

# ニホンヤマネの種内多型の維持機構の解明

生態環境科学専攻 生態遺伝学講座

博士後期課程 1 年 安田俊平 (指導教官 鈴木仁)

## はじめに

ニホンヤマネ (*Glirulus japonicus*) は、日本の本州・四国・九州・隠岐島後に生息する日本固有の小型哺乳類である(阿部ら, 1994)。齧歯目 (Rodentia) ヤマネ科 (Gliridae) に属し (Corbet and Hill, 1991)、日本産の哺乳類の中で最古参の種とも考えられている (Dobson and Kawamura, 1998)。生態学的には、広葉樹林帯に棲息し、漿果や昆虫を採食し、日内休眠や冬眠を行うという特徴を持つ (湊, 2000; 中島, 2001)。種内の多様性を解析したこれまでの研究から、1)山梨と和歌山の個体間に毛色などの形態学的特性の変異 (湊, 1986)、2)西日本と東日本のそれぞれに分布標高のクライン (棲息する地域の緯度が上がるほど分布標高が下がる傾向) が存在 (中島, 2001)、3)長野・山梨・福井・和歌山・高知の 5 地点 5 個体の遺伝的解析の結果、“山梨/長野”・“福井”・“和歌山”・“高知”の古い 4 系統の存在 (Suzuki *et al.*, 1997) などの知見が明らかになっている。したがってニホンヤマネにおいて、列島内の集団の遺伝的構造を詳細に把握し、近年の人為的な分断化の影響を図り、希少種である本種を保全するための基盤情報を収集する必要性が認識されている。このことは天然記念物指定を受けている本種を象徴種として扱い、社会的な環境保全意識を高める上でも重要である。

これらを踏まえ、本研究は、集団構造の形成維持機構を解明すると同時に、集団内多型や集団間の遺伝的交流を定量化し、保全基盤としての ESU (Evolutionarily Significant Unit: Frankham *et al.*, 2002) を確立することを目的とした。

## 材料と方法

現在保有するニホンヤマネ 24 個体のミトコンドリア DNA の cytochrome *b* 遺伝子前半 402 bp を解析し、ヨーロッパヤマネ (*Muscardinus avellanarius*) を外群とし、木村 2 変数法 (Kimura two-parameter method: Kimura, 1980) 距離を用いて近隣結合法 (NJ tree: Saitou and Nei, 1987) で系統樹を作成し、ニホンヤマネのグループ分けを行い、また、確認された各集団から 1 個体、cytochrome *b* 遺伝子全領域である 1140 bp を解析し、402 bp の解析と同様の方法で系統樹を作成し、それぞれの集団の系統関係を推定した。同様に、核 DNA の IRBP (Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein) 遺伝子のエクソン 1 の一部 (1190 bp) を解析し、変異サイトのみを抽出してミトコンドリア DNA で確認された各集団間で比較検討を行った。また、各集団から 1 個体を選び、核 DNA の rDNA (ribosomal DNA) のスペーサー領域を制限酵素で切断した後サザンハイブリダイゼーションを行い、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析を行った。

マイクロサテライト開発は、古典的なスクリーニング法 (種生物学会, 2001) を用いて行った。

体毛からの DNA の抽出は、死亡後に本剥製にされ標本として保管された個体、民家でミイラ状態で発見された個体、死亡後に冷凍保存された個体の合わせて 3 個体の体毛を、長いものを中心に毛抜きを使って約 30 本回収し、ISOHAIR (Nippon gene) を用いて DNA を抽出した。

## 結果

<DNA 配列解析>

ミトコンドリア DNA の cytochrome *b* 遺伝子 402 bp を解析し、系統樹を作成した結果、東北（青森・秋田・岩手）、信州（長野・山梨・静岡）、北陸（福井・鳥取）、紀州（和歌山）、四国（高知・徳島・愛媛）、九州（山口・佐賀・長崎・宮崎・熊本）の 6 つの地域特異的な集団が確認された（図 1）。また、1140 bp の解析から、始めに九州系統が分岐し、後に残りの 5 系統がほぼ同時に分岐したことが示された。九州系統と他の系統の間には、約 10% の塩基置換が存在し、他の 5 集団間では約 7% の塩基置換が認められた（図 1）

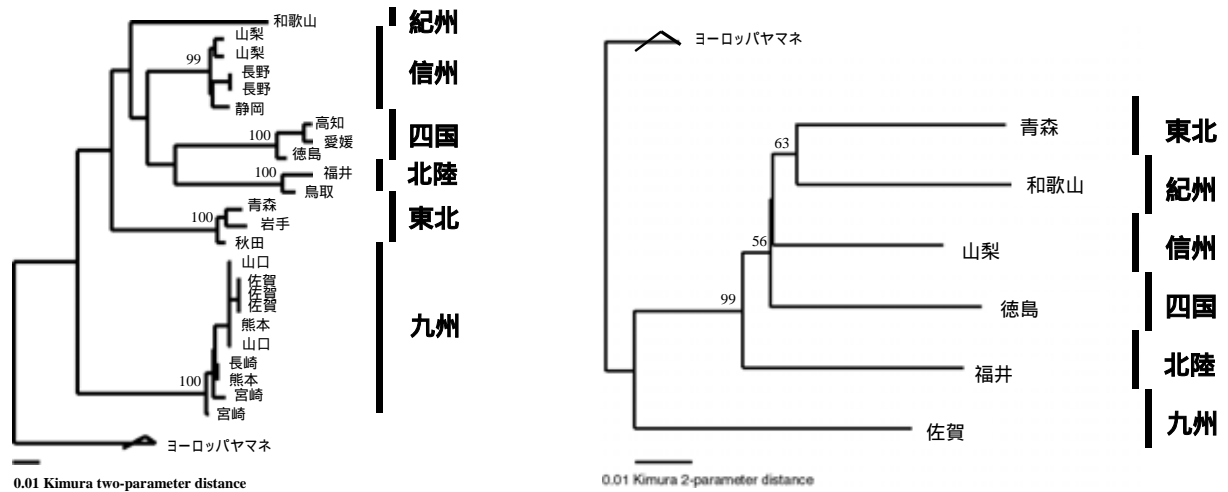
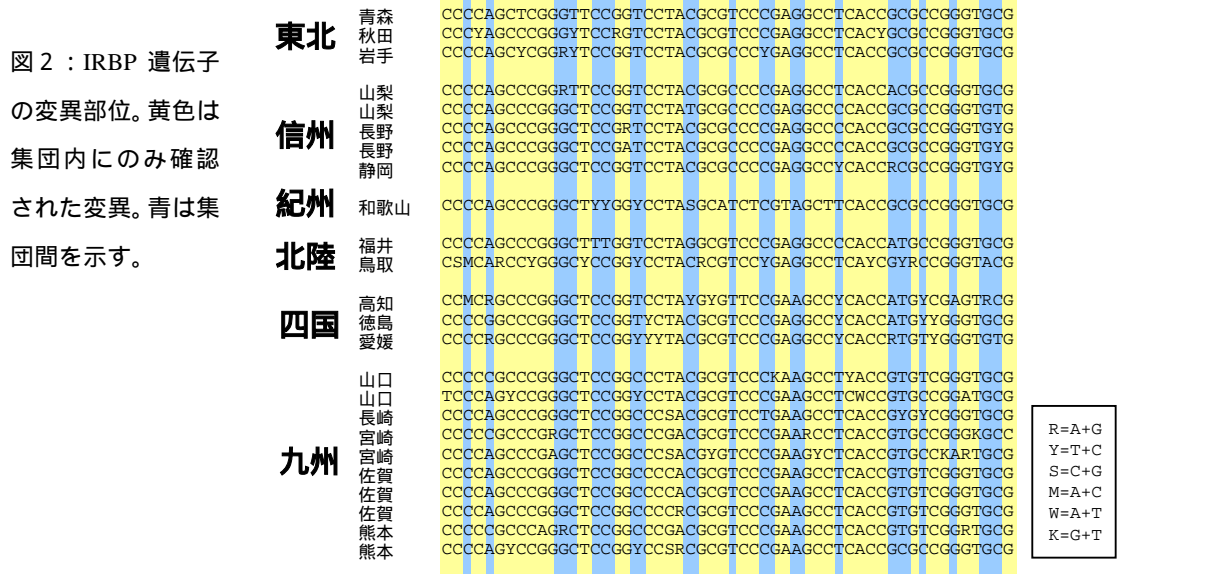


図 1 : cytochrome *b* 遺伝子 402 bp の系統樹（左）と 1140 bp の系統樹（右）

核 DNA の IRBP 遺伝子の解析では、ミトコンドリア DNA で確認された 6 集団間で考えると、東北集団では 5 置換、紀州集団では 4 置換、信州集団では 7 置換、北陸集団では 7 置換、四国集団では 9 置換、九州集団では 7 置換が他集団と共有されていた。しかし、分布域の北限である東北と南限である九州間ではわずかに 1 つの突然変異しか共有されておらず、地理的な距離が遺伝的な距離と比例していた。また、集団内のみ確認された突然変異の数は、解析された個体数が一番多い九州で多く発見された（図 2）。



rDNA の RFLP 解析では、ミトコンドリアで確認された 6 集団のうち東北集団の青森個体は独自変異を 5 つ

持ち、九州集団の長崎個体は独自変異を 4 つ持つが、山梨産（信州集団）は 2 つ・福井産（北陸集団）・和歌山産（紀州集団）・高知産（四国集団）の 3 個体はそれぞれ 1 つのみ独自変異を持っていることが判明した。

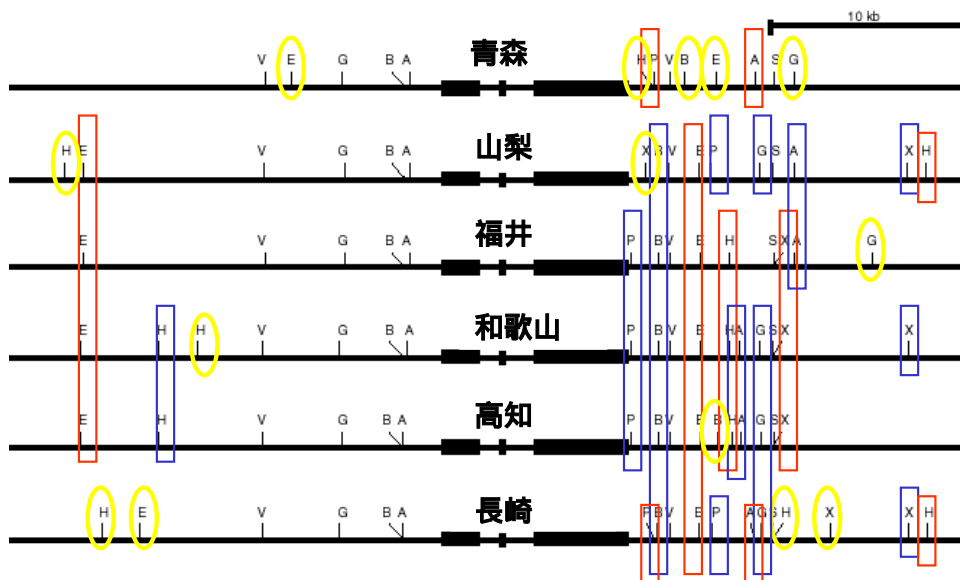


図 3 : rDNA の RFLP 解析。図中の太い線が左から 18SRNA・5.8SRNA・28SRNA コード領域を示し、細い線がスペーサー領域を示す。図中のアルファベットはそれぞれ以下の制限酵素の切断部位を示す ; A: *AatI*・B: *BamHI*・E: *EcoRI*・G: *BglIII*・H: *HindIII*・P: *PstI*・S: *SacI*・V: *PvuII*・X: *XbaI*。黄色丸はそれぞれの個体に特有の変異を、赤もしくは青の長方形は多個体と共有している変異をそれぞれ示す。

#### <マイクロサテライト開発>

現在までに、100 以上のマイクロサテライト配列を解析し、そのうち 4 つの配列について、蛍光プライマーを作成した。その内の 1 つは個体間多型が見られ、対立遺伝子が 10 以上検出されたが、そのほとんどがホモ接合体であった。残り 3 つのマイクロサテライトマーカーについては、ほとんどの個体がヘテロ接合体であり対立遺伝子がそれぞれ 10 以上検出された。

#### <体毛からの DNA 抽出と解析>

全個体、DNA の抽出とミトコンドリア DNA の増幅は可能であった。しかしながら、マイクロサテライトの増幅は同一条件下において増幅が安定しなかった。

### 考察

#### <DNA 配列解析>

ミトコンドリア解析から、列島内には、系統学的に独自性の高い 6 つのグループが列島内に存在することを明らかにすることができた。すなわち、東北、信州・関東、北陸、紀州、四国、そして九州の各地域集団である。塩基配列はそれぞれ 7-10%異なっており、第三紀後期の分岐であることが示唆された。このことは列島内でニホンヤマネの 50 万年より古い化石が発見されていない事実 (Kawamura, 1989) を考えると、今回のデータは列島内に本種が数百年間、各地域で系統の維持を行ってきた可能性を示唆しており、学術的に価値の高い発見であるといえる。一方、各地域集団内の塩基置換の差異は細微であり、ニホンヤマネには明白な遺伝的

構造が存在することが確認され、ESU として、ミトコンドリア DNA の変異を基に描かれた地域集団を活用することも有益であると思われた。今回、剥製標本やミイラの毛から抽出した DNA を活用したミトコンドリア DNA のタイピングにも成功した。今後、博物館標本も活用し、より詳細に解析を行ない、地域集団の境界線の策定を行なうことが重要であると思われた。

核 rDNA の RFLP 解析でも、信州集団、九州集団、東北集団は多かれ少なかれ、独自の変異を保有しており、それぞれの集団が進化的に独立して存続している可能性が強く示唆された。一方、紀州・四国・北陸の 3 集団は互いに比較的類似した制限酵素切断パターンを共有していることが明らかとなった。この結果はこれら 3 地域間で進化的な時間の中で、ある程度の遺伝的交流が起こっていることを示唆している。ミトコンドリア DNA 解析の結果と異なる結果が出ているのは、性差による移動力の違いがあるからかもしれない。実際、本種はメスの 2~4 倍もの面積をホームレンジをオスが持つことが明らかになっている (湊 1998)。今後より多くの遺伝的マーカーを用いて検討を行なう必要があるものと思われた。

系統地理学的マーカーとして核の遺伝子の塩基配列の活用はまさに開始されたばかりであり、今回、核 IRBP 遺伝子の塩基配列 (1190 bp) の解析を行ない遺伝的多様性の状況を把握するとともに、上記二つのマーカーの結果とも比較し、核遺伝子塩基配列のマーカーとしての有用性の検討も行なった。24 個体の解析を行ない、計 54 個の変異サイトを確認した。最大 5% もの塩基置換の異なる配列が種内に存在することを示しており、ニホンヤマネの本遺伝子領域における遺伝的多様性のレベルは極めて高いものであった。54 個の変異サイトのうち、25 はある一つの個体でのみ観察される singleton であった。この singleton を除いた残り 29 個の変異サイトの地理的分布をみると、ミトコンドリア DNA の変異から明らかになった地域集団の存在を弱いながらサポートする結果となっていた。例えば、個体数の比較的多い九州集団内に、その集団以外では確認できない変位が singleton を除いても 4 個存在し、九州集団が独自の進化的歴史を辿っている可能性を示唆していると思われた。他の集団にも同様の傾向が示されたが、しかし、いくつかの変異は他の集団と共有されているものも存在し、地域集団間で現在完全に遺伝的交流が断絶しているという強い証拠は得られなかった。今後、より鋭敏なマーカーで解析を行なう必要があることが示唆された。

ところで、今回用いた解析手段において、IRBP 遺伝子の解析は、他の種で用いられている方法をそのまま転用できるので非常に簡便な方法である。しかし、遺伝子の組み換えを検出することが事実上不可能であるため、検出されたそれぞれの突然変異を独立の変異として認識できず、また、ヘテロサイトの解析が困難であるという欠点がある。また、rDNA のスペーサー領域の RFLP 解析では、DNA シーケンスやマイクロサテライト解析を行う場合と比較して 100 倍以上の DNA サンプルが必要であるため、体毛等から抽出した微量 DNA の解析はできず、また、時間と手間が非常にかかるため大量解析に向かないという欠点がある。そのため、特に核 DNA を解析して、遺伝的交流を定量的に解析する場合には、今後はマイクロサテライトマーカーのように大量解析ができ、かつ微量のテンプレート DNA からでも解析が可能なマーカーを用いて解析する必要があると考えられる。

#### <マイクロサテライト開発>

4 遺伝子座を解析するための蛍光プライマーの作成を行ったが、うち 1 つは種内多型は存在するもののほとんどがホモ接合体であり、性染色体上に存在するマイクロサテライト配列であるものと考えられる。集団間の遺伝的交流を計る指標としての使用は可能であると考えられるが、他の常染色体上のマイクロサテライトマーカーと挙動が異なり、また、標本の性別を確認する必要があるため、体毛等からの微量 DNA の抽出に伴う遺

伝子交流の解析には不適であるものと考えられる。残りの3遺伝子座のマイクロサテライトマーカーについては、常染色体上に存在していると推定され、また、対立遺伝子がそれぞれ10以上存在したことから、集団間の遺伝子流動や、親子判別等に有効なマーカーとして機能しうるのであると考えられる。しかし、現存する3マーカーでは明らかに遺伝子マーカーとして数が不足しているので、今後さらに解析済みのマイクロサテライト座位から有用であると考えられるマーカーを開発する必要がある。なお、体毛からの抽出したDNAを用いて、マイクロサテライトマーカー解析は現時点では成功率が低い。今後はこの点の技術的克服も行なう予定である。

## 参考文献

- Corbet G. B., and Hill J. E. (1991) A World List of Mammalian Species. Third eds. Oxford University Press, New York.
- Dobson M., and Kawamura Y. (1998) Origin of the Japanese land mammal fauna: allocation of extant species to historically-based categories. *Quaternary Research (第四紀研究)*, 37: 385-395.
- Frankham R., Ballou J. D., and Briscoe D. A. (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Kawamura Y. (1989) Quaternary Rodent Faunas in the Japanese Islands (Part 2). *Memoirs of the Faculty of Science, Kyoto University, Series of Geology and Mineralogy*, 54: 1-235.
- Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Saitou N., and Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Suzuki H., Minato S., Sakurai S., Tsuchiya K., and Fokin I. M. (1997) Phylogenetic position and geographic differentiation of the Japanese dormouse, *Glirulus japonicus*, revealed by variations among rDNA, mtDNA, and the *Sry* gene. *Zoological Science*, 14: 167-173.
- Suzuki H., Yasuda S. P., Sakaizumi M., Wakana S., Motokawa M., and Tsuchiya K. (2004) Differential geographic patterns of mitochondrial DNA variation in two sympatric species of Japanese wood mice, *Apodemus speciosus* and *A. argenteus*. *Genes and Genetic Systems*, 79: 165-176.
- 阿部永, 石井信夫, 金子之史, 前田喜四雄, 三浦慎悟, 米田政明 (1994) 日本の哺乳類 東海大学出版会.
- 種生物学会 (編) (2001) 森の分子生態学 - 遺伝子が語る森林のすがた - 文一総合出版.
- 中島福男 (2001) 日本のヤマネ 信濃毎日新聞社.
- 湊秋作 (1986) ニホンヤマネの生態 平凡社.
- 湊秋作 (1998) 連載・おもしろ観察記 ヤマネ WWF.
- 湊秋作 (2000) ヤマネって知ってる? - ヤマネおもしろ観察記 築地書館.