

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

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 分子生物学研究室

DV1005 村田 倫子

## 目 次

はじめに.....	1
第 1 章 国内飼育されているケープペンギンのミトコンドリア DNA 多型解析 .....	4
図表 .....	13
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マーカーを 用いた集団解析 .....	19
図表 .....	27
第 3 章 ケープペンギンに特異的な DNA 配列の探索 .....	33
図表 .....	50
第 4 章 ケープペンギンの核型分析 .....	76
図表 .....	81
総括.....	83
謝辞 .....	89

はじめに

ペンギンは南半球に生息する海鳥であり、ペンギン目はペンギン科のみからなる。複数の核 DNA 領域における鳥類の分子系統的研究では、ペンギン目はミズナギドリ目、アビ目、コウノトリ目、ペリカン目に近縁であるとされている (Hackett *et al.*, 2008)。ペンギン科にはコウテイペンギン属、アデリーペンギン属、キガシラペンギン属、マカロニペンギン属、コガタペンギン属、フンボルトペンギン属の 6 属が含まれ、さらに 18 種に分類されている。ケープペンギンはフンボルトペンギン属に属し、アンゴラ共和国南部から南アフリカ共和国東部のネルソン・マンデラ・ベイにかけての沿岸海域に生息している (Crawford *et al.*, 2007)。20 世紀初頭には 150 万~300 万羽いるとされていた野生のケープペンギンの個体数は、2001 年には 56000 ペア、さらに 2009 年には 21000 ペアと推定されており、8 年間で 60%以上激減している (Crawford *et al.*, 2011)。個体数減少の原因として、乱獲や生息海域の環境の変化のために、餌となる魚が減少していることやタンカー座礁による重油汚染が挙げられている。IUCN のレッドリストにおいて、ケープペンギンはこれまでの絶滅危惧 II 類から、2010 年に絶滅危惧 IB 類に見直され、絶滅の危急度が高まっている。また、絶滅のおそれのある野生動物の種の国際取引に関する条約 (CITES) では附属書 II に指定され、国際商取引の一部が制限されている。

日本はペンギンの飼育・繁殖に関して高い技術を持っており、18 種のうち 11 種が国内の動物園や水族館で飼育され、ペンギンの飼育数は世界で最も多い。国内飼育されているペンギンの血統は、日本動物園水族館協会 (JAZA) による血統登録台帳で管理され、ケープペンギンの飼育数は 2011 年には 485 羽に上っている。国内のケープペンギンは、飼育ペンギンの中でも良好な繁殖成績を示しており、人工孵化や人工育雛の技術も確立しており、飼育数は年々増え続けている。国内の飼育施設では、限られた飼育スペースの中で、繁殖に供する血統や個体の選別が重要な課題となっている。

今後も長期的に個体数を維持し、飼育続けていく上で、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とされている。また国内ではケープペンギンと同属のフンボルトペンギンやマゼランペンギンを同エリアで飼育していたことから交雑種が生まれている事例もある。しかし、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おらず、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も不明である。

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)。

## 参考文献

Crawford, R. J. M., Underhill, L. G., Upfold, L., & Dyer, B. M. (2007). An altered carrying capacity of the benguela upwelling ecosystem for african penguins (*Spheniscus demersus*). *ICES J. Mar. Sci.*, *64*, 570–576.

Crawford, R. J. M., Altwegg, R., Barham, B. J., Barham, P. J., Durant, J. M., Dyer, B. M., Geldenhuys, D., Makhado, A. B., Pichegru, L., Ryan, P. G., Underhill, L. G., Upfold, L., Visagie, J., Waller, L. J. & Whittington, P. A. (2011). Collapse of south africa's penguins in the early 21st century. *Afr. J. Mar. Sci.*, *33*: 139–156.

Hackett, S.J., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C., Yuri, T. (2008). A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, *320*: 1763-1768

## 第1章 国内飼育されているケープペンギンのミトコンドリア DNA 多型解析

### 1 序論

ミトコンドリア DNA (mtDNA) は核 DNA とは別の独自のもので、ATP (adenosine triphosphate) を産生する電子伝達系を構成するサブユニットのうち 13 種類のポリペプチドをコードしている。塩基配列の変異速度は核 DNA に比べて 5~10 倍速いと言われており (Brown *et al.*, 1979)、変異量は種や系統が分化してからの時間を反映し、進化を調べる上で有用な指標となることが知られている。さらに、比較的サイズが小さいため扱いが容易であること、遺伝様式が母性遺伝をするため、1 個体が 1 つの母系集団の代表となり得ること (Moritz *et al.*, 1987) などの特徴を持っている。ペンギン科では、2003 年に初めてコガタペンギン (*Eudyptula minor*) の mtDNA 全長配列 17,611bp が決定された (Slack *et al.*, 2003)。その後イワトビペンギン (*Eudyptes chrysocome*) のほぼ全長 16,930bp (Watanabe *et al.*, 2006)、ヒゲペンギン (*Pygoscelis antarctica*) の全長 15,972bp (Subramanian *et al.*, 2013)、ケープペンギンの全長 17,346bp (Labuschagne *et al.*, 2014) が決定され、ペンギン種間やペンギン以外の鳥類との系統分類に用いられている。

本研究ではまず mtDNA に着目し、中でも non-coding 領域で同一種内でも多型が多く観察されるコントロール領域と、遺伝子領域のうち、多くの動物種で系統分類に使用されるチトクローム b (cytb) 領域を使用した。

これまで mtDNA を用いて野生個体群の系統解析を行なった報告として、イワトビペンギン (Jouventin *et al.*, 2006) やコガタペンギン (Banks *et al.*, 2002、Overeem *et al.*, 2007) の例が挙げられるが、ケープペンギンでの報告はない。

そこで本章では、mtDNA を用いて日本の飼育ケープペンギンにおける集団の遺伝学的特性や各個体間の血縁関係を明らかにすることを目的とした。

## 2 方法

### 2-1 材料および DNA の抽出

全国の動物園・水族館から計 236 羽のケープペンギン (*Spheniscus demersus*) サンプルを提供いただいた (内訳はサンシャイン国際水族館 59 羽、東京都恩賜上野動物園 24 羽、あわしまマリンパーク 9 羽、長崎ペンギン水族館 19 羽、八景島シーパラダイス 23 羽、千葉市動物公園 2 羽、掛川花鳥園 1 羽、松江フォーゲルパーク 8 羽、エプソン品川アクアスタジアム 17 羽、二見シーパラダイス 5 羽、神戸花鳥園 1 羽、マリンワールド海の中道 8 羽、東北サファリパーク 6 羽、那須どうぶつ王国 6 羽、久留米市鳥類センター 5 羽、ヨーデルの森 5 羽、伊豆三津シーパラダイス 4 羽、登別マリンパーク・ニクス 1 羽、マリニピア松島水族館 4 羽、宮崎市フェニックス自然動物園 3 羽、京都水族館 24 羽、横浜市繁殖センター 2 羽)。マゼランペンギン (*Spheniscus magellanicus*) 2 羽は八景島シーパラダイスより、フンボルトペンギン (*Spheniscus humboldti*) 20 羽は横浜市繁殖センターより提供していただいた。

DNA の抽出は血液または羽軸から行なった。血液は Gen とるくん血液用 (TaKaRa Bio) または Genra Puregene® Blood Kit (QIAGEN)、羽軸は Get pureDNA Kit-Cell, Tissue (Dojindo) を用い、添付のマニュアルに従って抽出した。

### 2-2 PCR と塩基配列の決定

mtDNA のうちコントロール領域の 653bp、cytb 領域の全長 1140bp を PCR により増幅した。コントロール領域では、L-tRNA<sup>Glu</sup> (5'-CCTGCTTGGCTTTTTYTCCAAGACC) と H-Dbox (5'-CTGACCGAGGAACCAGAGGCGC) (Roeder *et al.*, 2002)、cytb 領域では BCL1 (5'-AGGCCTACCTAGGATCCTTCGCCCT) と BCH1 (5'-GTCTTTGGTTAATTACAAGACCAATGTTT) (Hitosugi *et al.*, 2007) のプライマーセットを使用した。PCR 反応は 1×buffer、20 mM Tris-HCl、pH8.0、100 mM KCL、2 mM MgCl<sub>2</sub>、200 μM dNTPs、1.25 units *Ex Taq*® HS DNA polymerase (TaKaRa Bio)、各プライマー 0.2 μM を含んだ全

量 50 $\mu$ l で行い、初期熱変性を 95°C 3 分間の後、熱変性 95°C 30 秒間、アニーリング温度 60°C 30 秒間（コントロール領域）、55°C 30 秒間（cytb 領域）、伸長反応 72°C 30 秒間（コントロール領域）、72°C 1 分間（cytb 領域）のセットを 32 サイクル、最終反応として伸長反応 72°C 5 分間の条件で行なった。1.5%アガロースゲルを用いて、PCR 産物のうち 5 $\mu$ l を電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、目的のサイズの DNA 断片が増幅できていることを確認した。PCR 産物を exonuclease I (Wako)と shrimp alkaline phosphatase (TaKaRa Bio)を用いて、デオキシヌクレオチド 3 リン酸の脱リン酸化処理を行なった。H-Dbox、BCL1、BCH1 プライマーはシーケンス用プライマーとしても使用した。シーケンス反応は BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用い、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer によってコントロール領域の 433bp、cytb 領域の 1140bp の配列を決定した。

### 2-3 系統樹の作成とネットワーク解析

系統学的解析は MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2011) を用いて行なった。Clustal W によるアラインメントを行い (Thompson *et al.*, 1994)、近隣結合 (NJ) 法、最節約 (MP) 法、最尤 (ML) 法により系統樹を作成した。遺伝距離 ( $p$ ) の算出には Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993) を使用した。信頼性は 1000 回繰り返した場合のブートストラップ値により評価した (Felsenstein, 1985)。また、ハプロタイプ間の系統関係について SplitsTree4 software (Huson & Bryant, 2006) (<http://www.splitsree.org/>)を用いてネットワーク解析 (Bryant & Moulton, 2004) を行なった。



### 3 結果

236羽のケープペンギンの mtDNA コントロール領域の 433bp を決定したところ、39 箇所が多型部位が観察され、30 ハプロタイプに分けられた (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AB775475-775504、表 1)。39 箇所の変異はすべてトランジションであった。フンボルト、マゼランペンギンも同様に解析し、フンボルトで 6 ハプロタイプ、マゼランで 2 ハプロタイプを決定した (accession No. AB775505-775512)。NJ 法による系統樹を作成したところ、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 タイプ、cladeB には 4 タイプが含まれた (図 1)。5 箇所の変異箇所 (110、166、217、225、285) は cladeB に特徴的であった。cladeA 内の遺伝距離は 0.93%、B 内は 1.18% だったのに対し、2 つの clade 間の遺伝距離は 3.39% であった。MP 法、ML 法の系統樹でも同様に 2 つの clade に分けられた (図 2、3)。また、ネットワーク解析においても cladeA、B の大きく 2 グループに分かれることが確認できた (図 4)。

ケープペンギン 54 羽について、cytb 領域の全長 1140bp の配列を決定したところ、11 箇所が多型部位が観察され、8 ハプロタイプに分けられた (accession No. AB776002-776009、表 2)。同様にフンボルトでは 5 ハプロタイプ、マゼランでは 1 ハプロタイプを決定した (accession No. AB776010-776015)。NJ 法による系統樹では、コントロール領域の結果と一致して cladeA (6 ハプロタイプ)、B (2 ハプロタイプ) の 2 つのグループに分けられた。9 箇所の変異は同義置換であったが、979 番目と 1066 番目の変異は非同義置換であった。979 番目の変異では 8 ハプロタイプのうち、7 ハプロタイプはトレオニンだったが、1 ハプロタイプのみアラニンであった。一方、1066 番目の変異では cladeA ではフェニルアラニンだったのに対し、cladeB ではロイシンであり、A、B グループ間で特徴のある変異であった。

#### 4 考察

日本国内では 1935 年からケープペンギンの飼育を始め、1973 年から 2011 年までの間に 156 羽のファウンダーが導入されている。156 羽のうち、92 羽は南アフリカ由来、30 羽は海外の動物園・水族館由来、残りの 34 羽は由来不明である。血統登録台帳によれば、2011 年には国内ケープペンギンは 485 羽飼育されており、87 ファウンダーに分けられる。血統登録台帳と、本研究における mtDNA の解析に矛盾は見られなかった。解析した南アフリカ由来のケープペンギンファウンダーは 27 ハプロタイプに分布し、cladeA にも B にも含まれた。よって、野生下でも少なくとも 2 つの異なる母系血統が存在することが示唆された。

これまで野生下のイワトビペンギン (*Eudyptes spp.*) やコガタペンギン (*Eudyptula minor*) では系統分類に mtDNA を使用した報告がされている。イワトビペンギンはこれまで 1 種で、キタイワトビペンギンとミナミイワトビペンギンの 2 亜種と考えられてきた (del Hoyo *et al.*, 1992)。Jouventin ら (2006) はキタイワトビペンギンとミナミイワトビペンギンの mtDNA のコントロール領域と ND5 領域を調べ、両亜種のコントロール領域の遺伝距離が  $d=6.1\%$  と大きく離れていること、冠羽など形態学的特徴や鳴き声など生態学的特徴にも違いが見られること、生息域が異なることから、2 亜種は独立した種であることを主張した。現在は IUCN や BirdLife International といった国際組織でもイワトビペンギンはキタイワトビペンギン (*Eudyptes moseleyi*) とミナミイワトビペンギン (*Eudyptes chrysocome*) の 2 種として認められている。また、コガタペンギンはこれまで 6 亜種が知られており (Kinsky *et al.*, 1976)、mtDNA 配列の解析結果からオーストラリア・オタゴグループとニュージーランドグループの大きく 2 つに分けられ、この 2 グループ間のコントロール領域の遺伝距離は  $d=11.8\%$  と大きく離れていることが知られている (Banks *et al.*, 2002)。さらにコガタペンギン 6 亜種のうち、南オーストラリアに生息する 1 亜種 *E. m. novaehollandiae* の 7 コロニーについてのコントロール領域の解析結果では、コロニー間で遺伝的変異は少なく、近縁であることが明らか

となった (Overeem *et al.*, 2007)。この報告を元に accession No. EU043384-043403 の配列を使用し遺伝距離を計算してみたところ、 $d=1.0\%$ であった。

一般的に飼育集団では、野生下と比べると遺伝的多様性がより早く減少すると言われており、前述したイワトビペンギン、コガタペンギンの遺伝的データは野生下のものであることを考慮しなければならないが、本章で得た国内ケープペンギンの cladeA、B 間の遺伝距離  $d=3.39\%$  は野生のケープペンギンの地理的分集団、またはこれまで知られていなかった亜種を反映しているのかもしれない。

国内飼育されている絶滅危惧種であるコウノトリ (*Ciconia boyciana*) では、mtDNA コントロール領域のハプロタイプ分けが繁殖プランにも応用されている (Yamamoto *et al.*, 2000、Yamamoto, 2011)。ケープペンギンにおいても、域外保全のための繁殖計画に、本研究で得られた遺伝情報が利用できると考えられる。

## 5 参考文献

- Banks, J. C., Mitchell, A. D., Waas, J. R., & Paterson, A. M. (2002). An unexpected pattern of molecular divergence within the blue penguin (*Eudyptula minor*) complex, *Notornis*, *49*, 29–38.
- Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *76*, 1967–1971.
- Bryant, D., & Moulton, V. (2004). Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol.*, *21*, 255–65.
- del Hoyo, J., Elliott, A. & Sargatal, J. eds. (1992). Handbook of the birds of the world - volume 1. *Spheniscidae* (penguin). Lynx Edicions. *Lynx Edicions, Barcelona*, 140–160.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, *39*, 783-791.
- Hitosugi, S., Tsuda, K., Okabayashi, H., & Tanabe, Y. (2007). Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA cytochrome b gene in east asian ducks. *J. Poult. Sci.*, *44*, 141-145.
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.*, *23*, 254–67.
- Jouventin, P., Cuthbert, R. J., & Ottvall, R. (2006). Genetic isolation and divergence in sexual traits: evidence for the northern rockhopper penguin *Eudyptes moseleyi* being a sibling species. *Mol. ecol.*, *15*, 3413–23.

- Labuschagne, C., Kotzé, A., Grobler, J. P., & Dalton, D. L. (2014). The complete sequence of the mitochondrial genome of the african penguin (*Spheniscus demersus*). *Gene*, *534*, 113–118.
- Moritz, C., Dowling, T. E., & Brown, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, *18*, 269–292.
- Overeem, R. L., Peucker (nee Mitchelson), A. J., Austin, C. M., Dann, P., & Burridge, C. P. (2007). Contrasting genetic structuring between colonies of the world's smallest penguin, *Eudyptula minor* (Aves: *Spheniscidae*). *Conserv. Genet.*, *9*, 893–905.
- Roeder, A. D., Ritchie, P. A., & Lambert, D. M. (2002). New DNA markers for penguins. *Conserv. Genet.*, *3*, 341–344.
- Slack, K. E., Janke, A., Penny, D., & Arnason, U. (2003). Two new avian mitochondrial genomes (penguin and goose) and a summary of bird and reptile mitogenomic features. *Gene*, *302*, 43–52.
- Subramanian, S., Lingala, S. G., Swaminathan, S., Huynen, L., & Lambert, D. (2013). Second generation DNA sequencing of the mitogenome of the chinstrap penguin and comparative genomics of antarctic penguins. *Mitochondrial DNA*. in press
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, *10*, 512–526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, *28*, 2731–9.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673–80.

Watanabe, M., Nikaido, M., Tsuda, T. T., Kobayashi, T., Mindell, D., Cao, Y., Okada, N., Hasegawa, M. (2006). New candidate species most closely related to penguins. *Gene*, 378, 65–73.

Yamamoto, Y. 2011. New haplotypes in the mitochondrial control region of oriental white storks, *Ciconia boyciana*. *Reintroduction*, 1, 77-80.

Yamamoto, Y., Murata, K., Matsuda, H., Hosoda, T., Tamura, K., & Furuyama, J. (2000).

Determination of the complete nucleotide sequence and haplotypes in the D-loop region of the mitochondrial genome in the oriental white stork, *Ciconia boyciana*. *Genes Genet. Syst.*, 75, 25–32.

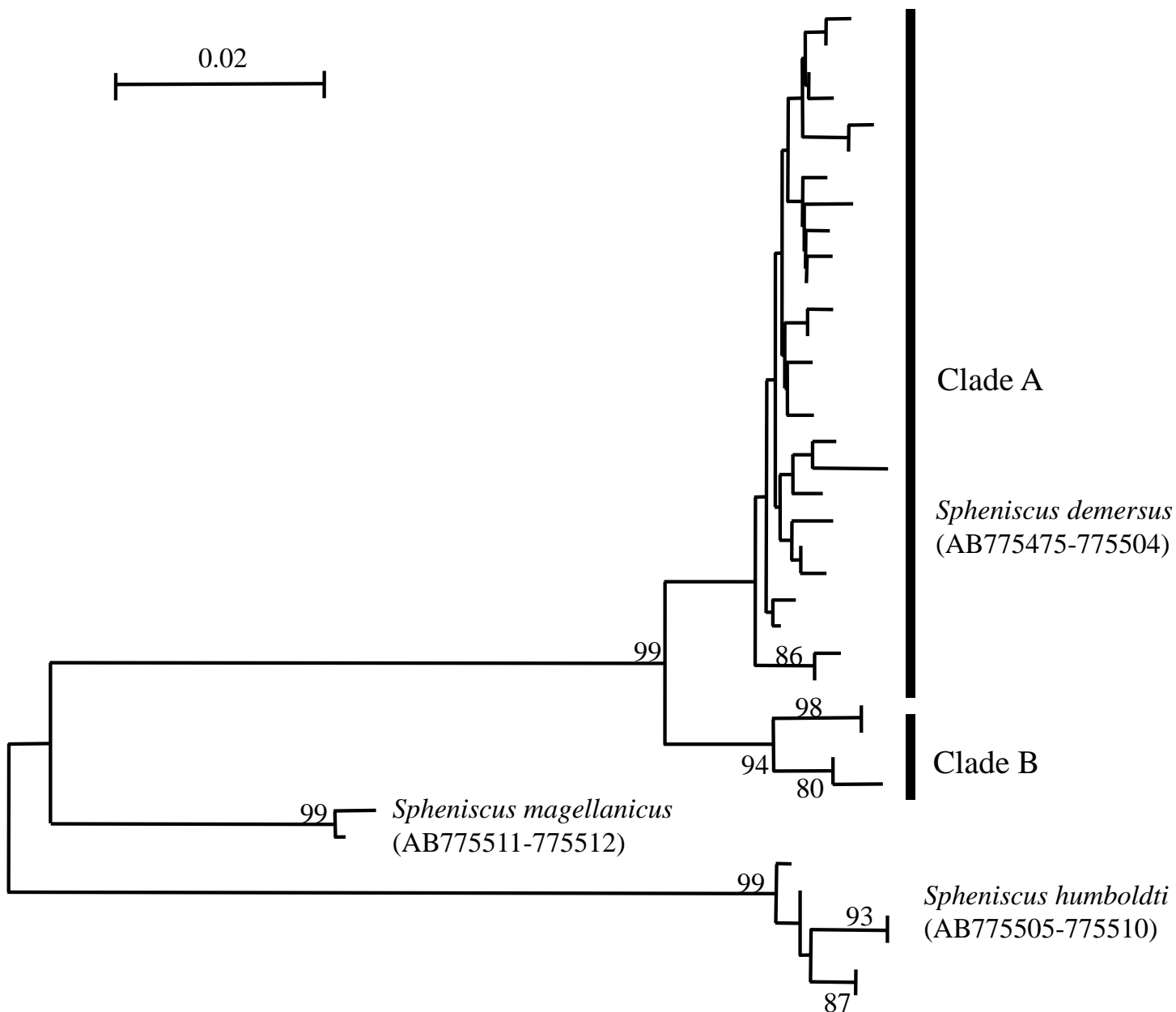


図1 NJ法によるmtDNAコントロール領域の系統樹

outgroupにはフンボルトペンギンを置き、Bootstrap値は70%以上の値を表示した。ケープペンギンは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。

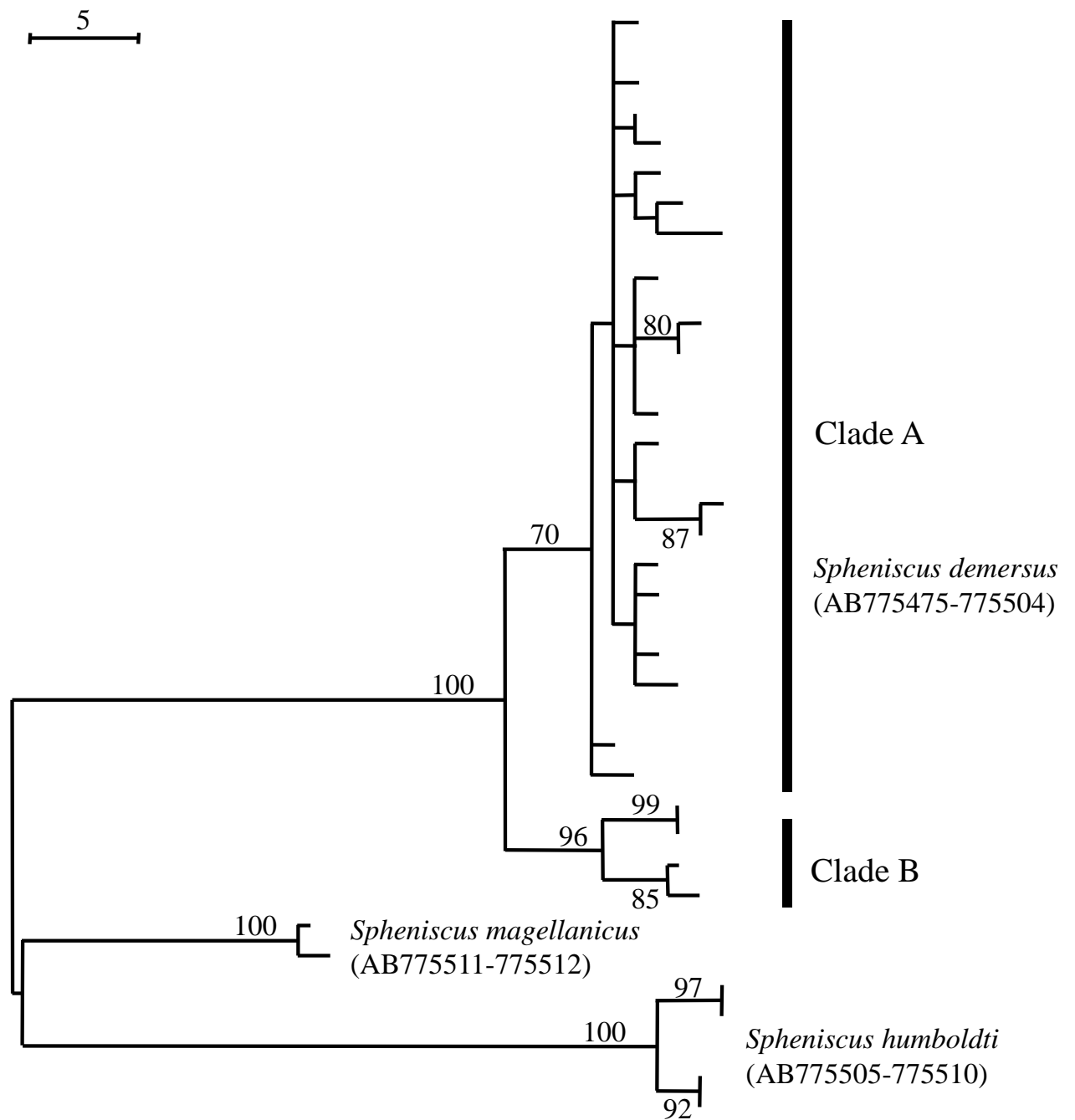


図2 MP法によるmtDNAコントロール領域の系統樹

outgroupにはフンボルトペンギンを置き、Bootstrap値は70%以上の値を表示した。MP法の系統樹においても、ケープペンギンはcladeAとBの大きく2つのグループに分けられた。



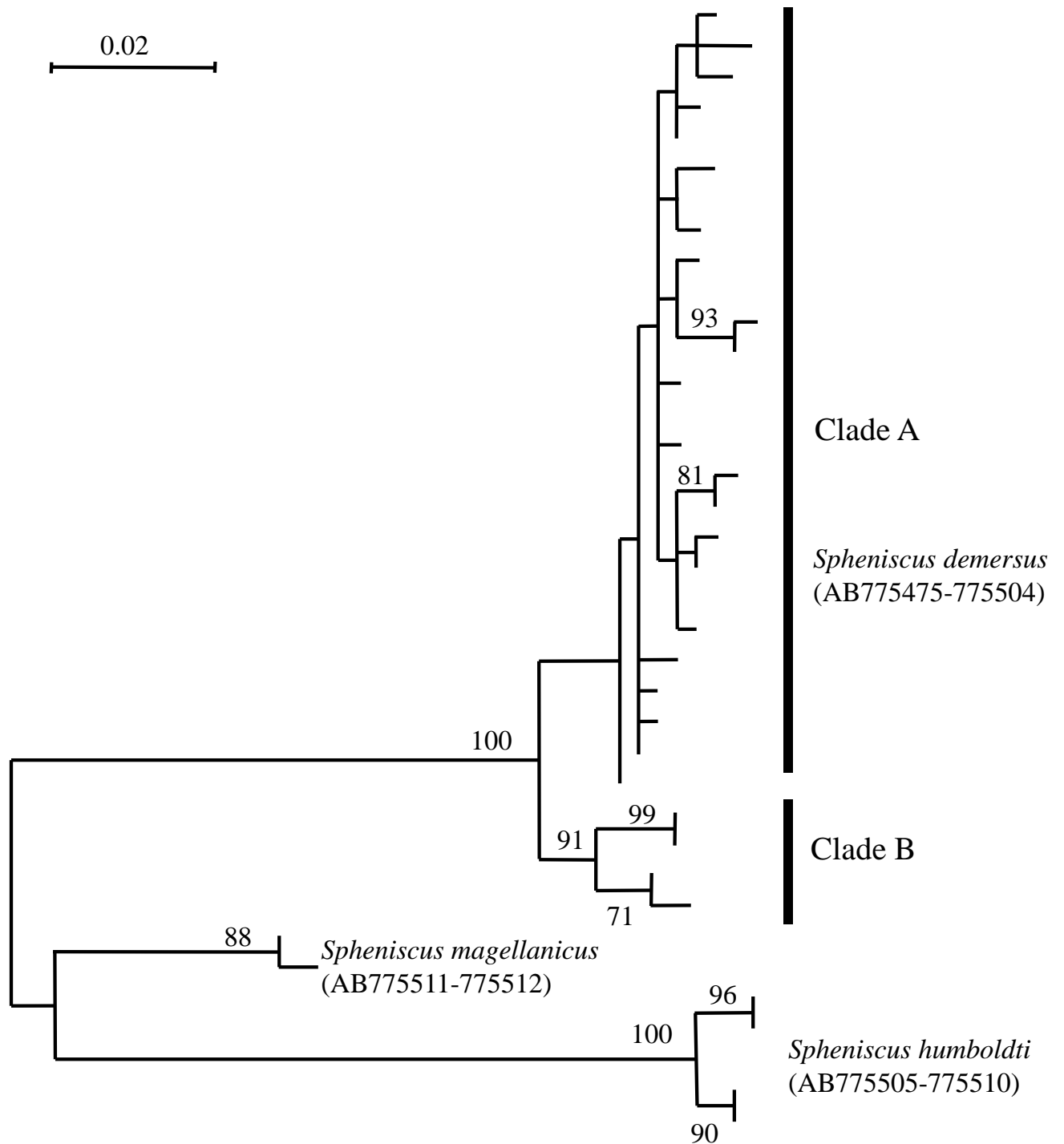


図3 ML法によるmtDNAコントロール領域の系統樹

outgroupにはフンボルトペンギンを置き、Bootstrap値は70%以上の値を表示した。  
MP法の系統樹においても、ケープペンギンはcladeAとBの大きく2つのグループに分けられた。

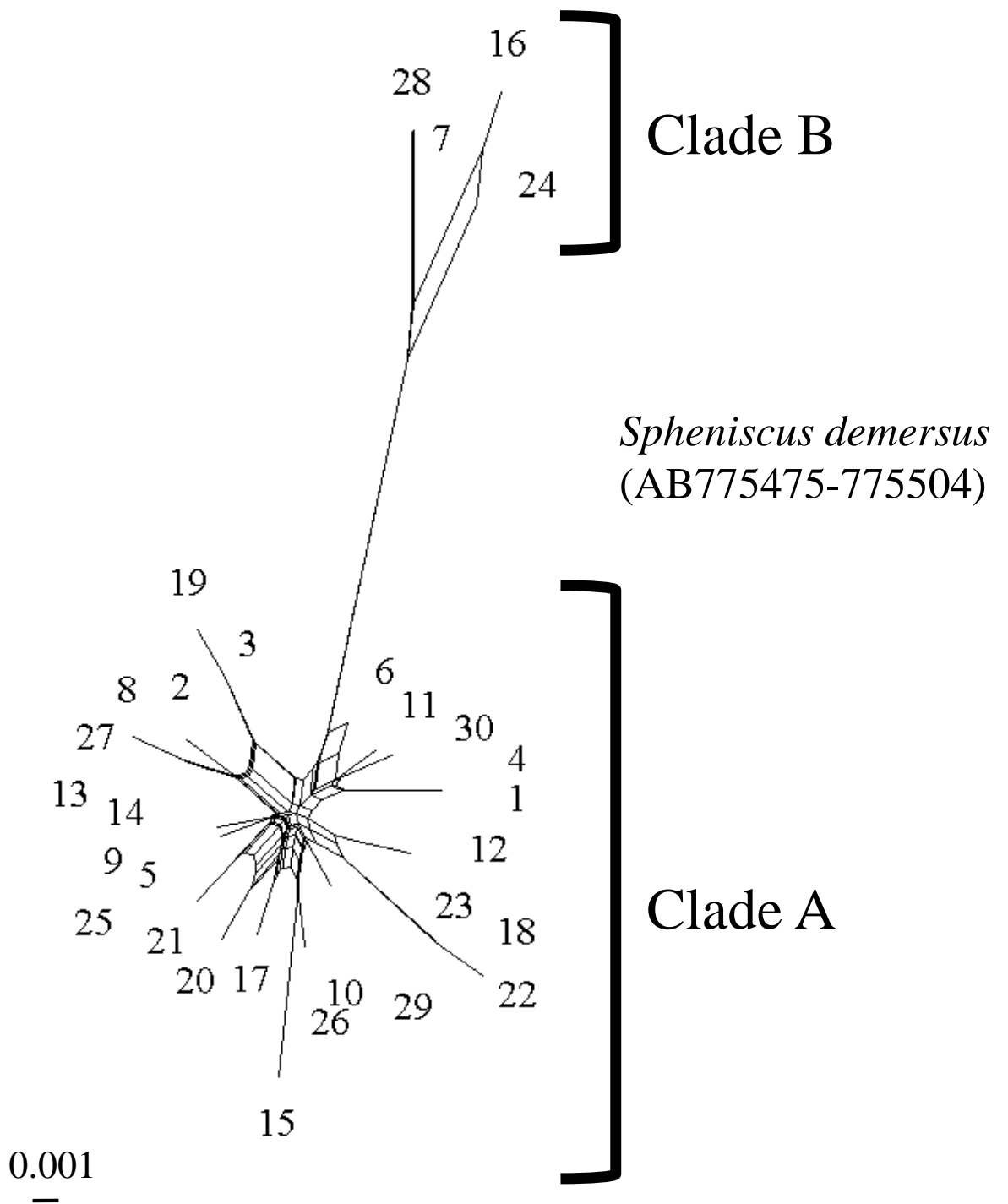


図4 ケープペンギンにおける  
mtDNAコントロール領域の系統ネットワーク  
ケープペンギンはcladeAとBの大きく2つのグループに分けられた。

表1 mtDNAコントロール領域433bpの多型部位

Haplotype	Nucleotide position																																	Number of individuals								
	3	1	0	1	7	8	0	7	1	2	4	5	9	1	1	5	6	0	7	4	8	7	0	5	7	9	3	5	5	6	8	2	3		4	5	5	6	9	6		
type1	A	G	T	T	T	A	A	A	G	A	T	C	T	G	A	A	G	G	C	G	G	G	A	T	A	G	A	T	G	G	G	T	T	A	A	T	T	22				
type2	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	3	
type3	G	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	9		
type4	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	20	
type5	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	C	28		
type6	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	7	
type8	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	25	
type9	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	27	
type10	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	9	
type11	.	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	3	
type12	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	3	
type13	G	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	8
type14	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	18	
type15	G	.	.	.	.	.	G	.	.	G	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	8
type17	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	3	
type18	G	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
type19	G	.	.	.	C	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
type20	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	4	
type21	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	C	2	
type22	G	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	1		
type23	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	1	
type25	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	1	
type26	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	3	
type27	G	.	.	.	.	.	G	G	.	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	11	
type29	G	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	2
type30	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	3	
type7	.	A	C	.	C	.	G	G	.	.	.	.	.	A	.	G	.	R	.	.	A	.	A	.	.	.	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.	G	.	C	7		
type16	.	.	.	C	C	.	G	G	.	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	A	.	A	G	.	G	A	G	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	1		
type24	.	.	.	C	C	.	G	G	.	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	A	.	A	G	.	G	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	1		
type28	.	A	C	.	C	.	G	G	.	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	.	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.	G	.	C	4	
<b>total</b>																																	<b>236</b>									

表2 mtDNAチトクローム b 領域1140bpの多型部位

		Nucleotide position												
		1												
Haplotype		1	2	4	6	6	6	7	9	9	9	0	control region Haplotype	Number of individuals
		9	2	2	1	3	9	5	4	5	7	6		
		5	5	9	8	6	3	3	5	4	9	6		
	cytb-type1	T	C	T	C	A	A	A	A	T	A	T	1,4,6,30	52
	cytb-type2	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2,3,5,8,9,11,12,13,14,15,17,19,21,22,25,26,29	145
CladeA	cytb-type3	C	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	10	9
	cytb-type4	C	.	.	T	.	.	.	G	.	.	.	18,23	2
	cytb-type5	C	.	.	.	G	G	G	.	.	.	.	20	4
	cytb-type6	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	27	11
CladeB	cytb-type7	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	7,16,28	12
	cytb-type8	C	T	C	.	.	.	.	.	.	.	C	24	1
													Total	236

## 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

### 1 序論

1章では mtDNA を用いて系統解析を行なったが、mtDNA は単一の遺伝子座とみなされることから、集団の遺伝学的特性を明らかにするためには、核 DNA マーカーも併用することが望ましい。マイクロサテライトはゲノム中に不規則に局在している、数塩基程度の大きさを単位配列とする繰り返し配列であり、一般に高度な多型を示すことが知られている。高多型性でかつ共優性の DNA マーカーとしてマイクロサテライト DNA マーカーが活発に利用され、リンゲージマッピングや集団遺伝学、個人識別や親子鑑定など幅広く応用されている。

ゲノム配列の大部分が不明である野生動物でもマイクロサテライトは有用であり、近年は特に次世代シーケンサーを使用し、より簡便にマイクロサテライト DNA マーカーが開発できるようになってきた。ペンギン科ではこれまでに各種ペンギンに多型がみられるマーカーが開発されており (Schlosser *et al.*, 2003)、野生のフンボルトペンギンの個体群構造の解析に使用されている (Schlosser *et al.*, 2009)。その他にも様々なマイクロサテライト DNA マーカーが発見され、これまでに野生下のマゼランペンギン (Bouzat *et al.*, 2009)、ガラパゴスペンギン (Akst *et al.*, 2002、Nims *et al.*, 2007)、コガタペンギン (Overeem *et al.*, 2007)、アデリーペンギン (Roeder *et al.*, 2001)、キガシラペンギン (Boessenkool *et al.*, 2009) の集団解析に使用されている。また 2012 年には新たにケープペンギン (Lacbushagne *et al.*, 2012) のマイクロサテライト DNA マーカーが開発された。

本章では既知のフンボルトペンギン (Schlosser *et al.*, 2003)、ケープペンギン (Lacbushagne *et al.*, 2012) のマイクロサテライト DNA マーカーを使用し、日本のケープペンギンがいくつかの集団に分けられるのか集団解析を行なった。

## 2 方法

### 2-1 材料および DNA の抽出

全国の動物園・水族館から計 254 羽のケーブペンギン (*Spheniscus demersus*) の血液または羽軸サンプルを提供いただいた (内訳はサンシャイン国際水族館 61 羽、東京都恩賜上野動物園 24 羽、あわしまマリンパーク 16 羽、長崎ペンギン水族館 19 羽、八景島シーパラダイス 24 羽、千葉市動物公園 3 羽、掛川花鳥園 1 羽、松江フォーゲルパーク 8 羽、エプソン品川アクアスタジアム 17 羽、二見シーパラダイス 7 羽、神戸花鳥園 1 羽、マリンワールド海の中道 8 羽、東北サファリパーク 6 羽、那須どうぶつ王国 6 羽、久留米市鳥類センター 5 羽、ヨーデルの森 5 羽、伊豆三津シーパラダイス 5 羽、登別マリンパーク・ニクス 1 羽、マリンピア松島水族館 4 羽、宮崎市フェニックス自然動物園 3 羽、京都水族館 28 羽、横浜市繁殖センター 2 羽)。

血液からは Gen とるくん血液用 (TaKaRa Bio) または Genra Puregene® Blood Kit (QIAGEN)、羽軸からは Get pureDNA Kit-Cell, Tissue (Dojindo) を用い、添付のマニュアルに従って DNA を抽出した。

### 2-2 PCR とアリのルの検出

Schlosser ら (2003) によって開発されたフンボルトペンギン用の 5 座位のプライマーセットに加えて、Lacbushagne ら (2012) によって開発されたケーブペンギン用の 5 座位を用いて PCR を行なった (表 1)。各プライマーセットのフォワードプライマーの 5' 末端に NED、FAM、PET、VIC のいずれかを標識し、PCR に用いた。PCR 反応は 1×buffer、20 mM Tris-HCl、pH8.0、100 mM KCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、200 μM dNTPs、0.625 units *Ex Taq*<sup>®</sup> HS DNA polymerase (TaKaRa Bio)、各プライマー 0.2 μM を含んだ全量 17 μl、または Multiplex PCR Assay Kit (TaKaRa Bio) を使用し、Multiplex PCR Mix 2 を 8.5 μl、Multiplex PCR Mix 1 を 0.085 μl、各プライマー

0.2  $\mu\text{M}$  を含んだ全量 17 $\mu\text{l}$  として行なった。Ex Taq<sup>®</sup> HS DNA polymerase を用いた場合は、初期熱変性を 95°C 3 分間の後、熱変性 95°C 30 秒間、至適アニーリング温度 30 秒間、伸長反応 72°C 30 秒間のセットを 35 サイクル、最終反応として伸長反応 72 °C 10 分間の PCR 条件で行ない、Multiplex PCR Assay Kit を用いた場合は、初期熱変性を 94°C 1 分間の後、熱変性 94°C 30 秒間、至適アニーリング温度 1 分 30 秒間、伸長反応 72°C 1 分 30 秒間のセットを 35 サイクル、最終反応として伸長反応 72 °C 10 分間の条件で行なった。PCR 後、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer によって電気泳動を行い、アリの検出およびサイズ決定は GeneMapper v4.0 を用いた。

### 2-3 データ解析

Cervus ver3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007) を用いて、遺伝的多様性の指標となるヘテロ接合体率の観察値 ( $H_o$ ) と期待値 ( $H_e$ )、ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) からの逸脱の有無、を算出した。また GENEPOP 4.2 (Raymond & Rousset, 1995、Rousset, 2008) 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。また血統登録台帳に記載されている親子関係が明らかな個体同士を比較し、連鎖が起きていないことを確認した。

各マーカーの遺伝子型の情報に基づき、STRUCTURE2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) を用いて分集団を推定した。まず  $K = 1-15$  のそれぞれの  $K$  について、100,000 回のマルコフ連鎖モンテカルロシミュレーションを独立に 10 回試行した。分集団数  $K$  を与えたときの個体の遺伝子型が生じる対数尤度  $[\ln \text{Pr}(X/K)]$  を算出し、 $\Delta K$  が最も高い値を示す  $K$  を分集団数と推定した (Evanno *et al.*, 2005)。

### 3 結果

既知の 10 座位のマイクロサテライト DNA マーカーを用いて、254 サンプルの PCR を行った。254 サンプルのうち、血液は 119 サンプル、羽軸は 135 サンプルであった。ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer による電気泳動の結果、検出できたアレルのうち、シグナルのピークが 1000 以上あるもの、スタッターバンドやピークの形態がはっきりしているものを採用した。10 座位のうち 2 座位 (Sh1Ca17、Sh2Ca12) は感度が悪く、DNA 量の少ない羽軸を用いたサンプルでは null allele が頻繁に発生したことから、その後の解析には用いなかった。残りの 8 座位 (Sh1Ca12、Sh1Ca16、Sh2Ca21、PNN01、PNN03、PNN06、PNN09、PNN12) 全てにおいてピークが検出できた 173 サンプルをその後の解析に用いた。

Sh1Ca12、Sh1Ca16、Sh2Ca21 座位における各遺伝子座のアレル、及び頻度を表 2 に、PNN01、PNN03、PNN06、PNN09、PNN12 座位についてを表 3 にまとめた。解析で得られた 173 サンプルのヘテロ接合体率の観察値 ( $H_o$ ) と期待値 ( $H_e$ )、アレル数について表 4 に示した。 $H_e$  は 0.4477~0.7209 (平均 0.6039)、 $H_o$  は 0.4474~0.7131 (平均 0.6200)、アレル数は 4~11 (平均 6.125) であった。いずれの座位においても HWE からの逸脱は見られなかった。

連鎖不平衡の有無については、台帳を基に血縁関係ではない 52 サンプルを選定し検定を行った。すべての座位の組み合わせで  $P > 0.05$  となり、連鎖不平衡は見られなかった。また、父、母、子の親子関係が明らかな個体同士でアレルを比較したところ、矛盾の見られた親子ペアが 34 組中 2 組存在した。

各マーカーの遺伝子型を基に 173 個体のクラスター解析を行ったところ、 $\Delta K$  の最大値は 34.68752 ( $K=3$ ) となり、3 つのクラスターを仮定することが最も適当であると明らかになった。



#### 4 考察

本研究では、8つのマイクロサテライトマーカーを用いて、254個体について調査を行った。しかしながら解析に使用できたサンプルは173個体であった。うち血液は97サンプル、羽軸は76サンプルであり、血液では高い確率で増幅に成功した(81.5%)が、羽軸サンプルではシグナルが弱くうまく増幅されない割合が高かった(56.2%)。血統登録台帳を参考に34組の親子(父-子、母-子、父・母-子)について、得られたアリルについて比較したところ2組の親子で1座位ずつ(Sh1Ca16、PNN09)の矛盾が見られた。Sh1Ca16では、母親は95のホモアリルを持っていたのに対し、子は97のホモアリルを持っていた。PNN09では、父親は370のホモアリル、母親は366/370のヘテロアリルだったのに対し、子は366/374のヘテロアリルであった。台帳の記録の間違ひまたは、つがい外交尾の可能性も考えられるが、いずれも羽軸サンプルだったことから抽出したDNA量が不十分であり、null alleleの存在が考えられた。今回解析した8座位は、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、今後ケーブペンギンの野生集団にも応用可能なマイクロサテライトDNAマーカーセットであることが示された。しかし十分なDNA量を得るために使用するサンプルは血液が好ましいと考えられる。

Schlosserら(2009)が調べた野生のフンボルトペンギンのヘテロ接合体率の観察値( $H_o$ )は、Sh1Ca12では0.825~0.884、Sh1Ca16では0.714~0.897、Sh2Ca21では0.517~0.670であった。今回解析したケーブペンギンの $H_o$ 値と比較するとSh2Ca21では同等の値であったが、Sh1Ca12とSh1Ca1では今回の解析結果の方が低かった。しかし、マーカーは異なるものの同じ絶滅危惧種であるキガシラペンギンの $H_o$ 値は0.30~0.45であることを考えると

(Boessenkool *et al.*, 2009)、本研究のケーブペンギンの遺伝的多様性は低いと考えられた。今後はケーブペンギンの野生個体群との比較が必要である。

STRUCTURE2.3.4を用いたクラスター解析では、日本のケーブペンギンは大きく分けると

3つの祖先集団に由来することが明らかとなった。1章でクラスターBに含まれた4ハプロタイプも3つの祖先集団を持っており、mtDNA多型解析の結果と、本章のマイクロサテライトDNAマーカーを用いた集団解析の結果は一致しなかった。今回サンプル提供をいただいた動物園・水族館のうち、飼育羽数の多い4つの動物園・水族館でクラスターの分布を比較したところ、飼育施設によって祖先集団の偏りがあった。今後多様性を維持するために、mtDNA多型解析で得られた30ハプロタイプを維持しながら、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。

また、任意の2個体が異なる遺伝子型を有する確率である識別能 (Power of Discrimination: PD) を算出し、n個の座位を用いた総合識別能力 (APD) を

$$APD = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - PD_i)$$

の式を用いて計算した。PDは0.6149~0.8692 (平均0.7969)、APDは $1 - 1.8 \times 10^{-6} = 0.9999982$ となり、8遺伝子座の遺伝子型を用いた総合的な識別能力、つまり任意の2個体が異なる遺伝子型を持つ確率は、99.99982%となり、本マイクロサテライトDNAマーカーは個体識別にも利用できる可能性が考えられた。

## 5 参考文献

- Akst, E. P., Boersma, P. D., & Fleischer, R. C. (2002). A comparison of genetic diversity between the galápagos penguin and the magellanic penguin. *Conserv. Genet.*, *3*, 375–383.
- Boessenkool, S., Star, B., Waters, J. M., & Seddon, P. J. (2009). Multilocus assignment analyses reveal multiple units and rare migration events in the recently expanded yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Mol. ecol.*, *18*, 2390–400.
- Bouzat, J. L., Walker, B. G., & Boersma, P. D. (2009). Regional genetic structure in the magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) suggests metapopulation dynamics. *The Auk*, *126*, 326–334.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol*, *14*, 2611-20.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online*, *23*, 47-50.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., & Marshall, T.C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. ecol.*, *16*, 1099-1006.
- Lacubushagne, C., Wyk, A. M., Kotzé, A., Grobler, P., & Dalton, D. L. (2012). Isolation and characterization of species-specific microsatellite loci in african penguin (*Spheniscus demersus*). *Conserv. Genet. Resour.*, *5*, 169–171.
- Nims, B. D., Vargas, F. H., Merkel, J., & Parker, P. G. (2007). Low genetic diversity and lack of population structure in the endangered galápagos penguin (*Spheniscus mendiculus*). *Conserv. Genet.*, *9*,

1413–1420.

Overeem, R. L., Peucker, A. J., Austin, C. M., Dann, P., & Burridge, C. P. (2007). Contrasting genetic structuring between colonies of the world's smallest penguin, *Eudyptula minor* (Aves: *Spheniscidae*). *Conserv. Genet.*, *9*, 893–905.

Pritchard, J.K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*, 945-959.

Raymond, M., & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, *86*, 248-249.

Roeder, A. D., Marshall, R. K., Mitchelson, A. J., Visagathilagar, T., Ritchie, P. A., Love, D. R., Pakai, T. J., McPartlan, H. C., Murray, N. D., Robinson, N. A., Kerry, K. R., & Lambert, D. M. (2001). Gene flow on the ice: genetic differentiation among adélie penguin colonies around antarctica. *Mol. Ecol.*, *10*, 1645–1656.

Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for windows and linux. *Mol. Ecol. Resour.*, *8*, 103-106.

Schlosser, J. A., Garner, T. W. J., Dubach, J. M., & McElligott, A. G. (2003). Characterization of microsatellite loci in humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and cross-amplification in other penguin species. *Molecular Ecology Notes*, *3*, 62–64.

Schlosser, J. A., Dubach, J. M., Garner, T. W. J., Araya, B., Bernal, M., Simeone, A., Smith, K. A., & Wallace, R. S. (2008). Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the humboldt penguin, *Spheniscus humboldti*. *Conserv. Genet.*, *10*, 839–849.

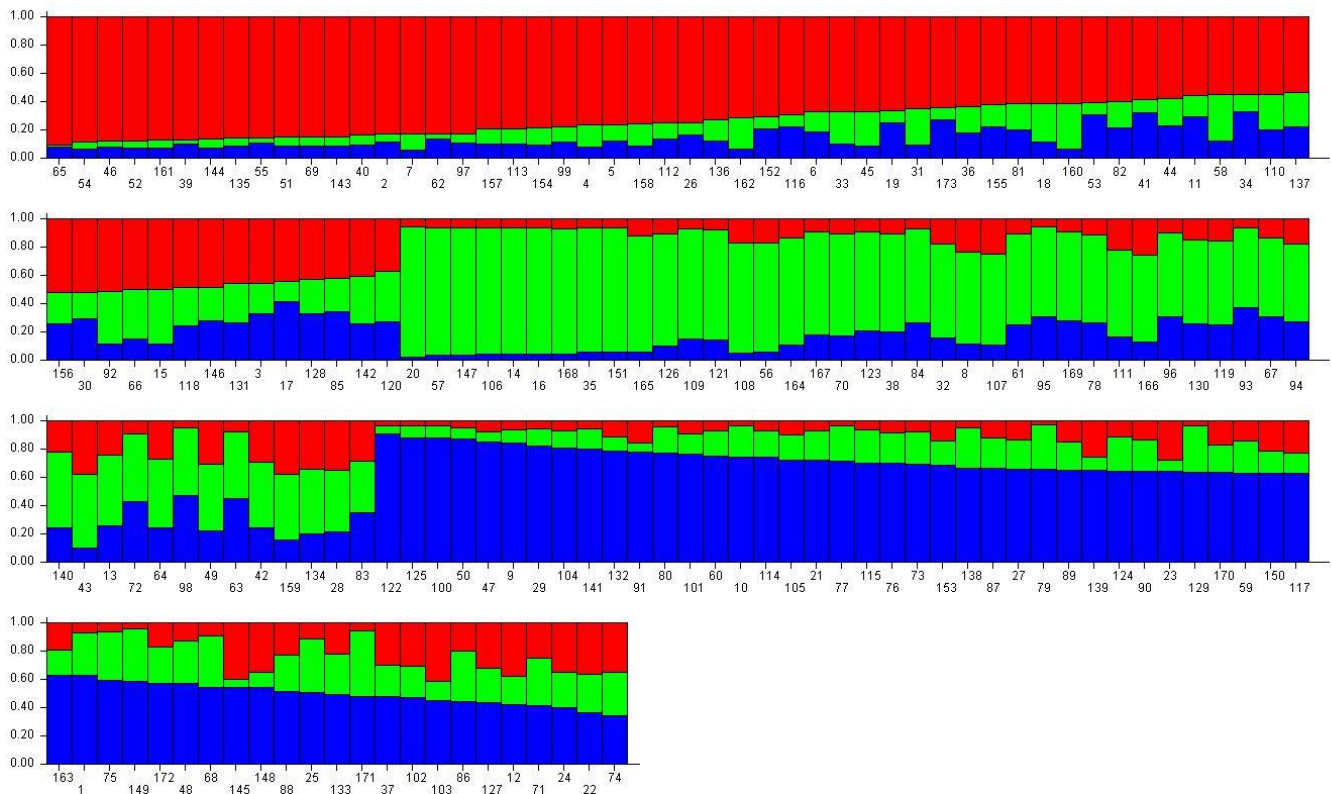


図1 飼育ケーブペンギン173個体の集団解析

$\Delta K$ の値により、 $K=3$ つのクラスターに分かれている。  
 それぞれのカラムは各個体を示しており、国内のケーブペンギン  
 飼育集団は赤色、緑色、青色の大きく3つの祖先集団に由来する。

表1 使用したマイクロサテライトDNAマーカー

Locus	Primer Sequences (5'-3')	Fluorescent dye label	Repeat unit	Ta (°C)	Allele size range in bp	Accession No.	Reference
Sh1Ca12	F: GCACACTGTGAGCTTGAC R:CTTGGGCTCTCAAATACCC	NED	(T) <sub>7</sub> (CTA)(T) <sub>4</sub> (G)(T) <sub>7</sub> (AC) <sub>14</sub>	60	118-130	AF540007	Schlosser <i>et al.</i> ,2003
Sh1Ca16	F: GTAGGGCAGCAGCACACC R:TCTCCTGGAAAGCAGGAATCC	VIC	(CCCT) <sub>2</sub> (CT) <sub>1</sub> (CA) <sub>20</sub> (GAG) (TTTC) <sub>2</sub> (TG) <sub>2</sub>	60	101-107	AF540008	
Sh1Ca17	F: GCCCTCAGTGGTTGCACA R: GGTGGTCAAAACCCCTCTTT	PET	(CA) <sub>15</sub> (TATGCAA)(CA) <sub>4</sub>	60	105-126	AF540009	
Sh2Ca12	F: TCAGTGTACGAGCCAGAAGG R: CTAGGATCCCGGCTTTTGTC	NED	(T) <sub>3</sub> (CA) <sub>14</sub> (A) <sub>3</sub>	55	112-148	AF540010	
Sh2Ca21	F: AAAATAAAGCCTATACACAACAGG R: GTGCACTTAATGGGGTGTATG	FAM	(CA) <sub>11</sub>	53	119-137	AF540011	
PNN01	F: ATGATGAGAGGGATGAATGGAC R: GAGTACACCTGCGCCAGAC	VIC	(GGAT) <sub>7</sub>	55	317-329	JX494403	Lacbushagne <i>et al.</i> ,2013
PNN03	F: ACAAACTTCCCACCTGACTGTT R: GCTCCTATTTACGACTCATCC	NED	(TAC) <sub>12</sub>	55	368-383	JX494404	
PNN06	F: TCAGAAAGGAACTGTGTAGAGGC R: TCCTGAGTAACACTTGTGGGTG	FAM	(TCTA) <sub>10</sub>	55	299-315	JX494406	
PNN09	F: CTGAGCAGACAAACTGGTAAAA R: TCAACTCGTCTTTGCTTACAAC	FAM	(GATA) <sub>12</sub>	55	360-378	JX494409	
PNN12	F: TGGAGGTGTATGTTTAGCAT R: TTCAGTGGCTGTATTTGCTG	FAM	(GT) <sub>10</sub>	55	252-264	JX494410	

表2 Sh1Ca12、Sh1Ca16、Sh1Ca21座位において観察されたアリル頻度

Sh1Ca12			
Allele	Count	Heterozygotes	Frequency
118	6	6	0.0174
124	236	72	0.686
128	99	73	0.2878
130	3	3	0.0087

Sh1Ca16			
Allele	Count	Heterozygotes	Frequency
91	5	5	0.0145
93	11	11	0.032
95	231	77	0.6715
97	13	13	0.0378
101	20	14	0.0581
103	42	38	0.1221
107	22	20	0.064

Sh2Ca21			
Allele	Count	Heterozygotes	Frequency
113	4	4	0.0116
119	1	1	0.0029
121	6	6	0.0174
123	182	96	0.5291
125	65	47	0.189
127	30	26	0.0872
129	7	5	0.0203
131	8	8	0.0233
133	34	34	0.0988
135	1	1	0.0029
137	6	6	0.0174

表3 PNN01、PNN03、PNN06、PNN09、PNN12座位において  
観察されたアリル頻度

PNN01			
Allele	Count	Heterozygotes	Frequency
317	100	60	0.2907
321	122	70	0.3547
325	102	64	0.2965
329	20	20	0.0581
PNN03			
Allele	Count	Heterozygotes	Frequency
368	21	19	0.061
371	14	14	0.0407
374	217	69	0.6308
377	17	15	0.0494
380	47	41	0.1366
383	23	17	0.0669
389	5	5	0.0145
PNN06			
Allele	Count	Heterozygotes	Frequency
299	70	66	0.2035
303	129	87	0.375
307	138	88	0.4012
311	5	5	0.0145
315	2	2	0.0058
PNN09			
Allele	Count	Heterozygotes	Frequency
362	8	8	0.0231
366	92	66	0.2659
370	145	77	0.4191
374	62	46	0.1792
378	39	33	0.1127
PNN12			
Allele	Count	Heterozygotes	Frequency
252	143	81	0.4157
256	8	8	0.0233
258	126	78	0.3663
260	17	17	0.0494
262	45	35	0.1308
264	5	5	0.0145



表4 173個体における  
8座位のヘテロ接合体率の観察値 ( $H_o$ ) と期待値 ( $H_e$ )、  
ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) からの逸脱の有無

Locus name	Number of allele	$H_e$	$H_o$	HWE
Sh2Ca21	11	0.6802	0.6672	-
Sh1Ca16	7	0.5174	0.5256	-
Sh1Ca12	4	0.4477	0.4474	-
PNN01	4	0.6221	0.7005	-
PNN03	7	0.5233	0.5726	-
PNN12	6	0.6512	0.6747	-
PNN06	5	0.7209	0.6587	-
PNN09	5	0.6647	0.7104	-
Avarage	6.125	0.6034	0.6196	-

表4 173個体における  
8座位のヘテロ接合体率の観察値 ( $H_o$ ) と期待値 ( $H_e$ )、  
ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) からの逸脱の有無

Locus name	Number of allele	$H_e$	$H_o$	HWE
Sh2Ca21	11	0.6802	0.6672	-
Sh1Ca16	7	0.5174	0.5256	-
Sh1Ca12	4	0.4477	0.4474	-
PNN01	4	0.6221	0.7005	-
PNN03	7	0.5233	0.5726	-
PNN12	6	0.6512	0.6747	-
PNN06	5	0.7209	0.6587	-
PNN09	5	0.6647	0.7104	-
Avarage	6.125	0.6034	0.6196	

### 第3章 ケープペンギンに特異的な DNA 配列の探索

#### 1 序論

これまで1、2章では国内飼育されているケープペンギンの遺伝的多様性や系統関係について、比較的進化速度の速いマイクロサテライトや mtDNA を用いて解析してきた。本章ではより大きなスケールでケープペンギンの種としての特徴を捉え、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ことを目的とし、ケープペンギン特異的な DNA 配列を探索した。特異的な DNA の探索には異なる4種類の方法（制限酵素を用いたサテライト DNA の探索、RAPD-PCR 法、MASA 法、RDA 法）を用いた。

サテライト DNA とは数塩基からなる単位が数千にも繰り返す、単純な繰り返し配列であり、ヘテロクロマチン領域に存在することが明らかとなっている (Sullivan *et al.*, 2001)。これらのサテライト DNA は、種間や地域集団間において多様性があることが知られており、種や集団を同定する遺伝マーカーになると考えられている。

全ゲノム DNA を対象とする Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) -PCR 法 (Williams *et al.*, 1990) は 10~13 塩基対のランダムプライマーを用いて PCR を行い、遺伝的差異を検出する方法で多くの生物の種判定や地域集団の識別に用いられている。RAPD-PCR 法は微量の試料で分析が可能で、簡便である一方、再現性が低いことが指摘されている。一方 RAPD-PCR 法に似た方法に Mini/Microsatellite-Associated Sequence Amplification (MASA) 法が挙げられる。MASA 法ではランダムプライマーの代わりに、ミニまたはマイクロサテライトのコア配列をプライマーとして PCR を行い、より多型性のある領域を増幅する方法である。インドサイ (Ali *et al.*, 1999) などの野生動物でも、種特異的な繰り返し配列の探索に用いられている。

Representational difference analysis (RDA) 法は、2種のゲノム間の変異欠失を簡便かつ効率よく検出するサブトラクション法の1種である (Lisitsyn & Wigler, 1993)。RDA 法では、

representation の過程において、PCR による増幅が 0.1~1.5kb の DNA 断片を優先的に増幅することを利用し、ゲノム DNA の複雑度を下げ単純化し、その後の kinetic enrichment の過程では、2 種類の amplicon (tester と driver) を競合的ハイブリダイゼーションさせ、PCR により tester 特異的 DNA 断片の選択的増幅を行う。kinetic enrichment を繰り返すことで tester 特異的 DNA 断片を濃縮していく手法である。これまで、動物や植物、バクテリアなどの、種や株特異的マーカー (Murakami *et al.*, 2002、Nekrutenko *et al.*, 1999)、性特異的マーカー (Pérez-Pérez & Barragán, 1998) を探索するのに用いられている。

これら 4 種類の方法を用いて、ケープペンギンに特異的な DNA 配列を探索した。

## 2 方法

### 2-1 材料と DNA の抽出

ペンギン科では、フンボルトペンギン属のケープペンギン、マゼランペンギン、フンボルトペンギン、マカロニペンギン属のイワトビペンギン (*Eudyptes chrysocome*)、アデリーペンギン属のアデリーペンギン (*Pygoscelis adeliae*)、ジェンツーペンギン (*Pygoscelis papua*)、コウテイペンギン属のキングペンギン (*Aptenodytes patagonicus*) を用いた。ペンギンのサンプルは八景島シーパラダイス、伊豆三津シーパラダイス、マリンピア松島水族館、京都水族館、すみだ水族館、東武動物公園から提供いただいた。

ペンギン以外の鳥類として、ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*)、カワウ (*Phalacrocorax carbo*)、コサギ (*Egretta garzetta*)、アオサギ (*Ardea cinerea*)、ヤマドリ (*Syrnaticus soemmerringii*)、カラス (*Corvus spp.*)、カモ (*Anas spp.*)、ミドリコンゴウインコ (*Ara militaris*) からも DNA を抽出した。サンプルは麻布大学解剖学第二研究室、NPO 法人四国自然史科学研究センター、東武動物公園、A.Land おゆみ野動物病院から提供していただいた。

DNA の抽出は血液または組織から行なった。血液は Gen とるくん血液用 (TaKaRa Bio) または Genra Puregene®Blood Kit (QIAGEN) を用い、組織は Get pureDNA Kit-Cell, Tissue (Dojindo) を用い、添付のマニュアルに従って抽出した。DNA 溶液の濃度は波長 260nm での吸光度から求めた。

### 2-2 制限酵素切断によるサテライト DNA の検出法

#### 2-2-1 サテライト DNA の単離

ケープペンギンのゲノム DNA を 78 種類の制限酵素 (表 1) で一晩処理し、1.5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色しバンドを確認した。78 種類の制限酵素のうち、Stu I、BmeT110 I、EcoO109 I、BmeT120 I で切断した際に、明確なバンドを得た。

中でも Stu I、BmeT110 I 処理で得られたバンドを、Fast Gene™ Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics) を用いてアガロースゲルから精製した。

#### 2-2-2 特徴的 DNA 断片のクローニングと配列の決定

TA クローニングには pGEM-T Easy Vector System II (Promega) または平滑末端のクローニングには pUC119 ベクター (TaKaRa Bio) を用いた。ライゲーション反応はキットに付属の T4 DNA Ligase と 2×Rapid Ligation Buffer を用いて行い、トランスフォーメーションには *E.coli* JM109 Competent Cell (TaKaRa Bio) を使用した。コンピテントセル 25µl とライゲーション液 4µl を混和し、氷中で 30 分静置した。42°C で 1 分間インキュベートした後、滅菌蒸留水を 200µl 加えアンピシリン (50µg/ml) 加 LB 培地に播種し、37°C で一晩培養した。

インサートサイズの確認のために、PCR を用いてプラスミドベクターに対するフォワードプライマーとリバースプライマーによりインサート部分を増幅した。PCR 反応には、AmpliTaq Gold® 360 Master Mix を用い、0.2µM 各プライマーを加えて全量 25 µl とした。初期熱変性を 95°C 3 分間の後、熱変性 95°C 30 秒間、55 °C 30 秒間、伸長反応 72°C 30 秒間のセットを 32 サイクル、最終反応として伸長反応 72 °C 5 分間の PCR 条件で行なった。PCR 産物は 1.5% アガロースゲル電気泳動を行い、目的のサイズのインサートを含むことを確認した。

PCR 産物は exonuclease I (Wako) と shrimp alkaline phosphatase (TaKaRa Bio) を用いて精製し、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer によって配列を決定した。

#### 2-2-3 特異的プライマーの作製と作製したプライマーによる PCR 反応

Amplify version 3.1.4/3X を用いて、決定配列から新規プライマーを作製した。PCR 反応は 1×buffer、20 mM Tris-HCl、pH8.0、100 mM KCL、2 mM MgCl<sub>2</sub>、200 µM dNTPs、1.25 units Ex Taq® HS DNA polymerase (TaKaRa Bio)、各プライマー0.2 µM を含んだ全量 50µl で行い、初期熱変性を 95°C 3 分間の後、熱変性 95°C 30 秒間、アニーリング温度 65°C 30 秒間、伸長反応 72°C

30秒間のセットを27サイクル、最終反応として伸長反応72℃5分間の条件で行なった。1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、増幅されたDNA断片がケーブペンギンに特異的かどうか検討した。

#### 2-2-4 サザンブロットハイブリダイゼーション

2-2-3で得られたPCR産物の電気泳動像において、100~800bpの大きさのバンドをゲルから切り出し、Fast Gene™ Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics)を用いて精製した。精製DNAをpGEM-T Easy Vector System II (Promega)を用いてTAクローニングし、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzerによって配列を決定した。決定配列のうち、190bpの繰り返し単位が3回繰り返されている配列をインサートとしたプラスミドをFast Gene™ Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics)を用いて精製した。精製したプラスミドDNAをテンプレートとして、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche)を用いて、ジコキシゲニン (DIG) 標識プローブとした。

各種ゲノムDNA 2.5μgを制限酵素で一晩処理し、1%アガロースゲルで100V 60分間電気泳動を行なった。エチジウムブロマイドで染色し、バンドを確認した後、0.4N NaOHで30分間浸漬し変性させ、その後中和溶液(0.5M Tris-HCl、pH7.5、1.5M NaCl)で30分間浸漬した。ナイロンメンブレン Biodyne® Plus Nylon Membrane (Pall Corporation)を用いてキャピラリートランスファーを行なった。終了後、UVクロスリンカーにて紫外線を120mJ/cm<sup>2</sup>照射しDNAを固定した。

DIGラベルしたDNAプローブとブロット上のDNAを、DIG Easy Hyb (Roche)を用いて42℃で一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション終了後、DIG Wash and Block Buffer Set (Roche)を用いてメンブレンを洗浄した。Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche)、CDP-Star, ready-to-use (Roche)を使用した化学発光法によりハイブリッドされたDNAを検出し、メンブレンをX線フィルムに感光させ可視化した。

## 2-3 RAPD-PCR 法

### 2-3-1 ランダムプライマーによる PCR 反応

10~13bp のランダムプライマー12 種類 (表 2) を使用した。ケープペンギン、フンボルトペンギンの DNA を用いて、1×buffer、20 mM Tris-HCl、pH8.0、100 mM KCL、2 mM MgCl<sub>2</sub>、200 μM dNTPs、1.25 units Ex Taq<sup>®</sup> HS DNA polymerase (TaKaRa Bio)、各プライマー0.2 μM を含んだ全量 50μl で PCR 反応を行った。PCR は初期熱変性を 95°C 3 分間の後、熱変性 95°C 30 秒間、アニーリング温度 36°C 30 秒間、伸長反応 72°C 30 秒間のセットを 40 サイクル、最終反応として伸長反応 72 °C 5 分間の条件で行なった。1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、ケープペンギンに特徴的と思われるバンドを選び、Fast Gene<sup>™</sup> Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics) を用いてアガロースゲルから精製した。

### 2-3-2 特徴的 DNA 断片のクローニングと配列の決定

選んだ DNA 断片は、2-2-2 と同様に、pGEM-T Easy Vecter System II (Promega) を用いて TA クローニングを行ない、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer によってインサート DNA の配列を決定した。

### 2-3-3 特異的プライマーの作製と作製したプライマーによる PCR 反応

2-2-3 と同様に、新規プライマーを作製し PCR を行い、増幅された DNA 断片がケープペンギンに特異的かどうか検討した。

## 2-4 MASA 法

### 2-4-1 ミニ/マイクロサテライトコアプライマーによる PCR 反応

ミニ/マイクロサテライトのコア配列である 6 種類のプライマー (表 3) を使用した。PCR 反応には、AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix を用い、0.4μM 各プライマーを加えて全量 25 μl とした。初期熱変性を 95°C 3 分間の後、熱変性 95°C 30 秒間、至適アニーリング温度 30 秒間、



伸長反応 72°C 30 秒間のセットを 35 サイクル、最終反応として伸長反応 72 °C 5 分間の PCR 条件で行なった。PCR 産物は 1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、ケーブペンギンに特徴的と思われるバンドを選び、Fast Gene™ Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics) を用いてアガロースゲルから精製した。

#### 2-4-2 特徴的 DNA 断片のクローニングと配列の決定

選んだ DNA 断片は、2-2-2 と同様に、pGEM-T Easy Vector System II (Promega) を用いて TA クローニングを行ない、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer によってインサート DNA の配列を決定した。

#### 2-4-3 特異的プライマーの作製と作製したプライマーによる PCR 反応

2-2-3 と同様に、新規プライマーを作製し PCR を行い、増幅された DNA 断片がケーブペンギンに特異的かどうか検討した。

### 2-5 RDA 法

#### 2-5-1 ゲノム DNA の制限酵素消化

ケーブペンギン、フンボルトペンギン、ジェンツーペンギンのゲノム DNA を制限酵素 Bgl II、HindIII、BamH I を用いて一晩消化した。1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、完全消化を確認し PCI 抽出を行なった。3M 酢酸ナトリウムとイソプロパノールを用いて DNA を沈殿させ、滅菌蒸留水で溶出した。今回行なった tester と driver の組み合わせは表 4 に示した。

#### 2-5-2 Amplicon の作製

制限酵素消化ゲノム DNA に、各制限酵素に対応した R24/12 アダプター (表 5) をライゲーションした。R24 配列をプライマーとし、Whole Genomic PCR を行なった。PCR 反応は 1×buffer、20 mM Tris-HCl、pH8.0、100 mM KCL、2 mM MgCl<sub>2</sub>、320 μM dNTPs、3.75 units Ex Taq® HS DNA polymerase (TaKaRa Bio)、各プライマー1.2 μM を含んだ全量 100μl で PCR 反応を行

った。PCR は 72°C 5 分間の後、95°C 1 分間、72°C 3 分間のセットを 20 サイクル、最終反応として 72 °C 10 分間の条件で行なった。1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、増幅量を見積もり PCI 抽出、イソプロパノール沈殿を行なった。アダプターを除去するために、制限酵素で 2 時間処理し、再び PCI 抽出、イソプロパノール沈殿を行なった。tester amplicon のみ Amicon Ultra -0.5 (Millipore) を使用し精製した。

### 2-5-3 1st round RDA

tester amplicon に、各制限酵素に対応した J24/12 アダプター (表 5) をライゲーションした。ライゲーション済み tester amplicon と driver amplicon を Bgl II、BamH I では 1 : 100 で、Hind III では 1 : 40 で混和し、PCI 抽出後、8 $\mu$ l のハイブリダイゼーションバッファー (30mM EPPS pH 8.2、3mM EDTA pH8.0) に溶解し、67°C で 24 時間ハイブリダイズさせた。

ハイブリダイゼーション溶液をテンプレートとして、1 $\times$ buffer、20 mM Tris-HCl、pH8.0、100 mM KCL、2 mM MgCl<sub>2</sub>、320  $\mu$ M dNTPs、3.75 units Ex Taq<sup>®</sup> HS DNA polymerase (TaKaRa Bio)、各プライマー1.5 $\mu$ M を含んだ全量 100 $\mu$ l で PCR 反応を行った。PCR は 72°C 5 分間の後、95°C 1 分間、70°C 3 分間または 72°C 3 分間のセットを 10 サイクル、最終反応として 72 °C 10 分間の条件で行なった。反応後の PCR 産物は PCI 抽出、イソプロパノール沈殿を行い、Mung Bean nuclease 処理を行なった。

Mung Bean nuclease 処理後の PCR 産物をテンプレートとして、1 $\times$ buffer、20 mM Tris-HCl、pH8.0、100 mM KCL、2 mM MgCl<sub>2</sub>、320  $\mu$ M dNTPs、3.75 units Ex Taq<sup>®</sup> HS DNA polymerase (TaKaRa Bio)、各プライマー1.5 $\mu$ M を含んだ全量 100 $\mu$ l で PCR 反応を行った。PCR は 72°C 5 分間の後、95°C 1 分間、70°C 3 分間または 72°C 3 分間のセットを 20 サイクル、最終反応として 72 °C 10 分間の条件で行なった。1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、増幅量を見積もり PCI 抽出、イソプロパノール沈殿を行なった。アダプターを除去するために、制限酵素で 2 時間処理し、再び PCI 抽出、イソプロパノール沈殿を行なった。

#### 2-5-4 2nd round RDA

1st round RDA と同様に 2nd round RDA を行なった。アダプターは各制限酵素に対応した N24/12 アダプター (表 5) を使用した。Bgl II、BamH I では 1 : 800 で、HindIII では 1 : 400 の濃度でハイブリダイスさせた。

#### 2-5-5 3rd round RDA

2nd round RDA と同様に 3rd round RDA を行なった。アダプターは各制限酵素に対応した J24/12 アダプターを使用した。tester amplicon と driver amplicon の濃度は適宜調整してハイブリダイスさせた。

#### 2-5-6 特徴的 DNA 断片のクローニングと配列の決定

最終的に残った断片は Fast Gene™ Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics) を用いてアガロースゲルから精製した。2-2-2 と同様に、pGEM-T Easy Vector System II (Promega) を用いて TA クローニングを行ない、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer によってインサート DNA の配列を決定した。

#### 2-5-6 特異的プライマーの作製と作製したプライマーによる PCR 反応

2-2-3 と同様に、新規プライマーを作製し PCR を行い、増幅された DNA 断片がケーペンギンに特異的かどうか検討した。

#### 2-5-7 サザンハイブリダイゼーション

特徴的だった DNA 断片をインサートとしたプラスミド DNA は、2-2-4 と同様に PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) を用いて、ジコキシゲニン標識プローブとした。各種ペンギン、鳥類のゲノム DNA 2.5µg とサザンハイブリダイゼーションを行い、特徴的 DNA 断片の各ゲノム中の有無について検討した。

### 3 結果

#### 3-1 制限酵素切断によるサテライト DNA の検出法

78 種類の制限酵素を用いて、ケープペンギンのゲノム DNA を消化したところ、Stu I、BmeT110 I、EcoO109 I、BmeT120 I 処理で、明確なバンドが得られた (図 1)。BmeT110 I 処理で得られたバンドについてクローニングを行い、190bp の配列を決定した (図 2、Sde-Bme 配列)。Sde-Bme 配列は BmeT110 I 以外の 3 種類の制限酵素 Stu I、EcoO109 I、BmeT120 I の認識配列を持っており、さらに配列の異なる変異体が存在していた。Stu I についても同様に、制限酵素処理後、配列を決定したが、Sde-Bme 配列と同様の配列であった。

この Sde-Bme 配列を元に新規プライマー (図 2、表 6、Sde-Bme F、Sde-Bme R) を作製し、ペンギン類、その他鳥類について PCR を行なったところ、ペンギン科に共通して 190bp 間隔のラダー状のバンドが観察された。ペンギン以外の鳥類ではバンドは見られなかった (図 3)。

BmeT110 I 処理したケープペンギンのゲノム DNA と、DIG 標識した Sde-Bme 配列のサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、シグナルはラダー状に検出された (図 4)。以上のことから PCR の結果と合わせて、Sde-Bme 配列はゲノム中では縦列反復配列として存在していると考えられた。BmeT110 I 処理をオーバーナイトで行い、完全分解させたケープペンギンゲノム DNA でも 1 つのスポットとはならず、ラダー状のシグナルとなったことから、縦列反復配列のなかには BmeT110 I の認識配列が欠けている変異体の存在が確認できた。ケープや、マゼラン、フンボルトペンギンのゲノム DNA とのハイブリダイゼーションでは、縦列反復配列が検出されたのに対し、キングやアデリーペンギンでは大きな塊として検出された (図 5)。さらに、HindIII で消化したケープペンギンのゲノム DNA と、DIG 標識した Sde-Bme 配列とのサザンハイブリダイゼーションでは、シグナルは大きな塊として検出された。一方で、キングペンギンのゲノム DNA とのサザンハイブリダイゼーションでは、縦列反復配列が検出された (図 6)。

### 3-2 RAPD-PCR 法

2-3-1 に示した 12 種類のランダムプライマーのうち、N9 プライマーで PCR を行なった際に、ケープペンギンに特徴的なバンドを得た。そこで、クローニングを行ない、776bp の配列を決定した (図 7、RAPD 配列)。この RAPD 配列を元に新規プライマー (図 7、表 6、N9-RAPD F、N9-RAPD R) を作製し、ペンギン科、その他鳥類について PCR を行なったところ、ペンギン科に共通して 635bp のバンドが観察された (図 8)。ペンギン以外の鳥類ではバンドは見られなかった。

### 3-3 MASA 法

2-4-1 に示したミニ/マイクロサテライトのコア配列である 6 種類のプライマーのうち、33.6d プライマーで PCR を行なった際に、ケープペンギンに特徴的なバンドを得た。そこで、クローニングを行ない、540bp の配列を決定した (図 9、MASA 配列)。この MASA 配列を元に新規プライマー (図 9、表 6、33.6-MASA F、33.6-MASA R) を作製し、ペンギン科、その他鳥類について PCR を行なったところ、ペンギン科の中でもフンボルトペンギン属のケープペンギン、マゼランペンギン、フンボルトペンギン、マカロニペンギン属のイワトビペンギンに共通して 321bp のバンドが観察された。一方でアデリーペンギン属のアデリーペンギン、ジェンツーペンギン、コウテイペンギン属のキングペンギンや、ペンギン目と比較的近縁とされているカツオドリ目のカワウでは、異なるサイズのバンドが観察された (図 10)。このバンドについてダイレクトシーケンスを行なったところ、一部に挿入のみられる配列であった。ペンギン以外の鳥類ではバンドは見られなかった。

### 3-4 RDA 法

tester としてケープペンギンゲノム DNA、driver としてフンボルトペンギン、ジェンツーペ

ンギンゲノム DNA を用いて、5 種類の組み合わせで RDA 法を行なった (表 4)。

driver にフンボルトペンギンのゲノム DNA を用いた場合は、いずれの制限酵素でも 3rd round 時点でバンドはなく、ケーブペンギン特異的 DNA 配列を得ることはできなかった。

一方で driver にジェンツーペンギンのゲノム DNA を使用し、BamH I 処理を行なった場合は 3rd round めに約 400bp と 500bp 付近に 2 本のバンドが残った (図 11)。この 2 本のバンドをクローニングし、4 種類の配列を得た (図 12-15、RDA-1~4 配列)。そこでそれぞれの配列を元に新規プライマー (図 12-15、表 6) を作製し、ペンギン科、その他鳥類について PCR を行なった。

そのうち RDA-1 配列を基に設計したプライマーを使用し PCR を行なったところ、ペンギン科の中でもフンボルトペンギン属のケーブペンギン、マゼランペンギン、フンボルトペンギン、マカロニペンギン属のイワトビペンギンに共通して 329bp のバンドが観察された。一方で、アデリーペンギン属のアデリーペンギン、ジェンツーペンギン、コウテイペンギン属のキングペンギンや、その他の鳥類ではバンドは検出されなかった (図 16)。

その他の RDA-2、3、4 配列ではペンギン科に共通してのバンドが観察され、ペンギン以外の鳥類ではバンドは見られなかった (図 17-19)。

ペンギン科の間で特徴のあった RDA-1 配列を DIG プローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行なった。PCR でもバンドが検出されたケーブペンギン、マゼランペンギン、フンボルトペンギンでは、サザンハイブリダイゼーションでもシグナルが検出された。PCR でバンドが検出できなかったアデリーペンギン、ジェンツーペンギン、キングペンギンのうち、アデリーペンギンとジェンツーペンギンではシグナルも検出されなかったが、キングペンギンではシグナルが検出された。ペンギン以外の鳥類ではシグナルは検出できなかった (図 20)。

RDA-1 配列をインサート DNA としたプラスミド DNA を 0.1pg、1pg、10pg、100pg、1ng の濃度でブロットィングし検出感度を確認したところ、1ng ではほぼシグナルが検出できな

くなることから、検出限界は 1~10ng の間であると推定された。また、ペンギンサンプルのシグナルと比較したところ、フンボルトペンギン属の中でもケーブペンギン、マゼランペンギンではシグナルは 100ng とほぼ同等の強度のシグナルであり、フンボルトペンギンではやや弱いシグナルであった (図 20)。鳥類の全ゲノムの塩基対はヒトの 3 分の 1 であることや、1 レーンにブロットしたゲノム DNA 量 (2.5 $\mu$ g) から、100ng のシグナル強度は 1 細胞当たり数 10 分子に相当し、RDA-1 配列がゲノム中で占める割合は低いと推定された。

#### 4 考察

本章ではケープペンギンに特異的な DNA 配列を探索した。その結果、制限酵素切断によるサテライト DNA の検出法、RAPD-PCR 法、RDA 法ではペンギン科に共通の 5 配列を得た。そのうちサテライト DNA の探索で得られた Sde-Bme 配列は、サザンハイブリダイゼーションの結果から、フンボルトペンギン属とアデリーペンギン属やコウテイペンギン属のペンギンでは存在様式が異なることが明らかとなった。しかし、ケープペンギンと同じフンボルトペンギン属のペンギン間には、存在様式の違いも見られなかった。MASA 法や RDA 法を用いた場合には、フンボルトペンギン属、マカロニペンギン属に共通の 2 配列を得た。RDA 法で得られた RDA-1 配列は、ケープペンギンからジェンツーペンギンをサブトラクションした際に得られた配列であり、同属のフンボルトペンギンとのサブトラクションは成功しなかった。4 種類の異なる方法を用いたが、ケープペンギンにのみ特異的な DNA 配列は得ることができなかった。

現生するペンギンは 6 属 18 種に分類されているが、これまでペンギン科全体の分類として、形態学的分類、行動学的分類、DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる分類などが行われてきた。Baker ら (2006) は 18 種のペンギンについて、mtDNA の rRNA 12S、16S、cytb、CO I、核 DNA の RAG-1 領域の 5851bp を解析し系統分類を行ない、各ペンギンの分岐時期について推定した。ペンギンの起源は、約 7100 万年前のゴンドワナ大陸であり、現生ペンギンは新世代始新世に出現したとされている。まずコウテイペンギン属が 4000 万年前に、アデリーペンギン属が 3800 万年前に分岐した。フンボルトペンギン属とコガタペンギン属は 2780 万年前にマカロニペンギン属と分岐し、その後フンボルトペンギン属は、コガタペンギン属とは 2510 万年前に分岐した。フンボルトペンギン属内では、610 万年前にフンボルトペンギン、ガラパゴスペンギンと、ケープペンギン、マゼランペンギンが分岐し、350 万年前にケープペンギンとマゼランペンギンが分岐したと推定されている。本研究でも 1 章で mtDNA を用い



た系統解析を行なった際に、フンボルトペンギン属以外のイワトビ、ジェンツー、アデリー、キングペンギンを加えた NJ 法による系統樹を作製した (accession No. AB775513-775518、AB776016-776021) ところ、系統樹は Baker らの系統樹と一致した(データは示していない)。従って、MASA 法や RDA 法でフンボルト、マカロニペンギン属に共通の配列が得られたこと、サテライト DNA の探索で得られた Sde-Bme 配列の存在様式がジェンツー、アデリー、キングペンギンで異なることは、ペンギンの系統関係とも一致している。しかしながら RDA 法で得られた RDA-1 配列のサザンハイブリダイゼーションではキングペンギンにもシグナルが検出されたことから、RDA-1 配列はアデリーペンギン属にのみ存在しない配列なのかもしれない。

一方、MHC クラス II 分子の DRB 領域を用いたフンボルトペンギン属間の系統分類では、フンボルトペンギン属の 4 種間は近縁で、同一のクラスターに分類され、種間でクラスター分けができないことが知られている (Kikkawa *et al.*, 2009、Knafler *et al.*, 2012)。また、チリのプニウィル島では、フンボルトペンギンとマゼランペンギンの生息域が重なっている。プニウィル島では野生下で初めて、mtDNA を用いた PCR-RFLP 法により、フンボルト×マゼラン、フンボルト×ケープの種間雑種の調査が行われ、種間雑種の存在が証明された (Simeone *et al.*, 2009)。Simeone らの報告によれば、飼育下においてもフンボルト×ケープの種間雑種の存在が示唆されており、実際に国内の動物園でも報告されている。

本章の結果からも、フンボルトペンギン属のケープペンギン、マゼランペンギン、フンボルトペンギンの核 DNA には大きな違いがないと考えられた。

## 5 参考文献

Ali, S., Azfer, M. A., Bashambo, A., Mathur, P. K., Malik, P. K., Mathur, V. B., Raha, A.K., & Ansari, S. (1999). Characterization of a species-specific repetitive DNA from a highly endangered wild animal, *Rhinoceros unicornis*, and assessment of genetic polymorphism by microsatellite associated sequence amplification (MASA). *Gene*, 228, 33–42.

Ali, S., Müller, C. R., & Epplen, J. T. (1986). DNA finger printing by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Hum. Genet.*, 74, 239–43.

Baker, A. J., Pereira, S. L., Haddrath, O. P., & Edge, K. A. (2006). Multiple gene evidence for expansion of extant penguins out of antarctica due to global cooling. *Proc. Biol. Sci.*, 273, 11–7.

Epplen, J. T. (1988). On simple repeated GATA/GACA sequences in animal genomes: A critical reappraisal. *J. Hered.*, 79, 409–417.

Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature*, 314, 67–73.

Kikkawa, E. F., Tsuda, T. T., Sumiyama, D., Naruse, T. K., Fukuda, M., Kurita, M., Wilson, R. P., LeMaho, Y., Miller, G. D., Tsuda, M., Murata, K., Kulski, J.K., & Inoko, H. (2009). Trans-species polymorphism of the Mhc class II DRB-like gene in banded penguins (genus *Spheniscus*). *Immunogenetics*, 61, 341–52.

Knafler, G. J., Clark, J. A., Boersma, P. D., & Bouzat, J. L. (2012). MHC diversity and mate choice in the magellanic penguin, *Spheniscus magellanicus*. *J. Hered.*, 103, 759–68.

Lisitsyn, N., & Wigler, M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 259, 946–51.

Murakami, M., Matsuba, C., & Fujitani, H. (2002). Characterization of DNA markers isolated from the gynogenetic triploid gínbuna (*Carassius auratus langsdorfi*) by representational difference analysis. *Aquaculture*, 208, 59–68.

Nekrutenko, A., Makova, K. D., Chesser, R. K., & Baker, R. J. (1999). Representational difference analysis to distinguish cryptic species. *Mol. Ecol.*, 8, 1235–1237.

Pérez-Pérez, J., & Barragán, C. (1998). Isolation of four pig male-specific DNA fragments by RDA. *Anim. Genet.*, 29, 157–8.

Simeone, A., Hiriart-Bertrand, L., Reyes-Arriagada, R., Halpern, M., Dubach, J., Wallace, R., Pütz, K., & Lüthi, B. (2009). Heterospecific pairing and hybridization between wild humboldt and magellanic penguins in southern Chile. *The Condor*, 111, 544–550.

Sullivan, B. A., Blower, M. D., & Karpen, G. H. (2001). Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nat. Rev. Genet.*, 2, 584–96.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531–5.

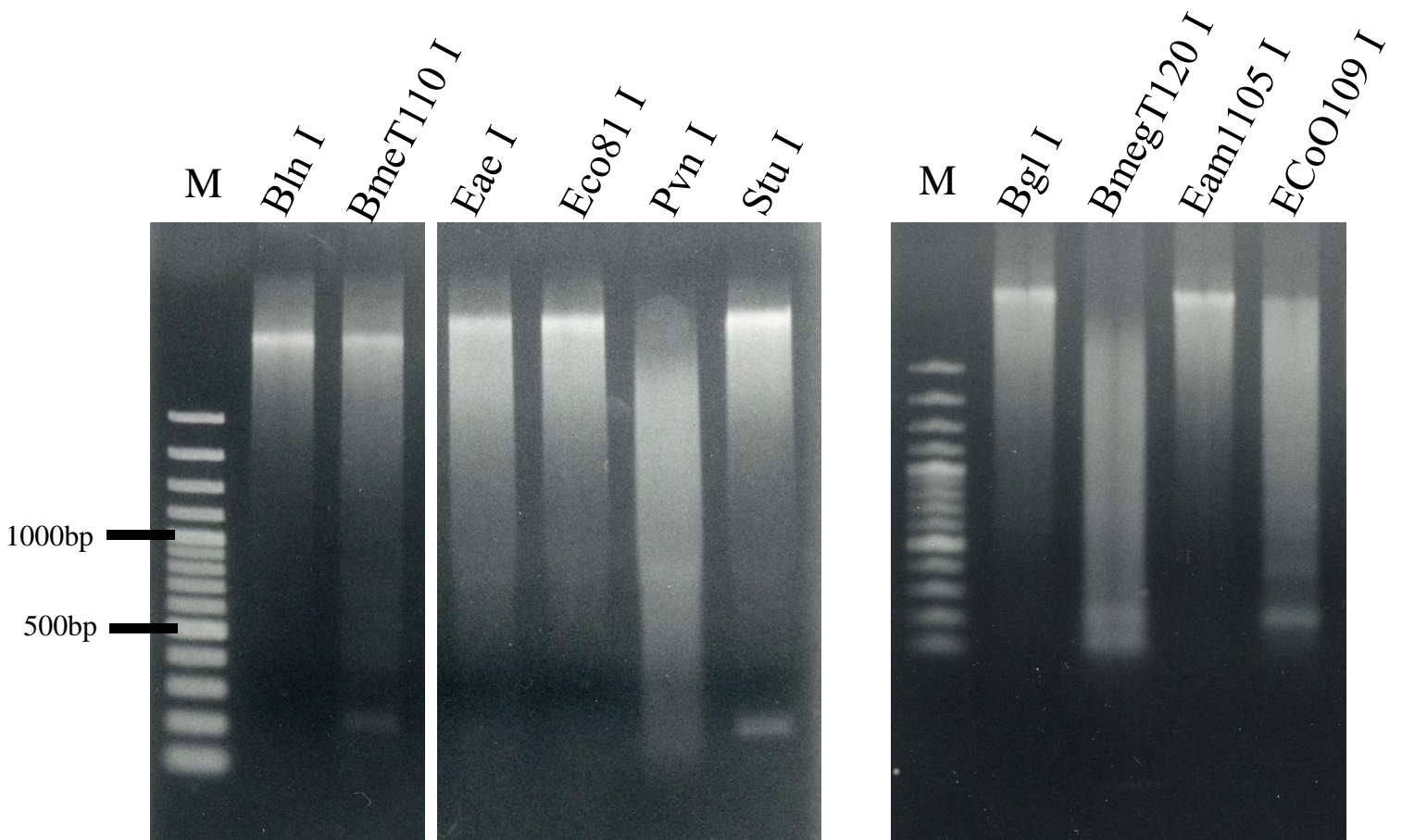


図1 ケープペンギンゲノムDNAの制限酵素処理によって得られたバンド

Stu I、BmeT110 I、EcoO109 I、BmeT120 I 処理で、明確なバンドが得られた。

M: 100bpマーカー

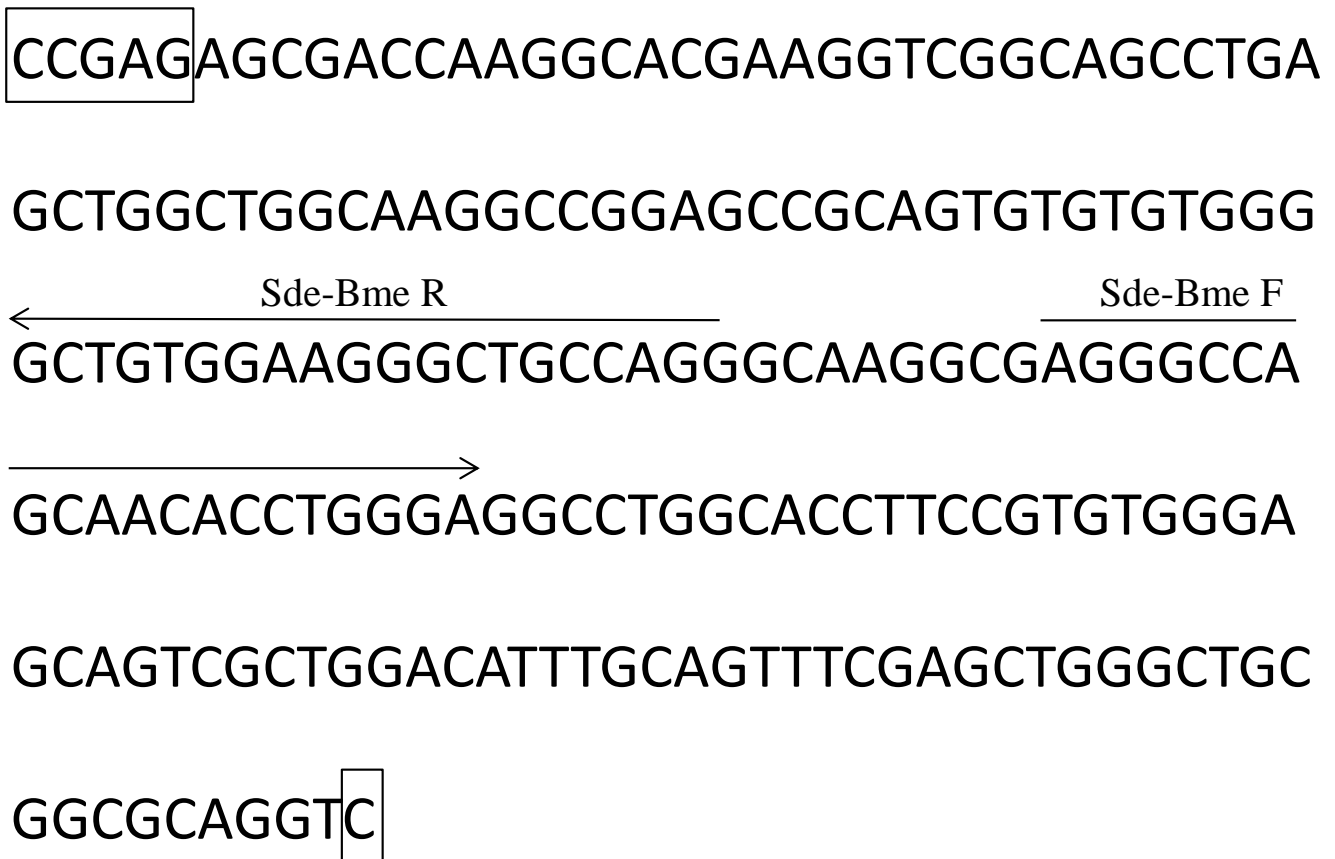


図2 ケープペンギンゲノムDNAのBmeT110 I 処理によって得られた  
Sde-Bme配列 190bp

決定配列には、配列の一部異なる変異体が存在していた。  
枠はBmeT110 I の認識配列、矢印は新規プライマー (Sde-Bme F、Sde-Bme R) の位置を示す。

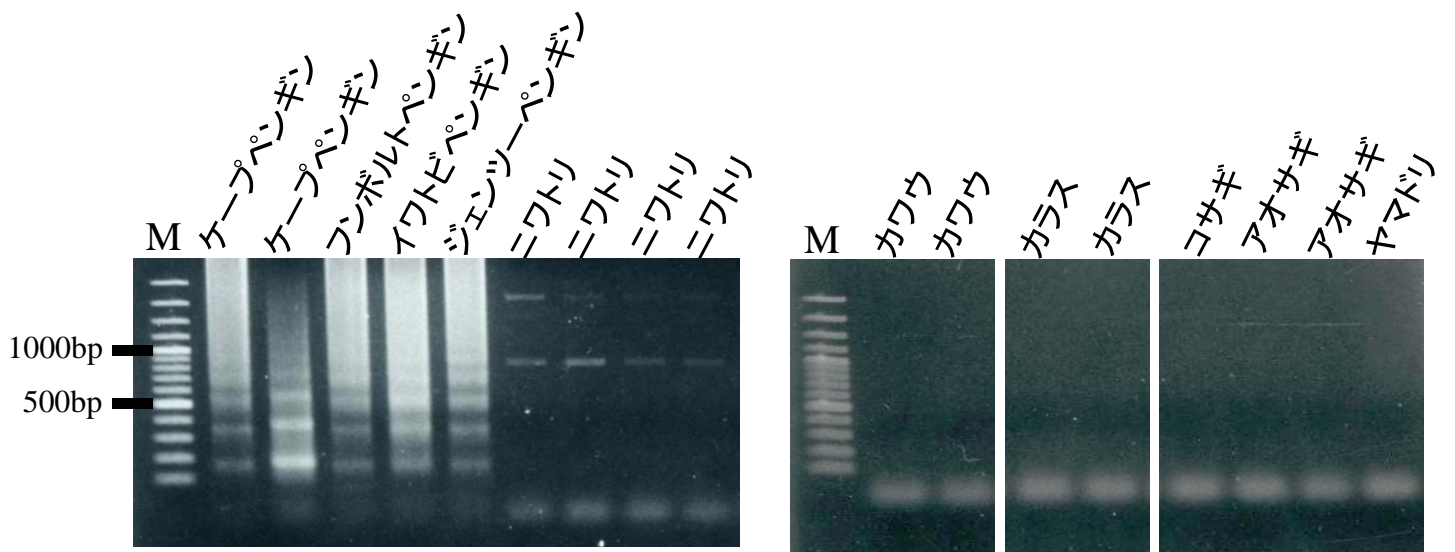
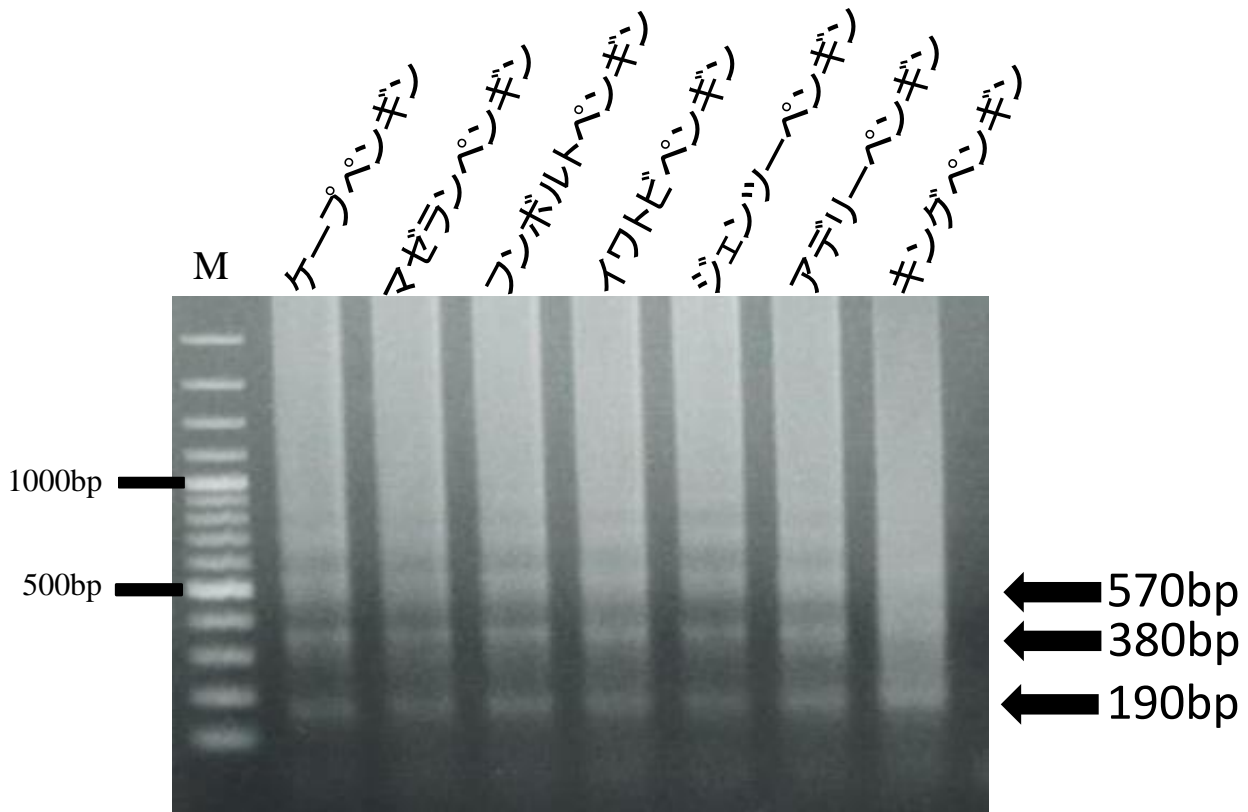


図3 新規プライマー (Sde-Bme F、Sde-Bme R) を用いたPCR

ペンギン科に共通して190bp間隔のラダー状のバンドが観察された。

M: 100bpマーカー

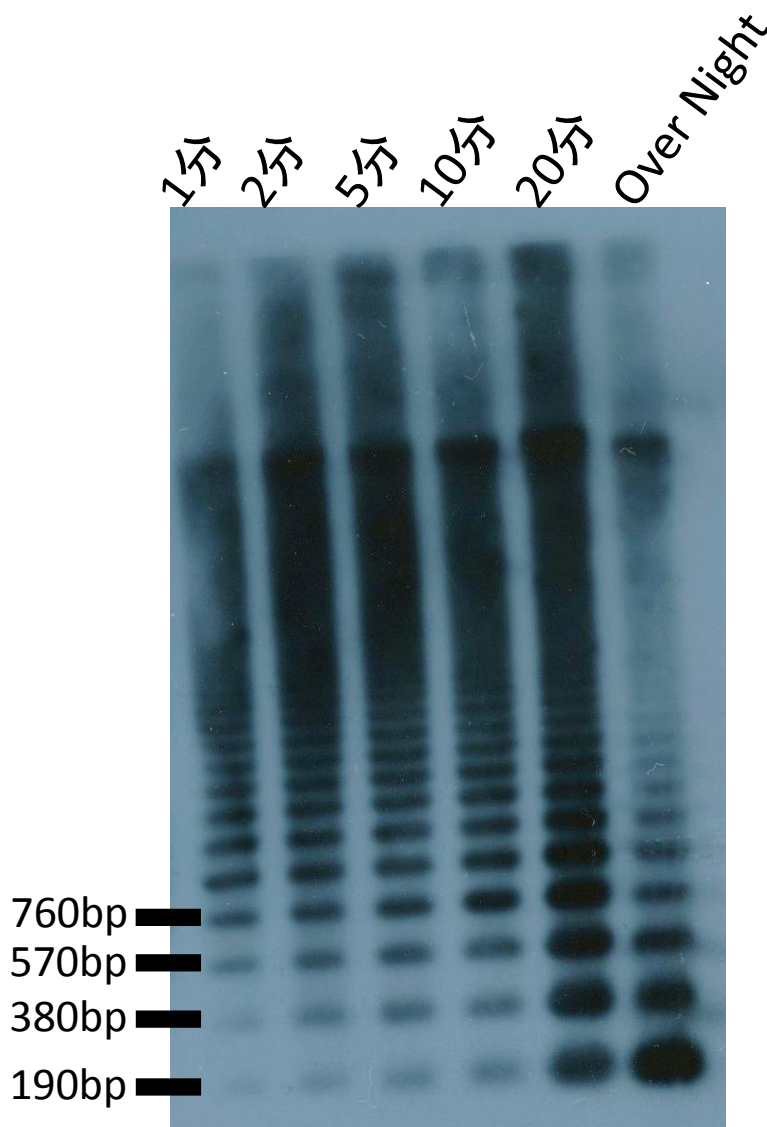


図4 BmeT110 I 処理を行なったケーペンギンゲノムDNAとDIG標識したSde-Bme配列のサザンハイブリダイゼーション

シグナルはラダー状に検出され、Sde-Bme配列はゲノム中では縦列反復配列として存在していると考えられた。

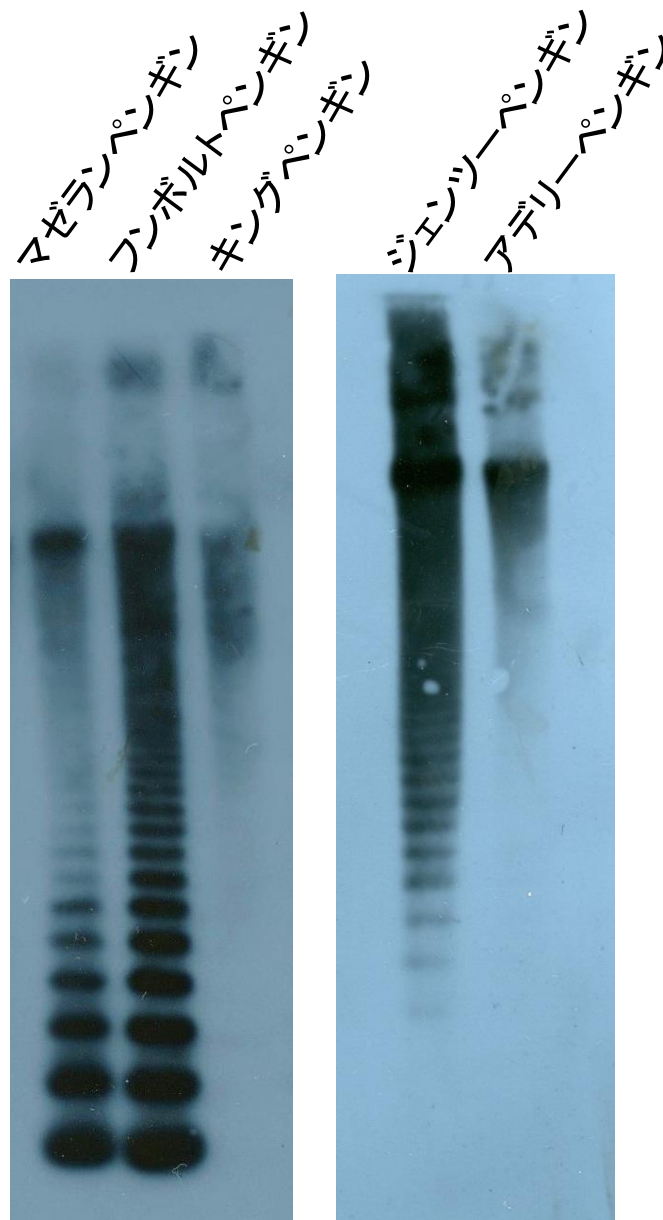


図5 BmeT110 I 処理を行なった各種ペンギンゲノムDNAとDIG標識したSde-Bme配列のサザンハイブリダイゼーション

マゼランペンギン、フンボルトペンギンのゲノムDNAとのハイブリダイゼーションでは、縦列反復配列が検出されたのに対し、キングペンギンやアデリーペンギンでは大きな塊として検出された。



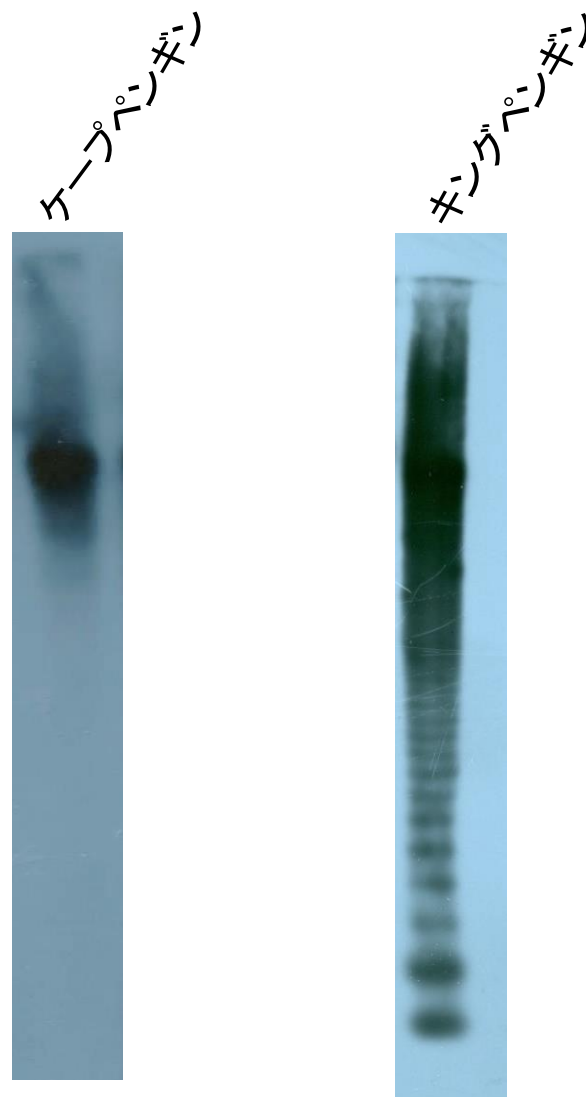


図6 HindIII処理を行なったケーブペンギンおよびキングペンギンゲノムDNAとDIG標識したSde-Bme配列のサザンハイブリダイゼーション

ケーブペンギンのゲノムDNAではシグナルは大きな塊として検出された。一方で、キングペンギンのゲノムDNAとのハイブリダイゼーションでは、縦列反復配列が検出された。

TTGCCGGCTTGAATGTCACCCAGTGGTGCTGCCCCTGCAGCCG

N9-RAPD F →

CGCAGCCCCTGGGCTCCGTGCTATAAATAGCCTCCGCCTGTGTC  
TGGCCGCTGCAAGAGCAAGTGGCAATTAAGGCATTGGGGAG  
CAAAGTGGTGGGGCAGCCCCCTTGCCTGCACACCAGGGCATC  
GTGGGGCCAACCAGCTCCCCATGCTGGCAGTGCCCAGCCCTTC  
CCCGAAATCCTGGGGGAGACTGCGGGGACCCTAGGGATCAGG  
AACCTTGCTTGGGTGAAGGGGAGTGACGGAGAACATGGTTGT  
CTTCTCCCTTCCACCAATACATGTACCGAGGCCTGTCCCAAAGC  
CCTCCAGAAGGATGTATTCTCCACTAACCATCACAGCATCACTGC  
AACCTTAATCCCCCTGTGGCTACTGGCCTGTTGTCTTTAGGGGG  
AAATGCCGCCATGTGACGCAAAAGGGGTGCTCCGTGTTATGCA  
GAAGACACACAGTCTCACCGCTCTTTCCTTGTTCTATCCCAGTGC  
TTTGAAATAAAGGTGAGGCTGCACGTTCAGGGCTCGTGCTTAC  
AGGGGATACTGCCTGAATGGGGCAGAGCACCGGTCCATATTTG  
CACATCCATTGATAAAGCATCTGAGCACTGGTCTGACTCATCTGG  
CATCTCATCTCCTGGCTCAGGTCACAGCCATCCATGTTAGAGCAC

← N9-RAPD R

CTGAGAGCAGCTGATACCAAATAATGCAGGGAGAGATGGACAC  
CTCTTGAGCTCCCTAGACATCTGCAAGCCGGCAA

図7 N9プライマーを用いたRAPD-PCR法によって得られた  
RAPD配列 776bp

矢印は新規プライマー (N9-RAPD F、N9-RAPD R) の位置を示す。

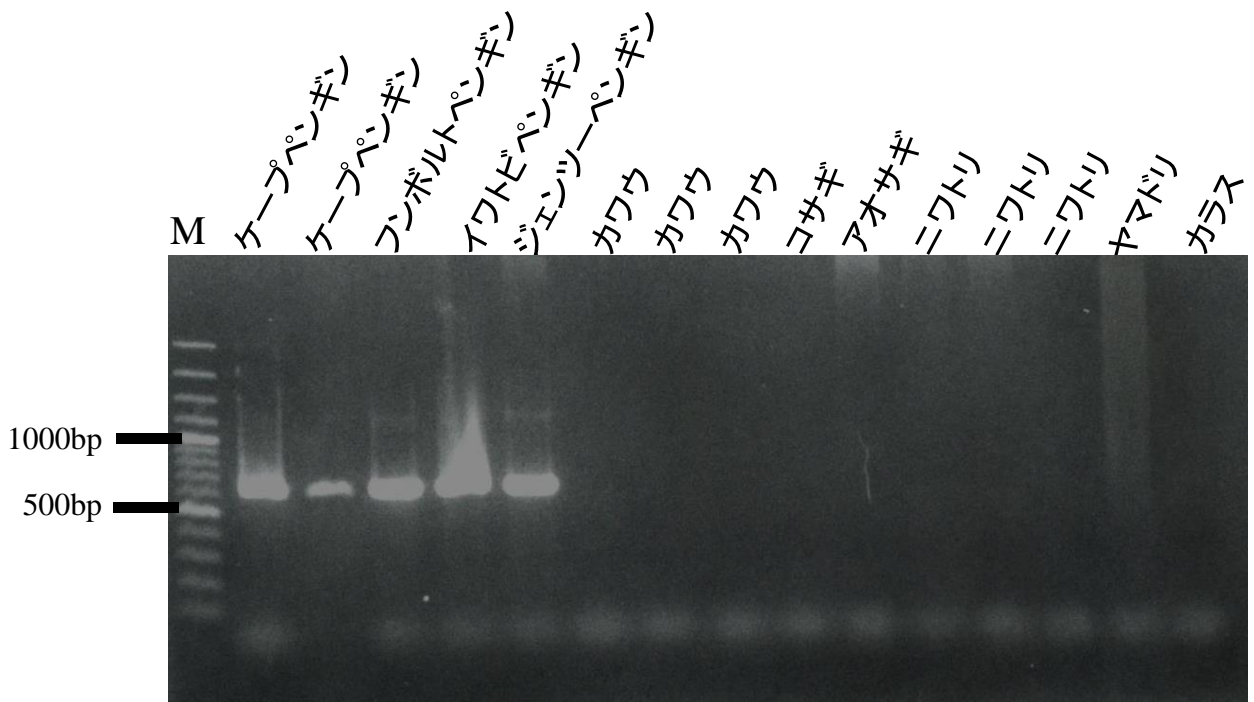
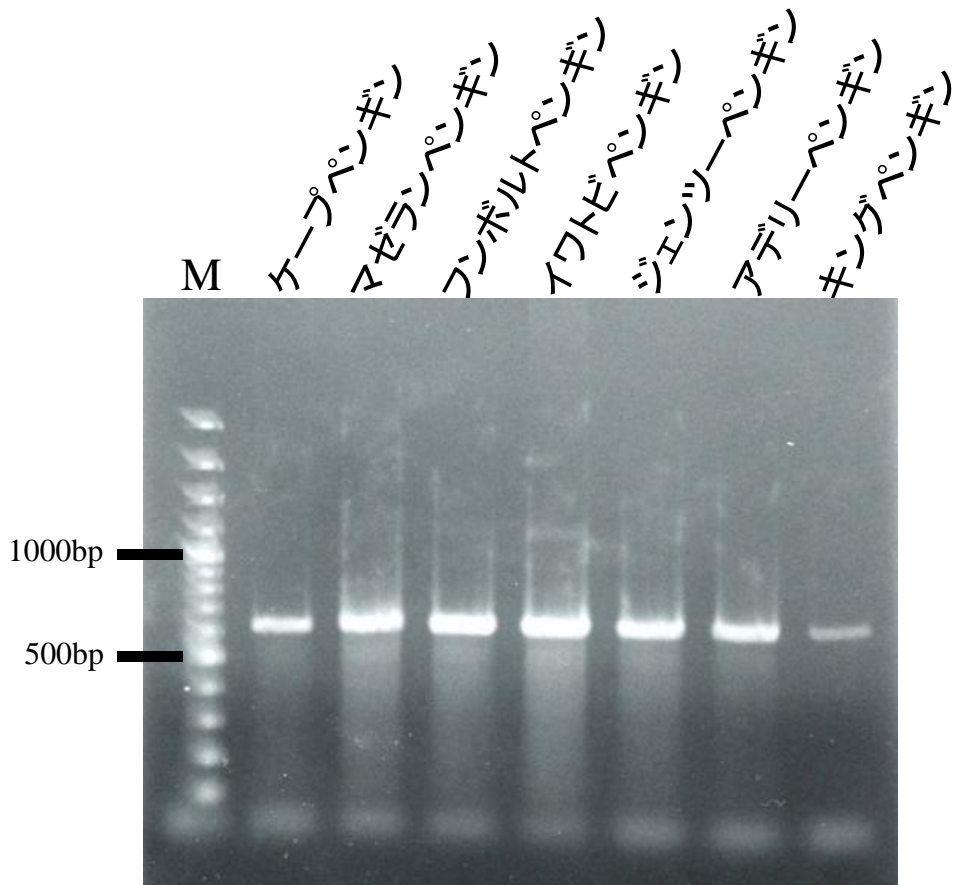


図8 新規プライマー (N9-RAPD F、N9-RAPD R) を用いたPCR

ペンギン科に共通して635bpのバンドが観察された。

M: 100bpマーカー

33.6-MASA F →

TGGAGGAGGGCTGGAGGAGGGAAGCAGCCGTGCTGCGCCAAG  
 CCCGGGGCCACGCAGCCCTCCTTGGAGTGGCGGCGTGGGGCCT  
 GTCCCGAGAACCCTTGGGCAGGAGAGCCTGTGGCAGCAGCAGC  
 AGCGAGCGTTGTTCTGCCGCTCACTGTGTGTTTCCCCTCCTGCC  
 CAGGCCGCCAGGCAGCACGTGAGGATCCAAAGCTACGAGTGGA  
 GCGGGAAAGCGCTAGCACCTCTGGCCCAAGGAGCCTGCTGAC  
 GATTCAACGGTAACGAGCGCCTCCCTCGCTCTGGGGGTCTTGGC  
 CGTGGGGCTGGCAGGAGACTCGGATGAACCAGTGCATCAGCCA

← 33.6-MASA R

TCGGGGGGGACGCACGGCCTCCCGCCGATCAGGCTGCGGGGGTC  
 CCACCGCCTCTCCGCAGGGAGTAGCCAAAGGCTTTAACCCAGCG  
 TCAGCGCAGCAGCTCCGGCCATCCTGGCCACCGGCGAGCTCTGG  
 TTGCCGGCAGAGCCAGCGCACCGTGACCCTGCCCCCCCCGCCCC  
 CTCCTCCAGCCCTCCTCCA

図9 33.6dプライマーを用いたMASA法によって得られた  
 MASA配列 540bp

矢印は新規プライマー(33.6-MASA F、33.6-MASA R)の位置を示す。

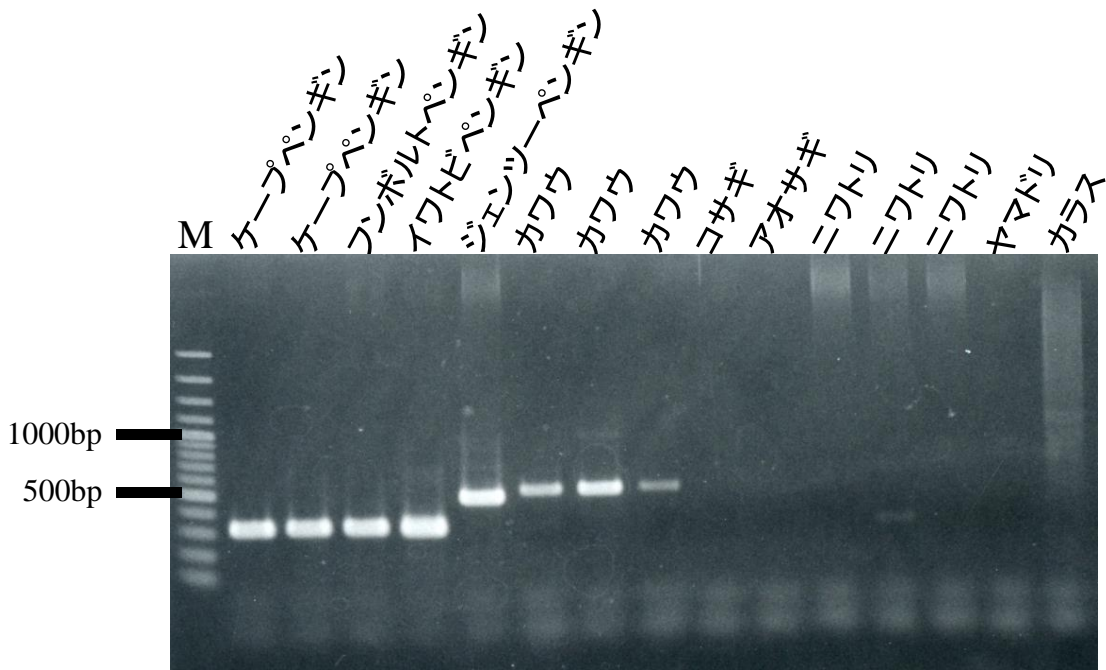
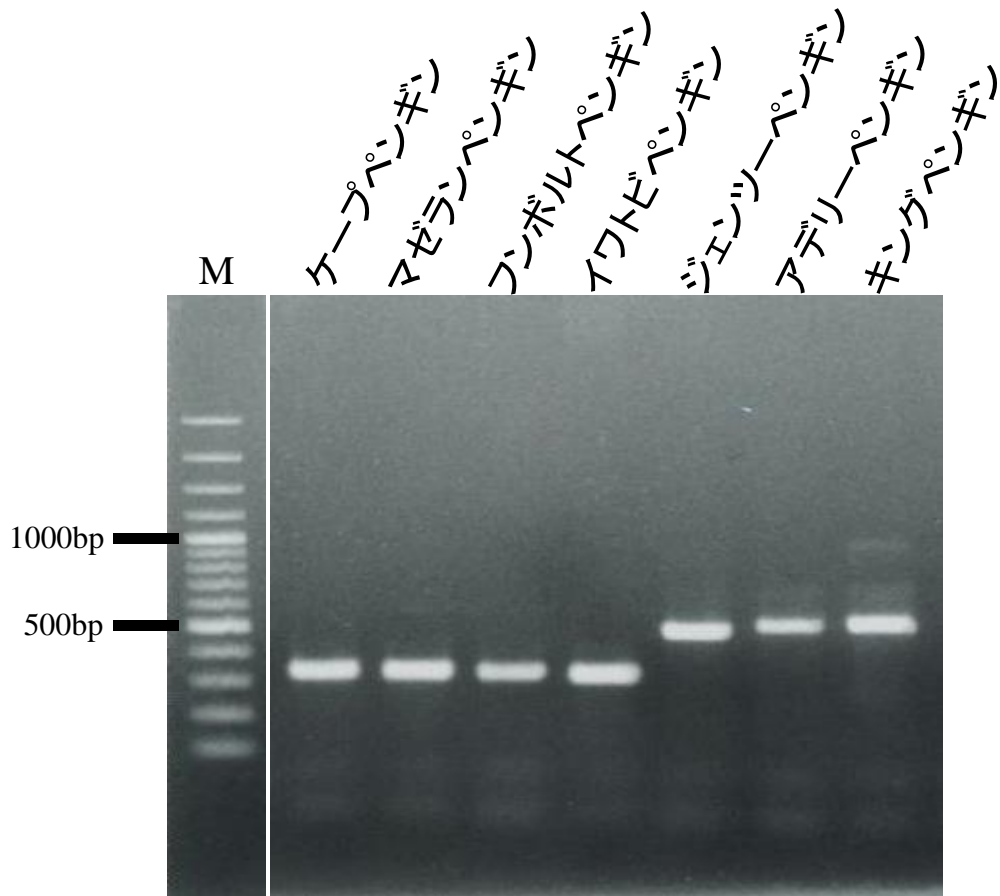


図10 新規プライマー(33.6-MASA F、33.6-MASA R)を用いたPCR

フンボルトペンギン属のケープ、マゼラン、フンボルトペンギン、マカロニペンギン属のイワトビペンギンに共通して321bpのバンドが観察された。

M: 100bpマーカー

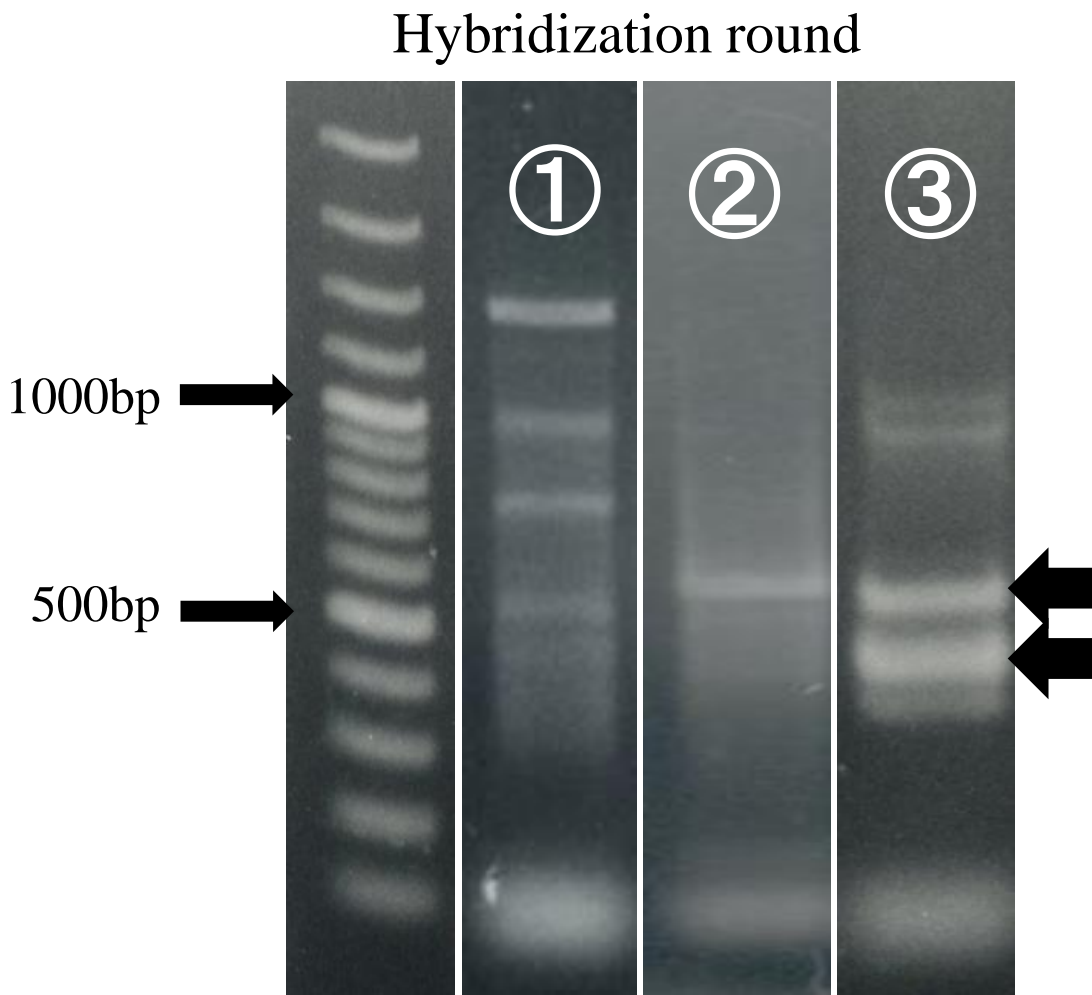


図11 制限酵素BamH、tester ケープペンギン、driverジェンツーペンギンを用いたRDA法の結果

3rd roundめに約400bpと500bp付近に2本のバンドが残った（矢印）。

RDA-1 F →

ACCGACGTCAACTATCCATGAACGGATCCTGTGCGAGCGTA

\_\_\_\_\_

ACTGATGCGTAGCTCTCATGCTACTCTAATACCATCACGCAC  
 AGGTTACAGAAGACTCTGGCTCCAAAGTAAAGAACCAGC  
 TGCACATTACCGGCTCGTTCTTTAGCTTCTCACTTCTCAGG  
 AATGGTATCTGTGAGCCCTACCTGATGGAATTTATGGTATTT  
 TCAAGATGCGTGTCTTAGCCTCAGAGAACTAACTCAATTG  
 AAGAAATGCTTTGGGGAAACATCTCTATCCTTTTCTCTGAA  
 CGTATCTGTATTTTCAGACTGTCTCAAGAGCAGCTGTGAAC  
 ACAACCCACTCGTTCACTACTGTGCTCTAAGCGCTGACTGC

← RDA-1 R

CTGCCCAGCTGGA

図12 RDA法によって得られたRDA-1配列 380bp

矢印は新規プライマー (RDA-1 F、RDA-1 R) の位置を示す。

RDA-2 F →

ACCGACGTCAACTATCCATGAACGGATCCGTCTCGTGATGGG

\_\_\_\_\_

TAGGAGGATGTGCTCTAGAACAGGCATTCCCTGCTGCACCAT  
 CAGAGGGACAGGGCATGATGGCTGCCCTCTCCCGGGGATG  
 GCTGCAGGGGTGTGAAGGGGGTGTGCAGCCAAGGATTCCA  
 AGGGCTGTCCTTCAGAGCAGGGTCCCTGTGCCCCAGGGGCC  
 TTTGTGCCGGGACAGGGACTCTGCCACCCGCCAAGGTCAGC  
 ACTCAGCCTGGCTGGGGATGTTCCCATGGCACTGCAGGGAG  
 AAGCTGTGGGTGCAAGGAGCGACTGCCAGCAGGGCAGGG  
 CAGGGCAGGGTTCCTCTGCTGTCAGGGGGGTTCTATGTGGG  
 TGAGGGCTACTCACAGCTCCAGAGCACCCCCAGGACTTCC

← RDA-2 R

CAGGGCACTGTTCAAGAAGCACAGCAAGGCAGGGGCTACT  
 GGAAAGGTAGGGATCCGTTTCATGGATAGTCGACGTCGGTAAT  
 CGAATT

図13 RDA法によって得られたRDA-2配列 496bp

矢印は新規プライマー (RDA-2 F、RDA-2 R) の位置を示す。



RDA-3 F →

ACCGACGTCGACTATCCATGAACGGATCCTGTGCCTTGCCAC

---

ACACCGTACAAGAAGAGATCAAGCTGGAGGTGAGAGTCTC  
TACGTCATATGCTTATAGGACAATTCAGGGTGGGAGGGAGC  
TCAGGTGGTCTGTAGTCCGATGTCCAGCTCCAAGCAGGGCC  
AGCTCTGAGGTCAGACCAGGTTGCTCAGTCAATGTCAGCGT  
CTACAGAGAGAGCTTACACAGGAACCAGGCATCTAAGACC  
CCATTA AAAAAGAGACAGGCATTTGACCAGCTCCGTGAACA  
CAGTGATCAGGACAGCATGCCTCCGGAGATGCCTGGGAAC  
ATCCACCGTCTTGTCCAGAGGAGCGGGATCCGTTTCATGGAT  
← RDA-3 R

AGTCGACGTCGGTAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGG  
CCGGGAGC

図14 RDA法によって得られたRDA-3配列 416bp  
矢印は新規プライマー (RDA-3 F、RDA-3 R) の位置を示す。

ACCGACGTCGACTATCCATGAACGGATCCCATTTCAG  
GCACTTGCTGAATAATATTTTTCTATCCATGGAAA

RDA-4 F

→  
GATGGTCCAGCAAACGGCTTCCCAGATGGGGCAA  
CAGGTTCTGGTATAAGCGAAACGAGGCTTTTAAAC  
CAGCCACAGTGAAGTCACTCACCCCATTTCAGCAG  
CACTGCATCCCAGCACACTCTTCCCATCAGCCCAAT  
CCCATATTCTTAATTCAGTCCAAACCAGTCCCATTTT  
CAGCTCAAATTCAACACAGTCTAAGGCAGCTAAC  
CCAGTCAAGTCTAGCCTTCCCAGAGCATGCCTATC  
ACAAGCTGCCATCTCAAACCTGCATTCAGATTGCA

RDA-4 R

←  
CTCAGCCCATATAAGTGTCGTTTCAGTTGGATCCGTT

CAT

図15 RDA法によって得られたRDA-4配列 393bp

矢印は新規プライマー (RDA-4 F、RDA-4 R) の位置を示す。

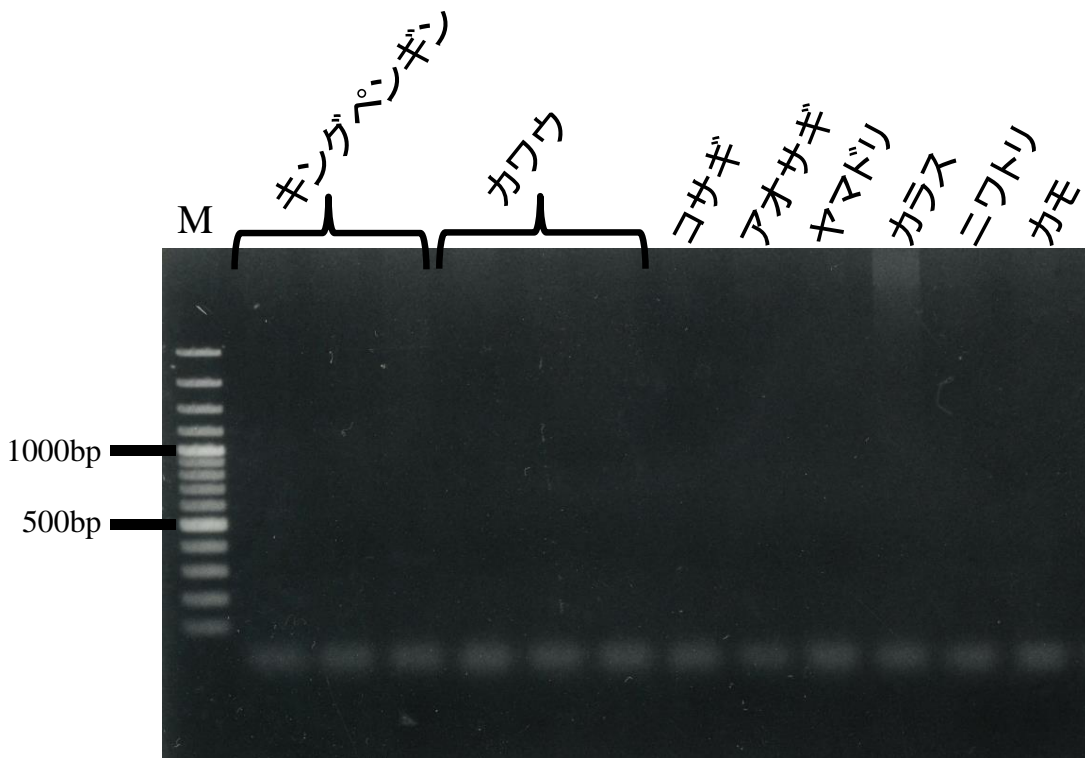
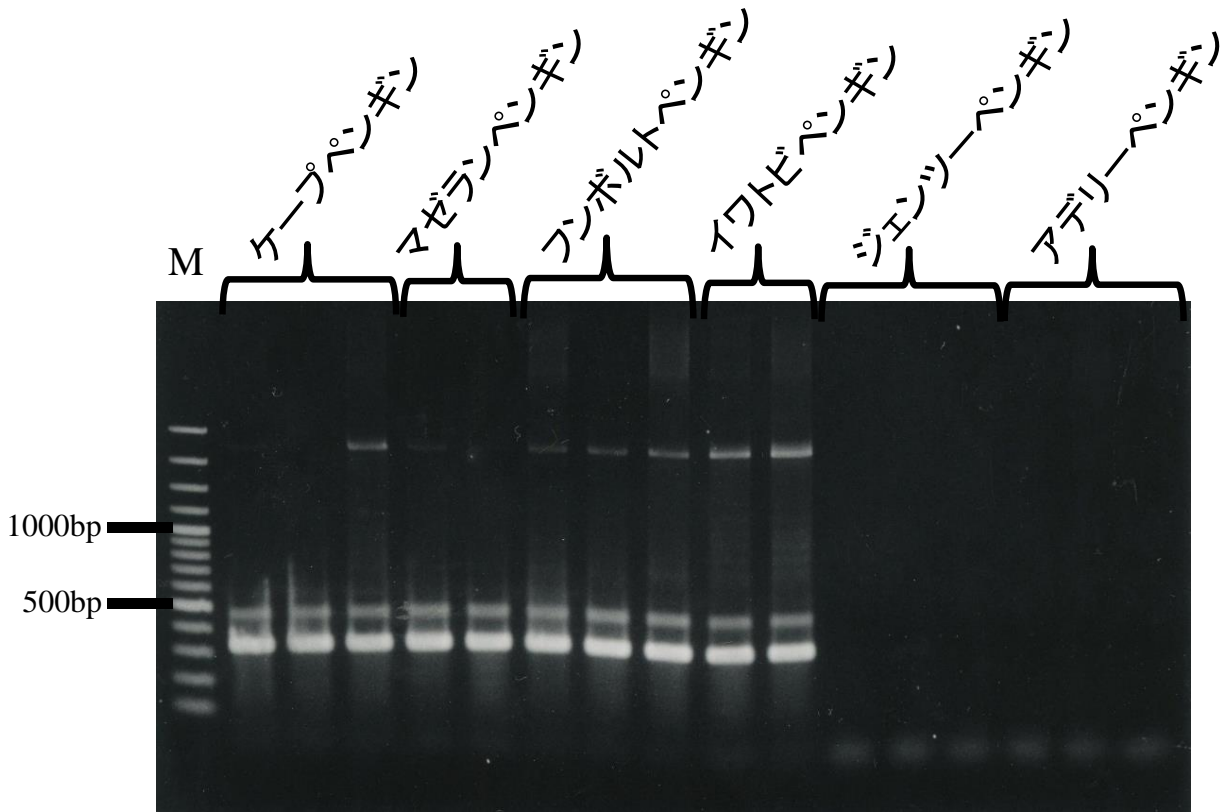


図16 新規プライマー (RDA-1 F、RDA-1 R) を用いたPCR

フンボルトペンギン属のケープペンギン、マゼランペンギン、フンボルトペンギン、マカロニペンギン属のイワトビペンギンに共通して 329bp のバンドが観察された。  
M: 100bp マーカー

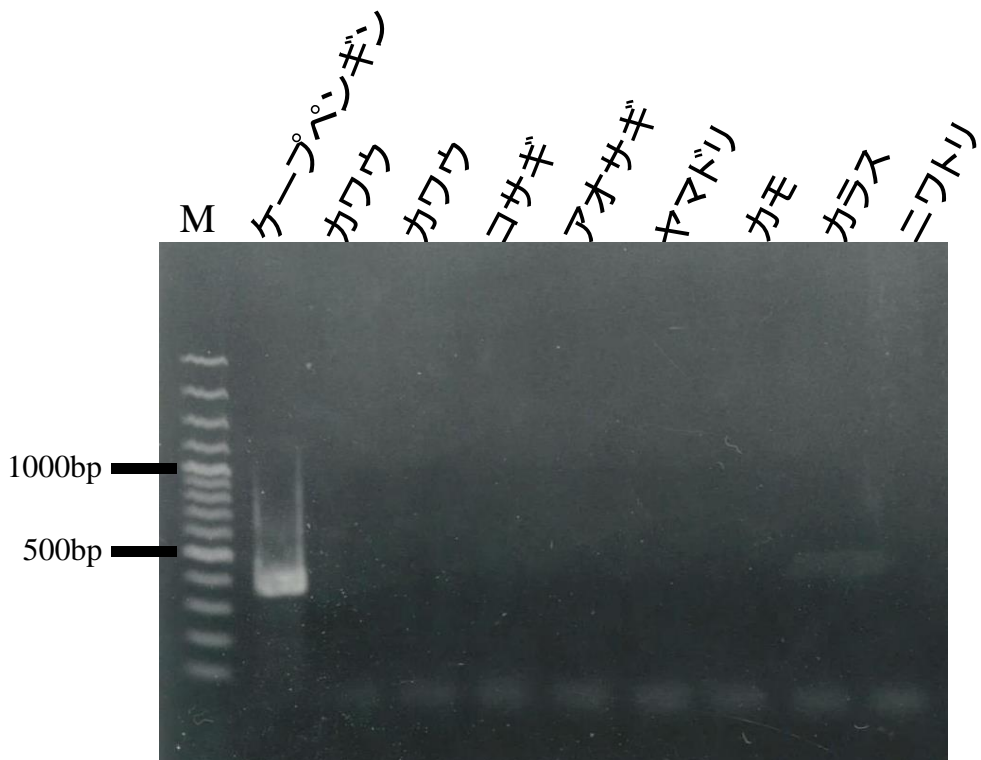
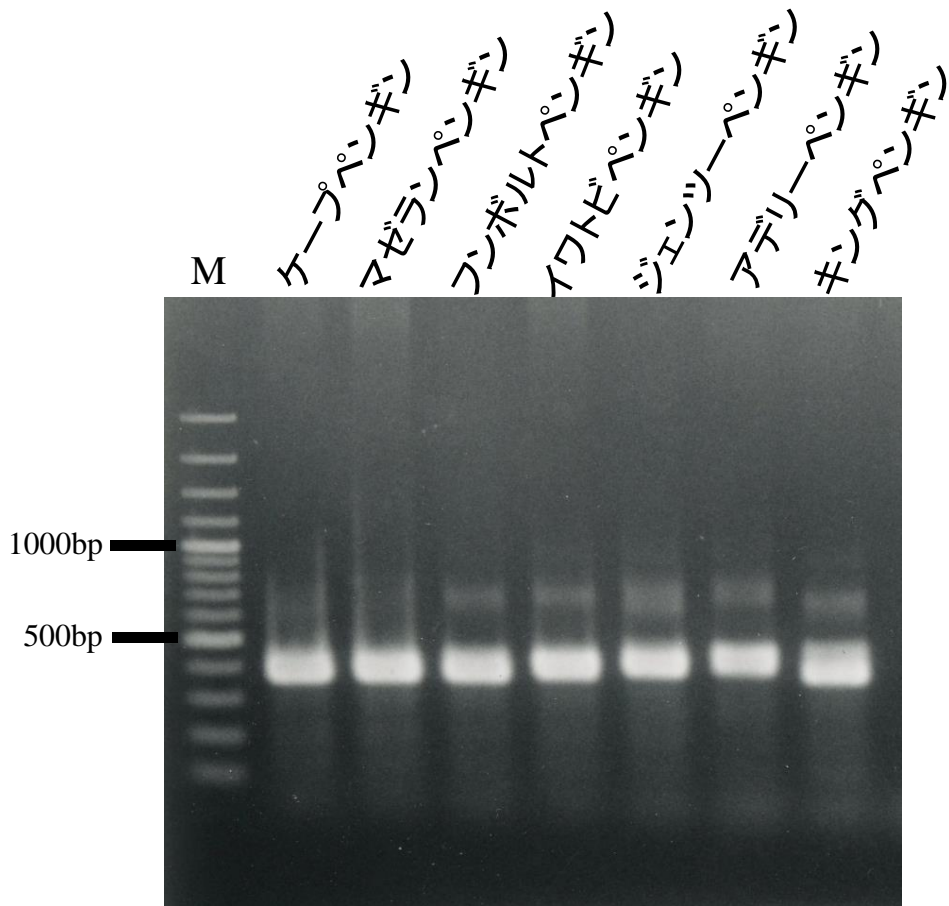


図17 新規プライマー (RDA-2 F、RDA-2 R) を用いたPCR

ペンギン科に共通して 371bp のバンドが観察された。

M: 100bp マーカー

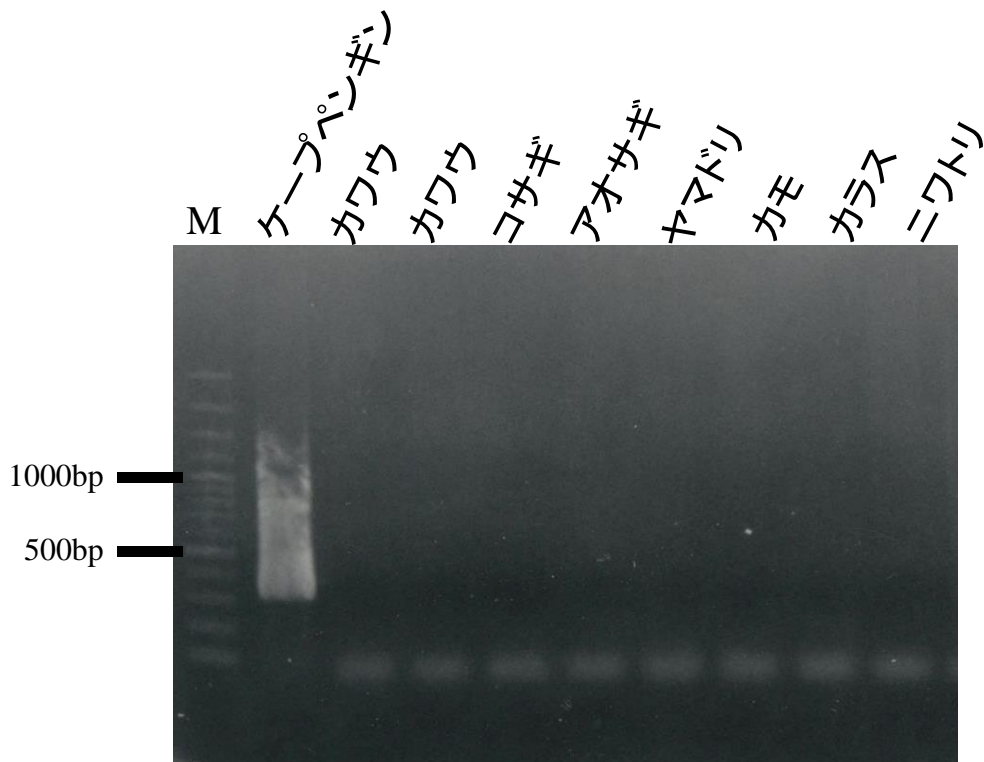
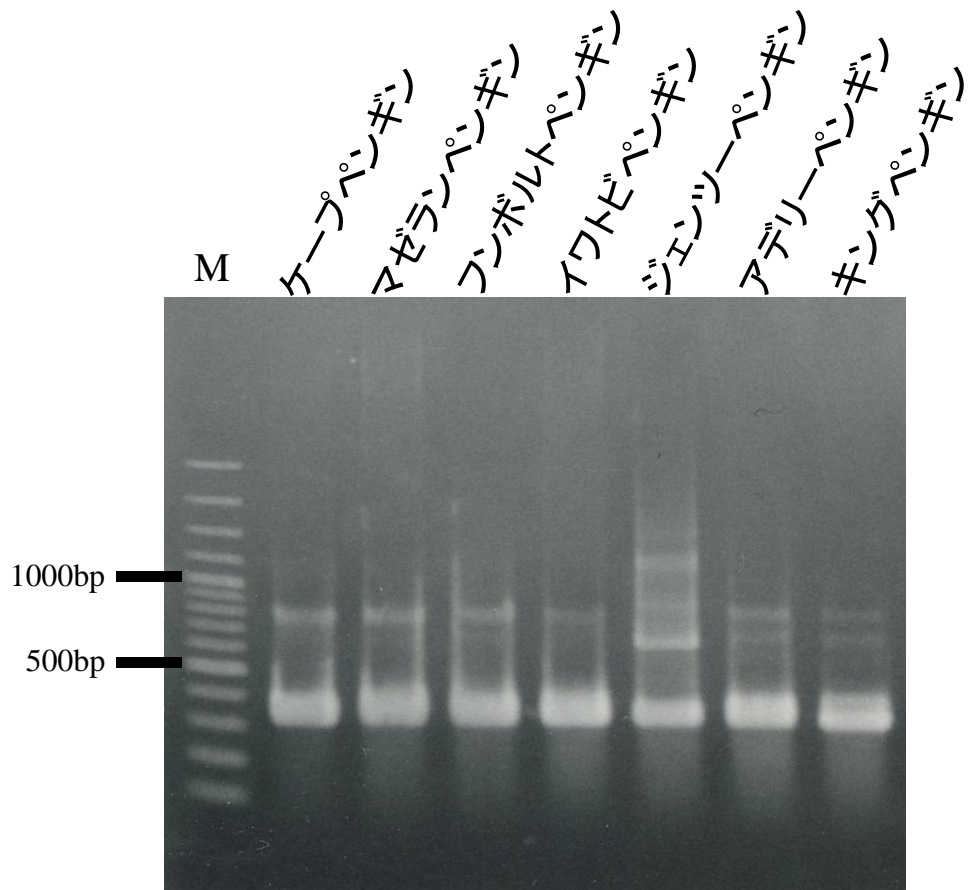


図18 新規プライマー (RDA-3 F、RDA-3 R) を用いたPCR

ペンギン科に共通して315 bpのバンドが観察された。

M: 100bpマーカー

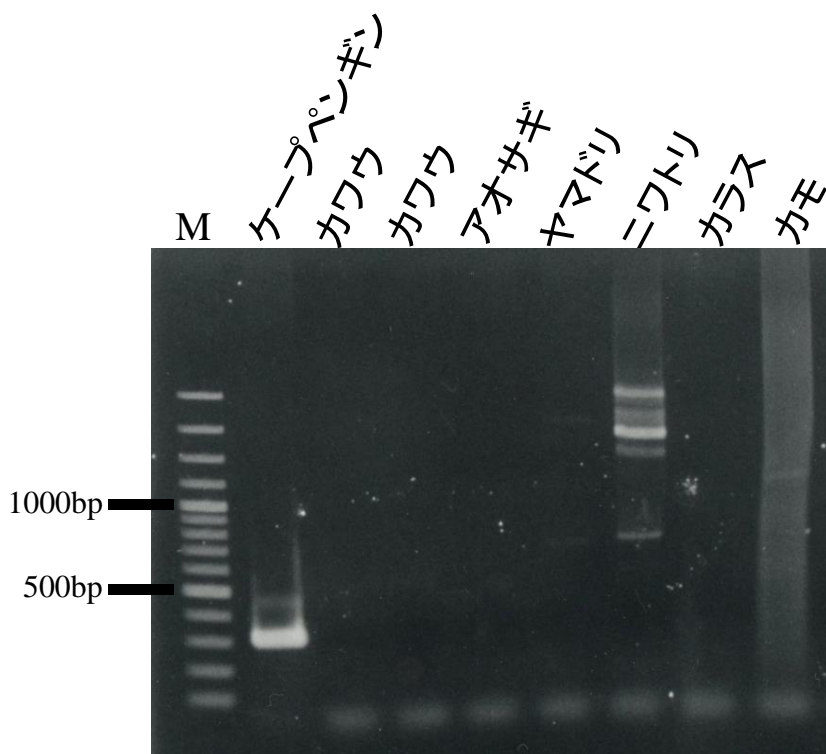
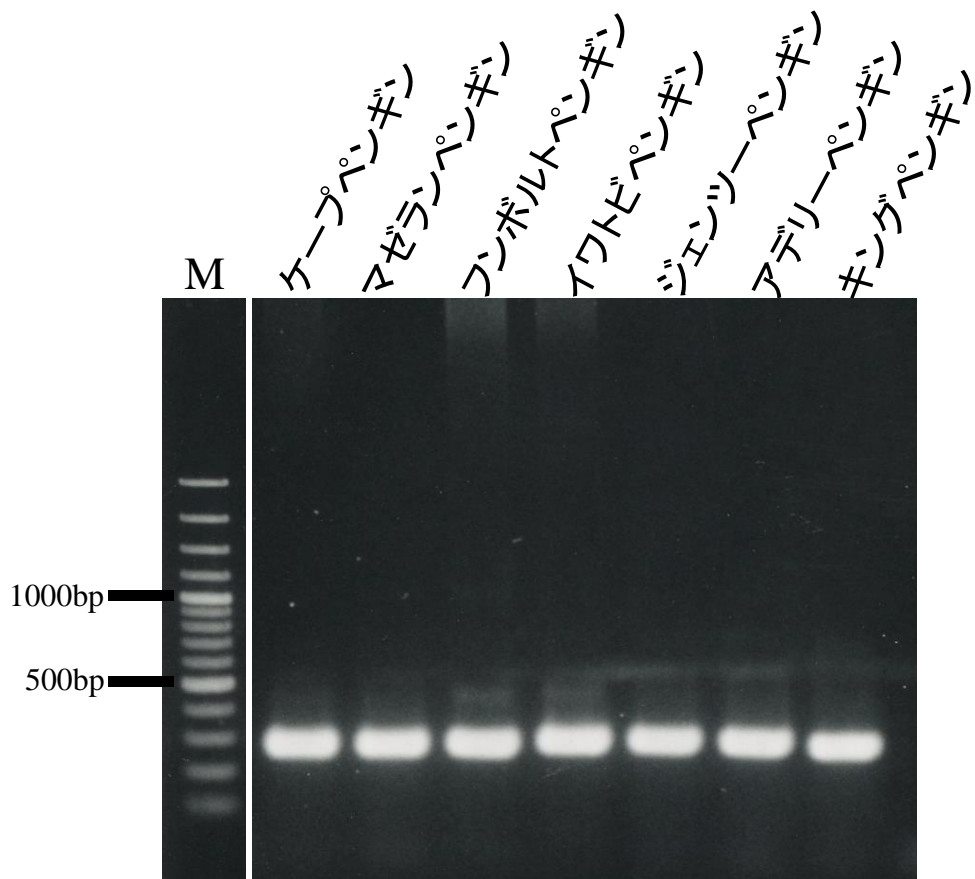
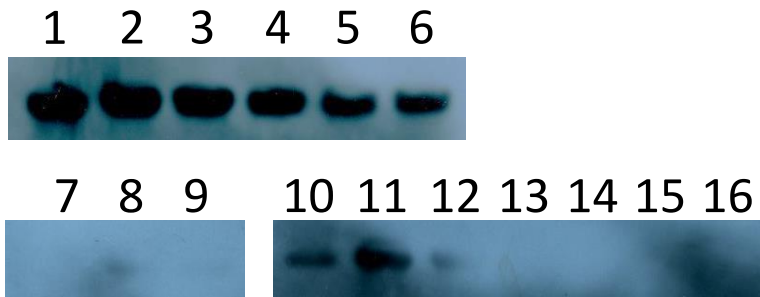


図19 新規プライマー (RDA-4 F、RDA-4 R) を用いたPCR

ペンギン科に共通して 301bp のバンドが観察された。  
M: 100bp マーカー



- 1、2： ケープペンギン
- 3、4： マゼランペンギン
- 5、6： フンボルトペンギン
- 7、8： ジェンツーペンギン
- 9： アデリーペンギン
- 10、11： キングペンギン
- 12、13： ニワトリ
- 14： カラス
- 15： カモ
- 16： ミドリコンゴウインコ

図20 ペンギン科および各種鳥類のゲノムDNAとDIG標識したRDA-1配列のサザンハイブリダイゼーション

表1 サテライトDNAの検出法で使用した制限酵素

Restriction enzyme	Buffer	°C	Restriction enzyme	Buffer	°C
Aat II	T+BSA	37	Hha I	M	37
Acc I	M	37	Hinc II	M	37
Acc II	M	37	HindIII	M	37
Acc III	Acc III Buffer	60	Hinf I	H	37
Afa I	T+BSA	37	Hpa I	K	37
Afl II	M+BSA	37	Kpn I	L	37
Alu I	L	37	Mbo I	K	37
Aor13H I	K+BSA	55	Mbo II	L	37
Aor51H I	M	37	Mlu I	H	37
Apa I	L	37	Msp I	T+BSA	37
ApaL I	L	37	Mva I	K	37
Bal I	Bal I Buffer+BSA	37	Nae I	L	37
BamH I	K	30	Nco I	K+BSA	37
Ban II	H	37	Nde I	H	37
Bgl I	Bgl I Buffer	37	Nhe I	M	37
Bgl II	H	37	Not I	H+BSA+TrionX-100	37
Bln I	K	37	Nru I	Nru I Buffer	37
BmeT110 I	K	37	PshA I	K	37
BmgT120 I	H	37	PshB I	PshB I Buffer	37
Bpu1102 I	Bpu1102 I Buffer+BSA	37	Psp1406 I	T+BSA	37
BssH II	M	50	Pst I	H	37
Bst1107 I	K	37	Pvn I	K+BSA	37
BstP I	H	60	Pvn II	M	37
BstX I	H	45	Sac I	L	37
Cpo I	K	30	Sal I	H	37
Dra I	M	37	Sau3A I	H	37
Eae I	M	37	Sca I	H	37
Eam1105 I	Eam1105 I Buffer	37	Sfi I	M	50
ECo52 I	ECo52 I Buffer+BSA	37	Sma I	T+BSA	30
ECo81 I	M	37	Spe I	M	37
ECoO109 I	L	37	Sph I	H	37
ECoR I	H	37	Sse8387 I	M+BSA	37
ECoRV	H	37	Ssp I	Ssp I Buffer	37
ECoT22 I	H	37	Stu I	M	37
Fba I	K	37	Taq I	Taq I Buffer	65
Fok I	M+BSA	37	Van91 I	K	37
Hae II	M	37	Xba I	M+BSA	37
Hae III	M	37	Xho I	H	37
Hap II	L	37	Xsp I	K	37



表2 RAPD-PCR法で使用したランダムプライマー

N9プライマーを用いたPCRにおいて、ケープペンギンに特徴的と思われるバンドが得られた。

Primer	Sequence	Length
A10	5'-GTGATCGCAT-3'	10
R16	5'-CTCTGCGCGT-3'	10
N9	5'-TGCCGGCTTG-3'	10
AP4	5'-TCACGATGCA-3'	10
R108	5'-GTATTGCCCT-3'	10
23L	5'-CCGAAGCTGC-3'	10
OPB-4	5'-AATCGGGCTG-3'	10
OPB-6	5'-TGCTCTGCCC-3'	10
OPB-15	5'-GGAGGGTGTT-3'	10
OPB-17	5'-AGGGAACGAG-3'	10
YUKI	5'-GACGGCCAGTTTA-3'	13
Primer6	5'-GCGATCCCCA-3'	10

表3 MASA法で使用したプライマー

33.6dプライマーを用いたPCRにおいて、ケープペンギンに特徴的と思われるバンドが得られた。

Primer	Sequence	Length	Region	Reference
33.15d	5'-GAGGTGGGCAGGTGGAGAGGTGGGCAGGTGGA-3'	32	minisatellite	Jeffreys <i>et al.</i> , 1985
33.6d	5'-TGGAGGAGGGCTGGAGGAGGG-3'	21		
GATA20	5'-GATAGATAGATAGATAGATA-3'	20	microsatellite	Epplen, 1988
OAT18.2	5'-CAGACAGACAGACAGACA-3'	18		
GGAT18	5'-GGATGGATGGATGGATGG-3'	18	microsatellite	Ali <i>et al.</i> , 1986
TG18	5'-TGTGTGTGTGTGTGTGTG-3'	18		

表4 RDA法を行なった制限酵素とTester、Driverに使用した  
ゲノムDNAの組み合わせ

Restriction enzyme	Tester	Driver	Result
Hind III	ケーブ	フンボルト	×
	ケーブ	ジェンツー	×
Bgl II	ケーブ	フンボルト	×
BamH I	ケーブ	フンボルト	×
	ケーブ	ジェンツー	○

表5 RDA法で使したアダプター配列

	Adaptor Pair Set	Sequence
BamH I	R Bam 24	5' AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG 3'
	R Bam 12	3' AGTGGCTCCTAG 5'
	J Bam 24	5' ACCGACGTCGACTATCCATGAACG 3'
	J Bam 12	3' GTACTTGCCTAG 5'
	N Bam 24	5' AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG 3'
	N Bam12	3' GCTCCCTCCTAG 5'
BglII	R Bgl 24	5' AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA 3'
	R Bgl 12	3' AGTGGCGTCTAG 5'
	J Bgl 24	5' ACCGACGTCGACTATCCATGAACA 3'
	J Bgl 12	3' GTACTTGTCTAG 5'
	N Bgl 24	5' AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA 3'
	N Bgl 12	3' GCTCCCTTCTAG 5'
HindIII	R Hind 24	5' AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA 3'
	R Hind 12	3' AGTGGCGTTCTGA 5'
	J Hind 24	5' ACCGACGTCGACTATCCATGAACA 3'
	J Hind 12	3' GTACTTGTTCGA 5'
	N Hind 24	5' AGGCAGCTGTGGTATCGAGGGAGA 3'
	N Hind 12	3' CTCCTCTTCGA 5'

表6 新規作製プライマー

Primer name	Sequence	PCR product
Sde-Bme F	AGGGCCAGCAACACCTGGGA	190bp satellite DNA
Sde-Bme R	CTGGCAGCCCTTCCACAGC	
RAPD F	GCTCCGTGCTATAAATAGCCTCC	635bp
RAPD R	AACATGGATGGCTGTGACCTG	
MASA F	GGAAGCAGCCGTGCTGCGCCAA	321bp
MASA R	ATGCACTGGTTCATCCGAGT	
RDA-1 F	GTCGAGCGTAACTGATGCGTAG	380bp
RDA-1 R	GGGGTGCTCTGGAGCTGTGAGTA	
RDA-2 F	TCCGTCTCGTGATGGGTAGGAG	371bp
RDA-2 R	ACTCACAGCTCCAGAGCACCCC	
RDA-3 F	GCCTTGCCACACACCGTACAAGA	416bp
RDA-3 R	CTCCTCTGGACAAGACGGTGGAT	
RDA-4 F	GATGGTCCAGCAAACGGCTTC	301bp
RDA-4 R	GACACTTATATGGGCTGAGTGC	

## 第4章 ケープペンギンの核型分析

### 1 序論

鳥類の核型は2倍体で、メスヘテロ型のZW型である。染色体は、サイズが大きく異なる数対のマクロ染色体と、多数のマクロ染色体からなる。鳥類がもつマイクロ染色体は、遺伝子密度、GC含量、組換え頻度などが高く、マクロ染色体とは構造や特徴が大きく異なることが知られている。

1960～80年代には様々な鳥類で核型分析がなされているが、鳥類のマイクロ染色体は数が多く、小さくて短いため、正確なマイクロ染色体の数を決定するのは困難である。2n=78の核型であるニワトリでは、1920年代頃より染色体研究が行われてきたが、研究初期は40-80本の間と考えられてきた。1960年になって、顕微鏡の性能も向上し、Ohno (1961) はニワトリの染色体数は70本以上であると報告していたが、メスがZW型であるか、またはZO型であるのかは決定していなかった。1962年になってメスのW染色体が認識され(Schmid, 1962)、染色体数も78本であることが報告された (Owen, 1965)。その後、ニワトリのゲノムプロジェクトの進行と同時に、2003年にマイクロ染色体を含めた詳細な核型分析が終了した (Masabanda *et al.*, 2003)。

一方でペンギン目では、キガシラペンギンの染色体分析で、7対のマクロ染色体と1対の性染色体が報告されているが、正確な染色体数については不明のままである (Seddon & Seddon, 1991)。フンボルトペンギンの核型分析でも7対のマクロ染色体と1対の性染色体が観察されているが、染色体数は $2n=78\pm$ という表現にとどまっている (Takagi & Sasaki, 1974)。マゼランペンギンの核型分析では $2n=68$  (Ledesma *et al.*, 2003)、ケープペンギンでは1973年に $2n=72$  (Jensen, 1973) という報告がある。

本章では、報告はあるものの詳細が不明であるケープペンギンの染色体に着目し、核型分析を行い染色体レベルでの特徴も調べた。

## 2 方法

### 2-1 材料および培養

実験にはあわしまマリンパーク、京都水族館から提供された血液サンプルを使用した。

抗凝固剤にヘパリンを用いて、ケーブペンギンから少なくとも 1ml 以上を採血した。冷蔵で輸送された血液を、300rpm で 5 分間遠心し、血清ならびにバフィーコートを培養に用いた。培養液には 20%FBS 加 RPMI1640 (Sigma) 5ml を用い、フィトヘマグルチニン P (Wako) を 20~40 $\mu$ g 加え、血清ならびにバフィーコートを 38~39°C で 72 時間培養した。培養 71 時間後にコルヒチン (Wako) 0.1 $\mu$ g/ml を加え、細胞分裂を停止させた。

### 2-2 固定細胞懸濁液の作製

培養 72 時間後に培養液を回収し、1000rpm、10 分間遠心した。上清を除去し、低張液 0.075KCl を 8ml 加え、よく攪拌し 37°C で 30 分インキュベートした。

低張処理後、酢酸 : 100%メタノールを 1 : 3 で調整したカルノア液を 1ml 加え、カルノア液を滴下させながらゆっくりと混和し、1000rpm、10 分間遠心した。上清を 1ml 残して捨て、新しいカルノア液を 7ml 重層し、よくピペッティングし、再び 1000rpm、10 分間遠心した。さらにもう一度カルノア液を重層し 1000rpm、10 分間遠心し上清を捨て、細胞量に合わせてカルノア液を加え、固定細胞懸濁液とした。

### 2-3 顕微鏡用標本作製と染色

よく拭いたスライドガラスに、固定細胞懸濁液を 10 $\mu$ l 滴下し空気乾燥法にて顕微鏡用の染色体中期標本作製した。

完成した標本は 5%ギムザ染色 (MERCK)、ヨウ化プロピジウム (PI) (Wako)、または 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma) による蛍光染色を行い、倍率 1000 倍の顕微鏡下で観察した。

### 3 結果

作製した染色体標本はまずギムザ染色を行い、染色体像を確認し、その後良好な染色体像のみ PI 染色、または DAPI 染色を行なった。ケープペンギンの染色体も、その他の鳥類と同様に多数のマイクロ染色体があり、ギムザ染色だけではマイクロ染色体かどうかははっきりしなかったため、最終的な染色体数のカウントは PI または DAPI 染色標本で行なった (図 1)。

観察の結果、7 対のマクロ染色体と 1 対の性染色体が確認できた (図 1)。1~3 番染色体が特に大きく、1、2 番染色体はサブメタセントリック、3 番染色体はテロセントリックであった。4~7 番染色体はほぼ同等の大きさで、1 対のメタセントリック、2 対のサブメタセントリック、1 対のテロセントリックであると思われた。W 染色体は Z 染色体よりも小さく、Z、W 染色体ともにサブメタセントリックであった。その他に 30 対のマイクロ染色体が観察された。

良好な 30 個の染色体中期標本の観察から、染色体数は最頻値である 76 本であると推定された (表 1)。



#### 4 考察

本章で行なった核型分析の結果より、ケープペンギンの核型は7対のマクロ染色体、1対の性染色体を含む  $2n=76$  であると推定された。7対のマクロ染色体は、これまで報告のあったキガシラペンギン、フンボルトペンギン、マゼランペンギンのマクロ染色体数と一致した。

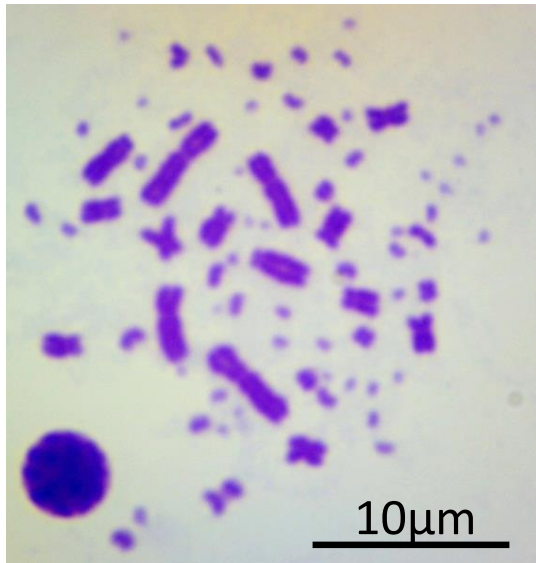
本研究では、観察された染色体数にばらつきはあったが、多くの標本で70本以上の染色体が観察されたことから、70本以上の標本を30個選出し、蛍光染色しカウントに用いた。また染色体数が奇数の標本も観察されたが、マイクロ染色体の染色分体が2個に分離してしまった場合や、マイクロ染色体が他の染色体と重なっている場合が考えられた。

本研究の核型分析  $2n=76$  は、過去に報告のあったケープペンギンの核型  $2n=72$  (Jensen, 1973) とは異なっていた。さらに Jensen の核型分析の場合では、2、4、5、6、7番染色体がメタセントリックとされているが、今回得られた30個の染色体像のうち、2番染色体は明らかにサブメタセントリックであった。4~7番染色体、Z染色体はほぼ同様の大きさであり、正確な分類をするために centromeric index (CI) を算出する必要がある。

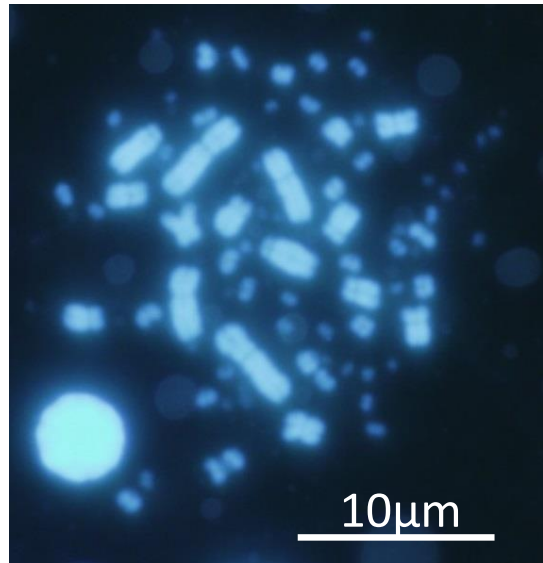
また、本研究の結果は、ケープペンギンと同属のフンボルトペンギン  $2n=78$  (Takagi & Sasaki, 1974)、マゼランペンギン  $2n=68$  (Ledesma *et al.*, 1993) という報告とも異なっていた。マクロ染色体は7対で一致していることから、フンボルトペンギン属内のペンギンによる染色体数の違いはマイクロ染色体の数の違いによると考えられた。

## 5 参考文献

- Garnero, A.V., Boccelli, M., Oliveira, J.C.P., Ledesma, M.A., Montalti, D., Coria, N., & Gunski, R.J.(2013). Chromosomal characterization of four antarctic *Procellariiformes*. *Marine Ornithology*, *41*, 63-68.
- Jensen, R.A.C. (1973). Karyotype of the ostrich and the jackass penguin. *Genetics*, *74*, 127-128.
- Ledesma, M. A., Freitas, T.R.O., Silva, J.D., Silva, F.D., & Gunski, R.J., (2003). Descripción cariotípica de *Spheniscus magellanicus* (*Spheniscidae*). *Hornero*, *18*, 61-64.
- Masabanda, J. S., Burt, D. W., O'Brien, P. C. M., Vignal, A., Fillon, V., Walsh, P. S., Cox, H., Tempest, H. G., Smith, J., Habermann, F., Schmid, M., Matsuda, Y., Ferguson-Smith, M. A., Crooijmans, R. P. M. A., Groenen, M. A. M., & Griffin, D. K. (2004). Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: the first complete avian karyotype. *Genetics*, *166*, 1367–73.
- Ohno, S. (1960). Sex chromosomes and microchromosomes of *Gallus domesticus*. *Chromosoma*, *11*, 484–498.
- Owen, J. J. (1965). Karyotype studies on *Gallus domesticus*. *Chromosoma*, *16*, 601–8.
- Seddon, P. J., & Seddon, R. J. (1991). Chromosome analysis and sex identification of yellow-eyed penguins. *Marine ornithology*, *19*, 144-147.
- Schmid, W. (1962). DNA replication patterns of the heterochromosomes in *Gallus domesticus*. *Cytogenetics*, *1*, 344–52.
- Takagi, N., & Sasaki, M. (1974). A phylogenetic study of bird karyotypes. *Chromosoma*, *46*, 91–120.



ギムザ染色



DAPI染色

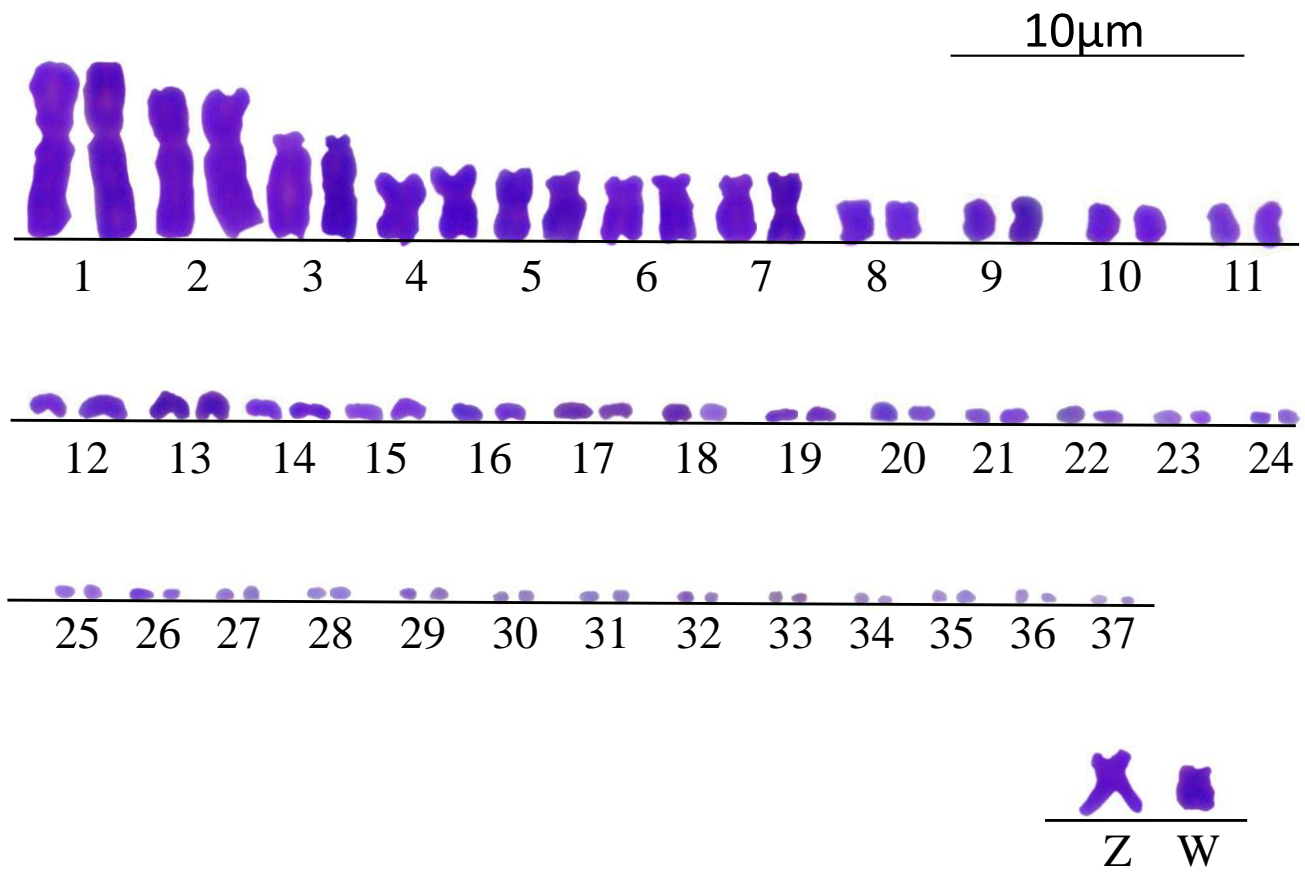


図1 メスのケーブペンギンの核型分析 (2n=76)

表1 ケープペンギンで観察された染色体数

Chromosome	71	72	73	74	75	76	77	78	total
Count number	3	1	3	7	2	11	2	1	30

## 総括

本研究では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)。

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、第 1 章の mtDNA 多型解析では大きく 2 つの異なる母系系統が存在することが示された。2 章の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った。よって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。

## General overview

The African penguin (*Spheniscus demersus*), which is endemic to southern Africa, is one of the world's most endangered seabirds. While wild African penguin populations continue to decrease, properly maintained captive populations are steadily increasing each year. To avoid close inbreeding and to maintain genetic diversity, the Japanese Association of Zoos and Aquariums keeps studbooks, which it uses to promote long-term breeding plans. However, genetic data have not been collected on either wild or captive African penguins in Japan to date.

This study addresses the genetic characterization of captive African penguins in Japan, and is organized into four chapters. The first and second chapters describe the genetic diversity and phylogenetic relationships among African penguins based on mitochondrial and microsatellite DNA. The third chapter characterizes DNA markers isolated from African penguins. The fourth chapter includes an analysis of the karyotype and nucleolus organizer region of the African penguin.

### Chapter 1 Mitochondrial DNA analysis of captive African penguins in Japan

According to the 2011 Japanese regional studbook for the African penguin, they were first introduced to Japan in 1935, and 156 additional founders were introduced from 1973 to 2011. The captive African penguin populations in Japan comprise 485 individuals belonging to an estimated 87 different founder lineages. In this study, 236 African penguin samples derived from 62 founder lineages were analyzed based on two mitochondrial DNA (mtDNA) regions.

#### 1) Analysis of the control region

Multiple sequence alignments of the 433-bp partial control region showed 39 polymorphic sites and a total of 30 distinct haplotypes. Neighbor-joining (NJ) phylogenetic analysis using

the sequences revealed that the captive African penguins clustered into two clades (A and B) supported by high bootstrap values. The divergence between African penguin clades A and B ( $d = 3.39\%$ ) observed in the present study may reflect geographical isolation, the existence of undefined subspecies, or both, although it must be noted that our data focused on captive-bred individuals.

## 2) Analysis of the cytochrome b gene

The complete 1140-bp sequence of the cytochrome b gene was obtained from 54 captive African penguins in Japan. We detected 8 haplotypes defined by 11 variable sites. NJ phylogenetic analysis using the cytochrome b sequences identified two clades similar to those observed using the control region.

These mtDNA analyses suggest that captive African penguins in Japan are derived from two distinct maternal lines.

## Chapter 2 Genetic population structure of captive African penguins in Japan based on microsatellite DNA analysis

Eight microsatellite loci (Sh1Ca12, Sh1Ca16, Sh2Ca21, PNN01, PNN03, PNN06, PNN09, and PNN12) were examined to estimate the genetic variability and relationships among 178 captive African penguins derived from 58 founder lineages. Deviation from Hardy–Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium were not observed for any of the markers. Mean  $H_E$  (expected heterozygosity) and  $H_O$  (observed heterozygosity) values ranged from 0.45 to 0.72 and from 0.45 to 0.71, respectively. These heterozygosity values for captive African penguins were higher than those of a previously described wild population of yellow-eyed penguins (*Megadyptes antipodes*). A Bayesian clustering method was used to characterize genetic differentiation among populations, and three subpopulations of captive African penguins were inferred.

### Chapter 3 Isolation and characterization of novel DNA markers from the African penguin

Four methods were used to isolate genetic markers specific to the African penguin.

#### 1) Isolation of a satellite DNA fragment

A 190-bp satellite DNA fragment (a type of repetitive DNA) was isolated by digesting African penguin genomic DNA with the resection enzyme *BmeT110*. PCR analysis with newly designed primers based on the sequence showed that the repetitive DNA sequence was shared among spheniscid species. Southern blot hybridization analysis was performed using the satellite DNA fragment as a probe. Hybridization with genomic DNA from the African penguin, Magellanic penguin, and Humboldt penguin, which all belong to genus *Spheniscus*, generated ladder signals of tandem repeats, whereas non-tandem repetitive signals were found in genera *Pygoscelis* and *Aptenodytes*.

#### 2) DNA markers obtained by randomly amplified polymorphic DNA

Randomly amplified polymorphic DNA PCR techniques were used to identify a 778-bp band that differentiates the African penguin from the Humboldt penguin in addition to several common bands. Cloning and sequence analysis of the unique band and band-specific PCR analysis showed that the fragment was common to spheniscid species.

#### 3) DNA markers obtained by mini/microsatellite-associated sequence amplification analysis

Mini/microsatellite-associated sequence amplification (MASA) techniques were used to generate a prominent 540-bp band that differentiates the African penguin from the Humboldt penguin. Cloning and sequence analysis of the unique band, and subsequent band-specific PCR analysis showed that this fragment distinguished genera *Aptenodytes* and *Pygoscelis* from genera *Spheniscus* and *Eudyptes*.

#### 4) Representational difference analysis

Three series of representational difference analysis were performed using a combination of



African penguin amplicons as testers and Gentoo penguin amplicons as drivers. One informative polymorphic marker, present exclusively in *Spheniscus* and *Eudyptes*, was obtained. No polymorphic DNA fragments were isolated when amplicons prepared from the Humboldt penguin were subtracted from those prepared from the African penguin.

#### Chapter 4 Karyotype of the African penguin

The African penguin karyotype was analyzed. To obtain metaphases, the direct culture technique was used for peripheral blood lymphocytes. The chromosome number of the diploid African penguin was, for the first time, determined to be 76 ( $2n = 76$ ), where 7 pairs of autosomes and a pair of sex chromosomes were considered macrochromosomes, and the remaining 30 pairs (60 chromosomes) were microchromosomes. According to several previous studies, the diploid chromosomal numbers of the Magellanic penguin and the Humboldt penguin were 68 and 78, respectively. While the number of macrochromosomes was constant among species of genus *Spheniscus*, the number of microchromosomes varied.

Taken together, we demonstrated the existence of two divergent clades of captive African penguins with moderate genetic distance based on mtDNA sequence analyses. Next, we showed three different subpopulations within the African penguin. The population of captive African penguins in Japan was derived from multiple genetic origins, resulting in genetic diversity. Moreover, we isolated DNA markers shared among family Spheniscidae, but did not detect genetic markers specific to the African penguins. This finding suggests that penguin species in *Spheniscus*, including the African penguin, have a high level of genetic homogeneity. In addition, the African penguin karyotype was determined for the first time.

These molecular analyses should be useful to Japanese zoos and aquariums for future management decisions and the implementation of breeding programs.

参考論文

Mutrata, M., & Murakami, M. (2014). Two distinct mtDNA lineages among captive african penguins in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76, 559-63.

## 謝辞

本論をまとめるにあたり、終始懇切なるご指導とご助言を賜りました麻布大学動物工学研究室、田中和明准教授、附置生物科学総合研究所、落合秀治准教授ならびに分子生物学研究室、村上賢教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました北海道大学水産科学研究院海洋応用生命科学部門育種生物学分野、荒井克俊教授ならびに麻布大学分子生物学研究室、村上賢教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究を行うにあたり多大なるご指導とご協力を頂いた麻布大学分子生物学研究室の先輩、後輩の皆様方に厚く御礼を申し上げます。