

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：30109

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K18473

研究課題名(和文) 集団遺伝学的手法による絶滅危惧種ノグチゲラ個体群の健全性評価と動態プロセスの推定

研究課題名(英文) Okinawa Woodpecker (*Sapheopipo noguchii*)

研究代表者

森 さやか (MORI, SAYAKA)

酪農学園大学・農食環境学群・准教授

研究者番号：70623867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ノグチゲラは世界で沖縄島北部のやんばる地域にのみ生息する鳥類である。個体数は最大580個体あまりと推定され、絶滅の可能性が極めて高いとされている。本研究では、本種で初めての集団遺伝学的解析を実現し、個体群の健全性を評価するとともに、個体群の動態の歴史や維持の重要なプロセスを明らかにすることを目的とした。

解析したのは、やんばる地域全域から1998年～2013年に採集された322個体のDNAである。本種の遺伝的多様性はかなり低かったが、高解像度の血縁解析や遺伝的集団構造解析によって幼鳥の分散や微細な集団構造を推定でき、それに基づいて個体群動態の過去と未来について議論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国ではトキを絶滅させた苦い経験があるが、トキの保全事業を開始した時には、すでに個体数が回復不可能なほどに減少し、遺伝的多様性も劣化していた。ノグチゲラはその瀬戸際にある。トキは中国からの移入と増殖で個体数を増加させているが、ノグチゲラは世界でやんばる地域にしか生息せず、ごく近い将来における野生での絶滅の危険性が極めて高い。

本種の効果的な保全施策のためには、個体群動態の歴史や傾向、それに影響する人為的要因や、その他の環境要因について明らかにすることが必須である。本研究では、本種で初めての集団遺伝学的解析によってそれらの一部を明らかにし、結果は環境省による本種の保護増殖事業にも活用されている。

研究成果の概要(英文)：The Okinawa Woodpecker (*Sapheopipo noguchii*) is critically endangered and endemic to the Yambaru forests of northern Okinawa Island, Japan. Its numbers are estimated about 580 at maximum. This study is the first report of the population genetic analysis in this species. The aim of this study is to assess genetic health and estimate the history and essential processes of population dynamics of this species.

Genetic analysis was conducted on 322 birds sampled from entire Yambaru region during 1999-2013. The genetic diversity was quite low referred to other endangered species in the world. The pattern of juvenile natal dispersal and fine scale population structure were estimated from the high resolution analysis of kinship and genetic population structure, then on the basis of these result, past and potential future population dynamics of this species were discussed.

研究分野：保全生物学

キーワード：保全遺伝学 絶滅危惧種 景観遺伝学 マイクロサテライト 次世代シーケンサー 島嶼個体群

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ノグチゲラは、沖縄島の環境に適応して独自の進化を遂げ、現在は世界で沖縄島北部のやんばる地域だけに生息するキツツキの一種である(図1)。1960~80年代に、生息地である森林の伐採や開発の影響を受けて個体数が減少し、現在の推定個体数は150~584羽と非常に少ない(BirdLife International 2001; Threatened birds of Asia: the BirdLife International Red Data Book)。一般的に、野生動物は総個体数が500以下になると遺伝的多様性が劣化し、自然災害や伝染病等の突発事象への抵抗力を失うことにより、絶滅の可能性が非常に高くなる。

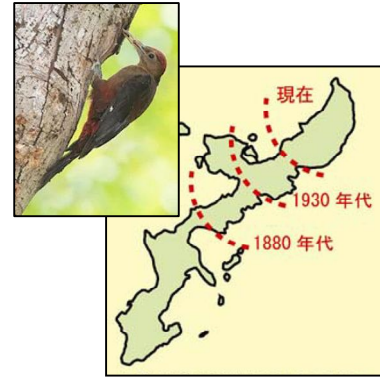


図1 ノグチゲラと分布南限の変遷

そこで環境省は「ノグチゲラ保護増殖事業計画」を策定し、1999年から足環を用いた個体識別や追跡調査を進めてきた。それによって、基礎的な繁殖生態は明らかになりつつあるが、個体群動態を理解するために必要な個体の移動分散や血縁関係に関するデータを直接観察で収集することは、ほぼ不可能である。これらを推定するにはマイクロサテライトDNA解析が有効である。

マイクロサテライトは進化速度が速く多型性に富む遺伝子座で、解像度の高い遺伝マーカーとして集団遺伝学的解析に最もよく利用されている。しかし、この遺伝マーカーの大きな欠点は、解析に必要なPCR増幅に用いるプライマーを開発するまでに煩雑な実験が必要で、多くの時間と費用がかかる点である。近縁種や異なる地域個体群で開発されたプライマーを転用することも多いが、遺伝的に遠くなるほど成功率は低下する。そのため、近縁のモデル生物のいない絶滅危惧種への応用は困難な場合が多い。

ノグチゲラを含むキツツキ類では、既知のマイクロサテライトマーカーはまだ少数しかない。ノグチゲラにも利用できる可能性の高いプライマーは、日本にも生息する近縁種オオアカゲラのヨーロッパ個体群で開発された6種類のみである(Ellegren et al. 1999; Hereditas 130: 291-299)。加えて、島嶼で進化、存続してきた種や個体群では、遺伝的多様性は低く維持されがちであり、遺伝的劣化に対する抵抗性も獲得している場合が多いと考えられる。そのため、遺伝的構造や血縁関係などを推定するには、進化速度がなるべく早い遺伝マーカーを用いたり、通常よりも解析遺伝子座数を増やしたりして、解析の解像度を保つ工夫をする必要がある。研究代表者は、前述の6種類のプライマーを用いた予備研究を行い、ノグチゲラの遺伝的多様性が近縁普通種のアカゲラよりも低い水準であるうえ、一部のプライマーは本種の解析には適さない事を明らかにした。つまり、ノグチゲラ個体群の遺伝的構造を高解像度で明らかにするには、やはり新たに多数のマイクロサテライトマーカーを開発する必要があることを確認した。

研究代表者は、環境省が収集した300個体あまりのノグチゲラの組織サンプルを供与され、2013年度からDNA抽出や本研究のための予備研究と技術試験をしてきた。本研究では、これまでに準備してきたDNAサンプルと実験技術を活用し、より詳細に個体群の遺伝的特性を解析し、個体群の動態の歴史や維持のプロセスを明らかにすることを目指す。

2. 研究の目的

本研究では、沖縄島北部のやんばる地域に固有の鳥類であるノグチゲラにおいて、初めての集団遺伝学的解析を実現する。本種は絶滅危惧IA類に指定され、わずか580羽の単一個体群からなる。狭い島嶼内で進化、維持されてきたため、その遺伝的多様性は低いと思われる。そこで、まずは多数のマイクロサテライトマーカーを用いて、高解像度の集団遺伝学的解析を実現する。それによって、個体群の健全性を評価するとともに、個体群動態の歴史を高い精度で推定し、個体群維持の重要なプロセスである個体の分散・定着過程や血縁関係の影響も推定することを目的とする。

3. 研究の方法

環境省の「ノグチゲラ保護増殖事業」によって、1998~2013年にやんばる地域のほぼ全域から採取された322個体(成鳥208個体、幼鳥105個体、年齢不明9個体)のノグチゲラの組織サンプルを用いて、下記の解析をおこなった。

(1)本研究では、新しい技術である次世代シーケンサーを活用して、メス成鳥1個体のDNAからマイクロサテライト遺伝子座を探索し、それぞれの遺伝子座にプライマーを設計した。この方法では、一度に大量のマイクロサテライト遺伝子座を検出することが出来、従来よりも大幅に省略された手順で多数のマーカーを開発することが可能である。

(2)上記で設計したプライマーを用いて効率的かつ経済的な実験系を設計し、成鳥48個体を用いて各マーカー候補の有効性の試験を行った。

(3)(2)で有効性が確認されたマーカーを用いてすべての個体の多型解析をおこない、ノグチゲラの遺伝的多様性がどの程度の水準かを評価するため、他の絶滅危惧種における既往の知

見と比較した。

(4) いくつかの仮定をおいた上で、個体群内で親子関係または生年の異なる全きょうだい関係にある個体対を推定し、幼鳥の出生地からの分散行動のパターンを推定した。なお、ノグチゲラは一夫一妻制で一度定着した営巣地への固執性が高いため、生年の異なる全きょうだいは同じ営巣地からそれぞれ分散したものと見なせる。

(5) 多数のマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的集団構造解析により、高い解像度で集団構造を把握してその成因を考察した。この解析は「全個体(幼鳥を含む)」と「成鳥のみ」の2つのデータセットに分けて行った。出生分散途中に捕獲された幼鳥を遺伝的集団構造の解析に含めると、集団構造が不明瞭になってしまう可能性が高いからである。なぜなら、ノグチゲラの成鳥は一度定着したなわばりへの固執性が高いが、生まれた幼鳥は出生地を離れて遠くまで分散していくことに加え、幼鳥は繁殖を始める前に死亡する確率が高く、たとえ生き残ってもサンプリング地点付近で定住して繁殖するようになるとは限らないからである。

4. 研究成果

(1) マイクロサテライト遺伝子座の探索とプライマーの設計

メス1個体のDNAを次世代シーケンサーの解析により、2,250遺伝子座のマイクロサテライト遺伝子座を検出した。そのうち146遺伝子座に、理論上優良なPCR増幅用のプライマー配列を設計した。

(2) 実験系の構築とマーカーの有効性試験

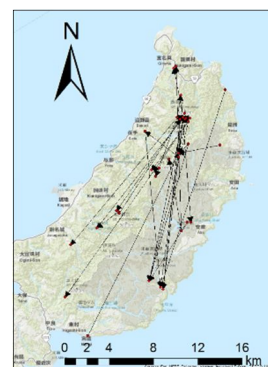
上記のプライマーを用いて候補を組み合わせ、1回の実験で5~8遺伝子座を同時にPCR増幅して解析することができる実験系を7組構築し、合計55遺伝子座のマーカー候補の有効性を試験した。その結果、45遺伝子座で遺伝子型を決定することができた。

(3) ノグチゲラの遺伝的多様性の評価

上記の45遺伝子座のうち24遺伝子座のマーカーを用いてすべての個体の解析を進めたところ、遺伝的多様性の評価に適した条件を持つ遺伝子座は15遺伝子座だった。これらのマーカーの遺伝子型の情報から遺伝的多様性の指標値を求めると、ノグチゲラの遺伝的多様性の水準は世界の絶滅危惧の種や個体群で知られている値と比較してもかなり低いレベルであり、日本のシマフクロウ個体群よりはるかに低く、一時は絶滅したと思われていた中国のトキ個体群よりもやや高い程度であった。

(4) 幼鳥の分散行動パターンの推定

(2)の45遺伝子座のうち13遺伝子座で解析を進めたところ、この解析に適した条件を持つのは9遺伝子座だった。これらの遺伝子型の情報に基づき、いくつかの仮定をおいた上ですべての個体対(47,655対)から、親子または生年の異なる全きょうだいである可能性のある個体対を推定すると、116個体対が検出された。その個体間の位置関係から、幼鳥の出生地からの分散の範囲や方向性を検討したところ、分散の範囲はやっぱり地域全体にわたり、特定の距離や方向への偏りはないものと推定された(図2)。したがって、幼鳥の分散を介した遺伝子流動は、生息域全域で偏りなく起こっている可能性が示唆された。



● 捕獲地点
➔ 推定された分散
図2 幼鳥分散の推定

(5) 遺伝的分集団構造の解析とその成因

(2)の45遺伝子座のうち20遺伝子座で解析を進めたところ、遺伝的集団構造の解析に適した条件を持つのは17遺伝子座だった。それらのすべての個体間の距離と血縁度の関係を調べると、個体間距離は近くても遠くても個体間の血縁度はゼロ付近でほとんど変わらなかった(図3)。したがって、距離的に血縁関係の近い個体が集まる傾向も、特定の距離を越えると個体の分散による遺伝的交流が起こりにくくなるような移動の障壁の存在も示唆されなかった。この結果は、(4)の推定結果と矛盾しなかった。

次に、すべての個体間の遺伝距離に基づいて、遺伝的に近い個体のクラスターが存在するかどうかを主座標分析で調べてみると、明瞭な遺伝的クラスターが9つ検出されたが、地理的な分布パターンを見出すことはできなかった。

さらに、主成分判別分析で解析すると、遺伝的クラスターは全個体で8個、成鳥のみで6個と推定されたが、クラスター間の重複が大きく地理的分布パターンは不明瞭だった。しかし、個体

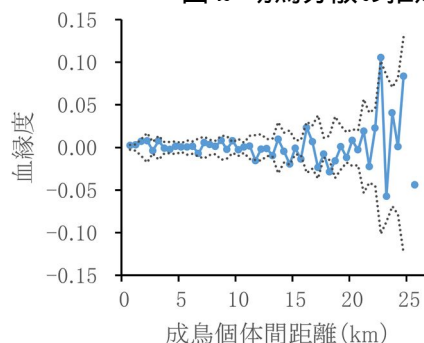


図3 成鳥間の血縁度と距離の関係

ごとに各クラスターへの所属確率を見ると、やんばる地域の南端部では他の地域とは異なるクラスターへの所属確率が高く、北端部の辺戸では分布の中心地の西銘岳と地理的に近いにもかかわらず、クラスターの所属確率に急激に変化するようが見えた。このことから、分布の周縁、特に南部に行くほど遺伝的特徴が変化している可能性が示唆された。西銘岳と辺戸の間の森林域には、帯状に農用地が点在しており、それがこの地域間の遺伝的交流をやや妨げている可能性も考えられた。

そこで、遺伝子型の情報に加えてサンプルの採集地点の位置関係も考慮する景観遺伝学的手法を用いて遺伝的分集団構造を推定した。すると、成鳥では与那覇岳付近を境に南北に2集団に分かれると推定された(図4)。幼鳥を含めた全個体での解析でも2集団に分かれたが、島の中央を走る脊梁山地の西側も西銘岳の南方まで南部の集団に含まれると推定された。

この分集団構造が形成されたのは、やんばる地域南部で一度消失した本種の分布の回復に伴う創始者効果だと考えられる。本種の分布南限は、森林の伐採や開発が盛んだった1977年までに現在よりも北側まで後退し、その後、現在の南限まで回復したと言われている。したがって、南部の分集団は北部から移動して再定着した個体(創始者)が持っていた遺伝子型の影響を強く受け、北部とは遺伝子頻度が異なるようになったと考えられる。また、南部集団の回復の背景には、1990年代以降の森林回復の効果だけでなく、やんばる地域南部で環境省が実施中の外来捕食者マングースの徹底的防除の効果もあると考えられる。ノグチゲラは特にオスが地上で採食する傾向が強く、マングースに捕食されていることも明らかになっている。成鳥のみでの解析結果と、幼鳥を含めた全個体での解析結果の差は、2集団の遺伝的交流が幼鳥分散を介して進んでいることを示し、それは東部よりも西部で多くなっている可能性を示唆する。やんばる地域の東部では、西部よりも内陸側まで道路があり、ダムや米軍基地もある。こうした環境条件の差が、個体の移動分散に影響している可能性がある。

以上の結果を総合的に考えると、集団内に人為的な要因に関連する可能性のある集団構造はあるものの、本種の保全施策をすすめる上では喫緊に保全されるべき分集団や、排除すべき移動分散の障壁はないようである。南北での遺伝的差異は現在の保全施策を継続していけば、今後は時間と共に薄まっていくことが期待できる。

(6) 今後の展望

本研究では、本種のような遺伝的多様性の低い島嶼性の絶滅危惧種においても、多数のマイクロサテライトマーカーを用いて景観データも考慮した高解像度の景観遺伝学的解析をおこなえば、個体群動態の歴史やそれに影響する要因を推定する有効な手がかりを得られることが示された。現時点では、開発した遺伝マーカーの一部をまだ集団構造の解析に活用できていない。また、既存サンプルの半数以上は西銘岳から採集されているため、サンプルの偏りの問題がある可能性もある。現段階では、遺伝的多様性の分布パターンと景観データの解析は十分にできておらず、サンプリング地点の位置情報しか解析に組み込んでいない。しかし、景観遺伝学的解析に活用可能な土地利用や、森林施業歴、外来種分布の変遷などの景観データベースは、複数整備されていることを確認している。本研究で示唆された複雑な遺伝的集団構造は、本種の個体の分散や定着の様式に、森林施業、道路やダムの開発、外来捕食者の侵入、米軍の軍事活動などの人為的な要因が影響を与えて生じた可能性が考えられる。今後、追加調査でサンプルの偏りを解消し、未利用のマーカーや既存の景観データベースを用いて分布域全体に高解像度の遺伝的解析を適用すれば、これらの可能性をより詳細に検証することが可能である。そうすれば、遺伝的背景に基づいた本種よりも頑健な保全シナリオを提供することができ、他のやんばる地域に固有の生物の保全研究においても基盤となる情報を提供することができるだろう。

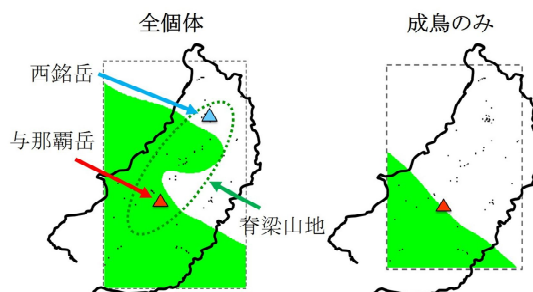


図4 景観遺伝学的手法で検出された分集団構造。点はサンプリング地点、グレーの点線が解析範囲、緑が南部集団を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sayaka Mori, Saori Tsuyama, Shokuro Tamura, Satoru Chiba, Hiroe Izumi, Isao Nishiumi
2. 発表標題 Analysis of genetic population structure in the critically endangered insular endemic Okinawa Woodpecker (<i>Dendrocopos noguchii</i>).
3. 学会等名 27th International Ornithological Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sayaka Mori, Kahori Kuno, Saori Tsuyama, Shokuro Tamura, Satoru Chiba, Hiroe Izumi, Isao Nishiumi
2. 発表標題 Genetic structure analysis for the conservation of critically endangered insular endemic Okinawa Woodpeckers (<i>Dendrocopos noguchii</i>)
3. 学会等名 8th International Woodpecker Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森さやか, 泉洋江, 千葉悟, 西海功, 水田拓
2. 発表標題 マイクロサテライト多型解析で示された絶滅危惧種オオトラツグミの低い遺伝的多様性
3. 学会等名 日本鳥学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森さやか
2. 発表標題 遺伝的集団構造解析 実施状況
3. 学会等名 平成30年度 第1回ノグチゲラ保護増殖事業ワーキンググループ会合 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森さやか, 千葉悟, 泉洋江, 西海功, 上開地広美, 山本以智人
2. 発表標題 NGSを用いた絶滅危惧種ノグチゲラのマイクロサテライトマーカーの開発
3. 学会等名 日本鳥学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森さやか, 泉洋江, 津山紗央莉, 田村庄九郎, 上開地広美, 山本以智人
2. 発表標題 絶滅危惧種ノグチゲラの集団遺伝学的解析
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森さやか
2. 発表標題 遺伝的多様性分析実施状況について
3. 学会等名 平成29年度第2回ノグチゲラ保護増殖事業ワーキンググループ会合
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 上田 恵介 編 (森さやか 分担執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 一色出版	5. 総ページ数 432
3. 書名 遺伝子から解き明かす鳥の不思議な世界 (第16章 絶滅危惧種保全と外来種管理への保全遺伝学的アプローチ)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小高 信彦 (Kotaka Nobuhiko)		
研究協力者	山本 以智人 (Yamamoto Ichihito)		
研究協力者	上開地 広美 (Kamigaichi Hiromi)		
研究協力者	西海 功 (Nishiumi Isao)		