

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23310164

研究課題名(和文) 絶滅危惧種シマフクロウの遺伝的多様性評価と遺伝子資源保存の基盤形成

研究課題名(英文) Evaluation on genetic diversity of the endangered Blakiston's fish owl and establishment of the preservation system of the genetic resources

研究代表者

増田 隆一 (Masuda, Ryuichi)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80192748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、北海道における絶滅危惧種シマフクロウの保全をめざして、地域集団の遺伝的多様性を評価し、さらに、細胞・遺伝子資源の保存体制を確立することを目的とした。そのために、ミトコンドリアDNA、マイクロサテライト、および主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の集団遺伝学的解析を行った。その結果、どの遺伝子分析においても共通して、ボトルネック後の地域集団の分断と各集団内の遺伝的浮動と近親交配による遺伝的多様性の低下、および、集団間の遺伝的構造が急速に変化したことが示された。さらに、シマフクロウの培養細胞・血液・組織等および抽出したDNAを長期保存・活用するシステムの基盤を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：The purposes of the present study are to evaluate genetic variation of the endangered Hokkaido population of the Blakiston's fish owl, and to establish the preservation system of genetic resources on this owl. The population genetic studies on the fish owls were performed using genetic markers including mitochondrial DNA, microsatellites and major histocompatibility complex (MHC) genes. The results of these genes commonly showed the genetic differentiations among the regionally isolated populations, low genetic diversity and rapid changes within each regional population probably due to genetic drift and inbreeding after bottleneck. In addition, the preservation system for genetic resources including new samples has been established with usable genetic information obtained in the present study.

研究分野：保全遺伝学

キーワード：保全生物学 絶滅危惧種 シマフクロウ 遺伝的多様性 遺伝的浮動 マイクロサテライト ミトコンドリアDNA 集団遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) シマフクロウ(*Bubo blakistoni*)は北海道、サハリン、クナシリ、大陸沿海州地方にのみ分布する極東地域固有の大型猛禽鳥類である。冬でも凍らない湧水のある河川や湖沼周辺の原生林に生息し、主に魚類や小型哺乳類を捕食するため、北方の森林生態系の頂点に立つ。シマフクロウが生息できる自然環境には豊かな自然が維持されており、その傘下には豊富な生物多様性が存在する。よって、シマフクロウは傘種(アンブレラ・スピーシーズ)であり、その種保全是生態系全体を維持するために極めて重要である。

(2) シマフクロウは、北海道の南部、中央部、北部では明治時代の開拓期および昭和の開発期に絶滅した。現在では、東部、十勝、日高地方で個体群が分断孤立し、その総生息数は約130羽と推定されている。日本の天然記念物に指定され、緊急に保全を要する絶滅危惧種である。標識調査により親子兄弟やいとこ関係等の近親関係にあるつがいも確認されており、血縁関係が濃い状況にある。個体数の減少や個体群の分断・孤立化による多様性の低下や生殖機能の低下が危惧される。海外(ロシア沿海州、サハリン、クナシリ)のシマフクロウでは詳細な調査が進んでいないが、やはり個体数の減少が懸念される。しかし、国内外を通じて、シマフクロウ個体群の遺伝的多様性はこれまでまったく調査研究されていない。このような現状を踏まえ、シマフクロウ集団の遺伝的多様性を明らかにする本申請研究を計画するに至った。

## 2. 研究の目的

(1) シマフクロウ個体間の違いを検出できる多型的DNAマーカーを新規に開発し、北海道において分断化されたシマフクロウ地域個体群内の遺伝的多様性の低下がどの程度進んでいるかを明らかにする。さらに、病原体に対

する免疫力を評価するため、主要組織的適合遺伝子複合体(MHC)遺伝子の多様性を分析する。

(2) 北海道におけるシマフクロウ個体群間の遺伝的交流(遺伝子流動)がどの程度進んでいるかを明らかにする。

(3) 古い剥製や考古出土骨等の古代DNA分析を行い、現生個体群の特徴と比較解析することにより、渡りをしない留鳥であるシマフクロウ個体群の遺伝的多様性の時代的変遷を解明する。

(4) 上記で得られた成果に基づき、保全ユニットの設定、生息域間のコリドー設定、捕獲・繁殖個体の再導入・野生復帰など保全対策を提言する。

(5) 個体数が比較的多いと考えられている大陸沿海州の個体群を比較分析し、北海道個体群の多様性の評価および両者の分岐年代や氷河期から現代に至る気候変動と多様性の関係を明らかにする。

(6) これまで凍結保存されている繊維芽細胞を培養系に戻して生きていることを確認したうえで、再度細胞を増やし、将来の遺伝子資源のために保存する。また、新規に採取された血液、組織等から抽出したゲノムDNAを凍結保存する。

## 3. 研究の方法

(1) シマフクロウの培養細胞、血液、組織、剥製の羽等のサンプルからDNA抽出を行い、現在から過去にさかのぼって分析できる体制を整えた。これらのサンプルは、過去に採取され北海道大学、動物園、博物館等に保存されていたもの、および、本研究期間に新規に採取されたものを含む。

## (2) 母系遺伝するミトコンドリアDNA

(mtDNA) について、特にコントロール領域の塩基配列を決定し、その多様性について詳細に分析するとともに、時代的変遷も調査した。

(3) シマフクロウ集団の遺伝的多様性を評価するマイクロサテライト DNA マーカーを確立した。まず、シマフクロウのゲノム DNA から複合型マイクロサテライトをクローニングし、その多型性の検出を試みたが、得られたすべての座位で多型性が見られなかった。そこで次に、フクロウ類における既報のマイクロサテライトプライマーを順にシマフクロウで試したところ、反復配列を含み、かつ、多型性をもつ座位を 8 種類見つけることができた。よって、それを使用してシマフクロウ個体の遺伝子型を決定した。そのデータに基づき、各地域集団のヘテロ接合度や対立遺伝子数などの遺伝的多様性とその時代的変遷を分析した。

(4) シマフクロウ集団の病原体に対する免疫力が低下しているかどうかを明らかにするため、主要組織適合遺伝子複合体 (Major histocompatibility complex: MHC) について、次世代シーケンサ解析を導入して、各個体の遺伝子型を決定し集団遺伝学的解析を行った。そのデータに基づき、各地域集団のヘテロ接合度や対立遺伝子数などの遺伝的多様性とその時代的変遷を分析した。

(5) 細胞・遺伝子資源の保存体制を確立するために、これまで凍結保存されてきたシマフクロウの皮膚細胞を培養系に戻し、その保存状態を確認した。さらに、染色体分析を行った。細胞および血液、組織から抽出した DNA について分析に用いた後には冷凍保存した。

## 4. 研究成果

(1) シマフクロウの mtDNA コントロール領域の塩基配列を詳細に調べたところ、本種に特異的な反復配列を見出し、さらに個体間の変異および種レベルの特徴を解明することができた。さらに、剥製標本や古い年代の組織サンプルを用いた mtDNA 分析の結果、北海道シマフクロウ集団において mtDNA には少なくとも 5 つのタイプが見出された。過去のボトルネック以前には各タイプが広い地域に分布し、地域間の遺伝子流動があったが、ボトルネック後には少なくとも 1 つのタイプが喪失し、他の 4 タイプの分布範囲も縮小して、現在の各地域集団で見られるタイプは 1 つか 2 つになったことが示された。

(2) マイクロサテライトについて、北海道におけるシマフクロウ各地域集団のヘテロ接合度や対立遺伝子数などの遺伝的多様性とその時代的変遷を分析したところ、多くの地域において多様性が低下する傾向にあることが判明した。さらに、地域集団間の遺伝的分化が進行していることも明らかになった。これは、集団間の移動個体が少ないことを示している。一方、従来の生態学的調査により、地域集団間の少数個体の移動が報告されているが、そのような移入個体を受けた集団では、遺伝的多様性が増加している傾向が見られた。

(3) MHC 遺伝子を指標にした集団遺伝学的解析においては、MHC クラス II 遺伝子座の遺伝子型を決定した。その結果、19 種類の対立遺伝子が検出された。地域集団間の多様性を比較すると、遺伝的に大きく分化していることが明らかとなった。さらに、時代経過と比較すると、個体数が減少した時期から多様性が減少してきたことが示唆された。この MHC 遺伝子分析の結果は、短期間における遺伝的浮動が、長期間の進化において維持されていた

平衡選択の効果に大きく影響を与えたことを示している。さらに、この機能的遺伝子の結果は、上述した母系遺伝するmtDNAや両性遺伝するマイクロサテライト（ともに中立的に進化していると考えられる遺伝子）の分析結果と同様に、ボトルネック後のシマフクロウ地域集団の分断と各集団内の遺伝的浮動と近親交配による遺伝的多様性の低下、および、集団間の遺伝的構造が急速に変化（分化）したことを示唆している。

(4) 継続して採取されたシマフクロウの血液からゲノムDNAを精製し、保存することができた。これまでの解析成果により、遺伝的多様性の情報とともに、生きた培養細胞および血液・組織等から抽出したゲノムDNAを長期保存・活用するシステムの基盤を確立することができた。さらに、シマフクロウ染色体について、ニワトリDNAをプローブとした染色体ペインティング解析を行った結果、シマフクロウの遺伝的特徴づけおよび核型進化過程の詳細な追跡を行うことができた点は発展的な成果の一つである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Omote, K., Nishida, C., Takenaka, T., Saito, K., Shimura, R., Fujimoto, S., Sato, T., and Masuda, R. (2015) Recent fragmentation of the endangered Blakiston's fish owl (*Bubo blakistoni*) population on Hokkaido Island, northern Japan, revealed by mitochondrial DNA and microsatellite analyses. *Zoological Letters* 1: 16. 査読有

DOI: 10.1186/s40851-015-0014-3

Kohyama, T.I., Omote, K., Nishida, C., Takenaka, T., Saito, K., Fujimoto, S., and

Masuda, R. (2015) Spatial and temporal variation at major histocompatibility complex class IIB genes in the endangered Blakiston's fish owl. *Zoological Letters* 1: 13. 査読有  
DOI:10.1186/s40851-015-0013-4

Omote, K., Nishida, C., Dick, M.H., and Masuda, R. (2013) Limited phylogenetic distribution of a long tandem-repeat cluster in the mitochondrial control region in *Bubo* (Aves, Strigidae) and cluster variation in Blakiston's fish owl (*Bubo blakistoni*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 889-897. 査読有  
DOI: 10.1016/j.ympev.2012.11.015

Omote, K., Nishida, C., Takenaka, T., and Masuda, R. (2012) Temporal changes of genetic population structure and diversity in the endangered Blakiston's fish owl (*Bubo blakistoni*) on Hokkaido Island, Japan, revealed by microsatellite analysis. *Zoological Science* 29: 299-304. 査読有  
DOI: 10.2108/zsj.29.299

[学会発表](計7件)

Nishida, C., Izumi, H., Kuroiwa, A., Uno, Y., Masuda, R., and Matsuda Y.: Comparative chromosome analysis of the Blakiston's fish owl (*Bubo blakistoni*) with the chicken (*Gallus gallus*). The Fifth Asian Chromosome Colloquium (ACC 5). April 29 - May 1 2015, Bangkok (Thailand).

表溪太, 西田千鶴子, 竹中健, 齋藤慶輔, 志村良治, 藤本智, 佐藤孝雄, 増田隆一: mtDNA分析によるシマフクロウの集団構造変遷の解明. 日本動物学会第84回岡山大会, 2013年9月26日, 岡山大学(岡山県・岡山市).

甲山哲生，表溪太，西田千鶴子，竹中健，増田隆一：パイロシーケンシング法を用いた絶滅危惧種シマフクロウの主要組織適合遺伝子複合体（MHC）の多様性解析．日本動物学会第84回岡山大会，2013年9月26日，岡山大学（岡山県・岡山市）．

表溪太，西田千鶴子，竹中健，齋藤慶輔，志村良治，藤本智，佐藤孝雄，増田隆一：集団遺伝学的解析によるシマフクロウ個体群の歴史的変遷．日本鳥学会 2013 年度大会，2013 年 9 月 16 日，名城大学天白キャンパス（愛知県・名古屋市）．

増田隆一：“はじめに～分子から動物の進化を探る”，公益社団法人日本動物学会北海道支部シンポジウム「最新技術による動物の進化と歴史の探求」，2013 年 5 月 25 日，北海道大学総合博物館（北海道・札幌市）．

表溪太，西田千鶴子，Matthew Dick，増田隆一：シマフクロウの系統的位置およびミトコンドリア DNA コントロール領域における巨大な反復配列の進化．日本動物学会北海道支部第 57 回大会 2012 年 8 月 25 日，北海道大学（北海道・札幌市）．

増田隆一：“はじめに～北海道の動物相 その普遍性と特異性”，日本動物学会第 82 回大会実行委員会企画一般公開シンポジウム「変わりゆく北海道の自然—動物学からの視点」，2011 年 9 月 23 日，旭川市大雪クリスタルホール（北海道・旭川市）．

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ：  
<https://www.sci.hokudai.ac.jp/grp/lgd/genetics/index.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

増田 隆一（MASUDA, Ryuichi）  
北海道大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：80192748

### (2)研究分担者

西田 千鶴子（NISHIDA, Chizuko）  
北海道大学・大学院理学研究院・助手  
研究者番号：50106580