

## 千葉県栗山川流域で発見されたニホンイシガメとクサガメの交雑種

# The hybrid of *Mauremys japonica* and *Mauremys reevesii* discovered in the Kuriyamagawa River area, Chiba Prefecture

八木 幸市<sup>1)</sup>・松岡 耕二<sup>2)</sup>・佐々木啓子<sup>2)</sup>

Koichi YAGI, Koozi MATUOKA and Keiko SASAKI

九十九里浜平野から太平洋に注ぐ栗山川上流には、千葉県野生生物研究会の調査で日本固有のニホンイシガメ *Mauremys japonica* (以下イシガメ) の生息が確認されている。この地域にはクサガメ *M. reevesii* やミシシippアカミガメ *Trachemys scripta elegans* も生息しており、特にイシガメとクサガメとの交雑が疑われる個体が形態での違いで確認されている。そのため純粋なイシガメの確認のためには形態だけでなくDNAを調べる必要がある。今回、調査で捕獲したカメの血液を採取してDNA解析を行ったところ、C-mos 遺伝子を調べることによりイシガメとクサガメの配列の違いを検出できること、またそれぞれに由来する配列をもった交雑種が存在することが確認できた。

### 1. はじめに

#### 1-1. 調査地の環境

イシガメは爬虫類レッドリスト2006年版では情報不足とされ2012年版では準絶滅危惧種 (NT)<sup>1)</sup> になった。千葉県レッドデータブック2011年改訂版では重要保護生物 (A)<sup>2)</sup> となっており、減少傾向にある生物である。<sup>3) 4)</sup>

本調査を行った地域は栗山川流域の借当川である。借当川は栗山川本流より東部に向かって千葉県匝瑳市方面に分かれた支流河川である (図1)。調査地の直ぐ北側には妙福寺があり寺には妙見信仰がある。古くより地域の人たちはカメを大事にし、農地などで捕まったカメは、妙福寺に奉納され寺にある池で飼われている。また、妙福寺近くには飯高檀林として知られている飯高寺があり、講堂にはカメに乗った妙見菩薩の像が安置されている。この像は江戸初期に造られたことから、<sup>5)</sup> 妙見菩薩が乗るカメは、時代から考えてニホンイシガメと思われる。

調査地からはイシガメの他に、クサガメ、イシガメとクサガメの交雑が疑われる個体、およびミシシippアカミガメの生息が確認されている。<sup>6) 7)</sup> 在来種はイシガメで、ミシシippアカミガメは外来種であり、クサガメも近年外来種であると報告されている。<sup>8)</sup>

### 2. 方法

#### 2-1. 調査方法と形態学的観察

千葉県より「内水面における水産動植物採捕許可」(せんによる採捕許可証：許可番号第1193号) を受けた借



図1. 栗山川支流の借当川にある調査地  
上図の ■ は下総台地の森林を示す

連絡先：松岡耕二 kmatuoka@cis.ac.jp

1) 野生生物研究会

Chiba Wildlife Research Society

2) 千葉科学大学薬学部薬学科

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

(2014年9月26日受付, 2014年12月25日受理)

当川で、カメが行動する5月～10月は、目視調査を行い生息が確認できた場所に、カメ捕獲用の罾カゴに魚のアラとキャットフードを餌として入れ一夜おいた翌日の午前中に網を回収した。罾カゴにはカメが呼吸できるように網の一部が地上まで伸びているタイプ(図2)と、発泡スチロールのウキを入れたタイプ(図3)の2種類を使用した。活動が鈍い11月～4月は手探りで捕獲した。

捕獲されたカメのクサガメは、側頭部や頸に黄色や黄緑色の模様があり、甲板に隆起(キール)が3本あり、背甲後縁が滑らかになっていた。<sup>9)</sup>ニホンイシガメでは、甲板の隆起は1本で、背甲後縁に鋸歯があり、甲羅の色

もクサガメに比べて茶褐色であった。交雑が疑われる個体では側頭部から頸に黄色の模様があり、背甲後縁に鋸歯があり、甲羅の色は茶褐色で両者の特徴を併せ持っていた。(図4, 図5)

捕獲個体の中からDNA解析用にイシガメ(♂1, ♀1)、クサガメ(♂1, ♀1)、外部形態で交雑が疑われる個体(♂1, ♀1)合計6個体(表1)から血液試料を得た。採血には、テルモシリンジ予防接種用1mLにテルモ注射針21G×1 1/2"SBを用いた。腹甲を上にして右後肢付け根から背甲に向け注射し、0.05～0.1mLを採血して直ちに-20℃で冷凍保存した。



図2. 捕獲用罾カゴ

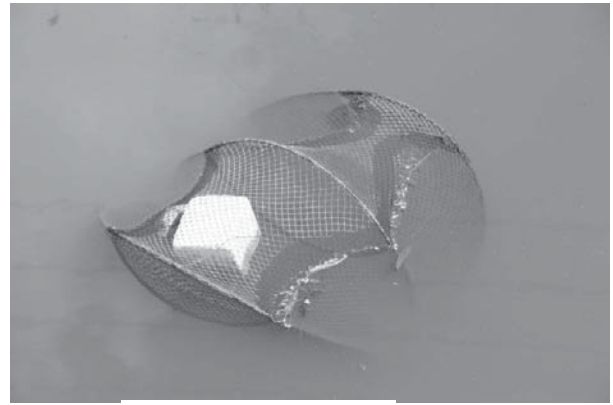


図3. 捕獲用罾カゴ

表1. 分析した個体

解析番号	種名	性別	体重(g)	年齢	採集日	採取方法
a	イシガメ	♂	170	4	2012/11/17	手探り
b	イシガメ	♀	438	5	2013/9/21	罾カゴ
c	交雑個体	♂	88	1	2012/11/17	手探り
d	交雑個体	♀	287	4	2011/1/9	手探り
e	クサガメ	♂	87	2	2012/11/17	手探り
f	クサガメ	♀	504	7	2014/7/5	罾カゴ

※ 体重・年齢推定(亀甲を用いて)は捕獲時のデータである。

## 2-2. 遺伝子解析

冷凍保存した血液試料を用いてC-mos遺伝子の塩基配列を調べた。

(1)血液サンプルからDNA抽出キット(DNeasy,QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。<sup>10)</sup>

(2)DNA抽出後PCR法によりC-mos遺伝子の一部を増幅した。プライマーには、文献10に基づいて

forward側:

CM1 5'-GCCTGGTGCTCCATCGACTGGGA-3'

reverse側:

Cmos3 5'-GTAGATGTCTGCTTTGGGGGTGA-3'

を用いThermal Cyclerで94℃、3分→(94℃30秒、55℃30秒、72℃30秒)30cycle→72℃5分の条件によりPCRを行った。



図4. クサガメ♂・交雑個体♂・イシガメ♂



図5. 交雑個体♂の頭部

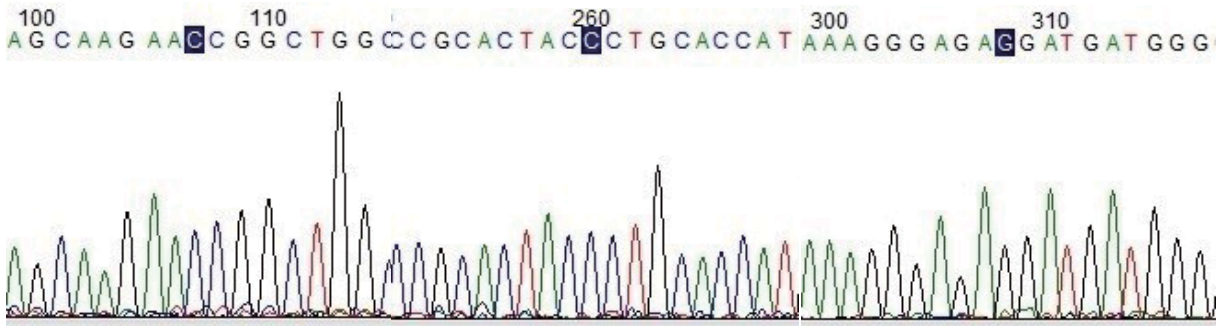


図6. ニホンイシガメ (a) forwardのシーケンスデータ

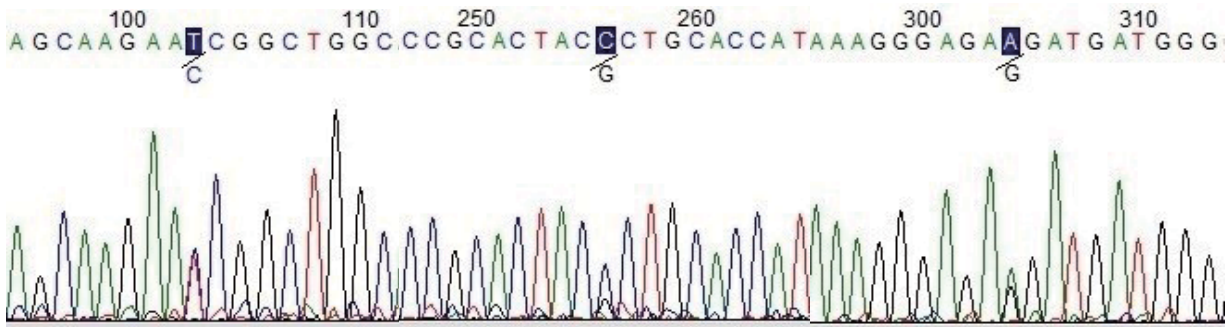


図7. 交雑個体 (c) forwardのシーケンスデータ

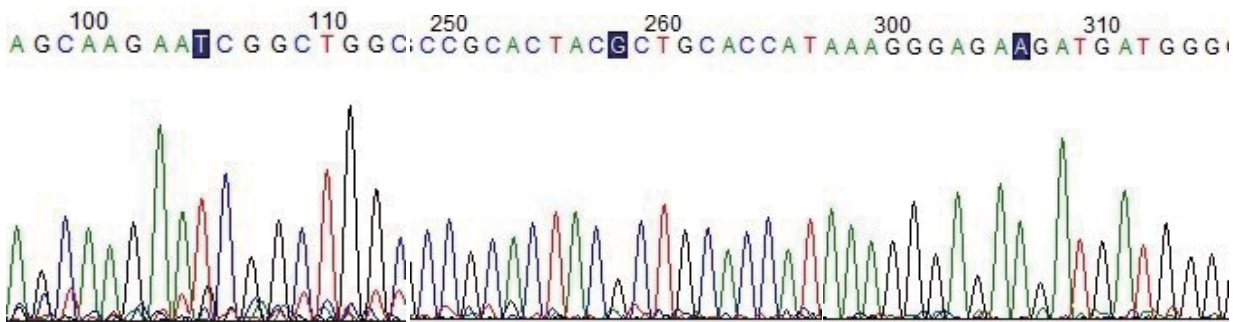


図8. クサガメ (e) forwardのシーケンスデータ



(3) 電気泳動によるPCR増幅産物の確認

アガロースゲル電気泳動により増幅産物のバンドが確認された。

(4) シーケンシング反応

PCR産物から、ジデオキシ法でThermal Cyclerを用い伸長反応を96°C、1分→(96°C 10秒、50°C 5秒、60°C 3分) 20cycle→8°Cの条件で行い、DNA塩基配列決定を行った。

(5) シーケンサーによるDNAシーケンス

反応液をNucleoSEQで精製後シーケンサー(ABI

PRISM 3130 Genetic Analyzer) によりDNAシーケンスを行った。

3. 結果

得られたシーケンシングデータを、DDBJ ClustalWで比較し、違いがあった部分をもとにシーケンスデータを確認し塩基配列を決定した(図6, 図7, 図8)。

C-mos遺伝子の解析した範囲では、イシガメとクサガメで3カ所の塩基配列の違いがあった(表2)。その部分は、forward側でイシガメC-mos遺伝子の解析データの

表2. 違いの検出された塩基配列の部位

			a-107	a-260	a-308
a	ニホンイシガメ	forward	C	C	G
b	ニホンイシガメ	forward	C	C	G
c	交雑個体	forward	T/C	C/G	A/G
d	交雑個体	forward	T/C	C/G	A/G
e	クサガメ	forward	T	G	A
f	クサガメ	forward	T	G	A

			a-276	a-324	a-477
a	ニホンイシガメ	reverse	C	G	G
b	ニホンイシガメ	reverse	C	G	G
c	交雑個体	reverse	C/T	G/C	G/A
d	交雑個体	reverse	C/T	G/C	G/A
e	クサガメ	reverse	T	C	A

a-107等はイシガメ(a)の解析データ forward 107番目等の塩基に対応する部位を示す。

a-276等はイシガメ(a)の解析データ reverse 276番目等の塩基に対応する部位を示す。

T/C、C/T:TとCが両方検出された。

C/G、G/C:CとGが両方検出された。

A/G、G/A:AとGが両方検出された。

eクサガメについては、reverseプライマーでの遺伝子解析は行わなかった。

5'側より107番C・260番C・308番Gに対して、クサガメはT・G・Aで、交雑が疑われた個体は、TとC・CとG・AとGの両方の塩基が確認された。特に、107番と308番に対しては明らかなダブルピークが認められた(図7)。C-mos遺伝子の解析ではreverse側でもクサガメと交雑が疑われた個体では同様な結果が得られた。

4. 考察

借当川の個体で形態だけでなく、核ゲノムに存在するC-mos遺伝子を解析することで交雑の判断ができた。交雑個体はC-mos遺伝子の解析した範囲で、イシガメとクサガメの塩基配列の片方ずつ受け継いでいることが分かった。交雑を疑われる個体で甲羅の形態や色はイシガ

メ・頭部から頸はクサガメに近いという両種の特徴を持つものは、遺伝子的にも両種の雑種であることが判った。DNA解析を通して得られたデータから、ヒトが持ち込んだ外来生物により、在来生物との間に交雑個体を生じることが確認できた。これは、純粋な在来種が減っていくことになり、在来種への影響が大きいことを示している。

## 5. おわりに

現地調査と遺伝子解析の結果、イシガメ・クサガメと両種の交雑個体の生息が確認できた。調査の際捕獲したイシガメ以外の個体は調査地に戻さず回収した。この回収を今後も継続していきイシガメの個体群の維持に繋がるか経過を観察していきたい。

今後は、捕獲したイシガメと交雑個体全ての遺伝子解析を実施し確認をしたい。さらに、捕獲された個体のC-mos遺伝子以外の部分の解析も行い純粋なイシガメ個体を確認したい。遺伝子解析を行うとともに、詳しい生息状況も把握しイシガメの保護活動に繋げていきたい。

## 謝辞

解析のご指導をいただいた九州大学持続可能な社会のための決断科学センター鈴木大先生、カメの採取調査を行った千葉県野生生物研究会の千葉県立検見川高等学校小賀野大一先生・千葉県立市原八幡高等学校笠原孝夫先生・千葉県立船橋高等学校田中一行先生・千葉県立銚子高等学校吉野英雄先生・市立船橋高等学校對島浩二先生に感謝いたします。また、DNA解析実習に快く参加してくれた敬愛大学八日市場高等学校と横芝敬愛高等学校の生徒に感謝いたします。この研究は、2013年度武田科学振興財団の奨励金により実施しました。

## 参考文献

- 1) レッドデータブック／リスト：環境省生物多様性情報システム, 2014. [http://www.biodic.go.jp/rdb/rl2012/redList2012\\_hachurui.csv](http://www.biodic.go.jp/rdb/rl2012/redList2012_hachurui.csv) (参照2014-09-15)
- 2) 長谷川雅美：千葉県の保護上重要な生物－千葉県レッドデータブック－動物編、千葉県環境部自然保護課：132, 2011
- 3) 鈴木 大・疋田 努：ニホンイシガメの地理的変異。日本の淡水カメ記録'亀楽'4-5, 2011.
- 4) 小賀野大一：房総半島におけるニホンイシガメの危機。第14回日本カメ会議&ニホンイシガメシンポジウム講演要旨集, 2012
- 5) 飯高寺資料について, 2012.11

<http://www.city.sosa.lg.jp/index.cfm/18,24684,c,html/24684/20121109-100839.pdf> (参照2014-09-15)

- 6) 小賀野大一：房総半島におけるニホンイシガメの現状と保護への試み。第22期プロ・ナトゥーラ・ファンダ助成成果発表会要旨集。日本自然保護協会, 2012
- 7) 小賀野大一・吉野英雄・八木幸市・田中一行・笠原孝夫：房総半島のため池に生息するニホンイシガメの危機的状況。日本爬虫両棲類学会第52回大会, 2013
- 8) 鈴木 大：クサガメ日本集団の外来性について。第14回日本カメ会議&ニホンイシガメシンポジウム講演要旨集, 2012
- 9) 富田京一：日本のカメ・トカゲ・ヘビ2007.7.15
- 10) LE, M., C. J. RAXWORTHY, W. P. MCCORD, AND L. MERTZ: A molecular phylogeny of tortoises (Testudines: Testudinidae) based on mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40:517-531, 2006