

多摩川の河川敷環境がコリドーとして山間部と
市街地に孤立したアカネズミ個体群をつないで
いる可能性に関する保全遺伝生態学的研究

2005年

小原 嘉明
東京農工大学農学部 教授

目 次

はじめに	2
材料と方法	
材料	3
調査地	3
サンプリング	4
DNA抽出	4
ミトコンドリアDNAコントロール領域の解析	6
核DNAのマイクロサテライト多型の検出と解析	10
結果	
1. 捕獲状況	13
2. ミトコンドリアDNAコントロール領域の解析	14
3. 核DNAのマイクロサテライト領域の解析	27
考察	
1. ミトコンドリアDNAコントロール領域の解析	31
2. 核DNAのマイクロサテライト領域	35
まとめ	38
謝辞	39
引用文献	40

はじめに

近年、人間の様々な社会活動により野生生物の生息地が分断・縮小され、地域個体群が孤立化していくことが保全生物学上大きな問題となっている。なぜならば、個体群の縮小は、単に偶然の個体数変動の効果で絶滅する確率を増すだけではなく、近親交配による生存率や繁殖率の低下、遺伝的浮動による遺伝的多様性の低下など、個体群の遺伝的劣化をもたらし、地域個体群の絶滅を加速すると考えられるからである。個体群の孤立化を防ぎ、遺伝的多様性の低下を防ぐには、各地域個体群間の交流が可能なメタポピュレーション構造を維持していくことが必要である。そのための具体的な方策として、市街地に野生動植物の移動を可能とする街路樹や公園、水路沿いの緑地など生息地をつなぐ掛け橋となる「コリドー」を設けることが有効であると考えられている。

アカネズミは本州で最も普通にみられる野生小型哺乳類で、自然林、二次林から都市部に取り残された緑地、河川敷の草地にも生息している。特に、河川敷の草地は、上流の森林地帯と下流域の市街地とをつなぎ、これらの動物の移動・分散ルートとして、市街地の個体群に遺伝的多様性を供給し、広い地域でメタ個体群構造を維持する「コリドー」として機能している可能性がある。

本研究は、東京都西部の多摩川流域の河川敷と、隣接した市街地に孤立した緑地を調査地とし、アカネズミ各地域個体群の遺伝的構造や類似性をDNA多型解析により明らかにし、メタ個体群構造の存在を検証することを目的に行った。それにより、多摩川の河川敷環境の保全が、山間部から都市部にも棲息するアカネズミのような野生動物の存続に重要な意義をもっていることを明らかにした。

材料と方法

【材料】

アカネズミ (*Apodemus speciosus*) は成体の体重が雄 28-60g、雌 26-59g の日本のネズミ類の中では中型のネズミである。アカネズミの分布範囲は広く、本州から屋久島まで分布し、平地から山岳地帯まで生息しているが、山林が主な住み場所で、平地の田畑にはあまり多くない。また、この種では繁殖期に関係した個体数の季節的変動が知られている (Kondo 1982)。

【調査地】

地勢的な条件より、細長く連続した生息地として、東京都府中市、多摩市、昭島市、羽村市の多摩川河川敷の草地、多摩川より北側に位置し、宅地などにより分断されて孤立した生息地として、国分寺市及び三鷹市の市街地に残された林、多摩川より南側に位置し広がりがあり連続した生息地として日野市及び八王子市の林の計 8 カ所を調査地とした (図 1)。



図 1. 調査地の分布と土地利用の様子

上に挙げた調査地は東京都の中央部に位置する東西 20km、南北 13km の範囲にあり、ほぼ中央部を多摩川が流れている。多摩川の北側はおもに市街地、住宅地として利用され、南側は限られた地域で市街地、住宅地があるものの、多摩丘陵につながり、自然の景観を残している地帯である。

【サンプリング】

1998 年 1 月から 2004 年 9 月にかけて捕獲調査を行った。1 回の捕獲調査において、それぞれの調査地で、シャーマン型トラップ(9×7×29cm) 40～60 個を 7～10 メートル間隔で格子状に設置した。シャーマン型トラップは夕刻に設置し、翌日の午前中に回収した。各調査地間でばらつきがないように、ワナをかけた総面積は約 1.5ha とした。捕獲した個体は性別と体重を調べた後、血液を採取し、エタノールを 1ml 容れた 1.5ml エッペンドルフ型チューブに入れて保存し、後述する DNA 抽出に用いた。捕獲個体の体毛の一部を市販の毛染め液で染めてから放逐した。

同じ地区で連続してワナをかける場合は、同じ個体を捕獲しないように前日ワナをかけた範囲と重複しないようにした。また、毛染めによる着色跡がある個体は、以前捕獲されている個体と判別し、重複サンプリングを避けた。各地区 30 個体を目安に生け捕りワナ捕獲を繰り返した。

【DNA抽出】

アカネズミの血液塊を個体ごとに 1.5ml エッペンドルフ型チューブに移し、プロテアーゼ K 1mg が入った分解バッファー液 700 μ l と混合して加え、37℃で一晩インキュベートして血液組織を分解した。その後フェノール液 700 μ l で 1 回、フェノール/クロロホルム液 700 μ l で 2 回、クロロホルム液 700 μ l で 1

回、それぞれ 20 分間攪拌した後、15000 回転で 15 分間遠心し、毎回上澄み液を新しいチューブに移し抽出を行った。上澄み液を新しいチューブに移し、イソプロピルアルコール $700\ \mu\text{l}$ と混合して、室温で 15 分間静置し DNA を沈殿させた。15000 回転で 15 分間遠心し沈殿を固めた後、上澄み液を捨て、沈殿を 70% エタノール $500\ \mu\text{l}$ で 2 回洗浄し、乾燥させた。乾燥させた DNA は TE 液 $100\ \mu\text{l}$ に溶かして、DNA サンプルストック (DNA の濃度は約 $10\sim 50\text{ng}/\mu\text{l}$) とした。

【ミトコンドリア DNA コントロール領域の解析】

母系遺伝し、また単数体であるため組換えを起こさないミトコンドリア DNA の多型解析を行うことにより、個体群の遺伝的多様性、類縁関係、メスの移動分散による地域間の遺伝的交流を解析した。

(i) PCR

ミトコンドリア DNA の一部の領域で遺伝情報をコードしていない control region (D-loop) の約 350bp の多型性に富む配列を PCR 法で増幅した。PCR 反応液は 1 サンプルあたり $10\times$ PCR バッファーを $2\ \mu\text{l}$ 、 2.5mM dNTP mixture を $1.6\ \mu\text{l}$ (4nmol)、 $5\text{Unit}/\mu\text{l}$ Taq ポリメラーゼを $0.08\ \mu\text{l}$ (0.4Unit)、 $10\ \mu\text{M}$ m15997 プライマー ($5'\text{-TCCCCACCATCAGCACCCAAAAGC-3}'$) と $10\ \mu\text{M}$ h16401 プライマー ($5'\text{-TGGGCGGGTTGTTGGTTTCACGG-3}'$) (Stacy et al. 1997)、をそれぞれ $1\ \mu\text{l}$ (10pmol) もちいた。そして滅菌蒸留水を $12.32\ \mu\text{l}$ 、滅菌蒸留水で 10 倍希釈した鋳型 DNA サンプルを $2\ \mu\text{l}$ (およそ $2\sim 10\text{ng}$) 混合して総量 $20\ \mu\text{l}$ の反応液として調整した。PCR 増幅はサーマルサイクラー (TaKaRa) を使用し、はじめに 94°C で 4 分間変成した後、 94°C で 30 秒、 63°C で 30 秒、 72°C で 60 秒のサイクルを 30 回繰り返した後、 72°C で 5 分間伸長反応を行い、 4°C で保存した。

(ii) 増幅産物の精製

PCR を行ったサンプルは、1%アガロースゲルで電気泳動(50V 50分、1×TAEバッファー)した後、エチジウムブロマイドで染色し、アガロースゲルから増幅産物である 350bp 付近の DNA 断片を切り出した。以下の操作には主として TaKaRa EASYTRAP Ver. 2 を用いた。PCR 増幅産物を含むアガロースゲル断片を 1.5ml エッペンドルフ型チューブにいれ、NaI 溶液を 300 μ l 加え、ゲルが完全に溶解するまで 55°C でインキュベートした。ガラスパウダーを 5 μ l 加え十分に混合し、室温で 5 分間静置した後、3000 回転で 1 分間遠心し上清を取り除いた。沈殿したガラスパウダーに洗浄用緩衝液を 300 μ l 加え懸濁し、3000 回転で 1 分間遠心して上清を取り除きガラスパウダーを回収、これを 2 回繰り返した。洗浄用緩衝液を十分に取り除き、沈殿したガラスパウダーに 6 μ l の滅菌蒸留水をいれ懸濁させ、55°C で 3 分間インキュベートした後 10000 回転で 30 秒間遠心し、上清として PCR 産物を回収した。

(iii) シークエンス反応

反応液の組成は dRhodamine Terminator RRMix (Perkin-Elmer) 4 μ l、1 μ M m15997 プライマー 1.6 μ l (1.6 pmol)、PCR 生成産物抽出液 4.4 μ l (およそ 0.1~0.5 μ g) を混合して総量 10 μ l とした。反応にはサーマルサイクラーを使用し、96°C で 2 分間変性後、96°C で 10 秒、50°C で 5 秒、60°C で 4 分を 25 サイクル行い、4°C で保存した。PCR 産物は 1.5ml エッペンドルフ型チューブにいれ 70%エタノールを 37 μ l 加え攪拌し、氷上に 30 分静置した後、4°C、16000 回転、20 分遠心分離をした。遠心分離後、上清を取り除き、沈殿を乾燥させローディングバッファー 3 μ l に溶解させ -20°C で保存した。PCR 法で増幅した塩基配列の長さを確認するために、10 個体のみ 1 μ M h16401 プライマー 1.6 μ l (1.6 pmol)

を用いて同様の反応を行った。

(iv) シークエンス

ローディングバッファーに溶解した DNA サンプルを 95°C 2 分間のヒートショックで一本鎖に変性した後氷中に入れ急速に冷やした。泳動用のポリアクリルアミドゲルには、Urea 14.4g、Long Ranger gel solution (FMC BioProducts) 4ml、10×TBE 4ml を入れ、miliQ 水で 40ml にメスアップし、撹拌後負圧ポンプを用いて濾過し、塵を取り除き、5 分間の脱気のあと 10%APS 200 μ l、TEMED 20 μ l を加え、36cm ガラス板に注入し、約 6 時間硬化させたものを用いた。変性させたサンプルを 2 μ l ずつ、ABI PRISM377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer 社製)を用いて泳動を行った。泳動後、コンピュータプログラム ABI PRISM377 DNA Sequencing Software を用いて塩基配列の解析をおこなった。

(v) 塩基配列データの解析

両側のプライマー (m15997, h16401) を用いた実験から PCR によって増幅された領域は 345-347bp であった。他のシークエンシングには片側のプライマー (m15997) のみを用いて行ったので、プライマー' (m15997) 領域 23bp、プライマー (m15997) 側の 49bp およびプライマー (h16401) 領域 23bp の計 95bp を除いた 250-252bp を以下の解析に用いた。塩基配列を各個体間で比較するためコンピュータープログラム ClustalX を用いて個体ごとに塩基配列を確認しハプロタイプを決め、各調査地にみられるハプロタイプの組成、多様性、調査地間の遺伝的類似度を調べた。以下の変異の分析においては、挿入(欠失)は 1 回の変異とした。

(vi) 調査地間の類似度

各調査地が持つハプロタイプの類似度について、群平均法によるクラスター解析を行った。類似度には Odum(1950)の差分百分率を用い、以下の式により算出した。

$$1 - \{(\sum |N_{ai} - N_{bi}|) / (N_a + N_b)\}$$

ここで、 N_{ai} と N_{bi} は、各々調査地 a と b の i 番目のハプロタイプの頻度、 N_a と N_b は、調査地 a と b の全てのハプロタイプの観察頻度の合計値(したがって、 $N_a = N_b = 1$)である。

(vii) 個体群内の塩基多様度

個体群内の遺伝的多様性を評価するために、各個体群と、全個体群の塩基多様度' (π)を以下の式により算出した(Doi1987)。

$$\pi = n / (n-1) \sum_{i < j} x_i x_j \pi_{ij}$$

ここで、 n は調べた塩基配列の数、 x_i は標本内のタイプ i の DNA 配列の頻度、 π_{ij} は DNA 配列のタイプ i とタイプ j の間で異なっている塩基の割合である。

(viii) 個体群間の遺伝的距離

個体群間の遺伝的距離を評価するために、各個体群間の純塩基置換数(d_A)を以下の式より算出した(Nei1987)。

$$d_x = n_x / (n_x - 1) \sum_{i,j} i_j x_i x_j d_{ij}$$

$$d_Y = n_Y / (n_Y - 1) \sum_{i,j} i_j y_i y_j d_{ij}$$

ここで、 n_x および n_Y はそれぞれ集団 X, Y の標本中の配列数であり、 d_{ij} はハプロタイプ i と j の間の、サイトあたりの塩基置換数である。

$$d_{XY} = \sum_{i,j} i_j x_i y_j d_{ij}$$

ここで、 d_{ij} は集団 X からとったハプロタイプ i と集団 Y からとったハプロタイプ j の間の塩基置換数である。純塩基置換数 (d_A) は

$$d_A = d_{XY} - (d_x + d_Y) / 2$$

で与えられる。地図上で各調査地間の距離を測り、個体群間の純塩基置換数と調査地間の距離との相関を Mantel test を用いて検定した。

(ix) ハプロタイプ間の類縁関係

コンピュータプログラム ClustaX を用い、100 回 bootstrap を繰り返し、ハプロタイプの bootstrap neighbour-joining tree を作成した。その際、アカネズミと同じネズミ科 (Muridae) に属する Bank vole (*Clethrionomys glareolus*) の d-100P 領域の対応する塩基配列 (EMBL database、accession number Y07543) を外群として用いた。

【核DNAのマイクロサテライト多型の検出と解析】

父親と母親の双方から伝わる核ゲノム中のマイクロサテライト遺伝子座の多型を検出し、遺伝的多様度、類縁度、また対立遺伝子頻度を用いた近交係数の集団遺伝学的な解析を行った。ミトコンドリア遺伝子型の解析と組み合わせると、オスによる遺伝子交流の評価も可能となる。

(i) PCR

プライマーには、アカネズミと同じ *Apodemus* 属であるヒメネズミ *Apodemus argenteus* のゲノム DNA から開発された、CA リピートのマイクロサテライトマーカーMSAA-3 (F:CTGGCTCCATCATGTAAACAC R:TTCTTGTGCTCTGTGCCAGC)、MSAA-4 (F:ACAAGGTAGATAGCATCTAAG R:GATCGTGTTCATAGTTATCTAT)、MSAA-6 (F:AGTCAAACCTGCTGGGCCTAAC R:ATACTCTGGCCTCACCTCATAC) の 3 種類を使用した。これらのマーカーは、ヒメネズミはもちろん北海道に生息するハントウアカネズミにおいても、複数の対立遺伝子を検出している (Ohnishi et al., 1998)。

1 サンプル当たり、抽出した各サンプル DNA を $2\mu\text{l}$ 、 $10\times\text{PCR}$ バッファー $2\mu\text{l}$ 、 2.5mM dNTP ミックス $2\mu\text{l}$ 、任意のプライマー (1 組) $0.5\times 2\mu\text{l}$ 、 $5\text{Unit}/\mu\text{l}$ Taq ポリメラーゼ $0.1\mu\text{l}$ 、滅菌蒸留水 $12.9\mu\text{l}$ を、氷上で冷却しながら混合し、これを PCR 反応液とした。PCR 反応液 $20\mu\text{l}$ を各サンプル毎に $200\mu\text{l}$ チューブに小分けにした後、氷上で十分に冷やしてからサーマルサイクラーにセットし、以下の条件で PCR 反応を行った。

最初は 95°C で 2 分間、DNA を変成させた。次に、 94°C で 30 秒間 DNA 変成、 48°C で 30 秒間プライマーのアニーリング、 72°C で 1 分間の伸長反応を 3 サイクル繰り返した。更に、アニーリングの温度条件だけを 44°C に変更し、これを 3 サイ

クル繰り返した。最後に再びアニーリング温度を 40°C に変更し、34 サイクル繰り返した。反応終了後、反応産物は冷蔵庫 (4°C) で保管した。

所定の部位の DNA が増幅しているか確認するため、MuPid ミニゲル泳動槽 (コスモ・バイオ社) を用いて電気泳動を行った。各サンプル 2.5 μ l にローディング溶液を 0.5 μ l 混ぜ、3% アガロースゲルにアプライし、100V で 25 分間電気泳動した。泳動終了後、ゲルを 0.2 μ l/ml エチジウムブロマイド溶液に約 10 分浸し、MINI-TRANSILLUMINATOR (フナコシ) で紫外線を照射してバンドを確認した。

(ii) 電気泳動

あらかじめスラブゲル用泳動板で、8% ポリアクリルアミドゲル (14×14×0.1cm) を作成しておき、ゲルが固化したらスラブゲル用電気泳動装置 (日本エイドー) にセットし、泳動用バッファーとして 1% TBE を 1.20 入れた。

ゲルの不純物を洗い流し、ゲルを均一化する目的で、400V100mA の条件で 10 分間プレランした。プレラン終了後、PCR 反応を終えた各サンプル 2.5 μ l にローディング溶液を 0.5 μ l 混合し、ゲル上部へ差し込んだウェルへアプライした。200V50mA の条件で 4 時間電気泳動を行い、マイクロサテライト座における CA リピート数の違いによって各サンプル DNA を分離した。

泳動後ゲルを取り出し、後述する銀染色法によって、電気泳動で分離した DNA を黒いバンドとして検出した。

まず、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTAB) 200mg を蒸留水 200ml に溶解させ、この溶液にゲルを 20 分間浸した。蒸留水で数回すすいだ後、蒸留水 200ml に 20 分間浸した。次に、25% アンモニア水 200 μ l を蒸留水 200ml に加え、ゲルを 15 分浸した。

硝酸銀 320mg を蒸留水 200ml に溶解させ、これに 10N NaOH100 μ l と 25% アン

モニア水 1ml を混合し、銀染色液を作成した。この銀染色液にゲルを 15 分浸し、蒸留水で数回すすいだ。

炭酸ナトリウム 4g を蒸留水 200ml に溶解させ、これに 35%ホルマリン 100 μ l を加え、現像液を作成した。この現像液をゲルに浸し、黒色のバンドが確認できるまで反応させた。バンドが適度に染まった時点で、1%酢酸 200ml に 10 分浸し、反応を停止させた。

その後、ゲルの保存の為、蒸留水 165ml に 100%エタノール 75ml とグリセリン 10ml を混合した保存液にゲルを 30 分浸し、冷蔵庫 (4°C) で一晩静置した。

(iii) データ解析

得られたデータを基に、各調査地点毎に以下のパラメータを算出した。

①ヘテロ接合度 (H_o)

ヘテロ接合度とは、ある遺伝子座におけるヘテロ接合型の集団内頻度で、観察値を H_o で表す。 H_o は、ある集団内のヘテロ型の個体数を、集団の総数で割ったものである。

②遺伝的多様度 (H_e)

遺伝的多様度とは、言い換えるとヘテロ接合度の期待値である。ヘテロ接合度の期待値は次の数式から算出することができる (Nei & Roychoudhury, 1974)。

$$H_e = 1 - \sum \chi_i^2 \quad (\chi_i : \text{対立遺伝子頻度})$$

③対立遺伝子の有効数 (n_e)

対象集団に、実際どの程度の遺伝的変異が存在するかを表すことができる。対立遺伝子の有効数は次の数式から算出することができる (Kimura & Crow)。

$$N_e = 1 / \sum \chi_i^2 (\chi_i : \text{対立遺伝子頻度})$$

結果

1. 捕獲状況

8カ所の調査地において、府中市 32 個体、多摩市 40 個体、昭島市 27 個体、羽村市 34 個体、国分寺市 24 個体、三鷹市 28 個体、八王子市 37 個体、日野市 27 個体の計 249 個体のアカネズミを捕獲した (表 1)。1 ワナあたりの捕獲数は八王子市が最も高く (0.31)、国分寺市が最も低かった (0.05)。シャーマン型トラップで捕らえた他種哺乳類としてはハツカネズミ (*Mus musculus*)、ハタネズミ (*Microtus montebelli*)、ヒミズ (*Urotrichus talpoides*) を確認した。

調査地	ワナの数 (累計)	日数	n	r	オス比	捕獲した他種哺乳類
府中市	176	4	32	0.18	0.47	ハツカネズミ
多摩市	132	4	40	0.3	0.4	ハタネズミ、ハツカネズミ、ヒミズ
昭島市	164	3	27	0.16	0.56	ハタネズミ、ヒミズ
羽村市	120	3	34	0.28	0.44	ハタネズミ、ハツカネズミ、ヒミズ
国分寺市	480	12	24	0.05	0.58	
三鷹市	300	6	28	0.09	0.5	
八王子市	120	3	37	0.31	0.51	
日野市	-	-	27	-	-	-

表1：捕獲調査の結果。nは捕獲個体数、rはワナ1つあたりで捕獲した個体数を示す。

2. ミトコンドリアDNAコントロール領域の解析

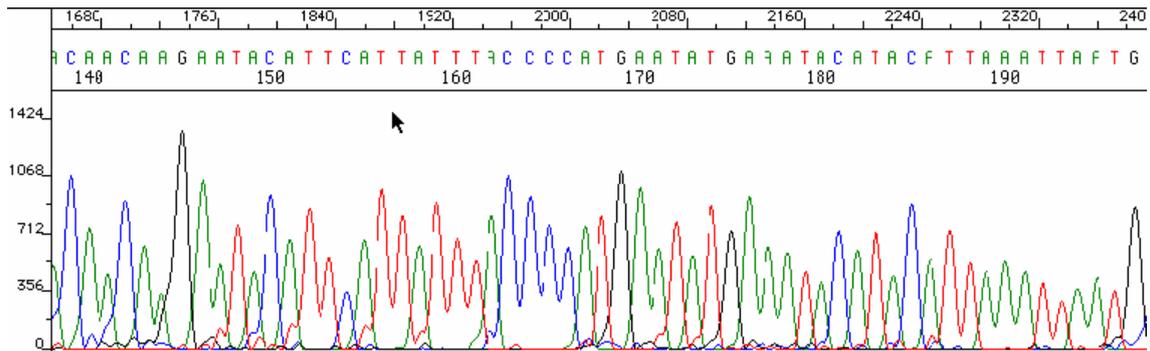
(i) 遺伝的多型の解析

シーケンスで塩基配列を決定できた8個体群の計221個体で、35のハプロタイプが存在した。変異は調べた250塩基の内16.4%にあたる、41カ所でみられた。変異の内訳は2カ所で挿入(欠失)、30カ所でトランスバージョン、10カ所でランジッション、2カ所で同一サイト内の3種類以上の変異が確認された(表2)。1個体あたり平均2.37カ所で塩基の変異があり、各個体間の変異塩基数の幅は0~19個であった。以下に示すNo.1のハプロタイプの塩基配列をNCBI (National Center for Biotechnology Information) のデータベース (GenBank) に登録した (Accession no. AB176922)。

	1 1 1 2 5	5 5 5 6 7	7 7 8 8 8	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 2	2 2	
	2 3 9 5 1	3 6 9 5 4	7 8 5 7 9	0 0 0 0 0	0 1 1 2 2	2 2 3 3 3	3 3 4 4 6	6 7 8 9 1	2 4	
				1 2 4 5 8'	8 3 8 5 6	7 9 3 6' 7'	8 9 6 9 1	3 7 4 4 9	0 3	
1	C T T A T	A A T C T	A C T C A	T C T T	C C A A A	T T C	A A T C T	T C A C C	C A	1
2	2
3	. A	3
4	. A	4
5	5
6	6
7	7
8	T	8
9	. A	9
10	T . G	10
11	11
12	12
13	13
14	14
15	. A	15
16	16
17	17
18	. A	18
19	19
20	. A	20
21	. A	21
22	22
23	23
24	A	24
25	A	25
26	26
27	. C	27
28	28
29	29
30	A	30
31	. C	31
32	32
33	A . . . C	33
34	. C . C	34
35	35

表2: ミトコンドリアDNAのControl regionの塩基配列の変異。左右の数字はハプロタイプの種類、上の数字は変異のあった箇所、ドットはハプロタイプ1と同じ塩基であったことを示す。

TTAATACATAATTATGTATATaGTACATTAaATTATTtaCCCCTAGCATATAAGCAGGTCCATATAATTAATTAATATAG
 ACATTACAaCAaGAATACATTCACTATCTACCCCATGAATATGAAACATATACATTAaATTAATGTTTTATaGACATATC
 TGTGTTATCTTACATACACCATTAAGTCATAAACTCTTCTCTTCATATGACTATCCCCCTCCCCATTTGGtCTATATTT
 CTA



上はオートシーケンサーによる塩基配列のエレクトロホログラムの1例である。

(iii) 各調査地で見られたハプロタイプ

各調査地におけるハプロタイプの構成を表 3 に示す。多くのハプロタイプは調査地固有であったが、6 個のハプロタイプが 2 つ以上の調査地でみられた。多摩川河川敷の 4 カ所の調査地、府中市、多摩市、昭島市、羽村市では 18 種類のハプロタイプがあり、そのうち 4 タイプ(タイプ 1, 6, 9, 11)が複数の調査地で見られた。隣接する 2 調査地間では必ず共通するハプロタイプが 1 つは確認された。3 カ所で共有されるタイプが 1 つあった(タイプ 6)。4 カ所すべてで共有されるタイプはなかった。日野市と八王子市ではそれぞれ 8 種類のハプロタイプがあり、そのうち 2 つ(タイプ 25, 27)が両方の調査地で確認された。国分寺崖と国立天文台では他の調査地と共通のハプロタイプを持つ個体は存在せず、国分寺崖では 1 つ(タイプ 19)、国立天文台では 2 つ(タイプ 20, 21)のタイプが存在した。(図 2, a, b, c)

	T F	T S	T T	T H	N K	N C	N Z	N S	
1	10	5	-	-	-	-	-	-	1
2	3	-	-	-	-	-	-	-	2
3	5	-	-	-	-	-	-	-	3
4	5	-	-	-	-	-	-	-	4
5	2	-	-	-	-	-	-	-	5
6	-	5	7	3	-	-	-	-	6
7	-	10	-	-	-	-	-	-	7
8	-	17	-	-	-	-	-	-	8
9	-	-	10	12	-	-	-	-	9
10	-	-	1	-	-	-	-	-	10
11	-	-	1	2	-	-	-	-	11
12	-	-	3	-	-	-	-	-	12
13	-	-	1	-	-	-	-	-	13
14	-	-	-	4	-	-	-	-	14
15	-	-	-	1	-	-	-	-	15
16	-	-	-	2	-	-	-	-	16
17	-	-	-	5	-	-	-	-	17
18	-	-	-	1	-	-	-	-	18
19	-	-	-	-	24	-	-	-	19
20	-	-	-	-	-	8	-	-	20
21	-	-	-	-	-	17	-	-	21
22	-	-	-	-	-	-	4	-	22
23	-	-	-	-	-	-	1	-	23
24	-	-	-	-	-	-	1	-	24
25	-	-	-	-	-	-	11	5	25
26	-	-	-	-	-	-	1	-	26
27	-	-	-	-	-	-	1	5	27
28	-	-	-	-	-	-	4	-	28
29	-	-	-	-	-	-	2	-	29
30	-	-	-	-	-	-	-	4	30
31	-	-	-	-	-	-	-	5	31
32	-	-	-	-	-	-	-	8	32
33	-	-	-	-	-	-	-	3	33
34	-	-	-	-	-	-	-	1	34
35	-	-	-	-	-	-	-	1	35
	25	37	23	30	24	25	25	32	

表3：各調査地でみられたハプロタイプの個体数。左右の数字はハプロタイプの種類、TF：府中市、TS：多摩市 TT：昭島市 TH：羽村市 NK：国分寺市 NC：三鷹市 NZ：日野市 NS：八王子市 の各調査地を表す。

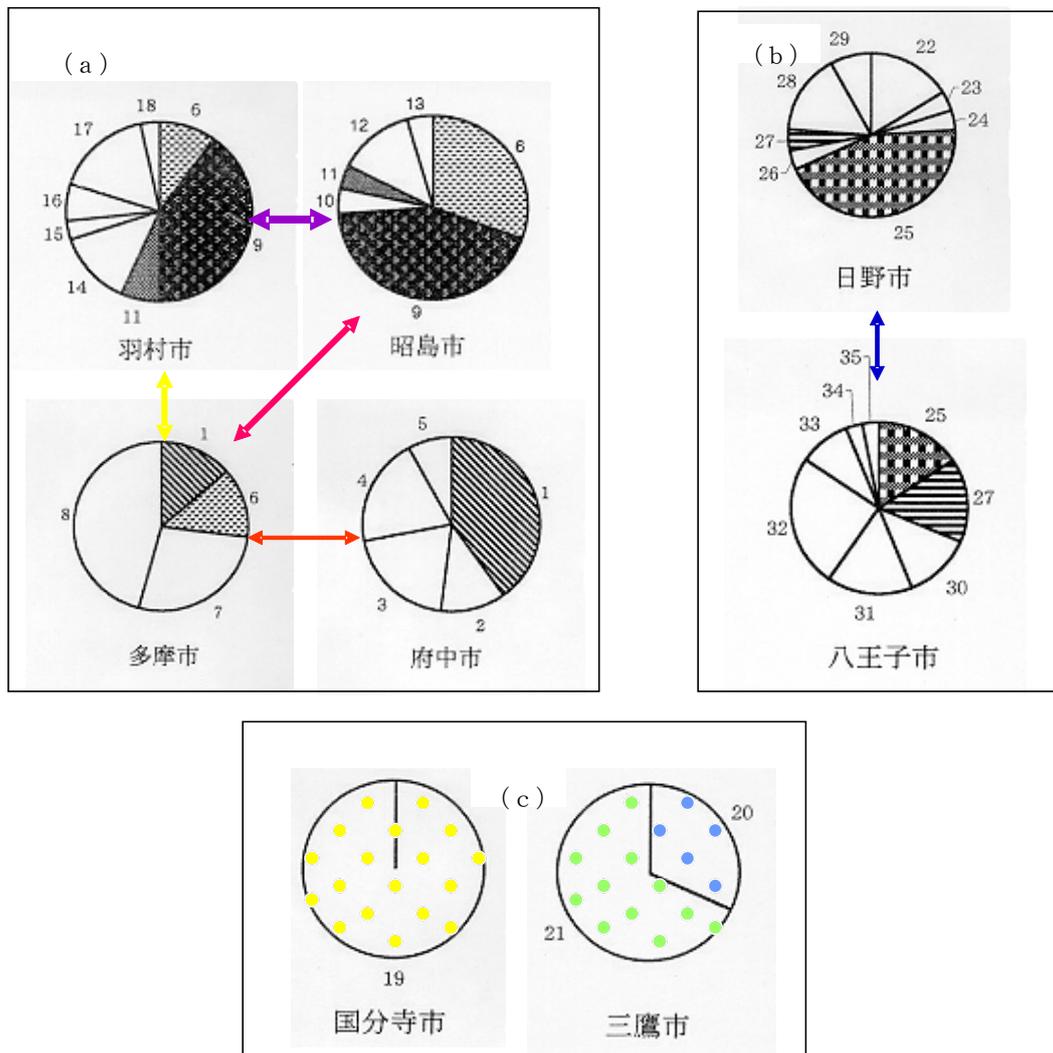


図2 各生息地のハプロタイプ構成。番号はハプロタイプの種類、矢印は共通するハプロタイプの存在、その太さはその数を表す。

- (a) 多摩川河川敷沿いに連なる生息地。隣接する生息地には共通のハプロタイプが見られる。また、上流域から下流域にかけて遺伝的多様性が減少する傾向が見られる。
- (b) 多摩丘陵沿いの生息地。同様に隣接する生息地には共通のハプロタイプが見られる。
- (c) 市街地に孤立した生息地。多と共通のハプロタイプはみられない。遺伝的多様性が極端に低い。

(iv) 調査地間の遺伝的類似性

各調査地が持つハプロタイプ牽用いて作成した調査地間の遺伝的類似性を図3に示す。多摩川河川敷の4カ所の調査地は1つのグループ、国分寺市、三鷹市の2調査地はそれぞれ単一のグループ、山林に囲まれる日野市と八王子市の2調査地は1つのグループにまとめることが可能だった。

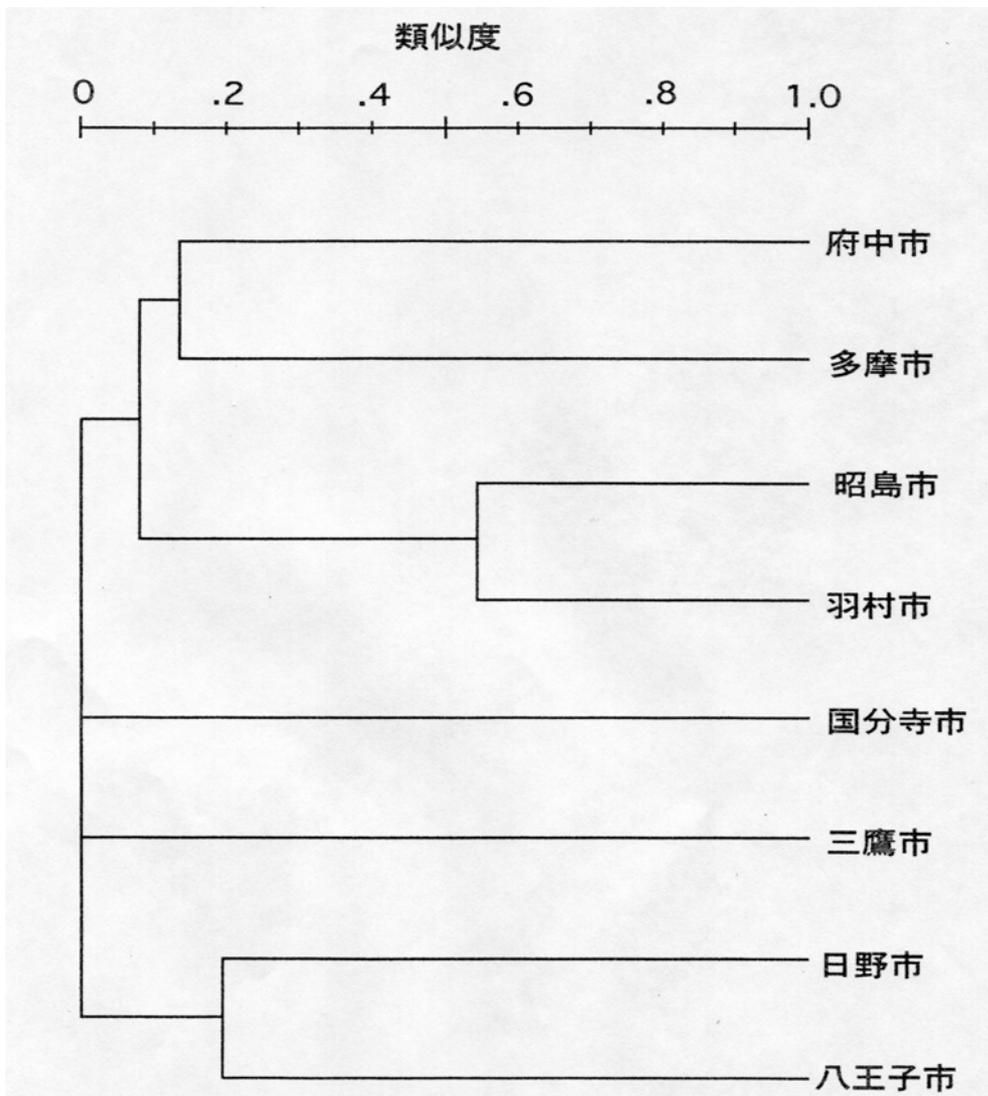


図3. 調査地間の遺伝的類似性

(v) 個体群内の塩基多様度

表4に示すように、国分寺市、三鷹市など市街地内の調査地において低い傾向があった。多摩川河川敷の個体群ではいずれも高い値を示したが、上流域のパッチほど高かった。最高は羽村市の0.0134で、最低は国分寺市の0であった。

府中市	0.0074
多摩市	0.0110
昭島市	0.0126
羽村市	0.0134
国分寺市	0.0000
三鷹市	0.0018
日野市	0.0066
八王子市	0.0120
全個体	0.0143

表4：各調査地と全個体の集団内塩基多様度

(vi) 個体群間の遺伝的距離

最低値が日野市と府中市の個体群間の1.22%で、最高値は三鷹市と日野市の間
の5.01%であった。多摩川河川敷の各調査地間では、羽村市と多摩市の間で2%
を越えたほかは1%台であった。日野市と八王子市の間は1.52%と比較的低い値
であった。三鷹市はどの調査地の間とも、高い傾向があった(表5)。各調査地間
の純塩基置換数と、距離には有意な正の相関があった

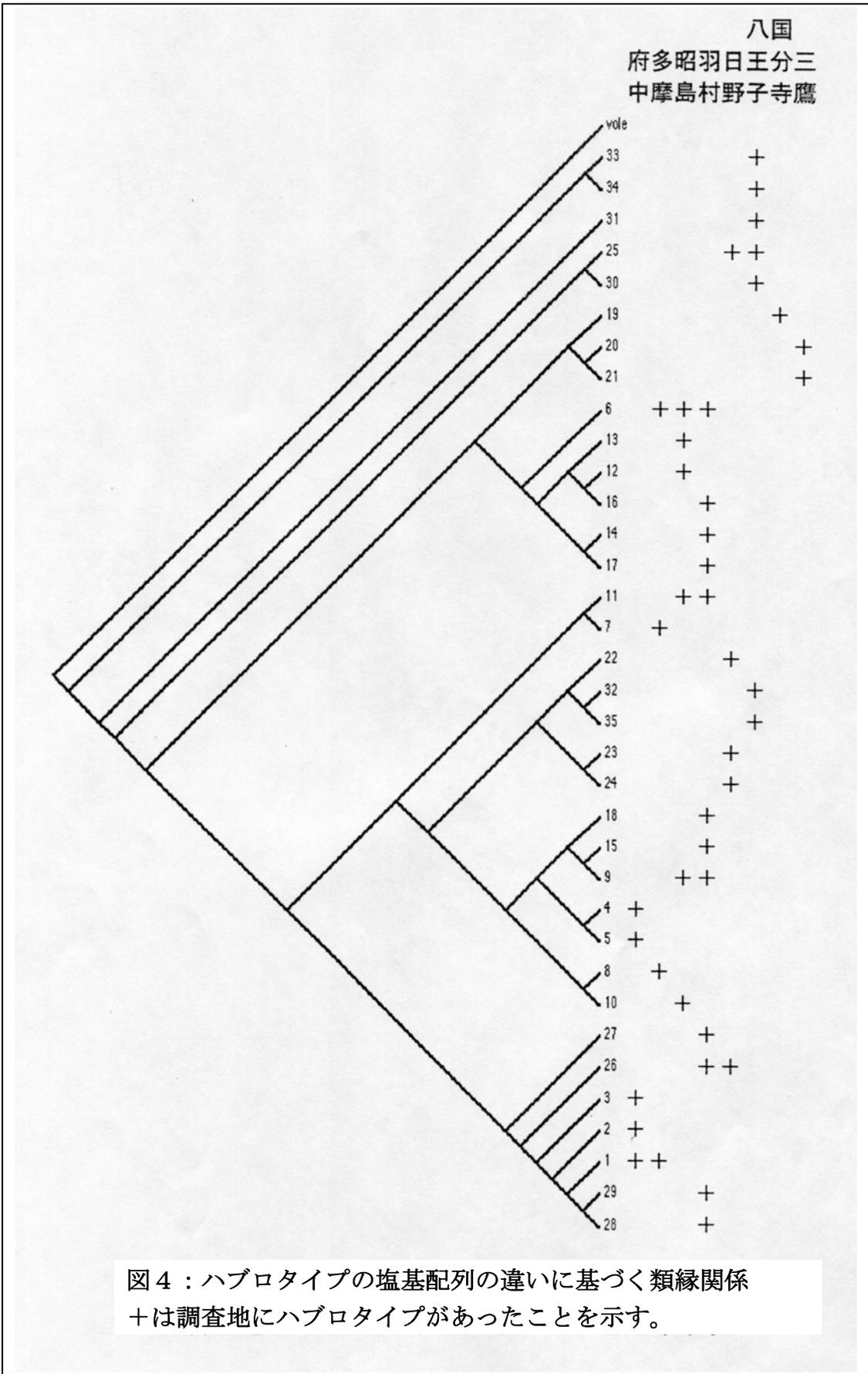
(Manteltest, $p=0.0436$, $Z=738.4$)。

調査地		TF	TS	TT	TH	NK	NC	NZ	NS
府中市	TF		1.77	1.86	1.86	1.97	5.01	1.22	2.02
多摩市	TS	1.77		1.86	2.02	2.56	2.99	2.76	2.22
昭島市	TT	1.86	1.86		1.38	2.46	4.37	1.84	2.4
羽村市	TH	1.86	2.02	1.38		2.77	3.69	1.98	2.49
国分寺市	NK	1.97	2.56	2.46	2.77		2.36	2.02	2.45
三鷹市	NC	5.01	2.99	4.37	3.69	2.36		3.01	3.42
日野市	NZ	1.22	2.76	1.84	1.98	2.02	3.01		1.52
八王子市	NS	2.02	2.22	2.4	2.49	2.45	3.42	1.52	

表5：各調査地間の純塩基置換数（％）

(vii) ハプロタイプ間の類縁関係

Bootstrap neighbour joining tree を図4に示す。ハプロタイプの分岐はおおよそ、近い調査地のもの同士でグループとなったが、同一のタイプがな調査地のハプロタイプ同士がグループになる場合もあった。



(viii) 市街地による局所個体群の分断と遺伝的分化

上記データをもとに、市街地による孤立化が地域個体群間の遺伝的分化に与えた影響を再解析した。その結果、市街地を間に挟むことにより、個体群間の距離に関係なく、遺伝的な分化の尺度である F_{ST} 値が有意に高くなることが明らかになった。対照的に、連続した緑地内では、 F_{ST} 値が有意に低く、遺伝的な分化の程度が低いことが示唆された。

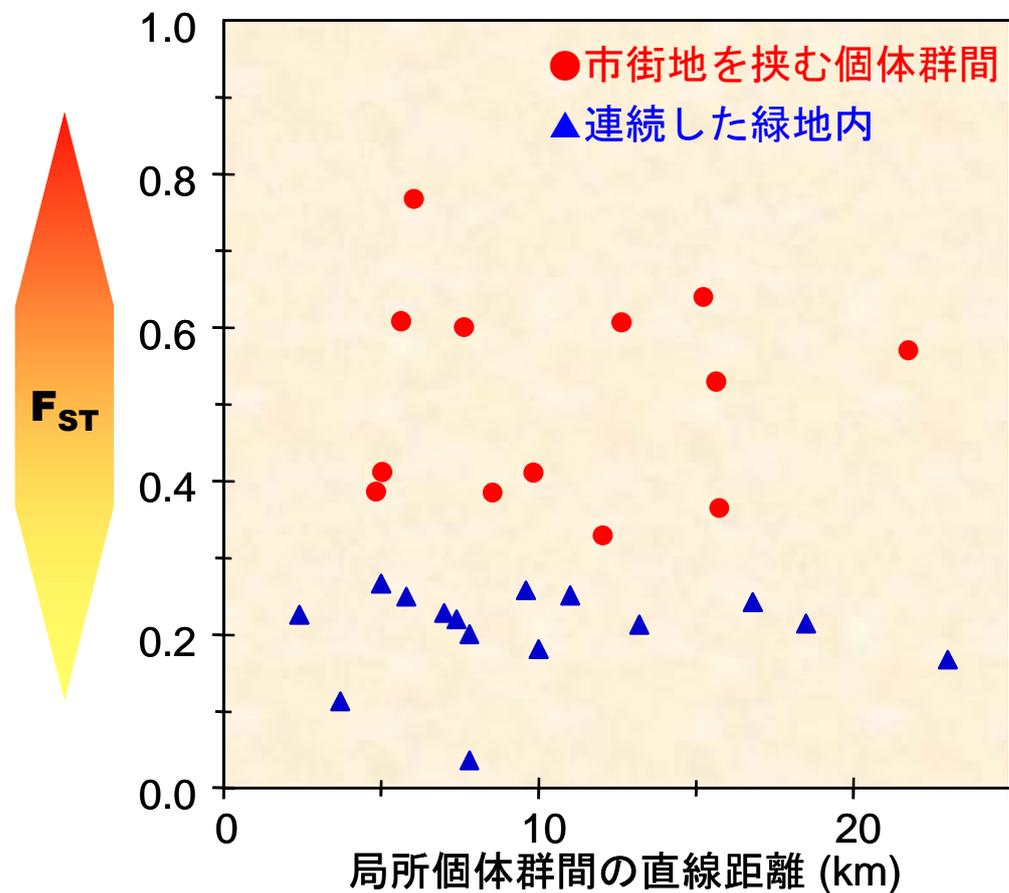


図5. 遺伝的分化の程度に都市化による孤立化が与える影響

(ix) ハプロタイプ間のネットワーク解析

Minimum Spanning Network を描くことにより、各ハプロタイプがどのような進化的関係にあるのかを解析した (図 6)。三鷹の国立天文台構内で発見された 2つのハプロタイプ (No. 20 と 21) は塩基配列に 2つしか差がないが、そのようなハプロタイプが偶然同じ場所に分配される確率は低い ($p = 21/35C2 = 0.035$)。したがって、ネットワーク図から推測すると、おそらくハプロタイプ 20 は孤立後にハプロタイプ 21 から突然変異により生じた可能性が高い。

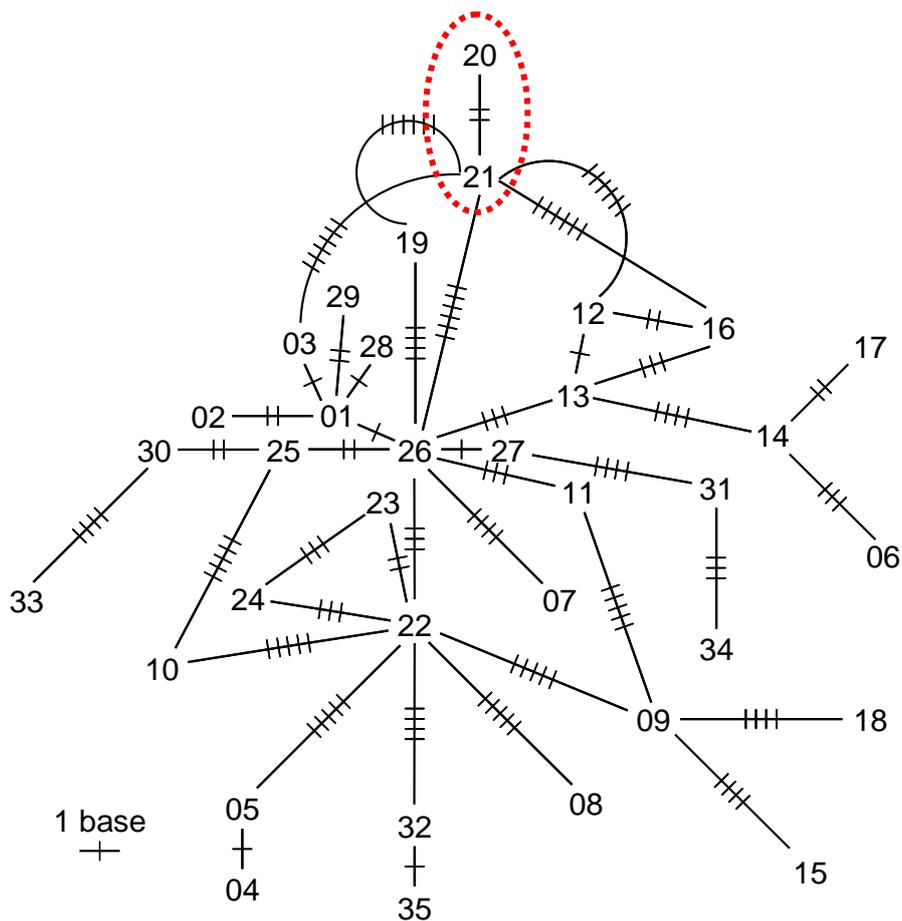


図 6. Minimum Spanning Network : 枝長と垂直の線の数、1塩基の差異

(x) Nested clade analysis による地域個体群の遺伝的歴史の解析

最後に、どのような過程でアカネズミが都市に孤立していったのかを推定するため、Nested clade analysis を行った (図 7 a, b)。その結果、生物学的な意義が明確な Nested Clade は、range expansion、すなわち、アカネズミが過去において多摩川流域沿いにその周辺へと分布を広げたことを支持した。具体的には、

Clade 1-1: C3 (多摩), C5 (府中) → C6 (日野)

Clade 3-1: C3 (多摩), C5 (府中), C6 (日野) → C4 (八王子)

Clade 3-3: C2 (昭島), I1 (国分寺) → C1-3 (羽村、昭島、多摩)

Clade 4-1: C1-3 (羽村、昭島、多摩), I2 (三鷹)

→ C1-6 (羽村から八王子まで), I1 (国分寺)

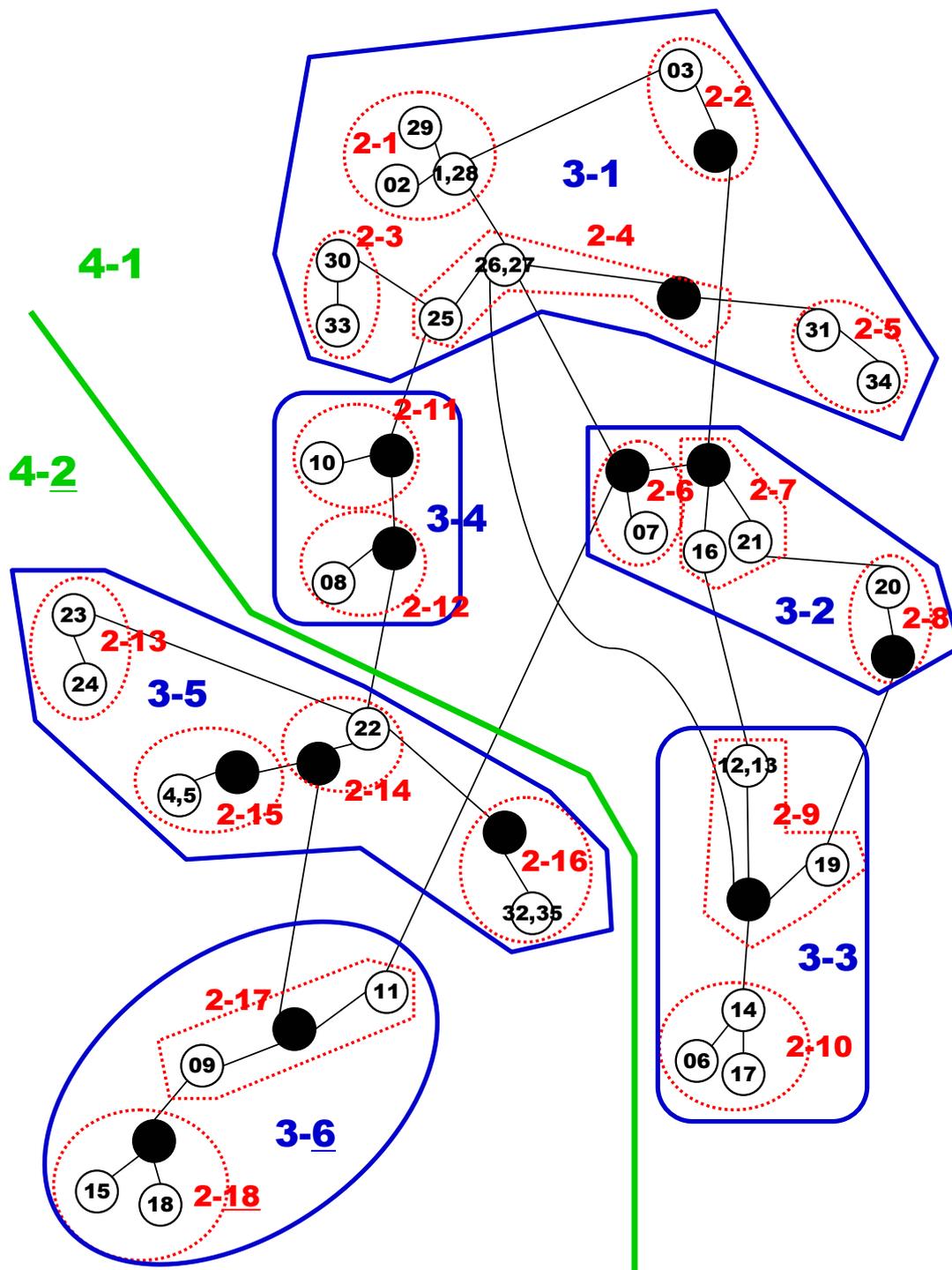
Clade 3-5: C6 (日野) → C4 (八王子), C5 (府中)

Clade 4-2: C4-6 (八王子、府中、日野) → C1, 2 (羽村、昭島)

以上の結果からは、孤立した地域でも、長期の隔離や、過去の分断は示唆されなかった。このことは逆に、都市化による孤立と多様性の低下は、ごく最近であったことを示唆する。

Haplotypes			1-step Clades			2-step Clades			3-step Clades			4-step Clades		
#	Dc	Dn	#	Dc	Dn	#	Dc	Dn	#	Dc	Dn	#	Dc	Dn
1	2S	3S												
28	0	6L												
I-T	2	-3S												
1-2-11-12No:RE			1-1	4	3									
2	0	0	1-2	0	2									
29	0	0	1-29	0	5L									
			I-T	4	0									
			1-2-11-17-No:IC			2-1	4S	5L						
3	0	0	1-3	0	0	2-2	0S	6L						
30	0	0	1-30	0	0									
33	0	0	1-33	0	0	2-3	0S	5						
25	0	0	1-25	2	2									
26	0	3												
27	2	2	1-26	2	2	2-4	3S	4S						
31	0	0	1-31	0	0									
34	0	0	1-34	0	0	2-5	0S	4.7						
						I-T	3L	0						
						1-2-11-12-13-14No:RE			3-1	5S	8S			
7	0	0	1-7	0	0	2-6	0S	0						
16	0	0	1-16	0	0									
21	0	0	1-21	0	0	2-7	7	6						
20	0	0	1-20	0	0	2-8	0S	4S						
12	0	0				1-2:IC			3-2	7S	9L			
13	0	0	1-12	0	9L									
19	0	0	1-19	0S	3S									
			1-2-3:IC			2-9	4S	8S						
6	0	0	1-6	9	9L									
14	0	0	1-14	0	6									
17	0	0	1-17	0S	7									
			I-T	-6	-2									
			1-2-3-5-6-7-8NoIBD/RE			2-10	9	10L						
						I-T	-5S	-2S						
						1-2-11-12No:RE			3-3	9	10L			
10	0	0	1-10	0	0	2-11	0	10						
8	0	0	1-8	0	0	2-12	0	1	3-4	2S	6S			
									I-T	-2S	-1			
									1-2-11-12-13-14No:RE			4-1	9S	9S
23	0	0	1-23	0	0									
24	0	0	1-24	0	0	2-13	0	4						
22	0	0	1-22	0	0	2-14	0S	4S						
4	0	0												
5	0	0	1-4	0	0	2-15	0S	7L						
32	0	0												
35	0	0	1-32	0	0	2-16	0S	5						
						I-T	0	-2S						
						1-2-11-12No:RE			3-5	6S	11L			
9	0	0	1-9	5	5									
11	0	0	1-11	6	4	2-17	5	5						
15	0	0	1-15	0	0									
18	0	0	1-18	0	0	2-18	0	3						
						I-T	5	2						
									3-6	5S	10			
									I-T	1	1			
						1-2-11-12-13-14No:RE			4-2	11	11L			
									I-T	-2S	-1S			
						1-2-11-12No:RE								

図 7a. Nested Clade Analysis の結果 (1)



Step-1以降のネットワーク

図 7b . Nested Clade Analysis の結果 (2)

3. 核 DNA マイクロサテライト領域の解析

(i) 対立遺伝子数

3 種類のマーカーを試した結果、MSAA-3 では 7 種類（分子量の小さい順に a、b、c、d、e、f、g とする）の対立遺伝子を検出し、MSAA-6 では 5 種類（同じく p、q、r、s、t とする）の対立遺伝子を検出した（表 6）。しかし MSAA-4 に関しては、PCR の反応条件をいろいろ検討したが、いずれの条件でも DNA は増幅しなかった。

表 6. マイクロサテライト領域の対立遺伝子数お

	サンプル数	対立遺伝子数	
		マーカー3	マーカー6
三鷹	6	3	3
国分寺	21	5	4
府中	17	6	5
昭島	18	7	5

MSAA-3 について、連続した生息地である昭島では、今回検出した 7 種類全ての対立遺伝子が見られた。同様に連続した生息地である府中でも、遺伝子頻度が低い a 以外の 6 種類の対立遺伝子が見つかった。これに対して、断片化した生息地である国分寺では、対立遺伝子 a は存在していたが、f と g が見られず 5 種類、三鷹ではわずか 3 種類の検出にとどまった（図 5）。

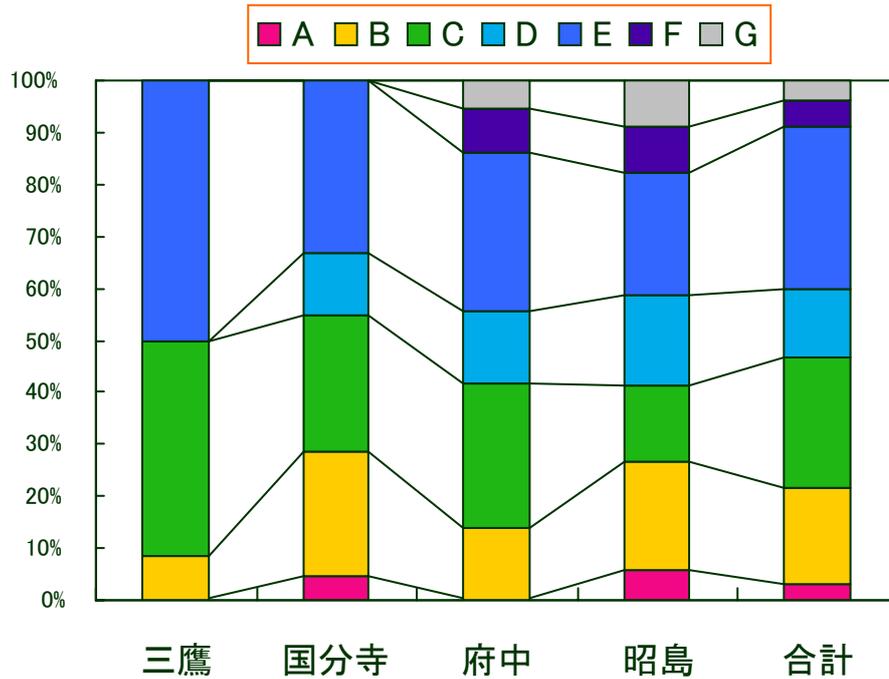


図 8. MSAA-3 領域のマイクロサテライト対立遺伝子頻度

また MSAA-6 でも、府中と昭島では、今回検出した 5 種類全ての対立遺伝子が見られたのに対して、国分寺では 4 種類、三鷹では 3 種類しか認められなかった (図 6)。

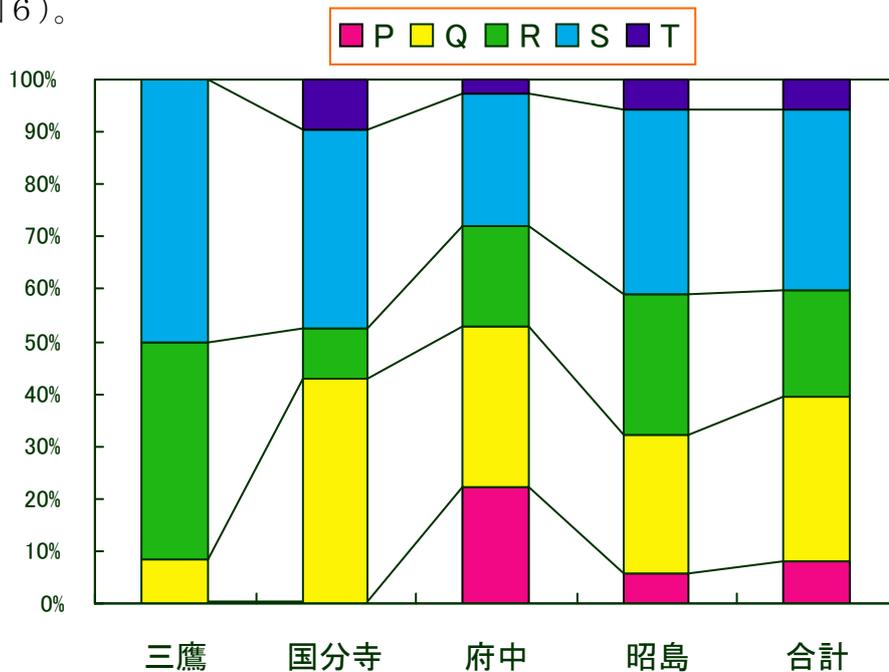


図 9. MSAA-6 領域のマイクロサテライト対立遺伝子頻度

これらのことから、連続した生息地である府中や昭島に比べ、断片化した生息地である三鷹や国分寺では、対立遺伝子数が少ない傾向にあることが明らかになった。特に三鷹は、どちらのマーカを用いた結果でも、対立遺伝子 2 種類によるホモないしヘテロ接合体の割合が高かった。サンプル数を考慮しても、存在が稀な対立遺伝子の消失を示唆している。

(ii) 対立遺伝子の有効数

MSAA-3 および MSAA-6 で明らかになった対立遺伝子頻度から、各調査地における対立遺伝子の有効数を算出した (図 7)。

その結果、どちらのマーカでも、連続した生息地よりも断片化した生息地で低い値を示した。このことから、断片化した生息地では対立遺伝子が減少している傾向が認められた。

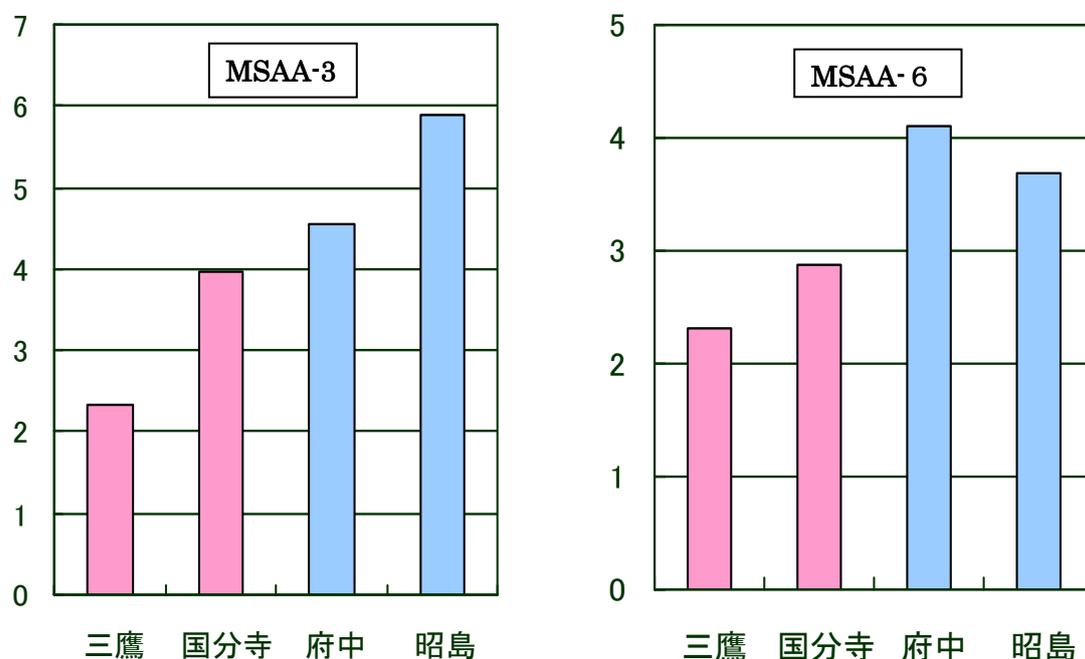


図 10. 対立遺伝子の有効数

(iii) ヘテロ接合度

全 62 個体を調べた結果、MSAA-3 で 52 個体、MSAA-6 で 51 個体の対立遺伝子がヘテロ接合だった (図 8)。府中、昭島、国分寺の 3 ヶ所では、どちらのマーカでも観察されたヘテロ接合度が 0.8 を越えた。これは、全体の調査地の 80% 以上の個体が、ヘテロ接合であることを表している。一方、三鷹ではヘテロ接合度が 0.67 と 0.50 で、いずれのマーカでも低い水準を示した。ただ、これは三鷹で見られた対立遺伝子数が、他の調査地より少ないことによる影響が大きいものと思われる。

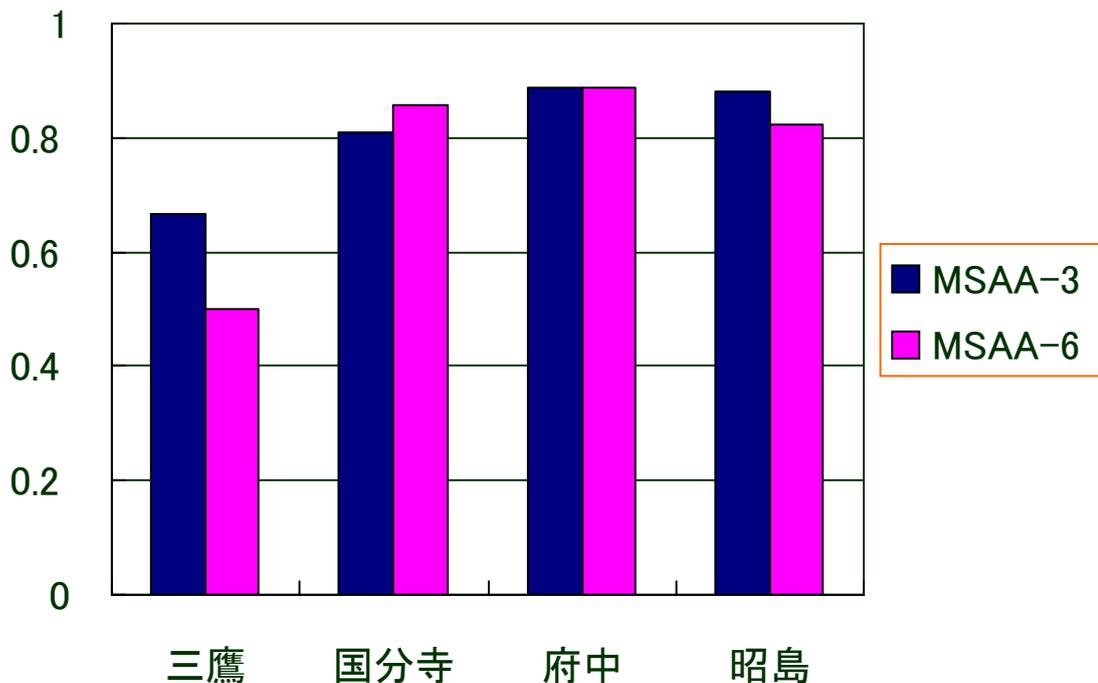


図 11. 各調査地のヘテロ接合度

(iv) 遺伝的多様度

MSAA-3 および MSAA-6 で明らかになった対立遺伝子頻度から、各調査地におけるヘテロ接合度の期待値、つまり遺伝的多様度を算出した。その結果、実際の

観察値に基づくヘテロ接合度は、全体的に期待値よりやや高い傾向を示した。

各調査地の遺伝的多様度を見てみると、連続した生息地である府中と昭島が高く、国分寺がこれに続き、他の3地点に比べて、三鷹では低かった。これはもともと遺伝的多様度は、対立遺伝子数が少ない程下がりやすい値なので、今回観察された値と特に矛盾しない。

また、観察されたヘテロ接合度と算出した期待値（遺伝的多様度）に差はなかった。

考察

1. ミトコンドリアDNAコントロール領域の解析

局所個体群の絶滅の要因として、Shaffer(1981, 1987)は①個体の生存率や繁殖成功のばらつきによるもの、②環境要因によって起こるもの、③自然環境の破局によるもの、④遺伝的浮動と近交弱勢によるものの4つをあげている。また、Lynch and Gabriel(1990)は小さな個体群において個体群サイズの縮小と有害突然変異の蓄積は相互依存的な関係があり、ともに個体群絶滅に寄与する要因であると述べている。その一方で、Lande(1988)は野生生物の個体群の存続サイズの決定には、遺伝的多様性の低下より個体群の大きさの変動の方が直接的に関わっていると結論づけている。

本研究におけるアカネズミ局所個体群の遺伝的構造の調査から、連続的な環境に住む個体群は遺伝的交流が行われており遺伝的多様性は高いが、孤立した環境に住む個体群は遺伝的多様性が極めて低く、交流も制限されていることを示す結果が得られた。多摩川河川敷の4カ所の調査地では、地理的に隣り合っ

ている2つの調査地間で少なくとも1つは共通するハプロタイプが存在した。このことから多摩川河川敷の調査地間では、ハタネズミの一種である bank vole (*Clethrionomys glareolus*) でも報告されているような (Aars et al. 1998)、河川敷に沿った直線状の遺伝的交流が保たれていると考えられる。河川敷は季節的な大雨などに起因する洪水などが原因で局所個体群の絶滅が起こりやすいと考えられるが、広い範囲でアカネズミが確認できた事は、アカネズミにとって地理的に連続している環境が残されており、局所個体群間で遺伝的交流が保たれている結果、個体群が維持されるというメタ個体群的構造が多摩川流域で成り立っていることを示唆している。

河川敷の下流の調査地は上流の調査地と比べると遺伝的多様性が低い傾向が見られた。生物種の分布域の周辺の個体群は孤立した個体群と似た特徴を持ち (Soule 1973)、同じメカニズムで遺伝的多様性が減少する。上流域の個体群は供給源となりうる奥多摩の森林につながっているが、本調査における下流域の個体群は、相対的にこの地域のアカネズミ分布域の周辺に位置する可能性があり、河川敷以外との遺伝的交流は制限されているかもしれない。

多摩丘陵の山林にある日野市と八王子市の調査地間には、2つのハプロタイプが共通しており、遺伝的距離も近い。また2つの調査地の距離はあまり離れておらず、土地利用の状態から推測されるように、生息地として連続しているため遺伝的交流が保たれているのではないか。またこの二つの調査地は、多方向の生息地のつながりを持つためにそれらとの遺伝的交流の機会も多いため多様なハプロタイプが存在し、遺伝的多様性も高い状態が保たれているものと考えられる。

国分寺市と三鷹市の調査地は他と共通するハプロタイプがなく、他の調査地との遺伝的距離が比較的遠いことから、遺伝的交流が極めて制限された状態で

あると考えられる。生息地が分断されると有効な集団サイズは小さくなるため、遺伝的浮動が強く作用をおよぼし、集団内の遺伝的多様性が減少して絶滅危険性が高くなると予想される。また、集団間の地理的な距離が広がると、遺伝的交流が極端に制限されるため同様に遺伝的多様性が減少する(Lacy 1987)。この2つの調査地は市街地に取り残され、孤立し遺伝的交流が制限された生息地と考えられるため、ハプロタイプの種類が少なく、遺伝的多様性が低い遺伝的構造の個体群になったのかもしれない。実際、2004年の秋から冬にかけて天文台およびその周辺の林地で生け捕りわなを用いた同様の捕獲調査を行ったが、1頭もアカネズミが捕獲されなかった。この地域でアカネズミの個体数が激減、あるいは最悪のケース局所的な絶滅が起こってしまった可能性は否定できない。近年、遺伝的多様性の低下が個体群の局所的な絶滅に寄与する実証的な例がタテハチョウの一種のヒョウモンモドキ(*Melitaea cinxia*)で報告(Saccheri et al. 1998)され、孤立した小さい生物個体群では、近親交配による遺伝的多様性の低下が個体群の消滅にとって重大な危険要因となっていることが示されている。共通するハプロタイプがなかった多摩川河川敷と多摩丘陵、また多摩川河川敷と国分寺市の間の遺伝的距離は、同じハプロタイプが存在した集団間の値とあまり差がなかった。また、類似度が近いハプロタイプがさまざまな個体群にみられ、調査地間の地理的距離と純塩基置換数の間には有意な正の相関がみられた。算出した遺伝的距離が中立の遺伝子の変異量にもとづいており、自然淘汰の影響を受けていない場合、集団分化の初期における遺伝子交流が集団間の遺伝的距離を短くする効果(Nei et al. 1972, Chakraborty and Nei 1974)や、一般に遺伝子が分岐する時点のほうが、集団が分岐する(生息地が分断される)時点よりも古いこと(Nei 1987)が知られている。以上に基づいた、今回の結果は生息地分断の歴史を反映しており、か

っては相互に遺伝子交流があったか、ひとつづきの個体群であったがハプロタイプがある程度分岐したあと細分化されたことを示唆している。

本研究では集団の遺伝的構造を解析する指標としてミトコンドリア DNA の Control region (d-loop) の変異を用いた。この領域はミトコンドリア DNA の中でも最も変異に富むため (Saccone et al. 1991) 集団の遺伝的構造を分析するのに適しており、小型哺乳類 (Stacy et al. 1997、Aars et al. 1998、Kim et al. 1998) や大型哺乳類 (Nagata et al. 1998、Simonsen et al. 1998) など個体群の遺伝的構造を調査するために広く使われている。今回観察された塩基配列の変異量は、今回の調査規模における個体群の遺伝的構造を明らかにするために適した指標であった。しかしながら、ミトコンドリア DNA は完全に母系遺伝であるため (Gyllensten et al. 1985)、オスの分散の傾向を予測することはできない。アカネズミにおいても多くの哺乳類と同様、オスの方が分散する傾向は強く (Kondo 1981, 1982)、今回示した個体群の遺伝的構造は遺伝的交流・遺伝的多様性を過小評価している可能性がある。また変異速度の点からも、より短いタイムスケールでの個体群の遺伝的交流を調査する目的には後述する核遺伝子のマイクロサテライト領域の変異などを用いた方がより緻密な結果が得られるだろう。ミトコンドリア DNA の Control region は自然淘汰に対しては中立だと考えられ、この領域の遺伝的多様性と、自然淘汰が大きく影響を与えるような適応形質に関する遺伝的変異の豊富さとは相関しないため、個体群の脆弱化を直接示す指標とはならない。しかしながら中立的な遺伝子の変異の大きさは、個体群の集団としての履歴を推定することができ、間接的に個体群の存続可能性を指標となると考えられる。

分断された生息地では、個体群内の遺伝的多様性は極めて低かった。このような生息地の個体群においてチーター (*Acinonix jubatus*) で報告 (O'Brien et

a1. 1983、1985) されているような、適応形質に関する遺伝的変異量が減少し近交弱勢の兆候が現れているかどうか、近交弱勢の指標として考えられる繁殖成功率や、直接適応的形質に関係する MHC 領域などの変異量を調査し他個体群と比較することは、今後この種に限らず全ての野生動物の保護・保全の観点からも大変重要となるに違いない問題である。

最後に、Minimum Spanning Network 解析や Nested Clade Analysis からは、アカネズミは少なくとも過去においては多摩川流域沿いとその周辺地域において自由な遺伝的交流があったこと、市街地における遺伝的孤立化と多様性の極端な低下は、ごく最近のできごとであることが示唆された。このことは、多摩川流域の自然環境が、アカネズミのような野生動物がメタ個体群構造を維持する上で、大変重要な役割をはたしていることを改めて認識させるものである。

2. 核 DNA マイクロサテライト領域の解析

(i) マーカーについて

今回 3 種類のマイクロサテライトマーカーを試したが、その中で MSAA-4 については、PCR 反応による DNA の増幅が上手くいかなかった。元々アカネズミの近縁種であるヒメネズミで開発されたプライマーを用いたので、アニーリング温度をやや下げなければいけない。MSAA-4 については、通常のアニーリング温度より 10℃まで下げたり、または反応時間を延長させてみたが、増幅するに到らなかった。

マイクロサテライトは高い多型性を示す有用なマーカーであるが、種特異性が高く、同属で開発されたマーカーでも使えないことがある。ただ、他の論文ではアカネズミの亜種にあたるハントウアカネズミでは MSAA-4 でも増幅出来て

いるので、PCR 反応の条件を変えることによって多型が検出されるかもしれない。

(ii) 三鷹個体群への環境要因の影響

今回調査した 4 調査地のうち、三鷹ではアカネズミの捕獲効率が悪く、従って捕獲数も少なかった。調査当時、三鷹の国立天文台構内及び周辺では、道路の拡張工事が行われており、その影響によって生息数が減少している可能性がある。しかし、マイクロサテライトは適応に対して中立なマーカーであるため、今回のような急激な環境悪化に起因する個体数の減少によって対立遺伝子が減少することは考えにくい。道路工事以前から、生息数が他の調査地より少ないと考えるのが妥当であろう。

(iii) 対立遺伝子

今回実際に用いた 2 つのマーカーでは、いずれも複数の対立遺伝子を検出した。その傾向は、連続した生息地のアカネズミ個体群より、断片化した生息地である国分寺および三鷹の個体群の方が、対立遺伝子数が少ない傾向にあった。

遺伝子頻度が 5% に満たない稀な対立遺伝子が、国分寺や三鷹では殆ど見られなかった。これは、国分寺や三鷹の断片的生息地の面積が、府中や昭島などの多摩川河川敷に比べて小さいことから、有効集団サイズが小さく、稀な対立遺伝子が消失しやすいことが伺える。

また、各調査地の対立遺伝子の有効数も算出した。この値は、集団間の対立遺伝子数の多少を比較する時に用いる指標になる。算出した結果、いずれのマーカーでも、連続した生息地と比較して断片化した生息地では対立遺伝子の有効数が少なかった。特に MSAA-6 ではその差が顕著であった。

(iv) ヘテロ接合度

本来、断片化した生息地では、有効集団サイズが小さくなるため、対立遺伝子のヘテロ接合度も減少する危険性がある。しかし、本研究の結果からは、稀な対立遺伝子の減少は認められたが、ヘテロ接合度は期待値よりむしろ高い水準を示した。どのようなメカニズムによって、断片化した生息地に生息する個体群は、水準以上のヘテロ接合度を維持しているのでしょうか？

長年にわたる野外調査の結果からは、*Apodemus* 属の社会構造は一夫多妻制であること示唆されており、多数の論文がそれを支持している。しかし近年、マイクロサテライトマーカーを用いて、*Apodemus* 属 2 種（この 2 種は同属の中でも分子系統学的には最も遠縁にあたる）の妊娠メスと妊娠メスの同腹子について親子鑑定を行った結果、同一の同腹子でも父親が複数存在することが明らかになった (Baker et al. 1998)。

複数の父親からなる同腹子の意義は、単一の父親と比べて有効集団サイズが増加することにあると思われる。今回調査したアカネズミでも、繁殖戦略として多夫多妻制をとると仮定するならば、ヘテロ接合度の減少を抑えることも可能である。しかし、有効個体群サイズが増えても個体数自体は少ないので、稀な対立遺伝子が一度消失してしまうと、突然変異による新たな対立遺伝子が出現する以外に、対立遺伝子が増えることはない。

本研究では用いたマイクロサテライトマーカーは、自然選択に対して中立なマーカーである。そのため、進化的適応度の消失や近交弱勢などの有害な遺伝的影響を調べることは出来ない。そのため今後は、直接適応的形質に関する免疫系の MHC 領域の遺伝多型を調べる必要がある。MHC は対立遺伝子がヘテロである方が、病原体のタンパク質を識別するレパートリーが増えるため、超優性によって高いヘテロ接合度が維持されている。また、MHC のヘテロ接合度は流産

率と負の相関があり、ヘテロ接合度が低下すると、流産率が上げることが示唆されている。このことから、MHC 領域の遺伝的変異は個体群の遺伝的多様性を測る指標になるだろう。

まとめ

母系遺伝するミトコンドリア DNA の解析からは、市街地に孤立した生息地のアカネズミは遺伝的にも孤立していることを示唆している。一方、父親からもその半分が伝えられる核 DNA のマイクロサテライト領域の解析からは、父親のアカネズミが移動分散して引き起こす遺伝的交流が現在存在する、あるいは少なくとも最近まで存在していたことを否定するものではなかった。市街地に孤立した生息地では、メスの定着性が強いことにより、ミトコンドリア DNA の多様性は減少しても、他の生息地からオス分散してきて繁殖に参加することで核 DNA の多様性は維持されている可能性がある。

本研究は、多摩川河川敷が野生動物の移動・分散のコリドーとして機能している可能性を示している。その点で高槻氏による研究 No. 217「生物保全のコリドーとしての玉川上水の動植物の調査」と関連が深い。また、メタ個体群構造を DNA 多型解析により明らかにする点で、申請者らが行った研究 No. 198「多摩川流域に生息する蝶類の遺伝的多様性とその保護に関する研究」と関連が深い。その研究では、生息地が孤立する傾向にあるオオムラサキ地域個体群の遺伝的多様性が、生息地が連続しているモンシロチョウと比べ、著しく低いことを明らかにした。野生哺乳動物の生息状況・生態に関わる点では、No. 9, 108, 113, 165, 178, 196 と関連性がある。多摩川河川敷の環境、特に植生との関わりにおいては、No. 235, 242, 251, 252 と関係している。以上の研究成果も考慮する

と、多摩川河川敷が野生動物のコリドーとして果たしている役割は甚大であることが示唆され、多摩川流域の自然環境を保全することの重要性を改めて認識させられる。今後は、免疫能力に関わる MHC 遺伝子の解析も行ない、適応的観点からの検討も必要となろう。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、助成をいただいたとうきゅう環境浄化財団に改めて深謝いたします。また、広畑哲男氏、馬島洋博士、捕獲調査及び DNA 解析を補佐してくれた、東京農工大学農学部獣医学科の学生諸子に感謝します。

引用文献

Aars J, Ims RA, Liu HP, Mulvey M and Smith MH(1998) Bank vole in linear Habitats show restricted gene flow as revealed by mitochondrial DNA(mtDNA).

Mol Ecol, 7, 1383-1389.

Chakraborty R and Nei M(1977) Bottleneck effects on average heterozygosity and genetic distance with the stepwise mutation model. Evolution, 31, 347-356.

Gyllensten U, Wharton B and Wilson AC(1985) Maternal inheritance of Mitochondrial DNA during backcrossing of two species of mice. Heredity, 76, 321-324.

Kim I, Phillips CL, Monjeau JA, Birney EC, Noack K, Pumo DE, Sikes RS and Dole JA (1998) Habitat islands, genetic diversity, and gene flow in a Patagonian rodent. Mol Ecol, 7, 667-678.

Kondo T (1981) Social behavior of the Japanese wood mouse, *Apodemus speciosus* (mammalia: Muridae), in an outdoor pen. Physiol. Ecol. Japan., 18, 149-162.

Kondo T. (1982) A population study of the Japanese wood mouse, *Apodemus speciosus* (mammalia; Muridae), with reference to its social behavior.

Physiol. Ecol. Japan., 18, 149-162.

Lacy RC (1987) Loss of genetic diversity From managed population: Interacting effects of drift, mutation, immigration, selection and population subdivision. Conservation Biology, 1, 143-158.

Lande R (1988) Genetics and demography in biological conservation. Science, 24, 1455-1460.

Lynch M and Gabriel W (1990) Mutation load and survival of small populations. Evolution, 44, 1725-1737.

Nagata J, Masuda R, Kaiji K, kaneko M and Yoshida MC (1998) Genetic variation and population structure of the Japanese sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido Island, based on mitochondrial D-loop sequences. Mol Ecol, 7, 871-877.

Nei M (1972) Genetic distances between populations. Am Nat, 106, 283-292.

Nei M (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.

O'Brien SJ, Wildt DE, Goldman D, Merril CR and Bush M (1983) The cheetah is depauperate in genetic variation. Science, 221, 459-462.

O'Brien SJ, Roelke ME, Newman A, Winkler CA, Meltzer KD, Colly L, Evermann JF, Bush M and Wildt DJ (1985) Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science*, 227, 1428-1434.

Odum EP (1950) Bird populations of the highlands (North Carolina) plateau in relation to plant succession and avian invasion. *Ecology*, 31, 587-605.

大林成行 (1994) 土地分類基本調査図: 東京都土地利用図、東京、東京理科大学出版会

Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, Vikman P, Fortelius W and Hanski I (1998) Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*, 392, 491-494.

Saccone C, Pesole G and Sbisà E (1991) The main regulatory region of Mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *J Mol Evol*, 33, 83-91.

Shaffer ML (1981) Minimum population sizes for species conservation. *Bioscience*, 31, 131-134.

Shaffer ML (1987) Minimum viable populations: coping with uncertainty. in: *Viable populations for conservation*. (M.E. Soule, ed). Cambridge University press, 69-86.

Simonsen BT, Siegismund HR and Arctander P (1998) Population structure of African buffalo inferred from mtDNA sequences and microsatellite loci: high variation but low differentiation. *Mol Ecol*, 7, 225-237.

Soule ME (1973) The epistasis cycle: a theory of marginal populations. *Annu Rev Ecol Syst*, 4, 165-187.

Stacy JE, Jorde PE, Steen H, Ims RA, Purvis A and Jakobsen KS (1997) Lack of concordance between mtDNA gene flow and population density fluctuations in the bank vole. *Mol Ecol*, 6, 751-759.

「^{た ま がわ}多摩川の^{かせんしきかんきょう}河川敷環境が^{さんかんぶ}コリドーとして^{しがいち}山間部と^{こりつ}市街地に孤立したアカネズミ

^{こたいぐん}個体群をつないでいる^{かのうせい}可能性に関する^{ほぜんいでんせいたいがくてきけんきゅう}保全遺伝生態学的研究」

(研究助成・学術研究 VOL. 34-N0. 255)

著 者 ^{おはら}小原 ^{よしあき}嘉明

発行日 2006年3月31日

発行者 財団法人 とうきゅう環境浄化財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141