

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

② 遺伝的多様性の減少機構の解明

研究代表者 農林水産省 森林総合研究所森林生物部森林動物科 三浦 慎悟

農林水産省 森林総合研究所

北海道支所 鳥獣研究室		斎藤 隆
東北支所 鳥獣研究室	大井 徹	中村 充博
森林生物部 森林動物科		三浦 慎悟
鳥獣生態研究室		山田 文雄
鳥獣管理研究室		堀野 眞一
昆虫生理研究室		山内 英男

(委託先)

京都大学霊長類研究所 変異研究部門 床武 孝義 川本 芳

平成5-7年度合計予算額 27,224千円  
(平成7年度予算額 8,861千円)

[要旨] 東北のニホンザルの中でも孤立化小規模化の著しいと考えられる秋田県と岩手県の個体群の分布についてアンケート調査を行った。岩手県では、五葉山地域の4ないし5群、秋田県では、白神山地と八幡平大深沢で群れの生息が確認された。孤立度の極めて高い五葉山個体群の群れを観察したところ、1991年から1995年の間、約20頭の個体数が維持されてきたことがわかった。群れの行動域は、五葉山東斜面から南斜面にかけての標高450-1300mの地帯で、面積は7.3km<sup>2</sup>であった。行動域の84.2%は林齢100年以上の天然林広葉樹林と針広混交林であった。

東北、関東、中部地方のニホンザル生息地24地点由来の計70個体についてmtDNAの変異を検索した。6塩基を認識する制限酵素28種類、7塩基を認識する制限酵素3種類を用いて血液ないしは皮膚から調製したDNAの切断パターンを電気泳動法で比較し、mtDNA変異の地理的分布にみられる特徴、地域個体群内の変異性、地域個体群間の分化について検討した。この結果、使用した31種類中19の制限酵素で個体変異が検出され、70個体は14種類のmtDNAタイプに分類でき、これらは2グループに大別できた。2グループの変異間には多数の塩基置換があり、東日本には母系の起源の大きく異なる2系統のニホンザルが分布すると予想された。

希少野生動物の保全の基礎データ収集に必要なDNA分析手法(マイクロサテライトDNAの1遺伝視座ごとの対立遺伝子決定法とmtDNAの塩基配列決定法)を開発し、モデルとしてエゾヤチネズミ個体群に適用した。この結果、遺伝的な空間構造をもつ場合があることが明らかになった。つまり、メスは血縁者同士が固まって分布していたのに対し、オスはランダムであった。オスの分散行動が近親交配を回避させ、ひいては遺伝的多様性の維持に大きな役割を果たしていた。

これまでに得られたツキノワグマの生活史特性とブナ、ミズナラの豊凶頻度をもとにシュミレーションによって人口学的MVPを試算した。この結果、孤立個体群については100頭がMVPであるこ

とが判明した。分布域が分断化されたツキノワグマの孤立個体群の保全管理の基本として、少なくとも100頭以上の集団サイズを維持することを目標にするべきと考えられた。また、複数集団の移動を想定してシュミレーションを行ったところ、隣接集団の存在が絶滅率を飛躍的に低下させる効果をもつことが明らかになった。

アマミノクロウサギの分布実態調査、行動調査および遺伝学的検討を行った。生息密度の比較的高い分布域は奄美大島で3地域、徳之島で2地域と少なく、個体群の断片化と縮小化傾向が進んでいた。2個体のウサギは谷部に巣穴を設け、巣穴を中心におよそ100~200m以内で行動していた。また、活動時間は夜間を中心とし、昼間も若干の活動のあることが明らかになった。捕獲したクロウサギとニホンノウサギのmtDNAのCyt-bと12SrRNA領域を比較した結果、両者の塩基配列のいくつかの部分に差が見られた。

クマゲラの遺伝学的なMarkerとしてmtDNAを適用するために、アカゲラの血液や羽軸、クマゲラの糞やクマゲラの剥製の羽軸からのDNAの抽出を行った。その結果、血液からのDNAの抽出はもちろん羽軸や糞からも抽出できることがわかった。分析部位として、12S rRNA遺伝子からcyt-b遺伝子をコードしている領域までを選定し、プライマーの作成を行い、アカゲラの血液から抽出したDNAを用いてPCR法によるmtDNAの増幅を行い、一部のDNAを増幅することができた。

[キーワード] 希少野生動物、遺伝的多様性、遺伝的距離、ハビタット、生存可能最小個体群サイズ、モデル

## 1. 序

野生動物個体群の絶滅には、生息地の分断化や孤立化、個体群サイズの減少、遺伝的多様性の減少など、さまざまな要因が関与している。この研究では、近年希少化の程度が著しいニホンザル（東北地方）、クマゲラ、アマミノクロウサギを対象に、遺伝的多様性と集団間の遺伝学的距離の現状、ならびに分布と個体数の変化とそれに関わる要因を検討し、把握する。また、遺伝的多様性の減少機構をヤチネズミの野外および実験個体群をモデルとしDNA分析手法を用いて解明する。さらに、大型哺乳類（ツキノワグマ）の生活史特性を総括し、人口学的な生存可能最小個体群（MVP）サイズをシュミレーションにより試算する。

## 2. 研究の成果

### 1) 東北地方のニホンザルの個体群動態と好適生息環境の解明

#### (1) はじめに

ニホンザルの生息数は、全国で数万頭のオーダーであると考えられるが、狩猟や有害鳥獣駆除、生息地の攪乱によって、個体群の分断、孤立化が進んでいる（大井、1994）。特に東北地方のニホンザルはその傾向が著しく（三戸、1992参照）、いわゆる日本版レッドデータブックでは、「保護に留意すべき地域個体群」として分類されている（環境庁、1991）。このように、東北のニホンザル個体群は、地域的な絶滅が懸念されているが、下北半島（佐井村教育委員会、1995など）、金華山（宮城のサル調査会、1988など）を除いて分布地域や個体群規模についての正確な現状把握は行われていない。そこで、本研究では、東北のニホンザルの中でも、保全上最も注意を払う

べき状態にあると推測される地域での現状把握を行い、個体群の存続可能性の客観的評価に備えること、この地域の個体群特性と好ましい生息環境についての知識を整理し保全のための指針を得ることを目的とした。

## (2) 調査地及び調査方法

### ① アンケートなどによる分布調査

個体群の孤立化小規模化が特に著しい岩手県と秋田県で（小金沢、1995参照）、アンケート調査を行い、群れの生息情報（1979年以降の状況）と集団間の遺伝子交流の担い手であるハナレザルの出没情報（1985年以降の状況）を収集した。情報は、アンケート記入者が直接目撃した情報と、記入者が人から聞いた情報とを区別した。分布情報は県内を5kmメッシュで分割した地図に整理した。

### ② 群れの直接観察による個体群規模と行動域の推定

五葉山地域個体群は、東北地方、北上山系唯一の個体群であり、岩手県の沿岸南部に存在する。全国的に見ても、海で隔てられているものを除くと、他個体群との距離が最も離れている地域個体群である（小金沢、1995参照）。アンケート調査と併せて現地踏査を行い、痕跡や群れの発見に努め、個体群の規模を推定した。特に、この地域個体群を構成する一群れ（大沢の群れ）については、群れの直接追跡により、群れサイズ、構成のカウント、行動域の把握を行った。平成5年11月から平成7年12月までの間、毎月2日間から10日間調査地を探索し、群れを追跡した。追跡時間は、5,217分にのぼり、雪上の足跡などの追跡データとも併せて行動域を推定した。行動域は、移動の軌跡の最外郭をなめらかな線で結んだ内側とした。平成7年2月には、生体捕獲が成功し、発信器装着後、放獣した。その後、この個体が群れと共に移動をしていることを確認したので、電波による位置探索をもとに群れの追跡、観察を行った。また、事業図、空中写真を基に行動域内の植生を分類した。

## (3) 結果と考察

### ① アンケートなどによる分布調査

岩手県でのアンケート回収率は、63%であり、140名から回答を得た。群れの分布情報は、7メッシュで得られた。連続するメッシュを一つの分布情報地域としてまとめると、3分布情報地域となった。1978年の調査時には、群れの分布の確実な地域は、3地域あったが、今回の調査では、五葉山地域だけが分布の確実な地域であった。五葉山地域（片羽山から五葉山にかけて）の5メッシュの分布情報地域には、4ないし5群の生息が確実である。この地域の群れ分布を1978年のもの（環境庁、1979）と比べると、1メッシュ拡大し、6メッシュ減少していた。それぞれの調査は精度が異なると考えられるので、分布地域が減少したとは単純に結論できないが、少なくとも大幅な分布拡大は認められなかった。残り2分布情報地域は、それぞれ1件の伝聞情報による不確かな情報である。また、アンケート以外の情報で北上市夏湯温泉と三陸町綾里埼に生息すると聞いたという情報があったがこれも未確認である。

秋田県でのアンケート回収率は、74%であり163名から回答を得た。群れの分布情報は24メッシュで得られ、5分布情報地域となった。1978年の調査時には、群れの分布の確実な地域は、4地域あったが、今回の調査では、2地域だけを確認できた。その一つの白神山地（20メッシュ）は、1978年と比べると10メッシュ増加が認められた。またもう一つの分布地域は八幡平大深沢で、1988年における目撃情報に基づいているが（1メッシュ）、1978年の調査では群れの生息の可能性

のある地域となっていた。残る3分布情報地域は、それぞれ1ないし2件の伝聞情報によるものであり、不確かな情報である。両県において1978年の調査で確認されたが、今回の調査では確認されなかった分布地域があった。実際に消滅した分布地域もあると考えられるが、聞き取りやアンケートでは調査精度が十分ではないということの他に、個体群規模が小さくなると人の目につきにくくなり、生息するかしないかという単純な情報すら得にくくなるということが考えられる。このような状況に陥った個体群の監視方法、体制をどうするか今後考えていく必要がある。

ハナレザルは、岩手、秋田両県とも、ほぼ全域的に出没しているが、連続的に市街地、農耕地が広がる北上盆地、横手盆地、秋田平野、男鹿半島と北秋田郡の奥羽山系に空白地帯が認められた。連続的に広がる農耕地、市街地はハナレザル移動の障害になっていると考えられるが、北秋田郡の奥羽山系については森林がほぼ連続しているので、単にハナレザルが人の目に触れにくいという理由が考えられる。ハナレザルは集団間の遺伝子交流の担い手であり、個体群の遺伝的多様性の維持に貢献していると考えられるが、このようなサルが非出自群に加入し繁殖に参加できるかどうか、孤立化からの時間経過とともに個体群の遺伝的多様性のあり方と大きく関わっている。今後、個体群の規模や孤立度が、個体群の遺伝的多様性にどう影響しているか、ハナレザルの分散に関わる行動様式とも関連づけて明らかにしていく必要がある。

#### ②群れの追跡観察による個体群規模と行動域の把握

五葉山地域個体群は、5メッシュ分の広がりを持ち、1979年以降の情報により、4ないし5群の分布が推定できた。その内、片羽山の1群の生息情報は、1989年が最後の目撃情報であることと、現在、生息地がカラマツ造林により広域的に攪乱されていることから、現在の生息は疑問である。その他の4群の情報は、少なくともここ5年内の目撃に基づくものであり、現在も確実に生息すると推測される。それぞれの群れサイズは、3群のものについておおよそ判明しているだけであるが（約20頭のもので2群、約10頭のもので1群）、他の2群も同程度と考えると総個体数は70-100頭と推測できる。

大沢の群れについては、1991年から1995年間の9回にわたる群れサイズと構成のカウント結果から、この間、約20頭の個体数が維持されてきたことがわかった。繁殖可能なメスは6頭であり、秋から冬にかけてのカウントでは、毎年2頭ないし3頭のアカンボウを目撃した。開葉期の林内は極端に視界が悪くなるので実際の出産数は不明であるが、秋、冬に得られたアカンボウのカウント数を出産数の最小値とすると、少なくとも0.33という出産率でこの期間推移してきたことになる。

1995年2月24日大船渡市上石橋国有林内で大沢の群れとともに行動していたオトナオス（推定年齢11才-12才）を麻酔銃捕獲した。この個体の体重は13.2kg、前胴長は518mm、胸囲は537mmであった。捕獲後、遺伝学的分析用に血液採取を行うとともに、首輪式の発信器を装着し放逐した。1995年2月から11月までの間、群れの行動域は、五葉山東斜面から南斜面にかけての標高450-1300mの地帯で、面積は7.3km<sup>2</sup>となった。行動域の84.2%は林令100年以上の天然林広葉樹林と針広混交林であった。積雪寒冷地の比較的攪乱を受けていない地域に生息する群れの1頭当たりの行動域面積は、8~24ha（Takasaki, 1981）であるが、大沢の群れでは32ha/頭、サルが利用していない可能性の高い幼齢造林地を除いても29ha/頭とやや大きめの値となった。理由は今のところ不明だが、他地域の行動域の植生との詳細な比較により明らかになるであろう。この大沢の群れを含めて、積雪寒冷地の群れの行動域の実測値がいくらか得られているが（Takasaki, 1981参照）、

このような行動域が、個体群ないし群れの存続に十分なものかどうか、今後、個体群動態にもとづいて評価する必要がある。

## 2) 東北地方のニホンザル地域個体群に関する遺伝学的評価

### (1) はじめに

ニホンザルはヒト以外の霊長類の北限に分布するわが国の固有種で、南は鹿児島県屋久島から北は青森県の津軽半島・下北半島まで分布している。GIS (geographic information system) コンピュータプログラムを利用したニホンザル地域個体群の孤立度の分析結果では、東北地方で個体群の孤立化が認められ、特に北部の青森、秋田、岩手の3県でこの傾向が強く、次いで他の関東以北の地域個体群でも同様の孤立化がうかがえる(小金沢、1995)。

一方、地域個体群の遺伝的変異性を比較した結果では、予想に反して分布地域の辺縁に位置する下北半島の個体群で高変異性が報告されている(Hayasaka et al., 1987; Nozawa et al., 1991)。また、ニホンザルの成立後に派生した分子変異が高頻度で存在する例も発見されている(Takenaka et al., 1985)。遺伝的変異性の減少は、繁殖に関与する個体サイズ減少の指標として動物の絶滅と関連づけてしばしば議論されている。しかし、現実に観察される集団の遺伝的変異性と孤立化ないしは絶滅の関連は少なくとも東北地方のニホンザルに関しては明瞭ではないように思える。集団サイズの急激な変動、特にボトルネックに代表される一時的なサイズの縮小は遺伝的多様性に強い影響を与える要因である(例えばNei et al., 1975)。しかし、サイズの回復にともなうその後の遺伝的変異性の上昇は新生突然変異の蓄積によるため一般にサイズ自体の変化に比べて長時間を要する。

本研究では、現在孤立化が著しい東北地方のニホンザル個体群の成立過程をミトコンドリアDNAを標識に検討した。従来の研究は核遺伝子にコードされた機能遺伝子を標識にニホンザルの遺伝的多様性や繁殖構造を検討しているが、ミトコンドリアDNAはその遺伝様式が核DNAと異なっている。遺伝標識としてミトコンドリアDNAが持つ特徴とは、1) 母性遺伝し父親のタイプは子孫へ伝わらない、2) 無性的に増殖し、核遺伝子のような組み換えがなく単純に突然変異を蓄積する、3) 進化速度が大きい、という諸点である。一方、この標識をニホンザルに適用する際には、さらに念頭におくべき特徴が2点ある。その第一は、社会構造の基本単位である群れが母系の集合である点で、雌雄の拡散のパターンが大きく異なる点である(female philopatry)。雌は終生出生群に留まるのが原則で、雄は成熟年齢に達すると出生群から周囲の群れへと移出してゆく。第二は群れが分裂するときには母系を単位とした家系の分割が起こり、雌の移住が群分裂と連動する点である(matrilineal group fission)。従って、ミトコンドリアDNA変異の地理的な分布は、群分裂の歴史を反映し、成体オスのミトコンドリアDNA変異は群れ間の移住を反映すると予想される。さらに、氷河期以後ニホンザルの祖先の分布地域の変遷も念頭に置く必要がある。最終氷河期の最寒冷期(今から約2万年前)、東北、北関東、中部山岳地帯にはサルが定住できる森は無かったと予想される(安田、1980; 和田、1994)。従って、ミトコンドリアDNA変異の分布は最終氷河期以後に東日本の分布地域が変化したことを反映し、ニホンザルの成立に関わる歴史を考える上で有効な情報を提供する可能性がある。

### (2) 材料および方法

地域差を比較するため、24地点(東北4地点、関東11地点、中部9地点)由来の70個体か

ら採取した血液ないしは皮膚試料からDNAを抽出し分析に供した。肝臓から別途精製したニホンザルのミトコンドリアDNAをdigoxigeninで標識してプローブとし、通常のSouthern法で制限酵素による切断パターンを比較した。使用した制限酵素は31種類で、切断の認識サイトが6塩基のものが28種類、7塩基のものが3種類であった。地域比較を行う際には、小金沢(1991, 1995)を参考に、生息地の地理的な分断状況をもとに地域個体群を分類した。この結果、調査した24地点は17地域に区分できた。集団内のミトコンドリアDNAの変異性を定量する際には、 $k$  = 分子タイプ(morph)の数、 $s$  = 異なった切断サイトの数、 $v$  = 異なった切断サイトの平均数、 $\pi$  = 平均塩基置換率(%)を用いた。

### (3) 結果

#### ① ミトコンドリアDNA変異

使用した31種類の制限酵素のうち、切断パターンに個体差が認められたものが19種類、個体差のなかったものが12種類あった。1酵素当たりでは最大5種類までの異なった分子タイプ(morph)が検出できた。変異を示した酵素の組み合わせからミトコンドリアDNA変異タイプ(ハプロタイプ)が14種類区別できた。1ハプロタイプ当たり検出できた切断サイトは平均78で、これはミトコンドリアDNA分子の約3%(約500塩基)の塩基置換をランダムに検索したことに匹敵する値であった。

#### ② 集団内の変異性

ア)地点の比較:同一地点にみられるミトコンドリアDNA変異を複数の個体について調査できた14地点についてまとめた。この結果、10地点では個体差がなく、4地点で2タイプ以上ありと判定できた。一方、個体差の認められた4地点のうち3地点では、成体オスが異なるタイプを示し、これを除外すると同一地点での個体差は認められなかった。従って、他所から移入の可能性のある個体を除くと、各地点のミトコンドリアDNAタイプは均一性がきわめて高く、地点を代表する分子タイプ(morph)は限られたものになると予想された。

イ)地域の比較:同一地域個体群にみられるミトコンドリアDNA変異を13地域個体群についてまとめた。この結果、13地域個体群のうち8地域個体群では個体変異が認められず、5地域個体群では個体差が検出された。一方、個体差のあった5地域個体群のうち3つでは異なるタイプを示した成体オスを除外すると、その地域個体群の個体差はなくなった。また、残りの2地域個体群では個体差は依然あるものの、その違いの程度は塩基置換率で0.05%~0.09%と小さい値になった。つまり、分布が連続したニホンザル地域個体群内でも特定の地点と同様に、ミトコンドリアDNAタイプの均一性は高いと予想された。

#### ③ 集団間の分化

ア)ミトコンドリアDNAタイプの比較:検出できた14種類のミトコンドリアDNAハプロタイプにみられる構造の類似性を比較するため、タイプ間のsequence divergenceを求め、クラスター分析を行った。UPGMA法によるクラスタリングの結果から、14種類は2つのグループに大別できる。相互の構造は大きく異なり、塩基置換率に換算すると平均で2.5%以上の相違と推定できた。このミトコンドリアDNAの構造の違いはMacaca属のサルの種間の違いに匹敵するほど大きい(Hayasaka et al., 1988)。またこの推定値は、置換速度を100万年当たり2~4%とすると、時間にして60~125万年の分岐時間に相当する値と見積もられる。つまり、東日本のニホンザル地域個体群の中には由来の異なる2種類の家系の子孫が分布していると判断できる。

酵素の切断サイトの類似性をもとに14種類のDNAタイプを節約法による無根系統樹で評価しても上記の結果と同様に2グループが区別できる。これらのグループ間には切断サイトにして20箇所以上の違い（塩基置換率相当で2.1%以上の違い）がある。一方、各グループ内では黒丸で示した個数だけ切断サイトの違いがあり、その範囲はグループ間に比べて小さい。つまり、UPGMA法に基づく分子構造の平均的な類似性からも、節約法によるタイプの類別からも同じ結論が得られ、東日本には母系の起源の大きく異なる2系統のニホンザルが分布すると考えられる。

イ)地方の特性比較：東日本の各地方の特性を次のようにまとめることができる。

《東北地方》：東北の調査地域は下北・津軽・白神・五葉山・飯豊の5つだが、北限青森の下北・津軽・白神には今のところタイプの違いは見出せず、しかもこのタイプは関東の日光と同一タイプである。五葉山に発見されたタイプは丹沢に近く、丹沢と房総、ないしは丹沢と下北・津軽・白神をつなぐ中間型と判定できる。一方、飯豊はもうひとつのグループに属するタイプであった。以上の結果は、母系の起源が異なる2系統のニホンザルが東北地方に分布することを示唆する。他地方と比べると、東北地方のニホンザルに現存するミトコンドリアDNA変異は関東地方の一部地域のものと同じタイプか、構造的に類似したタイプと考えられる。

《関東、伊豆地方》：関東にはミトコンドリアDNAタイプが異なる2系統のニホンザルが分布し、地域分化の傾向が顕著に認められる。2系統の現在の分布境界は東京と神奈川の間、および埼玉と栃木の間付近にあると予想できる。また、この地域分化のパターンは血液タンパク遺伝子などの核遺伝子を標識にしてみた地域分化のパターン（Nozawa et al., 1991）と異なっている。

《中部地方》：他地域からの移入が確認できた志賀高原のオスが例外的に別系統のミトコンドリアDNAタイプであった以外はすべて一方のミトコンドリアDNA系統ばかりが検出できた。各タイプは丹沢に検出されたタイプから放射状に分かれており、東北や関東の集団のように系統の大きく異なるタイプはこの地方では混在していない。

#### (4) 考察

ニホンザル地域個体群のミトコンドリアDNA変異を調査した結果、地点内および地域個体群内では著しくこの標識遺伝子の変異性が低いことが明らかになった。この原因としては、1) 家系を単位とした分裂で新しい群れが成立すること、ならびに2) 群れを構成する家系数が多くないか、多くても血縁的に近いこと、が考えられる。成体オスが異なるタイプを示す場合が散見できたが、こうしたオスは地域間の遺伝的交流に関与する移住個体である可能性がある。ミトコンドリアDNAの遺伝様式が母性遺伝であることを考えると、この遺伝標識はニホンザルのオスの拡散をモニターする道具として今後の研究で利用価値があろう。

東日本、特に関東を中心とするミトコンドリアDNA変異は2グループに分類できることが明らかになった。両グループ間の分子構造は大きく、また両者の中間型が現在の集団中に見つけにくいことから、この原因としては、1) ニホンザルの種分化の時期に関わる程度古いタイプが偶然に残存しているか、2) 氷河期に隔離されて分化し、その後の生息地域の拡大で分布を接するようになった可能性、が考えられよう。

東北地方に現存するミトコンドリアDNA変異は関東の一部地域の変異と類似性が高いことが予想された。この原因としては、後氷期の分布拡大以前に関東地方に存在したか、拡大開始前後に派生した変異である可能性が考えられる。これが事実であれば、氷河期以後に東北地方に達したニホンザルの分布地域変化はかなり早い速度で進行したと考えられる。少なくとも、現在ニホ

ンザルの分布北限に位置する3地域（下北・津軽・白神）が全く同一タイプであったことは、これらの地域個体群の成立が最近のことであることを支持し、氷河期に生存した先住ニホンザルがいた可能性に否定的な結果と考えられる。

タンパク多型から推定した場合、下北半島のニホンザルが分布辺縁地域にもかかわらず高い変異性を保持していること（Nozawa et al., 1991）や、ニホンザル固有の新生突然変異を高頻度で示すこと（Takenaka et al., 1985）が報告されているが、これらの結果も最近の分布域の拡大と関連付けて解釈する必要があるだろう。特に、分析の対象となっている個体群が下北半島のもので強いボトルネック効果を受けている可能性があることから、集団サイズの縮小から回復にともなう遺伝的変異性の変化が過渡的な高変異状態を呈している可能性が考えられよう（Kawamoto et al., 1988; Kondo et al., 1993）。また、遺伝的多様性の問題を議論する場合にも、単純にその大小を比較するだけでなく、そうした多様性の変化に関わる対象個体群の成立過程、ならびにその他の進化的背景までを考慮した評価が必要だと考えられる。

### 3) アマミノクロウサギの絶滅を防ぐための個体群およびハビタットに関する研究

#### (1) はじめに

アマミノクロウサギ *Pentalagus furnessi* は世界中で奄美大島（面積820km<sup>2</sup>）と徳之島（250km<sup>2</sup>）にだけ生息し、1963年に特別天然記念物、環境庁レッドデータブックの危急種に指定される希少野生動物である。本種は中新世中・後期（一千万年前）の化石プリオペンタラクス属 *Pliopentalagus* に直接起源すると考えられ、ウサギ科で最も原始的特徴を持つため1属1種として分類される（Corbet, 1983）。近年個体数減少が危惧されているが、これまで本種の保全生物学的研究はほとんど行われず、また具体的保護対策も実施されていない。本研究ではアマミノクロウサギを対象に、生息地の現況や遺伝的多様性の現状を把握し保全戦略策定のための基礎的資料を得ることを目的に、分布実態調査、捕獲個体の行動調査および遺伝学的検討を行った。

#### (2) 調査地および調査方法

調査地は奄美大島と徳之島を対象に、1994年から1996年の期間に発見した糞と直接観察に基づいて生息分布の実態を調べた。また、鹿児島県大島郡住用村川内地区の住用村有林58林班（標高300～400m、15年生広葉樹林）および鹿児島県天城町天城山国有林山くびり林道沿線（標高200～400m、60年生広葉樹林）を対象とした。捕獲はウサギ捕獲用トマホーク型などの罠を用い、餌としてさつまいも、リンゴなどを使用した。捕獲は奄美大島では1995年8～9月、11～12月、1996年1～2月、2月～3月の各期間に実施した。また、徳之島では1995年3月に実施した。捕獲個体は麻酔後外部計測を行い、DNA抽出用の血液と皮膚を採取後、首輪型発信機を装着し捕獲地点に放した。

遺伝学的検討を行う材料として、上記の捕獲行動調査地で捕獲された個体およびそれ以外の場所で捕獲された個体の耳介部先端部の3mm方形程度の皮膚組織を切断し、100%エタノールで保存した。さらに、林道上などで死体、骨格などの収集を行った。DNA抽出を行い、mtDNA領域の塩基配列をPCR法を用いて直接解読する方法を用いた。

#### (3) 結果および考察

##### ① 生息分布と推定生息数

クロウサギは奄美大島北部と南部の農耕地帯、都市部および加計呂麻島を除いた地域や徳之島



の天城岳、丹発山、井之川岳周辺部の地域のシイ、カシの原生林、二次林、海岸林などに生息していた。生息密度の比較的高い分布域は奄美大島で3地域、徳之島で2地域と少なく、個体群の断片化と縮小化傾向が進んでいた。奄美大島における本種の生息数は1975年の調査では約6,000頭（鹿児島県, 1977）と推定されたが、1985年の調査では奄美大島に最大3,750頭、また徳之島に500頭と推定されている（杉村乾, 1987）。生息数はかなり減少していると考えられるが、今後とも生息数トレンドの継続的な調査が必要である。

## ② 行動圏および活動性

奄美大島において5個体のアマミノクロウサギが捕獲されたが、徳之島では捕獲できなかった。奄美大島における捕獲個体のうち、4個体は成獣、1個体は幼獣で、また個体No. 1と4は行動調査地以外で捕獲された。このうちテレメトリー調査には2個体（個体No. 2, 3）が用いられた。2個体の生息地は10ha程度の面積内に隣接しあい、各個体は谷部に巣穴を設け、巣穴を中心におよそ100~200m以内で行動していた。また、活動時間は夜間を中心とし、昼間も若干の活動のあることが明らかになった。本調査地には捕獲された3個体以外にも数頭以上のクロウサギの生息が確認されている。アナウサギ類の行動圏はノウサギ類（10~300ha）と比較して0.5~3haと狭い（Gibb, 1990）。ウサギ類の社会構造はヨーロッパアナウサギでは優位な雄と数頭の雌、およびその周辺部に位置する若齢雄や劣位雄からなる順位性の強い社会グループを形成する。トウブワタウサギでは数頭の雌を核としそのまわりに順位性のある多数の雄からなる繁殖グループが形成される（Chapman and Ceballos, 1990）。現在のところ捕獲数が少なく資料も不十分であるが、本種の行動圏はアナウサギ類の行動圏程度と予想される。社会構造や繁殖個体群構成の解明は今後の課題である。

## ③ 遺伝的解析

本種の形態的特徴を見るためニホンノウサギの外部形態と比較すると、体重や頭胴長は両者でほぼ同じであるが、従来からの指摘どおりクロウサギの耳長や四肢長、後足長がかなり短いことが明らかになった。これらは走行能力の低い本種のウサギ科における原始的特徴といえる。本種の系統類縁を明らかにするため、捕獲したクロウサギとノウサギのmtDNAのCyt-bと12SrRNA領域を比較した結果、両者の塩基配列のいくつかの部分に差が見られた。さらに、林道上などで発見した死体サンプル（毛皮、骨格）を集めた結果、奄美大島産10個体、徳之島産3個体に達した。本種の類縁系統に関する研究はこれまで主に臼歯咬面パターンや形態的特徴に基き（Dawson, 1981; Corbet, 1983）、また核型研究も行われている（Van Der Loo et al., 1981）。今後、塩基置換速度を考慮した両種の分岐年代推定を行うとともに、クロウサギと類縁の比較的近いと考えられている種間比較を行い、本種の系統的な位置づけを行う必要がある。さらに、クロウサギの地域個体群内や個体群間の遺伝的多様性や分化状況を検討し、個体群サイズと遺伝的多様性の関係やテレメータデータを加えた個体群の断片化状況を解明する必要がある。

## 4) エゾヤチネズミの遺伝的多様性の変動に関するDNA分析手法の開発と野外個体群への応用（血縁個体の分布様式の解析と配偶システム）

### (1) はじめに

希少野生動物の保全にあたっては、個体群の単純なサイズ（個体数）ばかりでなく、その遺伝的な構成も把握する必要がある。なぜならば、近親個体ばかりからなる個体群は、血縁者間で繁

殖する可能性が高く、同じ個体数であっても、遺伝的に多様な個体群よりも絶滅する危険性は高いからである。また、個体群内に繁殖の成功度に偏りがある場合には、実際に次世代に子どもを残せる個体数（有効個体群サイズ）は見かけの個体数よりも少ない。このような個体群も、遺伝的な多様性を失いやすいために、繁殖成功度に偏りが無い個体群より絶滅に瀕する可能性は高いと考えられる。このように、野生動物の適正な保全には遺伝学的な分析を抜きには難しく、その重要性は、すでに指摘されて久しいが、実際の分析には遺伝学的なテクニックが障害となり、近年までほとんど手つかずの状態であった。しかし、最近のDNA分析技術の発展はめざましく、1990年代に入って、動物個体群の遺伝生態学的分析が盛んに試みられるようになった。

動物の生態におけるDNA分析では、多数の遺伝子座での変異を同時に検出するDNAフィンガープリント法がよく使われていた。この手法は一回の分析で多くの遺伝的特徴を検出できるために親子判定には有効であるが、分析には比較的多量のDNAを必要とすること、また対立遺伝子を特定できないといった短所を持つため（齊藤・石橋 1992 を参照）、十分な量のサンプルを繰り返し採取する事が困難な希少動物では適用できる範囲に限られ、また、集団遺伝学的な分析手法を適用しにくいために遺伝的多様性の検出には適した手法とはいえない。

この研究では微量のDNAでも分析が可能な手法（マイクロサテライトDNAの1遺伝子座ごとの対立遺伝子決定法とミトコンドリアDNA（mtDNA）の塩基配列決定法）を開発し、これらの手法を野外個体群に適用することを目的とした。マイクロサテライトDNAは変異性に富む核内の遺伝子マーカーであり、ミトコンドリアDNAは母系遺伝する核外のDNAで進化速度が早く、やはり変異に富むことが知られている。いずれも微量のサンプルから特定のDNA領域をPCR法によって、人工的に増幅できるので、希少野生動物の保全を実際に計るためには必要不可欠な手法である。手法の開発と野外集団への適用を想定したモデル実験にはサンプルが容易に手に入り、基本的な生態が明らかとなっているエゾヤチネズミ（*Clethrionomys rufocanus*）を用いた。

エゾヤチネズミは森林性の小型の齧歯類で、その個体数は年次的に大きく変動することが知られている（Saitoh 1987）。また、比較的安定した個体群から、極端な低密度から大発生まで周期的に大変動する個体群まで、地域的に変動パターンも変異に富んでいる（Bjrnstad et al. in press）。このような個体群変動の特徴は、個体数の変動と遺伝的な多様性の変化に関する研究材料として適している。なお、DNAの分析は、北海道大学理学部動物染色体研究施設の協力を得て行った。

## （2） 材料と方法

実験には札幌市あるいはその近郊の当別町の防風林に生息していた自然個体群から採取したエゾヤチネズミとこれらを実験室内で繁殖させた第1世代を用いた。野外実験では標識再捕獲法を採用し、捕獲にはシャーマンタイプの生け捕りワナを使った。ゲノムDNAは個体識別のために切除した指先2本からフェノール/クロロフォルム法によって抽出した。

### ① マイクロサテライトDNAの分析

エゾヤチネズミのゲノムDNAを制限酵素（Sau3AI）で消化し、クローニングベクターに組み込み、オーダードアレイ法（Armour et al. 1990）などによって単離した後、マイクロサテライトDNA（CA繰り返し配列）とその周辺領域の塩基配列を degenerate sequencing primers を使って決定した（Browne & Litt 1992）。この塩基配列データを基にPCR法でDNAを増幅させるためのプライマーを作成した。PCR法によるマイクロサテライトDNAの増幅にはパーキンエルマー社のサーマル

サイクラーを使用した（反応液組成や反応条件などの詳細は Ishibashi et al. 1995 を参照）。遺伝子型は、増幅したDNAをポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、銀染色を行い決定した。

#### ② ミトコンドリアDNAの分析

ミトコンドリアDNAの最も変異に富む領域として知られるD-loop領域 (Vigilant et al. 1989) とその周辺領域の塩基配列を主に2つのプライマー、L15926(5'-TCAAAGCTTACACCAGTCTTGTAAACC-3') とH00651(5'-TAACTGCAGAAGGCTAGGACCAAACTT-3'; Kocher et al. 1989; Thomas et al. 1990) を使って決定した。この結果を基に新たなプライマー (Hpr-2; 5'-AAATGTGGGTGGGGATAG-3') を合成し、これをシーケンシングプライマーとして使用して、実験個体のミトコンドリアDNAのD-loop領域の塩基配列 (約300 bp) を直接決定した。

#### ③ 自然個体群における行動圏の観察

個体群内の個体の分布を調べるために当別町の防風林内で1992年5月に標識再捕獲調査を行った。約1ヘクタール (70 x 150) の調査地に10 m ごとに生け捕りワナを仕掛け、捕獲個体の個体番号、性、体重、繁殖状態などを記録した後に捕獲地点で解放した。個体識別には指切り法を用い、切除した指先は実験室に持ち帰りDNA分析用のサンプルとした。行動圏の分布を表す指標として行動圏の幾何学的重心を意味する活動中心を採用した (Hayne 1949)。なお、この調査時期は繁殖の開始直後で、多くのメスは妊娠中か授乳可能の状態であった。

#### ④ 実験個体群における移動・分散行動の観察

個体群内の個体の分布を決めるのは出生地点からの分散行動である。その基本的な特徴を把握するため、実験柵を使った野外実験の結果を分析した。野外実験柵は北海道大学農学部苫小牧地方演習林の広葉樹林の中に設置してあるものを使用した。この実験柵の大きさは2.1ヘクタール (100 x 210 m) で行動圏が10~30 m のエゾヤチネズミの移動を調べるには十分の広さであった。生け捕りワナを10 m ごとに210地点において、2週間ごとに2年間余り調査した。このような高頻度の調査は、繁殖の過程を個体ごとに把握することを可能にし、巣立ちして間もない個体も数多く捕獲できた。巣立ち直後の幼体が捕れた場所をその個体の出生地点とし、追跡調査の結果わかった繁殖場所を定着地点として、出生地点からの分散距離を得た。

### (3) 結果

#### ① マイクロサテライトDNAとミトコンドリアDNAの分析

当別町の調査地内に生息していた成体81個体 (オス39; メス42) のマイクロサテライトDNAを5組のプライマーで分析した結果、各遺伝子座で9~25の多数の対立遺伝子を確認した。このような高い変異性は親子を判定する場合に有利な特徴で、対立遺伝子を世代間で比較することによって、高い確率で親子を判定することができる。また、多くの対立遺伝子が2塩基間隔で変異している結果は繰り返し配列の数に変異があることを示唆していた (Hughes & Queller 1993)。

集団の遺伝的な多様性を表す指数であるヘテロ接合体頻度を各遺伝子座ごとに求めると、1遺伝子座 (No. 3) を除いてハーディ・ワインベルグの平衡から期待される値とよく一致していた。

この平衡が成立するには、一般に任意交配集団であること、その遺伝子座が進化的に中立であること (自然選択が働かない) などの条件を満たす必要がある。多くの遺伝子座でヘテロ接合体頻度がハーディ・ワインベルグの平衡の値とよく一致していた事実は、この個体群が任意交配集団であることを示唆しており、第3遺伝子座での期待値からの大きな歪みはこの遺伝子座特有の現象だと考えられた。

分析した81個体のミトコンドリアDNAから13の変異型（ハプロタイプ）を確認した。各ハプロタイプの個体数にはバラツキがあり、もっとも多いハプロタイプは26個体に見られ、もっとも少ないものは1個体のみで見られた。

#### ② 自然個体群における行動圏の分布

エゾヤチネズミはオス、メスともに調査地全体に分布しており、表面上は個体群に明瞭な構造は認められなかった。各個体のミトコンドリアDNAのハプロタイプを調査地上におとしたが、結果は錯綜しており、特定のハプロタイプが特定の場所に集中するなどの生物学的意味を読みとることは難しかった。

そこで、隣接する行動圏を持つ2個体のハプロタイプが同じかどうかに着目して分析してみた。隣り合った個体メス間では、同じハプロタイプのミトコンドリアDNAを持つ頻度が、ランダムに2個体を取り出したと仮定して求めた期待値よりも有意に高かった。一方、この値はオス間、オス-メス間ではランダムな組み合わせと変わらなかった。この結果は、メスは同じ母系列の血縁者同士が隣接して分布する傾向を持つのに対し、オスは遺伝的に偏りのない分布をしていたこと示し、おそらくはオスの遺伝的に偏りのない分布のために隣接したオスとメスの組み合わせにおいても遺伝的な偏りはないことを意味している。

上の結果をさらに具体的に把握するために、マイクロサテライトDNAの分析結果を基に、各個体間の血縁度を求めた。血縁度算出は Queller & Goodnight (1989) に従った。その結果、メスでは母系を共有する血縁個体が集団を作る場合があることが明らかになった。図-3に二つの典型的なタイプを示した。ハプロタイプ3の個体（メス）は調査地の一角にしか見られず、このうち6個体の血縁度は0.376～0.613と非常に高い。この血縁度は0.5は親子、兄弟（姉妹）などにほぼ対応するので、これらの個体は調査前年の秋に繁殖したメスとその娘が大きく分散せずに留まって、越冬したためであろうと考えられた。また、ハプロタイプ2の個体（メス）は調査地のほぼ全体に分布しており、個体間の関係はより複雑であった。しかし、ハプロタイプ3の個体と同様に血縁度の高い個体（0.310～0.715）が集中して分布する一角があった。ハプロタイプ2の個体が調査地のほぼ全体に分布しているように見えるのは、ハプロタイプ3の個体のように前年の秋に繁殖したメスとその娘がすべて越冬地に留まるのではなく、家族のうちの一部が分散したためであろうと考えられた。

#### ③ 実験個体群における移動・分散行動

個体の分布様式を決定する移動・分散行動をオス-メス間で比較した。明らかに、オスの方が出生地から遠くまで分散している個体が多い。行動圏の2倍の距離を移動した個体を分散個体と考えると（行動圏の平均的な大きさを長径で示すとオスで24 m、メスで18 mである）、オスでは約半数（49.6%）の個体が分散個体となる。一方、メスはほとんどの個体が出生地付近に留まり、分散個体の割合は22%だった。

#### (4) 考察

この研究で開発したDNA分析手法はDNAを増幅する技術（PCR法）を採用しているため、ごく少量の組織断片を動物個体から採取すれば分析可能である。このため、個体を大きく傷めることなくDNAサンプルを得ることができるため、生態調査と平行して遺伝的な分析ができる。この野外実験でも、個体識別用に採取した指先から必要量のDNAを抽出し、行動圏の観察などの生態学的な調査も平行して行えた。希少野生動物の保全に関わる基礎的知見には生態学と遺伝学両方にまたがる

データの収集が不可欠なので、この研究で確認された手法の有効性は今後の保全生物学で主流となる研究手法の方向性を示すものといえよう。ただし、このようなDNA分析では、個体レベルにも変異が見られる非常に突然変異率の高い領域を扱うので、データの分析の際には十分な注意が必要である。この研究においても、マイクロサテライトDNAの第3遺伝子座で null allele の存在が明らかになった。これは分析の対象領域ばかりでなく、プライマーに対応する領域にも変異が見られたためであった。もし、ここで十分な検討なく、第3遺伝子座の分析結果を受け入れたとするなら誤った生物学的解釈をすることになるのである。

この研究で開発した二つのDNA分析手法によって、生息地全体に一様（あるいはランダム）に分布しているように見える個体群であっても、遺伝的な空間構造を持つ場合があることが明らかになった。つまり、エゾヤチネズミの行動圏はほぼ一様に分布しているのだが、遺伝学的にはメスは血縁者同士が固まって分布しているのである。このような傾向はオスでは見られなかった。これは、オスが出生地から大きく分散するのに対し、多くのメスは出生地に留まるため、母娘、姉妹は隣接した行動圏を持ちやすくなるためであった。

一般に、近親個体同士での集団化は遺伝的多様性の維持の点からするとプラスとは言えない。ある地域における血縁個体だけの集積は近親交配などによって遺伝的多様性を失う方向に作用する。この研究では、血縁個体の集団化はメスだけに起こり、オスは大きな分散（おそらくは無方向的）によって、遺伝的に偏りのない分布をしていた。この結果、オスとメスの組み合わせも遺伝的に偏りのないものとなり、任意交配集団を成立させていると考えられた。つまり、オスの分散行動が近親交配を回避させ、ひいては遺伝的な多様性に維持に大きな役割を果たしていることがわかる。

哺乳類では約70%の種で出生地から分散していくのはオスに偏るといわれている（Greenwood 1983）。また、オスの分散行動は近親交配回避に有効であるとの報告もある（Hoogland 1982; Foltz & Hoogland 1983）。エゾヤチネズミにおいても分散行動は繁殖の開始との関係があると指摘されており（Saitoh 1995）、エゾヤチネズミを用いたこのモデル実験は哺乳類に一般に見られる特徴を十分に反映していると考えられる。つまり、個体群の存続に必要な遺伝的な多様性を維持するメカニズムの一つとしてオスの出生地からの分散が重要であること、この分散行動を制限するような生息地の分断化などは近親交配の促進を通じて個体群の遺伝的な劣化に作用し、絶滅の危険性を増大させると考えられるのである。

オスの分散による近親交配の回避、また、近親交配の回避を通じての遺伝的な多様性の維持という多くの哺乳類に見られるであろうこの関係を明らかにした研究例はまだ少ない。まして、分散行動の制限が遺伝的多様性の変化に与える影響を野外集団で定量的に測定した研究はまだ知られていない。これらの要因に加えて、一夫多妻制が多い哺乳類では（Kleiman 1977）、少数のオスによるメスの占有が遺伝的な多様性の減少をもたらす原因ともなる；キタゾウアザラシに見られるような極端な例では平均して30頭に1頭しか次世代に子どもを残していない（Leboeuf & Reiter 1988）。今後は、遺伝的な多様性の変化のメカニズムを探る中で分散行動や配偶システムが与える影響を定量的に評価していく必要がある。

## 5) 大型哺乳類の存続可能最小個体群サイズ(MVP)の試算

(1) はじめに、MVPとはなにか

狩猟や有害駆除による捕獲と生息地の急速な減少によってツキノワグマの個体数は各地で減少の一途をたどり、現在大型哺乳類ではもっとも絶滅の危機に瀕しているといわれている。とりわけ、日本版レッドデータブックにも記載されているように、中国、四国、九州、紀伊半島などでは、生息地の分断と孤立化が進み、生息数はそれぞれ100頭に満たないと推定されている。果たしてこのような孤立個体群は、今後も安定的に存続できるのだろうか。そして、存続できるためには少なくとも何頭以上が必要なのだろうか。それがこの研究のテーマである。

孤立した集団が、さまざまな要因から脅威を受けつつも、一定の期間（たとえば100年間）、一定の確率（たとえば95%）以上で存続できる個体数は、「存続可能最小個体群サイズ（Minimum Viable Population Size:略してMVP）」と呼ばれる。このサイズを求めることがいま保全生物学の重要な課題となっている。とくにツキノワグマは森林生態系の食物連鎖の頂点に立つ「キーストーン・スピーシス」であるから、このサイズを求めることは科学的な管理基準を提供する上で積極的な意義がある。また、それはほかの野生生物や生態系の保全にも確実に繋がっている。

MVPの算定には通常、次元の異なる2つの生物学的要因に注目する。1つは、集団の遺伝的多様性の減少で、それは個体数の減少にともなう近親交配の増加によってもたらされると考えられている。多くの動物では近親交配が続くと奇形や死産、繁殖率の低下が起こる（近交弱勢という）ことが知られている。だから、こうしたことが起こらない一定の遺伝的多様性をもった集団サイズを見積もることができる。しかしこのようなアプローチは、遺伝子レベルの分析が難しいために、哺乳類ではいまのところできていない。今後の大きな課題である。

もう1つは、野生動物の多くは、生息環境の変化（これを環境のゆらぎという）や偶然によって、生存率や繁殖率、産子数（子供の数）、性比などの人口学的特性が変化し、個体数が変動することが知られている。たとえば、子供の性比は通常1:1であるが、それは確率に支配されてから、個体数が少なければ一方の性ばかりが連続して生まれ、絶滅する可能性がある。だから、こうした確率に支配される不安定な状況なかで、絶滅しないような最小限の個体数を見積もる必要がある。これを人口学的MVPという。環境と個体数の変化に打ち勝って安定的に存続できるような個体数とは何頭なのだろうか。ツキノワグマを対象に試算してみよう。

## (2)ツキノワグマの人口学的MVPの算定法

ツキノワグマの人口学的特性、とくに初産齢、繁殖率、産子数といった繁殖特性は、秋のフラッシュの結実状況に大きく左右されていると判断される。すなわち、ブナ、ミズナラ豊作年の翌春では、初産齢が早くなり、出産率が増加し、産子数が多くなるのに対し、凶作年では初産齢が遅れ、出産率が低下し、産子数が減少すると考えられる。クロクマでは、出産率はベリーやオークの豊凶と強い関係があり（Roger 1976）、堅果類の豊作年の翌年では発情年齢が低下し、出産率が増加し、子供の生存率が増加するのに対し、不作年では逆の傾向を示すことが知られている（Eiler et al. 1989）。ツキノワグマでは、この関係を裏付ける資料は今のところ少ないが、繁殖率に年変動が見られることはこれまでに各地で報告されてきた（花井 1983ほか）。米田（1991）は、サンプル数は少ないが、堅果類の豊作年では凶作年に比べ出産率が著しく増加したと述べている。また、佐々木・伊藤（1983）は、繁殖能力の獲得が年齢よりも体重に依存し、一定の体重を越えた個体は3歳から繁殖することを明らかにした。このことは豊作年での体重増加が初産齢の低下や出産率の増加をもたらすことを示唆している。そこで、これまでに得られたツキノワグマの繁殖特性をまとめると、初産齢は3～5歳、成獣（4歳以上）の出産率は30～80%、産子

数は1～3頭(平均1.8頭)の変動幅が報告されている(宮尾 1989、花井 1975、米田 1991)ことから、これらの特性値が、堅果の豊凶の各年において一定の値で変動すると仮定しよう。

一方、ブナ、ミズナラの豊凶頻度についてはこれまで各地で詳しい資料が蓄積されてきた(橋詰・山本 1974, Imada et al. 1990, Kanazawa 1982, 櫻村 1952, 前田 1988)。これらをまとめると、ブナの豊作年はおよそ4～6年の周期をもち、豊作年が連続することはないこと、ミズナラの豊作年は1～6年に1度で、明瞭な周期性はないことなどが知られている。そこで、前田(1988)とImadaら(1990)の頻度をもとに、ブナ、ミズナラの豊作年をそれぞれ10.5年、5.3年に1回、平作年をそれぞれ4.8年と2.0年に1回、残りを凶作年と仮定することにした。

また、ツキノワグマの個体数変動に影響を及ぼすもうひとつのパラメタである齢別生存率に注目すると、もっともクリティカルな季節の死亡を冬眠によって回避していること、春の資源量が安定していることを考慮すると、年変動は大きくないと推定された。そこでここでは生存率に年変動はないものと仮定し、新潟県で捕獲された齢構成をスムージングした曲線から(林・林 1987) 齢別生存率(死亡率)を推定し、当てはめた。

これらの関係から次のような手順でシミュレーションを行った。①: 集団の初期サイズを最小10頭から最大500頭まで変化させた。100頭までは10頭おきに、100頭以上は50頭おきに計算した。②: 毎年の結実状況を上記の豊凶頻度に基づいて乱数によって決定した。③: 1年ごと1個体ごとに、上記の齢別生存率に基づく乱数によって生死を決定した。また、メスについては豊凶に応じた齢別繁殖率と齢別産子数に基づく乱数によって繁殖結果を導いた。④: ②と③の計算を100年間(または絶滅するまで)繰り返した。⑤: ②～④の計算を100集団について実行し、絶滅率と経過年数を求めた。

### (3) ツキノワグマのMVP

#### ① 単独集団の場合

当然のことだが、初期サイズの増加とともに存続率は増加する。初期サイズと存続率の関係を求めると、MVPを100年後の絶滅率5%以下と定義すれば、少なくとも500頭となる。この定義をもう少しゆるめ、50年後の絶滅率を20%以下とすれば、約150頭となる。どのようなMVPを採用するかはきわめて微妙な問題である。ここではわが国の実情を考慮し、後者のMVPを当面の目標とした。そして結論をいえば、ツキノワグマの孤立集団を存続させるには少なくとも3桁の個体数が必要なのである。この点からみても現状はかなり深刻である。四国、九州の地域個体群はおそらく100頭を越えてはいないだろう(羽澄、私信)。

ところで、このMVPは2歳から15歳までの成獣の生存率を0.86として算出した。この生存率を少しずつ下げ、0.84と0.82で同様の計算を行うと、50年後の絶滅率は前者では65%、後者では90%とはね上がる。このことは、自然死亡にわずかな狩猟による死亡率が加わると、絶滅率は飛躍的に増加することを示している。有害駆除による狩猟圧の増加には十分慎重でなければならない。

また、このシミュレーションでは初期サイズが1000頭以上であっても、同じ豊凶頻度をもつ単一の環境系と結びついている場合には、そのサイズにかかわらずいつかは絶滅してしまう。これは日本列島に生き残ってきたという現実にはそぐわない。この点でいえば、ツキノワグマもまた、もともと孤立分散化した集団ではなく、実際には複数の環境系にまたがるメタ個体群として存続してきたと考えられる。そこで、複数の環境系をもち、互いに移動可能な複数集団からなる地域個体群の場合をつぎに考えてみよう。

## ② 複数の集団からなる地域個体群の場合

単独集団の場合には密度依存性はまったく考慮しなかったが、ここでは生息密度には上限があり、これを越える場合には隣接集団へ移動すると仮定する。この仮定は以下の論議に基づく。ツキノワグマがどのような社会構造をもっているかはまだ明確ではない。テレメトリーによって行動圏のサイズや分布が各地で調査されているが、いまのところナワバリ性や排他的な行動圏の存在などは認められていない。しかし、アメリカクロクマのRoger (1987a)の研究によれば、メスの行動圏は相互にスペースアウトし、はっきりとしたナワバリ性が存在している。また、オスの行動圏はメスよりも大きく、互いに大きく重複している。おそらく、ツキノワグマにはこのように明確なナワバリ性は存在していないものの、同じような生態的特性を持つことから判断すれば、基本的には単独性の資源防衛者であるだろう。とすれば、生息地での生息数には密度依存性が存在していると考えられる。そこで、次のモデルでは、生息密度に上限値（環境収容力）を設け、相互に移動可能な複数集団を想定する。

仮定は以下の通りである。①：複数（2、4、8、16個）のパッチ集団を想定し、初期サイズを設定する。初期サイズは各集団とも同数とする。②：初期サイズをK値として、メスは生息数がK値を越えたときには空いている（K値以下の）パッチへとランダムに移動する。移出成功率は0.9とする。③オスは3歳で50%が空いているパッチへと移出する。4歳以上は4年に1度移出する。移出成功率はそれぞれ0.9とする。

単独集団の場合とまったく同じ仮定と手順をもちいて、絶滅率と経過年数の関係を求める。なお、絶滅は注目する単独集団の絶滅と地域個体群全体の絶滅をとれるが、ここでは前者とする。まず、各パッチで豊凶が同調している場合を見よう。初期サイズ100頭までの単独と複数の絶滅率を比較すると、いずれの初期サイズでも複数集団の場合には絶滅率の大幅な改善が見られる。ここで、50年後の絶滅率を20%以下という前述の定義を当てはめれば、MVPは50頭、2集団以上となる。このことは複数の集団を存続させ、それらを回廊によってつなぐことの重要性を改めて示唆している。また、複数集団の場合、2つ以上であれば集団数にほとんど関わりなく同様の曲線を描くことが注目される。この点でも保全管理の最小単位が2集団であることを浮き彫りにしている。この想定のような集団が実際にも存在している。丹沢個体群は分布でみると、箱根、東京北西部の個体群と隣接し、明かに地域個体群を形成している。したがって、これら個体群を相互につなぎ、交流を確保することが重要である。なお、分散についてはRoger (1987b)がアメリカクロクマいまのところほとんど資料がないので、移出成功率についてはいまのところまったく資料がない。とりあえず0.9としたが、0.8に下げても全体の傾向には大差がない。

つぎに各パッチで豊凶が同調していない複数集団を考えてみたい。初期サイズ20、40、80頭の絶滅率を比較すると、同調している場合に比べ、わずかではあるが各サイズともに絶滅率の改善がみられる。また、この場合には、同調している場合のそれに比べ、集団数の増加とともに絶滅率の減少が顕著である。ところで、ブナの豊凶はかなり広い範囲の地域で同調することが知られているから、このケースは裏日本側と太平洋側を含む東北全域といった範囲での環境系を対象としていると考えられる。

## 6) DNA分析による東北地方と北海道のクマゲラ個体群の比較

### (1) はじめに



クマゲラは、森林生態系における高次捕食者であり、日本では、北海道と東北地方北部に生息している。東北地方では、その生息はブナ林に依存していると考えられている。しかもその生息数は極度に少なく衰退が著しいと言われている（小笠原・泉、1977；由井・石井、1994）。現在までに東北地方でクマゲラの繁殖が確認されたのは、青森県側の白神山地（小笠原・千羽、1986）や青森営林局弘前営林署管内（内海、1990）など青森県内の5カ所と秋田県では森吉山（小笠原・泉、1977；1978）の1カ所のみで、生息が判明している数はわずかに十数羽である。このため、東北地方のクマゲラ個体群が隔離個体群であるなら、北海道の個体群とは別に保全上の単位として考えるべきであるが、一方、遺伝的多様性の減少や近親交配による遺伝的劣化が個体群の存続に与える影響も心配される。北海道のクマゲラ個体群と交流している場合には、その保全策は別の方針のもとにたてられるべきである。この点については明らかになっていない。したがって、東北地方のクマゲラの保護のためには、東北地方と北海道の個体群が交流を行っているかを解明することが重要である。そこで、東北地方と北海道の両個体群間の遺伝的差異があるかどうかを解明するために、DNA分析手法の確立をめざす。また、その結果、個体群間の隔離期間と個体群の規模が、遺伝的多様性にどのような影響を与えているかの解明も可能になる。

## ② 材料および方法

クマゲラは個体数が少なく、一般にDNA分析で使用されるサンプル（細胞や血液）が手に入りにくい。そこで、DNAの抽出にはクマゲラ（*Dryocopus martius*）の糞とキツツキ類の一種であるアカゲラ（*Dendrocopos major*）の血液、アカゲラの羽軸とクマゲラの剥製の羽軸を用いた。

遺伝学的にDNAなどをMarkerとして利用した研究手法のうち今回は、mtDNAを使用した。このDNAは細胞に多数のコピーが含まれていることやその塩基置換速度が核の遺伝子よりもずっと速いといわれていることなどから、近縁種間や個体群間などの研究に核DNAよりも適していると考えられている。mtDNAは母性遺伝をし、普通どの個体も個体独自のミトコンドリアDNAゲノムを一種類持っている。また、mtDNAは、環状ゲノムで、13のタンパク質、2つのリボゾームRNA、22の転移RNAの遺伝子をコードしている領域とDループを含む領域などの遺伝子をコードしていない領域がある（香川靖雄、1992）。遺伝子をコードしている領域は、塩基配列の保存性が高く、未知のDNAについてのプライマーとして適している。しかし、その変異が小さく、個体群間の差が見られない可能性もある。また、遺伝子をコードしていない領域は、塩基配列の保存性が低く、個体群間の差の検出に利用できると思われるが、未知のDNAについては、プライマーの作成が困難である。そのため、今回は、12S rRNA遺伝子をコードしている領域の分析を行うために、この部位の増幅を行った。方法としては、まず、材料からのDNA抽出をフェノール-クロロフォルムを用いて行った。また、DNAの抽出をアガロースゲル電気泳動法（後述）により確認し、その濃度を推定した。次に、PCR法を使って、目的の部位を増幅するために抽出したDNAをsymmetric PCRで目的の2本鎖DNAの増幅を行った。PCR法とは、少量のDNAから任意のDNA断片を分析可能な量までDNA鎖の熱変性、プライマーとのアニリング、ポリメラーゼによる伸長反応を繰り返し行うことによりDNAを増幅する方法である（村松正実・岡山博人編、1991）。使用したプライマーは、すでに報告されているニワトリのmtDNA（Desjardins, S. & Morais, R., 1990）でヒト、ウシ、ネズミなどとも保存性の高い（ホモロジーの高い）12S rRNAとチトクロームbの部位をもとにデザインしたLC: CCA TCC AAC ATC TCT GCT TGA TGA AA (26 mer; 7844 dalton)、HC: GAA GAG GGT GAC GGG CGG TAT GT (23 m

er; 7223 dalton)を用いた。抽出したDNAの特定の部位(2本鎖)を増幅するため、作成した等濃度の2本のプライマーを用いた。PCR法は、93℃45秒DNA二本鎖の熱変性、60℃1分プライマーとのアニーリング、72℃2分30秒DNAポリメラーゼによる伸長反応の3サイクルでサイクルを30回繰り返した。その結果をアガロースゲル電気泳動法(後述)により確認し、そのサイズを測定した。アガロース電気泳動法とは、中性pHでは、DNAのリン酸基は負に帯電しており、その単位重量当たりの電荷は一定であるので、アガロースやポリアクリルアミドなどの分子ふるい効果を持つゲルを用いて電気泳動するとDNA分子サイズが小さいほど速く陽極へ泳動される。従って、分子サイズの差に基づいてDNAは分離される。また、同時に流すマーカーから、そのサイズや濃度を推定することができる(今堀和友・山川民夫監修、1990)方法である。

### (3) 結果

#### ① DNAの抽出

アカゲラの血液：約5 $\mu$ lの血液から20000bp以上の長いgenomicDNAが6 $\mu$ gほど抽出できた。

クマゲラの糞：約5mm<sup>3</sup>のクマゲラの糞から20000bp前後のgenomicDNAが2 $\mu$ lほど抽出できたが、このクマゲラの糞はムネアカオオアリアリの死骸からなっているので、ムネアカオオアリのDNAの可能性もあるので、シーケンスなどで確かめる必要がある。

アカゲラの羽軸：1本の羽軸から、切断されていると思われるDNAが抽出できた。

クマゲラの剥製からの羽軸：1本の羽軸から、切断されていると思われる微量のDNAが抽出できた。

#### ② PCR法

DNA抽出で多くのDNAを抽出できたアカゲラの血液について、mtDNAの12S rRNAの部位からデザインしたプライマーでPCR法を行った。その結果生成物ができることがわかった。しかし、全てのDNAで生成物はできなかった。

### (4) 考察

遺伝学的にDNAなどをMarkerとして利用した研究手法では、個体に大きなダメージを与えることがなく動物の細胞や血液を少量採取して分析することができる。今回の研究では、アカゲラの血液からの抽出は確実にできた。しかし、クマゲラは個体数が少なく、捕獲することが困難である。そのため、クマゲラにDNA分析を行うためには、手に入れることが可能なサンプルでDNAを抽出する必要がある。そのため、アカゲラの羽軸とクマゲラの剥製の羽軸からDNAの抽出を試み、ある程度の大きさや量のDNAが抽出できることがわかった。このことから北海道産のクマゲラが剥製として多く残されているのでこの個体群のDNA分析が可能であると考えられる。しかし、本州産のクマゲラの剥製がほとんどないことから本州産のクマゲラ個体群のDNA分析のためには現在生息しているクマゲラのサンプルからのDNA分析が必要となってくる。このため、東北地方で採取したクマゲラの糞からDNAの抽出を行い、DNAの抽出ができた。このクマゲラの糞はムネアカオオアリアリの死骸から構成されているので、抽出できたDNAがムネアカオオアリのDNAの可能性もあるので、今後塩基配列を決定することで確かめる必要がある。抽出したDNAを増幅するPCR法を行うためのプライマーは、すでに報告されているニワトリのmtDNAでヒト、ウシ、ネズミなどとも保存性の高い(ホモロジーの高い)12S rRNAとチトクロームbの部位をもとにデザインし、アカゲラの血液から抽出したDNAの一部で増幅

に成功した。今後、PCR法の条件を確立し、より精度と信頼性の高いPCR法を行う必要がある。また、PCR法により増幅した部位についてシーケンスにより塩基配列を決定し、変異の高いmtDNAの他の部位についても解析を進めていくことにより、個体間や個体群間や種間の比較検討を行ない、個体群間等の分析を行う必要がある。

### 3. 研究発表リスト

(誌上発表)

斎藤隆・石橋靖幸. 集団生物学としての保全生物学－哺乳類研究のミニレビュー. 個体群生態学会報50:43-46. (1993)

○Saitoh, T. and A. Nakatsu. Effects of size and perimeter of removal plots on immigration of the gray red-backed vole. *J. Mamm. Soc. Japan* 18:79-86. (1993)

○Ishibashi, Y., T. Saitoh, S. Abe, and M. C. Yoshida. Polymorphic microsatellite DNA markers of the grey red-backed vole *Clethrionomys rufocanus bedfordiae*. *Molecular Ecology* 4: 127-128. (1995)

○Saitoh, T. Sexual differences in the natal dispersal and philopatry of the grey-sided vole, *Clethrionomys rufocanus*. *Res. Pop. Ecol.* 37:49-57. (1995)

○Kawaji, N., T. Saitoh, Y. Ishibashi & M. C. Yoshida. An example of polygyny in the short-tailed bush warbler *Cettia squameiceps*. *J. J. Ornithol.* 44:93-97. (1995)

○Ishibashi, Y. T. Saitoh, S. Abe & M. C. Yoshida. Null microsatellite alleles due to nucleotide sequence variation in the grey-sided vole *Clethrionomys rufocanus*. *Molecular Ecology* (in press)

○Bjorstand, O. N., Champley, S., Stenseth, N. C. & Saitoh, T. Cyclicity and stability of grey-sided voles, *Clethrionomys rufocanus* of Hokkaido: Evidence from spectral and principal components analyses. *Phil. Trans. Royal Soc. London B* (in press)

○Saitoh, T., N. C. Stenseth & O. N. Bjornstad. Density dependence in fluctuating grey-sided vole populations. (in press)

○Ishibashi, Y., T. Saitoh, S. Abe & M. C. Yoshida. Sexual difference in spatial structure of relatedness in a vole population: Female kin clusters revealed by DNA analyses. (in press)

斎藤隆. 息子は出ていき娘は残る: オスに偏った哺乳類の移動・分散行動. *北方林業* 47:183-185 (1995)

杉村 乾・佐藤重穂・山田文雄, 徳之島におけるアマミノクロウサギの生息状況について. *チリモス* 6:17-21 (1995)

山田文雄, 生きている化石, アマミノクロウサギを探る. *美しい自然* 53:6-11 (1993)

Yamada, F., K. Sugimura & H. Koyanagi, Status of Amami rabbit *Pentalagus furnessi* and requirement of ecological engineering for its conservation. *Newsletter Int. Conf. Habitat Fragmentation*, pp. 1. (1995)

Horino, S. & Miura, S. Status of the black bear populations of Japan. *Newsletter Int. Conf. Habitat Fragmentation*, pp. 1-2 (1995)

- 川本芳、マカクの種内・種間にみられる遺伝分化。 遺伝 48: 24-29 (1994)
- 川本芳、庄武孝義、嶋田誠、G. Belay、東日本のニホンザル集団のミトコンドリアDNA変異。  
 霊長類研究 11: 313 (1995)
- 川本芳、野生生物の持続的利用 サル。 畜産の研究 50: 165-175 (1996)
- 大井徹、森林の保全とニホンザルの保護管理。 森林科学, 11: 43-49. (1994)
- 大井徹、他、ニホンザルの新センサス法, ブロック分割定点調査法の有効性について。 霊長類研究, 10: 77-84. (1994)
- 中村充博、クマゲラの生息実態と保護。 平成6年度森林総合研究所東北支所研究発表会記録(支所年報36) : 37-40 (1995)
- 中村充博、DNA分析手法を用いた鳥類個体群の分析の可能性。 東北支所たより 403: 1-4 (1995)

(口頭発表)

- 石橋靖幸・斎藤隆 (1994) ミトコンドリアDNA分析によるエゾヤチネズミの血縁個体の分布様式の解析。 日哺乳大会要旨
- 川本芳、庄武孝義、嶋田誠、G. Belay、東日本のニホンザル集団のミトコンドリアDNA変異。  
 第11回日本霊長類学会大会、犬山、1995年6月
- 川本芳、東北地方のニホンザル地域個体群に関する遺伝学的評価。1995年度地球環境研究総合推進費による研究発表会、筑波、1996年1月
- 大井徹、存続可能個体群サイズをめぐって。 京都大学霊長類研究所共同利用研究会。(1995)
- 大井徹、東北地方のニホンザルの個体群特性と好適生息環境について。 1995年度地球環境研究総合推進費による研究発表会。(1996)
- 杉村 乾・佐藤重穂・平川浩文・山田文雄(1995)。 糞粒法によるアマミノクロウサギの生息数の推定。 日哺乳大会要旨
- 三浦慎悟・堀野眞一 ツキノワグマの生存可能最小個体群サイズ(MVP)の試算—その人口学的アプローチ。 日哺乳大会要旨 (1994)
- 堀野眞一・三浦慎悟 ツキノワグマの複数個体群の人口学的モデル。 日哺乳大会要旨 (1995)
- 三浦慎悟・堀野眞一 大型哺乳類の生存可能最小個体群サイズ(MVP)の試算—その人口学的アプローチ。 生態学センター研究会 (1995)