分子生物学的手法の鳥類保全への応用

永 田 尚 志

国立環境研究所・地球環境研究グループ・野生生物保全研究チーム
〒305-0053 茨城県つくば市小野川16-2

The Applications of Molecular Techniques to Avian Biological Conservation

Hisashi NAGATA

*Laboratory of Wildlife Conservation, Global Environmental Research Division,
National Institute for Environmental Studies (NIES)
Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305-0053, Japan*

Human activities resulting from habitat loss and fragmentation have seriously threatened many birds and other fauna to the point of extinction. Almost 20% of bird species were categorized as either endangered or 'nearly threatened' species in 1996 IUCN Red data list. Recent advances in molecular techniques provide us with many tools appropriate to conservation in addition to the field of population biology. Allozyme analysis, DNA sequencing, minisatellite, microsatellite, and random amplified polymorphic DNA (RAPD) procedures enable us to identify parentage, pedigree, founder and bottleneck effects, population structure, effective population size, phylogenetic relationships among populations, as well as gene flow within and between populations. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of small amounts of DNA (nanogram), enable us to analyse genetic profiles without harming endangered birds. They also provide us with sophisticated techniques for analysis of metapopulation structure, hybridization, phylogenetic relationship within and between populations. All information regarding genetic population structure is important for the conservation of endangered bird species. In this review, I highlight the role of molecular techniques for studying bird population structures and for the effective planning of bird conservation strategies. Detailed knowledge of the relationship between genetic variation, environmental factors and fitness are all necessary if bird populations are to be successfully conserved.

Key Words: Avian conservation, Conservation genetics, Molecular techniques, Population structure

人間活動による生息地の分断化や消失によって、生物多様性が地球規模で消失の危機に曝されている。過去400年間に108種類の鳥類が絶滅し、現存している鳥類種の約11%にあたる1107種類もが絶滅危惧種に分類され、約9%にあたる952種が絶滅危惧種の予備軍にあたる保全依存種または準絶滅危惧種に分類されている(IUCN 1996)。日本国内においても14種類がすでに絶滅し、90種もの鳥類が絶滅危惧種に分類されている(環境庁自然保

護局 1998). このままの人間活動を続ければ、大量の生物種が地球上から姿を消してしまうのは時間の問題である。種や個体群を絶滅に追い込んでいる要因を診断し、その要因を取り除き、絶滅を防ぐための実践的理論を構築する保全生物学という新しい学問分野が形成されたのは1980年代のことであった。その後、多くの教科書が出版され (Frankel & Soule 1981, Soule 1986, Primack 1993, Meffe & Carroll 1994, Caughley & Gunn 1996), 日本国内でも遅ればせながら1990年代中ごろになって相次いで教科書が出版されている (樋口 1996, 鷲谷・矢原 1996)。以前は、実験個体群や理論的にしか扱えなかった遺伝的問題が、最近の分子生物学的手法の発達により、実際の野外個体群において遺伝的形質を特定できるようになったため、個体群保全における遺伝的な重要性が認識されるようになり、1990年代になり保全遺伝学の教科書が相次いで出版された (Loeschcke *et al.* 1994, Avise & Hamrick 1995, Smith & Wayne 1996)。保全遺伝学では、遺伝的多様性が個体群の存続期間に及ぼす影響や、人為的導入種との移入交雑による固有 (亜) 種の消失のような遺伝的要因による種や個体群の絶滅の問題を取り扱っている。

個体数の減少によって生じる人口学的確率性、開発による生息環境の悪化などの環境要因、および近交弱勢や遺伝的多様性の減少による繁殖力の低下などの遺伝的要因は、複雑に絡み合って個体群や種の存続に影響を与える。そのため、遺伝的多様性を維持することが、種や個体群の存続にとって十分条件ではないけれども、必要条件であり重要である。大規模な開発により生息地そのものが消失してしまうような危機的状況においては、遺伝的多様性の保持のような個体群の長期的な維持を目的にすることは悠長すぎるかもしれない。しかし、分子生物学的手法は、個体群の遺伝的多様性を維持するような長期的保全計画や種の回復計画における初期の人口学的問題を明らかにするのに有効な道具である。まず、種や亜種など保全の分類単位を同定するのに大きな力を発揮する。つぎに、個体群間の遺伝的分化の程度を解明することにより、保全を必要としている個体群を特定できる。さらに、個体群構造を明らかにすることにより、回復計画の早い段階から個体群の管理計画を適切に立てることが可能になる。ここでは、鳥類の保全に役立つ分子生物学的手法や保全遺伝学の概要について簡単に紹介し、応用可能な分野について総説する。この小文が、鳥類の保全において分子生物学的手法を利用する際の有効なマニュアルになることを期待する。

分子生物学的手法

近年の生化学的手法の急速な発達によって分子生物学的手法を集団生物学や野生生物の保全へ利用することが可能になった。集団生物学や保全生物学に利用される分子生物学的な遺伝子マーカーとして使用されるのは、DNA から翻訳された酵素などのタンパク質のサイズ多型や核やミトコンドリアにある DNA そのものである (Table 1)。電気泳動法が発達した1950年代に、アロザイム酵素多型をもちいた集団の遺伝的な解析は確立し、多くの分類群で研究が行なわれた (Evans 1987)。電気泳動法で分子量の異なるバンドとして表せるタンパク質の遺伝子座がアロザイムである。しかし、対立遺伝子数が少なく多型を持つ遺伝子座が少ないこと、組織試料が必要で野外での長期保存が容易でなかったため、他の分類群に比べて鳥類ではあまり研究されなかった (Parker *et al.* 1998)。一方、

Table 1. A comparison of the characteristics of each molecular technique and appropriate techniques for studies involving parentage and population structure
表 1. 各分子生物学的手法の比較と目的別適性

分子生物学的手法	the manner of inheritance 遺伝様式	Genetic variation 遺伝的変異	genomic specificity ゲノム特異性	Risk of anomalous result 結果の信頼性	Ease of scoring 遺伝子型の判別	Phylogenetic distinction 系統解析	Hybridization 種間交雑	Parentage 親子判定	Population structure 個体群構造
Allozyme アロザイム	Mendelian メンデル遺伝	low 少ない	from plant to humans なし	low-moderate 中～高	easy-moderate 易～中	◎	○	△	▲
RAPD	Mendelian メンデル遺伝	Moderate ? 中程度 ?	from plant to humans なし	high 低い	difficult 難	△	×	×	▲
RFLP : nDNA 制限断片長変異 : 核DNA	Mendelian メンデル遺伝	sufficeint variation 充分	種一属 ? species-genus ?	low 高い	easy 易	△	○	△	○
RFLP : mtDNA 制限断片長変異 : mtDNA	Maternal 母系遺伝	low 少ない	種一属 ? species-genus ?	low 高い	easy 易	△	○	×	○
VNTR : Multilocus Minisatellite 繰返し数変異 : ミニサテライト	Mendelian メンデル遺伝	high 多い	from plant to humans なし	low-moderate 中～高	moderate-difficult 中～難	△	○	◎	○
VNTR : Microsatellite 繰返し数変異 : マイクロサテライト	Mendelian メンデル遺伝	high 多い	種一目 ? species-order ?	low-moderate 中～高	easy-moderate 易～中	△	○	◎	▲
DNA Sequence DNA塩基配列	—	depending on loci 遺伝子座による	種一属 ? species-genus ?	low 高い	easy 易	◎	○	×	◎

×: inappropriate; △: fair; ○: good; ▲: fairly good under some conditions; ◎: excellent (×: 不適; △: 可; ○: 良; ▲: 条件により良; ◎: 優)
modified from Westneat & Webster (1994), Mace *et al.* (1996), and Parker *et al.* (1998)

DNA はタンパク質に比べて安定した物質であり、野外でも適当な保存液を準備すれば常温で長期間保存可能なこと、鳥類では赤血球に核が存在するため微量の血液から採取できるため、対象個体を殺さずに採取できる利点がある (Seutin *et al.* 1991, Parker *et al.* 1998). ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 装置の発明と自動塩基配列読取装置 (オートシーケンサー) の発達で、生化学の技術に熟練していないフィールド研究者にも DNA 解析ができるようになった (Haig 1998, Parker *et al.* 1998). DNA には、細胞内器官であるミトコンドリアが持っていて母親からのみに伝わる mtDNA と核内にあり両親から半分の設定が子に伝わる核 DNA の 2 種類がある。

DNA を遺伝子マーカーとして用いる際、DNA 断片長やタンデムリピートの繰返し数を間接的に遺伝情報として用いる方法と直接 DNA 塩基配列を読み取る方法がある。RAPD (random amplified polymorphic DNA) や制限断片長変異 (RFLP: restriction fragment length polymorphism) は、無作為に合成された DNA 断片や制限酵素で切られた DNA 断片の長さを遺伝子マーカーとして利用している。また、Jeffreys *et al.* (1985) により、生物の DNA 塩基配列中にタンパク質に翻訳されないタンデムリピートとよばれる数十塩基の繰返し配列 (ミニサテライト) が発見され、この反復数が個体によって大きく異なり、選択的に中立な部位であることから、ミニサテライト部位が集団や個体群構造の解析に頻繁に利用されるようになった。ひとつの繰返し配列の長さが 10-60 塩基対のものをミニサテライト、2-6 塩基対の短い繰返し配列をマイクロサテライトとよび、DNA 上の特定の場所のタンデムリピートの繰返し数の変異 (VNTR: variable number of tandem repeat) を遺伝子マーカーとして利用している。オートシーケンサーを用いて、特定の場所の DNA 塩基配列 (DNA sequence) を読み取り利用するのが最も情報のロスが少ないが、問題点もある (後述)。各マーカーの生化学的解析手法や原理についての詳しい説明は石田 (1996) と西海 (1997) を参照してほしい。集団生物学的解析において遺伝的マーカーとして用いられるのは、アロザイム多型、核 DNA および mtDNA の制限断片長変異 (RFLP)、マイクロサテライトやミニサテライトとよばれる核 DNA のタンデムリピート数の変異 (VNTR)、および mtDNA の塩基配列である。

個々の遺伝子マーカーにはそれぞれ長所と短所がある (Table 1)。アロザイムは、多型がある遺伝子座の場合は、集団の遺伝的構造の解析には適している。マルチローカスミニサテライト遺伝子座などの制限断片長変異 (RFLP) や RAPD 法は、複数の塩基配列の断片長変異であるため、集団間の類似性を調べるのには適しているが、対立遺伝子を特定することはできない。また、RAPD 法ではバンドパターンの出現が実験条件に依存するため結果の再現性は低い。特定のプライマーが必要ないため、短時間に簡単に解析できる利点がある (石田 1996)。mtDNA は母系遺伝をするので、雄の寄与は全くないため、親子関係の判定や家系解析にはあまり役に立たない。ただし、鳥類では主に雌が個体群間を分散するので (Greenwood 1987)、遺伝子交流など集団間の遺伝的構造を調べるのに適している。核 DNA は、マイクロサテライトやミニサテライトなどの繰返し配列をたくさん含み、メンデル遺伝をするため、親子判定や家系解析に適している。また、対立遺伝子数が数個程度のマイクロサテライト遺伝子座は、個体群構造の解析に最適である。一方、対立遺伝子数が多く希な対立遺伝子を含むマイクロサテライト遺伝子座は、個体群解析にはむかないが、親子判定には最適である。DNA 塩基配列の決定は、処理時間が長く

分析費用が高いのが欠点だが、情報量が多く最も細かい遺伝構造の解析が可能である。

分子生物学的手法ごとにかかる分析コストを Table 2 に示した。アロザイム分析は、比較的短時間で解析でき、電気泳動装置さえあれば可能であるので、初期投資が少なくすむうえ、1 サンプルあたりの分析費用も安い。しかし、組織標本が必要であるうえに遺伝的変異が少ないため、希少種の遺伝的解析にはむかない。DNA を遺伝子マーカーとして利用する有利な点は、羽毛1枚や数 μ l の血液等、微量のサンプルさえあれば、PCR 法により増幅して解析できる点である。しかし、DNA 分析はアロザイム分析に比べると習熟が必要であり、薬品が高価なので分析費用は高くなる。RAPD やマイクロサテライト遺伝子座の解析では、いったんルーチン化してしまえば、ランニングコストはそれほどかからないが、PCR 装置など百万円程度の初期投資が必要である。RFLP 法では、特定の部位で DNA を切断する制限酵素が必要なため、分析費用が高くなる。また、RFLP 法は、PCR 法を使わないので、RAPD やマイクロサテライト解析に比べて多量の試料が必要になり、分析に長い時間を要する。mtDNA などの塩基配列の解析は、薬品類が高価で分析費用がさらにかかるうえに、一千万円近くもするオートシーケンサーが必要である (Westneat & Webster 1994, Parker *et al.* 1998)。

Table 2. A comparison of the expense and time consumption of each molecular techniquer to analyze DNA profiles.

表 2. 各分子生物学的手法の分析に要するコスト

分子生物学的手法	Development time 開発に要する時間	processing time per sample 解析に要する時間	Equipment 解析装置の値段	Oppering supplies cost 試料の分析費用	The number of samples in a year 1年間に処理可能な試料
Allozyme アロザイム	2-4 weeks (2~4週間)	2 days (2日)	Cheap (~10万円)	Cheap 安い(数百円)	Several thousands 数千
RAPD	1-2 weeks (1~2週間)	1 week (1週間)	Moderate (~100万円)	Cheap 安い(数百円)	~10000
RFLP 制限断片長変異	1-4 months (1~4カ月)	2-4 weeks (2~4週間)	Moderate (~100万円)	Moderate 中程度(千円未満)	~1000
Minisatellite ミニサテライト	1-3 months (1~3カ月)	2-4 weeks (2~4週間)	Moderate (~100万円)	Moderate 中程度(千円未満)	~1000
Microsatellite マイクロサテライト	2-6 months (2~6カ月)	1 week (1週間)	Moderate (~100万円)	Cheap 安い(数百円)	~10000
DNA Sequence DNA塩基配列	1-3 months (1~3カ月)	2-4 week (2~4週間)	The most expensive (~1000万円)	Expensive 高い(数千円)	~2500

modified from Westneat & Webster (1994) and Parker *et al.* (1998)

PCR 法によって DNA の特定の部位を増幅する際には、プライマーと呼ばれる DNA 断片が必要である。マイクロサテライト多型解析や DNA 塩基配列の解析に必要な最新のプライマーの情報は、国立遺伝研究所 (1999) およびアメリカの国立衛生研究所 (NIH 1999) において検索が可能である。

保全遺伝学

アメリカ大陸の絶滅危惧鳥類の個体数減少の最も大きな原因は、大陸においても島嶼においても開発による生息地の消失である (Collar *et al.* 1992). 生息地が消失するにつれて生息できる個体数が減少すると同時に、生息地の分断化がおり、分集団が次々に消失していき、最終的に残った最後の集団が消失したときに、種の絶滅が起こる (Fig. 1). 有効集団サイズを N_e としたとき、個体群中に保持されているヘテロ接合度は、1 世代あたり $1/2N_e$ の割合で減少していくので、1 世代後のヘテロ接合率の減少率 ΔH は、

$$\Delta H = \frac{1}{2N_e} \quad (\text{式 1})$$

となる。最初のヘテロ接合率を H_0 とすれば、 t 世代後のヘテロ接合度 H_t は次の式で求められる。

$$H_t = H_0 \cdot \left(1 - \frac{1}{2N_0}\right) \cdot \left(1 - \frac{1}{2N_1}\right) \cdots \left(1 - \frac{1}{2N_t}\right) = H_0 \cdot \prod_{i=0}^t \left(1 - \frac{1}{2N_i}\right) \quad (\text{式 2})$$

式 2 から明らかなように、集団サイズが小さくなるほどヘテロ接合度が急速に失われてしまい、いったん集団サイズが小さくなると個体群が回復しても減少した多様性は回復しない。たとえば、有効集団サイズ 500 個体のときは、ヘテロ接合度は世代当たり 0.1% しか減少しないが、ある世代に有効集団サイズが 10 個体まで減少したとすると 5% ものヘテロ接合度が減少してしまう。このように個体数が減少するにつれて、遺伝的浮動の効果が大

図1 ハビタットの減少による絶滅プロセスと小集団化が絶滅に影響を与える様々な要因
Fig. 1. Species extinction resulting from habitat loss, fragmentation, and reduced population size.

きくなり遺伝的多様性は急速に失われる (Frankel & Soulé 1981, 鷲谷・矢原 1996). 実際, いろいろな動物種の個体群サイズとヘテロ接合率は正の相関関係を示し, 個体群サイズが小さくなるとホモ接合が増加している (Fig. 2) (Soulé 1976, Frankham 1996). 対立遺伝子の多様性の減少によって環境変動や病気への抵抗力をもつ遺伝子を失うばかり

図2 個体群サイズ ($\log N$) とヘテロ接合度 (H') の関係

Fig. 2. The correlation between heterozygosity (H') and population size ($\log$ -transformed N) for animal species. (after Soulé 1976)

でなく, ホモ接合の増加により集団中に保持されている有害遺伝子が発現したり, 超優性遺伝子の効果がなくなるため, 個体群の生存力は低下する (Crow & Kimura 1970). また, 個体数の減少は人口学的確率性による絶滅の危険性を大きくする. 10円硬貨をほうり投げて表が出る確率は $1/2$ であるが, 100回の試行で, すべてが表または裏になることはほとんど起こらない ($1.57 \times 10^{-28}\%$). しかし, 3回の試行ならば, すべてが表または裏になることが25%の確率で生じる. 同様に, 個体数が減少すると, 平均の性比が $1:1$ の鳥類であっても偶然により難の性比がどちらかに偏ってしまい絶滅する確率が生じやすくなる. 遺伝的浮動や人口学的確率性による絶滅の危険性の増大に加えて, カタストロフィックな天変地異が起これば小集団は簡単に絶滅してしまう (Fig. 1). すなわち個体群が小さくなることによって遺伝的浮動, 人口学的確率性, 環境の確率性などが相互に悪影響を及ぼしあって, 絶滅の可能性がより大きくなる (Primack 1993, Meffe & Carroll 1994, Caughley & Gunn 1996).

分子生物学的手法を用いた保全遺伝学に期待されているのは, 自然個体群がお互い遺伝的にどのくらい異なるのか, もし個体群の遺伝的多様性が減少しているとすれば, 近親交

配によるものなのか、過去の急激な個体数の減少（ボトルネック効果）によるものなのかを明らかにし、当該の個体群が本当に環境変動に対して絶滅しやすい状態にあるのかに答えを出すことである。保全遺伝学で主に扱うのは、分断化や小集団化でおこる遺伝的多様性の減少や個体群間の遺伝子交流の程度、種の境界と種間交雑の程度、個体の親子関係と近縁度などの問題である（Avise 1996）。分子生物学的手法を用いることにより、各個体のもつ個々の対立遺伝子を特定できるため、多型遺伝子座の割合 P 、多型遺伝子座あたりの平均対立遺伝子数 AP 、遺伝子座当たりの平均対立遺伝子数 A 、有効対立遺伝子数 A_e 、ヘテロ接合をしている遺伝子座の割合 H_e などが、種内および個体群内の遺伝的多様性を表す尺度として用いられる。個体群間の遺伝子頻度の類似度 I から個体群間の遺伝的距離 D が、遺伝子頻度の個体群間の分散 F_{st} から個体群間の間接的な遺伝子交流 Nm がもとめられる（付表）。その詳細は、Avise & Hamrick (1995) と Nei (1987) を参照してもらいたい。

分子生物学的手法の応用分野

1) 個体群や種の同定

実際に種や個体群の保護策をたてる際に、まず行なわなければならないのは、保全すべき種、亜種、個体群の定義である。保全の単位として適当なのは、分類種（生物種）ではなく、系統種である。現存の約9000種を系統種で分類しなおすとすれば、2万種になると推定されている（Martin 1996）。系統種の識別には、分子生物学的手法が必要不可欠である。また、個体群が存続できないくらい個体数が減少したときに、どの個体群をひとつにまとめて保全すべきか、どの個体群から個体を補充すべきかという議論において、分子生物学的証拠が明快な指針を与えてくれる。また、投入できる保全努力に制限があるとすれば、分子生物学的手法から得られた系統樹を用いて、進化遺伝学的にもっとも対象分類群に貢献している種を選択して保全すべきであるという議論がされている（Krajewski 1994）。

Tarr & Fleischer (1993) は、ユミハシハワIMITSUス属の2つのアマキヒ種群（Amakihi complex）*Hemigrathus virens* のmtDNAを解析した結果、*H. v. chloris* と *H. v. stejnegeri* は別種であり、個別の保全策をたてるべきであることを明らかにした。また、フロリダの一部にのみ生息していたクロハマヒメドリ *Ammodramus maritimus nigrescens* は、形態的にハマヒメドリ *A. maritimus* と異なっていたため別種とされたり亜種と分類されたりしていたが、絶滅後のmtDNA解析の結果、クロハマヒメドリはハマヒメドリの大西洋岸型と同一の遺伝子型を持っていることがわかり、同種であることが確認された（Avise & Nelson 1989）。1980年にクロハマヒメドリは飼育下の5羽の雄しか生存していなかったが、ハマヒメドリの子メキシコ湾岸亜種の雌との亜種間交配で雌を得た後に、戻し交配を繰り返し、クロハマヒメドリを復活する計画が開始された。残念ながら、クロハマヒメドリの子メキシコ湾岸亜種の雌を87.5%持つ雑種を得た1987年に、最後の雄1羽が死んでしまい、復活プログラムは失敗した。この例では、異なった遺伝子型の亜種が交配相手に選ばれたことが失敗の原因のひとつであり、同じ遺伝子型の亜種を選ぶべきであったと指摘されている（Zink & Kale 1995）。

2) 種間交雑：遺伝子汚染の問題

鳥類では、野外においても種間交雑が頻繁に生じ、約10%の種で捻性のある種間雑種ができるといわれている (Grant & Grant 1992). とくに、陸ガモ類のマガモ (*Anas*) 属では、種間交雑を避けるしくみが求愛ディスプレイのみであるため種間雑種が生じやすい (Lack 1974). 人為的に世界中の湖や池に導入されたマガモ *Anas platyrhynchos* が、その地域の固有の *Anas* 属のカモと交雑を起こしている. アロザイム分析の結果、オアフ島ではマガモとの交雑が進んだ結果、ハワイガモ *A. wyvilliana* 独自の対立遺伝子が消滅してしまい、純粋なハワイガモはほとんどいない (Browne *et al.* 1993). また、mtDNA の解析の結果、ニュージーランドのマミジログアモ *A. superciliosa* でも、純粋な個体は南島の一部にほんの5%ほど残っているにすぎない (Rhymer *et al.* 1994). 北米からヨーロッパに導入されたアカオタテガモ *Oxyura jamaicensis* も、在来種のカオジロオタテガモ *O. leucocephala* と種間交雑を行ない、在来種への影響が大きくなったため、アカオタテガモと雑種個体の駆除が行なわれている (Williamson 1996). 最近、ニシアメリカフクロウ *Strix occidentalis* とアメリカフクロウ *S. varia* の種間交雑も問題になっている (Harmer *et al.* 1994). 分子生物学的研究は始まったばかりであり、脊椎動物以外では研究例が少なく、人為的導入種と在来種との交雑があまり問題になっていないが、今後、増えてくると考えられる (Haig 1998).

3) 性判定

鳥類では外見上雌雄の区別がつかない種も多いが、最近、Ellegren (1996) によって走鳥類を除くほとんどの種で利用可能な W 染色体上の遺伝子マーカーが発見され、容易に性判定ができるようになった. アオコンゴウインコ *Cyanopsitta spixii* は、1995年現在、飼育個体を含めて32羽が生存しているが、野外には性別不明の1羽が生存していただけであった. この野外個体の換羽で脱落した羽からDNAを抽出し性判定を行なったところ、雄と判定されたので、すぐに雌が放たれた (Griffiths & Tiwari 1995). この例のように、DNAを使った性判定は、飼育下でつがい形成を行なう時や (Murata *et al.* 1998)、希少種の野外個体群に適切な個体を導入する際に役に立つと考えられる.

4) 家系および近縁度の解析

分子生物学的手法のもっとも大きな貢献は、社会生物学や行動生態学の分野において実際の親子関係が判定できるようになったことである (Westneat & Webster 1994). 遺伝子マーカーをもちいた個体識別ができるようになったことで、一夫一妻の種が9割を占めると考えられていた鳥類でも婚外授精が普通にみられることが明らかになった (Birkhead & Møller 1992). 希少鳥類を飼育下で繁殖させて個体群を維持する際には、飼育個体群の親子関係を完全に把握することにより、近親交配をさけ、飼育個体群の遺伝的多様性を維持する必要である.

ホオアカトキ *Geronticus eremita* は、16-17世紀には中央ヨーロッパ、北アフリカ、中近東に広く分布していた. ヨーロッパでは狩猟圧と農業によって個体数が激減し、1989年にトルコで最後の個体が死亡したことにより、ヨーロッパの野外個体群は絶滅した. 現在、野外では、アフリカ北西部モロッコには200羽ほどが生息し、北イエメンで1989年に9羽、

サウジアラビアで最近24羽が見つっているだけである。しかし、IUCNの飼育下繁殖専門家グループの協力でケージ内飼育が成功し、現在、800羽ほどの飼育個体群が存在している (Cramp 1977)。Signer *et al.* (1994) は、チューリッヒ動物園の家系がわかっている39羽の飼育個体をミニサテライト DNA を用いて家系分析を行った。その結果、分子生物学的手法と飼育記録による家系分析の結果が一致し、分子生物学的手法が飼育個体間の近縁度を知り、個体群の遺伝的変異を調べる強力な道具となることが証明された。

グアム島では、第2次世界大戦中に侵入したナンヨウオオガシラ *Boiga irregularis* というヘビにより、11種の固有種のうち7種までが絶滅してしまった (Savidge 1987)。アメリカ野生生物局は、1984年に野外に残っていた21羽のグアムクイナ *Rallus owstoni* と、29羽のズアカショウビン *Halcyon cinnamomina cinnamomina* を全個体捕獲し、飼育下での増殖を開始した。アロザイムとミニサテライト DNA を用いて捕獲された個体の近縁度を解析し (Haig & Ballou 1995)、近親交配による遺伝的多様性の減少が生じないように注意深く繁殖プログラムが組まれた。その結果、グアムクイナでは最初に捕獲した21個体の持っていた遺伝的多様性の89%が維持されている。グアムクイナの増殖は成功し、個体数が190羽までに回復したため、1994年に一部をナンヨウオオガシラのいないロタ島に再導入し、野外個体群を確立した。再導入する個体は、コンピュータによる遺伝子座追跡シミュレーションを用いて、遺伝的多様性を維持できるように注意深く選ばれた (Haig *et al.* 1990)。1995年にロタ島に導入された個体の繁殖が最初に確認され、すこしづつではあるが個体数を回復しつつある (AZA Species Survival Plan 1998)。

5) 個体群構造の解析

分子生物学的手法を用いた DNA マーカーがもっとも威力を発揮するのは、個体群間および個体群内の集団構造の解析においてである (Barrowclough & Gutierrez 1990, Haig *et al.* 1993, Haig *et al.* 1994, Fleischer *et al.* 1995, Haig *et al.* 1996)。各遺伝子座の対立遺伝子頻度の個体群間の共有率の情報をを用いて集団間の遺伝的な距離、有効集団サイズ、移出入率を推定することが可能になる。マルチローカスミニサテライト DNA を使った RFLP 解析においては、遺伝子座を特定することはできないので、バンドの共有率を使った個体群構造の解析が行なわれた。Haig & Avise (1996) は、絶滅危惧種ではバンドの共有率が高く、絶滅の危険がない種に比べて遺伝的な類似度が高いことを指摘している (Fig. 3)。

まず、ミニサテライト DNA マーカーを用いた個体群構造の解析例を2つ紹介する。現在、北欧に生息している3~5万羽のカナダガン *Branta canadensis* は、1930年代に移入された5羽から増えたものである。5羽のうち、4羽はドイツのハーゲンベック動物園で飼育されていた個体で、1羽が北米から輸入されたものである。ミニサテライト DNA を用いた解析で、北欧のカナダガンはバンドの共有率が高く、最初に導入された5羽の個体が近親交配をくりかえして生じた個体群で、他からの個体の移入がなかったことを示していた (Fig. 4; Tegelström & Sjöberg 1995)。

アオガモ *Hymenolaimus malacorhynchos* は、ニュージーランドの溪流にのみ生息する希少種で、かつてはニュージーランド全土に広く分布していたが、森林が農地や牧草地に変わっていくにしたがって減少し、現在では、分断化された小さな個体群のみになってい

図3 絶滅危惧種と普通種のミニサテライトDNAのバンド共有度の頻度分布

Fig. 3. A frequency distribution of mean band sharing coefficients (DNA similarity) for non-endangered and endangered bird species. Band sharing coefficient were calculating as the number of shared band divided by the total number of bands from conspecific individuals. (after Haig & Avise 1996)

図4 ガン類の種間および地域間のバンド共有度。図中の縦棒は標準偏差 (SD) を示している
Fig. 4. The mean band sharing coefficients among different species of geese on different geographic scale. Vertical bars show SD. (modified after Tegelström & Sjöberg 1995)

る。標識個体の追跡調査では、河川間の分散は少なく、ほとんどの個体が出生地の近隣に定着していた (Williams 1991)。このアオガモの個体群構造をミニサテライト DNA を用いて解析したところ、河川流域内ではバンドの共有率が高く遺伝的交流が認められるが、地域間ではバンドの共有率が低くほとんど移動分散がなく、隣り合った河川間で少しの遺伝的交流があることが推定された (Fig. 5; Triggs *et al.* 1992)

次に、マイクロサテライト DNA を用いた個体群の遺伝的構造の解析として、レイサン

図5 アオガモの地域間の遺伝的類似性。図中の縦棒は標準偏差 (SD) を示し、横棒はカテゴリ間の比較を示し、アステリクスが統計上の有意水準を示す

Fig. 5. The mean band sharing coefficients within and between populations of Blue Duck in New Zealand. Vertical bars show SD, horizontal bars show comparisons between categories, and number of asterisks shows the statistical significance level (modified after Triggs *et al.* 1992)

ハワイマシコ *Telespiza cantans* の例を紹介する。マイクロサテライト DNA を用いた解析では、対立遺伝子を特定して記述すること (スコア化) が可能である。レイサンハワイマシコは、レイサン島にのみ生息し、1923年には100羽程度しか生存していなかったが、個体群は急速に回復して1968年に10,000羽程度になった。レイサンハワイマシコを保全するために、アメリカ野生生物局は1967年にレイサン島の約300km北西に位置する Pearl and Hermes 環礁の Southeast 島に108個体を導入し、新しい個体群を創設した (Fig. 6)。導入直後は30~50羽にまで減少したが、個体群は回復して500羽前後で安定した。また近くにある North 島と Grass 島にも自然に定着し増加した。これらの島のレイサンハワイマシコの遺伝的多様性を9種類のマイクロサテライト遺伝子座を用いて解析した結果、各遺伝子座で創始者効果と遺伝的浮動による遺伝子頻度の変化が生じていて、レイサン島の

図6 Pearl and Hermes 環礁に導入されたレイサンハワイマシコの2つの遺伝子座の対立遺伝子頻度 (右円: 遺伝子座 Tc11B1C, 左円: 遺伝子座 Tc12B5E). 破線矢印は, 導入後に Southeast 島から, 環礁内の North 島と Grass 島に自然に個体が定着した様子を示している

Fig. 6. A map of Pearl and Hermes reef, showing the colonization history of three finch populations, and geographic representation of allele frequencies for two microsatellite loci [Tc12B5E (left circles) and Tc11B1C(right circles)] in each population. A solid arrow shows introduction of birds from Laysan island, and broken arrows show migration within the reef. (modified after Tarr *et al* 1998)

遺伝的多様性をすべて保存することはできていなかった (Tarr *et al.* 1998). Pearl and Hermes 環礁の生息地の総面積は34haしかなく, 有効集団サイズが9~30個体と小さく, 遺伝的多様性の減少が避けられないため, 時々, レイサン島から個体を移入してやることで遺伝的多様性を保つ保全策が必要であると結論された. この例のように数個程度の対立遺伝子数を持つマイクロサテライト遺伝子座は, 過去に受けたボトルネック効果の程度や有効集団サイズを推定するには役に立ち, 遺伝的多様性の観点から個体群の保全策を検討するための強力な道具となる.

6) 個体の移動分散

個体の移動や分散を直接推定するために, 多くの研究者が繁殖調査で巣内雛や成鳥に足輪をつけて研究を行ってきた (Lebreton 1993). コロニーで繁殖する鳥類では, 複数のコロニーを集中的に調査すれば, コロニー間の移動を調べることが可能だが, 非コロニー性の鳥類では, 調査地以外への遠くへの分散は発見されにくくなる. このように, 標識調査では, 観察された分散と実際の分散の間には差が生じる (Crochet 1996). 分子生物学的手法を使えば間接的に個体群間の遺伝子交流を推定することが可能である (Edwards 1992). 個体群間の遺伝的変異の程度 F_{st} が得られれば, 1世代あたりの集団間の移動個

体数 (Nm) は次の式で算出される (Wright 1931).

$$Nm = \frac{1 - F_{ST}}{4F_{ST}}$$

レイサンハワイマシコの例 (Tarr *et al.* 1998) では, Southeast 島-North 島間の F_{ST} = 0.266 であるので 1 世代当たり 0.7 個体が移動分散し, 同様に Southeast 島-Grass 島間では F_{ST} = 0.150 であるので, 1 世代当たり 1.4 個体移動していると推定された. ただし, 注意しなければならないのは, 標識個体による直接推定と個体群間の遺伝子頻度から推定される移動分散の間接推定値とは, 時間的スケールが異なることである (Crochet 1996). 分子生物学的手法からの間接推定値は, 過去数十世代の平均有効分散個体数を示しているのに対し, 直接推定では, 短期間に観察された繁殖しなかった個体の分散を含むすべての分散個体数であることに留意する必要がある.

個体が供給源 (ソース) ハビタットから条件の悪いシンクハビタットへ供給されるような個体群構造を持つ場合, 対象種を保全するためにはソースハビタットを保護する必要がある. Dias *et al.* (1996) は, シングルローカスミニサテライト遺伝子座を使ってアオガラ *Parus caeruleus* のハビタット毎の対立遺伝子頻度を推定して, ハビタット間の遺伝的差異の程度からシンク・ソース個体群関係を判定した. シンク・ソース構造を持つ個体群では, 遺伝子流動はソース-シンク間 > ソース-ソース間 > シンク-シンク間の順に少なくなるので, 集団間の F_{ST} は逆にシンク・シンク間で一番大きくなった. また, シンクハビタットには, たえず新しい個体に移入してくるため, ハーディ・ワインベルグ平衡に達していないので連鎖不平衡が生じていた.

7) 渡りの経路や越冬地

繁殖地と越冬地間を長距離渡り, かつ広く分布している鳥種では, 個体群の繁殖地, 中継地および越冬地を特定することが困難である. マナヅル *Grus vipio* やオオワシ *Haliaeetus pelagicus* のような大型鳥類では, 人工衛星を使った追跡で渡りのルートを解明することも可能だが (Higuchi *et al.* 1994a, Higuchi *et al.* 1994b, Ueta *et al.* 1998), 小型の渡り鳥では発信器を装着することは不可能である. 繁殖地で大量標識して標識個体を追跡する方法が世界中で行われてきた (Lebreton 1993) が, 標識場所から分散して発見される個体は日本国内では全放鳥個体数のほんの 0.3% にすぎない (山階鳥類研究所 1997). 最近, 越冬個体群と繁殖個体群の遺伝的類似度や特定の個体群に特異的な遺伝的マーカーを使って, 繁殖地と越冬地を結びつける研究が行なわれている. Haig *et al.* (1997) は, 北アメリカ大陸のハマシギ *Charadrius alpina*, アメリカオオハシギ *Limosa haemastica* などの中・小型の渉禽類 10 種類を繁殖地, 渡りの中継地, 越冬地で捕獲し, 血液や組織から DNA を抽出し, RAPD 法で捕獲地間の遺伝的類似性を調べた. その結果, RAPD 法で得られた電気泳動のバンドパターンの類似性から, 渡りのルートや繁殖地と越冬地の関係を推定することができた. アメリカオオハシギとハマシギは, アラスカとノースウェストテリトリーのハドソン湾岸で繁殖し, ハマシギはカリフォルニアとメキシコ湾岸で越冬し, アメリカオオハシギはアルゼンチンで越冬する. 秋にサスカチュワン州を通過するアメリカオオハシギの個体群はマニトバ州のチャーチルからで

はなくマッケンジーデルタから来ていると考えられ、春にサスカチュワン州を通過するハマシギ個体群は、マニトバのチャーチルではなくアラスカのプルドー湾へ渡っていることが推測された (Fig. 7). また, Bensch & Hasselquist (1999) は, ヨーロッパで繁殖しているオオヨシキリ *Acrocephalus arundinaceus* の6つの繁殖個体群と1つの越冬個体群 (ケニア) で捕獲した106羽から血液を採取し, mtDNA のコントロール領域 (494塩基対) を解析した. その結果, 33種類の遺伝子型が発見され, 2つの系統群 (クレード) に分類された. 系統群 A と B の2群の塩基配列の違いは, 全配列の1.29%であり, 70,000年前に分かれたと考えられた. クレード B は, ヨーロッパ東部でのみみられ, その割合が東にいくにしたがって増加した (Fig. 8). また, ケニアではクレード B を持つ個体群しか越冬していず, ヨーロッパの東部と西部で繁殖する個体群の越冬地が異なることが推定された. ここで紹介した例のように, 分子生物学的手法を用いることによって, 渡り鳥の移動の経路や越冬地を推量することは可能である. 分子生物学的手法から得られた渡りの経路の推量の証明は, 実際に標識された個体が発見される必要がある. この作業も大変なことにはかわりないが, 全く予測できない経路から標識個体を探すよりは可能性が高いであろう. 渡り鳥の保全には, 繁殖地だけでなく中継地と越冬地の保護も重要である.

図7 北アメリカのシギ類の繁殖地, 越冬地 (下線), 中継地 (2重下線) の個体群の遺伝的距離から構築したデンドログラムとの採集地点の地図

Fig. 7. A distribution map of sampling sites and the results of a UPGMA cluster analysis for Rodger's genetic distance among breeding, migrant (double-underlined) and winter (underlined) populations of Hudsonian Godwit and Dunlin. (Modified after Haig *et al.* 1998)

図8 オオヨシキリの個体群毎のミトコンドリアDNAの遺伝子型の頻度の分布図

Fig. 8. A map showing the distribution and relative frequency of clade A (white) and clade B (Black) mtDNA haplotypes for the six European breeding populations and one Kenyan wintering population of the Great Reed Warbler. (after Bensch & Hasselquist 1999)

さいごに

この総説では、分子生物学的手法を用いて、保全すべき系統の特定、家系分析、集団内および集団間の遺伝的構造、集団の移動分散などが推定できることを紹介し、この手法がどのように鳥類の保全生物学に役立つ道具となりうるかを具体的に示した。どんな生物もいつかは必ず絶滅するので、保全生物学のゴールは、単に種を絶滅しないように保存することではなく、継続した進化が起ころうる条件下で自然界の種や群集を長期間保つことにある (Frankel & Soule 1981)。たくさんの遺伝的変異を持っている生物こそが絶えず変化し続ける環境に適応できるであろうから、個体群の長期間の存続のためには、遺伝的多様性が重要であると考えられる。これまで多く用いられてきたマイクロサテライトやミニサテライトとよばれる反復 DNA は、機能を持たない遺伝子であるため、自然選択上は中

立である。研究者は、暗黙のうちに中立な遺伝子座のふるまいと機能している遺伝子のふるまいに相関があり、中立な遺伝子座の多様性の減少によって適応度が減少することを期待している。鳥類においては、中立な遺伝子座の多様性の減少と適応度の関係を研究した例はほとんどない。今後、なるべく多くのマイクロサテライト遺伝子座を調べて個体あたりのヘテロ接合度の平均と適応度の関係および集団のヘテロ接合度と個体群の適応度の関係を明らかにする必要がある。免疫防御反応に影響を与える主要組織適合性抗原複合体(MHC)多型は、いろんな病原菌に対する抵抗性に直接に相関している(Hill 1991)。そのため、直接、集団の生存力を測定するにはMHC多型の変異と適応度の関係を研究するのが適当かもしれない。

分子生物学的手法を用いることによって、保全すべき集団の特定、移植候補個体群の同定、移植後の個体群の遺伝的モニタリング、飼育化個体群の遺伝的多様性の管理、個体群の遺伝的存続可能性の解析、渡りの経路の推定などが、鳥類の保全に応用できる。複数の分子生物学的手法を併用することにより、より精度の高い結論を得ることができるだろう。これらの分子生物学的手法で得られた情報は、野外での個体群生態学、行動生態学、および生理学的研究といっしょに使われたときに最も威力を発揮できるであろう。DNA解析は、分析費用が高く、ある程度の熟練が必要なため、多くの野外鳥類研究者にとってまだ敷居が高いかもしれないが、今後、分子生物学の技術革新によってもっと簡単に解析できるようになるであろう。分子生物学的手法を使った個体群の遺伝的構造の解析が鳥類の保全に大きく貢献することはまちがいない。

北九州で開催された鳥学会シンポジウムに招待し本稿を書く機会を与えていただき、本稿ができ上がるのを辛抱強く待っていただいたシンポジウム実行委員長の江口和洋博士に厚く御礼を申し上げる。また、本稿をまとめるにあたって、農業研究センターの吉田保志子氏および、2人の匿名の校閲者から草稿に対して適切な助言をいただいた。石田俊子氏には文献の収集と整理を手伝っていただいた。また、STAフェローとして国立環境研究所に滞在しているStewart Plaistow博士には英語をみていただいた。これらの方々に心より御礼申し上げる。

引用文献

- Awise, J. C., 1996 Introduction: The scope of conservation genetics, Awise J. C. and Hamrick J. L. (eds.) *Conservation Genetics-Case histories from nature*: 1-9, Chapman & Hall, New York.
- Awise, J. C., and Hamrick, J. L., 1995 *Conservation Genetics: Case history from nature*. Chapman and Hall, New York.
- Awise, J. C., and Nelson, W. S., 1989 Molecular genetic relationship of the extinct dusky seaside sparrow. *Science* **243**: 646-648.
- AZA Species Survival Plan, 1998. GUAM RAIL 98 Fact Sheet (9/1/98) . Guam. [news letter posted on the World Wide Web]. Retrieved September 1, 1998 from the World Wide Web: <http://aza.org/Programs/SSP/ssp.cfm?ssp=41>.
- Barrowclough, G. F. & Gutierrez, R. J., 1990 Genetic variation and differentiation in the spotted owl (*Strix occidentalis*). *Auk* **107**: 737-744.
- Bensch, S. & Hasselquist, D., 1999. Phylogeographic population structure of great reed warblers - an analysis of mt DNA control region. *Biol. J. Linn. Soc.* **66**: 171-185.
- Birkhead, T. R. & Møller, A. P., 1992. *Sperm competition in birds: Evolutionary cause*

- and consequences*. Academic press, London.
- Browne, R. A., Griffin, C. R., Chang, P. R., Hubley, M. & Martin, A. E. 1993. Genetic divergence among populations of the Hawaiian duck, Laysan Duck, and mallard. *Auk* **110**: 49-56.
- Caughley, G. & Gunn, A., 1996 *Conservation Biology in theory and practice*. Blackwell Science, Cambridge, Massachusetts.
- Collar, N. J., Gonzaga, L. P. & Krabbe, N. 1992 *Threatened birds of Americas*. ICBP, London.
- Cramp, S., 1987. *Handbook of the birds of Europe and the Middle East and North Africa. The birds of the western Palearctic. 1. Ostrich to Ducks.*, Oxford University Press, Oxford.
- Crochet, P. A., 1996 Can measures of gene flow help to evaluate bird dispersal? *Acta Oecol* **17**: 459-474.
- Crow, J. F., and Kimura, M. 1970 *An introduction to population genetic theory*. Harper and Row, New York.
- Dias, P. C., Verheyen, G. R. & M. Raymond, 1996 Source-sink populations in Mediterranean blue tits: Evidence using single-locus minisatellite probes. *J. Evol. Biol.* **9**: 965-978.
- Edwards, S. V., 1992 *Gene flow and mitochondrial DNA evolution in social babblers (Aves: Pomatostomus)*,. Ph. D. thesis, University of California at Berkeley.
- Ellegren, H., 1996 First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc. R. Soc. Lond. B* **263**: 1635-1641.
- Evans, P. G. H., 1987 Electrophoretic Variability of Gene Products, Cooke, F. & Buckley, P. A. (eds.) *Avian Genetics-A Population and Ecological Approach*: 105-162. Academic Press, London.
- Fleischer, R. C., Fuller G. & Ledig, D. B. 1995. Genetic structure of endangered clapper rail (*Rallus longirostris*) populations in Southern California. *Conserv. Biol.* **9**: 1234-1243.
- Frankel, O. H. & Soule, M. E. 1981 *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham, R., 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conserv. Biol.* **10**: 1500-1508.
- Grant, P. R. & Grant, B. R. 1992. Hybridization of bird species. *Science* **250**: 1394-1397.
- Greenwood, P. J., 1987. Inbreeding, philopatry, and optimal outbreeding in birds., Cooke, F. and Buckley, P. A. (eds.) *Avian genetics. A population and ecological approach*: 207-222, Academic Press, London.
- Griffiths, R. & Tiwari, B. 1995. Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature* **375**: 454.
- Haig, S. M., 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology* **79**: 413-425.
- Haig, S. M. & Avise, J. C. 1996. Avian conservation genetics, Avise, J. C. and Hamrick, J. L. (eds) *Conservation Genetics-Case histories from nature*-. 160-189. Chapman & Hall, New York.
- Haig, S. M., & Ballou, J. D. 1995. Genetic diversity in two avian species formerly endemic to Guam. *Auk* **112**: 445-455.
- Haig, S. M., Ballou, J. D. & Derrickson, S. R. 1990. Management options for preserving genetic diversity: Reintroduction of Guam Rails to the wild. *Conserv. Biol* **4**: 290-300.
- Haig, S. M., Belthoff, J. R. & Allen, D. H. 1993. Examination of population structure in red-cockaded woodpeckers using DNA profiles. *Evolution* **47**: 185-194.
- Haig, S. M., Bowman, R. & Mullins, T. D. 1996. Population structure of red-cockaded woodpeckers in south Florida: RAPDs revisited. *Mol. Ecol.* **5**: 725-734.
- Haig, S. M., Gratto-Trevor, C. L., Mullins, T. D. & Colwell, M. A. 1997. Population identification of western hemisphere shorebirds throughout the annual cycle. *Mol. Ecol.* **6**: 413-427.

- Haig, S. M., Rhymer, J. M. & Heckel, D. G. 1994. Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers *Picoides borealis*. *Mol. Ecol.* 3: 581-593.
- Harmer, T. E., Forsman, E. D. Fuchs, A. D. & Walters, M. L. 1994. Hybridization between Barred and Spotted Owls. *Auk* 111: 487-492.
- Higuchi, H., Nagendran, M. & Sorokin, A. G. 1994a. Satellite tracking of common cranes *Grus grus* migrating north from Keoladeo National park, India. Higuchi, H & Minton, J.. (eds) *The Future of Cranes and Wetlands*: 26-31, Wild Bird Society of Japan, Tokyo.
- Higuchi, H., Ozaki, K., Golvuskin, K., Goroshko, O., Krever, V., 1994b. The migration routes and important rest-sites of cranes satellite tracked from South-Central Russia. Higuchi, H. & Minton, J.. (eds) *The Future of Cranes and Wetlands*: 15-25, Wild Bird Society of Japan, Tokyo.
- 樋口広芳. 1996. 保全生物学. pp253. 東京大学出版会. 東京.
- Hill, A. V. S., 1991 HLA associations with malaria in Africa: some implications for MHC evolution., Klein, J. & Klein, D. (eds.), *Molecular evolution of the major histocompatibility complex*: 403-420. Springer Verlag, New York.
- 石田 健. 1996. 鳥類の生態研究における DNA 研究—系統と保全遺伝学を中心に—山階鳥研報 28: 51-80.
- IUCN, 1996. *The 1996 IUCN Red List of Threatened Animals*. IUCN, Gland, Switzerland.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. & Thein, S. L., 1985 Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- 環境庁自然保護局, 1998. レッドデータブック, 生物多様性情報システム. <http://www.biodic.go.jp/rdb/rdbf.html>
- 国立遺伝研究所, 1999. 日本 DNA データバンク, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcom-j.html>
- Krajewski, C., 1994. Phylogenetic measures of biodiversity: A comparison and critique. *Biol. Conserv.* 69: 33-39.
- Lack, D., 1974. *Evolution illustrated by waterfowl*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Lebreton, J.-D., 1993. *Marked Individuals in the study of bird population*. Birkhäuser, Basel/Switzerland.
- Loeschcke, V., Tmiuk, J. & Jain, S. K., 1994. *Conservation Genetics*. Birkhäuser, Basel/Switzerland.
- Mace, G. M., Smith, T. B., Bruford, M. W. & Wayne, R. K., 1996. An Overview of the Issues, Smith, T. B. & Wayne, R. K. (eds) *Molecular Genetics Approaches in Conservation*: 3-21. Oxford University Press, New York.
- Martin, G., 1996. Birds in double trouble. *Nature* 380: 666-667.
- Meffe, G. K. & Carroll, R. C., 1994. *Principle of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Murata, K., Itoh, Y. Ogawa, A. & Mizuno, S., 1998. Sexing the Oriental White Stork *Ciconia boyciana* by PCR using a single plucked feather as a source of DNA. *Jpn. J. Ornithol.* 46: 157-162.
- Nei, M., 1987 *Molecular Evolutionary Genetics*. Colimbia University Press, New York. 「邦訳: 根井正利, 1990. 分子進化遺伝学 (五条堀孝・斎藤成也共訳), p.433, 培風館, 東京」
- NIH, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 西海 功, 1997. DNA 多型分析の生態学への応用, pp.158-170. 山岸 哲編, 鳥類生態学入門: 観察と研究のしかた, 築地書館, 東京.
- Parker, P. G., Snow, A. A. Schug, M. D. Booton, G. C. & Fuerst, P. A., 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382.
- Primack, R. B., 1993. *Essential of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Rhymer, J. M., Williams, M. J. & Braun, M. J., 1994. Mitochondrial analysis of gene flow between New Zealand mallards (*Anas platyrhynchos*) and grey ducks (*A. superciliosa*). *Auk* **111**: 970-978.
- Savidge, J. A., 1987. Extinction of an island forest avifauna by an introduced snake. *Ecology* **68**: 660-668.
- Seutin, G., White, B. N. & Boag, P. T., 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can. J. Zool.* **69**: 82-90.
- Signer, E. N., Schmidt, C. R. & Jeffreys, A. J., 1994. DNA variability and parentage testing in captive Waldrapp ibises. *Mol. Ecol.* **3**: 291-300.
- Smith, T. B., & Wayne, R. K., 1996. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press, New York.
- Soule, M. E., 1976 Allozyme variation, its determinants in space and time., Ayala, F. J. (ed) *Molecular Evolution*: 60-77. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Soule, M. E., 1986. *Conservation Biology; The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tarr, C. L., Conant, S. & Fleischer, R. C., 1998. Founder events and variation at microsatellite loci in an insular passerine bird, the Laysan finch (*Telespiza cantans*). *Mol. Ecol.* **7**: 719-731.
- Tarr, C. L. & Fleischer, R. C., 1993. Mitochondrial DNA variation and evolutionary relationships in the 'Amakihi' complex. *Auk* **110**: 825-831.
- Tegelström, H., & Sjöberg, G., 1995. Introduced Swedish Canada geese (*Branta canadensis*) have low levels of genetic variation as revealed by DNA fingerprinting. *J. Evol. Biol.* **8**: 195-207.
- Triggs, S. J., Williams, M. J., Marshall, S. J. & Chambers, G. K., 1992. Genetic structure of blue duck (*Hymenolaimus malacorhynchos*) populations revealed by DNA fingerprinting. *Auk* **109**: 80-89.
- Ueta, M., Sato, F., Lobkov, E. G., & Mita, N., 1998 Migration route of White-tailed Sea Eagles *Haliaeetus albicilla* in northeastern Asia. *Ibis* **140**: 684-686.
- 鷺谷いずみ・矢原徹一. 1996. 保全生態学入門. p270. 文一総合出版. 東京.
- Westneat, D. F. & Webster, M. S., 1994 Molecular analysis of kinship in birds: Interesting questions and useful techniques, Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G. P. & DeSalle, R., (eds) *Molecular Ecology and Evolution Approaches and Applications*: 91-126, Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland.
- Williams, M., 1991 Social and demographic characteristics of Blue Duck, *Hymenolaimus malacorhynchos*. *Wildfowl* **42**: 65-86.
- Williamson, M., 1996. *Biological Invasion*. Chapman & Hall, London.
- Wright, S., 1931 Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**: 97-159.
- 山階鳥類研究所, 1997. 渡り鳥アトラス (スズメ目編1961年~1995年), 山階鳥類研究所, 我孫子.
- Zink, R. M. & Kale, H. W., 1995 Conservation genetics of the extinct dusky seaside sparrow *Ammodramus maritimus nigrescens*. *Biol. Conserv.* **74**: 69-71.

(1999年2月13日受付; 1999年4月7日受理)

付表：遺伝的多様性を計測する時に用いられる尺度

個体群内および種内の遺伝的多様性の尺度

P ：多型遺伝子座の割合

AP ：多型遺伝子座あたりの平均対立遺伝子数

A ：遺伝子座あたりの平均対立遺伝子数

A_e ：遺伝子座あたりの有効対立遺伝子数 ($1/\sum p_i^2$)

H_o ：個体当たりのヘテロ遺伝子座の割合

H_e ：ハーディ・ワインベルグ平衡時のヘテロ遺伝子座の割合の期待値 ($1 - \sum p_i^2$)

個体群間の遺伝的多様性の尺度

F_{ST} ：個体群間の遺伝子頻度の標準分散

$$F_{ST} = \frac{\sigma_p^2}{p_i(1-p_i)}$$

σ_p^2 ：対立遺伝子の個体群間の分散, $\bar{p}_i$ ： i 番目の対立遺伝子の平均頻度

F_{ST} は個々の遺伝子座および対立遺伝子ごとに計算される。

集団間の類似度および遺伝的距離

I ：遺伝的類似度 ($0 \leq I \leq 1$)

$$I = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$$

x_i, y_i , は, 集団 x, y 中での対応する i 番目の対立遺伝子の割合。

D ：遺伝的距離 $D = -\ln I$

S ：ロジャールの遺伝的距離

$$S = 1 - \frac{1}{\sqrt{\sum (x_i \cdot y_i)^2}}$$