



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	北海道のヒグマ (<i>Ursus arctos yesoensis</i>) の遺伝的変異に関する研究
Author(s)	釣賀, 一二三
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第3679号
Issue Date	1995-03-24
DOI	https://doi.org/10.11501/3082681
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51271
Type	doctoral thesis
File Information	000000285133.pdf



3679

北海道のヒグマ (*Ursus arctos yesoensis*) の遺伝的変異
に関する研究

釣賀一二三

①

北海道のヒグマ (*Ursus arctos yesoensis*) の遺伝的変異 に関する研究

釣賀一二三

目 次

緒言	1
----------	---

第1章：塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムによる化学的不動化

はじめに	6
材料と方法	7
結果	8
考察	11
小括	12

第2章：タンパク多型による遺伝的変異の推定

はじめに	13
材料と方法	14
結果	14
考察	14
小括	18

第3章：DNAフィンガープリント法の個体識別、父子判定および遺伝的変異の推定への応用

はじめに	19
材料と方法	20
結果	25
考察	32

小括	35
第4章：ミトコンドリアDNA多型による遺伝的変異の推定	
はじめに	38
材料と方法	38
結果	41
考察	41
小括	46
総括	47
謝辞	53
引用文献	54
英文要約	60

クマ類の生息数は、ジャイアントパンダ (*Ailuropoda melanoleuca*) を含む8種のうち6種において減少しつつある (Cowan, 1972; Servheen, 1990)。本研究で扱ったヒグマ (*Ursus arctos*) はクマ類の中ではもっとも広範囲に生息しているが、1800年代の半ば以来、猟銃の進歩やヒトの生活域の拡大あるいは生息地の破壊によってその生息域は顕著に減少してきた (Servheen, 1990)。ヨーロッパでは多くの地域で絶滅に瀕している状態で、生息域の分断化が進行しており、すでに絶滅した地域もある (Curry-Lindahl, 1972)。現在、将来に安定して生息し得るのは、元ソヴィエト連邦の北部、アラスカそれにカナダのヒグマにすぎない (Servheen, 1990)。

北海道のヒグマ (*Ursus arctos yesoensis*) についても、その生息域は減少、分断化され、全体の生息数も減少しつつあると考えられる (北海道, 1994)。1900年代後半に始まった北海道開拓以来ヒグマは害獣として扱われ、一貫した駆除が行われた結果、1980年代には北海道北部地域で生息数および生息域の急激な縮小が起きている (青井, 1990)。北海道では、アンケート調査を中心としたヒグマの分布に関する調査を行っているが、1984年と1991年の調査の結果を比較すると、1991年の調査において生息区画数が増加しているのは上川支庁のみで他の支庁ではすべて減少している。特に、根室支庁、石狩支庁および宗谷支庁では半減以下の減少率を示し、胆振支庁をはじめとする5支庁では30%以上の急減を示した。唯一減少のみられなかった上川支庁でもその増加率はわずか3%にすぎない (北海道, 1994)。このような生息域の減少傾向の中、生息域の分断化も進行し、現在では北海道のヒグマは、アンケート調査による分布の空白域に沿って、図1に示した5つの地域に生息域をもつ個体群 (地域個体群) に分けられると考えられる (北海道, 1994)。本研究においてもこの5つの地域個体群をもとに検討した。最近になってヒグマに対する保護管理の必要性が提唱され、1966年に導入された「春グマ一斉

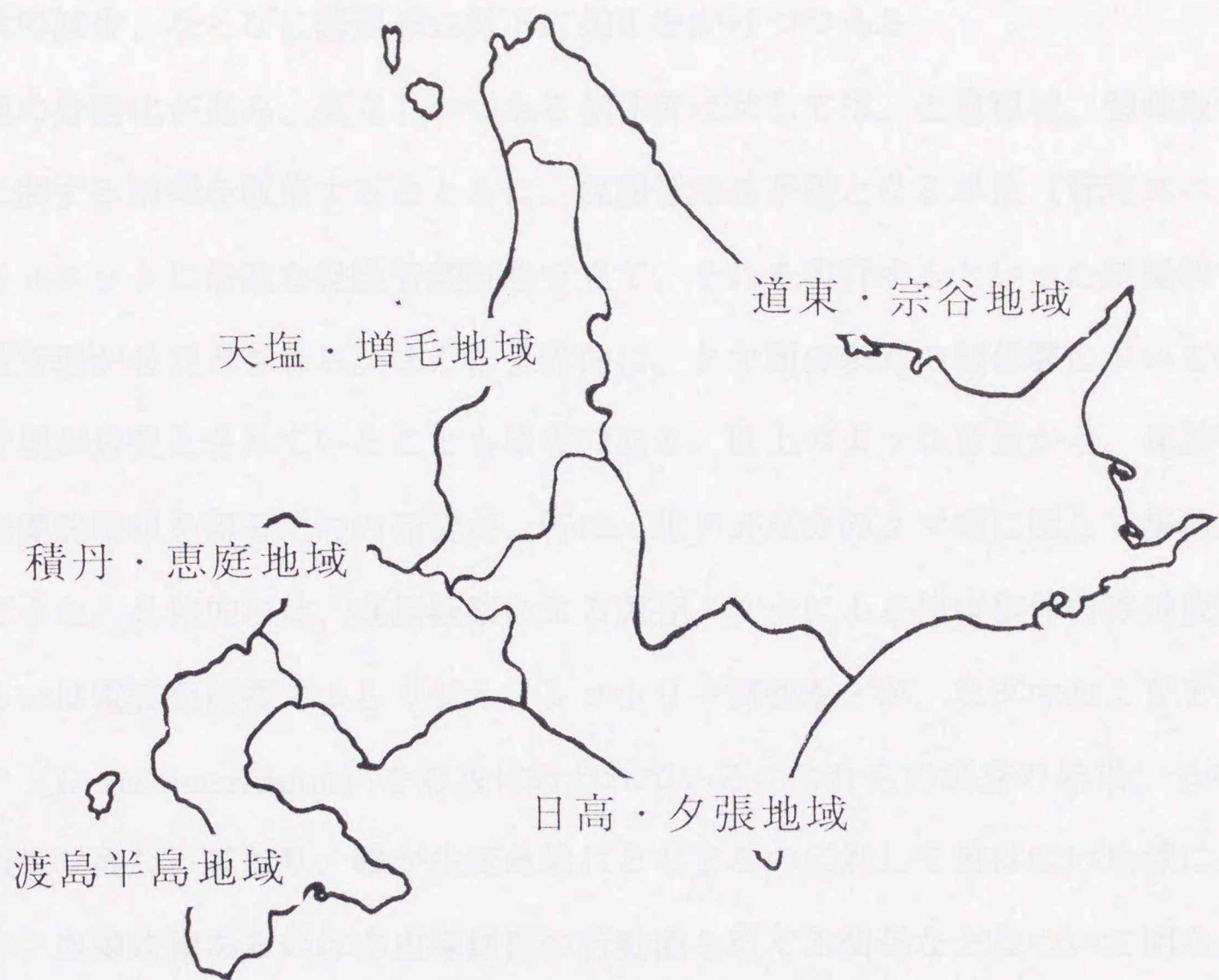


図1 ヒグマの地域個体群 (北海道, 1994)

駆除制度」が廃止された。これにより積極的な駆除の歴史に終止符は打たれたが、生息地である森林の開発は今なお続けられ、進行しつつある生息域の分断化は繁殖に参加する個体数の減少、ならびに繁殖率の低下に拍車をかけつつある。

生息地の分断化が進み、孤立しつつある個体群に対しては、生息環境、個体数あるいは繁殖に関する情報を収集するとともに、保護管理の基礎となる単位（管理ユニット）を定め各ユニットに最適な保護管理計画を立て、それを実行するといった組織的で徹底的な保護管理が必要とされる。また、世界的に、クマ類の多くの個体群について積極的な保護管理が必要とされていることも事実である。以上のような背景から、保護管理のための基礎的情報を得るための研究が、特に、北アメリカのクマ類に関して集約的に進められてきた。具体的には、直接観察による調査、ワナによる捕獲個体の標識放逐と再捕獲あるいは電波発信機によるラジオテレメトリー調査などが、ヒグマおよびアメリカクロクマ（*Ursus americanus*）を対象に行われている。これらの調査の結果、子の分散様式が雌雄で異なっており、雌が生誕地域にとどまるのに対して雄は広い地域に分散することや、血縁雌間あるいは非血縁雌間の行動圏をめぐる関係などについて明らかにされてきた（Rogers, 1976, 1977; Elowe and Dodge, 1989）。さらに、ラジオテレメトリーあるいは狩猟個体から得られた情報による年齢構成、繁殖率および死亡率の推定が試みられており、保護管理の対象となる個体群についての個体数の増減の推移あるいは、今後におけるその傾向について論じられている（Bunnell and Tait, 1985）。

北海道のヒグマに関する研究の歴史はまだ浅く、アンケート調査による分布の変遷や、狩猟統計の分析による個体群の動向（梶, 1982）、捕獲個体の性あるいは年齢の構成（青井, 1985; Mano, 1987）および捕獲個体の生殖器の分析による繁殖状態の推定（Tsubota *et al.*, 1993）に関する報告がなされている。そして、地域個体群の生存率と繁殖率からその個体群における個体数の減少を示唆した研究は最近になってようやくみられるようになったばかりである（間野, 1993）。

個体群の保護管理を考える上で、これまでに述べたラジオテレメトリーなどの手法で

対象とする個体群に関する情報を得ることは必要不可欠であるが、同時に対象とする個体群の遺伝子構成を把握することも重要であると考えられる。生息地域の分断化は地域個体群の縮小をもたらし、それが進行すれば近親交配が起り急激な個体数の減少へと向かう恐れもある。また、アンケート調査などによってある程度の分布状況は明らかになるが、地域個体群間に個体の移動がどの程度あるのか、あるいは隔離されていると思われる個体群の孤立の程度までを計り知ることはできない。このような点を明らかにし、将来保護管理の基準となるような管理ユニットを作成する上で、遺伝子構成に関する情報は必要不可欠である。

ヒトを含む生物種に関して、ゲノム全体の遺伝的変異を視野に入れた分析が行われるようになったのは、ゲル電気泳動が用いられるようになってからである (Harris, 1966; Lewontin and Hubby, 1966)。以降、血液や臓器に含まれるいくつかのタンパクや酵素の遺伝的変異を電気泳動法を用いて1つ1つ検索する方法によって、1984年までに1000種を越える動植物についてのデータが集約された (Nevo *et al.*, 1984)。さらに、最近では核DNAの変異を直接検索する事で、対象とする種内あるいは個体群内の変異について研究されるようになった (Kreitman, 1983; Gilbert *et al.*, 1990)。

これまでに、クマ類に関する遺伝的変異に関する研究として、タンパク多型を用いた種内変異に関する研究が、アメリカクロクマとホッキョクグマ (*Ursus maritimus*) について報告されているが、検出された変異はきわめてわずかで個体群としての低変異性を考察するにとどまっている (Allendorf, 1979; Manlove, 1980)。最近になってミトコンドリアDNAの変異を扱った研究もみられるようになり、主に、種間の変異を検討したものが多く報告されているが (Shields and Kocher, 1991; Taberlet and Bouvet, 1992; Zhang and Ryder, 1993)、Kohn *et al.* (*in press*) は、ヨーロッパのヒグマ (*Ursus arctos arctos*) の6つの地域個体群における遺伝的変異を検索し、遺伝子構成を明らかにした。また、Paetkau and Strobeck (1994) は、マイクロサテライトDNAによる核DNAの検索で3つの地域個体群に関して個体群内の遺伝的変異を検討し、ニューファン

ドランド島の個体群が大陸の個体群と比較して遺伝的多様性が著明に低いことを示した。

本研究では、これまでに他の動物種や地域の個体群について調べられてきた遺伝的変異に関する研究の手法を北海道のヒグマの個体群に応用し、ヒグマの遺伝的多様性について検討した。

第1章：材料の収集の際に応用した塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬による化学的不動化について述べた。

第2章：捕殺個体から得られた筋組織材料を用い、タンパク多型による遺伝的変異の検討を行った。

第3章：飼育個体についてミニサテライトプローブを用いたDNAフィンガープリント法による個体識別および父子判定を試みるとともに、野生個体の遺伝的多様性と地域分化について検討した。

第4章：全道各地域個体群の捕殺個体から得られた肝を材料とし、ミトコンドリアDNAの多型による遺伝的変異性について検討した。

はじめに

野生動物から生体試料を得る際にその不動化法の選択は、重要な問題である。小型の草食獣であれば、物理的な不動化の適用も考えられるが、大型の肉食獣では薬物を用いた化学的不動化が必要である。化学的不動化に使用する薬物は、体重を推定に頼らなければならないことから、安全域が広くなければならない。野生動物では雌雄の判別も困難な場合が多いため、雌雄による効果の差も少ないものが求められる。さらに、作業する側の安全性の面からも、安定した効果の得られることが要求される。北海道のヒグマを含め、クマ類の化学的不動化には、これまで塩酸ケタミン (ketamine hydrochloride) と塩酸キシラジン (xylazine hydrochloride) を併用する方法が多く用いられてきた

(Addison and Kolenosky, 1979; Lee *et al.*, 1981; Tsubota *et al.*, 1991)。この薬剤の組み合わせは、特に、塩酸ケタミンの用量において安全域が広く、雌雄による感受性の差もないようである (Tsubota *et al.*, 1991)。しかし、不動化薬を投与する際に使用する吹き矢のタマに充填できる薬液量は限られているのに対し、塩酸ケタミンが200 mg/ml以上の濃度で調製できないことから必然的に薬液量が多くなるため、数度に分けて投与しなければならない。実際、野外でヒグマの不動化を行う場合出来る限り興奮させずに早く導入を行うことが必要であり、薬剤の投与回数は出来る限り少なくすることが望まれる。

近年、200種を越える様々な生物に応用され、多くのクマ類に関する使用例の報告があり (Schobert, 1987)、アメリカクロクマ (*Ursus americanus*) では広く応用されている塩酸チレタミン (tiletamine hydrochloride) と塩酸ゾラセパム (zolazepam hydrochloride) の混合薬は、少量で不動化を行うことができその効果も優れているとい

われている (Schobert, 1987; Gibeau and Paquet, 1991)。そこで、今回この塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬を飼育下および野生のヒグマに応用し、塩酸ケタミンと塩酸キシラジンの併用例と比較検討した。

材料と方法

塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬の実験に用いたヒグマは、のぼりべつクマ牧場で飼育されている20頭と1993年に渡島半島南西部でドラム缶ワナで生け捕りにした9頭である。また、塩酸ケタミンと塩酸キシラジンを併用したヒグマは、のぼりべつクマ牧場で飼育されている23頭および1992年に渡島半島南西部で生け捕りにした3頭である。

飼育個体に対する応用

不動化薬の投与に先立って硫酸アトロピン (atropine sulfate; アトロピン, 田辺) 0.005–0.01 mg/kg を前投薬として投与した。その10分後に、塩酸キシラジン (Celactar, Bayer, Germany) は100 mg/ml に調製したものを1 mg/kg、塩酸ケタミン (ケタミン原末, 三共) は200 mg/ml に調製したものの10 ml/kg を混合して初期投与し、必要に応じて塩酸ケタミン (ケタミン原末あるいはケタラール50, 三共) の追加投与を行った。また、100 mg/ml に調製した塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬 (Zoletil 100, Virbac, France) においても硫酸アトロピン投与10分後に、2–3 mg/kg を初期投与し、必要に応じて1–1.5 mg/kg の追加投与を行った。なお、薬液の投与は主に突き槍式の注射器 (一部吹き矢) を用い、導入後はデイスポーザルのシリンジを用いた。

不動化薬を投与した後、刺激に対する反応がなくなり安全に作業ができる状態になった時点を導入とし、それまでの時間を分単位で計測した。導入後は、採血などの作業を

進めると同時に体温、呼吸数および心拍数を計測した。作業後は安静を保ち、頭部を挙上した時点を覚醒としこの時間も計測した。ただし、作業上の都合ですべての個体についてすべての項目を測定することはできなかった。

野生個体に対する応用

野生個体の場合は、飼育個体と異なり事前に体重を測定することは不可能である。したがって、推定体重に従って飼育個体同様硫酸アトロピンを前投与し、10分後に不動化薬の投与を行った。薬液の投与には、容量3mlの吹き矢か、ディスポーザルのシリンジを用いた。測定した項目についても飼育個体と同様であるが、野生個体については採血以外に電波発信機の装着、耳票の装着、体重などの測定および年齢査定のための抜歯などを行ったため、作業時間が長くなっている。また、ここでも一部測定できなかった項目があるが、特に、覚醒の時間については作業に従事する者の安全を考えて測定しなかった。

結果

飼育下、野生個体に対して2種類の不動化薬を用いたときの投薬量、導入時間などの各測定値を表1（飼育下）および表2（野生個体）に示した。野生個体については、不動化後に計測した体重より算出したkgあたりの投薬量を示した。2種類の不動化薬間の比較では、導入時間、体温、呼吸数ともに有意差は認められなかった（Mann-WhitneyのU検定）。一方、体重あたりの薬液量の比較では、塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬が有意に少ない値を示した（Mann-WhitneyのU検定）。

塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬については、投薬量および導入時間について雌雄差を検討したが、有意な差はみられなかった（Mann-WhitneyのU検定）。また、飼育下の個体における覚醒までの時間は、表3に示した。

表1 飼育個体における化学的不動化薬の投薬量と各測定値の比較

投薬量および 測定値	塩酸ケタミン ¹⁾ (供試頭数)		塩酸チレタミン 塩酸ゾラゼパム (供試頭数)	
体重 (kg)	248.3	±101.2 (23)	263.7	±104.9 (20)
薬用量 (mg/kg)	8.68	± 3.26 (23)	3.49	± 1.56 (20)
薬液量 (ml/kg)	0.043±	0.016 ^a (23)	0.035±	0.016 ^b (20)
導入時間 (分)	16.6	± 6.9 (9)	14.0	± 10.0 (15)
直腸温 (℃)	37.4	± 0.5 (13)	37.1	± 0.5 (6)
呼吸数 (/分)	13.1	± 7.0 (12)	16.0	± 11.0 (11)
心拍数 (/分)	59.2	± 13.1 (5)	89.0	± 14.0 (4)

数値は、平均値±S D、a,b間に有意差あり (P<0.05)。

1) 塩酸キシラジンと併用。

表2 野生個体における化学的不動化薬の投薬量と各測定値の比較

投薬量および 測定値	塩酸ケタミン ¹⁾ (供試頭数)		塩酸チレタミン 塩酸ゾラゼパム (供試頭数)	
体重 (kg)	108.7	±57.4 (3)	60.0	±29.5 (9)
薬用量 (mg/kg)	10.4	± 2.6 (3)	3.86	± 1.45 (9)
薬液量 (ml/kg)	0.052±	0.013 (3)	0.039±	0.015 (9)
導入時間 (分)	20.0	± 12.3 (3)	14.0	±11.0 (9)
直腸温 (℃)	37.5	± 0.5 (3)	37.9	± 0.3 (8)
呼吸数 (/分)	11.3	± 7.6 (3)	16.0	± 2.0 (9)
心拍数 (/分)	74.0	± 14.1 (3)	118.0	±20.0 (7)

数値は、平均値±S D。

1) 塩酸キシラジンと併用。

表3 飼育下のヒグマの塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬を用いた不動化において覚醒に要した時間

ヒグマ No.	性別	覚醒までの時間 (分)		
		初期投与から	導入から	最終投与から
1	雄	56	35	20
2	雄	82	74	40
3	雄	51	41	計測せず
4	雄	45	40	計測せず
5	雌	59	55	計測せず
6	雄	66	計測せず	計測せず
7	雄	57	計測せず	計測せず

考察

今回の実験において、塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬を用いることにより、有意に薬液量が少なくなることが示された。さらに、この製剤がフリーズドライ品であるため最大400mg/mlまで濃度を高めることができることから、体重の大きい個体にも少ない薬液量で対応することが可能で、今回得られた結果以上の有用性があると思われる。使用対象の動物の大きさや薬液の投与方法に応じて、場合に応じた対応が可能である。また、今回のように通常濃度の使用では、高濃度の塩酸ケタミンのように結晶が析出する (Lee *et al.*, 1981) こともなく、寒冷時の使用にも耐え得ると考えられる。

不動化中のヒグマの状態は、個体間に大きな差がなく安定しているといえる。呼吸数の時間の経過による変化は、実際に継時的なデータを取ったわけではないので経験的なことしかいえないが、比較的不動化の状態をよく反映していると思われ、毎分10-20回程度を維持していれば安定した不動化の状態であると考えられる。また、今回の実験からは材料が少なく確かではないが、表3に示したように野生個体に対する導入時間については、過去の塩酸ケタミンと塩酸キシラジンをを用いた報告 (Tsubota *et al.*, 1991) と比較するとやや短いように思われる。しかし、導入時間には個体の状態が大きく関わっていると思われ、興奮状態にあれば当然延長すると考えられることから、塩酸ケタミンと塩酸キシラジンを併用した場合 (Tsubota *et al.*, 1991) と同様に個体差が大きい。雌雄間の比較においては、効果を得るための投薬量および導入時間に有意差は認められなかった。しかし、個体差が大きいことを考慮すると、各測定値に関して個体差を生ずる原因を整理した上で、さらに、例数を増やして検討する必要があると思われる。

小括

飼育下および野生のヒグマに対して、塩酸キシラジンと塩酸ケタミンの併用と塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬を化学的不動化薬として使用し、投薬量および効果について比較した。その結果、薬液量に関しては、塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬で有意に少なく、導入時間、直腸温、呼吸数および心拍数については差がみられなかった。また、雌雄間で効果を得るための投薬量および導入時間に有意な差は認められなかった。

以上の結果より、一度の投薬量が限られる一方で少ない投薬回数が求められる大型の野生動物に対して、塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬は、有用であることが示された。

はじめに

これまで生物の個体群における遺伝的変異性を評価する方法としては、血液や組織中に含まれる何種類かのタンパクをその生物種が持つすべての遺伝子座から任意抽出された標本標識とみなし、電気泳動法により変異を検索しゲノム全体としての遺伝的変異のレベルを推定する方法が、一般に用いられてきた。Nevo *et al.* (1984) は全世界の1,111種の動植物について14以上の座位におけるタンパク電気泳動のデータを収集した。その結果、脊椎動物では無脊椎動物や植物に比較して遺伝的変異のレベルは一様に低く、哺乳類184種の平均ヘテロ接合度は4.1%および多型遺伝子座の割合は19.1%と脊椎動物の中では最低であったと報告している。

クマ類に関しては、これまでホッキョクグマ (*Ursus maritimus*) とアメリカクロクマ (*Ursus americanus*) について、タンパク電気泳動のデータが報告されている。ホッキョクグマの場合、多型を示す座位は認められず、平均ヘテロ接合度は0% (Allendorf *et al.*, 1979)、また、アメリカクロクマについては、各地域集団内の平均ヘテロ接合度が1.3–3.1%および多型遺伝子座の割合は7.7–17.6%と報告されている (Manlove *et al.*, 1980)。これらの2種のクマ類に関しては、他の哺乳類と比較して遺伝的変異が低いようである。

この章では、まだ報告のない北海道のヒグマの遺伝的変異を調べるため、タンパク多型に関する検討を行った。

材料と方法

材料には、1991年に採取した筋組織のうち、図1に示した5つの地域個体群の3つから計10頭の材料を選び分析に用いた（表4）。タンパク多型の検索は、表5に示した21の遺伝子座について行った。分析に際して筋組織はホモジナイズし、カニクイザルと鳥類のタンパク多型の検索に用いた方法を応用した澱粉ゲルによる電気泳動を行い、それぞれのタンパク質に特異的な染色を施した（Kawamoto and Ischak, 1981; Cook and Buckley, 1987）。澱粉ゲルによる電気泳動に用いた緩衝液の組成は表5に示した。

結果

検索したすべての遺伝子座において多型は確認されなかった。検索した座位のうちPGM（phosphoglucosmutase）に関して行った電気泳動および染色の結果を写真1に示した。PGMは単量体の蛋白質であるが、すべての個体で検出されたバンドは1本で遺伝子型がホモであることを示していた。

考察

これまでに報告のある日本の陸生哺乳類の遺伝的変異をみると、ニホンザル（*Macaca fuscata*）、ニホンカモシカ（*Capricornis crispus*）、ホンシュウジカ（*Cervus nippon centralis*）、エゾシカ（*Cervus nippon yesoensis*）、コキクガシラコウモリ（*Rhinolophus cornutus*）およびユビナガコウモリ（*Miniopterus schreibersi*）で、1.30–2.26%の平均ヘテロ接合度が得られている（Nozawa *et al.*, 1977, 1982; 野澤,

表4 タンパク多型の分析に用いたヒグマの捕獲地域

ヒグマ・No.	捕獲地域	地域個体群
1	上ノ国	渡島半島
2	森	渡島半島
3	厚沢部	渡島半島
4	松前	渡島半島
5	夕張	日高・夕張
6	三石	日高・夕張
7	様似	日高・夕張
8	浦河	日高・夕張
9	浦幌	道東・宗谷
10	浜中	道東・宗谷

表5 タンパク多型の分析に用いた遺伝子座

タンパク名 (遺伝子座略号)	緩衝液組成 ¹⁾
Adenosine deaminase (ADA)	1
Adenylate kinase (AK)	2
Creatinine kinase (CK)	3
Diaphorase (Dia)	4
Esterase (ES)	5
Esterase D (ESD)	2
Glutamine oxaloacetate transaminase (GOTs, GOTm)	6
Glycophospho isomerase (GPI)	7
Glutamine pyruvate transaminase (GPT)	3
Hexokinase (HK)	3
Isocitrate dehydrogenase (IDHs, IDHm)	3
Lactose dehydrogenase (LDHA, LDHB)	3
Malate dehydrogenase (MDHs, MDHm)	3
Mannose phosphate isomerase (MPI)	3
Peptidase (PEP)	6
6-Phosphogluconate dehydrogenase (PGD)	3
Phosphoglucomutase (PGM)	6

1) 各緩衝液の組成-1: 0.1M citrate buffer pH5.0(bridge), 0.005M citrate buffer pH5.0(gel) 2: 0.155M Tris-0.043M citric acid(bridge), 0.01M Tris-0.0029M citric acid(gel) 3: 0.04M citric acid-0.067M aminopropyl morpholine pH6.3(bridge), 0.002M citric acid-0.0034M aminopropyl morpholine pH6.3(gel) 4: 0.128M Tris-0.071M boric acid-0.003M EDTA pH8.6(bridge), 0.09M Tris-0.05M boric acid-0.002M EDTA pH8.6(gel) 5: 0.3M borate pH8.0(bridge), 0.03M borate pH8.5(gel) 6: 0.1M Tris-0.1M maleic acid-0.01M EDTA pH7.4(bridge), 0.01M Tris-0.01M maleic acid-0.001M EDTA pH7.4(gel) 7: 0.25M Tris-0.05M citric acid pH8.3(bridge), 0.017M Tris-0.0032M citric acid pH8.3(gel)

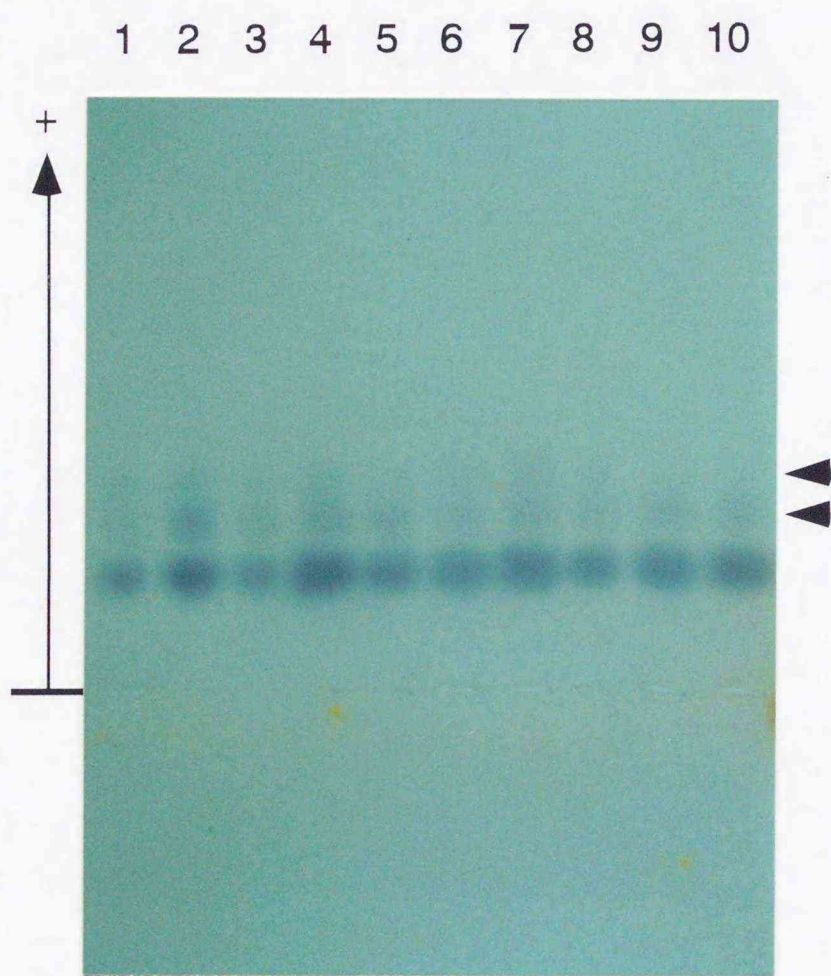


写真1 10頭のヒグマ（1-10）についてのPGMについての澱粉ゲル電気泳動像。矢頭で示したバンドは、サブバンド。

1986)。これらの値は哺乳類の中でも低いと考えられるが、日本列島のように大陸から切り離された島環境に生息する哺乳類は一般的に低変異となる傾向があるといわれている(野沢・庄武, 1985)。また、Manlove *et al.* (1980) はアメリカクロクマの6つの地域集団について35の遺伝子座におけるタンパク多型を調べ、遺伝的変異がアメリカ本土に分布する他の哺乳類に比べ低いことを指摘しており、変異の程度が比較的隔離された個体群や島に生息する個体群と同等であると述べている。これらのことから推測すると、少数であるものの、北海道の広い地域のヒグマから採取された材料に関してタンパク多型による遺伝的変異が検出されなかったことは、クマ類が持つ低変異性と北海道という他の地域と隔離された生息環境に起因しているのかもしれない。

今回の研究は、材料として用いたヒグマの数が少ないことから、さらに検討の余地があると考えられるが、北海道のヒグマにおける遺伝子構成を調べる上で、タンパク多型の検索という手法では変異を検出することは困難であることが予想され、DNAレベルでの研究など、さらに、精度の高い方法で遺伝的変異を検索する必要があると思われる。

小括

北海道のヒグマの3つの地域個体群から回収された10頭のヒグマの筋組織について、澱粉ゲルを用いた電気泳動を行い、21の遺伝子座におけるタンパク多型の検索を行った。その結果、検索したすべての座位において変異は認められず、他のクマ類や日本の陸生哺乳類と同じく、北海道のヒグマの遺伝的変異の低いことが推測された。また、北海道のヒグマにおける遺伝子構成を詳細に調べるためには、精度の高いDNAレベルでの分析が必要とされることが考えられた。

第3章：DNAフィンガープリント法の個体識別、父子判定および遺伝的変異の推定への応用

はじめに

これまで、動植物の核DNAの変異を検出する方法としてはタンパク多型を用いた方法が主に用いられてきたが、比較的新しい年代に起った変異を検討するためには精度の高い方法が必要となりつつある (Jin and Chakraborty, 1994)。DNAはタンパクに比較して多型の頻度が高いことが知られており、近年、核DNAの塩基置換を制限酵素の切断部位の変化によって検出するRFLP (restriction fragment length polymorphisms) あるいは特定の塩基配列の繰り返しの数の違いによって変異を検出する方法であるVNTR

(variable number of tandem repeat) が核DNAの変異の検出に応用されるようになってきた (石山, 1989)。

VNTRを応用した方法の1つであるDNAフィンガープリント法は、ヒトについて Jeffreys *et al.* (1985a) によって最初に報告されている。ミニサテライトDNAを用いたDNAフィンガープリントは、個体特有のバンドパターンを示し、しかも、メンデルの法則に従って遺伝することから、法医学分野で個体識別や父子判定に用いられることで発展してきた。この方法は、イヌやネコの父子判定 (Jeffreys and Morton, 1987) および野生の鳥類における繁殖形態の解明にも応用されている (Burke and Bruford, 1987; Burke *et al.*, 1989; Morton *et al.*, 1990)。

しかし、遺伝的変異を検討しようとする場合には、ミニサテライトDNAのようなマルチローカスプローブを用いたDNAフィンガープリントからは遺伝子座の数や対立遺伝子に関する十分な情報が得られないため、タンパク多型などから得られた遺伝的変異を表す指数との比較が困難であった (Jin and Chakraborty, 1994)。そのため、DNAフィン

ガープリント法を用いた遺伝的変異に関する報告では、独自の指数を用いて遺伝的変異性が考察されている (Gillbert *et al.*, 1990)。しかし、DNAフィンガープリントから遺伝子座や対立遺伝子に関する推定ができれば、同時に複数の遺伝子座について検討が加えることが可能であり、野生個体群の遺伝子構成を考える上で有用であると考えられる。

そこで本章では、まず、ヒグマに対してDNAフィンガープリント法を用いた個体識別および父子判定が可能であるかどうかを検討した。さらに、遺伝子座および遺伝子多様度に関する推定法 (Jin and Chakraborty, 1994) を用い、実際にヒグマの地域個体群内、あるいは地域個体群間の遺伝的変異の定量を行い、北海道のヒグマの遺伝的変異性について検討した。

材料と方法

個体識別および父子判定では、のぼりべつクマ牧場で飼育されている4つの家族を含む47頭のヒグマを用いた。これらの一部は野外で捕獲されたヒグマであるが、その他は牧場内で繁殖したヒグマである。

遺伝的変異の推定に用いたヒグマは、渡島半島南西部 (渡島半島地域個体群) で生け捕りにした13頭および知床半島 (道東・宗谷地域個体群) で生け捕りにした13頭の合計26頭およびのぼりべつクマ牧場で飼育されている6頭を用いた。また、地域分化の検討には、のぼりべつクマ牧場で飼育されているヒグマのうち、捕獲地点の明らかな6頭および渡島半島南西部と知床半島で捕獲したそれぞれ1頭ずつ、合計8頭を用いた。のぼりべつクマ牧場のクマの捕獲地域は、表6に示した。

DNAフィンガープリントの作成

DNAの調製： ヒグマの橈側皮静脈あるいは頸静脈より、抗凝固剤としてヘパリンを

表6 のぼりべつクマ牧場で飼育されているヒグマのうちDNAフィンガープリント法による分析に用いた6頭の捕獲地域

ヒグマ・個体番号	捕獲地域	地域個体群
1	積丹	渡島半島
2	熊石	渡島半島
3	静内	日高・夕張
4	新冠	日高・夕張
5	羅臼	道東・宗谷
6	紋別	道東・宗谷

含んだ真空採血管 (Venoject, Terumo, Japan) を用い、血液を10ml採取した。血液より白血球を分離するため、 $1,300\times g$ 、10分間の遠心を行った後、 Buffy coat を取り出し10mlのTNE buffer (10mM Tris, 100 mM NaClおよび5mM EDTA) に懸濁した。懸濁液に最終濃度 $50\mu\text{l/ml}$ のProteinase K (Sigma, USA) と0.5%のsodium dodecyl sulfate (SDS, Eastman Kodak, USA) を加え、 37°C で1晩インキュベートした。その後、等量のTE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0) 飽和フェノールで3回およびクロロホルムで1回DNAの抽出を行い、3倍量のエタノールを加えて沈殿したDNAを回収した (Sambrook *et al.*, 1989)。

制限酵素による消化と電気泳動： 1個体当たり、 $10\mu\text{g}$ のDNAサンプルを制限酵素 *HinfI* と *HaeIII* (ニッポンジーン, Japan) で消化し、0.8%のアガロースゲル (長さ15cm) を用い30Vで20–24時間電気泳動を行った (Sambrook *et al.*, 1989)。泳動後のゲルは、アルカリ処理でDNAを1本鎖にした後ニトロセルロース膜にブロッティングを行った (Southern, 1975)。

プローブDNAの調製： ミニサテライトDNA、Myoは、DNA標識キット (Multiprime DNA labelling system, Amersham, USA) を用いたランダムプライム法によって $[^{32}\text{P}]$ -dCTPで標識した (Feinberg and Vogelstein, 1983, 1984)。Myoの塩基配列は、5'-GACCGAGGTCTAAAGCTGGAGG-3'である (本間・石山, 1987)。

ハイブリダイゼーション： ニトロセルロース膜は、 55°C のハイブリダイゼーション液 [$5\times\text{SSC}$ 、20mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA、1%SDSおよび $10\mu\text{g/ml}$ yeast tRNA] 中で、4–12時間プレハイブリダイゼーションを行った後、 $2.0\times 10^6\text{cpm/ml}$ になるようにプローブDNAを加え 55°C で1晩ハイブリダイゼーションを行った (Sambrook *et al.*, 1989)。

ハイブリダイゼーションの終わったニトロセルロース膜は、 42°C の $1\times\text{SSC}$ と室温の $0.25\times\text{SSC}$ 中で洗浄し、 -80°C で3日間オートラジオグラフィーを行った。

個体識別

作成したDNAフィンガープリント像の多型を示す2.0キロ塩基対以上のバンドから、Jeffreys *et al.* (1985b)の方法に従ってバンドパターンの多様性を求めた。バンド共有率 x は、41頭の成獣から *Hinf*Iについては45、*Hae*IIIについては33組を任意に選び、それぞれのバンドパターンを比較して次式により算出した x の平均値を求めた。

$$x = [(N_{ab}/N_a) + (N_{ab}/N_b)] / 2$$

ここで、 N_a と N_b は個体 a と b のバンドの総数を示し、 N_{ab} は個体 a と b に共通なバンド数である。

また、同一のバンドパターンが出現する確率 ($P1$) は、次式から求めた。

$$P1 = x^m$$

ここで、 m はDNA断片数の平均値を示す。

比較に際しては、各個体間で同じ移動度でどちらも容易に観察される濃さのバンドを同一の遺伝子座の同一対立遺伝子由来と判定した。また、各個体の同一位置に観察されるバンドのうち、極端に薄いバンドはバンドとして判定しなかった。バンドと対立遺伝子の関係は過去の報告 (Jeffreys *et al.*, 1986; Honma and Ishiyama, 1989a) に従い、1つの遺伝子座に2つの対立遺伝子が存在し、それらを優勢 (+) と劣性 (-) とし、それぞれの頻度を $q(+)$ と $1-q(-)$ と仮定した。バンドが観察されるのは、 $q^2(+/+)$ あるいは $q(1-q)(+/-)$ の場合で、バンド共有率 x は、 $x=2q(1-q)$ で表される。

父子判定

母親とその子どものDNAフィンガープリントの比較から、父親である可能性のある雄の出現する確率 ($P2$) を、次式により計算した (Jeffreys *et al.*, 1985b)。

$$P2 = x^n$$

ここで、 n は母子のDNAフィンガープリントの比較で父親由来であると考えられるバンドの数である。

遺伝指数の算出

遺伝子多様度 (H) および遺伝子分化係数 (G_{ST}) の補正推定値は、Stephens *et al.*

(1992) と Jin and Chakraborty (1993, 1994) の方法に従って以下のように算出した。

DNA フィンガープリント中に観察されるすべてのバンドを、優性の遺伝形質として考えると、 k 番目の対立遺伝子の頻度 (P_k) は、次の式で表される。

$$P_k = (1 - \sqrt{1 - S_k})$$

ここで S_k は、 k 番目のバンドの出現頻度を現す。

そして遺伝子座の数 (L) と遺伝子多様度 (H) の補正推定値は、次式で求められる。

$$L = L_m + \sum_{k=1}^{A_p} (1 - \sqrt{1 - S_k}) - \frac{\sum_{k=1}^{A_p} S_k / \sqrt{1 - S_k}}{8n}$$

$$H = \left(\sum_{k=1}^A S_k / L \right) - 1$$

ここで A_p はすべての多型を示す遺伝子座の対立遺伝子数を示し、 A はすべての対立遺伝子数を示す。また、 L_m は多型を示さない遺伝子座の数とし、 n は検査頭数を示す。

つぎに、遺伝子分化係数 (G_{ST}) は Nei (1987) により次式のように表された。

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

ここで H_S は、 $H_S = \sum k H_k / s$ で表され、そのとき H_k は k 番目の地域個体群内の遺伝子多様度、 s は地域個体群数である。また、 H_T は総遺伝子多様度を示し、今回は以下の2通りの方法によって求めた。1つは、野外で生け捕りにした2地域個体群の1頭ずつと飼育されている6頭の合計8頭のヒグマから対立遺伝子頻度 (P_k) を求め、もう一方では、野外の2地域個体群のヒグマ26頭から対立遺伝子頻度 (P_k) を求めた。

結果

個体識別

制限酵素 *HinfI* と *HaeIII* を用いて作成した DNA フィンガープリントの 1 部を写真 2 に示した。それぞれ、およそ 10 本の多型を示す 2.0 キロ塩基対以上のバンドが、各レーンに観察された。すべての DNA フィンガープリント像から得られたバンド数、バンド共有率 x および平均対立遺伝子頻度 q を表 7 に示した。2.0 キロ塩基対以上で同一なバンドパターンの出現する確率 (P_1) を求めたところ、*HinfI* では $0.69^{9.9} = 2.5 \times 10^{-2}$ および *HaeIII* では $0.83^{10.8} = 1.3 \times 10^{-1}$ が得られた。

父子判定

親子関係の明らかな 4 家族の内の 1 家族 (表 8, No.1) について *HinfI* を用いて作成した DNA フィンガープリント像を写真 3 に示した。母親 (M) とその子ども (O) のバンドパターンを比較すると母親にはみられない 2 本のバンド (矢頭) が子供には存在した。この 2 本のバンドは父親である F1 のバンドパターンにも観察された。一方、他の家族の父親である F2 のバンドパターンには、この 2 本のバンドは観察されなかった。4 家族の DNA フィンガープリント像について、父親由来と考えられるすべてのバンドを持つ雄の出現する確率 (P_2) を、表 8 に示した。

遺伝的変異の推定

写真 4 に、渡島半島南西部と知床半島のヒグマから得られた DNA フィンガープリントを示した。2 つの地域個体群に対する対立遺伝子頻度 (P_k)、遺伝子座数 (L) および平均遺伝子多様度 (H) は、表 9 に示した。片方の地域個体群にのみ存在する対立遺伝子は、表に挙げなかった。知床半島の地域個体群における平均遺伝子多様度の推定値は、渡島半島南西部の地域個体群における値よりも小さく、知床半島のヒグマの遺伝的多様

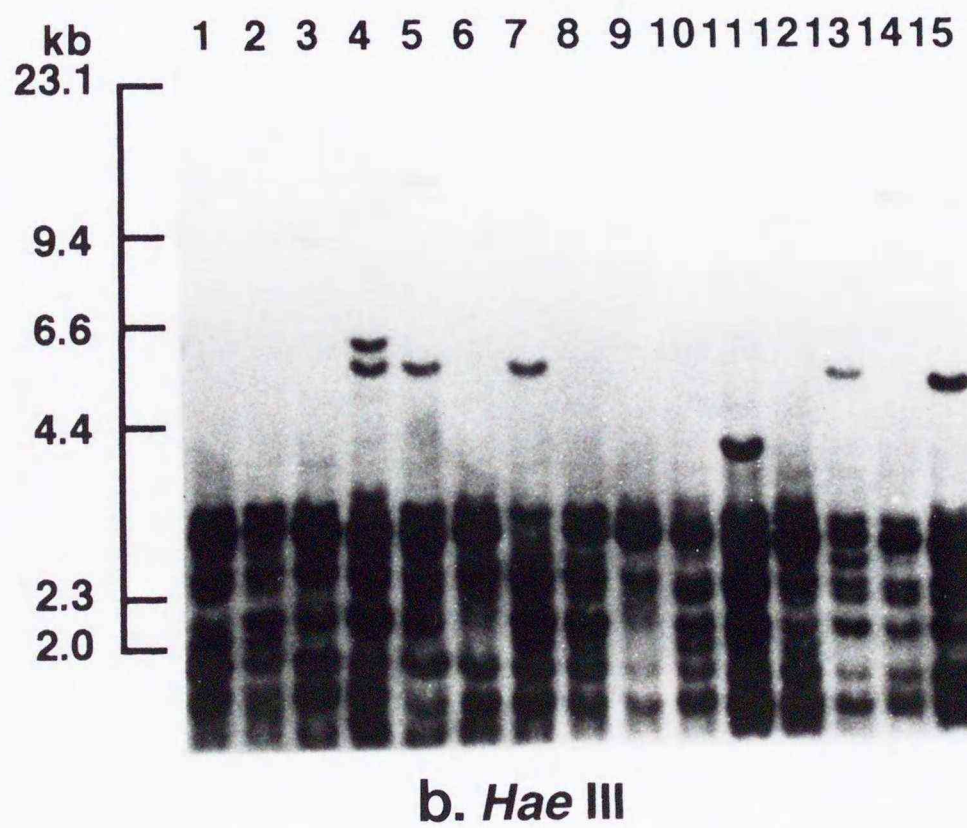
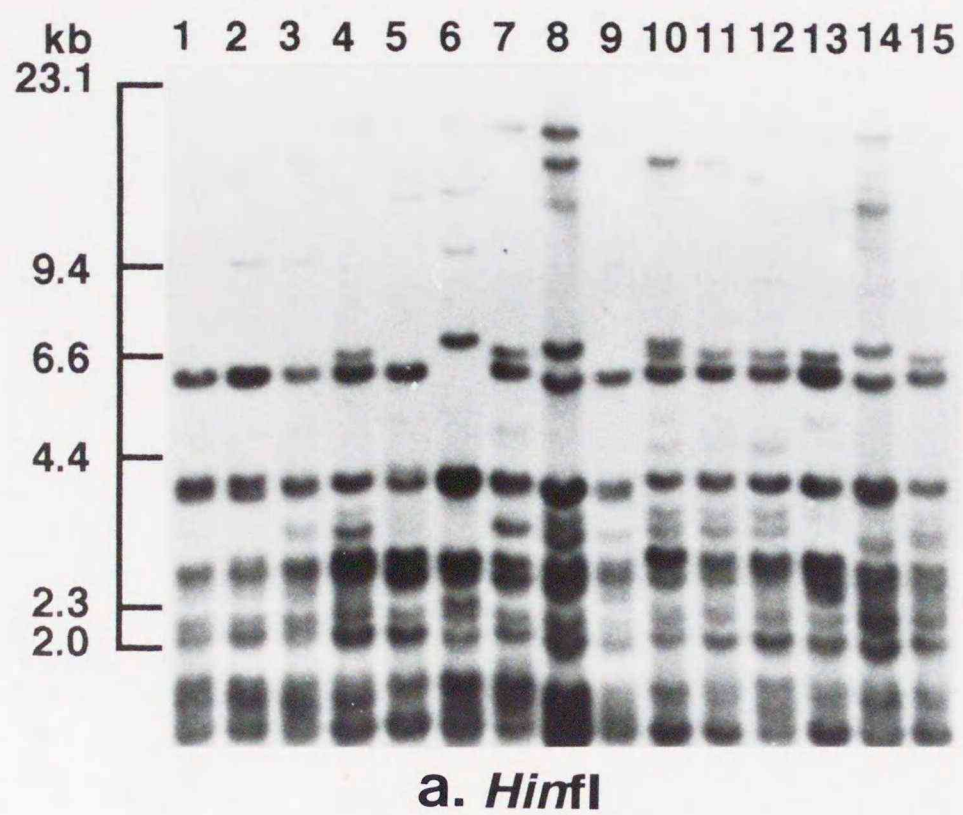


写真2 ヒグマのDNAフィンガープリント像。のぼりべつクマ牧場で飼育されている個体から任意に選択した15頭（1－15）について制限酵素*HinfI*（a）と*HaeIII*（b）でゲノムDNAを消化し、電気泳動、サザンブロッティングの後ミニサテライトプローブMyoとハイブリダイゼーションを行った。サイズマーカーとして*HindIII*で消化した λ DNAを用いた。

表7 ヒゲマにおけるDNAフィンガープリントの多様性

DNA 断片長 (kb)	1個体におけるDNA断片数 (平均値±SD)		バンド共有率 x		平均対立遺伝子頻度 q	
	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III
9.4-23.1	1.4±0.9	1.2±1.2	0.39	0.64	0.22	0.40
4.4- 9.4	2.2±0.9	2.7±2.4	0.64	0.66	0.40	0.41
2.0- 4.4	6.3±1.2	6.8±1.1	0.77	0.87	0.52	0.64
2.0-23.1	9.9±1.9	10.8±4.2	0.69	0.83	0.44	0.59

45頭のヒゲマから得られたDNAフィンガープリント像を比較し、各制限酵素におけるDNA断片長（バンド）の数を示した。バンド共有率 x は、任意の1個体に存在するDNA断片が、別の1個体にも存在する確率を示す。バンド共有率 x は、 $x=2q(1-q)$ で表される。

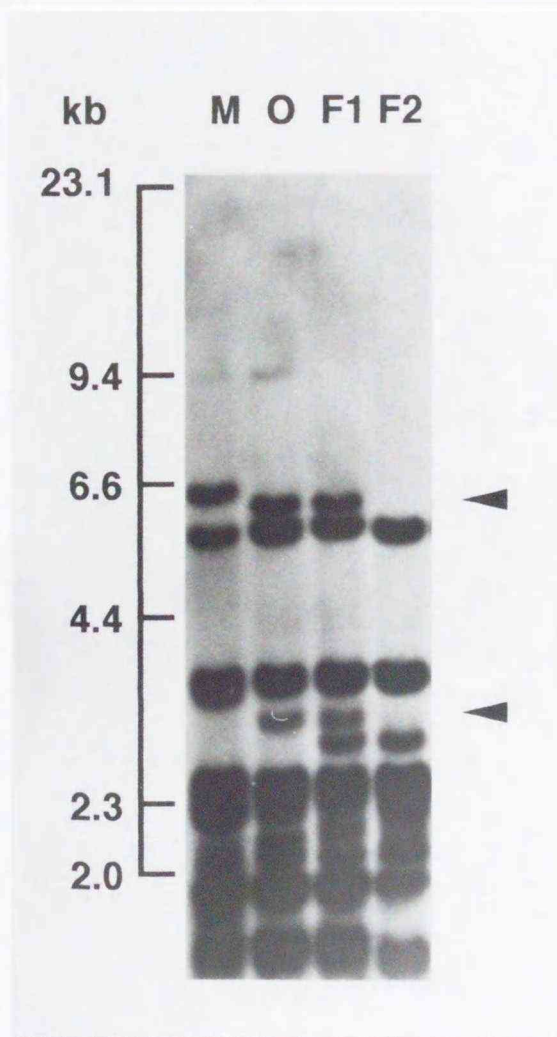


写真3 制限酵素*Hinf*Iを用いて作成した1組のヒグマの親子のDNAフィンガープリント像。Mは母親、Oは子ども、F1は父親、F2は血縁関係にない雄のDNAフィンガープリント像を示している。矢頭は父親由来のDNA断片（バンド）を示している。

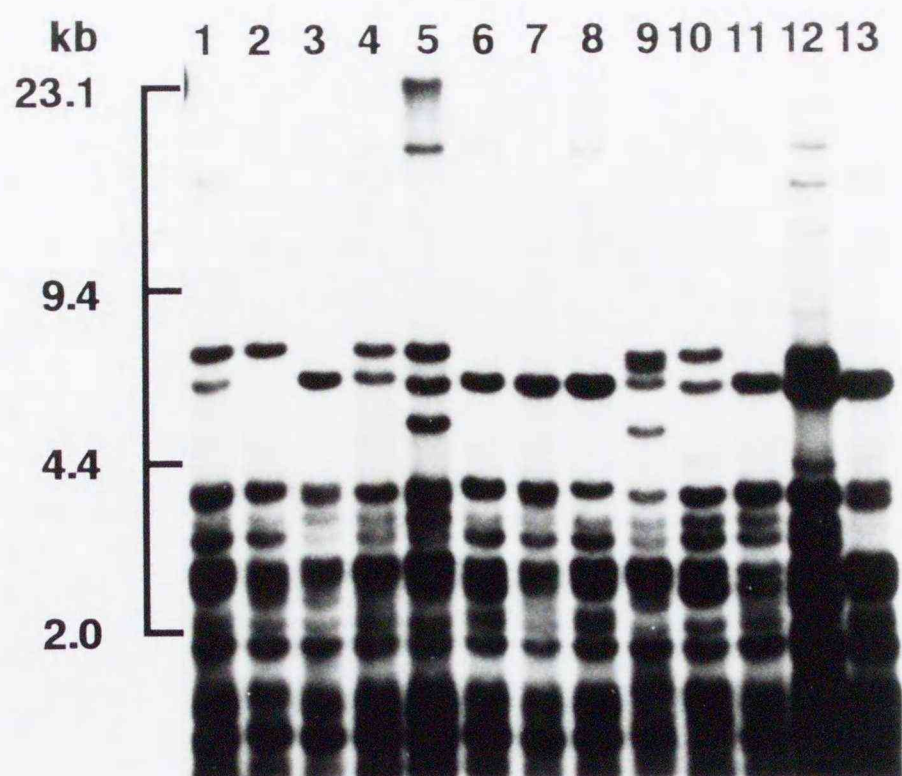
表8 DNAフィンガープリント法による父子判定

親子 No.	父親由来のバンド数		$P2^a)$	
	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III
1	2	1	0.48	0.83
2	2	0	0.48	1.00
3	3	5	0.33	0.39
4	4	3	0.23	0.57

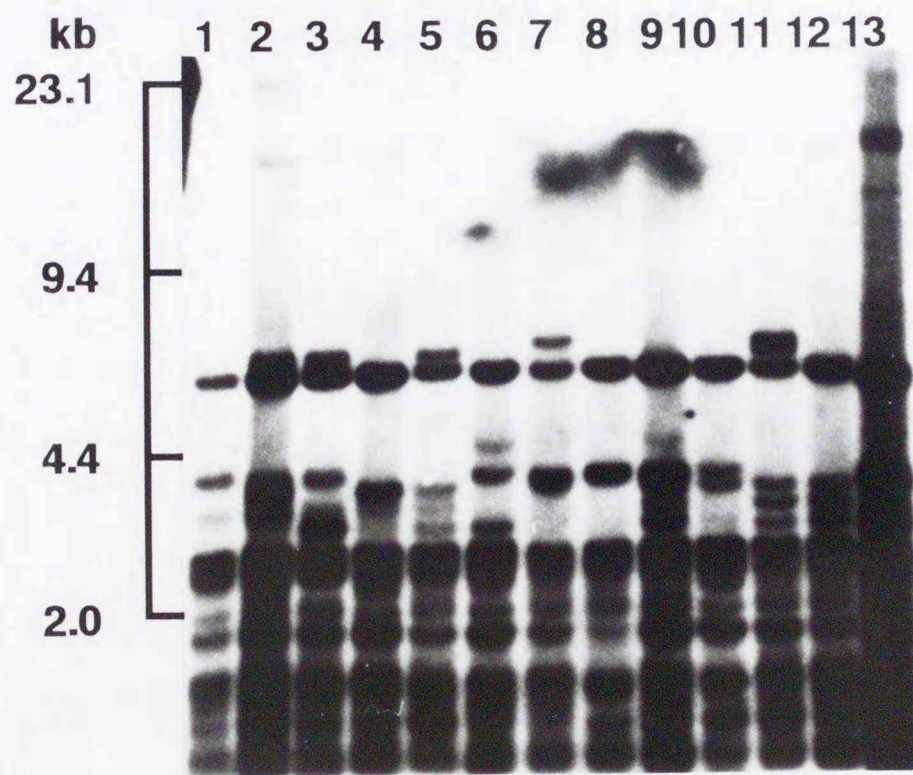
a) すべての父親由来のDNA断片を持つ雄の出現する確率。

$$P2 = x^n$$

x : バンド共有率
 n : 父親由来のバンド数



a. 渡島半島



b. 知床半島

写真4 渡島半島南西部 (a) と知床半島 (b) で生け捕りにしたヒグマ各13頭 (1-13) のDNAフィンガープリント像。サイズマーカーとして *Hind*III で消化した λ DNA を用いた。

表9 遺伝子座の数と平均遺伝子多様度の推定

対立遺伝子	k 番目の対立遺伝子頻度(P_k)	
	渡島半島南西部	知床半島
1	0.445	0.445
2	0.321	0.226
3	0.080	0.039
4	0.321	0.080
5	0.080	0.168
6	0.723	1.000
7	1.000	0.380
8	0.216	0.445
9	0.723	0.445
10	0.723	0.380
11	0.723	1.000
12	0.520	1.000
13	0.168	0.168
14	1.000	1.000
15	1.000	1.000
遺伝子座の数(L)	7.858	7.746
遺伝子多様度(H)	0.302	0.241

性が渡島半島南西部のヒグマよりも低いことを示している。

表10は、遺伝子分化係数についてまとめたものである。 HT は種全体の遺伝子多様度を示し、 HS は地域個体群内の平均遺伝子多様度を示す。遺伝子分化係数によって示される地域個体群間の遺伝子多様度は、種全体の遺伝子多様度の7.9および19.5%と算出され、 HT の求め方により差がみられた。渡島半島南西部と知床半島の全個体から HT を求めた場合の遺伝子分化係数は、北海道の8地点の個体から HT を求めた場合に比べ大きかった。

考察

ミニサテライトプローブMyoを用いて作成した日本人のDNAフィンガープリントから得られた4.4–23.1キロ塩基対におけるバンド共有率 x は0.192と低い値を示しており、このプローブを用いたDNAフィンガープリント法が個体識別や父子判定に有効であることを示している (Honma and Ishiyama, 1989b)。さらに、Myoをニホンザルやエゾヤチネズミの父子判定に応用した報告もあり、バンド共有率は示されていないもののその有用性が示されている (Inoue *et al.*, 1990; Ishibashi *et al.*, 1992)。本研究で得られたHinfIを用いた場合のバンド共有率 x は、0.69であり、イヌやネコなどの家畜から得られた数値 (Jeffreys *et al.*, 1987; George *et al.*, 1988) に近く、ミニサテライトプローブMyoを用いたDNAフィンガープリント法がヒグマの個体識別にも応用可能であると考えられた。

父子判定への応用に関しては、4家族においてDNAフィンガープリントは正しい親子関係を示した。しかし、表8に示したように父親由来と思われるバンドの数が少ない場合もあり、父親候補の雄が多い場合は父親の特定が困難であると考えられた。父親候補の雄が少ないか、あるいはNo.4の親子のように比較的多くの父親由来と思われるバン

表10 遺伝子分化係数の推定

地域数	個体数	<i>HS</i>	<i>HT</i>	<i>GST</i>
8	8	0.272	0.295	0.079
2 ¹⁾	26	0.281	0.349	0.195

1) 8地域中の2地域（渡島半島南西部と知床半島）。

ドが得られ、 $P2$ の値が小さくなったときにのみ有効であると思われた。

今回実験を行ったのぼりべつクマ牧場のように多数のヒグマを飼育している施設では、クマの個体識別は飼育に従事している人の注意深い観察に頼っているが、確実に個体識別を行うためにはDNAフィンガープリント法を応用することが出来ると考えられる。また、動物園など少数飼育の場合には繁殖に際して父親の特定も可能であろう。さらに、電波発信機を用いたテレメトリー調査や野外での標識調査において、標識の脱落といった不慮の事故の際の個体識別にもこの方法を応用することが出来る。

野生個体を用いた遺伝的変異に関する研究で、知床半島の地域個体群のヒグマの遺伝的多様性は渡島半島南西部に比べて低いことが示唆された。これは、知床半島のヒグマが他の地域から隔離されていることや個体群の有効な大きさが小さいことに起因していると予想される。また、アンケート調査による結果からも、知床半島の地域個体群は北海道中央に生息する大きな個体群から隔離に近い状態にあると推測することができる（北海道, 1994）。

これまで、ネコのDNAフィンガープリント像から得られた種内の遺伝子多様度は0.435、また、ヒトの模擬マルチローカスDNAフィンガープリント像（7種のシングルローカスプローブを用いて作成したDNAフィンガープリント像）から得られた種内の遺伝子多様度は、0.710であったと報告されている（Stephens *et al.*, 1992; Jin and Chakraborty, 1993, 1994）。これらの値に比べ、今回2つのヒグマの地域個体群について得られた値（0.302および0.241）は小さい。タンパク多型を用いたアメリカやヨーロッパのクマ類についての報告（Allendorf *et al.*, 1979; Manlove *et al.*, 1980）と同様に北海道のヒグマについても種内の遺伝的多様性は、低いと考えられる。

表10に示したように、遺伝子分化係数（ G_{ST} ）は H_T の求め方によって差が認められた。渡島半島南西部と知床半島の個体のみから H_T を求めた場合に G_{ST} が大きくなり、この2つの地域個体群間に遺伝的分化があることが推測される。

これまで遺伝子分化係数 (GST) は、タンパク多型などのデータから多くの陸生哺乳類について報告されている。タンパク多型から得られた GST の数値を今回得られた数値と比べることができるかどうかについては検討が必要であると思われるが、これらと比較することは、非常に興味深い。そこで、日本人を含む日本の陸生哺乳類について血液のタンパク多型から得られた遺伝子分化係数 (GST) の数値を表11に示した。日本人やネコでは、種全体の遺伝的多様性が高く (HT が大きく)、地域分化の程度が低い (GST が小さい)。それに対して、ヒグマで得られた GST の数値は、種全体の遺伝的多様性が低く (HT が小さく)、地域分化の程度も低い (GST が小さい) ニホンカモシカの数値に近い。ニホンカモシカの個体群におけるこのような遺伝子構成は、近い過去におけるボトルネックとその後の生息域の拡張に関係があると考察されており (野澤, 1985)、北海道のヒグマについても同様の状況があった可能性が考えられる。

以上のように北海道のヒグマは、遺伝的多様性が低く地域個体群間の遺伝的分化の程度も小さいと考えられる。しかしながら、今回の研究では材料として用いたヒグマの数が少なく、材料を得た地域も限られていることから、これらの結果がヒグマの遺伝子構成を正しく反映しているかどうかは検討の余地がある。今後材料を増やしての検討が必要である。

小括

北海道のぼりべつクマ牧場で飼育されているヒグマ47頭について、ヒトの法医学分野でその有用性が認められているミニサテライトプローブ Myo を用いDNAフィンガープリントを作成し、個体識別と父子判定への応用について検討した。さらに、野生個体を用いて北海道のヒグマ個体群における地域個体群内と地域個体群間の遺伝的多様性の定量を試みた。

表11 他の哺乳類における遺伝子分化係数 (G_{ST}) の値

個体群	遺伝子座の数	H_T	H_S	G_{ST}	引用文献
日本人	30	0.0915	0.0912	0.0029	Ishimoto(1975), Omoto(1975)
ネコ	31	0.0802	0.0793	0.0112	Nozawa <i>et al.</i> (1985)
ニホンカモシカ (<i>Capricornis crispus</i>)	30	0.0294	0.0261	0.1122	野澤ら(1994)
ニホンザル (<i>Macaca fuscata</i>)	32	0.0315	0.0215	0.3175	Nozawa <i>et al.</i> (1991)

HinfI、*HaeIII*の2種類の制限酵素を用いて作成したDNAフィンガープリント像より、バンド共有率 x を求めたところ、*HinfI*では0.69および*HaeIII*では0.83であった。飼育集団内での偶然に同じバンドパターンを持つ個体が出現する確率を求めたところ、*HinfI*で 2.5×10^{-2} および*HaeIII*で 1.3×10^{-1} の値が得られた。*HinfI*については家畜について報告されている値に近く、ヒグマにおいてもDNAフィンガープリント法の個体識別への応用が可能であることが示唆された。父子判定については、父親由来のバンドが少なく父親候補が多い場合には判定が困難であると考えられたが、バンドパターンは、正しい親子関係を示すものであった。

ヒグマの地域個体群におけるにおける平均遺伝子多様度 (H) は、渡島半島南西部の地域個体群 (13頭) で0.302および知床半島の地域個体群 (13頭) で0.241であった。これらの数値は、他の哺乳類で得られた数値と比べて小さく、2つの地域個体群における遺伝的変異の低いことが示唆された。また、地域個体群間の遺伝的分化の程度を示す遺伝子分化係数 (G_{ST}) は、2つの方法でそれぞれ0.079および0.195で、地域個体群への遺伝的分化の程度の低いことが推察された。

はじめに

哺乳類のミトコンドリアDNAは、約16,000個の塩基対からなり、核DNAの5-10倍の速さで進化が起ることから (Brown *et al.*, 1979)、多くの研究者がミトコンドリアDNAを使って進化や個体群間の遺伝的分化の問題に関する研究を行っている。また、ミトコンドリアDNAは母系遺伝であり (Hutchison III *et al.*, 1974)、雌雄で異なった分散のパターンを示すような種に関しては核DNAと異なった遺伝的分化の程度を示すことから、分散のパターンの雌雄差についての検討にも有用であると考えられる。

これまでクマ類に関するミトコンドリアDNAの研究としていくつかの報告があるが、系統発生や分類に関する研究では、アメリカクロクマ、ヒグマ (ヨーロッパと北アメリカ) およびホッキョクグマの3種 (Shields and Kocher, 1991; Taberlet and Bouvet, 1992) およびジャイアントパンダを含むすべてのクマ類の種間変異 (Zhang and Ryder, 1993) が検索されている。また、地域個体群間の分化を扱った研究としては、特に、ヨーロッパのヒグマの地域個体群間の遺伝的分化について報告されている (Taberlet and Bouvet, 1994; Kohn *et al.*, *in press*)。

本研究では、北海道のヒグマのミトコンドリアDNAの制限酵素による切断パターンを地域個体群間で比較し、北海道のヒグマの遺伝子構成の解析を試みた。

材料と方法

1992年10月から1994年9月に、有害獣駆除あるいは狩猟によって捕獲されたヒグマ

のうち図1に示した5つの地域個体群中、天塩・増毛地域を除く4つの地域個体群の24頭から肝臓を採取し、分析に用いた。材料として用いたヒグマの捕獲地点は、表12に示した通りである。

ミトコンドリアDNAは、Tamura and Aotsuka (1988)の方法に従い、凍結保存されていた肝臓よりアルカリ溶解法によって抽出した。*ApaI* および *HindIII* (Takara, Japan) の6塩基認識の制限酵素、*Cfr13I* (Takara) および *HinfI* (ニッポンジーン, Japan) の5塩基認識の制限酵素と *AfaI*、*AluI*、*HhaI*、*MboI*、*HaeIII* (Takara) および *MspI* (ニッポンジーン) の6種の4塩基認識の制限酵素で別々に消化した後、12.5cmの長さの4%–5%ポリアクリルアミドゲル (厚さ1mm) を用いて20mA、90–120分間電気泳動を行った (Sambrook et al., 1989)。電気泳動の終わったポリアクリルアミドゲルは、Tegelström (1986)の方法に従い塗銀染色を行い、DNA断片を検出した。各制限酵素による切断パターンはすべての個体間で比較を行い、全制限酵素による切断パターンの組み合わせからハプロタイプに分類した後、それぞれのハプロタイプの個体群内における頻度を求め、各地域個体群ごとに以下の式に従いハプロタイプ多様度 (h) (Nei and Tajima, 1981) を求めた。

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

ここで、 x_i はハプロタイプ i の頻度、 m は地域個体群内に存在するハプロタイプの数である。

また、地域個体群の関係を調べるため、各個体群間の最小遺伝距離 (Nei, 1973) を次式により求めた。

$$d = \sum (x_i - y_i)^2 / 2$$

ここで、 x_i 、 y_i は、ハプロタイプ i の遺伝距離を求める個体群X、Yにおける頻度である。

表12 ミトコンドリアDNAの分析に用いたヒグマ24頭の捕獲地域

地域個体群	供試頭数
渡島半島	8
積丹・恵庭	1
日高・夕張	8
道東・宗谷	7

結果

実験に用いた10種の制限酵素のうち、*ApaI*を除く9種で多型が観察された。制限酵素による切断パターンは、*AfaI*、*HhaI*、*HindIII* および *MspI*で2つの型、*AluI* では6つの型、それ以外の4種の制限酵素では3つの型に分類された（写真5）。切断パターンの観察において、100塩基対以下の大きさのDNA断片については、観察が困難なため記録することができなかった。

それぞれの制限酵素による切断パターン型の組み合わせよりすべての個体をハプロタイプに分けたところ、9種に分類された（表13）。積丹・恵庭地域は材料が1個体であることから、ハプロタイプは1種であったが、道東・宗谷地域では2種、日高・夕張地域でも2種、そして渡島半島地域では4種のハプロタイプが存在した。また、道東・宗谷地域と日高・夕張地域には共通のハプロタイプが存在したが、渡島半島地域と他の地域、あるいは積丹・恵庭地域と他の地域の間で共通するハプロタイプは、存在しなかった。表4-1に、それぞれの地域におけるハプロタイプの頻度と、ハプロタイプ多様度を示した。道東・宗谷地域と日高・夕張地域では渡島半島地域に対して低いハプロタイプ多様度を示した。

個体群間の最小遺伝距離は、道東・宗谷地域と日高・夕張地域の間で0.251、他の個体群間では共通するハプロタイプが存在しなかったためすべて1.0と算出された。

考察

ハプロタイプ多様度の比較により、道東・宗谷地域と日高・夕張地域の個体群は渡島半島地域に比べ遺伝的多様性が低いことが明らかになった。また、最小遺伝距離から道東・宗谷地域の個体群と日高・夕張の地域個体群が、他の個体群に比べ遺伝的に近縁で

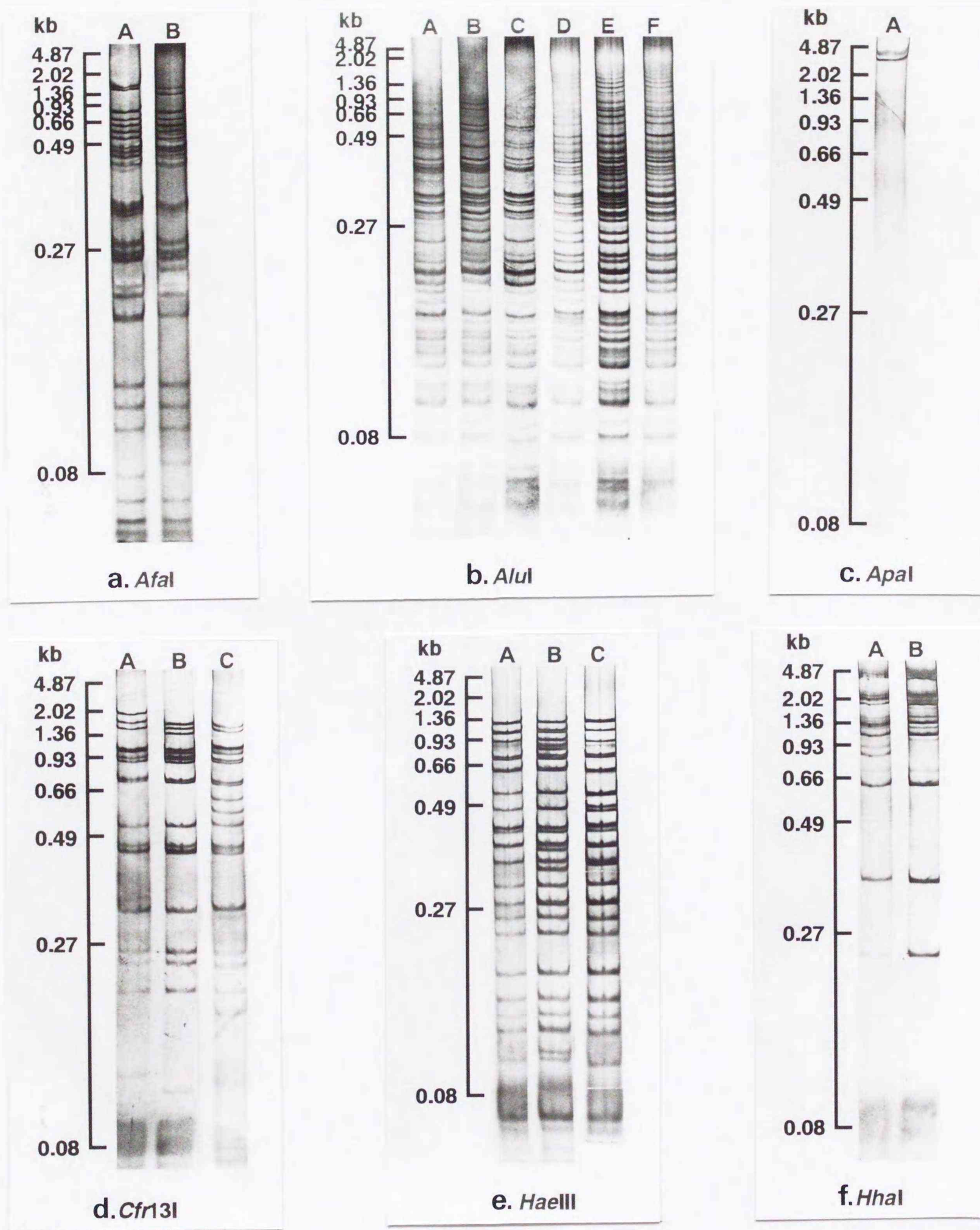


写真5 24頭のヒゲマのミトコンドリアDNAから得られた、10種の制限酵素(a. *AfaI*, b. *AluI*, c. *ApaI*, d. *Cfr13I*, e. *HaeIII*, f. *HhaI*, g. *HindIII*, h. *HinfI*, i. *MboI*およびj. *MspI*) についての切断パターン。A—Fは、それぞれの制限酵素における切断パターンの種類を示す。すべての制限酵素に関して、pHY300PLKの*HindIII*消化物をサイズマーカーとして用いた。

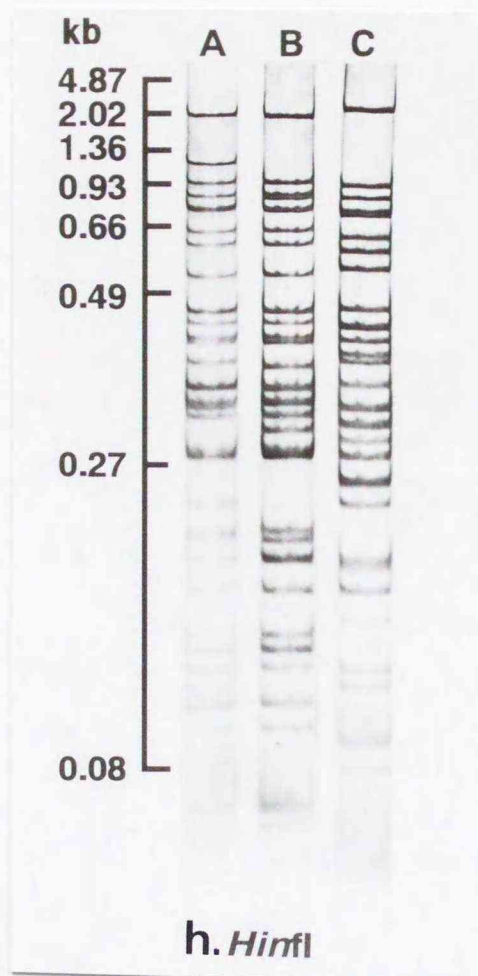
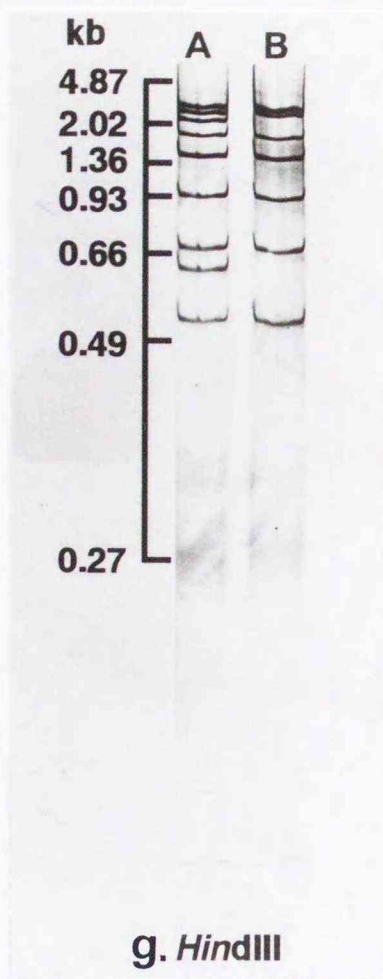


写真5つづき

表13 ヒグマの地域個体群内の各ハプロタイプの出現頻度とハプロタイプ多様度

ハプロタイプ No.	制限酵素による消化パタ ーンの組み合わせ	ハプロタイプ頻度 (個体数)			
		道東・宗谷	日高・夕張	渡島半島	積丹・恵庭
1	A A A A A A A A A A	0.875 (7)	0.143 (1)		
2	- C - - - - - - - -		0.857 (6)		
3	B B - B B B - B B -	0.125 (1)			
4	- D - C C - - C C -			0.125 (1)	
5	- E - - A - - - - -			0.125 (1)	
6	- F - - - - - - - -			0.375 (3)	
7	- E - - - - B - - -			0.125 (1)	
8	- D - - - - A - - B			0.250 (2)	
9	- E - - - - - - D A				1.000 (1)
ハプロタイプ 多様度 (<i>h</i>)		0.219	0.278	0.666	0.000

消化パターンは、左から *Afa*I、*Alu*I、*Apa*I、*Cfr*13I、*Hae*III、*Hha*I、*Hind*III、*Hinf*I、*Mbo*I、*Msp*Iの順に列挙した。A-Fは写真5に示した制限酵素の切断パターンの型を示す。
-は直上に同じ。

あることが示唆された。各地域個体群の実験に用いた個体数が少ないため、以下に述べることは推測にすぎないが、道東・宗谷地域の標茶町で捕獲されたで唯一異なるハプロタイプ3を示した個体は、調べられた10種の制限酵素のうち7種の制限酵素で切断パターンが同地域の他の個体と違っており、道東・宗谷地域のヒグマ個体群の中で標茶町の個体群が特殊であることが予想される。北海道（1994）の生息調査によると標茶町と隣接する知床、根室半島の基部でヒグマの分布が途切れていることが予想され、両半島のヒグマについて調べられることが望まれる。また、積丹・恵庭地域の1個体は他の地域にないハプロタイプ9を示したが、渡島半島地域で観察されたハプロタイプ5とは1種の制限酵素 *MboI* の切断パターンにおいてのみ異なっており、地域が隣接していることから渡島半島地域の個体群と関係が深いことが考えられた。

今回の実験を行うに当たって、予備実験として8種の6塩基認識の制限酵素を用いて任意に選んだ1頭のヒグマから得られたミトコンドリアDNAを消化し、制限酵素パターンの観察を行ったが、複数のDNA断片が得られた制限酵素は3種であった。その中でも3つ以上のDNA断片が得られたのは、*HindIII* 1種のみであった。一般的に、ミトコンドリアDNAの制限酵素による切断パターンの比較には、Brown *et al.* (1979) が行ったように制限酵素地図を作成し、制限酵素によって切断される位置の差異から塩基多様度を推定するために、6塩基認識の制限酵素がよく用いられている。今回の実験では、より多くのハプロタイプを検出するために4塩基あるいは5塩基認識の制限酵素を多く用いた。しかし、4塩基あるいは5塩基認識の制限酵素を用いた結果、DNA断片が多発したために断片長の推定が困難となり、制限酵素地図を作成するにはいたらなかった。Potter *et al.*

(1975) は、哺乳類のミトコンドリアDNAの4塩基認識の制限酵素による切断パターンを比較したが、長さ30cmのポリアクリルアミドゲルあるいは30ないし60cmのアガロースゲルを用いて電気泳動を行っている。このように大きなゲルを使用すれば制限酵素地図の作成も可能であると思われるが、その反面操作が煩雑であり多数の材料の処理には適さないとと思われる。したがって今回は、ハプロタイプ多様度についての検討を行った

が、今後、ミトコンドリアDNAの特定の領域に絞り込んで制限酵素地図を作成することにより、制限酵素サイトの差異が求められれば、塩基多様度についても考察が加えられるはずである。

小括

北海道のヒグマの遺伝子構成を解析する目的で、全道4つの地域個体群のヒグマ24頭から得られたミトコンドリアDNAの、10種の制限酵素による切断パターンを比較した。用いた10種の制限酵素のうち9種において多型が観察され、それぞれの制限酵素による切断パターンの組み合わせにより、ヒグマ24頭のミトコンドリアDNAは9種のハプロタイプに分類された。道東・宗谷地域と日高・夕張地域には共通なハプロタイプが存在したが、渡島半島地域とその他の地域に共通なハプロタイプは存在しなかった。

道東・宗谷地域と日高・夕張地域におけるハプロタイプ多様度は渡島半島地域に比べ低く、遺伝的多様性の低いことが明らかになった。また、最小遺伝距離が道東・宗谷地域と日高・夕張地域の間で小さく、遺伝的に近縁であることが示唆された。

全体の考察と今後の問題点

野生動物の集団においてその遺伝子構成を明らかにしようとするとき、遺伝子座の数や対立遺伝子に関する情報が重要である。第3章で扱ったマルチローカスプローブを用いたDNAフィンガープリントからは、これらに関する十分な情報は得られない。しかし、1度に多くの遺伝子座について検討できるこの方法は、材料の数や量に限りのある野生動物を扱う上で有効な手段となるはずである。本研究では、材料として用いたヒグマの数が少ないものの、北海道のヒグマ全体の変異性が低いことが明らかになった。ある種に関して遺伝的変異の問題を扱う時、最初にその種が持つ変異性について検討する場合、マルチローカスプローブを用いたDNAフィンガープリントは適当な手法であると考えられる。また、それぞれの種の遺伝的な特性について詳しく考察するために、多くの種についてDNAフィンガープリントから遺伝子多様度や遺伝子分化係数が求められることが望まれる。

タンパク多型あるいはDNAフィンガープリント法による分析で、北海道のヒグマ全体の低変異性が示唆された。さらに、DNAフィンガープリント法による分析の結果については、次のような比較も可能であると考えられる。Jin and Chacraborty (1994) は、模擬マルチローカスDNAフィンガープリントから得た遺伝子多様度の補正推定値と遺伝子座に特異的なシングルローカスプローブから得られる遺伝子多様度には差がないと報告している。そこで、特定の遺伝子座における変異を検出するマイクロサテライトDNAのデータから得られた遺伝子多様度を本研究で得られた数値と比較することができれば、北海道のヒグマの遺伝子構成をさらに検討できる可能性がある。実際に、過去に経験したボトルネックのために遺伝的多様性が低いウォンバット (*Lasiorhinus krefftii*) の地

域個体群に関する報告と比較してみると、マイクロサテライトDNAのデータから得られたウォンバットの個体群における遺伝子多様度は0.28と低く (Taylor *et al.*, 1994)、ヒグマのDNAフィンガープリントから得られた数値と類似している。従って、ヒグマの種内の遺伝的変異もウォンバットと同様に低いことが考えられる。ホッキョクグマに関するタンパク多型についての報告の中で、Allendorf *et al.* (1979) は、その低変異性を過去における極端な生息数の減少 (ボトルネック効果) と関連づけて考察している。実際、クマ類のように世代時間の長い生物においては、遺伝的変異の蓄積する速度が遅いことが考えられ、かなり遠い過去でボトルネックを経験したことも考えられる。しかし低変異性を示す理由については明らかではない。今後、雌雄の繁殖における特性や世代時間などについて検討することで、低変異性の背景を探る必要があると思われる。

ミトコンドリアDNAの分析から、渡島半島地域と道東・宗谷・日高・夕張 (北海道東部地域) の個体群間で遺伝的変異に差のあることが示されたが、渡島半島地域の個体群は、地理的に狭い面積に生息しており遺伝的多様性が高く、北海道東部地域の個体群は、広い面積に生息しており遺伝的多様性が低いといえる。その理由として、渡島半島地域には古い時代に生息していた個体の子孫が残っており、多くの遺伝的変異が蓄積されていることや、北海道東部地区の個体群が、過去に遺伝的変異を減らすボトルネックのような状態を経験したことが考えられる。また、渡島半島地区と北海道東部地区の個体群の間には、2つの個体群を隔てる障壁が存在すると思われるが、現実には存在する開発による分断が原因なのか、それ以前に起こった何かが原因なのかは不明である。しかし、これらの推測や疑問に関して検証しようとするれば、さらに、遺伝的変異に関する詳細な研究を行うとともに、北海道の古環境や化石材料についてのデータを詳しく調べる必要がある。

DNAフィンガープリント法のように核DNAに関して得られたデータと、ミトコンドリ

アDNAから得られたデータは、後者が完全に母系遺伝と考えられていることから、両方のデータを比較することにより雌雄の拡散の様式の差に基づいた考察が可能である。しかし、残念ながら本研究で用いた手法では、ミトコンドリアDNAの変異の程度を他の哺乳類のデータと比較できず、検出された変異の程度については不明であり、2つの手法から得られた変異性に差があるかどうかについては考察できなかった。今後、ミトコンドリアDNAについては、特定領域に関して制限酵素地図を作成するか、あるいは直接塩基配列を読むなど、塩基の置換数を解析できるデータを取る必要がある。また、DNAフィンガープリント法に関しては、分解されていないゲノムDNAが必要であることから、材料に大きな制約を受ける。より広い地域から多くの材料を得るためには、いろいろな材料が分析可能である方が有利である。したがって、核DNAを分析する方法としては、毛髪からも分析が可能であるpolymerase chain reaction (PCR) 法を応用したマイクロサテライトDNAの分析が必要であろう。

保護管理への応用

北海道のヒグマの遺伝子構成は、本研究でその概要が明らかになったと思われる。特に、ミトコンドリアDNAの分析により得られた結果は、北海道の地域個体群の分類の妥当性を示したものであった。しかし、今回のデータは今後、各地域について経時的な遺伝的変異性の変化を観察することが必要である。しかし、保護管理を目的とした場合、集団遺伝学的観点から注目しなければならないことはその個体群の有効な大きさであり、この大きさの維持が重要な問題である。したがって、北海道のヒグマ個体群の現在における有効な大きさを推定することが急務であり、前に述べたマイクロサテライトDNAの分析などを中心に、さらに詳しく調査を進めていかなければならない。その過程で、ヒグマの低変異性についても考察を加えることができるであろう。また、ヒグマという特定の動物の遺伝的変異といった限られた部分にだけ注目するのではなく、ヒグマをとりまく生息環境にも目を向け、そこに生息する他の生物との関わりから明らかになること

もあるはずである。ヒグマの保護管理を考える上でも生態系全体を視野に入れて考えることが重要であろう。

本研究の要約

現在北海道のヒグマは生息域の縮小と分断化が進行し、生息数も減少しつつあると考えられ、生息情報のない部分に沿って5つの地域個体群に分けられると考えられている。近年、ヒグマの保護管理を前提とした基礎的研究が行われつつあるが、本研究ではヒグマの保護管理には欠かせない個体群の遺伝子構成を明らかにするため、これまで他の動物種やクマ類の個体群の遺伝的変異の解明に用いられてきた手法を応用し、ヒグマの遺伝的多様性について検討した。

第1章では、ヒグマから研究試料となる血液を採取するために必要な化学的不動化について検討した。すなわち、現在一般に使用されている不動化薬（塩酸キシラジンと塩酸ケタミンの併用）と塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬を用いた新しい方法について比較した。その結果、塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬では少ない投薬量で、キシラジン－ケタミン法と同等の不動化効果が得られ、雌雄間で投薬量および導入時間に差異のないことが明らかになった。従って、一度の投薬量が限られる一方で投薬回数を最小限にとどめなければならないヒグマの不動化には、塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパムの混合薬が、有用であることが示された。

第2章では、北海道の3つの地域個体群から採取した10頭のヒグマの筋組織を材料として、タンパク多型による遺伝的変異の推定を試みた。澱粉ゲルを用いた電気泳動を行い、21の遺伝子座におけるタンパク多型の検索を行った結果、検索したすべての座位におい

て変異は認められず、他のクマ類や日本の陸生哺乳類と同じく、北海道のヒグマの遺伝的変異の低いことが推測された。

第3章では、飼育下のヒグマ47頭について、法医学分野で有用性が認められているミニサテライトプローブMyoを用いDNAフィンガープリントを作成し、個体識別と父子判定への応用について検討した。さらに、飼育個体のうち捕獲地域の明らかな6頭と、渡島半島南西部および知床半島で生け捕りにした13頭ずつ計26頭について地域個体群内と地域個体群間の遺伝的多様性の定量を試みた。その結果、2種類の制限酵素 *HinfI* および *HaeIII* を用いて作成したDNAフィンガープリント像より求めたバンド共有率は、*HinfI* で0.69および *HaeIII* で0.83であった。飼育集団内での偶然に同じバンドパターンを持つ個体が出現する確率を求めたところ、*HinfI* で 2.5×10^{-2} および *HaeIII* で 1.3×10^{-1} であった。*HinfI* については家畜について報告されている値に近く、ヒグマにおいてもDNAフィンガープリント法が個体識別へ応用できることが示唆された。また、父子判定におけるDNAフィンガープリントの比較では父親由来のバンドは少なかったが、父親候補の少ない場合には判定可能であることが示唆された。さらに、DNAフィンガープリントから得られた平均遺伝子多様度は、渡島半島南西部の地域個体群で0.302、知床半島の地域個体群で0.241であった。これらの数値は、ヒトあるいはネコで報告されている数値と比べて小さく、2つの地域個体群における遺伝的変異の低いことが示唆された。また、地域個体群間の遺伝的分化の程度を示す遺伝子分化係数は、飼育下の6頭と野生の23頭から求めた場合は0.079、野生の23頭のみから求めた場合には0.195となり、地域個体群の間で遺伝的分化の程度の低いことが推察された。

第4章では、ヒグマの遺伝子構成を解析する目的で、4つの地域個体群（渡島半島、積丹・恵庭、日高・夕張および道東・宗谷）のヒグマ24頭から得られたミトコンドリアDNAについて、10種の制限酵素による切断パターンを比較した。その結果、10種の制

制限酵素のうち9種において多型が観察され、それぞれの制限酵素による切断パターンの組み合わせにより、検査した24頭のミトコンドリアDNAは9種のハプロタイプに分類された。道東・宗谷地域と日高・夕張地域には共通なハプロタイプが存在したが、渡島半島地域とその他の地域に共通なハプロタイプは存在しなかった。道東・宗谷地域と日高・夕張地域におけるハプロタイプ多様度は渡島半島地域に比べ低く、遺伝的多様性の低いことが明らかになった。また、最小遺伝距離は道東・宗谷地域と日高・夕張地域の間で小さくこの2つの地域個体群のヒグマは、遺伝的に近縁であることが示唆された。

本研究の結果、タンパク多型の検索とDNAフィンガープリント法により、北海道に生息するヒグマ個体群の低変異性が明らかになった。また、ミトコンドリアDNA多型の検索から道東・宗谷地域個体群と日高・夕張地域個体群は遺伝的に近縁であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、終始ご指導とご助言を頂いた北海道大学獣医学部金川弘司教授に深く感謝いたします。また、本稿をご校閲いただき、有益なご助言を賜った佐藤文昭教授、渡辺智正教授ならびに酪農学園大学獣医学部林正信教授に感謝いたします。

京都大学霊長類研究所の川本芳助教授には、研究計画の立案とタンパク多型の検索において研究室を利用させていただきお世話になりました。北海道環境科学研究センターの間野勉博士には、研究の全般にわたって多大なる助力をいただき、また、水谷哲也博士（現在国立ガンセンター）には、試料の分析にあたってひとかたならぬご協力をいただきました。

のぼりべつクマ牧場では、伊勢伸也氏、前田菜穂子氏ならびに合田克己獣医師をはじめ従業員の方々には、貴重な試料や薬物を提供していただいたばかりでなく、種々の援助をいただきました。

試料の採取にあたっては、北海道環境科学研究センターの梶光一博士と富沢昌章氏に大変お世話になり、各支庁の関係者各位のご便宜と北海道猟友会各位のご協力がなければ、本研究は為し得ませんでした。野生個体からの試料の採取に際しては、知床自然センターの山中正実氏と岡田秀明氏、知床博物館の増田泰氏、橋本英樹氏、岡田更正氏そして北海道大学ヒグマ研究グループの各位に様々なご支援をいただきました。

DNAフィンガープリントの作成においては、新潟大学医学部木南凌教授に貴重なDNAプローブを提供していただきました。

さらに、北海道大学獣医学部の高橋芳幸助教授と菱沼貢助手には始終ご助言をいただき、高橋明子氏には励ましとご援助をいただきました。また、試料の分析に北海道大学獣医学部実験動物学講座を利用させていただき、前田秋彦氏と学生各位には、大変お世話になりました。

最後になりましたが、多くのご助言とご支援をいただいた当講座員各位に心からの感謝の意を捧げます。

引用文献

- Addison, E. M. and Kolenosky, G. B. 1979. Use of ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride to immobilize black bears (*Ursus americanus*). *J. Wildl. Dis.* 15: 253-258.
- Allendorf, F. W., Christiansen, F. B., Dobson, T., Eanes, W. F. & Frydenberg, O. 1979. Electrophoretic variation in large mammals 1. The polar bear, *Thalarctos maritimus*. *Hereditas* 91: 19-22.
- 青井俊樹. 1985. エゾヒグマの捕獲実態と個体群の現状. 哺乳類科学, 50:27-30.
- 青井俊樹. 1990. 北海道北部地方における狩猟と森林環境の変遷がヒグマの生息動態に与える影響. 北大農学部演習林研究報告. 47: 249-298.
- Brown, W. M., George, Jr., M. and Wilson, A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1967-1971.
- Bunnell, F. L. and Tait, E. N. 1985. Mortality rates of north American bears. *Arctic* 38: 316-323.
- Burke, T. and Bruford, M. W. 1987. DNA fingerprinting in birds. *Nature* 327: 149-152.
- Burke, T., Davies, N. B., Bruford, M. W. and Hatchwell, B. J. 1989. Paternal care and mating behavior of polyandrous dunnocks *Prunella modularis* related to paternity by DNA fingerprinting. *Nature* 338: 249-251.
- Cooke, F. and Buckley, P. A. 1987. Avian genetics — A population and ecological approach, Academic Press, England.
- Cowan, I. M. 1972. The status and conservation of bears (Ursidae) of the world-1970. *Int. Conf. Bear Res. & Manage.* 2: 343-367.
- Curry-Lindahl, K. 1972. The brown bear (*Ursus arctos*) in Europe: decline, present distribution, biology and ecology. *Int. Conf. Bear Res. & Manage.* 2:74-80.
- Elow, K. D. and Dodge, W. E. 1989. Factors affecting black bear reproductive success and cub survival. *J. Wildl. Manage.* 53: 962-968.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137: 266-267.

- George, M., Lequaré, A.-S., Castelli, M., Hanset, R. and Vassart, G. 1988. DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenet. Cell Genet.* 47: 127-131.
- Gibeau, M.L. and Paquet, P. C. 1991. Evaluation of Telazole for immobilization of black bears. *Wildl. Soc. Bull.* 19: 400-402.
- Gilbert, D. A., Lehman, N., O'Brien, S. J. and Wayne, R. K. 1990. Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California Channel Island fox. *Nature* 344: 764-767.
- Harris, H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proc. R. Soc. Lond B* 164: 298-310.
- 北海道. 1994. ヒグマ・エゾシカ分布調査報告書. 北海道環境科学研究センター. 札幌. 63pp.
- 本間正充, 石山いく夫. 1987. DNAフィンガープリント: その法医学的利用 (1) —ミニサテライトDNAプローブの親子鑑定への応用—. 日本法医学雑誌. 41: 236-241.
- Honma, M. and Ishiyama, I. 1989a. Probability of paternity in paternity testing using the DNA fingerprint procedure. *Hum. Hered.* 39: 165-169.
- Honma, M. and Ishiyama, I. 1989b. Variability of DNA fingerprint in a Japanese population. *Jpn. J. Legal Med.* 43: 128-133.
- Hutchison III, C. A., Newbold, J. E., Potter, S. S. and Edgell, M. H. 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251: 536-538.
- Inoue, M., Takenaka, A., Tanaka, S., Kominami, R. and Takenaka, O. 1990. Paternity discrimination in a Japanese macaque group by DNA fingerprinting. *Primates* 31: 563-570.
- Ishibashi, Y., Abe, S. and Yoshida, M. C. 1992. DNA fingerprinting of grey-backed voles *Clethrionomys rufocanus bedfordiae*. *J. Mamm. Soc. Jpn.* 17: 19-26.
- Ishimoto, G.: Red cell enzymes. 1975. In: Watanabe, N., Kondo, S. and Matsunaga, E. eds. JIBP Synthesis, Vol. 2. Anthropological and genetic studies on the Japanese, pp.109-139, Univ. of Tokyo Press, Tokyo.
- 石山いく夫. 1989. 法医学の新しい展開, サイエンス社, 東京.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. 1985a. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. 1985b. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316: 76-79.

- Jeffreys, A. J., Wilson, V. Thein, S. L., Weatherall, D. J., and Ponder, B. A. J. 1986. DNA "fingerprints" and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. *Am. J. Hum. Genet.* 39: 11-24.
- Jeffreys, A. J. and Morton, D. B. 1987. DNA fingerprints of dogs and cats. *Animal Genetics* 18: 1-15.
- Jin, L. and Chakraborty, R. 1993. A bias-corrected estimate of heterozygosity for single-probe multilocus DNA fingerprints. *Mol. Biol. Evol.* 10: 1112-1114.
- Jin, L. and Chakraborty, R. 1994. Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single-probe multilocus DNA fingerprinting data. *Mol. Biol. Evol.* 11: 120-127.
- 梶 光一. 1982. 北海道におけるエゾヒグマの生息分布. *北方林業* 34: 16-20.
- Kawamoto, Y., Ischak, M. T., and Supriatna, J. 1984. Genetic variations within and between troops of the crab-eating macaque (*Macaca fascicularis*) on Sumatra, Java, Bali, Lombok and Sumbawa, Indonesia. *Primates* 25: 131-159.
- Kohn, M., Knauser, F., Stoffella, A., Schröder, W. and Pääbo, S. Conservation genetics of the European brown bear — a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. (in press)
- Kreitman, M. 1983. Nucleotide polymorphisms at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 304: 412-417.
- Lee, J., Schweinsburg, R., Kernan, F. and Haigh, J. 1981. Immobilization of polar bears (*Ursus maritimus*, PHIPPS) with ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride. *J. Wildl. Dis.* 17: 331-336.
- Lewontin, R. C. and Hubby, J. L. 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudobscura*. *Genetics* 54: 595-609.
- Manlove, M. N., Baccus, R., Peltom, M. R., Smith, M. N. and Graber, D. 1980. Biochemical variation in the black bear. *Int. Conf. Bear. Res. and Manage.* 3: 37-41.
- Mano, T. 1987. Population characteristics of brown bears in Oshima peninsula, Hokkaido. *Int. Conf. Bear Res. & Manage.* 7: 69-73.
- 間野 勉. 1993. ヒグマ個体群のモニタリングの試みと保護管理対策. *哺乳類科学* 32: 159-163.

- Morton, E. S., Forman, L. and Braun, M. 1990. Extrapair fertilizations and the evolution of colonial breeding in purple martins. *The Auk* 107: 275-283.
- Nei, M. 1973. The theory and estimation of genetic distance. In: Morton, N. E. eds. Genetic structure of populations, pp. 45-59, Univ. Press of Hawaii, Honolulu.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics, Columbia Univ. Press, New York.
- Nei, M. and Tajima, F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97: 145-163.
- Nevo, E., Beiles, A. and Ben-Shlomo, R. 1984. Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity. Springer, Berlin, Heidelberg, New York and Tokyo.
- 野澤 謙. 1986. 哺乳動物の遺伝的変異性と集団構造, 続分子進化学, 今堀宏三, 木村資生, 和田敬四郎編, 培風館, 東京 pp. 57-82.
- 野澤 謙. 1994. 動物集団の遺伝学, 名古屋大学出版会, 名古屋.
- Nozawa, K., Fukui, M. & Furukawa, T. 1985. Blood-protein polymorphism in the Japanese cats. *Jpn. J. Genet.* 60: 425-439.
- 野澤 謙, 庄武孝義. 1985. 中部山岳地帯南部のニホンカモシカの遺伝的変異、特に木曾川両岸集団間の遺伝的分化について pp. 295-303. ニホンカモシカの繁殖、形態、病態および個体群特性に関する基礎的研究、文部省科学研究費補助金総合研究 (A) 研究成果報告書 (研究代表者、杉村誠) .
- Nozawa, K., Shotake, Kawamoto, Y. and Tanabe, Y. 1982. Population genetics of Japanese monkeys: II. Blood protein polymorphisms and population structure. *Primates* 23: 252-271.
- Nozawa, K., Shotake, T., Minezawa, M., Kawamoto, Y., Hayasaka, K., Kawamoto, S. and Ito, S. 1991. Population genetics of Japanese monkeys: III. Ancestry and differentiation of local populations. *Primates* 32: 411-435.
- Nozawa, K., Shotake, Ohkura, Y. and Tanabe, Y. 1977. Genetic variations within and between species of Asian macaques. *Jpn. J. Genetics* 52: 15-30.
- Omoto, K. 1975. Red cell enzymes. In: Watanabe, N., Kondo, S. and Matsunaga, E. eds. JIBP Synthesis, Vol. 2. Anthropological and genetic studies on the Japanese, pp.141-162, Univ. of Tokyo Press, Tokyo.
- Paetkau, D. and Strobeck, C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Mol. Ecology* 3: 489-495.

- Potter, S. S., Newbold, J. E., Hutchison III, C. A. and Edgell, M. H. 1975. Specific cleavage analysis of mammalian mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 4496-4500.
- Rogers, L. L. 1976. Effects of mast and berry crop failures on survival, growth, and reproductive success of black bears. *North Am. Wildl. Conf.* 41: 431-438.
- Rogers, L. L. 1977. Social relationships, movements, and population dynamics of black bears in northeastern Minnesota. Ph.D. Thesis, Univ. Minn., Minneapolis.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd. edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schobert, E. 1987. Terazole use in wild and exotic animals. *Veterinary Medicine* 1080-1088.
- Servheen, C. 1990. The status and conservation of the bears of the world. *Eighth Int. Conf. Bear Res. & Manage Monogr.* 2: 1-32.
- Shields, G. F. and Kocher, T. D. 1991. Phylogenetic relationships of north American ursides based on analysis of mitochondrial DNA. *Evolution* 45: 218-221.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Stephens, J. C., Gilbert, D. A., Yuhki, N. and O'Brien, S. J. 1992. Estimation of heterozygosity for single-probe multilocus DNA fingerprints. *Mol. Biol. Evol.* 9: 729-743,
- Taberlet, P. and Bouvet, J. 1992. Genetics of the pyrenean brown bear (*Ursus arctos*): first results. *C. R. Acad. Sci. Paris Serie III* 314: 15-21.
- Taberlet, P. and Bouvet, J. 1994. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proc. R. Soc. Lond. B* 255: 195-200.
- Tamura, K. and Aotsuka, T. 1988. Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by alkaline lysis procedure. *Biochem. Genet.* 26: 815-819.
- Taylor, A. C., Sherwin, W. B. and Wayne, R. K. 1994. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorhinus krefftii*. *Mol. Ecology* 3: 277-290.
- Tegelström, H. 1986. Mitochondrial DNA in natural populations: An improved routine for the screening of genetic variation based on sensitive silver staining. *Electrophoresis* 7: 226-229.

- Tsubota, T., Yamamoto, K., Mano, T., Yamanaka, M. and Kanagawa H. 1991. Immobilization of the free ranging Hokkaido brown bear, *Ursus arctos yesoensis* with ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride. *J. Vet. Med. Sci.* 53: 321-322.
- Tsubota, T., Mano, T. Aoi, T. and Kanagawa, H. 1993. Reproductive parameters of the Hokkaido brown bear. *Wildlife Conservation*: 214-216.
- Zhang, Y. P. and Ryder, O. A. 1993. Mitochondrial DNA sequence evolution in the Arctoidea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9557-9561.

A study on the genetic variability of Hokkaido brown bears
(*Ursus arctos yesoensis*)

Hifumi TSURUGA

Department of Theriogenology,
Faculty of Veterinary Medicine,
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

The habitat of the Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*) is getting smaller and the total population is thought to be separated into five subpopulations. This study was made for the purpose of revealing the genetic constitution of the Hokkaido brown bears. The genetic variability in their population was observed by allozyme analysis, DNA fingerprinting and restriction analysis of mitochondrial DNA that have been applied for the study of other animals.

1. Immobilization of bears for blood collection

To collect blood samples for the genetic study, two combinations of chemicals for immobilization of brown bears were compared. One combination was xylazine hydrochloride and ketamine hydrochloride (xylazine-ketamine), which is generally applied to brown bears, and another was a mixture of tiletamine hydrochloride and zolazepam hydrochloride (tiletamine-zolazepam). The effective volume of injected tiletamine-zolazepam was lower than that of xylazine-ketamine and there was no difference in the condition of immobilized bears between the two combinations. In use of tiletamine-zolazepam, there was no difference in the volume and induction time between sexes. The tiletamine-zolazepam was found to be more effective for the immobilization of Hokkaido brown bears.

2. Allozyme analysis of genetic differentiation

A total of 21 biochemical loci were analyzed electrophoretically in 10 bears from 3 subpopulations in Hokkaido in order to estimate genetic variability of the brown bear population. No polymorphic locus was observed and the genetic variability of Hokkaido brown bears are thought to be as low as other land mammals inhabiting in Japan.

3. Application of DNA fingerprinting in bears.

DNA fingerprinting employing a minisatellite Myo probe, which is known to be valuable in forensic study, was applied for individual identification and paternity determination of 47 captive bears. Moreover, it was applied for the estimation of genetic variability within and between subpopulations using 6 captive bears with known origins and 26 free-ranging bears captured in the southwestern Oshima peninsula (n=13) and the Shiretoko peninsula (n=13).

Two restriction enzymes, *HinfI* and *HaeIII* were used to make DNA fingerprints and the band patterns obtained from 45 (*HinfI*) and 33 (*HaeIII*) pairs of randomly selected bears were compared with each other. The obtained values of the probability x that a fragment in an individual is also present in the other were 0.69 for *HinfI* and 0.83 for *HaeIII* and the mean probability of all fragments was calculated to be 2.5×10^{-2} for *HinfI* and 1.3×10^{-1} for *HaeIII*. The value of x for *HinfI* (0.69) was similar to that obtained from other species, such as domestic animals. Thus, the results suggest that DNA fingerprinting can be used for individual identification. On the other hand, DNA fingerprinting is effective for paternity determination only in the case suspected males are limited, owing to the insufficient number of paternal fragments.

The estimates of the average heterozygosity (gene diversity) were 0.302 and 0.241 for the populations on the southwestern part of the Oshima peninsula and

the Shiretoko peninsula, respectively. These values suggest that the local populations sampled in this study have low genetic variability compared with those of other animal species. The degree of genetic differentiation between the populations, measured by the coefficient of gene diversity, was 7.9 percent for both captive and free-ranging bears and 19.5 percent for free-ranging bears only. These results indicate a low degree of genetic differentiation between the local populations.

4. Restriction analysis of mitochondrial DNA

The restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA in 24 bear samples collected from 4 subpopulations (Oshima, Syakotan-Eniwa, Hidaka-Yubari and east Hokkaido-Soya) were examined using 10 restriction enzymes. The restriction patterns of 9 enzymes showed polymorphisms, and mitochondrial DNAs of the sample bears were separated into 9 haplotypes by means of the combination of restriction patterns. There were some shared haplotypes between Hidaka-Yubari and east Hokkaido-Soya subpopulation, although there was no shared haplotype between Oshima and other populations. The haplotype frequency in the east Hokkaido-Soya and the Hidaka-Yubari subpopulations was lower than that of the Oshima subpopulation. The minimum genetic distance between east Hokkaido-Soya and Hidaka-Yubari subpopulation was very small, so that these subpopulations are presumed to be genetically close.

In the conclusion, the low genetic variability of Hokkaido brown bears were revealed by allozyme analysis and DNA fingerprinting. East Hokkaido-Soya and Hidaka-Yubari subpopulation are thought to be genetically close by restriction analysis of mitochondrial DNA.

