

## F-1 地理的スケールにおける生物多様性の動態と保全に関する研究

### (4) 野生鳥獣のメタ個体群構造と遺伝的多様性の解析

独立行政法人森林総合研究所

森林動物科長	北原英治
森林生物部 鳥獣生態研究室	山田文雄・堀野眞一
北海道支所	石橋靖幸
東北支所	中村充博
多摩森林科学園	林 典子

平成 11～13 年度合計予算額 41,098 千円  
(平成 13 年度予算額 11,097 千円)

#### [要旨]

野生鳥獣の保護管理手法を確立するため、生息地のランドスケープ構造と野生鳥獣のメタ個体群動態やその維持機構の研究を行った。メタ個体群の構造解析と保護管理研究では、森林の孤立化や環境変化が、生息に大きな影響を与えている現状が二ホンリスで明らかになった。その至近要因として、メスの生残率低下や移動分散の阻害や遺伝的多様性減少が明らかになった。また、分断化の進んだ個体群間で遺伝的分離と多様性低下がツキノワグマ西日本個体群で明らかになり、保護的管理が求められる。遺伝的マーカー開発と適用研究では、DNA によるクマゲラと他種の判定と、糞から得られた DNA の利用が可能になり、生息の確認に適用可能になった。また、日本産ノウサギの固有性が遺伝的に検証され、遺伝的多様性が分化維持されてきたことが明らかになった。希少野生動物保全研究にとって、生態学的、遺伝学的手法及び絶滅リスク評価手法などを用いることによって、メタ個体群構造や生息実態が把握され、今後の必要な保全施策立案のための多くの知見が得られることが明らかになった。

[キーワード] 希少野生鳥獣、個体群存続可能性評価、シミュレーションモデル、遺伝学的多様性

#### 1. はじめに

野生鳥獣の種の絶滅をもたらす要因として、生息地の破壊や移入種の影響、狩猟や採集、環境汚染などがあげられ、このような過程で小集団化すると、人口学的な要因と遺伝学的要因、さらに複合的要因が重なり加速度的に絶滅を起こすと考えられている。近年の森林の開発、道路網の発達、農地・宅地開発などによって、かつて連続していた一塊りの森林は小面積の島状森林に分断されてきた。森林の断片化は、生活のすべてを森林に依存している動物にとって、生息を大きく左右する要因である。しかし、わが国の野生鳥獣の生息実態の歴史の変遷を過去長期間にわたってたどるための、科学的に信頼できる資料はほとんど存在しないために、歴史的・地理的スケールで野生鳥獣の絶滅過程やその要因を分析することは極めて困難な作業といえる。そこで、これらの絶滅プロセスや要因を推定し、今後の野生鳥獣の保護管理を確立するために、野生鳥獣の

メタ個体群を生態学的にまた遺伝学的に把握し、個体数減少要因の抽出を行い、個体群存続可能性分析を行う必要がある。本研究では、わが国の野生鳥獣のうち、人為的影響を受けつつ分布や個体数の減少が著しく、保護管理策の求められている次のような種類を中心にこれらの研究を進める。ニホンリス *Sciurus lis* (以下リス) は九州、四国、本州の低地から亜高山帯に分布するが、近年、九州や西日本では生息の確認がされていない<sup>6)</sup>。こうした地域的絶滅には、人為による森林環境の変化が関わっていると考えられる。クマ類(ツキノワグマ *Ursus thibetanus* とヒグマ *U. arctos*) は、日本哺乳類学会編「レッドデータブック」(1997)、環境省版「日本版レッドデータブック」(1998)などに掲載され、地域的な絶滅の危険性のあることが広く認識されるようになった<sup>10)</sup>。キツツキ類のクマゲラ *Dryocopus martius* は、本州では生息数が極めて少なく衰退が著しいといわれており<sup>18)</sup>、環境省のレッドデータリストでは絶滅危惧Ⅱ類(VU)に分類されている。わが国のウサギ科(Leporidae)動物は固有種として位置づけられるが、近年の狩猟統計や生息調査結果では1970年代に比べると、いずれの種類も大幅な減少傾向が認められ、また、島嶼性の希少種ウサギの保護は緊急で重要な課題である。

## 2. 研究目的

本研究では、わが国の希少野生鳥獣の保護管理手法を確立するための基礎的知見を得るために、1)メタ個体群の構造解析と保護管理、2)遺伝的マーカー開発とその適用を目的とし、森林依存性の高いニホンリス、クマ類、クマゲラ(キツツキ類)及びウサギ類を対象とする。いずれの動物も、森林の断片化や縮小及び劣化に伴って、生息環境が悪化し、生息分布の縮小や個体数減少が顕著である。特に、人間活動の活発な西日本や本州における生息状況は厳しく、本研究ではこのような地域の個体群を主な対象とする。

メタ個体群の構造解析と保護管理の研究では、ニホンリスとクマ類を対象とする。ニホンリスは、宅地開発や道路網の発達による森林の断片化が急速に進んだ東京都西部の山林において、生息実態を明らかにし、森林環境の違いが本種の個体群構造や遺伝的多様性に与える影響を検討する。また、ツキノワグマでは、西日本個体群の遺伝的多様性の把握と個体群間の遺伝的分化の程度を明らかにし、地域個体群の保護・管理体制整備のための基礎的知見を提供する。保護管理のために、クマ類の個体群存続可能性評価技術の向上と、実際の個体群への適用を検討する。遺伝的マーカー開発とその適用の研究では、クマゲラ(キツツキ類)とウサギ類を対象とした。クマゲラは直接観察による生息確認や捕獲が極めて困難であり、このため採餌跡に残される糞や羽毛などを利用<sup>4, 13)</sup>し、かつ同所に生息する他のキツツキ類と識別するために、DNAによる種の同定法を開発し、さらにクマゲラのmtDNAの12S rRNA部位について塩基配列を決定し、東北地方と北海道個体群の比較を行う。また、クマゲラに利用できるマイクロサテライトプライマーの開発を行う。ウサギ類では、個体群縮小と遺伝的変異との関係を検討するために、ウサギ類の遺伝的特性を明らかにする必要がある、遺伝的マーカーの検討が必要である。このための種間変異を検討し、種としての固有性や位置づけを検討する。

## 3. 研究方法

### (1)森林の断片化のニホンリス個体群に及ぼす影響

生息状況と森林の断片化調査では、高尾山塊から東へ20km、多摩川と相模川に囲まれた区域

を調査範囲とした。1970年、1980年、1989年、1997年の空中写真から林分率と森林面積を測定し、森林塊の変化を比較した。また、この範囲の1ha以上の林すべてを対象として、リスの生息の有無を林分単位で調査した。リスの直接目撃、リス特有のアカマツやオニグルミの食痕、またはリスの巣を確認することによって生息の証拠とした。行動圏と個体群構造調査では、高尾山の連続した天然林(以下MT)と、道路によって孤立し人工林が含まれる多摩森林科学園(以下TFSG)において、2ヶ月おきにわなかけを続けた。捕獲個体には個体識別の首輪を装着し、定着期間を記録した。また、MTではオス10個体、メス9個体、TFSGではオス14個体、メス19個体に発信機を装着し行動圏解析を行った。また、TFSGにおいて、リスがどのような植生を選択的に利用するのかを明らかにするために、発信機をつけたオス7個体、メス6個体について10分ごとに位置を調べ、利用した植生タイプを記録した。植生タイプは天然林、二次林、針葉樹林、落葉広葉樹林、樹木園、低木林/草地の6タイプである。それぞれの植生が占める面積比で期待値を算出し、選択的に利用しているか否かを判断した。遺伝的多様性調査では、1999年からMTとTFSG両地区で、捕獲された個体全ての耳介から約2mm<sup>2</sup>の皮膚を採集した。ヨーロッパ産アカリス *Sciurus vulgaris* の全塩基配列を参考にして、ニホンリス用のD-loop領域プライマーを設計し、PCRによって増幅して各個体の塩基配列を読みとった。

#### (2) ツキノワグマにおける分断個体群と遺伝的多様性

京都府、兵庫県、鳥取県、島根県下で捕獲されたツキノワグマ試料(筋肉、臓器片)からフェノール抽出法によりDNAを抽出した。マイクロサテライトDNAマーカー(6遺伝子座)<sup>3)</sup>を使って、西中国山地個体群(島根県)、東中国山地個体群(兵庫県、鳥取県)、京都北西部個体群(京都)、京都北東部(京都)の遺伝的多様性(対立遺伝子数、ヘテロ接合度)と個体群間の遺伝的距離(FST)等を分析した。また、ミトコンドリアDNAのコントロール領域の一部(約400塩基対)の塩基配列をPCR法を用いて直接解読し、出現するミトコンドリアDNAタイプの組成の違いを個体群間で分析した。

#### (3) クマ類の存続可能性評価

生命表パラメータなどから人口学的ゆらぎを含めた個体群動態を計算するプログラムを作成した。これを用いて個体数調査結果と捕獲統計から、過去約10年間の個体数変化を推定し、今後約10年間の変化を予測した。個体群ごとの環境条件を織り込んだ数値モデルを作成し、個体群絶滅確率を推定するシステムを構築した。このシステムを用いて、個体群および生息地管理オプションの違いが絶滅確率にどのような影響を及ぼすのかを検討した。その結果を総合的に分析し、個体群存続可能性を評価するとともに、対象個体群に対して必要な管理オプションを検討した。なお、個体群モデルは個体ベースモデルの手法によって構築し、絶滅確率はそのモデルを使ったモンテカルロ法によるシミュレーション実験で求めた。

#### (4) クマゲラのメタ個体群と遺伝的多様性

キツツキ類の種の同定法の開発では、クマゲラの死骸1個体、アオゲラの死体2個体、オオアカゲラの死体2個体、アカゲラの血液13個体を使用し、フェノール-クロロホルム法<sup>9)</sup>を用いてDNAを抽出した。ニワトリのmtDNAの塩基配列<sup>1)</sup>を基に12SrRNA部位の一部を増幅するプライマ

ーを設計し ( LC01801, 5' -AGAACTACGAGCACAAA CGC-3' と HC02152, 5' -GAAGAGGGTGACGGGCGGTATGT-3' )、サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9600) を使用し、95℃ 1分、60℃ 30秒、72℃ 1分のサイクル 30回の条件でPCRを行った。塩基配列の決定は、LC01801とHC02152のプライマーとPRISM BigDye Terminator Kitを使用し、シーケンサ (PRISM 310 Genetic Analyzer) を用いて行った。4種のキツキ類の塩基配列を比較し、種特異的なプライマーを設計した。

種の同定法による同定と塩基配列の比較では、北海道のクマゲラの剥製の羽5個体、キツキ類の糞10サンプル、羽6サンプル、くちばし1サンプルを使用し、糞については5mm角に切り出し、STEバッファーに混ぜた上澄み液を、他のサンプルについてはホモジナイザーでよくすりつぶしたものを、フェノール-クロロホルム法<sup>9)</sup>でDNAを抽出した。0.25pmol/ $\mu$ lのLC01801とHC02152のプライマーで、95℃ 1分、60℃ 30秒、72℃ 1分のサイクル 30回の条件でPCRを行った後、このPCR産物をテンプレートに再度25pmol/ $\mu$ lのLC01801とHC02152のプライマーで95℃ 1分、60℃ 30秒、72℃ 1分のサイクル 30回の条件でPCRを行った。このPCR産物を使用し、PCR法による種の同定を行った。また、クマゲラのもと同定されたサンプルは、プライマー Drm I (5' -CCAACAGTGAGCACAAACC-3' )、Drm II (5' -GGTTTAA GACAAGCATGG-3' )をインナープライマーとし、PRISM BigDye Terminator Kitを使用し、シーケンサ (PRISM 310 Genetic Analyzer) を用いて12SrRNA部位の塩基配列を決定し、東北地方と北海道の個体群の比較を行った。

マイクロサテライトマーカーの開発では、微量のサンプル、古いサンプル、劣化したサンプル等の分析が可能であると考えられ、保全が必要とされる生物を分析する場合でも、微量のサンプルで分析できる、生物体に与えるダメージを少なくすることができるマイクロサテライト分析のためのマイクロサテライトマーカーを開発するため、多量のDNAが得られるアカゲラの核DNAを使用してマイクロサテライトマーカーを開発した。開発されたマイクロサテライトマーカーがクマゲラに適用できるかを確認した。

#### (5) 日本産のウサギ科の遺伝的多様性

日本産ウサギ科動物としてアマミノクロウサギ、ニホンノウサギ及びエゾユキウサギの狩猟個体の収集もしくは現地での捕獲を行い、体組織もしくは血液サンプルを採集した。それを持ち帰り、それぞれのDNAを抽出した後、mtDNAの12S領域とチトクロームb領域をPCR法で増幅し、シーケンシングを行い、遺伝的特性を比較検討した。

## 4. 結果・考察

### (1) 森林の断片化のニホンリス個体群に及ぼす影響

森林の断片化の歴史の変遷と現在のリスの生息の有無を調査した。明治40年頃の図版によると、調査範囲は高尾山から続く連続した丘陵地で、樹林に覆われていた<sup>15)</sup>。したがって、この区域の森林断片化はここ60年ほどのできごとであると考えられる。1970年には調査地中央の盆地に市街地が広がり高速道路による南北の分断も始まった (図1)。しかし、この時期には比較的大きな面積の森林が近接して分布し、西側は高尾山塊に連続していた。その後、森林の細分化が進み、1985年以降には国道が縦走し東西の大きな境界ができた。林分数で比較すると、1970年には24カ所であったが、1980年には52カ所、1989年には70カ所と増加した。平均森林面積は1970

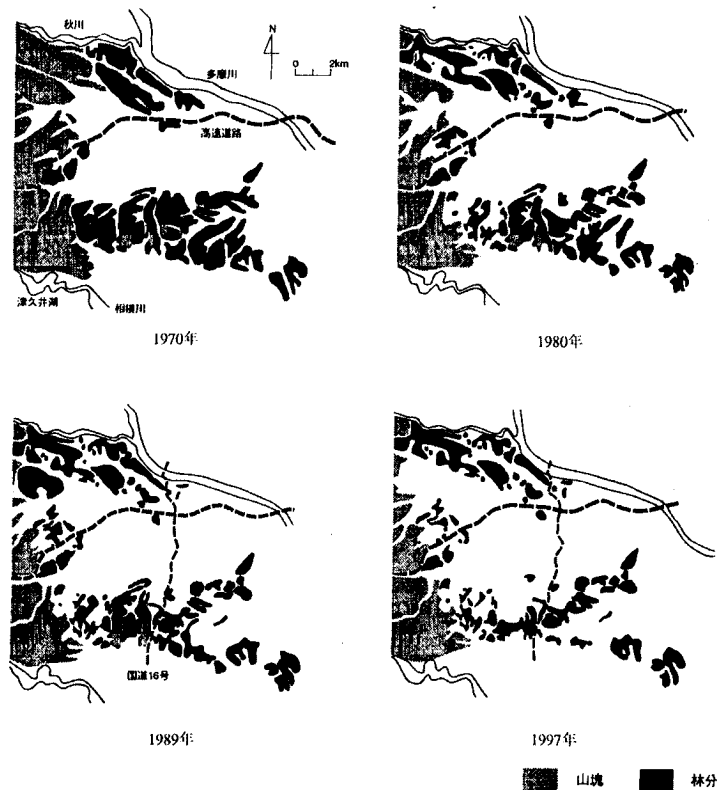


図 1. 高尾山周辺の森林環境の変化

年には 152ha、1980 年には 61ha、1989 年には 46ha と縮小した。1997 年に調査範囲には 76 カ所の孤立林分が存在し、平均面積は 38ha であった。このうち、リスが生息していた 14 カ所の森林面積は 20.7ha 以上、平均 112.0ha であったのに対し、リスが生息しなかった林分は平均 10.8ha で、有意な差があった（図 2）。つまり、20ha 以上の大きな森林だけにリスが生息していた。隣接する林分との距離は生息林分では平均 27.7m、非生息林分では 232.6m と有意差があった。したがって、リスはいくつかの森林間を行き来して生息している可能性があり、林間の距離が大きくなると生息できなくなることが明らかになった。また、国道より東側には生息する林分は無かった。

生息環境と行動圏及び個体群構造を検討した結果次のことが明らかになった。調査地の一つ TFSG で、どの植生タイプをリスが好んで利用するのかを比較した結果、天然林をもっとも選択的に利用していた<sup>14)</sup>。また、オニグルミの林を好んで利用したが、それ以外の落葉樹や針葉樹林は通過する程度であった。樹木園、低木/草地はほとんど利用しなかった。MT と TFSG 両地区を含め行動圏サイズを比較すると、リスが好む天然林が多いところでは個体の行動圏が小さく、好適環境が減るにつれて、個体の行動圏が大きくなる傾向が見られた（図 3）。また定着月数と行動圏内の好適植生割合との相関を調べると、オスには有意な相関は見られなかったが、メスでは有意であった（Spearman 順位相関  $Z = 2.18$ 、 $P=0.03$ ）。つまり、行動圏内に好適環境が多い個体に比べ、少ない個体では定着期間が短い傾向が見られた。植生環境の変化が行動圏のサイズに影響し、さらにメスの生残率に影響を与えていることが明らかになり、リスが生息するためには好適な植生割合の閾値が存在することが示唆された。

地域個体群間の遺伝的多様性を比較するため、MT で 24 個体、TFSG で 20 個体の解析を行った。全体で 8 つのハプロタイプが区別された。このうち MT で 6 タイプ、TFSG で 5 タイプ、両地区で

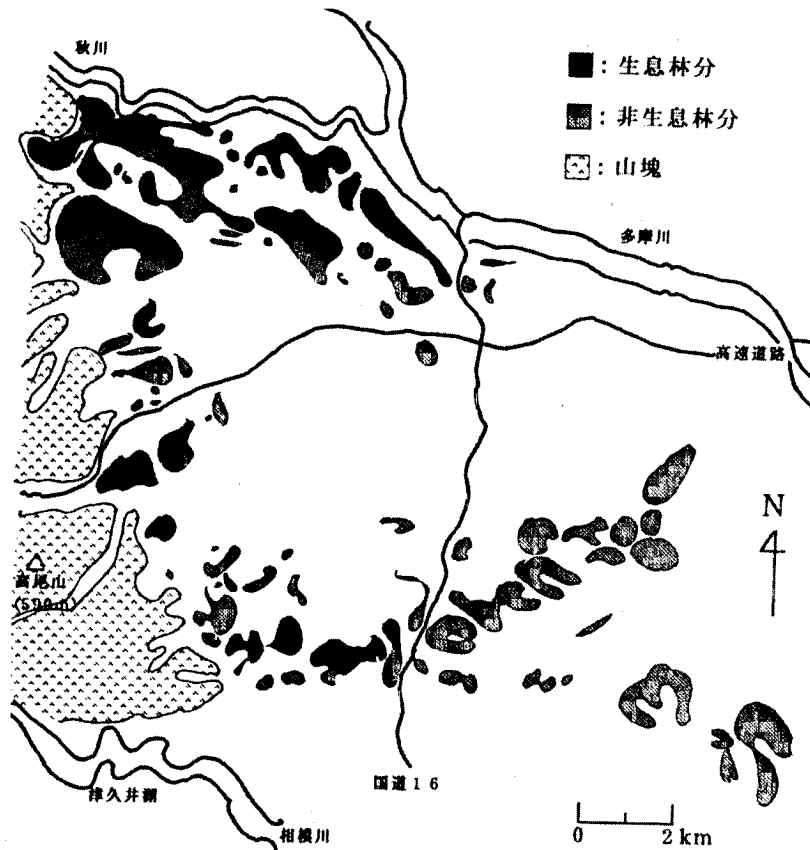


図 2. 1997 年におけるニホンリスの分布

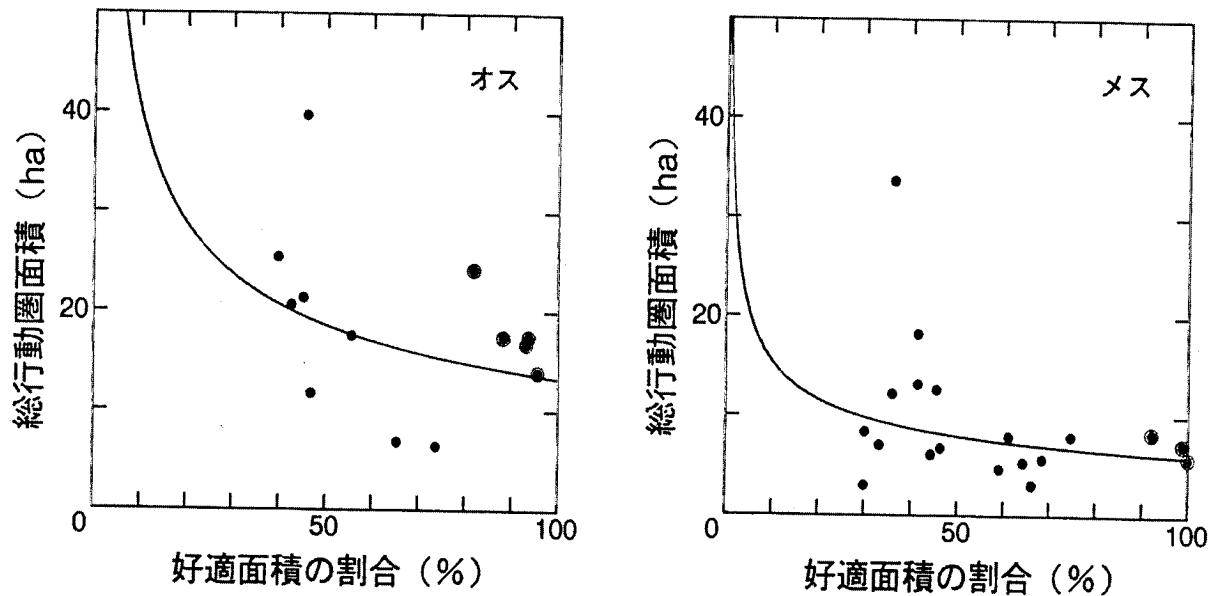


図 3. ニホンリスにとって好適な天然林の占める割合と行動圏面積の関わり

共通するタイプは3タイプあった。オスについてはMT、TFSGそれぞれ4タイプと5タイプが確認され違いは明確ではなかった。しかし、メスではMTでは4タイプ、TFSGでは2タイプであり、孤立したTFSGではメスの移動が阻害されている傾向が見られた。

(2) ツキノワグマにおける分断個体群と遺伝的多様性<sup>8)</sup>

地域個体群間の遺伝的多様性と個体群間の遺伝的距離を分析するために、マイクロサテライト DNA の分析を行った。東中国山地個体群（鳥取県、兵庫県 N = 24）を含め、西中国山地個体群（島根県 N = 52）、北近畿個体群（京都北西部 N = 66、京都北東部 N = 67）からの試料を対象に分析をおこなった。分析した 6 遺伝子座で観察された対立遺伝子の総数は西中国山地個体群で 12、東中国山地個体群で 15、京都北西部個体群で 20、京都北東部個体群で 25 であり、東方の個体群ほど多様性が高かった。京都北西部には他の個体群で観察されなかった固有の対立遺伝子はなく、すべて京都北東部個体群と共有していた。東西の 2 つの中国山地個体群もほとんどの対立遺伝子が京都北東部個体群と共通していたが、西中国山地個体群には 1 つ、東中国山地個体群は 2 つ、京都北東部個体群では観察されない固有の対立遺伝子が見つかった。ヘテロ接合度（観察値）については、ランダムイゼイション法<sup>5)</sup>を用いて検定を行ったところ、京都北東部個体群の平均値（0.445）は、他のいずれの個体群よりも有意に高かった（図 4）。また、西中国山地個体群と京都北西部個体群のヘテロ接合度の間には有意な差は見られなかったものの、東中国山地個体群は、京都北部の 2 個体群とは有意に異なる最も低い値を示した。

個体群間の遺伝的分化の程度を明らかにするために、観察されたマイクロサテライト DNA の遺伝子型の頻度分布の違いを個体群の間で比較し、個体群間で遺伝的距離 ( $F_{ST}$ ) をもとめ（図 4）、さらにアサインメント検定<sup>7)</sup>でそれぞれの個体が 6 つの遺伝子座の遺伝子型をもとに由来する個体群に正しく振り分けられるかどうか調べた。観察された遺伝子型の組成は、京都北部の隣接する 2 個体群間では 6 遺伝子座のうち 5 座において有意に異なることが明らかになったほか、どの個体群の組み合わせにおいても、多型性のある分析可能な座のほとんどにおいて有意に異なっていた。個体群間の遺伝的距離は、他の集団から孤立していると考えられている西中国山地個体群と他の 3 集団の間で特に高い遺伝的分化を示す値 ( $> 0.2$ ) が観察されたが、4 つの地域個体群

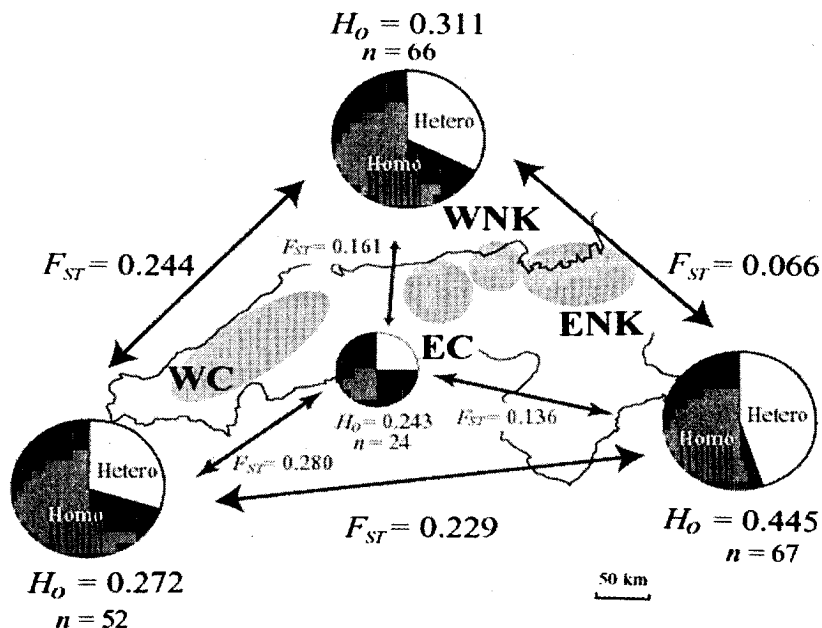


図 4. 西中国山地個体群(WC)・東中国山地個体群(EC)・京都北西部個体群(WNK)・京都北東部個体群(ENK)の平均ヘテロ接合度( $H_o$ )と各個体群間の遺伝的な距離( $F_{ST}$ )  $n$ はサンプル数を示す。文献 8)からの引用。

の間では、いずれもゼロとは有意に異なる遺伝的距離が確認された ( $P < 0.0001$ : 図4)。また、アサインメント検定の結果、全個体の63%、173個体は個体が捕獲された個体群に正しく割り振られたが、少数の個体は異なる個体群に割り振られた。だが、西中国山地個体群由来の個体は全て正しく割り振られており、また、東方の3つの個体群由来の個体が西中国山地個体群に割り振られることはなかった。6つの座における遺伝子頻度が個体群の間で類似することによる個体の振り分けの間違ひは、東方の3個体群の間に限られていた。

個体群の遺伝的組成を比較するためにミトコンドリア DNA の分析を行った。西中国山地個体群、東中国山地個体群、京都北西部個体群、京都北東部個体群、それぞれ 15、16、32、29 個体 (計 92 個体) において、ミトコンドリア DNA のなかで最も変異性が著しいコントロール領域の一部の塩基配列を PCR 法を用いて直接解読した。その結果、共通して解読した 355 塩基対の中に T (チミン) の繰り返し数の変異が見られたほか、10 カ所で塩基置換が見られ、計 17 種類のミトコンドリア DNA のタイプ (ハプロタイプ) が観察された。ハプロタイプは、西方の個体群からそれぞれ 4、3、8、7 種類観察され、京都北部の2つの個体群では3種類のタイプが共通していたが、東中国山地個体群と京都北西部個体群の間、東西の中国山地個体群の間ではそれぞれ1種類のみが共通し、西中国山地個体群と京都北部の2個体群の間には共通するタイプは存在しなかった。また、観察されたハプロタイプの組成は、どの個体群の組み合わせにおいても有意に異なっていた ( $P < 0.001$ )。

以上の結果を総合すると、マイクロサテライト DNA とミトコンドリア DNA という遺伝様式の異なる2つの DNA マーカーを用いて得られたどちらの結果からも、これら4つの個体群の間では遺伝的分化が進んでいることが示された。特に西中国山地個体群は、両マーカーに関して多様性が低く、しかも他と異なる特異的な遺伝的組成を持つことから、他からは孤立した小集団であるというこれまでの認識は遺伝学的に裏付けられたと言える。また、東中国山地個体群もミトコンドリア DNA に関して、隣接する京都北部の個体群に存在しないタイプの割合が高く、かつマイクロサテライト DNA に関して多様性が低く、東の隣接個体群とは異なる分化した遺伝的組成を示すことから、この個体群も孤立している可能性が高いと思われる。さらに京都北西部個体群も、北東部個体群と共通するミトコンドリア DNA のタイプをいくつか共有していたものの、全く異なる組成を示し、マイクロサテライト DNA に関して西中国山地個体群と同程度の低いヘテロ接合度を示し、京都北東部個体群とは遺伝子の組成が異なっていた。したがって、この集団も北東部個体群とは遺伝的交流が非常に少ない状態になっている可能性がある。

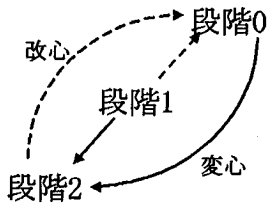
### (3) クマ類の存続可能性評価

個体群絶滅確率を推定するために、絶滅リスクの高い西中国地方個体群の過去と今後の変化予測を行った。現在の個体数調査結果の推定幅 ( $478 \pm 200$  頭) と個体群の人口学的ゆらぎを考慮して逆算すると、10年前の個体数は640~1,100頭の範囲にあったと推定された。10年前の個体数を推定する際に用いたパラメータにはまだ吟味が必要とはいえ、この10年間に減少が起きたことはほぼ間違ひがないと思われる。この個体数減少は毎年平均55頭という捕獲によってもたらされた。今後も同じレベルの捕獲が続くとすると早ければ7年で絶滅する可能性がある。これを過去10年の最低年間捕獲数である18頭にまで抑えれば10年後の個体数は個体数調査推定幅の下限278頭をとったとき140~270頭、上限678頭なら640~840頭と推測され、最悪でも半減で済むことになる。



クマの段階分けと変心・改心のモデル

	段階0	1	2	2(3)
人間を恐れる	○	×	○	×
被害を及ぼさない	○	○	×	×



シミュレーションの流れ

個体ベースモデル(IBM)

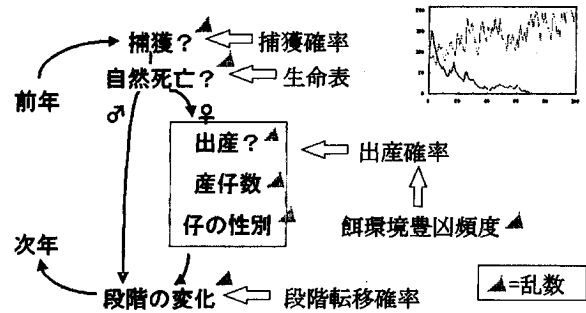


図5. クマの段階分けとシミュレーションの流れ

環境変動の影響を明らかにするために、孤立した下北半島個体群において人口学的確率性を排除したモデルによるシミュレーション実験を行った。これまでに、この個体群を対象としたシミュレーション実験を行ってきたが、そこでは人口学的確率性と環境の確率変動の両方を同時に働かせてきた。実際の個体群でもこれらのふたつの確率性の相乗効果によって個体群変動の程度が決まっているはずである。そのことを数値実験で検証するため、下北半島ツキノワグマ個体群モデルを元にして環境変動確率性だけが働くモデルを作って実験した。その結果、初期個体数 100 頭、環境収容力 200 頭のととき 100 年後の絶滅確率は 0.3% となった。人口学的確率性が働くときは 5% 強であるから、環境変動の確率性だけを考慮したのでは絶滅の危険性を的確に推定することができない、ということが明らかになった。

適切な保護管理法確立のために、渡島半島ヒグマ個体群を対象にシミュレーション実験を行った(図5)。ヒグマと人間との生態学的・社会学的関係についての知見を集約して問題点を整理すること、および、それに基づく数値シミュレーションによってヒグマ個体群の動態を分析することを目的とする。後者はさらに二種類のリスクの評価を目的として含んでおり、そのひとつはヒグマと人間との軋轢という社会的リスクがどのように変動するかを各種パラメータとの関係で予測すること、もうひとつはヒグマ個体群の絶滅リスクを評価することである。このモデルでは、人間との軋轢という観点からヒグマを3段階に分けて考えるとともに、各段階間の移行についてもこれまでの観察例をもとに規定した。段階0：人間に対して恐怖心を持ち、人間の産物や人間そのものを避けようとする性質を持っている「正常」なクマ。段階1：人間に対する無関心・不用意な行動をとり、しばしば人間の活動域へ侵入するクマ。亜成獣にみられがちである。段階2：繰り返し家畜・農作物食害をもたらすクマ(無防備の農地・蜂場・粗放な放牧から餌を得られると学習したクマで、有害駆除の対象とされる)。この個体群モデルに現在の道南地域のヒグマについて観測または推定された個体群パラメータ、および各段階別の個体数等を入力してシミュレーションを行うと、絶滅確率が許容できる値を超えているという結果が出た。また、いわゆる問題グマとみなされる段階2のクマの個体数割合も比較的高いレベルで推移し、200年後の個体群存続確率は64%しかなかった(図6)。この結果から、段階2の問題グマを生み出してしまうような人間側のクマへの対処法を改善し、段階2のクマの発生率を50%に低下させれば、個体群存続確率は99.7%に高まった(図7)。

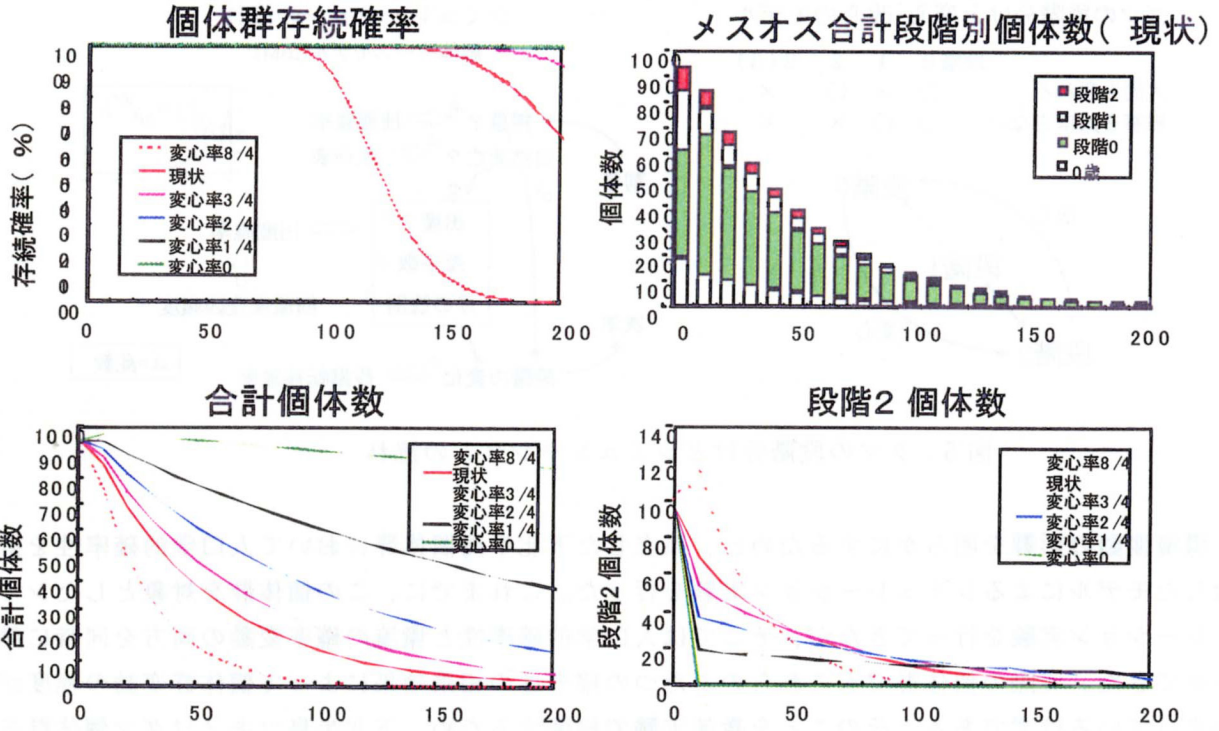


図6. 現状の問題グマ発生率のもとでのシミュレーション

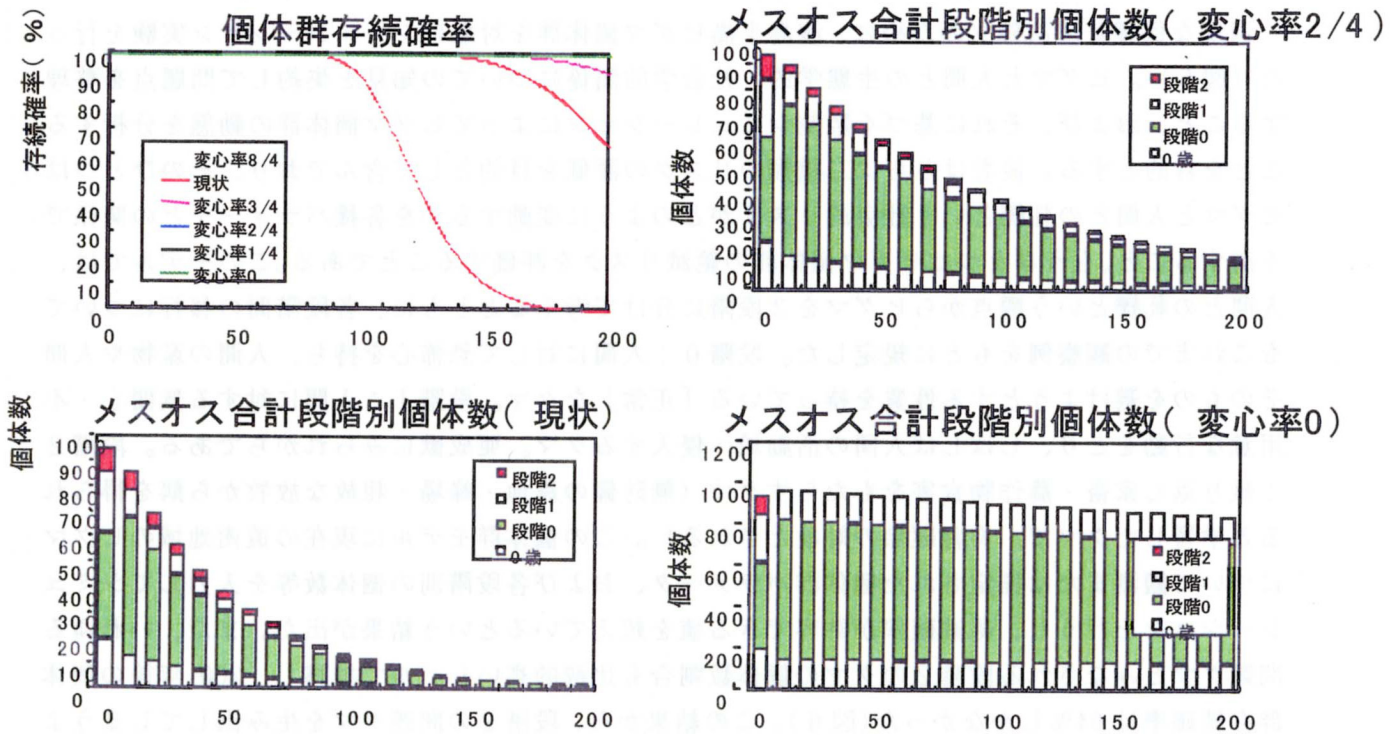


図7. 問題グマの発生率の違いによる個体数減少のシミュレーション

(4)クマゲラのメタ個体群と遺伝的多様性

キツツキ類の種の同定法の開発のため、クマゲラの死骸 1 個体、アオゲラの死体 2 個体、オオアカゲラの死体 2 個体、アカゲラの血液 1 3 個体から抽出した DNA を用いて、12SrRNA 部位の一部の塩基配列を解読した (EMBL/GENEBANK/DDBJ#AB080364- AB080369)。アカゲラでは 3 種類の異なる塩基配列が得られた。また、すでに報告されているセジロコゲラ<sup>16)</sup> (EMBL/ GeneBank/DDBJ#AF173562) とニワトリの mtDNA の塩基配列を加えて分子系統樹を作成した (図 8)。その結果、4 種間では 91% 以上のホモロジーで、セジロコゲラとは 89.6-91.0% のホモロジーが得られた。これらの塩基配列から種に特異的な部位を 3' 末端とするプライマーを作成し (表 1)、PCR を行ったところ、種特異的な増幅が見られた (図 9)。これらのプライマーセットは 4 種のキツツキ類の種の同定に有効であると考えられる。このため、食痕跡に残されたキツツキ類の糞などの種が不明のサンプルの種の特定により、クマゲラのサンプルの収集や生息の確認に利用可能である。東北地方で収集されたキツツキ類の糞 10 サンプル、羽 6 サンプル、くちばし 1 サンプルを使用し同定した結果、糞 7 サンプル、羽 6 サンプル、くちばし 1 サンプルがクマゲラであると同定された。

地域個体群の遺伝的多様性を明らかにするために、クマゲラと同定できた東北の 14 サンプルと北海道のクマゲラの剥製 5 サンプルから抽出した DNA をテンプレートとして、プライマー-Drm I (5' -CCAACAGTGAGCACAACC-3' )、Drm II (5' -GGTTTAAG ACAAGCATGG-3' ) をインナープライマー

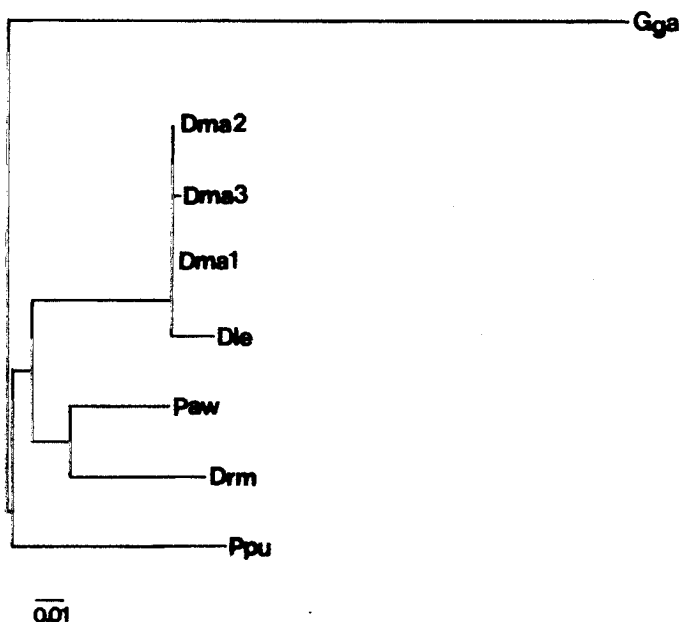


図 8. キツツキ類 5 種とニワトリ (ou tgroup) の 12SrRNA 部位の一部の塩基配列をもとにした近隣接合法による分子系統樹。Drm : クマゲラ、Paw : アオゲラ、Dle : オオアカゲラ、Dma : アカゲラ、Ppu : セジロコゲラ、Gga : ニワトリ

表 1. キツツキ類 4 種の 12SrRNA 部位の塩基配列から設計した種特異的プライマーセット

Pairs of primer	Species identified	PCR product (bp)
Drm I – Drm II 5'-CCAACAGTGGAGCACAACC-3' 5'-GGTTTAAGACAAGCATGG-3'	<i>Dryocopus martius</i>	176bp
Paw I – Paw II 5'-TCGATAACCCACGCTACACCCG-3' 5'-CTTCTGAGAGTTATTTTCAGGCT-3'	<i>Picus awokera</i>	212bp
Dle I – Dle II 5'-TGAGCACAACAGCCCCG-3' 5'-TTCTGAGGGCTGTTTCG-3'	<i>Dendrocopos leucotos</i>	122bp
Dma I – Dma II 5'-TGGGCTACATTTTCTGAA-3' 5'-GGGCCGACTTAAGACAGGT-3'	<i>Dendrocopos major</i>	108bp

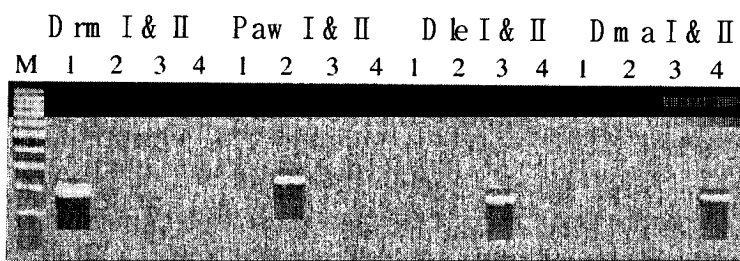


図 9. 4 種のキツツキにおける種特異的プライマーを使用した PCR の結果。  
Lane M :100-bp ladder marker、Lane# 1:クマゲラ、Lane# 2:アオゲラ  
Lane# 3:オオアカゲラ、Lane# 4:アカゲラ

として塩基配列を決定し、比較した。その結果、すべてのサンプル間で変異は見られなかった。これは 12SrRNA 部位が Cytb 部位や D-loop 部位より置換速度が遅いためと考えられる。このため、地域個体群の解析に適した D-loop 部位を解析中であるが、DNA の劣化が進んでいると考えられるため、D-loop 部位のような長い PCR 産物が得られていない。このため、微量のサンプル、古いサンプル、劣化したサンプル等の分析が可能であると考えられるマイクロサテライト分析を試みる必要があり、アカゲラの核 DNA のマイクロサテライトマーカーの開発を行った。開発されたマーカーがクマゲラに適用できるかを確認するため、東北地方 (3 サンプル) と北海道のクマゲラ (2 サンプル) について、95℃1 分、52℃30 秒、72℃1 分 30 サイクルで PCR を行い、5%のアガロースゲルで電気泳動を行ったところ、すべてのサンプルで増幅が確認された。また、北海道のサンプルではヘテロ接合しているものが見られたが、東北地方のサンプルでは見られなかった。このため、東北地方のクマゲラ個体群の遺伝的多様性が低い可能性が示唆されたが、サンプル数を増やしてさらに確認する必要がある。

#### (5) 日本産のウサギ科の遺伝的多様性

わが国のウサギ科 3 種と他地域の遺伝的距離を明らかにするために、mtDNA の 12SrRNA 領域 (710bp) の他の 7 属との比較結果を表 2 に示した。これによると、アマミノクロウサギ (*Pentalagus furnessi*) の塩基置換率は 6~13% と大きく、特にアジア産のスマトラウサギ *Nesolagus* sp.<sup>12)</sup> やアフリカ産のアカウサギ *Pronolagus* と遺伝的変異は大きい、アメリカ産メキシコウサギやワタオウサギとは小さかった。同様に、ニホンノウサギ (*Lepus brachyurus*) における置換率は 7~12% でアジア産のスマトラウサギやアフリカ産のアカウサギと大きな遺伝的変

表 2. ウサギ科 11 種における 12SrRNA 領域の塩基置換率 (種 1 はナキウサギ科)

Taxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>Ochotona hyperborea</i>	-											
2 <i>Brachylagus idahoensis</i>	0.203	-										
3 <i>Bunolagus monticularis</i>	0.210	0.102	-									
4 <i>Lepus brachyurus</i>	0.210	0.104	0.083	-								
5 <i>Lepus timidus</i>	0.197	0.100	0.081	0.026	-							
6 <i>Nesolagus</i> sp.	0.205	0.139	0.137	0.121	0.118	-						
7 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	0.201	0.099	0.094	0.076	0.072	0.131	-					
8 <i>Pentalagus furnessi</i>	0.186	0.087	0.084	0.078	0.073	0.130	0.076	-				
9 <i>Pronolagus crassicaudatus</i>	0.224	0.148	0.141	0.108	0.098	0.144	0.117	0.126	-			
10 <i>Romerolagus diazi</i>	0.195	0.099	0.075	0.078	0.070	0.123	0.078	0.064	0.119	-		
11 <i>Sylvilagus audubonii</i>	0.212	0.095	0.090	0.065	0.065	0.143	0.074	0.069	0.117	0.077	-	
12 <i>Sylvilagus floridanus</i>	0.182	0.078	0.091	0.065	0.067	0.130	0.065	0.057	0.110	0.065	0.045	-

Note : Kimura two-parameter distances with all substitutions (710 bp).

表 3. ノウサギ属 12 種におけるチトクロム b 領域の塩基置換率

Taxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>L. callotis</i>	-														
2 <i>L. californicus</i>	0.035	-													
3 <i>L. allenii</i>	0.039	0.024	-												
4 <i>L. americanus</i>	0.094	0.090	0.092	-											
5 <i>L. arcticus</i>	0.096	0.094	0.090	0.117	-										
6 <i>L. brachyurus</i> (Honshu1)	0.092	0.099	0.094	0.107	0.092	-									
7 <i>L. brachyurus</i> (Honshu2)	0.097	0.104	0.099	0.109	0.094	0.004	-								
8 <i>L. europaeus</i>	0.110	0.117	0.108	0.122	0.099	0.106	0.112	-							
9 <i>L. othus</i>	0.098	0.096	0.092	0.119	0.001	0.094	0.092	0.101	-						
10 <i>L. saxatilis</i>	0.094	0.097	0.090	0.110	0.101	0.095	0.101	0.108	0.103	-					
11 <i>L. timidus</i> (Hokkaido1)	0.099	0.097	0.094	0.115	0.011	0.098	0.103	0.101	0.012	0.099	-				
12 <i>L. timidus</i> (Hokkaido2)	0.099	0.097	0.094	0.115	0.012	0.096	0.101	0.103	0.014	0.099	0.001	-			
13 <i>L. timidus</i> (Russia)	0.094	0.096	0.089	0.119	0.001	0.094	0.096	0.101	0.003	0.103	0.012	0.014	-		
14 <i>L. timidus</i> (UK)	0.096	0.097	0.087	0.110	0.016	0.085	0.084	0.089	0.017	0.083	0.029	0.031	0.020	-	
15 <i>L. townsendii</i>	0.090	0.092	0.082	0.113	0.035	0.080	0.082	0.103	0.037	0.096	0.042	0.043	0.037	0.023	-

Note : Kimura two-parameter distances with all substitutions (671 bp).

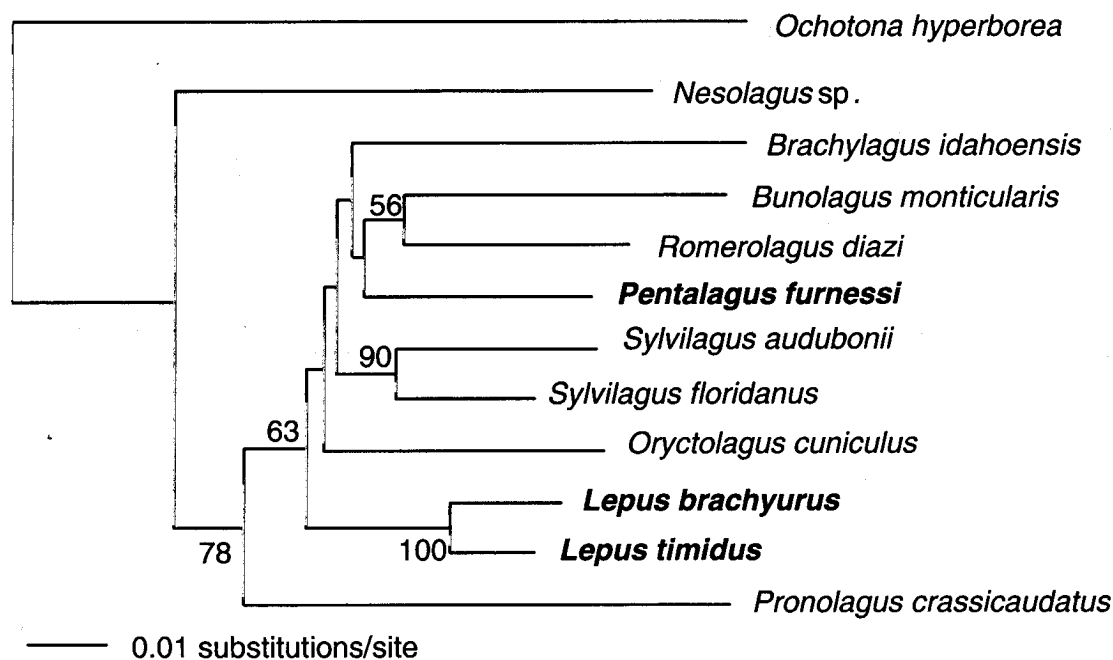


図10. 12S rRNA に基づく近隣結合法によるウサギ科9属の分子系統樹. 数値はブートストラップ値 (500回繰返し) が50%以上の分岐だけを表示する.

異を示したが、ワタオウサギ *Sylvilagus* とは小さかった。わが国のノウサギ属2種の mtDNA におけるチトクロム b 領域 (671bp) のノウサギ属の他 10 種との比較結果を表 3 に示した。ニホンノウサギの塩基置換率は 8~11% あり、同種内 (2 個体) では 0.4% であった。また、エゾユキウサギでは、9~12% あり、同種内 (2 個体) では 0.1% であった。アジア産のノウサギの遺伝的データはこれまでにほとんど発表されていないが、かつて形態的にニホンノウサギと同種とされた中国産ノウサギ *L. mandshuricus* は遺伝的には別種と考えられた<sup>17)</sup>。

わが国のウサギ科 3 種と他地域の遺伝的特性を明らかにするために、これらの結果を踏まえ、12S 領域を用いたウサギ科 9 属の分子系統樹を作成した (図 10)。アマミノクロウサギは古いタイプのウサギとグループ化され、ノウサギは比較的最近に分化したことが明らかになった。しかし、全体的にブートストラップ値は低く、枝長が短かった。これは、ウサギ科動物の種分化が短期間に一斉に適応放散し、古い系統にもかかわらず遺伝的な差が少ないウサギ科の特徴を表していると考えられる<sup>2)</sup>。これには、ニッチェが限られているということと、移動力が大きいということが原因と考えられる。ウサギ類は、1) 古いタイプのウサギ類、2) ノウサギ類、3) ユキウサギ類と 3 段階で系統の分化をしてきたといえる。それぞれ、短時間に形態や生活様式を変えながら、亜熱帯から、温帯、寒帯地域に向けて、地球規模で分化しながら、分布圏を拡大してきたと考えられる。日本列島 (奄美諸島から、本土 (九州、四国、本州) 及び北海道) のそれぞれの地域は、ウサギ科の分化にとって、重要な環境を提供してきたといえる。今後もそれぞれの地域の種で分化の可能性をもっており、これらの遺伝的多様性を保全することが重要である。

これらの遺伝的マーカーがわが国のウサギ科の遺伝的多様性を比較するために有効であることが明らかになったが、ウサギ科で開発されているマイクロサテライトマーカー<sup>11)</sup> と併用することによって、今後、地域個体群の遺伝的多様性の検討がより可能となり、種内変異やアジア大陸

の種間関係などを検討する必要がある。

## 5. 本研究により得られた成果

メタ個体群の構造解析と保護管理研究では、森林の孤立や環境変化が、生息に大きな影響を与えている現状が二ホンリスで明らかになった。その至近要因として、メスの生残率低下や移動分散の阻害が生じていること、さらにそれによって遺伝的多様性が減少している事実が明らかになった。また、分断化の進んだ個体群間で遺伝的分離と多様性低下の起きていることがツキノワグマの西日本個体群で明らかになった。中国山地の東西2つの個体群の孤立化が著しいことに加えて、これまで北近畿個体群の一部と考えられていた京都北西部の個体群は京都北東部の個体群とは遺伝的に分離しており、孤立が進んでいることが明らかになった。この結果は従来の認識の修正を迫るものであり、緊急に京都北西部個体群の保護的管理を行う必要があり、特に有害駆除や狩猟での捕獲圧の低減や生息環境の回復が求められる。遺伝的マーカー開発と適用研究では、PCR法による種の判定が可能になったため、糞から得られたサンプルのDNA分析への利用として生息の確認がクマゲラで利用可能になった。劣化サンプルに適用できるマイクロサテライトプライマーの開発にクマゲラで成功した。また、日本列島の地理的・地史的スケールで固有性を確立し、遺伝的多様性を維持してきたことが日本産のウサギで明らかになった。以上のように、希少野生動物保全研究にとって、生態学的、遺伝学的手法や絶滅リスク評価手法などを用いることによって、メタ個体群構造や生息実態が把握され、今後の必要な保全施策立案のための多くの知見が得られた。

## 6. 引用文献

- 1) Desjardins, P. and R. Morais (1990) Sequence and Gene Organization of the Chicken Mitochondrial Genome. *Journal of the Molecular Evolution* 212, 599-634.
- 2) Halanych, K. M. and T. J. Robinson (1999) Multiple substitutions affect the phylogenetic utility of cytochrome b and 12S rRNA data: Examining a rapid radiation in leporid (Lagomorpha) evolution. *J. Mol. Evol.* 48, 369-379.
- 3) Kitahara, E. et al. (2000) Polymorphic microsatellite DNA markers in the Asiatic black bear *Ursus thibetanus*. *Molecular Ecology* 9, 1661-1662.
- 4) Leeton, P., L. Christides, and M. Westerman (1993) Feathers from museum bird skins-A good source of DNA for phylogenetic studies. *Condor*, 95, 465-466.
- 5) Manly, B. F. J. (1997). *Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology*. London, Chapman & Hall.
- 6) 日本哺乳類学会 (1997) レッドデータ日本の哺乳類. 文一総合出版. pp279.
- 7) Paetkau, D. et al. (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4, 347-354.
- 8) Saitoh, T. et al. (2001) Genetic status of fragmented populations of the Asian black bear *Ursus thibetanus* in western Japan. *Population Ecology* 43, 221-227.
- 9) Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- 10) 自然環境研究センター (2000) 西中国地域主要生息地域のツキノワグマ生息調査報告書-平成 10・11 年度- . 34pp
- 11) Surridge, A. K., D. J. Bell, C. Rico, and G. M. Hewitt (1997) Polymorphic microsatellite loci in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and also amplified in other lagomorph species. *Animal Genetics* 28, 302-305.
- 12) Surridge, A. K., R. J. Timmins, G. M. Hewitt, and D. J. Bell (1999) Striped rabbits in Southeast Asia. *Nature* 400, 726.
- 13) Taberlet P. and J. Bouvet (1991) A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *Auk* 108, 959-960.
- 14) 田村典子 (1998) ニホンリスの植生選択. *日本生態学会誌* 48, 123-127.
- 15) 東京都環境保全局 (1998) 緑から自然への道筋、そして次世代へ. 東京都環境保全局. 226pp.
- 16) Van Tuinen, M., C. G. Sibley, and S. B. Hedges (2000) The early history of modern birds inferred from DNA sequences of nuclear and mitochondrial ribosomal genes. *Molecular Biology and Evolution* 17, 3, 451-457.
- 17) Yamada, F., M. Takagi, and H. Suzuki (2002) Molecular phylogeny of Japanese Leporidae, the Amami rabbit *Pentalagus furnessi*, the Japanese hare *Lepus brachyurus*, and the mountain hare *Lepus timidus*, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genes Genetic Systems*, 77.
- 18) 由井正敏、石井信夫 (1994) 林業と野生鳥獣との共存に向けて- 森林性鳥獣の生息環境保護管理-. 日本林業調査会、東京、280pp.

[国際共同研究等の状況]

IUCN・SSC 専門家グループと情報交換やサンプル交換などを行い、保護管理の検討を行った。

[研究成果の発表状況]

(1) 誌上発表 (学術誌・書籍)

- ① 堀野 真一：哺乳類科学、39, 1, 55-64(1999)  
「環境のゆらぎからみた人口学的 MVP」
- ② S. Horino and S. Miura : *Population Ecology*, 42, 37-44(2000)  
“A population viability analysis of a black bear population”
- ③ E. Kitahara, Y. Isagi, Y. Ishibashi, and T. Saitoh : *Molecular Ecology*, 9, 10, 1661-1662(2000)  
“Polymorphic microsatellite DNA markers in the Asiatic black bear *Ursus thibetanus*”
- ④ 三浦 慎悟・堀野 真一：生物科学 51, 4, 225-238 (1999)  
「ツキノワグマは何頭以上いなければならないか- 人口学から見た存続可能最少個体数(MVP)の試算-」
- ⑤ 中村充博：東北の森 科学の散歩道 pp.180-182 (2000)  
「東北にもいる日本最大のキツツキ」
- ⑥ T. Saitoh, Y. Ishibashi, H. Kanamori and E. Kitahara : *Population Ecology* 43, 3,



221-227(2001)

- “Genetic status of fragmented populations of the Asian black bear *Ursus thibetanus* in western Japan”
- ⑦ K. Sugimura, S. Sato, F. Yamada, S. Abe, H. Hirakawa and Y. Handa: *Oryx*, 34, 3, 198-206 (2000)
- “Distribution and abundance of the Amami rabbit *Pentalagus furnessi* in the Amami and Tokuno Islands, Japan”
- ⑧ N. Tamura, Y. Hashimoto and F. Hayashi: *Animal Behaviour* 58, 635-642 (1999)
- “Optimal distances for squirrels to transport and hoard walnuts”
- ⑨ 田村典子: 森林防疫、49, 2-6 (2000)
- 「都市近郊における森林の断片化とリスの生息分布」
- ⑩ 田村典子: 哺乳類科学、41, 137-148 (2001)
- 「ニホンリスの保全ガイドラインつくりに向けてⅡ海外におけるリス類の保全事例」
- ⑪ N. Tamura: *J. For. Res.*, 6, 187-190 (2001)
- “Walnut hoarding by the Japanese wood mouse, *Apodemus speciosus* Temminck”
- ⑫ F. Yamada, K. Sugimura, S. Abe and Y. Handa: *Tropics*, 10, 1, 87-92(2000)
- “Present status and conservation of the endangered Amami rabbit *Pentalagus furnessi*”
- ⑬ 山田文雄: 『農山漁村と生物多様性(宇田川武俊編)』家の光協会, 78-99 (2000)
- 「森林生態系と生物多様性」
- ⑭ F. Yamada, M. Takagi and H. Suzuki: *Genes Genetic Systems*, 77 (2002)
- “Molecular phylogeny of Japanese Leporidae, the Amami rabbit *Pentalagus furnessi*, the Japanese hare *Lepus brachyurus*, and the mountain hare *Lepus timidus*, inferred from mitochondrial DNA sequences”
- ⑮ 矢竹一穂、田村典子: 哺乳類科学、41, 149-157 (2001)
- 「ニホンリスの保全ガイドラインつくりに向けてⅢニホンリスの保全に関わる生態」
- (2) 口頭発表
- ① 堀野 眞一、間野 勉、松田 裕之、平川 浩文、釣賀 一二三、富沢 昌章: 日本哺乳類学会 1999 年度大会講演要旨集:66 (1999)
- 「リスクの評価と管理のための個体群シミュレーション」
- ② 中村充博、石橋靖幸、阿部周一: 2001 年度鳥学会講演要旨(2001)
- 「PCR 法によるキツキ類の種の同定-クマゲラ用 PCR プライマーの開発-」
- ③ T. Saitoh, Y. Ishibashi, H. Kanamori and E. Kitahara: 8th International Theriological Congress, Sun City. South Africa (2001)
- “Genetic status of fragmented populations of the Asiatic black bear *Ursus thibetanus* in western Japan”
- ④ T. Saitoh, Y. Ishibashi, H. Kanamori and E. Kitahara: 8th International Congress of Ecology, Seoul, Korea (2002) (8月発表予定)
- “Genetic status of Asian black bear populations in western Japan”
- ⑤ 田村典子: 日本哺乳類学会 (2000)

「植生環境の連続性/断片性がニホンリスの行動圏および生残率に与える影響」

⑥ N. Tamura and F. Hayashi : American Society of Mammalogists (2001)

“Effects of micro-scale habitat fragmentation on ranging behavior of the Japanese squirrel”

⑦ 田村典子、林文男：日本哺乳類学会（2001）

「ミトコンドリア DNA D-loop 領域解析によるニホンリス小集団の遺伝的多様性について」

⑧ 山田文雄、多加喜未可、鈴木仁：日本哺乳類学会 1998 年度大会講演要旨集：111(1998)

「アマミノクロウサギの分子系統学的位置づけ」

(3) 出願特許

なし

(4) 受賞等

なし

(5) 一般への公表・報道等

① 南海日々新聞（1999 年 1 月 1 日号）

② NHK テレビ番組（1999 年 1 月 4 日）

③ 東海テレビ番組（2002 年 1 月 27 日）

(6) その他成果の普及、政策的な寄与・貢献について

① 北海道のクマ保護管理計画立案にあたり、本研究のクマの存続可能性評価を適用し、今後の事業に貢献した。

② 環境省の希少野生動物保護増殖事業の検討において、本研究成果である希少種の遺伝的多様性の成果や生息現状を提示し、今後の事業計画作成に貢献した。

③ 今後、森林総合研究所広報誌等を通じ、成果の広報・普及に努める。