九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

九州で繁殖するプッポウソウの遺伝的解析の試み

馬場，芳之
九州大学大学院比較社会文化研究院環境変動部門

飯田，知彦
九州大学大学院農学研究院森林資源科学部門

https://doi.org/10.15017/9496

出版情報：比較社会文化. 14, pp.41-47, 2008-03-20. 九州大学大学院比較社会文化学府
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

『比較社会文化』第14巻（2008）41～47頁
Bulletin of the Graduate School of Social and Cultural Studies, Kyushu University
vol.14（2008）, pp.41～47

九州で繁殖するブッポウソウの遺伝的解析の試み

Attempt of Genetic analysis for the eastern broad-billed roller, *Eurystomus orientalis,* breeding in Kyushu

馬場芳之[1]　飯田知彦[2]
1．九州大学大学院比較社会文化研究院環境変動部門
2．九州大学大学院農学研究院森林資源科学部門
Yoshiyuki BABA[1] and Tomohiko IIDA[2]
1．Department of Environmental Change, Graduate School of Social and Cultural Studies, Kyushu University
2．Department of Forest and Forest Products Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyushu University

キーワード：eastern broad-billed roller, Kyushu, mitochondrial control region, Last Glaciation, endangered species.

Abstract

The eastern broad-billed roller, *Eurystomus orientalis,* inhabiting in Japan is an endangered species and needed exact information for the conservation. The broad-billed roller breeding in Kyushu has morphological similarities with that in Chugoku; however there is no research on genetic inspection until now. To examine polymorphism of the mitochondrial control region, we at the first sequenced 3599 bp from cytochrome *b* region to 12s rRNA region, and then determined 380 bp sequences of the domain I at the control region using 17 samples. Using 10 haplotypes defined, phylogeny, ϕ_{ST} and Mantel test showed that the broad-billed roller both in Kyushu and Chugoku should be included into a single genetic population, which increased its population at least since the Last Glaciations when these islands were connected each other during the sea regression. Polymorphic analysis suggested that this species has high genetic diversity which might be enable to distinguish the mother bird. These continuous genetic studies for this species will contribute to ecology and conservation.

はじめに

ブッポウソウ *Eurystomus orientalis* は，ユーラシア大陸東北部のウスリーから中国東部，インド，東南アジア，ボルネオ島，ニューギニアにかけて繁殖し，冬は中国南部からオーストラリアですごす（中村・中村 1995）．日本で繁殖するブッポウソウは，環境省のレッドデータブックに絶滅危惧種II類（VU）と記載され（環境省 2002），九州地方各県のレッドデータブックでも絶滅危惧I類（鹿児島県環境生活部環境保護課 2003），絶滅危惧II類（大分県自然環境学術調査会野生生物専門部会2001），準絶滅危惧種（NT-r）（宮崎県レッドデータブック作成検討委員会 2000），危急種（熊本県希少野生動物植物検討委員会 1999），絶滅危惧IB類（福岡県環境部自然保護課2001）などに記載され，絶滅の危険性が指摘されている．

九州のブッポウソウの繁殖地は，1997年から2002年にかけて環境省により実施された種の多様性調査の調査ではランクAが4地域の5メッシュで，さらに筆者らの調査で宮崎県での繁殖が確認された（馬場 2007）が，それでも1974年から1978年の調査（環境省 2004）の7地域より少なく，それ以前からも繁殖地の減少が進んできたと考えられる．これまでの著者らの研究から九州で繁殖するブッポウソウは，繁殖期間などで地理的に近い中国地方のブッポウソウと似ていることがわかったが，繁殖地間の個体の移動についてはわかっていない．九州地方から最も近隣のブッポウソウの繁殖地としては，近年山口県の繁殖地が確認されて

いないことから，広島県廿日市市と推測され，九州地方の繁殖地から最短で153km と遠い距離になる．

日本で繁殖するブッポウソウは，日本鳥類目録第6版(日本鳥学会 2000) では亜種 *E. o. calonyx* とされているが，Fry *et al.* (1992) の分類では亜種 *E. o. calonyx* が存在せず，九州および本州で繁殖する個体は琉球などで繁殖する亜種 *E. o. orientalis*，もしくはネパールからウスリーまで繁殖する亜種 *E. o. calonyx* のいずれかである可能性が高い．また猛禽類の渡りを中心とした研究から，朝鮮半島と東南アジアを結ぶ渡りのルートとして，九州から南西諸島へ向かうルートと，九州から五島列島を経て直接中国大陸東岸へ向かう二つのルートが知られており（信州ワシタカ類渡り調査研究グループ 2003)，本州の繁殖個体と遺伝的に異なる集団が九州で繁殖し，国内で二つの系統が存在する可能性もあり，系統的な問題に関しても未解決な点が多い．

これまでのブッポウソウの遺伝的な研究は，フィリピンで捕獲された試料のミトコンドリア DNA チトクローム b 領域（以下 cyt *b* とする）と12s rRNA 領域など(Kirchman *et al.* 2002)，一部の DNA 塩基配列を用いて種間系統の比較で報告がされているのみで，種内多型の研究は報告されていない．本研究では九州のブッポウソウについて，はじめてミトコンドリア DNA コントロール領域の塩基配列を決定することで，本州と九州のブッポウソウの遺伝的関係を明らかにし，九州で繁殖をおこなうブッポウソウの系統的な位置関係を推定することを目的としている．

試料

ブッポウソウ分析試料の採集地は，九州地方の宮崎県高千穂町（1試料）と大分県佐伯市（1試料）および本州は九州に近い広島県の Hatsukaichi（廿日市市，1試料），Miyoshi（三次市，5試料），Yasuda（三次市，2試料），Kitahiroshima（北広島町，4試料），Taishaku（神石高原町，庄原市，2試料）で試料採集をおこなった (Fig. 1, Table 1)．

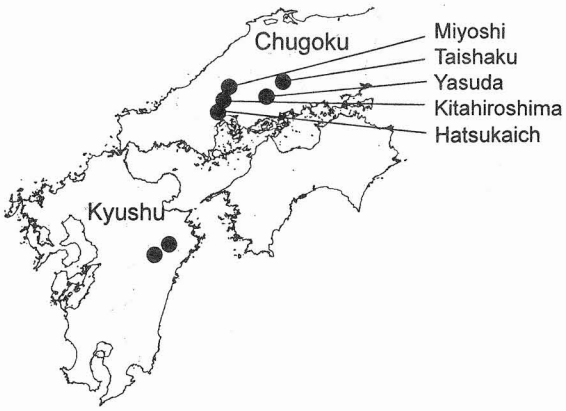

Fig. 1　Map of the sampling localities in the Kyushu and Chugoku areas.

Table 1 Number of samples and haplotype distribution of the eastern broad-billed roller.

Location		No. of Samples	No. of nest	Haplotypes
Kushu		2	2	E2, E4
Chugoku	Hatsukaichi	1	1	E6
	Kitahiroshima	4	2	EI, E3
	Miyoshi	5	3	E4, E8, E9
	Yasuda	2	2	E4, E5
	Taisaku	2	2	E7, E10
Total		16	12	

試料採取は，ブッポウソウが繁殖している巣箱に登り，雛を手取りして安全な場所に移動した後，綿棒で口腔内の粘膜を採集した．雛の手取りは，雛が骨折や脱臼を起こさないよう包み込むように保持した．試料の採取の時に雛が口を開けないときは，綿棒で嘴の基部付近の脇を軽く刺激することで，雛自ら口を開けるよう即した．雛の口腔内は餌および消化液が多い場合があり，このようなときには粘膜採取用の綿棒とは別の綿棒で一度口腔内を掃除した後，口腔内の粘膜を採取した．粘膜の採取は個体ごとに2回おこなった．

綿棒に採取した試料は，1.5ml エッペンドルフチューブ内に310μl の RSB buffer とともにいれ，4°Cで保存した．

組織片試料として広島県三次市で落鳥した成鳥の組織片をもちい，70%エタノール中に保存した．

方法

DNA 抽出

DNA の抽出は試料が付着した綿棒および RSB buffer が加えられたエッペンドルフチューブ内に20mg/ml Proteinase K 25μl, 10% SDS 15μl を加え，50°Cにローテーター上で2時間攪拌しながら，試料中の蛋白質を分解し DNA を反応液中に遊離させた．次に Baba *et al.* (2002) に沿って IsoQuick キットを用いて DNA を抽出した．抽出された DNA は TE buffer に溶かし，4°Cで保管した．

ミトコンドリア DNA cytb から12s rRNA 領域までの増幅と塩基配列の決定

DNA 塩基配列を決定するにあたり，はじめに GenBank の検索によって見つかったブッポウソウの cyt *b* 領域 (GenBank Accession No. AF407451) と12s rRNA 領域 (GenBank Accession No. AF407434) の配列をもとにプライマーを設計し，約3500塩基の DNA を増幅したあと，

ウォーキング法で両端から順に塩基配列を決定した．使用プライマー以外のDNAの増幅及びシーケンスによる塩基配列の決定には，Baba *et al.* (2005) に沿っておこなった．複数に分けて明らかにされたDNA塩基配列は，BioEdit ver. 7.0.5.3 (Hall 1999)を用いて手作業でアライメントをおこない，ひとつの塩基配列にした．プライマーの設計には，pDRAW32 (http://www.acaclone.com/) でPCRのシミュレートをおこない，FastPCR (Kalendar 2007) でプライマー内の塩基配列を確認した．

ミトコンドリアDNAコントロール領域の塩基配列決定

口腔粘膜試料からのミトコンドリアDNA塩基配列分析のために，使用するプライマー以外はBaba *et al.* (2005) に沿って塩基配列を決定した．1回目のPCR法による増幅には，tRNA (Glu) 座から12s rRNA座まで約1500塩基対を増幅するプライマーEuGluL1とEu12sH2の組み合わせを用いた．2回目のPCR法による増幅はtRNA (Glu) 座からコントロール領域の途中まで増幅するプライマーEuGluL1とEuconH2の組み合わせを用いた．

分析領域に類似した偽領域存在の確認

ミトコンドリアDNAに類似の塩基配列が核DNA内に複数存在していることがヒトで知られており (Mourier 2001)，鳥類においてもミトコンドリアDNAの重複や核DNAの偽配列の存在が知られている (Mindell 1997)．これらの偽配列を解析に使わないようにミトコンドリアDNA内のコントロール領域の重複に対しては，12s rRNAからcyt *b* 領域までの塩基配列を明らかにするとともに，1回目のPCRでミトコンドリアDNAコントロール領域付近の塩基配列重複のモデル (Quinn 1993) にもとづき座位が比較的安定していると考えられる12s rRNAからの増幅をおこなった．

核DNA内の偽配列に対しては，核DNAによる増幅がおこなわれないことを実験的に確かめた．実験は組織片試料から抽出した全DNAをアガロース電気泳動することにより，核DNAと分断化した核DNAおよびミトコンドリアDNAのバンドに分離しそれぞれのバンドを切り出し，SUPREC™-01 (TaKaRa Co. Ltd.) を使用してDNA溶液を回収した．それぞれのDNA溶液をPCR法で増幅を試み，ミトコンドリアDNAが含まれたPCRのみに予定していたDNAが増幅していることを確認した．

多型解析

塩基配列のアライメントはBioEditを用いて，手作業でアライメントをおこなった．Gamma alphaパラメーターはHidden Markovモデル (Felsenstein and Churchill 1996) を用いてPUZZLE Ver.5.0 (Strimmer and Haeseler 1996) を使用し計算した．塩基多様度 (nucleotide diversity; π) および分散，ハプロタイプ多様度 (haplotypic diversity; h) および分散，遺伝的距離 (d)，中立性テスト (Tajima's test; Tajima 1989)，Fu's Fsテスト (Fu 1997)，ϕ_{ST}およびマンテルテストの計算はARLEQUIN ver. 3.01 (Excoffer 2006)を用いた．マンテルテストに使用する繁殖地間の距離の計算は，カシミール ver. 8.7.2 (http://www.kashmir3d.com/) をもちいて直接距離を測地系WGS84，ヒュベニの距離計算式の条件でおこなった．系統樹の計算にはMEGA ver. 3.1 (Kumar *et al.* 2004) を用い近隣説合法 (Saitou and Nei 1987)および最節約法を，またNetwork ver. 4.2.0.0 (fluxus-engineering.com) を用いてmedian-joining法 (Forster *et al.* 2001, Bandelt *et al.* 1999) によるネットワーク図を計算した．近隣説合法での遺伝的距離は，Kimura 2-parameter モデル (Kimura 1980)をもちい，ブートストラップ法(Felsenstein 1985)による検定を5000回の繰り返しでおこなった．最節約法は，樹形探索にMin-Mini Heuristic with Search法をもちいた．

Table 2 Pairwise sequence divergence (above) and genetic differentation (ϕ_{ST}) between area.

Area	Kushu	Hatsukaichi	Kitahiroshima	Mioshi	Yasuda	Taisaku
Kyushu	–	3.333	1.667	2.167	2.500	4.333
Hatsukaichi	0.000	–	3.000	3.500	3.500	4.000
Kitahiroshima	0.200	0.000	–	2.000	2.500	4.000
Miyoshi	0.200	0.000	−0.143	–	4.000	4.250
Yasuda	0.200	0.000	0.000	−0.143	–	5.000
Taisaku	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	–

ϕ_{ST} values based on AMOVA(Ganma alpha=0.19).

結果

ミトコンドリアDNA塩基配列の決定

今回の研究で落鳥由来の組織片試料からcyt *b* 領域から12s rRNA領域までの塩基配列の3599塩基対の配列を決定した．ニワトリの塩基配列との比較でcyt *b* 領域631塩基対，tRNA (Thr) 領域72塩基対，tRNA (Pro)領域68塩基対，ND6領域519塩基対，tRNA (Glu) 72塩基対，コントロール領域1285塩基対，tRNA (Phe)領域70塩基対，12s rRNA領域856塩基対そしてそのほか領域間26塩基対の塩基配列に分類された．4つのtRNAはアンチコドンが正常であること，ND6領域はアミノ酸配列に翻訳した後ニワトリ(Desjardins Moraris 1990)と大きな違いが無いことを確認した．

ライチョウの塩基配列 (Baba *et al.* 2001) との比較の結果，コントロール領域内には，C stretch (Quinn and

Wilson 1993), ETAS（コントロール領域L鎖5'側から77-81および227-231塩基，Ramirez *et al.* 1993)，F box（448-472塩基対，Quinn and Wilson 1993)，D box（557-580塩基対，Quinn and Wilson 1993)，C box（605-619塩基対，Quinn and Wilson 1993), CSB-1（882-913塩基対，Quinn and Wilson 1993）があることが推定された．またCAAAをユニットとした繰り返し配列がコントロール領域12 srRNA側の端に存在し，試料では19回の繰り返しであった．コントロール領域のうち，ドメインIに相当するC stretchからF box間の380塩基対を分析領域とした．

コントロール領域解析部位の塩基配列

コントロール領域解析部位を増幅するために今回決定したブッポウソウのミトコンドリアDNAの一部3599塩基対をもとに1回目のPCR用のプライマーセットEuconL1とEu12sH2の組み合わせ，2回目のPCR用プライマーセットEuconL1とEuconH2の組み合わせを設計した．このプライマーを用いアガロース電気泳動で分離した核DNAおよび，ミトコンドリアDNAおよび断片化した核DNAの混合DNAのそれぞれでPCR法によるコントロール領域の増幅を2回目のPCRまでおこなったが，ミトコンドリアDNAを含まない試料からは予定した増幅DNAが検出されなかった．

17試料から分析領域の380塩基対を決定したところ，アデニン（A）が29.2%，シトシン(C)が28.6%，グリシン(G)が15.7%，チミン(T)が26.5%の割合であった．また11箇所の転移（トランジション）と2箇所の転換（トランスバージョン）からなる13箇所の塩基置換部位が検出し，10ハプロタイプを識別した（Table 1)．トランジションとトランスバージョンの比は6.01とトランジションが高い値で，ガンマ値は0.19であった．

集団遺伝子的解析

決定した380塩基対をNCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）のDNA−DNAホモロジー検索をおこなったところ，F box側にやや類似した塩基配列を持つデータが登録されていたが，系統樹でアウトグループに使用できるようなデータは登録されていなかったので，系統樹はアウトグループなしで計算した（Fig. 2)．検出された10ハプロタイプの近隣接合法と最節約法の厳密合意樹は，ハプロタイプE5，E6，E7とE9，E10そしてE3，E4からなるクラスターがあり，樹形がほぼ同じであった．最節約法の総体一致指数（CI）0.928，総体保持指数(RI)が0.833そして修正一致指数(RCI)が0.774で，1に近く重複や平行置換がすくなく信憑性が高い系統樹といえる．両系統樹の唯一の違いはハプロタイプE2の枝で，厳密合意樹ではクラスターを作らないが，近隣説合法ではE3，E4とともにクラスターを作る．近隣接合樹でのすべての分岐はブートストラップ値が75以下で高くはない．また表1に示した試料採集地と系統樹の関係は，系統樹上で分けられることはなかった．ネットワーク図ではハプロタイプE1, E2, E3, E4で重複もしくは平行置換の可能性がある樹形となり，近隣接合樹とほぼ同じ結果となった．

ϕ_{ST}および地域間の遺伝的距離（*dxy*）を表2に示した．九州地方と中国地方間と中国地方内では距離に大きな違いがあるが，遺伝的距離は九州地方と中国地方間の1.667から4.333に対して中国地方内は2.000から4.250と重複した値であった．遺伝的距離を加味したϕ_{ST}は非常に低い値で有意差がある地域間は無く，九州と中国地方を遺伝的に分けることは出来なかった．遺伝的距離と実際の距離をもちいてマンテルテストで比較をおこなったところ，p=0.445で優

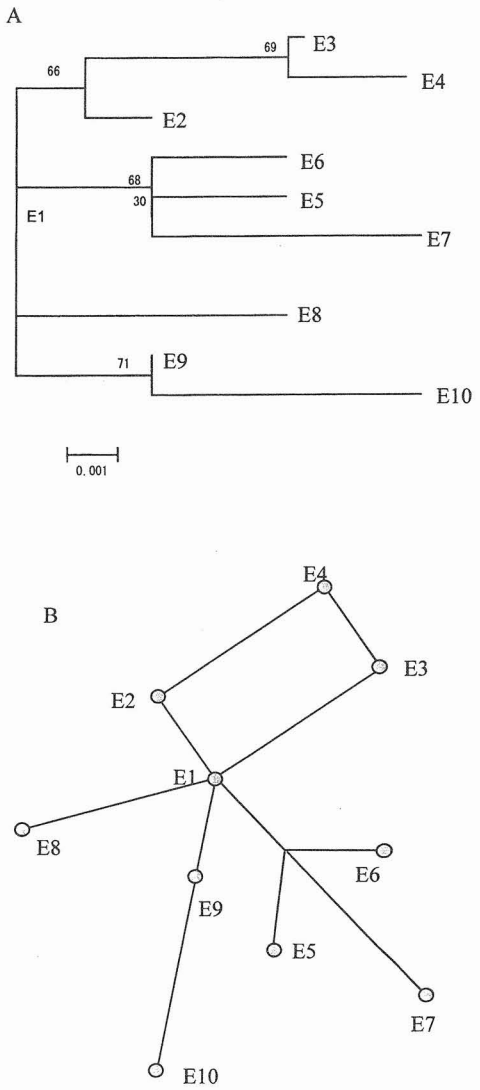

Fig. 2　Neighbor-joining tree (A) and network tree (B) for the 10 haplotypes of the eastern broad-billed roller. Numbers on nodes are from boot strap.

位ではなく関係は認められなかった．

九州地方，中国地方そして全体の個体群変動を明らかにするためにexpansion coefficient，Tajima's D そして Fu's Fs を計算した（Fig. 2）．試料数が少ない九州を除いた中国地方と全体は，expansion coefficient が高めの0.35から0.37で，Tajima's D が有意差はないが-0.79から-0.875の低い値で，Fu's Fs は-4.665から-5.121でやや低く，これらの値はすべて個体数の緩やかな増加を示している．ハプロタイプ多様度は0.95以上と高く，塩基多様度は中国地方で0.010，全体で0.009であった．

考察

ブッポウソウのミトコンドリアDNAコントロール領域および付近の塩基配列決定

ブッポウソウのミトコンドリアDNAコントロール領域を分析するためにcyt *b* 領域から12s rRNA 領域までの3599塩基対を決定し，コントロール領域以外に4つのtRNA 領域と ND6遺伝子座の塩基配列を決定した．これらの領域の塩基配列にはミトコンドリアDNA として矛盾はなく，ミトコンドリアDNA であると断定した．cyt *b* 領域から12s rRNA 領域まで PCR 法による DNA 増幅した約3500塩基対は，決定した塩基配列相当の長さとほぼ同じで，この間に重複などによって生じるコントロール領域の重複は存在しないと考えられる．今回使用したプライマーセットを，アガロース電気泳動で分離した核DNA を用いて PCR 法による増幅をおこなっても DNA の増幅が確認されなかったことから，核DNA 内に今回の実験法で増幅される類似配列が存在しないと考えられる．

ミトコンドリアDNA コントロール領域は，ニワトリやライチョウなどと同じようにその内部に ND6遺伝子座側から C stretch，ETAS，F box，D box，C box，CSB-1の順で領域が並んでおり，12s rRNA 側末端には CAAA をユニットとした繰り返し配列が存在し，ライチョウなど他の鳥類によく見られる構造であった．このことよりコントロール領域をもちいた DNA 多型解析は，ライチョウなどと同様に種内多型の解析に有用である．

九州地方と中国地方の遺伝的関係

九州2巣と中国地方の10巣から採取された16試料のミトコンドリアDNA コントロール領域380塩基の塩基置換部位は13箇所で，トランジション比率が高いことから塩基置換は飽和せず分化後の置換を残していると考えられる．近隣接合法と最節約法による厳密合意樹は樹形がほぼ同じであるが，近隣接合樹でのブーツストラップ法による検定で検定値が低く樹形が有意でないことを示しているが，これは塩基置換が13箇所と少なく各枝を構成する塩基置換が少ないことに起因するものと考えられた．さらに最節約法の総体一致指数，総体保持指数そして修正一致指数が1に近いことは，重複や平行置換がすくなく塩基置換は少ないが，信憑性が高い系統樹といえる．中国地方と九州地方を分ける分岐は，系統樹で見つからず九州と中国地方で明確な系統の違いはなかった．

地域間の遺伝的つながりを明らかにするために ϕ_{ST} と遺伝的距離を計算したところ，全ての地域で有意差を検出することはできなかった．これは表1に示すように複数巣を調べた地域で検出されたハプロタイプが全て異なり，ハプロタイプ間の距離が地域間の距離と大きく違わないことに起因しており，遺伝的に一つの集団である可能性がある．さらに地域間の遺伝的距離と実際の距離をマンテルテストで比較しても相関は見られなかったことや両地方でハプロタイプ E4が存在していることも，遺伝的に一つの集団であることと矛盾していない．しかし分析数が少なく，現在の遺伝的交流の有無は決定できない．

ブポウソウ個体群の分化と変遷

九州地方と中国地方で繁殖するブッポウソウの変遷を明らかにするために，expansion coefficient，Tajima's D そして Fu's Fs を計算したところ，それぞれの値はブッポウソウの個体数が増加しつつあることを示し，100万年あたり20.8パーセントの分子時計（Mindell 1997）を用いると，最終氷期中の5万年前には分化を始めていたこととなる．こ

Table 3 Genetic diversity indices of the eastern broad-billed roller based on 380 bp of the mitochondrial DNA control region sequence.

Localities	No.of nest	No.of haplotype	Gene diversity with variance	Nucleotide diversity with variance	S	d	S/d	Tajima's D	Fu's Fs
Kyushu	2	2	1.000±0.500	0.005±0.006	2	2.000	1.000	0.000(p=−1.000)	0.693
Chugoku	10	9	0.977±0.054	0.010±0.006	13	3.711	3.505	−0.875(p=0.217)	−4.665
Total	12	10	0.954±0.056	0.009±0.006	13	3.500	3.714	−0.791(p=0.239)	−5.121

S：number of segregating sites
d：mean number of pairwise nucleotide differences
S/d：expansion coefficient

の時期の瀬戸内海は陸地となっており（日本第四紀学会 1987），ブッポウソウの繁殖地は連続していた環境で現在へ続く多様性を作り始めていたと考えられる．

今回のDNA分析結果から最終氷期後のブッポウソウの交流について，2つのモデルが考えられる．ひとつは最終氷期中に出来たハプロタイプが九州と中国地方それぞれで残り続けたモデルであり，もう一つは現在も九州地方と中国地方で現在も交流があるモデルである．ミトコンドリアDNAコントロール領域の進化速度を考えると最終氷期以降の短い時間で2つのモデルの差がはでにくく，九州地方2試料でおこなった今回の分析結果でどちらであるのかを判断することは出来なかった．また現在九州地方で繁殖する個体が非常に少ないことから，ボトルネックを起こしていることが考えられ，今後新たに九州のほかの地域の試料を加えて分析しても正確な推定は難しいと考えられる．また生態的な面からの推定は，繁殖期以外のブッポウソウの観察例が少ないことからも難しいであろう．このようなことから現在は生息地が減少している九州地方で繁殖するブッポウソウは，少なくとも最終氷期中には中国地方で繁殖するものを含めて分化を始めた高い遺伝的多様性があったと推測される．

今回広島4地域で複数の巣を調べたところ，すべての地域で異なるハプロタイプのみ検出され，地域ごとにひとつの母系ではなく，複数の母系を持つことが明らかになった．巣箱設置開始前の営巣場所が少なかったことから，すべての地域で異なるハプロタイプが検出されたことは非常に興味深い結果である．これは鳥類一般にメスの分散が高い（Greenwood *et al.* 1978）ことから，メスの地域間への分散をおこなった結果，同一繁殖地でも他の繁殖地で生まれたメスが繁殖をおこなった可能性がある．これとは別に広島のブッポウソウは比較的少数の営巣場所から巣箱設置により増加してきたがものであり，母系によるハプロタイプ数はそれほど期待できず，発見されていなかった営巣場所が存在した可能性もある．この2つのうち1つもしくは両方の結果地域内で複数の母系が存在している結果を生じたのではないか．

今後の課題

今回の研究からブッポウソウの分化が最終氷期中にさかのぼり，多くのハプロタイプを持つことが明らかになった．今回もちいたミトコンドリアDNAコントロール領域の塩基配列の解析法は，分析数が少ないがハプロタイプの重複がほとんどなく，生態の分析ツールの有用なマーカーとなりうる可能性が示唆された．今後より多くの巣の遺伝子を調査することにより，人間活動により個体数が減少したブッポウソウがボトルネックを起こしたかどうか明らかにできるであろう．また長期にわたる調査をおこない，巣を使用する個体の変化やメス個体の移動についても調査が必要である．巣箱の設置と平行して，今回のようなDNA解析を九州地方で繁殖するブッポウソウに関しておこなえば，より的確な保全対策を提示することもできると考えられる．

引用文献

Baba, Y., Fujimaki, Y., Yoshii, R. and Koike, H. (2001) Genetic variability in the mitochondrial control region of the Japanese rock ptarmigan *Lagopus mutus japonicus*. Jap. J. Ornithol. 50： 53-64.

Baba, Y., Fujimaki, Y., Klaus, S., Butorina, O., Dorvetskii, S. and Koike, H. (2002) Molecular population phylogeny of the hazel grouse in East Asia inferred from mitochondrial control-region sequence. Wildlife Biology 8： 251-259.

Baba, Y., Klaus, S., Y.-Hua S. and Fujimaki, Y. (2005) Molecular phylogeny and population history of the Chinese grouse and the hazel grouse. Bulletin of the Graduate School and Culltural Studies, Kyushu University 11： 77-82.

馬場芳之（2007）九州におけるブッポウソウ巣箱設置の試み．比較社会文化 13： 57-62.

Bandelt, H. J., Macauly, V. and Richaeds, M. (2000) Median networks: speedy construction and greedy reduction, one simulation, and two case studies from human mtDNA. Mol. Phylogenet. Evol. 16(1)： 8-28.

Desjardins, P. and Moraris, R. (1990) Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. J. Mol. Evol. 212： 599-634.

Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. (2006) Arlequin ver. 3.0： An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1：47-50. (http://cmpg.unibe.ch/software/srlequin3)

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogeneies: An approach using the bootstrap. Evolution 39： 783-791

Felsenstein, J. and Churchill, G.A. (1996) A hidden Markov model approach to variation among sites in rate of evolution. Mol. Biol. Evol. 13： 93-104.

Fry, C. H. and Fry, K. (1992) Kingfishers, bee-eaters, & rolles. Princeton University Press, Princeton, New

Jersey.

Forster, P., Torroni, A., Renfrew, C. and Rohl, A. (2001) Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. Mol. Biol. Evol. 18：1864-1881

Fu, Y.-X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutation against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147： 915-925.

福岡県環境部自然保護課（2001）福岡県の希少生物．福岡県環境部自然保護課．福岡県．

Greenwood, P. J., Harvey, P. H. and Perrins, C. M. (1983) Inbreeding and dispersal in the great tit. Nature 271： 52-54.

Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence aligment editor and analysis program for windws 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp.Ser. 41：95-98.

鹿児島県環境生活部環境保護課（2003）鹿児島県レッドデータブック．鹿児島県環境生活部環境保護課．鹿児島県．

Kalendar, R. (2007) FastPCR: a PCR primer and probe design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. (www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm)

環境省（2002）改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物-レッドデータブック- 2鳥類．環境省．東京．

環境省（2004）種の多様性調査　鳥類繁殖分布調査報告書．環境省．東京．

Kirchman,J.J., Hackett,S.J., Goodman,S.M. and Bates,J. M. (2002) Phylogeny and systematics of ground rollers (Brachypteraciidae) of Madagascar. Auk 118 (4), 849-863.

Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolution rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. J. Mol. Evol. 16： 112-120.

熊本県希少野生動物植物検討委員会（1999）くまもとの希少な野生生物．熊本県環境生活部自然保護課．熊本県．

Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004) MEGA3：Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings in Bioinformatics 5：150-163.

Mindell, D. P ed. (1997) Avian molecular evolution and systematics. Academic Press. California.

宮崎県レッドデータブック作成検討委員会（2000）宮崎県の保護上重要な野生生物．宮崎県生活環境部生活環境課．宮崎県．

Mourier, T., Hansen, A. J., Willerslev, E. and Arctander, P. (2001) The human genome project reveals a continuous transfer of large mitochondrial fragments to the nucleus. Mol. Biol. Evol. 18(9)：1833-1837.

中村登流，中村雅彦（1995）原色日本野鳥生態図鑑，陸鳥編．保育社．大阪．

日本第四紀学会（1987）日本第四紀地図．日本第四紀学会．東京．

日本鳥学会（2000）日本鳥類目録　改定第6版．日本鳥学会．北海道．

大分県自然環境学術調査会野生生物専門部会（2001）レッドデータブックおおいた．大分県生活環境部生活環境課．大分県．

Quinn, T. W. and Wilson, A. C. (1993) Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. J. Mol. Evol. 37： 417-425.

Satiou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4. 406-425.

信州ワシタカ類渡り調査研究グループ（2003）タカの渡り観察ガイドブック．文一総合出版．東京．

Ramirez, V., Savoie, P. and Morais, R. (1993) Molecular characterization and evolution of a duck mitochondrial genome. J. Mol. Evol. 37： 296-310.

Strimmer, K. and von Haeseler, A. (1996) Quartet puzzling:A quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. Mol. Biol. Evol. 13： 964-969.

Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. 123：585-595.