

二子山山系で捕獲されたイノシシの DNA 解析

高橋 遼平・本郷 一美

Ryohei Takahashi and Hitomi Hongo: DNA Analysis of Wild Boar Hunted in the Futagoyama Mountain Area

Abstract. We carried out DNA analysis of wild boar (*Sus scrofa*) hunted in the Futagoyama mountain area, in Miura Peninsula in southern Kanto. The molecular phylogenetic characteristic of the wild boar was genetically close to those of the Asian *Sus scrofa* lineages including Japanese wild boar (*S. s. leucomystax*). Furthermore, it was suggested that this wild boar has a previously unknown sequence type of Glucosephosphate isomerase - processed pseudogene.

はじめに

ニホンイノシシ (*Sus scrofa leucomystax*) は野生イノシシの 1 亜種で、本州や四国、九州に広く分布する。近年は各地で分布拡大や個体数増加が指摘され、それに伴う農作物被害が報告されている (大東・伊藤・神崎, 1998; 小寺ほか, 2001 など)。また飼育下の家畜ブタや家畜ブタとイノシシの交雑種 (イノブタ) が逃走、もしくは人為的に放逐され野生ニホンイノシシ集団と交雑する事も問題視されている。日本の野生イノシシ集団の

遺伝的特徴が変化する事や (遺伝子汚染, 遺伝子移入), 多産性や成熟速度等が改良された家畜ブタ由来の遺伝子が野生集団に導入される可能性が懸念されるためである。

神奈川県ではニホンイノシシは丹沢や箱根などの県西部に生息し、本稿で対象とする葉山町を中心に広がる二子山山系 (図 1) では分布が確認されていなかった (神奈川県, 2011)。しかし 2013 年 3 月頃からイノシシのものと思われる足跡や、タケノコなどの農作物被害、泥浴びをしたような痕跡 (ヌタ場) が確認され、その存在が指摘されはじめた (二子山山系自然保護協議会 三井修氏私信, 2013 年 5 月 26 日)。2014 年には実際にイノシシが捕獲され、その存在が明らかとなった (図 2, 3)。二子山山系へのイノシシ移入の原因の 1 つに野生集団の分布拡大が考えられるが、二子山山系と元来の生息地である県西部を繋ぐ連続的なイノシシの目撃・捕獲情報は現状では確認されない^{注*1}。従って人為的移入の可能性もあり、この場合は二子山山系の個体がイノブタか検討する事も必要となる。

イノブタの検出法としては DNA 解析が有効であり、細胞小器官であるミトコンドリア内のミトコンドリア DNA (mtDNA) D-loop 領域や核 DNA である Glucosephosphate isomerase - processed pseudogene (*GPIP* 遺伝子) の塩基配列の特徴が調べられてきた (以下、この特徴を mtDNA では配列タイプ、*GPIP* 遺伝子では対立遺伝子と呼ぶ) (Giuffra *et al.*,



図 1. 二子山山系の概略位置図。二子山山系の詳細な範囲は神奈川県ホームページ内「二子山山系自然保護共同事業について」の地図を参照されたい。
(URL: <http://www.pref.kanagawa.jp/cnt/f370376/>)

2000; Ishiguro *et al.*, 2002)。ニホンイノシシについても各地で解析が行われており、東京都や愛媛県、群馬県の集団からはニホンイノシシが元来持たず、ヨーロッパ系統の家畜ブタ由来と考えられる mtDNA 配列タイプや *GPIP* 遺伝子の対立遺伝子が検出され、イノブタの存在が示された（遠竹ほか, 2003; Ishiguro and Nishimura, 2005; 高橋ほか, 2010&2011）。

本稿では二子山山系で捕獲された個体がニホンイノシシかイノブタか確認するため、上述の mtDNA と *GPIP* 遺伝子を解析した。また解析により新たに検出された *GPIP* 遺伝子の対立遺伝子の意義についても考察した。なお、神奈川県内で捕獲されたイノシシの mtDNA と *GPIP* 遺伝子の配列決定は本稿が初となる。

試料と方法

2014年4月18日に二子山山系内（葉山町上山口の山中）で捕獲されたメスのイノシシの DNA 解析を行った。本個体の体長は 120cm、体重は 80 kg で（二子山山系自然保護協議会 三井修氏私信, 2014年7月24日）、毛色は野生型（Agouti）と考えられる（図2, 3）。「尾が巻く」「耳が垂れる」等の家畜化により生じ



図2. 2014年4月18日に捕獲されたイノシシ-1.
二子山山系自然保護協議会 三井修氏からの写真提供.



図3. 2014年4月18日に捕獲されたイノシシ-2.
二子山山系自然保護協議会 三井修氏からの写真提供.

るような外貌変化は見受けられない（Trut, 1999）。本個体の肋骨付近と寛骨付近から肉片を採取し、それぞれ Futago1, Futago2 という試料番号を与えた。同一個体から 2 試料を採取した理由は、解析作業を 2 度繰り返す事で解析結果の再現性を確認するためである。

まず採取した肉片よりフェノール・クロロホルム法にて DNA を抽出した。DNA 抽出は Proteinase K によるタンパク質分解時の温度を 56°C に変更した以外は高橋ほか（2010）に準じた。続いて polymerase chain reaction (PCR) により、mtDNA D-loop 領域と *GPIP* 遺伝子の塩基配列を増幅した。mtDNA D-loop 領域の PCR 増幅には mitL112 と mitH106（Watanobe *et al.*, 2001; Ishiguro *et al.*, 2002）、*GPIP* 遺伝子の増幅には GPIP1 と GPIP4（Giuffra *et al.* 2000）というプライマーを用いた。PCR 条件は高橋ほか（2011）に準じた。PCR 産物中の過剰プライマーを ExoSAP-IT（Affymetrix）で除去後、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定し、データベース GenBank に登録されている塩基配列情報と比較した。この比較では二子山山系のイノシシの mtDNA 配列タイプと *GPIP* 遺伝子の対立遺伝子が世界のどのイノシシや家畜ブタで見つかっているか確認した。

結果

mtDNA D-loop 領域の解析では 592bp の塩基配列を決定した。Futago1 と Futago2 の両方とも同じ塩基配列であり、再現性が確認された。決定した塩基配列をデータベースの情報と比較した結果、二子山山系の個体は Watanobe *et al.* (2003) で J8 と呼ばれている配列タイプと同じものであった。J8 はニホンイノシシに特徴的な配列タイプで、群馬県（14/138 個体）や静岡県（5/10 個体）の野生集団から検出されている（Watanobe *et al.*, 2003; 高橋ほか, 2010&2011）。遠竹ほか（2003）でも J8 を持つと考えられるニホンイノシシが東京都西部で確認されている（65/125 個体）。

GPIP 遺伝子の解析では 762bp の塩基配列を決定した。mtDNA 解析と同様に、Futago1 と Futago2 の解析で再現性が確認された。先行研究（Ishiguro *et al.*, 2002）やデータベースの情報と比較した結果、二子山山系の個体は *GPIP*3a/GPIP*3a* という遺伝子型と相関性が高かった（表）。*GPIP*3a* はアジア系統のイノシシや家畜ブタに特徴的な対立遺伝子で、ニホンイノシシからも多く確認されている。先行研究では九州や四国、群馬県のニホンイノシシで *GPIP*3a* が検出されている（Ishiguro *et al.*, 2002; Ishiguro and Nishimura, 2005; 高橋ほか, 2011）。ただし二子山山系の個体は、塩基配列の一部が失われている（塩基の欠失がある）点で *GPIP*3a* とは異なっていた（表、第 626 番塩基座位のシトシン (C) の欠失）。Futago1 と Futago2 の解析で再現性を確認したほか、同一機器で共に解析した別系

表. *GPIP* 対立遺伝子の情報

		塩基座位番号 ^{*1, *2}									
		1	1	2	3	3	3	4	5	6	7
対立遺伝子 / 試料番号		8	8	2	1	8	8	1	4	2	6
		1	8	5	6	8	9	5	4	6	1
アジア型	<i>GPIP</i> *1	G	G	G	A	G	A	C	C	C	G
	<i>GPIP</i> *3	A	T	T	.	.	T
	<i>GPIP</i> *3a	A	A	.	.	.	T	T	.	.	.
	Futago1, Futago2 ^{*3}	A	A	.	.	.	T	T	.	-	.
ヨーロッパ型	<i>GPIP</i> *4	A	.	A	G	C	T	T	A	.	.

*1. 塩基座位番号は Giuffra *et al.* (2000) の Figure 3 に準じた。

*2. 「・」は *GPIP**1 と同一の塩基である事を、「-」は塩基の欠失を示す。
また空欄は塩基配列の情報が存在しない事を示す。

*3. 同一個体の別部位から採取した肉片を用いて再現性を確認した。

統のイノシシではこの変異が見られなかった事から、機器のエラーが塩基の欠失の原因とは考えにくい。この塩基の欠失は先行研究では報告されておらず、二子山山系のイノシシが新規の対立遺伝子を持つ可能性が示唆された。

考察

mtDNA D-loop 領域と *GPIP* 遺伝子を対象に、二子山山系で捕獲されたイノシシを解析した。世界のイノシシや家畜ブタは、上述した2つのDNAマーカーによってアジア型とヨーロッパ型に大別される (Okumura *et al.*, 2001)。日本に生息するニホンイノシシは本来アジア型に属すが、日本に流通する家畜ブタの多くは欧米品種を改良したもので、基本的にヨーロッパ型に属す (Giuffra *et al.*, 2000 など)。従って過去にニホンイノシシと家畜ブタが交雑した場合、ニホンイノシシからヨーロッパ型の遺伝的特徴が検出される可能性がある。

mtDNA の解析の結果、二子山山系の個体はアジア型に属し、かつニホンイノシシに特徴的である J8 という配列タイプを保持していた。また *GPIP* 遺伝子の解析では新規の塩基配列が検出され、アジア型に属す *GPIP**3a という既報の対立遺伝子と遺伝的に近縁である事が伺えた (表)。これらの解析結果から、二子山山系の個体はアジア型の遺伝的特徴を持つ事に加え、ニホンイノシシである可能性が高いと考えられた。ただし家畜ブタやイノブタがニホンイノシシ集団内で何世代かにわたり交雑した場合、子孫によっては mtDNA も *GPIP* 遺伝子もニホンイノシシの遺伝的特徴に置き換わる事がある。集団内にイノブタがいる可能性を詳細に検討するには、被解析個体数の増加や他の DNA マーカーによる解析も必要である。

解析結果が示唆する通り二子山山系の個体がニホンイノシシである場合、外部地域から二子山山系へニホンイノシシが移入した事になる。移入の理由 (野生集団の移

動、人為的な放逐) に関わらず「どこから、どこを通過して」という来歴の解明は今後の対策に有用である。しかしイノシシの移入を DNA 解析から考える際は、各地域集団の配列タイプや対立遺伝子の頻度を反映し得るだけの被解析個体数が必要となる。本稿で得た mtDNA 配列タイプ (J8) が県外の複数地域で確認される点からも、1 個体のみを扱った本解析結果をもとにその来歴を特定する事は難しい。ただし今後県内のイノシシ集団の mtDNA 配列タイプの頻度が把握できれば、今回検出した J8 が県内で一般的か確認できるため、移入源が県内か県外か検討できるかもしれない。また本解析では過去に報告のない *GPIP* 遺伝子の対立遺伝子を検出した。著者らは群馬県のニホンイノシシでもこの対立遺伝子を検出しているが、96 個体のうち 2 個体と非常に頻度は低かった (投稿準備中)。今後県内外の集団の *GPIP* 遺伝子解析が進み、この新しい対立遺伝子がどの地域のイノシシ集団に高頻度で検出されるか判明すれば、二子山山系のイノシシの来歴を議論できる可能性がある。

本稿で解析したイノシシはメスで、捕獲時には複数頭の幼獣が確認されている。2014 年 10 月初旬には複数頭のイノシシが再確認され (二子山山系自然保護協議会 三井修氏私信, 2014 年 10 月 26 日)、幼獣が成長した可能性や他地域からのイノシシ移入の繰り返し懸念される。また近年は横須賀市でもイノシシの目撃情報が報告されている (横須賀市, 2014)。二子山山系と横須賀市のイノシシが同一個体 (集団) かは不明だが、これらの地域を起点に個体数の増加や分布域が拡大する可能性もある。二子山山系は自然観察や農業等の活動の場として活発に利用される緑地で、近隣には小学校等もあるため、緑地保全や安全対策といった観点からも対策が必要である。今後、二子山山系を含む県内のイノシシの DNA 解析が継続し、その遺伝的特徴の変化が経時的に把握されれば「二子山山系に移入したイノシシは元々何系統いたのか」「新しく別系統が移入しているか」「県内の他の地域でも外部移入は生じているか」「それらの来

歴は」といった評価が可能となり、県内を舞台としたイノシシの外部移入や分布変化といった問題の対策に貢献できるであろう。

謝 辞

二子山山系自然保護協議会の三井修氏・室伏多門氏に試料採取や現地情報の提供等の方でご協力頂きました。また神奈川県環境農政局水・緑部自然環境保全課、神奈川県横須賀三浦地域県政総合センター環境部 みどり課、横須賀市環境政策部自然環境共生課、鎌倉市環境部環境保全課動物保護管理担当、茅ヶ崎市環境部 環境保全課生活環境担当、藤沢市環境部環境保全課からは周辺地域のイノシシの目撃・捕獲情報について有力な情報をご提供いただきました。記して深く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- Giuffra, E., J. M. H. Kijas, V. Amarger, O. Carlborg, J. T. Jeon & L. Andersson, 2000. The origin of the domestic pig: Independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*, **154**: 1785-1791.
- Ishiguro, N., Y. Naya, M. Horiuchi & M. Shinagawa, 2002. A genetic method to distinguish crossbred Inobuta from Japanese wild boars. *Zoological Science*, **19**: 1313-1319.
- Ishiguro, N. & M. Nishimura, 2005. Genetic profile and serosurvey for virus infections of Japanese wild boars in Shikoku Island. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **67**(6): 563-568.
- 小寺祐二・神崎伸夫・金子雄司・常田邦彦, 2001. 島根県石見地方におけるニホンイノシシの環境選択. *野生生物保護*, **6**(2): 119-129.
- 大東・伊藤絵理子・神崎伸夫, 1998. 近・現代のニホンイノシシの個体群トレンド. *野生生物保護*, **3**(2): 95-105.
- Okumura, N., Y. Kurosawa, E. Kobayashi, T. Watanobe, N. Ishiguro, H. Yasue & T. Mitsuhashi, 2001. Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs. *Animal Genetics*, **32**: 139-147.
- 高橋遼平・石黒直隆・姉崎智子・本郷一美, 2010. 群馬県に生息するニホンイノシシの mtDNA D-loop 領域および GPII 遺伝子の多型解析. *群馬県立自然史博物館研究報告*, **14**: 37-44.
- 高橋遼平・石黒直隆・姉崎智子・本郷一美, 2011. 群馬県に生息するニホンイノシシの DNA 解析. *群馬県立自然史博物館研究報告*, **15**: 129-136.
- 遠竹行俊・宮崎亜紀子・青塚正忠, 2003. 東京都西部におけるニホンイノシシ個体数増加の原因について. *東京都林業試験場年報*, 平成 15 年 (2003) 年度版: 51-52.
- Trut, L. N., 1999. Early Canid Domestication: The Farm-Fox Experiment: Foxes bred for tamability in a 40-year experiment exhibit remarkable transformations that suggest an interplay between behavioral genetics and development. *American Scientist*, **87**(2): 160-169.
- Watanobe, T., N. Ishiguro, N. Okumura, M. Nakano, A. Matsui, H. Hongo & H. Ushiro, 2001. Ancient mitochondrial DNA reveals the origin of *Sus scrofa* from Rebuton Island, Japan. *Journal of Molecular Evolution*, **52**: 281-289.
- Watanobe, T., N. Ishiguro & M. Nakano, 2003. Phylogeography and population structure of the Japanese wild boar *Sus scrofa leucomystax*: Mitochondrial DNA variation. *Zoological Science*, **20**: 1477-1489.
- 神奈川県, 2011. 神奈川の鳥と獣 神奈川県鳥獣生息分布調査報告書(平成 4 年 3 月)(抜粋). 神奈川県. Online. Available from internet: <http://www.pref.kanagawa.jp/cnt/f986/p10095.html> (downloaded on 2014-07-01)
- 横須賀市, 2014. イノシシを見つけたらご注意ください. 横須賀市環境政策部自然環境共生課. Online. Available from internet: <http://www.city.yokosuka.kanagawa.jp/4115/inoshishi2.html> (downloaded on 2014-10-31)

注 釈

- *1…周辺地域にイノシシがいるかどうかは、野生集団の分布拡大を検討するうえで重要な情報である。研究活動を通じ二子山山系の周辺諸地域で「イノシシを見た」「イノシシの足跡を見た」といった情報を耳にする事があった。しかし複数機関(謝辞を参照)にご協力頂き事実確認をした結果、引用文献や私信といった形で公表できる事例は把握できなかった。噂や伝聞ではイノシシの目撃情報が存在するため今後も調査が必要だが、現時点(2014年8月)では情報の信憑性は低いと判断した。

高橋遼平：山梨大学医学部法医学講座

本郷一美：総合研究大学院大学先導科学研究科