

学 位 論 文 題 名

The origin and ecology of *Rana nigromaculata* introduced into Hokkaido

(北海道に侵入したトノサマガエルの由来と生態)

学位論文内容の要旨

Introduced species pose major threats to natural environments. Understanding the origin and mechanisms underlying the expansion pattern of introduced species and their impact is crucial in managing them to protect native ecosystems effectively. In Japan, *Rana nigromaculata* originally occurs on the three main islands, Honshu, Shikoku and Kyushu, but not on the northernmost main island, Hokkaido. However, Takenaka (1997) reported a small exotic population of *R. nigromaculata* in paddy fields, ponds, and neighboring habitats in Kitahiroshima, central Hokkaido. In addition, this species has been found in Hiraoka Park and the campus of Hokkaido University, Sapporo. To determine the origin of these introduced *R. nigromaculata* populations, I examined phylogeography of this species in China, Korea and Japan, by analyzing mitochondrial DNA of *Cyt b* 1143 bp. I also monitored the expansion of their distribution in Kitahiroshima from 2006 to 2009 and I examined food menu of the Kitahiroshima population from their stomach contents to understand the effect of this species on ecosystem.

In the samples collected in Honshu, Shikoku and Kyushu Islands, Japan, a total of 76 haplotypes were identified: 49 for *R. nigromaculata*, 18 for *R. porosa porosa*, 9 for *R. p. brevipoda*. Including 29 haplotypes reported from China and Korea, a Bayesian tree and a maximum parsimony tree were constructed. These trees showed five major clades in pond frogs in Japan. Clade 1 consisted of eight *R. nigromaculata* haplotypes found in Chubu Region and a part of Aomori Prefecture; clade 2 was composed of 31 *R. nigromaculata* haplotypes found in most sampling sites in Honshu; clade 3 consisted of 10 *R. nigromaculata* haplotypes from those only in Kyushu. *R. porosa porosa* haplotypes were found in Tohoku and Kanto Regions, forming clade 4, and *R. porosa brevipoda* haplotypes were observed in only two sampling sites Takashima, Shiga Pref. and Inuyama, Aichi Pref., forming clade 5. The northernmost ranid populations in China and Korea were more closely related to Japanese *R. porosa* than to *R. nigromaculata* unlike Zhang et al. (2008) who had identified them *R. nigromaculata*.

Within *R. nigromaculata*, Kyushu populations are phylogenetically distinct from Chinese populations and Honshu-Shikoku populations which are more closely related to each other. A molecular clock of *Cyt b* strongly suggested that the *R. nigromaculata* groups had diverged in Quaternary when landbridges had been formed between China and Japan across East China Sea in some glacial eras. I assume that *R. nigromaculata* had colonized Japan twice through the

landbridges and the first immigrants had been extinct in Japan except Kyushu and the second immigrants had been extinct only in Kyushu.

Whereas Aomori Pref. and Chubu Region are located about 340 km apart from each other the two regions shared the same haplotypes which were not found in any other region, suggesting an artificial introduction of *R. nigromaculata* from Chubu Region to Aomori Pref of Tohoku Region, in addition to previously reported invasions of *R. nigromaculata* into Tsushima and Hokkaido. In Hokkaido, there were eight *R. nigromaculata* and three *Rana porosa porosa* haplotypes including six and two new haplotypes, which were not found in other regions of Japan, China or Korea: for *R. nigromaculata* a new haplotype Ho1 in the campus of Hokkaido University, haplotypes 12 and 63 and new haplotypes kita1-5 from Kitahiroshima District, haplotypes 63, 2 and 12 in Hiraoka Park; *Rana porosa porosa*, haplotype 4 and new haplotypes Iw1 and Iw2 from Iwamizawa. In the Bayesian tree, *R. nigromaculata* haplotype Ho1 belonged to a clade of haplotypes which were discovered in Shizuoka, Aichi, Nagano (Chubu Region), and Aomori. Kita1, kita3, kita4 and kita5 formed a clade with haplotype 12 found in Shiga and Hyogo Prefectures, (Kinki Region) and kita 2 formed a clade with haplotypes 63 and 64 found in Shimane and Yamaguchi Prefectures, (Chugoku Region).

From the haplotype compositions, I discussed how the ranid frogs had been introduced into Hokkaido. In Hokkaido University, some researchers have bought frogs as experimental materials from agents of Shizuoka Pref. and a few of the frogs might be once released to a pond. In Kitahiroshima and Hiraoka Park, it is unlikely that the releases of educational materials have been sources of the introduced frogs, because these populations seemed to originate from western Honshu where the agents providing frogs to schools are much fewer than in eastern Honshu. The Iwamizawa population shares one haplotype with a Machida population, Tokyo and Matumoto, Nagano, indicating its origin to be Tokyo where some agents deal ranids as educational materials.

In Kitahiroshima, *R. nigromaculata* occurred 27.1 km² of paddy fields and adjacent habitats in 2006, whereas it had been found only in the area of 1.7 km² in 1997. Surveys in 2008 and 2009 further demonstrated their gradual expansion. In Iwamizawa, the distribution of *R. porosa porosa* also expanded to paddy fields, and the range reached 5 km away from the range of *R. nigromaculata* in Kitahiroshima, suggesting that they will encounter each other in the near future.

To survey food habits, 140 frogs of *R. nigromaculata* were captured in 2005 and examined stomach contents. 662 prey items of 38 types were collected. Main prey items were lepidopteran larvae, Gerridae, Araneae, Isopoda and Carabidae. *Hyla japonica* showed a similar food habit, with Pianka's overlap index of 0.78. Only one *R. nigromaculata* stomach contained a piece of anuran which was probably an adult *Hyla japonica*, and there were a significant negative correlation between the densities of groundsurface invertebrates and frogs. These results suggest that *R. nigromaculata* may affect *H. japonica* through competition for food resource but not through predation.

学位論文審査の要旨

主査	教授	東	正剛
副査	教授	木村	正人
	准教授	鈴木	仁
	教授	竹中	践(東海大学生物理工学部)

学位論文題名

The origin and ecology of *Rana nigromaculata* introduced into Hokkaido

(北海道に侵入したトノサマガエルの由来と生態)

申請者は、1980年代末か1990年代初めに本州から札幌市内（北海道大学構内と平岡公園）とその近郊（北広島市周辺と岩見沢市）に持ち込まれて定着したと考えられているトノサマガエル個体群を対象として、ミトコンドリアDNA（チトクローム *b* 遺伝子 1143bp）のハプロタイプ比較による原産地の推定と、個体群動態の経年調査による生態系影響評価を試みている。ハプロタイプ比較では、本州・四国・九州各地からDNA標本を収集するとともに、先行研究による中国各地と韓国個体群のハプロタイプ分析結果も引用し、東アジア全域におけるトノサマガエルとその近縁種の分子系統解析も行っている。中国の研究者による先行研究では日本の個体群の分析が不十分であり、トノサマガエルとその近縁種の全分布域を対象に分子系統解析を行ったのは本研究が初めてである。

DNA分析により76ハプロタイプを得、これに中国と韓国の29ハプロタイプを加えてベイズ系統樹と最節約系統樹を作成した。両系統樹の樹形はほぼ等しく、6つのクレードから成っている。特筆すべきことは、1）これまでトノサマガエルとされてきた中国北部と韓国の個体群は日本のダルマガエル（亜種であるトウキョウダルマガエルを含む）と比較的近縁、2）本州と四国の個体群は中国の中部・南部の個体群と非常に近縁、3）九州の個体群は中国や本州・四国の個体群とはかなり異なる、などである。先行研究で1）が見落とされてきたのは、ダルマガエルを系統解析に加えなかったためであり、本研究で初めて得られた知見である。これまでダルマガエルは日本の固有種とされてきたが、台湾の系統もトノサマガエルよりダルマガエルに近いという指摘もある。中国北部と韓国の個体群を含め、ダルマガエル系統がトノサマガエルの分布域の周辺域に隔離分布していることから、ダルマガエル系統がトノサマガエルに先行して東アジアに広がっていた可能性があることも明らかとなった。また、2）

と3)から、日本には大陸からトノサマガエルが二度進入してきたと考えられる。いずれの場合にもその入り口であったと思われる九州で古い個体群が生き残っている事実は、今後両生類学会で議論を巻き起こす可能性の高い重要な発見である。

さらに申請者は、北海道のトノサマガエル80個体についてDNA分析を行い、11ハプロタイプを見出した。これらを本州・四国・九州のハプロタイプに加えてベイズ系統樹を作成したところ、北海道大学個体群は中部地方の個体群に、平岡・北広島個体群は近畿・中国地方の個体群に近いこと、岩見沢個体群は明らかにトウキョウダルマガエルであり、関東・中部地方の個体群に近いことが明らかとなった。これまで北海道への侵入経路としては、1)高校の生物実験用として静岡の業者から購入されたカエルが生きたまま野外に放され、定着した、2)鯉養殖業者が新潟から購入した鯉幼魚にカエルの卵やオタマジャクシが紛れ込んで侵入した、の2つが考えられてきたが、上記分析結果から北大の個体群は1)のケースであると思われる。岩見沢の個体群は関東地方のカエル業者から購入された実験用カエルが放された可能性が高い。平岡・北広島個体群の侵入経路はまだ不明だが、近畿・中国地方起源と考えられることから、今後明らかにできる可能性がある。

北広島個体群が占める面積は、1997年にはわずか25.6km²に過ぎなかったが(Takenaka 1997)、申請者が調査した結果、2006年には134.1km²、2008年には223.1km²、2009年には231.6km²であり、10年余りの間に約10倍にまで拡大していることが明らかとなった。特に、千歳川下流域への拡大が著しく、川の流れに乗って分布を拡げる傾向のあることが示唆された。在来種であるニホンアマガエルへの影響が懸念されるため、2種の密度の相関関係を求めたところ、有意な負の相関が認められた。2種の胃内容物を調べたところ、いずれも鱗翅目幼虫と鞘翅目成虫を主な餌としており、ピアンカの重複度指数も高い値(0.78)を示した。次に、トノサマガエルと地上徘徊性無脊椎動物の密度の相関を求めたところ、やはり有意な負の相関が認められた。トノサマガエルの胃からはニホンアマガエルの死骸がほとんど見つからなかったことから、先行研究において懸念された直接的な捕食による影響はないと思われるが、餌資源をめぐる競争が起こっている可能性は高い。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせて、申請者が博士(環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。