

ライチョウ遺伝子解析の実施について

1. 目的

ライチョウについては、近年ミトコンドリア DNA やマイクロサテライト DNA の解析がなされており、「平成 23 年度環境省マイクロサテライト DNA を用いたニホンライチョウの遺伝的多様性と遺伝分化に関する研究業務（信州大学中村浩志教授 他）」において、火打山、焼山、北アルプス常念岳周辺、乗鞍岳、御嶽山、南アルプス北部、南アルプス南部、白山の 8 つの山塊から採集した計 189 サンプルについて DNA 解析を実施している。

今後、本種の保全対策を念頭に置いて、下記の事項を明らかにしていくことを目的として、更に詳細な遺伝子解析についてサンプル地域を増やして進める。

- ・頸城山塊、北アルプス、乗鞍岳、御嶽山、南アルプスの 5 つの各集団間および集団内の地域間の遺伝的距離を把握し、ライチョウ保護増殖事業における保全単位を設定する。
- ・各集団内の遺伝的多様度を把握し、小集団等における遺伝劣化の程度を把握する。

2. 解析の実施方針

- ・マイクロサテライト DNA について、分析する遺伝子座を増やし（概ね二桁）、十分なサンプル数を確保した上で、これまでより詳細な解析を実施する。
- ・平成 28 年度は遺伝子解析に使用できるプライマーの数を増やすことを第一目標とし、これまでにサンプルのない山岳についてサンプル採集を実施する（平成 29 年度にも追加サンプルを採集予定）。
- ・今後、動物園における生息域外保全の飼育・増殖技術が確立した場合、飼育下個体からの DNA サンプルング実施も検討する。

3. DNA サンプルの収集地域（平成 28～29 年度実施予定）

- ・平成 28～29 年度にかけて、検体数の少ない北アルプス地域を中心に遺伝子サンプルを収集する方針。
- ・なお、過年度に収集・保存していた DNA サンプル（血液）を活用して、これまでの解析に使用したプライマーに、新たに作成したプライマーを加えて遺伝子の再解析を実施する。

4. 平成 28 年度の実施内容

環境省が平成 24 年に策定したライチョウ保護増殖事業を実施するにあたり、生息地間の遺伝的距離を明らかにして適切な保全単位を設定し、また各生息地内及び飼育下における遺伝的多様性を明らかにして必要な保全対策を検討するため、マイクロサテライト DNA 多型を用いたライチョウの遺伝子解析手法の確立をおこなう。

(1) 実施体制

①DNA 解析

西海 功 独立行政法人国立科学博物館動物研究部 研究主幹

②H28 年度 DNA サンプルの採集

肴倉 孝明 一般社団法人山岳環境研究所 代表理事

(2) 血液サンプルの収集と DNA 抽出

平成 27 年以前に中村浩志先生及び環境省事業で採集した 263 サンプルに加えて、新たに平成 28 年に 19 サンプル（朝日岳、三俣蓮華岳周辺、白馬岳周辺）の計 282 サンプルが分析可能なサンプルとして国立科学博物館に集約した（表 1、図 1）。

平成 28 年収集サンプルを全て DNA 抽出し、濃度調整をおこなった。平成 26 年以前のサンプルの一部に DNA が読めなくなったものがあるので、これらについても血液サンプルからの DNA 抽出を実施したが、現在までに 21 サンプル（乗鞍 16、南アルプス北部 2、御嶽 1、火打山 2）は分析できておらず、北アルプス南部の 1 サンプル（Sample No. K11, 2005 年採集）は血液サンプルがない。

表 1 H28 年度に採取されたライチョウ血液サンプル一覧

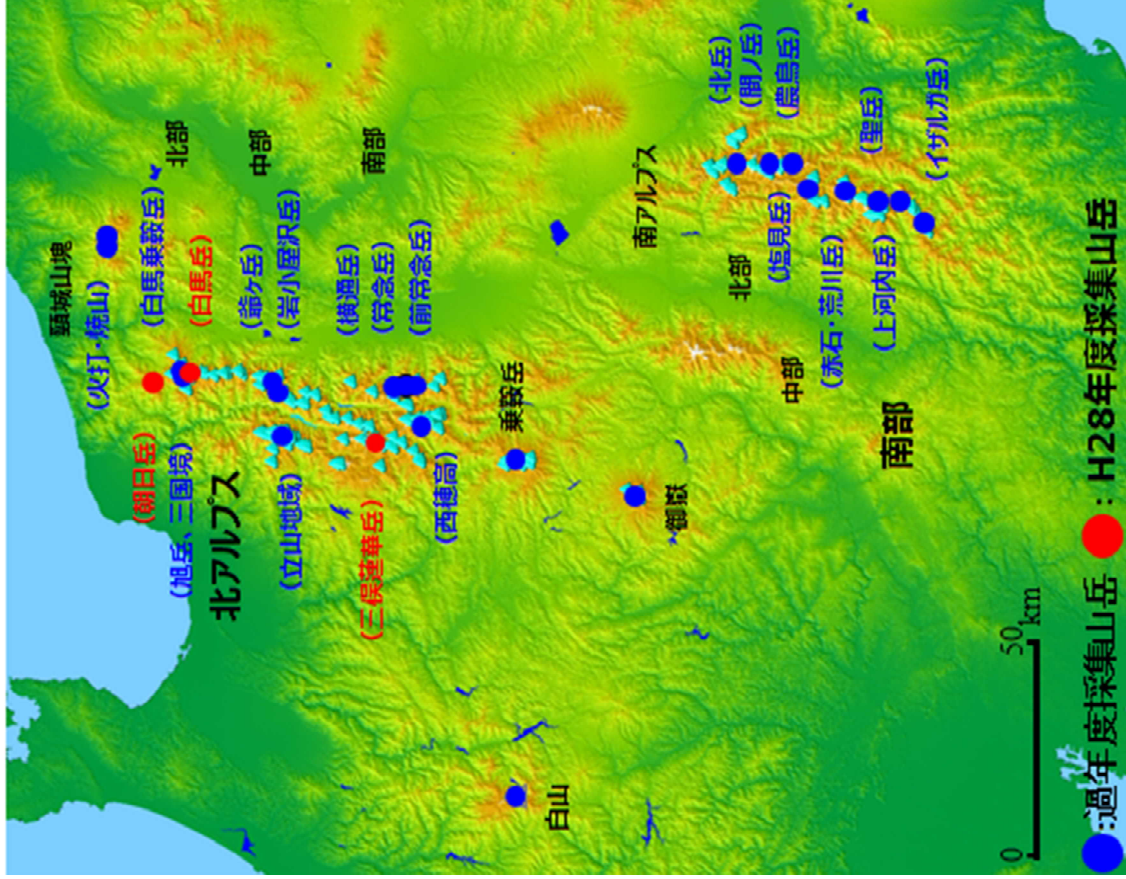
エッペン 番号	サンプル 番号	採取日	採取山域	サンプル採取箇 所 memo
1	LM16S01	9/30	朝日岳山頂東	北アルプス北部
2	LM16S02	9/30	朝日岳山頂北	北アルプス北部
3	LM16S03	9/30	朝日岳山頂北	北アルプス北部
4	LM16S04	10/6	双六岳東南端	北アルプス南部
5	LM16S05	10/6	双六岳東南端	北アルプス南部
6	LM16S06	10/6	双六岳山頂部	北アルプス南部
7	LM16S07	10/6	双六岳山頂部	北アルプス南部
8	LM16S08	10/6	双六岳山頂部	北アルプス南部
9	LM16S09	10/6	三俣蓮華岳南	北アルプス南部
10	LM16S10	10/6	三俣蓮華岳山頂部	北アルプス南部
11	LM16S11	9/8	雲ノ平	北アルプス南部
12	LM16S12	9/9	弓折岳分岐	北アルプス南部
13	LM16S13	9/9	弓折岳分岐	北アルプス南部
14	LM16S14	9/9	弓折岳分岐	北アルプス南部
15	LM16S15	9/9	弓折岳分岐	北アルプス南部
16	LM16S16	10/13	鑓温泉分岐	北アルプス北部
17	LM16S17	10/13	鑓温泉分岐	北アルプス北部
18	LM16S18	10/13	鑓温泉分岐	北アルプス北部
19	LM16S19	10/13	鑓温泉分岐	北アルプス北部

図1 血液サンプル数

(DNAのみを含む)
(2016年10月現在)

採取山岳	サンプル数
火打山	22
焼山	14
北アルプス (北部)	49(15)
北アルプス (中部)	10
北アルプス (南部)	19(4)
乗鞍岳	82
御嶽	17
南アルプス (北部)	45
南アルプス (中部：塩見)	5
南アルプス (南部)	19
白山	1
合計	282(19)

赤字：2016年の血液サンプル追加地域
※ ()内は追加数：計19サンプル追加



●: 前年度採集山岳 ●: H28年度採集山岳

(3) マイクロサテライト遺伝子座の検討

ライチョウについては、平成 28 年度より前に 5 つのマイクロサテライト遺伝子座の分析がおこなわれ、28 年度は、新たに 16 のマイクロサテライト遺伝子座に関して遺伝的多型解析への利用可能性を検討し、6 集団 98 サンプルを分析した。その結果、1 遺伝子座は多型が見られず、15 遺伝子座については 2～13 の対立遺伝子が見られた。このうち、7 遺伝子座は検討の必要があり、8 遺伝子座は有用な遺伝子マーカーとして今後の多型分析に利用できそうなことがわかった (表 2)。

表 2 マイクロサテライト多型解析の結果

遺伝子座	アレル数	HW 平衡にない集団 (P<0.01)			備考
○ ADL230	3				
○ SGCTAT1	4				
BG12	7	Kubiki	Norikura	NorthAlps	詳細検討が必要 3 遺伝子座と連鎖 不平衡?(P<0.05) TTT2 と連鎖不 平衡(P<0.01)
ADL184	3				
BG16	4				
○ TUT4	2				TUT2 と連鎖不 平衡? 多型なし
TTD2	5				
ADL146	1				
○ BG20	5				詳細検討が必要
BG15	10	SouthAlps			
○ LEI098	2				
○ TUT3	5				詳細検討が必要
TUT1	4	Kubiki			
○ ADL142	3				
○ BG18	13				LLSD4 と連鎖不 平衡?
SGCA9	6				

→ 少なくとも○を付けた 8 遺伝子座は今後の分析に利用できる

今年度は現在までのところ、今年度採集の 19 サンプルを含む 260 サンプルについて 20 遺伝子座の分析を終えた。さらに 3 月には 21 サンプルについて再度分析を試みた後、HW 平衡、連鎖不平衡の解析に進み、ヌル対立遺伝子の頻度が低く、連鎖のない遺伝子座 (おそらく 13 遺伝子座あると期待される) のデータに基づいて、集団構造の解析をおこなう予定である。

5. 次年度の事業実施について

今年度はマイクロサテライト DNA 多型を用いたライチョウの集団構造の解析を行ったが、次年度は以下について実施予定。

- ・必要に応じた遺伝子マーカーの追加検討
- ・DNA 解析が必要とされる地域の血液サンプルの追加（主に北アルプス地域）
- ・DNA 解析結果を踏まえた、ライチョウの保全単位の検討