論文の内容の要旨

氏名：吉川 枝里

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：ペンギン類の保全に関わる遺伝学的研究
　　　　　−MHC 遺伝子を指標としたペンギン類の遺伝的多様性評価−

第 1 章：緒言

ペンギン類は，全 18 種が IUCN（国際自然保護連合）のレッドリストに絶滅危惧種として指定されており，とくに温暖な地域に生息する種（図 1）の個体数は生息環境悪化などの要因により激減傾向にある．希少種の保全では，集団の断片化や近親交配などで生じる遺伝的多様性の損失に留意した遺伝学的管理が欠かせない．しかし，ペンギン類に関しては野生および飼育下集団のゲノム情報に関する基礎的研究がきわめて少ない．

野生動物の遺伝的多様性評価に用いられる中立 DNA マーカーの多型解析は，集団の分布拡散パターンや歴史的変遷（ボトルネック通過）などを知る上で有用である．しかし，中立 DNA マーカーであるマイクロサテライト DNA の解析では多数の PCR プライマーを設計する必要があり，またミトコンドリア DNA の解析では母系情報しか得ることができない．そこで本研究では，保全遺伝学分野で近年応用され始めた主要組織適合抗原複合体遺伝子（Major Histocompatibility Complex: MHC）に着目した（図 2）．MHC 遺伝子は多型性に富む領域であることから，少数の PCR プライマーで多型解析が可能である．しかし，ペンギン類における MHC 遺伝子領域のゲノム構造は未解明であり，その多型性に関する情報はほとんどない．本研究では，希少ペンギン類の保全における遺伝的多様性評価に MHC 遺伝子解析が有効である否かを検討するために，未解明なペンギン MHC 遺伝子のゲノム構造を明らかにし，その多型解析手法の確立およびペンギン類複数種における遺伝的多様性の評価を目的とした．

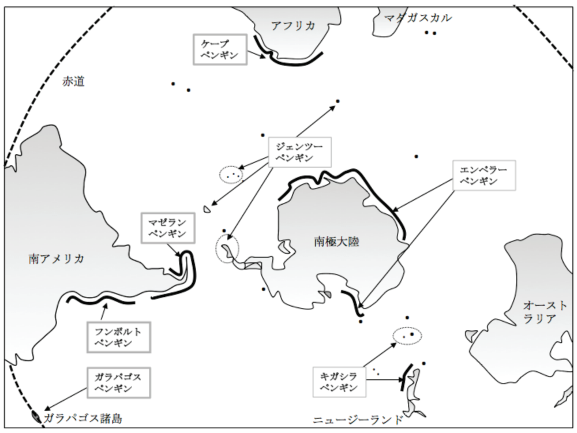

図 1. ペンギン類の生息分布
本研究において，MHC クラス I 遺伝子の多様性解析に用いたペンギン 7 種の生息分布を示した．ペンギン類は南半球に広く分布している．フンボルトペンギン属 4 種およびキガシラペンギンは，温暖な地域に生息分布している．

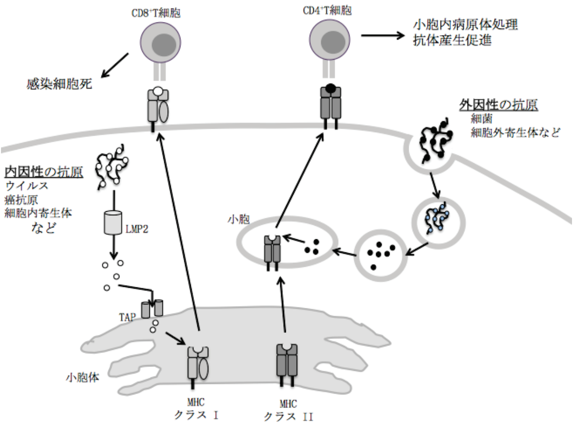

図 2. MHC 分子の働き
MHC クラス I 分子は内因性抗原，クラス II 分子は外因性抗原を細胞表面へ提示することで，T リンパ球に感染を知らせ免疫反応を活性化させる．MHC 分子をコードする MHC 遺伝子配列上のペプチド結合領域（PBR）に相当するエクソンに多型が集中することが知られている（Hughes & Yeager 1998）．

第 2 章：ペンギン MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造解明と多様性評価

本章では，細菌や細胞外寄生体などの外来抗原の認識および提示に関わる MHC クラス II 遺伝子に着目し，(1) フンボルトペンギン（*Spheniscus humboldti*）における MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造解明，(2) 本遺伝子による飼育下フンボルトペンギン集団の遺伝的多様性の評価を研究目的とした．ペンギン MHC クラス II 遺伝子の既存情報は exon 2 内の一部領域に関するもののみであったため，フンボルトペンギンにおける本遺伝子の広範囲な塩基配列決定を試みた．その結果，本種の MHC クラス II 遺伝子の exon 2 および exon 3 を含むゲノム構造（全長 807 bp）を初めて明らかにした．ついで，決定した塩基配列をもとに種特異的な PCR プライマーを設計しフンボルトペンギンにおける MHC クラス II 遺伝子の多型を解析した．その結果，本遺伝子の解析領域内では，他の動物種を対象とした既報の研究成果と同様に，ペプチド結合領域（Peptide Binding Region: PBR）を含む exon 2 内に多型が集中することが確認され，本遺伝子領域の多型性の特徴を明らかにすることができた．さらに，本遺伝子領域を指標とした飼育下フンボルトペンギン集団の多型解析では，国内の集団全体では高い遺伝的多様度が認められたものの，飼育施設ごとに注目すると，半数以上の施設において個体間のアリル（対立遺伝子）共有が認められ，飼育下集団が遺伝的に偏った家系で構成されていることを明らかにした．その要因として，一部施設集団が少数血縁で構成されている可能性が考えられた．

第 3 章　：フンボルトペンギン属 4 種の MHC クラス II 遺伝子の多様性評価

本章では，形態的な類似性や温帯への気候適応など多くの共通性を有するフンボルトペンギン属 4 種における（1）MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造解明，（2）本遺伝子による遺伝的多様性の評価を研究目的とした．その結果，4 種全てにおいて MHC クラス II 遺伝子 exon 1, exon 2 および exon 3 を含む約 1.5 kb の塩基配列を決定することに成功した．フンボルトペンギン属の種間における多型解析では共有アリルの存在が確認され，系統解析では 4 種の配列が混在したクラスターを形成することが分かった．本結果は，別種とされるフンボルトペンギン属 4 種が遺伝的にきわめて近縁であることを示すものであり，飼育下で生じている種間雑種の遺伝学的背景になると考える．また，4 種間でアリル数と遺伝的多様度を比較した結果，マゼランペンギン（*S. magellanicus*）集団では遺伝的多様性に富んでいる一方で，ガラパゴスペンギン（*S. mendiculus*）の多様性は乏しいことが明らかになった．　一般的な遺伝的多様性の評価基準である遺伝的多様度では見出せなかった多様性の低下が MHC クラス II 遺伝子の解析により明らかになったことで，フンボルトペンギン属の生息域内保全における MHC 遺伝子多様性解析の有用性が示された．

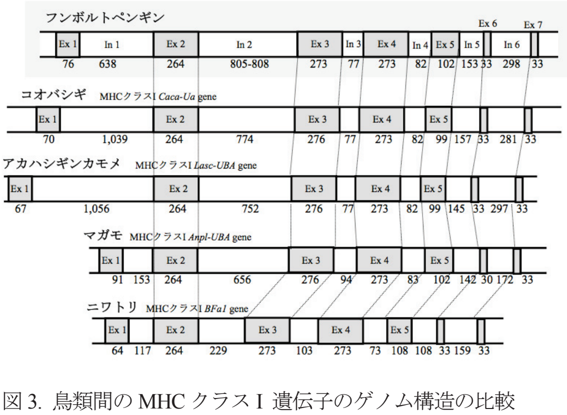

図 3. 鳥類間の MHC クラス I 遺伝子のゲノム構造の比較
フンボルトペンギンの MHC クラス I のゲノム構造をコオバシギ（KC205115），アカハシギンカモメ（HM008713），マガモ（AY885227）およびニワトリ（AL023516）と比較した．

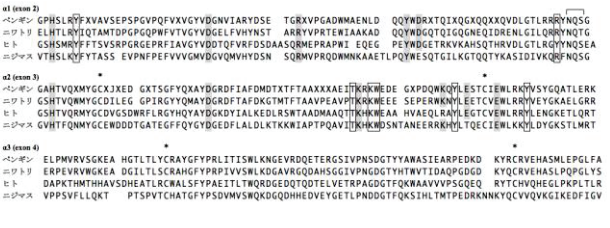

図 4. 古典的 MHC クラス I 遺伝子に保存されるアミノ酸残基.
哺乳類の古典的 MHC クラス I 遺伝子上には，MHC 分子の構造を規定するための重要なアミノ酸残基が種間で共通に保存されていることが明らかになっている（Aoyagi *et al*. 2002）．フンボルトペンギンのクラス I アミノ酸配列（CLSI*01010101）を，ニワトリ（BF12*0201；AY234768），ヒト（HLA-A2；HSU02935），ニジマス（UBA*101，AF287483）のアミノ酸配列と比較した．グレー塗りは塩橋サイト，黒枠の四角はペプチド末端と MHC 分子が結合するサイト，アスタリスクは保存されたシステイン残基を示す．これらのサイトは，ペンギン類でも保存されていた．また，exon 2 の末端には，N-グリコシル化サイトを確認した．

第 4 章：ペンギン MHC クラス I 遺伝子のゲノム構造解明と多様性評価

本章では，ウイルスや癌抗原などの内因性抗原の認識および提示に関与する MHC クラス I 遺伝子に着目し，（1）ペンギン類における MHC クラス I 遺伝子のゲノム構造解明，（2）本遺伝子による飼育下フンボルトペンギン集団の遺伝的多様性評価を研究目的とした．MHC クラス I 遺伝子のゲノム構造を解明するために，改良 inverse PCR 法を確立し，本遺伝子領域内約 7 kb の塩基配列を決定した（図 3）．その結果，古典的 MHC クラス I 分子の構造を規定する重要なアミノ酸残基がペンギン類でも保存されていることを明らかにした（図 4）．本遺伝子領域内の PBR に相当する exon 2 および exon 3 に高い多型率と非同義置換率を確認した．飼育下フンボルトペンギン集団の多型解析により，半数以上の施設で全解析個体が共通アリルをもつことが明らかにされ，その内 3 施設では遺伝的距離が近いアリルのみが検出された（図 5）．2 種類の MHC 遺伝子の結果が一致したことから，一部の飼育下集団において，限られた血縁の個体数増加による遺伝的多様性の低下が生じている可能性が高いと考える．集団内の MHC クラス I アリルの均一化が促進することにより，感染症などの環境ストレスに対する耐性が低下し，死亡リスクが高まる可能性が考えられた．感染症などへの高い抵抗性をもつ飼育下集団を維持するためには，MHC のアリルバリエーションを豊富に保ち，遠縁のアリルを施設内で増やすなどの対策が必要であると考える．

第 5 章：ペンギン類 7 種における MHC クラス I 遺伝子の多様性評価

本章では，高い多型性を示した exon 3 領域を中心にフンボルトペンギンを含む 7 種（図 1）の MHC クラス I 遺伝子における遺伝的多様性の評価を研究目的とした．その結果，全種において MHC クラス I 遺伝子の塩基配列が決定でき，設計した PCR プライマーが複数種に応用可能であることが明らかになった．解析集団内および集団間における多型解析の結果，野生ガラパゴスペンギンにおいて MHC クラス I 遺伝子の単型化が生じている可能性が示唆された．また，野生フンボルトペンギン，ジェンツーペンギン（*Pygoscelis papua*）およびキガシラペンギン（*Megadyptes antipodes*）の集団内でも，ほとんどの個体が共通アリルをもつことが明らかになった．解析した集団の内，最も遺伝的多様度が高かったマゼランペンギンの野生集団からは，遺伝的距離が比較的近いアリルのみ検出された．MHC クラス I 遺伝子の多様性低下は，感染症への抵抗力を弱める可能性があるため，アリルバリエーションを集団内に保つなどの遺伝的管理が必要であると考える（図 6）．

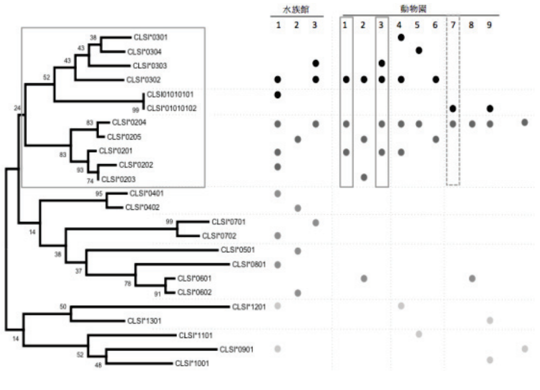

図 5. MHC クラス I 遺伝子アリルの系統樹と施設間分布の比較.
飼育下フンボルトペンギン集団で確認された 24 アリルのアミノ酸配列をもとに近隣接合法により系統樹を作成した．水族館 3 施設および動物園 9 施設におけるアリル分布を丸印で示した．動物園 1,3,7 では解析集団内に遺伝的距離の近いアリルのみが検出された．

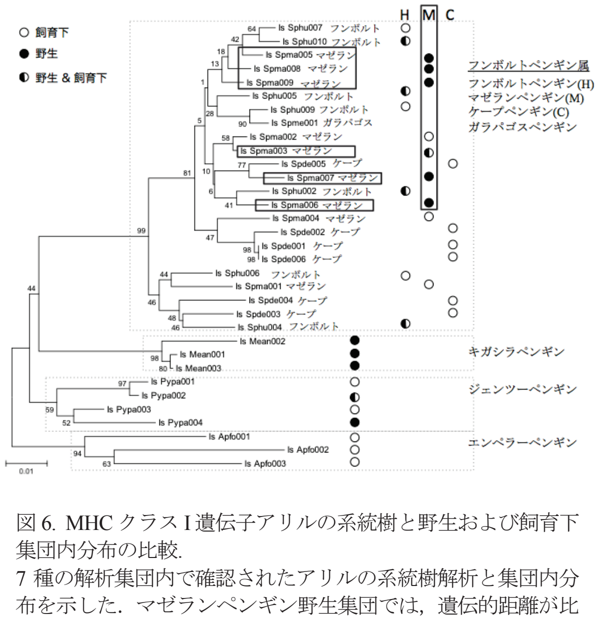

図 6. MHC クラス I 遺伝子アリルの系統樹と野生および飼育下集団内分布の比較.
7 種の解析集団内で確認されたアリルの系統樹解析と集団内分布を示した．マゼランペンギン野生集団では，遺伝的距離が比較的近いアリルのみ検出された．

第 6 章：総合考察

生息域内および域外におけるペンギン類の保全を目的として，ペンギン類の遺伝的多様性評価に対する MHC 遺伝子多型解析の有用性を検討した．その結果，当初の研究目的に掲げた（1）ペンギン類における MHC 遺伝子のゲノム構造解明，（2）MHC 遺伝子領域を増幅させる新規 PCR プライマーを用いた多型解析手法の確立，および（3）本法による飼育下ならびに野生集団の遺伝的多様性評価を行うことができた．具体的には，MHC クラス I およびクラス II 遺伝子の広範囲な塩基配列を決定し，さらに両遺伝子のゲノム構造を明らかにすることに成功した．また，両遺伝子領域内に高度な遺伝的多型性と非同義置換が蓄積されていることを確認し，ペンギン MHC 遺伝子における遺伝的多様性の特徴を初めて明らかにした．

飼育下フンボルトペンギン集団における MHC 遺伝子を指標とした多様性評価の結果, 半数以上の施設で飼育下集団が遺伝的に偏った家系で構成されていることが明らかになった．本結果は，飼育下集団が限られた繁殖ペアの血縁で構成されている可能性を示唆するものであり，このような飼育状態を継続すれば更なる遺伝的多様性低下を生じると推察された．生息域外保全（ex situ Conservation）における遺伝的多様性の保持を目的とした長期飼育下繁殖計画や個体群管理では，数施設間で個体や受精卵を移動または交換するだけではなく，国内の飼育下集団全体を対象とした遺伝的多様性の維持管理が必要であると考えた．その際には，本研究の成果のひとつであるペンギン類における MHC 遺伝子多型が役立つであろう．

MHC 遺伝子を指標としたペンギン類 7 種の多型解析の結果，野生および飼育下マゼランペンギン集団には高い遺伝的多様性が認められたのに対し，野生ガラパゴスペンギンを含む 4 種のペンギン集団においては，アリル分布の偏りがあり遺伝的多様度も低いことが判明した．もっとも多様性の低かったガラパゴスペンギンは過去 2 回のエルニーニョ現象を受け，世界の総個体数はおよそ 1,200 個体まで激減したが，生息域外保全は実施されていない．病原体認識で重要な役割を演じる MHC 遺伝子において，多様なアリルを集団内に保有することは耐病性に有利であることが知られている．解析したガラパゴスペンギン集団の保有する MHC 遺伝子アリル数がきわめて少ないことから, 侵入病原体や再興感染症などによる絶滅の危険性が高いと推察された．そのため，病原体などによる環境ストレスの影響が少ない環境で一部集団を管理するなどの生息域外保全が必要であると考える．

ペンギン複数種における MHC 遺伝子の遺伝的多様性解析が可能になったことで，今後，飼育下および野生ペンギン類に対する MHC 遺伝子のアリルを指標とした遺伝学的管理が期待される. 本研究において解析した 7 種のうち半数以上の種において MHC 遺伝子の多様性が低かったことから, 本研究で解析されなかったペンギン類 11 種においても遺伝的多様性の評価が急務であると考えた. また, 遺伝的多様性の評価では, より多くの遺伝マーカーを用いることが解析の正確性を高める上で重要であり，機能の異なる 2 種類の MHC 遺伝子の多様性解析が可能になったことは集団内の多様性評価の確実性を高めるために役立つと考える．

以上により, 希少ペンギン類の保全に対して, 本研究で確立した MHC 遺伝子解析手法による多型情報は, 生息域内および域外におけるペンギン類の遺伝的多様性の評価に有効であると結論づけられた．