

大黒島におけるオオセグロカモメ個体群の遺伝構造

北海道大学大学院地球環境科学研究科 長谷川 理

はじめに

野生動物の行動生態の解明、または保護管理を行う上で、個体群の遺伝的多様性や遺伝構造を把握することは重要である。なかでも婚姻制度や繁殖システムといった社会性が、どのように遺伝構造と関連しているかは非常に興味深い。しかし実際に野生動物、特に鳥類における遺伝的多様性や遺伝構造の研究報告は少ない。本研究は、個体数が多く比較的捕獲が容易だと考えられるオオセグロカモメ(*Larus schistisagas*)を用いて、海鳥のコロニーとその遺伝構造との関係を解明することを目的とした。

オオセグロカモメは、北海道沿岸からカムチャッカ半島、オホーツク海沿岸にかけて繁殖する大型のカモメである。断崖の斜面、岩棚、岩礁上、さらにテトラポットなどの人工物に、枯れ草などでカップ状の巣をつくる。他個体から孤立して一巣だけで営巣する番いもいるが、ほとんどは数十から数百巣の繁殖コロニーを形成する。オオセグロカモメにおいて、コロニー間の遺伝構造についての研究を行うことは、多くのコロニー性鳥類の遺伝構造を解明していくうえで重要だと考えられる。本研究では北海道東部の太平洋側に位置する大黒島内において、離れた3地点でサンプル採集を行い、それぞれの遺伝構造を比較した。また、大黒島以外にも、北海道東部の太平洋側と北部の日本海側でも一カ所ずつサンプル採集を行い、島間の遺伝構造についても比較、検討を行った。

本研究で遺伝構造の解析に用いた遺伝子領域は、ミトコンドリア DNA のコントロール領域である。通常ミトコンドリア DNA は核 DNA よりも塩基置換が起こる速度が速いといわれている。そのミトコンドリア DNA の中でも、コントロール領域はもっとも塩基置換が起こる速度が速い領域だとされている。そのため同種内において、個体群間や個体間の比較解析に用いられることが多い。まず各個体のコントロール領域の塩基配列を解読し、塩基置換の情報を元にその個体の遺伝子タイプを求める。次にそれぞれのコロニーに属する個体がどのような遺伝子タイプをもっているかを調べることで、コロニー間の遺伝構造およびオオセグロカモメの分散様式を明らかにしていく。

材料と方法

(1) 血液サンプルの採集および DNA 抽出

平成 11 年の 7 月 18 日～22 日に、厚岸町大黒島にてオオセグロカモメの血液サンプルを採集した。巣の近くにいるヒナを手取りにより捕獲し、注射針(25G、口径 0.55mm)とマイクロキャピラリー(口径 1.1mm のガラス管)を用いて採血した。まず注射針で翼下静脈をかるく刺し、にじみ出た少量の血液を、毛細管現象を利用してマイクロキャピラリーで 30～50 μ l 吸い取った。採血後は緩衝液(STE Buffer)に入れて、大黒島滞在中は風通しの良い日陰で、その後は 4℃ で保存した。

オオセグロカモメは通常 2～3 個の卵を産むので一つの巣に 2～3 個体のヒナが存在するが、今回の調査では一つの巣から一羽のヒナのみを捕獲した。同じ個体を二度捕獲しないよう採血後にヒナの後頭部にマジックペンでマーキングするとともに、同じ親から生まれた同巣のヒナから採血しないよう、最低 10m 以上距離をおいてヒナを捕獲した。

大黒島で捕獲したヒナの数、三ヶ所(A、B、C 区、図 1)でそれぞれ 10 羽ずつ、計 30 羽である。また、大黒島の個体群と比較するため、北海道東部の太平洋側に位置するモユルリ島および北海道北部の日本海側に位置する天売島においても、同様にヒナからの採血を行い解析に用いた。大黒島およびモユルリ島と天売島の位置関係を図 2 に示す。

さらに、オオセグロカモメのコントロール領域と比較するため、ウミネコ(*Larus crassirostris*)のヒナも捕獲し、オオセグロカモメと同様に血液を採集した。

血液サンプルからの DNA 抽出は、TaKaRa 社の DNA 抽出キット Dr. GenTLE を用いて、または必要に応じてフェノール・クロロホルム法(Sambrook et al., 1989)により行った。

(2) プライマーの設定

ミトコンドリア DNA のコントロール領域を PCR 法で増幅させるために、コントロール領域の 5'側に位置する ND6 領域、および 3'側に位置する 12S rRNA 領域または tRNA-Phe 領域に PCR プライマーの設定を行った(図 3)。鳥類(ニワトリ:*Gallus gallus*)のミトコンドリア DNA の遺伝子配列を補足 1 に示す。

パソコンオンライン上で検索可能な DNA データベース(DDBJ/EMBL/GenBank)から、ミナミオオセグロカモメ(*Larus dominicanus*)、オグロカモメ(*Larus heermanni*)、カモメ(*Larus canus*)の 12S rRNA 領域の塩基配列データ、さらにカモメ(*Larus canus*)、ウミガラス(*Uria aalge*)、エトロフウミスズメ(*Aethia cristatellus*)の ND6 領域の塩基配列デ

ータを入手した。これらの種は全てオオセグロカモメと同じチドリ目 (Charadriiformes) に属する。得られた塩基配列データをマッキントッシュの解析ソフト GeneWorks version 3.2(Intelligenetics)で比較し、塩基が一致している約 20 塩基対の長さの配列を探し出した。このような種間で相同な配列を元に、12SrRNA 領域上にプライマーCha01563 を、ND6 領域上にプライマーCha16620 を設定した (図3)。

次に上記のプライマーCha01563 と Cha16620 を用いて、数サンプルについて対象 PCR を行った。PCR 産物を電気泳動し、約 1000 塩基対の長さのバンドが確認されたサンプルについて、TA Cloning Kit (Invitrogen)を用いてクローニングを行った。まずプラスミドベクターの DNA に PCR 産物組み込み、続いてプラスミドベクターを大腸菌の細胞内に取り込ませた。寒天培地上で大腸菌を一晩増殖させた。こうして得られたいくつかの大腸菌のクローンを、もう一度上記の PCR プライマーを用いて同じ条件で対象 PCR を行い、PCR 産物を取り込まれているかを確認した。PCR 産物を取り込まれていた大腸菌のクローンを液体培地内で一晩培養した後、 Wizard Plus Minipreps Kit (Promega)を用いて DNA を抽出した。プラスミド DNA の塩基配列を元に作られたシーケンスプライマー T7 と M13 reverse を用いて、オートシーケンサー HITACHI SQ-5500 (HITACHI) により 5'側と 3'側の両側から塩基配列の解読を行った。

こうして得られたオオセグロカモメの塩基配列を、もう一度 DNA データベースに登録されていた他種(上記の 6 種)の配列と比較し、相同な塩基配列上に新たな PCR プライマー LarusND6 と LarusPhe を設定した。

またオオセグロカモメ数個体、ニワトリ、およびタンチョウ (*Grus japonensis*) のコントロール領域の塩基配列データを GeneWorks version 3.2 で比較し、相同な塩基配列を検索、ダイレクトシーケンス用のプライマー LCcr-2 および LCcr-3 を設定した。

(3) 解析

DNA 抽出および以下の解析は平成 11 年 9 月上旬から平成 12 年 2 月下旬にかけて北海道大学理学部附属動物染色体研究施設にて行った。

大黒島、モユルリ島、天売島のオオセグロカモメ計 38 個体およびウミネコ 2 個体から得た各 DNA サンプルについて、プライマーLarusND6 と LarusPhe を用いて対象 PCR を行い、ミトコンドリア DNA コントロール領域を増幅した。PCR 産物を QIAquick PCR Purification (QIAGEN)を用いて精製した。ダイレクトシーケンス用プライマーLCcr-2 と LCcr-3を用いて、各サンプルの塩基配列をオートシーケンサー (HITACHI SQ-5000) により解読した。

各個体の塩基配列は GeneWorks version 3.2 により比較し、塩基置換を元に各個体に

おけるミトコンドリア DNA コントロール領域の遺伝子タイプを決定した。

遺伝子タイプ間の系統関係を把握するため、最節約ネットワークを Bandelt 1994 に従って作製した。

結果

(1) プライマーの有効性

今回、ミトコンドリア DNA コントロール領域を増幅するため、数本の PCR プライマーを作製した(図3)。DNA データベースに登録されていた他種の塩基配列を元に設定した Cha01563 と Cha16620 の組み合わせでは、目的とするコントロール領域以外に不特定多数の短い遺伝子領域が増幅してしまった。中には短いサイズの領域のみ増幅され、目的とするコントロール領域(約 1000bp)が増幅できない場合もあった。そこでクローニングを行いオオセグロカモメのコントロール領域に特異的な LarusND6 と LarusPhe を作製した。しかしこの組み合わせでも不特定他数の短い領域が増幅してしまう場合があった。

一方、ダイレクトシーケンス(塩基配列の解読)のために作製したプライマー LCcr-2 および LCcr-3 は、コントロール領域に特異的であると考えられ、複数の遺伝子領域が増幅された PCR 産物を用いた場合でも、問題なくコントロール領域のみの塩基配列を解読することができた。

(2) オオセグロカモメのミトコンドリア DNA コントロール領域の特徴

シーケンス用のプライマー LCcr-2 を用いてコントロール領域の 5'側の 400 塩基対(解析領域 a)を、また LCcr-3 を用いて 3'側の 450 塩基対(解析領域 b)を解読した(図3)。38 個体の比較から、5'側 400 塩基対中に全部で 12 ヶ所の塩基置換が認められた(表1)。また同様に、3 個体の比較から、3'側 450 塩基対中に、計 2 ヶ所の塩基置換が確認された。塩基置換の内容は全てトランジション(ピリミジン塩基同士またはプリン塩基同士で置換すること)であった。オオセグロカモメの 3'側領域には AAACAAC という 7 塩基を一つの単位として 12 回から 14 回の繰り返しからなるリピート配列が確認された。

オオセグロカモメとウミネコの配列を比較したところ、解析領域 a の比較では 22 ヶ所で、解析領域 b の比較では 10 ヶ所で塩基置換が確認された。

(3) 大黒島内および三つの島の間におけるオオセグロカモメ個体群の遺伝構造

オオセグロカモメ計 38 個体(大黒島 A 区 5 個体、B 区 9 個体、C 区 7 個体の計 21 個体、およびモユルリ島 8 個体、天売島 9 個体)について、5'側 400 塩基対(解析領域 a)で見られた塩基置換の組み合わせから、計 15 種類の遺伝子タイプが認められた(表 1、表 2)。

各調査区ごとに見つかった遺伝子タイプのうち、Is.3、Is.9、Is.10 は全ての調査区で見つかった(表 2)。一方、大黒島の 8 タイプのうち、Is.4、Is.6、Is.8、Is.13、Is.14 の 5 タイプが、またモユルリ島の Is.7、天売島の Is.11、Is.12、Is.15 がそれぞれ調査区特有の遺伝子タイプであった。

各遺伝子タイプの系統関係を、最節約ネットワークを用いて示した(図 4)。円中には、遺伝子タイプおよびその遺伝子タイプを持っていた個体数を示す。白抜きの円は、今回は見つからなかったが実際は存在すると考えられる遺伝子タイプを表す。置換が起こっている塩基は全部で 12 ヶ所見つかったが、遺伝子タイプ間では、最大でも 8 ヶ所までの塩基置換しかなかった。

考察

これまでカモメ属において、DNA 遺伝子マーカーを用いた研究は報告されていない。今回の解析を行うにあたり、まずタンチョウ(*Grus japonensis*)の解析に用いていたプライマー(Hasegawa et al. 1999)を使用した。ミトコンドリア DNA コントロール領域を増幅することはできなかった。そのため新たなプライマーを開発する必要が生じた。今回開発したプライマーLarusND6 および LarusPhe は、やや特異性にかけており、PCR の条件によっては小さいサイズの他の遺伝子領域が増えてしまう場合がある。それを防ぐためには、高温で処理したときのみ酵素活性をもつポリメラーゼ(例えばAmpli Taq Gold: PERKIN ELMER)を用いるなどの工夫が必要であろう。

しかしダイレクトシーケンスに用いたプライマーLCcr-2 および LCcr-3 はコントロール領域に特異的だと考えられ、対象 PCR の際にコントロール領域さえ増幅できていれば、たとえ他の遺伝子領域が同時に増幅されていたとしても、コントロール領域の塩基配列を解読する上で問題はない。プライマーLarusND6、LarusPhe、LCcr-2、LCcr-3 はオオセグロカモメとともにウミネコでも用いることができ、少なくともカモメ属の他の種でも使用が可能であろう。今後のカモメ属の個体群の遺伝構造研究のためにも今回開発したプライマーは非常に有効であるといえる。

ミトコンドリア DNA のコントロール領域は鳥類では約 1000~1200 塩基対である (Taberlet, 1996)。一般にコントロール領域は、塩基置換の起こりやすさにより、5'側から 3'側にかけて I、II、III と 3つの領域に分けられる (Baker and Marshall, 1997)。5'側に位置する領域 I が最も塩基置換が多く、次いで 3'側の領域 III で多い。中間に位置する領域 II は種間でもかなり保存性が高く、塩基置換が最も少ない。本研究における解析領域 a は、5'側末端に近い 400 塩基対であり、オオセグロカモメのコントロール領域の中でも最も塩基置換が起こりやすい領域であったと考えられる。解析領域 a で 12ヶ所の塩基置換が見つかったのに対し、解析領域 b では 450 塩基対を解読したが、塩基置換は 2ヶ所しか見つからなかった。解析に用いたサンプルが 3 個体と少なかったため正確には評価できないが、この領域にはそれほど多くの塩基置換は起こっていないと推測される。しかし解析領域 b では、7 塩基の繰り返しからなるリピート配列が見つかった。このようなリピート配列は、アメリカオオモズ (*Lanius ludovicianus*) やイヌワシ (*Aquila chrysaetos*) でも見つかっている (Mundy et al., 1997、Masuda et al., 1998)。オオセグロカモメのリピート配列の繰り返し回数はかなり個体変異が大きいようで、3 個体を比べたところ、それぞれ 12 回、13 回、14 回と全て異なっていた。このことから、今後このリピート配列の繰り返し回数による遺伝子タイプの特定も個体群の遺伝構造の解析を行ううえで有効であると考えられる。

オオセグロカモメとウミネコのコントロール領域を比較したところ、予想よりもかなり少ない塩基置換しか見られなかった。コントロール領域は一般にミトコンドリア DNA の中でも変異速度が速いと考えられている。今回オオセグロカモメとウミネコで用いた 400 塩基対はコントロール領域の中でも一番変異が高い場所だと考えられるが、その領域 a で約 20ヶ所、領域 b で見つかった置換数を合わせても計 30ヶ所である。これらから推測するとオオセグロカモメとウミネコの間では、コントロール領域全体で見てもせいぜい 40 塩基対ほどの塩基置換しかないと考えられる。他種におけるコントロール領域の報告によると ()、近縁種間でも 10%程度、つまり 1000 塩基対のうち 100 塩基対程度の塩基置換が見られていることからする (Wenink et al., 1994) と、オオセグロカモメとウミネコの間の変異は非常に小さいと推測される。しかしオオセグロカモメとウミネコは決して最も近縁な種間関係ではなく、互いに他のカモメと近縁種として分類されている。オオセグロカモメとその近縁種だと考えられているワシカモメ (*Larus glaucescens*) やシロカモメ (*Larus hyperboreus*) などとはさらに遺伝的変異が小さい可能性がある。

今回オオセグロカモメで確認された遺伝子タイプのうち、Is-3、-9、-10 の 3 タイプ

が大黒島内の三つの調査区全てで見つかった(表2)。さらに Is-3 は大黒島以外の二つの島でも見つかっている。このことからオオセグロカモメは、大黒島内の別のコロニーはもちろん、同じ太平洋側のモユルリ島、さらには日本海側の天売島まで、かなり広く分散して繁殖地を選んでいると考えられる。

しかし一方で、それぞれの島に特有のタイプも見られている。今回の調査では、サンプル数が少ないため評価が難しいが、将来サンプル数を増やすことで、大黒島内のコロニー間の移出入、さらにモユルリ島および天売島との移出入の程度の違いが定量的に評価できるであろう。加えて、北海道のオホーツク海側や、本州方面のオオセグロカモメの他コロニーでもサンプルを採集することにより、北海道近辺のオオセグロカモメの分散様式および遺伝構造が明らかになるであろう。

最節約ネットワークから遺伝子タイプ間の系統関係を調べたところ、個体数の多かった Is-9 や Is-10 がネットワークの中心であったことから、これらの遺伝子タイプが祖先系であると考えられる(図4)。大黒島とモユルリ島、天売島の間には遺伝子交流があると考えられるため、遺伝子タイプが各調査区ごとに独立した系統になることは考えられない。しかし大黒島に特有の Is-4 や -6、-13 などが互いに近接しており、また天売島特有の Is-2、-5、-12 がそれと反対側で近接していることから、各島ごとに保有する遺伝子タイプの系統にはある程度偏りがあるかもしれない。これについても今後さらにサンプル数を増やし、調査区を増やしていく必要があるだろう。

またコントロール領域の遺伝構造から推測される分散様式の特徴は、メスについて限定される。それはミトコンドリアが母親からしか子供に遺伝しないことに基づいている。将来オスも含めたオオセグロカモメの分散様式を明らかにするには、核に存在する遺伝子領域をマーカーとして研究を進める必要がある。今後は各島やコロニーの個体数変動なども考慮に入れることで、さらに海鳥のコロニーとその遺伝構造との関係が明らかになるであろう。

引用文献

Baker, A. J., and H. D. Marshall. 1997. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. Pp. 51-82 in D. P. Mindell, ed. Avian molecular evolution and systematics. Academic Press, San Diego, California.

Bandelt, H.-J. 1994. Phylogenetic networks. Verhandlungen des naturwissenschaftlichen

vereins in Hamburg. N. F. 34:51-71.

Hasegawa, O., S. Takada, M. C. Yoshida, and S. Abe. 1999. Variation of mitochondrial control region sequences in three crane species, the red-crowned crane *Grus japonensis*, the Common crane *G. grus* and the hooded crane *G. monacha*. *Zoological science* 16:685-692.

Masuda, R., M. Noro, N. Kurose, C. Nishida-Umehara, H. Yakechi, T. Yamazaki, M. Kosuge, and M. C. Yoshida. 1998. Genetic characteristic of endangered Japanese golden eagles (*Aquila chrysaetos japonica*) based on mitochondrial DNA D-loop sequences and karyotypes. *Zoo Biology* 17:111-121.

Mundy, N. I., C. S. Winchell, and D. S. Woodruff. 1997. Tandem repeats and heteroplasmy in the mitochondrial DNA control region of the Loggerhead shrike (*Lanius indovicianus*). *Journal of Heredity* 87:21-26.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press, New York.

Taberlet, P. 1996. The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. Pp. 125-142 in T. B. Smith and R. K. Wayne, eds. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. OXFORD UNIVERSITY PRESS, New York.

Wenink, P. W., A. J. Baker, and M. G. J. Tilanus. 1994. Mitochondrial control-region sequences in two Shorebird species, the Turnstone and the Dunlin, and their utility in population genetics studies. *Molecular Biology and Evolution* 11:22-31.

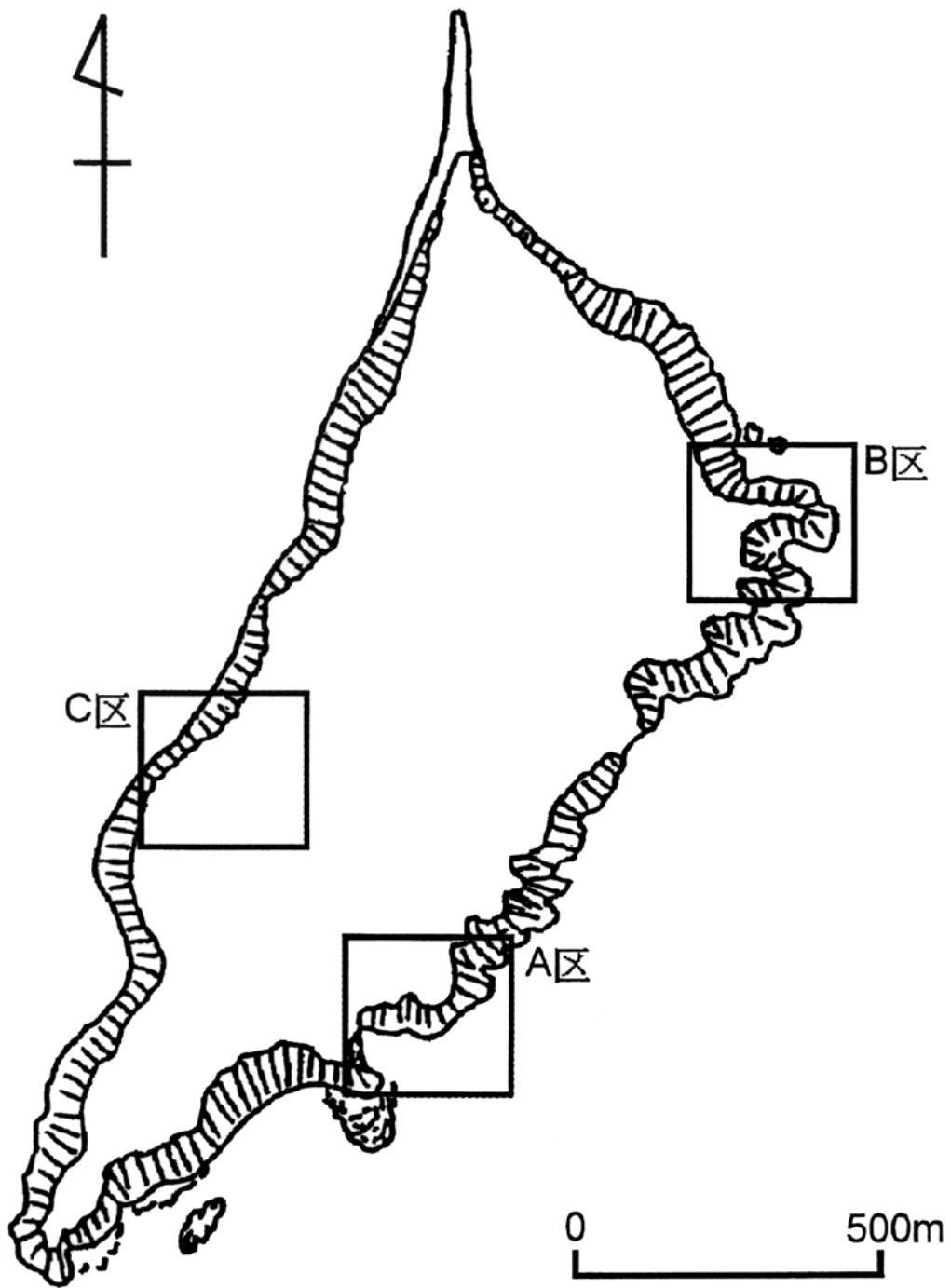


図1 大黒島におけるサンプル採集地点 (A、B、C区)

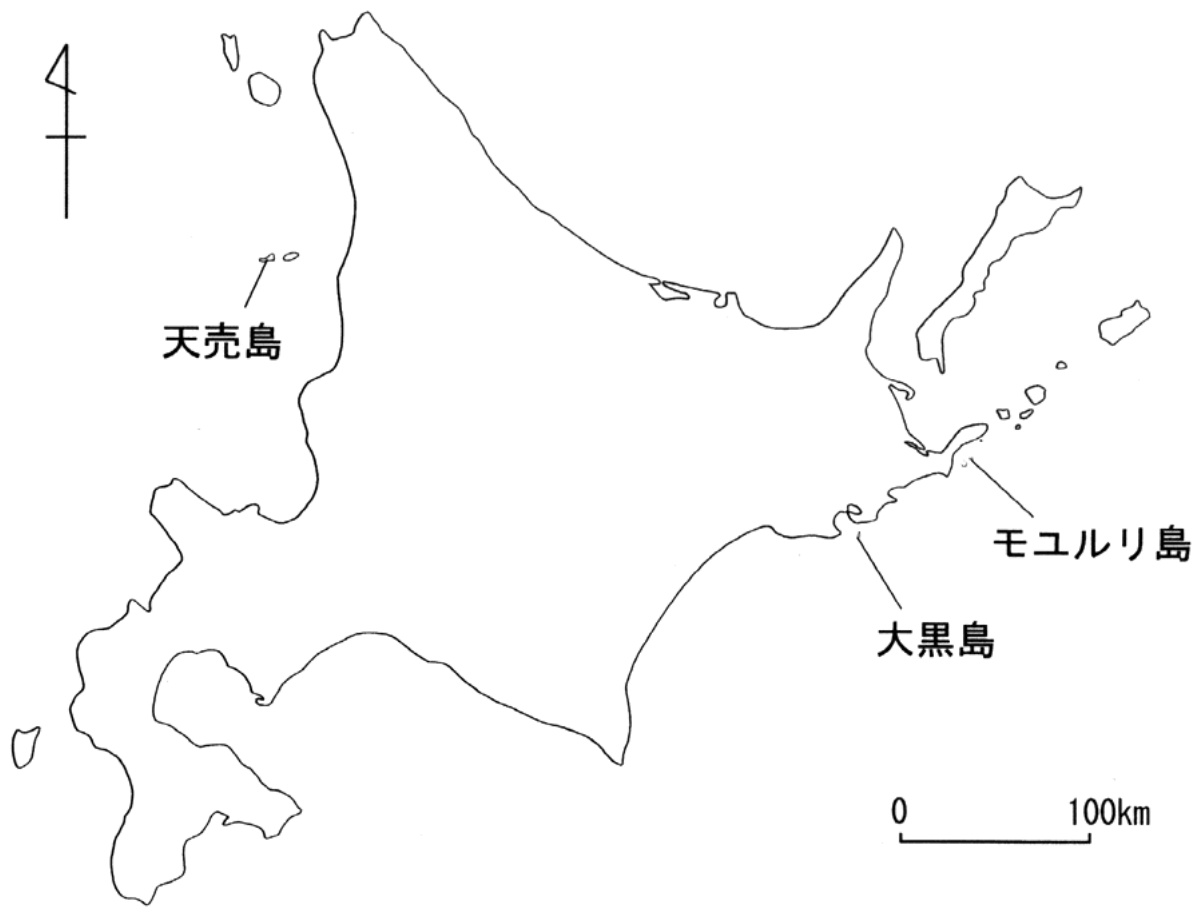


図2 サンプル採集した島の位置関係

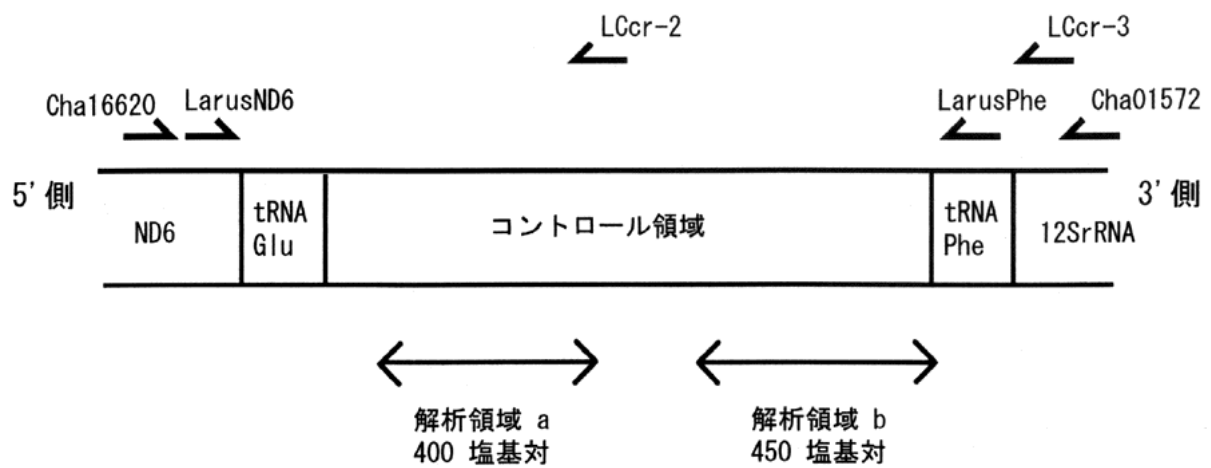


図3 コントロール領域を増幅させるためのPCRプライマーとシーケンスプライマーの配置および解析に用いた領域の位置と長さ

表1 遺伝子タイプ及び塩基置換

遺伝子タイプ	塩基の位置											
	22	228	281	283	285	296	302	312	315	315	326	329
コンセンサス	C	C	A	G	G	G	A	T	A	G	A	A
ls. 1	・	T	・	・	・	・	・	C	・	・	・	・
ls. 2	・	T	・	・	・	・	・	・	G	・	・	・
ls. 3	・	・	G	・	・	・	G	・	G	A	・	・
ls. 4	T	・	・	・	・	・	・	・	G	・	・	・
ls. 5	・	T	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
ls. 6	T	T	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
ls. 7	T	・	G	・	・	・	G	・	・	・	・	・
ls. 8	・	・	G	・	・	・	G	・	・	・	・	・
ls. 9	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
ls. 10	T	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
ls. 11	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	G	・
ls. 12	・	・	G	・	・	A	G	・	・	・	・	・
ls. 13	T	・	・	A	・	・	・	・	・	・	・	G
ls. 14	・	・	・	・	・	・	・	C	・	・	・	・
ls. 15	T	・	・	・	A	・	・	・	・	・	・	・

表 2 各調査区ごとにみられた遺伝子タイプ

調査区	遺伝子タイプ	サンプル番号
大黒島 A (N=5)	Is. 1	Ls206
	Is. 3	Ls202
	Is. 4	Ls210
	Is. 9	Ls207
	Is. 10	Ls209
大黒島 B (N=9)	Is. 1	Ls214
	Is. 3	Ls211
	Is. 8	Ls219
	Is. 9	Ls213
	Is. 10	Ls215
	Is. 10	Ls220
	Is. 13	Ls217
	Is. 13	Ls218
	Is. 14	Ls212
大黒島 C (N=7)	Is. 1	Ls227
	Is. 2	Ls224
	Is. 3	Ls221
	Is. 4	Ls222
	Is. 5	Ls223
	Is. 6	Ls225
	Is. 7	Ls226

調査区	遺伝子タイプ	サンプル番号
天売島 (N=9)	Is. 2	Ls023
	Is. 3	Ls061
	Is. 3	Ls063
	Is. 5	Ls034
	Is. 5	Ls043
	Is. 9	Ls064
	Is. 11	Ls056
	Is. 12	Ls049
	Is. 15	Ls068
モユルリ島 (N=8)	Is. 1	Ls093
	Is. 2	Ls090
	Is. 3	Cm206
	Is. 5	Cm204
	Is. 5	Cm208
	Is. 7	Ls094
	Is. 10	Cm205
	Is. 10	Cm209

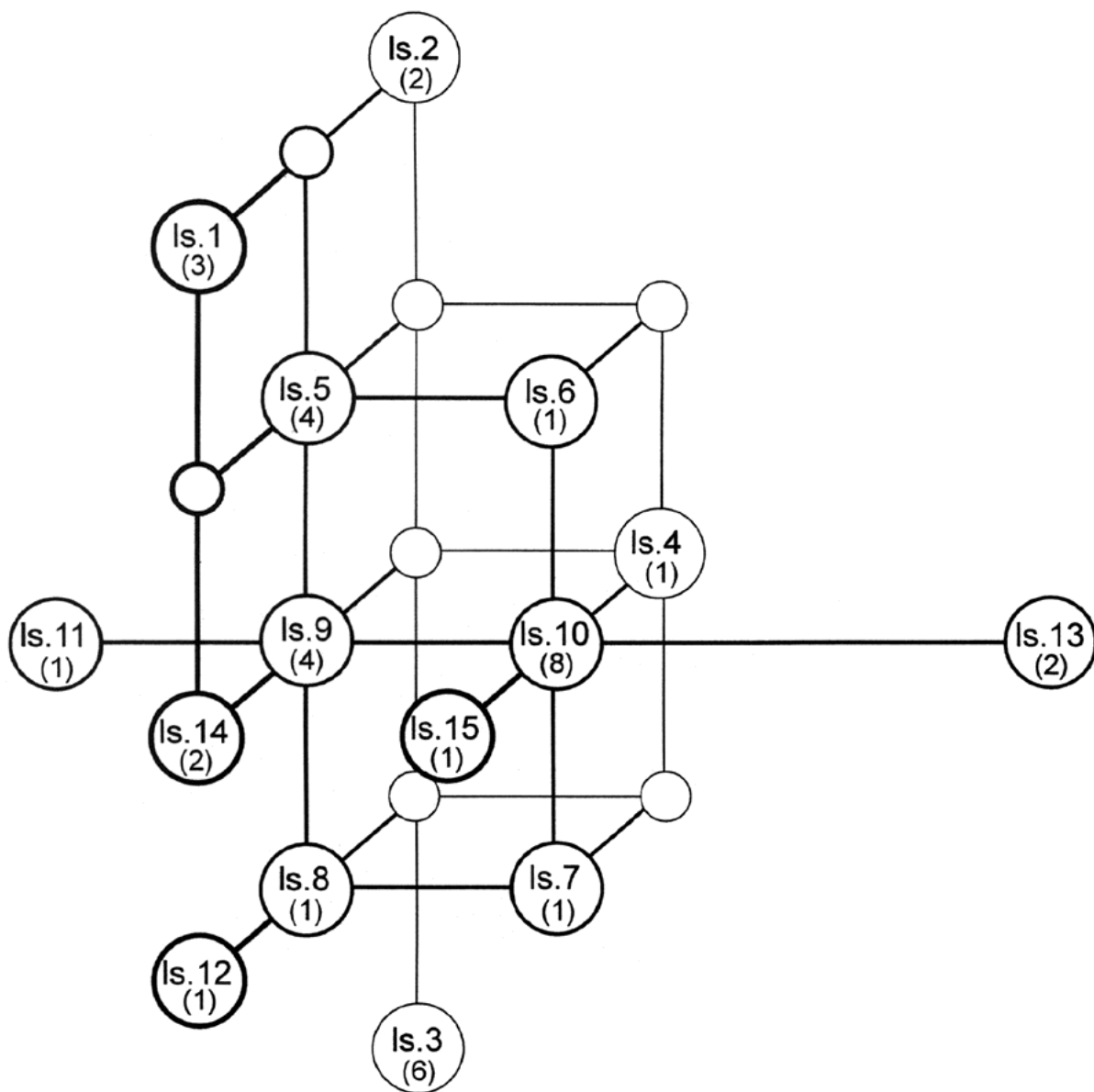
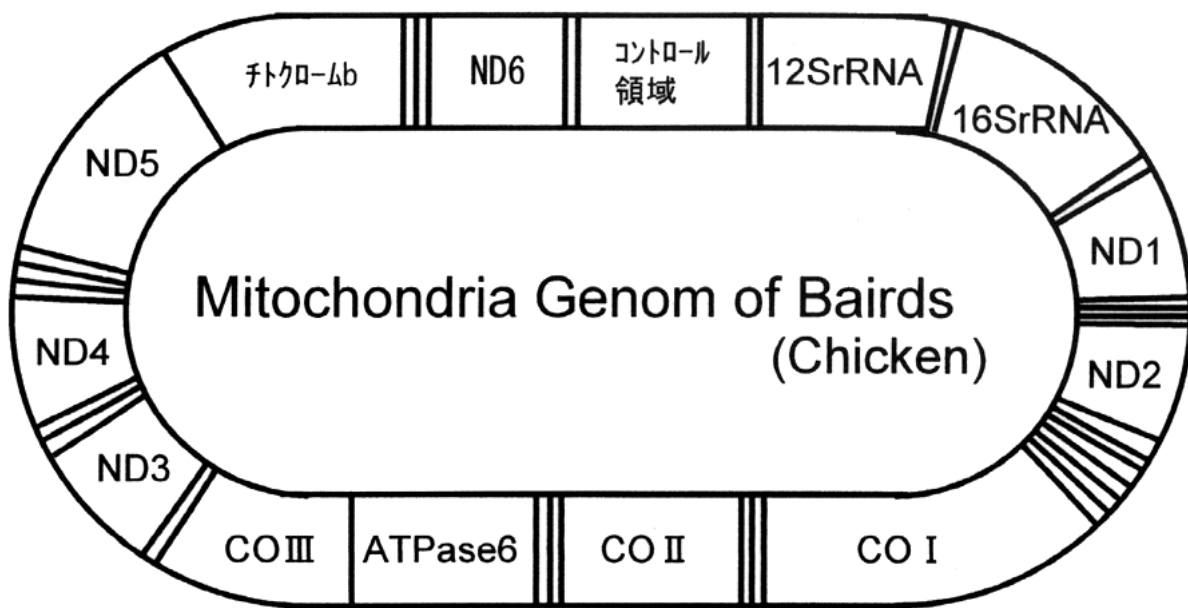


図4 各遺伝子タイプの塩基置換にもとづいた最節約ネットワーク（括弧内は個体数を表す。ls10とls.13のみ2塩基、その他はすべて1塩基ずつ異なる。）



補足1 鳥類（ニワトリ）のミトコンドリアDNAの遺伝子配列