DNAを利用した鳥類の系統解析と分類

梶 田 学

山階鳥類研究所第一研究室 〒270-1145 千葉県我孫子市高野山115

Avian Phylogeny Using DNA Analysis and Taxonomy

Manabu KAJITA

*The Yamashina Institute for Ornithology,
115 Konoyama, Abiko, Chiba 270-1145, Japan*

Advances in molecular techniques, particularly the development of DNA sequence determination, have led to an explosive increase in studies of avian phylogeny. To date, many of these studies have examined mitochondrial DNA (mtDNA) because it has many useful features for the study of the phylogeny of closely related taxa. Unfortunately, however, the use of mtDNA also has some problems since mitochondria are inherited maternally. Samples of blood, tissue, feather and even dried skin can be used as a source of DNA. DNA sequences are analysed in the order: extraction, amplification, sequence determination. Inferences about phylogenetic relationships from sequence data are made using an assortment of methods that include parsimony, maximum likelihood, and distance. The confidence levels of the resulting phylogenetic trees can be determined using statistical methods such as bootstrap. For the time being, it is not possible to delimit species solely on mtDNA information. There are many unsolved problems, and many fruitful areas for study in the phylogeny of Japanese birds. DNA analysis is a requisite method to solve these problems. Phylogenetic analysis using DNA sequencing will play a leading role in solving questions relating to avian evolution.

Key Words: DNA sequence, Evolution, Phylogeny, Taxonomy

1990年代の鳥類学における大きな変化のひとつとして、鳥類の系統研究にDNA分析の手法を利用することが一般化し、関連の研究事例が急激に増加した事を挙げることができる。DNAやこれにコードされたタンパク質などの分子情報から、生物の系統を推定する学問分野は「分子系統学」と呼ばれる(長谷川・岸野 1996, 長谷部 1996)。DNAなどの分子情報を用いた系統解析には、これまで系統解析に利用されてきた手法にはない利点が多くあり、そこから得られる成果は、鳥類の系統進化を考える上でなくてはならない情報になりつつある。その一方で、日本及びその周辺の鳥類には、分子系統学的手法を用

注：本文中で用いた鳥類の和名は基本的に日本鳥学会(1974)及び山階(1986)によった。

いて研究を行うべき課題が山積されている。しかし、国内における「鳥類分子系統学」の発達是非常に遅れており、日本鳥学会誌へのこの分野に関連した投稿は現在まで皆無である。しかし、今後、国内でも多くの鳥類研究者がこの興味深い分野の研究に着手するようになり、研究例も急速に増加すると推測される。本稿は1998年度日本鳥学会において催されたシンポジウム「鳥類学における DNA 研究」の中での著者の発表内容が基になっているが、「鳥類分子系統学的研究」に実際に着手する際、すぐに役立つ情報や研究に不可欠なサンプル採取・保存の方法及び日本における今後の研究課題などについて多くの内容を追加している。

系統を知る必要性

鳥類の各分類群の正確な系統関係を把握することは、それ自体がひとつの学問的興味の的ともなっているが、単にそれだけではなく鳥類の多様性と進化に関する全ての研究の基礎となるものである。求愛行動や囀りなどの行動形質、環境や食物選択などの生態形質、嘴の形状や羽色などの形態形質など、あらゆる形質の進化に関する考察を行うためには、ある1種だけの考察は不可能であり、種間比較（分類群間比較）が必要となる（Harvey & Pagel 1991, 粕谷 1995）。この比較の対象となる種（分類群）を系統を無視して選んだ場合、誤った結論を導いてしまうことが多い。正確な種間比較を行うには正確な系統関係を知ることが大前提となる。

DNAを使用する利点

DNA の塩基配列データは、以下にあげるような系統推定に非常に適したいくつかの特徴を持っている。①非常に多くの形質情報が得られる。例えば200塩基対（base-pair = bp）の塩基配列を系統解析に使用した場合、各サイトを1つの形質として扱うので200形質を集めて解析したことになる。例えば形態形質を200集めるのは非常に困難を要する場合が多く、それと比較すると非常に容易に大量の形質を集めて解析することができる。②定量化しやすく、統計的解析が容易である。③異なる分類群でも同じ尺度を用いて比較することができる。④分子時計を設定することができる。塩基配列データは、ある程度自然選択に中立で、時間に比例して変異を蓄積していると考えられている。したがって、変異の程度を比較すれば、分類群同士がどのくらい前に分化したのかが推定できる場合がある。また、伝統的に利用されてきた形態的形質と比べた場合、塩基配列データには研究者の主観が入り込む余地が少なく、収斂進化をより簡単に排除できるという特徴がある。さらに、塩基配列データはデータベース化が容易であり、実際データバンクから他の研究者が登録した解析データを簡単に取り出すことが可能である（高木・金久 1996）。

利用されるDNAと領域

1) ミトコンドリア DNA (mtDNA)

鳥類の DNA には、核に存在する核 DNA とミトコンドリア内に存在するミトコンドリ

ア DNA (=mtDNA) があるが、今のところ鳥類の系統解析に利用されているのは主に mtDNA である。鳥類の mtDNA は、2 本鎖の環状 DNA で、ニワトリ *Gallus gallus* では 16,775bp の長さを持つ (Desjardins & Morais 1990)。ニワトリについては全塩基配列 (Desjardins & Morais 1990)、アヒル (ペキンダック) *Anas platyrhynchos* についても 6,474bp が解析されており (Ramirez *et al.* 1993)、遺伝子の配置なども明らかになっている (Fig. 1)。

Fig. 1. Schematic diagram of the gene content and order of the chicken mitochondrial genome (Adapted from Fig. 3 in Desjardins & Morais 1990).

ミトコンドリアは核に比べ分裂周期が早いいため、単位時間あたりの突然変異の発生が多く、生じた突然変異を修復する能力を持たない (高畑 1986)。このため核 DNA に比べ mtDNA の単位時間あたりの塩基の置換率 (=進化速度) は非常に速く、核 DNA の約 10 倍~20 倍である (Brown *et al.* 1979)。このため近縁種間の系統解析に使用することができる。ただし、進化速度は mtDNA 内の領域によっても多少異なる。現在鳥類の系統解析に頻繁に使用されているのは、12S リボソーム RNA (12SrRNA) 領域、チトクローム b (Cytochrome b=Cyt.b) 領域、コントロール (Control) 領域の 3 領域である。その他の領域を使用している研究例は今のところ非常に少ないが、今後は使用される領域の多様化が見込まれる。以下に良く利用される領域について解説を加える。

(1) 12Sリボゾーム RNA (12SrRNA) 領域

12SrRNA 領域は約1,000bpの長さを持ち、リボゾーム（タンパク質合成に関与する細胞小器官）の一部を構成する RNA (12SrRNA) の遺伝情報をコードしている (Desjardins & Morais 1990). 進化速度は、ここに挙げた 3 領域の中では最も遅いと考えられており (Mindell & Honeycutt 1990), ニホンジカ *Cervus nippon* における塩基配列の比較を行った例では、12SrRNA 領域は Cyt.b 領域の約 2.7 分の 1 の進化速度を示す (Nagata *et al.* 1995). このため、種よりも上の分類階級（属、科）の系統解析に利用されることが多いが、鳥類における実際の研究例は今のところあまり多くない (Houde *et al.* 1997). PCR 法で増幅を行う際にはポリヌクレオチド（一般に primer と呼ばれる）が必要となるが、この領域については幅広い分類群で使用可能な汎用性のプライマーも開発されている (Kocher *et al.* 1989). 分類群による塩基配列の変異は Cyt.b 領域などに比べ少ないため、このような汎用性プライマーや他の分類群用に設計されたプライマーをそのまま流用しやすいという利点がある。

(2) チトクローム b (Cytochrome b) 領域

チトクローム b 領域は 1,143bp の長さを持ち、ミトコンドリアの電子伝達系の反応に関与する酵素タンパク質の 1 種チトクローム b の遺伝情報をコードしている (Desjardins & Morais 1990). 進化速度は、12SrRNA 領域より速く、Control 領域よりも遅い。進化速度が中間的であるため、主に種レベル（時に亜種レベル）の系統解析に利用されており、現在最も多く利用されている領域である (Moore & DeFilippis 1997). 過去の研究例が豊富かつデータベース化されていて引用が容易にできることも Cyt.b 領域が頻繁に利用される理由のひとつである。汎用性のプライマーも開発されているが (Kocher *et al.* 1989), 種間での塩基配列の変異が比較的多いため、汎用性のプライマーや他の分類群用に設計されたプライマーをそのまま流用できない場合がある。しかし、過去に行われた研究例が多いので、近縁種の塩基配列データの比較により、自らの研究対象に適合するプライマーを新しく設計することはさほど難しくない。

(3) コントロール (Control) 領域

約 1,135bp の長さを持つ制御遺伝子である Cyt.b 領域や 12SrRNA 領域に比べ非常に速い進化速度を持つ領域と考えられている (Brown *et al.* 1986). これは、コントロール領域がタンパク質などの遺伝情報をコードしていない領域（non-coding 領域）であるため (Desjardins & Morais 1990), 突然変異による塩基の置換を容易に固定する事によると考えられている。進化速度が速いため主に亜種・個体群レベルの研究に利用される。過去に行われた研究は多くないが、近年増加しつつある (Baker & Marshall 1997). すでに開発されたいくつかのプライマーがあるが (Quinn & Wilson 1993, Tarr 1995, Baker & Marshall 1997), 種間、個体群間での塩基配列の変異が多いため、他の分類群用に設計されたプライマーをそのまま流用することは他の領域に比べると困難である。蓄積された研究例も多くないため、近縁種の塩基配列データが公表されていない場合にはプライマー設計に時間がかかる場合がある。この点については、今後研究例が増加することで解決されてゆくと思われる。

(4) その他の領域

最近では前述した3領域以外にも鳥類の系統解析に利用される mtDNA の領域が急速に増加しつつあり、ND2 (Zink & Blackwell 1998), ND6 (Moum & Johansen 1992, Wood & Krajewski 1996, Jones & Gibbs 1997, Zink *et al.* 1997), CO I (Miranda *et al.* 1997), CO II, ATP8 (Greenberg *et al.* 1998) などの蛋白質コーディング領域, tRNA^{Thr}, tRNA^{Pro} (Krajewski & Wood 1995, Wood & Krajewski 1996), tRNA^{Lys} (Greenberg *et al.* 1998) などのトランスファー RNA 領域の研究例がある。これらの領域は Cyt.b と同じく主に種レベルの系統解析に使用されたものである。ただし、ほとんどの場合、単独では使用されず、Cyt.b 領域など他の領域と組み合わせで解析されている。進化速度などについては現在不明な点が多いが、今後情報が蓄積されるにつれて明らかになると考えられる。

2) 核 DNA

mtDNA のみの分子データを用いて系統の解析を行った場合、後述のような母系遺伝に伴う問題点が生じる可能性がある。これらの問題を排除するため遺伝様式が mtDNA とは異なる核 DNA の解析を同時に行うことが望ましい。鳥類の核 DNA は両性遺伝をするため母系遺伝に伴う問題点は生じ得ない。しかし、核 DNA は mtDNA に比べ進化速度の遅い領域が多く、例えば類縁の遠い生物間の系統解析によく用いられる核 DNA の 18SrRNA 領域 (約2,000bp) は、ヒトとアフリカツメガエルの間で9%の違いしかない (和田ら 1992)。そのような領域を使用しても広い分類群間ではほとんど同じ配列を示すため低次分類群 (種, 亜種) の系統解析などにはあまり役に立たない。鳥類においては、Chikuni *et al.* (1996) が核 DNA の 18SrRNA 領域の部分塩基配列293bpを解析した研究例がある。この研究では対象としたスズメ目20種の内17種で解析した部分の塩基配列が完全に一致しており、18SrRNA 領域が近縁種間の系統解析にはあまり有効ではないことが明らかである。

18SrRNA 領域以外では、比較的進化速度の速い 18SrRNA のスペーサー領域 (100万年に約1%の塩基置換を固定する=約1%MY=Cyt.bの約半分の進化速度) や遺伝子の機能を有していない偽遺伝子領域 (約0.2%MY=Cyt.bの約10分の1の進化速度) などが候補になると思われるが、今のところ鳥類の系統解析への応用例はないようである。生態学でよく利用される反復配列領域のミニサテライト (minisatellites) やマイクロサテライト (microsatellites) では逆に進化速度が速すぎ、個体間でも変異が検出されてしまうため (西海 1997)、種間の系統解析などには利用しにくい場合が多い。現在のところ鳥類の種レベルの系統解析に利用しやすい進化速度を持つ核DNAの領域は知られていないため、実際に核DNAの情報を検討する場合には間接的なアプローチではあるが、アロザイム (allozymes) 分析 (酵素タンパク質の多型を検出する手法) が使用される場合が多い。今後利用しやすい領域が発見されれば、核DNAを解析に用いた研究例も増加するものと思われる。

mtDNAを使用する場合の問題点

1) 核に類似配列が存在する問題

核の中に mtDNA と類似する配列があることが知られている (Quinn 1997). PCR 法を使って mtDNA の一部を増幅する場合、誤ってこのような核の mtDNA 類似配列を増幅し、そのことに気づかずに解析してしまうことが考えられる。この点については mtDNA を核 DNA から分離した上で PCR に使用することで防ぐことが可能である。

2) mtDNAの母系遺伝に関する問題点

細胞小器官であるミトコンドリアの持つ基本的かつ重要な特徴として、メス親からのみ子供 (F₁) に受け渡されることがあげられる。このためミトコンドリアが保持する mtDNA もメス親からのみ子供に遺伝する性質を持つ (母系遺伝)。オスの持つ mtDNA は子供には受け継がれない (異種間交雑の場合はこの原則が崩れることが知られている。雑種判定の項参照)。このため、mtDNA の各領域を用いた系統解析は、実際にはメスの系統 (mtDNA の系統) のみを示している。このことが鳥類の系統解析を行う際に問題となる場合があるので、分析結果の考察を行う際には十分な注意が必要である。この点について以下に解説しておく。

(1) メスの出生地からの分散 (natal dispersal) に関連する問題

メスが出生地から他地域へは分散をせず、代々そこで繁殖をくり返す習性を持ち、一方オスは出生地から分散して他地域へ移動して繁殖を行う習性をもつ種の場合、いくつかの地理的に隔離された個体群は、オスの移動によって個体の交流=核 DNA の交流が維持されているため実際には分化しない。しかし、このような種の mtDNA は、メスの交流がないために時間と共に個体群間の相違が大きくなる。十分な時間が経過したのち、この種の各個体群の mtDNA の塩基配列を比較した場合、実際には個体群間の交流は保たれて続けているのにもかかわらず、mtDNA は個体群間で大きな分化を示すことになる。一般に鳥類は、哺乳類と異なりメスが出生地から分散して繁殖を行い、オスは出生地からあまり分散しない傾向のあることが知られている (Greenwood & Harvey 1982)。このため上記のような問題が頻繁に生じるとは考えにくい。カモ目 (Anatidae) のいくつかの種では、メスが出生地に留まる傾向の強いことが示されている (Sowls 1955, Cooke *et al.* 1975, Alison 1977, Greenwood & Harvey 1982)。

標識した個体の帰還率からメスが出生地に戻る傾向が極めて強いことが明らかになっているハクガン *Anser caerulescens* で mtDNA を分析した例では、地理的に隔離されている繁殖地間において mtDNA の明確な分化は検出されなかった (Avise *et al.* 1992)。このハクガンの例を含め、メスの分散性の低さによって個体群間の mtDNA が分化した事例は、少なくとも鳥類では実際には確認されていない。しかし、理論的には起こりうる現象である。形態や行動などの形質が全く異なる分類群間の mtDNA に相違が認められる場合には、隠蔽種 (cryptic species: 形態的には区別が困難であるにも関わらず、生殖的に隔離されている種) であると結論する前に、メスの分散について検討を加える必要がある。

(2) 異種間浸透 (introgression) に関する問題

異種間で交雑が起こった場合、例えばシジュウカラ *Parus major* のオスとヤマガラ *P. varius* のメスが交雑した場合、生まれるヒナ (F_1) の核 DNA は両種のものが混じって遺伝しているが、mtDNA は母系遺伝するので全てヤマガラのメスから遺伝したものである。このヒナのうちメスが成長してシジュウカラのオスと繁殖すると生まれるヒナ (F_2) は、やはり全てヤマガラの mtDNA を持つことになる。これを何代にも渡ってくり返すと、ヤマガラの核 DNA はシジュウカラの核 DNA によって薄められてしまうが、mtDNA は薄められることなくシジュウカラの集団の中に広がってゆき、見た目はシジュウカラなのにヤマガラの mtDNA を持つ集団が生じることになる。このような現象は mtDNA の異種間浸透と呼ばれる。mtDNA の広まりが、種を形成する個体群の一部に限られる場合は、種内に大きく異なる mtDNA タイプが検出され、そのひとつが他種の mtDNA と一致することになる。しかし、場合によっては種内全体に他種の mtDNA が広がることもあり、この場合異なる 2 つの種の mtDNA が同じ配列を示すことになる。異種間浸透の後、再び 2 種の mtDNA の分化が起こった (= 交雑以降交流がなかった) 場合でも分化の程度は実際の種の分化よりも低くなるため、系統推定や分岐年代の計算に影響を与える。鳥類で異種間浸透が実際に確認された例はないが、他の分類群ではいくつかの例が知られている (高畑 1986)。形態や行動などの形質が大きく異なる分類群間の mtDNA に相違が認められない場合には、類縁が近いと結論する前に異種間浸透について検討を加える必要がある。

3) 塩基配列の収斂進化

mtDNA に限った問題点ではないが、塩基配列にも収斂現象が知られている。本来、涙や唾液に含まれ、侵入する細菌類から体を守る働きをしている酵素 (リゾチーム) が、木の葉を食べる偶蹄類の反芻動物 (シカなど) とサル の 1 種では新しく消化酵素の働きを獲得している。新機能を獲得したリゾチームの情報をコードしている領域のアミノ酸配列は、類縁関係のない反芻動物とサルで部分的に似たものとなっている (Stewart *et al.* 1987)。このように希ではあるが、分子レベルでも適応的進化により収斂が起こることは事実である。しかし、複数の領域を調べればこれが収斂であることはすぐに明らかとなる。また、鳥類の系統解析に頻繁に利用される mtDNA の Cyt.b, 12SrRNA, Control などの領域では、今のところこのような収斂進化は検出されていない。ただし、全くないと決まったわけではないので、解析された系統が従来の分類と一致しない場合には収斂進化も一応考慮すべきであろう。

進化速度と分岐年代

1) 分岐年代の計算

DNA の塩基配列を利用した系統解析の場合、分析した領域における単位時間あたりの塩基の置換率 (進化速度) が明らかであれば、分岐年代を計算することが可能である。進化速度を求めるための基礎となっているのは主に化石資料や地史的情報である。例えば鳥類においてよく利用される Cyt.b 領域の 100 万年あたりの塩基の置換率 2 % (2 %/MY)

という値も現生のガン類の分子データとその化石資料から計算されたものである (Shields & Wilson 1987). その他, 計算されているものとしてはハワイミツスイ類の2.0%/MY (Tarr & Fleischer 1993), ツル類の0.7–1.7%/MY (Krajewski & King 1996) がある. しかし, その後 Cyt.b 領域では大半の変異がコドン (codon: 塩基配列がアミノ酸に翻訳される場合の暗号, 3塩基で1つのコドンを形成する) の3番目の塩基に生じていることが明らかになり (Edwards *et al.* 1991), この部分のみを用いて進化速度を計算することも行われるようになった (例: アホウドリ類1.58–2.86%/MY (Nunn *et al.* 1996)). しかし, これらの値は化石資料などを基に推定した値であるため, 大雑把な値であり, かなり大きな誤差を含んでいるものと推測される. また, 次に述べるように, 分岐年代を計算する上で, 問題となるいくつかの要因も指摘されている.

2) 分岐年代を計算する上での問題点

分岐年代を計算する上で最も問題になるのは, 分類群による進化速度の違いが存在することである. 分類群による進化速度の違いが生じる主な原因は, 分類群ごとに代謝速度が異なることと世代交代の速度が異なることの2点である. 基礎代謝量は一般に体の大きさに反比例し, 基礎代謝量の大きいもの (代謝速度の速いもの) ほど進化速度が速いと考えられている (Martin & Palumbi 1993).

世代交代の速度については, 交代速度の速いものほど進化速度は速くなると考えられている. 例えば, 生まれた翌年には繁殖を開始する世代交代の速いスズメ目の鳥類と繁殖開始に数年を要し世代交代の速度の遅いツル類では, 同じ2%の塩基置換でも, それを生じるのに必要な年月は同じではない (ツル類の方がより長い年月が必要である) と推測されている (Krajewski & King 1996). これは, ある個体に生じた淘汰に中立な突然変異が集団全体に拡がる (固定される) のに必要な時間が, 平均4 N_e 世代 (ここでの N_e は有効な集団の有効な大きさで, 大雑把に言えば1世代あたりの繁殖個体数) であることによる (木村 1988). したがって, 突然変異の生じる率と繁殖個体数 (N_e) が同じ2つの種を比較した場合, 世代交代の速い種のほうが突然変異が固定されるのに必要な絶対時間は短くなる=進化速度が速くなる (この点を考察するのに不可欠な各種鳥類の繁殖開始年齢は Sibley & Ahlquist 1990 の Table 16 にまとめられている).

また, 同様の原理で世代交代の速度が同じであれば, 1世代あたりの繁殖個体数がより少ない (N_e が小さい値) 種の方が, より進化速度が速くなると考えられる. 加えて, 個体数の多い個体群よりも個体数の少ない個体群の方が突然変異が固定される率が高い場合のあることも指摘されている (Ohta 1992). 歴史的にボトルネックや創始者効果の働いた可能性のある個体群や種の系統を解析・分岐年代の計算をする場合には注意が必要である (本号, 高木論文を参照).

以上のことから, 鳥類の他の分類群で計算された進化速度を, 自らの研究対象にあてはめて分岐年代を計算する場合には, 両者の代謝速度や世代交代速度及び個体数が極端に大きく異ならないことを確認する必要がある.

また, 理由は明らかではないが, 鳥類は哺乳類などと比較して進化速度が遅いことも指摘されている (Kessler & Avise 1985, Martin & Palumbi 1993, Nunn *et al.* 1996). このため哺乳類で計算された進化速度 (例えば, Cyt.b 領域でコドンの3番目の進化速度

10%/MYなど)を鳥類に利用する場合には注意が必要である。

また、塩基の突然変異にはトランジション (transition=TS: プリンが他のプリンに、またはピリミジンが他のピリミジンに置き換わる点突然変異、すなわち G が C に変異する場合とその逆、A が T に変異する場合とその逆を全てトランジションと呼ぶ) とトランスバージョン (transversion=TV: プリンがピリミジンに、またはピリミジンがプリンに置き換わる点突然変異、すなわち G が T もしくは A に変異する場合とその逆、C が T もしくは A に変異する場合とその逆を全てトランスバージョンと呼ぶ) があることが知られており、TS と TV の起こり易さの違いも分岐年代を計算する上での問題となる。最初に例として挙げたガン類やハワイミツスイ類、ツル類の進化速度は、TS と TV 両方の塩基置換をあわせて計算したものである。実際には同じ 2% の相違でも、含まれる TS、TV の割合によって分化するのに必要な時間は変わってくる可能性が高い (9-(3) 重みづけの問題の項を参照)。

この他、塩基の多重置換の影響も問題となる場合が多い。塩基配列の分化程度が大きい分類群間では多重置換が起こっている可能性が高く、計算された分岐年代は実際よりも過小評価になると考えられる (9-(4) 多重置換の問題の項を参照)。また、DNA 解析によって検出される塩基配列の分化は、そのうちのかなりの量が種分化や完全な地理的隔離よりも前に起こった可能性があることも指摘されている (Avice & Ball 1991, Lynch & Jarrell 1993)。

このような様々な不確定要素が知られているために、計算された分岐年代の値は信頼性の低いものとなっている。多くの論文で、一応分岐年代が計算されているにも関わらず、地史的情報と重ね合わせた考察がほとんど行われていないのはこのためであろう。

mtDNAの雑種判定への利用

雑種判定は系統解析と直接の関係はないが、対象となる分類群の中に雑種の可能性のあるサンプルが混じっている場合、必要となるテクニックである。新たに発見された種が雑種か否かが問題となる場合も多い。ただし、容易に判定ができるのは雑種 1 代目 (F_1) のみである。実例としては 1982 年に独立種として記載された Cox's Sandpiper *Calidris paramelanotos* (和名未定) がアメリカウズラシギ *C. melanotos* とサルハマシギ *C. ferruginea* の雑種である事が判明した例がある (Christidis *et al.* 1996a)。母親となった種の特定には mtDNA が利用される。雑種と思われる個体の mtDNA の塩基配列と一致する種を見つけ出せばよい。当然種レベルで変異の検出できる領域を使用する必要がある。Cox's Sandpiper の場合は Cyt.b 領域の部分塩基配列 288bp が使用され、サルハマシギの Cyt.b 領域の配列と一致することが確認された。父親の特定には今のところアロザイム (酵素タンパク質の多型) が利用されている。ただし、最近の研究ではマウスやショウジョウバエなどにおいて異種間または亜種間交雑の場合、雑種 1 代目に限り父親由来の mtDNA が子供に遺伝し、母親由来の mtDNA と同居する例のあることが明らかとなった (金田・米川 1998)。鳥類での事例は今のところ確認されていないようだが、発見された場合 Cox's Sandpiper で使用された手法は今後見直しを迫られる可能性もある。

サンプルの採取と保存

現在利用できる主なサンプルは、組織及び血液、羽毛などである。いずれのサンプルも得られるDNAは全く同じものであり、PCR法を利用する系統解析の手法全てに利用可能である。これらのサンプルはいずれも個体を生かしたまま採取することが可能である。なお、生体からのサンプル採集には環境庁への学術申請を行い許可を受けることが必要である。

博物館などに保存されている標本（剥製、液浸標本）からDNAを抽出し分析に利用することも可能である（Ellegren 1994, Thomas 1994）。また、国外には鳥類の組織、血液を保存し研究者に提供するバンクも存在する（具体例については、6）サンプルバンクの利用の項参照）。

ここでは著者が実際に使用している方法を中心に手法の説明を記す。ここに挙げた方法で採取・保存したサンプルは、最も一般的なフェノール・クロロフォルム法でのDNA抽出には適しているが、近年各製薬会社等から発売されているDNA抽出キットを利用しての抽出には適さない場合がある。このようなキットを利用する場合は、それぞれに適したサンプル採取・保存法を使用する必要がある。また、サンプル採取に使用する器具などは他個体のDNAの混入を避けるため、個体毎に取り替える必要がある。保存には滅菌済みのチューブやガラス瓶、ビニールバックを使用する。ただし、冷凍保存には耐冷凍性のチューブなどを使用しなければならない。冷凍保存にはディープフリーザー（ -80°C ）もしくは液体窒素中（ -196°C ）が適している。野外でのサンプル採取及び運搬に使用できる小形の液体窒素運搬容器も各種市販されている。なお、冷蔵保存は約 4°C で行う（家庭用冷蔵庫の冷蔵室で可能）。

1) 血液サンプル

個体に与える影響を最低限に抑え、分析に十分な量のDNAを採取するためのサンプルとしては血液が最も適している。簡易DNA抽出キットも多種類が市販されており利用しやすい。鳥類は赤血球に核が存在するため、赤血球に核を持たない哺乳類に比べ少量の血液で大量のDNAを得ることができる（西海 1997）。しかし、これは核DNAについてのみ言えることで、鳥類でも赤血球はミトコンドリアを持たず、白血球などにのみミトコンドリアを有するためmtDNAについては採取できる量に哺乳類との間で大きな違いはない。

採血は尺側皮静脈（一般的にはwing vein＝翼下静脈と呼ばれる）から行うのが一般的である。また、爪の先端部を切り取り、毛細血管からしみ出た血液を採取する方法も知られている。この他に、頸静脈や心臓（Utter 1971）から血液を採取することも可能だが、熟練を要する上、個体への影響も大きいと一般的には使用されていない。大量の血液を採取する場合には注射器を用いる場合が多いが（酒井 1997）、PCR法を利用した系統解析を行う場合、必要なDNAはそれほど多くないので、毛細管を使用する方法が一般的である。採血量については通常脂肪のない状態で体重の1%程度にとどめるのがよいとされるが（Stangel 1986, American Ornithologists' Union 1988, 西海 1997）、PCR法を利用する系統解析には通常 $70\sim 140\mu\text{l}$ 程度（75mm毛細管1～2本）採取すれば十分で

ある。

一般的な翼下静脈からの採取法としては、70%エタノールをしみこませた脱脂綿で翼の下面（肘の部分）を拭き、翼下静脈を露出させる（Fig. 2）。血管に滅菌した注射針で小さな穴を開ける。しみ出た血液を毛細管を押つけて採取する。大抵の場合、出血はすぐに止まるが、止まらない場合は脱脂綿などで圧迫止血を行う。使用する注射針のサイズは小形の鳥では26Gもしくは27Gが適している（G=ゲージ、数字の大きい方が針の径が細い。27G=直径0.4mm）。また、毛細管はヘパリン処理（血液の凝固を防ぐ）したものを用いる場合が多いが、作業を短時間で行えばヘパリン処理をしていない毛細管を用いても血液凝固を防ぐことができる。また、DNA抽出キットによっては、ヘパリンの使用不可のものもあるので注意が必要である。

Fig. 2. The underwing vein of birds and the sampling position.

採取した血液は血液保存用の緩衝液に入れて冷蔵もしくは常温保存する。保存用緩衝液の組成は0.01M Tris, 0.01M NaCl, 0.01M EDTA, 1% n-lauroylsarcosine, pH8.0 (Seutin *et al.* 1991)。その他にもいくつかの保存液が開発されている (Seutin *et al.* 1991, Dessauer *et al.* 1996)。保存用緩衝液が入手できない場合は高純度エタノール (99.5%) を保存液として利用することができる (常温で保存可能)。保存状況で変化することも考えられるが保存用緩衝液では最低でも半年 (西海 1997)、エタノール中では少なくとも数年間は保存可能である。

2) 羽毛サンプル

羽毛自体は基本的に死細胞で形成されているため、DNA を採取しても断片化している場合が多いが、皮膚と接合していた部分の羽軸基部には生細胞が付着しているため、この部分からは完全な DNA が得られる。個体に与える影響は最も少ないが、得られる DNA 量は血液や組織に比べ少量である (Taberlet & Bouvet 1991)。採取する羽毛の部位は基本的にどの部分でも問題がないが、小形の体羽よりも風切羽や尾羽など大形の羽毛の方が多くの DNA を抽出できる可能性が高い (Pasquet 1998, Srikwan & Woodruff 1998)。しかし、体羽 1 枚から抽出された DNA で分析が行われた例もある (馬場 1996, Murata *et al.* 1998)。換羽期にみられる成長途中の羽毛からはより多くの DNA の採取が可能である (西海 1995)。

採取法としてはピンセットなどで引き抜いた羽毛を個体毎に 99.5% エタノール中 (70% 程度でも可能) に入れ、冷蔵または常温で保存する。生細胞の付着している羽軸の先端を汚染しないように注意することが必要である。エタノール以外では、組織を保存する際に使用される緩衝液 (Seutin *et al.* 1991, Dessauer *et al.* 1996) を利用することができる。また、冷凍保存する場合は緩衝液などを利用する必要はない。腐敗に注意すれば、常温でも保存可能と思われるが、DNA の収量が減少する可能性がある。

3) 組織サンプル

基本的に体のどの部分の組織からでも DNA の抽出は可能であるが、現在よく利用されているのは、胸筋 (大胸筋) と肝臓である。胸筋の細胞は大量のミトコンドリアを含むため mtDNA を多く得ることができ、肝臓からは主に核 DNA を大量に抽出することができる。ただし、量的な違いはあるものの、どちらの組織からも核 DNA, mtDNA の両方を得ることができるので、PCR 法を利用する場合、このような違いはあまり問題にはならない。サンプルを採取する場合には多くの場合対象とする個体を死亡させなければならない。死亡させた個体からはなるべく早くサンプル採取を行う必要がある。これは、死亡した個体では DNA 分解酵素の働きで速やかに DNA の分解が起こるためである。死亡した後、冷凍と解凍をくり返した場合も DNA は分解されることが多く、博物館などに運び込まれる弊死体からサンプルを採取する場合などには注意が必要である。腐敗が進んだ場合には DNA の採取が困難である場合が多い。

採取法としては滅菌したメス、ハサミなどを用いて必要な組織を切り出す。採取する量は数 g 程度 (実際には小指の頭程度) で十分である。切り出した組織は、ハサミで細かく裁断して 99.5% エタノール中に常温または冷蔵保存する。裁断せずに保存すると組織の表面だけがエタノールで固定され、内部が固定されない可能性があるため注意が必要である。冷凍保存の場合は裁断する必要はない。冷凍保存された鮮度の高い組織は DNA 分析だけでなくアロザイム分析にも利用可能である (アロザイム分析に利用する場合、胸筋、心筋、肝臓が揃っているのが望ましい)。なお、個体を死亡させずに筋肉を採取する方法も報告されており (Baker 1981)、日本でもオオヨシキリで実際に試行され、翌年の帰還率に影響がなかった例が知られている (上田恵介 私信)。しかし、この方法は普及せず現在ではほとんど使用されていない。

4) 標本からのサンプル採取

博物館などに保存されている各種の標本からDNA抽出を目的とするサンプルを採取することは、研究対象とする分類群の捕獲が難しい場合や絶滅鳥を研究する際などに行われ、成果も上がっている (Table 1). しかし、標本から採取できるDNA量は生体からのサンプルに比べ少量で、しかも細かい断片に分断されている場合が多い (Thomas 1994). また、現在のところ標本を全く破壊せずにDNAを採取する事は不可能であることから、標本 (特に絶滅鳥や稀少鳥の標本) の安易な利用は避けるべきである。鳥類の場合、利用される標本は主に乾燥標本 (本剥製, 研究用仮剥製) と液浸標本である。モアなどの絶滅した鳥類の系統関係を研究する際に骨標本からDNAを採取した例 (Cooper *et al.* 1992, Cooper 1994) もあるが、少なくとも鳥類では一般的ではない。

Table 1. Example of avian phylogenetic studies retrieving DNA from museum specimens.

Taxon 対象とする分類群	DNA source 使用されたサンプル	References 文献
<i>Podica senegalensis</i> アフリカヒレアシなど	muscle, skin, feathers 乾燥標本の筋肉、皮膚、風切羽	Houde & Braun (1988)
<i>Laniarius turatii</i> ニシヤブモズなど	skin 仮剥製の皮膚	Smith <i>et al.</i> (1991)
<i>Hirundo rustica</i> , <i>Ficedula hypoleuca</i> ツバメ, マダラヒタキ	one feather 仮剥製の羽毛1枚	Ellegren (1991)
<i>Anomalopteryx</i> モアなど	bone, dry tissue 骨, 乾燥した組織	Cooper <i>et al.</i> (1992)
<i>Geopsittacus occidentalis</i> ヒメフクロウインコ	one feather 仮剥製の翼の羽毛1枚	Leeton <i>et al.</i> (1993,1994)
<i>Turnagra capensis</i> ニュージーランドツグミ	unknown 剥製(部位不明)	Christidis <i>et al.</i> (1996b)
<i>Puffinus assimilis</i> セグロミズナギドリなど	one feather 仮剥製の羽毛1枚	Austin (1996)
<i>Lanius ludovicianus</i> アメリカオオモズ	leg skin 仮剥製の脚の裏の皮膚	Mundy <i>et al.</i> (1997)
<i>Philortyx fasciatus</i> ヨコフウズラなど	unknown 仮剥製(部位不明)	Zink & Blackwell (1998)
<i>Dendronanthus indicus</i> イワミセキレイ	leg skin 仮剥製の脚の裏の皮膚	Voelker & Edwards (1998)
<i>Sitta frontalis</i> アカハシゴジュウカラなど	abdominal skin 仮剥製の腹部の皮膚	Pasquet (1998)

(1) 乾燥標本からのサンプル採取

乾燥標本 (本剥製, 研究用仮剥製) からのサンプルとしては羽毛と皮膚が利用しやすい。羽毛の基本的な採取法は、生体からの場合と変わらない。実際にアジアヒレアシ *Heliopais personata* (Houde & Braun 1988) やヒメフクロウインコ *Geopsittacus occidentalis* (Leeton *et al.* 1993) などでも利用され、DNA採取及び分析に成功した例がある。また、保存状態にもよるが100年以上前に作成された標本の羽毛からもDNAの採取が可能であることが確かめられている (Ellegren 1991).

皮膚については基本的にどの部分でも利用できるが、標本の見た目が損なわれないよう

な場所（腹部の縫い合わせ部分付近や脚の裏）から採取することが多い（Smith *et al.* 1991, Mundy *et al.* 1997, Pasquet 1998）。採取量は腹部の皮膚で 8×3 mm（Pasquet 1998）、脚の裏の皮膚で 1.5×1.5 mm（Mundy *et al.* 1997）程度で分析が可能であることが確認されている。ただし、DNA 採取量は、標本の保存状態などによって大きく変化する可能性がある。

（2）液浸標本からのサンプル採取

液浸標本のうちエタノールで保存された標本からは、状態の良い DNA が得られることが知られている（Thomas 1994）。一方で、博物館などで一般的に使用されているホルマリンで固定された標本からは PCR 法に使用できる DNA 採取が難しいことが知られている。ただし、エタノールで置換した後に DNA の抽出及び増幅に成功した例が、魚類のミナミトミヨ *Pungitius kaibarae* などで行われている（高田 1995）。その他の各種の液浸標本用保存液が DNA 抽出及び PCR 法による増幅に与える影響は今のところあまり良く判っていない。

5）採取するサンプル数

採取するサンプル数に決まった値は存在しない。基本的集めるサンプルは母集団の変異を反映しているものでなくてはならない。母集団の遺伝的変異の幅が大きければ多くのサンプルが必要になる。母集団の変異の幅は、分類群によっても異なるが、解析に使用する領域によっても異なり、進化速度の速い領域ほど遅い領域に比べ変異の幅が広く、サンプル数を多くしなければならない。これまでに行われた系統に関する研究では、少数のサンプルに基づくものがほとんどであった。ただし、最近の研究ではサンプル数の増加が認められ、Helbig *et al.* (1996) は、チフチャフ *Phylloscopus collybita* の Cyt.b 領域の解析で、1 亜種最大 26 個体を解析している。同研究では 20 個体以上の解析を行うことができた分類群については母集団の変異の幅を十分に表していると結論づけている。

サンプル数は多ければ多いほどよいというわけではなく、必要十分な量を得る事が重要である。適切なサンプル数を決めるには、対象とする分類群の解析を行って対象とする領域の変異の幅を確認し、対象とする分類群の個体数や分布の広さや隔離の程度なども考慮に入れた上で、更にサンプリングを行うか否かを判断する必要がある。

6）サンプルバンクの利用

現在いくつかの国の大学や博物館が自らの保存している組織、血液などのサンプル及び抽出済みの DNA コレクションを研究者に提供している。鳥類ではカリフォルニア大学バークレー校の Museum of Vertebrate Zoology やコペンハーゲン大学の Department of Population Biology and Zoological Museum がサンプルの利用ガイドラインやデータベースをインターネット上に公表している（Arctander & Fjeldsø 1994）。入手しにくい国外の鳥類のサンプルもこのようなサンプルバンクを利用すれば比較的容易に入手が可能である。なお、上記 2 ヶ所を含め鳥類のサンプルを保存・提供している機関の一覧表は Dessauer *et al.* (1996) に掲載されている。

7) DNA 研究の裏付けとなる標本 (voucher specimens)

DNA による系統解析を行う場合、DNA の裏付けとなる標本の採取、すなわち分析する DNA の持ち主である個体を採集し標本 (仮剥製標本、液浸標本など) として組織サンプルなどと共に保管しておくことは非常に重要である (Winker *et al.* 1996). 裏付けとなる標本が存在することで種及び亜種の誤判定の防止、さらには、遺伝子解析の結果を形態の面から再検証できるなどの利点がある。稀少な鳥類の場合など標本を採集するのが非常に困難な場合もあるが、少なくとも分類や系統推定を最終目的とする研究の場合はある程度の標本の採集は必須である。博物館などに届けられた弊死鳥を利用して研究を行う場合などにもサンプルと標本の整合性を保つ必要がある。

DNA 分析の手法

DNA の分析は、①野外から持ち帰ったサンプルからの DNA 抽出、②解析する領域の増幅、③塩基配列の解析の順で行われる。各段階で使用される手法については、村松 (1990)、中山・西方 (1995a, b)、中山 (1996) に実験操作法の説明があるので、ここでは詳細な記述はせず、どのような手法が使われるのかのみを簡単に記述する。

1) DNA の抽出

採取したサンプルからの DNA の抽出法としてはタンパク質分解酵素 (プロテナーゼ K など) を作用させたのち、フェノール・クロロフォルム法によって DNA を精製する手法がもっとも一般的で汎用性が高い。なお、エタノールに保存していたサンプルは、デンケーター内で乾燥させるなどしてエタノールを完全に除去してから抽出を行う必要がある。また、羽毛からの DNA 抽出にはプロテナーゼ K の代わりに Celex[®]100 を使用する場合が多い (Murata *et al.* 1998)。組織や血液からは短時間で DNA 抽出を行うことができる DNA 抽出キットが各社から市販されている。これは、抽出に使用する薬品などをセットにしたもので、実験手順や使用する薬品、サンプルの保存法などキットによって異なる場合が多い。薬品の調整などをする必要がなく、長くとも数時間で DNA 抽出が可能であるなど利点は多い。ただし、指定された以外の方法で保存されていたサンプルについては DNA 抽出が不可能な場合があるので注意が必要である。

2) DNA の増幅

サンプルから抽出された DNA は、核 DNA と mtDNA が混合された状態になっている (total DNA)。DNA の分析を行う場合、まずこの状態の DNA から塩基配列を決定したい領域の DNA のみを大量に増幅する (コピーを作る) ことが必要となる。DNA の増幅には、大腸菌などの DNA に目的となる DNA 領域を組み込んで増幅させる方法と試験管内で無生物的に増幅を行う方法 (PCR 法 polymerase chain reaction) があるが、後者のほうが簡便で処理速度も速いため利用しやすい。PCR 法を実際に行うには、サーマルサイクラーなどと呼ばれる専用の装置が必要であるが、近年は安価となり各器機メーカーから市販されているので入手は容易である。PCR 法で増幅を行う際に必要となるプライマーについては、各研究事例を参考にするか、データベース上からいくつかの種の塩基配列デー

タを引用して設計する必要がある。設計したプライマーは、専用の機器があれば個人的に作成することも可能であるが、専門の業者に依頼して合成してもらうのが一般的である。

3) DNA の情報を読みとる手法

PCR 法などで増幅された DNA は、系統解析に利用するために塩基配列の読みとり (ダイレクトシーケンシング) が行われる。塩基配列を直接読みとる方法以外の DNA 分析法としては、DNA-DNA 交雑法、制限酵素断片長多型の検出法がある。それぞれの手法については石田 (1996) に一般的な解説があるので、これらの手法の変遷などについてのみ簡単に述べる。

(1) DNA-DNA 交雑法 (DNA-DNA hybridization)

DNA-DNA 交雑法は1970年代から1980年代にかけて精力的に鳥類の系統解析を行った Charles G. Sibley らが使用した方法で、主に上位の分類群 (亜目から属) において様々な新知見が得られている。その成果は Sibley & Alquist (1990) にまとめられており、日本でも盛んに紹介され非常に有名な手法である (柿沢 1991, 石田 1996, Sibley 1997)。この手法では、まず比較したい種から得た二本鎖 DNA を熱することにより分離させ一本鎖 DNA を作る。できた一本鎖 DNA を異なる種間で相同性を利用して結合させ DNA の雑種を形成させる。その上で雑種 DNA の熱安定性を測定することによって、両種の DNA の塩基配列の差異を推定する。特殊な実験装置が必要であることや実験設定の再現が難しいこと、新しい手法の発達などにより現在ではほとんど使用されておらず (Fig. 3)、今後日本で利用される可能性は極めて低い。

(2) 制限酵素断片長多型

(RFLP=restriction fragment length polymorphism)

DNA-DNA 交雑法に変わって1990年代初頭に一般化したのが制限酵素断片長多型を検出する方法である。RFLP と呼ばれるこの手法には、制限酵素 (restriction enzyme) と呼ばれる酵素を利用する。制限酵素は DNA の二本鎖を決まった配列 (認識配列) のある場所で切断する働きを持つ (例: Alu I という名の制限酵素は AGCT という配列を認識して G と C の間で切断する)。認識配列の違いにより200種以上が知られており、種類数は現在も増加している。一覧表は各製薬会社のカタログや中山・西方 (1995b) に掲載されている。解析したい DNA 領域に制限酵素を作用させ、DNA が切断されるパターンを電気泳動によって検出し、分類群間でこのパターンの違いを比較する。多種の制限酵素を使用することで間接的に分類群間の塩基配列の違いをかなり正確に検出することができ、薬品の価格も安価で実験に特別な設備も必要でないなどの利点から、1990年代前半には鳥類の分子系統学的研究に多用された (Fig. 3)。しかし、間接的な検出法であるため情報の損失が多く、塩基配列を直接読みとるダイレクトシーケンシングが広まるにつれ系統解析には急速に使用されなくなり、現在ではほとんど使用されなくなっている (Fig. 3)。

(3) 塩基配列の決定 (nucleic acid sequencing, direct sequencing)

1990年代半ば以降普及し今後も主流となると思われる手法が、直接塩基配列を読みとる

Fig. 3. Annual change in the relative frequency of the DNA analysis method used for avian phylogenetic studies, 1991 to 1997. Studies were made of three international journals of avian science: *The Auk*, *The Condor*, *Ibis*. Seq: Direct sequence method. RFLP: Restriction fragment length polymorphism method. Hybrid: DNA-DNA Hybridization method.

ダイレクトシーケンシング (direct sequencing, nucleic acid sequencing) である。現在、塩基配列を読みとる方法として主に使用されるのはヌクレオチド類似体と DNA ポリメラーゼを用いたダイデオキシ (dideoxy) 法 (またはサンガー法と呼ばれる) である。分析対象とする領域の一次構造である塩基配列を直接読みとるので RFLP 法に比べ情報の損失は極端に少ない。分析結果は A, G, C, T の 4 塩基記号の羅列で示されるため、他の分類群の分析結果との比較、分化の程度の定量化、系統推定ソフトへの読み込み、データベースへの登録・引用なども非常に容易である。

ダイデオキシ法の基礎となる PCR 法の普及、ダイデオキシ法に蛍光色素を使用する技術の一般化 (かつては RI を使用する必要があった) とダイデオキシ法で処理した結果を電気泳動を用いて自動解析するオートシーケンサーと呼ばれる装置の普及によって、塩基配列を直接読みとる手法は爆発的に広まり、現在の分子系統学分野では、それ以外の手法で DNA を分析している研究例をみつけることが困難になりつつある (Fig. 3)。近年の研究では、以前よりも長い塩基配列を系統解析に用いる傾向がある (Fig. 4)。これは、オートシーケンサーの性能が向上し、一度に読みとれる塩基配列の長さ (塩基対数) が増加していることに加え、少数の塩基配列データから解析される系統関係は信頼性が高くないと考えられているためである。

Fig. 4. Annual change in the number of DNA sequences (bp) used for avian phylogenetic studies, 1991 to 1997. Studies were made of three international journals of avian science: *The Auk*, *The Condor*, *Ibis*.

系統推定と系統樹の作成

系統推定法や系統樹作成法及び得られた系統樹の信頼性の検定など、分子系統学的研究に用いられる一連の手法は、その数も多く、原理や計算法を理解することも容易とは言いがたい。しかし最近この分野に関する解説書が日本語で出版されたことにより（長谷川・岸野 1996, 三中 1997）、理解のし易さは格段に向上した。分子系統学で使用される手法は、現在も改良が続けられており、ここで紹介する手法が、今後も継続して利用され続ける保証はない。系統学（分子系統学を含む）に携わる研究者は、系統推定法などの改良に常に注意を払う必要がある。

DNA-DNA ハイブリダイゼーション, RFLP, ダイレクトシーケンシングのいずれの手法から得られたデータからも系統樹を作成することが可能である。しかし、ここでは、煩雑さを避けるためダイレクトシーケンシングによって得られた塩基配列データを使用することを前提とする。

1) 系統推定法

得られた塩基配列データは専用のプログラム（DNASIS など）を用いてギャップの挿入などの処理を行った上で系統推定に利用される。鳥類の系統推定法として良く使用されるのは近隣結合法（NJ 法：neighbor-joining method）、最大節約法（MP 法：maximum parsimony method）、最尤法（ML 法：maximum likelihood method）の3つである。それぞれ、系統推定の原理が異なり利点・欠点がある。この点については上島（1996）、長谷川・岸野（1996）、Swofford *et al.*（1996）に詳しい解説があるのでここでは詳細を

省くが、各手法の特徴を十分に把握した上で使用することが望ましい。

最近では、複数の DNA の領域（例えば Cyt.b 領域と Control 領域の両方の塩基配列）のデータを総合評価するのが容易で、進化速度の分類群による不一致、多重置換などが存在する条件下でも正しい系統関係を構築できる可能性が高い、などの長所から最尤法が使用されることが多くなっている。ただし、どれかひとつの手法のみを使って系統樹を作成している研究は、現在では希であり、近隣結合法、最大節約法、最尤法のうちいずれか2つ、もしくは全ての原理を用いて系統樹を作成し、各系統樹を比較することによって系統関係を論議している研究が、少なくとも鳥類では主流である。

実際にこれらの系統推定には、コンピューターソフトウェアを利用することになる。使用する系統推定法やオペレーションシステムにより多数のソフトウェアが出回っている。分子データを用いた系統推定に使用できるソフトウェア（名称、使用可能な手法、使用可能なオペレーションシステム、入手先）の一覧表は Swofford *et al.* (1996) に掲載されている。また、日本語での紹介は長谷川・岸野 (1996) に掲載されている。これらのソフトウェアのうち、鳥類の分子系統学的研究で頻繁に使用されているのは、幅広い手法が使用できる *PHYLP* (Felsenstein 1996) と最節約法を中心に使用できる *PAUP* (Swofford 1993) の2ソフトである。

2) 外群の使用

系統樹には、共通祖先からの分岐点（根=root）が示されているものと（有根系統樹）と示されていないもの（無根系統樹、ネットワーク）がある。上記3手法では基本的に無根系統樹を作成するようになっている。しかし、無根系統樹だけでは系統関係が判らないことが多いので、正確な系統関係を把握するには、系統樹に根を付けることが必要である。根を付けるために用いられる一般的な手法は、研究対象となる分類群（内群 ingroup）以外の分類群（外群 outgroup）のデータを利用する外群付根法（outgroup rooting）である。これは、外群の情報（塩基配列データ）を基に外群と内群を分けている枝の上に根を付ける方法だが、内群と系統関係が離れてすぎている外群を用いた場合、誤った系統樹を構築する場合がある。このため信頼性の高い系統樹を構築するためには、外群の選択にあたって、①できる限り内群と系統学的に近縁な分類群を用いる。②できるだけ多くの外群を用いることが必要である（上島 1996）。実際には系統推定ソフトウェアで系統樹を作成する際に、対象とする分類群の塩基配列データと共に外群の塩基配列データを入力することで根をつける事ができる。

3) 重みづけの問題

系統樹を作成する際、トランジション (TS) とトランスバージョン (TV) の起こり易さが異なることに基づいて重みづけする場合がある。鳥類の Cyt.b 領域では TS:TV = 20 : 1 (Edwards *et al.* 1991), 9 : 1 (Hackett 1995), 5 : 1 (Helbig *et al.* 1995) などが使用されているが、今のところ確定された値はなく、全く重みづけを行わない場合もある。多くの場合、複数の重みづけ値を用いて複数の系統樹を推定し、各系統樹の信頼性を検討した上で考察を加えている。

4) 多重置換の問題

系統樹の推定の際、しばしば問題になるのが一度置換した塩基が再び置換を起こす多重置換である。場合によっては再び元の塩基に戻ってしまうことも考えられる。特にコドンの3番目の塩基は進化速度が早く、Cyt.b領域において約10%の塩基配列の相違が存在する種間では、コドンの3番目の塩基の変異は飽和していることが知られている (Edwards *et al.* 1991, Hackett 1995)。このため、分化程度の大きい分類群間では誤った系統樹を推定する可能性が出てくる。分化程度の大きい分類群間の系統推定には、進化速度のより遅い領域を使用することで多重置換の影響をある程度排除することが可能である。実際には、Cyt.b領域で約10%以上の相違のある分類群の比較には進化速度の遅い 12SrRNA 領域の解析を併用することで、ある程度系統推定の誤りを防ぐことができると思われる。

5) データバンクの使用

これまでに解析された鳥類の塩基配列データは、ほとんどの場合データベースに登録されており、文中にデータの受入番号 (accession number) を明記すれば引用も可能である。また、自らの分析した塩基配列データを登録することもできる。日本では、国立遺伝学研究所生命情報センターが日本 DNA データバンク (略称 DDBJ) を運営している。また、海外のデータベース (米国の NCBI 及び NCGR, 欧州の EBI) と共同で国際 DNA データベース (DDBJ/EMBL/GenBank International Nucleotide Sequence Database) を共同構築し運営しているので、海外の研究例についても検索が可能である。データベースの利用法については国立遺伝学研究所生命情報センターに直接問い合わせることも可能であるが、詳しい解説書も市販されている (高木・金久 1996)。

6) 系統樹の信頼性の検討 (ブートストラップ法)

系統樹の中の特定の枝 (分岐) の信頼性を統計学的に評価する方法としては、ジャックナイフ法 (jackknife method) やブートストラップ法 (bootstrap method) などが知られている。現在最も頻繁に使用されている方法は、ブートストラップ法である。この方法は、系統樹を作成するのに使用した塩基配列データから無作為に塩基データ (1bp) を抜き出すことをくり返して、もとの塩基配列データの長さと同じ長さの疑似塩基配列データを作成し、それを使用して系統樹 (ブートストラップ系統樹) を作成する。ここまでの作業を1回として、同様の作業を多数回 (現在では通常1,000回以上) くり返す。この結果得られた多数のブートストラップ系統樹のうち、もとの塩基配列データから得られた系統樹の特定の枝が再現されたものの頻度 (%) を調べるものである (上島 1996)。疑似データを作成する際の抽出は、重複を許しているため、ある部分は複数回抽出され、他のある部分は全く抽出されないということが起こりうる。得られた頻度はブートストラップ確率 (bootstrap probability=BP) と呼ばれる。BPが100%に近いほど、その枝の信頼性は高いと考えられる。BPは各枝 (分岐) ごとに計算されるため系統樹のそれぞれの枝にBPが表示され、枝ごとの信頼度を評価することができる。従って、構築された系統樹の内、ある特定部分だけが信頼性が高く、他はあまり支持されないというケースは往々にして起こりうる。

BPは、得られた樹形がその分類群の系統関係を正しく示しているか否かを表わす値と

受け取られることが多いが、実際には使用した塩基配列データの範囲内に特定の枝（分岐）を支持するデータがどの程度含まれているかを大まかに示した値にすぎない（上島 1996）。使用したデータに何らかの偏りがあった場合や、データの量が少ない場合など、高い BP の値が得られたとしても実際には間違った系統関係を示している場合もある。系統樹の基になったデータの質を考慮することなしに BP の値の高低のみで系統樹の信頼性を評価するのは非常に危険である。

塩基置換は確率過程である以上、ある遺伝子の塩基配列から推定した系統関係は当然ながら誤差を含んでおり、その分子系統樹が100%正しいことはあり得ない（上島 1996）。また、系統樹作成法やその前提となる進化モデルにしても完成されたものではなく、様々な問題が依然として多く残されており、今後多くの点で改善が予想される。従って、現時点で作成された系統樹をそのまま鵜呑みにするのではなく、個々の系統樹の信頼性を冷静に判断する必要がある。改善された系統推定法を使用した場合、これまで提出されていた分子系統樹の樹形が変更になることも起こりうると思われる。しかし、解析された個々の塩基配列データそのものは信頼性が高く、系統樹作成法が改善されれば同じデータを用いて、よりよい分子系統樹を構築することが可能である。

7) 分子系統と他の形質から推定された系統の不一致

分子データから推定された系統樹と形態や生態的形質から推定された系統樹が一致しない場合どちらを信用すればよいのかといった疑問がしばしば呈される。塩基配列などの分子データ、特に mtDNA のみの塩基配列データを使用した場合の問題点や系統樹推定の原理や方法についての不確定要素は今のところ数多く存在しているため、現在示されている系統樹が正確であると断定はできない。また、前述した様に得られる系統樹の全ての枝が100%正しいことはあり得ない。

しかし、現在得られる情報の中で mtDNA の塩基配列データは最も有効な系統推定の道具であることは間違いなく、いくつかの問題点を除くことができれば、形態や生態に比べ系統を推定する能力は非常に高いと思われる。従って、問題点をクリアーした信頼性の高い分子データの系統と形態形質や生態形質から推定した系統が一致しない場合、分子データから得られた系統の方が対象とした分類群の分化の順番と分化の時間的な長さを正しく示している場合が多いと考えられる。ただし、分子データから推定された系統樹は、あくまで対象とした遺伝子領域（例えば Cyt.b 領域）の系統を示しているのであって、この遺伝子系統樹を実際の分類群の系統を示す系統樹であるとみなすには、遺伝子の系統関係と分類群の系統関係が同形であるとの仮定が必要になる（三中 1997）。遺伝子系統樹を基に分類群の系統を論じる場合には、この点に注意することを忘れてはならない。

研究事例

1990年代には DNA を利用した多くの系統学的研究が行われ、対象となった分類群も多岐にわたる（Table 2）。最近の研究例については石田（1996）、Baker & Marshall（1997）、Houde *et al.*（1997）、Moor & DeFilippis（1997）によって総説がなされている。ここでは DNA の塩基配列データから鳥類の系統解析を行った研究の中から、日本に

Table 2. Example of avian molecular phylogenetic studies, 1990 to 1998.

Taxon 対象とする分類群	Method 1) 解析手法	Gene(bp) 2) 領域(解析塩基数)	References 文献
<i>Struthio camelus</i> ssp. ダチョウの亜種	RFLP		Freitag & Robinson (1993)
Procellariiformes, Sphenisciformes ミズナギドリ目, ペンギン目	Seq, Allo	12SrRNA (381bp)	Paterson <i>et al.</i> (1995)
Diomedidae アホウドリ科	Seq	Cyt.b (1143bp)	Nunn <i>et al.</i> (1996)
<i>Pterodroma heraldica</i> シロハラミズナギドリ属の1種	Seq	Cyt.b (307bp)	Brooke & Rowe (1996)
<i>Puffinus lherminieri</i> , <i>P. assimilis</i> ヒメミズナギドリ, セグロミズナギドリ	Seq	Cyt.b (307bp)	Austin (1996)
<i>Psudebulweria</i> , <i>Bulweria</i> アナドリ属他	Seq	Cyt.b (496bp)	Bretagnolle <i>et al.</i> (1998)
<i>Oceanodroma</i> ウミツバメ属	Seq	Cyt.b (302bp)	Dawson <i>et al.</i> (1997)
<i>Zebrilus undulatus</i> , <i>Tigriornis leucolophus</i> コビトトラフサギ, アフリカトラフサギ	Hybrid		Sheldon <i>et al.</i> (1995)
<i>Aquila</i> イヌワシ属	Seq	Cyt.b (1026bp)	Seibold <i>et al.</i> (1996)
<i>Branta canadensis</i> , <i>B. sandvicensis</i> カナダガン, ハワイガン	RFLP		Quinn <i>et al.</i> (1991)
<i>Anas</i> , <i>Mergus</i> マガモ属, アイサ属	RFLP		Tuohy <i>et al.</i> (1992)
<i>Anas platyrhynchos</i> , <i>A. superciliosa</i> マガモ, マミジロカルガモ	RFLP		Rhymer <i>et al.</i> (1994)
<i>Tympanuchus</i> ソウゲンライチョウ属	RFLP, Allo		Ellsworth <i>et al.</i> (1994)
Tetraoninae ライチョウ亜科	RFLP		Ellsworth <i>et al.</i> (1995)
Tetraoninae ライチョウ亜科	Seq	Cyt.b (609bp)	Ellsworth <i>et al.</i> (1996)
<i>Callipepla</i> ウロコウズラ属	Seq	Cyt.b, ND2 (1040bp)	Zink & Blackwell (1998)
<i>Francolinus</i> シャコ属	RFLP		Crowe <i>et al.</i> (1992)
Gruidae ツル科	Seq	Cyt.b (1042bp)	Krajewski & Fetzner, Jr. (1994)
<i>Gurs antigone</i> オオヅル	Seq	Cyt.b, tRNA ^{Thr} tRNA ^{Pro} , (1304bp)	Krajewski & Wood (1995)
<i>Gurs antigone</i> ssp. オオヅルの亜種	Seq	Cyt.b, tRNA ^{Thr} tRNA ^{Pro} , ND6(1831bp)	Wood & Krajewski (1996)
<i>Rhynchotos jubatus</i> カゲー	Seq	12SrRNA (400bp)	Kakizawa <i>et al.</i> (1996)
<i>Phalaropus</i> ヒレアシシギ属	RFLP		Dittmann & Zink (1991)
<i>Calidris alpina</i> , <i>Arenaria interpres</i> ハマシギ, キョウジョシギ	Seq	Control (1000bp)	Wenink <i>et al.</i> (1994)
<i>Calidris alpina</i> ハマシギ	Seq	Control (608bp)	Wenink & Baker (1996)
<i>Calidris paramelanotos</i> Cox's Sandpiper	Seq, Allo	Cyt.b (288bp)	Christidis <i>et al.</i> (1996a)
<i>Brachyramphus perdix</i> マダラウミスズメ属の1種	Seq, Allo	Cyt.b (1045bp)	Friesen <i>et al.</i> (1996)

Table 2. continued

Taxon 対象とする分類群	Method 1) 解析手法	Gene(bp) 2) 領域(解析塩基数)	References 文献
<i>Geopeltacus occidentalis</i> , <i>Pezoporus wallicus</i> ヒメフクロウインコ, キジインコ	Seq	Cyt.b (924bp)	Leeton <i>et al.</i> (1994)
<i>Cuculus canorus</i> カッコウ	Seq	ND6 (474bp)	Jones & Gibbs (1997)
Strigiformes フクロウ目	RFLP		Li <i>et al.</i> (1998)
<i>Mimizuku gurneyi</i> オニコノハズク	Seq	12SrRNA, COI (2140bp)	Miranda <i>et al.</i> (1997)
Trochilidae ハチドリ科	Hybrid		Bleiweiss <i>et al.</i> (1994)
<i>Anthracoceros</i> カササギサイチョウ属	Seq	Cyt.b (189bp)	Srikwan & Woodruff (1998)
Capitonidae, Ramphastidae ゴシキドリ科, オオハシ科	Seq	Cyt.b (888bp)	Lanyon & Hall (1994)
<i>Sphyrapicus</i> シルスイキツツキ属	Seq	Cyt.b (711bp)	Cicero & Johnson (1995)
<i>Leptopogon</i> ハシボソハエトリ属	RFLP, Allo		Bates & Zink (1994)
<i>Empidonax traillii</i> , <i>E. alnorum</i> メジロハエトリ, キタメジロハエトリ	RFLP		Winker (1994)
<i>Certhilauda albescens</i> ウスイロハシボソヒバリ	Seq	Cyt.b (495bp)	Ryan <i>et al.</i> (1998)
Hirundinidae ツバメ科	Hybrid		Sheldon & Winkler (1993)
Hirundinidae ツバメ科	Hybrid		Winker & Sheldon (1993)
<i>Anthus</i> タヒバリ属	Seq	Cyt.b (1041bp)	Arctander <i>et al.</i> (1996)
Motacillidae セキレイ科	Seq	Cyt.b (1035bp)	Voelker & Edwards (1998)
<i>Laniarius</i> ヤブモズ属	Seq	Cyt.b (295bp)	Smith <i>et al.</i> (1991)
<i>Toxostoma lecontei</i> サボテンムジツグミモドキ	Seq	Cyt.b, ND6 (619bp)	Zink <i>et al.</i> (1997)
Muscicapidae ヒタキ科他	Seq	Cyt.b, 18SrRNA (936bp)	Chikuni <i>et al.</i> (1996)
<i>Pomatostomus</i> オーストラリアマルハシ属	Seq	Cyt.b, 12SrRNA (633bp)	Edwards & Wilson (1990)
<i>Pomatostomus temporalis</i> オーストラリアマルハシ	Seq	Control (400bp)	Edwards (1993)
<i>Acrocephalus</i> ヨシキリ属	Seq	Cyt.b (1068bp)	Leisler <i>et al.</i> (1997)
<i>Phylloscopus</i> メボソムシクイ属	Seq	Cyt.b (910bp)	Richman & Price (1992)
<i>Phylloscopus bonelli</i> , <i>P. nitidus</i> ボネリームシクイ, ミドリムシクイ	Seq	Cyt.b (1038bp)	Helbig <i>et al.</i> (1995)
<i>Phylloscopus collybita</i> チフチャフ	Seq	Cyt.b (1041bp)	Helbig <i>et al.</i> (1996)
<i>Turnagra capensis</i> ニュージーランドツグ	Seq	Cyt.b (924bp)	Christidis <i>et al.</i> (1996b)
<i>Parus</i> シジュウカラ属	RFLP		Ball & Avise (1992)

Table 2. continued

Taxon 対象とする分類群	Method 1) 解析手法	Gene(bp) 2) 領域(解析塩基数)	References 文献
<i>Parus</i> シジュウカラ属	RFLP		Gill & Slikas (1992)
<i>Parus</i> シジュウカラ属	Hybrid		Sheldon <i>et al.</i> (1992)
<i>Parus</i> シジュウカラ属	RFLP		Gill <i>et al.</i> (1993)
<i>Parus</i> シジュウカラ属	Seq	Cyt.b (439bp)	Kvist <i>et al.</i> (1996)
Paridae シジュウカラ科	Hybrid		Sheldon & Gill (1996)
Paridae シジュウカラ科	Hybrid		Slikas <i>et al.</i> (1996)
<i>Sitta</i> ゴジュウカラ属	Seq	Cyt.b (491bp)	Pasquet (1998)
<i>Zosterops luteus</i> , <i>Z. lateralis</i> キバラメジロ, ハイムネメジロ	RFLP		Degnan & Moritz (1992)
<i>Apalopteron familiare</i> メグロ	Seq	12SrRNA (401bp)	Springer <i>et al.</i> (1995)
<i>Passerella iliaca</i> , <i>Melospiza melodia</i> ゴマフスズメ, ウタスズメ	RFLP		Zink (1991)
<i>Passerella iliaca</i> ゴマフスズメ	RFLP		Zink (1994)
<i>Melospiza melodia</i> ウタスズメ	RFLP		Hare & Shields (1992)
<i>Melospiza georgiana</i> ヌマウタスズメ	Seq	Control, COII tRNAIys, ATP8 (641bp)	Greenberg <i>et al.</i> (1998)
<i>Zonotrichia</i> ミヤマシトド属	RFLP		Zink <i>et al.</i> (1991a)
<i>Zonotrichia capensis</i> アカエリシトド	RFLP		Lougheed & Handford (1993)
<i>Passerculus sandwichensis</i> クサチヒメドリ	RFLP		Zink <i>et al.</i> (1991c)
<i>Ammodramus caudacutus</i> トゲオヒメドリ	RFLP		Rising & Avise (1993)
<i>Spizella</i> ヒメドリ属	RFLP		Zink & Dittmann (1993)
<i>Pipilo</i> , <i>Spizella</i> トウヒチョウ属, ヒメドリ属	Seq, RFLP	Cyt.b (433bp)	Dodge <i>et al.</i> (1995)
<i>Piranga</i> フウキンチョウ属	Seq	Cyt.b (1045bp)	Burns (1998)
<i>Diglossa baritula</i> ハナサンミツドリ	Seq, Allo	Cyt.b (307bp)	Hackett (1995)
<i>Hemignathus</i> ユミハンハワイミツスイ属	RFLP		Tarr & Fleischer (1993)
Vireonidae モズモドキ科	Seq	Cyt.b (273bp)	Murray <i>et al.</i> (1994)
<i>Quiscalus quiscula</i> オオクロムクドリモドキ	RFLP		Zink <i>et al.</i> (1991b)
<i>Carduelis flammea</i> , <i>C. hornemanni</i> ベニヒワ, コベニヒワ	RFLP		Seutin <i>et al.</i> (1995)
Corvidae カラス科	Seq	Cyt.b (1143bp)	Helm-Bychowski & Cracraft (1993)

Table 2. continued

Taxon 対象とする分類群	Method 1) 解析手法	Gene(bp) 2) 領域(解析塩基数)	References 文献
Corvidae カラス科 (カケス類)	Seq	Cyt.b (1143bp)	Monteros & Cracraft (1997)
Many species 旧大陸と新大陸両方に分布する種	RFLP		Zink <i>et al.</i> (1995)

1) Seq: Nucleic acid sequencing 塩基配列の直接読みとり, Hybrid: DNA-DNA Hybridization method DNA-DNA 交雑法, RFLP: RFLP method 制限断片長多型の検出, Allo: Allozyme method 酵素タンパク質多型検出法

2) Indicate only Nucleic acid sequencing method. 塩基配列を読みとる手法を使用した研究例についてのみ表示.

生息する種の系統推定と分類に関する成果のいくつかを紹介する.

1) アホウドリ類

Nunn *et al.* (1996) によって, 現生のアホウドリ類全14種の系統解析が Cyt.b 領域の全塩基配列1,143bpを用いて行われ, アホウドリ *Diomedea albatrus* の最近縁種は, 太平洋を挟んだ反対側に繁殖するガラパゴスアホウドリ *D. irrorata* であることが示された. また, この研究からクロアシアホウドリ *D. nigripes* とコアホウドリ *D. immutabilis* が近縁であること, これら北半球 (ガラパゴスアホウドリは赤道直下) で繁殖するアホウドリ類4種が比較的近縁な1つのグループを形成することなども明らかになった. Nunn *et al.* (1996) は, この研究に基づいてアホウドリ, ガラパゴスアホウドリ, コアホウドリ, クロアシアホウドリの4種を *Diomedea* 属から分離して *Phoebastria* 属とする新分類体系を提唱した. この分類体系は American Ornithologists' Union (1997) によって採用されているが, 日本では今のところ採用されていない (日本鳥学会目録編集委員会 1997).

2) タンチョウ

Krajewski & Fetzner, Jr. (1994) によって, 現生のツル類全14種の系統解析が Cyt.b 領域の塩基配列1,142bpを用いて行われ, タンチョウ *Grus japonensis* が, 遺伝的にクロヅル *G. grus*, オグロヅル *G. nigricollis*, ナベヅル *G. monacha*, アメリカシロヅル *G. americana* の4種と比較的近縁な1つのグループを形成するものの, これら5種の中では最も早期に分化しており, 現生ツル類の中に 遺伝的にごく近縁な種は存在しないことなどが明らかにされた.

3) アカハラ・シロハラ・マミチャジナイ

日本及びその周辺に繁殖分布するシロハラ *Turdus pallidus*, マミチャジナイ *T. obscurus*, アカハラ *T. chrysolaus* の3種のツグミ類は, 形態的に類似点が多いこと, 分布が側所的であることなどから比較的近年分化した近縁な種 (上種 *superspecies*) であると考えられていた (日本鳥学会 1974, Morioka 1982). Chikuni *et al.* (1996) の塩基配列データ (Cyt.b 領域の部分塩基配列646bp) を用いた系統解析からも, これら3種の分化の程度が低く, 遺伝的な面からも近縁なひとつのグループを形成することが確かめら

れた(各種間の相違は分析された配列全体の約3.0%程度, 同属のツグミ *T. naumanni* やクロツグミ *T. cardis* とは6%以上の相違がある)。

4) オオヨシキリ

日本でも繁殖するオオヨシキリは, 形態の研究に基づきニシオオヨシキリ *Acrocephalus arundinaceus* の1亜種 *A. a. orientalis* として扱われることが多いが(日本鳥学会 1974, 日本鳥学会目録編集委員会 1997), 独立種 *A. orientalis* とする考えもあり見解は統一されていない(Shirihai *et al.* 1995), Leisler *et al.* (1997) による Cyt.b 領域の部分塩基配列1,068bpを用いた系統解析ではオオヨシキリはチュウヨシキリ *A. stentoreus* と遺伝的に近縁(両者の相違は平均4.2%)で, ニシオオヨシキリとはやや類縁が遠い(平均6.3%の相違)ことが明らかになった。

5) イイジマムシクイ・センダイムシクイ

日本固有種であるイイジマムシクイ *Phylloscopus ijimae* の類縁については, 過去における研究からセンダイムシクイ *P. coronatus* に近縁であるとする説(Ticehurst 1938)とエゾムシクイ *P. tenellipes* に近縁とする説が存在した(Williamson 1976)。Cyt.b 領域の部分塩基配列910bpの分析から得られた系統樹は, イイジマムシクイがセンダイムシクイに近縁であること(7.9%の相違), 及びエゾムシクイがこれら2種とは異なる系統に属することを示した(Richman & Price 1992)。また, センダイムシクイは形態的研究からヒマラヤに隔離分布するニシセンダイムシクイ *P. occipitalis* の1亜種 *P. o. coronatus* として扱われる場合が多かった(日本鳥学会 1974)。しかし, 塩基配列データはセンダイムシクイとニシセンダイムシクイが別系統に属し, 分化程度も比較的大きいこと(11.6%の相違)を示した。日本でも現在はセンダイムシクイとニシセンダイムシクイを別種とする分類体系を採用している(日本鳥学会目録編集委員会 1997)。

6) メグロ

小笠原諸島に生息するメグロ *Apalopteron familiare* は, 研究者間で分類学的見解が一致しない種であった。これまで形態に基づきヒヨドリ科, メジロ科, チメドリ科, ミツスイ科に分類されたことがあり, 現在はミツスイ科の1属1種として分類されている(Deignan 1958, 日本鳥学会 1974)。Springer *et al.* (1995) は, 12SrRNA 領域の部分塩基配列401bpを用いてメグロの系統解析を行い, メグロが遺伝的には, 同じく1属1種のオウゴンミツスイ *Cleptornis marchei* に近縁で, この2属がミツスイ科よりもメジロ科に近縁であることを明らかにした。しかし, 分子系統解析に用いた分類群が十分でないこと, 形態形質など他形質の検討が十分でないことを理由にメグロをメジロ科に含む分類体系は日本では今のところ採用されていない(日本鳥学会目録編集委員会 1997)。

日本における研究課題

日本及びその周辺においては, 分子系統学的手法を導入して研究にあたるべき研究課題が, 未だ大量に存在している。この点については1987年に開催された日本鳥学会の津戸基

金によるシンポジウム「アジア・太平洋地域における鳥類の進化・生態学とDNA多型利用の可能性」の中で上田恵介氏が総説している(上田 1997)。重なる部分も多いがいくつかの課題を示しておく。この中にはすでに分子系統学的研究が着手されている分類群もあるが、少なくとも論文として発表されたものはない。また、ここにあげた分類群については、塩基配列が解析されていないのみではなく、形態、行動、生態など各方面からの情報が不足している場合が多く、今後各方面からの研究を進める必要がある。

1) 日本固有種の系統関係

日本固有種の中には、系統関係が明らかになっていない種が多い。その中には形態や行動から類推された系統関係が複数提唱され、研究者間での見解が一致しない種も多い。

奄美大島のルリカケス *Garrulus lidthi* については、ヒマラヤに隔離分布するインドカケス *G. lanceolatus* との共通祖先を持つ遺存種とする説と単に島に隔離されたカケス *G. glandarius* が特殊化したものであるという説がある(山階 1942b, Kuroda 1957, 森岡 1974, Madge & Burn 1994, Higuchi *et al.* 1995)。

セグロセキレイ *Motacilla grandis* についてもインドのオオハクセキレイ *M. maderaspatensis* と共通祖先を持つ遺存種説とハクセキレイ *M. alba* に近縁とする説の両方がある(中村 1985, 1987, Higuchi & Hirano 1989)。

アカコッコ *Turdus celanops* はアカハラ *T. chrysolaus* に近縁とする説とミヤンマーに生息するムナグロアカハラ *T. dissimilis*, もしくはタイワンツグミ *T. poliocephalus* のボルネオ産亜種 *T. p. seebhomi* と近縁な遺存種とする説の両方が提案されていて系統的な位置が定まっていない(山階 1942, 藤村 1948, 日本鳥学会 1974, Kawaji *et al.* 1989, 森岡 1990)。

ノグチゲラ *Sapheopipo noguchii* の近縁種や系統関係についても古くからアカゲラ *Dendrocopos* 属もしくはアオゲラ *Picus* 属との類縁が示唆されてきた(山階 1941, 1955)。近年においては、エビチャゲラ *Blythipicus* 属及びタケゲラ *Gecinulus* 属に近縁とする説(Short 1973a,b), オオアカゲラ *Dendrocopos leucotos* から直接分化したとする説(Goodwin 1968), ヤマゲラ *Picus canus* との類縁関係を示唆する説(森岡 1974) など様々な意見があり、明確な結論はでていない。

これら系統関係について複数の説が提唱されているものの内のいくつかは、収斂進化を真の系統と見誤っている可能性が高い。DNA解析を行うことで少なくとも収斂進化の影響は取り除けるものと思われる。真の系統関係を明らかにすることは、これら固有種の進化及び固有化の歴史を考える上で不可欠である。

一方で、類縁関係についてほぼ統一見解が示されている固有種もいくつか知られている。これらの種についてもDNA解析を行うことで従来から提唱されていた類縁関係に強力な裏付けが得られ、分岐の順序や年代などの系統学的情報が得られる可能性が高い。

例えば、ヤマドリ *Syrnaticus soemmerringii* は、台湾の高山に生息するミカドキジ *S. mikado*, カラヤマドリ *S. ellioti*, オナガキジ *S. reevesii*, ビルマカラヤマドリ *S. humiae* との類縁性が指摘されている(Higuchi *et al.* 1995)。ヤマドリについては国内で顕著な亜種分化をも生じており、これら亜種間の系統についても興味深い課題である。

アマミヤマシギ *Scolopax mira* とヤマシギ *S. rusticola* は形態から近縁と考えられて

いるが(森岡 1974), 分化の程度など不明な点も多い。また, これら2種と東南アジアの島嶼性ヤマシギ類3種(ミナミヤマシギ *S. saturata*, セレベスヤマシギ *S. celebensis*, オビヤマシギ *S. rochussenii*) 及び北米に広く分布するアメリカヤマシギ *S. minor* との系統関係も不明である。ヤンバルクイナ *Rallus okinawae* はフィリピンなど東南アジアの島嶼に分布するムナオビクイナ *R. torquatus* との類縁性が形態面から指摘されているが具体的な研究は行われていない(Yamashina & Mano 1981, 黒田ら 1984)。

ミゾゴイ *Nycticorax goisagi* はズグロミゾゴイ *N. melanolophus* との, カラスバト *Columba janthina* はアカメカラスバト *C. vitiensis* などとの類縁関係が示唆されている(黒田 1972)。

アカヒゲ *Erithacus komadori* についてもコマドリ *E. akahige*, シマゴマ *E. sibilans* など他の *Erithacus* 属の種との系統関係が不明な上, 亜種分類上の問題も解決されていない(山階 1942b, Kawaji & Higuchi 1989)。

ノジコ *Emberiza sulphurata* の系統関係についてはアロザイムによる研究によってアオジ *E. spodocephala* に非常に近縁で次いでクロジ *E. variabilis* に近縁であることが明らかになっている(Watada *et al.* 1995)。ただし, この点についてDNAを用いての追試は今のところおこなわれていない。

2) ヨーロッパの類似種との関係

ヨーロッパコマドリ *Erithacus rubecula* とコマドリ *E. akahige*, ヨーロッパアオゲラ *Picus viridis* とアオゲラ *P. awokera*, ヨーロッパカヤクグリ *Prunella modularis* とカヤクグリ *P. rubida*, オニミズナギドリ *Calonectris diomedea* とオオミズナギドリ *C. leucomelas* など別種と考えられているが形態的に良く似た種がヨーロッパと日本周辺に隔離して分布している例は多い(Meinertzhagen 1951, 黒田 1972)。しかし, これらが共通の祖先を持つ近縁種なのか, 単に収斂して形態が類似しているのかについては未だに明らかになっていない。また同属の他種も交えた系統関係については研究が進んでいない。

オナガ *Cyanopica cyana* は, ヨーロッパのイベリア半島と日本を含む東アジア地域に極端に隔離された分布域を持つが, 形態的な類似から同種と考えられている(Meinertzhagen 1928, 1951)。このような隔離された分布域を持つためにオナガは, 新生代第三紀起源の古い種と考えられることが多い(Udvardy 1969, 黒田 1972, 中村 1992)。しかし, イベリア半島のオナガについては, 人為的移入種である可能性も示唆されている(Goodwin 1986)。形態的には, 亜種分化が認められることから人為的な移入種である可能性は低いと思われるが, この点についての遺伝的側面からの考察は今のところ行われていない。

3) 日本と中国大陆に隔離分布する種

日本国内以外には中国大陆に隔離された極めて局地的な繁殖分布域を持つ種がいくつか知られている。両分布域間の個体の交流が現在もあるのか否か, 両者の分化程度など, DNA解析を利用することで明らかになることも多いと思われる。このような分布域を持つ種としては, キビタキ *Ficedula narcissina*, クロツグミ *Turdus cardis*, オオセッカ

Locustella pryeri, コジュリン *Emberiza yessoensis*, トキ *Nipponia nippon* などがあげられ, このうちキビタキ, オオセッカ, コジュリンについては, 大陸に分布する個体群と日本国内に分布する個体群の間に形態的に亜種分化が認められている(クロツグミもかつては別亜種に分類されていたことがある). キビタキ, クロツグミについては近縁と推測される種(キビタキにはマミジロキビタキ *Ficedula zanthopygia*, クロツグミにはカラアカハラ *Turdus hortulorum*, ムナグロアカハラ *T. dissimilis*) が側所的に分布しておりそれらとの系統関係も不明である. 側所的な分布ではないものの, コジュリンの分布域の近辺にも近縁と思われるシベリアジュリン *E. pallasi*, オオジュリン *E. schoeniclus* が分布しており, 3者間の系統関係ははっきりしていない.

キビタキについては, 国内にも亜種分化が認められており(南西諸島に分布するリュウキュウキビタキ *F. n. owstoni*), 中国大陸の亜種 *F. n. elisae* を含めた3亜種間の系統関係も明らかにはなっていない.

4) 多様な亜種分化を示す種

日本列島及びその周辺を中心とする比較的狭い分布域の中で顕著な亜種分化を示す種として, コゲラ *Dendrocopos kizuki* (13亜種), ヒヨドリ *Hypsipetes amaurotis* (14亜種), ウグイス *Cettia diphone* (12亜種), ヤマガラ *Parus varius* (8亜種), メジロ *Zosterops japonicus* (9亜種), カワラヒワ *Carduelis sinica* (6亜種), などがある. これらの亜種間系統や分化程度について研究することで亜種分化のシステムを明らかにできる可能性がある.

さらに, 広い分布域を持ち多くの亜種分化を示す種の中で, 日本に分布する亜種が重要な分化を示している例として, キジ *Phasianus colchicus* (33亜種), オオアカゲラ *Dendrocopos leucotos* (16亜種), トラツグミ *Zoothera dauma* (16亜種), メボソムシクイ *Phylloscopus borealis* (7亜種), シジュウカラ *Parus major* (31亜種), エナガ *Aegithalos caudatus* (19亜種), ウソ *Pyrrhula pyrrhula* (10亜種), カケス *Garrulus glandarius* (36亜種), ハシブトガラス *Corvus macrorhynchos* (14亜種) などがあげられる. これらの多くは日本国内に他地域とは形態的に大きく異なる固有亜種が生息している. これらは独立種か亜種かといった問題が論議されることも多いが, いずれも亜種間の系統関係や遺伝的な分化程度すら明らかになっていない. 例えば, トラツグミ *Z. dauma* の奄美大島固有亜種であるオオトラツグミ *Z. d. major* は, 囀りや尾羽の枚数などの独自性を根拠に, 近年独立種として扱うべきとの意見が盛んに提出されている (Ishihara 1986, 石田 1996, 奄美野鳥の会 1997). しかし, トラツグミ *Z. dauma* は, 亜種により尾羽の枚数(12枚の亜種と14枚の亜種が知られる)や体の大きさなどの形態形質や囀りなどが多様である. 亜種オオトラツグミ *Z. d. major* に囀りが類似し, 尾羽の枚数も同じ12枚の亜種も, ヒマラヤ産の基亜種 *Z. d. dauma* をはじめとしていくつか知られている. このため, 亜種オオトラツグミの地位を明らかにするには, 日本国内に分布する亜種のみと比較検討だけでは不十分であり, 種内の亜種全体の系統や分化程度についての研究が必要である. 分子系統学的アプローチは, このような種の研究には非常に適している. 他に同様の問題を抱える分類群としては, リュウキュウコノハズク *Otus elegans*, オオコノハズク *Otus bakkamoena*, シロガシラ *Pycnonotus sinensis orii*, リュウキュウサンショ

ウクイ *Pericrocotus divaricatus tegimae*, ウチャマセンニュー *Locustella pleskei* などがあげられる。これらの種・亜種についてもDNAを用いた系統解析を行うことで混乱している類縁関係や系統上の問題の解決に新たな進展をもたらすことができる可能性が高い。

5) 絶滅種の系統

日本にはすでに絶滅したと考えられる固有の種・亜種がいくつか知られており、これら絶滅種・亜種の系統関係についても興味深い問題が未解決のまま残されている。絶滅したと思われる日本固有種としては、現存するカラスバト *Columba janthina* との類縁関係が示唆されているオガサワラカラスバト *C. versicolor* 及びリュウキュウカラスバト *C. jouyi* (山階 1955, 森岡 1974), グァム島やボナペ島に分布するズアカシヨウビン *Halcyon cinnamomina* のグァム島産亜種アカハラシヨウビン *H. c. cinnamomina* と羽色が酷似しており (山階1955), 採集地の誤記載の可能性をも含めて独立種であることが疑問視されているミヤコシヨウビン *H. miyakoensis* (森岡 1974, 1989), ネパールに分布するベニマユマシコ *Pinicola subhimachalus* など様々な種との類縁が示唆されていて意見が統一されていないオガサワラマシコ *Chaunoproctus ferreorostris* (Seeböhm 1890, 初山 1930, Morioka 1992), 今のところ類縁が全く判明していないオガサワラガビチヨウ *Zoothera terrestris* の5種が知られている。

絶滅したと思われる日本固有亜種としては、ハシブトゴイ *Nycticorax caledonicus crassirostris*, マミジロクイナ *Poliolimnas cinereus brevipes*, ダイトウミソサザイ *Troglodytes troglodytes orii*, ダイトウウグイス *Cettia diphone restrictus*, ダイトウヤマガラ *Parus varius orii*, ムコジマメグロ *Apalopteron familiare familiare* が知られている。これら種・亜種の系統関係についても不明な点が多く残されている。また、日本固有ではないが、キタタキ *Dryocopus javensis richardsi* の対馬個体群及びカンムリツクシガモ *Tadorna cristata* も絶滅したと考えられており、特にカンムリツクシガモについては、他のツクシガモ *Tadorna* 属の種との系統関係すら明らかではない。

これらの絶滅種及び亜種のうち、標本が全く現存していないことが明らかになっているのはダイトウウグイスのみである。他の全ての種・亜種については国内もしくは国外の博物館に標本が現存していることから、分子系統学的手法による系統解明が期待できる。ただし、前述の通り標本からのサンプル採取には、標本の破壊が伴う点について極めて慎重に考慮する必要がある。

分子データと分類 (特に種分類について)

分子系統学的研究の考察には分類に関わる部分が含まれることもあるが、必ずしもこれらの研究は分類の再考を主目的とはしておらず、扱った分類群の系統を探るのが主な目的である。系統学と分類学は明らかに別の学問分野であり、系統解析の結果を必ずしも分類学と結びつけて考える必要はない。しかし、実際には、分子データを用いた系統解析の結果、収斂進化が明らかになった場合 (同種と考えられていた2つの分類群が、遺伝的には異なる系統に所属していた場合など) や、塩基配列の分化程度が従来研究されてきた形態などの分化程度と一致しない時などには、分類学的取り扱いについて言及している場合が

多い。これまで行われた鳥類の分子系統学的研究においては、このような場合、明らかな収斂進化を別にすれば、DNAの塩基配列データからのみではなく、生態や形態形質、分布状況なども検討した上で考察をしていることが多い。

しかし、最近では鳥類の塩基配列データ、特にCyt.b領域に関しては多くの例が蓄積されてきているため、塩基配列の分化程度と種・亜種の分類についての関連性が考察され始めている。Helbig *et al.* (1995) がまとめたCyt.b領域の分化率（2つの分類群で比較された塩基配列にしめる塩基の置換の割合）は、亜種もしくは個体群の関係にある2つの分類群間で最高2.6%程度であった。一方、最も近縁な2種間の相違は0.2~10%以上まで様々である。実際には別種に分類されている種間の相違が亜種間の相違よりも小さい例も多い (Helbig *et al.* 1995)。亜種間の相違が2.6%よりも大きい例もその後知られているので (Leisler *et al.* 1997)、これらの値については今後も変更が予測される。

今のところ、2.6%のCyt.b領域の塩基配列の相違を基準にそれ以上の相違が検出された場合を種とするような、境界線は主張されて居らず、多くの論文の著者が塩基配列の分化程度のみを使用しての種・亜種の線引きには否定的であることから (Leisler *et al.* 1997) 今後も境界線として、この値が単独で利用されることはないと推測される。しかし、この値は分類の再検討を行う目安としては利用可能である。塩基配列データの相違を目安にして、亜種と分類されているが遺伝的には分化程度が大きい分類群や別種として分類されているが遺伝的には非常に近い分類群を検出し、これまで用いられていた分類形質の再検討を行うことが可能となる。

塩基配列データを分類の根拠として単独で使用するのはいまのところ困難であるとしても、今後、分子系統の研究が増加することで急速に分類の再検討が行われる可能性は高く、実際欧米では分子系統学的研究例の増加に伴い多くの分類群で分類の見直しが行われている (Knox 1994, Martin 1996)。しかし、研究例が増加する一方で「サンプルがあり、分子遺伝学的解析を行えばデータは得られるであろうし、論文も書けるだろう。そうした論文を最近しばしば見かけるが分類学的視点を欠いた論文は、こうしたらこうなったというだけのもので、ほとんど何の価値もない」という批判もある (森岡 1997)。分子データを扱う場合も対象とする分類群の持つ、分類学的課題や問題点を把握しながら研究を進めることは解析した系統関係を検討・考察する上でも重要であり、分類学者から批判されないサンプリングを行う上での基礎ともなる。

考 察

DNAを用いた系統解析は、植物、昆虫から哺乳類まで鳥類以外の広い分類群において、日本でもすでに一般的な研究分野となりつつある。にもかかわらず鳥類においてのみ極端にこの分野の発達が遅れているのは、著者を含め、この国の現在の鳥類研究者の大半がフィールドワークを好み、実験室での分析を嫌う傾向があること、及び魅力的な研究課題を示してこなかったことに原因があるように思われる。形態などの形質を用いて系統の研究を行う国内の研究者がほとんど絶滅危惧種のような状態であることも、この分野の発達遅滞を助長した一因であるかもしれない。前述した様に、鳥類においても日本列島及びその周辺には分子系統学的研究課題が山積している。この点については国内の研究者よりも海外の

研究者の方が正確に認識しているらしく、欧米の研究者からのサンプル提供要請も年々増加している。また、海外で発表される鳥類の分子系統学的研究論文の謝辞やサンプル提供者として日本人の名を認めることは、決して希ではない。海外の研究者に彼らの欲しがるサンプルを提供して、この分野の研究を進めてもらうのも悪くはない。あるいは、そうした方が日本周辺の鳥類進化上の不明点が明らかになる日は早まるかもしれない。しかし、必要な機器・薬品の入手が容易で、手法の簡略化・自動化が進んだ現在、国内でも独自に鳥類の分子系統学的研究を行うのは十分に可能である。海外の研究者と協力して研究を進める場合にも、一方的なサンプル提供ではなく、対等な意味での共同研究を行える素地を形成することは、我が国の鳥類学に課せられた重要なテーマであろう。

分子系統学的分野で使用される分析手法としては、今後もダイレクトシーケンシングによる解析が主流であり続ける確率が高いが、非常に技術革新の速度が速い分野であるため新たな手法が開発される可能性もある。少なくともDNA抽出や増幅、解析などの手法は今後も簡略化と短時間化が急速に進むと思われる。分析される領域や塩基数は現在のところ増加傾向にあるが、今後とも限りなく増加してゆく可能性は低いと推測される。現在鳥類の系統解析によく利用されているmtDNAの3領域(12SrRNA, Cyt.b, Control)についてフルベース(全塩基対)を読みとり比較することができれば、少なくとも低次分類群間(属、種、亜種レベル)の系統関係を明らかにするには十分であると思われる。当然、より系統解析に適した領域が発見されれば、解析に利用される領域の変更は十分に考えられる。しかし、当面はmtDNAの他の領域についての探求よりも、遺伝様式の異なる核DNAにおいて利用可能な領域を確定することの方が急務となるであろう。得られた塩基配列データから系統推定を行うための手法やそれを表現するための方法、信頼性を統計的に検討する手法は、今後も引き続き改良が行われると思われる。系統学的研究において提示された系統樹を理解し、信頼性などを判断するには、これらの手法の理解が不可欠である。系統学に直接関与しない鳥類研究者もある程度これらの手法を理解することで、質の悪い系統樹を無批判に信じ込むような事態を防ぎ、示された系統樹の善し悪しを自ら判断することができる。

日本の鳥類分類学が分子系統学の成果を今後どの様に取り込むのかは明らかでないが、海外の状況から推測して、現在使用されている分類が再検討を迫られる可能性は高い。ただし、鳥類系統学(分子系統学を含む)と鳥類分類学の研究者を合わせても片手の指にも足りない現状では、現時点での活発な論議はほとんど望めそうにない。

いずれにせよ、分子系統学的研究が増加することにより、日本列島周辺に解かれないまま放置されている多くの鳥類進化上の謎に新たな視点からの考察が加えられ、鳥類進化に関する研究が急速に進展する可能性は非常に高い。鳥類の進化を明らかにするには、分類群の分岐の順序と分化程度が判明するのみでは不十分であり、形態・生態・生理などあらゆる面からの研究と論議が不可欠である。しかし、DNAの塩基配列データを利用した系統解析がその鍵を握る分野となる可能性は非常に高いと思われる。

本稿をきっかけに鳥類分子系統学に興味を持つ研究者が増加し、鳥類の進化についての研究が今以上に活発になれば幸いである。

本稿をまとめるにあたり、柿沢亮三博士をはじめとする山階鳥類研究所の皆さまには懇切なご指導

と様々な援助をしていただいた。また、東京大学の石田健氏、立教大学の上田恵介氏、農林水産省森林総合研究所の川路則友氏、国立科学博物館の森岡弘之氏にも様々な面でご指導をいただいた。これらの方々ならびに発表の場を与えていただいた九州大学の江口和洋氏に心からの謝意を表したい。

摘 要

DNA を用いた鳥類の系統解析は近年急速に発達し、現在では多くの研究例が知られている。DNA の中でも mtDNA は近縁な分類群の系統解析に適した性質を多く持つ。ただし、mtDNA のみを解析に使用した場合には、異種間浸透などによって誤った系統を推定する可能性も知られている。DNA を採取するためのサンプルとしては血液、組織、羽毛などが利用可能で、標本からの DNA 採取も可能である。分析は DNA 抽出、増幅、塩基配列決定の順で行われる。得られた塩基配列データから、系統推定法によって分類群の系統関係が推定される。得られた系統樹についてはその信頼性を統計的処理によって判断することが可能である。日本周辺には、鳥類の系統や進化に関する研究課題が山積されており、これらの課題を解明するには分子系統学的側面からの研究が不可欠である。今のところ DNA の塩基配列データのみを利用して種・亜種の境界を決めることは困難であるが、鳥類の分類を再検討する上での非常に重要な情報となる可能性が高い。DNA の塩基配列データを用いた系統解析が、鳥類の進化を明らかにする上で大きな役割を担う手法となることは間違いなく、この分野の国内での早期の発展が望まれる。

引 用 文 献

- 奄美野鳥の会, 1997. オオトラツグミのさえずり個体のセンサス結果 (1996年春). *Strix*. 15: 117-121.
- Alison, R. M., 1977. Homing of subadult Oldsquaws. *Auk* 94: 383-384.
- American Ornithologists' Union, 1988. Guidelines for use of wild birds in research. Supplement to the *Auk* 105: 1a-41a.
- American Ornithologists' Union, 1997. Forty-first supplement to the American Ornithologist' Union check-list of North American birds. *Auk* 114: 542-552.
- Arctander, P. & Fjeldsá, J., 1994. Avian tissue collections for DNA analysis. *Ibis* 136: 359-360.
- Arctander, P., Folmer, O. & Fjeldsá, J., 1996. The phylogenetic relationships of Berthelot's Pipit *Anthus berthelotii* illustrated by DNA sequence data, with remarks on the genetic distance between Rock and Water Pipits *Anthus spinoletta*. *Ibis* 138: 263-272.
- Austin, J. J., 1996. Molecular phylogenetics of Puffinus Shearwaters: Preliminary evidence from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6: 77-88.
- Avise, J. C. & Ball, R. M., Jr., 1991. Mitochondrial DNA and avian microevolution. *Acta XX Congressus Internationalis Ornithologici* 1: 514-524.
- Avise, J.C., Alisauskas, R.T., Nelson, W.S. & Ankney, C.D., 1992. Matriarchal population genetic structure in an avian species with female natal philopatry. *Evolution* 46: 1084-1096.
- 馬場芳之, 1996. 日本産ライチョウ類の遺伝的多様性と保全. 九州大学大学院比較社会文化研究科平成8年度修士論文.
- Baker, A. J. & Marshall, H. D., 1997. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. Mindell, D. P. (ed.) *Avian Molecular evolution and systematics*: 51-82. Academic Press, London.

- Baker, M. C., 1981. A muscle biopsy procedure for use in electrophoretic studies of birds. *Auk* 98: 392-393.
- Ball, R. M., Jr. & Avise, J. C., 1992. Mitochondrial DNA phylogeographic differentiation among avian populations and the evolutionary significance of subspecies. *Auk* 109: 626-636.
- Bates, J. M. & Zink, R. M. 1994. Evolution into the Andes: Molecular evidence for species relationships in the genus *Leptopogon*. *Auk* 111: 507-515.
- Bleiweiss, R., Kirsch, J. A. W. & Matheus J. C., 1994. DNA-DNA hybridization evidence for subfamily structure among Hummingbirds. *Auk* 111: 8-19.
- Bretagnolle, V., Attie, C. & Pasquet, E., 1998. Cytochrome-B evidence for validity and phylogenetic relationships of *Pseudobulweria* and *Bulweria* (Procellariidae). *Auk* 115: 188-195.
- Brooke, M. DE L. & Rowe, G., 1996. Behavioural and molecular evidence for specific status of light and dark morphs of the Herald Petrel *Pterodroma heraldica*. *Ibis* 138: 420-432.
- Brown, G. G., Gadeleta, G., Pepe, G., Saccone, C. & Sbisà, E., 1986. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 192: 503-511.
- Brown, W. M., George, M., Jr., & Wilson, A. C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1967-1971.
- Burns, K. J., 1998. Molecular phylogenetics of genus *Piranga*: Implications for biogeography and the evolution of morphology and behavior. *Auk* 115: 621-634.
- Chikuni, K., Minaka, N. & Ikenaga, H., 1996. Molecular phylogeny of some passeriformes, based on cytochrome b sequences. *J. Yamashina Inst. Ornithol.* 28: 1-8.
- Christidis, L., Davies, K., Westerman, M., Christian P. D. & Schodde, R., 1996a. Molecular assessment of the taxonomic status of Cox's Sandpiper. *Condor* 98: 459-463.
- Christidis, L., Leeton, P. R. & Westerman, M., 1996b. Were bowerbirds part of the New Zealand fauna? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3898-3901.
- Cicero, C. & Johnson, N. K., 1995. Speciation in Sapsuckers (*Sphyrapicus*): III. Mitochondrial-DNA sequence divergence at the cytochrome-B locus. *Auk* 112: 547-563.
- Cooke, F., MacInnes, C. D. & Prevett, J.P., 1975. Gene flow between breeding populations of lesser Snow Geese. *Auk* 92: 493-510.
- Cooper, A., 1994. DNA from museum specimens. Herrmann, B. & Hummel, S. (eds.) *Ancient DNA*: 149-165. Springer-Verlag, New York.
- Cooper, A., Mourer-Chauvire, C., Chambers, G. K., von Haeseler, A., Wilson, A. C. & Pääbo, S. 1992. Independent origins of New Zealand maos and Kiwis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8741-8744.
- Crowe, T. M., Harley, E. H., Jakutowicz, M. B., Komen, J. & Crowe, A. A. 1992. Phylogenetic, taxonomic and biogeographical implications of genetic, morphological, and behavioral variation in Francolins (Phasianidae: *Francolinus*). *Auk* 109: 24-42.
- Dawson, R. J. G., Parkin, D. T., Cubitt, M., Won, P. & Zino, F. J. A., 1997. DNA amplification and sequencing of unidentified Dark-rumped Storm-Petrels *Oceanodroma* in the North Atlantic Ocean. *Bull. Kor. Assoc. Wildl. Conserv.* 1: 67-72.
- Degnan, S. M. & Moritz, C., 1992. Phylogeography of mitochondrial DNA in two species of White-eyes in Australia. *Auk* 109: 800-811.
- Deignan, H. G., 1958. The systematic position of the bird genus *Apalopteron*. *Proc. U. S. Natl. Mus.* 108: 133-136.
- Desjardins, P. & Morais, R., 1990. Sequence and gene organization of the chicken

- mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 212: 599-634.
- Dessauer, H. C., Cole, C. J. & Hafner, M. S. 1996. Collection and storage of tissues. Hillis, D. M., Moritz, C. & Mable, B. K. (eds.) *Molecular Systematics*: 29-47. Sinauer Associates, Sunderland.
- Dittmann, D. L. & Zink, R. M., 1991. Mitochondrial DNA variation among Phalaropes and Allies. *Auk* 108: 771-779.
- Dodge, A. G., Fry, A. J., Blackwell R. C. & Zink, R. M., 1995. Comparison of phylogenies derived from two molecular data sets in the avian genera *Pipilo* and *Spizella*. *Wilson Bull.* 107: 641-654.
- Edwards, S. V., 1993. Mitochondrial gene genealogy and gene flow among island and mainland populations of a sedentary songbird, the Gray-crowned Babbler (*Pomatostomus temporalis*). *Evolution* 47: 1118-1137.
- Edwards, S. V. & Wilson, A. C., 1990. Phylogenetically informative length polymorphism and sequence variability in mitochondrial DNA of Australian songbirds (*Pomatostomus*). *Genetics* 126: 695-711.
- Edwards, S. V., Arctander, P. & Wilson, A. C., 1991. Mitochondrial resolution of a deep baranch in the genealogical tree for perching birds. *Proc. R. Soc. Lond. B* 243: 99-107.
- Ellegren, H., 1991. DNA typing of Museum birds. *Nature* 354: 113.
- Ellegren, H., 1994. Genomic DNA from museum bird feathers. Herrmann, B. & Hummel, S. (eds.) *Ancient DNA*: 211-217. Springer-Verlag, New York.
- Ellsworth, D. L., Honeycutt, R. L. & Silvy, N. J., 1995. Phylogenetic relationships among North American grouse inferred from restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Condor* 97: 492-502.
- Ellsworth, D. L., Honeycutt, R. L. & Silvy, N. J., 1996. Systematics of Grouse and ptarmigan determined by nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome-B gene. *Auk* 113: 811-822.
- Ellsworth, D. L., Honeycutt, R. L., Silvy, N. J., Rittenhouse, K. D. & Smith, M. H., 1994. Mitochondrial-DNA and nuclear-gene differentiation in North American Prairie Grouse (Genus *Tympanuchus*). *Auk* 111: 661-671.
- Felsenstein, J., 1996. *PHYLIP: Phylogeny inference package, Version 3.572*. Computer software and documentation distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington.
- Freitag, S. & Robinson, T. J., 1993. Phylogeographic patterns in mitochondrial DNA of the Ostrich (*Struthio camelus*). *Auk* 110: 614-622.
- Friesen, V. L., Piatt, J. F. & Baker, A. J., 1996. Evidence from cytochrome B sequences and allozymes for a 'new' species of alcid: The Long-billed Murrelet (*Brachyramphus perdix*). *Condor* 98: 681-690.
- 藤村和男, 1948. アカコッコに就いて. 鳥 12: 57-62.
- Gill, F. B. & Slikas, B., 1992. Patterns of mitochondrial DNA divergence in North American Crested Titmice. *Condor* 94: 20-28.
- Gill, F. B., Mostrom, A. M. & Mack, A. L., 1993. Speciation in North American Chickadees: I. Patterns of mtDNA genetic divergence. *Evolution* 47: 195-212.
- Goodwin, D., 1968. Notes on Woodpeckers (Picidae). *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool.* 17: 1-44.
- Goodwin, D., 1986. *Crows of the world.-second edition*. The British Museum (Natural History). London.
- Greenberg, R., Cordero, P. J., Droege, S. & Fleischer, R. C., 1998. Morphological adaptation with no mitochondrial DNA differentiation in the coastal plain Swamp Sparrow. *Auk* 115: 706-712.
- Greenwood, P.J. & Harvey, P.H., 1982. The natal and breeding dispersal of birds. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13: 1-21.
- Hackett, S. J., 1995. Molecular systematics and zoogeography of flowerpiercers in the

- Diglossa baritula* complex. Auk 112: 156-170.
- Hare, M. P. & Shields, G. F., 1992. Mitochondrial-DNA variation in the polytypic Alaskan Song Sparrow. Auk 109: 126-132.
- Harvey, P. H. & Pagel, M. D., 1991. *The comparative method in evolutionary biology*. Oxford University Press, London.
- 長谷部光泰, 1996. 分子系統学のすすめ. 岩槻邦男・馬渡峻輔(編) 生物の多様性. 裳華房, 東京.
- 長谷川政美・岸野洋久, 1996. 分子系統学. 岩波書店, 東京.
- Helbig, A. J., Martens, J., Seibold, I., Henning, F., Schottler, B. & Wink, M., 1996. Phylogeny and species limits in the Palaearctic Chiffchaff *Phylloscopus collybita* complex: mitochondrial genetic differentiation and bioacoustic evidence. Ibis 138: 650-666.
- Helbig, A. J., Seibold, I., Martens, J. & Wink, M., 1995. Genetic differentiation and phylogenetic relationships of Bonelli's Warbler *Phylloscopus bonelli* and Green Warbler *P. nitidus*. Journal of Avian Biology 26: 139-153.
- Helm-Bychowski, K. & Cracraft, J., 1993. Recovering phylogenetic signal from DNA sequences: Relationships within the corvine assemblage (Class Aves) as inferred from complete sequences of the mitochondrial DNA cytochrome-b gene. Mol. Biol. Evol. 10: 1196-1214.
- Higuchi, H. & Hirano, T., 1989. Breeding season, courtship behaviour, and territoriality of White and Japanese Wagtails *Motacilla alba* and *M. grandis*. Ibis 131: 578-588.
- Higuchi, H., Minton, J. & Katsura, C., 1995. Distribution and Ecology of birds of Japan. Pacific Science 49: 69-86.
- Houde, P. & Braun, M. J., 1988. Museum collections as a source of DNA for studies of avian phylogeny. Auk 105: 773-776.
- Houde, P., Cooper, A., Leslie, E., Strand, A. E. & Montano, G. A., 1997. Phylogeny and evolution of 12S rDNA in Gruiformes (Aves). Mindell, D. P. (ed.) *Avian Molecular evolution and systematics*: 121-158. Academic Press, London.
- 石田健, 1996. 鳥類の生態研究における DNA 分析. 山階鳥研報 28: 51-80.
- Ishihara, T., 1986. The Amami Ground Thrush distinct from the White's Ground Thrush. Strix 5: 60-61.
- Jones, D. A. & Gibbs, H. L., 1997. Intra- and interspecific sequence variation in a portion of the mitochondrial ND6 gene in Cuckoos. Condor 99: 815-818.
- 柿沢亮三, 1991. DNA 交雑法による鳥類の新しい分類. 野鳥 542: 33.
- 柿沢亮三・鈴木仁・土屋公幸, 1996. ミトコンドリア DNA の変異から見たカゲーの系統分類. カゲー研究会報告. 37-41.
- 金田秀貴・米川博通, 1998. ミトコンドリア DNA にみられる母性遺伝の不思議. 遺伝 52: 27-31.
- 粕谷英一, 1995. 最近の比較生態学の方法の発展-種間比較には系統関係が必要である-. 日本生態学会誌 45: 277-288.
- Kawaji, N. & Higuchi, H., 1989. Distribution and status of the Ryukyu Robin *Erithacus komadori*. J. Yamashina Inst. Ornithol. 21: 224-233.
- Kawaji, N., Higuchi, H. & Hori, H., 1989. A new breeding record of the Izu Island Thrush *Turdus celaenops* from the Tokara Islands, southwest Japan. Bull. B. O. C. 109: 93-95.
- Kessler, L. G. & Avise, J. C., 1985. A comparative description of mitochondrial DNA differentiation in selected avian and other vertebrate genera. Mol. Biol. Evol. 2: 109-125.
- 木村資生, 1988. 生物進化を考える. 岩波書店, 東京.
- Knox, A., 1994. Lumping and splitting of species. British Birds 87: 149-159.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X. & Wilson, A. C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6196-6200.

- Krajewski, C. & Fetzner, J. W., Jr., 1994. Phylogeny of Cranes (Gruiformes: Gruidae) based on cytochrome-B DNA sequences. *Auk* 111: 351-365.
- Krajewski, C. & King, D. G., 1996. Molecular divergence and phylogeny: Rates and patterns of cytochrome b evolution in cranes. *Mol. Biol. Evol.* 13: 21-30.
- Krajewski, C. & Wood, T. C., 1995. Mitochondrial DNA relationships within the Sarus Crane species group (Gruiformes: Gruidae). *Emu* 95: 99-105.
- Kuroda, N., 1957. Notes on the evolution in the Eurasian Jay, *Garrulus glandarius*. *Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool.* 13: 72-77.
- 黒田長久, 1972. 動物地理学. 共立出版, 東京.
- 黒田長久・真野徹・尾崎清明, 1984. クイナ科とその保護について. 山階鳥類研究所50年のあゆみ: 36-57. 山階鳥類研究所.
- Kvist, L., Ruokonen, M., Orell, M. & Lumme, J., 1996. Evolutionary patterns and phylogeny of tits and chickadees (genus *Parus*) based on the sequence of the mitochondrial cytochrome b gene. *Ornis Fennica* 73: 145-156.
- Lanyon, S. M. & Hall, J. G., 1994. Reexamination of barbet monophyly using mitochondrial-DNA sequence data. *Auk* 111: 389-397.
- Leeton, P. R., Christidis, L., Westerman, M. & Boles, W. E., 1994. Molecular phylogenetic affinities of the Night Parrot (*Geopsittacus occidentalis*) and the Ground Parrot (*Pezoporus wallicus*). *Auk* 111: 833-843.
- Leeton, P., Christidis, L. & Westerman, M., 1993. Feathers from museum bird skins- A good source of DNA for phylogenetic studies. *Condor* 95: 465-466.
- Leisler, B., Heidrich, P., Schulze-Hagen, K. & Wink, M., 1997. Taxonomy and phylogeny of Reed warblers (genus *Acrocephalus*) based on mtDNA sequences and morphology. *Journal für Ornithologie* 138: 469-496.
- Li, Q., Lin, J., Wen, W., Li, W. & Zheng, Y., 1998. Diversity of mitochondrial DNA in eight species of strigiformes. *Acta Zool. Sinica* 44: 94-101. (In Chinese with English Summary).
- Lougheed, S. C. & Handford, P. 1993. Mitochondrial DNA hyperdiversity and vocal dialects in a subspecies transition of the Rufous-collared Sparrow. *Condor* 95: 889-895.
- Lynch, M. & Jarrell, P. E., 1993. A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics* 135: 1197-1208.
- Madge, S. & Burn, H., 1994. *Crows and Jays*. Christopher Helm, London
- Martin, A. P. & Palumbi, S. R., 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4087-4091.
- Martin, G., 1996. Birds in double trouble. *Nature* 380: 666-667.
- Meinertzhagen, C.R., 1928. Some biological problems connected with the Himalaya. *Ibis*: 480-533.
- Meinertzhagen, C.R., 1951. Some relationships between African, Oriental, and Palaearctic genera and species, with a review of the genus *Monticola*. *Ibis* 93: 443-459.
- 三中信宏, 1997, 生物系統学, 東京大学出版会, 東京
- Mindell, D. P. & Honeycutt, R. L., 1990. Ribosomal RNA in vertebrates: Evolution and phylogenetic applications. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 21: 541-566.
- Miranda, H. C., Jr., Kennedy, R. S. & Mindell, D. P., 1997. Phylogenetic placement of *Mimizuku gurneyi* (Aves: Strigidae) inferred from mitochondrial DNA. *Auk* 114: 315-323.
- 棚山徳太郎, 1930. 小笠原諸島並に硫黄列島産の鳥類に就いて. 日本生物地理学会会報 1: 89-186.
- Monteros, A. E. D. L. & Cracraft, J., 1997. Intergeneric relationships of the new world Jays inferred from cytochrome b gene sequences. *Condor* 99: 490-502.
- Moore, W. S. & DeFilippis, V. R. 1997. The window of taxonomic resolution for phylogenies based on mitochondrial cytochrome b. Mindell, D. P. (ed.) *Avian Molecular evolution and systematics*: 83-119. Academic Press, London.

- 森岡弘之, 1974. 琉球列島の鳥相とその起源. 国立科博専報 7: 203-211.
- Morioka, H., 1982. Status of Brown Thrush *Turdus chrysolaus* of Japan, with special reference to the population in the Fuji area. Mem. Natn. Sci. Mus. 15: 213-220.
- 森岡弘之, 1989. ヤンバルクイナとミヤコショウビン—琉球の鳥 2 題. 日本の生物 3: 19-24.
- 森岡弘之, 1990. トカラ列島の繁殖鳥類とその起源. 国立科博専報 23: 151-166.
- Morioka, H., 1992. Relationships of Ogasawara Islands Grosbeak *Chaunoproctus ferreorostris* (Aves, Fringillidae). Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser.A. 18: 45-49.
- 森岡弘之, 1997. 日本の鳥類目録と鳥類分類学. 日本動物大百科. 4. 鳥類II: 175-176. 平凡社, 東京
- Moum, T. & Johansen, S., 1992. The mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6) gene in Murres: relevance to phylogenetic and population studies among birds. Genome 35: 903-906.
- Mundy, N. I., Unitt, P. & Woodruff, D. S., 1997. Skin from feet of museum specimens as a non-destructive source of DNA for avian genotyping. Auk 114: 126-129.
- 村松正實, 1990. ラボマニユアル遺伝子工学. 丸善, 東京.
- 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.
- Murray, B. W., McGillivray, W. B., Barlow, J. C., Beech, R. N. & Strobeck, C., 1994. The use of the cytochrome B sequence variation in estimation of phylogeny in the Vireonidae. Condor 96: 1037-1054.
- Nagata, J., Masuda, R. & Yoshida, M. C., 1995. Nucleotide sequences of the cytochrome b and the 12S rDNA genes in the Japanese Sika Deer *Cervus nippon*. J. Mamm. Soc. Japan 20: 1-8.
- 中村一恵, 1985. 日本列島におけるセキレイ属近縁2種の地理的分布の変遷 (予報). 神奈川県立博物館研究報告 16: 23-36.
- 中村一恵, 1987. ハクセキレイとセグロセキレイの分布総説. 日本の生物 1: 44-51.
- 中村一恵, 1992. オナガの分布. 世界編. 野鳥 545: 20.
- 中山広樹, 1996. バイオ実験イラストレイテッド③本当にふえる PCR. 秀潤社, 東京.
- 中山広樹・西方敬人, 1995a. バイオ実験イラストレイテッド①分子生物学実験の基礎. 秀潤社, 東京.
- 中山広樹・西方敬人, 1995b. バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎. 秀潤社, 東京.
- 日本鳥学会目録編集委員会, 1997. 日本産鳥類リスト. 日本鳥学会誌 46: 59-91.
- 日本鳥学会, 1974. 日本鳥類目録. 学研, 東京.
- 西海 功, 1995. 羽毛採取がもつ可能性—将来の DNA 分析のために. 鳥学ニュース 56: 6.
- 西海 功, 1997. DNA 多型分析の生態学への応用. 山岸哲 (編) 鳥類生態学入門: 158-170. 築地書館, 東京
- Nunn, G. B., Cooper, J., Jouventin, P., Robertson, C. J. R. & Robertson, G. G. 1996. Evolutionary relationships among extant Albatrosses (Procellariiformes: Diomedidae) established from complete cytochrome-B gene sequences. Auk 113: 784-801.
- Ohta, T., 1992. The nearly neutral theory of molecular evolution. Annu. Rev. Ecol. Syst. 23: 263-286.
- Pasquet, E., 1998. Phylogeny of the nuthatches of the *Sitta canadensis* group and its evolutionary and biogeographic implications. Ibis 140: 150-156.
- Paterson, A. M., Wallis, G. P. & Gray, R. D., 1995. Penguins, Petrels, and Parsimony: Does cladistic analysis of behavior reflect sea birds phylogeny? Evolution 49: 974-989.
- Quinn, T. W. & Wilson, A. C., 1993. Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. J. Mol. Evol. 37: 417-425.
- Quinn, T. W., 1997. Molecular evolution of the mitochondrial genome. Mindell, D. P. (ed.) *Avian Molecular evolution and systematics*: 3-28. Academic Press, London.
- Quinn, T. W., Shields, G. F. & Wilson, A. C., 1991. Affinities of the Hawaiian Goose

- based on two types of mitochondrial DNA data. *Auk* 108: 585-593.
- Ramirez, V., Savoie, P. & Morais, R., 1993. Molecular characterization and evolution of a Duck mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* 37: 296-310.
- 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.
- Richman, A. D. & Price T., 1992. Evolution of ecological differences in the Old World leaf warblers. *Nature* 355: 817-821.
- Rising, J. D. & Avise, J. C., 1993. Application of genealogical-concordance principles to the taxonomy and evolutionary history of the Sharp-tailed Sparrow (*Ammodramus caudacutus*). *Auk* 110: 844-856.
- Ryan, P. G., Hood, I., Bloomer, P., Komen, J. & Crowe, T. M., 1998. Barlow's Lark: a new species in the Karoo Lark *Certhilauda albescens* complex of southwest Africa. *Ibis* 140: 605-619.
- 酒井秀嗣, 1997. ホルモンと繁殖活動. 山岸哲 (編) 鳥類生態学入門: 143-157. 築地書館, 東京
- Seeböhm, H., 1890. *The birds of the Japanese empire*. P.H.Porter, London.
- Seibold, I., Helbig, A. J., Meyburg, B. -U., Negro, J. J. & Wink, M. 1996. Genetic differentiation and molecular phylogeny of European *Aquila* Eagles according to cytochrome b nucleotide sequences. Meyburg, B. -U. & Chancellor, R. D. (eds.) *Eagle Studies*: 1-15.
- Seutin, G., Ratcliffe, L. M. & Boag, P. T., 1995. Mitochondrial DNA homogeneity in the phenotypically diverse Redpoll Finch complex. *Evolution* 49: 962-973.
- 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.
- Sheldon, F. H. & Gill, F. B., 1996. A reconsideration of songbird phylogeny, with emphasis on the evolution of titmice and their sylvioid relatives. *Syst. Biol.* 45: 473-495.
- Sheldon, F. H. & Winkler, D. W., 1993. Intergeneric phylogenetic relationships of Swallows estimated by DNA-DNA hybridization. *Auk* 110: 798-824.
- Sheldon, F. H., Slikas, B., Kinnarney, M., Gill, F. B., Zhao, E. & Silverin, B., 1992. DNA-DNA hybridization evidence of phylogenetic relationships among major lineages of *Parus*. *Auk* 109: 173-185.
- Sheldon, F. H., McCracken, K. G. & Stuebing, K. D., 1995. Phylogenetic relationships of the Zigzag Heron (*Zebrius undulatus*) and White-crested Bittern (*Tigriornis leucolophus*) estimated by DNA-DNA hybridization. *Auk* 112: 672-679.
- Shields, G. F. & Wilson, A. C., 1987. Calibration of mitochondrial DNA evolution in geese. *J. Mol. Evol.* 24: 212-217.
- Shirihai, H., Roselaar, C. S., Helbig, A. J., Barthel, P. H. & Loon, A. J., 1995. Identification and taxonomy of large *Acrocephalus* warblers. *Dutch Birding* 17: 229-239.
- Short, L.L., 1973a. Notes on Okinawan Birds and Ryukyu Island zoogeography. *Ibis* 115: 264-267.
- Short, L.L., 1973b. Habits, relationships, and conservation of the Okinawa Woodpecker. *Wilson Bull.* 85: 5-20.
- Sibley, C. G. & Ahlquist, J. E., 1990. *Phylogeny and classification of birds. a study in molecular evolution*. Yale University Press, New Haven.
- Sibley, C. G., 1997. DNAでみた鳥の世界. *biohistory* 5: 4-11. (加藤和人翻訳の訳文.)
- Slikas, B., Sheldon, F. H. & Gill, F. B., 1996. Phylogeny of titmice (Paridae): I. Estimate of relationships among subgenera based on DNA-DNA hybridization. *J. Avian Biol.* 27: 70-82.
- Smith, E. F. G., Arctander, P., Fjeldså, J. & Amir, O. G., 1991. A new species of Shrike (Laniidae: *Laniarius*) from Somalia, verified by DNA sequence data from the only known individual. *Ibis* 133: 227-235.

- Sowls, L.K., 1955. *Prairie Ducks*. University of Nebraska Press, London.
- Springer, M. S., Higuchi, H., Ueda, K., Minton, J. & Sibley, C. G., 1995. Molecular evidence that the Bonin Islands "Honeyeater" is a White-eye. *J. Yamashina Inst. Ornithol.* 27: 66-77.
- Srikwan, S. & Woodruff, D. S., 1998. DNA Sequence variation and Hornbill conservation. Poonswad, P. (ed.) *The Asian Hornbills: Ecology and Conservation*: 69-82. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.
- Stangel, P. W., 1986. Lack of effects from sampling blood from small birds. *Condor* 88: 244-245.
- Stewart, C.-B., Schilling, J. W & Wilson, A. C., 1987. Adaptive evolution in the stomach lysozymes of foregut fermenters. *Nature* 330: 401-404.
- Swofford, D. L., 1993. *PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, Version 3.1*. Computer software. Smithsonian Institution, Washington.
- Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J. & Hillis, D. M., 1996. Phylogenetic inference. Hillis, D. M., Moritz, C. & Mable, B. K. (eds.) *Molecular Systematics*: 407-514. Sinauer Associates, Sunderland.
- Taberlet, P. & Bouvet, J., 1991. A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *Auk* 108: 959-960.
- 高田啓介, 1995. 博物館魚類標本を用いたDNA解析の試み. 国立科学博物館ニュース 318: 4-9.
- 高木利久・金久實, 1996. ゲノムネットのデータベース利用法. 共立出版, 東京.
- 高畑尚之, 1986. 細胞質オルガネラDNAの変異と進化(2). 遺伝 40: 64-70.
- Tarr, C. L., 1995. Primers for amplification and determination of mitochondrial control-region sequences in oscine passerines. *Molecular Ecology* 4: 527-529.
- Tarr, C. L. & Fleischer, R. C., 1993. Mitochondrial-DNA variation and evolutionary relationships in the Amakihi complex. *Auk* 110: 825-831.
- Tuohy, J. M., McHugh, K. P. & Kloet, S. R. DE, 1992. Systematic relationships among some Anitini as derived from restriction-endonuclease analysis of a repeated DNA component. *Auk* 109: 465-473.
- Thomas, R. H., 1994. Analysis of DNA from natural history museum collections. *Molecular Ecology and Evolution* 311-321.
- Ticehurst, C. B., 1938. *A systematic review of the genus Phylliscopus*. The British Museum, London.
- 上田恵介, 1997. DNAはドラエモンのポケット?—アジア・太平洋地域における鳥類の進化学的研究の重要性. 日本鳥学会誌 45: 247-249.
- 上島 励, 1996. 系統樹をつくる. 岩槻邦男・馬渡峻輔(編) 生物の多様性. 裳華房, 東京.
- Udvardy, M. D. F., 1969. *Dynamic Zoogeography*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Utter, J. M., 1971. A technique for sampling blood from small passerines. *Auk* 88: 169-171.
- Voelker, G. & Edwards, S. V., 1998. Can weighting improve bushy trees? Models of cytochrome b evolution and the molecular systematics of Pipits and Wagtails (Aves: Motacillidae). *Syst. Biol.* 47: 589-603.
- 和田 洋・片山智恵・佐藤矩行, 1992. 18 SrDNA 分子からたどる動物の系統・類縁関係. 遺伝 46: 51-56.
- Watada, M., Jitsukata, K. & Kakizawa, R., 1995. Genetic divergence and evolutionary relationships of the old and new world Emberizidae. *Zoological Science* 12: 71-77.
- Wenink, P. W. & Baker A. J., 1996. Mitochondrial DNA lineages in composite flocks of migratory and wintering Dunlins (*Calidris alpina*). *Auk* 113: 744-756.
- Wenink, P. W., Baker A. J. & Tilanus, M. G. J., 1994. Mitochondrial control-region sequences in two shorebird species, the Turnstone and the Dunlin, and their utility in population genetic studies. *Mol. Biol. Evol.* 11: 22-31.
- Williamson, K., 1976. *Identification for ringers. The genus Phylloscopus*. British Trust for Ornithology.

- Winker, K., 1994. Divergence in the mitochondrial DNA of *Empidonax traillii* and *E. alnorum*, with notes on hybridization. *Auk* 111: 710-713.
- Winker, K., Braun, M. J. & Graves, G. R., 1996. Voucher specimens and quality control in avian molecular studies. *Ibis* 138: 345-346.
- Winkler, D. W. & Sheldon, F. H., 1993. Evolution of nest construction in swallows (Hirundinidae): A molecular phylogenetic perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5705-5707.
- Wood, T. C. & Krajewski, C., 1996. Mitochondrial DNA sequence variation among the subspecies of Sarus Crane (*Grus antigone*). *Auk* 113: 655-663.
- 山階芳麿, 1941. 琉球列島特産鳥類三種の分類学的位置と生物地理学的意義に就いて. *Biogeographica* 3: 319-328.
- 山階芳麿, 1942. 伊豆七島の鳥類. *鳥* 11: 191-270.
- 山階芳麿, 1955. 琉球列島における鳥類分布の境界線, 日本生物地理学会会報 16-19: 371-375.
- 山階芳麿, 1986. 世界鳥類和名辞典. 大学書林, 東京.
- Yamashina, Y. & Mano, T., 1981. A new species of Rail from Okinawa Island. *J. Yamashina Inst. Ornithol.* 13: 147-152.
- Zink, R. M. 1991. The geography of mitochondrial DNA variation in two sympatric sparrows. *Evolution* 45: 329-339.
- Zink, R. M. 1994. The geography of mitochondrial DNA variation, population structure, hybridization, and species limits in the Fox Sparrow (*Passerella iliaca*). *Evolution* 48: 96-111.
- Zink, R. M. & Blackwell R. C., 1998. Molecular systematics of the Scaled Quail complex (Genus *Callipepla*). *Auk* 115: 394-403.
- Zink, R. M. & Dittmann, D. L., 1993. Population structure and gene flow in the Chipping Sparrow and a hypothesis for evolution in the genus *Spizella*. *Wilson Bull.* 105: 399-413.
- Zink, R. M. & McKittrick, M. C., 1995. The debate over species concepts and its implications for ornithology. *Auk* 112: 701-719.
- Zink, R. M., Blackwell R. C. & Rojas-Sato, O., 1997. Species limits in the Le Conte's Thrasher. *Condor* 99: 132-138.
- Zink, R. M., Dittmann, D. L. & Rootes, W. L., 1991a. Mitochondrial DNA variation and the phylogeny of *Zonotrichia*. *Auk* 108: 578-584.
- Zink, R. M., Rootes, W. L. & Dittmann, D. L., 1991b. Mitochondrial DNA variation, population structure, and evolution of the Common Grackle (*Quiscalus quiscula*). *Condor* 93: 318-329.
- Zink, R. M., Dittmann, D. L., Cardiff, S. W. & Rising, J. D., 1991c. Mitochondrial DNA variation and the taxonomic status of the Large-billed Savannah Sparrow. *Condor* 93: 1016-1019.
- Zink, R. M., Rohwer, S., Andreev, A. V. & Dittmann, D. L., 1995. Trans-Beringia comparisons of mitochondrial DNA differentiation in birds. *Condor* 97: 639-649.

(1999年2月5日受付; 1999年4月9日受理)