

京都大学	博士（理学）	氏名	斉 惠元
論文題目	Development of epigenetic clocks in multiple felid species—from small to big, domestic to wild (ネコ科の多様な種におけるエピジェネティック時計の開発—小型種から大型種、飼育から野生まで—)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>個体の年齢を知ることは、野生下および飼育下の保全プログラムの両方において、対象となる野生動物種のより効率的で適切な管理計画を立案するために有用である。しかし、ほとんどの種では、観察のみから年齢を判別することは容易ではない。DNAメチル化を指標とする方法は、侵襲性の低い方法で採取した微量試料を用いて、年齢を高精度に推定できる有望な手法のひとつである。本研究では、小型から大型、飼育から野生までの多数のネコ科動物種で初めて、DNAメチル化に基づくエピジェネティック時計を開発した。ネコ科には絶滅危惧種が多く含まれており、保全の必要性が高いにもかかわらず、年齢推定の精度向上を目指した研究はこれまで少なかった。そこで本研究では、少数の遺伝領域と低コストの手法によって、精度の高いエピジェネティック時計を開発することを目指した。対象とするネコ科は、小型種としてはイエネコ (<i>Felis catus</i>) とツシマヤマネコ (<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>)、大型種としてはジャガー (<i>Panthera onca</i>)、アムールヒョウ (<i>P. pardus orientalis</i>)、アフリカライオン (<i>P. leo leo</i>)、ユキヒョウ (<i>P. uncia</i>)、アムールトラ (<i>P. tigris altaica</i>) である。これらの種の飼育個体の血液試料を用いて、メチル化感受性高分解能融解法 (MS-HRM) と次世代シーケンサーによるターゲットバイサルファイトシーケンシングの2種類の方法により、低コスト (約1サンプルあたり\$3~7) かつ高精度なエピジェネティック時計を構築した (平均絶対誤差: MAE = 1.35~1.97年)。これにより、半数以上の試料由来の個体年齢を、1年以内の誤差で推定することに成功した。大型種では、複数種をまとめて年齢推定モデルを作成しても高い精度を維持できた。種の分岐が比較的短いことが一因と考えられる。イエネコとツシマヤマネコでは、健康状態の影響を受けないモデルの作成もできた。また、絶滅危惧種であるツシマヤマネコでは、非侵襲的に得られた糞の試料を用いて年齢を推定できる可能性を示すことができた (MAE = 2.54年)。今後は、より多くの試料を用いてモデルを改良することにより、糞を利用した年齢推定の精度をさらに向上させ、野生個体への応用を図ることが期待される。以上より、この論文では、ネコ科の複数の種に対する安価で高精度なエピジェネティック時計を開発した。また、同一個体のサンプルには、ばらつきがあるため、より正確な年齢推定には、1年以内に複数回サンプリングすることが推奨される。次の段階として、飼育個体で構築したモデルを野生個体で検証することが必要である。</p> <p>将来、新しい遺伝領域の選択やモデルのパラメータの調整によって、生息環境から影響を受けない年齢推定モデルや近縁種間で共通のモデルを開発できれば、動物園の飼育個体から多種多様な野生個体の年齢推定が可能になる。それにより、野生からの傷病保護個体の年齢を推定することができれば、個体の年齢に合わせた治療・飼育環境の整備や、飼育下繁殖ペアの候補リストに追加するなど、域外保全に貢献できる。また、直接観察が困難な野生下で糞のみから年齢ピラミッドを推定できれば、将来の個体数予測も可能になり、域内保全においても重要な情報を提供できる。</p>			

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

この論文では、7種のネコ科動物を対象としたDNAメチル化の解析により、小型種から大型種、飼育から野生まで応用可能な、高精度かつ安価なエピジェネティック時計の開発を目指した。第1章では、ヒトの医学・法医学分野での研究が先行し、ヒト以外の動物では歴史の浅い当分野の状況を概観し、野生動物で年齢推定法を開発する意義を説明した。第2章では、ネコ科動物で最初のエピジェネティック時計の研究として、重要な伴侶動物であるイエネコを対象に、容易に実施可能なメチル化感受性高分解能融解法 (MS-HRM) を使用した。これはリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いる簡易法で、試料を低コストで短期間に解析できる。イエネコで開発した遺伝マーカーやモデルは、ユキヒョウにも応用可能であることがわかった。第3章では、モデルの精度をさらに向上させ、他のネコ科動物への応用を目指して、種の類似性と差異を調査するため、標的遺伝領域を増やして、先述の7種のネコ科動物の血液由来DNAを対象に、次世代シーケンシングを用いて解析したところ、これらの種にも応用できることがわかった。ただし、標的遺伝子領域において全種をまとめてモデルを作成するよりも、種ごとにモデルを作成した方の推測精度が高いことがわかった。ただし大型ネコ科動物では、まとめてモデルを作成しても高い推定精度を実現できた。これは種間の分岐時間が短いことが一因と考えられる。またイエネコとツシマヤマネコでは、健康状態から影響を受けないモデルを作成できた。第4章では、保全の文脈での応用範囲をさらに広げるために、ベンガルヤマネコの亜種アムールヤマネコ (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) で、対馬島に生息し絶滅の危機に瀕しているツシマヤマネコの非侵襲的に得られた糞試料を対象に、エピジェネティック時計を構築した。費用効果が高い方法を採用するため、MS-HRMによって解析した。また、糞を用いた研究で推定モデルの精度を向上させる方法についても考察した。精度は先行研究と同程度であったが血液に比べて低いため、改良が必要と考えられた。2-4章で、標的遺伝領域、計6領域の精度を検討した。第5章では、上記の研究成果にもとづき、本研究における年齢推定法の達成度と今後の課題について総括した。

本研究は、ネコ科の各種においてDNAメチル化を指標とした年齢推定に初めて取り組み、精度の高い方法を開発したパイオニアワークとして高く評価できる。次世代シーケンサーによる方法だけではなく、リアルタイムPCRを用いたより安価な方法も採用したことで、年齢推定の保全現場での実用可能性を広げた。また複数の種に応用可能であることを確認した。さらに非侵襲的に採取した糞試料から解析可能であることも示した。本研究で用いた解析手法や得られた情報は、ネコ科動物だけではなく多くの絶滅危惧種の保全にも応用が期待できる。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和6年1月19日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行い、その結果をもって令和6年1月24日に系会議で合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日：令和 年 月 日以降