

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 22 年度 ～ 平成 24 年度

課題番号：22510248

研究課題名（和文） 野外および飼育下からなるコウノトリのメタ個体群における遺伝的管理の最適化

研究課題名（英文） Optimization of the genetic management of meta-population of oriental white stork in captivity and in the wild.

研究代表者

内藤 和明 (NAITO KAZUAKI)

兵庫県立大学・自然・環境科学研究所・講師

研究者番号：50326295

研究成果の概要（和文）：2005 年から再導入が行われている絶滅危惧鳥類コウノトリにおいて、野外および飼育下集団の遺伝的管理を効果的に行うために、新たな遺伝的評価手法としてマイクロサテライト DNA マーカーを用いた解析を実施し、父性解析の手法の確立および繁殖計画への適用可能性の検討を行った。また、飼育集団の効果的な遺伝的管理に資するために、飼育下のコウノトリの個体情報および飼育情報を格納し総合的に管理できるデータベースを構築した。

研究成果の概要（英文）：In order to perform the effective genetic management for a threatened bird species, Oriental White Stork, both in captivity and in the wild, the analysis of microsatellite DNA markers was carried out to establish the method for paternity analysis and breeding program. In addition, a relational database including individual information medical record and so on was created for genetic management of a captive population.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	710,000	210,000	920,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	1,910,000	570,000	2,480,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：保全，鳥類，絶滅危惧種，再導入

### 1. 研究開始当初の背景

絶滅が危惧される野生動物の再導入に当たっては、IUCN（国際自然保護連合）によるガイドラインが作成されており、再導入個体の飼育繁殖技術の確立、野外環境への馴致、生息地の整備、再導入に関する社会的合意形成など、再導入の前に必要な事項、再導入後のモニタリングなどの項目が記述されている（IUCN, 1996）。1971 年に繁殖個体群が日本から絶滅し、長年保護の取り組みが進めら

れてきたコウノトリの再導入も、このガイドラインにしたがって準備作業が進められ、2005 年から豊岡盆地で行われている再導入の実施に至った（内藤ほか, 2011; Naito and Ikeda, 2007）。

当面の目標となる自律的で安定した個体群の確立のためには、野外および飼育集団の維持管理が重要である。中でも遺伝的多様性の維持は、いったんボトルネックを受けて多様性が低下していると考えられる絶滅危惧

種において、個体数の維持と並んで非常に重要な課題である。

コウノトリの飼育個体では、国内・国際血統登録の制度による管理が 1991 年から行われ、履歴が詳細に記録されている。しかし、創設個体（飼育第 1 世代の個体）の血縁関係はわからない。また、野外集団では、1) 個体が識別できない場合がある（個体を捕獲できないときには足環が装着できないため）、2) つがい外交尾などが生じるため家系が明白でない、といった問題がある。したがって、血統登録によるだけでは、十分な家系管理ができない場合がある。

また、遺伝情報としてミトコンドリア DNA の D-loop のハプロタイプ (Yamamoto et al., 2000 ほか) を指標にした家系管理がこれまで採用されてきた。ミトコンドリア遺伝子は母系遺伝するため、父系系統を知ることはできないという制約がある。すなわち、野外集団では個体識別をして父性の推定を行ったり、遺伝的多様性を定量的に測定してそれを管理していくためには、新たな技術的枠組みが必要と考えられる。

## 2. 研究の目的

本課題の目的は、飼育下および野外においてコウノトリ個体群の遺伝的多様性の維持管理を長期的な視点で行うことを念頭に、家系情報およびミトコンドリア DNA のハプロタイプ情報に加えて、新たな指標としてマイクロサテライト DNA マーカーの活用を取り入れ、従来の情報に遺伝解析の結果を加味した家系管理・繁殖計画の仕組みを構築することである。そのための個別の課題として、コウノトリでのマイクロサテライト DNA 解析の有効性の検討、マイクロサテライト遺伝子座を活用した父性解析、個体間の遺伝的距離の推定と繁殖計画への適用可能性の検討、家系情報を含む飼育管理情報のデータベース化を設定した。

## 3. 研究の方法

### (1) コウノトリでのマイクロサテライト DNA 解析の有効性の検討

個体群の管理に活用できる新たな遺伝マーカーとして、マイクロサテライト DNA マーカーを想定し、近縁種を対象にマーカーが開発された遺伝子座を含む複数の遺伝子座について解析を行い、対立遺伝子の数、ヘテロ接合度の期待値および観察値等のパラメータを算出する。これにより、コウノトリの集団の遺伝的管理におけるにおけるマイクロサテライト遺伝子情報の有効性を検討する。

### (2) マイクロサテライト DNA を活用した父性解析

マイクロサテライト DNA を用いた解析の適

用例として父性解析を試みる。つがい外交尾の結果オス親が一意に特定できないヒナの遺伝子型を、親候補となる複数の個体と合わせて解析し、遺伝的なオス親の特定を行う。

### (3) 個体間の遺伝的距離の推定と繁殖計画への適用可能性の検討

飼育下での繁殖計画の立案に資するために、また野外での繁殖つがいの遺伝的な評価を行うために、複数のつがいを含むサンプル集団のマイクロサテライト遺伝子座を解析し、個体間の遺伝的距離を算出する。その結果とミトコンドリア DNA のハプロタイプ情報とを比較し、マイクロサテライト遺伝子情報の繁殖計画への適用可能性を検討する。

### (4) 家系情報を含む飼育管理情報のデータベース化

飼育集団の繁殖計画の立案に役立てるために、家系情報や遺伝情報を含む飼育管理情報を格納するデータベースを設計構築し、飼育現場における運用体制を整備する。

## 4. 研究成果

### (1) コウノトリでのマイクロサテライト DNA 解析の有効性の検討

日本国内で飼育されているあるいは過去に飼育されていた個体について、血液サンプル等から DNA を抽出し、オートシーケンサーを用いてマイクロサテライト DNA の 12 遺伝子座をタイピングした結果を基に、対立遺伝子の数、ヘテロ接合度等を算出した。使用した遺伝子座は、近縁種でプライマーが開発されたものおよび独自に開発したものからなる。

遺伝子座当たりの対立遺伝子の数は、平均 5.08 (最大 13, 最小 2) であった。ヘテロ接合度の期待値は平均 0.608 (最大 0.891, 最小 0.292), 観察値は平均 0.628 (最大 0.900, 最小 0.226) であった。いずれの遺伝子座においても、ハーディ・ワインバーグ平衡からの有意なヘテロ接合度のずれは確認されなかった。

中国の野生個体群での解析結果が存在する 6 遺伝子座について比較したところ、対立遺伝子の数は全ての遺伝子座において同数あるいは中国の野生個体群の方が多かった。この違いは、日本の飼育個体群の創設個体の数が限られていることを反映していると思われるが、対立遺伝子の平均値は中国の野生個体群で 6.2 に対して本研究のサンプル集団では 5.0 であり際立った違いではなかった。

ヘテロ接合度の期待値の平均は、中国の野生個体群で 0.72 に対して本研究でのサンプル集団では 0.60 であった。これらの結果から、日本で飼育されているコウノトリの集団においても、一定程度のマイクロサテライト

遺伝子座の多様性が存在しており、その解析結果を、父性解析、個体群の多様性解析、繁殖計画等に活用できる可能性が示された。

### (2) マイクロサテライト DNA を活用した父性解析

日本および世界の飼育施設におけるコウノトリの繁殖開始年齢は、最も若い例としてオス、メスともに満4歳に達する年からの繁殖が記録されており、コウノトリの性成熟は早くても4歳前後と考えられていた。ところが、野外において再導入された個体において、次の通り満2歳に達する年での繁殖が確認された。

この繁殖に成功したつがいのオスは、野外に設置された放鳥拠点で2006年5月18日に生まれ、同地から7月21日に放鳥された個体で、メスは2003年4月10日に飼育下で生まれ、2005年9月24日に放鳥された個体であり、つがい成立前に他の個体（メス個体の兄弟で当時満7歳になる年であった）との交尾が確認されていた。

2008年7月6日にこのつがいが巣立ちさせた幼鳥を捕獲し標識を行った際に、DNA抽出用の採血を行った。

血液サンプルを元に幼鳥と親個体（候補を含む）について、マイクロサテライト DNA の遺伝子型を特定し、その組合わせに基づいて父性判定を行ったところ、二つの遺伝子座における結果から、この幼鳥のオス親は、当時満2歳に達する年であったオスであると判明した。

この結果は、コウノトリの繁殖開始年齢に関する新発見であると同時に、マイクロサテライト DNA による父性解析の有効性を示すものとなった。

### (3) 個体間の遺伝的距離の推定と繁殖計画への適用可能性の検討

豊岡で現在飼育されているあるいは過去に飼育されていた個体を含む31個体について、マイクロサテライト DNA の12遺伝子座をタイピングし、その結果に基づき個体間の全組合わせについて遺伝的距離を算出して視覚化した（図1）。

飼育下および野外でつがいを形成している個体間の遺伝的距離は比較的遠く、ミトコンドリア DNA のハプロタイプが同一の個体はつがいにしないことで近縁な個体同士のつがいを避けるというこれまでの飼育下での管理の方針が、有効に機能してきたことが示唆された。一方で、ハプロタイプが同一の個体であっても遺伝的距離が離れている場合があることも明らかになった。すなわち、マイクロサテライト遺伝子座の情報を活用すれば、ハプロタイプが同一の個体同士をつがいにできる可能性があり、そうすることによ

り国内における繁殖つがいの不足をある程度解消できることが考えられた。これらの結果に基づき、マイクロサテライト遺伝子座の解析結果のコウノトリの繁殖計画への活用の可能性について検討し、個体の交換等を通じた国内の他の飼育園館との連携や国外から創設個体を導入することの必要性について論じた。なお、豊岡以外の国内で飼育されている個体の解析結果からは、豊岡における集団との明瞭な違いは認められなかった。

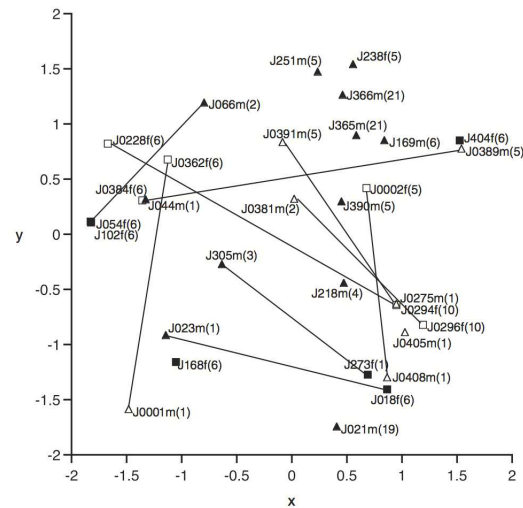


図1. 多次元尺度法による個体間の遺伝的距離の視覚化。繁殖つがいを構成する個体を実線でつないで示した。詳細は内藤ほか(2012a)を参照。

これらの内容について、多摩動物公園等の飼育施設と意見交換の機会を持ち今後の繁殖計画において連携していくこととなった。このような連携体制は、今後のコウノトリの再導入の進展と個体群の維持管理にとっての大きな前進であり、国内外における絶滅危惧動物の野生復帰研究への波及効果も大である。また本課題の内容を一般市民等に紹介する機会として、豊岡で定期的に開催されているコウノトリ・サイエンスカフェで、また多摩動物公園で開催されたシンポジウムにおいて話題提供を行った。

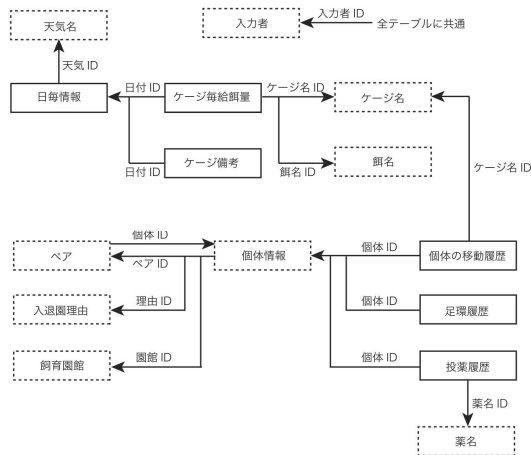
### (4) 家系情報を含む飼育管理情報のデータベース化

飼育集団の効果的な遺伝的管理に資するために、兵庫県立コウノトリの郷公園で飼育されているコウノトリの個体情報および飼育情報を格納し総合的に管理できるリレーショナル・データベースを構築した（図2）。

このデータベースはLinux OS上でapache, PHP/mysqlにより稼働し、個体の来歴、ケージ間の個体の移動履歴、給餌量情報や投薬の履歴などの情報を含む。個体の家系情報や遺伝情報も項目に含まれており、飼育下での個体群管理に必要な情報を総合化したもので

ある。オープンソースのアプリケーションを活用したことで、低コストでの導入・運用を可能にし、インターフェース部分をインターネットブラウザで賄うことで、慣れていない入力者でも比較的簡単に入力作業を行えるようにした。また、野外に生息する個体のデータ管理にも備えるため、データベースの拡張に容易に対応できる構造とした。

図 2. データベースを構成するテーブル名と相互の関連。詳細は内藤ほか (2012b) を参照。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① 内藤和明・西海 功・大迫義人. 2012. 豊岡の飼育下および野外のコウノトリの遺伝的多様性と繁殖計画への示唆. 野生復帰, 査読あり, 2: 57-62.
- ② 内藤和明・吉沢拓祥・三橋陽子・佐藤 稔・大迫義人. 2012. コウノトリの飼育情報を一元的に管理するシステムの開発とその運用. 野生復帰, 査読あり, 2: 75-80.
- ③ 大迫義人・内藤和明・吉沢拓祥. 2012. 明け 2 才で繁殖した野外コウノトリのオス. 野生復帰, 査読あり, 2: 81-82.

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 内藤和明・西海 功・大迫義人. マイクロサテライトマーカーを用いたコウノトリの遺伝解析、日本鳥学会 2012 年度大会、2012 年 09 月 14 日～2012 年 09 月 17 日、東京大学(東京都)
- ② 内藤和明・西海 功・大迫義人. コウノトリの遺伝解析と個体群管理への適用の可能性、第 60 回日本生態学会大会、2013 年 03 月 05 日～2013 年 03 月 09 日、静岡県コンベンションアーツセンター(静岡県)
- ③ 内藤和明. コウノトリの野生復帰におけ

る遺伝的管理の最適化、第 60 回日本生態学会大会、2013 年 03 月 05 日～2013 年 03 月 09 日、静岡県コンベンションアーツセンター(静岡県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内藤 和明 (NAITO KAZUAKI)

兵庫県立大学・自然・環境科学研究所・講師

研究者番号：50326295

### (2) 研究分担者

大迫 義人 (OHSAKO YOSHITO)

兵庫県立大学・自然・環境科学研究所・准教授

研究者番号：40326294

### (3) 連携研究者

西海 功 (NISHIUMI ISAO)

独立行政法人国立科学博物館・動物研究部・主幹

研究者番号：90290866