

名古屋周辺ワシタカ類のDNAバーコーディングと集団遺伝解析

横山 悠理⁽¹⁾ 中島 京也⁽¹⁾⁽²⁾ 陸田 径典⁽¹⁾⁽³⁾ 熊澤 慶伯⁽¹⁾

- ⁽¹⁾ 名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科生物多様性研究センター 〒467-8501 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町山の畑1
⁽²⁾ 日本ワシタカ研究センター 〒488-0084 愛知県尾張旭市旭ヶ丘町山の手470番地
⁽³⁾ 株式会社テクノ中部 〒455-8512 愛知県名古屋市港区大江町3番地12

DNA barcoding and population genetic analyses of falconiform and accipitriform raptors in Central Japan

Yuri YOKOYAMA⁽¹⁾ Keiya NAKAJIMA⁽¹⁾⁽²⁾
Michinori MUTSUDA⁽¹⁾⁽³⁾ Yoshinori KUMAZAWA⁽¹⁾

- ⁽¹⁾ Research Center for Biological Diversity, Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University, 1 Yamanohata, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8501, Japan.
⁽²⁾ The Japan Falconiformes Center, 470 Yamanote, Asahigaoka, Owariasahi, Aichi 488-0084, Japan.
⁽³⁾ Techno Chubu Co. Ltd., 3-12 Oe-cho, Minato-ku, Aichi 455-8512, Japan.

Correspondence:

Yoshinori KUMAZAWA E-mail: kuma@nsc.nagoya-cu.ac.jp

Keiya NAKAJIMA E-mail: jfc-keiya@wh.commufa.jp

要旨

名古屋周辺より保護された11種のワシタカ類合計69個体について、ミトコンドリアDNAにコードされるシトクロムオキシダーゼサブユニットI (CO I) 遺伝子の部分塩基配列を決定した。ハヤブサ及びオオタカについては、ミトコンドリアDNA制御領域の部分塩基配列も決定した。これらの塩基配列は、性別や採取地などの関連情報とともに、Barcode of Life Data Systems データベースに、プロジェクト名DNA Barcoding of Raptors in Central Japan (DBRCJ) として登録し、DNAバーコードデータベースを作成した。解析した11種のワシタカ類に関して、形態的特徴から同定された種とCO I 遺伝子配列から推定される種が一致し、DNAバーコーディングによる種の識別が可能であることを再確認した。トビ、ミサゴ、ノスリでは、日本産個体とデータベース由来の欧州産個体との間で、明確な遺伝的分化が見られた。またミサゴとオオタカでは、日本産個体とデータベース由来の米大陸産個体との間でも、明確な遺伝的分化が見られた。一方ハヤブサでは、日本(極東)、欧州、米大陸といった広域の個体間で明確な遺伝的分化が示されなかった。以上の結果は、それぞれの種に属する個体の渡りの様式とおおむね関連していたが、中にはチョウゲンボウのように、海外への渡りを行った記録が確認されていないにもかかわらず、日本産個体と欧州産個体の間に明確な遺伝的分化が見られない種もあった。国内産のオオタカは種内の遺伝的多様性を示す指標が比較的低く、近年の個体数の減少によるボトルネック現象を反映すると思われた。

受付日: 2019年10月3日

受理日: 2020年1月22日

Abstract

Partial nucleotide sequences of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (CO I) genes were determined for 69 individuals representing 11 falconiform and accipitriform raptor species from Central Japan. Partial control region sequences of mitochondrial DNA were also sequenced for individuals of the northern goshawk *Accipiter gentilis* and the peregrine falcon *Falco peregrinus*. The determined sequences were deposited to the Barcode of Life Data Systems database under the project DNA Barcoding of Raptors in Central Japan (DBRCJ) together with relevant information for specimens. Morphologically identified species and molecularly delimited species status corresponded with each other, confirming the usefulness of the DNA barcoding for identifying the 11 raptor species. There was strong genetic differentiation between Japanese and European individuals in the black kite *Milvus migrans*, the osprey *Pandion haliaetus*, and the common buzzard *Buteo buteo*. Strong genetic differentiation was also found between Japanese and North American individuals in the osprey and the northern goshawk. However, there was no strong genetic differentiation between Japanese, European and North American individuals in the peregrine falcon. These results were mostly consistent with the available evidence for the migration range of each species though overseas migration has not been recorded for the common kestrel *Falco tinnunculus* of Japan, which showed no strong genetic differentiation between Japanese and European individuals. The northern goshawk in Japan had relatively small haplotype and nucleotide diversities and this may be due to the population bottleneck of this species in the 20th century.

序文

猛禽類は、鋭い爪と嘴を生かして他の動物を捕食する習性がある鳥類であり、鳥綱タカ目、ハヤブサ目、フクロウ目に属する種が含まれる (日本鳥学会, 2012)。このうちタカ目とハヤブサ目の鳥類は、古来から鷹狩などでヒトとの関わりも深く、一般によく知られた存在である (本稿では以下ワシタカ類と称する)。大都市名古屋及びその周辺地域 (名古屋圏) では、近年開発等に伴い野生動物の生息環境が劣化しているものの、なお多くのワシタカ類が生息している (名古屋市, 2016)。タカ目ではミサゴ科のミサゴ、タカ科のハチクマ、トビ、チュウヒ、ハイロチュウヒ、ツミ、ハイタカ、オオタカ、サシバ、ノスリが見られる。ハヤブサ目では、ハヤブサ科のチョウゲンボウ、コチョウゲンボウ、チゴハヤブサ、ハヤブサが見られる。

ワシタカ類は生態系において食物連鎖の頂点に位置しているが、生息環境の変化や農薬等の化学物質による影響で世界的に生息数を減らしており、その保全に取り組む必要がある (McClure et al., 2018)。国際自然

保護連合 (IUCN, International Union for Conservation of Nature) がまとめた最新のレッドリストによるとタカ目とハヤブサ目に属する計316種のうち、3種が絶滅し、61種が絶滅危惧種 (Critically Endangered species, Endangered species, Vulnerable species) となっている (IUCN, 2019)。日本国内に生息するワシタカ類の一部も各種レッドリストで絶滅危惧種に含まれている (愛知県環境部, 2015; 名古屋市, 2015; 環境省, 2019)。例えば、ハヤブサは環境省レッドリストに絶滅危惧II類として掲載されている絶滅危惧種である (表1; 環境省, 2019)。

ワシタカ類の構成種には、一般によく知られた種が多いものの、その生態や進化については不明な点も多い。日本で見られるワシタカ類には、年間を通して同じ場所に生息し季節により大きな移動を行わない留鳥と、繁殖や越冬のために定期的に長い距離を移動する渡り鳥がいる (日本鳥学会, 2012)。保全を行う視点からは、それぞれの種 (野生で生殖隔離を持たない集団の範囲) や種内系統の正確な把握、繁殖行動様式 (食性や移動様式な

表1. DNAバーコーディングを行った名古屋周辺ワシタカ類の概要
Table 1. Samples used for DNA barcoding in this study from Central Japan

目	科	和名	学名	絶滅危惧レベル ¹	渡り ²	個体数 ³	H ⁴	BIN ⁵	
タカ目	タカ科	オオタカ	<i>Accipiter gentilis</i>	準絶滅危惧 (NT)	○	17	3	ABX6076	
		ハイタカ	<i>Accipiter nisus</i>	準絶滅危惧 (NT)	○	9	1	AAB5171	
		サシバ	<i>Butastur indicus</i>	絶滅危惧II類 (VU)	○	1	1	AAD9465	
		ノスリ	<i>Buteo buteo</i>	—	△	5	2	AAB3969	
		トビ	<i>Milvus migrans</i>	—	×	3	1	AAC9619	
		クマタカ	<i>Nisaetus nipalensis</i>	絶滅危惧 I B類 (EN)	×	4	1	AAE2593	
		ハチクマ	<i>Pernis ptilorhynchus</i>	準絶滅危惧 (NT)	○	1	1	AAD4127	
		ミサゴ科	ミサゴ	<i>Pandion haliaetus</i>	準絶滅危惧 (NT)	△	4	1	ABY4933
		ハヤブサ目	ハヤブサ科	ハヤブサ	<i>Falco peregrinus</i>	絶滅危惧II類 (VU)	○	16	3
チゴハヤブサ	<i>Falco subbuteo</i>			—	○	1	1	AAC0850	
チョウゲンボウ	<i>Falco timunculus</i>			—	△	8	2	AAB2172	

¹ 環境省, 2019 に基づく

² 森岡ら, 1995, 山田, 1998, 信州ワシタカ類渡り調査研究グループ, 2003, 日本鳥学会, 2012 に基づく

○: 海外への渡りが確認されている種

△: 渡りは確認されているが, 海外への移動記録が無い種

×: 留鳥性が強く, 長距離の渡りは想定されない種

³ 本研究でDNAバーコード配列データを取得した個体数

⁴ ハプロタイプ数

⁵ BOLDデータベースにおいて生物学的な種に相当すると認識されたDNAバーコードのグループ名称 (Barcode index number)

¹ Endangered category based on the 2019 Redlist from the Ministry of Environment, Japan

² Migrational ability based on the literature

○: Species with records of oversea migration

△: Species with records of migration but without records of oversea migration

×: Basically resident species that probably do not migrate in a long distance

³ Number of individuals sequenced for the DNA barcoding in this study

⁴ Number of haplotypes

⁵ Barcode index number in the BOLD database

ど)を踏まえたそれぞれの種に適した生息環境の解明などが特に重要である。日本本土のワシタカ類のうち、イヌワシ、クマタカ、トビは基本的に留鳥であり、サシバ、ハチクマ、チゴハヤブサは渡り鳥としての特徴が顕著である(表1)。オオタカ、ハイタカ、ノスリ、ミサゴ、チュウビ、ツミ、ハヤブサ、チョウゲンボウは留鳥と渡り鳥の両方を含むと考えられている(表1)。留鳥と渡り鳥の両方を含む種の個体群において、留鳥と渡り鳥で遺伝的構造に違いがあるかどうかはよく分かっていない。繁殖や越冬のためにユーラシア大陸まで渡りを繰り返すとすれば、現地の個体群と遺伝子交流を行い、一方で北米や欧州の個体群との間では遺伝的隔離が進むことが考えられるが、これらもよく検証されていない。また種の存続には種内の遺伝的多様性の維持が必要であると一般に考えられているが、日本のワシタカ類について遺伝的多様性を調べた研究論文はそれほど多くない(例えばイヌワシに関するMasuda et al., 1998; Nebel et al., 2015, オ

オタカに関するAsai et al., 2008; 河原ら, 2008など)。

DNAバーコーディングは、数百塩基対のDNA塩基配列(DNAバーコード)における種特異性に基づき、生物標本の簡便な種同定を行うための技術である(Hebert et al., 2003)。日本産鳥類のDNAバーコーディングは、主に国立科学博物館と山階鳥類研究所の共同プロジェクトで進められ、日本で繁殖する鳥類234種においてDNAバーコーディングによる種の識別が可能であることや、沖縄など周辺域を含めた日本全体で24種の隠蔽種候補の存在が示されている(Saitoh et al., 2015)。しかしながら、日本産ワシタカ類のDNAバーコーディングにおける解析個体数はまだそれほど多くなく、各種内の遺伝的多様性も十分解明されていない。そこで本研究では、日本ワシタカ研究センターによって保護された傷病ワシタカ類のサンプルを用いて、DNAバーコーディングと集団遺伝解析を行った。

材料および方法

日本ワシタカ研究センター（愛知県尾張旭市）では、ワシタカ類の生息状況調査、生息環境保全対策の提案や実践、傷病ワシタカ類の治療と放鳥などを行っている。本研究で用いたサンプルは、日本ワシタカ研究センターにおいて傷病により保護された個体（死亡後の冷凍個体を含む）より採取されたものである。それぞれの標本は、著者の一人である中島により形態情報に基づき種同定され、各種ごとに保護回収された地域、雌雄、年齢などが記録されている。これらの標本の一部は、日本ワシタカ研究センターから名古屋市立大学システム自然科学研究科附属標本庫に寄贈され、筋肉組織（アルコール液浸標本、4℃保存）ないしは血液（-20℃保存）が保存されている。

治療飼育個体については、抗凝固剤入り採血管を用いて採血を行い-20℃冷凍保存した。冷凍保存された死亡個体については、解凍後胸部を切開し胸筋を採取し99.5%エタノールに浸し4℃冷蔵保存した。採取された各サンプルは、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いて全DNAの抽出を行い、その10倍希釈液を用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。PCRは、SpeedStar HS DNA polymerase（タカラバイオ）とPCR Thermal Cycler Dice（タカラバイオ）を用いて、10 μ lの液量で行った。タカラバイオが提供する標準的な反応液組成で、98℃ 5秒、55℃ 15秒、72℃ 20秒のサイクルを30回行った。ミトコンドリアDNAにコードされるシトクロムオキシダーゼサブユニットI（CO I）遺伝子の一部（約680塩基対）を増幅する鳥類ユニバーサルプライマーとして、BirdF1とBirdR1（Hebert et al., 2004）ないしは、L6697BirdとH7390Thrush（Saitoh et al., 2015）を使用した。また、ミトコンドリアDNAのtRNA^{Thr}遺伝子から制御領域の一部までの領域（約650塩基対）を増幅するプライマーとして、オオタカにはL16064とH15426（Sonsthagen et al., 2004）を、ハヤブサにはL15206とH15856（Talbot et al., 2011）を用いた。

当該DNA領域の増幅を1%アガロースゲル電気泳動によって確認した後、ExoSAP-IT 試薬（Affymetrix）によって処理したPCR反応液を用いて、サイクルシーケンシング反応を行った。この反応にはBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Life Technologies）を用い、

反応産物を3500 Genetic Analyzer（Life Technologies）に展開して、塩基配列の解読を行った。両方向から読んだ塩基配列をSequencher 4.8（Gene Codes）を用いてアセンブルすることで、塩基配列をサンプルごとに確定した。

合計69個体のワシタカ類について、DNAバーコード領域の塩基配列を決定し、標本採集地・採集日や分類などの付帯情報、標本全体の写真画像、名古屋市立大学システム自然科学研究科附属標本庫（SDNCU）の標本登録番号、DNAシーケンサーで分析されたときのエレクトロフェログラムデータ（ベースコールに用いた波形データ）とともに、Barcode of Life Data Systems (BOLD) データベースに、DNA Barcoding of Raptors in Central Japan (DBRCJ) のプロジェクト名で登録し、DNAバーコードデータベースを作成した。

DNAバーコード領域の塩基配列における距離の算出は、BOLDデータベースのBarcode Gap Analysisを参照して行った。距離モデルにはKimura 2-parameter modelを、アラインメントオプションにはMUSCLEを、ギャップサイトの取扱いにはPairwise Deletionのオプションを採用した。分子系統解析は最尤法を用い、MEGA7（Kumar et al., 2016）を使って行った。距離モデルにはKimura 2-parameter modelを、ギャップサイトの取扱いにはall use sitesのオプションを、サイト間の分子進化速度の違いを表すモデルにはGamma+Invariantモデル（Gamma補正は5カテゴリー）を使用した。また、あわせて1000回のリサンプリングによるブートストラップ解析を行い、各結節点におけるブートストラップ確率を求めた。集団解析はDnaSP version 6.12.03（Rozas et al., 2017）を用いて行った。MEGA7で使用したDNA塩基配列をDnaSPで読み込み、塩基多様度 π 、ハプロタイプ多様度 h 、Tajima's D 、Fu's F_S などを算出した。遺伝的分化指数 Φ_{ST} の算出はArlequin version 3.5.2.2（Excoffier and Lischer, 2010）を用いて行った。そのためにDnaSPでDNA塩基配列を地域ごとにグループ化し、Arlequin上で距離モデルKimura 2Pを使用したCompute pairwise FSTを行った。ネットワーク図は、DnaSPによりハプロタイプを決定し、NETWORK 5.0.1.1（Bandelt et al., 1999）上でMedian-joining法により作成した。

結果

CO I 遺伝子塩基配列

名古屋圏（主に愛知県だが一部他府県も含む）で保護された11種のワシタカ類69個体（表1）について、CO I 遺伝子の一部（DNAバーコード領域）の塩基配列を決定した。これらの塩基配列は両方向から正確に読み取られ、未確定塩基は含まれなかった。オオタカ17個体とハヤブサ16個体から得られた塩基配列には、それぞれ3つのハプロタイプが見られた（表1）。またノスリ5個体とチョウゲンボウ8個体にも、それぞれ2つのハプ

ロタイプが存在した。これら以外の7種については、同一種内のハプロタイプ数は1であった。

本研究で得られたDNAバーコード領域の塩基配列を用いて作成した最尤系統樹を図1に示す。11種のワシタカ類は、タカ科の7種とミサゴ科の1種（以上はタカ目に含まれる）、ハヤブサ科（ハヤブサ目）の3種に分かれ、タカ目とハヤブサ目は姉妹関係にあった。この系統関係は、比較的最近の分類学的研究や他の分子系統研究（例えばWink and Sauer-Gürth 2004; Wink 2018）と整合する結果であった。

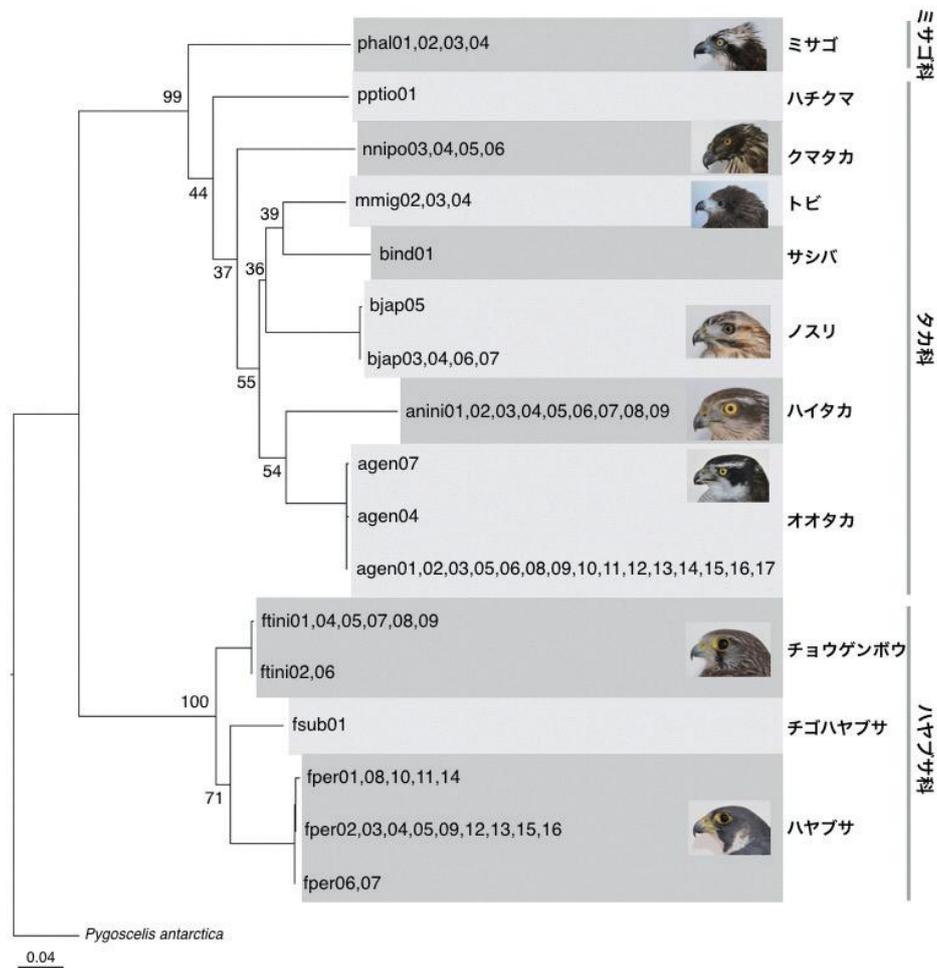


図1. DNAバーコード領域の塩基配列（アラインメント後693サイト）を用いて作成した名古屋周辺ワシタカ類の最尤系統樹。タクソンは同一のハプロタイプを持つものをまとめて解析し、タクソン名には該当するサンプルID番号を記した。外群にはヒゲペンギン (*Pygoscelis antarctica* : INSD アクセス番号 EU525475) を使用し、各結節点には1000回の試行から求められたブートストラップ確率を示した。

Fig. 1. A maximum likelihood tree constructed using the DNA barcode sequences (693 alignable sites) for the raptors from Central Japan. Identical sequences were merged into the haplotype with a name listing the corresponding sample IDs. *Pygoscelis antarctica* (INSD accession number EU525475) was used as an outgroup. Bootstrap probabilities from 1000 replications are shown at the corresponding nodes.

各種のワシタカ類について、BOLDデータベースまたはInternational Nucleotide Sequence Database (INSD)データベースに登録されている国内外の塩基配列を利用して、種内の各地域の個体間で遺伝的な差異が見られるかどうか調べた(図2)。クマタカについては、日本生息個体以外のデータベース登録が無かったが、本研究でシーケンスした4個体とデータベースに登録されている個体(北海道、栃木、静岡、広島産)は同一の塩基配列を持っていた。

トビ、ミサゴ、ノスリでは、種内において生息地域によりCO Iハプロタイプの明確な分離が見られた。トビでは、本解析で用いた個体及びデータベースに登録されている国内産個体、太平洋の離島の個体が一つのハプロタイプ(H₁)を共有し、パキスタン(H₂)やインド(H₃)のハプロタイプと遺伝的に近いことが示された(図2A)。また、これらのハプロタイプと欧州産個体(ドイツ:H₅、チェコスロバキア:H₄)との間で4塩基以上の変異があり、明確な遺伝的な差がみられた。

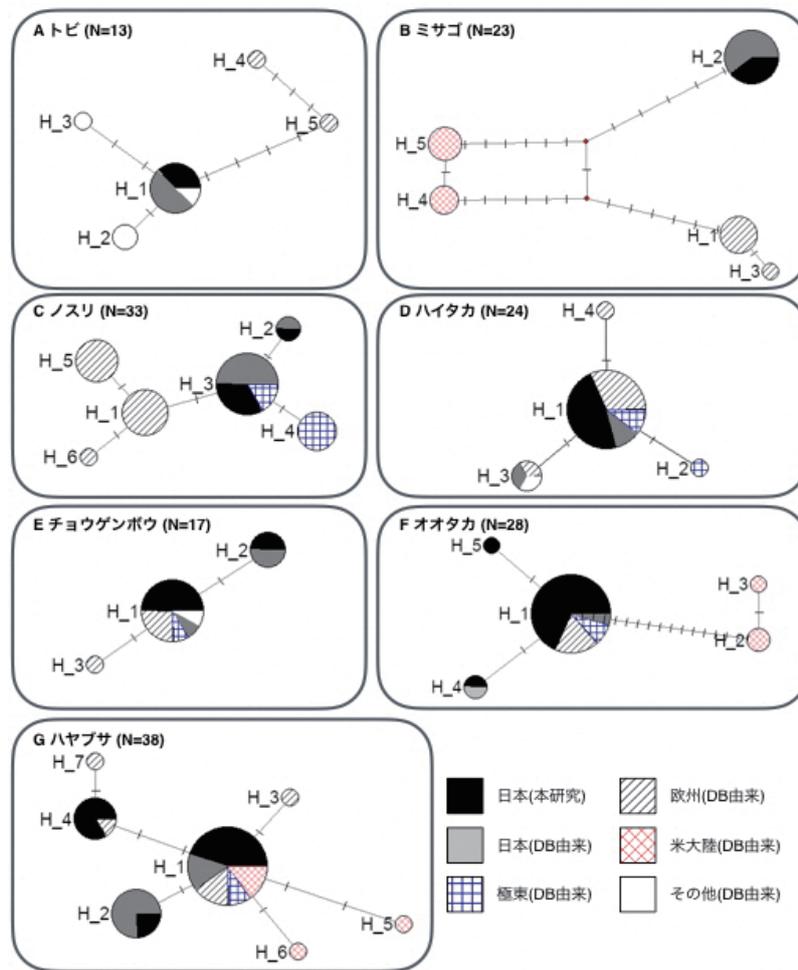


図2. DNAバーコード領域の塩基配列を用いて作成したハプロタイプネットワーク図。節における円の大きさはハプロタイプの相対頻度を表す。本研究でシーケンスした名古屋周辺のサンプル(黒)、BOLDまたはINSDデータベース(DB)由来の日本国内のサンプル(灰色)、欧州産のサンプル(斜線)、極東産のサンプル(格子)、米大陸産のサンプル(斜め格子)、その他の地域のサンプル(白)。各ハプロタイプをつなぐ線上の一区切りは、1塩基置換を表す。

Fig. 2. A haplotype network constructed using the DNA barcode sequences. The size of circles at nodes represents relative abundancy of individuals that share the haplotype. Sequences determined in this study from central Japan (black), and sequences from the BOLD or INSD databases of Japanese individuals (gray), European individuals (diagonal), far eastern individuals (lattice), North American individuals (diagonal lattice), and individuals from the other regions (white). Punctuations on branches stand for the number of base changes.

ミサゴでは、本研究で用いた日本産個体及びデータベース由来の国内個体が一つのハプロタイプ (H_2) を共有していた (図2B)。加えて、スウェーデンやノルウェーの欧州産個体 (H_1, H_3) とカナダやアメリカ、コロンビアなどの北米・南米産個体 (H_4, H_5) との間で10塩基以上の明確な遺伝的な差異があった。

ノスリについては、日本及び極東ロシアや韓国の個体 (H_2, H_3, H_4) と欧州産個体 (H_1, H_5, H_6) でハプロタイプが明確に分かれることが示された (図2C)。また、日本産個体のハプロタイプ (H_3) から派生する形で韓国産5個体のハプロタイプ (H_4) が存在していた。ロシア産のノスリのうち、ロシア東部に位置するサハリン州産の個体は日本産個体と同じハプロタイプ (H_3) を共有し、ロシア西部に位置するカリーニングラード州産の個体は欧州産個体を中心としたハプロタイプ (H_1) を持っていた。

一方で、ハイタカやチョウゲンボウ、ハヤブサでは、種内において生息地域により遺伝的な差異が明確に示されなかった。ハイタカでは、ユーラシア大陸全域の個体が一つのハプロタイプ (H_1) を共有しており、この中に本研究でシーケンスした個体やデータベース由来の日本産個体、極東の韓国やロシア、中央ロシアから欧州のフランスやスウェーデン由来の個体などが広く含まれていた (図2D)。それ例外に少数のハプロタイプ (H_2, H_3, H_4) が存在したが、地域による強い相関は見られなかった。

チョウゲンボウでは3つのハプロタイプが見られ、極東から欧州にかけてユーラシア大陸の多くの個体と同じハプロタイプ (H_1) を共有していた (図2E)。H_1にはスウェーデンやノルウェー、イギリスなどの欧州から、中央アジアのカザフスタン、極東の韓国や日本の個体が広く含まれていた。一方で、H_3には欧州産の1個体、H_2には本研究でシーケンスした個体の一部とデータベース由来の日本産個体のみが属しており、それぞれ独立したハプロタイプも認められた。

オオタカでは、日本産個体や極東産・欧州産の個体が主要なハプロタイプ (H_1) を共有していた (図2F)。一方で、一部の日本産個体は独立したハプロタイプ (H_4, H_5) を持っていた。これらの日本産・欧州産個体が持つハプロタイプ (H_1, H_4, H_5) と、北米産

個体が持つハプロタイプ (H_2, H_3) の間には18塩基の変異があり、明確な遺伝的な差が見られた。

ハヤブサでは、最も主要なハプロタイプ (H_1) を北米 (カナダ) から欧州 (スウェーデンやノルウェー)、極東 (韓国や日本) に至る広範な地域の個体が共有していた (図2G)。その一方で、日本産個体のみが属するハプロタイプ (H_2) や、日本産個体と欧州産の1個体 (チェコスロバキア) のみが共有するハプロタイプ (H_4) も確認された。

日本を含む極東産個体、欧州産個体、米大陸産個体間で遺伝的分化指数 Φ_{ST} を計算した (表2)。ミサゴでは、極東 vs 欧州、極東 vs 米大陸、欧州 vs 米大陸のいずれの比較においても0.96を超える高い Φ_{ST} 値を示し、これらの地域間に非常に強い遺伝的分化があることを示した。トビおよびノスリでは、極東 vs 欧州の Φ_{ST} 値がそれぞれ約0.59と約0.31であった。一般に0.25以上の Φ_{ST} 値は集団間の分化の程度が非常に高いことを示すと考えられているので (Hartl and Clark, 2007)、この基準に照らせばトビおよびノスリの極東産個体と欧州産個体の間には高い遺伝的分化があると解釈できる。一方オオタカでは、極東 vs 欧州の Φ_{ST} 値がゼロ以下となりほとんど遺伝的分化がないことが示された。ただし極東 vs 米大陸、欧州 vs 米大陸の Φ_{ST} 値は0.97を超える高い値となり、非常に強い遺伝的分化の存在が示された。ハヤブサでは、極東 vs 米大陸の比較において他の比較よりも若干高い Φ_{ST} 値 (約0.12) が見られたものの、基本的には全ての地域間で遺伝的分化が乏しいことを示した。ハイタカとチョウゲンボウにおいても、極東 vs 欧州の Φ_{ST} 値は0.25以下であり、これらの地域間の強い遺伝的分化は認められなかった。ただし、チョウゲンボウにおける Φ_{ST} 値 (約0.16) は弱い遺伝的分化の存在を示唆していた。以上の結果は、前述のハプロタイプネットワークに基づく結果 (図2) と整合的であった。

制御領域塩基配列

集団解析を行うために、10個体を超える個体数を持つオオタカ (17個体) とハヤブサ (16個体) の2種について、ミトコンドリアDNA内でも比較的分子進化速度が高い制御領域の部分塩基配列を決定した。これらにBOLDまたはINSDデータベースに登録されている塩基

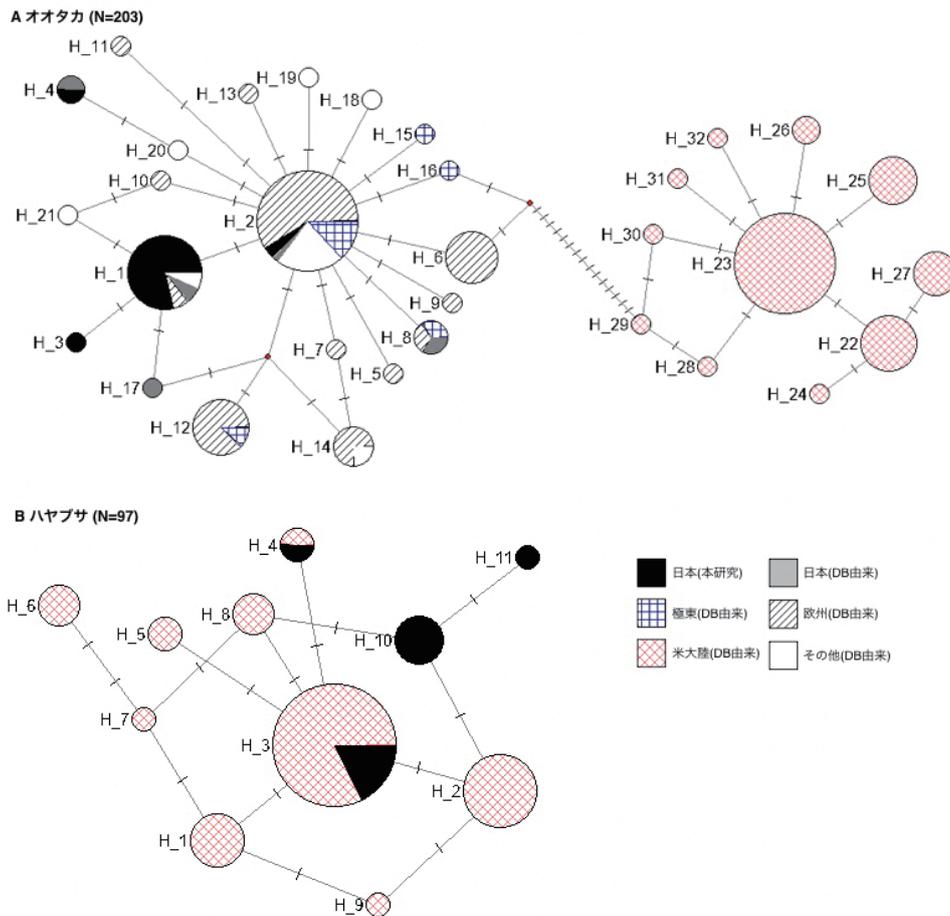


図3. 制御領域の塩基配列を用いて作成したオオタカ及びハヤブサのハプロタイプネットワーク図。節における円の大きさはハプロタイプの相対頻度を表す。本研究でシーケンスした名古屋周辺のサンプル（黒）、BOLDまたはINSDデータベース（DB）由来の日本国内のサンプル（灰色）、欧州産のサンプル（斜線）、極東産のサンプル（格子）、米大陸産のサンプル（斜め格子）、その他の地域のサンプル（白）。各ハプロタイプをつなぐ線上の一区切りは、1塩基置換を示す。

Fig. 3. A haplotype network constructed using the control region sequences of the northern goshawk (A) and the peregrine falcon (B). The size of circles at nodes represents relative abundance of individuals that share the haplotype. Sequences determined in this study from central Japan (black), and sequences from the BOLD or INSD databases of Japanese individuals (gray), European individuals (diagonal), far eastern individuals (lattice), North American individuals (diagonal lattice), and individuals from the other regions (white). Punctuations on branches stand for the number of base changes.

配列を加えて、ハプロタイプネットワーク図を作成した(図3)。

オオタカでは、本研究でシーケンスした日本産個体の多くはハプロタイプH_1を持っていたが、ハプロタイプH_1には欧州産個体や極東産個体も一部含まれていた(図3A)。しかし、欧州から極東まで含んだユーラシア大陸の主要なハプロタイプはH_2であり、日本産の主要ハプロタイプH_1とは1塩基異なっていた。一方、極東産および欧州産個体のハプロタイプと米大陸産個体の

ハプロタイプの間には大きな遺伝的差異を認めたが(図3A)、これはCO I 遺伝子を用いた解析(図2)で示された結果と同様であった。ハヤブサでは、本研究でシーケンスした日本産個体の多くが米大陸産個体と主要なハプロタイプ(H_3)を共有していた(図3B)。米大陸産個体のみが持つハプロタイプ(H_1, H_2, H_6など)がいくつか見られた一方で、日本産個体のみが有するハプロタイプ(H_10, H_11)も確認された。

制御領域を用いた遺伝的分化指数を求めたところ、オ

オオタカの極東vs米大陸, 欧州vs米大陸の Φ_{ST} 値は0.95-0.96と極めて高く, CO I 遺伝子を用いた場合と同様に非常に高い遺伝的分化を示した(表2)。しかし, オオタカの極東vs欧州の Φ_{ST} 値は約0.12となり, CO I 遺伝子を用いて得られた Φ_{ST} 値(約-0.30)よりも大きくなっていた。オオタカの制御領域においては, 極東と欧州の間で弱い遺伝的分化があることを示唆する結果であり, 前述のハプロタイプネットワーク図の観察結果と矛盾しない。ハヤブサの制御領域においては, 欧州産の配列データが利用できなかったため, 極東(日本)vs米大陸の Φ_{ST} 値(約0.02)のみが求められた(表2)。この結果は, 日本と米大陸のハヤブサの間に目立った遺伝的分化がないことを示している。

考察

ワシタカ類のDNAバーコーディング

本研究では, 名古屋圏で保護されたワシタカ類11種のCO I 遺伝子をシーケンスすることで, 名古屋周辺ワシタカ類のDNAバーコードデータベースを構築した。これら11種のDNAバーコード領域の塩基配列はすでに他の研究者によって決定され, データベースに登録されている(Saitoh et al., 2015)。ただし個々の種について配列決定された個体数はおおむね10個体未満であり, 種内の遺伝的多様性や欧州・米大陸の個体との遺伝的関係などについては, まだよく分かっていなかった。本研究ではオオタカ・ハヤブサを中心にDNAデータを追加し, DNAバーコードデータベースを充実させるとともに, 各種内の個体間の遺伝的関係についての解析を試みた。

その結果, これら11種に属する個体から得られたCO I 遺伝子配列は, 種内において単系統群を形成し(図1), この単系統群はそれぞれ固有のBarcode Index Number (BIN)に対応していた(表1)。すなわちこれら11種では, 形態的特徴に基づく種情報とDNA塩基配列に基づく種情報が極めて良い一致を示すことになり, DNAバーコーディングに基づく種同定を問題なく実施できることを示している。種内に複数のハプロタイプが見られた場合でも, それらは互いに極めて近縁であり(図1), 1-2塩基の置換によって隔たっているのみであった。このことは, データベース由来の他の国内産個体を解析に加えた場合

でも同様に見られた(図2)。

名古屋市内の淡水貝類のDNAバーコーディングを行った研究(熊澤ら, 2019)では, いくつかの種内に2%を超える大きな距離で隔たったハプロタイプの存在が示され, 淡水貝類の種境界に相当するDNA上の距離が一般的に言われる2%よりも大きい可能性が議論された。今回分析したワシタカ類では, このような状況は全く生じておらず, 種内のハプロタイプは互いに極めて近縁であった。2種類の動物でなぜこのような差が生じたのか現時点で全く不明であるが, DNA塩基配列の相違度に基づく種認識はDNAバーコーディングの根幹をなす重要な原理であるため, 相違の遺伝的背景を今後さらに探求することが望まれる。

地域間の遺伝的交流

本研究で調べた11種のワシタカ類において, 日本産の個体と海外産の個体のハプロタイプの関係において異なったパターンが見られた。まず, トビ, ミサゴ, ノスリでは, 生息地域によりCO Iハプロタイプの明確な分離が見られた。これらの種の日本産個体のハプロタイプと欧州産個体のハプロタイプの間には明確な分離が確認され(図2), そのことは遺伝的分化指数 Φ_{ST} の解析結果からも裏付けられた(表2)。ミサゴでは, 日本産個体vs米大陸産個体, 欧州産個体vs米大陸産個体の間にも明確なハプロタイプの分離が見られた(図2; 表2)。これらの種では, 日本産の個体は欧州産の個体との間で(ミサゴでは米大陸産の個体との間でも)遺伝子交流を行っていないことが示唆された。

日本産のトビは, 基本的に留鳥で海外への渡りを行わないと考えられており(表1), そのことは欧州産個体との間でのハプロタイプの明確な分離と調和的である。分類学上は日本産トビが*M. m. lineatus*亜種, 欧州産トビが*M. m. milvus*亜種とされているが, 両者を分類学上も別タクソンと考える遺伝学的根拠は十分あると考えられる。

日本産のノスリも留鳥性が強い種であるが, 一部に渡りを行う個体が確認されている(森岡ら, 1995)。しかし筆者が知る限り海外への渡りを行なった記録はない(表1)。日本産ノスリと欧州産ノスリの間で遺伝子交流が見られないとの本研究の結果は, 日本産ノスリ(*B. b.*

表2. CO I 遺伝子及び制御領域の塩基配列を用いた地域間の遺伝的分化指数 Φ_{ST}
 Table 2. Fixation index calculated using nucleotide sequences of COI gene and control region

解析領域	和名	極東 (日本) vs 欧州	極東 (日本) vs 米大陸	欧州 vs 米大陸
CO I	トビ	0.59142 (7 / 3)	-	-
	ミサゴ	0.99055* (10 / 7)	0.98028* (10 / 6)	0.96451* (7 / 6)
	ノスリ	0.31033* (19 / 13)	-	-
	ハイタカ	-0.04018 (15 / 7)	-	-
	チョウゲンボウ	0.16906 (11 / 4)	-	-
	オオタカ	-0.30168 (22 / 2)	0.98214* (22 / 3)	0.97345 (2 / 3)
	ハヤブサ	-0.01067 (27 / 5)	0.12082* (27 / 5)	-0.02329 (5 / 5)
	制御領域			
	オオタカ	0.12144* (40 / 80)	0.95069* (40 / 56)	0.95707* (80 / 56)
	ハヤブサ	-	0.02371 (18 / 79)	-

*: 有意差検定 ($p < 0.05$)
 (/): 各地域のサンプル数

japonicus 亜種) を欧州産ノスリ (*B. b. buteo* 亜種) と別種であるとする近年の分類学的位置付け (Lerner et al., 2008; Gill and Donsker, 2019) と調和的である。ロシア東部サハリン州産のノスリ2個体は日本産個体と同じハプロタイプ (H_3) を持っていたが、韓国産の5個体はこれとは1塩基異なる別のハプロタイプ (H_4) を持っていた (図2C)。まだ個体数が少ないので明確な結論は導けないが、日本産と韓国産のノスリの間にも部分的に遺伝的隔離が存在する可能性を示唆するデータと思われる。サハリン (旧樺太) は北海道から宗谷海峡を隔ててすぐ北に位置する島であり、地理的には日本列島と同一区分と解釈できる。

ミサゴでは、データベースの個体も含めて日本産個体が単一のハプロタイプ (H_2) を共有していたが、米大陸産個体 (H_4, H_5) や欧州産個体 (H_1, H_3) と遺伝的に大きな隔たりが存在した (図2B)。この結果は、ミサゴには大陸間をまたいだ遺伝子流動が見られないことを明確に示している。遺伝的分化指数 Φ_{ST} の結果もそれを支持した (表2)。ミサゴは古くから日本に生息しており、魚類を中心に爬虫類や貝類なども食べ幅広い食性を持ち環境適応力は高い。日本産ミサゴは基本的に留鳥であるが、北日本で繁殖した個体は冬季に渡りを行う

ことも知られている (森岡ら, 1995)。ただしどこで越冬するかはよく解明されていない。長距離の渡りを行っていないために、日本/欧州/米大陸といった広い範囲の比較においては、明確な遺伝的分化を示したと考えられる。現在の分類では日本を含めたユーラシア大陸全域のミサゴを一つの亜種 *P. h. haliaetus* としているが、欧州と極東では遺伝的な流動が途絶えており、それぞれを別タクソンと考える方がよいと思われる。

オオタカにおいては、CO I 遺伝子及び制御領域を用いた解析のどちらにおいても、米大陸産個体とユーラシア大陸産個体との間で明確な遺伝的差異が示された (図2F; 図3A; 表2)。ユーラシア大陸内の欧州産個体と極東産個体の間での遺伝的な分化はCO I 遺伝子を用いた場合は全く検出されなかったが (図2F; 表2)、制御領域を用いた場合に弱い遺伝的分化が検出された (Φ_{ST} 約0.12; 表2)。制御領域を用いたハプロタイプネットワーク (図3A) では、主に欧州の個体からなる主要なハプロタイプ (H_2, H_6, H_12) がある一方で、主に日本産個体からなる主要ハプロタイプ (H_1) があることが示されており、H_1とH_2は1塩基置換でつながっている。このためCO I 遺伝子領域では検出できなかったような欧州vs極東でのわずかな遺伝的分化を制御領

域で検出できた可能性が高い。オオタカにおける日本、欧州、米大陸間のハプロタイプネットワーク図は先行研究(河原ら2008; Kunz et al. 2019)でも報告されているが、本研究で得られた結果と整合的である。日本国内のオオタカの一部は留鳥であるが、越冬のため渡りを行うものも知られている(森岡ら, 1995)。また日本と韓国の間をオオタカが移動したとする報告もある(山田, 1998; 信州ワシタカ類渡り調査研究グループ, 2003)。おそらく米大陸までの長距離の移動は不可能であるが、ユーラシア大陸内で短距離の渡りを繰り返す過程で、極東の個体と欧州の個体間で低頻度ながら遺伝的交流が維持されてきたのかもしれない。

一方、前述の4種と異なりハイタカ、チョウゲンボウ、ハヤブサでは地域間での明確な遺伝的分化を検出できなかった(図2; 図3B; 表2)。日本のハイタカは、オオタカと同様に留鳥であるが、越冬のため渡りを行うものもあり、韓国との間での移動個体の存在も報告されている(森岡ら, 1995; 山田, 1998; 信州ワシタカ類渡り調査研究グループ, 2003)。ハイタカは極東地域から欧州に至るまでユーラシア大陸の広域に分布していることから、渡りを行う一部の個体が遺伝子流動を引き起こしていると考えられる。

日本産のチョウゲンボウには留鳥と渡り鳥の両方が含まれるが(森岡ら, 1995)、筆者が知る限り海外への渡りの確かな証拠は得られていない(表1)。一部の日本産個体が持つCO I 遺伝子は、日本独自のハプロタイプ(H₂)であったものの、欧州産個体でも同様の独自のハプロタイプ(H₃)が見られており、その他の多くの日本産個体は韓国、中央アジア、欧州等の個体と主要なハプロタイプ(H₁)を共有していた。従って、日本産チョウゲンボウの少なくとも一部は、海外産のチョウゲンボウと一定レベルの遺伝的交流を行ってきたと解釈せざるを得ない。その仕組みがどのようなものであったのか興味深く、関連する今後の研究が待たれる。

ハヤブサにおいては、ハプロタイプネットワーク(図2G; 図3B)の一部に、日本産個体のみからなるハプロタイプが少数見られたものの、大部分の日本産個体は米大陸産の個体と(CO I 遺伝子では欧州産の個体とも)主要ハプロタイプを共有しており、地域間での遺伝的分化を示す Φ_{ST} 値も低かった(表2)。従ってハヤブサは、

極東/欧州/米大陸といった地域間において基本的に遺伝子流動を維持してきたものと考えられる。日本で繁殖するハヤブサは基本的に留鳥であるが、越冬のため日本に南下する個体もあることが分かっている(森岡ら, 1995)。ハヤブサは他のワシタカ類に比べてより長距離の渡りを行う能力を持つことが知られている(Dixon et al., 2012)。この高い渡りの能力が地域間での遺伝子流動の要因となったものと思われる。

世界のハヤブサ(*Falco peregrinus*)は19亜種に分けられており、日本産ハヤブサは*F. p. japonensis*に該当する(日本鳥学会, 2012)。北米産ハヤブサの多くはアメリカハヤブサ(*F. p. anatum*)であるが、高緯度地方にはツンドラハヤブサ(*F. p. tundrius*)が分布し、カナダ西海岸からアラスカ、アリューシャン列島にかけての沿岸域にはオオハヤブサ(*F. p. pealei*)が分布するとされている。今回の解析で用いられた北米産のハヤブサ個体がどの亜種に該当するか詳細は不明であるが、日本産ハヤブサと遺伝子交流を最も起こしやすいのはオオハヤブサであると考えられる。欧州に分布するハヤブサにも*F. p. peregrinus*や*F. p. brookei*などの亜種名が与えられているが、CO I 遺伝子を解析した欧州個体がどの亜種に属するかも同様に不明である。ただし*F. p. peregrinus*亜種は、欧州から中央アジア・シベリアにかけて広く広がっているため、この亜種を通して日本産の亜種との遺伝子交流が行われてきた可能性が高いと考えられる。

遺伝的多様性

種内の遺伝的多様性を調べるためには、通常多数の個体についてDNAデータを解析する必要がある。本研究では11種のワシタカ類についてDNAデータを取得したが、このうち本研究でシーケンスした個体数、あるいはデータベース由来の国産個体を加えた個体数が最低10個体以上ある種(オオタカ、ハヤブサ、チョウゲンボウ)について、遺伝的多様性の指標を求めた(表3)。米大陸産の個体に関するデータもある場合には、国産個体とともに記した。

まず、本研究でシーケンスした名古屋周辺の個体の解析結果と、それにデータベース由来の国産個体を加えて行った解析結果には大きな違いが見られなかった。従っ

表3. CO I 遺伝子及び制御領域の塩基配列を用いた集団遺伝学的解析
Table 3. Population genetic analyses using nucleotide sequences of COI gene and control region

解析領域	和名	地理区分	サンプル数	H	<i>h</i>	π	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F_S</i>
CO I								
	オオタカ	日本 (本研究)	17	3	0.228	0.00034	-1.50	-1.68
		日本 (本研究+DB)	22	3	0.255	0.00039	-1.18	-1.31
	ハヤブサ	日本 (本研究)	16	3	0.608	0.00166	0.79	1.31
		日本 (本研究+DB)	25	3	0.653	0.00178	1.02	1.74
	チョウゲンボウ	日本 (本研究)	8	2	0.429	0.00062	0.33	0.54
		日本 (本研究+DB)	11	2	0.509	0.00079	1.19	1.02
制御領域								
	オオタカ	日本 (本研究)	17	4	0.551	0.00148	-1.01	-0.70
		日本 (本研究+DB)	23	7	0.696	0.00239	-1.33	-1.26
	ハヤブサ	北米 (DB)	48	8	0.707	0.00193	-0.84	-2.75
		日本 (本研究)	16	5	0.767	0.00238	0.87	-0.34
		北米 (DB)	79	9	0.535	0.00153	-0.69	-4.09

Tajima's *D* 及び Fu's *F_S* は全ての解析で $p > 0.1$ を示した
H: ハプロタイプ数, *h*: ハプロタイプ多様度, π : 塩基多様度
 $p > 0.1$ for all values of Tajima's *D* and Fu's *F_S*
H: number of haplotype, *h*: haplotype diversity, π : nucleotide diversity

て以下は、全ての国産個体を用いて解析した結果を用いて議論する。ハヤブサとチョウゲンボウの国産個体では、CO I 遺伝子のハプロタイプ多様度 *h* がいずれも 0.5 を上回る値を示したが、オオタカの国産個体のハプロタイプ多様度は 0.255 と小さめの値を示した。塩基多様度 π においても、オオタカ国産個体の値 (0.00039) が最も低く、ハヤブサ国産個体の値 (0.00178) よりも 1桁低くなっていた。従ってこれら3種の中では、オオタカの遺伝的多様性が比較的低くなっていることが示唆された。

日本国内のオオタカは、生息地の開発などによって数が激減し、一時国内の生息数が300-480個体程度まで減ったと考えられている (日本野鳥の会研究部, 1984)。そのため希少野生動物種に指定されて保護されたが、近年その生息数を急速に回復し、希少野生動物種の指定が解除された。すなわちボトルネック現象を経てから個体数の急速な回復が起きたと考えられる。0.5 よりも小さいハプロタイプ多様度と 0.005 よりも小さい塩基多様度は、集団が最近にボトルネック現象を経験したときに典型的に見られるパターンである (Grant and Bowen 1998)。Tajima's *D*, Fu's *F_S* の値はともに負値となり、統計的に有意な結論ではないものの、集団が拡大傾向にあることを支持した。制御領域の塩基配列はCO I 遺伝子領域よりも進化速度が速いため、ハプロタイプ多様度や塩基多様度の値は、CO I 遺伝子を用いて得られた値

より大きくなる傾向がある (表3)。日本産オオタカの制御領域におけるハプロタイプ多様度 (0.696) と塩基多様度 (0.00239) は、先行研究 (Asai et al., 2008) で得られた値と類似していた。制御領域を用いた場合でも、Tajima's *D*, Fu's *F_S* の値はともに負値であった。制御領域については、北米産オオタカ個体のデータも得られたが、やはり Tajima's *D*, Fu's *F_S* の値は負値であった。北米産のオオタカは、20世紀中頃に降に森林伐採などにより深刻な影響を受けており (McClaren et al., 2015)、そのことが背景にあるのかもしれない。

ハヤブサは世界的に個体数が減少している絶滅危惧種であり、各地で保護活動が行われている。日本産ハヤブサのCO I 遺伝子領域のハプロタイプ多様度は0.653、塩基多様度は0.00178となった (表3)。Grant and Bowen (1998) の基準に照らせば、これらの値は集団がボトルネック現象を経た後に急激に個体数を増加させた時に典型的に見られるパターンである。しかし正のTajima's *D* の値 (1.02) は集団が減少傾向にあることを示唆するので、逆の結論を支持する。残念ながら本研究で求めたTajima's *D* およびFu's *F_S* の値はいずれも統計的に有意でなく、集団の拡大縮小を定量的に議論することは難しいと思われる。

ワシタカ類は野外調査において容易にサンプリングすることができないため、その遺伝的多様性は必ずしも十

分に解明されていない。今回の研究では、日本ワシタカ研究センターが長年の活動を通して蓄積したサンプルを活用して研究を進めたが、計画的に行われたサンプリングによる標本ではないため、解析にも一定の制約があった。例えば成鳥の場合、どこで生まれどのような渡りを経た個体なのかは不明である。また解析する個体数を追加することも直ちに困難である。このような制約はあるにせよ、本研究で得られた知見やデータは今後のワシタカ類の保全に有用であると考え、とりわけ海外産の個体との間での遺伝的分化に関する知見は、それぞれの種の保全単位を考える上で参考データを提供するものと考えられる。

謝辞

日本ワシタカ研究センターの中島 知也氏及び中島 智佳子氏には、ワシタカ類標本の収集及びDNA解析の一部において多大なご協力を賜り厚く御礼申し上げます。集団遺伝解析のご助言を頂いた布目 三夫博士、Wahyu Endra Kusuma博士、藤谷 武史氏に深く感謝申し上げます。本研究は、平成30年度名古屋市立大学特別研究奨励費（地域貢献型共同研究等推進事業No.17）による助成のもと、名古屋市立大学共用機器センターのDNAシーケンサー（3500 Genetic Analyzer）を用いて行った。

引用文献

- 愛知県環境部. 2015. レッドリストあいち2015, 愛知県.
- Asai, S., D. Akoshima, Y. Yamamoto, Y. Shigeta, M. Matsue, and H. Momose. 2008. Current status of the northern goshawk *Accipiter gentilis* in Japan based on mitochondrial DNA. *Ornithological Science*, 7: 143-156.
- Bandelt H.J., P. Forster, and A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Dixon, A., A. Sokolov, and V. Sokolov. 2012. The subspecies and migration of breeding Peregrines in northern Eurasia. *Falco*, 39: 4-9.
- Excoffier, L., and H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.
- Gill, F., and D. Donsker. 2019. IOC World Bird List (v9.2) doi: 10.14344/IOC.ML9.2.
- Grant, W.S., and B.W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89: 415-426.
- Hartl, D.L., and A.G. Clark. 2007. Principles of population genetics. 4th edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 545p.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, and J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: 313-321.
- Hebert P.D.N, M.Y. Stoeckle, T.S. Zemlak, and C.M. Francis. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2: e312.
- IUCN. 2019. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-2, International Union for Conservation of Nature, Gland, Switzerland.
- 河原孝行・高木義栄・北村尚士・工藤琢磨. 2008. オオタカの遺伝的多様性. 尾崎研一・遠藤孝一（編）オオタカの生態と保全—その個体群保全にむけて. 日本森林技術協会. pp. 48-56.
- 環境省. 2019. レッドリスト2019, 環境省.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- Kunz, F., A. Gamauf, F.E. Zachos, and E. Haring. 2019. Mitochondrial phylogenetics of the goshawk *Accipiter [gentilis]* superspecies. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 57: 942-958.
- 熊澤慶伯・松原美恵子・横山悠理・寺本匡寛・村瀬幸雄・那須健一郎・孫 垚・森山昭彦・川瀬基弘. 2019. 名古屋市産淡水貝類のDNAバーコーディング. *なごやの生物多様性*, 6: 1-14.
- Lerner, H.R.L., M.C. Klaver, and D.P. Mindell. 2008.

- Molecular phylogenetics of the buteonine birds of prey (Accipitridae). *The Auk*, 125: 304-315.
- Masuda, R., M. Noro, N. Kurose, C. Nishida-Umehara, H. Takechi, T. Yamazaki, M. Kosuge, and M.C. Yoshida. 1998. Genetic characteristics of endangered Japanese golden eagles (*Aquila chrysaetos japonica*) based on mitochondrial DNA D-loop sequences and karyotypes. *Zoo Biology*, 17: 111-121.
- McClaren, E., T. Mahon, F.I. Doyle, and W.L. Harrower. 2015. Science-based guidelines for managing Northern Goshawk breeding areas in coastal British Columbia. *Journal of Ecosystems and Management*, 15: 1-91.
- McClure, C.J.W., J.R.S. Westrip, J.A. Johnson, S.E. Schulwitz, M.Z. Virani, R. Davies, A. Symes, H. Wheatley, R. Thorstrom, A. Amar, R. Buij, V.R. Jones, N.P. Williams, E.R. Buechley, and S.H.M. Butchart. 2018. State of the world's raptors: distributions, threats, and conservation recommendations. *Biological Conservation*, 227: 390-402.
- 森岡照明・叶内拓哉・川田 隆・山形則男. 1995. 図鑑日本のワシタカ類. 文一総合出版, 東京.
- 名古屋市. 2015. 名古屋市版レッドリスト2015, 名古屋市.
- 名古屋市. 2016. 名古屋市野鳥生息状況調査報告 名古屋の野鳥2014. 名古屋市緑政土木局都市農業課, 名古屋.
- Nebel, C., A. Gamauf, E. Haring, G. Segelbacher, A. Villers, and F.E. Zachos. 2015. Mitochondrial DNA analysis reveals Holarctic homogeneity and a distinct Mediterranean lineage in the Golden eagle (*Aquila chrysaetos*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 116: 328-340.
- 日本鳥学会. 2012. 日本鳥類目録改訂第7版. 日本鳥学会, 三田.
- 日本野鳥の会研究部. 1984. クマタカ・オオタカ・ハヤブサの生息状況に関するアンケート調査. 特殊鳥類調査, 環境庁. pp. 21-27.
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J.C. Sánchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S.E. Ramos-Onsins, and A. Sánchez-Gracia. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 34: 3299-3302.
- Saitoh, T., N. Sugita, S. Someya, Y. Iwami, S. Kobayashi, H. Kamigaichi, A. Higuchi, S. Asai, Y. Yamamoto, and I. Nishiumi. 2015. DNA barcoding reveals 24 distinct lineages as cryptic bird species candidates in and around the Japanese Archipelago. *Molecular Ecology Resources*, 15: 177-186.
- 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.
- Sonsthagen, S.A., S.L. Talbot, and C.M. White. 2004. Gene flow and genetic characterization of northern goshawks breeding in Utah. *The Condor*, 106: 826-836.
- Talbot, S.L., A.G. Palmer, G.K. Sage, S.A. Sonsthagen, T. Swem, D.J. Brimm, and C.M. White. 2011. Lack of genetic polymorphism among peregrine falcons *Falco peregrinus* of Fiji. *Journal of Avian Biology*, 42: 415-428.
- Wink, M. 2018. Phylogeny of Falconidae and phylogeography of peregrine falcons. *Ornis Hungarica* 26: 27-37.
- Wink, M., and H. Sauer-Gürth. 2004. Phylogenetic relationships in diurnal raptors based on nucleotide sequences of mitochondrial and nuclear marker genes. in Chancellor, R.D., and B.-U. Meyburg (eds) *Raptors Worldwide*, WWGBP, Berlin pp. 483-498.
- 山田一太. 1998. 春期のハイタカ属の渡り日韓ルート 1998. *Birder*, 12: 38-43.