

# 絶滅危惧種シマフクロウの種保全をめざした個体識別・遺伝的多様性の解析と遺伝子資源保存システムの確立

北方鳥類多様性研究グループ

増田隆一<sup>1</sup>・西田千鶴子<sup>1</sup>・竹中 健<sup>2</sup>・表 溪太<sup>3</sup>

シマフクロウの凍結保存細胞を解凍した後に再度培養し、増殖細胞の再凍結保存および DNA 抽出と保存を行った。20 年以上凍結保存されていた細胞や、個体によっては 1 本のチューブしか残されていない細胞についても、再培養に成功した。さらに、野外から得られた血液や羽毛等から抽出された DNA を保存し今後の研究に活用するシステムづくりを進めた。

シマフクロウに使用可能な多型的 DNA マーカーを見だし、それをを用いた遺伝的な個体識別解析法を確立した。この手法は、シマフクロウの家系（親子関係）および個体関係を分析するのに有効であることが判明した。過去から現在に至るシマフクロウの集団遺伝学的分析により、地域集団内・間の遺伝的多様性を明らかにした。さらに、時間的な変遷を検討した結果、遺伝的多様性が低下しつつあることが明らかとなった。

## I. 背景と研究目的

シマフクロウ (*Bubo blakistoni*) は世界的に見ても北東ユーラシアのみに生息し、日本では北海道だけに生息する固有の鳥類であり、重要な生態的位置を占めている。シマフクロウは主に魚食性であり、営巣のために古木の樹洞を利用するため、魚影が豊富な河川を有する原生林やそれに近い環境の森林を生息地としている。現在、北海道におけるシマフクロウの生息域は分断化され、その生息数も約 130 羽と推定されているため、緊急に保全を要する絶滅危惧種である。しかし、シマフクロウの遺伝的特徴については個体レベル、集団レベルにおいてほとんど明らかにされていない。よって、シマフクロウ個体ごとの遺伝的特徴および集団内・間の遺伝的多様性を明らかにすることは、今後の保全活動を進めるうえでも重要な生物学的情報をもたらす。

本研究では、北海道のシマフクロウ集団の保全をめざして、以下の 3 つの項目を目的とした。

(1) これまで野外から採取され蓄積されてきたシマフクロウの皮膚培養細胞の再培養とその保存状態の確認を行う。野外から得られた新規の血液・羽毛等ならびに抽出されたゲノム DNA を保存し、今後の研究に活用するシステムを確立する。

(2) 高多型的 DNA マーカーを開発し、遺伝子レベルから個体識別解析法を確立する。その手法を導入して、シマフクロウの家系（親子関係）および個体関係を分析する。

(3) 現在のシマフクロウの地域集団内・間の遺伝的多様性を解明する。さらに、過去の標本の比較分析を行い、遺伝的多様性の変動を明らかにする。

## II. 方法と結果

### 1. 過去の凍結保存細胞の再培養および培養細

1: 北海道大学大学院理学研究院 2: シマフクロウ環境研究会 3: 北海道大学大学院理学院  
2011.11.17 受付, 2013.10.11 公開

## 胞・血液・羽毛からの DNA 抽出と保存

シマフクロウの性判定は、1980年代から北海道大学において西田（本研究グループのメンバー）らによって開始された。その手法として、培養細胞から得られる染色体標本の核型分析が行われ、性染色体構成により判定された。すなわち、メスはZW型、オスはZZ型である。その染色体分析には、ヒナの足輪取り付けの際に採取された微量の皮膚から無菌培養された繊維芽細胞が用いられ、同時に増殖した培養細胞は自主的に液体窒素に凍結保存されていた。本研究では、それらの貴重な凍結保存細胞を再培養し、増殖した細胞をDNA抽出用および液体窒素への再保存用とした。長期間のものでは20年以上もの間凍結保存されていたこと、個体によっては1本のチューブしか残されていないものがあったことなどにより、再培養が成功するか懸念されたが、慎重に操作を進めた結果、幸いにも保存されている凍結細胞（100個体分）を再培養することに成功した（写真1）。各サンプル細胞の一部からはゲノムDNAを抽出し、下記のⅡ-2およびⅡ-3の分析に使用するとともにそのDNAを保存した。

さらに、知床、十勝、日高などにおける野外でのヒナ足環調査に参加し、微量の採血による塗抹標本（写真2）および営巣地周辺に落下していた羽毛（写真3）等の収集を行い、DNAを抽出・保存した。血液塗抹標本・羽毛ともに以下に示すDNA分析に使用可能であることが明らかとなった。

## 2. 高多型的 DNA マーカーの開発

本研究では、両親から遺伝するマイクロサテライト遺伝子座をマーカーとして用いた。マイクロサテライトは、ゲノムDNAの中に散在し、1塩基から10塩基を一つの単位とする反復配列のことである。その反復回数には多様性があり、一つのマイクロサテライト遺伝子座におい

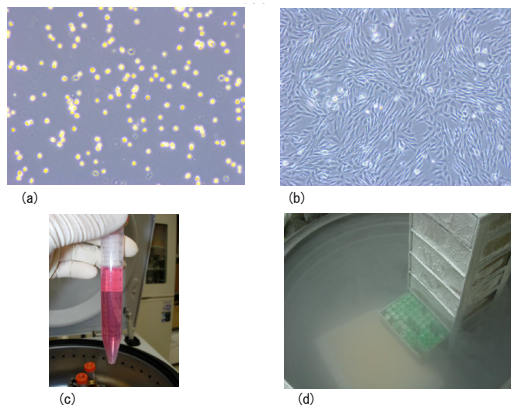


写真1 シマフクロウ皮膚繊維芽細胞の培養。

(a) 解凍した細胞を培養液に移す。(b) 一面に増殖細胞がみられる。(c) 遠心することにより培養液から増殖細胞を分離する。(d) 培養細胞を液体窒素中に凍結保存する。



写真2 ヒナ足輪調査時に健康診断のために採血された血液標本。微量血液の塗抹標本をDNA分析用に保存する。



写真3 営巣地周辺に落ちているシマフクロウの羽毛。回収してDNA分析を行う。

て、反復回数の異なる塩基配列を異なる対立遺伝子としてとらえる。

まず、シマフクロウのゲノム DNA を用い、遺伝子増幅法 (PCR) とそのクローニングにより、複合型のマイクロサテライトの 38 遺伝子座を単離した。これには複合型マイクロサテライト配列を PCR プライマーとして用いた。その各 PCR 産物の中間部位に、新規に PCR プライマーをデザインするとともに最適な反応条件を設定し、家系が異なると考えられるシマフクロウ約 10 個体について遺伝子型を調べた。その結果、これらの個体では多様性がなく単型であったため、残念ながら、得られた 38 遺伝子座はマーカーに使用することができなかった。

次に、複数種のフクロウ類から既に報告されているマイクロサテライト遺伝子マーカーをシマフクロウ DNA 分析へ適用し、多型性の有無を調べた。マーカー候補として、以下の 6 種 [ワシミミズク (*Bubo bubo*) (Isaksson and Tegelstrom 2002), リュウキュウコノハズク (*Otus elegans*) (Hsu et al. 2003, 2006), ニシアメリカフクロウ (*Strix occidentalis lucida*) (Thode et al. 2002), アカスズメフクロウ (*Glaucidium brasilianum*) (Proudfoot et al. 2005), キンメフクロウ (*Aegolius funereus*) (Koopman et al. 2004), アナホリフクロウ (*Athene cunicularia*) (Korfanta et al. 2002; Faircloth et al. 2010)] から報告されているもの、ならびに、キンカチョウ (*Taeniopygia guttata*) で開発されメンフクロウ (*Tyto alba*) など有効性が確認されているマーカー (Klein et al. 2009) の計 53 遺伝子座を使用した。これら

のマイクロサテライトマーカー候補を用いて、シマフクロウ 2 個体の DNA について PCR を行った。計 53 遺伝子座のうち 33 遺伝子座において、シマフクロウ DNA からの PCR 増幅に成功した。得られた PCR 産物について塩基配列を決定し、反復配列であるマイクロサテライト領域が確実に含まれることを確認した。その後、比較的長いサイズのマイクロサテライト領域を含むマーカー候補について、シマフクロウ約 10 個体について予備的分析を行い、多型性の有無を調べた。これらのマーカー候補は 2 塩基から 5 塩基の単位の反復を有していたが、2 塩基または 3 塩基の単位のマーカーは多型的ではなかった。一方、4 塩基または 5 塩基の単位が 10 回以上反復するマイクロサテライト遺伝子座のすべてにおいて多型性が見い出された。最終的に、リュウキュウコノハズク、ニシアメリカフクロウ、アカスズメフクロウ、アナホリフクロウから報告された計 8 遺伝子座が多型性をもつことが判明し、それらをシマフクロウ分析のマーカーとして選定することとした (表 1)。なお、マーカー No.8 については Faircloth et al. (2010) により常染色体上にある遺伝子座として報告されていたが、本研究での分析により、シマフクロウでは性染色体である Z 染色体上に位置していることが明らかになった。それ以外のマーカー遺伝子座は常染色体上に位置していると考えられた。

### 3. 家系調査, 個体関係, 集団内遺伝的多様性の解析

表 1 8 種類のマイクロサテライト遺伝子座に関する対立遺伝子数とヘテロ接合度の観察値 ( $H_o$ )。

遺伝子座	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8
対立遺伝子数	7	2	3	2	7	6	3	3
ヘテロ接合度 観察値( $H_o$ )	0.66	0.05	0.49	0.51	0.74	0.61	0.51	オス 0.49 メス 0

上記 II -2 で選定した DNA マーカーを用いて、II -1 で得られた計 120 個体のサンプルについて遺伝子型を決定した。採取年代と個体数は、1986～1989 年の 25 個体、1990～1993 年の 37 個体、1997～1999 年の 37 個体、2009～2010 年の 21 個体である。さらに、サンプル採取地にに基づき以下の 5 つの地域集団を設定した：知床 (44 個体)、釧路北部 (18 個体)、根室 (31 個体)、十勝 (22 個体)、日高 (5 個体)。

その結果、各個体間で遺伝子型が一致することではなく、選定した 8 つの DNA マーカーを用いることにより個体識別および性別判定が可能になることが判明した。表 1 は、各マーカー遺伝子座において見いだされた対立遺伝子数とヘテロ接合度 (遺伝的多様性の指標の一つ) の観察値 ( $H_o$ ) を示す。これらのマーカーを用いて得られた遺伝子型と生態調査から明らかにされている家系とを照合することにより、使用している DNA マーカーすべてが親から子へ遺伝していることが明らかになった。つまり、個体の由来が不明である 2 つのサンプルを調べた時に、もしそれらが異なる個体由来であれば、その遺伝子型が異なる確率が極めて高いと考えられる。反対に、遺伝子型が同じであれば、両サンプルは同一個体由来する可能性が高い。こ

れらのマーカーによって決定される遺伝子型を比較することにより、親子鑑定や近縁関係を的確に考察することができる。

分析した全個体の遺伝子型データについて、ARLEQUIN 3.1.1 (Excoffier et al. 2005) によりハーディ・ワインベルク平衡 (HWE) 検定を行ったところ、一部の遺伝子座で HWE からの有意な逸脱 ( $P < 0.05$ ) がみられた。一方、5 つの地域集団それぞれについて HWE 検定を行ったところ、どの地域集団についても HWE からの逸脱はみられず、各地域集団において、外部からの移入個体が少ない状態で世代交代が進んでいることが示された。

さらに、ARLEQUIN 3.1.1 を用いて、分集団間での遺伝的分化度 (pairwise  $F_{ST}$ ) を算出した結果、いずれの地域集団間でも有意な分化がみられた。さらに、各地域において、サンプリング年代で分けた集団間で遺伝的分化度を算出したところ、同地域における年代間では小さな値が得られたが、異なる地域の集団間の分化度はどの年代においても有意であった。その遺伝的分化度を用いて、MEGA 5.0 (Tamura et al. 2007) により地域集団間の系統関係 (近隣結合法) を描いたところ、知床集団が他の 4 地域集団と近い関係にあることが明らかとなった (図

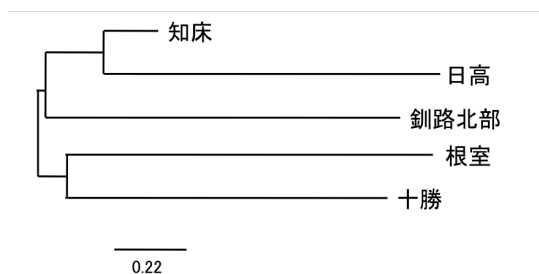


図 1 地域集団間の遺伝的分化度  $F_{ST}$  に基づく系統関係 (近隣結合法による)。下にある棒線は遺伝距離を表す。

1).

図2は各地域集団におけるヘテロ接合度を示す。さらに、図3は各地域集団における4つの年代を経たヘテロ接合度の変遷を示している。十勝集団を除いた他の地域集団においては、1980年代から現代にかけて遺伝的多様性が減少しつつある傾向がみられた。一方、十勝集団では、年を経るごとにヘテロ接合度が上昇していた。日高集団では、2009年から2010年のサンプルのみである。

### III. 考察

本研究の目的は、シマフクロウ集団の多様性や遺伝的分化の程度を評価するための遺伝子マーカーを開発すること、そのマーカーを用いて実際に評価を行うこと、そして、将来の研究や保全のために培養細胞やDNAを着実に保存する体制を確立することであった。これら3つの目的に沿って研究を進めることができたと考えている。

培養細胞の凍結保存については緻密で地道な作業が必要であり、今後も継続していく。

また、本研究により特定した8種の遺伝子マーカーは、個体レベルでの家系・個体識別分析、ならびに、集団遺伝レベルの分析に十分活

用できるものであることが明らかになった。そのマーカーを用いて得られた結果について以下の点を考察した。

まず、全個体の遺伝子型を分析した際にみられたHWEからの逸脱は、遺伝的構成の異なる複数の地域集団を単一の集団として扱ったことによるものと考えられる。この現象はワーランドの原理として知られているものである。一方、5つの地域集団の各々において検定したところでは、HWEからの逸脱はみられなかったため、北海道のシマフクロウ集団が生息地域ごとに遺伝的に分化しており、地域集団間の個体の移動が少ないことが示唆された。これまでの標識調査により、一部の地域集団は限られた家系によって構成されていることが示されている。

一方、遺伝的分化度がどの地域集団間でも統計的に有意であったことも、地域集団間の遺伝的分化の進行を裏づけている。また、地域集団間の遺伝的分化度と地理的距離との相関はみられなかったため、各地域集団が孤立した状態でボトルネックとそれに伴う遺伝的浮動を経験したことが示唆された。北海道におけるシマフクロウの個体数は1900年以降大きく減少したと報告されている(早矢仕1999)。分集団間で比較すると、知床、十勝集団のヘテロ接合度期待

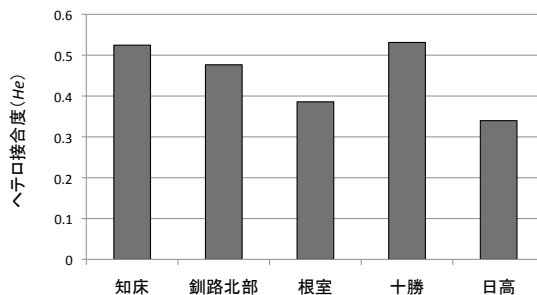


図2 地域集団におけるヘテロ接合度の期待値 ( $H_e$ )。

Omote et al. (2012) より。

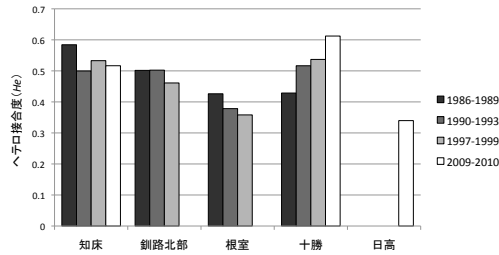


図3 地域集団における年代ごとのヘテロ接合度期待値 ( $H_e$ ) の変遷. Omote et al. (2012) より.

値 ( $H_e$ ) は比較的大きく、釧路北部、根室、日高集団では低かった。釧路北部、根室、十勝集団では  $H_o$  が  $H_e$  よりも大きな値であった (図2)。これはボトルネックを経た後間もない集団にみられるヘテロ接合度過剰を示しているものと思われる。100-150 頭以下のボトルネックを経た鳥類集団では、遺伝的多様性の低下や近交化のために孵化率の低下が進行することが報告されている (Heber and Briskie 2010)。現在のシマフクロウ集団においては、顕著な孵化率の低下は報告されていないが、このようなことも念頭において保護対策を進めるべきである。

一方、知床集団とその他の4つの地域集団の間の遺伝的分化度は比較的小さかった (図1)。知床ではシマフクロウが比較的安定して生息しており、その生息数は北海道における全個体の約半数を占めると報告されている (竹中 2010)。本研究の結果は、知床集団では他の地域集団と比べてボトルネックによる影響が小さく、従来の遺伝的多様性が維持されていることを示唆する。

シマフクロウの遺伝的多様性 (表1, 図2) は他のフクロウ類と比べてどうであろうか。シマフクロウ全個体の  $H_e$  の平均値は 0.54 であった。それに対し、既報のユーラシア大陸に広く分布するワシミズクの  $H_e$  は 0.60 (Isaksson and Tegelstrom 2002)、リュウキュウコノハズク

の台湾亜種 (台湾 Lanyu Island のみに分布し、IUCN Red List の準絶滅危惧種に指定) の  $H_e$  は 0.80 である (Hsu et al. 2003)。種、サンプルサイズ、サンプリング地域などのちがいがあため、 $H_e$  を直接比較することは難しいが、 $H_e$  の値だけみても北海道シマフクロウ集団における遺伝的多様性が低下していることが示唆される。

さらに、各地域における年代におけるヘテロ接合度の変遷を検討した結果、知床、釧路北部、根室集団において 1980 年代から順に低下していた (図3)。これは、集団サイズが小さいことによる遺伝的浮動によって遺伝的多様性が時間とともに低下したことを示している。一方、十勝集団においては、ヘテロ接合体の上昇が見られた。十勝集団の遺伝子型構成を詳細に調べると、年代を経るごとに変化し、徐々に根室集団との類似性が生じていることから、根室から十勝への個体の移入により遺伝子流動が起こったものと考えられる。

#### IV. 今後の展望

以上のように、北海道のシマフクロウでは地域集団間でわずかな個体が移動している可能性があるが、遺伝的多様性が徐々に減少しつつある地域が多いと考えられる。今後の保護対策において、保全ユニットや生息域間のコリドーを

設定する際には、本研究データおよびこの手法を用いて得られる今後のデータを生物学的データとして生かしていくことが重要であると考えられる。さらに、生息域外（飼育下）の繁殖個体群についての遺伝的モニタリングにおいても、本研究成果と手法は貢献することができる。

## 謝辞

本研究を進めるにあたりご協力いただきました環境省釧路環境事務所、釧路湿原野生生物保護センター、早矢仕有子氏、山本純郎氏に深く感謝いたします。最後に、研究助成をいただきました自然保護助成基金に深く御礼申し上げます。

本調査の成果は、Omote et al. (2012) として論文発表しました。

## 文献

- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Faircloth, B. C., Title, A., Tan, K., Welty, J., Belthoff, J. R. and Gowaty, P. A. 2010. Eighteen microsatellite loci developed from western burrowing owls (*Athene cunicularia hypugaea*). *Conservation Genetics Resources* 2: 167-171.
- 早矢仕有子 1999. 北海道におけるシマフクロウの分布の変遷—主に標本資料からの推察— *山階鳥研報* 31: 45-61.
- Heber, S. and Briskie, J. V. 2010. Population bottlenecks and increased hatching failure in endangered birds. *Conservation Biology* 24:1674-1678.
- Hsu, Y.-C., Severinghaus, L. L., Lin, Y.-S. and Li, S.-H. 2003. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers from the Lanyu scops owl (*Otus elegans botelensis*). *Molecular Ecology Notes* 3: 595-597.
- Hsu, Y.-C., Li, S.-H., Lin, Y.-S. and Severinghaus, L. L. 2006. Microsatellite loci from Lanyu scops owl (*Otus elegans botelensis*) and their cross-species application in four species of strigidae. *Conservation Genetics* 7: 161-165.
- Isaksson, M. and Tegelström, H. 2002. Characterization of polymorphic microsatellite markers in a captive population of the eagle owl (*Bubo bubo*) used for supportive breeding. *Molecular Ecology Notes* 2: 91-93.
- Klein, A., Horsburgh, G. J., Kupper, C., Major, A., Lee P. L. M., Hoffmann, G., Matics, R. and Dawson, D. A. 2009. Microsatellite markers characterized in the barn owl (*Tyto alba*) and of high utility in other owls (*Strigiformes: Aves*). *Molecular Ecology Resources* 9 : 1512-1519.
- Koopman, M. E., Schable, N. A. and Glenn, T. C. 2004. Development and optimization of microsatellite DNA primers for boreal owls (*Aegolius funereus*). *Molecular Ecology Notes* 4: 376-378.
- Korfanta, N. M., Schable, N. A. and Glenn, T. C. 2002. Isolation and characterization of microsatellite DNA primers in burrowing owl (*Athene cunicularia*). *Molecular Ecology Notes* 2: 584-585.
- 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.
- Proudfoot, G., Honeycutt, R. and Douglas, Slack, R. 2005. Development and characterization of microsatellite DNA primers of ferruginous pygmy-owl (*Glaucidium brasilianum*). *Molecular Ecology Notes* 5: 90-92.
- 竹中 健 2010. シマフクロウの現状と課題. 斜里町立知床博物館編「しれとこライブラリー 10 知床の自然保護」, 32-49, 北海道新聞社, 札幌.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thode, A. B., Maltbie, M., Hansen, L. A., Green, L. D. and Longmire, J. L. 2002. Microsatellite markers for the Mexican spotted owl (*Strix occidentalis lucida*). *Molecular Ecology Notes* 2: 446-448.

# Study on individual identification and genetic diversity of the Blakiston's fish owls and establishment of the preservation system of their genetic resources

Ryuichi Masuda, Chizuko Nishida, Takeshi Takenaka and Keita Omote

In the present study, we obtained the following results, which contribute to development of conservation of the Blakiston's fish owls:

- 1) Cultured fibroblasts preserved in liquid nitrogen were successfully re-cultured, and some parts of sub-cultured cells were preserved again in liquid nitrogen and the others were applied to DNA extraction for genetic analysis. In addition, DNA of bloods and feathers collected in field was extracted and preserved for genetic analysis.
- 2) Using polymorphic microsatellite markers, the methods for genetic analysis of the Blakiston's fish owls were established. The methods were useful for analyses of familial and individual relationships.
- 3) Temporal analysis of population genetic features revealed that the population genetic diversity has gradually reduced during the last quarter of a century.