

学 位 論 文 題 名

Molecular Phylogeography of the Japanese Dormouse,
Glirulus japonicus

(ニホンヤマネの分子系統地理)

学位論文内容の要旨

ニホンヤマネ (*Glirulus japonicus*) は属として日本固有であり、日本列島の生物相の固有性・多様性を代表する種である。本州・四国・九州・隠岐島後の4島に棲息し、冬眠および日内休眠を行なうことで知られている。1975年に国の天然記念物に指定され、また、日本の哺乳類のレッドリストでは危急種に指定されており、保全の対象でもある。ここ20年余りの研究から、毛色・頭骨形態・染色体・遺伝子などに地理的な変異が存在することが確認されてきたが、系統地理学的な観点からの十分な研究が未だなされておらず、Evolutionarily Significant Unit (ESU) のように、遺伝的特性を重視した保全学的単位の樹立も緊急の課題となっている。そこで、本研究では、ミトコンドリアの cytochrome *b* 遺伝子、Y 染色体の *SRY* 遺伝子、常染色体のリボソーム RNA (rDNA) 遺伝子を用いて系統地理学的解析を行なうとともに、マイクロサテライトマーカーを今回新たに本種において開発し、遺伝的構造の解明をめざした。さらにこれらの遺伝的分化の指標に基づいた保全単位の樹立も試みた。最後に、マイクロサテライトマーカーを用い、行動学的観点からの調査も行なった。

ニホンヤマネの試料を分布域から広く収集し、48地点63個体について母系遺伝をするミトコンドリア DNA の塩基配列の解析を行なった。その結果、日本列島には東北(I)・関東(II)・岐阜+和歌山(III)・山陰(IV)・四国(V)・九州+西中国(VI)・石川県白山(VII)・静岡県静岡市北部(VIII)の地域に8つの系統が存在することが確認された。この中で、系統 VII と系統 VIII は1個体のみであるが、他の系統は複数個体から成立しており、それぞれ分布域が重ならない地域特異性を示した。また、分岐年代を推定した結果、系統 VI が約500万年前に分岐し、残りの多くの系統は約340万年前に分岐したものと推定された。ただし、系統 II と系統 VIII の分岐は、約130万年前と推定された。この結果はニホンヤマネの遺伝的構造の構築は第三紀後期に遡ることを示唆し、これは他の日本産哺乳類の中でも際立った特性であると思われた。特に東北集団のこの長い歴史性は、これまでの他の生物の研究では確認されておらず、ニホンヤマネの氷期待避所が第四紀を通して東北地方に存在した可能性が示唆する証拠が示され意義深いものであった。次に、父系遺伝をする Y 染色体の *SRY* 遺伝子の塩基配列の変異について、メス1匹の試料しかない系統 VII を除き解析を行なった。その結果、系統 III と系統 VI で同一のタイプが発見されたこと以外は、ミトコンドリアの結果を支持する結果となり、地域集団に固有の系統の存在が改めて示された。したがって、メスだけでなく、メスより行動圏の広いオスの地域集団間の移動も妨げられている可能性が示唆された。しかし、*SRY* の進化速度が推定できないため、この結果の解釈には慎重になる必要がある。また、分断化の要因については、山脈の影響があると考えられる場所を除いて不明であり、今後の調査が必要である。

核 rDNA 遺伝子制限酵素断片長多型は DNA 試料の十分な系統 I~VI について解析を行なった。その結果、分布域の両端である系統 I と系統 VI を代表する個体で高い遺伝的独自性が確認された。一方、地理的に近い場所に位置する系統 III・系統 IV・系統 V を代表する個体の間では独自の変異がほとんど確認されず、本マーカーの解像力の弱さが要因かあるいは実際に遺伝的な分化が進んでいないのかは判別がつかなかった。

集団遺伝学的解析を進めるために、本種においてマイクロサテライトマーカーの開発を行った。スクリーニングの結果、GT タンデムリピートを含む配列を 108 配列入手できた。さらに、30 のクローンについて塩基配列の解析を行なった結果、6 つのマイクロサテライト座位を解析用のマーカーとして樹立するに至った。この 6 つの座位を用い、38 地点から集められた 46 個体についての解析を行なった結果、上記のミトコンドリア系統の系統 II・系統 III 間と系統 IV・系統 VI 間で遺伝的交流が断たれていることが確認された。両境界線とも、他の哺乳類でも確認される事があり、前者においては日本アルプスが地理的障壁となり分断の原因となったと考えられるが、後者については要因ははっきり分かっていない。ここまでの研究から、ESU の基準を厳密に満たすのは九州+西中国集団のみと言うことになるが、ミトコンドリア系統の古さから考えて、現状ではそれぞれのミトコンドリア系統を最小の保全単位とするのが妥当であると考えられた。

さらに、個体間関係を調査するため、八ヶ岳の麓にある山梨県北杜市清里の森（標高約 1400m）にて捕獲された 45 個体から DNA を抽出し、マイクロサテライトと母系遺伝するミトコンドリアの control region を解析した。その際、DNA は、個体識別用に切った耳サンプルを用いて抽出した。その結果、2 家族（母子）の調査の結果、それぞれの家族の子供は全て父親を共有していることが判明した。飼育下の観察事例によると、メスは繁殖期に 1 晩のうちに複数のオスと交尾をする事例が確認されているが、今回の調査結果はその事例に反するものであった。サンプル数が少なく、今後調査を続ける必要があるが、ニホンヤマネでは過去に交尾栓が発見されており、その交尾栓が有効に機能している可能性もある。

また、ニホンヤマネは、複数個体が寄り集まって日内休眠や冬眠を行なう事例がいくつか確認されているが、今回、日内休眠時に巣箱を共有していた個体間の関係も調査した。巣箱を共有していた 5 グループのうち、1 グループは兄弟であった。しかし、明確な血縁関係が確認できないグループも複数存在し、性成熟した血縁関係のないオス同士が巣箱を共有している事例も確認された。これは、ニホンヤマネの他個体への寛容さを示す事例であると同時に、生誕地からの拡散についても今後なんらかの示唆を与えるものであると考えられる。これにより、これまで多くの謎に包まれていたニホンヤマネの繁殖行動の解明にむけた研究の端緒が開かれ、ニホンヤマネに対して、遺伝学および生態学的視点も加え統合的な保全に関する枠組みづくりの研究が展開されるものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 鈴 木 仁

副 査 教 授 木 村 正 人

副 査 教 授 東 正 剛

学 位 論 文 題 名

Molecular Phylogeography of the Japanese Dormouse, *Glirulus japonicus*

(ニホンヤマネの分子系統地理)

ニホンヤマネ (*Glirulus japonicus*) は属レベルで日本固有であり、日本列島の生物相の固有性・多様性を代表する種である。本州・四国・九州・隠岐島後の4島に棲息し、冬眠および日内休眠を行うことで知られている。1975年に国の天然記念物に指定され、また、日本の哺乳類のレッドリストでは準絶滅危惧種に指定されており、保全の対象でもある。ここ20年余りの研究から、毛色・頭骨形態・染色体・遺伝子などに地理的な変異が存在することが確認されてきたが、系統地理学的な観点からの十分な研究が未だなされておらず、Evolutionarily Significant Unit (ESU) のような、遺伝的特性を重視した保全学的単位の樹立も緊急の課題となっている。そこで、本研究では、ミトコンドリアの cytochrome *b* 遺伝子、Y 染色体の *SRY*、常染色体のリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) を用いて系統地理学的解析を行なうとともに、マイクロサテライトマーカーを今回新たに本種において開発し、遺伝的構造の解明と保全単位の樹立を試みた。また、マイクロサテライトマーカーを用い、行動学的観点からの調査も行なった。

第1章では、ニホンヤマネの試料を分布域から広く収集し、48地点63個体について母系遺伝をするミトコンドリア DNA の cytochrome *b* 遺伝子の塩基配列解析を行った。その結果、日本列島には東北 (I)・関東 (II)・岐阜+和歌山 (III)・山陰 (IV)・四国 (V)・九州+西中国 (VI)・石川県白山 (VII)・静岡県静岡市北部 (VIII) の地域に8つの系統が存在することが確認された。この中で、系統 VII と系統 VIII は1個体のみであるが、他の系統は複数個体から成立しており、それぞれ分布域が重ならない地域特異性を示した。また、分岐年代を推定した結果、系統 VI が約500万年前に分岐し、残りの多くの系統は約340万年前に分岐したものと推定された。ただし、系統 II と系統 VIII の分岐は、約130万年前と推定された。この結果は、ニホンヤマネの遺伝的構造の構築が第三紀後期に遡ることを示唆した。特に東北集団のこの長い歴史性は、ニホンヤマネの氷期の待避所が第四紀を通して東北地方に存在したことを示唆する意義深いものであった。父系遺伝

をする Y 染色体の *SRY* の塩基配列も cytochrome *b* 遺伝子とほぼ同様の結果を示した。また、分断化の要因については、山脈の影響があると考えられる場所を除いて不明であった。核 rDNA スペーサー領域の制限酵素断片長多型は DNA 試料の十分な系統 I~VI について解析を行なった。その結果、分布域の両端である系統 I と系統 VI を代表する個体で高い遺伝的独自性が確認された。一方、地理的に近い場所に位置する系統 III・系統 IV・系統 V を代表する個体の間では独自の変異があまり確認されなかったが、本マーカーの解像力の弱さによるのか、実際に遺伝的な分化が進んでいないためであるのかは判別がつかなかった。

第 2 章では、集団遺伝学的解析を進めるために、本種においてマイクロサテライトマーカーの開発を行った。その結果、6 つのマイクロサテライト座位を解析用のマーカーとして樹立するに至り、さらに、この 6 つの座位を用い 38 地点から集められた 46 個体についての解析を行った結果、上記の系統 IV とそれ以外のグループの間で遺伝的分化が進んでいることが確認された。この分化は、歴史的な分断化の結果であると考えられるので、ESU の定義である「ミトコンドリアの単系統性」と「核の遺伝子交流の制限」を満たすと考えられる。ただし、ミトコンドリア系統の古さや、他の核 DNA マーカーの結果から考えて、現状ではそれぞれのミトコンドリア系統を最小の保全単位とするのが妥当であると考えられた。

第 3 章では、さらに、今回開発したマイクロサテライトを用いて生態学的研究への応用を試みた。手始めに 2 家族（母子）の血縁関係を調査したところ、それぞれの家族の子供は全て父親を共有していることが判明するなど、生態学的情報を得るとともに、用いたマイクロサテライトマーカーの有効性が確認された。さらに、ニホンヤマネは、日内休眠や冬眠の際の同巢個体の血縁度について解析を試みたところ、血縁性とは関係なく個体が集合することが確認された。これは、ニホンヤマネの他個体への寛容さと個体拡散に関する有益情報を与えるものと考えられた。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や習得単位などもあわせ、申請者は、博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定された。