

## 資料

# 福岡県内で違法飼養個体として保護されたメジロの遺伝子解析

中村朋史・中島 淳・河村真紀子\*

県では鳥獣保護法に基づき、密猟および違法飼養の取締りのために、担当部署が立入検査を実施している。しかし、対象となる鳥類の種・亜種の外部形態からの同定は一般的に難しく、遺伝子解析による客観的な同定手法の確立は円滑に検査を実施する上で重要である。今回、2011年に違法飼養個体として保護されたメジロ類の羽を用いて、ミトコンドリア DNA シトクロム *b* 領域の解析による種・亜種判定が可能かどうか検証を行った。その結果、解析可能な遺伝子断片が得られ、系統解析によって全ての個体が日本産であることが強く示唆され、遺伝子解析による種・亜種の同定が技術的に十分可能であることが明らかとなった。

[キーワード：メジロ、違法飼養、遺伝子解析]

## 1 はじめに

メジロ (*Zosterops japonicus*) はスズメ目メジロ科メジロ属の鳥類の一種である。全長は約 12 cm でスズメより小さく、緑がかった背と暗褐色の羽を持つ。また、その名前の由来となった目の周りの白い輪が最も特徴的な鳥である。日本の野鳥の中では鳴き声がよく、姿が愛らしいため、古くから愛玩用、あるいは鳴き声を競わせる“鳴き合わせ”を目的として飼養されてきた。

本種は日本国内では 6 亜種、海外では 3 亜種が分布している。従来日本では国内で捕獲されたメジロについては一世帯 1 羽に限り飼養することが認められてきた。しかし、無許可での飼養や密猟、売買が横行し、海外から輸入された別種・別亜種のメジロ類は制限なく飼養できることから、日本産を外国産と偽って飼養を継続する事例も多数報告されている。このような状況の下、環境省は鳥獣の保護および狩猟の適正化に関する法律（鳥獣保護法）の指針改正を行い、2012 年 4 月からメジロの愛玩飼養を目的とした捕獲を原則許可しないことを正式に決定した。したがって、今後は日本産メジロの捕獲・飼養自体が基本的に禁止されることとなった<sup>1)</sup>。

福岡県内でもメジロの鳴き合わせ会は開催されており、2011 年には 2 回にわたって警察・県による立入検査が行われ、日本産と思われる多数の個体が保護された。これらの個体については、山階鳥類研究所が認定する標識調査員の鑑定の結果、日本産と同定されており、その多くは違法と判断されるものであった。しかしながら、メジロ類の外部形態・色彩のみの同定は専門家以外では困難であり、違

法に捕獲された日本産メジロが、海外産と偽って取引される可能性は今後も想定される。したがって、外部形態・色彩での同定と合わせて、遺伝子解析を活用した同定を併用すれば、より確実に日本産と海外産の識別が可能となり、違法個体の摘発あるいは違法飼養の抑制にもつながることが期待される<sup>2)</sup>。

そこで、2011 年に県内で違法として摘発されたメジロの羽からの DNA 抽出および遺伝子系統解析を試み、サンプル保存法および解析法の有効性に関して検討を行ったので報告する。

## 2 解析方法

### 2・1 検体

久留米市鳥類センター（久留米市東櫛原町中央公園内）にて保護中のメジロ個体から風切羽および尾羽を採取し、個体毎にチャック付きポリエチレン袋に小分けした。ポリエチレン袋は保冷材を同封したクーラーボックスに収納して研究所に持ち帰り、その後は研究所内のフリーザー（-30℃）にて保管した。サンプリングは平成 23 年 3 月および 9 月の 2 回にわたって行い、それぞれのサンプル数は 83 個体および 18 個体であった。そのうち、10 個体を選抜し、今回の解析に用いた。なお、羽採取後のメジロは規定に従いそのまま放鳥されたが、大部分の個体は問題なく飛翔することが可能であった。

### 2・2 遺伝子解析

上記 10 サンプルを遺伝子解析に供した。total DNA の抽出は既報に準じ CTAB 法にて行った。サンプル羽は基部

福岡県保健環境研究所（〒818-0135 太宰府市大字向佐野 39）

\*福岡県環境部自然環境課（〒812-8577 福岡市博多区東公園 7-7）

をハサミで細かく裁断した後、1.5 mL チューブ内にてグライNDERに接続したペッスルを用いてすり潰した。定法通りに抽出および沈澱させた DNA は減圧乾燥した後、一晩かけて超純水に穏やかに溶解させた。得られた DNA 溶液はフリーザー (-30°C) にて解析まで保存した。DNA 溶液から Ex Taq (TaKaRa) および特異的プライマーを用いて、系統解析等に利用されているミトコンドリア DNA シトクロム *b* (*cytb*) をコードする領域を増幅した。既報に基づいてデザインし、今回用いたプライマーを表 1 に示す<sup>3,5)</sup>。

表 1 本研究で使用したプライマー

Primer	Sequence (5' -3' )	Purpose
L14833	CAGGCCTAATAAAAGCCTA	PCR, Sequencing
L15407	TGAGGTGGATTCTCAGTAGAC	Sequencing
H15487	GATCCTGTTTCGTGGAGGAAGGT	Sequencing
H16070	GGAGTCTTCAGTCTTTGGTTTAC	PCR, Sequencing

増幅断片を Microcon YM-100 (ミリポア) にて精製し、所定量を用いて BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ) によるシーケンス反応に供した。反応産物を BigDye XTerminator (アプライドバイオシステムズ) にて精製後、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer にて塩基配列を決定した。

シーケンスにて決定された塩基配列は ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/> など) によるアライメント解析およびフリーソフトである MEGA (<http://www.megasoftware.net/>) を用いた分子系統樹作成に供した。系統樹においては、登録配列との比較を行うことにより産地および近縁種との関係を推定した。

### 3 結果

得られた DNA 溶液から増幅した *cytb* 領域のアガロースゲル電気泳動の結果を図 1 に示す。羽毛 (主に基部) から得た DNA 溶液からは *cytb* の良好な増幅が確認できた (約 1,100 bp)。羽毛の基部のみから遺伝子解析 (対象領域の増幅) に用いるのに十分な DNA を抽出できたことにより、サンプルの採取法および保存法に問題が無いことが明らかとなった。

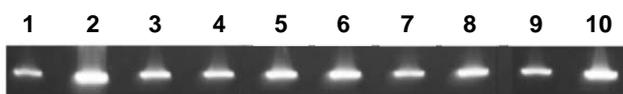


図 1 メジロ保護個体より得た DNA から増幅した cytochrome *b* (*cytb*) 領域の電気泳動図 (約 1,100 bp)

増幅断片を鋳型としてシーケンス反応を行い *cytb* 領域の塩基配列決定を試みたところ、9つの断片の配列の全長を決定することに成功した。しかしながら、今回は1つのサンプルからは良好な波形を得られなかった。DNA 抽出および *cytb* 領域の増幅は問題なく行っていたことから (図 1)、サンプル調整中のコンタミネーションもしくはシーケンス酵素反応段階での不具合の可能性が考えられる。今回は全ての個体の遺伝子型を確定する必要は無かったため、他の 9 サンプルについて解析を継続した。

決定した配列 (*cytb* 領域、約 1,100 bp) を用いて作成した系統樹を図 2 に示す。保護個体サンプルは頭に黒丸 (●) を表記、サンプリング年月およびサンプル番号で示した。系統樹の作成は既報に準じて、近隣結合法により行った。比較対象として NCBI などのデータベースに登録されている配列を取得し、解析に用いた。その結果、今回遺伝子解析に成功した 9 サンプルはすべて同じクレードに分類され、サンプルの *cytb* 領域配列はデータベースに登録のあった日本産メジロ (茨城、対馬、屋久島) の *cytb* 領域と非常に相同性が高いことが明らかとなった。一方、比較に用いた海外産の別亜種とされるメジロ (キクチメジロ、ヒメメジロ) とは遺伝的にも隔たりが大きく、ユーラシア大陸や東南アジア周辺に分布する別種のメジロ属 (ハイバラメジロ、チョウセンメジロ) とともに遺伝的に大きく異なっていた。

### 4 考察

今回解析した 9 個体は海外産の別亜種のメジロや別種のメジロ類とは遺伝的に明瞭に区別が可能であった。したがって、今回県内において違法として保護された個体は日本産の野生種である個体、もしくは野生種同士の掛け合わせで繁殖した個体である可能性が非常に高いと考えられる。以上より、生体から採取して冷凍保管していた羽からの遺伝子解析は十分可能であり、かなり精度の高い種・亜種の同定が可能であることがわかった。

今回の解析には *cytb* の全長 (約 1,100 bp) を用いたが、全長がデータベースに登録されているケースはあまり多くなく、200-300 bp ほどの断片として登録されているものが多かった。今後、日本産か否かを判定する場合には *cytb* 領域の全長を解析する必要性はあまりなく、変異が多い領域を選抜して検討を行うことでも対応が可能であると考えられる。また、他の遺伝子領域を用いて系統間比較を行った文献もあることから、*cytb* 領域のみからではなく、他領域も含めた複合的な解析を行うことでより確実性の高いデータが得られる可能性が高い。

前述したように、環境省は 2012 年 4 月からメジロの捕獲・飼養を原則許可しないことを正式に決定したため、メ

ジロ飼養に対する監視の目はより一層強化されることが予想される。遺伝子解析による種・亜種同定は科学的で確実な手法であり、きわめて客観性の高い証拠として裁判等で用いることも可能であることから、今後もこの分野についての技術的知見を蓄積していくことの必要性は高い。特に、遺伝子解析が可能な状態でサンプルを長期保管する方法については、ディープフリーザーの活用もしくは無水エタノール中での保管など、さらなる検討が必要である。

**文献**

1) 環境省：鳥獣の保護を図るための事業を実施するための基本的な指針，平成 23 年 9 月 5 日，2011.

- 2) (財) 山階鳥類研究所：メジロ識別マニュアル, 2001.
- 3) S. Zhang *et al.*: Molecular phylogeny of the yuhinas (Sylviidae: *Yuhina*): a paraphyletic group of babblers including *Zosterops* and Philippine *Stachyris*. *Journal of Ornithology*, 148, 417-426, 2007.
- 4) J. C. Lee *et al.*: A novel strategy for avian species identification by cytochrome *b* gene. *Electrophoresis*, 29, 2413-2418, 2008.
- 5) F. Dong *et al.*: Molecular systematics and diversification of the Asian scimitar babblers (Timaliidae, Aves) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, 1268-1275, 2010.

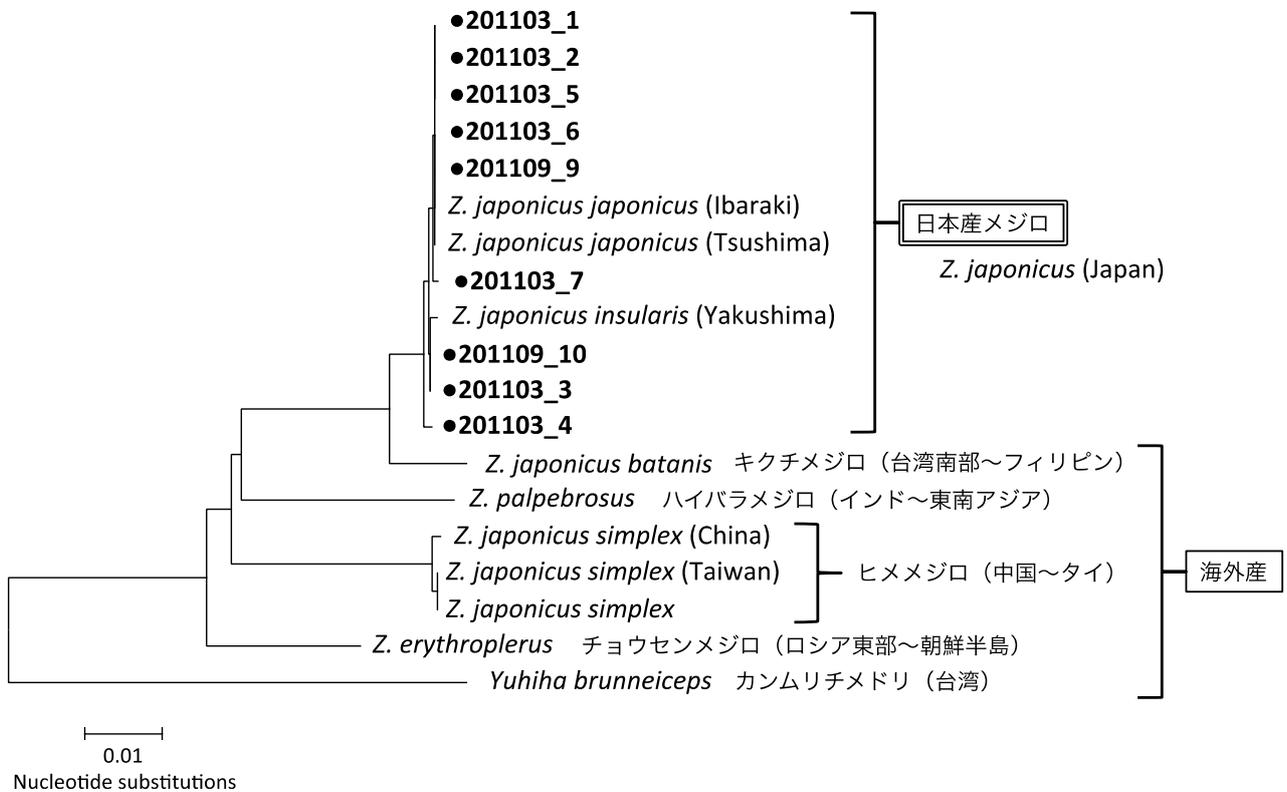


図 2 近隣結合法により作成した日本産メジロおよび近縁種の分子系統樹  
頭に黒丸（●）が付いたものが今回保護されたメジロ個体（個体番号は図 1 と同じ）