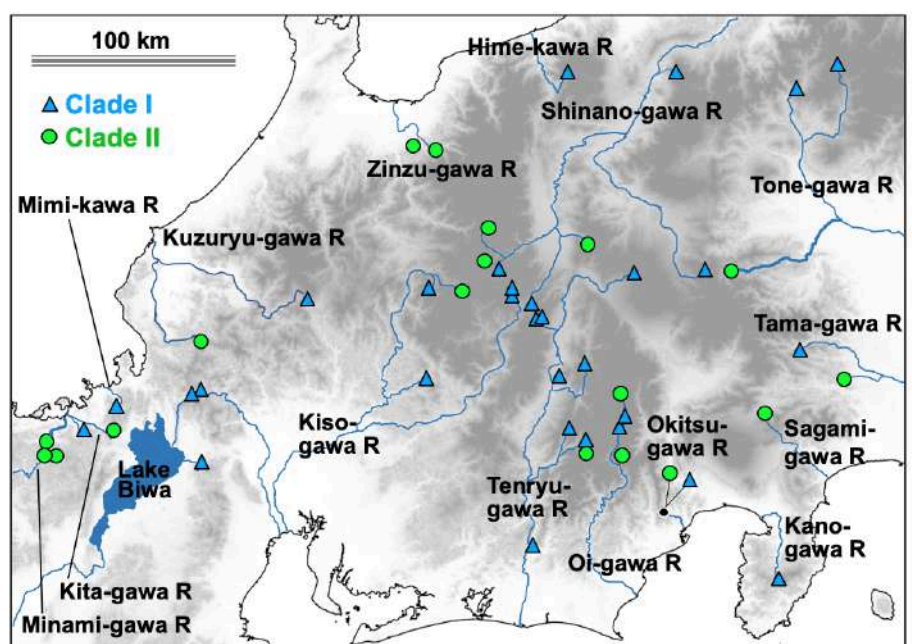


図7 カワネズミの2遺伝系統群の分布重複地域。ミトコンドリアDNA *Cyt b* の塩基配列に基づき区分された系統I, IIを構成する個体（糞）の採取地点。同一水系内（中には同一地点内）に両系統が混成する事例もある。

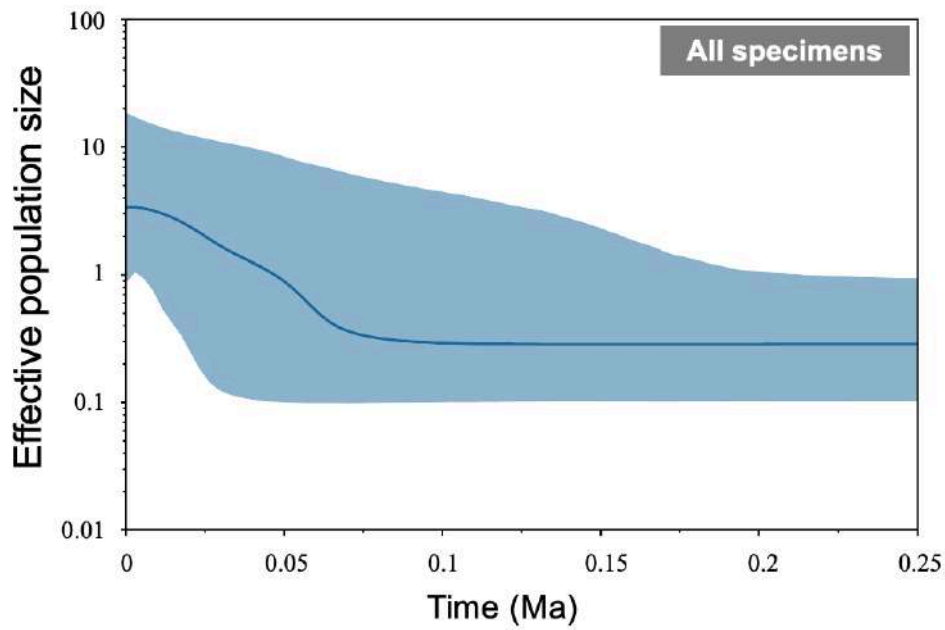


図8 カワネズミ全集団のベジアンスカイラインプロット。
実線は有効集団サイズの変化。色付きの部分が95%信頼区間。

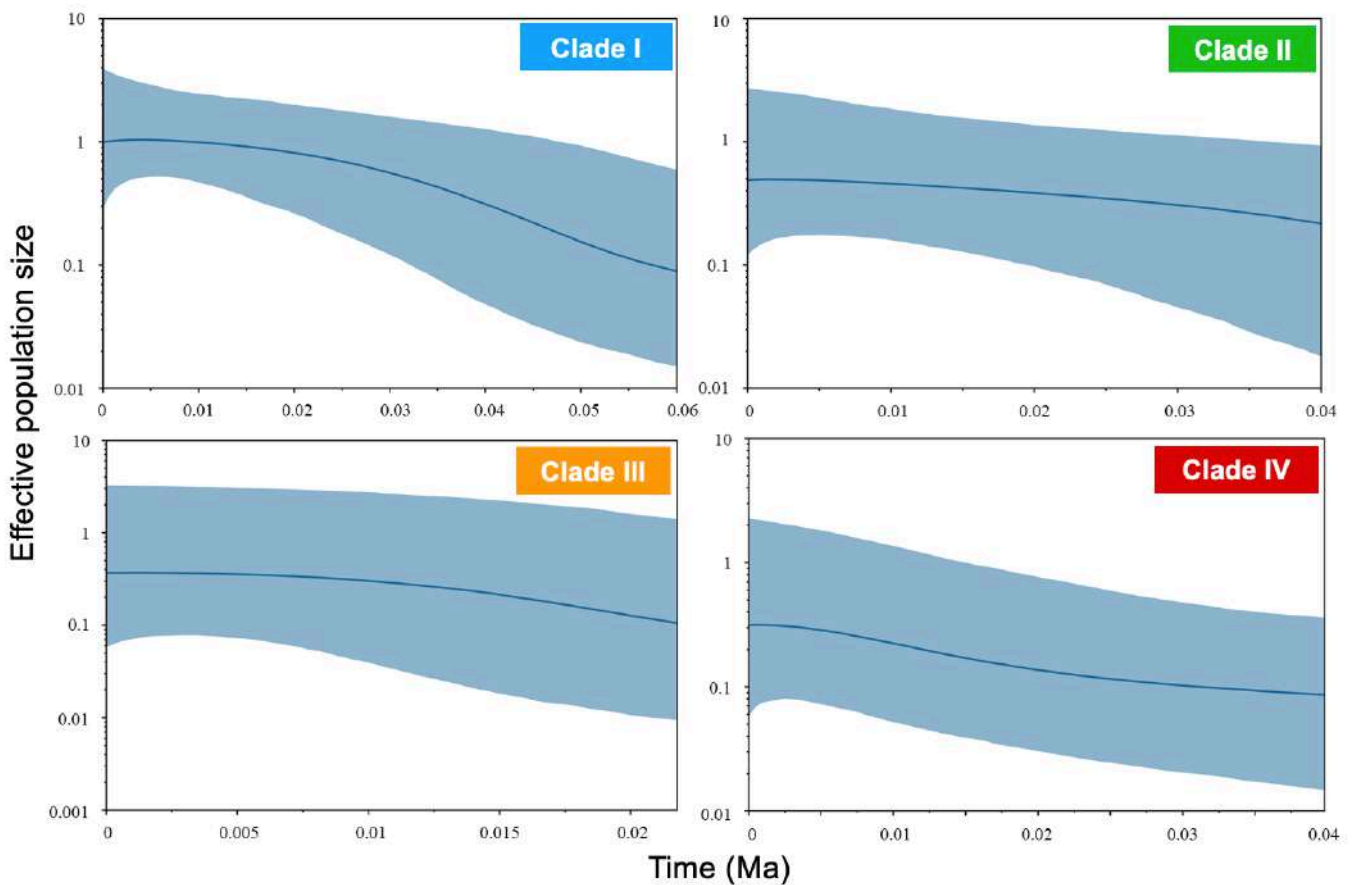


図9 カワネズミ・各遺伝系統群ごとのベジアンスカイラインプロット。
実線は有効集団サイズの変化。色付きの部分が95%信頼区間。

3.4. 生態ニッチモデリング

生態ニッチモデリングにおいて、まず WorldClim と ENVIREM の全ての気候データセットを用いた解析から、生息可能性に影響する気候パラメータとしては以下の5つの項目が評価された：上位から、①**BIO14**: 乾燥している月の降水量 (Fick and Hijmans, 2017)、②**embergerQ**: 地中海性気候を区別するための指標 (Daget, 1977)、③**minTempWarmest**: 最温暖月の最低気温 (Metzger et al., 2013)、④**PETColdestQuarter**: 最も寒冷な四半期の月平均潜在蒸発散量 (Metzger et al., 2013)、⑤**BIO3**: 毎月の最高気温と最低気温の気温差の平均を年間の気温差で割りパーセント化した指標であり、値が大きいほど気温の変化が激しい (Fick and Hijmans, 2017)。これら5項目を用いて再解析を行なった結果、現在の潜在的な生息可能地域としては本州・四国・九州の広範囲と推定され、とくに内陸の山地帯の分布可能性が高かった。実際にはカワネズミが生息していない北海道や絶滅したとされる四国、そして大陸の一部地域にも生息可能性が高い地域が推定された。また、本州では関東平野とその周辺のみで生息可能性が低く評価された。

また、上述した気候パラメータ5項目を用いて推定された LGM における潜在的な生息可能地域は、CCSM4 と MIROC の2種のモデルで CCSM4 を使用した方がやや広範囲となった (図 10)。北海道～東北地方にかけて生息可能性が低く、また中国山地や中部山岳域でも、そして四国でも生息可能性は低く評価された。関東地域とその周辺～九州にかけて山地を囲むように

生息可能地域として推定された。CCSM4 では比較的沿岸部の生息可能性が高くなっていた。

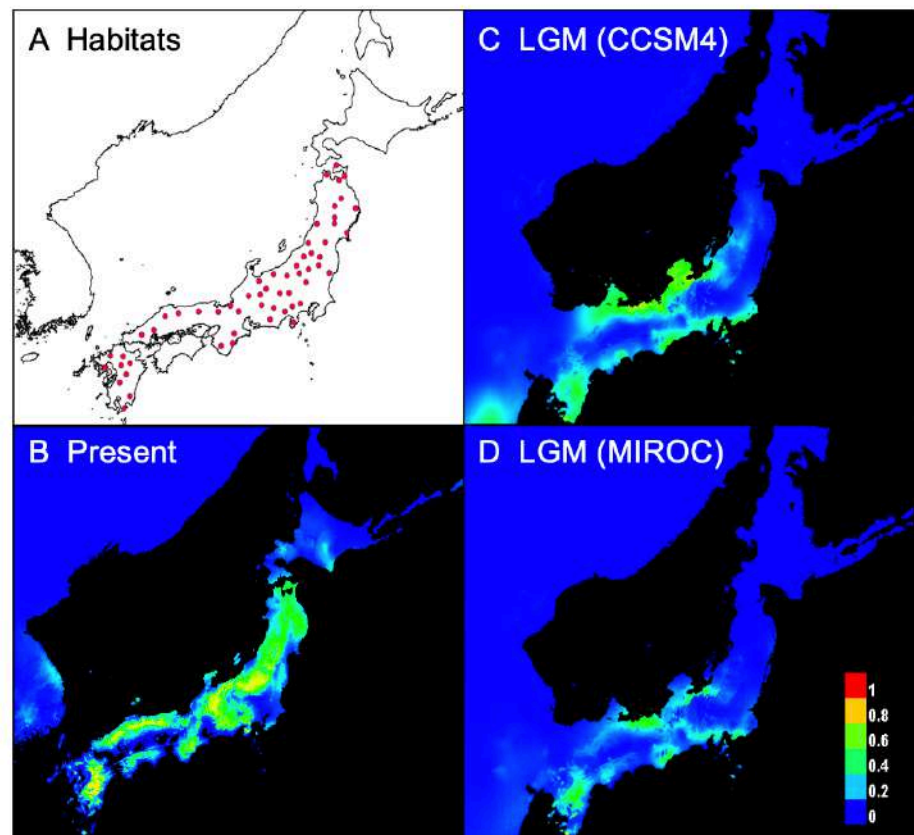


図10 カワネズミの生態ニッチモデル解析の結果.

- A. 解析に使用した生息地点情報
- B. 推定された現在の潜在的な分布可能域
- C. LGMの潜在的な分布可能域 (CCSM4モデル)
- D. LGMの潜在的な分布可能域 (MIROCモデル)

3.5. 祖先集団の推定

4つの遺伝系統群ごとの解析に加え、Bayes 樹をもとにカワネズミの祖先集団の推定を行なった結果、カワネズミの祖先集団としては大陸および九州の遺伝系統群Ⅳが推定された（図6, 11）。まず大陸からの渡来後に、九州の系統群Ⅳが分岐した後、系統群Ⅰ～Ⅲが本州へと渡り、中国地方の系統群Ⅲが分岐した後に近畿の系統群Ⅱと中部から東北地域に分布する系統群Ⅰが分岐したと推定された（図6, 11）。

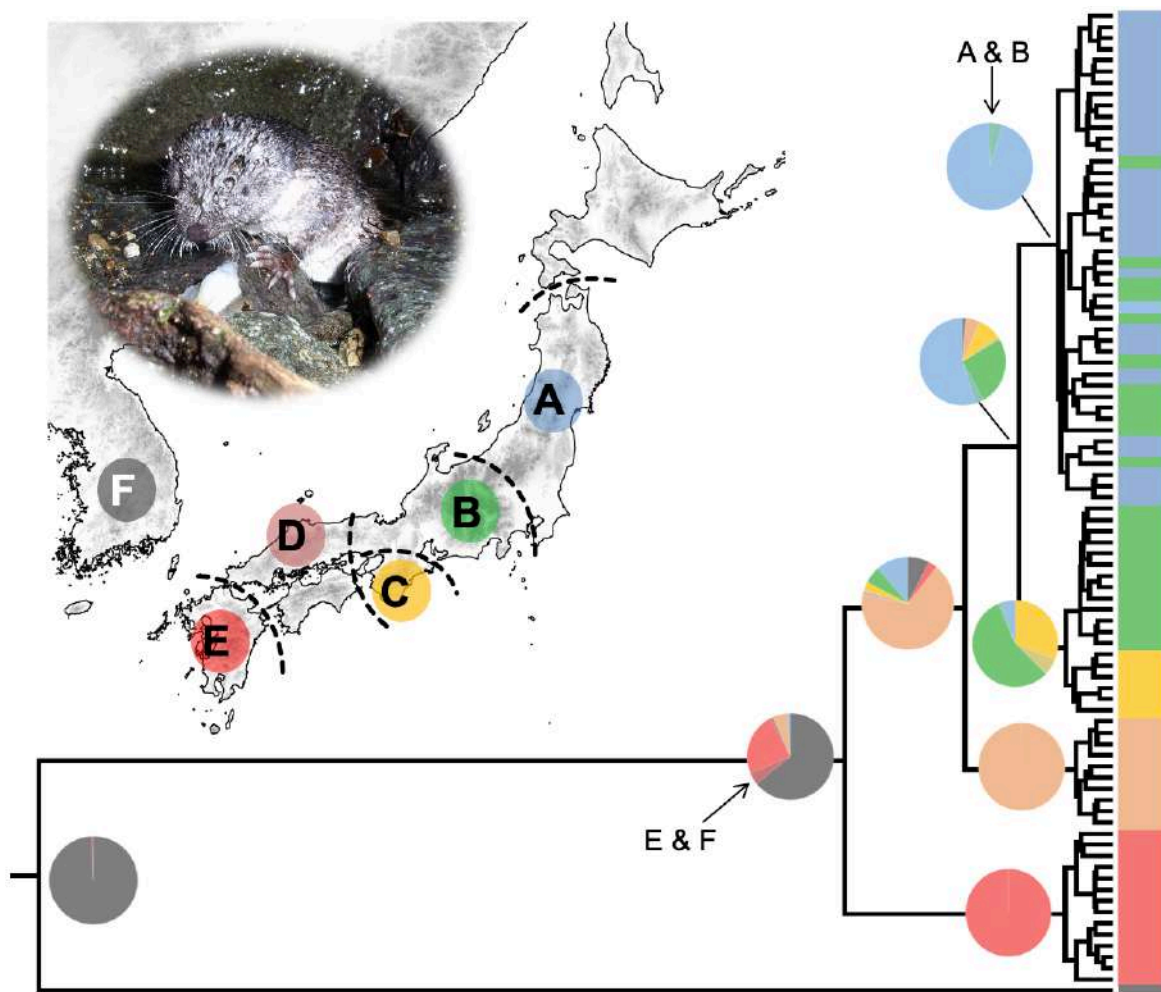


図11 カワネズミの主要ノードにおける祖先地域の推定結果。4つの遺伝的系統と系統Ⅰ, Ⅱについては、それぞれの単独生息域と混生域を区分して全5地域に区分した上で推定した結果。

3.6. カワネズミ野生集団の糞サンプルを用いた SSR 解析

カワネズミ野生集団の糞サンプルによる SSR 解析では、最初に開発した 21 マーカーだけでなく、追加作成した断片長を短く設計した SSR マーカーを追加することで解析効率が上昇した。複数の SSR 座位の解析ができた比較的新しい野外個体の 29 の糞サンプルを用いて解析を行なった場合、先に開発した SSR マーカー21 セット（Yamazaki et al., 2020）では1サンプル当たりの平均解析座位数 21 座位中 11.9 座位（成功率 56.8 %）であったのに

対し、追加作成した SSR マーカー 12 セットでは 1 サンプル当たり平均解析座位数 11 座位中 9.2 座位 (成功率 77.0 %) であった。なお、以後の系統解析では、これらを合わせた 33 の SSR マーカーのうち解析できた糞サンプルが多く、かつ変異数が多い 12 座位を用いている。

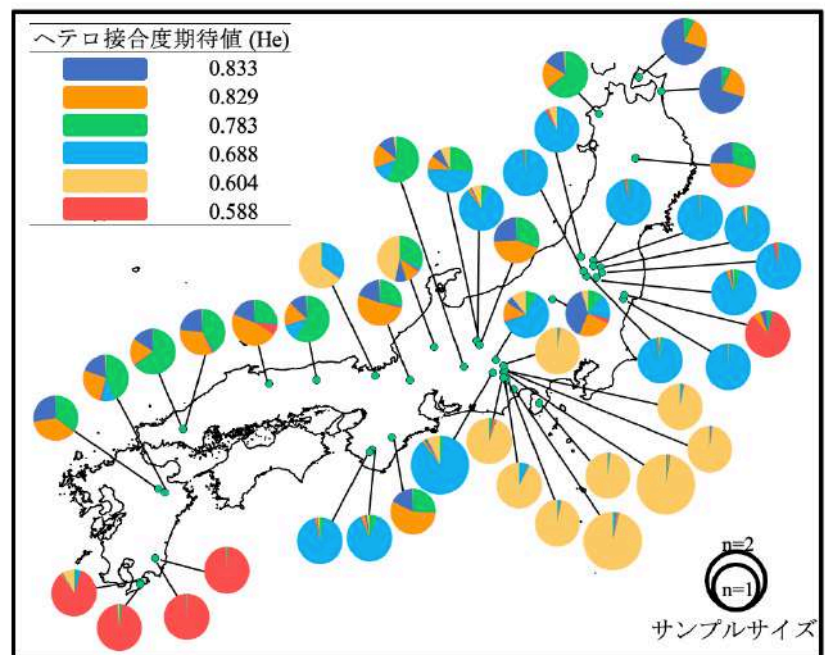


図12 カワネズミの核遺伝子SSR 12座位を用いた Structure解析の結果。 Structure 解析結果 (K=6 の場合) の遺伝構造を円グラフとして地図上にプロットしたもの。色の違いが遺伝構造 (クラスター) の違いであり、丸の大きさはサンプル数を反映している。左上の表は各クラスターのヘテロ接合度期待値。

3.7. SSR 解析から算出されたカワネズミの核 DNA における遺伝的多様性

全国の SSR 解析サンプルを、サンプルサイズを考慮したうえで緯度・経度ごとに 6 つの地域に区分した後、区分地域ごとに GenAlEx を用いて遺伝的多様性を算出した (図 12)。その結果、ヘテロ接合度 He は東北・北部地域①にて最も高く (0.689, サンプルサイズ補正值 0.811)、中国地域⑤にて最も低かった (0.492, サンプルサイズ補正值 0.599)。また、サンプルサイズが小さいにも関わらず地域①のプライベートアリル数が多く ($PA=20$)、アレリックリッチネスの値も 6 地域のうちで最も高かった ($Ar=3.017$)。地域間のペアワイズ遺伝的分化度 F_{st} は、他地域間と比べ地域②・③・④間の値が低かった ($F_{st}=0.061\sim0.081$)。地域⑤と⑥間の F_{st} 値が最も高く、0.255 であった。同じく、地域間のペアワイズ遺伝距離 Da でも、他地域間と比べ地域②・③・④間の値が低かった ($Da=0.255\sim0.360$)。地域①と⑥間の Da が最も高く、1.220 であった)。また、中部地域③を除く 5 地域における近交係数が大きかった (0.197~0.435)。なかでも、東北・北部地域① (0.419) と中国地域⑤ (0.435) の個体の近交係数がとくに高かった。

3.8. SSR 解析結果から算出された 6 地域区分の F_{st} および Da の NJ 樹

Poptree2 (Takezaki et al., 2009) を用いて、地域ごとのペアワイズ F_{st} および Da をもとに作成された NJ 樹から、地域②・③・④の個体は互いに近縁であり、それ以外の地域の個体は地域ごとに分化していることが示唆された。地域②・③・④の個体をまとめた根本の Bootstrap 値は F_{st} と Da の場合どちらもそれなりに高く、これらの地域の個体が近縁で

あることが確認できた。一方、地域②・③・④の個体間の系統関係および地域①・⑤・⑥の個体間の系統関係は、用いる遺伝的指標 (F_{st} , D_a) によって変わってしまい、Bootstrap 値も高くはなかったため、これらの地域間の系統関係を推定することは困難であった。

3.9. SSR 解析結果を用いた 6 地域区分を対象とした ABC 解析

日本列島のカワネズミ SSR 解析集団を機械的に区分した 6 地域を対象に、4 つの基準、(1) SSR 解析結果を用いて算出された地域間の遺伝的多様性、(2) Structure 解析結果 ($K=6$)、(3) カワネズミのミトコンドリア DNA *cyt b* 領域、(4) 複数の日本固有哺乳類の分子系統地理学的特徴から考えられる分散様式 (増田, 2017) から分岐シナリオ 23 パターンを作成し、ABC 解析を行なった。この結果、最適とされたシナリオは基準 (2) Structure 解析結果 ($K=6$) の遺伝構造から推定されたシナリオであった。最適シナリオは、「九州地域⑥とそれ以外の本州の集団が分岐し、次に地域⑤と地域①が分岐した。その後、地域⑤と地域②・③・④が分岐した後、最後に地域④と地域②が分岐し、地域②と地域④の交雑の結果、地域③が形成されたシナリオ」であった (図 13)。このシナリオの事前分布における主成分分析では、構築されたシミュレーションデータセットの分布のなかに実際の観察データセットが含まれた。事後分布のモデルチェックから、シミュレーションデータセットと観察データセットとの間で、解析に用いた要約統計量 (遺伝的指標) 93 個のうち 4 個で逸脱が観察された。

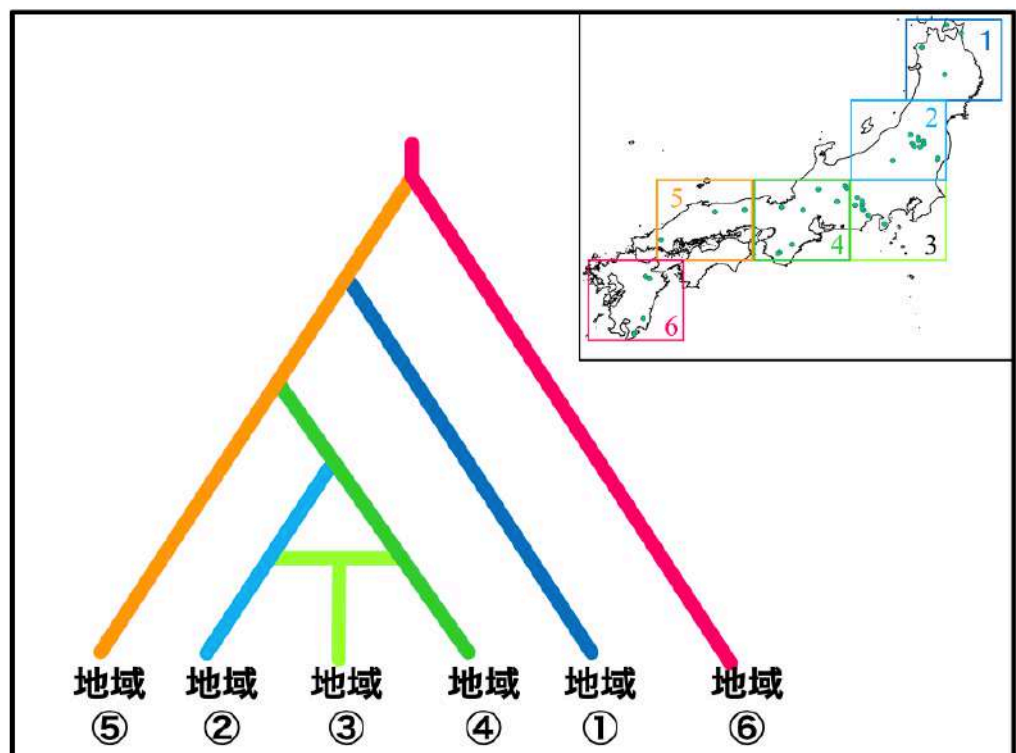


図13 SSR解析において6地域区分を対象としたABC解析から推定された最適分岐シナリオ。 4つの基準に基づいて作成された全23パターンのシナリオから最適と推定された分岐シナリオ。基準 (2) Structure 解析結果 ($K=6$) から推定された遺伝構造を参考にして作成されたシナリオの一つが最適シナリオとして評価された。

4. 考察

4.1. mtDNA Cyt b 領域の遺伝子解析から紐解くカワネズミの系統進化史

カワネズミの生息域を網羅する広域から糞のサンプリングを行なうことにより、カワネズミの生息地点を詳細に把握することができた。なかには遺伝子解析が不可能であった糞サンプルもあったが、これは採取した糞が古い、水に濡れた状態であったなど、サンプルの質の問題（DNA の断片化）と考えられる。

本研究により、新規のカワネズミ生息地点を 45 地点も追加することができたのは大きな成果と言える。特筆すべきは、東京都内で採取された糞サンプルである。東京都はレッドリストにて「絶滅」カテゴリとして指定しているが、本研究によりカワネズミの糞が採取され、遺伝子解析の結果としてもカワネズミの生息が疑いのないものであると確認された。本研究のほか、奥多摩町内ではカワネズミが撮影されるなど、生息が示唆されていたが（島田ほか, 2018）、本研究における遺伝子解析からは疑いのない証拠が得られており重要な知見と言える。また、奥多摩町に加えて八王子市裏高尾町においてもカワネズミの生息が明らかとなった。裏高尾のカワネズミ集団は遺伝系統群Ⅱに属するのに対し、奥多摩のカワネズミ集団は遺伝系統群Ⅰに属する。すなわち、西東京地域は遺伝系統群ⅠとⅡの分布重複域に相当することが新たに明らかになるとともに、これまで知られていた分布重複域もより広域にわたることが示唆された。

ミトコンドリア DNA Cyt b 領域における系統解析により、カワネズミ集団は 4 遺伝系統群に分化していることがより強く支持された（図 6）。このことは先行研究からも示唆されていたことではあるが、大幅に解析対象集団を増加させたことで、より強い支持が得られたと考えられる。また、分布域をほぼ網羅する地域を対象に加えられたことで、第 5・第 6 の遺伝系統群が存在する可能性はほぼ確実に否定できるものと考えられる。とくに、調査が十分ではなかった九州地域や中国地域において解析地点数を充実させられたことの意義は大きい。また、系統群ⅠとⅡの分布域が重複する地域やその周辺でのより綿密なサンプリングと遺伝子解析結果から、2 系統群の分布重複域はより広域にわたり、かつ両遺伝系統群の分布域の重複は河川や山塊などの地形にはよらないことも明らかとなった（図 6-7）。

遺伝的多様性については系統群ごとにあまり大きな相違はなかったが、わずかに系統群Ⅰで高く、また系統群ⅢとⅣの値が低い傾向にあった。また *Fst* に関しては系統群間の地理的距離が離れるにつれて *Fst* の値も大きくなる傾向（地理的距離による遺伝的分化: IBD, isolation by distance）も認められた。

作成した系統樹をもとに、Rasp を用いてカワネズミの祖先集団の分化パターンを推定した（図 10）。結果から、大陸から祖先集団が渡来した後、現在の九州地域の遺伝系統群Ⅳが分化したことが示唆された。カワネズミの同属別種は東アジアに広域分布しており、アジア大陸からの祖先集団の渡来は妥当な結果と考えられる。その後、系統群Ⅰ-Ⅲが本州へと渡り、中国地方から中部・関東・東北地方へ、東北方面へと分散しながら（系統群Ⅲ, Ⅱ, Ⅰの順に）系統群の分化が生じたこと、すなわち系統分化を伴いながら南西方面から東北方面へと分布域を拡大したと考えられる。加えて、4 つの系統群の分岐年代を推定した結果、いずれの系統群も 100 万年前以降に分岐したと推定された（図 6）。また、これらの分岐年代の推定値と、海洋中の酸素同位体（ O^{18} ）比の変化から推定される古気候（気温

の変化)に関する知見(Bassinot et al., 1994)とを照合したところ、カワネズミの遺伝的分化は気温が低下する時期に生じていたことが示唆された。このことから、氷期-間氷期サイクルの中で、氷期にカワネズミの生息地の縮小・分断化が起こり、異なるレフュジアにおける分断分布を強いられることで遺伝的分化が促進されたものと考えられる。

このことは生態ニッチモデリングの結果からも支持される。生態ニッチモデリングでもLGM(最終氷期最寒冷期)にカワネズミの分布域の縮小が示唆されている(図11)。また、現在の分布状況および気候条件から、間氷期にあたる現在カワネズミの潜在的な分布域はより広範囲(本州~四国、九州まで)に及ぶことが推定されたため(図11)、カワネズミは寒冷な気候であると分布域が縮小し、温暖な気候であると分布域を拡大していると考えられる。加えて、中立テストでは有意ではない値も含まれるものの、4つの遺伝系統群の全てにおいて、現在の集団サイズは拡大傾向にあることが推定された。さらに、ベイジアンスカイラインプロット解析結果からもカワネズミの全集団の有効集団サイズは現在に向けて増大傾向であることが推定された(図8-9)。また、ベイジアンスカイラインプロットの結果からは、現在の集団サイズの増加の直前(およそ10万年前以降)に一度減少を経験していたことも示唆されている(図8-9)。このタイミングは最終氷期の時期(約10万年前以降)とも一致している。

以上の系統解析の結果をまとめることで、カワネズミの進化史を考察してみる。まず、第四紀の更新世にアジア大陸からカワネズミの祖先集団が九州へと渡り、その後本州へと渡り南西部から東北部へと分布域を拡大させた。カラブリアン期からチバニアン期にかけての時代に、氷期-間氷期サイクルによる気候変動に伴いカワネズミの分布域は縮小・拡大を起こし、とくに氷期において分布域の縮小、間氷期において拡大をした。その際、異なるレフュジアに由来する4系統群への分岐が生じ、現在の間氷期において集団サイズの増加・分布拡大を起こした。とくに系統群IとIIは二次的な接触を起こすとともに、分布域の重複や同一集団内に混生するような状況に至ったと考えられる。

本研究では、解析データ数を大幅に更新することで、カワネズミの進化史シナリオをより詳細かつより深く再考してみた。先行研究により、氷期-間氷期サイクルにおける分布域の縮小・拡大までは議論されてきたものの、本研究では新たに生態ニッチモデリングや化石記録を用いた分岐年代推定を導入することで、より詳細かつ具体的なシナリオの考察をすることができた。また、カワネズミの系統進化史としてはアジア大陸から九州に渡来し、その後本州へと渡り、日本列島を東北進していったとするシナリオが究明された。

本研究では、カワネズミのミトコンドリアDNA Cyt b 領域の遺伝構造より、カワネズミの進化史を再考することができたが、核DNAにおいてはほとんど解析がされておらず、ミトコンドリアDNAと核DNAの遺伝構造を比較することは全くできていない。このような背景から、以降、核DNA解析を実現させるために、我々の研究室で新規開発したSSRマーカーの有用性についての検証を行なう。分布重複域における遺伝系統群間での交雑の有無を検討し、また核とミトコンドリアDNAの遺伝構造の比較については以降で触れたい。

4.1. SSR解析から紐解くカワネズミの集団動態(系統進化史)

全国のカワネズミ集団を機械的に区分した6地域のSSR解析結果を用いた遺伝的多様

性（遺伝的分化度 F_{st} 、ヘテロ接合度期待値 H_e 、プライベートアリル数 PA 、アレリックリッチネス Ar ）の推定から、東北部集団①の遺伝的多様性が最も高く、九州集団⑥および中国集団⑤は遺伝的多様性が低いことが分かった。これは、近年の個体数減少に起因すると考えられる。九州地方のカワネズミは、環境省レッドリスト 2019 にて「絶滅の恐れのある地域個体群 (LP)」として指定されており（環境省, 2019）、捕獲調査でも本州に比べて捕獲率が低いとの報告がなされている（阿部, 2003）。中国地方では、都道府県別レッドリストから岡山県（絶滅危惧Ⅰ種）、広島県（絶滅危惧Ⅱ種）、山口県（絶滅危惧Ⅱ種）、など各県の絶滅危惧ランクが高く、生息に適した溪流は中国山地沿いにほぼ限定されてしまうことから、カワネズミの集団サイズが小さいと考えられる。また、中国地方はオオサンショウウオ *Andrias japonicas* の主な生息地であり、溪流生態系の上位捕食者がカワネズミ以外にも存在している。過去にオオサンショウウオにカワネズミが捕食される事例も確認されており（松井, 2004）、上述のように生息適地が少ないため集団サイズが小さいうえ、オオサンショウウオとの競合があることにより個体数が減少したと考えられる。

SSR 解析から近交係数 F_{IS} を算出したところ、地域③を除く 5 つの区分地域にて近交係数が高くなった（0.197~0.435）。原因として、糞サンプルからの解析によるアリルドロップアウトが起きてしまった可能性がある。唯一近交係数が低かった地域③は、静岡県ふじのくに地球環境史ミュージアムから提供頂いたカワネズミ標本から採取した組織サンプルが多く含まれていた。同様に、福島県のアクアマリンいなわしろ・カワセミ水族館から提供頂いたカワネズミ標本から採取した組織サンプルが含まれる地域②では、地域③の次に近交係数が低かった。これらのことから、本来のカワネズミ集団の近交係数は高くはなく、糞サンプルの解析であるがゆえにアリルドロップアウトによりヘテロ接合度観察値が高くなったと考えられる。先に述べたとおり、アリルドロップアウトは糞サンプルにおいてとくに顕著に起こりうる現象である。今回の解析では、野外で採集したカワネズミの糞サンプルを対象にしており、これらの解析サンプルには古い糞も含まれるため、飼育個体から採取された糞や、カワネズミ標本から採取した組織サンプルと比べ DNA の断片化が進んでいる可能性が高い。糞からの解析では 5 回繰り返しを推奨している場合もあるが（増田, 2017）、本研究では実験の再現性を確保するために少なくとも 2 回以上の繰り返しを行ない、場合により最大 5 回までの解析を実施した。今回の結果から、アリルドロップアウトを考慮したとしてもヘテロ接合度期待値の高さからみられるように多様なアリルが検出されており、地域によって遺伝的分化がみられたことなどは考察に加えるべき新たな知見と言える。

Poptree2 (Takezaki et al., 2009) を用いて、6 地域区分の個体の解析結果から F_{st} および Da をもとに作成された地域ごとの NJ 樹によると、地域②・③・④の個体は近縁であることが示唆された（図 13）。一方、地域①・⑤・⑥は地域ごとに遺伝的に分かれた。さらに、Structure 解析結果 ($K=6$) から遺伝構造をより細分化した結果、地域①・⑤では、暗青色、茶色、緑色の 3 色が混じった遺伝構造となった（図 12）。地域②・③・④にもこれら 3 色が混じりあった個体が少数みられた。このことから地域①・⑤から地域②・③・④への分布拡大が起こったことが示唆される。また、Structure 解析結果 ($K=6$) から地域⑥は九州北部と南部に分けられ、九州北部の個体は地域⑤の個体と近縁であった（図 12）。生態ニッチモデリングの結果と併せて考察すると、LGM において九州は生息可能域が北部と南

部に分断されており、このことから氷期に集団が分断されたことで、現在北部と南部で遺伝構造が分化しているのではないかと考えられる。

6 地域区分を対象とした ABC 解析の結果、地域⑥が祖先的であり、本州に分岐した後、地域⑤から地域②・④と地域①が分岐し、地域④から地域②・③が同時に分岐したシナリオが最も事後確率が高いことが示唆された（図 13）。このシナリオは地域①・⑤・⑥が祖先的であることを支持するシナリオであり、シナリオから地域①・⑤・⑥の中でも地域⑥が最も古いことが明らかとなった。地域②・③・④は氷期後の分散により形成されたと考えられ、近年急速に分布したことから遺伝的多様性も低く非常に類似した遺伝構造をもつと考えられる。そのため、地域②・③・④間での分岐を正確に推定することは困難であった。

シミュレーションデータセットと観察されたデータセットとの間で、解析に用いた要約統計量（遺伝的指標）93 個のうち 4 つの統計量で逸脱が確認された。これらの逸脱は、①サンプルサイズが小さいこと、②糞サンプルからの解析でありアリルドロップアウトによる遺伝的多様性の過小評価が起きている可能性があること、に起因すると考えられる。一般に SSR を含む DNA 領域では突然変異率が高いために、サンプルサイズが小さいことによるバイアスの影響が他の領域と比べて大きくなる（Hardy et al., 2003）。実際に逸脱が検出された要約統計量（遺伝的指標）は、地域①の個体のアリルサイズレンジの平均、地域①と④および⑤の個体間の F_{st} 値、地域⑤と⑥の個体割り当ての

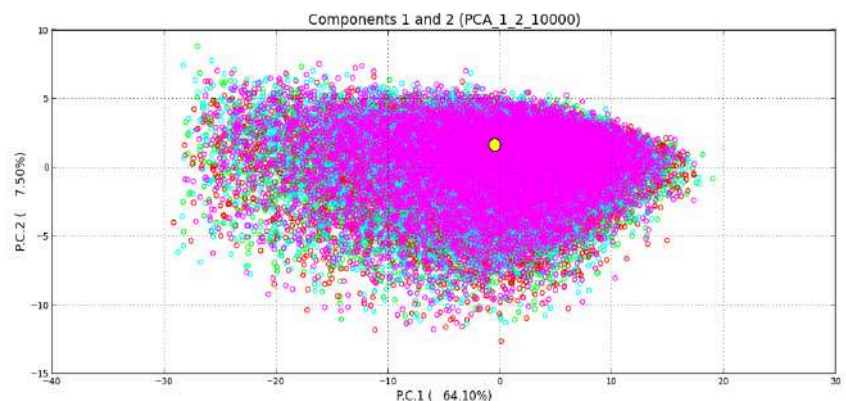


図14 6地域区分を対象に行なったABC解析の事前分布のPCA. SSR解析結果を用いて6地域区分を対象に行なったABC解析において4つのシナリオの事前分布から構築されたシミュレーションデータセット（白抜き丸）と、観察データセットとの逸脱を確認するPCA。黄色い丸で示された観察データセットがシミュレーションデータセットの中心に位置している。

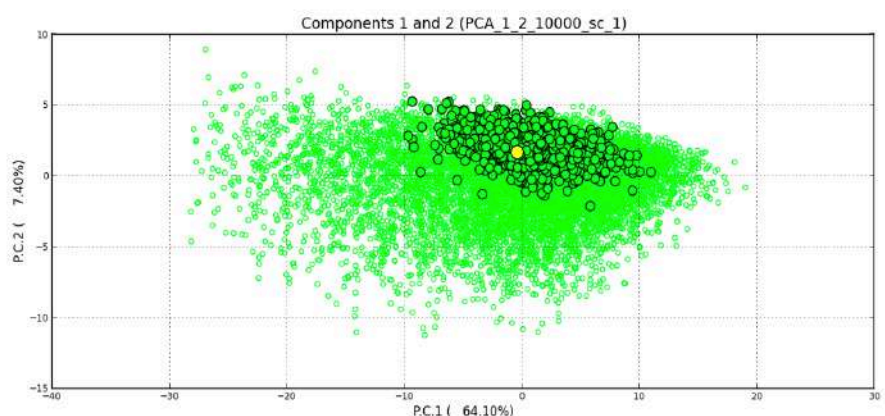


図15 6地域区分を対象に行なったABC解析の最適シナリオのPCA. SSR解析結果を用いて6地域区分を対象に行なったABC解析において、最適シナリオから構築されたシミュレーションデータセットと観察データセットとの逸脱を確認するPCA。緑が緑色のプロットはシミュレーションデータセットの事前分布、緑が黒色のプロットはシミュレーションデータセットの事後分布であり、黄色い丸で示される観察データセットがシミュレーションデータセットの中心に位置している。

平均尤度の4つである。地域①・⑤・⑥は解析サンプルサイズが4~6ととても小さく、データの不確実性がある。サンプルサイズに起因すると考えられる逸脱については除外すべきであり、加えて、モデルチェックによるシミュレーションデータセットの主成分分析（PCA）範囲内に観察データセットは含まれたため（図14-15）、最適として選ばれたシナリオの信頼性は高いと考えられる。

本研究ではサンプルサイズによるバイアスや糞からの解析のための過小評価が含まれる可能性があるものの、これまでになかった核DNAからの遺伝構造解析による新たな基礎的知見を提供することができたのは大きな成果と言える。

4.2. マイクロサテライトマーカーを用いた行動・生態研究への応用

本研究では、カワネズミ糞からの遺伝子解析手法の確立やマイクロサテライト・マーカーの開発、さらにはその新規開発マーカーにおける多型解析や個体識別における有効性を実験的に解析し検討することに1年間のうちの多くの時間を費やしてしまい、野外生態系における行動・生態学的研究への応用研究はあまり実践できなかった。しかしながら、1つの「ため糞」場に排泄されていた糞が同一個体によるものではなく、複数のカワネズミによるものであることが判明した事例が3件、いずれも異なる地域集団において明らかとなった。このことは、カワネズミ一般的に、「ため糞」は1個体の定まった排泄場所としてではなく、複数個体が同じ「ため糞」場を共用していることを意味している。すなわち、複数個体が行動圏の重なりをもちながら生活していることが示唆された。ただし、この「複数個体」というのが、全く血縁関係のない個体同士であるのか？ つがいであるのか？ 親子であるのか？ 兄弟姉妹であるのか？ などにより、その意味するところは大きく異なるため、今後の精査が必要である。少なくとも、カワネズミにおける雌雄性を判別するマーカーを用いた雌雄判定をすることや、マイクロサテライト解析による個体識別だけでなく、血縁性に関する統計学的な評価を並行して実施することで、より「ため糞」行動における理解が深まるものと考えられる。



図16 カワネズミの野生集団におけるため糞サイトの様子。
地点の番号は図17の地図中の地点番号と対応している
（St. 3 に関しては写真を撮影できなかった）。

カワネズミに発信器やGPSを装着して追跡することが困難であることから、糞試料を対象にして、分子マーカーを用いることでの個体が行動範囲や、個体間に行動圏の重なり合い等に関する基礎知識が究明されてゆくことは、今後のカワネズミにおける行動・生態学

的理解において極めて重要である。今回は、その第一歩となる、糞試料からの遺伝子解析手法やマイクロサテライト解析のためのマーカー開発やジェノタイピング法を確立できたことの意義は大きいと考えている。

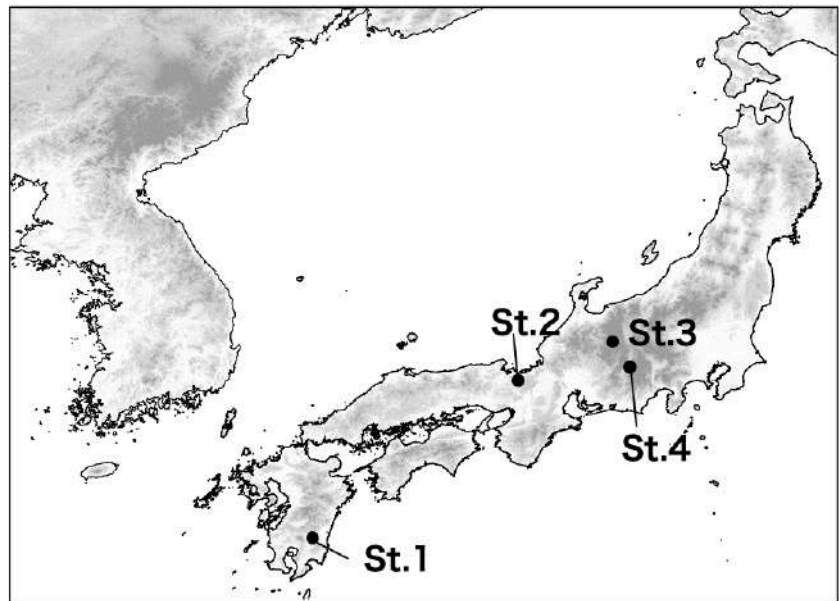


図17 カワネズミのSSR解析の対象となった野生個体のため糞場の地点。 4つの河川のため糞場 (St. 1–4)) から複数の糞サンプルを採取しSSR解析を実施した。地図の背景色は色が濃いほど標高が高いことを示す。

4.3. 本研究成果の河川管理への適用

本研究では、日本列島内のカワネズミの分布域を網羅するような地域を対象に、満遍なく糞便試料を採取し、ゲノム DNA 解析をすることができた。予定していたミトコンドリア DNA Cyt b 領域 (1,106 bp) の解析は問題なく実施でき、SSR マーカーによるジェノタイピングでは、糞便試料ゆえの苦労はあったものの、地域集団レベルでの遺伝構造解析については、ほぼ計画通りに進展させることができた。結果として、日本固有種であり、希少種でもあるカワネズミの系統進化史を詳細に究明することができた。加えて、その中でも、九州の地域集団は遺伝的固有性が強い原始系統であること、続いて系統が分化した中国地方の地域集団も固有性の強い遺伝系統群であることが明らかとなった。また、本州の東北部や中部の広域に棲息する2系統群は最も派生的系統ではあるものの、東北部に独特のリフュジアがあったと推定され、これに起因する東北部の系統の存在や、東南部や中部地方では、2つのリフュジアに起因する2系統群が二次的に接触することで遺伝的交雑を経験している特殊な地域であることも明らかとなった。以上の系統進化史や遺伝構造の詳細把握については、ミトコンドリア DNA Cyt b 領域の解析に加えて、我々が独自に開発したマイクロサテライト (SSR) マーカーによる解析を併用することで初めて明らかにすることができた。これらの遺伝構造の可視化や進化的重要単位 (ESU: evolutionary significant unit) を明確にした上での保全策検討は、近年ではとても重要視されており、カワネズミ保全における極めて重要な基盤的知見を蓄積することができたと評価している。

一方、糞便試料ゆえにゲノム DNA の断片化の影響も受け、個体識別や血縁関係の評価に耐え得るだけの、対象とするサンプル間での共通遺伝子座位数を (開発した) 全 31 座位マーカーのうちの 13 座位以上に確保することは難易度が高く、ため糞サイトのうち 4 サイト (本州から 3 サイト、九州から 1 サイト) において複数個体が共通のため糞サイトを利用

していることを究明できた程度に留まった。すなわち、カワネズミ個体レベルでの移動分散や溪流内の空間利用エリアを詳細にマッピングすること（可視化すること）は、今後も課題として継続して検討していく必要がある。

しかし本研究からは、異なる個体同士が同じため糞サイトを利用すること自体は究明できており、互い行動圏が重複することだけは明らかにすることができた。今後、これらの別個体の性別や血縁度なども遺伝的に究明することで、行動生態についてもより知見を深められるものと期待される。

糞便試料を用いることで、カワネズミの系統進化史や集団遺伝構造を究明することに主眼をおいた当初の目標については、ほぼ計画通りに達成することができたと考えている。

5. 摘要（まとめ）

本研究では、日本で唯一の溪流棲トガリネズミであるカワネズミを対象に、生息域のできる限り広域から糞をサンプリングし遺伝子解析することで、その系統地理や進化史についてより詳細に究明することを目指した。

まず、カワネズミのミトコンドリアDNA Cyt b領域を対象に、解析数や対象地域を大幅に増加させることで、カワネズミの進化史シナリオを再考した。先行研究により、氷期一週氷期サイクルにおける分布域の縮小・拡大までは議論されてきたものの、本研究では新たに生態ニッチモデリングや化石記録を用いた較正による分岐年代推定を導入し、より詳細な進化シナリオの考察ができた。カワネズミの系統進化史としては、アジア大陸から九州に渡来し、その後に本州へと渡り、日本列島を東北進するように分布拡大したとするシナリオが究明された。

次に、我々自身が新規開発したSSRマーカー合計33座位について、カワネズミの飼育個体を用いて個体識別テストを行ない、その有用性を検証した。開発したSSRマーカーは極めて高感度であり、13座位用いることで個体識別が可能であることが示された。また、このマーカーを野生集団に適用することで、カワネズミはため糞場を複数個体で共用していることも新たに明らかとなった。

これらのミトコンドリアDNA Cyt b領域の解析とマイクロサテライト（SSR）解析を組み合わせることで、やや中長期的な時間スケールでの進化史とより短い時間スケールでの集団動態を効果的に評価することができ、また互いに補完し合うことでより深い考察が可能となった。このことにより、カワネズミの野外集団を対象としたSSR解析効率を格段に高めることができた。

結果として、カワネズミが九州から本州へと分布してきたことがより強く支持されたほか、東北北部におけるマイクロレフュジア存在の可能性も示唆された。また、ミトコンドリアDNA Cyt b領域の解析では異なる遺伝系系統群ⅠとⅡが、互いに広域にわたって分布域を重複させていると判断されたが、SSR解析により、これらの遺伝系統群ⅠとⅡの重複地域では大規模に系統間の交雑が生じていることが新たに明らかとなった。

以上のように、本研究ではカワネズミの進化史を詳細に明らかにすることができ、基礎的知見を充実させる多くの新たな考察を得ることができた。また、本研究における遺伝子解析の技術開発により、捕獲などの侵襲的手段を用いることなく、カワネズミ糞サンプル

からのSSR解析による個体識別が可能となった。この手法は、今後遺伝的多様性の評価や行動・生態の究明など幅広い研究に用いることができ、カワネズミ研究の将来的なさらなる進展が期待される。

6. 謝辞

この研究は、柿田川河川生態系研究会ならびに沼津河川国道事務所のご協力、ならびに河川生態学術研究会・千曲川研究グループならびに千曲川河川事務所のご協力のもとに実施した。カワネズミ糞の調査サンプリングを実施した地域のうち、上高地・穂高連峰山麓の溪流などの国立公園特別保護地域（国の特別天然記念物や、国の特別名勝）のようにサンプリングの許認可や立入りの許認可に関しては、関連する省庁から許認可をいただいた。また、信州大学理学部生物科学科と関係大学院に所属する東城研究室の皆さんには現地調査をはじめ、遺伝子解析において支援を頂いた。感謝申し上げる。

7. 引用文献

- 阿部永 (2003) カワネズミの捕獲、生息環境および活動. 哺乳類科学 43:51–65.
- 阿部永 (2011) カワネズミ *Chimarrogale platycephala* の胃内容について. 哺乳類科学 51:311–313.
- Bassiot FC, Labeyrie LD, Vincent E, Quidelleur X, Shackleton NJ and Lancelot Y (1994) The astronomical theory of climate and the age of the Brunhes–Matuyama magnetic reversal. Earth and Planetary Science Letters 126:91–108.
- Bouckaert R, Vaughan TG, Barido–Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A, Heled J, Jones G, Kühnert D, Maio ND, Matschiner M, Mendes FK, Müller NF, Ogilvie HA, Plessis LD, Popinga A, Rambaut A, Rasmussen D, Siveroni I, Suchard MA, Wu CH, Xie D, Zhang C, Stadler T and Drummond AJ (2019) BEAST 2.5: an advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. PLoS Computational Biology 15:e1006650.
- Buchan JC, Archie EA, van Horn RC, Moss CJ and Alberts SC (2005) Locus effects and sources of error in noninvasive genotyping. Molecular Ecology Notes 5:680–683.
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, Robert CP, Marin JM, Balding DJ, Guillemaud T and Estoup A (2008) Inferring population history with DIYABC: a user–friendly approach to Approximate Bayesian Computations. Bioinformatics 24:2713–2719.
- Cornuet JM, Pudlo P, Veyssier J, Dehne–Garcia A, Gautier M, Leblois R, Marin JM, and Estoup A (2014) DIYABC v2.0: a software to make Approximate Bayesian Computation inferences about population history using Single Nucleotide Polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. Bioinformatics 30:1187–1189.
- Daget P (1977) Le bioclimat méditerranéen: analyse des formes climatiques par le système d'Emberger. Vegetatio 32:87–103.
- Drummond AJ and Rambaut A (2007) BEAST: bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology 7:214.

- Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet* 16:551–558.
- Excoffier L and Lischer H (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564–567.
- Fick SE and Hijmans RJ (2017) Worldclim 2: New 1–km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 37:4302–4315.
- Fu Y (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.
- 藤本竜輔・安藤元一・小川博 (2011) カワネズミ *Chimarrogale platycephala* における効率的な捕獲調査方法の検討. *東京農大農学集報* 55:290–296.
- Hardy OJ, Charbonnel N, Fréville H and Heuertz M (2003) Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163:1467–82.
- Hope A, Waltari E, Dokuchaev N, Abramov S, Dupal T, Tsvetkova A, Henttonen H, MacDonald S and Cook J (2010) High-latitude diversification within Eurasian least shrews and Alaska tiny shrews (Soricidae). *Journal of Mammalogy* 91:1041–1057.
- Hudson RR, Slatkin M and Maddison WP (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132:583–589.
- Ichikawa A, Nakamura H and Yoshida T (2005) Mark-recapture analysis of the Japanese water shrew *Chimarrogale platycephala* in the Fujisawa Stream, a tributary of the Tenryu River, central Japan. *Mammal Study* 30:139–143.
- Iwasa MA and Abe H (2006) Colonization history of the Japanese water shrew *Chimarrogale platycephala*, in the Japanese Islands. *Acta Theriologica* 51:29–38.
- 環境省 (2019) 環境省レッドリスト 2019 (第4次). <https://www.env.go.jp/press/106383.html>
- Kawamura Y, Kamei T and Taruno H (1989) Middle and Late Pleistocene mammalian faunas in Japan. *Quaternary Research* 28:317–326.
- Kirov G, Williams N, Sham P, Craddock N and Owen MJ (2000) Pooled genotyping of microsatellite markers in parent-offspring trios. *Genome Research* 10:105–115.
- Librado P and Rozas J (2009) DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–2.
- 増田隆一 (2017) 哺乳類の生物地理学. 東京大学出版会, 東京.
- 松井正文 (2014) レッドデータブック 2014 —日本の絶滅のおそれのある野生動物— 3 爬虫類・両生類. pp130–131. 環境省自然環境局野生生物課希少種保全推進室編. 株式会社ぎょうせい, 東京.
- Metzger MJ, Bunce RGH, Jongman RGH, Sayre R, Trabucco A and Zomer R (2013) A high-resolution bioclimate map of the world: a unifying framework for global biodiversity research and monitoring (Sykes M, Ed.). *Global Ecology and Biogeography* 22:630–638.
- Nei M and Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:5269–5273.

- Nei M and Tajima F (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97:145–63.
- Ohdachi S, Dokuchaev NE, Hasegawa M and Masuda R (2001) Intraspecific phylogeny and geographical variation of six species of northeastern Asiatic *Sorex* shrews based on the mitochondrial cytochrome *b* sequences. *Molecular Ecology* 10:2199–2213.
- Pascual M, Chapuis MP, Mestres F, Balanyà J, Huey RB, Gilchrist GW, Serra L and Estoup A. (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology* 16:3069–3083.
- Peakall R and Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288–295.
- Phillips SJ, Dudík M, Elith J, Graham CH, Lehmann A, Leathwick J and Ferrier S (2009) Sample selection bias and presence-only distribution models: implications for background and pseudo-absence data. *Ecological Applications* 19:181–197.
- Phillips SJ, Anderson RP, Dudík M, Schapire RE and Blair ME (2017) Opening the black box: an open-source release of Maxent. *Ecography* 40:887–893.
- Rambaut A and Drummond A (2007) FigTree. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rannala B and Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:9197–9201.
- Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406–425.
- Sekiya T, Ichianagi H and Tojo K (2017) Establishing of genetic analyses methods of feces from the water shrew, *Chimarrogale platycephalus* (Erinaceidae, Eulipotyphla). *JSM Biology* 2:1010.
- 島田将喜・関口和世・藤原詩織・森貴久 (2018) 東京都奥多摩町サイグチ沢におけるカワネズミの生息確認. 帝京科学大学紀要 14:17–24.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
- Takezaki N, Nei M and Tamura K (2010) POPTREE2: software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with windows interface. *Molecular Biology and Evolution* 27:747–752.
- 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.
- Tanabe AS (2011) Kakusan4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Molecular Ecology Resources* 11:914–921.
- Thompson J, Higgins D and Gibson T (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific

- gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673–4680.
- Title PO and Bemmels JB (2018) ENVIREM: an expanded set of bioclimatic and topographic variables increases flexibility and improves performance of ecological niche modeling. *Ecography* 41:291–307.
- 東城幸治 (2019) カワネズミ糞を用いた非侵襲的遺伝子解析手法の確立：個体識別を可能とするマイクロサテライト・マーカー開発による行動・生態学的研究. 河川財団成果報告書, 23pp.
- Vernes C, Hoban SM, Pecchioli E, Crestanello B, Bertorelle G, Rosà R and Hauffe HC (2016) Ecology, environment and evolutionary history influence genetic structure in five mammal species from the Italian Alps. *Biological Journal of Linnean Society* 117:428–446.
- Waits LP, Luikart G and Taberlet P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* 10:249–256.
- Wilberg MJ and Dreher BP (2004) GENECAP: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture–recapture population estimation. *Molecular Ecology Notes* 4:783–785.
- Wright S (1951) The general structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323–354.
- Yamazaki H, Sekiya T, Nagayama S, Hirasawa K, Tokura K, Sasaki A, Ichiyanagi H and Tojo K (2020) Development of microsatellite markers for a soricid water shrew, *Chimarrogale platycephalus*, and successful individual identification using them. *Genes and Genetic Systems* 95:1–10.
- 横畑泰志・川田伸一郎・一柳英隆 (2008) 増補版食虫類の自然史 7. カワネズミの生態と保全: 最近の知見. *哺乳類科学* 48:175–176.
- Yu Y, Harris A, Blair C and He X (2015) RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): A tool for historical biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 87:46–49.
- Yuan SL, Jiang XL, Li ZJ, Harada M, Oshida T and Lin LK (2013) A mitochondrial phylogeny and biogeographical scenario for Asiatic water shrews of the genus *Chimarrogale*: implications for taxonomy and low-latitude migration routes. *PLoS ONE* 8:e77156.

・助成事業者紹介

東城 幸治

現職: 信州大学学術研究院 理学系 (生物学領域) 教授

・共同研究者

山崎 遥

信州大学大学院 理工学系研究科

(現・九州大学大学院 博士課程 大学院生)

関谷 知裕

信州大学大学院理工学研究科