Environment Research and Technology Development Fund

**環境研究総合推進費　終了研究成果報告書**

# 4-2002　両生爬虫類をモデルとした希少種選定の基礎資料整備と保全対象種の簡易同定法の確立およびそれらのワークフローの提案

(JPMEERF20204002)

令和２年度～令和４年度

Construction of cost-effective workflows enabling development of simplified identification tools and designation of endangered species of amphibians and reptiles

<研究代表機関>
琉球大学

<研究分担機関>
京都大学
東海大学
千葉県立中央博物館

○図表番号の付番方法について
「Ⅰ．成果の概要」の図表番号は「０．通し番号」としております。なお、「Ⅱ．成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。
「Ⅱ．成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号．通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和５年５月

目次

I. 成果の概要 ・・・・・・・・ 1
１．はじめに（研究背景等）
２．研究開発目的
３．研究目標
４．研究開発内容
５．研究成果
５－１．成果の概要
５－２．環境政策等への貢献
５－３．研究目標の達成状況
６．研究成果の発表状況
６－１．査読付き論文
６－２．知的財産権
６－３．その他発表件数
７．国際共同研究等の状況
８．研究者略歴

Ⅱ．成果の詳細
Ⅱ－１　未整理な点が残る絶滅危惧種の分類の整理 ・・・・・・・・ 11
（千葉県立中央博物館）
要旨
１．研究開発目的
２．研究目標
３．研究開発内容
４．結果及び考察
５．研究目標の達成状況
６．引用文献

Ⅱ－２　国内希少種およびその予備群の脆弱性評価 ・・・・・・・・ 21
（琉球大学）
要旨
１．研究開発目的
２．研究目標
３．研究開発内容
４．結果及び考察
５．研究目標の達成状況
６．引用文献

Ⅱ－３　DNAバーコーディング・ライブラリの構築 ・・・・・・・・ 30
（琉球大学）
要旨

１．研究開発目的
２．研究目標
３．研究開発内容
４．結果及び考察
５．研究目標の達成状況
６．引用文献

Ⅱ－４　LAMP法など、簡便法による希少種の同定法の確立　・・・・・・・・　40
（京都大学）
要旨
１．研究開発目的
２．研究目標
３．研究開発内容
４．結果及び考察
５．研究目標の達成状況
６．引用文献

Ⅱ－５　AIを使った画像認証に基づく同定ツールの開発　・・・・・・・・　47
（東海大学）
要旨
１．研究開発目的
２．研究目標
３．研究開発内容
４．結果及び考察
５．研究目標の達成状況
６．引用文献

Ⅲ．研究成果の発表状況の詳細　・・・・・・・・　57

Ⅳ．英文Abstract　・・・・・・・・　61

## I. 成果の概要

課題名　　4-2002 両生爬虫類をモデルとした希少種選定の基礎資料整備と保全対象種の簡易同定法の確立およびそれらのワークフローの提案

課題代表者名 戸田　守　（琉球大学熱帯生物圏研究センター　准教授）

重点課題　　主：【重点課題１３】生物多様性の保全に資する科学的知見の充実や対策手法の技術開発に向けた研究

行政要請研究テーマ（行政ニーズ）　（４－３）絶滅危惧種の新種記載及び国内希少野生動植物種の同定の簡便化に対応するDNAバーコード･ライブラリの充実促進に向けた研究

研究実施期間　令和２年度～令和４年度

研究経費
93,539千円（合計額）
（各年度の内訳：令和２年度：36,355千円、令和３年度：32,649千円、令和４年度：24,535千円）

研究体制
（サブテーマ１）未整理な点が残る絶滅危惧種の分類の整理（千葉県立中央博物館）
（サブテーマ２）国内希少種およびその予備群の脆弱性評価（琉球大学）
（サブテーマ３）DNAバーコーディング・ライブラリの構築（琉球大学）
（サブテーマ４）LAMP法など、簡便法による希少種の同定法の確立（京都大学）
（サブテーマ５）AIを使った画像認証に基づく同定ツールの開発（東海大学）

研究協力機関
研究協力機関はない。

本研究のキーワード　分類、種同定、塩基配列データ、LAMP法、AI画像、両生類、爬虫類

## １．はじめに（研究背景等）

生物多様性の低下は、いまや地球環境の持続的な維持･利用を脅かす問題のひとつと認識されており、生物多様性条約でも種の絶滅の防止が重要な課題として掲げられている。この課題に向けた環境行政による主な取り組みとして､レッドリストの作成･更新と種の保存法による絶滅危惧種の保全が挙げられ、ともに生物多様性保全に大きく貢献している。しかし、前者に関しては、絶滅リスクの情報が十分でない種も少なくないなど、掲載種の選定に課題を残している。一方後者は、未記載種を対象にできないという問題や、実際に捕獲規制がなされている種でも同定が容易でない場合があるなどの問題を残している。この問題は、特に取り締まりの現場で顕在化しており、違法採集者の一部は意図的にこの弱点をついている悪質なケースも見受けられる。

DNAバーコーディングによる種の同定は、こういった問題を解決しうる極めて有望な方法である。しかし、DNA配列を決定して種の帰属を知ろうとしても、参照データが十分に充実していないと正しく機能しない。そのため、網羅的なDNAバーコーディング・ライブラリの整備は、保全生物学の重要な課題の一つである。とはいえ、その構築に付随する幾つかの課題がある。ひとつは、ライブラリの単位とな

る種の認識が必ずしも十分でないことである。既知種全種のDNA配列情報を揃えたとしても、未知の種がたくさん残っていれば、やはりDNAバーコーディングによる同定には問題が生じる。もう一つは大型ライブラリ構築のための作業の効率化である。膨大な数の種を広くカバーしようとすれば、効率の問題は非常に重要である。

ところで、例えDNAバーコーディングが強力な種同定のツールだとしても、実際にDNAの塩基配列を得て種の検索をするにはそれなりの知識や時間が必要である。希少種の同定が、パトロールや税関など、違法採集・所持・輸出入などの取り締まりの現場で即座に行われるべきことを考えると、たとえライブラリが整備されていたとしても、塩基配列決定までを必要とするDNAバーコーディングは手間がかかりすぎる。もっと簡便な検査キットのように、DNA情報を使いながらも短時間で結果のでるツールの開発が望まれる。さらに、市民による監視を考えた場合には、そういった検査の前の一次スクリーニングや、そもそも違法採集等が行われにくい地域づくり、あるいは市民参加型の希少種のモニタリングの促進に向け、DNA分析を伴わない高度に簡便化された同定ツールの開発・導入も強く望まれる。

## ２．研究開発目的

上述した背景に鑑み、このプロジェクトでは、両生爬虫類をモデルに、保全の基本単位としての分類群を正しく認識したうえで、ゲノム解析によって絶滅に対する脆弱性を評価して、レッドリスト掲載種の選定、カテゴリーの見直し、希少野生動植物種の選定に活用できる情報を提示する。また、その一連の方法論を確立し、提案する。それと並行して、今後のゲノム解析による多様性評価、脆弱性評価の基礎資料として、国内両生爬虫類の代表的なグループのドラフトゲノム配列を決定し、追従研究を促進する。また、同じく両生爬虫類をモデルに国内の現存種全てのミトコンドリアDNAの全周配列を決定し、DNAバーコーディング用の参照情報を揃える。それを参照して任意の配列に対して同定結果を返せる体制を整え、違法採集・違法保持の取り締まりから環境DNA分析に至る様々な用途での種同定をサポートするシステムを構築・公表する。得られた情報の一部はBOLD (Barcode of Life Data System)に登録し、世界規模での配列参照システムの拡充に貢献する。また、mtDNA全周配列決定では効率性を追求し、費用対効果の高い方法を確立・提案するとともに、コストも算出して、追従研究の促進を図る。さらに、幾つかの希少種を対象に、塩基配列決定によらない簡便なDNA分析による種の同定法、さらに簡便なAI学習を用いた生物の画像に基づく同定法を確立し、一部を社会実装することで、違法行為を抑止する。また、それらの研究開発のプロセスをまとめて公表し、追従研究・追従事業を促進する。

## ３．研究目標

| | |
|---|---|
| 全体目標 | 国産両生爬虫類をモデルに、希少種選定の基礎となる種分類の見直しと絶滅リスク評価を行ったうえで、DNAによる同定の基盤となるデータベースを整備し、さらに取り締まりの現場に実装できる簡便な同定ツールを開発する。また、データベースの整備では効率化を追求し、他の分類群に応用できるワークフローを提案する。 |

| | |
|---|---|
| サブテーマ１ | 未解決な点が残る絶滅危惧種の分類の整理 |
| サブテーマリーダー/所属機関 | 栗田隆気/千葉県立中央博物館 |
| 目標 | 分類学的問題が残り、かつ潜在的に絶滅リスクが高い種を含むことが想定される10の種群についてDNA分析と形態形質分析を進め、学名の整理を行う。また、命名行為にまで踏み込めないものに関しても主要な保全単位を認識し、他の４つサブテーマに基礎情報を提供する。 |

| | |
|---|---|
| サブテーマ２ | 国内希少種およびその予備群の脆弱性評価 |
| サブテーマリーダー/所属機関 | 佐藤行人/琉球大学 |
| 目標 | 国産の両生爬虫類およそ60属を代表する種についてドラフトゲノムを決定し、特に希少種を含むグループに着目して希少種ゲノム・データベースを構築する。また、保全上重要と思われる種および希少性について情報が不足している種ないし種群に対して縮約ゲノム解析、あるいは全ゲノム解析を行い、遺伝多様性とその継時的変動を推定し、保全上の脆弱性を評価する。 |

| | |
|---|---|
| サブテーマ３ | DNAバーコーディング・ライブラリの構築 |
| サブテーマリーダー/所属機関 | 戸田守/琉球大学 |
| 目標 | 外来種を含む国産の全種200種あまりについてミトコンドリアの全長配列を決定し、データベース化するとともに、任意の配列との相同性検索をする自動化された解析パイプラインを構築する。また、データベース構築では効率性を追求し、そのワークフローを提示するとともにかかるコストについてもデータを提供する。 |

| | |
|---|---|
| サブテーマ４ | LAMP法など、簡便法による希少種の同定法の確立 |
| サブテーマリーダー/所属機関 | 西川完途/京都大学 |
| 目標 | サブテーマ１～３から提供された情報を利用しつつ、商取引で問題になる少なくとも５つの種群（トカゲモドキ類、セマルハコガメ類、ミナミイシガメ類、小型サンショウウオ類、オオサンショウウオ類）に対して塩基配列決定によらない簡便なDNA同定ツールの開発を進め、取り締まりの現場に実装するためキット化する。 |

| | |
|---|---|
| サブテーマ５ | AIを使った画像認証に基づく同定ツールの開発 |
| サブテーマリーダー/所属機関 | 鈴木大/東海大学 |
| 目標 | サブテーマ１～３から提供された情報を利用しつつ、商取引で問題になる少なくともセマルハコガメ類、トカゲモドキ類、オオサンショウウオ、ダルマガエル類、カナヘビ類の５つの種群に対して画像認証による簡易同定ツールの開発を進め、その一部を取り締まりと市民活動の現場に実装する。 |

**４．研究開発内容**

本研究では、研究・調査から違法売買の取り締まりに至るあらゆる場面で生物多様性保全の基礎となる希少種の同定に焦点をあて、日本産の両生爬虫類を対象に、同定の対象となる種分類の見直し、希少種選定の基礎となる希少性・脆弱性の評価、DNAバーコーディング・ライブラリの構築、塩基配列決定を伴わない簡便なDNA同定法の開発、さらに簡便なAI画像認証による同定法の開発に取り組んだ。

サブテーマ１は種分類の見直しを担当した。特に、希少種や、分布域の狭さから潜在的に絶滅リスクが高そうな種を含む分類群、分類学的情報が限られていて種の帰属が明確でないものを対象とし、DNA

分析や形態形質分析を通して分類を整理した。未記載種の一部は記載まで進め、そうでないものも保全単位として整理した。サブテーマ２では、希少種あるいは潜在的に絶滅リスクが高い可能性のある種を対象に全ゲノム解析や縮約ゲノム解析を行い、集団構造を解明して保全の単位を整理するとともに、それらの遺伝的多様性を解析して、絶滅に対する脆弱性を評価した。また、ゲノムワイドな分析により、そのような評価がどの程度少数の標本によって可能かを検討した。国産両生爬虫類の各属を代表する種について全ゲノム解析を行い、参照情報を整えた。その際、保全上の優先度、属内の種多様性、国内での分布などをもとに参照情報の有用性を検討し、一部の属は解析を見送った。サブテーマ３では、日本国内に生息する両生類と爬虫類全種を網羅するDNAバーコーディング・ライブラリの構築をした。様々な状況、用途に対応できるよう調節領域を除くミトコンドリアDNAの全長配列を対象にした。また、得られた配列情報に基づき、新たなDNAバーコーディング領域を提案した。さらにライブラリ構築のためのワークフローとかかったコストをまとめ、今後の同様な取り組みに対し、基礎情報を提供した。サブテーマ４では、実際に保全の現場で同定がネックになっている数種を取り上げ、それらに対して、LAMP法など、シーケンスによらない簡易なDNA分析による同定法を開発した。また、違法販売取締りの現場での使用を念頭におき、試料の採取についても簡略化した方法を検討した。サブテーマ５では、さらに簡易な方法として、AI画像認証による種の同定ツールの開発を行った。画像認証により、生物を撮影して種名を返すシステムはすでに幾つかあるが、ここでは、類似種がいて、同定が容易でないために即座に効果的な対応・対策ができない希少種を対象とし、その分類群に特化した同定ツールの開発をした。

## ５．研究成果

### ５－１．成果の概要

日本産両生爬虫類のなかで分類学的に未解決な問題に取り組み、また、保全優先度の高い種ないしは集団を認識する分析を行った。さらに、この分類群の専門家でなくとも同定が可能なように、DNAバーコーディングライブラリを構築したうえで、保全対策の上で具体的に問題になっている幾つかの分類群に焦点をあて、より簡便な同定ツールを開発した。

サブテーマ１では、潜在的な絶滅危惧種を含む可能性が高い日本産両生爬虫類の18の種・種群あるいは集団に対して分類学的な検討を加え、少なくとも８種の未記載種の存在を確認し、このうち２種を記載した。一方、セマルハコガメの亜種分割や、尖閣諸島のアカマダラなどについては、現行の分類学的認識の妥当性を確認した。タシロヤモリの外来性を示し、また宮古島のセマルハコガメの外来集団の分類学的帰属を明らかにした。これらの分類学的整理により、潜在的に保全の対象とすべきものが大幅に整理できたことの意味は非常に大きい。サブテーマ２では、希少種を中心に10種（ないし種群）の集団構造を解析し、保全の単位を明確にした。またゲノム解析に基づくヘテロ接合度の推定を通して、種の脆弱性を評価する方法を示し、少数個体の分析でもある程度妥当な推定値が得られることを示した。さらに48種に対して全ゲノムショットガン解析を行い、参照データとした。サブテーマ３では、日本産両生爬虫類の199種356個体についてミトコンドリアDNAの調節領域を除く全配列を決定し、DNAバーコーディングのための参照データを構築した。また、保全対象種が多く、形態形質に基づく同定がとりわけ難しい有尾類について、国産の全種を識別できるDNAバーコーディング用プライマーを設計した。また、今後のライブラリ構築の参考となるよう、効率的に配列を決定するためのワークフローを示し、コストを提示した。サブテーマ４では、保全対象類種トウキョウサンショウを特異的に検出するLAMPプライマーを開発した。また、そのなかで識別したい対象種の間にどの程度の違いがあればLAMPプライマーの開発が可能か検討し、目安を示した。トカゲモドキ類については、国内の種を特異的に増幅できるPCRプライマーを開発し、PCR法により国外の種と簡易に区別できるようにした。オオサンショウウオはミトコンドリアDNAに基づく簡易な同定は難しく、核DNA分析が最も効率的な種同定になること、[redacted]サブテーマ５では、オオサンショウウオ類とトカゲモドキ類において、種間で違いが大きい部位を切り出してAI学習を実施することにより、識別モデルを構築した。このうち、前

者の学習モデルは正答率が高く、それをアプリ化して一般の人に使用してもらうテストまでを行った。また、上記２群にトノサマガエル類を加えた３群では、画像データを二次的に加工した画像を加えたときの学習の効果、画像枚数を制限したときの学習の効果を比較し、少数の資料から正答率の高い学習モデルを構築する方法について検討した。

## ５－２．環境政策等への貢献

＜行政等が既に活用した成果＞

（１）トウキョウサンショウウオ用のLAMPプライマー開発

サブテーマ４におけるトウキョウサンショウウオ用のLAMPプライマー開発の成果について、その論文内容を環境省野生生物課希少種保存推進室と連名でプレスリリースした。その後も取材を受けるなど反響は大きく、プレスリリース後の違法採集や違法販売は確認されていないことから、この簡易同定法の開発自体が違法販売の抑止に貢献したと思われる。

（２）国内希少動植物種ミヤコカナヘビの遺伝的構造と脆弱性評価

[redacted]

（３）宮古島に定着しているセマルハコガメ集団の分類学的帰属の決定

サブテーマ１で得られた、宮古島のセマルハコガメ集団が亜種ヤエヤマセマルハコガメに帰属するという成果は、行政が、本集団を国指定の天然記念物として扱うことの根拠として使われた。

＜行政等が活用することが見込まれる成果＞

[redacted]

（２）日本産両生爬虫類のミトコンドリアDNAのライブラリの構築

サブテーマ３で構築した両生爬虫類のDNAバーコーディングライブラリは、今後、種同定が必要な保全に関連する行政活動で利用されることが期待される。[redacted]

（３）両生類の飼育水を利用した非侵襲的なDNA採取法の確立

サブテーマ４で確立した、両生類の飼育水を利用した非侵襲的なDNA採取法は、所持や販売に関して違法性が疑われるケースでの確認方法の一環として使われることが期待される。[redacted]

（４）AI画像認証に基づくオオサンショウウオの識別学習モデル

サブテーマ５で、オオサンショウウオ類の頭部の画像により国産種と外来種（交雑個体を含む）を識別するAI学習モデルを構築した。これをもとにアプリを試作し、一般の人にも試してもらった。アプリに改良を加え、リリースするためには継続的な予算の確保もしくは採算がとれる仕組み作りが必要であり、ここでは一時的な使用に止まったが、技術的には本格的なアプリの作成が可能である。それが実現すれば、関係地域住民に提供し、外来性オオサンショウウオ侵入の早期検出に役立てることができる。

## ５－３．研究目標の達成状況

| 全体目標 | 目標の達成状況 |
|---|---|
| 国産両生爬虫類をモデルに、希少種選定の基礎となる種分類の見直しと絶滅リスク評価を行ったうえで、DNAによる同定の基盤となるデータベースを整備し、さらに取り締まりの現場に実装できる簡便な同定ツールを開発する。また、データベースの整備では効率化を追求し、他の分類群に応用できるワークフローを提案する。 | 目標どおりの成果をあげた。<br>両生爬虫類18種群を対象に分類の見直しを行うとともに10種群で絶滅リスクを評価した。また、199種のmtDNAデータベースを整備した。小型サンショウウオの一種とトカゲモドキ類で簡易DNA同定ツールを開発し、オオサンショウウオについてはAI学習による画像に基づく同定ツールを開発した。DNAデータベースの構築にあたっては、多検体の分析を並行して処理することによって効率化を図り、その中で見えてきた課題についても整理したえでワークフローを示した。 |

| サブテーマ１目標 | 目標の達成状況 |
|---|---|
| 分類学的問題が残り、かつ潜在的に絶滅リスクが高い種を含むことが想定される10の種群についてDNA分析と形態形質分析を進め、学名の整理を行う。また、命名行為にまで踏み込めないものに関しても主要な保全単位を認識し、他の４つサブテーマに基礎情報を提供する。 | 目標を上回る成果をあげた。<br>絶滅リスクが高いかそういった種を含む可能性が高い11の種群に対してDNA分析と、一部、形態形質分析を行い、学名の整理や、新種の記載、在来性/外来性の整理などと並んで保全単位を提示した（P. 12-17）。加えて、分類の見直しの結果いかんによっては保全措置の検討が必要になると見込まれる7つの種ないし種群についても同様な分析を行った（P. 17-18）。また、当初の研究目標には明示されていなかったが、要望の強い博物館等の標本からの遺伝情報の活用技術を開発した。以上のことから目標以上の成果を挙げたと言える。 |

| サブテーマ２目標 | 目標の達成状況 |
|---|---|
| 国産の両生爬虫類およそ60属を代表する種についてドラフトゲノムを決定し、特に希少種を含むグループに着目して希少種ゲノム・データベースを構築する。また、保全上重要と思われる種および希少性について情報が不足している種ないし種群に対して縮約ゲノム解析、あるいは全ゲノム解析を | 目標どおりの成果をあげた。<br>保全上の重要性を考慮して37属48種のドラフトゲノムを決定した。解析が追いつかず目標の60属には満たなかったが、希少種を含む属の多くはカバーしており、また、一部の希少種について複数の個体を分析することで脆弱性評価にも使えるデータ |

| | |
|---|---|
| 行い、遺伝多様性とその継時的変動を推定し、保全上の脆弱性を評価する。 | を得ることができた。希少種ゲノムデータベースは、作成したドラフトゲノムデータをウェブ上で公開する形で構築中である。また、希少性のデータが十分でない10種についてゲノム解析に基づき保全単位を明確にしたうえで、それぞれの相対的な脆弱性の評価を行った（P.22-26）。 |

| サブテーマ３目標 | 目標の達成状況 |
|---|---|
| 外来種を含む国産の全種200種あまりについてミトコンドリアの全長配列を決定し、データベース化するとともに、任意の配列との相同性検索をする自動化された解析パイプラインを構築する。また、データベース構築では効率性を追求し、そのワークフローを提示するとともにかかるコストについてもデータを提供する。 | 目標どおりの成果をあげた。<br>国内の両生爬虫類199種のミトコンドリアDNA配列を決定し、DNAバーコーディング・ライブラリを構築した。一部は種内変異もカバーしており、今後の多様性保全/多様性研究に関わる様々な側面で活用されると期待できる。解析パイプラインについては、コストとユーザーの利便性から既存の検索システムに頼ることとし、本ライブラリをパッケージにしてローカルデータベースとして使えるようにすることで対応できる。ライブラリ構築の作業フローとかかるコストについても示すことができ（P.37-39）、目標は達成できている。 |

| サブテーマ４目標 | 目標の達成状況 |
|---|---|
| サブテーマ１～３から提供された情報を利用しつつ、商取引で問題になる少なくとも５つの種群（トカゲモドキ類、セマルハコガメ類、ミナミイシガメ類、小型サンショウウオ類、オオサンショウウオ類）に対して塩基配列決定によらない簡便なDNA同定ツールの開発を進め、取り締まりの現場に実装するためキット化する。 | 目標を上回る成果をあげた。<br>種名を偽って違法に販売されることのあったトウキョウサンショウウオを対象にLAMP法による簡易同定ツールを開発した。[redacted]それを発表したことで、実際に違法販売の抑止に大きく貢献した。その他の種群についても、それぞれの分化程度やゲノムの特性に応じて最善の識別法を示した（P.43-45）。LAMP法が適用できる範囲についての指針を示した点、両生類の飼育水からの非侵襲的DNA採取法を確立した点は目標以上の成果といえる。 |

| サブテーマ５目標 | 目標の達成状況 |
|---|---|
| サブテーマ１～３から提供された情報を利用しつつ、商取引で問題になる少なくともセマルハコガメ類、トカゲモドキ類、オオサンショウウオ、ダルマガエル類、カナヘビ類の５つの種群に対して画像認証による簡易同定ツールの開発を進め、その一部を取り締まりと市民活動の現場に実装する。 | 目標どおりの成果をあげた。<br>オオサンショウウオとトカゲモドキ類で判別精度90%以上の学習モデルが構築できた。[redacted] |

| | |
|---|---|
| | [redacted]<br>カナヘビ類は本研究開発の行政ニーズが相対的に低いことから予備的な学習に留め、他の分類群の課題解決に注力することとした。AI学習の試行錯誤を通し、対象種の体の一部の画像を使った識別が有効であること、少数の画像からでもAI学習モデルが構築できること、二次的に加工した画像の学習も検討すべきことなど、方法論について多くの知見を示すことができた。また、オオサンショウウオでは国産種と外来種とを識別するAI学習モデルのアプリを試作して一般の方々に実地で使ってもらうところまでを達成できた（p. 54-55）。これらのことから、当初の目標は達成できたと考えている。 |

６．研究成果の発表状況

６－１．査読付き論文

＜件数＞

１０件

＜査読付き論文＞


1) Nishikawa, K., M. Matsui, and A. Tominaga. 2022. Morphological and taxonomic reexamination on a crocodile newt recently described from Japan (Urodela, Salamandridae, *Echinotriton*). Zootaxa 5196(2): 223–234. (doi: 10.11646/zootaxa.5196.2.4)

2) Niwa, K., M. Kuro-o, and K. Nishikawa. 2021. Discovery of two lineages of *Hynobius tsuensis* (Amphibia, Caudata) endemic to Tsushima Island, Japan. Zoological Science 38(3): 259–266 (doi: 10.2108/zs200149)

3) Niwa, K., N. Yoshikawa, K. Nishikawa, and M. Matsui. 2022. Development of eight microsatellite markers for the Tsushima salamander, *Hynobius tsuensis* and its close relatives (Amphibia; Caudata). Current Herpetology 41(1): 125–131. (doi: 10.5358/hsj.41.125)

4) Niwa, K., T. V. Dung, and K. Nishikawa. 2022. Differentiated historical demography and ecological niche forming present distribution and genetic structure in coexisting two salamanders in a small island, Japan. *PeerJ* 10: 20220310. (doi: 10.7717/peerj.13202)

5) Ozaki, K., A. Tominaga, M. Matsui, S. Hara, and K. Nishikawa. 2023. Skull morphology differentiation between the two species of Japanese crocodile newts, *Echinotriton andersoni* and *E. raffaellii* (Ampbihia: Urodela: Salamandridae), inferred from geometric morphometrics. Current Herpetology 42(1):9–16. (doi: 10.5358/hsj.42.9)

6) Tominaga, A., M. Matusi, and M. Matsui. 2021. Structure and movement of the hybrid zone between two divergent lineages of the Japanese newt *Cynops pyrrhogaster* (Amphibia: Urodela) in central Japan. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 59(5): 1097–1112.

7) Tran, D. V., S. Terui, K. Nomoto, K. Nishikawa. 2020. Ecological niche differentiation of two salamanders (Caudata: Hynobiidae) from Hokkaido Island, Japan. Ecological Research 36(2): 281–292.

8) Ueno, S., Kamezaki, N., Mine, K., Suzuki, D., Hosoya, S., Kikuchi, K., Okamoto, K., Torii, M., Kadowaki, K.,

Okamoto K., and Sano, M. (2022) Reproductive ability of the hybrid between Japanese pond turtle (*Mauremys japonica*) and Reeves' pond turtle (*Mauremys reevesii*). Zoological Science. 39(2) 186–192.

9) Tominaga, A., Yoshikawa, N., Matsui, M, Nagata, N., Sato, Y. 2022. The emergence of a cryptic lineage and cytonuclear discordance through past hybridization in the Japanese fire-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster* (Amphibia: Urodela). Biological Journal of the Linnean Society. 137 (4): 651–666 (doi: 10.1093/biolinnean/blac12010.1093/biolinnean/blac120)

10) Suzuki, T., Nishikawa, K., Sato, Y., Toda, M. 2021. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for quick identification of the Japanese salamander *Hynobius tokyoensis*. *Genes & Genetic Systems* 96(5): 247–252.

## ６－２．知的財産権

特に記載すべき事項はない。

## ６－３．その他発表件数

| | |
|---|---|
| 査読付き論文に準ずる成果発表 | ０件 |
| その他誌上発表（査読なし） | ０件 |
| 口頭発表（学会等） | １３件 |
| 「国民との科学・技術対話」の実施 | ３３件 |
| マスコミ等への公表・報道等 | １０件 |
| 本研究費の研究成果による受賞 | ０件 |
| その他の成果発表 | ０件 |

## ７．国際共同研究等の状況

「画像に基づくAI学習によるセマルハコガメ類２亜種の同定ツールの開発」 Dr. Ten-Si Chen, 国立台湾屏東科技大学, 台湾; Dr. Zhu-Lung Chen, 台北市立動物園, 台湾. 共同研究/資料収集, 二国間共同研究

## ８．研究者略歴

研究代表者：

戸田 守

京都大学大学院理学研究科博士後期課程終了，博士（理学）．京都大学大学院理学研究科動物学教室助手・同助教．現在，琉球大学熱帯生物圏研究センター准教授

研究分担者：

１）佐藤行人

東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了，博士（理学）．国立遺伝学研究所特任研究員，東北大学東北メディカル・メガバンク機構ゲノム解析部門助教，琉球大学戦略的研究プロジェクトセンター特命講師．現在，琉球大学医学部附属実験実習機器センター講師

２）西川完途

京都大学大学院人間・環境学研究科中退，博士（理学）．同研究科助教，同研究科准教授．現在，京都大学大学院地球環境学堂教授

３）鈴木 大

京都大学大学院理学研究科修了，博士（理学）．東京海洋大学海洋科学部学術研究員，九州大学大学院比較社会文化研究院特任助教，九州大学持続可能な社会のための決断科学センター助教，東海大学生物学部特任講師，同講師，現在，東海大学生物学部准教授

４）栗田隆気

琉球大学理工学研究科博士前期課程終了，同研究科博士後期課程中退，理学修士．現在，千葉県立中央博物館研究員

## Ⅱ．成果の詳細

## Ⅱ－１　未整理な点が残る絶滅危惧種の分類の整理

千葉県立中央博物館
　生態・環境研究部　　栗田　隆気

＜研究分担者＞
琉球大学熱帯生物圏研究センター　　戸田　守
京都大学地球環境学堂　　西川　完途
東海大学生物学部　　鈴木　大

＜研究協力者＞
琉球大学教育学部　　富永　篤
琉球大学熱帯生物圏研究センター　　和智　仲是

［要旨］

日本産両生爬虫類には分類学的見直し、集団の起源の解明、および保全ユニットの認識が保全上特段の影響を及ぼすと考えられる種群が多く含まれていることから、それらの種群について集団遺伝学的または形態学的分析を行い、（１）分類学的問題が残る種の分類学的整理を実施した。また、それにあたって博物館等に収蔵されている標本の集団遺伝学的解析を可能にするために（２）博物館標本の遺伝的解析手法の確立を目指した。

（１）については、分類学的再検討により局所分布する種が見出されたり、生息環境の消失・劣化の影響が明らかになると当初から想定していた10属（11種群）で一塩基多型またはミトコンドリアDNAの分析を行い、それぞれの種群で新種記載、形態による信頼性の高い近縁種の識別方法の確立、保全ユニットの認識、集団の在来性・外来性の解明など多くの成果をあげることができた。さらに、これまでに集団構造が研究されていなかったり、調査が困難な地域に分布していたりすることで分類学的基礎情報が不足している７種・種群・個体群についても集団遺伝学的解析を実施し、集団の帰属の決定、もしくは今後の研究の必要性を示した。

（２）に関しては、DNAの分析に不適な方法による処理・保管を経た組織試料を用いて、複数のDNA抽出法について有効性を検討した。その結果、尿素とジチオスレイトールを添加したSTEバッファーとProteinase Kによる組織溶解、フェノールクロロホルム法による精製で比較的高い収量が達成できることを示した。さらに、長期間保存されたDNAは断片化して短くなっていたり、本来の二本鎖構造が壊れ、一本鎖化していることがあるため、そのような状態でも塩基配列できる方法を検討し、断片化した3′末端へのpoly T付加と5′末端へのアダプタ付加によって解析可能になることを示した。

本サブテーマ全体として、学名の整理、保全単位の認識に関し、設定した目標以上の進展があったと評価している。

### １．研究開発目的

日本産両生爬虫類のうち、これまでの知見により分類学的な見直しが行われると非常に局所的な種が見出されると予想される種（種群）や生息環境の消失・劣化に直面していることが明らかになる可能性のある種､あるいは分類学的帰属が不明であることにより保全の必要性や法的根拠が定まっていない種･個体群に関して、形態、遺伝、生態的情報を把握し、保全の基本的単位を整理する。博物館標本や映像資料などに基づく形態的分析、縮約ゲノム解析または全ゲノム解析を行い、分類学的に別種とみなされる実体について種の記載を含む分類学的整理を実施する。

## ２．研究目標

分類学的問題が残り、かつ潜在的に絶滅リスクが高い種を含むことが想定される10の種群についてDNA分析と形態形質分析を進め、学名の整理を行う。また、命名行為にまで踏み込めないものに関しても主要な保全単位を認識し、他の４つサブテーマに基礎情報を提供する。

## ３．研究開発内容

（１）分類学的問題が残る種の分類学的整理

既に絶滅のリスクの高さが認識され、さらに分類学的問題が残るグループとしてツシマサンショウウオ種群、イシヅチサンショウウオ種群、イボイモリ属、セマルハコガメ類、トカゲモドキ属の５グループを対象にした。また、分類学的整理が行われた場合、きわめて局所的に分布する種を含むことになる可能性が高いグループとしてヤモリ属とヒバカリ属の２グループ、由来を明確にすべき種あるいはそういった集団を含む種としてハロウエルアマガエル、ヤエヤマイシガメ、リュウキュウヤマガメ、タシロヤモリの４種を対象とした。ハロウエルアマガエルとヤエヤマイシガメ以外の種・種群について一塩基多型（SNP）解析を、ハロウエルアマガエルについて全ゲノムシーケンスとドラフトゲノム構築を、ヤエヤマイシガメについてミトコンドリアDNA（mtDNA）の塩基配列解析を実施した。また、サンショウウオ属、イボイモリ属、トカゲモドキ属、ヤモリ属については大学や博物館に収蔵された標本の形態分析も行った。

また、現状では保全上の危急性については不明であるが、分類の見直しの結果いかんよっては保全措置の検討が必要になると見込まれる種として、アカハライモリ、ヌマガエル、シロマダラ、[redacted]ダンジョヒバカリ、尖閣諸島のシュウダ、尖閣諸島のアカマダラがあり、それらについても遺伝的解析を実施した。

（２）博物館標本の遺伝的解析手法の確立

長期間保管された博物館標本から遺伝情報を得るために、DNA抽出およびライブラリ作成法を検討した。DNA抽出実験はホルマリン固定後にエタノールで保管されたウミヘビおよびトカゲモドキの肝臓組織と筋組織を用いて、複数の方法（市販のキット含む）を評価した。ライブラリ作成法は配列既知の人工のDNA分子（短鎖、一本鎖DNA分子）を断片化したDNA分子のモデルとして、複数の方法を試行・評価した。

## ４．結果及び考察

（１）－１．ツシマサンショウウオ種群の分類学的再検討

対馬固有のサンショウウオ属のツシマサンショウウオには隠蔽種の可能性のある個体群が存在する。そこで、この個体群の系統分類学的な扱いを解決するために、対馬のサンショウウオについてmtDNAのcytochrome bの全長配列とマイクロサテライト（SSR）７遺伝子座を用いて集団遺伝学的解析を行った。その結果、対馬のサンショウウオは明瞭な２群に分けられた。ツシマサンショウウオは九州の近縁な止水産卵性種のグループの中で最初に分岐したのに対し、分類学的位置の確定していない個体群はカスミサンショウウオと姉妹群をなし、これら２群は単系統ではなかった。さらに今後必要になるSSRを８サイト開発し、生態ニッチモデリングにより２群が生態的にも別種レベルに分化していることも明らかにした。今後はタイプ標本の調査も含めて分類学的な結論を下す必要がある。これらの結果に関し、３編の学術論文を公表した。

（１）－２．イシヅチサンショウウオ種群の分類学的再検討

イシヅチサンショウウオは四国の山地に固有の種で、種内に大きな地理的変異の存在することが形態およびアロザイム分析によって示されていたが（Nishikawa et al., 2007）、分類学的な判断がなされていなかった。そこで四国の生息域全域を網羅してサンプリングを行い、mtDNAのcytochrome bの全長配列とSNPの解析を行った。その結果、本種はトポタイプ含む中央集団、剣集団、南予集団の３群に分かれ

た。しかしSNPの結果からは中央集団と剣集団との間に遺伝子流動が認められた。一方、南予集団は他から遺伝的に大きく分化して遺伝子流動も認められなかった。さらに南予集団は形態的にも他の群から識別可能なほどに分化しており、新種ナンヨサンショウウオとして記載した（図1.1）。以上の結果を１編の学術論文として公表した。

図1.1. 新種として記載されたナンヨサンショウウオ（撮影者：金森さりい）

（１）－３．イボイモリの形態分類の確立

イボイモリは遺伝的に沖縄集団と奄美集団（徳之島含む）との2つに分かれることが示されており、両者は別種の関係にあるほど大きな遺伝的分化をしていることが報告されていた[1)]。本種は絶滅が危惧されていることから、礫死体を含めた既存の標本を可能な限り調査して、特に頭骨要素の詳細な地域比較を行った。その結果、沖縄集団と奄美集団との間に明瞭な違いの存在することが明らかになった。さらに台湾産とされる頭骨標本も調査して、奄美個体群と類似していることを見出した。この結果に基づき奄美個体群を新種とする論文を投稿したが、査読中に奄美個体群を新種記載する論文が海外のグループによって先に出版された[2)]。しかし、その記載論文はわずかな数の標本しか観察しておらず識別形質もあいまいな表現のものであった。そこで査読中の論文は取り下げて、新種の再記載を十分な標本数に基づいて行った。上記の成果を2編の学術論文として発表した。

（１）－４．セマルハコガメの亜種分類ならびに宮古島集団の由来

セマルハコガメについては八重山諸島の集団を亜種ヤエヤマセマルハコガメ、台湾と中国大陸の集団を基亜種セマルハコガメ（ここではチュウゴクセマルハコガメと呼称する）とする見方が広く認められている。前者は文化財保護法や条例で捕獲や飼養が規制されているが、後者は商業的に流通しており（ただしCITESに記載）、亜種によって法的扱いが異なる。しかし、亜種間の関係性は明らかになっていない。加えて、近年になって宮古島に定着した外来集団の帰属も不明で、法的な位置づけが定まっていない。

宮古島、石垣島、西表島、台湾、および中国のサンプルを用いてSNP解析を行った結果、石垣島・西表島と台湾・中国本土の集団の間には明瞭な遺伝的分化が認められた（図1.2）。また、mtDNAの解析でも同様に亜種間には明瞭な遺伝的分化が見られ、ヤエヤマセマルハコガメを亜種とみなす現行の分類が支持された。由来不明であった宮古島集団は遺伝的には八重山諸島集団に内包され、ヤエヤマセマルハコガメであることが明らかになった。

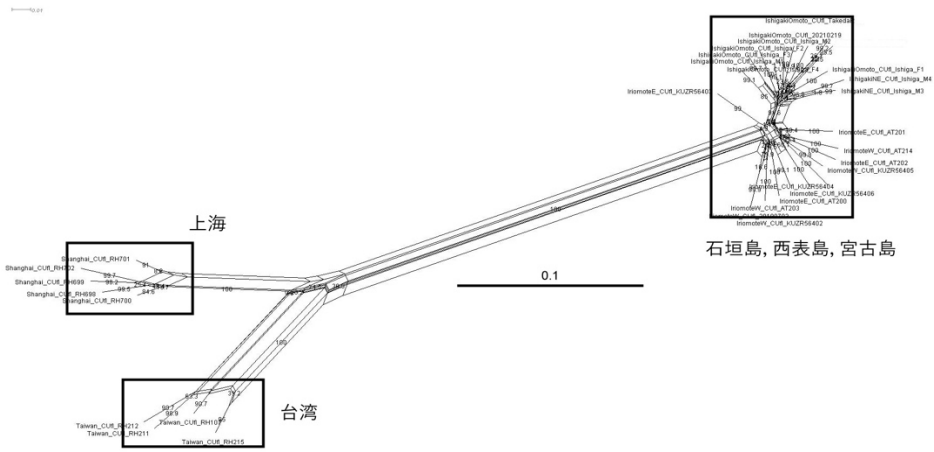


図1.2. セマルハコガメの系統ネットワーク（Neighbor-net法；1228 SNPs）

（１）－５．クロイワトカゲモドキ種群の分類学的再検討

沖縄島とその周辺離島に分布する基亜種クロイワトカゲモドキには遺伝的に分化した２群が含まれることが知られ、沖縄島内で狭い範囲に交雑帯を維持しつつ側所的に分布していることから、これらを別種とみなすべきだとする先行研究がある[3)]。本課題では沖縄島内の６集団とそれらとは形態的に大きな差異がある伊江島の同亜種集団、さらに比較のため、他の琉球産同属種・亜種のサンプルを用いてSNP解析を実施するとともに、クロイワトカゲモドキのホロタイプ（図1.3）をはじめとする博物館標本および生体写真を用いて形態解析を行い、２系統が形態的にも識別可能であることを示した。これらの結果から、片方を未記載の別種であると判断した。この未記載種の記載論文は投稿中である。

図1.3. クロイワトカゲモドキ*Goniurosaurus k. kuroiwae*のホロタイプ

（１）－６．ミナミヤモリ種複合群の生殖隔離の検討

九州から琉球列島、台湾、中国東部に分布するミナミヤモリはmtDNAの分析で明確に区別できる複数の系統を含み、内部にヤクヤモリなどが含まれることから、実際には複数の種が含まれる種複合群であると考えられる。その証拠を固めるため、サンプルを増やしてmtDNAの配列を元に系統解析をし直したところ、台湾と日本にまたがって分布する複数の系統が台湾で分布を接して生息することが分かった。この結果は、それらが種のレベルで違っていること示唆している。さらにこれを核DNA解析によって確認するため、複数のmtDNA系統が二次的に同所性を獲得している屋久島のサンプルを対象にSNP解析を

行った。その結果、屋久島に侵入した３つのmtDNAのうちの2つでは、接触域地でも遺伝子の交流は制限されており、やはり種のレベルで異なると考えられた。このほか、博物館標本を元に、沖縄諸島の未記載種とミナミヤモリの形態比較を行い、形態的な識別点を整理した。

（１）－７．琉球列島のヒバカリ属の分類学的再検討

琉球列島には３種のヒバァ類がおり、このうち奄美諸島と沖縄諸島に生息するガラスヒバァは宮古諸島のミヤコヒバァに対して側系統群となることがmtDNAおよびいくつかの核遺伝子の塩基配列を用いた先行研究により示されていた[4)]。ミヤコヒバァは沖縄島や久米島の集団に近縁で、奄美諸島の集団、伊平屋島・伊是名島の集団はそれぞれ、系統樹のなかでそれよりも外側に位置する。本種群の分類学的整理に向け、本課題ではSNP解析によりこの関係を確認した。その結果、久米島と沖縄島の関係がやや曖昧であった点を除き、先行研究で示されていた系統関係と一致する結果が得られた（図1.4）。このことから奄美諸島および伊平屋島・伊是名島の集団については今後形態形質の分析に基づく分類学的再検討を行う必要があり、少なくともそれぞれ独立した保全ユニットとして扱う必要性が示された。

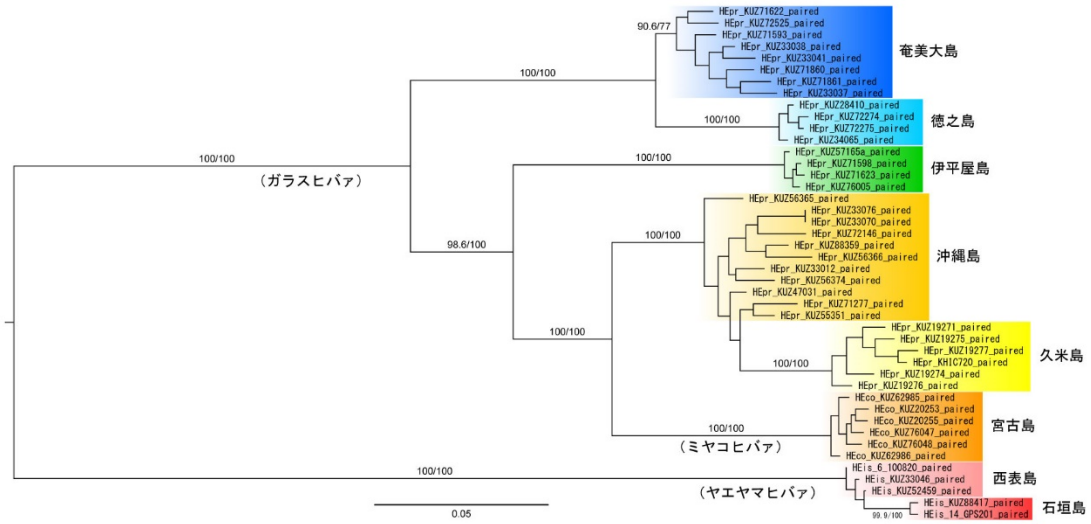


図1.4. SNPデータに基づく琉球列島産ヒバカリ属の系統関係

（１）－８．ハロウエルアマガエルのリファレンス用ドラフトゲノムの構築

ハロウエルアマガエルは奄美諸島と沖縄諸島の一部に生息しているが、西表島からも古い記録がある。形態形質分析により、西表島からの標本には、奄美・沖縄諸島の集団とは若干異なる点があることが指摘されているが[5)]、分類学的帰属は明らかにされていない。その分類学的位置づけを検討するために、長期間保存された標本から遺伝情報を得ることが望まれるが、方法の確立が十分ではなかったため、比較用に、本プロジェクトのサブテーマ２で、沖縄島の個体のゲノム解析を行った。ここでは、リファレンスとなるドラフトゲノム配列について報告する。

本課題ではIlluminaのショートリードシーケンサーで得られた150bp×2のペアエンドデータをソフトウェアMegahitでアセンブルし、500塩基対（bp）以上のコンティグが1,288,365配列得られた。全配列合計は約26.5億bp、最長のコンティグは35,371 bp、N50は2,953 bpであった。本種に関してはサブテーマ３でもmtDNAの参照用配列を得ており、今後、西表島の標本の分析により、分類を明確にする。

（１）－９．ヤエヤマイシガメの集団間系統関係

ミナミイシガメは2亜種を含み、基亜種は中国や台湾に、別亜種ヤエヤマイシガメは八重山諸島に生息する。また、基亜種とされる外来個体群が近畿地方を中心に生息している。このうち国内の集団については亜種間の系統関係も含めて遺伝的な関係性が未解明であった。そこで、国内外のサンプルに対しmtDNAの調節領域約700塩基を決定し、系統関係を調べた。[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

（１）－10．リュウキュウヤマガメの島嶼集団間関係

リュウキュウヤマガメは沖縄諸島の固有種で、沖縄島北部、渡嘉敷島、久米島に分布する。種の保存法、文化財保護法、CITESによる保全対象種であるが、違法取引が絶えず、最近も違法捕獲や密輸の事例があった。これまで、少数サンプルのmtDNA部分配列データに基づいた３島嶼の集団の比較がなされ、ごくわずかな違いしか見出されていなかった[6]。そこで本課題ではこれら３島嶼集団のSNP解析によって本種の集団構造を再評価した。その結果、沖縄島、渡嘉敷島、久米島のサンプルを明瞭に識別できた（図1.6）。この結果は３島嶼の集団はいずれも在来集団であることを裏付けるものであり、３者間の遺伝的相違から、それぞれを別の保全ユニットとみなすべきことが示された。

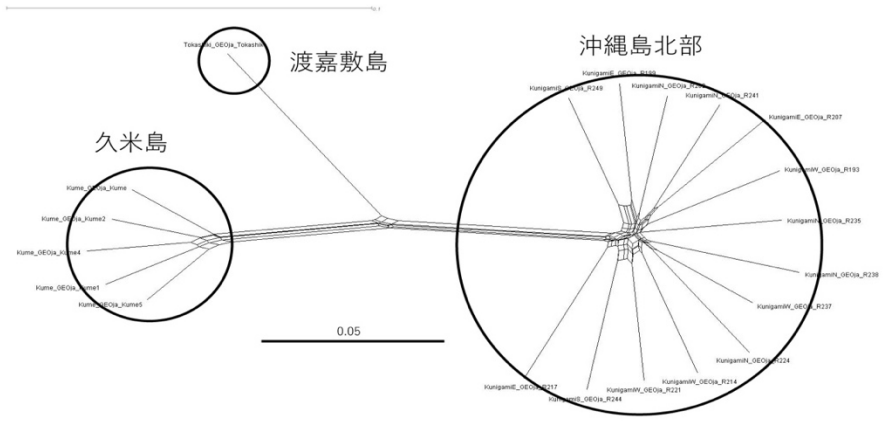


図1.6. リュウキュウヤマガメの系統ネットワーク（Neighbor-net法；3599 SNPs）

（１）－11．タシロヤモリの在来性の検討

タシロヤモリは奄美大島以南の琉球列島、台湾、中国南部、ベトナム北部、ミャンマーに分布するが、近年国内では奄美諸島北部でしか見つからず、分布範囲の縮小が指摘されている。一方、その広い分布域から国内の集団は外来の可能性もあり、保全上の扱いが明確でない。そこでSNP解析を行った結果、

奄美諸島の集団は台湾・中国大陸南東部（沿岸部）の集団（以降、南東集団）と近縁であることが明らかになった（図1.7）。そのなかで奄美諸島の個体はまとまったクラスタを形成し、南東集団から区別されるが、遺伝的分化の程度は南東集団内の地域集団間の差とさほど違わなかった。このことから、奄美諸島集団は南東集団の一部に由来し、隔離されたことで独自の遺伝的特徴を持つようになったのではないかと考えられた。この結果を受け、奄美大島と福建省のサンプルについて、分岐時のボトルネックの有無と現在までの遺伝子流動の有無が異なる４種類の集団動態モデルを想定して各モデルのパラメータ推定とAICによる比較を行ったところ、最も当てはまりがよいモデルでは福建省集団と奄美大島集団の分岐はごく最近になってから生じ、人為的移入により奄美諸島集団が形成された可能性を強く示唆するものであった。

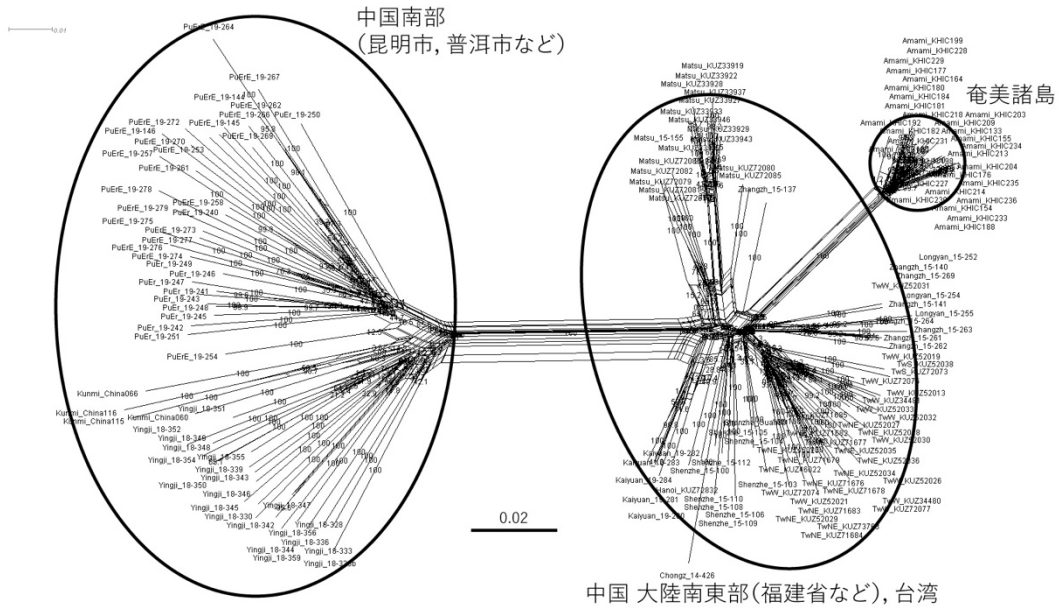


図1.7. タシロヤモリの系統ネットワーク（Neighbor-net法；3385 SNPs）

（１）－12．アカハライモリの集団構造

アカハライモリは本州、四国、九州およびそれらの離島に生息する広域分布種で、形態、繁殖行動、分子などで識別される５つあるいは６つの地域系統を含むことが知られている。mtDNAを用いた先行研究では、北日本、中部日本、南伊豆、西日本、南日本の５系統が認識されていた[7]。本課題ではとくに北日本系統および南伊豆系統の関係に注目し、SNPデータによる集団構造解析を行った。その結果、北日本系統の中により詳細な地理的構造として東北系統、北関東系統、南関東系統が見出された。このうち北関東系統は東北系統と南関東系統の交雑に由来すると推定されたが、同時に、遺伝的にこれらの親集団と識別可能であり、独自の遺伝的グループを形成していることが示唆された。ただしこれらの集団の分類学的扱いについては、より多くの集団、とくに分布境界域における動態についてさらに研究を進める必要があると考えられた。この成果を１編の学術論文として発表した。

（１）－13．ヌマガエルの集団構造

ヌマガエルは西日本と、八重山諸島を除く琉球列島、台湾、中国中東部に分布するが、分布様式が特異なうえ、一部の集団で多少の遺伝的な違いがあるため、分類学的再検討の必要性が指摘されていた[8]。本課題では、mtDNAとSNPの解析に基づいて集団構造を解析した。その結果、特に西日本集団と中琉球集団の関係性がmtDNAとSNPの間で食い違い、複雑な分化・分散史を持つ可能性が示唆された。分類学的結論を結ぶためには、形態や鳴き声など比較が必要である。

（１）−14．シロマダラの集団構造

シロマダラは日本固有のヘビ類で、北海道から大隅諸島まで広く分布するが、散発的にしか発見されずかつては珍しいヘビと認識されていた。そのことを反映してか、都道府県版レッドデータブックでは本種が頻出する。その一方で、本種の集団構造を調査した研究はなく、関連する知見もない。そこで本課題では、国内から広く収集したサンプルを使って、mtDNAとSNPを用いた集団構造解析を実施した。その結果、東日本〜近畿までの集団と、中国西部・九州の集団で遺伝的に若干の違いが認められたが、それらの境界は明確でなく、中国・四国地方で徐々に置き換わっていた。また、mtDNAでも特に種内に深い分岐は認められなかった。

（１）－15．調査困難地域の爬虫類集団

以上に加えて、これまで分類学的位置づけが検討されてこなかった難調査地に分布する爬虫類４種５集団について、mtDNAの配列情報に基づいて系統的位置を推定した。[redacted]

ダンジョヒバカリは日本、韓国、中国北東部、およびロシアの一部に分布するヒバカリの亜種の一つで、長崎県男女群島の男島に固有である。男女群島は天然記念物として上陸が制限されているため、本種の調査は限られ、原記載以来、分類学的な再検討もなされていない。[redacted]

尖閣諸島からは２種のヘビ類が知られているが、いずれも他集団との系統的関係は調べられていない。シュウダはベトナム北部、中国、台湾、および日本の与那国島と尖閣諸島から知られ、与那国島の集団が亜種ヨナグニシュウダ、それ以外の集団が基亜種シュウダに分類されている。系統解析の結果、尖閣諸島の集団は台湾のものと近縁であった。アカマダラはラオスから中国東部、台湾、韓国、ロシアの一部、そして日本の先島諸島、尖閣諸島、および対馬に分布している。このうち先島諸島の集団は亜種サキシママダラとして分割されており、それ以外は基亜種アカマダラに分類されている。系統解析を行ったところ、尖閣諸島のアカマダラは台湾や中国東部の集団にもっとも近縁であり、対馬集団は朝鮮半島の集団に近縁であった。サキシママダラは解析に加えた全てのサンプルの中で最初に分岐した。これらの結果は現行の分類を支持するものである。

（２）博物館標本の遺伝的解析

組織からのDNA抽出法として、使用する組織の種類（ホルマリン固定・エタノール保存されたウミヘビ類の肝臓または筋肉）、溶解方法（Proteinase Kまたは熱アルカリ処理）、溶解バッファー（７種類）、精製方法（市販キットまたはフェノールクロロホルム法）の組み合わせを検討し、NanoDropによる純度の測定とQubitによる二本鎖DNAの定量を行った。その結果、尿素とジチオスレイトールを添加したSTEバッファーを用いてProteinase Kの連続添加によって溶解し、フェノールクロロホルム法によって精製したものが最も高いDNA濃度を示した。

次にライブラリの作成方法として、DNA断片の3′末端に特定のアンカー配列を付加する方法と多数のチミン塩基を付加する方法を検討した。いずれも3′末端側を処理してから、5′末端にさらにアンカー付加を行った。その結果、3′末端にアンカー配列を付加する方法は付加効率が悪く、その後のライブラリ増幅ができなかった。一方、poly Tを付加したものは、5′末端アンカー配列とpoly A + B塩基（アデニン以外の３種の塩基の混合）3 bpからなるプライマーによって増幅が可能であり、ライブラリが作成できたことを確認した。これにより高度に断片化、加えて一本鎖化した配列未知のDNAについても塩基配列を決定できるようになった。

表1.1. さまざまなDNA抽出方法の比較

| 組織種類 | 溶解方法 | 溶解バッファー | buffer pH | 精製法 | A260/A280 | DNA濃度（ng/μl） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 肝臓 | ProteinaseK | ATL | | QIAamp MinElute Column | 1.42 | <0.05 |
| 肝臓 | ProteinaseK | STE（尿素添加） | 8.0-8.5 | QIAamp MinElute Column | 1.30 | <0.05 |
| 肝臓 | ProteinaseK | STE（DTT添加） | 6.5-7.0 | QIAamp MinElute Column | 1.37 | <0.05 |
| 肝臓 | ProteinaseK | STE（尿素・DTT添加） | 8.5 | QIAamp MinElute Column | 1.38 | <0.05 |
| 肝臓 | 低温短時間熱アルカリ＋ProK | 熱アルカリ→ STE | 6.0 | QIAamp MinElute Column | 1.26 | <0.05 |
| 肝臓 | 低温短時間熱アルカリ＋ProK | 熱アルカリ→ STE（尿素・DTT） | 8.0 | QIAamp MinElute Column | 1.19 | <0.05 |
| 背筋 | 熱アルカリ | 熱アルカリ | | PCI/PCI逆抽出 | 1.37 | <0.05 |
| 肝臓 | ProteinaseK | STE | 6.5-7.0 | PCI/PCI逆抽出 | 1.61 | 0.241 |
| 肝臓 | ProteinaseK | STE（尿素添加） | 8.0-8.5 | PCI/PCI逆抽出 | 1.51 | 0.205 |
| 肝臓 | ProteinaseK | STE（DTT添加） | 6.5-7.0 | PCI/PCI逆抽出 | 1.60 | 0.296 |
| 肝臓 | ProteinaseK | STE（尿素・DTT添加） | 8.5 | PCI/PCI逆抽出 | 1.53 | 0.709 |
| 肝臓 | 低温短時間熱アルカリ＋ProK | 熱アルカリ→ STE | 6.0 | PCI/PCI逆抽出 | 1.34 | <0.05 |
| 肝臓 | 低温短時間熱アルカリ＋ProK | 熱アルカリ→ STE（尿素・DTT） | 8.0 | PCI/PCI逆抽出 | 1.32 | <0.05 |
| 肝臓 | 熱アルカリ | 熱アルカリ | | PCI/PCI逆抽出 | 1.28 | <0.05 |
| blank | ProteinaseK | STE（尿素・DTT添加） | | PCI/PCI逆抽出 | 1.68 | <0.05 |

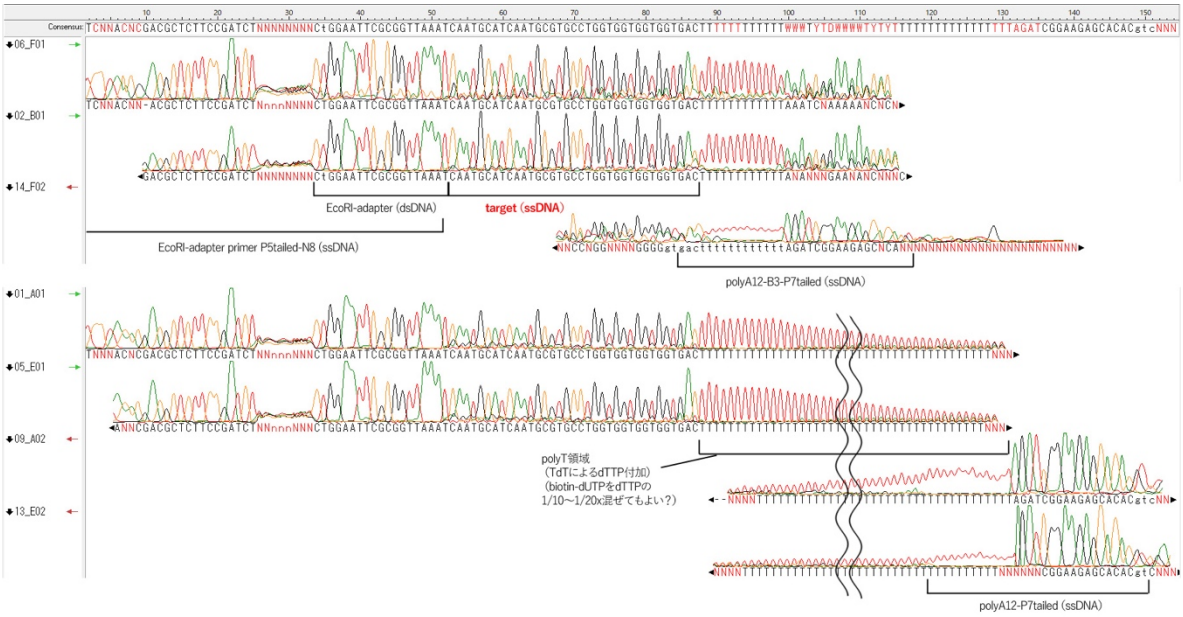


図1.8. Poly T付加（右側の赤い連続波形）により一本鎖かつ短断片のターゲットDNA（赤字で表記）の配列を決定した

## ５．研究目標の達成状況

保全の方針には集団の分類学的位置づけが強く影響する。本課題では18の分類群について現行の分類や集団の種への帰属について見直した。このうち、すでに保全の重要性が指摘されているか、潜在的に局所分布する種を含む可能性が高い11種群に対しては、ゲノムワイドSNPを中心とした集団遺伝学的分析または形態分析、あるいはその両方を使って分類学的整理を進めた。それにより、新種記載、形態による信頼性の高い近縁種との識別方法の確立、保全ユニットの認識、集団の在来性・外来性の解明などに関する多くの成果を得た。これらは保全対象種の指定と識別、保全計画の策定等に関わる重要な情報を提供するものであり、プロジェクト全体の目的にもよく沿ったものである。本成果の一部は論文として公表済みであり、他の成果についても現在論文を投稿中あるいは準備中である。さらに、比較的広範囲に生息するが集団構造が明らかになっておらず分析の必要があった種、または調査が困難な地域に分布し集団の実態が不明であった７つの種についても分析を行い、一部のものについては種の帰属を明確にし、別のものについても今後必要な研究の方向性を示すことができた。いずれの成果も保全対策にお

いて正確に種の範囲や地域集団間の関係性を認識することの重要性を示すものであり、全体として目標を上回る進展があった。

また、目標には明示されていないが、博物館等に収蔵されている標本の遺伝子情報を活用すべく、本課題で原理の異なる複数のDNA抽出法とライブラリ作成法を比較し、液浸標本からDNA配列を得る有効な方法を示した。

本課題は他のサブテーマの進行の下地としての性質もあり、とくに（サブテーマ２）国内希少種およびその予備軍の脆弱性評価および（サブテーマ３）DNAバーコーディング・ライブラリの構築とは、サンプリング、遺伝子解析、保全ユニットの認識など、研究プロセスから成果のまとめまでさまざまな段階で密接に連携して進めた。新型コロナウイルスの影響で出だしが遅れたこともあり、本課題で確証された種や保全対象とすべき集団の情報を早めに伝えて他のサブテーマでそれに立脚した分析を進めることができたものは限られるが、それを差し引いても本課題では、目標以上の成果を得ることができたと考えている。

## ６．引用文献


1) Igawa, T., H. Sugawara, M. Honda, A. Tominaga, S. Oumi, S. Katsuren, H. Ota, M. Matsui, and M. Sumida. Detecting inter- and intra-island genetic diversity: population structure of the endangered crocodile newt, *Echinotriton andersoni*, in the Ryukyus. Conservation Genetics 21: 13–26.Nishikawa, K., M. Matsui, S. Tanabe, and S. Sato. 2007. Morphological and allozymic variation in *Hynobius boulengeri* and *H. stejnegeri* (Amphibia: Urodela: Hynobiidae). Zoological Science 24: 752–766.

2) Dufresnes, D. and A. Hernandez. 2022. Towards completing the crocodile newts' puzzle with all-inclusive phylogeographic resources. Zoological Journal of the Linnean Society: zlac038.

3) Kurita, T., M. Honda, and M. Toda. 2018. Species delimitation and biogeography of the Ryukyu ground geckos, *Goniurosaurus kuroiwae* ssp. (Squamata: Eublepharidae), by use of mitochondrial and nuclear DNA analyses. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 56: 209–222.

4) Kaito, T. and M. Toda. 2016. The biogeographical history of Asian keelback snakes of the genus Hebius (Squamata: Colubridae: Natricinae) in the Ryukyu Archipelago, Japan. Biological Journal of the Linnean Society 118: 187–199.

5) 松井正文・松井孝爾. 1982. 琉球列島・八重山群島・西表島からのハロウウェルアマガエルの記録. 爬蟲兩棲類學雑誌 9: 79–86.

6) 太田英利・本多正尚・佐藤寛之. 2003. 種内変異. In: 太田英利・濱口寿夫（編）沖縄県天然記念物調査シリーズ第41集 リュウキュウヤマガメ・セマルハコガメ生息実態調査報告書. 沖縄県教育委員会, 那覇市.

7) Tominaga, A., M. Matsui, N. Yoshikawa, K. Nishikawa, T. Hayashi, Y. Misawa, S. Tanabe, and H. Ota. 2013. Phylogeny and historical demography of *Cynops pyrrhogaster* (Amphibia: Urodela): taxonomic relationships and distributional changes associated with climatic oscillations. Molecular Phylogenetics and Evolution 66: 654–667.

8) Sumida, M., M. Kotaki, M. M. Islam, T. H. Djong, T. Igawa, Y. Kondo, M. Matsui, De Silva Anslem, W. Khonsue, and M. Nishioka. 2007. Evolutionary relationships and reproductive isolating mechanisms in the rice frog (*Fejervarya limnocharis*) species complex from Sri Lanka, Thailand, Taiwan and Japan, inferred from mtDNA gene sequences, allozymes, and crossing experiments. Zoological Science 24: 547–562.

# Ⅱ－２　国内希少種およびその予備群の脆弱性評価

琉球大学
　医学部実験実習機器センター　　佐藤 行人

＜研究分担者＞
千葉県立中央博物館　生態・環境研究部　　栗田 隆気
琉球大学熱帯生物圏研究センター　　戸田　守
京都大学地球環境学堂　　西川 完途
東海大学生物学部生物学科　　鈴木　大

＜研究協力者＞
琉球大学熱帯生物圏研究センター　　和智 仲是

［要旨］
生物多様性保全のために、多数いる種のなかでどの種がどの程度危機的状態にあるのかを把握することは重要である。しかし、多くの動物群でそれをきちんと検討するためのデータは圧倒的に不足しており、生息状況についてほとんど情報がない種も多い。関連する知見を得るために野外調査の実施が望まれるが、その予算やマンパワーも十分でない。そこで本サブテーマでは、（１）縮約ゲノム解析による爬虫両生類の脆弱性の評価、（２）多数の種の全ゲノム参照情報の構築、（３）少数標本から種の脆弱性を大まかに評価する方法の確立に取り組んだ。（１）では、絶滅危惧種やその予備群を含むミヤコカナヘビ、ミヤコトカゲ、キクザトサワヘビ、ヒバァ類、キタサンショウウオ、ヤクヤモリ、ニホンイシガメを扱い、前の３種では遺伝的集団構造を検出することにより保全の単位を明らかにした。ヒバァ類については、ヘテロ接合度を通した推測として、非常に危機的な状況にある種ないし島嶼集団はなさそうなこと、最後の２種については、浸透交雑の実態を明らかにした。また、サブテーマ１で扱ったヤエヤマセマルハコガメとリュウキュウヤマガメについても脆弱性評価のため再解析した。（２）では、48種について全ゲノムショットガン解析を行い、2–20倍程度の深度でゲノム情報を得た。それらは今後の縮約解析の参照データとなると期待される。（３）では、トカゲモドキ類をモデルに異なる分析手法の比較を行い、集団のヘテロ接合度/塩基多様度の推定に対し、4–5個体の縮約解析が、多数のサンプルを使ったマイクロサテライト解析と同様の推定値を返すことを示した。また、久米島で同所的に生息するヘビ類７種について縮約解析によりヘテロ接合度を推定し、キクザトサワヘビの個体数が特に小さいと考えられること、一方、野外で観察される機会が少ないハイ（ヘビの種名）は、見かけよりも多く生息している可能性を示した。

## １．研究開発目的

生物多様性の低下に歯止めをかけるためには、多様性の実態を可能な限り正確に把握したうえで、どの種あるいは地域集団が危機的状況にあるのかを知る必要がある。環境行政ではレッドリストを作成・更新することで、個別に保全対策が必要な種を可視化しているが、掲載種の選定やカテゴリーの決定に必要な情報は不足している。本サブテーマでは、従来のような野外調査による生息状況の把握とは別に、ゲノム解析によりその評価を行う。縮約ゲノム解析により集団構造を把握するとともに、今後のそのような解析の参照となるよう国産両生爬虫類の多くの種群について全ゲノムデータ情報を整備する。また、ゲノムワイドな解析を通して少数の検体から情報を引き出し、集団の状況を推定する方法論を確立する。

## ２．研究目標

国産の両生爬虫類およそ60属を代表する種についてドラフトゲノムを決定し、特に希少種を含むグル

ープに着目して希少種ゲノム・データベースを構築する。また、保全上重要と思われる種および希少性について情報が不足している種ないし種群に対して縮約ゲノム解析、あるいは全ゲノム解析を行い、遺伝多様性とその継時的変動を推定し、保全上の脆弱性を評価する。

## ３．研究開発内容

（１）個々の種ないし系統群に対する縮約ゲノム解析と脆弱性の評価

絶滅危惧種、あるいはその予備群を含む可能性があるものとして、トカゲモドキ、ミヤコカナヘビ、ミヤコトカゲ、キクザトサワヘビ、キタサンショウウオ、ヤクヤモリ、ニホンイシガメについてMIG-seq法による縮約ゲノム解析を行った。最後の２種については、異種との交雑によるインパクトを評価した。その他の種ないし種群については、解析をとおして集団構造を把握するとともに、集団または個体レベルで塩基多様度（＝ヘテロ接合度）を求め、それを指標に集団の脆弱性の評価をした。また、ヤエヤマセマルハコガメとリュウキュウヤマガメ、ヒバァ類に関してはサブテーマ１で解析したデータを利用し、塩基多様度を求めて同様な評価を行った。

（２）ドラフトゲノム参照情報の構築

日本産両生爬虫類を代表する48種61個体（無尾類12種、カメ類1種、トカゲ類17種、ヘビ類18種）をドラフトゲノム解析に供し、配列情報を得た。

（３）少数サンプルに基づく脆弱性評価の検討

トカゲモドキ類を対象に、複数の集団の少数のサンプルに対してドラフトゲノム解析と縮約ゲノム解析を行い、集団あるいは個体のヘテロ接合度を推定した。それを従来型の多数サンプルに基づく少数遺伝子座の解析結果から得られるヘテロ接合度と比較し、前者の方法の有効性を検討するとともに、トカゲモドキ類のなかで保全優先度を評価した。また、縮約ゲノム解析のデータを用い、解析遺伝子座数と解析個体数を様々に減らした時のヘテロ接合度の推定値の動向を調べ、推定値の信頼性をある程度担保しながら、どこまで簡便にヘテロ接合度の推定が可能かを検討した。最後に、同所的に生息するヘビ類に対して縮約ゲノム解析を行い、ヘテロ接合度の比較を通して相対的な保全危急度を評価した。

## ４．結果及び考察

（１）個々の種ないし系統群に対する縮約ゲノム解析と脆弱性の評価

各種・種群の解析結果と考察を以下に示す。

①トカゲモドキ類

トカゲモドキ類は奄美・沖縄諸島に６種が生息しており、その全てが県の天然記念物および国内希少野生動植物種（以下、国内希少種とする）に指定されている。環境省により保全事業が進められているが、６種のなかでも特に緊急性の高いものに注力すべく、保全重要性による順位づけが課題となっている。本研究では、特に著しく数が減っているとされるイヘヤトカゲモドキと、比較のためクロイワトカゲモドキについて、全ゲノム解析によりヘテロ接合度を算出し、すでに得ていたGRAS-Diによる縮約ゲノム解析の結果とも比較しながら、脆弱性を評価した。

全ゲノム解析の結果、複数個体を対象にしたイヘヤトカゲモドキでは、全ゲノムの86%程度、11.8億ベースペアの配列が得られた。このデータに基づき、各個体のヘテロサイトの割合を算出したところ、イヘヤトカゲモドキは0.045–0.081（平均0.064）%程度であったのに対し、クロイワトカゲモドキは0.11%程度と高かった（図2.1）。今のところ比較できるデータは多くないが、イヘヤトカゲモドキの数字は、コモドドラゴンやインドガビアルよりは高く、アルダブラゾウガメよりやや低く、哺乳類の絶滅危惧I類相当である。縮約解析の結果もあわせてみると、イヘヤトカゲモドキの遺伝的多様性はもっとも低く、やはり集団サイズが小さいと推定される。この種と並び、渡名喜島や久米島の種についても保全の優先度は高いことが示唆される。

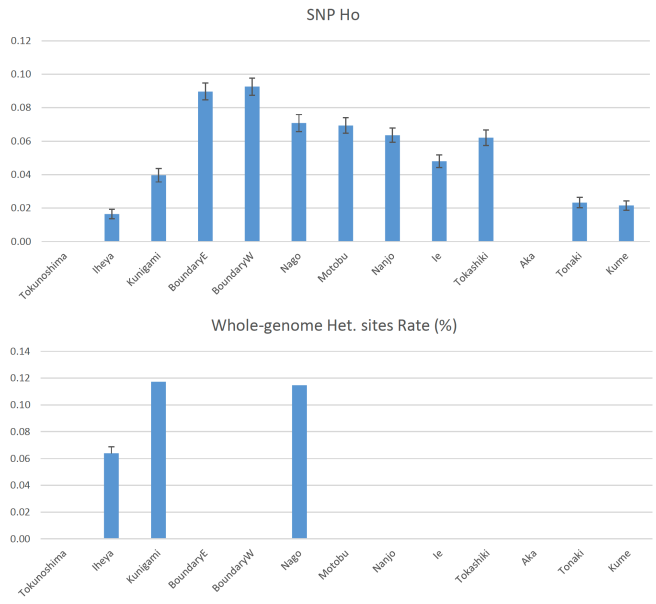


図2.1. トカゲモドキ類各集団の遺伝的多様性。上段: 縮約ゲノムデータに基づくヘテロ接合度、下段:全ゲノムデータに基づくヘテロサイトの割合

②ミヤコカナヘビ

本種は国内希少種に指定され、現在、環境省による保護増殖事業の対象になっているほか、地方自治体によっても保全対象種に位置付けられている。本研究では、分布域全体から集めたサンプルに対してMIG-seq法による縮約ゲノム解析を行った。その結果、伊良部島と下地島の集団が、それ以外の集団から明確に分化していることが明らかになった。野外調査により、伊良部島と下地島では本種の生息地点が極めて限られることがわかっていたが、それらの集団が独自の遺伝的特性を持つことがわかったため、その保全上の重要性がとても高いと位置付けることができた。

さらに、各サンプルについて塩基多様度を算出したところ、伊良部島と下地島を含む離島集団における多様度は、宮古島の比較的安定した集団のそれ比べて明らかに低く、したがって集団サイズが小さいことが示唆された（図2.2）。また、本種の塩基多様度は、これまでに示されている哺乳類の絶滅危惧種の値と同程度であった。[redacted]

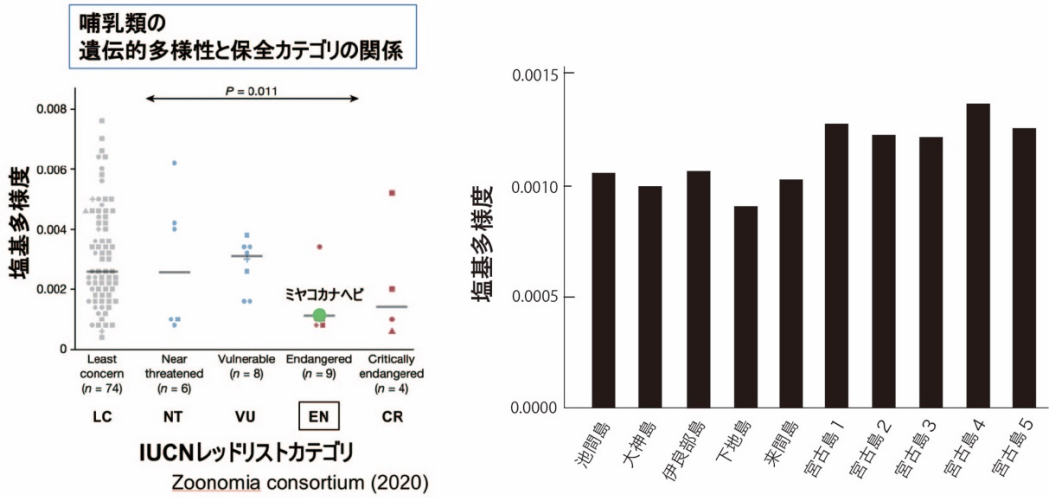


図2.2. ミヤコカナヘビ各集団の塩基多様度と、哺乳類における各レッドリストカテゴリーの種が示す値との比較

③ミヤコトカゲ

ミヤコトカゲは国内では分布が宮古諸島に限定されるものの、国外ではマリアナから東南アジア、ソロモン諸島に至る広大な分布域を持つ非固有種であり、その保全上の重要性については、関連する知見の不足もあり、十分検討されているとは言い難い。本種については、ちょうど宮古諸島内での分布の全貌を掴む調査を実施したところでもあったため、諸島内で広く集めたサンプルに対し、MIG-Seq解析を行った。その結果、本種は宮古諸島のなかでも地域ごとに幾つかの遺伝的グループに区分できることがわかった（図2.3）。近年のmtDNAを使った研究により、本種の宮古諸島の集団はフィリピンのカラヤン島の集団と非常に近いことが示されたが、台湾やルゾンの集団とは若干の分化が認められる。今回の分析で、宮古諸島のなかでも明確な地理変異が認められたということは、宮古諸島の集団は確立されてからある程度の時間が経過していることを示唆している。カラヤンの集団との関係は、いずれ再度、検討される必要があるとして、他の地域とは違った独自性を持っていることも考えられる。さらに、宮古の集団は断片化しており、潜在的な脆弱性はかなり高いと考えられる。この点は、分布調査の結果とも整合的である。

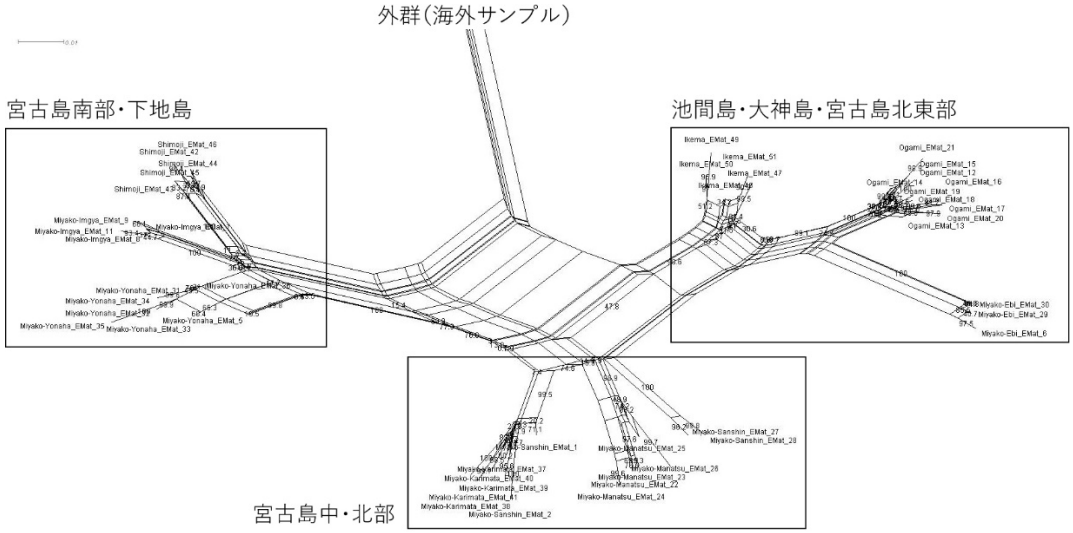


図2.3. 縮約SNPデータに基づく宮古諸島産ミヤコトカゲの個体間の遺伝的関係

④キクザトサワヘビ

本種は流水域に生息する変わった生態をしていて、沖縄県の久米島に固有ということもあって数は非

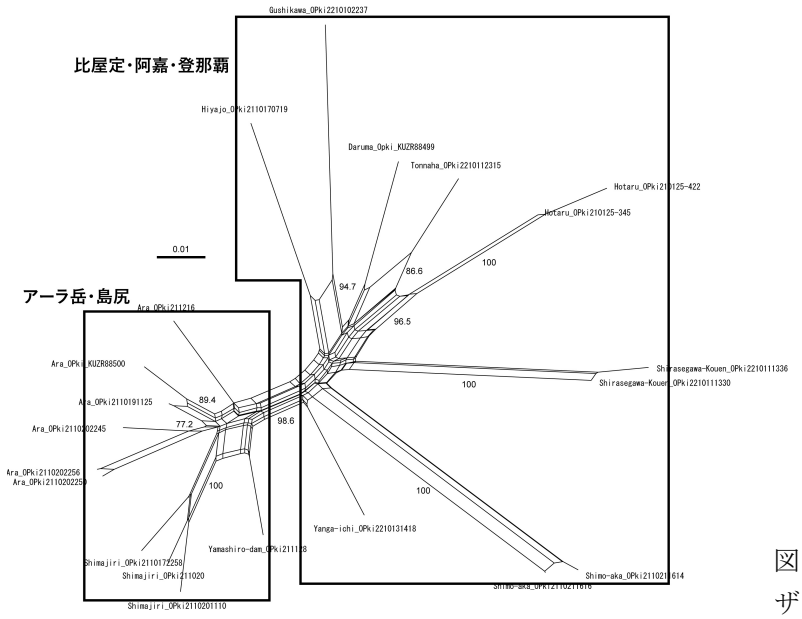


図2.4. 縮約SNPデータに基づくキクザトサワヘビの個体間の遺伝的関係

常に少ないと考えられており、国内希少種に指定されている。本種に対しても、島内のあちこちから採取したサンプルを分析に供したが、確実に多くの遺伝子座数みるためMIG-Seqに加えてMAAS法による解析も行った。その結果、久米島内で地理的な変異があることが確認された（図2.4）。すなわち、島の北・中央部の宇江城岳を中心とする地域と、南部のアーラ岳を中心とする地域の間で、若干の違いが見られる。この結果は、これら２つのエリアを分けて本種の保全にあたることの重要性を示している。この結果は、宇江城岳に次いで島の南部にも本種の保護区域が設けられたことの意義を改めて裏付けるものである。この解析で個体ベースで算出したヘテロ接合度は0.001%以下であり、全体として多様性のレベルは極めて低い。地域間の比較をするため多型サイトを含む遺伝子座を抽出してヘテロ接合度を再計算すると、南部よりも北部の個体が低い傾向があった。

⑤ヒバァ類

ヒバァ類には国内希少種のミヤコヒバァが含まれる。また先行研究によりガラスヒバァにも複数の種が含まれている可能性が示されており、その一部は分布域が非常に限られたタクソンになる可能性がある。この分類学的な未解決点を確認するために、本種群についてはサブテーマ１でMIG-seq解析を行い、未記載種２種が含まれることを示した（サブテーマ１の「４.結果と考察」を参照）。ここでは同じデータを使って集団サイズの指標であるヘテロ接合度を算出した。その結果、その値は島嶼の面積に比例する傾向があり、ミヤコヒバァで特に値が低いわけではなかった。また、種のレベルで分割される可能性のある集団も、島面積を考慮した場合、特に低い値を示すわけではなかった。表層水が少ない宮古島ではミヤコヒバァの発見例はとても少なく、非常に危機的な状況にある可能性も考えられた。今回の結果だけからその可能性を否定するのは危険であるが、隠遁性が高いことで個体数の少なさが強調されすぎている可能性がある。

⑥ヤエヤマセマルハコガメとリュウキュウヤマガメ

これら２種のカメはともに捕獲や売買が規制されているが、未だ商取引の対象とされ、違法な所持や運搬がみられる。これらの種については、分類学的見直しの観点からサブテーマ１でMIG-Seq解析がなされたが、集団内の遺伝的多様性についても分析したのでその結果を示す。

ヤエヤマセマルハコガメは石垣島と西表島の２島に分布しており、両島の間で若干の遺伝的差が検出された（サブテーマ１）。それら２島の集団のヘテロ接合度の値は0.022%と0.024%で、大陸や台湾のサンプルよりも低かったが、とりわけ小さい数字ではなかった。両集団とも島内での明確な構造は検出されず、島全体で一つの集団をなしていると考えられる。

リュウキュウヤマガメのヘテロ接合度は、沖縄島北部の集団で0.031%、渡嘉敷島集団で0.019%、久米島集団で0.025%となり、渡嘉敷島集団で低かった。ただし、塩基多様度では、久米島と渡嘉敷島が逆転した。今回分析できた渡嘉敷島のサンプルは一個体のみであり、追加サンプルの分析が必要である。また、個体のヘテロ接合度は、その個体が生まれた時（厳密には受精した時）の集団の遺伝的多様性を反映すると考えられるため、現状とは時間差がある可能性もあり、その点にも注意が必要である。

⑦キタサンショウウオ

国内における生息域の全体を網羅するようにサンプリングを行い、GRAS-DiでSNPの解析を行った。[redacted]

⑧ヤクヤモリ

ヤクヤモリは分布域のほとんどすべてが同属のミナミヤモリの分布域に内包され、両者が出会う幾つかの地域で浸透性交雑が確認されている。そのため、浸透性交雑のさらなる進行ついて注視する必要がある。本研究ではMIG-seq法により従来２種の交雑が知られていなかった屋久島でヤクヤモリとミナミヤモリの分析を行い、両者の間で交雑が進行していることを明らかにした。

⑨ニホンイシガメ

本種は、外来とされるクサガメとの交雑による遺伝的汚染が懸念されているため、MIG-seq法によりその点を検討した。その結果、これら２種の間では戻し交雑も頻繁に起きていることが明らかになり、対策の必要性が改めて示された（図2.5）。

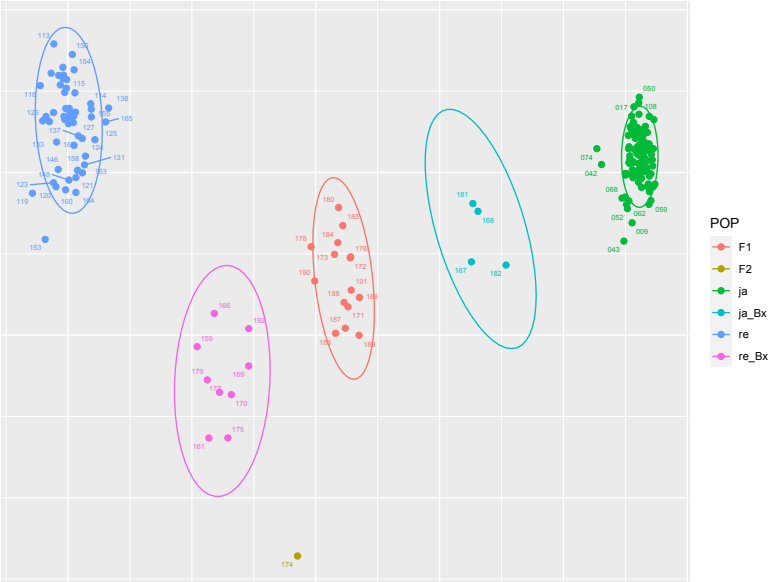


図2.5. 縮約SNPデータに基づくニホンイシガメとクサガメ、および交雑個体の判別分析の結果.両端の緑と青のプロットがそれぞれニホンイシガメとクサガメの純系個体である。中央のオレンジのプロットは雑種第１代、それと純系個体の間にくるプロットは戻し交雑個体と考えられる

（２）ドラフトゲノム配列参照情報の構築

各々の研究機関で収集し、抽出したDNAを集約し、Nextera XT DNA Library Preparation Kit（イルミナ社）を用いてショットガンDNAライブラリ調整を行った。この過程でいくつかの独自の調整を加えたあと、HiSeq X委託次世代シークエンシングに供した。出力データを解析した結果、比較的ゲノムサイズが小さい爬虫類では１種あたり150–300億塩基程度（およそ6–18Xの深度）、ゲノムサイズが大きな無尾類で2–4倍程度のデータが得られた。複数個体を分析したイヘヤトカゲモドキ７個体では133–345億塩基のデータが得られた。このトカゲモドキ属の*C* value値は約1.86であることから、ゲノムサイズはおよそ15.9億塩基対（ヒトの約半分）であると推定された。その他の種でもほぼ同等のデータがえられた。全体で48種61個体のゲノム配列を得たため、縮約ゲノム解析を中心に、今後の各種群におけるゲノム解析の参照データとしての活用が期待される。

（３）少数サンプルに基づく脆弱性評価の妥当性の検討

生物保全の現場では、多数いる保全対象候補種に対し危急度に応じた順位づけが必要である。しかし、発見が困難な種や、アクセスが容易でない地域にいる種については、個体数の多寡をおおまかにでも評価することさえ難しい。集団内の遺伝的多様性は集団サイズの指標として使うことができ、従来、その多様性の評価は幾つかの遺伝子座について多くの個体をジェノタイピングすることによっていた。しかしこれは、少数の個体について十分に多い遺伝子座についてジェノタイピングするのと原理的には同じ

である。その検証のため、上記（１）で示したトカゲモドキ類のデータに、過去に実施したマイクロサテライトデータを加え、多検体・少数座位のマイクロサテライトデータ、多検体・多数座位の縮約SNPデータ、少数検体・超多数座位の全ゲノムSNPデータの解析結果を比べ、それらが整合するかを検証した。また、検体数と座位数を変化させ、それらをどの程度まで減らすと信頼に足る推定ができなくなるかを検討した。

３つの解析手法で得られたトカゲモドキ類各集団の遺伝的多様性の値を図2.6に示す。この図にみるように、得られた推定値のパターンは手法間で概ね整合した。次に、１個体の全ゲノム解析のデータを使って、解析塩基対数を意図的に減らし、遺伝的多様性の推定値がどのように変化するかを観察した。遺伝的多様性の指標としてヘテロサイト割合を用いた。その結果、解読塩基対11.8–0.97億の範囲では、ヘテロサイト割合の推定値にほとんど差はなかった。上の（２）の項目で、トカゲモドキのゲノムサイズが15.9億塩基対と見積もられたため、少なくともその1/15ほど解読すれば、十分信頼にたる値が得られる。

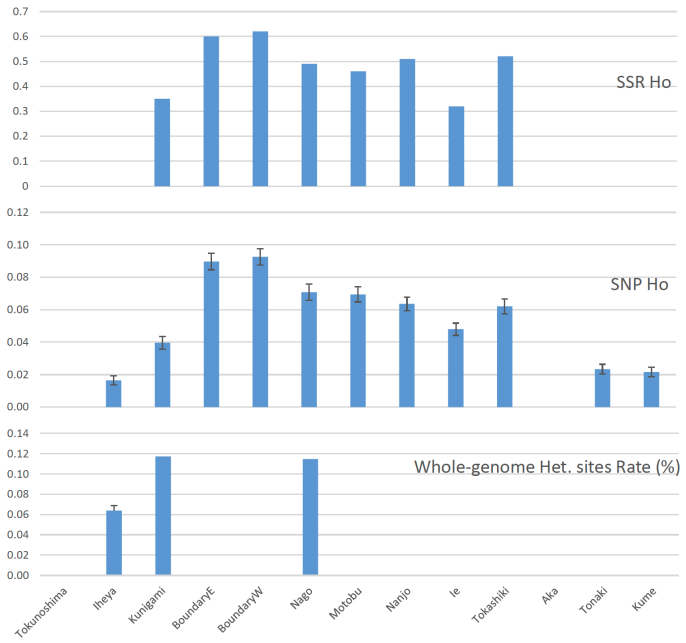


図2.6. ３つの手法によるトカゲモドキ類の各集団内の遺伝的多様性の推定値。上段：マイクロサテライト、中段：縮約ゲノム解析（GRAS-Di）、下段：全ゲノム解析

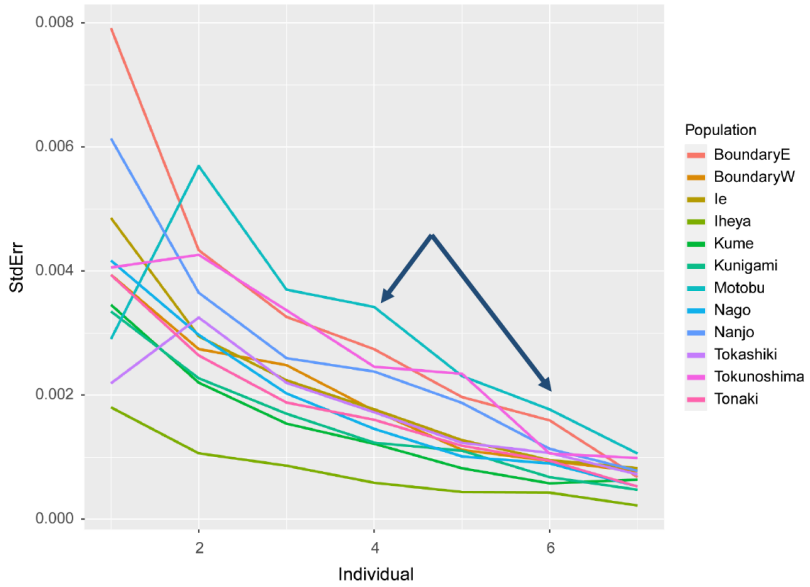


図2.7. トカゲモドキ類各集団のヘテロサイト割合の標準誤差と分析個体数の関係

次に、縮約SNP解析のデータを用いて、解析個体数とヘテロサイト割合の推定値の信頼性の関係をみてみる。図2.7は、トカゲモドキ類の各集団のヘテロサイト割合の標準誤差がサンプル数に応じてどのように変化するのかを表している。標準誤差は、サンプルが１、２個体の時には非常に大きいが、３、４個体ぐらいから収束し始める。よって、分析に供することのできる個体の入手が非常に困難な場合は、数個体の分析でも、ヘテロサイト割合の推定で大きく外れた値を出してしまう確率は大きくない。以上のことをまとめると、表2.1のようになる。

表2.1. 限られた試料・資金のなかで集団の遺伝的多様性の評価をする場合の考え方

| サンプル数 | 予算 | データ | 分析 | 注意が必要な点 |
|---|---|---|---|---|
| とても少ない<br>（1～3個体） | 多い | Whole-genome SNP | ヘテロ割合 | 評価した集団の範囲が不明<br>1個体だと精度が低いかもしれない |
| | 少ない | 縮約SNP | ヘテロ割合 | 評価した集団の範囲が不明<br>1個体だと精度が低いかもしれない |
| 少ない<br>（4～6個体くらい） | | 縮約SNP | ヘテロ割合 | 評価した集団の範囲が不明 |
| そこそこ以上<br>（10個体＜くらい？） | | 縮約SNP | Population genetics的分析＋集団構造解析 | |

さて最後に、上記のことを踏まえ、MIG-seq法を用いた縮約ゲノム解析により、同所的に生息するヘビ類のヘテロ接合度を調べ、相対的な集団サイズの評価を試みた。対象としたのは久米島に生息する８種のヘビのうち単為生殖のブラーミニメクラヘビを除く７種で、分析個体数はそれぞれ８（ハイのみ７）とした。得られたデータをもとにヘテロ接合度と塩基多様度を算出した。その結果、生息環境が流水域に限られ、国内希少種に指定されているキクザトサワヘビの値が顕著に小さく（図2.8）、やはり集団サイズが小さいことが示唆された。一方、発見例が少なく、生息状況について詳しい評価が難しいハイは、比較的普通にみられるアカマタと同程度の値を示した。この結果は、ハイの発見例の少なさは個体数の少なさを反映しているわけではなく、単に、隠遁性の高い本種の習性が人による発見を難しくしていることを反映している可能性を示している。

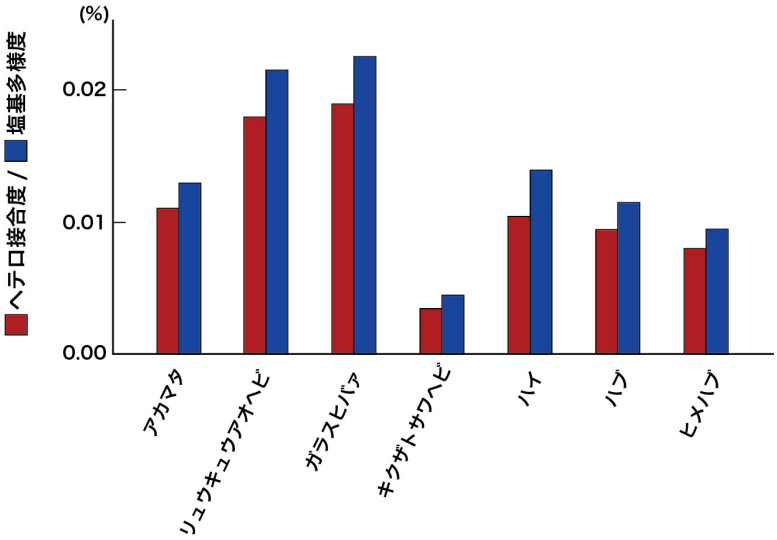


図2.8. 縮約解析に基づく久米島産ヘビ類７種のヘテロサイト割合と塩基多様度の比較

## ５．研究目標の達成状況

37属48種のドラフトゲノムを決定した。解析が追いつかず目標の60属には満たなかったが、一部の希少種について複数の個体を分析することで脆弱性評価にも使えるデータを得ることができた。希少種ゲ

ノムデータベースはまだデータ解析中であり、完了し次第、ウェブサイトで公開する。また、保全上重要と思われる種としてトカゲモドキ類、ミヤコカナヘビ、キクザトサワヘビ、セマルハコガメ、リュウキュウヤマガメ、キタサンショウウオを、希少性について情報が不足している種ないし種群としてミヤコトカゲ、ヒバァ類、ヤクヤモリ、ニホンイシガメを選定してゲノム解析を加え、遺伝的多様性に着目して種の保全上の脆弱性について評価した。また、集団構造解析の結果をもとに保全単位を明確にしたうえで、一部の分類群では、それらの相対的な保全優先度を示した。さらにヘテロ接合度に基づき、種ないし集団の脆弱性について簡便に評価する方法を提案した。

## ６．引用文献

Zoonomia Consortium 2020. A comparative genomics multitool for scientific discovery and conservation. Nature 587: 240–245.

## Ⅱ－３　DNAバーコーディング・ライブラリの構築

琉球大学
　熱帯生物圏研究センター　　戸田　守

＜研究分担者＞
千葉県立中央博物館生態・環境研究部　　栗田 隆気
琉球大学医学部実験実習機器センター　　佐藤 行人
京都大学地球環境学堂　　西川 完途
東海大学生物学部生物学科　　鈴木　大

＜研究協力者＞
琉球大学教育学部　　富永　篤
琉球大学熱帯生物圏研究センター　　和智 仲是
京都大学地球環境学堂　　鈴木 智也
京都大学地球環境学堂　　許斐 有希
琉球大学大学院理工学研究科　　岡本 康汰
琉球大学大学院理工学研究科　　山本 拓海
琉球大学熱帯生物圏研究センター　　廖　珠宏
琉球大学大学院理工学研究科　　陶　善達

［要旨］
種同定に関する強力なツールであるDNAバーコーディングの機能を強化するため、その参照データであるDNAバーコーディング・ライブラリの構築を行った。対象は、日本国内に生息する両生爬虫類全種とし、それらのミトコンドリアDNA（mtDNA）の全長配列を揃えることを目標とした。配列の取得は、mtDNAを２～４分割してロングPCRにより全体を増幅し、それをショートリード・シーケンサー（MiSeq, イルミナ社）で解析したのち、出力データをアセンブルすることで行った。多くのサンプルを集約してMiSeq解析をすることにより効率化を図った。一部領域の欠損があった場合はサンガーシーケンサーにより穴埋めをした。その結果、国内の種の90%を占める199種、356個体のmtDNA配列を得た。ただし、繰り返しが多い調節領域はde novoアセンブルではうまくいかないことのほうが多かったため、除外した。世界的に使われているBarcode of Life Data System (BOLD)が対象とするCOIの前半部の領域については、さらに76個体、合計432個体分の配列を揃えた。得られた配列情報をもとに、有尾類については、国産種全種を識別可能なDNAバーコーディング領域を探索し、その増幅のためのユニバーサルプライマーを設計した。また、爬虫類の幾つかのグループの配列データを使い、これまでに提案されているバーコーディング領域の同定精度を評価した。配列を得るまでの一連の作業のなかでは、やはりPCR増幅にもっとも手間がかかり、それを軽減する一つの方法は、必要なプライマー数を減らすこと、すなわち、２分割での効率的な増幅から始めることである。PCR後は、特殊な場合を除き、個体ごとに増幅産物を混合して処理すると省力化とコストダウンを図ることができる。調節領域を除くmtDNA全長配列を決定するのにかかった金額は１個体当たり2200–4000円であった。

### １．研究開発目的

生物種の正しい同定は生物保全に関わるあらゆることの基礎である。生物多様性保全のための保全単位の認識、生息状況の把握、違法な採集・売買に関わる関連法の適切な行使、一般の方々による絶滅危惧種の存在の認識、そしてその保全に関わる市民参加型の活動など、あらゆる場面で、それは例外なく重要である。近年、DNA分析技術が生物分類に普通に使われるようになるに至り、生物学的実態に即し

たより正確な種分類が推し進められたことに伴い、DNAを見なければ識別が難しい種が増えたのも事実である。そのような状況のなか、DNAバーコーディングによる種の同定は非常にパワフルなツールであるが、その活用のためには充実した参照データが必要である。また、そのような参照データが不足している分類群が多数残されていることを考えると、参照データの効率的な構築法の検討も大切である。ここでは、日本産両生爬虫類をモデルとして網羅的なDNAバーコーディング・ライブラリを構築し、さらに他の分類群における今後の同様なライブラリ作成の助けとなるよう、ライブラリ構築の効率的な作業フローを示し、またコストについても資料を残す。

## ２．研究目標

外来種を含む国産の全種200種あまりについてミトコンドリアの全長配列を決定し、データベース化するとともに、任意の配列との相同性検索をする自動化された解析パイプラインを構築する。また、データベース構築では効率性を追求し、そのワークフローを提示するとともにかかるコストについてもデータを提供する。

## ３．研究開発内容

（１）日本産両生爬虫類のmtDNAデータベースの構築

本サブテーマに関わる各研究室でサンプルを整理し、不足しているものは収集して、DNA抽出までを行ってから集約した。次の方法によってmtDNAの塩基配列を決定した。それは、１）mtDNA全体を2–4分割にしてPCR増幅、２）NexteraXT DNA Library Prep Kit（イルミナ社）によるPCR増幅産物の断片化とタグ付け、３）MiSeq（イルミナ社）解析、４）MiSeq出力データの篩い分けとアセンブル、５）サンガーシーケンスによる欠損箇所の穴埋めである。多くのサンプルを集約して３）を行うことにより効率化を図った。４）のアセンブルは、既知配列に影響されないようにまずde novoで行い、うまくいかない場合に近縁種の既知配列を参照するようにした。とはいえ、それでも繰り返しの多い調節領域の配列の決定は難しい場合が多かった。とはいえ調節領域はバーコーディングには向かないため、ここでは調節領域とその近傍は欠けてもよいこととした。得られた配列は、BLAST検索、近縁種とのアラインメント、部分配列の系統樹作成を組み合わせて狙いのものであるか確認した。基本的に上記の手順を踏んだが、特にPCRの条件などが分類群によってかなり違ったため、実際には、有尾類、無尾類、爬虫類の３つに分けて進めた。それぞれの概要は以下の通りである。

①有尾類

有尾類は既存のmtDNAを２分割したロングPCR用プライマーでの増幅から始め、増幅ができなかったものについては４分割用プライマーを設計して増幅した。試行の末どうしても増幅ができないサンプルに対しては、全ゲノムショットガンシーケンスを行い、参照配列にマッピングする方法でアセンブルし、配列を得た。

②無尾類

無尾類のmtDNAでは、遺伝子の配置変動や、調節領域の極端な伸長などが知られ、一律の方法によるPCR増幅は容易でないことが予想された。それでもまず、無尾類に既存のPCRプライマーから全体を４分割するプライマー・ペアを選定し、増幅を試みた。これがうまくいかな場合は、簡略化のため２分割プライマーを設計し、再びPCRを行った。それでもうまくいかない場合はさらに個別にプライマーを改良した。

③爬虫類

爬虫類では、既知の配列をもとに４分割の汎用プライマーを設計し、増幅した。それで増幅できない場合は、目や科のレベルに分けてプライマーを設計し直し、増幅させた。その他、より効率を重視して、mtDNAのほぼ全長を一気に増幅する超ロングPCRも試行した。脊椎動物のmtDNAでは、一般に、２つの

rRNA遺伝子（16S rRNA領域にから12S rRNA領域）の中に、分類群を超えて非常に安定している領域が幾つかある。そこにプライマーをとり、ほぼ全長の15–16k pbを増幅するのが超ロングPCRである。これには、同じプライマーで両生類でも爬虫類でもほとんどの種に同じプライマー当たるという利点がある。また、カメ類など一部の分類群では核に転写したミトコンドリアDNA様配列（numt）もPCRにかかってきてしまったため、その場合は、ネスティッドPCRを使って解決した。

（２）バーコーディング領域の検討と提案

比較的早期に配列データを得ることができた有尾類について、塩基配列情報を使って日本産有尾類全種を識別可能なバーコーディング領域を探索した。配列が可変的な短い領域を挟む非可変的な部位を探索し、ユニバーサルプライマーを設計した。設計したユニバーサルプライマーを使って有尾類各種のサンプルを増幅し、ダイレクトシーケンスを実施して配列を得て、種の識別が可能であるかを検証した。

爬虫類では、複数種を含み、各種複数の個体の配列を決定した一部の属について、脊椎動物などで提案されているバーコーディング領域の配列を切り出し、系統解析によって種ないし種内系統のクレードが正しく再現されるかを分析し、既存バーコーディング領域の有用性と限界を示した。

（３）mtDNAデータベースの効率的な構築とコストの評価

上記（１）で行った実験を振り返り、配列取得までに辿った作業フローを示すとともに、要改善点などをまとめた。また、今後の同様な取り組みの参考資料となるよう、ここまでにかかった金銭的なコストを算出した。

## ４．結果及び考察

（１）日本産両生爬虫類のmtDNAデータベースの構築

有尾類42種、無尾類50種、爬虫類107種について、調節領域以外のほぼ全長にわたる配列を決定した。有尾類では本プロジェクト進行中にも種の記載が進み、全種はカバーできなかった。無尾類は全種の配列を得た。爬虫類では、セグロウミヘビの新鮮なサンプルが手に入らず、ロングPCRによる増幅ができなかった。一部の短い領域の増幅は可能だったため、サンガー法でND4領域の配列を決定し、既存のデータと比較したところ、太平洋に広く分布するものと完全一致した。太平洋に広く分布する系統のmtDNA全周配列はすでにGenBankに登録があるため、参照の際にはこれで代用できることを確認した。また、外来種のカミツキガメの配列が決定できていないが、これもGenBankに全周の登録がある。

配列を決定したのは多くの種で１、２個体であるが、状況が許す幾つかのグループでは、種内変異を考慮して数個体の配列を決定した。そのため、ほぼ全長の配列が取れた総個体数は356である。これらの配列のなかには未だ細部を点検中のものがあり、それが済み次第公表する。これらのデータの多くは調節領域こそ欠いているものの、国内の両生爬虫類のmtDNA配列を網羅しており、環境中から得たeDNAを含め、任意のサンプルから得た任意の配列の参照情報となる。検索パイプラインに関しては、コストやユーザーの使い勝手の点から、新たに独自のものを構築するのではなく、既存の検索システムを使用してもらうよう方針を変更した。論文の公表とともに全ての配列情報をレポジトリに置くことで、任意のユーザーがダウンロードしてローカルデータベースとしてBLAST検索に使用できる。

上記の配列のほかに、調節領域以外にもアセンブル結果に問題があり一部の領域の配列が欠けてしまっているものが76個体ある。それらは、国際的なDNAバーコーディングシステム（Barcode of Life Data System: BOLD）に使われているCytochrome c oxidase subunit I（COI）の658塩基対の配列は取れているため、ほぼ全周の配列が決定できた356個体のデータと合わせ、432個体についてCOIの当該領域の配列を取得した。これらも参照データとして広く活用されることが期待されるため、点検が完了し次第、BOLDに登録・公開する。

今回、配列を決定したサンプルには、尖閣諸島のヘビ類や、南硫黄島のヤモリなど、容易にアクセスができない地域から採られ、長期間組織が保存されていたものがいくつか含まれる。それらのサンプルから得た配列の一部をGenBankに登録されている同種や近縁種ものと比較した結果、当該集団の種や系

統的な帰属を知ることができた（詳細は、サブテーマ１の項目を参照）。検索と参照の関係が逆転しているが、それらの結果は、分析が十分にできない（あるいは十分でない）地域の集団の帰属を知るためにDNAバーコーディングがいかに有効であるかをあらためて示すものである。

（２）バーコーディング領域の検討と提案

①有尾類

日本産有尾類には多くの保護対象種が含まれ、また、形態形質に基づく識別も容易でない種が多いため、DNAバーコーディングの用途も特に多いと考えられる。そこで、本プロジェクトで決定したmtDNA全長配列をもとに、日本産有尾類をすべて識別し同定することが可能なバーコーディング領域を探索し、その領域を増幅させることのできるユニバーサルプライマーの設計を試みた。その際、環境DNA解析など、必ずしも質が良くないDNA抽出物の増幅も想定し、標的配列長をなるべく短くおさえることにも留

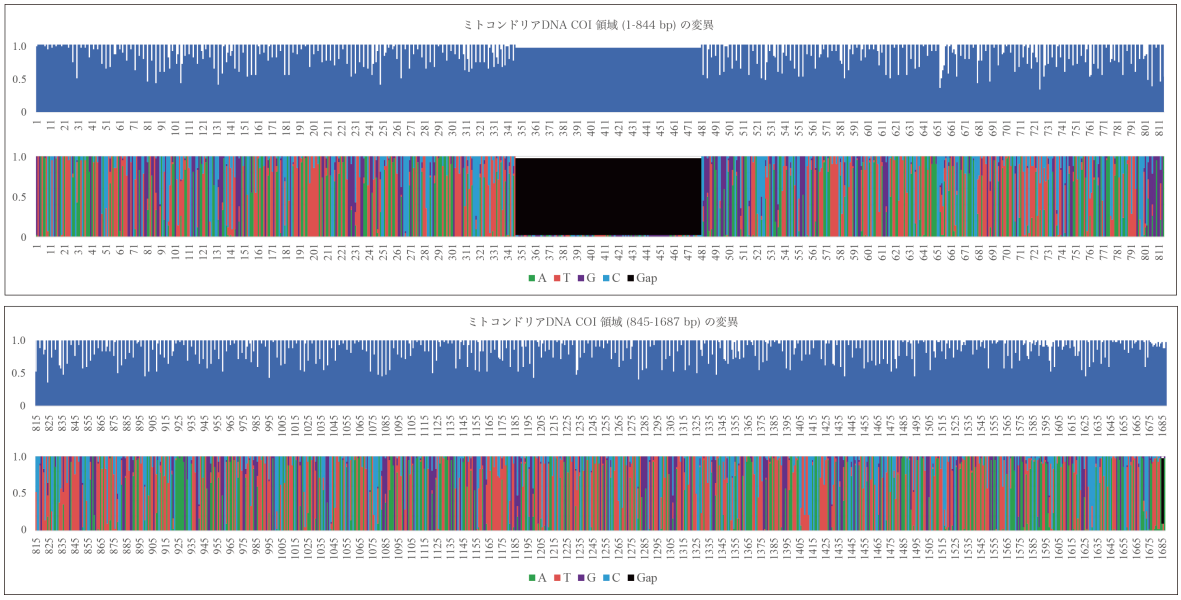


図3.1. 日本産有尾類におけるmtDNA COI領域の一致率（青色のグラフ）、および各塩基とギャップの配置

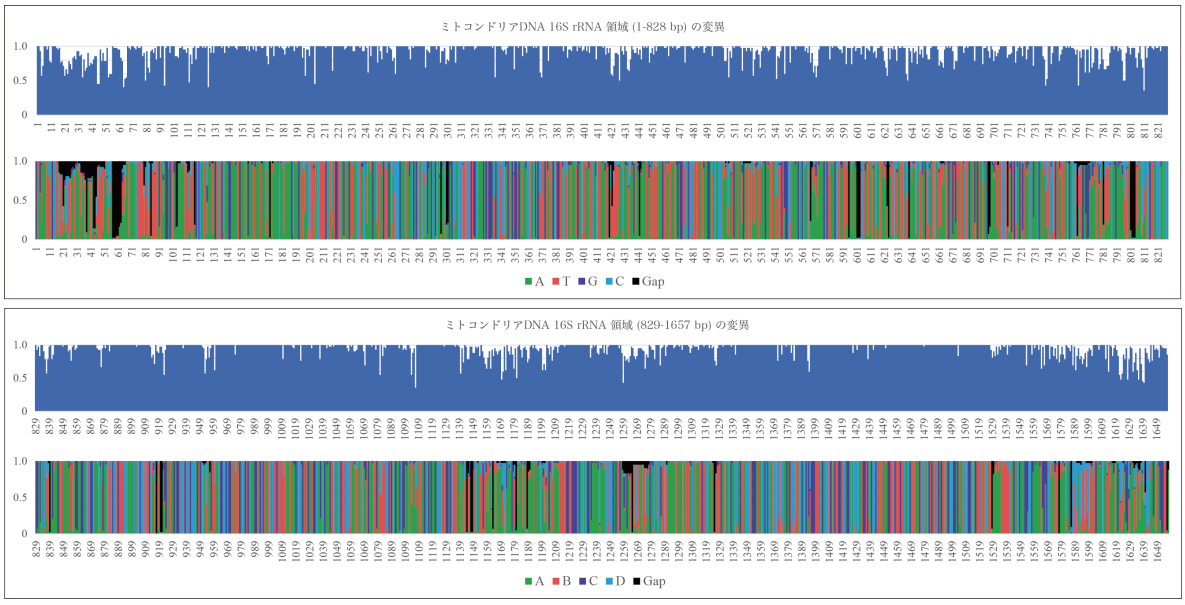


図3.2. 日本産有尾類におけるmtDNA 16S rRNA領域の一致率（青色のグラフ）、および各塩基とギャップの配置

表3.1. 本研究で設計したユニバーサルプライマーの配列

| プライマー名 | Sequence 5′-3′ |
|---|---|
| Urodeles_16S_F01 | [redacted] |
| Urodeles_16S_R01 | [redacted] |

意した。日本産有尾類のmtDNAをアラインメントした結果、多くの分類群でバーコーディング領域として利用されているmtDNA COI領域は、種間の変異は多いものの日本産有尾類全種で配列が安定している領域（すなわち、ユニバーサルプライマーの作成に適した領域）がないため、mtDNA COI領域にユニバーサルプライマーを設計するのは困難であることがわかった（図3.1）。

そこで、mtDNA COI領域よりも変異が少ないmtDNA 16S rRNA領域で適当な部位を探索した結果、可変的な領域を挟む安定的な箇所（つまり、種によって配列が異なるが、同じプライマーが使える領域）を見いだすことができた。その部分にプライマーを設計した（図3.2、表3.1）。

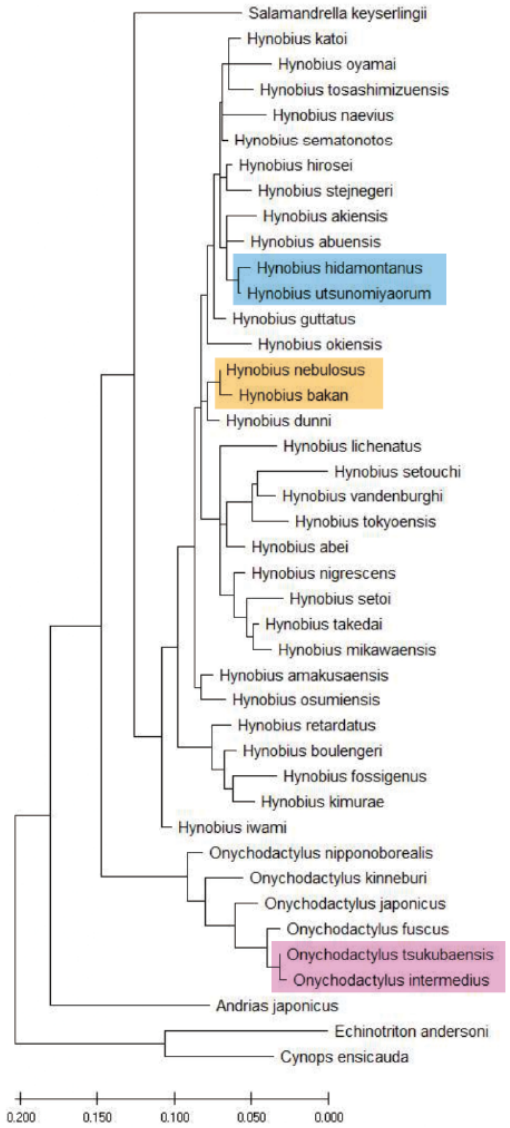


図3.3. 本研究で開発したユニバーサルプライマーで得られたmtDNA 16S rRNA領域（約250 bp）に基づく最尤系統樹．青・オレンジ・赤の組み合わせの種間は配列が似ているものの種識別については問題なくできる

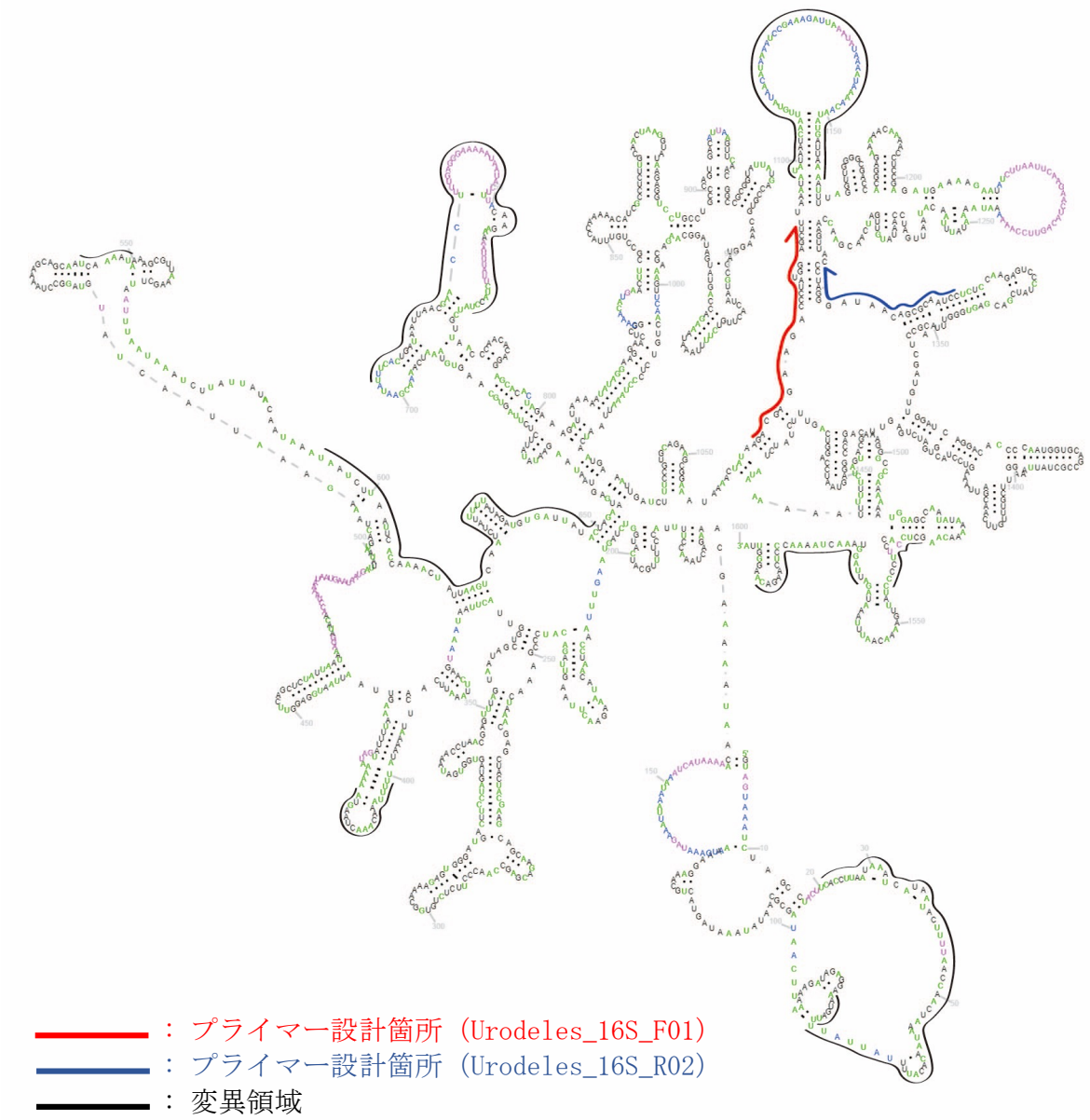


図3.4. カスミサンショウウオ *Hynobius nebulosus* のmtDNA 16S rRNA領域の二次構造とプライマー設計箇所および変異領域

開発したプライマーを使って有尾類各種の抽出DNAをPCRにかけ、増幅を確認するとともに、ダイレクトシーケンスにより配列を得て、種識別が可能であるかを検証した。その結果、すべての種で約250 bpの配列情報を得ることができた。取得した配列データを用いて最尤系統樹を作成した結果、いくつかの種の組み合わせで配列が類似しているものの、種の識別は問題なくできることがわかった（図3.3）。

ユニバーサルプライマーを設計したこの領域は、原核生物の23S rRNA（リボソーム大サブユニット）領域の一部と相同性があり、その二次構造は有尾類だけでなく魚類でも保存されている保存性の高い領域であった（図3.4）。この領域は、本来の23S rRNA上ではタンパク質合成の過程で非常に重要な領域であり、真核生物のmtDNAでも高度に保存されていると考えられている。

以上のように、日本産有尾類のバーコーディング領域を開発したことで、保全や取り締まりのためのより正確な種同定ツールとして有用であることに加え、形態学的に同定が困難な未成熟期個体やロードキル個体の同定にも役立つと考えられ、様々な分野で利用されることが期待される。

②爬虫類

国内に３種以上が分布する属のうち、トカゲ属、トカゲモドキ属、カナヘビ属については、多くの種で複数個体のmtDNA配列が得られた。それらのデータを用い、既存のバーコーディング領域の有効性をテストした。テストは、個々のバーコーディング領域の配列だけを切り出して系統樹を描き、全長配列に基づく系統解析のなかで認識される種および種内のクレードの幾つが再現されるかを指標に行った。なお、カナヘビ属については、同じ科のコモチカナヘビも解析に加えた。スコアはノードの再現率とし、全長配列による系統樹で支持率90％以上のノード（種間の関係を表すノードは除く）と、各バーコーディング領域の配列による系統樹で支持率に関係なく再現されたノードを数えて、後者を前者で割って算出した。

その結果を図3.5に示す。図に見るように、比較した既存のバーコーディング領域のいずれにおいても種を束ねるクレードの再現率は概して高かったが、種内クレードの再現率はばらついた。そのなかで、BOLDシステムで使われているCOI前半の660塩基対ほどの領域（COI-BOLD）のスコアは高く、トカゲ属では、種内のレベルでも96%であった。その他の分類群でもCOI-BOLDのスコアは66.7–84.6%と高く、その値は16S rRNAや12S rRNA、Cyt bの全長配列のスコアを上回ることがあった。ノードの再現性は、バーコーディングにより単に該当する種を検索するというだけでなく、未知のタクソンの配列があったときに、それが何に近縁なのかまでを映し出す点で有用である。

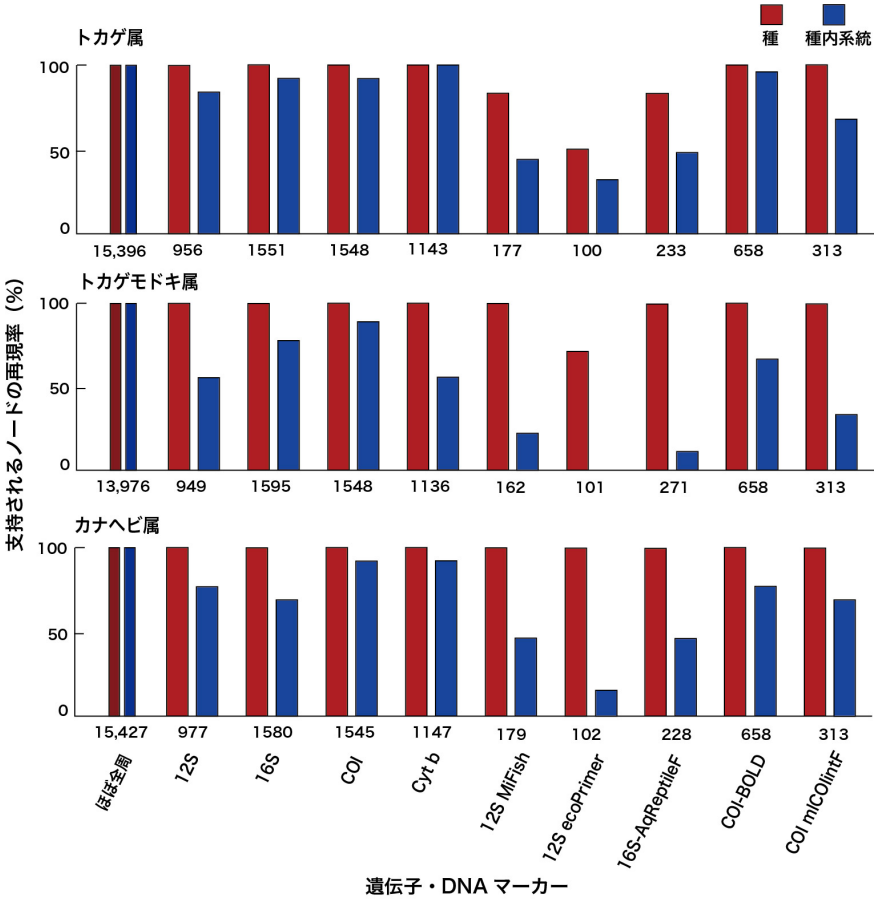


図3.5. 爬虫類の３つの属における、４つの遺伝子および、５つのDNAバーコーディング領域によるノードの再現率の比較。mtDNAのほぼ全長配列を使って描いた系統樹で支持された種もしくは種内のクレードを束ねるノードを母数とした。使用した個体数と母数のノード数（種/種内）は、トカゲ属が42、6/25、トカゲモドキ属が26、5/13、カナヘビ属が25、5/13。12S MiFish[1)]、12S ecoPrimer[2)]、16A-AqReptile[3)]、COI-BOLD[4)]、COI mlCOIintF[5)]

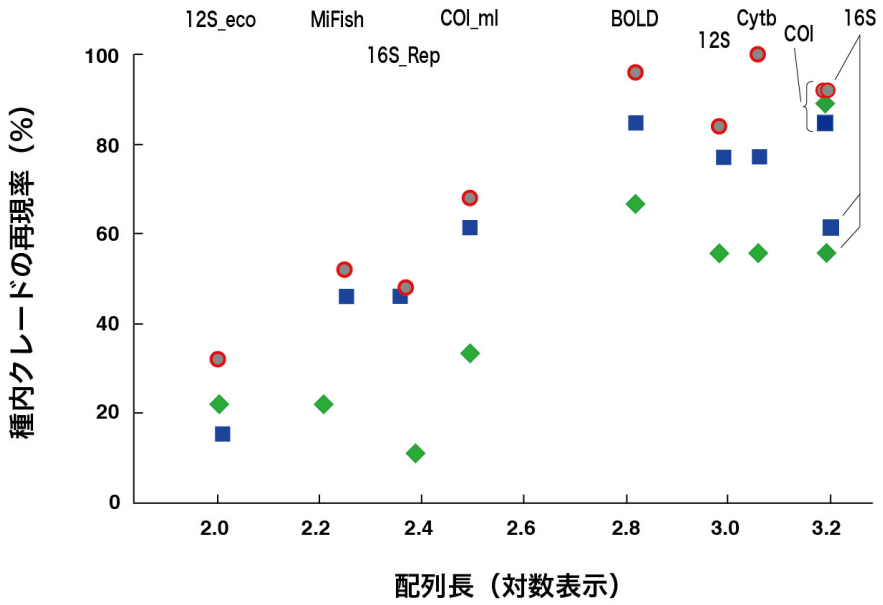


図3.6. mtDNAの４つの遺伝子と５つのDNAバーコンディング領域の配列長と、種内クレードの再現率の関係.

それ以外のバーコーディング領域では、特に種内のレベルでクレードの再現率が高くないものがあった。とはいえ、配列長が短いときに系統的分解能が低下するのは当然である。実際に、クレードの再現スコアと各領域の配列長は相関した（図3.6）。一方で、配列が長くなればPCR増幅効率は落ちるため、特に劣化したDNAサンプルを対象とする環境DNA解析や、類似するメタバーコーディング解析では、バーコーディング領域の配列長が短いことも重要である。上の図3.5の結果は、単に、種ないしクレードの識別能を示すものであり、このスコアが低いものが、バーコーディング領域として劣るとも言えない。実際の研究では、種やクレードの識別おいてどこまでの解像度が必要かなどを考慮して使い分けるとよいと考えられ、その際に、我々のこの分析の結果が参考になる。

（３）ミトゲノムライブラリーの構築にかかるコストと効率的な作業フローの検討

本研究で採用したシーケンスまでの流れは特に変わったものではないが、多くの種を並列的に扱うことの利点や問題点をまとめる。とはいえ、時間的な制約のため、それ用の実験を別に組んで問題を検証することはできなかったため、多分に経験則になる。

上記の実験の流れにおいては、PCR増幅後は、一律にNexteraXT DNA Library Prep KitとMiSeqランに持ち込めるので、やはり苦労したところはPCRであった。経験的にロングPCRは簡単ではないので、本研究では、有尾類を除いて４分割のセミロングPCR（各々5–6k bp程度が標的）から始めた。汎用性の高いプライマーで増幅を試みたが、結果的には、爬虫類では科のレベルに分けてプライマーを再設計することになった（図3.7）。また、４分割のうちの一部が増幅できないケースが頻発した。その場合、新たにプライマーを設計することになるが、それを挟む２つの領域と程よく重複させる必要があるため、その制約に悩まされた。途中から２分割での増幅（それぞれ10–12k bp）を試し、効率が向上した。

また､配列が非常に安定している16S rRNA領域にから12S rRNA領域まで一気に1増幅する超ロングPCRも試した。これには、同じプライマーで両生類と爬虫類の双方を増やせる利点がある。実験の結果、そのプライマーにより一部の検体で増幅から配列取得まで成功したが、増幅できないことが多く(成功率：25/115 =22%)、増幅できたものでも、配列をとると不足があるものもあり、作業効率を引き上げるには至らなかった。

結局、PCRは程よく２つに分けた２分割から試し、うまくいかない場合に４分割も検討するというのが結論であるが、PCRの結果はサンプルのクオリティにも大きく依存するため、ある程度の試行錯誤は

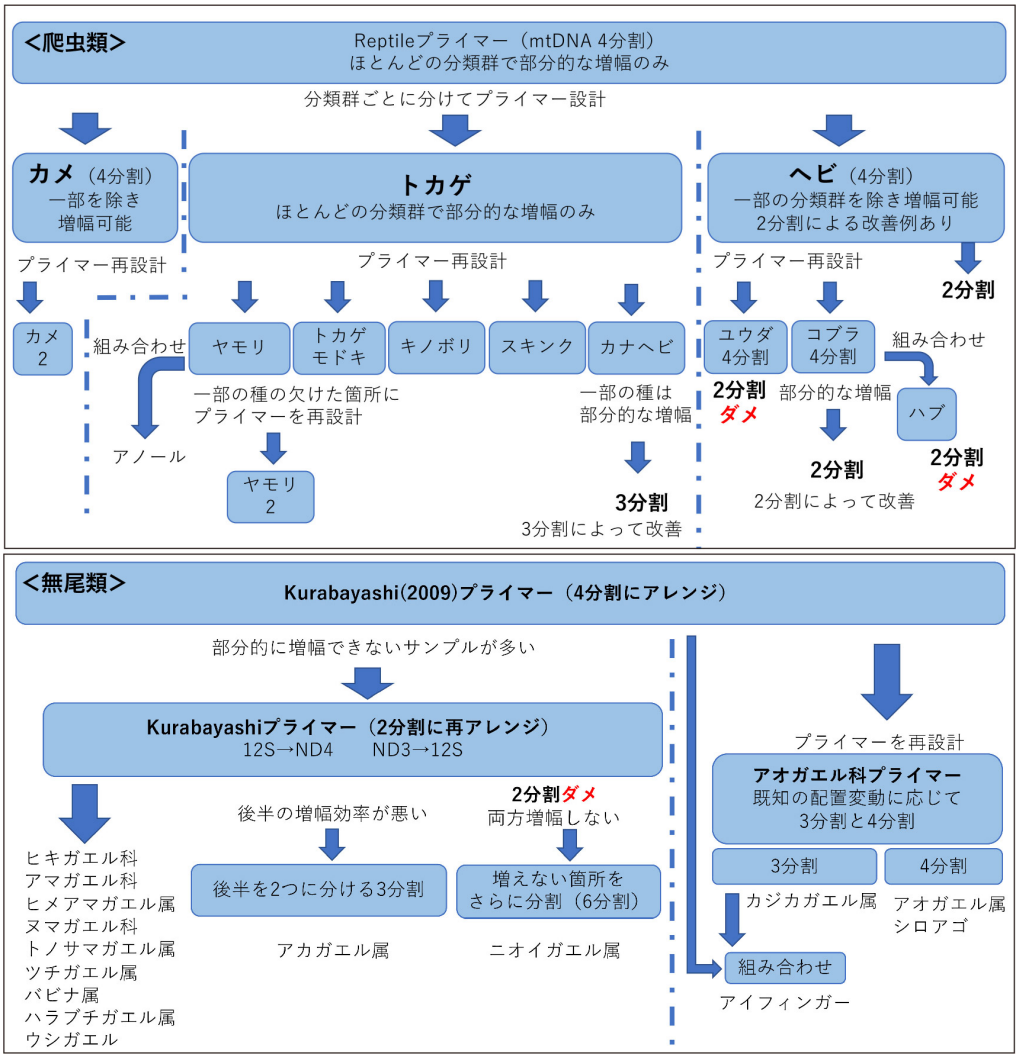


図3.7. 日本産の爬虫類と無尾類全種のロング/セミロングPCRに成功するまでの試行の概要

避けられず、また、可能な場合は鮮度のよいサンプルに切り替えるというオプションも大事である。あらかじめ各種複数のサンプルを準備し、PCRを行うと効率的である。結局、日本産両生爬虫類199種のmtDNA全体をカバーするPCR用に準備したプライマーは、試行的なものも含めて174であった。これに加え、アセンブルの穴埋めのためのサンガーシーケンス用プライマーを総計109個使用した。

これらの「穴」は、調節領域か別の場所にある繰り返し配列のせいで生じるが、ショートリードのMiSeqでは解決できない。近縁種などの既知配列にマッピングすることはできるが、それでは正確な配列はとれない。近年、ロングリードシーケンサーでmtDNAの全周配列を決定した研究では、これまで見落とされてきた繰り返し配列や、個体内多型（ヘテロプラズミー）も多いことが示されている。本研究でもトカゲモドキ類などでそういうケースが確認できた。もしシーケンスが、バーコーディングの参照用配列を揃える目的なのであれば、そういうややこしい領域は思い切ってカットするほうがよい。そのほか、核ミトコンドリア配列（Numt）も大きな障害になり、事前にネスティッドPCRなどで分離するしかない。Numtの増幅の確率を下げるためにも、２分割の長いPCRのほうが無難である。

調節領域を除くmtDNAの配列を得るためのコストについて、PCR増幅後の個体あたりの単価を計算すると、ライブラリ調整に1270-2540円、シーケンスに900–1600円（すなわち、2200–4000円程度）であった。ライブラリ調整コストに幅があるのは、例えば、ヘビ類では調節領域が２つあり、まとめて調整してMiSeqランにかけるとアセンブルができなくなるので、調整は別にやる必要があり、コストが倍になっている。逆に、そういった問題のないものであれば、２分割であれ４分割であれ、増幅産物を混合してから処理することで大幅にコストダウンできる。シーケンスのコストは使用するフローセルの違い

によるもので、高スペックのもので一度に多くの検体を裁けば単価は安くなる。これらの情報は、今後の計画に役立つものである。

## ５．研究目標の達成状況

日本に生息する199種356個体の両生爬虫類について、調節領域を除くmtDNAの全長配列を決定した。また、世界的なDNAバーコーディングシステム（BOLD）に対応するミトコンドリアCOI領域の前半部の配列を200種432個体で決定した。これらのデータは、今後、日本や周辺地域の両生爬虫類の多様性研究、環境DNAを使った分布調査、法的取締りの際の種同定など様々な用途でDNA分析を行う際の強力な参照データとなることが期待され、当初の目的は達成できたといえる。さらに、今後、特に早急にDNAバーコ-ディング技術の普及が望まれる国産有尾類で新たにバーコーディング・プライマーが開発できたことは当初の想定以上の成果といえる。このプライマーは、国産有尾類の網羅的なデータを元に開発されたものであり、今後の研究や、保全に関わる行政活動を後押しする強力なツールになると期待できる。さらに、今回の、日本産両生爬虫類を対象にしたDNAバーコーディング・ライブラリ作成の取り組みを通し、ライブラリの効率的な作成法について多くの示唆が得られたことも大きな成果である。なかでも、長い配列を得ようとするなかで、もっとも不確実な要素であるPCRの回数を少しでも減らそうという提案は、今後の同様な取り組みに活かされるものと期待できる。また、この規模のライブラリを構築するのにかかった費用の資料も、今後、別の分類群のライブラリ構築を計画する際の目安となる。mtDNAの全周配列の決定は、今後、長鎖シーケンサーに移行していくことも予想される。しかし、生物多様性研究の分野では、長期間保存されている試料の分析もしばしば必要であることを考えると、全てが長鎖シーケンサーに取って代わるとも思えない。今回得られた方法論的な示唆は、有用な情報として活用されていくと考えられる。新型コロナウイルスの影響で一時はかなり進行が遅れ、時間との戦いになった部分もあったが、当初の目標を十分に達成できたと考えている。

## ６．引用文献


1) Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J., Sato, Y., Minamoto, K., Yamamoto, T., Yamanaka, S., Araki H., Kondo, M., Iwasaki, W. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. Royal Society open science 2.7 (2015): 150088.
2) Riza, T, Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P., Coissac, E. (2011) ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. Nucleic Acid Research 39(21): e145
3) West, K. M., Heydenrych, M., Lines, R., Tucker, T., Fossette, S., Whiting, S., & Bunce, M. (2021). Development of a 16S metabarcoding assay for the environmental DNA (eDNA) detection of aquatic reptiles across northern Australia. Marine and Freshwater Research. doi.org/10.1071/MF20288
4) Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes Proc. R. Soc. Lond. B 270, 313–321.
5) Leray, M., Yang, J.Y., Meyer, C.P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J. T., Machida R. J. (2013) A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. Frontiers in Zoology 10, 34.

## Ⅱ－４　LAMP法など、簡便法による希少種の同定法の確立

京都大学
　地球環境学堂　　西川　完途

［要旨］
　爬虫両棲類はペットとして人気がある一方で、違法採集や違法販売などの問題が多い。また、採集や販売が禁止されているような希少種と、それに近縁な普通種との種識別が困難なケースもある。このような問題を解決するためには､簡易分子同定法などの確立が必要となる｡そこで本サブテーマでは､（１）希少種におけるLAMP法などによる簡易分子同定法の確立、（２）希少種におけるPCR法による簡易分子同定法の確立、（３）飼育水などを利用した非侵襲的なDNA採取法の確立、に取り組んだ。
　（１）については、2020年に特定第二種国内希少野生動植物種に指定されたトウキョウサンショウウオに着目してLAMP法による簡易分子同定法の開発に取り組み、トウキョウサンショウウオを特異的に検出するLAMPプライマーの開発に成功した。この成果は論文としても公表し[1)]、新聞やネットニュースなどでも大きく取り上げられた。当初の想定を上回る社会的効果が得られた。
　（２）については、複数種・亜種が含まれる日本産トカゲモドキ類を海外産種と識別するためのPCRプライマー開発と簡易分子同定法確立に取り組んだ。その結果、全ての日本産種・亜種でPCRによるDNA増幅が認められ、海外産種では増幅しないPCRプライマーの開発に成功し、簡易分子同定が可能となった。LAMP法による特定種の識別とは異なり、複数種・亜種が含まれる種群を単一のプライマーセットで検出できる本手法は極めて有用なツールになるといえ、当初の目的を達成できた。
　（３）については、小型サンショウウオ類の非侵襲的なDNA採取法確立を目指し、幼生の飼育水および成体の体表粘膜からのDNA採取を検証した。幼生については、飼育中に飼育容器に発生する気泡をスワブで集めた抽出法を試行し、成体については体表粘膜を用いた抽出を試行した。その結果、幼生・成体の何れにおいてもDNAの採取に成功し、LAMP法などの簡易分子同定法と組み合わせることで効率的な種識別が可能となった。当初の計画で想定通りの成果が得られた。
　全体としては、一部の解析で新型コロナウイルスの影響による影響が生じたものの、論文公表や一般市民への研究成果の宣伝効果なども含め、当初の計画以上の成果が得られた。

### １．研究開発目的

　希少種の保全において正確な種の同定は必要不可欠である。しかし、種同定には高度な専門知識や機器が必要になるケースもある。ペットとしての人気もある爬虫類や両棲類においても、売買が禁止されている希少種と、法的にはペットとしての売買が可能なその近縁種を見分けるのが困難な場合があり、違法販売者が希少種を近縁種と偽って売買するケースも報告されている。このような違法販売者を摘発するためには専門家ではない警察や空港職員等による迅速かつ正確な種識別が必須となる。そこで私たちは、非専門家が簡便に希少種の識別を行うことができる分子同定ツールの開発を目指した。

### ２．研究目標

　サブテーマ１～３から提供された情報を利用しつつ、商取引で問題になる少なくとも５つの種群（トカゲモドキ類、セマルハコガメ類、ミナミイシガメ類、小型サンショウウオ類、オオサンショウウオ類）に対して塩基配列決定によらない簡便なDNA同定ツールの開発を進め、取り締まりの現場に実装するためキット化する。

### ３．研究開発内容

（１）希少種におけるLAMP法による簡易分子同定法の確立

　多くの希少種を含む日本列島産小型サンショウウオ類であるが、特に2020年に特定第二種国内希少野生動植物種に指定されたトウキョウサンショウウオに着目してLAMP法による簡易分子同定法の開発に

取り組んだ。LAMP法は反応液を65℃で1時間インキュベートするだけで目的のDNA断片の増幅が可能であり、蛍光試薬を併用することでDNA断片の増幅の判断も容易な手法である。また、LAMP法は従来のPCR法のようにサーマルサイクラーなどの高額な機器を必要としないため、非専門家でも比較的簡単に実験を実施することが可能で、本研究の目標達成に最適な手法と言える。トウキョウサンショウウオの分布域は近縁種であるトウホクサンショウウオの分布域と近接しており、両種の識別は非専門家では困難なケースがあることから、LAMP法によって両種を識別する簡易分子同定法の確立を目指した。

（２）希少種におけるPCR法等による簡易分子同定法の検討

本サブテーマの目的は、LAMP法などによる簡易分子同定法の確立であることから、LAMP法での識別が困難な種群についてはPCR法による簡易分子同定法の確立を進めた。日本列島産トカゲモドキ類は全種の売買が禁止されているため、ペットとしても流通している海外産トカゲモドキ類と日本列島産トカゲモドキ類を識別することが可能なPCRプライマーの開発を検討した。また、トカゲモドキ類の系統解析に用いられているミトコンドリアDNAチトクロームb領域は種間の遺伝的変異が大きく、日本列島産全種に適用できるPCRプライマーの開発が困難だったため、サブテーマ３で取得したミトコンドリアDNAの配列情報を利用して、ミトコンドリアDNA 16S rRNA 領域の配列上で日本列島産と海外産のトカゲモドキ類を識別するPCRプライマーの開発に取り組んだ。また、関連法の適切な運用のために簡易な同定法の確立が望まれるセマルハコガメ類およびミナミイシガメ類、市民を巻き込んだ保全対策の拡充が望まれるオオサンショウウオに関してもミトコンドリアDNAの配列情報をもとに簡易同定法を検討し、その限界や注意点を示した。

（３）飼育水などを利用した非侵襲的なDNA採取法の確立

小型サンショウウオ類は幼生が売買されることも多く、幼生期の種識別は極めて重要な課題である。しかし、小型サンショウウオ類の幼生は概して別種間での形態的差異が小さく、専門家であっても正確な種識別が困難である。さらに、幼生は成体と比較してDNA採取時の死亡リスクが高く、違法販売者の摘発の際には非侵襲的なDNAの採取が望ましい。そこで、小型サンショウウオ類の飼育水からのDNA採取法の開発に取り組んだ。

## ４．結果及び考察

（１）希少種におけるLAMP法による簡易分子同定法の確立

トウキョウサンショウウオを特異的に検出するLAMPプライマーを開発するため、GenBankに登録され

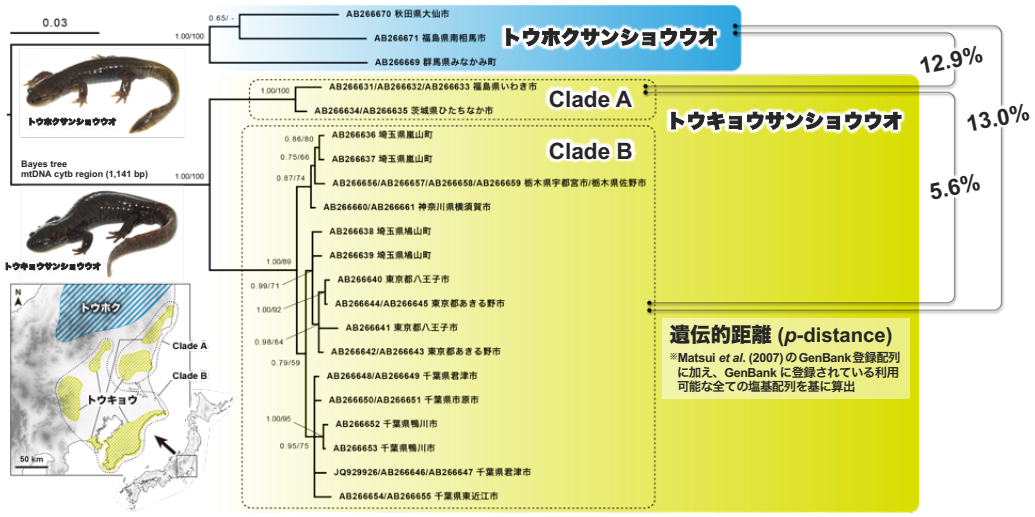


図4.1. ミトコンドリアDNAチトクロームb領域（1,141 bp）に基づくトウキョウサンショウウオとトウホクサンショウウオの分子系統解析結果（ベイズ樹）と各系統および種間の遺伝的差異

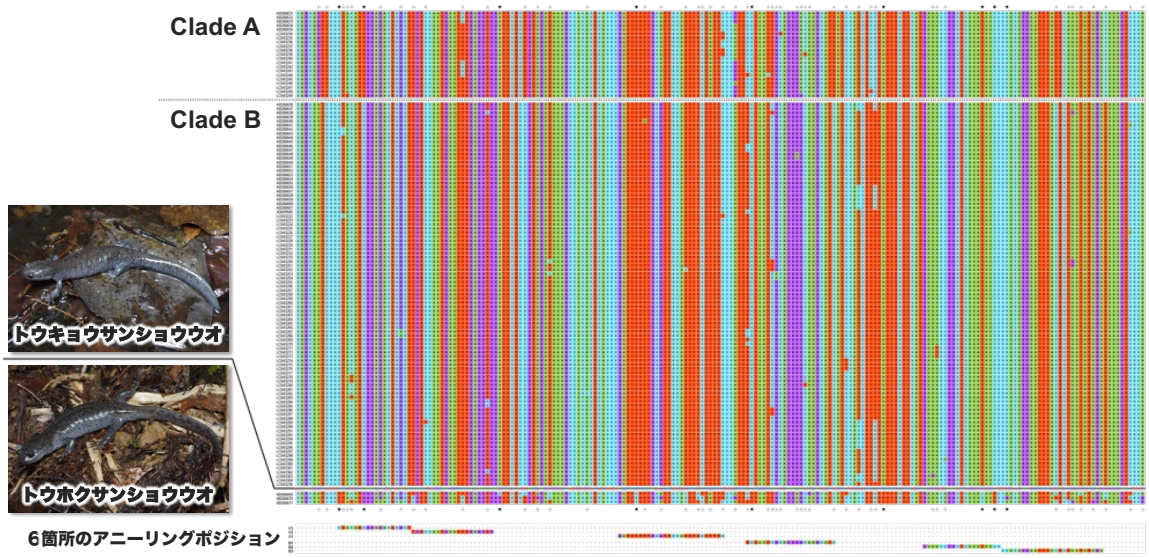


図4.2. LAMPプライマーのアニーリングポジション（６箇所）

ているトウキョウサンショウウオとトウホクサンショウウオのミトコンドリアDNAチトクロームb領域のDNA配列をダウンロードした。トウキョウサンショウウオには遺伝的に大きく分化した２つのクレード［Clade A（現在のイワキサンショウウオ）およびClade B；図4.1］が認められており、この２系統を網羅するように配列を取得した。

取得した両種のミトコンドリアDNAチトクロームb領域の配列を比較しながら、栄研化学株式会社のPrimerExplorer V5 (http://primerexplorer.jp/lampv5e/) を利用してLAMPプライマーの開発に最適な領域を探索した。その結果、トウキョウサンショウウオとトウホクサンショウウオの種間での変異が多く、トウキョウサンショウウオ種内の系統間では変異が少ない箇所にLAMPプライマーを設計することができた（表4.1、図4.2）。

表4.1. トウキョウサンショウウオ用LAMPプライマーセットの配列

| プライマー名 | シーケンス (5′–3′) |
|---|---|
| FIP_cytb_Ht | GAAAAGAAAATGGAACGCAAAAAATCTGTCCAATGAATTTGAGGTG |
| BIP_cytb_Ht | TCTAATCGCAGGGGCAAGCATCGGTTATTTGAGCCGGTTTC |
| F3_cytb_Ht | CTACATCGGAGACTCGCT |
| B3_cytb_Ht | TCTATATTAGAGTAAATTCCTGTGG |

開発したプライマーの有用性を検証するために、研究用に採集した福島、東京、神奈川および千葉産のトウキョウサンショウウオ、および青森、福島および群馬産のトウホクサンショウウオのDNAをテンプレートにして、株式会社ニッポンジーンから販売されているBst DNAポリメラーゼキット、栄研化学株式会社から発売されているLoopamp Fluorescent Detection (FD) Reagent（蛍光試薬）、および本研究で開発したトウキョウサンショウウオ用LAMPプライマーを下記の組成で混合した。テンプレートDNA：1.0 µL、蒸留水：4.6 µL、dNTPs (2.5 mM)：14.0 µL、FIP_cytb_HtおよびBIP_cytb_Htプライマー：0.4 µL ずつ、F3_cytb_HtおよびB3_cytb_Htプライマー：0.05 µLずつ、10× Bst DNA Buffer：2.5 µL、Bst DNA Polymerase：1.0 µL、Loopamp Fluorescent Detection (FD) Reagent：1.0 µL。

その後、65℃で１時間LAMP反応を実施した。その結果、トウキョウサンショウウオではClade A および Clade B の両系統でLAMP法によるDNAの増幅および、それに伴う蛍光反応が認められる一方で、トウホクサンショウウオとネガティブコントロールでは反応が認められず、トウキョウサンショウウオを特異的に検出するLAMPプライマーの開発に成功した（図4.3）。

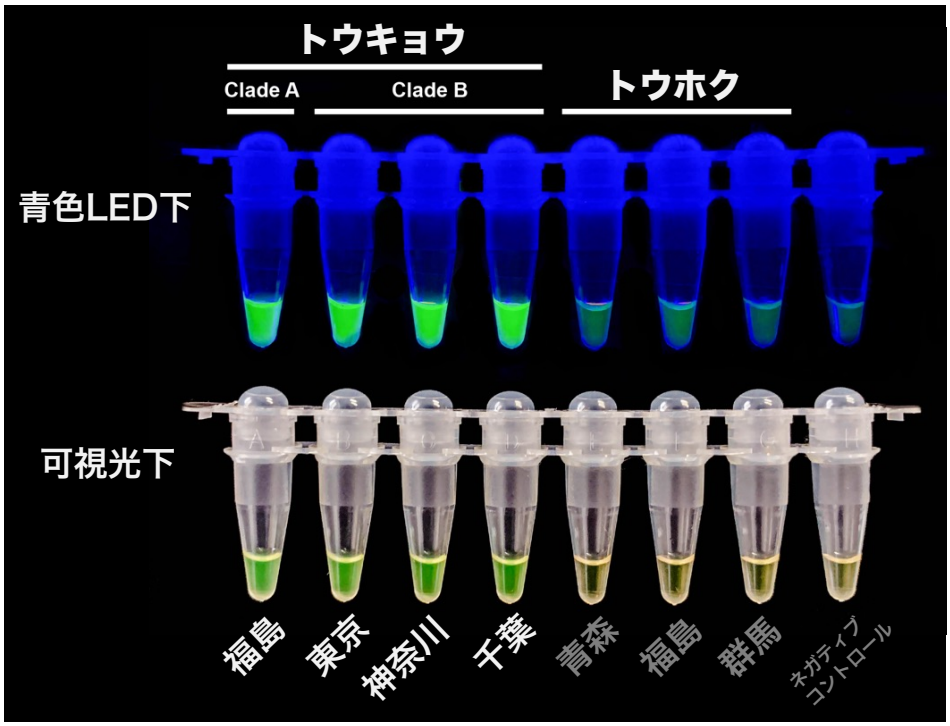


図4.3. トウキョウサンショウウオを特異的に検出するLAMPプライマーの有効性確認結果

この結果から、トウキョウサンショウウオとトウホクサンショウウオのように遺伝的な差異が10%以上の種間であればLAMPプライマーの開発は比較的容易に可能であることが明らかになった。一方で、トウキョウサンショウウオの Clade A（現・イワキサンショウウオ）と Clade B のように遺伝的差異が5%程度の種間では、LAMP法が必要とする複数の連続した種特異的なプライマーの設計は困難であり、その場合この方法による識別は難しいと考えられた。

（２）希少種におけるPCR法等による簡易分子同定法の検討

トカゲモドキ類については複数種が含まれる日本列島産種を検出し、かつ海外産種を検出しないというLAMPプライマーの開発が非現実的であったため、PCR法による簡易分子同定法を採用した。トウキョウサンショウウオのLAMPプライマー開発時と同様に日本産種と海外産種の配列を比較し、プライマーのアニーリング箇所を目視で決定した。トカゲモドキ類のプライマー開発については、検出したい日本産種に複数種・亜種が含まれており、ミトコンドリアDNAチトクロームb領域では種・亜種間の遺伝的変異が多いため日本産種を一括で検出するプライマーの設計が困難であった。そこで、トカゲモドキ類のプライマー設計ではチトクロームb領域よりも変異が少ないミトコンドリアDNA 16S rRNA領域に着目し、海外産種との配列比較でDNA配列の挿入あるいは欠損が認められる部位にプライマーのアニーリング領域を設定した（図4.4）。

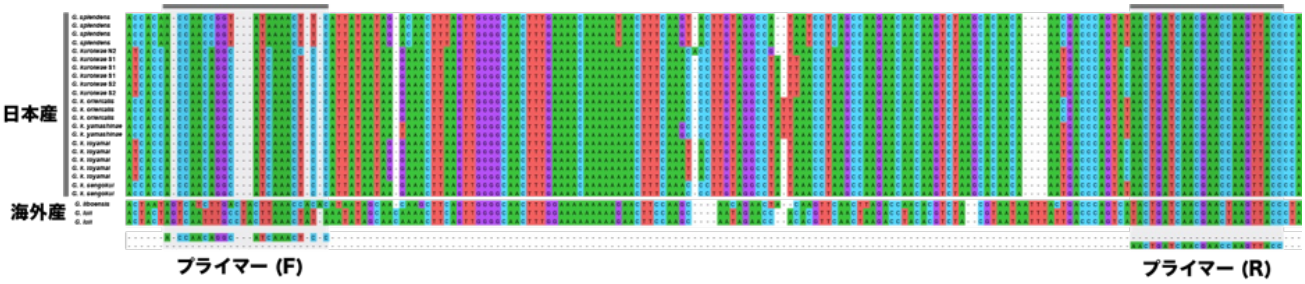


図4.4. 日本産トカゲモドキ類を特異的に検出するPCRプライマーの設計

開発したPCRプライマーを汎用性が高いPCR酵素（TOYOBO rTaq）を用いて以下のPCR条件でPCR反応を実施した。

ステップ①：94℃, 1min
ステップ②（35回繰り返し）：94℃, 1min; 50℃, 1min; 72℃, 1min
ステップ③：72℃, 7min

その結果、全ての日本産種でPCRによるDNA増幅が認められ、海外産種との簡易同定が可能となった（図4.5）。マダラトカゲモドキでは増幅が確認できなかった個体があったが、この個体は本研究で開発したPCRプライマー以外のプライマーでも増幅が確認できなかったことから、テンプレートDNAの劣化が要因である可能性が高いと考えている。したがって、本研究での目的は達成できている。

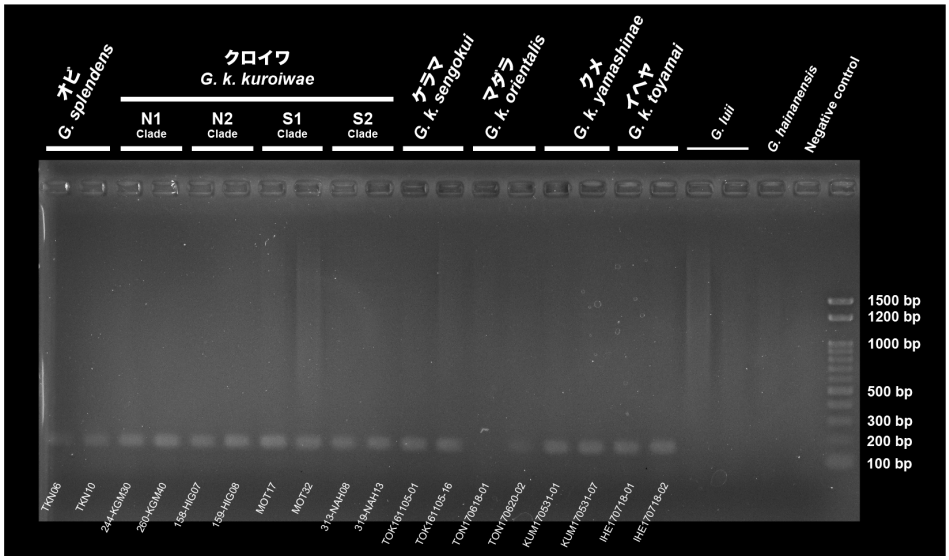


図4.5. 本研究で開発した日本産トカゲモドキ検出用PCRプライマーの有用性検証結果

セマルハコガメ類およびミナミイシガメ類についてミトコンドリアDNA配列を検討したところ、少なくともミトコンドリアDNAの12S~16S rRNA、ND5~調節領域におよぶ広い範囲で、それに酷似した配列が核DNAにも存在することが強く示唆された。この問題を回避し、目的のミトコンドリアDNAの配列情報を得る最も有効な方法の一つは階層的PCRである。[redacted]

オオサンショウウオ類については、トウキョウサンショウウオとトウホクサンショウウオのLAMPプライマーを設計した状況に習い、大陸産種と日本産種の間のミトコンドリアDNAチトクロームb領域の配列を確認したが種間の変異が6-7%と少なかった。LAMP法はループ型の特殊な反応系を含み、数個の種特異的なプライマーが連続して取り付くような箇所を必要とする。上のトウキョウサンショウウオのLAMPプライマー開発の項目でも示したように、一連のLAMPプライマーの設計には、識別したいグループ間で10%以上の遺伝的分化がないと安定した結果が得られないものと考えられた。実際に、オオサンショウウオのDNA塩基配列をみて種特異的な一連のプライマーが設計できる箇所がないか検討したが、適当な箇所は見当たらなかった。従来、大陸産と日本産オオサンショウウオ類の判別には、核DNAのマイクロサテライト領域に基づく判定法を用いてきており、それを使えば、両者は高い精度で判別が可能である。日本列島においては、大陸産および日本産オオサンショウウオ類の種間交雑が頻発し、母系遺伝のミトコンドリアDNAでは全ての交雑個体を正しくそれと判別することが不可能であるため、ミトコンドリアDNAによる識別には限界がある。そのため、LAMP法のような市民活動で実装可能なレベルの十分に簡易的な同定法でない限り、ミトコンドリアDNA分析に基づく同定法の用途は限定的であり、現状では、従来のマイクロサテライトによる種識別を実施するのが最も有効と考えられる。

（３）飼育水などを利用した非侵襲的なDNA採取法の確立

小型サンショウウオ類の非侵襲的なDNA採取法確立を目指し、幼生の飼育水および成体の体表粘膜からのDNA採取を検証した。幼生については、飼育中に飼育容器に発生する気泡をスワブで集めてDNA抽出キット（DNeasy Blood & Tissue Kit）を用いた抽出を実施した。成体については、体表粘膜をスワブで集めてDNA抽出キット（DNeasy Blood & Tissue Kit）を用いた抽出を実施した（図4.6）。

その後、非侵襲的な手法を用いて抽出したDNAをテンプレートにして本研究で開発したLAMPプライマーによるDNA増幅確認を実施した結果、トウキョウサンショウウオにおいてDNAの増幅が認められ、非侵襲的なDNA採取法が有用であることが示された。また、カメ類やトカゲモドキ類などの爬虫類については、口内粘膜などからの非侵襲的な採集がすでに確立されており、本研究で確立したLAMP法やPCR法、あるいはシーケンスによる分子同定と非侵襲的な抽出法を組み合わせることによって、効率的な種識別が可能になったものと考えている。

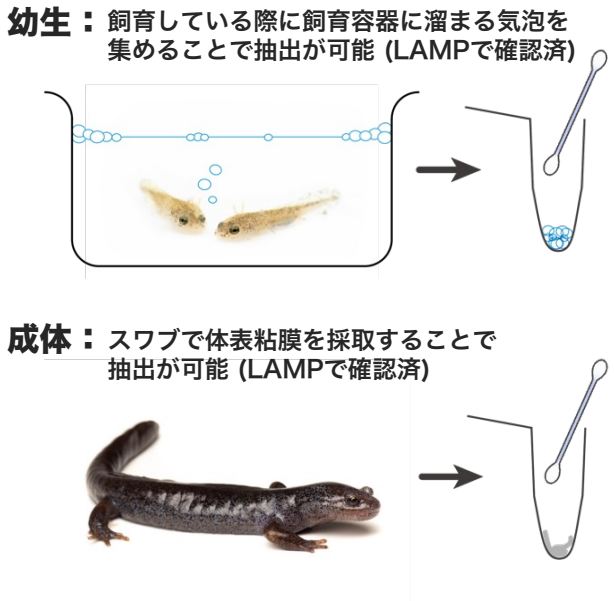


図4.6. 小型サンショウウオ類における非侵襲的DNA採取法のイメージ

## ５．研究目標の達成状況

本サブテーマでは、トウキョウサンショウウオを簡易識別するためのLAMP法に用いるプライマーを開発し、市販のLAMPキットと組み合わせることで簡易分子同定が可能なツールを開発した。[redacted]この成果を論文として公表し（Suzuki et al., 2021）、日本爬虫両棲類学会の一般公開シンポジウムにおいて広く宣伝し、新聞やネットニュースなどでも大きく取り上げられた結果、違法販売者へのプレッシャーになり、トウキョウサンショウウオについては論文公表後の違法採集や違法販売は確認されていない。このように、簡易同定法の確立とその公表が違法販売の抑止力となったことは、当初の目的以上の成果であるといえる。また、LAMP法は目的とする種の簡易識別が可能な便利なツールであり、非専門家であっても実験を実施できる有用な手法である一方で、識別したい種間の遺伝的差異が10%以上ないとプライマーの設計が困難であることが本研究から明らかになった。

さらに、トカゲモドキ類のようにLAMP法が適用できない場合については、PCRと電気泳動のみで日本産種と海外産種を識別できており、このような技術の開発と公表も違法販売の抑止力になるものと判断している。また、オオサンショウウオ類などのように遺伝的差異が少なく交雑もしている種間の識別については、結局は丁寧な核DNA分析が最も効率的であるとの結論を得た。[redacted]このように、本研究ではLAMP法の有用性と限界点を示すことができ、それは、今後同様の種識別ツールを開発する際の極めて重要な知見になる。これらのことから、本サブテーマでは、目標以上の成果が得られたと考えている

## ６．引用文献

1) Suzuki T, Nishikawa K, Sato Y, Toda M (2021) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for quick identification of the Japanese salamander *Hynobius tokyoensis*. Genes & Genetic Systems 96: 247–252.

# Ⅱ－５　AIを使った画像認証に基づく同定ツールの開発

東海大学
　生物学部生物学科　　鈴木　大

＜研究協力者＞
琉球大学熱帯生物圏研究センター　　戸田　守
京都大学地球環境学堂　　西川 完途
千葉県立中央博物館　　栗田　隆気
国立屏東科技大学　　Chen,Ten-Si
台北市立動物園　　Chen,Zhu-Lung

［要旨］
本サブテーマでは、AI（人工知能：Artificial intelligence）を用いて、画像データから種を判別するツールの開発を目的とした。主な対象生物は希少種であり、具体的にはオオサンショウウオ類、トカゲモドキ類、セマルハコガメ類である。これらの種群ごとに、画像から種判別（または個体群判別）を行うAI学習によるモデルを作り、あらかじめ種が確定している画像を正しく判別できるかを確かめることで、モデルの精度を検討した。また、学習に用いる画像の種類や編集処理を行うことで、モデルの精度変化を調べた。解析の結果、AI学習モデルを作る際の学習用画像において、被写体以外の背景要素が解析に影響を与えることがわかり、背景部分を切り取ることが重要であることがわかった。また、データオーグメンテーションとして加工編集処理を行った画像も学習に合わせて用いることが有効であることもわかり、少ない画像データからでも精度の高い学習モデルができることが示唆された。さらに、野外調査にて、本研究にて作成したオオサンショウウオ類の判別ツールキットのデモンストレーションを行い、AI画像認証アプリの社会実装に向けた課題抽出を行った。

## １．研究開発目的

多くの生物種の判別は、その生物の見た目に基づいて行われる。しかしながら、外見的特徴のみからでは判別が困難である種も数多く存在する。そのような背景から、特に正確な種判別が困難な希少種に対して、生物の種名を偽った違法な取引が生じている。また、野外に定着した外来種や、在来種と外来種間の交雑個体について、健全な生物多様性の保全、自然生態系保全の観点から野外から取り除く必要があるが、形態形質に基づく識別の困難さネックになって対策に支障が生じている。それらは専門家の観察やDNA鑑定によって判別が可能であるが、それでは時間がかかりすぎる場合が多い。野外や取締りの現場ではより迅速かつ簡便で、ある程度の正確性も担保された判定が求められている。近年、計算技術ならびにコンピューター技術による知能––AI（人工知能：Artificial intelligence）––に関する研究が盛んになっている。膨大な計算データのもと、人間の能力以上の成果を生み出す可能性があり、すでに様々な分野で社会実装がなされている。そこで、本サブテーマでは、上述のサブテーマ４の簡易DNA鑑別ツールよりもさらに簡単に希少種の識別ができるツールの開発を意図し、AIによる画像判別モデルの作成を目的とした。画像判別による生物種の同定補助ツールはすでに幾つかあるが、ここでは、実際に違法取引や外来種拡散が問題になっている希少種を取り上げ、非常に似通った種を見分けるためにその種群に特化した判別ツールの開発に取り組む。なお、AIを使った学習と推論は外注により行った。

## ２．研究目標

サブテーマ１～３から提供された情報を利用しつつ、商取引で問題になる少なくともセマルハコガメ類、トカゲモドキ類、オオサンショウウオ、ダルマガエル類、カナヘビ類の５つの種群に対して画像認証による簡易同定ツールの開発を進め、その一部を取り締まりと市民活動の現場に実装する。

## ３．研究開発内容

（１）AI学習による画像判別

AI学習による画像判別は以下の通りに進めた。はじめに、分類群ごとに、各分類群の専門家が自ら野外に出かけるか、手持ちの資料を整理して種の帰属が確実な画像データを収集・集約した。識別目標となる単位ごと、すなわち種あるいは個体群ごとに画像資料を分け、それぞれの群の画像を学習用画像と評価用画像の二つに分けた。これらの群は、それぞれの画像群から任意に選び出して作り、両群間で画像の重複がないようにした。つづいて、学習用画像からAIに機械学習を行い、AIに対して、画像とその画像被写体の正答となる生物種（あるいは亜種名）を紐づけして覚えさせた。そして、得られた学習モデル用いて評価用画像に対して推論（＝判別）を行い、正しい種と認識するかを確認することで、その学習モデルの精度を測った。

初めに、事前に一定数の画像データが揃っている３つの分類群（オオサンショウウオ類、トカゲモドキ類、セマルハコガメ類）に対して予備的にAI学習を実施し、課題を抽出した。その結果、判別したい種の画像群の間で撮影条件や背景の違いがあると、その部分が種判別に大きく寄与してしまうことが分かった。この点を踏まえ、次の解析では、画像にデータオーグメンテーション（データ拡張）を加えて学習させ、問題となる「ノイズ」を軽減するようにした。ここでいうデータオーグメンテーションとは、もとの画像から、回転処理や左右反転処理などの条件を任意に変えた多数の画像を人工的に作り出し、それらの二次的画像データを加えて解析することであり、本報告では「水増し手法」と記す。それらの画像データを基にAI学習を行った。一部の分類群では、学習モデルの条件を変更し、より精度の高いモデルの作成を試みた。以下に分類群ごとの内容を記す。

本研究課題の採択期間の３年間を通じて、コロナウイルス感染症拡大による行動制限がなされ、予定していた野外調査の実施の中止、あるいは実施時期の変更を余儀なくされた。そのため、本サブテーマにおいても、事業の進捗を見直す環境省との打ち合わせの中で、対象生物群数を絞り、社会実装を見越して重要度の高い分類群から、そして確保された学習画像の多いものから優先的に解析を行うことで、研究課題全体の目標である簡便な希少種識別ツールの開発を目指すこととなった。具体的には、オオサンショウウオ類、トカゲモドキ類、セマルハコガメ類の３グループを優先に複数の条件下での解析を行うことで、主目的を遂行した。トノサマガエル類、カナヘビ類、小型サンショウウオ類については予備的な解析にとどめた。

①　オオサンショウウオ類

オオサンショウウオ類に関しては、在来の特別天然記念物オオサンショウウオの分布域内で外来種チュウゴクオオサンショウウオとの交雑が進行し、そのエリアが拡大していることから、保全の上で深刻な問題となっている。外来種や交雑個体への直接的な対応はもちろん、侵入先での早期発見は喫緊の課題である。そこで本研究では、１）在来種オオサンショウウオ（以下、「日本産」とする）と、２）外来種チュウゴクオオサンショウウオおよびそれとの交雑個体（以下、「中国産」とする）の２群を設定し、識別する学習モデルの作成を目標とした。２群としたのは、累代で戻し交雑が可能な本種群では、交雑個体と親種とは本質的には連続的なので、「交雑個体」という群の識別は保留し、「純系の在来種」と「それ以外」という２群に整理して学習の単純化を図るためである。AI学習には、遺伝子解析によって分類学的帰属が明らかになっている個体の画像データを用いた。AI学習においては、一般に学習に用いる画像が多ければ多いほど精度の向上が期待されるが、希少生物では準備できる学習用画像の枚数に限界がある。そこで本研究では、少数の学習画像から有効なモデルを作ることにも焦点を当てた。なお、近年、チュウゴクオオサンショウウオに複数種が含まれることが報告されたが[2)]、それらは形態的には酷似しているため、本研究ではすべてまとめてチュウゴクオオサンショウオとして扱った。

②　トカゲモドキ類

６つの種ないし亜種が知られているトカゲモドキ類はもともとペットとして人気があり、違法採集の危機に晒されている。全て国内希少種に指定されているが、取締りのうえでは、やはり種の同定ができることが望ましい。とはいえ、６種全てを判別するモデルの構築は、資料収集のうえでも容易でないた

め、ここでは、形態的類似度は高いが遺伝的な差異があることが示されているクロイワトカゲモドキの沖縄島の北部の集団と南部の集団（両者は種のレベルで分化している：サブテーマ１を参照）[1)]を識別する学習モデルの作成を目標とした。本分類群においても、あらかじめ分類学的帰属を決定した個体の画像データをAI学習に用いた。

③　セマルハコガメ類

本種には、八重山諸島に生息するヤエヤマセマルハコガメと、台湾や中国に生息する基亜種セマルハコガメの２亜種が含まれる。国産亜種は国指定の天然記念物に指定されているが、国外産亜種はペット用に流通している（ただし、CITESにより国際取引は規制されている）。そのため、産地を偽って扱われることもあり、警察や担当行政も取締りに苦慮している。このように、２亜種の迅速かつ簡便な識別ツールの開発ニーズは高い。本研究課題では、国産亜種と、台湾産の基亜種を識別する学習モデルの作成を目標とした。各地域で対象動物を撮影し、そのデータをAI学習に用いた。

④　トノサマガエル類

ナゴヤダルマガエルは絶滅危惧種であるが、形態が類似するためトノサマガエルと混同されることも多く、気づかれないうちに生息地の喪失ないしは生息環境の悪化が進行することが懸念されている。もともと身近にいる種であり、生物保全に関心を持つ市民が保護活動を行ったりしているが、その輪を広げるためにも両種を識別するツールの開発が望まれる。ここでは、ナゴヤダルマガエルとトノサマガエルを対象にAI学習を行った。

（２）構築した学習モデルの社会実装に向けた取り組み

①　種判別ツールのデモンストレーション

AI画像認証アプリの社会実装に向け、オオサンショウウオ類の解析で得られた成果を元に画像認識アプリを開発し、市民参加型の観察会にて実演を行った。2022年10月に京都市にて、一般参加型のオオサンショウウオの観察会イベントを実施した。その際、一般参加者に開発中のアプリをデモンストレーション利用してもらい、ユーザー側の意見情報収集を行うことで、AI画像認証アプリの社会実装に向けた課題抽出を行った。

②　ヒアリング調査

希少生物判別ツールに対する現場ニーズの把握と希少生物の違法持ち出しに関する現場状況の把握のため、那覇空港および沖縄地区税関と密輸防止研修会を行い、ヒアリング調査を行った。沖縄県は、希少な国内産両生爬虫類が多く生息し、これらの事例が特に問題視される地域である。これらの機関における、生物の持ち出しに対する対策現状および課題をもとに、AI画像認証アプリの社会実装に向けた課題抽出を行った。

## ４．結果及び考察

①　オオサンショウウオ類

編集画像を用いた学習モデルの作成とデータオーグメンテーションの有効性

課題の抽出を目的とした試行的な予備解析では、日本産の同定精度は99.9%と極めて高かったが、中国産では14.1%と著しく低い値となった。その原因として、学習に用いた画像枚数不足に加え、学習用画像に写り込んだ被写体以外の背景要素による影響が考えられた。AIは、画像中の情報を全て取り入れて学ぶため、被写体以外の要素も特徴として捉えてしまう。他の分類群にも共通するこの問題を解決するシンプルな方法は画像の背景を切り抜くことであり、実際にセマルハコガメ類ではそれも試したが、動物の輪郭に合わせた切り抜き作業は容易でない。そこで、専門家の目では２群の特徴の違いがよく表れているとされる頭部背面を四角く切り抜いた画像を準備し、AI学習に用いた（図5.1）。ここで構築したいモデルはオオサンショウウオに特化したものであり、そのためそもそもそれがオオサンショウウオ

であることを識別する必要はなく、また、実際にモデルを使って種を識別する際にも、全身の写真を撮るよりも、頭部を撮影してAIに問い合わせるほうが楽である。

学習には日本産175枚と中国産76枚、評価にはそれぞれ43枚と19枚の画像を用いた。さらに、データオーグメンテーションとして、回転、左右反転、上下反転、縦横ランダム切り取り、画像輝度、画像彩度をランダムに組み合わせて２次的画像を大量に生成し、学習に用いた。

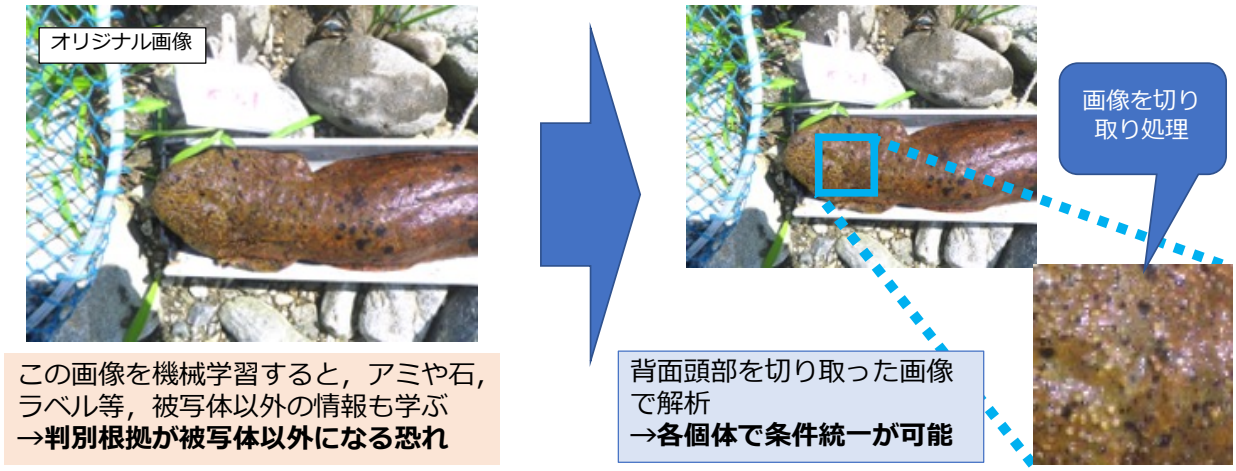


図5.1. オオサンショウウオ類のAI学習に用いる画像処理の概要

２種類のデータ（オリジナルの画像、水増画像）に基づく学習の結果、切り取り画像モデルの精度は日本産が98.8%、中国・交雑は97.4%となり、全体的に構築された学習モデルによる判別精度は非常に高かった。また、水増し処理をおこなった画像の学習の精度は、日本産が97.7%、中国・交雑は94.7%となり、オリジナルのモデルに比べて判別精度の向上はみられなかった。したがって、オオサンショウウオに関しては、頭部背面を切り出すことによって100–200枚程度の画像データからでも十分に判別精度の高い学習モデルが構築できることが分かった。

有効枚数とデータオーグメンテーションの検討

次に、有効なAI学習に必要な画像枚数を検討するため、用いる画像枚数を変化させて学習モデルを作り、それらの判別精度を比較した。ここでは、データオーグメンテーションにより、少ない画像からでも有効な学習モデルが構築できることも期待されるため、上述した方法で生成した水増しデータも使用した。学習画像枚数は２群のそれぞれから5枚、25枚、50枚、75枚とし、評価画像には全て同じ各群15枚の画像を用いて精度を検証した。

表5.1. 学習用画像の枚数およびデータオーグメンテーションによる違いを含めた、オオサンショウウオとチュウゴクオオサンショウウオ・交雑個体の学習モデルの精度

| 学習したモデル | 種群 | 精度（F1） | 学習したモデル | 種群 | 精度（F1） |
|---|---|---|---|---|---|
| 学習５枚 | 日本産 | 85.7% | 学習５枚 | 日本産 | 100% |
| | 中国・交雑 | 80.0% | 水増し手法 | 中国・交雑 | 100% |
| 学習25枚 | 日本産 | 96.8% | 学習25枚 | 日本産 | 100% |
| | 中国・交雑 | 96.6% | 水増し手法 | 中国・交雑 | 100% |
| 学習50枚 | 日本産 | 100% | 学習50枚 | 日本産 | 100% |
| | 中国・交雑 | 100% | 水増し手法 | 中国・交雑 | 100% |
| 学習75枚 | 日本産 | 96.8% | 学習75枚 | 日本産 | 100% |
| | 中国・交雑 | 96.6% | 水増し手法 | 中国・交雑 | 100% |

結果を表5.1にまとめた。判別制度は学習画像枚数が５の時に低かったが、それ以上では顕著な変化はみられなかった。また、それぞれに対してデータオーグメンテーションの操作を加えた結果、判別精度はすべて100％となり、本手法が非常に有効であることが示された。このように、画像枚数が少ない場合は今回施したデータオーグメンテーションは有効である。そして少なくとも今回のようなオオサンショウウオ類の２群の識別のケースでは、１群あたり25個体分の画像でも、十分に有効な学習モデルが構築できることが明らかになった。

**②　トカゲモドキ類**

解析部位の違いによる精度変化の検証

クロイワトカゲモドキの北部集団と南部集団（別種に相当）を対象に、AIによる画像判別を試みた。頭部画像および胴背面画像を合わせた学習では198枚（北部98枚、南部100枚）を、胴背面画像の学習では128枚（北部70枚、南部58枚）用いて、学習モデルを作成した。

頭部から胴背面までの画像による学習モデルでは、判別精度が両集団で７割程度であったのに対し、胴背面のみの画像による学習モデルでは北部集団で平均84％、南部集団で平均80％と判別精度が高かった（表5.2）。この結果は、各群の特徴が出る特定の部位に限定して学習させたほうが正答率の高い学習モデルが構築できることを示唆するものである。ただし、後者のモデルの検証の際に、評価用の画像を一部入れ替えてみたところ、判別精度はややばらついた。つまり、この学習モデルは、特定の特徴を捉えて判別しているが、それは両種の変異を十分にカバーしたものではない。誤判別された画像の特徴を見てみると、模様や色みに他の個体と異なる点が多い個体であり、そのような個体の画像を積極的に学習に取り入れることができれば、さらなる精度の向上が見込まれる。とはいえ、人の目にはさほど違いが見当たらない個体も誤判別されることがあり、トカゲモドキのように群内の変異が大きな種では、画像枚数を増やすことが重要と考えられる。

表5.2. クロイワトカゲモドキの北部集団と南部集団の学習モデルの精度

| 学習したモデル | 種群 | 学習画像枚数 | | 精度（F1） |
|---|---|---|---|---|
| 頭部と背面 | 北部 | 98 | 計198 | 73.6% |
| | 南部 | 100 | | 71.4% |
| 背面<br>パターン１ | 北部 | 70 | 計128 | 84.0% |
| | 南部 | 58 | | 76.5% |
| 背面<br>パターン２ | 北部 | 70 | 計128 | 80.1% |
| | 南部 | 58 | | 75.7% |
| 背面<br>パターン3 | 北部 | 70 | 計128 | 88.4% |
| | 南部 | 58 | | 87.8% |

有効枚数とデータオーグメンテーションの検討

オオサンショウウオと同様に、本種群でも、学習画像枚数の違いによる判別精度の変化を検証した。画像枚数は、２群の合計数で10枚、50枚、100枚、128枚、188枚とし、評価用画像は統一して比較を行った。

上述の128枚の画像を学習した背面パターン１（表5.2）の学習モデルをベースに精度比較を行った結果、学習画像10枚で構築したモデルでは精度を担保できないことがわかった。一方、188枚のものではやや精度が低下したものの、学習に50枚以上の画像を用いることで精度が両種群ともに７割以上と比較的高い精度を示した（表5.3）。

表5.3. 128枚の学習用画像を用いたモデル（パターン①）を基準にした、学習用画像の枚数の違いによる精度変化を示した、クロイワトカゲモドキの北部集団と南部集団の学習モデルの精度

| 学習したモデル | 種群 | 精度（F1） | 学習したモデル | 種群 | 精度（F1） |
|---|---|---|---|---|---|
| 学習10枚 | 北部 | 75.4%（-9.6%） | 学習128枚 | 北部 | 84.0% |
| | 南部 | 34.8% (-41.7%) | | 南部 | 76.5% |
| 学習50枚 | 北部 | 83.0% (-1.,0%) | 学習188枚 | 北部 | 73.7% (-10.3%) |
| | 南部 | 71.0% (-5.5%) | | 南部 | 78.3% (+1.8%) |
| 学習100枚 | 北部 | 75.0% (-9.0%) | | | |
| | 南部 | 77.3% (+0.8%) | | | |

データオーグメンテーションの効果の検証では、胴背面の切り取り画像188枚を基準に、以下の変数について画像の水増し生成を行った。それは、回転、左右反転、サイズ変更、軽度のAdditive Gaussian Noise処理（画質の低下処理）の４つである。それぞれの変数を変化させて学習モデルを構築し、それらの判別精度を比較することで各変数を操作することの効果を確認した。また、全ての手法を合わせた学習モデルも作成し、精度評価を行った。

その結果、左右反転と大きな角度での回転といった水増し操作が判別精度の向上に有効であることが示された（表5.4）。一方で、Additive Gaussian Noise処理では、0.10までは精度が上昇したが、それ以降は精度が低下した。全ての操作を混ぜたモデルでは精度は向上したが、もっともスコアが高かったわけではない。これらの結果から、オリジナル画像を見た目に大きく変える効果をもつ水増し処理が有効であると考えられた。

表5.4. 188枚の学習用画像を用いたモデルを基準にした、各データオーグメンテーションによる精度の違いを示す、クロイワトカゲモドキの北部集団と南部集団の学習モデルの精度

| 学習したモデル | 種群 | 精度（F1） | 学習したモデル | 種群 | 精度（F1） |
|---|---|---|---|---|---|
| 188枚 | 北部 | 73.7% | 回転(25°) | 北部 | 70.3% (-3.4%) |
| | 南部 | 78.3% | | 南部 | 76.6% (-1.7%) |
| 左右反転 | 北部 | 83.7% (+10.0%) | 回転(50°) | 北部 | 80.0% (+6.3%) |
| | 南部 | 82.9% (+4.6%) | | 南部 | 76.9% (-1.4%) |
| サイズ縮小(0.5倍) | 北部 | 82.9% (+9.2%) | 画質低下処理 0.05 | 北部 | 85.7%（+12%） |
| | 南部 | 83.7% (+5.4%) | | 南部 | 85.7% (+7.4%) |
| サイズ縮小(0.7倍) | 北部 | 70.3% (-3.4%) | 画質低下処理 0.10 | 北部 | 83.7% (+5.4%) |
| | 南部 | 76.6% (-1.7%) | | 南部 | 82.9% (+4.6%) |
| 回転(-50°) | 北部 | 87.5% (+13.8%) | 画質低下処理 0.15 | 北部 | 68.6% (-5.1%) |
| | 南部 | 83.3% (+5.0%) | | 南部 | 77.6% (-0.7%) |
| 回転(-25°) | 北部 | 71.8% (-1.9%) | 画質低下処理 0.20 | 北部 | 66.7% (-7.0%) |
| | 南部 | 75.6% (-2.7%) | | 南部 | 75% (-3.3%) |
| | | | AllMix | 北部 | 81.0% (+7.3%) |
| | | | | 南部 | 81.0% (+2.7%) |

次に、有効な画像枚数の検討に関し、上述のオオサンショウウオとも比較するためテストを行った。北部集団133枚、南部集団117枚の画像から、ランダムに各群5枚、25枚、50枚、75枚、100枚を抽出して学習モデルを構築し、各群30枚ずつの検証用の画像を用いて精度を調べた。検証用の画像は全てのモデルで共通のものを使った。データオーグメンテーションの処理としては、左右反転、サイズ縮小（0.5倍から1倍の範囲）、回転（-50から50°の範囲）、軽度のAdditive Gaussian Noise処理（0から0.2の強度）を施し、各変数の操作の度合いはランダムにした。

その結果、予想に反し、枚数の増加に伴う精度の向上は見られなかった。一方、データオーグメンテーションに関してはオリジナルのものよりも精度が高いことが多く、効果が認められた（表5.5）。また、データオーグメンテーションの操作を加えた系では、学習画像が100枚のときに最も精度が良く、全体

として枚数が多いほど精度が向上する傾向にあった。本分類群において有効な学習モデルを構築するためには、多くの画像に対してデータオーグメンテーションによる水増し画像を生成し、学習させることが重要なようである。

表5.5. 学習用画像の枚数およびデータオーグメンテーションによる違いを含めた、クロイワトカゲモドキの北部集団と南部集団の学習モデルの精度

| 学習したモデル | 種群 | 精度（F1） | 学習したモデル | 種群 | 精度（F1） |
|---|---|---|---|---|---|
| 学習5枚 | 北部 | 40.0% | 学習5枚 水増し手法 | 北部 | 65.5% |
| | 南部 | 70.0% | | 南部 | 70.1% |
| 学習25枚 | 北部 | 64.0% | 学習25枚 水増し手法 | 北部 | 74.2% |
| | 南部 | 40.0% | | 南部 | 72.4% |
| 学習50枚 | 北部 | 61.5% | 学習50枚 水増し手法 | 北部 | 86.7% |
| | 南部 | 70.6% | | 南部 | 86.7% |
| 学習75枚 | 北部 | 51.6% | 学習75枚 水増し手法 | 北部 | 80.0% |
| | 南部 | 48.3% | | 南部 | 83.1% |
| 学習100枚 | 北部 | 66.7% | 学習100枚 水増し手法 | 北部 | 91.5% |
| | 南部 | 50.0% | | 南部 | 91.8% |

③　セマルハコガメ類

国産ヤエヤマセマルハコガメと台湾産基亜種セマルハコガメの２群に対してAIによる画像判別を試みた。本分類群でも画像の背景要素が影響している可能性があったため、それぞれ98枚ずつの画像について、オリジナルの背景あり画像と、背景をカット処理したものの二つの学習モデルをつくり、判別の精度を比較した。その結果、背景ありモデルでは国産亜種が93.3%、台湾亜種が95.5%と高い判別精度を示していたが、背景をカットして構築したモデルでは精度がそれぞれ52.1%と80.4%と低下した。この結果から、背景ありモデルでは、被写体ではなく、背景要素に基づいて判別している可能性が高いことが示された。また、評価に用いた画像のなかでどのようなものが誤判別されているのかを確認したところ、国産亜種で、体表面が乾いた個体の画像が頻繁に誤判別されていることがわかった。これは学習で用いた台湾産個体の画像に乾いた状態のものが比較的多いことに起因するとみられた。

[redacted]

④　トノサマガエル類

トノサマガエルとナゴヤダルマガエルを対象にAIによる画像判別を試みた。被写体の背面や腹面、側面の画像をともに含むパターン１と、背面の画像のみからなるパターン２を準備し、学習させた。これ

らデータセットではそれぞれ234枚と221枚の画像を学習に使用した。

パターン１では精度がトノサマガエルは16.7%、ナゴヤダルマガエルは63.6%と、特に前者の値が低かった。一方で、パターン２では順に66.7%と73.5%となり、精度の向上が確認された。なお、パターン２のデータセットに対し、データオーグメンテーションとして回転した画像とサイズを変更した画像を加えたが、精度は同じく順に68.1%と63.4%となり、精度は低下傾向を示した。以上より、対象となる種群における種の特徴がわかる画像（今回は背面画像）を学習に用いることが精度の上昇に貢献することが示された。

（２）構築した学習モデルの社会実装に向けた取り組み

①種判別ツールのデモンストレーション

高い判別精度を示したオオサンショウウオ類の判別ツールの社会実装に向け、それをアプリ化して一般の人に使ってもらうイベントを持った。イベントは、2022年10月に一般から参加を募ってオオサンショウウオ観察会として実施し、その中で今回作成した判別アプリを実用した。野外で発見された個体、あるいは許可のもと捕獲した個体（捕獲時点での国産か中国・交雑かは不明）に対して、判別アプリを活用いただき、その実効性や利便性、有効性を検証した。参加者からはアプリに対して高い関心を持つ、今後のさらなる改良に期待するといった好意的な意見や感想を頂いた。一方で、中国種や交雑個体と判別された場合はその後どのように扱うべきか、といった利用後のフォローに関する意見もあった。

上述の切り取り画像を用いたAI学習モデルをベースに、画像判別のアプリケーションを作成した（図5.2）。仕組みとしては、ユーザーがスマートフォン等で撮影した画像を、インターネットを介してウェブサーバーへ送信し、その中で解析に用いる部分（今回は背面頭部）を自動で切り取り、その切り取り画像に対してAI学習モデルの入った画像認識プラットフォームにて解析を行う。得られた結果について、再度ウェブサーバーを介して、判別した種名および認識率（上述の精度に相当）をユーザーに送信する、というものである。Web/APIサーバーは、ユーザーログイン機能、希少種情報表示（解析結果として希少種情報を表示）、画像アップロード（画像を解析エンジンに送る）、希少種情報取得API（画像情報より希少種名を出力する）という役割を持ち、また解析エンジンは、一般物体認識エンジンより希少種名を取得するという役割を持つ。

今回の判別アプリはオオサンショウウオ類を対象にしたものであるが、今後の活用に向けた課題とし

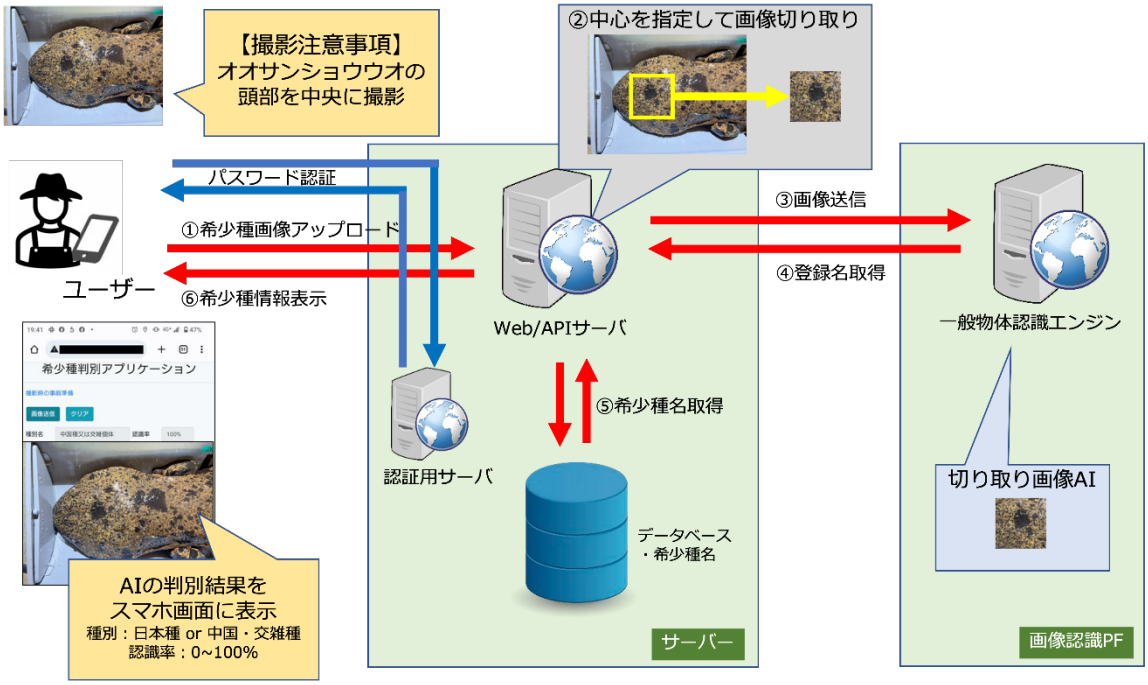


図5-2. オオサンショウウオ類の画像を元に作成した希少種判別アプリのシステム概要図

て、継続した運用方法と、用途に合わせた運用方法の必要性が課題として挙げられた。継続した運用については、①精度を上げるために定期的に学習モデルを改善する必要性、②サーバー利用に対する運営維持の必要性、③利用実態を踏まえたユーザー状況に合わせた調整（利用時間、利用可能人数、スマートフォン等利用端末種類の調整など）といった課題が挙げられた。また、本システムはインターネット環境が必要不可欠であるため、ウェブ環境が未整備な場所での野外調査時は利用できないことも問題となる。次の用途に合わせた運用方法として、商業取引が規制されている種の判別アプリを作った場合、警察や空港税関等での犯罪対策での利用が想定される。このようなアプリを公開すると、悪用される恐れがあるため、個々のアカウントとパスワードを作成するなどアクセスするユーザーを限定する必要がある。また、今回のサーバーやプラットフォームの商業利用は可能であるが、経費が必要となる。ランニングコストとして、継続した学習開発やサーバー利用代やメンテナンス代も不可欠である。

② ヒアリング調査

種判別ツールの社会実装化にむけて、環境省担当官と共に、希少種判別作業を実際に行なっている那覇空港の関係者（航空会社、セキュリティ会社、沖縄県）および沖縄税関の担当者と密猟防止研修会を実施した。旅行者が生物を持ち込んだ際の対策連絡フローを確認し、現行の体制把握と問題点についてヒアリングを行った。[redacted]今回開発を進めたアプリケーションのようなツールであれば、簡易な操作で、迅速かつ高い精度での生物種の判別が出来るため、実際に現場の窓口として作業される方からの極めて高いニーズがあることが確認された。特に、アプリケーションが判断するという点では、ユーザーである担当者の生物種判別能力の差が、判別結果に影響しないという点は高く評価された。

違法な生物の持ち込み行為については、後に裁判等の司法による判断を受ける必要がある。その中で、当該生物の種の判別は極めて重要な役割を担うが、種判別ツールがその全ての責任を追うことは困難であろう。そこで、一次スクリーニングとして画像認証による種判別を行い、二次スクリーングとして専門家による判断、さらに必要に応じてDNA鑑定といった体制作りが必要になるであろう。

## ５．研究目標の達成状況

本研究は、AI学習によって画像データから種判別モデルを作成することを目的とした。モデル作成の試行の中で、被写体以外の要素（背景等）を除去した画像を学習に用いる必要があること、分類群によっては種の特徴がでる特定の部位を写した画像の使用が有効であること、編集加工処理（データオーグメンテーション）した画像を追加した学習が有効であることがわかった。これらの操作を経て、オオサンショウウオ類では、国産種と外来種をほぼ100％の確率で識別するモデルの構築に成功した。また、トカゲモドキ類においても判別精度がおよそ90％の学習モデルが構築できた。[redacted]カナヘビ類についても予備的な学習は行ったが、撮影条件の違いなど要検討課題が多数ある一方で、AIに頼らずとも比較的識別が容易であり、したがって本研究開発のニーズが相対的には低いことから、以降の検討ではより優先度が高い前の４つの分類群に注力することとした。

オオサンショウウオにおいては、一般参加型の自然観察会にて、学習モデルに基づいたアプリケーションを利用してもらった。実際に、野外で利用できる、迅速かつ簡便に利用できるツールとしての有効性を確認することができた。AI学習モデルによる希少種判別は、今後、爬虫類や両生類のみならず、様々

な分類群で、そして国内のみならず国際的なニーズが高まることが予想され、本研究結果はその先駆けになるものとなり、極めて重要な知見を得ることができた。

コロナ禍という事情もあり、カナヘビ類など十分に解析を実施できなかった分類群もあるが、全体としてAI学習による希少種判別ツール作成のロードマップを作ることができ、目標は達成できたといえる。特に、編集画像による水増し解析手法の有効性を示すことができたことの意義は大きい。これは画像収集が難しい希少種であっても、判別ツールを作ることができる可能性を示しており、両生類や爬虫類のみならず、他の分類群への応用も多いに期待できる。この点は、目標を上回る成果であると考えている。

## ６．引用文献

1) Kurita, K., Honda, M., and Toda, M. 2018. Species delimitation and biogeography of the Ryukyu ground geckos, *Goniurosaurus kuroiwae* ssp. (Squamata: Eublepharidae), by use of mitochondrial and nuclear DNA analyses. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. 56(29), 209–222.

2) Turvey, S. T., Marr, M. M., Barnes, I., Brace, S., Tapley, B., Murphy, R. W., Zhao, E., Cunningham, A. A. 2019. Historical museum collections clarify the evolutionary history of cryptic species radiation in the world's largest amphibians. Ecology and Evolution. 9 (18), 10070–10084.

3) Ernst, C. H. and Lovich, E. J. 1990. A new species of *Cuora* (Reptilia: Testudines: Emydidae) from the Ryukyu Islands. Proceedings of the Biological Society of Washington 103 (1): 26–34.

## Ⅲ．研究成果の発表状況の詳細

### （１）誌上発表

＜査読付き論文＞

【サブテーマ１】

1) Niwa, K., M. Kuro-o, and K. Nishikawa. 2021. Discovery of two lineages of *Hynobius tsuensis* (Amphibia, Caudata) endemic to Tsushima Island, Japan. *Zoological Science* 38(3): 259–266 (doi: 10.2108/zs200149) (IF: 0.955)
2) Niwa, K., N. Yoshikawa, K. Nishikawa, and M. Matsui. 2022. Development of eight microsatellite markers for the Tsushima salamander, *Hynobius tsuensis* and its close relatives (Amphibia; Caudata). *Current Herpetology* 41(1): 125–131. (doi: 10.5358/hsj.41.125) (IF: 0.737)
3) Niwa, K., T. V. Dung, and K. Nishikawa. 2022. Differentiated historical demography and ecological niche forming present distribution and genetic structure in coexisting two salamanders in a small island, Japan. *PeerJ* 10: 20220310. (doi: 10.7717/peerj.13202) (IF: 3.06)
4) Kanamori, S., K. Nishikawa, M. Matsui, and S. Tanabe. 2022. A new species of lotic breeding salamander (Amphibia, Caudata, Hynobiidae) from Shikoku, Japan. *PeerJ* 10: e13891. (doi: 10.7717/peerj.13891) (IF: 3.06)
5) Ozaki, K., A. Tominaga, M. Matsui, S. Hara, and K. Nishikawa. 2023. Skull morphology differentiation between the two species of Japanese crocodile newts, *Echinotriton andersoni* and *E. raffaellii* (Ampbihia: Urodela: Salamandridae), inferred from geometric morphometrics. *Current Herpetology* 42(1): 9–16. (doi: 10.5358/hsj.42.9) (IF: 0.737)
6) Nishikawa, K., M. Matsui, and A. Tominaga. 2022. Morphological and taxonomic reexamination on a crocodile newt recently described from Japan (Urodela, Salamandridae, *Echinotriton*). *Zootaxa* 5196(2): 223–234. (doi: 10.11646/zootaxa.5196.2.4) (IF: 1.026)
7) Tominaga, A., M. Matusi, and M. Matsui. 2021. Structure and movement of the hybrid zone between two divergent lineages of the Japanese newt *Cynops pyrrhogaster* (Amphibia: Urodela) in central Japan. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 59(5): 1097–1112. (IF: 2.424)
8) Tominaga, A., Yoshikawa, N., Matsui, M, Nagata, N., Sato, Y. 2022. The emergence of a cryptic lineage and cytonuclear discordance through past hybridization in the Japanese fire-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster* (Amphibia: Urodela). *Biological Journal of the Linnean Society* 137(4): 651–666 (doi: 10.1093/biolinnean/blac12010.1093/biolinnean/blac120) (IF: 2.277)

【サブテーマ２】

1) Tran, D. V., S. Terui, K. Nomoto, K. Nishikawa. 2020. Ecological niche differentiation of two salamanders (Caudata: Hynobiidae) from Hokkaido Island, Japan. *Ecological Research* 36(2): 281–292. (IF: 2.056)
2) Ueno, S., Kamezaki, N., Mine, K., Suzuki, D., Hosoya, S., Kikuchi, K., Okamoto, K., Torii, M., Kadowaki, K., Okamoto K., and Sano, M. 2022. Reproductive ability of the hybrid between Japanese pond turtle (*Mauremys japonica*) and Reeves' pond turtle (*Mauremys reevesii*). *Zoological Science* 39(2) 186–192. (IF: 0.955)

【サブテーマ４】

1) Suzuki, T., Nishikawa, K., Sato, Y., Toda, M. 2021. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for quick identification of the Japanese salamander *Hynobius tokyoensis*. *Genes & Genetic Systems* 96(5): 247–252. (IF: 1.285)

＜査読付き論文に準ずる成果発表＞

特に記載すべき事項はない。

＜その他誌上発表（査読なし）＞

特に記載すべき事項はない。

（２）口頭発表（学会等）

【サブテーマ１】

1) 鈴木大，谷口真理，河野裕美，太田英利: 第60回日本爬虫両棲類学会，オンライン (2021)
「ミトコンドリア DNA 塩基配列に基づくヤエヤマセマルハコガメの遺伝的構造」

2) 岡本康汰，城野哲平，和智仲是，戸田守: 第61回大会日本爬虫両棲類学会，琉球大学 (2022)
「ミナミヤモリ系統間の移入先での二次的接触と交配:異所的集団の分類学的な関係解明への示唆」

3) 戸田守，城野哲平，岡本康汰，富永篤，林思民，山本拓海，和智仲是，廖珠宏: 第61回大会日本爬虫両棲類学会，琉球大学 (2022)
「東アジア島嶼域のミナミヤモリ種複合群の系統と分類」

4) 鈴木大: 第8回淡水ガメ情報交換会，早稲田大学，(2022)
「カメの骨より抽出したDNAによる解析の一例報告」

【サブテーマ２】

1) 栗田隆気，和智仲是，佐藤行人，戸田守: 第61回大会日本爬虫両棲類学会，琉球大学 (2022)
「どこまで少ない個体数から遺伝的多様性は推定できるのか:トカゲモドキの例」

2) 和智仲是，戸田守: 第60回日本爬虫両棲類学会，オンライン (2021)
「核DNAとミトコンドリアDNAからみたミヤコカナヘビの遺伝的多様性の特徴」

3) 鈴木大，阿部優，宮澤萌，粟村観月，水谷晃，井上太之，北夕紀，亀崎直樹，河野裕美: 第33回日本ウミガメ会議やんばる大会，沖縄県国頭村国頭村民ふれあいセンター（2022）
「ミトコンドリアDNAコントロール領域遺伝子配列に基づく西表島周辺海域に生息するアオウミガメ集団の遺伝的変異と起源の推定」

4) 鈴木大:第61回日本爬虫両棲類学会，琉球大学 (2022)
「カメのハイブリッド問題—企画集会２．交雑から考える種境界のサイエンス—」

【サブテーマ３】

1) 許斐有希，佐藤行人，松井正文，富永篤，吉川夏彦，西川完途，戸田守: 第59回日本爬虫両棲類学会(2020)
「日本産有尾類全種のDNAバーコーディング領域の探索」

2) 許斐有希，佐藤行人，松井正文，富永篤，吉川夏彦，西川完途，戸田守: 第60回日本爬虫両棲類学会，オンライン (2021)
「日本産有尾類全種のミトコンドリア全塩基配列の決定」

3)岡本康汰，栗田隆気，佐藤行人，陶善達，山本拓海，廖珠宏，戸田守: 第60回日本爬虫両棲類学会，オンライン (2021)
「ミトコンドリア DNA 全周配列に基づく琉球列島産トカゲモドキ属の系統関係」

【サブテーマ４】

1) 鈴木智也，西川完途，佐藤行人，戸田守: 第60回日本爬虫両棲類学会，オンライン (2021)
「LAMP 法を用いたトウキョウサンショウウオの簡易分子同定法の確立」

【サブテーマ５】

1) 鈴木大，川波稜，宇土健吾，清水善吉，大沼弘一，村田満，戸田守，西川完途: 第61回大会日本爬虫両棲類学会，琉球大学 (2022)
「人工知能モデルを用いたオオサンショウウオ属の画像認識システムの開発」

（３）「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ１～５】

1) 公開シンポジウム「希少種を認識する、同定する、保全する」（主催：日本爬虫両棲類学会第60回大会実行委員会，2021年9月18日，オンライン，234名が参加），鈴木智也，鈴木大，戸田守，早瀬穂奈実（環境省自然環境局野生生物課希少種保全推進室）が講演，富永篤がパネリスト
2) 公開講座「講座　動物の同定作業体験」2022年5月15日，千葉県立中央博物館，栗田隆気

【サブテーマ１】

1) 公開シンポジウム「日本におけるコイの起源–どうする外来コイ（馬渕浩司氏 [国立環境研究所 琵琶湖分室]、第9回淡水ガメ情報交換会、2023年3月18日 兵庫県神戸市），鈴木大（コーディネーター）
2) 特別講義「動物自然史」大阪府立北野高校３年生，2021年8月30日，33名，西川完途
3) 講演「ひょうご私学の学び場」兵庫県私立中学高等学校連合会，2021年10月23日，西川完途
4) 基調講演「生物多様性とSDGs～楽しい研究が世界を救う？～」，神戸国際会館，西川完途
5) 別講義「日本の動物相の成り立ちと種多様性研究」，鹿児島県立国分高校２年生，2022年11月8日，38名，西川完途
6) 特別講演「遊ぶように学ぼう」および対談「中高のその先で伸びる子／伸びない子」，関西難関私立中学高校進学相談会，2023年4月29日，西川完途
7) 別講義「京都大学へようこそ」福岡県立福岡高校１年生，94名，2022年12月23日，西川完途

【サブテーマ５】

1) 那覇空港，沖縄地区税関における密輸防止研修会(主催: 環境省沖縄奄美自然環境事務所，2022年8月17日，那覇空港国内線ターミナル；2022年8月18日，那覇港湾合同庁舎，ともに那覇市)，鈴木大・戸田守が講演.
2) 一般公開型イベント「オオサンショウウオ調査会in 秋の京北」（共催：東海大学京都大学，2022年10月22日，23日あうる京北，京都府京都市.（参加者約20名），鈴木大・西川完途（講演），栗田隆気・戸田守（ディスカッション）
3) 特別講義「オオサンショウウオ学」洛星中学・高等学校，30名，2021年7月3日，西川完途
4) 野外実習「オオサンショウウオ調査」洛星中学・高等学校，30名，　2021年7月20日，西川完途
5)兵庫県私立中学高等学校連合会「ひょうご私学の学び場 分科会講演『サンショウウオを追って日本から世界へ』」神戸国際会館. 2021年10月23日，西川完途
6) 解剖実習「オオサンショウウオ」洛星中学・高等学校，30名，2021年7月30日，西川完途
7) 骨格模型作成実習「オオサンショウウオ」洛星中学・高等学校，30名，2021年11月3日，西川完途
8) 野外実習「オオサンショウウオ調査」洛星中学・高等学校，30名，2022年5月20日，西川完途
9) 解剖実習「オオサンショウウオ」洛星中学・高等学校，30名，2022年5月21日，西川完途
10) 灘中高土曜講座「オオサンショウウオ学」灘中学・高等学校，30名，2022年6月4日，西川完途
11) 特別講義「オオサンショウウオについて」花背小学4年３名，2022年6月21日，西川完途
12) 解剖実習「オオサンショウウオ学」四天王寺中学・高等学校，72名，2022年7月9日，西川完途
13) 特別講義「オオサンショウウオ学」洛星中学・高等学校，30名，2022年7月16日，西川完途
14) 標本作成実習「オオサンショウウオ学」洛星中学・高等学校，30名，2022年7月30日，西川完途

15) 第19回京大変人講座「それいけ！オオサンショウウオ」京都大学. 2022年9月20日，西川完途
16) 特別講義「オオサンショウウオ学」三重県立上野高等学校，30名，2022年10月17日，西川完途
17) 解剖実習「オオサンショウウオ学」三重県立上野高等学校，30名，2022年10月19日，西川完途
18) 特別講義「オオサンショウウオと外来種問題」岡山県立岡山操山中学校２年生４名，2022年11月17日，西川完途
19) 出張変人講座「それいけ！オオサンショウウオ」株式会社タダノ. 2022年11月29日，西川完途
20) 講演「オオサンショウウオがやってくる」やましろ里山の会. 2023年3月4日，西川完途
21) 特別講義「オオサンショウウオ学」洛星中学・高等学校，２０名，2023年5月6日，西川完途
22) びっくりエコ研究所・京都超SDGsコンソーシアム「第13回SDGs問答『自然と人間は共生できるのか？』」京都里山SDGsラボ＜ことす＞. 2022年7月23日，西川完途
23) PodCast「ラジオ変人講座」Spotify（ラジオ）2023年1月13, 20, 27日，西川完途
24) ブース展示 環境広場さっぽろ2023．2023年4月15-16日，西川完途

（４）マスコミ等への公表・報道等

【サブテーマ２】

1) 北海道新聞（2020年12月9日，北海道版，「追いやられたキタサンショウウオ」），西川完途
2) 北海道新聞（2021年1月8日，北海道版，「キタサンショウウオを守れ」），西川完途
3) 読売新聞での取材コメント（2023年4月13日夕刊，「保護から駆除へ　クサガメ」），鈴木大

【サブテーマ４】

1) 朝日新聞（2021年12月13日，「希少種トウキョウサンショウウオ、短時間で簡単に判別　違法売買防げ」）
2) 読売新聞（2022年02月6日，「希少サンショウウオ、１日かかる判別を１時間で…違法販売防止へ京大など開発」）
3) 日本経済新聞（2022年3月4日，「絶滅危惧種サンショウウオの違法売買防げ」）

【サブテーマ５】

1) 朝日新聞（2022年10月27日，「古都に広がるサンショウウオの交雑問題 京大名物『変人講座』で学ぶ」[https://www.asahi.com/articles/ASQBV4QR5QB1ULBH00J.html]）被取材，西川完途
2) 日経サイエンス（2022年12月1日「特集サンショウウオの生き方『京の都のオオサンショウウオ交雑問題の現在』」p.62–65.）被取材，西川完途
3) 京都新聞（2022年12月2日「ソフィア京都新聞文化会議『京都発、全行政で交雑対応を』」[https://www.kyoto-np.co.jp/articles/-/933258]）寄稿，西川完途
4) NHK総合（2023年2月16日「所さん！事件ですよ『秋田犬が殺処分!? 天然記念物の事件簿』」）取材協力，西川完途

（５）本研究費の研究成果による受賞

特に記載すべき事項はない。

（６）その他の成果発表

特に記載すべき事項はない。

## Ⅳ．英文Abstract

Construction of cost-effective workflows enabling development of simplified identification tools and designation of endangered species of amphibians and reptiles

Principal Investigator: Mamoru TODA
Institution: University of the Ryukyus, Senbaru 1, Nishihara, Okinawa 903-0213, JAPAN
Tel: +81-98-895-8936 / Fax: +81-98-895-8965
E-mail: gekko@u-ryukyu.ac.jp
In cooperation with: Kyoto University, Tokai University, Natural History Museum and Institute, Chiba

[Abstract]

Key Words: Taxonomy, Species identification, DNA sequence data, LAMP method, AI image, Amphibians, Reptiles

Accurate species recognition and identification are among the most important issues in biodiversity conservation and related activities. In this research project we aimed to develop tools and systems to facilitate easy and accurate identification of Japanese amphibians and reptiles. We also conducted taxonomic revisions and evaluation of vulnerability for several potentially endangered species and for species groups that contain such species. In our taxonomic revisions we examined 18 species or species groups, and found at least eight potentially undescribed species, of which two have since been described. For evaluation of the vulnerability of species or populations, we carried out genome-wide SNP analyses for seven groups and clarified evolutionarily significant units for conservation. We estimated their heterozygosity from the SNP data as a simple measure of population vulnerability, and based on those scores, we suggested relative priorities among populations/species for the application of conservation measures. We also conducted whole-genome shotgun analysis for 48 species, to establish references for future genomic analyses of Japanese amphibians and reptiles. In developing species identification tools, we first determined nearly complete mitochondrial DNA sequences of over 350 individuals of 199 species of the Japanese ectothermal tetrapods (>90% of total) and complied the sequences as reference data for future DNA barcoding analyses. Based on the data, we designed new primers for urodelan (salamander) DNA barcoding that can identify all the species known from Japan. Second, we developed a method to identify a particular protected salamander, which is sometimes sold in the pet market illegally, by use of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique. This method can identify the species within one hour without any special equipment, and thus it is useful as a control measure to monitor the illegal trade. Third, we developed a species identification tool based on photographic images, using artificial intelligence (AI) learning, to discriminate several protected species from highly similar species. As a result, we successfully developed an AI learning model that can discriminate the Japanese giant salamander from introduced Chinese congeners using simple photographic images. These species are hybridizing in the wild, which poses a serious problem for conservation of the Japanese giant salamander. The new tool developed here will help prevent further introduction of the Chinese species to other river systems.