

F-1 野生生物集団の絶滅プロセスに関する研究

(4) 数理モデルによる絶滅プロセスの総合的解析

② 希少哺乳類の保存可能最小集団サイズに関する研究

研究代表者 森林総合研究所東北支所保護部 三浦 慎悟

農林水産省森林総合研究所

東北支所	保護部部長	三浦慎悟
森林生物部	鳥獣管理研究室	堀野眞一
関西支所	鳥獣研究室	齊藤 隆
森林生物部	鳥獣生態研究室	山田文雄
東北支所	鳥獣研究室	中村充博

平成8～10年度合計予算額 17,830千円
(平成10年度予算額 6,033千円)

〔要旨〕下北半島ツキノワグマ個体群を対象として MVP（生存可能最小集団サイズ）を求めるとともに、さらに各種パラメータの評価を加えて PVA（個体群存続可能性分析）を進めた。現在の有害駆除のレベルを下げるのが保全上の効果と実現可能性の両面から最も優先順位が高いことを指摘した。希少野生動物であるアマミノクロウサギを対象とした保全生物学的研究を行うことを目的に、ラジオテレメトリーによる行動圏サイズと活動性を明らかにし、さらに DNA 塩基配列変異分析による遺伝的多様性の検討を行った。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を用いて、エゾヤチネズミ (*Clethrionomys rufocanus*) の実験個体群の遺伝的多様性の変動をモニターし、遺伝的多様性の変動に係わる婚姻形態、近親交配の起きる頻度、近親交配を避ける機構などを解析した。東北地方と北海道のクマゲラ個体群間の遺伝的な関係を調べることで、遺伝的多様性の現状を把握するため、近縁種のキツツキ類の血液や細胞、また、クマゲラでは血液や細胞が手に入らないので、糞や剥製の羽軸からの DNA 抽出を行い、既に報告されているニワトリのミトコンドリア DNA からプライマーをデザインし、PCR 法を行い、塩基配列を決定した。

〔キーワード〕希少野生動物、生存可能最小個体群サイズ、シミュレーションモデル、人口学的要因、遺伝学的要因

1. 序

野生生物が絶滅に至る主要要因は生息地の破壊・消失にあるが、生息地保護だけでは生物の絶滅を回避できない。生息地の破壊消失に伴う少数集団化した生物を絶滅に導く機構として、人口学的要因、遺伝学的要因、および環境要因があげられる。この研究では希少哺乳類を中心に生存可能最小集団サイズの試算するためのモデルづくりを行うために、人口学的、遺伝学的変動とそ

の要因を小哺乳類実験個体群と大型哺乳類及び希少種を対象とし、シミュレーションモデルを検討する。

2. 研究内容

1) ツキノワグマにおける生存可能最小集団サイズ

① 研究目的

下北半島ツキノワグマ個体群を対象として MVP（生存可能最小集団サイズ）を求めるとともに、さらに各種パラメータの評価を加えて PVA（個体群存続可能性分析）を進めた。現在の有害駆除のレベルを下げるのが保全上の効果と実現可能性の両面から最も優先順位が高いことを指摘した。

② 材料および方法

ア. モデル

筆者らはツキノワグマ個体群の数値モデルを作成し、主として MVP の推定という手法により絶滅の危険性を評価する研究を続けてきた(平成5年度～平成7年度報告書参照)。MVP(Minimum Viable Population size)とは、当該の個体群が今後一定期間、少なくともある一定の確率で存続するのに必要な最低限の個体数と定義され¹⁾、個体群の保全指針を策定するための基礎的な指標として重要視されている。本研究では MVP 評価の手法を基本としつつ、さらに各種パラメータの評価を加えて個体群存続可能性分析(PVA: Population Viability Analysis)を進めた。

ツキノワグマの数値モデルにおいて重要な要素は餌環境のゆらぎである。前期で作成した個体群モデルは一般的なクマ個体群の振る舞いを明らかにするため、特定の具体的な生息地を想定せずシミュレーション計算をおこなうものであった。しかし、本研究は現実の個体群に適用してその保全に役立てるのが目的であるから、今期はいくつか現実の個体群を対象としてモデルに肉付けし、個体群存続可能性との関係を分析した。

まず、これまでの一般モデルに含まれていなかった環境収容力を組み込んだ。通常、環境収容力は餌資源量にしたがって決まると考えられる動物が多い。しかし、ツキノワグマは個体間距離を大きく保とうとする性質が非常に強く、このことが環境収容力を決めている可能性が高いと考えられる。そうであれば、生息地面積が環境収容力の決定要因となる。一定面積当たり何頭のクマが生息できるのかを示すデータは乏しいが、いくつかの生息地における密度調査結果^{2, 3, 4}を検討したところ 0.2 頭/km² が上限であると推定することができた。ツキノワグマの環境収容力に影響する要因が他にも存在する可能性は否定できないものの、ここでは生息地面積が主たる決定要因であると仮定して議論を進める。ところで、生息地面積は長年月の間には変わる可能性がある。日本の森林の多くは過去 100 年間に主として天然広葉樹林から人工針葉樹林へと大幅な組成の変化を経験した。今後 100 年間にも同様の変化が起こらないという保証はない。そのため、さまざまな環境収容力について個体群存続率を求め比較した。

また、ツキノワグマは個体数が減少した現在でも 2 種類の捕獲が続けられている。ひとつは自由意志による狩猟であり、もうひとつは有害鳥獣駆除の制度に基づく捕獲である。その数は日

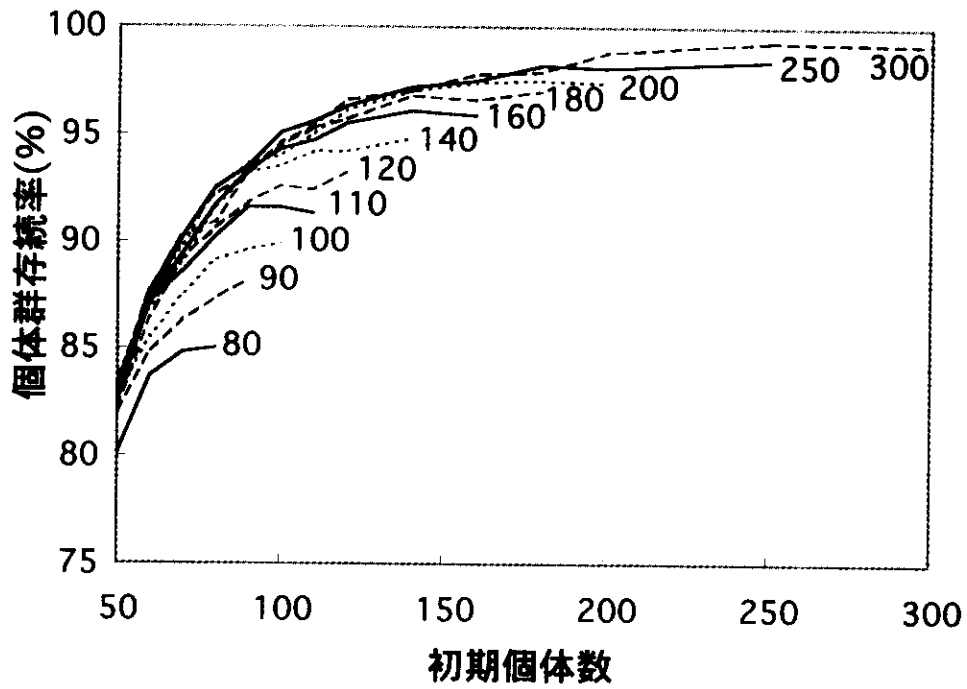


図1. 環境収容力と初期個体数の関係. 環境収容力 300 頭以外のグラフが途中で切れているのは, いかなる場合も初期個体数が環境収容力を超えないようにしたため.

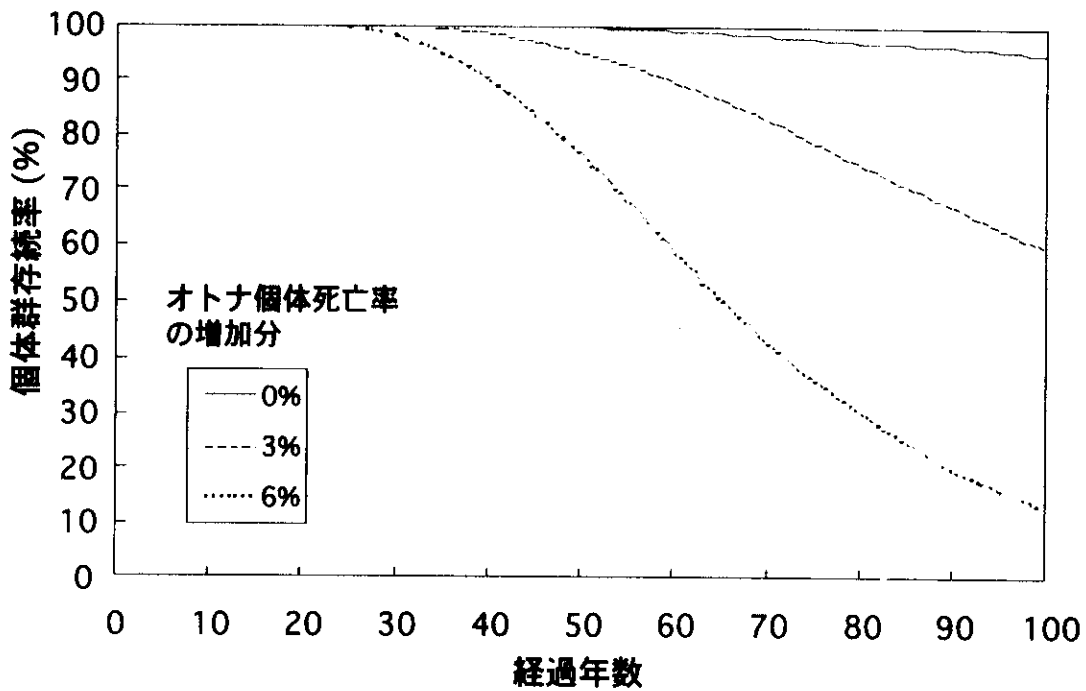


図2. 狩猟圧によるオトナ個体の死亡率の増加が下北個体群の存続率に及ぼす影響.

全体で毎年 1000 頭を超え、クマ個体群に大きな影響を及ぼしていると考えられる。下北半島では近年狩猟はほとんどおこなわれていないが、有害鳥獣駆除は毎年実施されている。今後も捕獲が続いた場合、それが個体群存続率をどのように左右するかを数値実験によって推定した。

イ. 下北半島クマ個体群

下北半島ツキノワグマ個体群は単独隔離個体群である。しかも生息地が主に海で囲まれ、その範囲が明瞭であるためモデル化の上での論理的な困難が少ない。一方、隔離個体群であるということは絶滅危険性の評価と保全対策の確立を急がなければならない可能性が高い。これらの理由から下北半島個体群を最初の分析対象として選定した。

ツキノワグマにとって好適な生息地はブナやミズナラなどの広葉樹林であり、下北半島では約 1000 km² を占める。したがって、下北半島における現在のツキノワグマ収容力として 200 頭という値を得る。現在の個体数については約 100 頭と推定されている¹⁴。

③ 結果および考察

狩猟が行われない場合の個体群存続率を図 1 に示す。計算誤差のためいくぶんグラフが滑らかさを欠くが、概ね次の点を読み取ることができる。まず、環境収容力 200 頭における MVP は約 110 頭であり、現在の個体数 100 頭はこれ以上決して減少させてはならないぎりぎりのレベルであると言える。次に、初期個体数と環境収容力、個体群存続率の関係をもう少し一般的に見ると、当然のことながら初期個体数が多いほど存続率は高まっている。ただし、1 本ずつのラインを見れば明らかなように、それに見合う環境収容力が必要である。逆に、環境収容力が高くても初期個体数が少ないと存続率の大幅な改善を見込むことはできない。したがって、ツキノワグマには十分な初期個体数と環境収容力の両方が必要であり、それらがそろわなければ満足な存続率はありえないということができる。

狩猟のためオトナ個体の死亡率が上昇した場合の結果を図 2 に示す。死亡率 6%増のラインが概ね現状の捕獲水準に相当する。この結果によれば、このまま獣害駆除を続け、他の条件も変化しないなら、下北半島ツキノワグマ個体群が 21 世紀末まで生き残る見込みはほとんどない。

初期個体数や環境収容力を急速に改善することは現実的には難しいが、有害駆除の捕獲数を減らすことはゴミや農業資材の徹底的な管理に奥山放獣などの手法を組み合わせれば可能である。しかも、初期個体数や環境収容力を多少改善するより効果が大きい。下北半島ではクマの有害駆除数を減少させる取り組みが強く望まれる。

④ 引用文献

- 1) Soule, M. E. *Viable Populations for Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge/New York, 189pp. (1987)
- 2) 林 知己夫 : 生息数の推定. クマ生態調査報告書 新潟県野生動物生態研究会:7-44. (1987)
- 3) 林 知己夫 : 生息数調査. 野生鳥獣保護調査事業・第 1 期調査 ニホンツキノワグマ生息実態調査報告書 岩手県環境保健部:16-29. (1990)

4) 自然環境研究センター：平成 8 年度下北半島ツキノワグマ生息調査報告書。自然環境研究センター，95pp. (1997)

2) 小哺乳類モデル個体群における遺伝的多様性の変動メカニズム

① 研究目的

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を用いて、エゾヤチネズミ (*Clethrionomys rufocanus*)の実験個体群の遺伝的多様性の変動をモニターし、遺伝的多様性の変動に係わる婚姻形態、近親交配の起きる頻度、近親交配を避ける機構などを解析した。

② 材料および方法

野外調査は札幌市郊外の自然林内に設置した実験柵 (3 ha) に、近郊から捕獲してきた個体 (エゾヤチネズミ *Clethrionomys rufocanus*) から遺伝的に多様な46個体 (オス：22；メス：24) を選抜して、解放し、個体数や繁殖、行動圏などの変化を標識再捕獲法などで観察した。解放した個体や実験柵内で出生した個体のDNAを個体識別のために切除した指から抽出し、マイクロサテライトDNAの遺伝子型をPCR法などを使って決定した^{1),2),3)}。

③ 結果

実験個体群は、1992年秋の解放直後から活発に繁殖を始め、翌年末までに合計921個体の幼体が出現した。この研究では、実験個体群の世代を便宜的に以下の6世代に区分し、各世代の遺伝的多様性を比較した：解放されてから定着・繁殖した創始世代 (G1)、1992年秋に生まれた第2世代 (G2)、越冬して翌年春の繁殖個体群を形成した世代 (G3)、1993年春に生まれた世代 (G4)、同年秋の繁殖個体群 (G5)、同年秋に生まれた最後の世代 (G6)。遺伝的多様性の変動は、マイクロサテライトDNAの3つの遺伝子座ごとにヘテロ接合体率を求めてモニターした。3つの遺伝子座の対立遺伝子の数は、13、25、11だった。最も対立遺伝子数が少なかったローカスはG1で、ヘテロ接合体率は低かったが、G2世代では上昇し、それ以降、高い値で安定した (図3)。一方、他の2つのローカスでは、全体に世代が下るに従って、減少する傾向が見られた。しかし、その減少率は低く、G1世代とG6世代のヘテロ接合体率の差は0.05~0.08であった。

ヘテロ接合体率が高い集団では近親交配が回避されていると予想されるので、同個体群で親子判定を行い、婚姻形態を分析した。同個体群で捕獲された921個体の幼体の遺伝子型を分析し、215組の親子を決定した。このうち明らかな近親交配は7例で、近親交配が起きる頻度がきわめて低いことがわかった。婚姻形態は、オスの密度が低く、また競争能力に差が大きいときには1頭のオスが複数のメスを占有して、一夫多妻的となり、オスの密度が高く、メスをめぐるの競争に決着がつきにくいと考えられる条件では交配相手が一定しない乱婚的な形態となった (図4)。同腹の子どもでも父親が違う (マルチプル・パタニティ) 場合は、交配関係が安定しない乱婚的な形質と理解され、乱婚の指標として用いることができる。マルチプル・パタニティの頻度は、オスの密度が低く、また競争能力に差が大きいときには低く、オスの密度が高く、メスをめぐるの競争が激しくなったと考えられるときに高くなった。

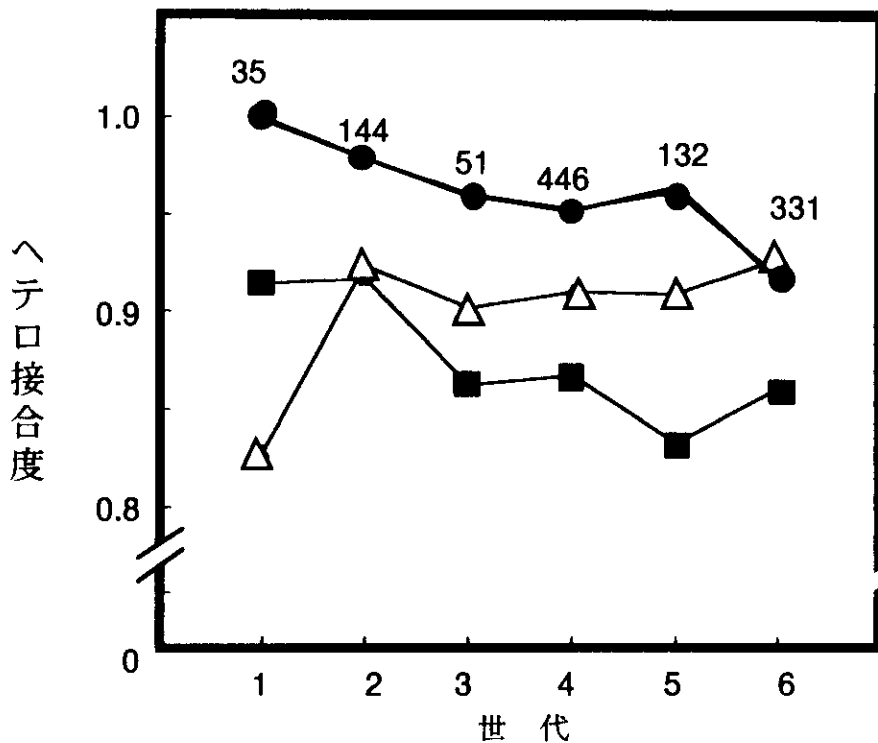


図3. エゾヤチネズミ実験個体群における6世代にわたる3遺伝子座のヘテロ接合体率の変化(世代については本文参照)．■：遺伝子座1；●：遺伝子座2；△：遺伝子座3．数字は各世代の個体数．

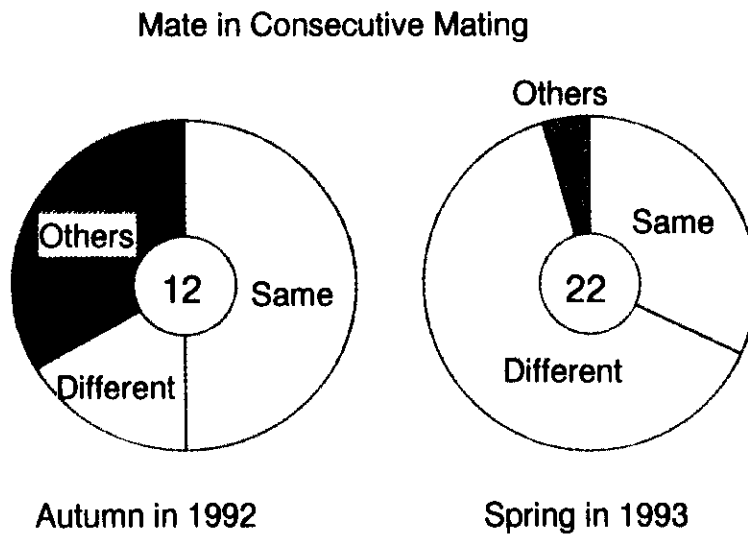


図4. エゾヤチネズミ実験個体群における婚姻形態の変化. オスの密度が低く, また競争力に差が大きかった1992年秋の繁殖期には, メスは同じオスと繰り返し交配することが多く (Same), オスの密度が高く, メスをめぐる競争に決着が付きにくいと考えられた1993年春の繁殖期には, 交配相手が一定しない例 (Different) が一般的だった. 「Other」は, 交配相手が死亡していたため, 交配相手を変えざるを得なかった例を示す.

メスは出生地にとどまって繁殖する傾向があり、血縁個体が隣りあって行動圏を持つことが多かったが、オスは繁殖を開始する前に大きく移動し、血縁個体がない場所に定着することが多かった。このようなオスの行動がエゾヤチネズミにおいての低い近親交配頻度に結びついており、野外で観察されている集団遺伝学的な任意交配性や高い遺伝的な多様性をもたらすと考えられた。

④ 考察

哺乳類では一夫一妻で繁殖する種は10%以下であろうといわれ、多くは一夫多妻か乱婚的な形態で繁殖する。また、分散行動が明らかになった種においては、メスは定着的でオスが分散的である傾向が繰り返し観察されている⁴⁾。この研究の結果、オスの分散行動が婚姻形態や近親交配の頻度の決定大きく関わっていることが明らかになった。近年、動物の生息環境が寸断され、多くの個体群が孤立化させられていると推測されているが、個体群間でオスの交流が妨げられ、婚姻形態に歪みが生じた場合には近親交配の頻度や遺伝的な多様性に大きな影響が現れるであろうと考えられた。

⑤ 引用文献

- 1) Ishibashi, Y., T. Saitoh, S. Abe & M. C. Yoshida, Polymorphic microsatellite DNA markers of the grey red-backed vole *Clethrionomys rufocanus bedfordiae*. *Molecular Ecology* 4: 127-128. (1995)
- 2) 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*, 5: 589-590. (1996)
- 3) Ishibashi, Y., T. Saitoh, S. Abe & M. C. Yoshida, Sex-related spatial kin structure in a spring vole population of *Clethrionomys rufocanus* as revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Molecular Ecology* 6: 63-71. (1997)
- 4) Saitoh, T. Sexual differences in the natal dispersal and philopatry of the grey-sided vole, *Clethrionomys rufocanus*. *Researches on Population Ecology* 37: 49-57. (1995)

3) 希少種アマミノクロウサギにおける行動と遺伝的多様性

① 研究目的

希少野生動物であるアマミノクロウサギを対象とした保全生物学的研究を行うことを目的に、ラジオテレメトリーによる行動圏サイズと活動性を明らかにし、さらに DNA 塩基配列変異分析による遺伝的多様性の検討を行った。

② 材料および方法

調査は鹿児島県大島郡住用村の調査地 (28°00'N, 129°25'E, 標高 300~400m,) で実施された。捕獲はウサギ捕獲用トマホーク型罠を用い、餌としてさつまいも、リンゴなどを使用し、1995~1999年の期間に実施した。捕獲個体は外部計測を行い、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。行動圏追跡では受信機とアンテナをもち昼夜のトラッキング調査を行った。活動性を明らかにするためにアクトグラム分析を行った。DNA 分析におい

ては、採取した組織をフェノール・クロロホルムにより抽出された DNA の PCR 法で増幅し、ダイレクトシーケンシング法で塩基配列を決定した。

③ 結果および考察

奄美大島において捕獲された成獣 7 個体の平均体重は雄で 2,226g (4 頭, 範囲 2030~2675g) 及び雌で 2,477g (3 頭, 2550~2880g) であった。また、行動圏サイズはどちらの性でも極めて小さかったが、雌 (1.0ha) よりも雄 (1.3ha) でわずかに広がった表 1)。これら 7 個体行動圏の配置を見ると、総生息地面積は 30ha 程度の面積内に隣接しあい、各個体は谷部に巣穴を設けていた。これらの巣穴を中心におよそ 100~200m 以内で行動していた (活動時間は夜間を中心としていたが、一部個体 (雌) では昼間にも若干の活動のあることが明らかになった。本種の行動圏を他種と比較すると、本種の行動圏はヨーロッパアナウサギ *Oryctolagus cuniculus*⁵⁾ やワタオウサギ属の種 *Sylvilagus*^{2, 4)} とほぼ同じサイズであるが、アラゲウサギ *Caprolagus hispidus* (雄 8.2ha, 雌 2.8ha)¹⁾ やブッシュマンウサギ *Bunolagus monticularis* (雄で 20ha, 雌で 13ha)³⁾ よりも小さい。本種の行動圏サイズはアナウサギ類と同じ程度と考えられる。

アマミノクロウサギの雌 3 頭の行動圏はお互いに重複しなかったが、雄の行動圏は雌や他の雄と重複していたことが今回の研究で明らかになった。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、及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。トウワタオウサギ *S. floridanus* 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²⁾。現在のところ捕獲数が少なく資料も不十分であるが、アマミノクロウサギの社会構造や繁殖個体群構成の解明は今後の課題であるが、今回の結果は社会構造や個体間関係の解明の手がかりになると考えられる。

アマミノクロウサギの遺伝的多様性を明らかにするための基礎として、mtDNA の 2SrRNA (831bp) と Cyt-b (1140bp) 領域に関して、アマミノクロウサギ 3 個体と他の日本産ウサギ科の 2 種ニホンノウサギ *Lepus brachyurus* 2 個体及びエゾユキウサギ *L. timidus ainu* 2 個体、およびメキシコ産のメキシコウサギ *Romerolagus diaz* 1 個体との比較検討を行った。また、データベース情報から得た他のノウサギ属やワタオウサギ属とも比較した (図 5)。この結果、アマミノクロウサギはメキシコウサギなど古いタイプのウサギ科の属の放散時点で分岐し独自の進化をとげたことが明らかとなった。これまでの形態学的系統関係と類似した結果が得られた。また、アマミノクロウサギ 3 個体ではこれらの領域における個体変異のあることが認められた。

今後、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 引用文献

- 1) Bell, D. J., W. L. R. Oliver and R. K. Ghose. The Hispid Hare. In Rabbits, Hares, and Pikas, pp.128-136. (1990)
- 2) Chapmann, J. A. and G. Ceballos. The Cottontails. In Rabbits, Hares, and Pikas, pp.95-110. (1990)

表1. アマミノクロウサギと他種の行動圏サイズの比較

Species		Range size (ha)		Body weight (g)		References
		Male	Female	Male	Female	
Amami rabbit	<i>Pentalagus furnessi</i>	1.3	1.2	2,226	2,550	This study
Hispid hare	<i>Caprolagus hispidus</i>	8.2	2.8	2,248	2,518	Bell et al. (1991)
Riverine rabbit	<i>Bunolagus monticularis</i>	20.9	12.96	2,500	2,500	Duthie (1989)
European rabbit	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	0.5-3		2,000		Gibb (1990)
Hares	<i>Lepus</i>	10-300		2,000-5,000		Flux and Chapman (1990)

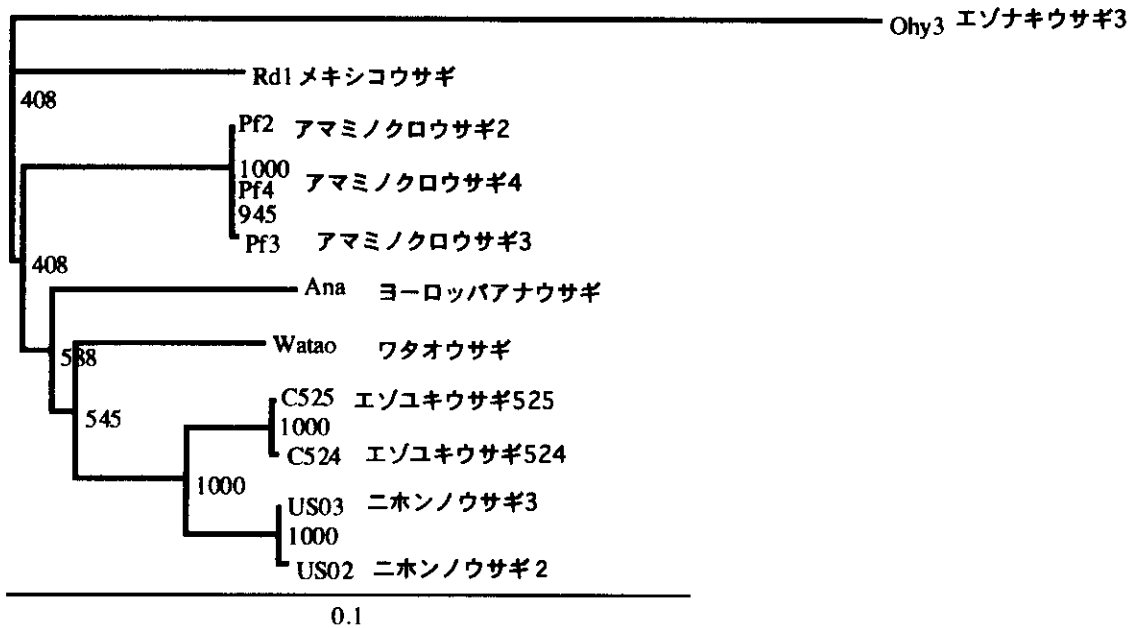


図5. アマミノクロウサギおよび日本産ウサギ科の分子系統樹。12S rRNA 領域における近隣接合法で作成。

- 3) Duthie, A. G. and T. J. Robinson. The African Rabbits. *In Rabbits, Hares, and Pikas*, pp.121-127. (1990)
- 4) Forys, A. E. and S. R. Humphery, Home range and movement of the Lower Keys marsh rabbit in a highly fragmented habitat. *J. Mamml.*, 77: 1042-1048. (1996)
- 5) Gibb, J. A. The European Rabbit. *In Rabbits, Hares, and Pikas*, pp.116-120. (1990)

4) 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研究目的

東北地方と北海道のクマゲラ個体群間の遺伝的な関係を調べることにより、遺伝的多様性の現状を把握するため、近縁種のキツキ類の血液や細胞、また、クマゲラでは血液や細胞が手に入らないので、糞や剥製の羽軸からの DNA 抽出を行い、既に報告されているニワトリのミトコンドリア DNA からプライマーをデザインし、PCR 法を行い、塩基配列を決定した。

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、東北地方のクマゲラの糞、羽軸、死骸、北海道の剥製の羽軸、アカゲラの死体（肝臓）、血液、羽軸、アオゲラ、オオアカゲラの死体（肝臓）、ニワトリの血液の収集を行いサンプルとした。

ア. DNA抽出

クマゲラの糞を5mm角に切り出し、STEバッファーに混ぜた上澄み液を用い、羽軸、死体（肝臓）については、5mm角に切り出したものをホモジナイザーでよくすりつぶしたのを用い、血液は約10 μ lにSTEバッファーを加えたものを使用して、フェノールクロロホルム抽出法によりDNA抽出を行い¹⁾、アガロースゲル電気泳動を行った後エチジムブロマイドで染色して確認した。

イ. PCR法

ニワトリのミトコンドリア DNA 塩基配列²⁾ から 12SrRNA をコードしている部位について LC01725 (5'-AAA CTG GGA TTA GAT ACC CCA CTA-3') と HC02152 (5'-GAA GAG GGT GAC GGG CGG TAT GT-3')、LC01346 (5'-TGC AAG TAT CCG CAT CCC AGT G-3') と HC01820 (5'-GCG TTT GTG CTC GTA GTT CT-3')、LC01801 (5'-AGA ACT ACG AGC ACA AAC GC-3') と HC02152 (5'-GAA GAG GGT GAC GGG CGG TAT GT-3')、LC049 (5'-GCA AGT ATC CGC ATC CCA GTG A-3') と HC431 (5'-GGG TCC TAG CTT TCG TGG GTT A-3')のそれぞれのプライマーセットをデザインした。また、チトクローム b をコードしている部位については LC14990 (5'-CCA TCC AAC ATC TCT GCT TGA TGA AA-3') と HC15304 (5'-TGG CCC CTC AGA ATG ATA TTT G-3')、LC15362 (5'-TTG GAC ACA CCC TAG TAG AG-3') と HC15907 (5'-TCT ACT GGT TGG CTT CCG AT-3')のそれぞれのプライマーセットをデザインした。SymmetricPCR では作成したプライマーセットを

等濃度使用し、DNA 二本鎖の熱変性 94℃30 秒～1 分、プライマーとのアニリング 60～68℃30 秒～1 分、DNA ポリメラーゼによる伸長反応 72℃30 秒～1 分の 3 サイクルを 30～50 回繰り返した。また、AsymmetricPCR では微量の SymmetricPCR 産物をテンプレートとして、一方のプライマーの濃度を 1/100 にしてもう一方のプライマーによって 1 本鎖 DNA を特異的に増幅した³⁾。これらをアガロースゲル電気泳動を行った後エチジムブロマイドで染色して確認した。

ウ. シーケンス法

これらの PCR 産物を濃縮してシーケンスのテンプレートとし、BigDyeTerminatorKit を使用して 96℃10 秒、50℃5 秒、60℃4 分を 25 回繰り返す PCR を行うシーケンス反応をおこなった。シーケンサーとして 310 GeneticAnalyzer (PerkinElmer 社製) を使用した。

③ 結果および考察

クマゲラは個体数が少なく、捕獲することが困難なのでクマゲラで DNA 分析するためには手に入れることが可能なサンプルで DNA を抽出することが必要であり、DNA 量が微量でも解析が可能であり、各 DNA よりも数倍速い進化速度を持つ⁴⁾ mtDNA をものさしにして研究を進めた。そのため、クマゲラでは糞、剥製の羽軸から DNA 抽出を試み、クマゲラの糞では DNA 抽出は従来のホモロナイザーですりつぶす方法ではなく、バッファーに混ぜるやり方で DNA が得られた。これは糞の表面に細胞が付着しているからだと考えられる。他のサンプルについては従来の方法で DNA が得られた。PCR 法については、12S rRNA をコードしている部位からデザインした LC01725、HC02152 のプライマーセットでは、アカゲラの肝臓、クマゲラの死骸、アオゲラの肝臓から抽出した DNA で 30 サイクルの PCR で増幅物が得られ、クマゲラの剥製から抽出した DNA では 50 サイクルの PCR で増幅物が得られた (図 6, 7)。LC01346、HC01820 のプライマーセットと LC01801、HC02152 のプライマーセットではアカゲラの肝臓、クマゲラの死骸、クマゲラの羽軸、オオアカゲラの肝臓、アオゲラの肝臓から抽出した DNA で 30 サイクルの PCR で増幅物が得られた。LC049、HC431 のプライマーセットでは、クマゲラの死骸、クマゲラの羽軸、アカゲラの肝臓、ニワトリの血液から抽出した DNA で 30 サイクルの PCR で増幅物が得られた。また、チトクローム b をコードしている部位からデザインした LC14990、HC15304 のプライマーセットでは、アカゲラの肝臓、クマゲラの死骸、クマゲラの剥製からの羽軸から得た DNA では 30 サイクルの PCR で増幅物が得られた。しかし、クマゲラの糞から得た DNA では増幅物が得られなかったため、キツツキ類に特異的なプライマーを確立して PCR 法を行うことが必要である。また、LC15362、HC15907 のプライマーセットではすべての DNA で増幅物が得られなかった。

PCR で増幅物が得られたサンプルのうち、チトクローム b をコードしている部位の LC14990 と HC15304 のプライマーセットで増幅したアカゲラの肝臓、血液、クマゲラの死骸をテンプレートにしてシーケンスを行った結果、アカゲラの肝臓、血液の一部で結果が得られたが、不明瞭な塩基配列が多かった。また、12S rRNA をコードしている部位の LC01346 と HC01820 のプライマーセットで増幅したアカゲラの肝臓、クマゲラの死骸、羽軸、アオゲラの肝臓、オオアカゲ

```

クマゲラ (死骸; 十和田)  ACTCAGCAGT AGCCCAAGAC GCCTTGCTTA AGCCACACCC CCACGGGTAC
アカゲラ (細胞; 盛岡)  .....
ニワトリ  .....

クマゲラ (死骸; 十和田)  TCAGCAGTAA TTAACCTTAA GCAATAAGTG TAAACTTGAC TTAGCCATAG
アカゲラ (細胞; 盛岡)  .....
ニワトリ  .....

クマゲラ (死骸; 十和田)  CAACCCAGGG TTGGTAAATC TTGTGCCAGC CACCGCGGTC ATACAAGAAA
アカゲラ (細胞; 盛岡)  .....
ニワトリ  .....

クマゲラ (死骸; 十和田)  CCCAAATCAA TAGCTAOC CGGTAAAGAG TGGCCACATG TTATCTGCAC
アカゲラ (細胞; 盛岡)  .....
ニワトリ  .....

クマゲラ (死骸; 十和田)  CAGCTAAGAT TAAAATGCAA CCAAGCTGTC ATAAGCCTAA GATCCACCTA
アカゲラ (細胞; 盛岡)  .....
ニワトリ  .....

クマゲラ (死骸; 十和田)  AACCCAACCC AAATCCATCT TAGCCTCAAC GATT
アカゲラ (細胞; 盛岡)  .....
ニワトリ  .....

```

図-6 クマゲラ、アカゲラとニワトリの12S rRNA の塩基配列 (284 bases)

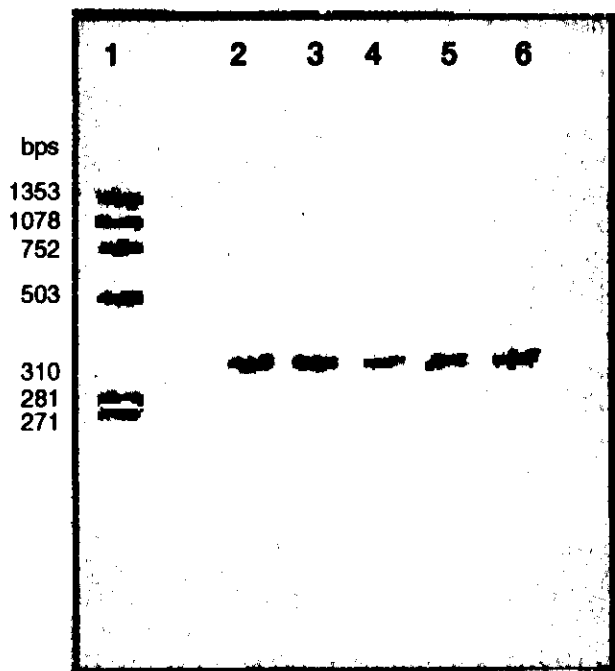


図-7 12SrRNA 部位をはさむプライマーを使用した PCR の電気泳動像 (3%アガロースゲル使用)
 レーン 1 : サイズマーカー (ΦX174HaeIII)
 レーン 2 : クマゲラ死骸から得た DNA
 レーン 3, 4 : アカゲラ肝臓から得た DNA
 レーン 5 : アオゲラ肝臓から得た DNA
 レーン 6 : オオアカゲラ肝臓から得た DNA
 プライマー LC01801, HC02152
 アニリング温度 60℃, 30 サイクル

ラの肝臓をテンプレートとしてシーケンスを行った結果、オオアカゲラの肝臓以外のサンプルで結果が得られたが、不明瞭な塩基配列が多く比較することができなかった。LC049 と HC431 のプライマーセットでは、クマゲラの死骸、クマゲラの羽軸、アカゲラの肝臓、ニワトリの血液をテンプレートとしてシーケンスを行った結果、284塩基を決定することができたが、変異がみられなかった。これは、遺伝子をコードしている領域であるため塩基配列の保存性が高いので、個体群間や種間で変異が見られなかったと考えられる。このため、保存性の高い他の領域についても解析を進めるとともに、そこから得られる塩基配列をもとにプライマーをデザインし、変異の高いと考えられる D-loop 部位への解析を進めていく必要がある。

④ 引用文献

- 1) Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. (1989)
- 2) Desjardin, S., Morais, R., *Sequence and Gene Organization of the Chicken Mitochondrial Genome A Novel Gene Order in Higher Vertebrates*. *Journal of Molecular Biology* 212:599-634 (1990)
- 3) Gyllenstein, U. B. and H. A. Erlich, *Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 85:7652-7656 (1988)
- 4) Brown, W. M., George, M. Jr. and Wilson, A. C., *Rapid evolution of animal mitochondrial DNA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 76:1967-1971 (1979)

[研究成果の発表状況]

(1) 口頭発表

- ① Horino, S., Miura, S. *A population viability analysis of the Japanese black bear*. *ITC-7 Abstracts*: 137. (1997)
- ② Yamada, F. *Radio-telemetric study of endangered Amami rabbit *Pentalagus furnessi**. *Abstract of 7th ITC*, p404. (1997)
- ③ 山田文雄. 奄美大島における移入マングースの影響. 日本生態学会第45回大会. (1997)
- ④ Yamada, F. and K. Sugimura., *Ecology and conservation of Amami rabbit *Pentalagus furnessi**. *Euro-American Mammalogy Congress*, 87. (1998)

(2) 論文発表

- ① Glocking, S. L. and F. Yamada., *A survey of fungi which kill microscopic animals in the dung of the Amami rabbit*. *Mycologist*, 11(3): 113-120. (1997)
- ② 堀野 真一, 三浦 愼悟: 個体群モデルとコンピュータシミュレーションの使いみち. 日本生

態学会誌 47(2):189-191. (1997)

- ③堀野 眞一：環境のゆらぎからみた人口学的 MVP. 哺乳類科学 (印刷中) . (1999)
- ④Horino, S., Miura, S. A population viability analysis of a black bear population. (投稿中)
- ⑤Ishibashi, Y., T. Saitoh, S. Abe, and M. C. Yoshida Sex-related spatial kin structure in a spring vole population of *Clethrionomys rufocanus* as revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Molecular Ecology* 6: 63-71. (1997)
- ⑥Ishibashi, Y., T. Saitoh, S. Abe, and M. C. Yoshida ,Cross-species amplification in old world microtine rodents with pcr primers for grey-sided vole microsatellites. *Mammal Study* 22: 5-10. (1997)
- ⑦Ishibashi, Y., T. Saitoh & M. Kawata Social organization of the vole *Clethrionomys rufocanus* and its demographic and genetic consequences: a review. *Researches on Population Ecology* 40: 39-50. (1998)
- ⑧Ishibashi, Y., T. Saitoh, S. Abe & M. C., Yoshida Kin-related social organization in a winter population of the vole *Clethrionomys rufocanus*. *Researches on Population Ecology* 40: 51-59. (1998)
- ⑨Ishibashi, Y., Y. Yoshinaga, T. Saitoh, S. Abe, H. Iida and M. C. Yoshida Polymorphic microsatellite DNA markers in the field vole *Microtus montebelli*. *Molecular Ecology* 8: 163-164.
- ⑩石田健・杉村乾・山田文雄：奄美大島の自然とその保全.生物科学,50:55-64. (1998)
- ⑪Ohnishi, N., Y. Ishibashi, T. Saitoh, S. Abe, and M. C. Yoshida (1998) Polymorphic microsatellite DNA markers in Japanese small wood mice *Apodemus argenteus*. *Molecular Ecology* 7: 1431-1432.
- ⑫齊藤 隆：ネズミの家族関係を追う -DNA分析から- pp.87-90. 森林総合研究所北海道支所編「北海道森を知る」、北海道新聞社.(1998)
- ⑬山田文雄： わが国における移入哺乳類の現状と課題. 哺乳類科学,38：97-105. (1998)
山田文雄： 南の島の黒いウサギ -アマミノクロウサギの生態と保護. どうぶつと動物園 51 (4)：22-25 (1999)
- ⑭Yamada, F., K. Sugimura, S. Abe and Y. Handa. Present status and conservation of the endangered Amami rabbit *Pentalagus furnessi* . *Tropics* . in press. (1999)