

氏名(本籍)	村田倫子(北海道)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第138号
学位授与年月日	平成26年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	DNA解析ならびに核型分析によるケープペンギンの 多様性と特徴付けに関する研究
論文審査委員	(主査) 村上 賢 (副査) 田中 和明 落合 秀治

論文内容の要旨

ペンギンは鳥綱ペンギン目ペンギン科に属する海鳥で、6属18種が知られている。そのうち国内には、コウテイペンギン属、アデリーペンギン属、コガタペンギン属、フンボルトペンギン属、マカロニペンギン属の5属11種が飼育されている。南アフリカ沿岸海域に生息するフンボルトペンギン属のケープペンギン (*Spheniscus demersus*) は、野生下で個体数が特に激減しており、国際自然保護連合 (IUCN) のレッドリストにおいて絶滅危惧IB類に指定されている。一方で、日本はペンギンの飼育・繁殖に関して高い技術を持ち、中でもケープペンギンの国内飼育数は年々増加している。今後も長期的に個体数を維持し、飼育を続けていく上で、近親交配を避け、血縁関係を最小とする遺伝的管理が必要である。しかし、野生から導入された日本の飼育個体群のファウンダーの起源は不明である。また、これまでに野生のケープペンギンの遺伝的データは報告されていない。

そこで本研究ではまず、ミトコンドリア由来のDNA (mtDNA)、核ゲノム由来のマイクロサテライトDNAマーカーを用いて国内飼育ケープペンギンの系統関係や遺伝的多様性を調べた(第1,2章)。続いて、ペンギン科におけるケープペンギンの分子系統的な位置付けを明らかにするため、ケープペンギンに特異的なDNAマーカーを探索した(第3章)。また、これまで詳細が報告されていないケープペンギンの核型分析を行い染色体レベルでの特徴も調べた(第4章)。

【第1章】国内飼育されているケープペンギンのmtDNA多型解析

ケープペンギンは1935年に初めて国内に導入されて以来、2011年には87ファウンダーの485羽が飼育されている。本研究ではそのうち全国の動物園・水族館から提供された62ファウンダーの236個体のサンプルを用い、1) mtDNAのコントロール領域および2) チトクロームb領域の塩基配列を分析し、多型解析を行った。

1) コントロール領域の解析

mtDNA コントロール領域の 433 塩基対 (bp) を決定した結果、39 箇所にも多型部位が観察され、これらの変異に基づき 30 ハプロタイプに分けられた。NJ 法による系統樹では、cladeA と B の大きく 2 つに分けられ、特に cladeB は 94% と高い bootstrap 値で支持された。30 ハプロタイプのうち cladeA には 26 ハプロタイプ、cladeB には 4 ハプロタイプが含まれた。cladeA 内の遺伝距離は 0.9%、B 内は 1.2% だったのに対し、2 つの clade 間の遺伝距離は 3.4% であった。野生のイワトビペンギン属の種間の遺伝距離は 6.1%、コガタペンギンの亜種間では 1.0% であることを考慮すると、今回得られた国内ケープペンギンの 2 つのグループ (cladeA と B) は、野生のケープペンギンの生息地域差、またはこれまで知られていない亜種による違いを反映しているのかもしれない。

2) チトクローム b 領域の解析

チトクローム b 遺伝子領域 1140bp では 11 箇所の多型部位が観察され、8 ハプロタイプに分けられた。これらのハプロタイプを用いた NJ 法による系統樹では、コントロール領域の解析結果と一致して cladeA (6 ハプロタイプ) と B (2 ハプロタイプ) の 2 つのグループに分けられた。

このようにコントロール領域および遺伝子領域であるチトクローム b 領域の多型解析から、国内ケープペンギンには少なくとも大きく 2 つの異なる母系系統が存在することが明らかになった。

【第 2 章】国内飼育されているケープペンギンのマイクロサテライト DNA マーカーを用いた集団解析

フンボルトペンギン用の既知の 3 座位 (Sh1Ca12、Sh1Ca16、Sh2Ca21)、ケープペンギン用の既知の 5 座位 (PNN01、PNN03、PNN06、PNN09、PNN12) の計 8 座位のマイクロサテライト DNA マーカーを用いて、国内飼育されている 58 ファウンダー由来の 178 羽のケープペンギンの集団解析を行なった。Cervus ver3.0 を用いて、ヘテロ接合体率の期待値 (H_e) と観察値 (H_o)、ハーディ・ワインベルグ (HWE) 平衡からの逸脱の有無を算出し、GENEPOP 4.2 を用いて、各座位間の連鎖不平衡の有無について検討した。その結果、HWE 平衡からの逸脱や連鎖不平衡は見られず、これら DNA マーカーの有用性が示された。 H_e は 0.45~0.72 (平均 0.60)、 H_o は 0.45~0.71 (平均 0.62) であった。調べたマーカーは異なるものの、ケープペンギンと同様に絶滅危惧種である野生のキガシラペンギンの H_o 値が 0.30~0.45 であることを考えると、本研究のケープペンギンの遺伝的多様性は低くないと考えられた。今後はケープペンギンの野生個体群との比較が必要である。コンピュータープログラム STRUCTURE2.3.4 を用いて個体の遺伝子型情報から分集団数を推定した結果、国内飼育のケープペンギンは大きく 3 つの祖先集団に由来することがわかった。今後多様性を維持するために、同じ祖先集団に由来する個体同士のみで繁殖に供しないなどの配慮が必要であると考えられた。

【第 3 章】ケープペンギンに特異的な DNA 配列の探索

ケープペンギンに特異的な DNA 配列を探索するために、以下の 4 つの手法を用いた。

1) 制限酵素切断によるサテライト DNA の検出法

ケーブペンギンゲノム DNA を 87 種類の制限酵素で処理し、そのうち BmeT110 I 処理により得られた唯一のサテライトバンドである 190bp の DNA 配列を決定した。決定配列を基に新規にプライマーを設定し、PCR を行った。結果、ケーブペンギンに特異的な配列ではなく、ペンギン科のペンギンに共通した配列であることがわかった。次に、この配列の各ペンギンのゲノム中における存在様式をサザンハイブリダイゼーションで調べたところ、ケーブペンギンは、同じフンボルトペンギン属であるフンボルトペンギンやマゼランペンギンとは同じ存在パターンを示したが、アデリーペンギン属やコウテイペンギン属のペンギンとは異なる DNA パターンであった。

2) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) -PCR 法

10~13 塩基からなる任意の配列をプライマーとする RAPD-PCR 法を行ない、ケーブペンギンに特徴的と思われる約 780bp のバンドを得た。この配列をクローニングし DNA 配列を決定した (776bp)。この配列の存在を PCR で調べたところ、ペンギン科に共通する DNA 配列であることがわかった。

3) Mini/Microsatellite-Associated Sequence Amplification (MASA) 法

ミニおよびマイクロサテライト DNA のコア配列をプライマーとする MASA 法を行ない、ケーブペンギンに特徴的と思われる約 550bp のバンドを得た。このバンドをクローニングし DNA 配列を決定した (540bp)。この配列の存在を PCR で調べたところ、ケーブペンギンを含むフンボルトペンギン属とマカロニペンギン属のペンギンにおいて目的のバンドが得られた。一方で、その他の属のペンギンでもバンドは得られたが、目的のサイズとは異なっていた。

4) Representational Difference Analysis (RDA) 法

2 種類のゲノム DNA の一部を PCR 増幅し、それらの増幅産物 (アンプリコン) をハイブリダイゼーション法を用いて引き算し、差異を検出する RDA 法を行なった。ケーブペンギンのアンプリコンから同属異種であるフンボルトペンギンのアンプリコンを相互に引き算した場合、特異的な配列は得られなかった。そこで、ケーブペンギンとは属の異なるジェンツーペンギンのアンプリコンと引き算したところ、380bp の DNA 断片を得た。この DNA 断片の存在を PCR で調べたところ、この配列はケーブペンギン DNA だけでなくフンボルトペンギン (フンボルトペンギン属)、さらにはマカロニペンギン属にも共通する配列であった。

上記の 4 種類の方法を用いてケーブペンギンの DNA の特徴付けを試みた結果、ケーブペンギンにのみ特異的な DNA 断片は得ることができなかったが、ケーブペンギンを含むフンボルトペンギン属とマカロニペンギン属の 2 属にのみ共通の 2 種類の DNA 断片が得られた。これは、フンボルトペンギン属内のケーブペンギン、マゼランペンギン、フンボルトペンギンはそれぞれゲノム上ではあまり違いがないことを反映しているのかもしれない。

【第 4 章】ケーブペンギンの核型分析

ケーブペンギンの白血球を培養し、空気乾燥法により染色体中期標本を作製した。得られた染色体像をギムザ染色及び蛍光染色し、核型分析を行なった。30 個の染色体中期標本を観察し、ケーブペン

ギンの染色体は、少なくとも明確な 7 対のマクロ染色体と 1 対の性染色体があり、さらに 30 対のマクロ染色体を含んだ計 76 本 ($2n=76$) であると推定された。ケープペンギンと同属のマゼランペンギンの染色体数は 68 本、フンボルトペンギンは 78 本と報告されており、今回のケープペンギンとは異なっていた。マクロ染色体は 7 対で一致していることから、フンボルトペンギン属内のペンギンによる染色体数の違いはマイクロ染色体の数の違いによると考えられた。

以上、本研究による国内ケープペンギンの一連の DNA 分析を通して、mtDNA 多型解析では 2 つの母系系統、マイクロサテライト DNA マーカーを用いた集団解析では 3 つの祖先集団に由来することが明らかとなり、国内のケープペンギンは遺伝的に複数の起源をもち、多様性があることが示された。本研究で得られたデータは、今後のケープペンギンの遺伝的管理に向けた基礎的データとなり得るであろう。ケープペンギンに特異的な DNA 配列の探索では、ケープペンギンにのみ特異的な DNA 断片の存在を確認することはできなかった。一方でフンボルトペンギン属に共通する DNA 断片は検出され、フンボルトペンギン属内のペンギンのゲノム DNA には大きな違いがない可能性が考えられた。また、ケープペンギンの核型分析では $2n=76$ であると推定され、染色体レベルでの特徴が初めて示された。

論文審査の結果の要旨

ペンギンは鳥綱ペンギン目ペンギン科に属する海鳥で、6 属 18 種が知られている。そのうち国内には、コウテイペンギン属、アデリーペンギン属、コガタペンギン属、フンボルトペンギン属、マカロニペンギン属の 5 属 11 種が飼育されている。南アフリカ沿岸海域に生息するフンボルトペンギン属のケープペンギン (*Spheniscus demersus*) は、野生下で個体数が特に激減しており、国際自然保護連合 (IUCN) のレッドリストにおいて絶滅危惧 IB 類に指定されている。一方で、日本はペンギンの飼育・繁殖に関して高い技術を持ち、中でもケープペンギンの国内飼育数は年々増加している。今後も長期的に個体数を維持し、飼育を続けていく上で、近親交配を避け、血縁関係を最小とする遺伝的管理が必要である。しかし、野生から導入された日本の飼育個体群のファウンダーの起源は不明であり、また野生のケープペンギンの遺伝的データに関する報告もない。

本研究では国内で飼育されているケープペンギンを対象として、ミトコンドリア由来の DNA (mtDNA) と核ゲノム由来のマイクロサテライト DNA マーカーを用いて母系系統や遺伝的多様性を調べた。また、各種 DNA 分析手法を用いてケープペンギンに特徴的な DNA マーカーの探索も行った。さらに、これまで詳細が報告されていないケープペンギンの核型分析を行った。これらを通してケープペンギンを DNA や染色体レベルで特徴付けした。本論文は、4 章から構成されており、各章の成績は以下のように要約できる。

【第 1 章】国内飼育されているケープペンギンの mtDNA 多型解析

ケープペンギンは国内で 87 ファウンダーの 485 羽が飼育されており (2011 年現在)、そのうちの

62 ファウンダーの 236 個体のサンプルを用い、mtDNA のコントロール領域及びチトクローム b 領域の塩基配列を解析した。

mtDNA コントロール領域の 433 塩基対 (bp) の配列を解析した結果、39 箇所に多型部位を見つけ、これらの変異に基づき 30 ハプロタイプに分けた。NJ 法による系統樹の作成から、これらのハプロタイプは大きく 2 つのグループに分けられることを示した。これら 2 つのグループ間の遺伝距離 (3.4%) から、国内のケープペンギンの 2 つのグループは、野生のケープペンギンの生息地域差、またはこれまで知られていない亜種による違いを反映している可能性を示唆した。また、チトクローム b 遺伝子全領域 (1140bp) の配列解析からも大きく 2 つのグループに分けられることを支持した。このように、mtDNA の多型解析から、国内のケープペンギンには少なくとも大きく 2 つの異なる母系系統が存在することが明らかとなった。

【第 2 章】国内飼育されているケープペンギンのマイクロサテライト DNA マーカーを用いた集団解析

フンボルトペンギン属で用いられている既知の 8 座位のマイクロサテライト DNA マーカーを用いて、国内飼育されている 58 ファウンダー、178 羽のケープペンギンの集団解析を行なった。その結果、ハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱や連鎖不平衡は見られず、これら DNA マーカーの有用性を確認した。ヘテロ接合体率の期待値と観察値の平均値はそれぞれ、0.60 と 0.62 であり、絶滅危惧種である野生のキガシラペンギンの値と比較して、ケープペンギンの遺伝的多様性は低くないと考えられた。また、STRUCTURE2.3.4 プログラムを用いた集団解析から、国内飼育のケープペンギンは大きく 3 つの祖先集団に由来することがわかった。

【第 3 章】ケープペンギンに特異的な DNA 配列の探索

以下の 4 つの手法を用いて特徴的な DNA 断片を探索した。

1) 制限酵素切断によるサテライト DNA の検出法

ケープペンギンゲノム DNA を 87 種類の制限酵素で処理し、そのうち BmeT110 I 処理により得られた唯一のサテライトバンドである 190bp の DNA 配列を決定した。この DNA 断片は、PCR から、ケープペンギンに特異的な配列というより、ペンギン科のペンギンに共通した断片であることがわかった。また、サザンハイブリダイゼーション法により、この DNA 断片の各ペンギンのゲノム中における存在様式を調べ、ケープペンギンは、同じフンボルトペンギン属であるフンボルトペンギンやマゼランペンギンと同じ存在パターンを示す特徴があり、アデリーペンギン属やコウテイペンギン属のペンギンとは異なる DNA パターンであった。

2) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR 法

RAPD-PCR により、ケープペンギンに特徴的と思われる約 780bp のバンドを得た。この DNA 断片の存在を PCR で調べたところ、ペンギン科に共通する DNA 配列であった。

3) Mini/Microsatellite-Associated Sequence Amplification (MASA)法

ミニおよびマイクロサテライト DNA のコア配列をプライマーとする MASA 法を行ない、ケーブペンギンに特徴的と思われる約 550bp のバンドを得た。この DNA 断片は、PCR から、ケーブペンギンを含むフンボルトペンギン属とマカロニペンギン属のペンギンに共通して存在しているものであった。一方で、その他の属のペンギンでもバンドは得られたが、目的のサイズとは異なっていた。

4) Representational Difference Analysis (RDA) 法

2 種類のゲノム DNA の一部を PCR 増幅した増幅産物（アンプリコン）からハイブリダイゼーション法を用いて引き算し、差異を検出する RDA 法を行なった。ケーブペンギンのアンプリコンから同属異種であるフンボルトペンギンのアンプリコンを相互に引き算した場合、特異的な配列は得られなかったが、ケーブペンギンとは属の異なるジェンツーペンギンのアンプリコンと引き算したところ、380bp の DNA 断片を得た。この DNA 断片の存在を PCR で調べたところ、この配列はケーブペンギン DNA だけでなくフンボルトペンギン属、さらにはマカロニペンギン属にも共通する配列であった。

上記 4 種類の方法を用いてケーブペンギンの DNA の特徴付けを試みた結果、ケーブペンギンにのみ特異的な DNA 断片は得ることができなかったが、ケーブペンギンを含むフンボルトペンギン属とマカロニペンギン属の 2 属にのみ共通の 2 種類の DNA 断片が得られた。これは、フンボルトペンギン属内のケーブペンギン、マゼランペンギン、フンボルトペンギンはそれぞれゲノム上ではあまり違いがないのかもしれないと考察している。

【第 4 章】ケーブペンギンの核型分析

ケーブペンギンの白血球を培養し、染色体中期標本を作製し、核型分析を行なった。30 個の染色体中期標本を観察し、ケーブペンギンの染色体は、少なくとも明確な 7 対のマクロ染色体と 1 対の性染色体があり、さらに 30 対のマイクロ染色体を含んだ計 76 本 ($2n=76$) であることを初めて示した。これは、同属のマゼランペンギンやフンボルトペンギンの染色体数とは異なっており、その違いはマイクロ染色体数の違いによることも示した。

以上、本研究による国内ケーブペンギンの一連の DNA 分析を通して、mtDNA 多型解析では 2 つの母系系統、マイクロサテライト DNA マーカーを用いた集団解析では 3 つの祖先集団に由来することが明らかとなり、国内のケーブペンギンは遺伝的に複数の起源をもち、多様性があることを示した。ケーブペンギンに特異的な DNA 配列の探索では、ケーブペンギンにのみ特異的な DNA 断片の存在を確認することはできなかった一方で、フンボルトペンギン属に共通する DNA 断片を検出し、フンボルトペンギン属内のペンギンのゲノム DNA には大きな違いがない可能性を示唆した。また、ケーブペンギンの核型分析では $2n=76$ であると推定され、染色体レベルでの特徴を初めて示した。本研究で得られた知見は、ケーブペンギンを DNA レベルで特徴付けた学術的価値があるだけでなく、今後のケーブペンギンの遺伝的管理や維持に向けた基礎的データとなり得る。獣医学上意義ある業績として評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するのにふさわしい研究と判定した。