— 短 報 —

脱落羽毛の遺伝的解析からみた日本で越冬するヒシクイ *Anser fabalis* の亜種区分

江田真毅^{1,*,**}・嶋田哲郎²・溝田智俊³・小池裕子^{1,***}

¹ 九州大学大学院比較社会文化研究院生物多様性講座 〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

² 宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団 〒989-5504 宮城県栗原市若柳字上畑岡敷味 17-2

³ 岩手大学農学部応用生物化学課程 〒020-8550 岩手県盛岡市上田 3-18-8

(2010 年 3 月 25 日受付；2010 年 11 月 7 日受理)

キーワード：*Anser fabalis*, 亜種, 制御領域, ヒシクイ, ミトコンドリア DNA.

日本鳥学会誌

Japanese Journal of
Ornithology

© The Ornithological Society
of Japan 2011

Masaki Eda^{1,*}, Tetsuo Shimada², Chitoshi Mizota³, Hiroko Koike¹. 2011. The identification of Bean Goose *Anser fabalis* subspecies wintering in Japan, based on studies of the mitochondrial DNA control region: a preliminary study. Jpn. J. Ornithol. 60: 100–104.

Abstract. The Bean Goose *Anser fabalis*, breeds in the northern Palaearctic region during summer and winters in the temperate zone, including in Japan. Based on morphological criteria, *A. f. serrirostris* winters in the Tohoku region along the Pacific coast, while *A. f. middendorffii* winters in the Hokuriku region along the Japan Sea coast and around Lake Kasumigaura. However, identification of the subspecies of birds wintering in the Izumo region has been uncertain due to morphological variation in the population. We sampled fallen feathers from four wintering sites (Lake Kejonuma, Miyagi Prefecture; Asahi pond, Niigata Prefecture; Sakai plain, Fukui Prefecture, and Izumo plain, Shimane Prefecture), determined nucleotide sequence in the mitochondrial DNA control region, and compared the results with those from previous studies. Feathers sampled from Lake Kejonuma were found to fall within a clade including *A. f. serrirostris*, while those sampled from the Asahi pond were included in a clade including *A. f. middendorffii*. These results were concordant with the subspecies allocations based on morphological criteria. The feathers sampled from the Izumo plain fell within the clade including *A. f. middendorffii*, which suggests that the population in the region mostly consists maternally of *A. f. middendorffii*. In addition, a control region sequence belonging to *A. f. serrirostris* was found in the Sakai plain where few *A. f. serrirostris* were observed.

Key words: *Anser fabalis*, Subspecies identification, Control region, Bean Goose, Mitochondrial DNA.

¹ Department of Environmental Changes, SCS, Kyushu University. Moto-oka 774, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan.

² The Miyagi Prefectural Izunuma-Uchinuma Environmental Foundation, 17-2 Shikimi, Wakayanagi, Kurihara, Miyagi 989-5504, Japan.

³ Department of Applied Biochemistry, Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate 020-8550, Japan.

* E-mail: edamsk@med.tottori-u.ac.jp

** 現住所：鳥取大学医学部機能形態統御学講座
〒683-0853 鳥取県米子市西町 86

*** 現住所：九州大学総合研究博物館
〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

doi:10.3838/jjo.60.100

JOI:JST.JSTAGE/jjo/60.100

はじめに

ヒシクイ *Anser fabalis* は、ユーラシア大陸北部に広く分布する大型のカモ科鳥類である。北極圏のツンドラ地帯とそれに接するタイガ地帯で夏季に繁殖し、日本を含む温帯域で越冬する (Kear

2005). 形態学的観点から、従来、ヒシクイはツンドラ型の2亜種(亜種ヒシクイ *A. f. serratirostris*, ロシアヒシクイ *A. f. rossicus*)とタイガ型の3亜種(オオヒシクイ *A. f. middendorffii*, ニシヒシクイ *A. f. fabalis*, ニシシベリアヒシクイ *A. f. johanseni*)の計5亜種に分類されてきた(Delacour 1954, del Hoyo *et al.* 1992). 一方、ニシシベリアヒシクイ以外の4亜種を対象としたミトコンドリアDNA・制御領域の解析では、タイガ地帯の東部で繁殖するオオヒシクイと、タイガ地帯の西部とツンドラ地帯で繁殖する亜種ヒシクイなどの3亜種で構成される2系統に分けられることが明らかになっている(Ruokonen *et al.* 2008).

日本には約12,000羽のヒシクイが東北地方の太平洋側と北陸地方を中心に冬鳥として渡来し、一部は関東地方の霞ヶ浦や山陰地方の出雲平野にも飛来することが確認されている(宮林 1994, 日本鳥類目録編集委員会 2000). また、渡来するヒシクイは、亜種ヒシクイとオオヒシクイが主に占めている。両亜種は、亜種ヒシクイがオオヒシクイに比べて小型であること、首や嘴の長さが短いこと、嘴の基部付近が厚いことなどから識別される(呉地ら 1983). 野外観察から、化女沼などの東北地方の太平洋側で越冬する個体群は主に亜種ヒシクイとされ、福島潟、朝日池、坂井平野など北陸地方の日本海側と霞ヶ浦周辺に越冬する個体群は主にオオヒシクイとされる(宮林 1994). 一方、出雲平野に渡来する個体群は、体サイズや嘴の形態に変異が大きく、これまで亜種は不明とされてきた(佐藤 1985).

本研究では、日本で越冬するヒシクイの亜種区分を明らかにするために、朝日池(新潟県)、坂井平野(福井県)、出雲平野(島根県)、化女沼(宮城県)でヒシクイの脱落羽毛を採取し、ミトコンドリアDNAの制御領域の塩基配列を決定して、Ruokonen *et al.* (2008)のデータと比較した。その結果、亜種の分布に関する新たな知見が得られたので報告する。

材料および方法

材料の採集

2005年11月から2006年1月にかけて、ヒシクイの採食地において脱落羽毛計28枚を採集した。試料の採集地と試料数は出雲平野(35°26'N, 132°52'E)が10試料、朝日池(37°15'N, 138°20'E)が10試料、坂井平野(36°10'N, 136°10'E)が5試

料、化女沼が3試料(38°38'N, 140°58'E)である。試料は採集後に恒温器で乾燥させた後、紙封筒もしくはポリエチレン製容器に入れて実験に供試するまで保存した。

塩基配列の決定

採集した羽毛の羽軸部分約3mgを切り取り、Eda *et al.* (2008)と同様の方法でIso-Quick法(Iso Quick Kit; ORCA社)によりDNAを抽出した。試料を入れずに試薬だけで同様の抽出作業をおこなうネガティブコントロールを各抽出の一つ含め、試薬へのDNAの混入(コンタミネーション)がないことを確認した。塩基配列の決定は、ミトコンドリアDNA・制御領域を対象とした、プライマーGCR-F(5'-GGTTATGGATATTCGTGCATAG-3'; Barens *et al.* 2000)とH454.gr(5'-GCCCTGACATAGGAACCAGAG-3'; Baba *et al.* 2002)を組み合わせ、ヒシクイの同領域・ドメインIの400塩基対を特異的に増幅した。この領域はRuokonen *et al.* (2008)が繁殖地で採集した199個体について分析した領域(221塩基対)を全て含んでいる。PCRによるDNAの増幅は、緩衝液に1μlの抽出DNA, 0.2μMの各塩基, 0.1μMの各プライマー, 0.2mg/mlのBSA, 1.25unitの*Ex Taq* (TaKaRa)を加え、総量25μlに調整しておこなった。PCRの条件は、熱変性を94°C 30秒、アニーリングを60°C 45秒、伸長反応を72°C 45秒、サイクル数を30もしくは40とした。各抽出のネガティブコントロールとともに、試料を入れずに試薬だけで同様のPCR作業をおこなうPCRのネガティブコントロールも各実験の一つ含めた。得られたPCR産物は5μlを電気泳動し、目的配列が増幅されていることを確認した後、PCR Product Pre-sequencing Kit (USB)で精製し、CEQ 2000 DNA Analysis Systems (Beckman Coulter)を用いて塩基配列を決定した。

系統解析

得られた配列はロシアヒシクイの配列(DDBJ/EMBL/GenBank登録番号AF159951)とともに、MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007)上でClustal Xを利用して整列した。また、繁殖地で採集されたヒシクイ種群の配列(DDBJ/EMBL/GenBank登録番号EU186805~EU186828)との系統関係を明らかにするため、Ruokonen *et al.* (2008)が199個体の配列を決定した領域(221bp)について、TCS 1.21 (Templeton *et al.* 1992)を用いて統計最節約ネットワーク(statistical parsimony network)を作成した。

ネットワーク中のループは Ruokonen *et al.* (2008) に従って解消した。得られた塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank に登録した (登録番号 AB551526～AB551534)。

結 果

分析した脱落羽毛全 28 試料から DNA を抽出し、制御領域・ドメイン I の配列 400 塩基対を決定した。すべての実験を通じてネガティブコントロールに DNA の増幅は確認されなかった。得られた塩基配列のうち、朝日池の 3 試料の配列はマガンの配列との相同性が高く、同所的に採食するマガンの羽毛に由来すると判断されたため、以下の分析から除外した。

配列を整列した結果、分析試料中では 11ヶ所、ロシアヒシクイと比較すると 13ヶ所の多型部位が認められ、9 ハプロタイプ (AFJ1～AFJ9) が確認された (表 1)。Ruokonen *et al.* (2008) が重点的に解析した 221 塩基対に限ると、ハプロタイプは 7 となった。このうち Ruokonen *et al.* (2008) でも検出されているハプロタイプは 4 つで、AFJ1 と AFJ2 が MID1 に、AFJ3 が MID3 に、AFJ4 が MID5 に、AFJ7 と AFJ8 が SER1 にそれぞれ対応した。一方で、AFJ5、AFJ6、AFJ9 と対応するハプロタイプは Ruokonen *et al.* (2008) では検出されていなかった。

統計最節約ネットワークでは、検出されたハプロタイプは、オオヒシクイのクレードに含まれるハプロタイプと、亜種ヒシクイ、ニシヒシクイ、ロシアヒシクイの 3 亜種から構成されるクレードにそれぞれ含まれることが明らかとなった (図 1)。オオヒシクイのクレードに含まれたのは、MID1 に対応する AFJ1 と AFJ2、MID3 に対応する AFJ3、MID5 に対応する AFJ4、新たに検出されたハプロタイプである AFJ5 と AFJ6 であった。地域別にみると、朝日池の 7 試料 (AFJ2)、坂井平野の 4 試料 (AFJ2 と AFJ3)、出雲平野の 10 試料 (AFJ1 と AFJ4～AFJ6) がこのオオヒシクイのクレードに含まれた。一方、亜種ヒシクイ、ニシヒシクイ、ロシアヒシクイの 3 亜種から成るクレードに含まれたのは、SER1 に対応する AFJ7 と AFJ8、および新たに検出されたハプロタイプである AFJ9 であった。地域別にみると、坂井平野の 1 試料 (AFJ7) と化女沼の 3 試料 (AFJ8 と AFJ9) がこの亜種ヒシクイなど 3 亜種から構成されるクレードに含まれた。

表 1. 検出されたハプロタイプとその多型座位、および各越冬地における出現頻度。図 1 における各ハプロタイプの名称と DNA データベースにおける登録番号もあわせて示した。多型座位のうち白で示した座位は Ruokonen *et al.* (2008) が重点的に解析した領域に含まれる。図 1 における各ハプロタイプの名称は基本的に Ruokonen *et al.* (2008) に基づき、本研究で新たに検出されたハプロタイプは太字で示した。

Table 1. Observed haplotype, variable nucleotide positions and haplotype frequency in each sampling site. Haplotype names in Fig. 1 and accession numbers in DDBJ/EMBL/GenBank are also shown. Variable nucleotide positions shown in white are included in a region that was studied intensively by Ruokonen *et al.* (2008). Haplotype names in Fig. 1 basically correspond to Ruokonen *et al.* (2008), while the names shown in bold are new haplotypes found in this study.

ハプロタイプ	多型座位 Variable nucleotide positions															ハプロタイプ頻度 Haplotype frequency				図 1 中の名称 Haplotype name in Fig. 1	DNA データベース 登録番号 DDBJ/EMBL/GenBank Accession Nos.
	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	朝日池 Asahi pond	坂井平野 Sakai plain	出雲平野 Izumo plain	化女沼 Lake Kejonuma		
	1	4	5	3	6	7	7	7	7	8	1	4	4	4	5						
<i>A. f. rossicus</i>	A	G	C	C	G	C	A	C	C	C	C	C	T	C	C	7	3	7	ROS2	AF159951	
AFJ1	C	A	T	T	T	T	T	T	T	G	.	.	.	.	.	7	3	7	MID1	AB551526	
AFJ2	C	A	T	T	T	T	T	T	T	G	.	.	.	.	.	7	3	7	MID1	AB551527	
AFJ3	C	A	T	T	T	T	T	T	T	G	.	.	.	.	.	7	3	7	MID3	AB551528	
AFJ4	C	A	T	T	T	T	T	T	T	G	.	.	.	.	.	7	3	7	MID5	AB551529	
AFJ5	C	A	T	T	T	T	T	T	T	G	.	.	.	.	.	7	3	7	AFJ5	AB551530	
AFJ6	C	A	T	T	T	T	T	T	T	G	.	.	.	.	.	7	3	7	AFJ6	AB551531	
AFJ7	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	1	SER1	AB551532	
AFJ8	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	1	SER1	AB551533	
AFJ9	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	1	AFJ9	AB551534

図1. 制御領域ドメインIの配列（221塩基対）に基づく統計最節約ネットワーク。本研究で検出されたハプロタイプと整理に利用した配列（ROS2）にのみ名称を付した。ハプロタイプの名称は表1と対応している。

Fig. 1. Statistical parsimony network based on mitochondrial DNA control region domain I of *Anser fabalis* and *A. brachyrhynchus*. Haplotypes named were found in this study or used as a reference sequence (ROS2). Haplotype names correspond to those in Table 1.

考 察

日本の越冬地で採集されたヒシクイの脱落羽毛25試料のミトコンドリアDNA・制御領域の配列を決定して、Ruokonen *et al.* (2008) のデータと比較した。その結果、Ruokonen *et al.* (2008) の分析領域では7（分析領域全体では9）ハプロタイプが検出され、このうち3ハプロタイプは未報告のものであった。これは、日本で越冬するヒシクイが、Ruokonen *et al.* (2008) のサンプルに含まれていないカムチャッカ半島などの極東地域で繁殖する個体に由来する（宮林 1994）ためと考えられる。

構築したネットワークから、オオヒシクイの系統に含まれる個体と亜種ヒシクイなど3亜種の系統に含まれる個体の2系統が日本で越冬していることが明らかになった。この結果は日本に渡来する亜種がオオヒシクイと亜種ヒシクイであるとする形態学的観点からの観察（宮林 1994, 日本鳥類目録編集委員会 2000）を支持するものである。また、亜種ヒシクイが主に飛来するとされる化女沼では亜種ヒシクイの系統に含まれる配列が、オオヒシクイが主に飛来するとされる朝日池ではオオヒシクイの系統に含まれる配列が認められ、これらの地域では従来の亜種の分布が支持された。一方で、亜種の分布について新たな知見が2つ得ら

れた。

第一に、今回採取した出雲平野の10試料すべてがオオヒシクイの系統に含まれたことである。試料数は少ないものの、この結果は、出雲平野で越冬する個体には、母系的にオオヒシクイに由来する個体が含まれることを示唆する。出雲平野に飛来する個体群には、体サイズがマガン程度からコハクチョウよりやや小さい程度までの個体が含まれ、またオオヒシクイ型と亜種ヒシクイ型の嘴の両方が認められることから、亜種不明とされてきた（佐藤 1985）。今回の結果では亜種ヒシクイなどの系統に含まれる試料は認められなかったが、これは試料数が少なかったことに帰因していることも考えられ、今後、分析試料数を増やす必要がある。また、両亜種の交雑の有無を明らかにするためには、母系遺伝するミトコンドリアDNAだけでなく、両系遺伝する核のマイクロサテライト領域などを分析する必要がある。

第二に、坂井平野にオオヒシクイと亜種ヒシクイの両系統に含まれる試料が認められ、両系統がこの地域で越冬することが示唆されたことである。これまで、坂井平野ではオオヒシクイが分布するとされ（宮林 1994）、亜種ヒシクイは1994年の2月にオオヒシクイの群中に2羽が確認された記録があるにすぎない（福井県 2002）。今回の分析結

果は、観察されている以上に亜種ヒシクイが坂井平野に飛来している可能性を示唆する。

今後、日本におけるヒシクイの亜種分布を明らかにするためには、形態を観察・計測し、同時に羽毛や血液などの試料を採集するなど、形態情報と遺伝情報の両方が得られる試料の採集が必要と考えられる。

羽毛の採集には足立容子氏、工藤邦彦氏、野津登美子氏、山田雅晴氏、柳町邦光氏のご協力をいただいた。呉地正行氏、佐藤仁志氏、森 茂晃氏にはヒシクイの文献や分布状況についてご教示いただいた。また編集者と二名の匿名の査読者からは論旨を明確にするうえで有益なコメントをいただいた。末筆ながら上記の方々に厚く御礼申し上げる次第である。なお、本研究は科学研究費補助金（特別研究員奨励費 04J06316 および若手研究（B）21700846）の助成を受けた研究成果の一部である。

摘 要

ヒシクイ *Anser fabalis* は北極圏で夏季に繁殖し、温帯域で越冬する。形態学的観点から、日本には東北地方の太平洋側で主に亜種ヒシクイが、北陸地方の日本海側と霞ヶ浦周辺で主にオオヒシクイ *A. f. middendorffii* が越冬し、出雲平野で越冬する個体群の亜種は不明とされてきた。本研究では、4ヶ所の越冬地（宮城県・化女沼、新潟県・朝日池、福井県・坂井平野、島根県・出雲平野）で脱落羽毛を採集し、ミトコンドリア DNA・制御領域の塩基配列を決定して、先行研究と比較した。その結果、化女沼の試料はすべて亜種ヒシクイなどの系統に、朝日池の試料はすべてオオヒシクイの系統に含まれ、形態学的観点からの亜種区分を支持する結果となった。一方、亜種不明とされてきた出雲平野の試料は遺伝的にはすべてオオヒシクイの系統に含まれ、また、従来亜種ヒシクイが殆ど確認されていなかった坂井平野でも亜種ヒシクイの系統に含まれる試料が認められた。

引用文献

- Baba Y, Fujimaki Y, Klaus S, Butorina O, Drovetskii S & Koike H (2002) Molecular population phylogeny of the hazel grouse *Bonasa bonasia* in East Asia inferred from mitochondrial control-region sequences. *Wildl. Biol.* **8**: 251–259.
- Barnes I, Young JPW & Dobney KM (2000) DNA-based identification of goose species from two archaeological sites in Lincolnshire. *J. Archaeol. Sci.* **27**: 91–100.
- Delacour J (1954) *The waterfowl of the world. Vol. 1. Country life*, London.
- Eda M, Kawakami K, Chiba H, Suzuki H, Horikoshi K & Koike H (2008) Genetic characteristics of the Black-footed Albatross *Diomedea nigripes* on the Bonin Islands and their implications for the species' demographic history and population structure. *Ornithol. Sci.* **7**: 109–116.
- 福井県 (2002) 福井県の絶滅のおそれのある野生動物 福井県レッドデータブック（動物編）。（オンライン），入手先 <<http://www.erc.pref.fukui.jp/gbank/rdb/rdbdata/bir027.html>>。（参照 2010-03-19）。
- del Hoyo J, Elliott A & Sargatal J (eds.) (1992) *Handbook of the Birds of the world. Vol. 1*. Lynx Editions, Barcelona.
- Kear J (2005) *Ducks, Geese and Swans. Volume 1*. Oxford University press, Oxford.
- 呉地正行・横田義雄・大津真理子 (1983) ヒシクイ *Anser fabalis serratirostris* とオオヒシクイ *A. f. middendorffii* の野外識別についての考察. 鳥 **32**: 95–104.
- 宮林泰彦 (1994) ガン類渡来地目録. 第1版. 雁を保護する会, 若柳.
- Ruokonen M, Litvin K & Aarvak T (2008) Taxonomy of the bean goose-pink-footed goose. *Mol. Phylogen. Evol.* **48**: 554–562.
- 佐藤仁志 (1985) 宍道湖の自然. 山陰中央新報社, 松江.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596–1599.
- Templeton AR, Crandall KA & Sing CF (1992) A cladistic-analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and dna-sequence data. 3. cladogram estimation. *Genetics* **132**: 619–633.