

F-3 希少野生動物の遺伝的多様性とその保存に関する研究

(1) 希少野生動物の遺伝的多様性に関する研究

① 希少野生動物の遺伝的多様性の現状把握

研究代表者 環境庁自然保護局野生生物課

(委託先)	財団法人自然環境研究センター	米田政明、石井信夫
	北海道大学	阿部周一、増田隆一
	石巻専修大学	玉手英利
	九州大学	小池裕子
	宮崎医科大学	土屋公幸

平成5-7年度合計予算額 21,515千円
(平成7年度予算額 7,764千円)

〔要旨〕本テーマでは、希少野生動物について、地域集団間および地域集団内における遺伝的多様性の現状を把握することにより、保全単位の明確化、保全上の重要性の評価、存続可能性の推定などを行う際の基礎とすることを目的として、日本版レッドデータブック掲載種のうち、国内において分布域が限定されていたり、地域変異が注目されるなどの特性を有する鳥類3種（シマフクロウ、タンチョウ、ライチョウ）と哺乳類6種・亜種（クビワオオコウモリ、オガサワラオオコウモリ、ツシマヤマネコ、イリオモテヤマネコ、ツシマジカ、ケラマジカ）を取り上げ、遺伝子にみられる地域集団間および地域集団内の変異を調べた。また一部の種については、他種との遺伝的類縁関係についても分析した。その結果、タンチョウでは、中国と釧路の両集団を塩基配列のタイプから明確に分けることはできないこと、近縁種との比較結果から両集団間の遺伝的差異は無視できるほど小さなものであることがなどが分かった。ヤマネコ類では、イリオモテヤマネコとツシマヤマネコが大陸のベンガルヤマネコと遺伝的にきわめて近縁であることが明らかになった。クビワオオコウモリについては亜種とされている島集団間の遺伝的変異は見出されなかった。シカ類では、ツシマジカ、ケラマジカともに他のニホンジカ地域集団にはみられない遺伝的特性を有していること、RADP法で得られた集団の遺伝的多様性指標は集団サイズと相関のあることなどが示唆された。シマフクロウ、ライチョウ、イリオモテヤマネコ、オオコウモリ類では地域集団内の変異は見出されなかった。さらに、以上の分析結果をそれぞれの対象種の生態学的特性（個体数、生息分布、地域間移動状況等）と関連付けることにより、今後の研究および保全の方向性について検討した。

〔キーワード〕希少野生動物、遺伝的多様性、シマフクロウ、タンチョウ、ヤマネコ類、オオコウモリ類、ニホンジカ

1. 調査の概要

本テーマでは、希少野生動物について、地域集団間および地域集団内における遺伝的多様性の現状を把握することにより、保全単位の明確化、保全上の重要性の評価、存続可能性の推定などを行う際の基礎とすることを目的とした。このため、日本版レッドデータブック掲載種のうち、国内において分布域が限定されていたり、地域変異が注目されるなどの特性を有する鳥類3種と哺乳類6種（亜種を含む）を取り上げ（表1）、遺伝子にみられる地域集団間および地域集団内の変異を調べた（表2）。また一部の種については、他種との遺伝的類縁関係についても分析した。

2. 調査方法

シマフクロウについては、道東地域からの合計25個体を対象とし、性染色体による性別判定のため標識装着の際に採取した皮膚片を培養して得られた繊維芽細胞、および末梢血からDNAを抽出し、ミトコンドリアDNAのうち、12S rRNA、チトクロームb、D-loop領域の塩基配列を解読した。また、CAくり返し配列を標的とするCAP-PCR DNAフィンガープリント法の開発を試みた。タンチョウを含むツル類11種、合計71個体（うちタンチョウ45個体）を対象として、末梢血、培養皮膚繊維芽細胞、および凍結保存肝臓などからDNAを抽出した。さらに、12S rRNAおよびチトクロームb遺伝子を分析し、またタンチョウの道東集団と釧路集団についてはD-loop領域の塩基配列解析を行った。ライチョウでは、落下した羽からDNAを抽出する方法を用いて、5つの地域集団に属する94サンプルについてミトコンドリアDNAのコントロール領域における塩基配列を解読した。ヤマネコ類については、イリオモテヤマネコ、ツシマヤマネコ、ベンガルヤマネコを対象として、臓器組織または血液からDNAを抽出し、ミトコンドリアDNAの12S rRNA、チトクロームb、D-loop領域の塩基配列を決定した。また、いくつかのマイクロサテライトについて対立遺伝子を検出し、そのヘテロ接合度を算出した。オオコウモリ類については、オガサワラオオコウモリとクビワオオコウモリを含む9種50個体を対象として、培養皮膚繊維芽細胞からDNAを抽出し、それぞれ遺伝様式の異なるチトクロームb、18S・28S rRNA、Y染色体上にあるSryの3つのミトコンドリアDNA領域について解析した。ニホンジカについては、筋肉、血液、生体試料を得ることが困難な集団では骨、皮からDNAを抽出し、チトクロームbの部分塩基配列を決定し、地域集団の遺伝的特異性を把握した。また、4地域集団についてRAPDマーカーを用いたDNA分析を行った。

3. 調査結果と考察

シマフクロウでは、解読したミトコンドリアDNAの塩基配列には、分析対象個体間で差異が認められなかった。しかし、これらのうち数個体において、今回用いたDNAフィンガープリント法により多形が認められた。ツル類では、タンチョウはクロヅル、ナベヅルと近縁であることが示された。また、D-loop領域の解析により、釧路集団では25個体から3つの、中国集団では20個体から9つのハプロタイプが認められたが、各集団内における変異が集団間の変異よりも大きく、塩基配列のタイプから両集団を明確に分けることはできなかった。また、近縁2種との比較により、タンチョウ両集団間の遺伝的差異は無視しうるほど小さなものであることが分かった。ライチョウでは、遺伝的多形を示す塩基配列を見出すことができず、遺伝的母集団の矮

小化が示唆された。ヤマネコ類ではミトコンドリアDNAの塩基配列から、イリオモテヤマネコおよびツシマヤマネコが、アジア大陸のベンガルヤマネコと遺伝的にきわめて近縁であることが明らかになり、日本産のヤマネコ2地域集団は分類学上はベンガルヤマネコの亜種に位置付けるのが妥当と考えられた。また、マイクロサテライト分析の結果、イリオモテヤマネコ集団のヘテロ接合度はきわめて低く、集団内の近交化により遺伝的多様性が減少していることが示唆された。オオコウモリ類では、クビワオオコウモリ、オガサワラオオコウモリの2種ともに種独自の遺伝子の分化が起きたものと推察された。しかし、南西諸島に広く分布するクビワオオコウモリでは、異なる亜種とされる島集団間に遺伝子変異を見出すことはできなかった。ニホンジカについては、ミトコンドリアDNAの分析結果から、ツシマジカ、ケラマジカともに他のニホンジカ地域集団とは異なる遺伝的特異性を保持している可能性が示唆された。また、4地域集団についてRAPDマーカーを用いたDNA分析を行った結果、地域集団の遺伝的多様性は五葉山、足寄、対馬、金華山の順に高く、これは推定個体群サイズと相関のあることが示唆された。以上の結果をそれぞれの対象種の生態学的特性（個体数、生息分布、地域間移動状況等）と関連付けることにより、今後の研究および保全の方向性について検討した。

4. 研究発表の状況

- 阿部周一 1993 タンチョウのミトコンドリアDNA解析. 第6回種保存委員会拡大会議経過報告, 社団法人日本動物園水族館協会: 118-121.
- Ishibashi, Y. S. Abe & M. C. Yoshida 1995 DNA fingerprinting of animal genomes by CA-repeat primed polymrase chain reaction. Japanese Journal of Genetics 70:75-78.
- 増田隆一 1994 食肉類におけるミトコンドリアDNAの塩基配列解析: PCR法の活用と分子系統への応用-イリオモテヤマネコおよびイタチ科を中心にして. 哺乳類科学34: 81-94.
- 増田隆一 1996 イリオモテヤマネコおよびツシマヤマネコの系統進化. 遺伝50: 11-12.
- Masuda, R. & M. C. Yoshida 1994 Two Japanese wildcats, the Tsushima cat and the Iriomote cat, show the same mitochondrial DNA lineage as the leopard cat *Felis bengalensis*. Zoological Science 11:655-659.
- Masuda, R., M. C. Yoshida, F. Shinyashiki & G. Bando 1994 Molecular phylogenetic status of the Iriomote cat *Felis iriomotensis*, inferred from mitochondrial DNA sequence analysis. Zoological Science 11:597-604.
- Tamate, H. & T. Tsuchiya 1995 Mitochondrial DNA polymorphisms in subspecies of the Japanese sika deer, *Cervus nippon*. Journal of Heredity 84:211-215.
- Tamate, H. et al. 1995 Assessment of genetic variations within populations of sika deer in Japan by analysis of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Zoological Science 12:669-673.

表1 調査対象種の分布と生息数

調査対象	分布域	生息概数
シマフクロウ	北海道東部	100
タンチョウ	北海道東部	600
ライチョウ	本州中部山岳	3000

ダイトウオオコウモリ	大東諸島	70
オガサワラオオコウモリ	小笠原諸島	500
イリオモテヤマネコ	西表島	100
ツシマヤマネコ	対馬	100
ケラマジカ	慶良間諸島	100
ツシマジカ	対馬	3000

表2 遺伝子分析結果のまとめ

調査対象	塩基配列の違い	
	地域集団内	地域集団間
シマフクロウ	-	
タンチョウ	+	+*
ライチョウ	-	-
クビワオオコウモリ	-	-
ヤマネコ類	-	+
ニホンジカ	+	+*

* 地域集団内の遺伝的多様性の違い

タンチョウ：中国＞釧路

ニホンジカ：五葉山＞足寄＞対馬＞金華山