

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2011～2014  
 課題番号：23580391  
 研究課題名(和文) 準絶滅危惧種コシジロヤマドリの繁殖と保護に関する研究 - 精子生理学の立場から  
  
 研究課題名(英文) Studies on the population fluctuation and habitat preference of Ijima's Copper Pheasant *Symnaticus soemmerringii ijimae*: an endemic, 'near threatened' Japanese subspecies.  
  
 研究代表者  
 芦沢 幸二 (Ashizawa, Koji)  
  
 宮崎大学・農学部・教授  
  
 研究者番号：60128353  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：日本固有種で準絶滅危惧種でもあるコシジロヤマドリの個体数変動と生息地選好性を明らかにするため、2002年から2014年まで調査を実施した。調査はライン・トランセクト法を用い、宮崎県日南市の2か所のコース(それぞれ、往復6.7 km)で合計584回行った。調査時間は約2,340時間、距離は3,910 kmであった。その結果、135羽のヤマドリを観察したものの、年々減少する傾向を示した。観察場所の植生についてみると、常緑・落葉広葉樹林における観察頻度が、スギ・ヒノキ壮齢植林のそれに比べて高かった。ゆえに、広葉樹林の維持と増加が、減少傾向にある生息数回復のための一つの適切な方策であると推察された。

研究成果の概要(英文)：Population fluctuations and habitat preferences of Ijima's Copper Pheasant were investigated using a line transect method at two different topographies; along a hillside in a mountainous region (Yamagariya) and along a ravine streamside (Kaichigoutani), Miyazaki prefecture from 2002 to 2014. During the 13 years of the survey, transects were walked a total of 584 times (representing approximately 2,340 hours and a walking distance of around 3,910 km). The total number of encounters was only 135 birds, which represents one bird every 17.3 hours or 29.0 km. The number of birds encountered appeared to decrease steadily throughout the study period. The frequency of encounters was higher in evergreen and deciduous broad-leaved forests, and lower in mature cedar and cypress plantations. Therefore, it is suggested that increasing their preferred broad-leaved forest habitat would be an appropriate strategy for the recovery of the declining Ijima's Copper Pheasant population.

研究分野：動物生殖生理学

キーワード：コシジロヤマドリ 生態 準絶滅危惧種 日本固有種 個体数変動 生息地選好性

### 1. 研究開始当初の背景

日本には約 550 種の鳥類が生息している。その中で、日本でしか確認されない、いわゆる「日本固有鳥類」は、わずか 9 種だけである。ヤマドリもその 1 種で、生物多様性保全の立場から、重要な地位を占めている。日本固有鳥類の多くは絶滅の危険にさらされており、なかでもヤマドリは、準絶滅危惧種に指定されているにもかかわらず、繁殖や保護対策に対しての取り組みは進んでいない。トキやコウノトリのように手遅れになってから策を講じるようではコストがかかりすぎるばかりでなく、その方策は困難である。今のうちに取り組むべきである。本研究は、家禽の繁殖に関する基礎的知見を活かして、野生鳥類の繁殖と保護という応用面に寄与することを目的として行うものである。

### 2. 研究の目的

東アジアに生息しているキジ類は、絶滅危険性の最も高いレベルの種を多く有しており、IUCN (国際自然保護連合) から絶滅危惧種あるいは準絶滅危惧種に指定されている。日本固有鳥類 (日本でしか繁殖せず、かつ周年国内に留まっている、まさに日本特産種) であるヤマドリはキジの仲間で、準絶滅危惧種に指定されている。しかし、IUCN からは現状が不明という指摘を受け、繁殖、生態、個体数管理などに関する基礎的研究が早急に求められている。コンジロヤマドリは、ヤマドリの 5 亜種のうちの 1 種で、九州南部地域にのみ生息している。野外における個体密度や行動圏などの知見が乏しく、激滅している可能性が示唆されている。このため、Bird Life International (バード・ライフ・インターナショナル) や World Pheasant Association (国際キジ協会) から、生態の正確な把握はもとより、生理学的な基礎研究の充実が強く要望されている。国がトキやコウノトリの人工繁殖に莫大な予算をつぎ込んでいるのを見ると、コンジロヤマドリについては今のうちから、繁殖生理学の立場からも十分な基礎的知見を得ておくことが肝要である。ヤマドリは、キジ目キジ科ヤマドリ属に分類されている鳥類であるが、鶏も同じく、キジ目キジ科に類別されている。

ところで、鳥類と哺乳類の繁殖現象の大きな違いの一つに、雌の生殖道内における精子の受精能保持期間が挙げられる。哺乳類は、コウモリなど一部の動物種を除けば短く、24-48 時間程度しか生存できない。これに対して鳥類の精子は、卵管の漏斗部と子宮腔移行部に存在する「精子貯留腺」と称される部位で長期間にわたって受精能力を保持できる。しかし、この長期生存機構についてはほとんど明らかにされていない。上述の長期生存機構に関連して、鳥類の精子は体温に近い 40 °C で運動を停止し、温度を下げると再び動き出す。この温度による可逆的不動化現象のメカニズムについては不明な点が多い。しかし最近、鞭毛タンパク質のリン酸化-脱リン酸化反応が、不動化現象に係わっている可能性が示唆されはじめた。一方、ヤマドリ精子の運動特性は全く不明である。もし類似の機構

が存在するならば、これまで鶏で得られた知見を基に、ヤマドリにおいても種の保存のために様々な応用技術を展開できる。

そこで本研究は、鳥類精子の不動化現象という、哺乳類精子では見られないユニークな現象に着目して、個体群レベルにおける「多様性」の保全に、細胞レベルでの「統一性」が応用できないかという課題に取り組み、これを明らかにする目的で行った。もし、両者を結びつけることができれば、単に一細胞の調節機構が明らかになるばかりでなく、野生鳥類の繁殖技術を飛躍的に向上させることができる。併せて、コンジロヤマドリが生息する一定の地域を定期的に調査することにより、未だ不明な点の多い生態を明らかにするために実施した。

### 3. 研究の方法

細胞膜の流動性は様々な環境の変化によって変動すると考えられている。しかし、細胞膜の流動性と精子の運動性との関係、とりわけ不動化現象との係わりについては全く明らかにされていない。そこで本実験では、蛍光分光光度計に偏光フィルターを取り付け、蛍光色素である 1,6-dyphenyl-1,3,5-hexatriene を使用して、不動化を起こしている鶏精子の細胞膜流動性を蛍光異方性比をモニターすることによって測定した。さらに、種々の運動調節物質を加えることによって、流動性がどのように変化するかについても検討した。

ところで、精子の鞭毛には「9 + 2」と称されるチューブリン (微小管) が存在し、運動は ATPase であるダイニンが ATP を分解することで得られるエネルギーにより、微小管を滑らせることで引き起こされる。「滑り運動」は、外的環境の変化を感知して巧みに調節されている。鶏精子の温度による不動化現象は、細胞膜の存在する正常精子ばかりでなく、Triton X-100 で除膜したモデル精子でも同様に認められる。まず、同様の現象が認められるか否かについて再確認した。さらに、運動調節に何れのリン酸化-脱リン酸化酵素が関与しているかを明確にするため、種々のリン酸化-脱リン酸化酵素阻害剤や  $Ca^{2+}$  チャンネル拮抗薬を用いて、正常精子や除膜精子の運動性と ATP 消費量に及ぼす影響を検討した。

一方、コンジロヤマドリの生態調査については、ヤマドリの習性を考慮して、ライン・トランセクト法を用いて、宮崎県日南市北郷町山仮屋付近 (北緯 31°44'16"、東経 131°21'18"、標高 390 ~ 455 m) と、家一郷谷付近 (北緯 31°46'20.18"、東経 131°21'12.61"、標高 270 ~ 395 m) の 2 つのコースで行った。前者は山の中腹沿い、後者は溪流沿いであり、距離は両コースとも往復 6.7 km である。山仮屋調査地は 2002 年 5 月から 2014 年 12 月まで、家一郷谷調査地は 2002 年 9 月から 2014 年 12 月まで、それぞれ原則的に 2 週間に 1 度の頻度で観察した。総調査回数は、山仮屋調査地で 299 回、家一郷谷調査地で 285 回であった。なお、日の出時刻から調査開始時刻の間を一定にするため、季節に

よって出発時刻を変更して調査を行った。ヤマドリ発見時には、全地球測位システムを用いて発見地点の位置を測定した。また、発見個体の雌雄の別や発見時刻、発見場所の植生なども併せて記録した。

#### 4. 研究成果

まず、コジジロヤマドリの代わりに、同じキジ目キジ科である鶏の精子を用いて、細胞膜流動性が運動性に及ぼす影響を検討した。ヤマドリの代わりに鶏の精子を用いた理由は、両者は同じキジ科に属しており、形態や生理特性が近似していること、ヤマドリは季節繁殖動物であり、春先の短い期間しか造精能力がないため、通年での実験が不可能なためである。

(1)最初に、鶏精子の細胞膜流動性の測定を行うための最適条件を設定した。その結果、溶液中のDPH濃度は $2.0 \times 10^{-6}$  M、添加精子濃度は $2.0 \times 10^6$ /ml、蛍光波長は426 nm、精子試料をキュベットに注入後に静置する時間を3分間とすることが最適であった。これらの条件下で細胞膜流動性(異方性比)を測定した。30及び40における異方性比を測定したところ、30よりも40の異方性比が有意に低かった( $P < 0.05$ )。このことは、40における細胞膜流動性が高まることを示唆している。30において鶏精子の運動を阻害することが知られているML-7とPD150606を添加した後の異方性比を比較すると、阻害剤添加区において無添加の対照区より有意に高い値を示した( $P < 0.05$ )。4で24時間保存した精子と採取直後の新鮮な精子について異方性比を比べてみると、異方性比値は保存後の精子でやや増加するものの、両区間に有意差は認められなかった。

(2)次に、 $Ca^{2+}$ を中心とする様々な細胞内情報伝達物質に着目して、鶏精子の運動調節における $Ca^{2+}$ のかかわりについて検討した。 $CaCl_2$ とEGTAを用いて精子浮遊液中の $Ca^{2+}$ 濃度を $10^{-9}$ から $10^{-3}$  Mまで変化させると、細胞膜の存在する正常精子は、30では何れの濃度域でも活発な運動を行っていた。これに対し40では、 $10^{-5}$  M以下ではほぼ停止していた。それ以上の濃度域で運動が徐々に再開し、 $10^{-3}$  Mでは60%以上の値まで回復した。除膜精子の場合は正常精子とは異なり、40では何れの濃度域でも不動化を起こしたままだった。一方30では、活発な運動を行っている除膜精子に2 mM EGTAを添加して溶液中の $Ca^{2+}$ を除去すると運動が停止し、その後2 mM  $CaCl_2$ を加えると再開した。正常精子に細胞膜透過性のCaM・アゴニストであるCALP1やCALP3を加えても、40では運動促進効果が観察されなかった。また、 $Ca^{2+}$ 感受性プロテアーゼの一種であるカルパインの活性化剤であるジブカインや、同じく $Ca^{2+}$ 感受性プロテアーゼであるcathepsin L/B/Kの阻害剤を加えても、無添加の対照区と比較して、正常精子や除膜精子の運動性に差異は認められなかった。除膜精子に脱リン酸化酵素(PP1/PP2A)の阻害剤であるカリクリンAを加えると運動が促進され、その後2 mM

EGTAを添加しても、促進効果は維持された。正常精子の細胞膜流動性は、40で $CaCl_2$ やカリクリンA存在下で運動を発現させても、無添加の対照区と比較して差異は観察されなかった。

一方、30と40で鶏精子抽出液中のダイニンATPase活性を測定したところ、2 mM EGTA添加区を除き、30に比べて40が何れの添加区(2  $\mu$ M  $CaCl_2$ , 2 mM  $CaCl_2$ , 100 nM カリクリンA)とも、有意に高い活性を示した( $P < 0.05$ )。この時の除膜精子の運動性は、カリクリンA添加区を除き、著しく抑制されていた。30では、EGTA、 $CaCl_2$ 、カリクリンAを加えても、ダイニンATPase活性に差異は認められず、40に比べて明らかに低下した。それにもかかわらず、運動性はEGTA添加区を除き80%前後の値を示した。

(3)30と40において、電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネル拮抗薬であるベニジピン添加が、細胞膜を除去していない正常精子の運動性に及ぼす影響を検討したところ、添加濃度を高めても、運動性に対する影響は見られず、30では70%前後の運動性を維持し、40では10%前後まで抑制された。10  $\mu$ M ベニジピンと2 mM  $Ca^{2+}$ 添加後の正常精子の運動性の推移を見てみると、30では、ベニジピン添加区と無添加の対照区との間に差異は認められず、高い値を維持していた。これに対して40では、 $Ca^{2+}$ を加えるまでベニジピン添加区と対照区のいずれの場合も、運動性は抑制されていた。その後 $Ca^{2+}$ を添加するとベニジピンが存在するにもかかわらず運動性は回復した。しかし、時間の経過とともに対照区に比べて運動性の低下が認められた。これとは逆に、先に $Ca^{2+}$ を添加し、その後にベニジピンを加えた場合でも、40においては、ベニジピン添加区の精子の運動性は、対照区より急激に減少するものの、完全には抑制できなかった。このような現象は、 $Ca^{2+}$ の代わりに脱リン酸化酵素の阻害剤であるカリクリンA(100 nM)を添加した場合では認められなかった。すなわち、正常精子をインキュベーションして5分後にベニジピンを加え、20分後に対照区と添加区の両方へカリクリンAを添加すると、30においては、対照区の運動性は70~80%前後の値を維持していた。ベニジピン添加区も対照区と同様の運動性を示し、カリクリンA添加後も運動性を継続したままであった。同様に40においても、ベニジピン添加区の精子の運動性は60%前後の値を保持していた。カリクリンAとベニジピンの添加順序を逆にしても同様の傾向を示した。Triton X 100により細胞膜を除去した除膜精子の運動性に及ぼすベニジピンの影響については、正常精子の場合とは異なり、30と40のいずれの温度域でも、ベニジピン添加による運動抑制作用は全く得られなかった。

以上の結果から、鶏精子の基本的な運動発現に $Ca^{2+}$ は不可欠であること、その $Ca^{2+}$ の一部は細胞膜の電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルを透過して流入するものの、 $Ca^{2+}$ と40で不動化を起こしている精子を動かすための $Ca^{2+}$ は、別の機

構に關与していると示唆された。また、その作用点に  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の CaM、カルパイン及び cathepsin の活性化は関係しないと考えられた。さらに、温度による可逆的な不動化現象はダイニン ATPase 活性の低下によるものではなく、この現象に細胞膜の流動性も關与しないと推察された。

(4)13年間にわたるコシジロヤマドリの生態調査において、山仮屋調査地ではオス41羽、メス14羽の合計55羽、家一郷谷調査地ではオス42羽、メス36羽、ヒナ2羽の合計80羽を発見することが出来た。個体発見はほぼ同じ地点が多かったが、発見日時が異なるため、同一個体であるかは不明である。発見時期は、繁殖期である3~5月が多かった。年次別の発見個体数は、山仮屋調査地では2005年まで年々減少してきていたが、2006年から増加傾向を示した。2007年をピークに再び減少し、2012年は増加傾向にあったもののそれ以降は年々減少している。家一郷谷調査地では、2003年、2006年に減少が見られるものの2008年まで特に大きな変動は認められなかった。2009年から2013年までは、2012年以外減少傾向にあったが、2014年は増加を示した。発見時刻は8:00~10:00の間が多く、日の出から2~3時間の間に多く発見できた。発見場所の植生は、山仮屋調査地では広葉樹と植林杉の混在地での発見が最も多く、家一郷谷調査地では広葉樹と落葉樹の雑木林での発見が多かった。発見個体と林道の距離は例年、山仮屋調査地では5~30mと遠距離であるのに対し、家一郷谷調査地では0~10mと近距離での発見が多かった。しかし、今年は山仮屋調査地においても近距離での発見であった。

以上の結果から、今まであまり明らかではなかったコシジロヤマドリの生態の一部を把握することが出来た。しかし、未だデータ数が少ないため、詳細な値を得るためには、今後も調査を継続し、森林伐採などの環境の変化が著しい中で、コシジロヤマドリの生態がどう変化していくのかについて注意深く観察していく必要がある。

## 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10件)

Ashizawa, K., Kawaji, N., Tanaka, A., Nagase, D., Matsumoto, Y., Tatemoto, H. and Tsuzuki, Y. (2014) Population fluctuation and habitat preference of Ijima's Copper Pheasant *Syrnaticus soemmerringii ijimae*: an endemic, 'near threatened' Japanese subspecies. *Ornithol. Sci.*, 査読有, 13, 77-81.

Ashizawa, K., Oyama, N., Katayama, S., Narumi, K., Tatemoto, H. and Tsuzuki, Y. (2013) Regulation of fowl sperm motility: evidence for the indirect, but not direct, involvement of dynein-ATPase activity on the

reversible temperature-dependent immobilization. *Theriogenology*, 査読有, 79, 558-565.

Narumi, K., Ashizawa, K., Fujiishi, Y., Tochinnai, R., Okada, E., Tsuzuki, Y., Tatemoto, H., Hamada, S., Kaneko, K. and Ohshima, W. (2013) Persistence and accumulation of micronucleated hepatocytes in liver of rats after repeated administration of diethylnitrosamine. *Mutat. Res.*, 査読有, 755, 100-107.

Narumi, K., Ashizawa, K., Takashima, R., Takasawa, H., Katayama, S., Tsuzuki, Y., Tatemoto, H., Morita, T., Hayashi, M. and Hamada, S. (2012) Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats: an investigation of diethylnitrosamine and 2,4-diaminotoluene. *Mutat. Res.*, 査読有, 747, 234-239.

Shimokawa, K., Oshiro, R., Yamanaka, K., Ashizawa, K., Ohta, S. and Tatemoto, H. (2012) Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native Agu pig sperm frozen in an extender supplemented with antiapoptotic PTD-FNK protein. *Theriogenology*, 査読有, 78, 1446-1455.

Nabenishi, H., Ohta, H., Nishimoto, T., Morita, T., Ashizawa, K. and Tsuzuki, Y. (2012) The effects of cysteine addition during *in vitro* maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. *Zygote*, 査読有, 20, 249-259.

Nabenishi, H., Takagi, S., Kamata, H., Nishimoto, T., Morita, T., Ashizawa, K. and Tsuzuki, Y. (2012) The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. *Mol. Reprod. Dev.* 査読有, 79, 31-40.

Lay, K.M., Oshiro, R., Arasaki, C., Ashizawa, K. and Tatemoto, H. (2011) Role of acidification elicited by sialylation and sulfation of zona glycoproteins during oocyte maturation in porcine sperm-zona pellucida interactions. *J. Reprod. Dev.*, 査読有, 57, 744-751.

Nabenishi, H., Ohta, H., Nishimoto, T., Morita, T., Ashizawa, K. and Tsuzuki, Y. (2011) Effect of the temperature-humidity index on body temperature and conception rate of lactating dairy cows in southwestern Japan. *J. Reprod. Dev.*, 査読有, 57,

450-456.

Lay, K.M., Ashizawa, K., Nakada, T. and Tatemoto, H. (2011) N-glycosylation of zona glycoproteins during meiotic maturation is involved in sperm-zona pellucida interactions of porcine oocytes. Theriogenology, 査読有, 75, 1146-1152.

[学会発表] (計 5 件)

原口恭昂・續木靖浩・芦澤幸二、体外成熟時のカルパイン阻害剤添加がガラス化保存するブタ未成熟卵母細胞の成熟能に及ぼす影響、第 7 回日本暖地畜産学会、2014 年 10 月 26 日、宮崎観光ホテル(宮崎県・宮崎市)。

芦澤幸二、温度センサー・タンパク質による鳥類精子の運動制御機構、第 45 回精子研究会、2014 年 1 月 11 日、神戸大学総合研究拠点(兵庫県・神戸市)。

芦澤幸二、鳥類精子の運動調節に関与するシングル伝達機構、第 54 回宮崎大学イブニングセミナー、2013 年 11 月 14 日、宮崎大学図書館(宮崎県・宮崎市)。

小野貴史・芦澤幸二・大山奈央・續木靖浩、鶏精子の可逆的不動化現象における Ca<sup>2+</sup>とダイニン ATPase の関与、第 116 回日本畜産学会大会、2013 年 3 月 30 日、安田女子大学(広島県・広島市)。

大山奈央・芦澤幸二・續木靖浩、鶏精子の運動調節機構における Ca<sup>2+</sup>と細胞膜流動性のかかわり、第 4 回日本暖地畜産学会、2011 年 10 月 30 日、沖縄産業支援センター(沖縄県・那覇市)。

[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]

ホームページ等

<http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~ags/lab/arp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

芦澤 幸二 (ASHIZAWA, Koji)  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号：60128353

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：