

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	谷口 幸雄
論文題目	Genetic Diversities among Founder Populations of the Endangered Avian Species, the Japanese Crested Ibis and the Oriental Stork in Japan (希少鳥類トキおよびコウノトリの国内始祖集団における遺伝的多様性に関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>トキおよびコウノトリは野生絶滅種に分類される希少鳥類であり、日本国内において保全活動が推進されている。希少動物の保全においては、集団の遺伝的多様性を把握し、維持することが重要な課題となっている。国内のトキ集団およびコウノトリ集団は、いずれも海外から導入された少数の個体を始祖として後代集団が形成されているが、始祖個体間の血縁情報が利用できないため、始祖集団内の遺伝的多様性を把握するためには多数のDNA多型マーカーを使用した解析が必須となっている。しかし、これらの希少鳥類についてはゲノム配列やDNA多型マーカーに関する情報は極めて少ないのが現状である。本研究では、DNA多型マーカーの大規模開発並びに主要組織適合遺伝子複合体(MHC)領域の構造と多型の解析により、トキおよびコウノトリ集団の遺伝的多様性について検討した。</p> <p>第1章では、現在の日本トキ集団が中国から導入された5個体のみを始祖としていることを踏まえ、この始祖5個体を対象としてReduced Representation Library (RRL)と次世代シーケンサーを組み合わせた手法により、DNA多型マーカーの大規模な開発を実施した。この手法は、リファレンスゲノム配列が利用できない生物種においても実行可能であり、さらに、各始祖個体から作製した5つのRRLを異なるタグ配列で区別することにより、マーカー開発と同時に各マーカー候補について個体の遺伝子型データが得られるように従来法に改変を加えた。次世代シーケンシングにより全体で約30Gbの塩基配列データが得られ、データ解析の結果、52,512の一塩基多型(SNP)候補および162のマイクロサテライト候補が開発された。また、これらの候補のうち、32,157のSNP候補と86のマイクロサテライト候補については各始祖個体の遺伝子型データが得られた。これらの遺伝子型データを使用した解析では、著しくゲノムが類似するペアは検出されなかったものの、ゲノム全域にわたり各座位でのアレル数は2~3であり、日本トキ集団の遺伝的多様性が極めて低いことが示唆された。</p> <p>第2章では、トキMHCクラスII領域のゲノム構造とその多様性についての解析を実施した。MHC領域は、ゲノム内で最も多型性が高い領域であり、さらに感染症などの疾病に対する抵抗性に関わる領域であることから、希少動物の保全においてその多様性が極めて重要である。トキゲノムライブラリーを作製し、MHC IIB遺伝子のクローニングおよびゲノムウォーキングを実施した結果、MHC IIA/IIB遺伝子ペア数の異なる3種類のハプロタイプのコンティグが作製された。全塩基配列を決定した結果、MHC IIA/IIB遺伝子ペアがCOL11A2遺伝子とBRD2遺伝子の間に位置するゲノム構造が明らかにされた。始祖5個体を対象として、PCR-RFLP法とサザンロット法によりMHCクラスII領域の多型を解析した結果、クローニングにより単離された3種類のハプロタイプのみが検出された。この結果は第1章の結果と一致しており、日本トキ集団の遺伝的多様性が極めて低いこ</p>			

とを追認する結果であった。

第3章では、コウノトリMHC領域のゲノム構造とその多様性についての解析を実施した。コウノトリゲノムライブラリーを作製し、クローニングおよびゲノムウォーキングを実施した結果、クラスII領域とクラスI領域を含む約160kbのコンティグが作製された。各クローンの一部の塩基配列を決定し、コウノトリMHC領域のおおよそのゲノム構造 (*COL11A2*-2コピーのMHC IIA/IIBペア-*BRD2*-*DMA*-*DMB1*-*DMB2*-MHC I-*TAP1*-*TAP2*-2コピーのMHC I-*TNXB*) が明らかにされた。MHCクラスII領域の多様性の解析では、始祖6個体から9種類のMHCクラスIIハプロタイプが検出され、トキ集団に比べてコウノトリ集団の遺伝的多様性が高いことが示された。

トキ、コウノトリおよびニワトリのMHC領域のゲノム構造の比較では、トキとコウノトリのMHCゲノム構造はほぼ一致していた。これに対し、ニワトリMHC領域は、*BRD2*遺伝子から*TAP2*遺伝子までの中央部分ではトキおよびコウノトリのものとゲノム構造が一致しているものの、その両側のクラスII領域とクラスI領域ではゲノム構造が大きく異なることが示された。これらのMHCゲノム構造の相違は、それぞれの鳥類種の進化過程の違いを反映していると考えられた。

本研究は、次世代シーケンサーを利用した簡便で費用対効果の大きなDNA多型マーカーの大規模開発法を提案するとともに、トキおよびコウノトリの保全の基礎となる重要な情報を提供しており、さらに、本研究の結果は鳥類MHCの進化の研究に対しても有用な情報になると考えられる。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

希少動物の保全における遺伝的多様性の把握とその維持の重要性は、生物多様性やエコロジーの観点からも明らかである。本研究において対象としているトキ集団やコウノトリ集団では、始祖個体間の血縁情報が利用できず、さらに、利用可能なDNA多型マーカーが少数であるため、遺伝的多様性を正確に把握するには大規模なDNA多型マーカーの開発とそれらを使用した解析が必須である。また、研究対象とした主要組織適合遺伝子複合体(MHC)は、多型性が極めて高く、しかもさまざまな感染症に対する抵抗性に関わるゲノム領域であることから、希少動物の保全や生物の進化研究において重要な領域とされている。本論文では、これらの課題を踏まえ、トキにおけるDNA多型マーカーの大規模な開発並びにトキおよびコウノトリのMHC領域のゲノム構造と多様性の解析を行った。評価すべき点は以下のとおりである。

1. トキ始祖個体5羽を対象として、次世代シーケンサーを利用した手法により5万を超える一塩基多型と160以上の反復配列多型マーカー候補を開発しており、レファレンスゲノム配列が利用できない動物における効率的なDNA多型マーカー開発法を提案し実践した。
2. 大規模なマーカー開発と同時に、3万以上のマーカー候補については各始祖個体の遺伝子型情報も取得しており、これらのデータを使用した解析により日本トキ集団の遺伝的多様性が極めて低いことを明らかにした。
3. トキMHCクラスII領域のゲノム構造を決定し、その多様性として3種類のハプロタイプのみが検出されることを示して、簡便なハプロタイプ型判定法を確立した。
4. コウノトリMHC領域約160kbのゲノム構造を決定し、さらに始祖6個体を対象とした多様性の解析において9種類のハプロタイプを検出して、日本コウノトリ集団は、日本トキ集団と比較して多様性が高いことを明らかにした。
5. これまでの研究では、ニワトリを含むキジ目以外の鳥類のMHC領域の構造についてはほとんど明らかにされておらず、本研究から得られたトキおよびコウノトリのMHCゲノム構造は、鳥類のMHC領域の進化の研究に対して有用な情報を提供した。

以上のように、本論文は、希少鳥類におけるDNA多型マーカーの大規模開発並びにMHC領域のゲノム構造の決定と多型評価を行って集団の遺伝的多様性を明らかにし、希少鳥類の保全および鳥類の進化に関する研究において有用な情報を提供したものであり、動物遺伝育種学、保全生物学、分子進化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成27年12月15日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、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。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降(学位授与日から3ヶ月以内)