

F-1 野生生物集団の絶滅プロセスに関する研究

(1) 小集団の遺伝的変異と近交弱勢の効果の解明

研究代表者 国立環境研究所生物圏環境部 椿宜高

環境庁国立環境研究所

生物圏環境部 上席研究官	椿宜高
地球環境研究グループ 野生生物保全研究チーム	高村健二・永田尚志
科学技術進行事業団 特別研究員	山根明弘
(委託先)	
東北大学大学院理学研究科	牧雅之
岐阜大学農学部	土田浩治
上越教育大学	中村雅彦
北海道大学地球環境科学研究科	東正剛
石巻専修大学	玉手英利

平成8～10年度合計予算額	53,333千円
(平成10年度予算額)	19,112千円)

[要旨] 野生植物の2分類群について、地理的分布の広さと遺伝的多様性の大きさの相関について検討し、現在の地理的分布の広さは歴史的な背景を無視することが出来ず、現時点で狭い分布域を持つ種が遺伝的多様性が低いとは必ずしもいえないことを示した。ウスバシロチョウの地域個体群について翅脈のFA値・酵素タンパク質ヘテロ接合度・交尾回数を測定し、個体群の平均FA値とGPI酵素のヘテロ接合度の間に負の相関関係が認められ、FA値が個体群の遺伝的変異性を表わす指標となりうることを示した。イトヨ地域個体群について鱗板数非対称個体の割合が個体数減少に伴って増加することと郡内で任意交配が実現していない可能性を示した。湿原鳥類オオセッカ・オオヨシキリ・コジュリンの個体群構造・遺伝的集団構造・FAの相互関係を研究し、希少種のオオセッカ以外は集団中に遺伝的構造が認められたが、FAと遺伝的構造の関係ははっきりしなかった。高山鳥類イワヒバリの帰還率・分散・繁殖システムを分析した結果、その個体群は高い生残率・同一グループへの高い帰還率・若鳥の高い帰還率によって維持され、一部の高順位個体が繁殖を独占していることが明らかになり、遺伝的多様性の低下が示唆された。エゾシカ集団がミトコンドリアDNA遺伝子で6つのタイプに分かれること、および千葉集団と比較して、マイクロサテライト遺伝子の平均ヘテロ接合度が低く対立遺伝子数が少ないことを示した。エゾシカ隔離個体群の個体は個体数崩壊後に下顎・枝角の小型化が認められるが、FAの大きさには個体数崩壊の影響は認められないことを示した。ニホンジカについて集団内の遺伝的変異を測定するための遺伝的マーカーを開発して各地域集団の遺伝的多様性の測定をおこない、さらに長期調査集団について、個体レベルの遺伝的多様性を測定して個体の適応度と遺伝的変異との関連性を検討した。イリオモテヤマネコの遺伝的多様性をマイクロサテライト遺伝子およびMHCクラスI遺伝子をマーカーとして評価し、前者の中立マーカーでは他のネコ科動物と比較しても極めて低い多様性の値となったが、後者の中立ではないマーカーでは多様性が維持されて

いることを明らかにした。

[キーワード] ヘテロ接合度、FA、酵素多型、DNA、遺伝マーカー

1. 序

狩猟や漁獲による乱獲などの人為的な攪乱、あるいは捕食者侵入・疾病流行・気候変化などの生物間相互作用や環境の攪乱によって野生生物集団の個体数が激減すると、近親交配が生じる機会が必然的に増加する。この近親交配によって個体の適応度を低下させる遺伝的な効果は近交弱勢と呼ばれる。近親交配が頻繁に行なわれている動物園集団においては、仔の死亡率の上昇などといった有害遺伝形質の発現を示唆する結果が報告されている。個体数の激減した野生生物集団においても近親交配とそれに起因する近交弱勢が生じているかどうかが目されるが、その関係が確証された例はない。この両者の関係について、さらには近交弱勢がもたらす小集団存続への影響について明らかにしておくことは、絶滅のプロセスを理論的に解明するための基礎研究からのみならず、絶滅危惧集団を保全しておくための応用研究からも重要な課題である。一方で、近交弱勢以外の絶滅を促進する遺伝的要因としては、集団内の遺伝的変異量の低下を挙げることができる。小集団がかりに、近交弱勢の弊害、或いはその他の障害にさらされながら長時間存続してきたとしても、移入個体による集団内への遺伝的変異の供給がまれな場合には遺伝的浮動によって遺伝的変異量が急速に失われてゆく。遺伝的変異量の減少は環境変動への潜在的適応能力の欠乏を意味し、生息環境になんらかの攪乱が生じた場合、その変化に迅速に適応できない危険性を孕んでいる。とくに、地理的に隔離された遺伝的な均一化が著しい小集団などでは、人為的な環境攪乱に対する適応能力が低下していることが予想される。したがって、実際に絶滅が危惧されている小集団の現状を遺伝的多様性の側面から把握することは、その集団の存続を管理する上で極めて重要な作業であるばかりではなく、小集団存続の機構の究明にも貢献することが期待される。本研究ではゲンカイミミナグサ・チャボホトトギス・ウスバシロチョウ・イトヨ・オオセツカ・コジュリン・オオヨシキリ・イワヒバリ・エゾシカ・ニホンジカ・イリオモテヤマネコの野生集団について遺伝的多様性の現況とその成立過程やそれが集団の属性に及ぼす影響に関する研究を行なった。

2. 調査地および調査方法

(1) ゲンカイミミナグサとオオバナミミナグサの遺伝的多様性の比較

今回の研究に用いた種群は、レッドリストにも記載されているナデシコ科のゲンカイミミナグサとその近縁種で広い分布域をもつオオバナミミナグサ、およびユリ科のキバナノホトトギス節植物4種(キバナノホトトギス・チャボホトトギス・キバナツキヌキホトトギス・タカクマホトトギス)である。

ゲンカイミミナグサとオオバナミミナグサについては、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)を用いて遺伝的多様性を推定した。ゲンカイミミナグサを7集団、オオバナミミナグサを9集団選び、各集団から10個体の葉をサンプリングした。この葉からCTAB法を用いてトータルDNAを抽出し、10種類のRAPDプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)により遺伝子増幅を行なった。得られた増幅断片は2%アガロースで泳動し、一つ一つ

のバンドを独立の遺伝子座とみなした。このデータをもとに、遺伝的多様性の指標として、Shannon's H を計算した。

キバナノホトトギス節植物については、解析に酵素多型を用いた。キバナノホトトギス5集団、チャボホトトギス7集団、タカクマホトトギス1集団、キバナツキヌキホトトギス1集団から約20~30個体をサンプリングし、緩衝液中でよくすりつぶして遠心し、その上清をポリアクリルアミドゲルとデンブングェルで電気泳動した。合計13種の酵素について、活性染色を行い、集団ごとに対立遺伝子頻度を計算し、集団遺伝学的解析を行なった。

(2) ウスバシロチョウの地域個体群間の表現型変異、遺伝的変異、適応度

岐阜県内の20カ所に採集地点を取り、各採集地点からウスバシロチョウの成虫を採集した。採集時には、採集個体数と採集時間を記録し、密度の指標とした。採集した成虫は、生きたまま実験室に持ち帰り、直ちに-80℃で保存した。冷凍されたサンプルを4℃の保冷庫に持ち込み、前後翅を切り離してFA測定用のサンプルとした。頭部と胸部はサンプル管に入れ、再び-80℃で保存した。腹部は乾燥標本にして交尾回数推定用のサンプルとした。

前後翅の12部位の翅脈について、左右双方の翅脈の長さを画像解析ソフトNIHImageで測定した。測定は3回繰り返した。各測定値の左右の差の絶対値を取ってFA(左右対称性のゆらぎ)値とし、その平均値を求めた。12部位における各平均値からさらに平均値を計算し、個体のFA値とした。

-80℃で保存した胸部を、抽出用緩衝液(Tris-HCl pH7.0) 200 μ lとともにホモジナイザーですりつぶし、遠心分離した後、上清のみを回収し、電気泳動実験を行うまで-80℃で保存した。13%デンブングェルを作成し、ゲル内に5mm角の濾紙にしみこませたサンプルを差し込んだ。泳動終了後、ゲルを水平にスライスし、各酵素を染色した。

本種の雄成虫は、交尾時にメスに交尾プラグを作るが、その際に雄の腹部末端分の体表面の毛をプラグに練り混む習性がある。したがって、その毛の残存程度から交尾回数が推定できると考えられる。今回は、雄サンプルの腹部の乾燥標本を顕微鏡下で検鏡し、相対的な雄の交尾回数を推定した。

(3) 絶滅のおそれのあるイトヨ地域個体群の個体数変動と左右非対称性の発現

本州中部濃尾平野を流下する揖斐川水系で散在して分布しているイトヨ個体群を対象として、個体数推定・形態計測・遺伝的変異量分析を行なった。調査水域で漁網を使って捕獲を行ない、一定の体長以上の個体にはトゲ切りで標識を行なった。採集を繰り返すことで標識個体の再捕率や未標識個体の捕獲数を調べ、その数値をもとにして調査水域内の生息個体数を推定した。イトヨ類魚類には左右体側面に大きく板状となった鱗板がある。形態計測用に採集した個体の鱗板をアリザリンレッド溶液で染色し、実体顕微鏡下で計数した。遺伝分析用に採集した個体からは、筋肉を数10mg採取した。この試料を液体窒素で凍結後粉碎し、そこに抽出用液体を加えた後、陰イオン交換樹脂カラムに導入し、DNAを樹脂に吸着させてそれ以外の不純物は洗い流した。吸着されたDNAは溶出用の液体で溶かし出し、エタノールで沈澱させて回収した。以上の抽出・吸着・溶出の作業はファルマシア製の細胞・組織用DNA抽出キットを用いて行なった。回収したDNAは北米のイトヨ類について報告されている8種のマイクロサテライト遺伝子増幅

用のプライマーを用いて特異的に増幅し、DNAシーケンサーを用いて電気泳動に拠って分別した。

過去の調査で採集された標本はホルマリン液中に保存されているために上記のDNA抽出方法では抽出が効率的に行なえなかったため、イトヨに近縁のミナミトミヨ類の遺伝分析用に実用化された方法を工夫を加えながら用いた。まず、ホルマリン保存標本から採取した筋肉試料を尿素液に浸し、尿素のタンパク分解作用で軟らかくした上で粉碎し、その後は一般的に使われる、フェノール・クロロホルム混合液とイソアミルアルコール・クロロホルム混合液とを繰返し加えては取り除く精製手法によって純度の高いDNAを回収した。

PCR反応による増幅の過程でも、a)増幅能力の高いPCR反応酵素の使用、b)酵素反応安定化剤の使用、c)プライマーの抽出DNAへの結合精度を高めるための反応温度上昇、d)PCR反応繰返し回数の増加といった工夫を凝らした。

(4) 湿地性スズメ目鳥類の個体群構造と遺伝的多様性の維持機構

利根川水系で繁殖する鳥類のうち、オオセッカ・コジュリン・オオヨシキリの3種類のスズメ目鳥類を調査対象種とした。オオヨシキリは日本中のヨシ原に分布する普通種であるが、オオセッカは環境庁レッドデータリストにおいて絶滅危惧IB類に、コジュリンは絶滅危惧II類に分類されている。神栖町高浜の利根川下流河川敷と霞ヶ浦湖岸の9カ所のヨシ原で、カスミ網を使って対象種を捕獲するとともに、繁殖成績を調査した。捕獲した対象種は、計測・採血・足輪装着後、その場で放鳥した。利根川下流の神栖町高浜と霞ヶ浦湖岸の浮島で合計679個体（浮島285個体、神栖394個体）のコジュリンを、両地域で1992年以降、合計270個体のオオセッカを、また、霞ヶ浦と利根川流域で860個体のオオヨシキリを捕獲した。標識個体は、繁殖期にすくなくとも毎週1回定着位置を確認した。採血した血液サンプルはSET Bufferにに入れて冷凍庫に保存した後に、MicroProbe社のIsoQuickを用いてDNAを精製し、オオヨシキリはG61・G62・G7の3つのマイクロサテライト遺伝子座¹⁾を、コジュリンはEsm1とEsm6の2つのマイクロサテライト遺伝子座²⁾を解析した。マイクロサテライト遺伝子座のうち、G61とG62は性染色体上にあるため、雄のみを使ってヘテロ接合度の解析を行なった。

(5) イワヒバリ小個体群の維持機構と遺伝的多様性の低下をもたらすメカニズム

調査及び分析には、1985年以来乗鞍岳（標高3027m）で標識した839個体を用いた。個体は、無双網によって捕獲し、身体測定、総排泄腔突起による性判定を行い³⁾、色足輪を装着した後放鳥した。識別した個体の経年観察より、調査地内のグループ数・グループサイズ・性構成・個体（成鳥と雛及び若鳥）の年帰還率と分散を分析した。また、識別個体同士の攻撃・追いかけ・逃避などの順位行動からメンバー間の順位を判定するとともに交尾関係も調べた。

(6) エゾシカ集団における遺伝的多様性およびFA

北海道各地からエゾシカ141頭の生体組織を採集し、DNAを抽出した。ミトコンドリアDNA (mtDNA) のD-loop領域の塩基配列をPCR法を用いた塩基配列直接決定法で602塩基の配列を決定し、地理情報システムをもちいてD-loopタイプの北海道での分布マップを作製した。エゾシカの遺伝的多様性の程度を明らかにするために3つのマイクロサテライト遺伝子

(OarFCB193・BOVIRBP・INRA040193・INRA040)^{4),5)}をPCR法によって増幅し、対立遺伝子頻度からヘテロ接合度の期待値と平均ヘテロ接合度の期待値を算出した。その多型について千葉集団と比較した。

(7) ニホンジカ小集団の遺伝的多様性と近交弱勢との関係

有害獣駆除・狩猟等によって捕獲されたニホンジカ個体より、筋肉・血液等を採取して保存した。標本を採取した地域は、北海道足寄町・岩手県・宮城県（金華山島）・兵庫県和田山・島根県・山口県・長崎県（対馬を含む）・宮崎県・鹿児島県の各地である。得られた標本からDNAを抽出して遺伝子試料とした。その試料を鋳型としてPCR法により標的遺伝子を増幅した。多様性を測定するための遺伝マーカーとして、ミトコンドリアゲノム中のチトクロームb遺伝子、核ゲノム中の主要組織適合性抗原遺伝子（MHC）、マイクロサテライト遺伝子座のBL42・BM203・BM888・BMC1009・BMC4107・BOVIRBP・Cervid14・ETH225・OARfcb193・TGLA53・Cervid2・Haut14・SPCRSP3・SPCRSP9を用いた。

遺伝的変異の検出は、チトクロームb遺伝子では塩基配列の決定、MHC遺伝子ではSingle strand conformation polymorphism(SSCP)、マイクロサテライト遺伝子ではDNA fragment analysisによって、それぞれおこなった。集団遺伝学解析用ソフトウェアGenepopを用いて、遺伝子座ごとの対立遺伝子頻度とヘテロ接合度を計算した。さらに集団間の遺伝的分化の程度を算定するためにRst値を計算した。

近交弱勢の影響をみるために、金華山島ニホンジカ集団の繁殖履歴を1989年から記録したデータ上で解析した。さらにこの期間に生存した個体193個体から血液を採取してDNA試料として保存した。家系追跡をおこなっている個体については、毎年11月と3月に一斉捕獲をおこなって、体重測定・形態測定・歯の磨滅状態・妊娠の有無等の記録をおこなった。マイクロサテライト遺伝子をもちいて定量化した個体の遺伝的多様性は、individual heterozygosity (IH) と mean d2 の2種類の遺伝的多様性指標で表わした。

(8) イリオモテヤマネコの遺伝的多様性

イリオモテヤマネコ(*Felis iriomotensis*)の血液サンプル(26個体)から、フェノール/クロロホルム抽出法によりゲノムDNAの抽出および精製を行なった。マイクロサテライト遺伝子の多型解析においては10遺伝子座のプライマー⁶⁾を合成し、各遺伝子座の一組のプライマーのうち一方をFITCにてラベルした。各マイクロサテライト遺伝子の増幅はDNAサーマルサイクラー(PJ-2000, PE Applied Biosystems)を用い、93℃ 60秒+48℃ 30秒+72℃ 30秒のサイクルを25回まわすPCRプログラムにて行なった。得られたPCR産物はホルムアミド存在下にて熱変性を行い、DNA塩基配列シーケンサー(ALF DNA Sequencer II, Amersham Pharmacia)にてフラグメント解析を行なった。各遺伝子座の対立遺伝子型のタイピングにはソフトウェアFragment Manager (Pharmacia)を用いた。また、比較の対象とする個体群に相ノ島(福岡県糟屋郡新宮町)のノネコ個体群を選び、約50個体について同様のマイクロサテライト遺伝子の多型の解析を行なった⁷⁾。

MHC遺伝子の解析については、カネネコのクラスI遺伝子の塩基配列⁸⁾から、 α ドメイン- α ヘリックスをコードする領域のフランキング部位にプライマーをデザインし、93℃ 30秒

+58℃ 30秒+72℃ 60秒を30サイクル回すPCRプログラムにて増幅を行なった。得られたPCR産物はアガロースゲルにて電気泳動し、目標のバンドのみを分離し、これを鋳型のDNAとしてBig Dye Terminator Cycle Sequencing (PE Applied Biosystems) 反応を行なった。反応液は乾燥凝縮させてから、ホルムアミド存在下の熱変性を行なった後、遺伝子塩基配列シーケンサー (ABI Prism 310, PE Applied Biosystems)にて各サンプルの塩基配列の決定を行なった。ヘテロ接合体の推定には遺伝子塩基配列解析ソフトFACTURA (PE Applied Biosystems)を用いた。

いくつかのサンプルについてはT-ベクターを用いたクローニングを行い、上記の方法にて塩基配列の決定を行なった後、PAUP・PHYLIP・ClustalW・MacClade等の系統樹解析ソフトを用いて、遺伝子重複の産物である偽遺伝子の存在の確認および識別も同時に行なった。

3. 結果・考察

(1) ゲンカイミミナグサとオオバナミミナグサの遺伝的多様性の比較

ゲンカイミミナグサの遺伝的多様性のほうが、オオバナミミナグサの遺伝的多様性よりも集団レベル、種レベルの両方において高かった。集団レベルのShannon's Hはゲンカイミミナグサでは2.73、オオバナミミナグサでは4.38となり、オオバナミミナグサの方が1.6倍大きかった。また、種レベルのShannon's Hは、ゲンカイミミナグサでは4.79、オオバナミミナグサでは9.07となり、オオバナミミナグサの方が1.9倍大きかった。

キバナノホトトギス節の4種のうち、チャボホトトギスは西日本に広く分布するが、キバナノホトトギスは鹿児島・宮崎両県に、タカクマホトトギスは高隈山系のみ、キバナツキヌキホトトギスは宮崎県尾鈴山のみ分布する。しかしながら、種レベルの遺伝的多様性はチャボホトトギスが一番低く、残りの3種は明らかにチャボホトトギスよりも遺伝的多様性が高かった(表1)。集団間の遺伝的距離に基づく類似系統樹を作成したところ、チャボホトトギスはキバナノホトトギスから比較的最近分化したことが示唆された。

一般的に分布域の狭い種の方が、分布域の広い種よりも遺伝的多様性が小さいとされてきた。今回用いた材料でもゲンカイミミナグサはその傾向に当てはまった。しかしながら、キバナノホトトギス節植物では、最も分布域の広いチャボホトトギスが最も遺伝的多様性が低かった。チャボホトトギスは、他のキバナノホトトギス節植物3種と違って、唯一雌雄同熟性を示す種である。したがって、この種だけは自家交配を行いうる。実際、得られた酵素多型のデータをもとに近交係数を計算したところ、チャボホトトギスだけは高い自殖性を示した。このことと集団間の遺伝的類似系統樹をあわせ考えると、チャボホトトギスはキバナノホトトギスから比較的最近自殖性を獲得して分化した種であると推定される。そして、現在のような広い分布域を持つようになった背景には、自殖性による分布拡大能力があると思われる。

これらの結果から、遺伝的多様性の大きさは必ずしも地理的分布の広さとは相関がないことが結論できる。むしろ、歴史的要因やその種の繁殖様式なども考慮しないと、現在は分布域が狭い種の遺伝的多様性を説明することは難しい。

表1. 集団レベルと種レベルの遺伝的多様性. P = 多型遺伝子座の割合 (%), A = 遺伝子座あたりの対立遺伝子数, AP = 多型遺伝子座あたりの対立遺伝子数, h = 遺伝子多様度

	P	A	AP	h
キバナノホトトギス				
F1	35.3	1.53	2.50	0.117
F2	23.5	1.47	2.40	0.084
F3	35.3	1.47	2.33	0.114
F4	35.3	1.53	2.00	0.110
F5	23.5	1.24	2.00	0.071
キバナの平均	30.6	1.45	2.25	0.099
キバナ種レベル	64.7	2.05	2.86	0.168
チャボホトトギス				
N1	0.0	1.06	2.00	0.002
N2	0.0	1.06	2.00	0.005
N3	0.0	1.00	-	0.000
N4	18.8	1.18	2.00	0.052
N5	5.9	1.06	2.00	0.014
N6	5.9	1.06	2.00	0.027
N7	0.0	1.00	-	0.000
チャボの平均	4.1	1.06	2.00	0.016
チャボの種レベル	23.5	1.24	2.33	0.026
タカクマ	35.3	1.41	2.00	0.105
キバナツキヌキ	35.3	1.47	2.14	0.112

(2) ウスバシロチョウの地域個体群間の表現型変異・遺伝的変異・適応度

本種には、EST・GPI・MDH・ACOH・PGM・G3PDHの6酵素に多型が観察された。特に、GPIとPGMは6対立遺伝子に支配されていた。各形質間の相関の程度を分析した結果、個体群の平均FAは個体群密度とは関係が無かったが、ヘテロ接合体率と有意な負の相関関係が認められた。また、個体群密度とヘテロ接合体率の間には相関関係が認められなかった(図1)。交尾個体の集団平均FAと非交尾個体の集団平均FAを比較したところ、後者の方が大きい傾向が認められた。ホモ型個体の平均交尾回数とヘテロ型個体の平均交尾回数を比較したところ、後者の方が大きい傾向が認められた。ホモ型個体の平均FAとヘテロ型個体の平均FAを比較したところ、前者の方が大きい傾向が認められた(図2)。

今回の調査結果では、個体のFA値とヘテロ接合体率・交尾回数などには相関関係が認められなかった。しかし、個体群の形質としてFA値を評価した場合、個体群の平均ヘテロ接合体率と有意な負の相関関係が認められた。以上のことから、FA値は個体群の平均ヘテロ接合体率、すなわち遺伝的多様性と関係があるものと考えられる。このことはFA値は個体群の遺伝的多様性を表わす指標になりうることを示唆している。GPIの変異は北アメリカ大陸に生息する *Colias* 属

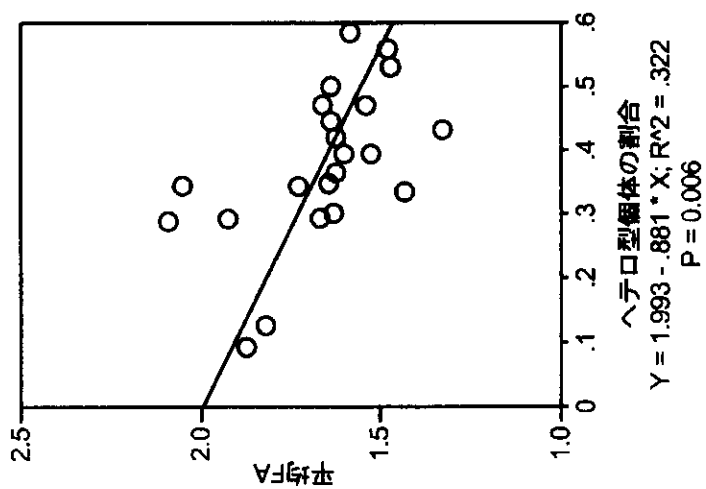
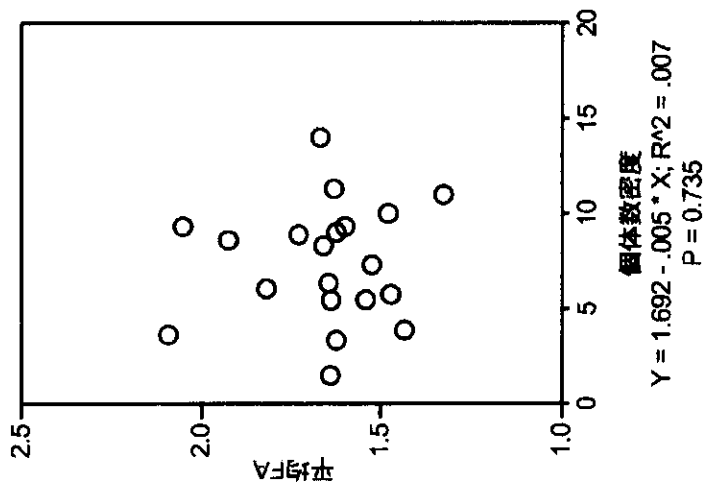
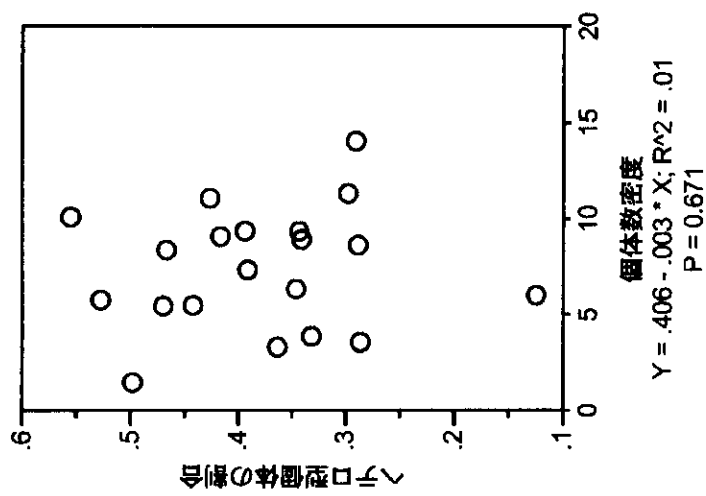


図1. 各個体群のパラメーター間の相関関係。一点は各個体群を表わす。

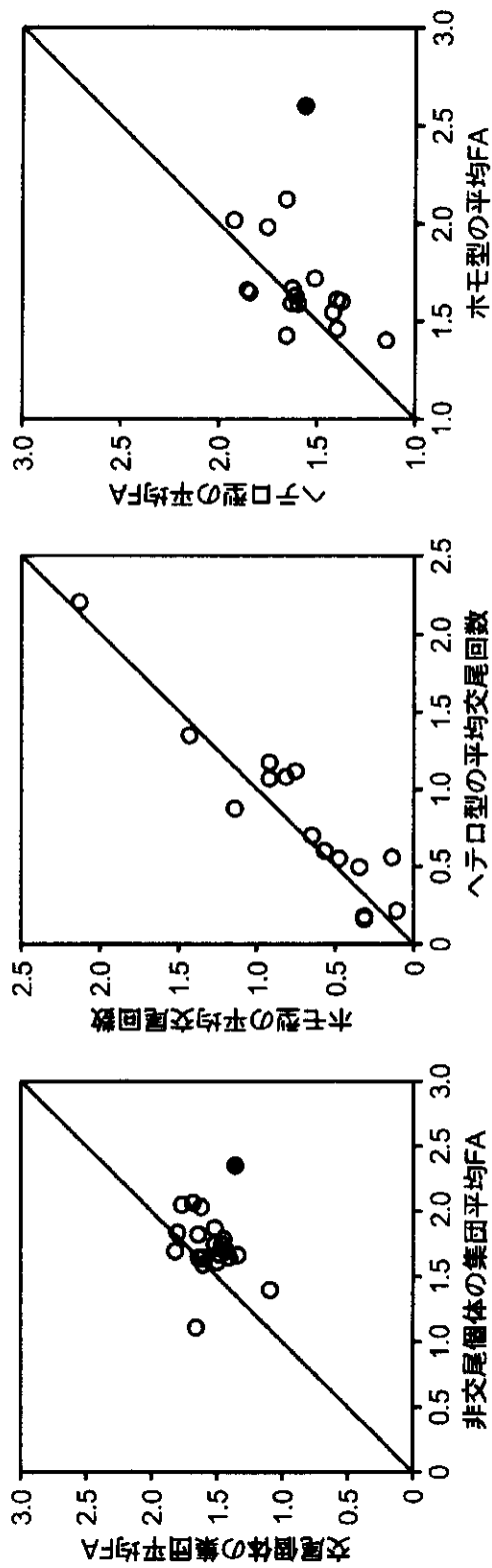


図2. ウスバシロチョウの集団ごとの平均FA・GPIヘテロ・交尾回数（指数）の関係

のチョウにおいて雑種強勢を起こしており、特定のヘテロ型が他の遺伝子型よりも、飛翔特性・交尾頻度などの属性において優れていることが報告されている^{9), 10), 11), 12), 13)}。今回の調査でも、GPIの変異性と気温との関係が不明瞭ながら認められる傾向にあった。遺伝的変異性が雑種強勢によって維持されているのか、それとも中立的な変異として維持されているかを解明することは、FA値を使って個体群の遺伝的多様性を推し量る上で必要なことと考えられる。今後は各DNAのマイクロサテライト遺伝子の変異性を調査し、その変異性の酵素多型との相関性やFA値との関係を明らかにする必要があるものと考えられる。

(3) 絶滅のおそれのあるイトヨ地域個体群の個体数変動と左右非対称性の発現

岐阜県のあるハリヨ生息地（流程数100m）で水域を一時的に網仕切りで分割して個体数の推定を行なった結果を紹介する。推定には標識再捕法とレスリー法を用いたが、前者では約95万個体、後者では76万個体と推定された。一部の水域でレスリー法推定の前提である新規採集個体数の減少が認められなかった、というように推定の制度を上げるためにはまだ手法の改善の余地がある。同時に試行中の営巣数からの個体数推定結果と合わせて検討を進めていく予定である。しかしながら、この生息地では1980年代初期には数千個体規模の生息数しか確認されておらず、今回の結果と比較するとその間に取られてきた生息条件改善の方策が成功している事がわかる。

計測した左右鱗板数から左右非対称個体の割合を導き出したが、上記生息地では非対称個体の割合は1980年代から現在までほとんど変化していなかった。一方で、上記調査とあわせて資料を整理した岐阜県南濃町と福井県大野市の生息地では個体数の激減に並行して非対称個体の割合が著しく増加しており、個体数の低下が近親交配の頻度を増し、近交弱勢によって遺伝的劣化が生じて、それが非対称個体の増加につながるという道筋を想定させる結果となった。一方、個体数増加に際しては逆向きの非対称個体減少が直ちに起こるわけではなく、急激な個体数減少を経過した個体群に見られる、いわゆるボトルネック効果が生じている可能性があるが、いずれにしても保全上貴重な示唆を与える結果である。

遺伝分析はまず、北米のイトヨで発見されたマイクロサテライト遺伝子が日本産のイトヨ類でも存在することを確認する作業から始めた。信濃川・春採川・錦多峰川の3個体群を調べた結果、各々の個体群で複数の対立遺伝子が認められた。登録名CIER11・51・62の3種のマイクロサテライト遺伝子座で信濃川27・16・21個、春採川26・20・20個、錦多峰川10・7・9個の対立遺伝子を検出した。さらに遺伝子型頻度と遺伝子頻度からこれらの集団が任意交配集団に認められるハーディー・ワインベルグ平衡にあるかどうかを検定したが、錦多峰川以外は有意に平衡からずれていることが分かり、集団内で任意交配が成立していない可能性があった。

ホルマリン標本については、8種のマイクロサテライトをすべて試したが、対立遺伝子を検出しやすい遺伝子座としにくい遺伝子座があることがわかった。検出しやすいものを用いて、個体数と鱗板数非対称率の経時的変化を追跡した個体群について遺伝的変異量を明らかにする予定である。

(4) 湿地性スズメ目鳥類の個体群構造と遺伝的多様性の維持機構

現在、オオセッカは青森県の岩木川下流域と仏沼地域周辺、および利根川下流域の3つの地域に合計1000羽程度が生息し繁殖していた。オオセッカに足輪をつけて行なわれた標識調査によって、青森県で繁殖したオオセッカは利根川下流域・霞ヶ浦沿岸で越冬し、利根川下流域で繁殖したオオセッカの一部は冬期も繁殖地に残るが、一部は房総から東海地方にかけての太平洋沿岸に移動して越冬していることが明らかになった。オオセッカはスゲ・ヨシの混成する植生を好み、好適なハビタットに縄張りを構えた雄は1繁殖シーズンを通して定着し、複数の雌と番になれるが、好適でないハビタットにしか縄張りを持たない個体は、メスと番いになれず2週間程度で入れ替わっていくことが確認された。オオヨシキリ¹⁾・ムシクイ類¹⁴⁾・ホオジロ類²⁾・ツバメ¹⁶⁾で開発された20数種類のマイクロサテライト遺伝子座を使って、遺伝的集団構造の解析を試みたが、多型をもつ遺伝子座は今のところ見つかっていない。

コジュリンについて浮島と神栖の翼長およびふ蹠長の左右対称性のゆらぎ (FA) を解析した。ほかの鳥類と同様に、若鳥のFAが成鳥より大きい傾向が認められたが、雌雄の間で差はなかった。また、翼長のFAは繁殖期において冬期におけるより大きくなる傾向が両地域で認められた。ふ蹠長のFAには両地域で差が認められなかったが、翼長のFAは浮島の方が神栖より有意に大きかった。Esm1とEsm6の2つのマイクロサテライト遺伝子座を両地域で比較したところ、神栖のほうが集団中に保持している対立遺伝子数がやや多く、地域ごとに特異的な対立遺伝子が存在していた。ヘテロ接合度は、Esm1では両地域で差がなかったが、Esm6では神栖より浮島のヘテロ接合率が低く遺伝的多様性がやや低い傾向が認められた。両地域の遺伝的類似度は0.72であり、比較的類似していた (表2)。雌雄とも親を捕獲できた11巣を解析したところ、4割の巣で婚外雛が確認され、24%の雛 (25羽) は番相手の雄の子ではなかった。また、

表2. 両調査地のコジュリンの遺伝的多様性とFAの比較

	神栖	浮島	合計
Esm-1			
対立遺伝子数	37	33	39
ヘテロ接合度 (Ho)	0.86	0.83	0.85
遺伝的多様性H'	4.68	4.32	4.72
遺伝的類似度Nei's I=			0.73
Esm-6			
対立遺伝子数	49	35	49
ヘテロ接合度 (Ho)	0.76	0.52	0.69
遺伝的多様性H'	5.00	4.51	5.04
遺伝的類似度Nei's I=			0.71
翼長のFA	0.35±0.24	0.68±0.36	P<0.05
ふしょ長のFA	0.10±0.06	0.09±0.07	有意差なし

利根川下流域ではトリオで繁殖し、番相手以外の雄が給餌に来る巣も観察された。

霞ヶ浦においてオオヨシキリは、0.01ha程度から2haを越えるヨシ原において繁殖をしていた。オオヨシキリの雄は、まず、大きいヨシ原から定着しはじめ、次に小さいヨシ原に定着した。ヨシ原のサイズと餌密度には相関が認められなかったものの、小さいヨシ原では繁殖成功率が低く、ほとんど雛を巣立たせることはできなかった。成鳥個体の翌年の帰還率も小さいヨシ原では低く、前年繁殖した個体が戻って来ない傾向が認められた。各ヨシ原のオオヨシキリの繁殖集団が保持している対立遺伝子数は、繁殖縄張り数が多いほど多くなり、ハーディー・ワインベルグ平衡に達しているが、小さいヨシ原では個体のサンプリング効果によって観察される対立遺伝子が決まってしまうため、平衡には達していない(表3)。ヨシ原間の距離が離れるにつれて繁殖集団間の遺伝的距離も離れる傾向にあり、近傍の大きな繁殖集団へ常時、個体が供給されていることが示唆された。次に、オオヨシキリの翼長とふしよ長のFAを解析した結果、FAの雌雄差は認められなかったが、8日令の巣内雛のFAは、成鳥より大きかった。ヨシ原間で巣内雛のFAには差が認められたが、ヨシ原サイズとは相関せず巣毎のばらつきによって差が生じていた。巣内育雛期の雛の栄養条件がFAにどのような影響を与えるかを残差と非同時孵化個体をもちいて解析した。残差分析の結果、平均より成鳥の悪い雛がFAが大きいという傾向は認められなかった。先に孵化した雛は、非同時孵化個体より有意に体重が重く、栄養条件が良いことは確認されたが、FAの差は有意ではなかった。ホモ接合の遺伝子座を持っている個体のほうが、ふしよ長のFAが小さい傾向が認められた。

一般的に、個体数が減少し、希少種になるにしたがって、分布が狭くなり個体群が分断化してくる。環境庁のレッドデータリストで絶滅危惧IBに指定されるオオセッカでは3つの繁殖集団しか確認されていないうえ、過去に繁殖個体群の絶滅と出現を頻繁に繰り返す典型的なメタ個体群構造¹⁶⁾をしている。マイクロサテライト多型が認められないのは、オオセッカの個体群が何度もボトルネックを経験しているためかもしれない。利根川水系下流域・東北地方北部・甲信越および阿蘇地方に局所的に分布するコジュリンは、オオセッカより分布が広く、個体群サイズも一桁は大きいため、絶滅危惧II類にされている。利根川水系下流域でコジュリンは波崎町から取手市にかけての利根川河川敷とその周辺の放棄水田および霞ヶ浦湖岸浮島に生息している。浮島と神栖は20km程度しか離れていず、標識個体の分散も2例確認されているため、遺伝子の交流は頻繁にあると考えられる。実際、遺伝的距離Dも0.33と両地域は遺伝的な類似度が高いことを示している。オオヨシキリは、小さなヨシ原でもやって来て繁殖するどこにでもいる種類であるが、霞ヶ浦内11箇所のヨシ原間の平均遺伝的距離Dは0.60となり、コジュリンよりもヨシ原間の遺伝的構造が分断化されている。これは、小さなヨシ原は生息個体数が少ないためサンプリング効果によって遺伝子頻度の組成が異なってしまうためである。調査個体数の20個体以上の大きいヨシ原間でみると平均遺伝的距離Dは0.30となり、コジュリンと同様に遺伝子交流は頻繁に起こっていると考えられる。ヨシ原間の距離が離れるにしたがって遺伝的距離も遠くなる傾向があるのと、小さいヨシ原では繁殖成功度がきわめて低いことを考えると、オオヨシキリでは大きな繁殖集団から、周辺の小さなヨシ原へ個体が供給されるシンク・ソース個体群構造¹⁷⁾をしていると考えられる。

コジュリンでは、周辺個体群である浮島において、Esm6遺伝子座のヘテロ接合率の低下と翼長のFAが高くなる傾向が認められたが、ふしよ長では差がなかった。オオヨシキリでは、繁殖

表3. 霞ヶ浦のヨシ原ごとのオオヨシキリの繁殖集団間の遺伝的多様性

遺伝子座	桜川	大室	大室 (小)	防 技 研	清 明 川	田 村 池	田 村 池 (小)	馬 掛	浮 島	浮 島 本 新	和 田 岬	霞 ヶ 浦 合 計
ヨシ原サイズ	0.8	1.1	0.1	0.2	2	0.3	0.3	0.3	44	0.1	0.3	
なわばり数(95)	26	26	4	7	51	7	9	3	186	3	5	
サンプル数	5	42	17	9	89	8	13	4	26	5	4	222
G61 対立遺伝子数	4	8	6	4	9	6	7	2	7	—	6	14
観察ヘテロ接合度	1.00	0.73	1.00	1.00	0.83	0.80	0.88	1.00	0.54	—	1.00	0.80
期待ヘテロ接合度	0.72	0.82	0.78	0.67	0.80	0.76	0.71	0.38	0.80	—	0.82	0.83
												N=97
G62 対立遺伝子数	3	8	7	4	17	5	6	2	8	6	2	17
観察ヘテロ接合度	0.00	0.76	0.89	1.00	0.79	0.75	0.75	1.00	0.27	1.00	1.00	0.74
期待ヘテロ接合度	0.61	0.73	0.81	0.72	0.84	0.78	0.80	0.50	0.78	0.82	0.44	0.85
												N=92
G7 対立遺伝子数	3	12	8	5	12	5	8	4	8	4	3	13
観察ヘテロ接合度	1.00	0.71	0.65	1.00	0.79	0.57	0.73	0.75	0.53	0.80	1.00	0.74
期待ヘテロ接合度	0.63	0.84	0.81	0.73	0.80	0.67	0.82	0.72	0.79	0.70	0.59	0.84
												N=222
合計 平均ヘテロ接合度	0.67	0.73	0.85	1.00	0.81	0.71	0.78	0.92	0.45	0.90	1.00	0.76

集団サイズおよび育雛中の栄養条件とFAの間に相関がみられず、これらの環境ストレスによってFAが生じている証拠は認められなかった。3つのマイクロサテライト遺伝子座のいずれかをホモ接合で持つ個体のFAが、それらをヘテロ接合で持つ個体よりFAが小さくなるという逆説的な結果が得られた。これからこの逆説的な結果を検証してみなければならないが、これが事実であればオオヨシキリのFAは遺伝的なバックグラウンドがあり遺伝子間不和合性によって生じているのかもしれない。いずれにせよ、個体群の遺伝的構造と左右対称性のゆらぎの関係は未だ検証してみる必要がある。

(5) イワヒバリ小個体群の維持機構と遺伝的多様性の低下をもたらすメカニズム

これまでの調査の結果、以下の事が明らかとなった。

- ・成鳥の乗鞍岳への帰還率は年平均65.6%（雄74.5%、雌56.7%）で、帰還した成鳥の95.0%は前年度に所属したグループへ再定着した。
- ・乗鞍岳で生産された雛及び若鳥の30.1%が、翌年乗鞍に帰還した。
- ・帰還した若鳥の56.9%が雄、43.1%が雌だった。
- ・グループは若鳥の移入（91.0%）と成鳥のグループ移籍（8.9%）により維持された。
- ・新規標識個体数は、年平均8.3羽だった。
- ・雄の配偶戦略は順位に依存し、最優位個体（ボス）は、産卵前の約一週間雌を防衛し、交尾を独占した。中順位の雄は、ボスの配偶者防衛期間の前後に多回交尾を試みた。低順位雄は一回の配偶機会に多回交尾を試みた。
- ・雌の卵受精期を最終卵産卵前の6日間と推定すると、一グループに所属する雌の卵受精期の総日数の72.4%はボス個体によって配偶者防衛されていた。
- ・雌も雄同様、高順位の個体ほど多くの雄との配偶機会を得ることができ、その結果、育雛期に多くの雄個体の世話を受けて繁殖成功度は高かった。
- ・雌雄とも年齢の上昇とともに順位を上げ（図3）、より成功度の高い配偶戦略を採用した。
- ・ボスになった雄個体の平均年齢は5.9歳、ボスになれなかった雄の平均年齢は2.2歳であった。
- ・ボスになった雌個体の平均年齢は4.3歳、ボスになれなかった雌の平均年齢は1.8歳であった。
- ・雌雄ともすべての個体が一生の間に必ずボスになれるわけではなく、そのほとんどはボスになる前に消失した。ボスになれた雄は175個体中38個体（21.7%）、雌は167個体中54個体（32.3%）であった。
- ・雄のボスの在位期間は平均3.4年（範囲1~7年）、雌のボスの在位期間は2.4年（範囲1~5年）で、雌雄とも一旦ボスの座につくと、長期にわたりその地位を維持した。

乗鞍岳で繁殖するイワヒバリ個体群は最優位個体の高い生残率と同一グループへの高い帰還率、若鳥の高い帰還率によって維持されている。足輪のついていない個体の数は毎年9羽程度で、それ以外の個体はすでに乗鞍岳で標識された個体だった。漂鳥あるいは渡り鳥では若鳥の出生場所への帰還率はおおむね5%以下である¹⁸⁾。イワヒバリが他の鳥類と比べて顕著に異なる点は、異常に高い若鳥の帰還率である。しかも帰還した若鳥の性比はほぼ一対一で、通常の鳥類のように雄に偏ることはない¹⁹⁾。これらの特徴が経年維持されれば、乗鞍岳のイワヒバリ個体群は、もっぱら乗鞍岳出身の個体によって補充されていくことになり、個体の遺伝的多様性の低下は免

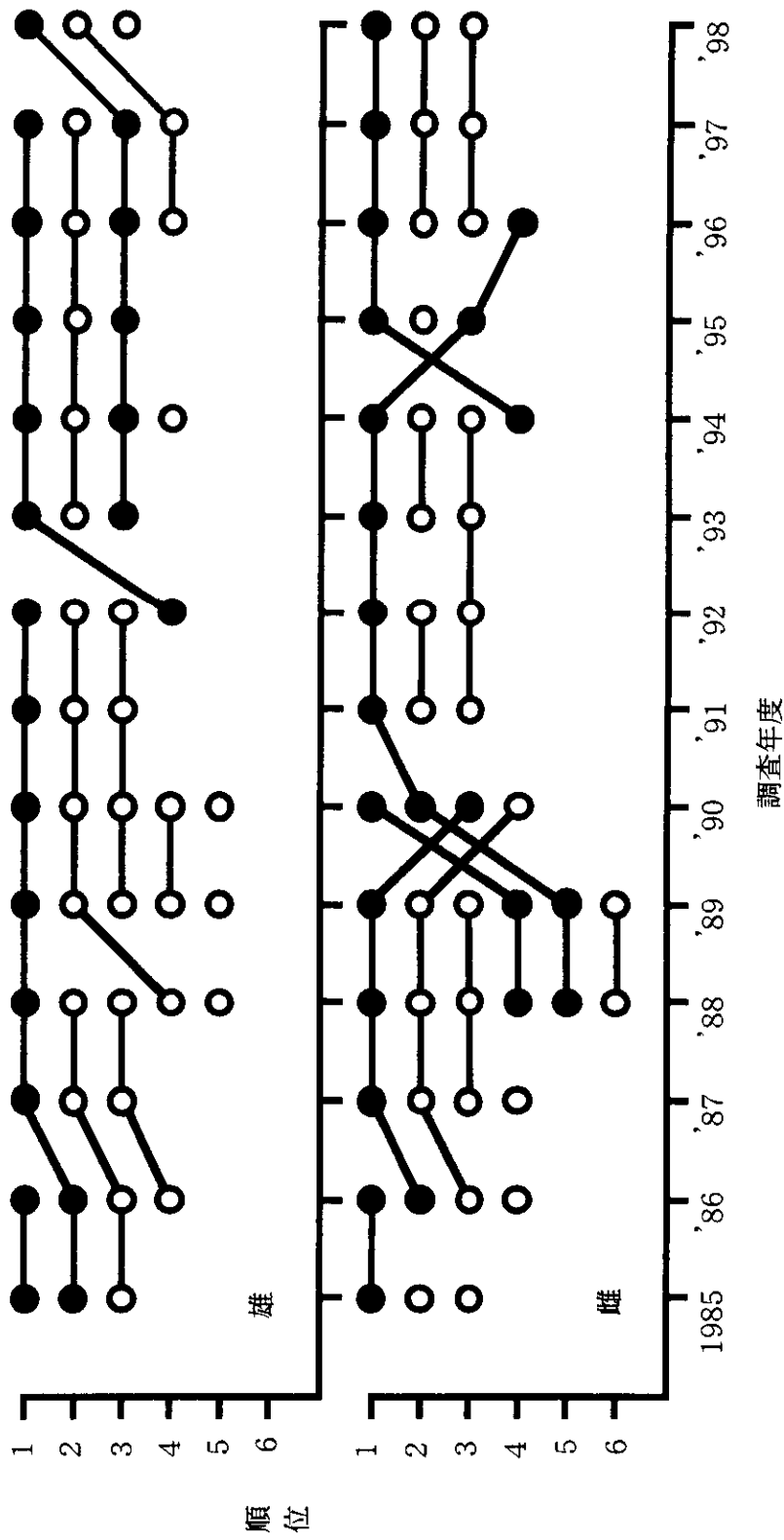


図3. Aグループに所属する雌雄の順位の経年変化. 同一個体を直線で結んである. 順位の数字は劣位ほど多くなる (順位1は最優位). 黒丸はボスになった個体、白丸はボスになれなかった個体を表わす。

れない。しかも、特定の個体が加齢とともに順位を上げ、一繁殖シーズンの繁殖成功を独占する。ボス個体は、数年にわたりその地位を維持し、その間グループ内の繁殖成功を独占した。こうしたイワヒバリ特有の繁殖システムは、上述した個体群維持の特性と相乗効果をもたらし、繁殖個体群の遺伝的多様性は一層低下することが考えられる。しかしながら、個体レベルで示唆された遺伝的多様性の低下が実際に遺伝子レベルの低下をもたらしているのか、低下した遺伝的多様性がイワヒバリの形態・繁殖成功率などにどのような影響を与えているのかは今後の課題として残された。

(6) エゾシカ集団における遺伝的多様性およびFA

PCR法を用いた塩基配列直接決定法で602塩基の配列を決定し、それぞれ個体の塩基の違いから、北海道集団は6つのD-loopハプロタイプ(a~fタイプ)に分けることができた。そのうちa・b・cタイプが優占していた。地理情報システムをもちいてD-loopタイプの北海道での分布マップを作製したところ、それぞれのハプロタイプの分布パターンは異なっていた(図4)。aタイプは広い分布を示したが、おもに道東地方に見られ、bタイプは道央から道東にかけて見られた。cタイプは日高地方および洞爺湖の中島に分布していた。dタイプは中央部から南にかけて点在し、eタイプおよびfタイプは少数のみみられた。優占していた3タイプ(a~cタイプ)の分布は北海道の針葉樹林帯の分布と一致した。このことから、北海道でのエゾシカの分布拡大が、針葉樹林帯を介して行われたと考えられた。

北海道集団の遺伝的多様性の程度を明らかにするために、3つのマイクロサテライト遺伝子座(OarFCB193・BOVIRBP・INRA040)の多型について千葉集団と比較した(表4)。千葉集団におけるINRA040($p=0.06$)を除く、全てのマイクロサテライト部位においてハーディー・ワインベルグ平衡が成立していた。エゾシカ集団における平均ヘテロ接合度($H_o=0.21\pm 0.11$)は、千葉集団のそれ($H_o=0.23\pm 0.09$)より多少低い値を示した。さらに、OarFCB193とBOVIRBPでのヘテロ接合度は、エゾシカ集団は千葉集団よりも低かった。そして、いずれのマイクロサテライト遺伝子座においてもエゾシカ集団の対立遺伝子数は千葉集団よりも少なかった。この結果はエゾシカ集団が過去に経験したボトルネックによって遺伝的多様性が低下しているものと考えられた。

各形質のサイズはいずれも、性的二型(雄>雌)と小型化(崩壊以前>崩壊後または斜里>崩壊以前)がみとめられた(表4)。FAの大きさは、下顎・枝角ともに個体群間および時系列間においても差はみられず、死体の年齢(生存期間)とFAとの間に相関はみられなかった。崩壊後の中島個体群において生体より死体で大きかった(表5)。死体の年齢(4~13才)とFAの大きさとの間に相関はみられず、老化以外の何らかの要因も影響していることが考えられる。

洞爺湖中島におけるエゾシカの成獣の体サイズは、1982年には北海道東部の良好な餌条件下のエゾシカと同程度であったが、その後急激な餌不足の進行とともに1984年の個体群崩壊直前には小型化した²⁰⁾。この場合の体サイズの小型化は餌制限によるものと考えられており、多くの有蹄類でも餌制限下にある個体群の体サイズが小さいことが知られている。本研究においても、崩壊後群の下顎の各計測値が他の2群より小さかったのは、餌不足による体サイズの小型化を反映したものと考えられる。

本研究で計測した形質では、集団サイズとFA、および生存期間とFAとの間に明瞭な関連は認められなかった。エゾシカは、明治時代に経験したボトルネックのために、分布域(北海道)

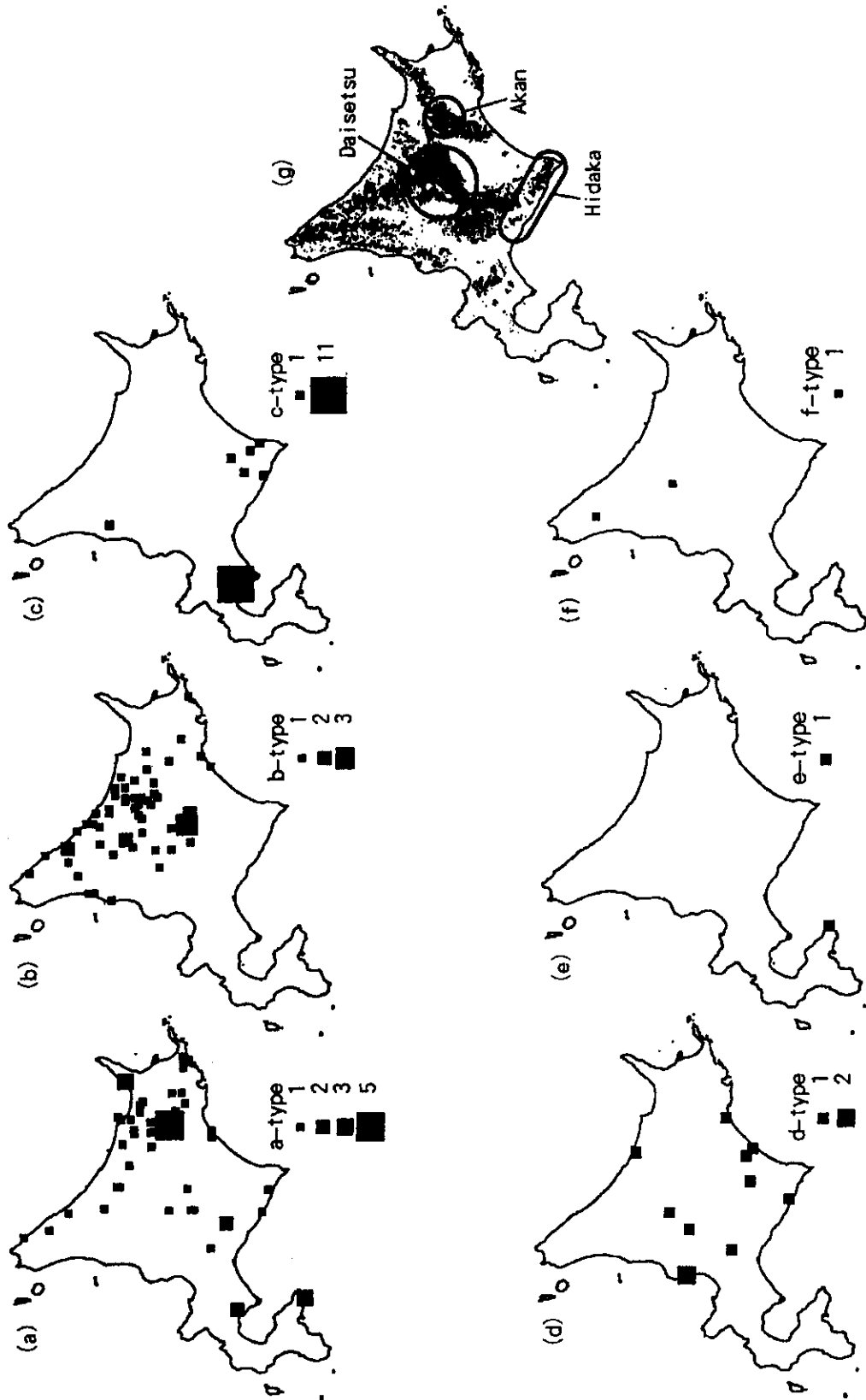


図4. ミトコンドリアDNA-Dループのハプロタイプの北海道における分布. 四角の大きさは頻度を表わす. (g)の円は主要な針葉樹林帯を表わす.

表4. 北海道と千葉のシカ集団におけるマイクロサテライト遺伝子座変異

遺伝子座		北海道	千葉	
OarFCB193	個体数	93	13	
	出現率 対立遺伝子	130	0.866	0.077
		128	0	0.077
		123	0	0.077
		109	0.134	0.769
	<i>h_o</i>	0.24	0.39	
	<i>h_e</i>	0.23	0.39	
BOVIRBP	個体数	108	13	
	出現率 対立遺伝子	144	1	0.962
		140	0	0.038
	<i>h_o</i>	0	0.08	
	<i>h_e</i>	0	0.07	
INRA040	個体数	100	13	
	出現率 対立遺伝子	240	0	0.038
		238	0	0.077
		202	0.32	0.808
		190	0	0.038
		188	0.68	0.038
	<i>h_o</i>	0.39	0.23	
	<i>h_e</i>	0.44	0.38	
3遺伝子座平均	個体数	100.33 ± 4.33	13.00 ± 0.00	
	対立遺伝子数	1.67 ± 0.33	3.67 ± 0.88	
	<i>H_o</i>	0.21 ± 0.11	0.23 ± 0.09	
	<i>H_e</i>	0.22 ± 0.13	0.28 ± 0.11	

対立遺伝子の名称は塩基数、*h_o*・*H_o*は観察ヘテロ接合度、*h_e*・*H_e*は期待ヘテロ接合度

表5. 中島・斜里エゾシカの形態測定値 (mm, 平均±標準偏差) . **, P<0.001; *, P<0.05

	中島		斜里	統計検定	
	崩壊以前	崩壊後		雌雄間	崩壊後と 他の2群
	雌 24個体 雄 33個体	雌 50個体 雄 29個体	雌 30個体 雄 24個体		
下顎					
下顎長	222.2±10.3	213.8±10.8	220.9±6.0	**	**
	236.2±10.0	226.1±7.3	236.4±6.5		
下顎高	119.9±9.2	110.9±7.1	117.8±4.4	**	**
	124.6±6.8	115.4±6.4	127.6±4.8		
歯隙長	57.0±4.0	53.4±4.2	55.5±2.8	**	**
	60.3±4.0	57.2±3.1	61.4±3.3		
臼歯列全長	96.8±4.2	94.0±5.2	97.9±2.8	**	**
	100.2±3.0	95.1±6.5	101.3±2.8		
小白歯列長	36.8±1.7	33.9±1.6	38.0±3.2	**	**
	36.9±1.7	34.2±3.8	38.0±2.3		
大白歯列長	59.6±4.6	58.6±2.2	59.2±3.3	**	*
	62.7±1.8	60.0±1.6	61.5±2.4		
角					
個体数	雌	-	-	-	
	雄	25	22	24	
角長	-	-	-	-	*
	525.7±111.0	509.5±84.8	626.4±131.3		
基部周長	-	-	-	-	*
	128.4±21.7	112.7±13.2	131.8±25.2		
角枝数	-	-	-	-	*
	6.9±1.0	6.4±0.9	8.0±0.6		

表6. FA値の標本間比較統計検定

	自然淘汰形質 (下顎)	性淘汰形質 (枝角)
遺伝子拡散		
斜里－崩壊以前	ns	ns
資源条件		
崩壊以前－崩壊後	ns	ns
斜里－中島	ns	ns
その他		
生体－死体	-	P < 0.05

ns、有意差なし

全域においても遺伝的多様性が低いことが示唆されている^{21), 22)}。したがって、中島個体群と斜里個体群の間の遺伝的変異の差は集団サイズの差に対して小さく、遺伝的要因によるFAには両集団間で顕著な差はないのかもしれない。この点は他地域のニホンジカ個体群との比較が今後の課題となろう。

(7) ニホンジカ地域集団の遺伝的多様性と近交弱勢との関係

集団サイズや分布が異なる9個の地域集団を対象にして、集団内の遺伝的多様性を検出するための遺伝マーカーを検索した。その結果、従来用いられてきたミトコンドリアDNAのハプロタイプでは集団内の多型がほとんど検出できないことが明らかになった²⁰⁾。一方、核ゲノム上の遺伝子ではMHC・マイクロサテライトともに個体ごとの遺伝的変異がみられた。しかし、MHC領域のDRB遺伝子では複数の遺伝子座が存在しているために、異なる遺伝子座の対立遺伝子を区別することは困難であった。適応度に関係する可能性があるラクトグロブリン・成長ホルモン各遺伝子の部分塩基配列の解析では変異が認められなかった。以上より、マイクロサテライト遺伝子が現時点では最も有効な遺伝マーカーであると判断された。微量のサンプルをもちいて多数のマイクロサテライト遺伝子座を迅速に検索するために、蛍光標識によるDNA internal labelingの方法を新たに開発した。

12種類のマイクロサテライト遺伝子座をもちいて、各地域個体群における遺伝子座ごとのヘテロ接合度を測定した。その結果、長崎集団でのみ平均ヘテロ接合度が低下していた。さらに特定の遺伝子座に注目した場合、地域ごとに異なる対立遺伝子が存在することが明らかとなった(図5)。例えば、兵庫・対馬・長崎で観察された対立遺伝子BL42.252は山口・島根・金華山では存在しない一方、金華山では他地域でみられない対立遺伝子BL42.26が観察された。さらに、集団間の遺伝的分化の指標となるRst値の最大値は、長崎—島根間の0.729であった。

続いて、金華山島の標本集団において、IHとmean d2の値が個体の生き残りにどのような関連をもっているのか、繁殖記録との対比をおこなった。まず、出生率と2歳前消失率はおおよそ

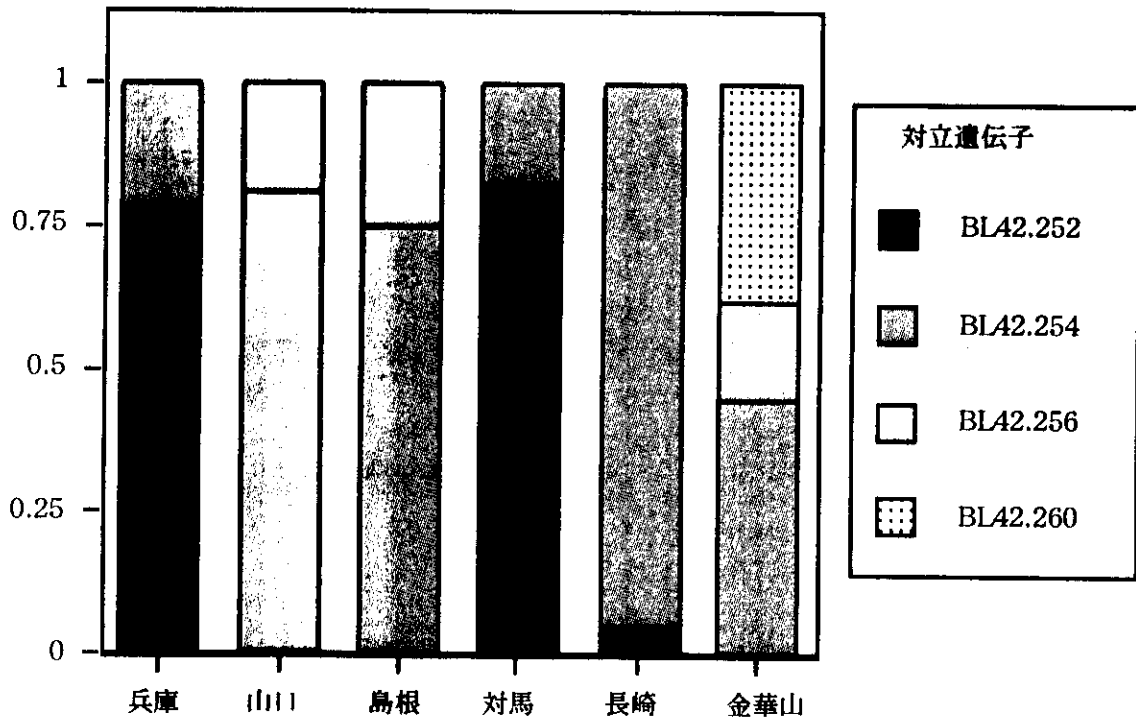


図5. ニホンジカ地域集団におけるBL42遺伝子座の対立遺伝子頻度

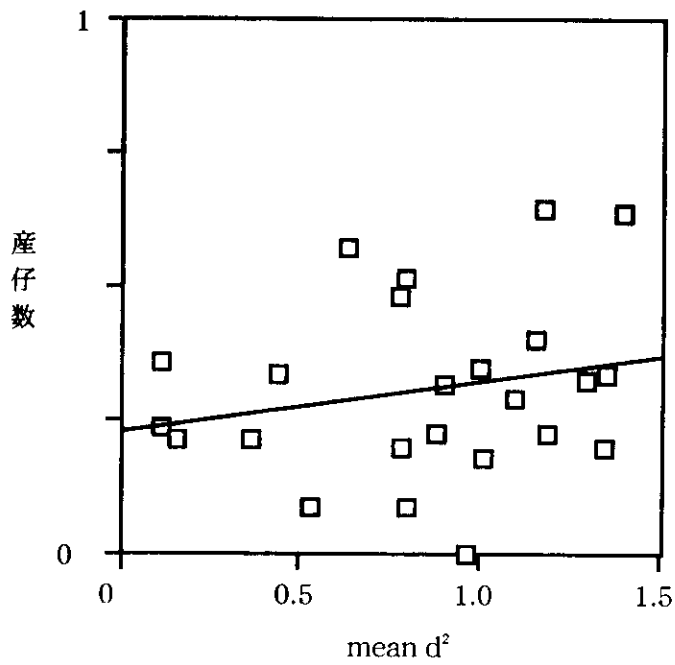


図6. 雌の平均 d^2 値と産仔ポイントの相関。縦軸、4年間の加重産仔数

逆の相関をしめした。2歳以前に消失した個体については、その大部分でDNAが保存されていた。そのため、これを利用して2歳前消失個体と生存個体とのIHとmean d2値の比較をおこなった。その結果、IH・mean d2ともに生存・死亡個体での有意差は認められなかった。一方、mean d2と雌の産仔数にはきわめて弱い正の相関が認められた(図6) ($p < 0.01$)。

本研究の結果より、ニホンジカの地域集団の遺伝的多様性は全体的には必ずしも低下していないことがあきらかになった。しかし、地域によっては長崎のように対立遺伝子の固定化が進行して、ヘテロ接合度が低下している場合も認められた。多様性の減少には先に述べたように集団サイズの減少が大きな原因となりうる。今回調査にもちいた地域集団のうち、最も集団サイズが小さいのは金華山島で総個体数が約550頭であり、ほかの地域集団はそれよりも10倍以上大きいと考えられる。しかし、遺伝的多様性の程度は現在の集団サイズとは相関しなかった。金華山島集団は長年にわたって金華山島でのみ維持されてきたという点で、孤立した小規模個体群であると考えられる。高槻ら²⁴⁾によると金華山島全体のニホンジカにたいする環境収容力は500頭程度であるという。このような限界的な生息環境のなかで、金華山島集団は1984年と1997年の2回にわたり大量死を経験した。これは遺伝学で想定するところのボトルネックに近い現象と考えられる。しかし、今回の調査であきらかになったように、マイクロサテライト遺伝子座の対立遺伝子頻度から判断するかぎりでは、かならずしも遺伝的多様性は減少していない。これはヘテロ接合度においても、金華山島集団と他地域の集団とで有意差がみられなかったこととも一致している。

遺伝学と保全生物学のこれまでの研究によって、個体ごとの遺伝的多様性と適応度は、理論的には相関関係があることが示唆されている²⁵⁾。しかし、野生生物の適応度に関連する遺伝子を同定してその変異を測定する試みは未だに成功していない。主要組織適合性抗原や成長ホルモン・ラクトグロブリンなどの遺伝子における多様性を測定することを本研究でも試みてきたが、突然変異率が中立的な遺伝子に比べて低いために、集団中での変異を検出することはできなかった。一方、次善の策としての中立遺伝子の使用が有効であるか否かは、どれくらいのマーカーが使用できるかに依存している。すなわち、中立的なマーカーであっても使用する数を増やせば、そのヘテロ接合度等はゲノム全体の近交度を知る目安にすることができると考えられる。

以上のような理由で、本研究ではマイクロサテライト遺伝子座を多数用いて、それから適応度に関連づけるための遺伝的多様性指標が得られるか、という問題を検討した。相関分析の結果からは、IHは上記のような指標としては不適切であることが明らかになった。一方、mean d2は適当な補正をおこなえば、個体の適応度を測るための遺伝学的指標となりうる可能性が示された。

本研究によってはじめて、ニホンジカ小規模集団では実際に遺伝的浮動によって対立遺伝子頻度が大きく年変動を示し、ときには特定の遺伝子が消失することが実際の現象として観察された。このように遺伝的変異の時間的変化を野生生物で追跡できるようになったことは、本研究の最も重要な成果である。今後、ニホンジカの地域集団を長期にわたり存続させていくためには、適切な保護管理を行う必要がある。しかし、今回の結果にみるように、それぞれの地域集団によって、その遺伝学的多様性の現状は異なっている可能性が考えられる。したがって遺伝学的管理においても、まず現状把握をおこない、それぞれの集団に対応した適切な方法を選択する必要がある。本研究で得られた遺伝学的知見は今後の保全対策に活用されるものと期待している。

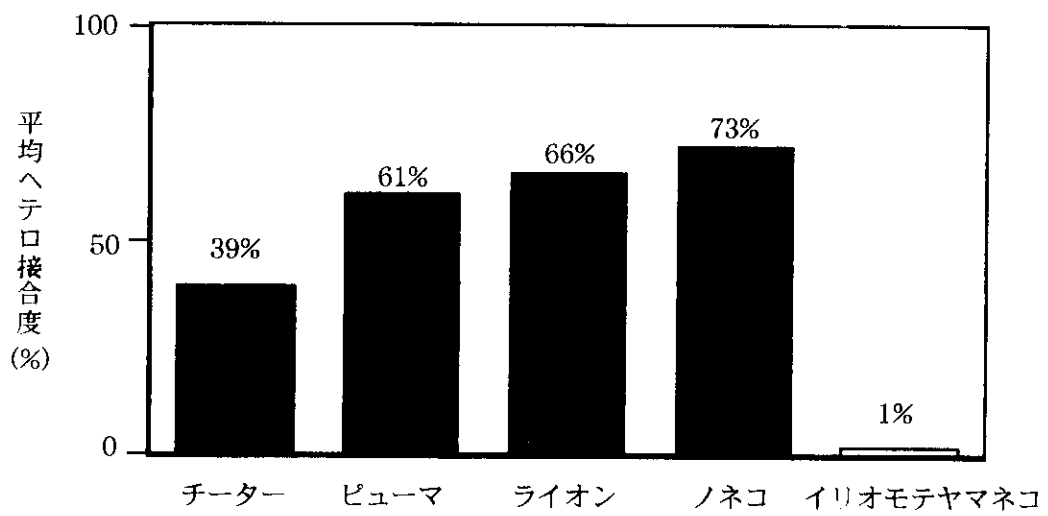


図7. ネコ科動物のマイクロサテライト遺伝子座多型

(8) イリオモテヤマネコの遺伝的多様性

イリオモテヤマネコのマイクロサテライト領域の多型を、平均ヘテロ接合度(%)および対立遺伝子の数にて評価し、他種のネコ科動物チーター・ピューマ・アフリカライオン・ノネコと比較した結果を図7に示す。また、イリオモテヤマネコのMHCクラスI領域の多型を調べた結果、少なくとも50%以上の個体がヘテロ接合体であり、塩基置換の多くがペプチド認識部位における置換であり、その多くが異義塩基置換であることが明らかになった。

本研究の対象としたイリオモテヤマネコはその生息数が100個体前後と推定されており、近年の大規模な人為的な生息環境の攪乱に加え、小集団固有の様々な絶滅促進要因によってその存続が最も危惧されている種のひとつである。その絶滅促進要因のひとつに、集団内の遺伝的多様性の減少があげられる。この集団の遺伝的多様性をマイクロサテライトDNAとよばれる中立な遺伝マーカーによって評価したところ、他種と比較しても極めて低いことが明らかになった。このことはイリオモテヤマネコ集団の遺伝的多様性がかなり低いレベルであることを意味し、環境変化に対する適応の可塑性が失われている可能性が高いことを示唆する。しかしながら、MHC遺伝子に関する限りは、多様性が維持されていることが明らかになった。これは、MHC遺伝子にパラサイト介在下の平衡淘汰という特殊な淘汰圧が作用した結果であろう。いづれにしても、この集団がかつて経験してこなかった人為的な環境の攪乱を極力避けることが、この集団の維持にとって望ましいことは確かである。

4. 本研究で得られた成果

本研究の成果が意味するところはそれぞれの考察で詳しく触れられているが、ここでは成果を生かす上で全体的に見て強調されるべきことをまとめる。

本研究が目標としたことの一つに遺伝的変異の現状解明がある。酵素多型やマイクロサテライト・ミトコンドリア・MHC遺伝子のDNAを遺伝マーカーに用いて解明が行なわれた。一般的に集団が小さく個体数が少なければ遺伝的変異も低いと言われるが、それに矛盾しないのはオオバミミナグサ・コジュリン・イリオモテヤマネコ(マイクロサテライト遺伝子)の例だけで、チャボホトトギス・ウスバシロチョウ・エゾシカ・ニホンジカでは集団の大きさに関わりがない、あるいは逆の傾向が認められた。また遺伝子の性質によって遺伝的変異の維持される程度が異なり、イリオモテヤマネコのMHC遺伝子では変異が維持されていた。マイクロサテライトなどの遺伝子と異なり、MHC遺伝子は選択圧を受ける非中立の遺伝マーカーなので、この結果は充分期待できたものではあるが、その維持機構解明は今後の取り組みが急がれる課題である。

チャボホトトギス・エゾシカ・イリオモテヤマネコの例のようにそれぞれの集団の遺伝的変異について歴史的あるいは進化的要因を考慮に入れる必要が広く認識されねばならないが、このような変異は歴史的・進化的に獲得されてきた結果その集団の存続と矛盾しない範囲で安定している可能性も考えられる。一方では、イトヨの例のような人的要因による集団縮小が遺伝的変異の低下につながるならば、生物の側にはそのような状態に適応する能力が備わっていない可能性も生じると考えられる。すなわち、遺伝的変異はそれを測定するだけでなく、その成立過程・要因についても対象野生生物集団に即して解明する必要があることを本研究の結果は示している。その点でイワヒバリの克明な調査例のように、個体の段階まで降りて集団の属性を調べることが常に調査項目の一つとして選択肢の中に入れておく必要がある。

本研究では、外部形態の左右対称性のゆらぎ、いわゆるFAを個体・個体群の質あるいは遺伝的変異の指標として有効であると考えて重点的に調査を進めてきた。その結果、ウスバシロチョウ・イトヨではFAと遺伝的変異あるいは集団の大きさとの間に負の相関が認められたので、集団の質を評価する際のFAの有用性は示された。しかしながら、オオヨシキリ・エゾシカではそのような相関は認められなかった。FAを測る形質・発育段階をどのように選ぶかは論議のあるところだが、野生生物の絶滅可能性を評価する上で有用な項目としてFAを取り扱うためには特定集団FAの長期モニタリングやより多くの形質についてのFAの測定・評価などといった作業が今後必要である。

引用文献

- 1) Nishiumi I. et al. (1996) Paternal expenditure is related to brood sex ratio in polygynous great reed warblers. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 39: 211-217.
- 2) Hanotte et al. (1994) Isolation and characterization of microsatellite loci in a passerine bird: the reed bunting *Emberiza schoeniclus*. *Molecular Ecology* 3: 529-530.
- 3) Nakamura M (1990) Cloacal protuberance and copulatory behavior of the Alpine Accentor (*Prunella collaris*). *Auk* 107: 284-295.
- 4) Abernethy K (1994) The establishment of a hybrid zone between red and sika deer (genus *Cervus*). *Molecular Ecology* 3: 551-562.
- 5) Vaiman D, Mercier D, Moazami-Goudarzi K, Eggen A, Ciapolini R, Leingle A, Velmala R, Kaukinen J, Varvio SL, Martin P, Leziel H & Guin G (1994) A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping and polymorphism. *Mammalian Genomes* 5: 288-297.
- 6) Menotti-Raimond M & O'Brien SJ (1995) Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. *Journal of Heredity* 86: 319-322.
- 7) Yamane A (1998) Male reproductive tactics and reproductive success of group-living feral cat (*Felis catus*). *Behavioural Processes* 43: 239-249.
- 8) Yuhki N & O'Brien SJ (1994) Exchange of short polymorphic DNA segment predation in feline major histocompatibility complex class I genes. *Journal of Molecular Evolution* 39: 22-33.
- 9) Watt WB (1983) Adaptation at specific loci. II. Demographic and biochemical elements in the maintenance of the *Colias* PGI polymorphism. *Genetics* 103: 691-724.
- 10) Watt WB, Cassin RC & Swan MS (1983) Adaptation at specific loci. III. Field behavior and survivorship differences among *Colias* PGI genotypes are predictable from in vitro biochemistry. *Genetics* 103: 725-739.
- 11) Watt WB, Carter PA & Blower SM (1985) Adaptation at specific loci. IV. Differential mating success among glycolytic allozyme genotypes of *Colias* butterflies. *Genetics* 109: 157-175.
- 12) Watt WB, Carter PA & Donohue K (1986) Females' choice of "good genotypes" as

- mates is promoted by an insect mating system. *Science* 233: 1187-1190.
- 13) Watt WB (1992) Eggs, enzymes, and evolution: natural genetic variants change insect fecundity. *Proceeding of national academic science of U. S. A.* 89: 10608-10612.
 - 14) Bensch et al. (1997) Isolation and characterization of microsatellite loci in a *Phylloscopus* warbler. *Molecular Ecology* 6:91-92.
 - 15) Primmer CR et al. (1995) A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5: 365-378.
 - 16) Gilpin ME & Hanski I (1990) Metapopulation dynamics: Empirical and theoretical investigations. *Biological Journal to the Linnean Society* 42: 1-336.
 - 17) Pulliam HR (1988) Source, sinks, and population regulation. *American Naturalist* 132:652-661.
 - 18) Weatherhead PJ and Forbes MRL (1994) Natal philopatry in passerine birds: genetic or ecological influences? *Behavioral Ecology* 5: 426-433.
 - 19) Greenwood PJ (1980) Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour* 28: 1140-1162.
 - 20) Kaji K, Koizumi T & Ohataishi N (1988) Effects of resource limitation on the physical and reproductive conditions of sika deer on Nakanoshima Island, Hokkaido. *Acta Theriologica* 33: 187-208.
 - 21) Nagata J, Masuda R, Kaji K, Kaneko M & Yoshida MC (1998a) Genetic variation and population structure of the Japanese sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido Island, based on mitochondrial D-loop sequences. *Molecular Ecology* 7: 871-877.
 - 22) Nagata J, Masuda R, Kaji K, Ochiai K, Asada M & Yoshida MC (1998b) Microsatellite DNA variations of the sika deer, *Cervus nippon*, in Hokkaido and Chiba. *Mammal Study* 23: 95-101.
 - 23) Tamate HB, Tatsuzawa S, Suda K, Izawa M, Doi T, Sunagawa K, Miyahira F & Tado H (1998) Mitochondrial DNA variations in local populations of the Japanese sika deer, *Cervus nippon*. *Journal of Mammalogy* 79: 1396-1403.
 - 24) Takatsuki S, Suzuki K & Suzuki I (1994) A mass-mortality of sika deer on Kinkazan Island, northern Japan. *Ecological Research* 9: 215-223.
 - 25) Bruford MW, Cheesman DJ, Coote T, Green HAA, Haines SA, O'Ryan C & Williams TR (1996) Microsatellites and their application to conservation genetics. Pp. 278-297 in Smith TB & Wayne RK (eds.), *Molecular Genetic Approaches in Conservation*, Oxford University Press, New York.

【研究成果の発表状況】

(1) 口頭発表

- ①堀江佐知子、増田理子、矢原徹一、牧雅之：第60回日本植物学会大会大会（1996）
「絶滅危惧植物ゲンカイミミナグサにおける RAPD 多型」
- ②牧雅之：第4回 TOYAMA 植物フォーラム（1996）

- 「野生植物の交配システムと植物園における保全」
- ③牧雅之、麻田雄志：第27回日本植物分類学会大会（1997）
「地域限定種ナンピイノデの遺伝的多様性」
- ④牧雅之：第61回日本植物学会大会（1997）
「絶滅危惧植物イソノギクの遺伝的多様性」
- ⑤牧雅之、森田裕子、笈木秀治、高橋弘：第28回日本植物分類学会大会（1997）
「キバナノホトトギス節における酵素多型変異」
- ⑥土田浩治：第46回日本生態学会大会シンポジウム-遺伝的変異は集団の絶滅リスクにどう影響するか（1999）
「ヘテロ接合度とFA」
- ⑦高村健二：第44回日本生態学会大会（1997）
「アカムシユスリカの交尾雄の翅長とFA」
- ⑧高村健二、森誠一：第46回日本生態学会（1999）
「イトヨ類淡水魚個体群の遺伝的多様性の経時的変化」
- ⑨H. Nagata and H. Yoshida : 6th International Behavioural Ecology Congress (1996)
“The relationship between patch quality and fluctuating asymmetries in Great Reed Warbler, *Acrocephalus arundinaceus*”
- ⑩永田尚志、ソーディ、N.、山根明弘：第15回日本動物行動学会大会（1996）
「コジュリン雄の配偶者防衛行動とその効果」
- ⑪永田尚志、ソーディ、N.：1997年度日本鳥学会大会（1997）
「利根川下流域のコジュリンにみられた婚外交尾」
- ⑫永田尚志、A. Dyrz、吉田保志子：第45回日本生態学会大会（1998）
「オオヨシキリにおける左右対称性のゆらぎとヨシ原の質」
- ⑬H. Nagata and N. S. Sodhi : 7th International Behavioural Ecology Congress (1998)
“Extra-pair paternity and mate guarding behaviour in the Japanese Reed Bunting”
- ⑭H. Nagata and N. S. Sodhi : 22nd Int. Ornith. Congress (1998)
“Extra-pair paternity and paternity assurance behaviour in the Ochre-rumped Bunting”
- ⑮A. Dyrz and H. Nagata : 22nd International Ornithological Congress (1998)
“Effect of human activities on breeding ecology of the Eastern Great Reed Warbler”
- ⑯永田尚志：1998年度日本鳥学会大会シンポジウム-鳥類学におけるDNA研究（1998）
「分子生物学的手法の保全生物学への応用」
- ⑰中村雅彦：第43回日本生態学大会（1996）
「イワヒバリの多夫多妻繁殖システム」
- ⑱窪田治夫、中村雅彦：1996年度日本鳥学会大会（1996）
「人為給餌が非繁殖期のヤマガラ社会行動に与える影響」
- ⑲中村雅彦：1997年度日本鳥学会大会（1997）
「12年間の標識結果：イワヒバリの生涯繁殖成功度はすべての個体で等しいか？」
- ⑳岡徹、中村雅彦：1997年度日本鳥学会大会（1997）

- 「島状生息地における面積、樹木率と鳥の種数・個体数の関係」
- ②清水義雄、中村雅彦：1997年度日本鳥学会大会（1997）
「カモ科鳥類3種の餌資源をめぐる三角関係」
- ③田嶋一善、中村雅彦：第6回日本動物行動学会大会（1998）
「ツバメの雌雄の給餌回数を決定する要因はなにか？」
- ④中村雅彦：第16回日本動物行動学会大会（1998）
「オスとオス親のジレンマ—イワヒバリの場合—」
- ⑤中村雅彦：1998年度日本鳥学会大会（1998）
「イワヒバリの雌は、交尾相手にどのような雄を選ぶか？」
- ⑥古澤博之、中村雅彦：第17回日本動物行動学会大会（1998）
「カブトムシの雌雄はどのような相手と交尾するか？」
- ⑦田嶋一善、中村雅彦：第17回日本動物行動学会大会（1998）
「ツバメの給餌回数を決定する要因は何か？」
- ⑧中村雅彦：第46回日本生態学会（1999）
「14年間の標識結果：イワヒバリの生涯繁殖成功率は全ての個体で等しいか？」
- ⑨H. B. Tamate：The 4th International Deer Biology Congress, (1998)
“Current genetic status of sika deer in Japan”
- ⑩H. B. Tamate：International Symposium The Ryukyu Islands (1998)
“Molecular phylogeny of sika deer in Ryukyu Islands”
- ⑪青野英雄、玉手英利：第67回日本動物学会大会（1996）
「ニホンジカ個体群のPCR-SSCP分析」
- ⑫玉手英利：1998年度日本哺乳類学会大会（1998）
「ニホンジカ個体群の遺伝学的構造」
- ⑬細井栄嗣ら：1998年度日本哺乳類学会大会（1998）
「中国地方におけるニホンジカの遺伝的多様性」

（2）論文発表

- ①M. Maki and T. Yahara：Genes and Genetic Systems, 72, 239-242 (1997)
“Spatial structure of genetic variation in a population of the endangered plant *Cerastium fischerianum* var. *molle* (Caryophyllaceae)”
- ②牧雅之：遺伝, 別冊9号「生物の多様性とその保全」, 23-30 (1997)
「遺伝子レベルから見た生物多様性とその保全」
- ③M. Maki and H. Morita：International Journal of Plant Sciences, 159, 148-152, (1998)
“Genetic diversity in island and mainland populations of *Aster spathulifolius* (Asteraceae)”
- ④M. Maki and Y. Asada：Heredity, 80, 604-610 (1998)
“High genetic variability revealed by allozymic loci in the narrowly restricted fern, *Polystichum otomasui* (Dryopteridaceae)”
- ⑤A. Soejima, M. Maki and K. Ueda：Genes and Genetic Systems, 73, 21-29 (1998)

- “ Genetic variation in relic and isolated populations of *Chionanthus retusus* (Oleaceae) of Tsushima Island and the Tono region, Japan”
- ⑥ K. Inoue, N. Kuramoto, M. Maki, M. Masuda and I. Washitani: *Ecological Research*, 13, 141–150 (1998)
 “ Identification of conservation measures to protect the Japanese endangered plant species *Aster kantoensis*”
- ⑦ K. Inoue, M. Masuda and M. Maki : *Journal of Heredity*, 89, 559–562 (1998)
 “ Inbreeding depression and outcrossing rate in the endangered autotetraploid plant *Aster kantoensis* (Asteraceae)”
- ⑧ M. Maki : *Plant Systematics and Evolution*, in press (1999)
 “ Genetic diversity in the threatened insular endemic plant *Aster asa-grayi* (Asteraceae)”
- ⑨ M. Maki, H. Morita, S. Oiki and H. Takahashi : *American Journal of Botany*, 86, 287–292, (1999)
 “ The effect of geographic range and dichogamy on genetic variability and population genetic structure in *Tricyrtis section Flavae* (Liliaceae)”
- ⑩ M. Maki and S. Horie : *Molecular Ecology*, 8, 145–150, (1999)
 “ RAPD markers revealed less genetic variation in the endangered plant *Cerastium fisherianum* var. *molle* than in its widespread congener *C. fisherianum* var. *fisherianum* (Caryophyllaceae)”
- ⑪ K. Takamura: *Behavioral Ecology*, in press (1999)
 “Wing size and asymmetry of male *Tokunagayusurika akamusi* chironomid midges performing alternative mating tactics”
- ⑫ N. S. Sodhi and H. Nagata: *Journal of Ethology*, 14, 145–149 (1996)
 “ Paternity assurance behaviour of the Japanese Reed Bunting (*Emberiza yessoensis*)”
- ⑬ N. S. Sodhi, G. F. Bennet and H. Nagata: *Japanese Journal of Ornithology*, 45, 2, 115–117 (1996)
 “ Absence of blood parasites in Japanese Reed Bunting *Emberiza yessoensis*”
- ⑭ 永田尚志 : 山階鳥類研究所報告, 29, 27–42 (1997)
 「オオセッカの現状と保全への提言」
- ⑮ G. Fujita and H. Nagata: *Journal of the Yamashina Institute for Ornithology*, 29, 43–49 (1997)
 “ Preferable habitat characteristics of male Japanese Marsh Warbler *Megarulus pryeri* in breeding season at Hotoke-numa reclaimed area, northern Honshu, Japan”
- ⑯ H. Nagata and H. Yoshida : *Journal of the Yamashina Institute for Ornithology*, 29, 50–56 (1997)
 “ Some notes on the wintering ecology of Japanese Marsh Warblers, *Megalurus pryeri*, at two sites around Lake Kasumigaura”

- ⑰ H. Nagata and N. S. Sodhi : *Ostrich*, 69, 262 (1998)
 “ Extra-pair paternity and paternity assurance behaviour in the Ochre-rumped Bunting”
- ⑱ A. Dyrce and H. Nagata : *Ostrich*, 69, 283 (1998)
 “ Effect of human activities on breeding ecology of the Eastern Great Reed Warbler”
- ⑲ N. S. Sodhi, R. D. Adlard, H. Nagata and A. U. Kara : *Japanese Journal of Ornithology*, 47, 63-65 (1999)
 “ Low prevalence of blood parasites in six *Emberiza* species in Japan”
- ⑳ 永田尚志 : 私たちの自然, 441, 6-9 (1999)
 「シリーズ「この鳥を守ろう」の現在、第38回オオセッカ-限られた地域でのみ繁殖-」
- ㉑ 永田尚志 : 日本鳥学会誌, 47, 印刷中 (1999)
 「分子生物学的手法の鳥類保全への応用」
- ㉒ M. Nakamura and Y. Ueuma : *Journal of the Yamashina Institute for Ornithology*, 28, 9-18 (1996)
 “ Comparative feeding ecology of the Alpine Accentor *Prunella collaris* on Mt. Hakusan and Mt. Norikura”
- ㉓ M. Nakamura, Y. Matsuzaki and H. Ootaka : *Japanese Journal of Ornithology*, 45, 71-82 (1996)
 “ Social unit of the Alpine Accentor *Prunella collaris* in the non-breeding season”
- ㉔ M. Nakamura and Y. Ueuma : *Annual Report of the Hakusan Nature Conservation Center*, 24, 15-21 (1997)
 “ Distribution and abundance of the Alpine Accentor *Prunella collaris*. Breeding in the Hakusan Mountain Range”
- ㉕ M. Nakamura : *Animal Behaviour*, 55, 259-275 (1998)
 “ Multiple mating and cooperative breeding in polygynandrous alpine accentors. I. Competition among females”
- ㉖ M. Nakamura : *Animal Behaviour*, 55, 277-289 (1998)
 “ Multiple mating and cooperative breeding in polygynandrous alpine accentors. II. Male mating tactics”
- ㉗ M. Nakamura and H. Kubota : *Journal of Avian Biology*, 29, 201-205 (1998)
 “ Food supply in early spring and stability of pair bonds in the Varied Tit *Parus varius*”
- ㉘ M. Nakamura and S. Kimura : *Bulletin of Joetsu University of Education*, 18, 301-308 (1998)
 “ Effect of site fidelity on cooperative breeding in the Long-tailed Tit *Aegithalos caudatus*”
- ㉙ H. Kubota and M. Nakamura : *Ibis*, 141, in press (1999)
 “ Effects of supplemental food on intra- and inter-specific behaviour of the Varied

Tit *Parus varius*”

- ⑩ J. Nagata, R. Masuda, K. Kaji, M. Kaneko and M. C. Yoshida : *Molecular Ecology*, 7:871-877 (1998)
“ Genetic variation and population structure of the Japanese sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido Island, based on mitochondrial D-loop sequences”
- ⑪ J. Nagata, R. Masuda, K. Kaji, K. Ochiai, M. Asada and M. C. Yoshida : *Mammal Study*, 23, 95-101 (1998)
“ Microsatellite DNA variations of the sika deer, *Cervus nippon*, in Hokkaido and Chiba”
- ⑫ H. B. Tamate, S. Tatsuzawa, K. Suda, M. Izawa, T. Doi, K. Sunagawa, F. Miyahira and H. Tado : *Journal of Mammalogy*, 79, 1396-1403 (1998)
“ Mitochondrial DNA variations in local populations of the Japanese sika deer, *Cervus nippon*”
- ⑬ M. Fukushima et al. : *J. Radioanalytical Chemistry and Nuclear Chemistry*, 239, 595-599 (1999)
“ Activation analysis of trace metals in several kinds of tissues of even-toed ungulates.
- ⑭ A. Yamane, T. Doi and Y. Ono : *Journal of Ethology*, 14, 35-44 (1996)
“ Mating behaviour, courtship rank and mating success of male feral cat (*Felis catus*)”
- ⑮ A. Yamane, J. Emoto and N. Ota : *Applied Animal Behaviour Science*, 52, 119-127 (1997)
“ Factors affecting feeding order and social tolerance to kittens in the group-living feral cat (*Felis catus*)”
- ⑯ A. Yamane : *Behavioural Processes*, 43, 239-249 (1998)
“ Male reproductive tactics and reproductive success of the group-living feral cat (*Felis catus*)”
- ⑰ A. Yamane : *Ecology, Ethology and Evolution*, in press
“ Male homosexual mounting in the group-living feral cat (*Felis catus*)”

(3) 出願特許、受賞等
なし