

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-

日本大学大学院生物資源科学研究科

吉川 枝里

2017

目次

第1章 緒言	・・・1
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型解析	・・・9
第1節 はじめに	・・・10
第2節 材料および方法	・・・12
2.1 供試検体	・・・12
2.2 ペンギン類 MHC クラス II 領域の塩基配列情報の獲得	・・・12
(1) PCR 法による MHC クラス II 遺伝子領域の増幅	・・・12
(2) 標的 PCR 産物の切り出し	・・・13
(3) Nested PCR	・・・13
(4) 塩基配列決定および解析	・・・13
2.3 発現解析	・・・15
(1) RNA 抽出および cDNA 合成	・・・15
(2) RT-PCR	・・・15
(3) 塩基配列決定	・・・16
2.4 MHC クラス II 遺伝子の多様性解明	・・・16
(1) フンボルトペンギン特異的プライマー設計および PCR 増幅	・・・16
(2) クローニング	・・・17
(3) コロニーPCR	・・・17
(4) 塩基配列決定および解析	・・・18
2.5 飼育下フンボルトペンギン集団における MHC クラス II 遺伝子の多様性評価	・・・18
(1) PCR 法による MHC クラス II 遺伝子領域の増幅	・・・19
(2) 塩基配列決定および解析	・・・19
2.6 ゲノム DNA のサザンブロット分析	・・・20
(1) ゲノム DNA の制限酵素処理および電気泳動	・・・20
(2) ゲノム DNA のメンブレンへのトランスファー	・・・21
(3) DNA プローブの調整	・・・21
(4) DNA プローブの標識およびハイブリダイゼーション	・・・22
第3節 結果	・・・24
3.1 MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造	・・・24

3.2	RT-PCR 法による発現解析	・・・24
3.3	相同性検索および系統樹解析	・・・25
3.4	ゲノム DNA サザンブロット分析による解析領域の評価	・・・25
3.5	MHC クラス II 遺伝子における多様性の特徴	・・・26
	(1) 塩基配列を用いた多型解析	・・・26
	(2) アミノ酸配列を用いた多型解析	・・・26
3.6	飼育下フンボルトペンギン集団における MHC クラス II 遺伝子の多様性評価	・・・27
	(1) 塩基配列情報	・・・27
	(2) ヘテロ接合度	・・・27
	(3) アリル分布	・・・28
	(4) アリル間の遺伝的距離	・・・28
第4節	考察	・・・38
	(1) フンボルトペンギン MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造	・・・38
	(2) ゲノム DNA サザンブロット分析による解析領域の評価	・・・38
	(3) フンボルトペンギン MHC クラス II 遺伝子の多様性	・・・39
	(4) 飼育下フンボルトペンギン集団における MHC クラス II 遺伝子の多様性評価	・・・40
第5節	小括	・・・41
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	・・・42
第1節	はじめに	・・・43
第2節	材料と方法	・・・45
2.1	供試検体および DNA 抽出	・・・45
2.2	MHC クラス II 遺伝子の塩基配列決定	・・・45
	(1) PCR 法による MHC クラス II 遺伝子の増幅	・・・45
	(2) クローニング	・・・46
	(3) コロニーPCR	・・・46
	(4) 塩基配列決定および解析	・・・47
	(5) MHC クラス II 遺伝子 exon 1 および intron 1 の配列情報の取得	・・・47
第3節	結果	・・・49
3.1	MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造	・・・49
3.2	MHC クラス II 遺伝子の多型解析	・・・50

(1) 塩基配列の多型解析	・ ・ ・ 50
(2) アミノ酸配列を用いた多型解析	・ ・ ・ 50
3.3 MHC クラス II 遺伝子の多様性評価	・ ・ ・ 51
(1) ヘテロ接合度	・ ・ ・ 51
(2) アリル分布	・ ・ ・ 51
(3) アリル間の遺伝的距離	・ ・ ・ 52
3.4 フンボルトペンギン属 4 種の近縁関係	・ ・ ・ 52
第 4 節 考 察	・ ・ ・ 61
(1) MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造および多様性	・ ・ ・ 61
(2) フンボルトペンギン属における MHC クラス II 遺伝子の多様性評価	61
(3) フンボルトペンギン属の近縁関係	・ ・ ・ 63
第 5 節 小 括	・ ・ ・ 65
第 4 章 ペンギン MHC クラス I の構造および多様性の解明	・ ・ ・ 67
第 1 節 はじめに	・ ・ ・ 68
第 2 節 材料および方法	・ ・ ・ 69
2.1 供試検体	・ ・ ・ 69
2.2 ペンギン類 MHC クラス I 領域の塩基配列情報の獲得	・ ・ ・ 69
(1) RT-PCR および塩基配列決定	・ ・ ・ 69
2.3 inverse PCR 法による MHC クラス I 領域の塩基配列情報の獲得	70
(1) 環状化 DNA ライブラリーの作製	・ ・ ・ 70
(2) inverse PCR および切り出し	・ ・ ・ 71
(3) Nested PCR および塩基配列確認	・ ・ ・ 71
(4) dA 付加および切り出し	・ ・ ・ 72
(5) クローニング	・ ・ ・ 72
(6) コロニー PCR	・ ・ ・ 72
(7) 制限酵素処理によるクローン選抜およびプラスミド抽出	・ ・ ・ 73
(8) ドラフト塩基配列決定およびマッピング	・ ・ ・ 73
(9) ゲノム PCR による MHC クラス I 遺伝子の塩基配列決定	・ ・ ・ 74
(10) データ解析	・ ・ ・ 74
2.4 飼育下フンボルトペンギン集団における MHC クラス I 遺伝子の多型解析	75
(1) PCR 法による MHC クラス I 遺伝子の増幅	・ ・ ・ 75
(2) クローニング	・ ・ ・ 76

(3) コロニーPCR	・ ・ ・ 76
(4) シーケンス解析およびデータ解析	・ ・ ・ 77
第3節 結果	・ ・ ・ 79
3.1 ペンギン MHC クラス I 遺伝子の塩基配列決定	・ ・ ・ 79
(1) RT-PCR および塩基配列決定	・ ・ ・ 79
(2) inverse PCR 法による塩基配列決定	・ ・ ・ 79
3.2 MHC クラス I 遺伝子のゲノム構造	・ ・ ・ 79
3.3 相同性検索および系統解析	・ ・ ・ 80
3.4 飼育下フンボルトペンギン集団における MHC クラス I 遺伝子の多型解析	81
(1) MHC クラス I 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の多型性	81
(2) 非同義置換率 (dN) および同義置換率 (dS)	・ ・ ・ 81
3.5 飼育下フンボルトペンギン集団の MHC クラス I 遺伝子の多様性評価	
(1) ヘテロ接合度	・ ・ ・ 82
(2) アリル分布	・ ・ ・ 82
(3) アリル間の遺伝的距離	・ ・ ・ 82
第4節 考察	・ ・ ・ 97
(1) 改良 inverse PCR 法	・ ・ ・ 97
(2) MHC クラス I 遺伝子のゲノム構造	・ ・ ・ 97
(3) MHC クラス I 遺伝子の多様性	・ ・ ・ 98
(4) 飼育下フンボルトペンギン集団における MHC クラス I 遺伝子の多様性評価	・ ・ ・ 99
第5節 小括	・ ・ ・ 101
第5章 ペンギン類7種における MHC クラス I 多様性の評価	・ ・ ・ 102
第1節 はじめに	・ ・ ・ 103
第2節 材料および方法	・ ・ ・ 104
2.1 供試検体	・ ・ ・ 104
2.2 ペンギン7種の MHC クラス I 遺伝子における多型解析	・ ・ ・ 104
(1) PCR 法による MHC クラス I 遺伝子の増幅	・ ・ ・ 104
(2) クローニング	・ ・ ・ 105
(3) コロニーPCR	・ ・ ・ 105
(4) 塩基配列決定および解析	・ ・ ・ 105
第3節 結果	・ ・ ・ 107

3.1	ペンギン7種における MHC クラス I 遺伝子の多型性	・・・107
3.2	ペンギン7種における MHC クラス I 遺伝子の多様性評価	・・・108
(1)	ヘテロ接合度	・・・108
(2)	アレル分布	・・・108
(3)	アレル間の遺伝距離	・・・108
第4節	考察	・・・116
(1)	ペンギン7種の MHC クラス I 遺伝子の特徴	・・・116
(2)	ペンギン7種における MHC クラス I 遺伝子の多様性評価	・・・116
第5節	小括	・・・120
第6章	総括	・・・121
(1)	MHC 遺伝子のゲノム構造および多様性の解明	・・・122
(2)	MHC 遺伝子の多型解析手法の確立	・・・123
(3)	飼育下フンボルトペンギン集団における多様性評価	・・・124
(4)	複数ペンギン種における遺伝的多様性評価	・・・125
(5)	MHC 遺伝子情報のペンギン保全における有用性	・・・128
要約		・・・131
謝辞		・・・137
引用文献		・・・139

第 1 章

緒 言

現生ペンギン類は6属16~19種に分類され、南極大陸から熱帯のガラパゴス諸島に至るまでの気候が異なる広範囲に生息分布している(Boersma 2008; Williams 1995, 1999)(図1-1)。このうち18種がIUCN(International Union for Conservation of Nature, 国際自然保護連合)のレッドリストにおいて絶滅危惧種(Endangered, EN), 危急種(Vulnerable, VU)もしくは準絶滅危惧種(Near Threatened, NT)のいずれかに指定され, 個体数は減少傾向にある(表1-1)。個体数減少の原因としては, 海洋および陸域の生息環境の悪化が考えられ, とくに海洋環境の変化や地球温暖化は, ペンギン類の分布, 個体数および種構成に深く影響を及ぼしている(Trathan *et al.* 2015)。例えば, ガラパゴス諸島の固有種であるガラパゴスペンギン(*Spheniscus mendiculus*)は, 過去2回の大規模なエルニーニョの影響を受け, 急速に個体数が減少した(Mills & Vargas 1997; Vargas *et al.* 2006)。また, 気候温暖化が原因で増加した降雨量が, アデリーペンギンやジェンツーペンギンの雛の死亡率上昇に関与していると報告されている(Boersma 2008; Ropert-Coudert *et al.* 2015)。

保全生物学は, 人為的な環境破壊によって生じる野生生物種の絶滅に対し, 3つのレベル(生態系・種・遺伝子)から生物多様性を保持することを目的とした学問である(小池と松井 2003)。その1分野である保全遺伝学は, 遺伝子レベルの多様性保持を目的とし, 野生生物の保全管理策定のための基礎的研究として重要な役割をもつ(Allendorf *et al.* 2010; Greig 1979; 小池と松井 2003)。本分野において, 集団内における個体数減少は, 近親交配率の増加などによる遺伝的多様性の低下を引き起こすと考えられている(Ujvari & Belov *et al.* 2011)。多様性損失の結果は, 近交弱勢リスクを増大させ, 子孫の生育率・繁殖力・生存能力の低下へつながる可能性や, 集団における環境変化への適応能力を減少させる可能性がある(Allendorf *et al.* 2010; Greig 1979)。そのため, 変動の激しい環境下で生物種が存続していくためには, 集団内の遺伝的多様性が保持される必要がある。しかし, 野生集団の個体数減少が著しいペンギン類に対する保全遺伝学分野の研究は少なく, マイクロサテライトやミトコンドリアDNAに関する研究は散見されるが(Akst *et al.* 2002; Boessenkool *et al.* 2010; Bouzat *et al.* 2009; Ritchie & Lambert 2000; Van Tuinen *et al.* 2001), 核DNA上に位置する遺伝子に関する情報はない。

野生動物における集団内の遺伝的多様性評価には, これまで主にマイクロサテライトDNAやミトコンドリアDNAなどの中立的遺伝マーカーが利用されてきた(Lowe *et al.* 2004;

Sunnucks 2000). 中立的遺伝マーカーの変異は、集団の拡散パターン（遺伝子流動）や歴史の変遷（ボトルネック効果）、集団間の血縁関係や系統などを解析する上で有用である（Alcaide *et al.* 2005; Brumfield *et al.* 2003; Fredsted *et al.* 2005; Godoy *et al.* 2004; Martínez-Cruz *et al.* 2004; Paetkau *et al.* 1995). しかし、マイクロサテライト DNA 解析では多数の PCR (polymerase chain reaction,) プライマーを設計する必要がある、ミトコンドリア DNA 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座 (Major Histocompatibility Complex; MHC) に着目した (Hughes *et al.* 1998). MHC 遺伝子領域は核 DNA 上に位置し、高度な多型性に富む領域であることから、単独または数個の PCR プライマーで遺伝的多様性の解析が可能である。また、生体防御において重要な役割をもつ MHC 遺伝子は、病原体を含む環境への適合性 (fitness) と適応性 (adaptive) をもつ機能遺伝子マーカーとして知られ (Sommer 2005; Ujvari & Belov 2011), 様々な動物種の遺伝的多様性解析への応用が試みられている (Ejmond & Radwan 2011; O'Brien *et al.* 1985).

MHC 分子には、機能と発現パターンが異なる 2 つの主要なグループであるクラス I とクラス II 分子がある (図 1-2). MHC クラス II 分子は細胞外環境をモニターするため、本分子をコードする MHC クラス II 遺伝子は外界の微生物環境の影響を反映する (Dengjel *et al.* 2005). それに対し、MHC クラス I 分子は細胞内に潜伏するウイルスや癌細胞に対して働くため、本分子をコードする MHC クラス I 遺伝子は様々な感染症との相関が報告されている (Bonneaud *et al.* 2006; Carrington *et al.* 1999; Penn *et al.* 2002). MHC 遺伝子領域の解析によって得られる情報はいずれも保全において貴重な情報となるが、その複雑で多様な構造のため、解析法の確立が困難であり、そのゲノム構造が明らかにされている鳥類は多くない (表 1-2). ペンギン類においても MHC 遺伝子領域のゲノム構造は未解明であり、その多様性に関する情報はほとんどない (Tsuda *et al.* 2001).

そこで本研究では、MHC 遺伝子を指標とした多様性解析をペンギン類保全の遺伝的管理に活用するために、未解明なペンギン MHC クラス I およびクラス II 遺伝子の構造と多様性の解明、多様性解析手法の確立およびペンギン類における遺伝的多様性の評価を目的とした。

研究の取組みとして、まず、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 遺伝子に着目した。ペンギン MHC クラス II 遺伝子の既存情報は exon 2 内の塩基長 198 bp に関するのみであったため、第 2 章では鳥類の既知配列情報を参考としてフンボルトペンギン (*Spheniscus humboldti*) における本遺伝子の主要なエクソン全体の塩基配列決定を試みた。さらに、フンボルトペンギンに特化した MHC クラス II 遺伝子の多型解析手法を確立し、飼育下フンボルトペンギン集団の多様性評価を試みた。第 3 章では、形態的特徴など多くの共通性を有するフンボルトペンギン属 4 種の野生および飼育下集団における、MHC クラス II 遺伝子の多様性評価を試みた。第 4 章では、ウイルスや癌抗原など、内因性抗原の認識および提示に関わる MHC クラス I 遺伝子に着目し、ペンギン類において未解明であった本遺伝子領域のゲノム構造解明を試みた。さらに、本遺伝子領域内でとくに多型性に富む領域を標的とした多型解析手法を確立し、飼育下フンボルトペンギン集団の多様性評価を試みた。第 5 章では、前章で確立した手法を用いて、もっとも多型性を有する exon 3 領域を中心にフンボルトペンギンを含むペンギン類 7 種の MHC クラス I 遺伝子における多様性評価を試みた。第 6 章は総合考察とし、第 1~5 章の内容を踏まえて、ペンギン類の生息域内外保全における遺伝的多様性評価に対する MHC 遺伝子多型解析の有用性について考察した。

表 1-1 現生ペンギン種の分類およびレッドリスト情報

属	種	学名	英名	IUCNの指定状況	傾向
ファンボルトペンギン属	ケープペンギン	<i>Spheniscus demersus</i>	African Penguin	絶滅危機：絶滅危惧IB類	EN decreasing
	ファンボルトペンギン	<i>Spheniscus humboldti</i>	Humboldt Penguin	危急：絶滅危惧II類	VU decreasing
	マゼランペンギン	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Magellanic Penguin	準絶滅危惧	Near Threatened decreasing
	ガラパゴスペンギン	<i>Spheniscus mendiculus</i>	Galapagos Penguin	絶滅危機：絶滅危惧IB類	EN decreasing
アダリーペンギン属	アダリーペンギン	<i>Pygoscelis adeliae</i>	Adelle Penguin	準絶滅危惧	NT increasing
	ヒゲペンギン	<i>Pygoscelis antarcticus</i>	Chinstrap Penguin	軽度懸念	LC increasing
	ジェンツーペンギン	<i>Pygoscelis papua</i>	Gentoo Penguin	準絶滅危惧	Near Threatened decreasing
コガタペンギン属	コガタペンギン	<i>Eudyptula minor</i>	Little Penguin	軽度懸念	LC decreasing
	ハネジロペンギン	<i>Eudyptula albosignata</i>	White-flippered Penguin	-	-
エンペラーペンギン属	エンペラーペンギン	<i>Aptenodytes forsteri</i>	Emperor Penguin	準絶滅危惧	Near Threatened NT stable
	キングペンギン	<i>Aptenodytes patagonicus</i>	King Penguin	軽度懸念	LC increasing
マカロニペンギン属	南イワトビペンギン	<i>Eudyptes chrysolophus</i>	Southern Rockhopper Penguin	危急：絶滅危惧II類	VU decreasing
	北イワトビペンギン	<i>Eudyptes moseleyi</i>	Northern Rockhopper Penguin	絶滅危機：絶滅危惧IB類	EN decreasing
	マカロニペンギン	<i>Eudyptes chrysolophus</i>	Macaroni Penguin	危急：絶滅危惧II類	VU decreasing
	フィヨルドランドペンギン	<i>Eudyptes pachyrhynchus</i>	Fiordland Penguin	危急：絶滅危惧II類	VU decreasing
ロイヤルペンギン属	スネアーズペンギン	<i>Eudyptes robustus</i>	Snares Penguin	危急：絶滅危惧II類	VU decreasing
	ロイヤルペンギン	<i>Eudyptes schlegeli</i>	Royal Penguin	準絶滅危惧	VU stable
	シュレーターペンギン	<i>Eudyptes sclateri</i>	Erect-crested Penguin	絶滅危機	Near Threatened NT stable
キガシラペンギン属	キガシラペンギン	<i>Megadyptes antipodes</i>	Yellow-eyed Penguin	絶滅危機：絶滅危惧IB類	EN decreasing

19 種を示しているが、ペンギン類の分類は研究者によって意見が異なり、ハネジロペンギンはコガタペンギンの亜種、もしくはロイヤルペンギンはマカロニペンギンの亜種であるという説がある (Williams 1995, 1999). ここに示す内 18 種が IUCN のレッドリストに記載されている (The IUCN Red List of Threatened Species).

表 1-2 鳥類 MHC の既知塩基配列情報

分類(目)	分類(科)	和名	学名	GenBank ID	種類	登録配列長 (bp)	決定 MHC 領域	決定領域
キジ目	キジ科	ニトリ	<i>Gallus gallus</i>	AL023516	DNA	92,863	class I, II	全 MHC 領域
		ウズラ	<i>Coturnix japonica</i>	AB078884	DNA	155,564	class I, II	全 MHC 領域
		キンケイ	<i>Chrysolophus pictus</i>	JQ440366	DNA	97,476	class I, II	全 MHC 領域
		シチメンチョウ	<i>Meleagris gallopavo</i>	DQ993255	DNA	197,022	class I, II	全 MHC 領域
スズメ目	ライチョウ科	クロライチョウ	<i>Lyrurus tetrix</i>	JQ028669	DNA	88,390	class I, II	全 MHC 領域
		ソウナンライチョウ	<i>Tympanuchus cupido</i>	JX971120	DNA	60,945	class I, II	全 MHC 領域
		キンカチョウ	<i>Taeniopygia guttata</i>	ENSTGUG00000017273他	DNA	738,755	class I, II	全 MHC 領域
カモ目	アトリ科	メキシコマシコ	<i>Carpodacus mexicanus</i>	AF205032	DNA	31,936	class II	1 遺伝子座 (詳細不明)
		ムシクワイオンチ	<i>Certhidea olivacea</i>	AF164165	DNA	2,163	class II	partial ex2~partial ex3
ツル目	カモ科	マガモ	<i>Anas platyrhynchos</i>	AY885227, HM070250	DNA	36,769	class I, II	7 遺伝子座 (class I), 1 遺伝子座 (class II)
		ハイロガン	<i>Anser anser</i>	AY387655	DNA	2,603	class I	1 遺伝子座 (partial (ex1 途中~ex8))
チドリ目	ツル科	カナダツル	<i>Gruus canadensis</i>	AF033106	mRNA	1,675	class I	1 遺伝子座 (complete (全 exon 含む))
		アカハシキンカモ	<i>Larus scopulinus</i>	HM008713	DNA	5,478	class I	1 遺伝子座 (complete (ex1-ex8 含む))
ハヤブサ目	ミズナギドリ科	コオハシギ	<i>Calidris canutus</i>	KC205115	DNA	4,447	class I	1 遺伝子座 (complete (ex1-ex8 含む))
		ニジノオトリ	<i>Fratercula arctica</i>	HQ822509	DNA	808	class II	2 exons
ハヤブサ目	ハヤブサ科	アオミズナギドリ	<i>Haliobaena caerulea</i>	JF276883他	mRNA/DNA	~1,622	class I, II	不明
		ハシボロウシドリ	<i>Pachyptila belcheri</i>	FJ588549	DNA	1,896	class II	1 遺伝子座 (partial (ex1~ex6 含む))
タカ目	ハヤブサ科	ハヤブサ	<i>Falco peregrinus</i>	JN613264	DNA	407	class I	ex3
		チョウゲンボウ	<i>Falco tinnunculus</i>	EU120718	DNA	277	class I	ex3
		イペリアカタシロウシ	<i>Aquila adalberti</i>	EU120684	DNA	414	class I	ex3
		カタグロトビ	<i>Elanus caeruleus</i>	EU120682	DNA	414	class I	ex3~ex4
コンドル目	コンドル科	コンドル	<i>Vultur gryphus</i>	EU120691	DNA	414	class I	ex3~ex4
		アオサギ	<i>Ardea cinerea</i>	HM991018	DNA	1,322	class II	partial ex1~partial ex3
コウノトリ目	サギ科	コウノトリ	<i>Egretta sacra</i>	JF340056	DNA	971	class II	partial ex1~partial ex3
		コサギ	<i>Egretta garzetta</i>	HM991056	DNA	662	class II	partial ex2~partial ex3

既知鳥類 MHC 遺伝子の配列情報を示した。全 MHC 領域が明らかになされている種は、キジ目 6 種とスズメ目 1 種で、カモ目マガモは MHC 領域の一部 (7 遺伝子座) が決定されている。1 遺伝子座の全構造が決定されている種はわずか 6 種であった。それ以外は、数百塩基の断片的な配列のみ報告されている。本データは、NCBI および ENSEMBL のデータベースの情報を参考に作製した。

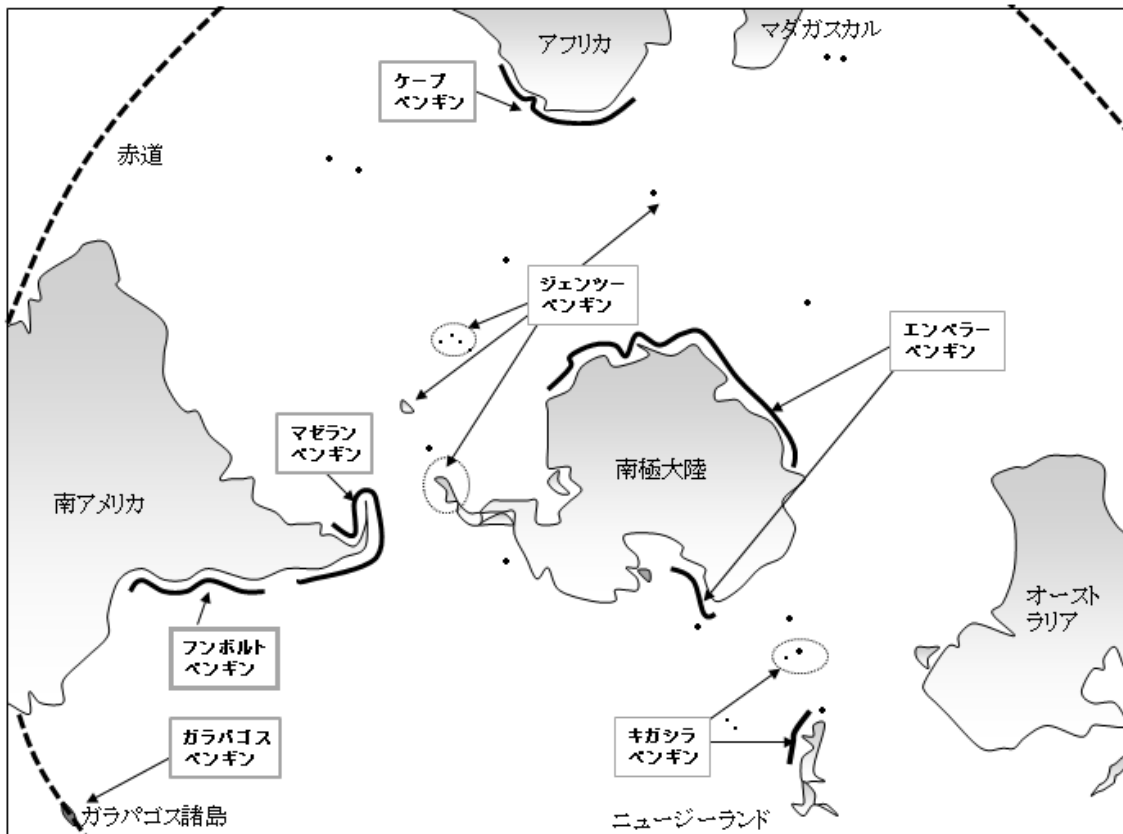


図 1-1 ペンギン類の生息分布.

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.

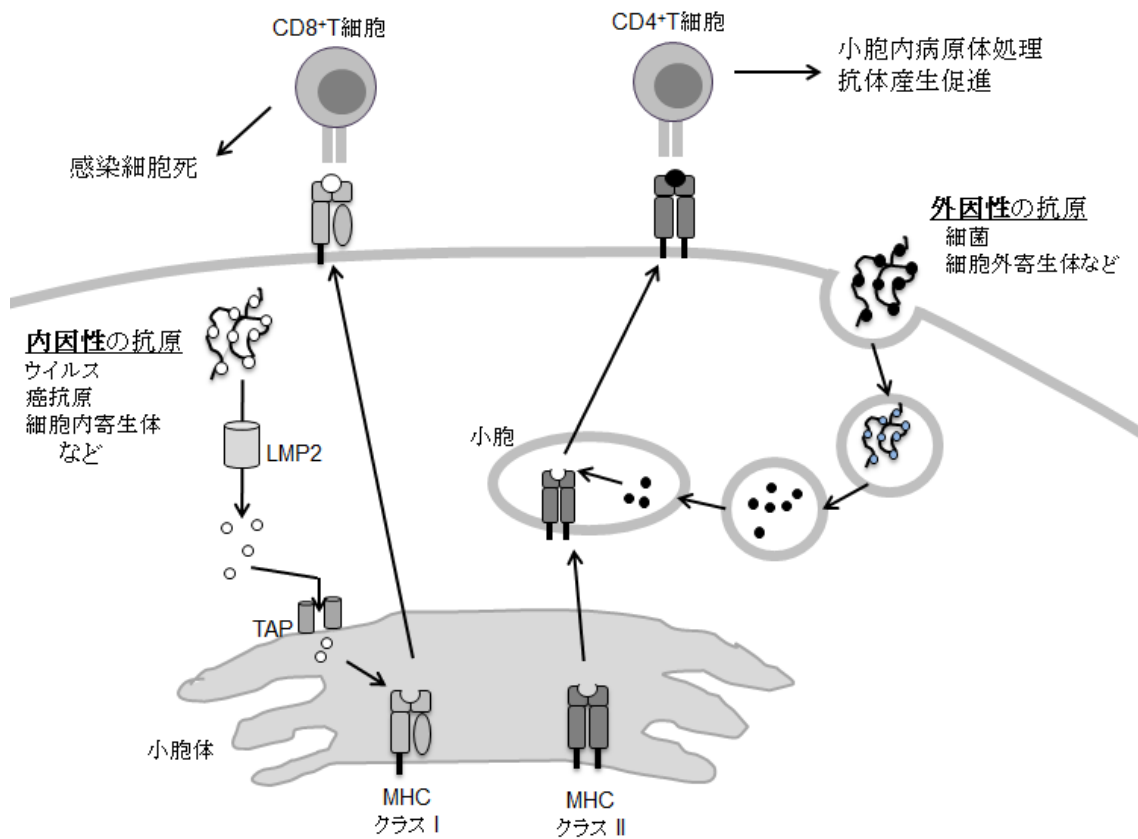


図 1-2 MHC 分子の働き.

MHC クラス I 分子は内因性抗原, クラス II 分子は外来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 (Kobayashi KS & van den Elsen 2012 より改変). 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型解析

第1節 はじめに

主要組織適合抗原複合体遺伝子座 (MHC; Major Histocompatibility Complex) は、核 DNA 上に存在し、免疫システムにおける自己と非自己の認識において重要な役割を担う MHC 分子をコードする遺伝子領域である。最も研究が進んでいるヒト MHC 領域 (HLA : Human Leucocyte Antigen) は、その全領域の塩基配列が決定され、これまでに 239 個の遺伝子座が同定されている (Marsh *et al.* 2000; Shiina *et al.* 2004a; The MHC Sequencing Consortium 1999)。このうち、MHC クラス II 遺伝子領域内には複数の遺伝子が位置しているが、免疫系で主要な働きをもつ古典的 MHC クラス II 遺伝子の中でも DRB1 遺伝子は高度な多型性を保持していることが知られている (表 2-1)。鳥類では、ニワトリ (*Gallus gallus*) とウズラ (*Coturnix japonica*) において MHC 領域の全塩基配列が明らかにされており、それぞれ 19 個および 41 個の遺伝子座が同定されている (Kaufman *et al.* 1999; Shiina *et al.* 2004b)。さらに機能的な古典的 MHC クラス II 遺伝子として、ニワトリでは 2 個 (BLB1 および BLB2 遺伝子)、ウズラでも 2 個 (DAB1 および DBB1 遺伝子) の遺伝子が知られている (Shiina *et al.* 2004b)。これら古典的 MHC クラス II 遺伝子上には高度な多型性が維持されており (Kulski *et al.* 2002; Marsh *et al.* 2000)、鳥類を含む様々な動物種において遺伝的多様性の解析対象とされている (Eimes *et al.* 2011; Ejsmond & Radwan 2011; Hawley & Fleischer 2012; Hedrick *et al.* 2002; O'Brien *et al.* 1985)。例えば、生息地の縮小による個体数減少を起こしたソウゲンライチョウ (*Tympanuchus cupido*) の MHC クラス II 遺伝子多様性解析では、遺伝的浮動 (genetic drift) の影響を強く受けた MHC 遺伝子の極度なアليل (対立遺伝子) 多様性の損失 (ボトルネック効果) が報告されている (Eimes *et al.* 2011)。

ペンギン類における MHC 遺伝子を用いた多様性解析は、従前では筆者らのグループが MHC クラス II 遺伝子 exon 2 内の一部塩基配列を決定したものが唯一の報告であり (Tsuda *et al.* 2001)、野生における個体数減少が著しいペンギン類に対する域内および域外双方の保全計画においては、より詳細な遺伝子情報が必要である。そこで、本章ではペンギン類の MHC クラス II 遺伝子に着目し、日本国内で最も多く飼育されているフンボルトペンギン (*Spheniscus humboldti*) を対象に、(1) MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造の解明、(2) MHC クラス II 遺伝子領域の多様性解明、(3) 飼育下フンボルトペンギン集団における MHC クラ

ス II 遺伝子の多様性評価を目的とした。

表 2-1 HLA の遺伝子座の種類およびアレル数

HLA クラス I

遺伝子座	古典的MHC遺伝子			非古典的MHC遺伝子		
	A	B	C	E	F	G
対立遺伝子数	3,492	4,358	3,111	21	22	53
発現分子数	2,480	3,221	2,196	8	4	18

HLA クラス II

遺伝子座	古典的MHC遺伝子						非古典的MHC遺伝子				
	DRA	DRB1	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	DMA	DMB	DOA	DOB	DOB
対立遺伝子数	7	2,135	73	940	43	671	7	13	12	13	13
発現分子数	2	1,569	33	647	21	552	4	7	3	3	5

ヒト MHC (HLA) のクラス I およびクラス II 遺伝子座の種類を示した。各遺伝子座において同定されたアレル数および発現分子数 (発現タンパク数) を示した。HLA 領域においては、構造の類似した 6 つの機能的なクラス I 遺伝子座と 11 個のクラス II 遺伝子座が同定され、現時点での全アレル数はクラス I が 11,100 個、クラス II は 3,920 個であった。全ての情報は、IMGT Nomenclature から抜粋した (Assigned as of June 2016 : <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>) .

第2節 材料および方法

2.1 供試検体

フンボルトペンギン 20 検体（国内の同一飼育施設由来 15 検体，野生（チリ）由来 5 検体，性別不明）の末梢血からフェノール・クロロホルム法（Inoko *et al.* 1986）を用いて抽出したゲノム DNA を使用した。さらに，上記とは異なる国内 11 施設で飼育されているフンボルトペンギン合計 31 検体（雄 13 検体，雌 18 検体）のゲノム DNA を供試した（日本大学野生動物学研究室より提供）。

2.2 ペンギン類 MHC クラス II 領域の塩基配列情報の獲得

ペンギン類の MHC クラス II 遺伝子の配列情報を得るために，鳥類の配列をもとに設計したプライマーを用いて，飼育下フンボルトペンギン 1 検体の塩基配列を決定した。その情報をもとに，ゲノム構造の推定および古典的 MHC クラス II 遺伝子の特徴を有するかを評価した。

(1) PCR 法による MHC クラス II 遺伝子領域の増幅

PCR プライマーとして，鳥類数種の共通配列をもとに 2 種のプライマー (LP1 および LP2) を設計した (図 2-1)。PCR 反応は以下の条件で行った。PCR 反応液は，フンボルトペンギンゲノム DNA 100 ng，10× LA Buffer 2 μ l，2.5mM MgCl₂ 2 μ l，5mM dNTP Mixture 3.2 μ l，各 10 μ M プライマー (LP1/LP2) 0.5 μ l，5units TaKaRa LA Taq 0.2 μ l (タカラバイオ株式会社) を滅菌水で合計 20 μ l に調整した。PCR 条件は，96°C 5 分間の熱変性後，96°C 30 秒間の熱変性，60°C 20 秒間のアニーリング，68°C 15 分間の伸長反応を 28 サイクル行った後，さらに 68°C 7 分間の伸長反応を行った。本章における全ての PCR 増幅は GeneAmp PCR System 9700 (ThermoFisher SCIENTIFIC K. K.) を用いた。

(2) 標的 PCR 産物の切り出し

PCR 産物から、標的とする断片 (1.5 kb) の切り出しおよび精製を行った。PCR 産物 20 μ l に 6 \times Loading Buffer Double Dye (株式会社ニッポン・ジーン) 3 μ l を加え、1.0% TBE アガロースゲル (Gene Pure LE Agarose, ビーエム機器株式会社) を用いて、100V で約 40 分間電気泳動を行った。DNA サイズマーカーは、Gene Ladder Wide 1 (株式会社ニッポン・ジーン) を使用した。泳動後のゲルは、EtBr Solution (株式会社ニッポン・ジーン) で染色を行い、ゲル撮影装置 (アトー株式会社) にて PCR 増幅バンドの出現の有無を確認した。その後、アガロースゲルから 1.5 kb の PCR 産物を切り出し、Gen Elute Minus EtBr Spin Columns (Sigma-Aldrich) を用いてマニュアルに従い精製した。

(3) Nested PCR

切り出し精製後の PCR 産物を鋳型として、Nested PCR を行った。PCR プライマーは、2 セット (LP1/pen4 および pen1/LP2) (図 2-1) を用い、以下の条件で PCR 反応を行った。PCR 反応液は、精製済 PCR 産物 1 μ l, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, 5mM dNTP 2 μ l, 各 10 μ M プライマー 0.5 μ l, 2units AmpliTaq polymerase (Thermo Fisher SCIENTIFIC K. K.) を滅菌水で 25 μ l に調整した。PCR 反応条件は 95 $^{\circ}$ C 10 分間の熱変性後、96 $^{\circ}$ C 30 秒間の熱変性、60 $^{\circ}$ C 30 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C 2 分間の伸長反応を 30 サイクル行った後、さらに 72 $^{\circ}$ C 4 分間の伸長反応を行った。

得られた Nested PCR 産物 1.5 μ l に、1 \times Loading Buffer Double Dye (株式会社ニッポン・ジーン) 2 μ l を加え、1.5% TBE アガロースゲル (Gene Pure LE Agarose, ビーエム機器株式会社) を用いて前述通りに電気泳動を行った。残分 PCR 産物は、QIAquick PCR Purification kit (株式会社キアゲン) を用いてマニュアルに従い精製した後、Nano Photometer (ワケンビーター株式会社) にて DNA 濃度を測定した。

(4) 塩基配列決定および解析

Nested PCR 産物を鋳型として、ダイレクトシーケンス法にて行った。シーケンスプライマーは、LP1, LP2, pen1 および pen4 プライマーの 4 種を用いた。サイクルシーケンス反応は以下の条件で行った。精製済 Nested PCR 産物 20~50 ng, 3.2pmol/ μ l のプライマ

ー 1 μ l, BigDye Mix 2.5 μ l を混合し, 滅菌水で 10 μ l に調整した. BigDye Mix は, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC K. K.) に含まれる Ready Reaction Premix 50 μ l と 5 \times Sequencing Buffer 175 μ l を混合した. PCR 条件は, 96°C 1 分間の熱変性後, 96°C 10 秒間の熱変性, 50°C 5 秒間のアニーリング, 60°C 4 分間の伸長反応を 25 サイクル行った.

反応液は, MULTISCREEN HTS 96 HV (メルクミリポア) および Sephadex G-50 Superfine (GE Healthcare UK Ltd) を用いてマニュアルに従い精製し, 96 well plate に回収した. 精製液は 96 well plate 内で乾燥させ, Hi-Di Formamide (Thermo Fisher SCIENTIFIC K. K.) を 10 μ l 加え, 95°C 2 分間のヒートショック後, 氷上で 5 分間静置した. PCR 産物の波形データは, ABI PRISM 377 automated sequencer (Thermo Fisher SCIENTIFIC K. K.) を用いて得た.

得られた波形データは, 解析用ソフトウェア (Sequencing Analysis Software, Thermo Fisher SCIENTIFIC K. K.) を用いて解析し, アセンブリおよび塩基配列決定は SEQUENCHER (タカラバイオ株式会社) を用いて行った.

得られた配列の構造を確認するために, GENETYX-MAC (株式会社ゼネティクス) を用いて, 他の鳥類の既知配列を参考にエクソンおよびイントロンの位置を推測した. 参考配列の種名および GeneBank Accessin number は, ニワトリ (*Gallus gallus*, M29763), ウズラ (*Coturnix japonica*, AB078884), マガモ (*Anas platyrhynchos*, HM070250) である. また, 決定配列の相同性検索を実施した (NCBI blast <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

塩基配列に基づく分子系統樹は, Mega ソフトウェア (<http://www.megasoftware.net/>) を用いて作製した. Clustal W ソフトウェアによりシークエンスのアライメントを行い, Kimura-2-パラメーターモデルを用いて各配列間の遺伝的距離を推定した. その情報をもとに近隣接合法 (NJ 法) を用いて系統樹を作成し, 系統樹の内部枝の統計的支持値をブーツストラップ法 (5,000 回の反復) で算出した. 系統比較に用いた配列は, ゲノム構造の推測で使用した鳥類 3 種およびヒト MHC の 3 種 (DRB1*01:01:01, DQB1*05:01 および DQA1*01:01, IMGT; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/align.html>) の配列を用いた.

決定した配列が, 免疫系で主要な働きをもち高度な多型性を保持する古典的 MHC 遺伝子由来の配列であるかを評価した. 決定した塩基配列から推定したアミノ酸配列上で, 哺乳類の古典的 MHC クラス II 遺伝子内で共通に保存されているアミノ酸サイトを確認した

(GENETYX-MAC). 確認したサイトは, MHC 分子の構造を安定化させる塩橋サイト, ドメイン間の結合に関与するシステイン残基およびNグリコシル化サイトを含む合計 16 箇所とした (Zoorob *et al.* 1993).

2.3 発現解析

標的領域の発現を確認するために, フンボルトペンギン飼育下個体の肝臓組織由来 RNA を鋳型に RT-PCR を実施した. 得られた PCR 産物について塩基配列を決定した.

(1) RNA 抽出および cDNA 合成

飼育下フンボルトペンギン 1 個体の肝臓組織 0.1 g から, TRIZOL Regent (GIBCO, Thermo Fisher SCIENTIFIC K.K.) を用いてマニュアルに従い RNA を抽出した. 組織の細断には解剖用ハサミを使用した. 最終的に, 組織を DEPC Water (invitrogen, Thermo Fisher SCIENTIFIC K.K.) 100 μ l に溶解し RNA 溶液を得た.

cDNA の合成は, 抽出した RNA 1 μ l を鋳型に GeneAmp RNA PCR kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC K.K.) を用いてマニュアルに従い行った.

(2) RT-PCR

決定したフンボルトペンギン MHC クラス II DRB 様遺伝子の塩基配列をもとに RT-PCR 用のプライマーを設計した (RT1_ex2F および RT3_ex3R) (図 2-1). 鋳型は, cDNA に加え, 増幅サイズを比較するためにゲノム DNA も用いた. PCR 反応は以下の条件で行った. PCR 反応液は, 50~100 ng の cDNA またはゲノム DNA, 10 \times Ex Taq buffer 2 μ l, 2.5 mM dNTP 1.6 μ l, 各 10 μ M プライマー 2 μ l, 0.5 units Ex Taq (TaKaRa) を滅菌水で合計 20 μ l に調整した. PCR 条件は, 96 $^{\circ}$ C 3 分間の熱変性後, 96 $^{\circ}$ C 30 秒間の熱変性, 60 $^{\circ}$ C 30 秒間のアニーリング, 72 $^{\circ}$ C 1 分間の伸長反応を 35 サイクル行った後, さらに 72 $^{\circ}$ C 5 分間の伸長反応を行った. 本章における PCR 増幅は全て, GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher SCIENTIFIC K.K.) を用いて行った. インターナルコントロールプライマーは, ハウスキーピング遺伝子である β アクチン遺伝子を増幅するプライマーセットを用いた (b-actin-F および b-actin-R,

Shimizu *et al.* 2004).

得られた PCR 産物 1.5 μ l を用いて前述の方法で電気泳動, 精製および DNA 濃度を測定した.

(3) 塩基配列決定

シーケンス解析は, 精製済 PCR 産物 50 ng を用いて前述の 2.2 (4)の方法により行い, ABI PRISM 3130 automated sequencer (Thermo Fisher SCIENTIFIC K. K.) にて波形データを得た. シーケンスプライマーは, RT1_ex2F および RT3_ex3R プライマーを用いた. 得られた波形データから, 前述通りの方法で塩基配列を決定した.

2.4 MHC クラス II 遺伝子の多様性解明

解析対象とした MHC クラス II 遺伝子領域内の遺伝的多様性の特徴を確認するために, フンボルトペンギン 20 検体について塩基配列を決定した. 決定した塩基配列をもとにアリルを特定し, 多型解析を実施した.

(1) フンボルトペンギン特異的プライマー設計および PCR 増幅

決定した配列をもとに, 主要なエクソン (exon 2 および 3) を含む領域を増幅するフンボルトペンギン特異的な多型解析用プライマーを 4 種類設計した (Lpen.hum1F, 2R, 2F および 3R) (図 2-1). このうち Lpen.hum1F および 3R プライマーを PCR プライマーとして, フンボルトペンギン 20 検体 (飼育下 15 検体および野生 5 検体) のゲノム DNA を試料として以下の条件で PCR 反応を行った. PCR 反応液は, ゲノム DNA 100 ng, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, 5mM dNTP 2 μ l, 各 10 μ M プライマー 0.5 μ l, 2 units AmpliTaq polymerase (ThermoFisher SCIENTIFIC K. K.) を滅菌水で合計 25 μ l に調整した. PCR 条件は, 95 $^{\circ}$ C 10 分間の熱変性後, 96 $^{\circ}$ C 30 秒間の熱変性, 60 $^{\circ}$ C 30 秒間のアニーリング, 72 $^{\circ}$ C 2 分間の伸長反応を 35 サイクル行った後, さらに 72 $^{\circ}$ C 4 分間の伸長反応を行った. 増幅後の PCR 産物は, 前述通りに電気泳動, 精製および DNA 濃度を測定し, クローニングおよびダイレクトシーケンスに用いた.

(2) クローニング

アリル決定のため、精製済 PCR 産物 (Lpen.hum1F /3R) 2 μ l をインサートとして、pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems (プロメガ株式会社) を用いてマニュアルに従いライゲーションを行った。

得られたライゲーションサンプル 2 μ l にコンピテントセル (Competent high DH5 α , 東洋紡株式会社) 20 μ l を加え、氷上 30 分間の後、42°C で 2 分間加熱処理を行い、直ちに氷上で 5 分間インキュベートした。その後、SOC Buffer (東洋紡株式会社) 200 μ l を加えウォーターバスで 37°C 1 時間の振とう培養を行った。

LB 寒天培地の表面に、0.1M IPTG (Sigma-Aldrich) 20 μ l, 20mg/ml X-gal 40 μ l (Sigma-Aldrich) および培養した菌液 200 μ l を塗布し、37°C で 18 時間培養した。IPTG および X-gal を添加した培地では、インサートを含まないプラスミドによる形質転換体は青色コロニーになるのに対し、インサートを含むプラスミドによる形質転換体は白色コロニーとなる。LB 寒天培地は、LB-Broth Miller, Pre-Weighed Litre Pack (フナコシ株式会社) および BACTO AGAR (Becton, Dickinson and Company) を用いて作製し、最終濃度 50 μ g/ml のアンピシリンナトリウム塩 (Sigma-Aldrich) を添加した。

(3) コロニーPCR

各 PCR 産物 (Lpen.hum1F /3R) につき、10 個以上の白色コロニーを PCR 増幅に用いた。PCR プライマーは、プラスミドベクター特異的に設計したプライマー (T7 および SP6 promoter) (図 2-1) を使用し、以下の条件で PCR 反応を行った。PCR 反応液は、10 \times PCR buffer 2.5 μ l, 5mM dNTP 2 μ l, 各 10 μ M プライマー (T7/SP6) 0.5 μ l, 2 units AmpliTaq polymerase (Thermo Fisher SCIENTIFIC K. K.) を滅菌水で合計 25 μ l に調整した。8 連 PCR チューブのウェル底に 1 コロニーを少量塗布し、調整した反応液 25 μ l を各ウェルに加えた。PCR 条件は、95°C 10 分間の熱変性後、96°C 30 秒間の熱変性、55°C 30 秒間のアニーリング、72°C 2 分間の伸長反応を 30 サイクル行った後、さらに 72°C 4 分間の伸長反応を行った。コロニー PCR 産物は、前述通りに電気泳動、精製および DNA 濃度を測定した。

(4) 塩基配列決定および解析

(1) の PCR 産物および (3) のコロニーPCR 産物についてシーケンス解析を行った。シーケンスプライマーは, Lpen.hum1F, 2R, 2F および 3R の 4 種を用い, 前述の 2.2 (4) の方法により塩基配列を決定した。

得られた配列情報の精度を評価するために, ダイレクトシーケンスおよびクローニングによりそれぞれ得られた塩基配列が一致するかを確認した。決定した各検体の配列情報から, GENETYX-MAC (株式会社ゼネティクス) を用いてアリルを特定した。

フンボルトペンギン MHC クラス II 遺伝子の多様性の特徴を明らかにするために, 以下に示す多型解析を実施した。多型解析および塩基置換率算出には, 配列解析用ソフトウェア (GENETYX-MAC, 株式会社ゼネティクス) を用いた。決定したアリルの塩基配列およびアミノ酸配列をペンギン 4 種の既知 MHC クラス II 遺伝子 exon 2 内 198 bp の配列と比較し (Tsuda *et al.* 2001), 各種内の多型数を確認した。比較に使用したペンギン種は, アデリーペンギン属アデリーペンギン (*Pygoscelis adeliae*), ヒゲペンギン (*P. antarcticus*), ジェンツーペンギン (*P. papua*) およびコガタペンギン属コガタペンギン (*Eudyptula minor*) の 4 種で, GeneBank Accessin number は図 2-3 に示した。さらに, フンボルトペンギンのアミノ酸配列 (exon 2, 3) を鳥類 8 種および哺乳類 8 種の配列と比較した。比較に用いた配列の詳細は図 2-4 に示した。ヒトで明らかにされているペプチド結合領域 (PBR) に相当するサイトの多型の有無をフンボルトペンギンアミノ酸配列上で確認した (Brown *et al.* 1993; Promerova *et al.* 2013)。決定したエクソン領域の塩基配列をもとに, 同義置換率と非同義置換率を算出した。

決定した塩基配列情報は, DDBJ に登録し, EBI/EMBL と NCBI/GenBank (www.ddbj.nig.ac.jp) の国際塩基配列データベース協同運営協会 INSDC (The International Nucleotide Sequence Database Collaboration) によって登録番号が発行された。

2.5 飼育下フンボルトペンギン集団における MHC クラス II 遺伝子の多様性評価

国内の飼育施設集団における MHC クラス II 遺伝子の遺伝的多様性を評価するために, 複数施設で飼育される検体の塩基配列を決定した。得られた情報をもとに, ヘテロ接合度,

アレル分布およびアレル間の遺伝的距離の3項目を指標とした MHC クラス II 遺伝子における多様性評価を実施した。

(1) PCR 法による MHC クラス II 遺伝子領域の増幅

日本国内11施設で飼育されているフンボルトペンギン31検体を試料として以下の条件で PCR 反応を行った。PCR 反応液は、ゲノム DNA 50 ng, 5× PrimeSTAR GXL Buffer 4 μl, 2.5mM dNTP mixture 1.6 μl, 各 10μM プライマー (Lpen.hum1F/3R) 0.3 μl, PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) 0.3 μl を滅菌水で合計 20 μl に調整した。PCR 条件は、94°C 20 秒間の熱変性後、98°C 10 秒間の熱変性、64°C 15 秒間のアニーリング、68°C 1 分間の伸長反応を 30 サイクル反応させた。得られた PCR 産物は、前述通りに電気泳動、精製および DNA 濃度を測定した。

(2) 塩基配列決定および解析

シーケンス解析は、ABI PRISM 3730 automated sequencer (Thermo Fisher SCIENTIFIC K. K.) を用いて前述と同様の方法で行い、塩基配列を決定しアレルを特定した。シーケンスプライマーは、PCR 増幅プライマーの内側に新たに設計した Lpen.hum1F2 と Lpen.hum3R2 プライマーを用いた (図 2-1)。

国内飼育下フンボルトペンギン集団の多様性解析は、本章 2.4 で解析した 1 施設集団 (施設 ID : A01) のうち 8 個体の配列情報を加え、合計 12 施設の集団を対象とした。しかし、2 施設 (施設 ID : Z06, Z08) は個体数が評価基準に満たなかったため、国内全体での評価では対象としたが、施設ごとの評価では対象外とした。全アレルの塩基配列から推定したアミノ酸配列に基づく分子系統樹は、前述した方法と同様に作成した。遺伝的多様度の評価指標とされるヘテロ接合度は、 $h = 1 - \sum x_i^2$ (x_i : アレル頻度) の計算式を用いて算出した (Nei 1973)。得られた数値は、小池と松井の評価方法にならい 0.8 以上を多様性が高く、0.4 以下を多様性が低いと評価した (小池と松井 2003)。

2.6 ゲノム DNA のサザンブロット分析

MHC 遺伝子領域は、遺伝子重複の結果として遺伝子コピーや偽遺伝子を含む相同性の高い遺伝子が複数密集した多重遺伝子構造を有することがヒトや鳥類の研究により明らかとなっている (Edwards & Hedrick 1998a; Kaufman *et al.* 1999; Hess & Edwards 2002; Shiina *et al.* 2004b). 本研究で設計したプライマーが、相同性の高い複数の遺伝子を増幅している可能性を否定するために、ゲノム DNA サザンブロット分析を実施した。

(1) ゲノム DNA の制限酵素処理および電気泳動

フンボルトペンギンのゲノム DNA 15 μ g に Pst I 制限酵素 (New England Biolabs Inc.) 60 Unites および添付 Buffer を加え全量 500 μ l に調整し、ウォーターバスで 37°C 一晚制限酵素処理を行った。処理後の反応液に、等量のフェノール (和光純薬工業株式会社) を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後 18,000 \times g で 5 分間遠心した。分離後、水相を新しいチューブに移し、3M 酢酸ナトリウム 50 μ l および冷却済みエタノール (99.5%, 和光純薬工業株式会社) 1 ml を加えよく混合した後、20,000 \times g で 10 分間遠心した。分離後上清を取り除き、70%エタノール 1 ml 加え、20,000 \times g 5 分間遠心した。上清を完全に取り除き、室温で沈殿を乾燥させた。滅菌水 8 μ l と 1 \times Loading Buffer Double Dye (株式会社ニッポン・ジーン) 4 μ l を加えボルテックスミキサーで沈殿を溶解し、55°C で 10 分間インキュベートすることで DNA を溶解させた。

13x13 cm のゲルメーカー (アトー株式会社) を用いて作製した 0.8%TAE アガロースゲルのウェルに DNA 溶液全量をアプライし、電気泳動電源装置 (アトー株式会社) を用いて 20V で 17 時間以上電気泳動した。

泳動後のゲルを適当なサイズの容器に移し、0.25N HCl (和光純薬工業株式会社) をゲルが浸かる程度まで注ぎ、ゲル上の BPB 色素 (1 \times Loading Buffer Double Dye に含まれる) が酸性を示す黄緑色に変色した後 10 分間振とうした。ゲルを 0.4N NaOH (和光純薬工業株式会社) を注いだ容器に移し室温で 30 分間振とう、もしくはゲル上の BPB 色素がもとの色に戻ってから 15 分間振とうした。

(2) ゲノム DNA のメンブレンへのトランスファー

ゲルと同形サイズに切断した Hybond-N⁺ membrane (メンブレン, Amersham) 1 枚およびブロットィング用ろ紙 (3MM, GE Healthcare) 3 枚 (長方形サイズ, 13 cm x 25 cm) を 0.4N NaOH 入りの容器内に浸した。

使用するガラス板よりも大きいサイズの容器を用意し, アクリルまたはプラスチックの台 (高さ 15 cm 程度) を容器の中央に設置した。その上にガラス板 (15x15 cm 程度) を乗せ, 0.4N NaOH を台の中央まで注いだ。長方形のろ紙 3 枚を両端が 0.4N NaOH に浸るようにガラス板の上に 1 枚ずつ順に置いた。ろ紙の中央にアルカリ変性後のゲルを逆さま (コーム穴が開いている方を下) にのせ, その上に Hybond-N⁺ membrane をおいた。メンブレンの上にゲルと同形サイズの乾いたろ紙 3 枚をのせ, その上にペーパータオル (日本製紙クレシア株式会社) 1 袋分をのせた。最後にガラス板 (15x15 cm 程度) をのせ, その上に 500 g 程度の重りをのせた。長方形のろ紙により吸い上げられた 0.4N NaOH がペーパータオルに移動するため, 0.4N NaOH で湿ったペーパータオルを 30 分ごとに 2 回程度交換し, 0.4N NaOH を容器に注ぎ足した後, 一晚静置した。

トランスファー後のメンブレンは, 2x SSC (0.3M NaCl, 0.03M クエン酸ナトリウム, pH7.0; 和光純薬工業株式会社) に浸し 2 分間振とう後, ハイブリダイゼーション用バッグ (ハイブリバック, コスモ・バイオ株式会社) に入れ, 手動シーラーを用いて袋状に閉じた後, 使用するまで 4°C に保存した。

(3) DNA プローブの調整

DNA プローブとして, 2 種類の PCR 産物を用意した (Lpen.hum1F/2R および RT1/RT2 のプライマーセットで増幅した PCR 産物)。プローブ調整の手順は以下の通りである。

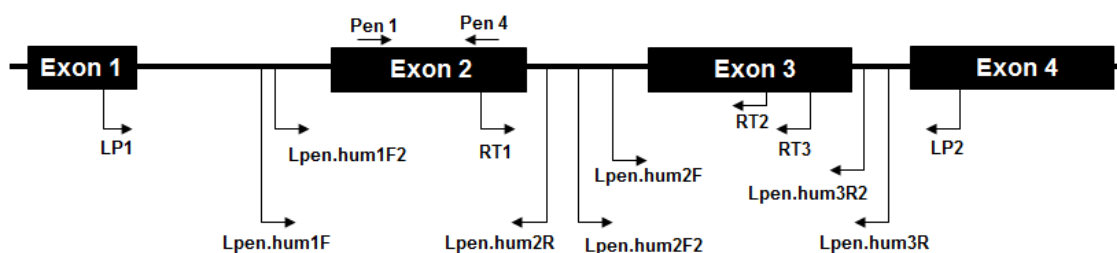
Lpen.hum 1F/3R の断片をインサートとしたプラスミド DNA (本章 2.4 (2)) を以下の方法で抽出した。終濃度 50 μ g/ml アンピシリンナトリウム塩 (Sigma-Aldrich) を添加した LB 培地 1 ml に 1 コロニーを懸濁し, 37°C で一晚振とう培養した。得られた菌液から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてマニュアルに従いプラスミド抽出を行った。

抽出したプラスミド (Lpen.hum 1F/3R) を鋳型に以下の条件で PCR 反応を行った。PCR 反応液は, プラスミド 50 ng, 10 \times NH₄ buffer 5 μ l, 50mM MgCl₂ 2 μ l, 2mM dNTP 4 μ l, 各 10 μ M

プライマー (Lpen.hum1F/2R または RT1/RT2 プライマーセット) 0.5 μ l, BIOTAQ DNA Polymerase (BIO LINE 社) 0.2 μ l を滅菌水で合計 50 μ l に調整した. PCR 条件は, 96°C 3 分間の熱変性の後, 96°C 10 秒間の熱変性, 62°C または 60°C 20 秒間のアニーリング (Lpen.hum 1F/2R は 62°C, RT1/2 は 60°C), 72°C 30 秒間の伸長反応を 30 サイクル行った後, さらに 72°C 5 分間の伸長反応を行った. 得られた PCR 産物は, 前述と同様の方法で電気泳動, 精製および DNA 濃度を測定した.

(4) DNA プローブの標識およびハイブリダイゼーション

DNA プローブの標識およびハイブリダイゼーションは, AlkPhos Direct ECL Direct (GE Healthcare) を用いてマニュアルに従い行い, 露光 X 線フィルムを得た. X 線フィルムは, Hyperfilm ECL (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を使用し, 5 分間, 20 分間, 1 時間露光し画像を得た.



プライマー名	配列情報 (5' ~ 3')	長さ	位置	向き	PCR産物塩基長	参考配列
pen1	AACGGCACCGAGCGGGTGAGGT	22 mer	Ex 2	sense	198 bp	ヒト, 鳥類
pen4	CCCGTAGTTGTGTTGGCAG	19 mer	Ex 2	antisense		
LP1	TGGGGCCCTACTGGTGGCACT	21 mer	Ex 1	sense	1.5 kb	鳥類
LP2	CGATCCCCGTCAGCATGTTGC	21 mer	Ex 4	antisense		
Lpen.hum1F	GTCAGGATCACACCGCCACTC	21 mer	Int 1	sense	476 bp	フンボルトペンギン
Lpen.hum2R	ACACGCTCTCCCCTCCTGTG	20 mer	Int 2	antisense		
Lpen.hum2F	ACGTCCCGCGTAGGGACCAC	20 mer	Int 2	sense	445 bp	フンボルトペンギン
Lpen.hum3R	CGCTCCCCGCCTGGATC	17 mer	Int 3	antisense		
Lpen.hum1F2	ACTCCTGGCACAGCCGCGTG	20 mer	Int 1	sense		
Lpen.hum3R2	AGGGTGCCGGACAGGGCG	18 mer	Int 3	antisense		
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	20 mer				ベクター
SP6 promoter	CAAGCTATTTAGGTGACACTATAG	24 mer				ベクター
RT1_ex2F	CCAAGTACTGGAACAGCCAGACG	23 mer	Ex 2	sense		フンボルトペンギン
RT2_ex3R	GTAGGTCCAGTCTCCGTTCTGGATC	25mer	Ex 3	antisense		
RT3_ex3R	TCCAGCATCACCAGCACCTG	20 mer	Ex 3	antisense		

図 2-1 ペンギン MHC クラス II DRB 様遺伝子領域内に設計した PCR プライマー情報。各プライマーの位置および方向を示した図を上段に、その下に各プライマーの情報を示した。pen1 および pen4 プライマーは、Tsuda *et al.* (2001) によって報告されたプライマーで、他は本研究において新たに設計した。参考配列は、プライマーを設計する際に用いた配列の由来を意味する。

第3節 結果

3.1 MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造

鳥類の既知塩基配列をもとに設計した LP1 および LP2 プライマーを用いて、フンボルトペンギン MHC クラス II DRB 様遺伝子 exon 2, intron 2 および exon 3 を含む 807 bp の塩基配列を決定することに成功した。決定したエクソンおよびイントロンの塩基長は, exon 2 が 270 bp, exon 3 が 282 bp, および intron 2 は 255 bp であった。他の鳥類の MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造と比較した結果, フンボルトペンギンの intron 2 の塩基長は, ニワトリ (Kaufman *et al.* 1999) を除く他の鳥類の中で最も短かったものの, exon 2 および exon 3 の塩基長は, 他の鳥類と同等であることが明らかになった。

得られた配列が古典的 MHC クラス II 遺伝子に特徴的なゲノム構造を有するか確認するために, 合計 16 箇所のアミノ酸残基を確認した結果 (Zoorob *et al.* 1993), $\beta 1$ と $\beta 2$ ドメインを結合するシステイン残基とされる 15 番目と 79 番目のアミノ酸残基がフンボルトペンギンにおいてもシステイン (C) であることが分かった (図 2-4)。19~21 番目のアミノ酸残基は, N グリコシル化サイトに特徴的な「NGT」を示した。塩橋サイトを含む MHC 分子の構造を安定化させるとされる 11 箇所のアミノ酸残基のうち 9 箇所は, フンボルトペンギンにおいても保存されていたことが明らかになった。残りの 2 箇所 (36 番目 Q と 39 番目 H) のアミノ酸残基は, ヒトなどの哺乳類とは異なる多型を示したが, ニワトリを含む鳥類とは一致した。以上の結果, フンボルトペンギンの配列上で確認した 16 箇所のアミノ酸残基は, マガモやニワトリとは 15 箇所, その他鳥類や哺乳類とは 14 箇所一致した。このことから, 本章で決定した配列が古典的 MHC クラス II 遺伝子の特徴を有することを確認した。

3.2 RT-PCR 法による発現解析

フンボルトペンギンの肝臓由来 cDNA から 313 bp, ゲノム DNA からは 568 bp の PCR 産物が得られた (図 2-5)。得られた PCR 産物のシーケンス解析の結果, 肝臓 cDNA 由来の PCR 産物は MHC クラス II DRB 様遺伝子の intron 2 を除く exon 2 および exon 3 の連続配列

で構成されていた。それに対し、ゲノム DNA 由来の PCR 産物は, intron 2 を含む exon 2- intron 2- exon 3 の配列で構成されていた。

以上の結果から, 解析対象とした領域が, 発現する MHC クラス II 遺伝子であることを明らかにした。

3.3 相同性検索および系統樹解析

決定したフンボルトペンギンの塩基配列を用いた相同性検索の結果, 複数鳥類の MHC クラス II 遺伝子配列が検出され, 高い相同率が得られた。例えば, ユキドリ MHC class II DAB 遺伝子 (*Pagodroma nivea*, KJ162536) と 92%, クロコシジロウミツバメ MHC class II DAB 遺伝子 (*Oceanodroma castro*, KJ162536) と 91%, マガモ MHC class II β 遺伝子 (AF390589) と 91.7% など, MHC クラス II 遺伝子の中でも主要な古典的 MHC 遺伝子に分類される DAB 遺伝子 (Shiina *et al.* 2004b) と 90% 以上の相同性を示した。参考として他の動物種における MHC クラス II β 遺伝子の相同率を算出したところ, ヒトの DRB1 遺伝子 (DRB1*01:01:01) とチンパンジー DRB 遺伝子 (Pan troglodytes, AY663401) では 93%, ニワトリの BLB2 遺伝子 (M29763) とウズラの DAB1 遺伝子 (AB078884) でも 93% の相同率が得られた。

ヒトや鳥類の MHC クラス II 遺伝子の塩基配列をもとに作成した系統樹は 2 つの分岐群に大別され, 1 つは α ドメインをコードする遺伝子の分岐群 (マガモの DRA 遺伝子, ヒトの DQA1 遺伝子など), もう 1 つは β ドメインをコードする遺伝子の分岐群 (ヒトの DRB1 および DQB1 遺伝子, ニワトリの BLB2 遺伝子, ウズラの DAB 遺伝子など) であった。フンボルトペンギンの MHC クラス II 遺伝子の塩基配列は, β ドメインの分岐群に位置した (図 2-6)。

3.4 ゲノム DNA サザンブロット分析による解析領域の評価

ゲノム DNA サザンブロット分析の結果, Lpen.hum1F / 2R プローブとハイブリダイズした 832 bp のシングルバンドを得ることができた (図 2-7)。RT1 / RT2 プローブがハイブリダイズする塩基配列内に PstI の切断サイトが 1 箇所存在するため, RT1 / RT2 プローブの結果

では 833 bp および 370 bp の 2 つの目的とするバンドが認められた。両プローブから検出されたバンドサイズは、PCR 産物の塩基配列および制限酵素切断サイトから予想したサイズと一致した。

3.5 MHC クラス II 遺伝子における多様性の特徴

(1) 塩基配列を用いた多型解析

フンボルトペンギン 20 検体（飼育下 15 検体および野生 5 検体）の塩基配列を決定した結果、ダイレクトシーケンスとクローニングによって得られた塩基配列は矛盾なく一致した。決定した 20 個体の塩基配列 807 bp (exon 2- intron 2- exon 3) から、8 つの異なるアレル配列が得られた (Accession ID: AB154393-9, AB162144) (図 2-2)。

得られたアレルの塩基配列における多型解析の結果、検出された一塩基多型の多くが exon 2 内で確認され、intron 2 と exon 3 は高い配列保存性を示すことが明らかになった (図 2-2)。具体的には、exon 2 上に 27 箇所、exon 3 に 3 箇所、そして intron 2 に 2 箇所の一塩基多型サイトを確認した。

既報のペンギン 4 種における exon 2 内 198 bp の塩基配列 (Tsuda *et al.* 2001) を加えた多型解析では、ペンギン各種に特徴的な多型を確認した (図 2-2)。フンボルトペンギンに特徴的な多型を 3 箇所 (107 番目-T, 125-G, 149 -T)、アデリーペンギン属で 3 箇所 (81 番目-C, 165-G, 200-G)、コガタペンギンで 1 箇所 (116-T) 確認した。

多型解析により検出した exon 2 領域内の多型がアミノ酸置換を生じるか確認した結果、フンボルトペンギンの 8 アレル間では同義置換率が 1.5%、非同義置換率が 9.4%となり、非同義置換率がきわめて高かった。アデリーペンギン属 3 種およびコガタペンギンにおいても同様の結果となった。以上の結果から、解析したペンギン種においては、MHC クラス II 遺伝子で検出された多型のほとんどがアミノ酸の変化する非同義置換であることが明らかになった。

(2) アミノ酸配列を用いた多型解析

既報のペンギン 4 種の exon 2 内 198 bp から推定した 53 アミノ酸残基 (Tsuda *et al.* 2001)

を加えたアミノ酸配列の多型解析では、フンボルトペンギンに特徴的な多型を1箇所（46番目-Q）確認した（図 2-3）。この多型を含む 46-Q と 47-F の組み合わせは、他のペンギン種とは明確に異なっていた。また、71 番目に4種のアミノ酸多型（R, K, E, S）を確認し、フンボルトペンギン配列内で最も多様なアミノ酸サイトであることが明らかになった。

他の鳥類および哺乳類のアミノ酸配列を加えた多型解析では、フンボルトペンギンに特徴的なアミノ酸多型を6箇所（6番目-Y, 46-Q, 164-T, 172-A, 181-Q, 182-H）確認した（図 2-4）。また、フンボルトペンギンおよび鳥類に特徴的で、哺乳類とは異なるアミノ酸多型が5箇所（34番目-R, 48-V, 106-S, 108-S, 155-Y）あることが明らかになった。

哺乳類で同定されている24箇所のPBRサイト（Hughes & Yeager 1998; Promerova *et al.* 2013）のうち12箇所に、フンボルトペンギンの種内多型を確認した（図 2-4）。さらに、フンボルトペンギンに特徴的な4箇所のアミノ酸多型（37番目-D, 38-V, 47-F, 71-RKES）が、PBRに位置することが明らかになった。

3.6 飼育下フンボルトペンギン集団における MHC クラス II 遺伝子の多様性評価

(1) 塩基配列情報

日本国内11施設の飼育下フンボルトペンギン31個体のMHCクラスII DRB様遺伝子の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した結果、2つの新規アレル（Sphu008およびSphu009）が検出され、Sphu008は2個体（NM001およびNM20）から、Sphu009は1個体（NM50）から得られた（表 2-2）。またNM25個体においては、Sphu001もしくはSphu002の1bp違いの新規アレル配列が推定された。そのため、2組の候補（Sphu001,002variantおよびSphu002,001variant）が考えられ、1つの候補に絞り込めないフェーズアンビギュイティ（phase ambiguity）となった。3.5で解析した施設（施設ID:A01）の個体も含め（図 2-2）、解析を実施した国内飼育下フンボルトペンギン全個体からは、新規アレルを含め10アレルを検出した（表 2-2）。

(2) ヘテロ接合度

解析した全飼育下個体（国内12施設39個体）におけるヘテロ接合度は、0.82であり、

遺伝的多様性は高いと評価した。しかし、施設ごとでは（国内 10 施設 37 個体）、1 施設（施設 ID : A01）が 0.76 で多様性が高く、2 施設（Z05, Z09）は 0.4 以下（0.25 または 0.38）となり多様性が低いと評価した。また 7 施設は 0.50~0.67 の数値となり多様性の高低は評価できなかった。7 施設の詳細な数値は、Z01 は 0.63, Z02 は 0.67, Z03 は 0.53, Z04 は 0.63, Z07 は 0.50, A02 は 0.62, A03 は 0.63 であった。

(3) アリル分布

全 39 個体のアリル分布を評価した結果、28 個体がヘテロ接合型（71.8%）で 11 個体がホモ接合型（28.2%）であった（表 2-2）。

施設ごとにアリル分布を評価した結果（国内 10 施設 37 個体）、全個体が同一アリルを保有している施設が 6 施設（施設 ID : Z01, Z03, Z05, Z07, Z09, A03）あった（表 2-2）。とくに施設 ID Z07 は、全個体がヘテロ接合型で同一アリルセットを保有していた（Sphu002, Sphu005）。他の施設においても、共通アリルをもつ個体が多く確認され、施設内で頻度の高いアリルを保有する個体の割合は、Z04 が 75%, Z02 が 68%, A02 が 60%, A01 は 38% であった。また、各施設で確認した共通アリルは、施設ごとで異なった。

(4) アリル間の遺伝的距離

各アリルの塩基配列をアミノ酸配列に変換し作成した系統樹を図 2-8 に示した。フンボルトペンギン MHC クラス II 遺伝子の 10 アリルは、4 群に分かれた（分岐群 a, b, c, d）。分岐群 a および c は枝長が短く、分岐群 a に属する Sphu003 と 007 アリル間の塩基多型は 1 塩基のみで、分岐群 c に属する Sphu0011 と 008 アリル間では 2 塩基多型のみであった。それに対し、最も枝長が長い分岐群 b に属する Sphu005 と 006 アリル間は 16 塩基多型であった。また、遺伝的距離（p-distance）の平均は、全アリル間で 0.016（0.001~0.024）、分岐群 a は 0.002（0.001~0.003）、分岐群 b は 0.019、分岐群 c は 0.005（0.001~0.007）であった。これにより、分岐群 b のアリルは遺伝的に遠く、分岐群 a および c は遺伝的に近縁なアリルで構成されていることが明らかになった。各施設で検出したアリルを確認したところ、例えば施設内に Sphu0011 と 008 が存在するというような遺伝的距離の近い群に属するアリルを保有する施設はなかった。しかし、国内の全解析個体から得られたアリルは、数塩基の差しか

ない近縁なアリルが多いことが明らかになった。

表 2-2. 飼育下フンボルトペンギン個体の MHC クラス II 遺伝子アリル情報

No.	検体 ID	性別	施設 ID	CLS2-DRB*	CLS2-DRB*
1	60	-		Sphu001	-
2	62	-		Sphu003	-
3	63	-		Sphu001	Sphu005
4	127	-	A01	Sphu0011	Sphu002
5	129	-		Sphu004	-
6	130	-		Sphu001	Sphu003
7	131	-		Sphu003	-
8	151	-		Sphu003	Sphu005
9	NM001	♂		Sphu008	-
10	NM010	♀	A02	Sphu002	Sphu003
11	NM020	♀		Sphu008	-
12	NM021	♀		Sphu002	Sphu003
13	NM022	♂		Sphu003	Sphu008
14	NM025	♂	Z01	Sphu001, 002v	Sphu001v, 002
15	NM026	♂		Sphu001	Sphu002
16	NM027	♂		Sphu001	Sphu003
17	NM030	♂	Z02	Sphu002	-
18	NM031	♀		Sphu003	Sphu005
19	NM032	♂		Sphu001	Sphu002
20	NM033	♂	Z03	Sphu001	Sphu003
21	NM034	♀		Sphu001	-
22	NM035	♀		Sphu001	Sphu002
23	NM036	♀		Sphu001	Sphu002
24	NM037	♀	Z04	Sphu001	-
25	NM038	♀		Sphu004	Sphu005
26	NM039	♀		Sphu004	Sphu005
27	NM040	♀		Sphu004	-
28	NM043	♂	Z05	Sphu001	Sphu002
29	NM044	♀		Sphu001	-
30	NM046	♀	Z06	Sphu001	Sphu002
31	NM049	♀	A03	Sphu002	Sphu003
32	NM050	♂		Sphu003	Sphu009
33	NM052	♀	Z07	Sphu002	Sphu005
34	NM053	♂		Sphu002	Sphu005
35	NM054	♀		Sphu002	Sphu005
36	NM055	♀		Sphu002	Sphu005
37	NM057	♂	Z08	Sphu001	Sphu006
38	NM060	♂	Z09	Sphu001	Sphu006
39	NM062	♀		Sphu001	Sphu004

施設 ID で示した記号の A は水族館，Z は動物園を意味する。横線はホモ接合型を示す。NM25 検体においては，Sphu-001,002variant または Sphu-002, 001variant の組み合わせの Ambiguity が考えられた。各施設で頻度の高いアリルをグレーのハイライトで示した。

ペンギン	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420
Sphu-	001	GGCAGAACAT	GTCCCGGGG	GACGGGGCA	AGCCAAAGCC	CGGGGCTCAC	AGGAAGGAG	AGCGTGTCCG	TGCCGTCCTT	GGCAGGGCC	CCGGGCGCC	TCCAGAGGA	CGGAGTCCC	GTGCAGCCTC
	001.1
	002
	003
	004
	005
	006
	007
ペンギン	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560
Sphu-	001	CCTGGGACG	TCCCGGCTG	GGACCAACG	GGCAGCCCTG	GGCAGCCCTG	GGTGGCCCG	GTGGTGGCCG	GTGGTGGCCG	GTGGTGGCCG	GTGGTGGCCG	GTGGTGGCCG	GTGGTGGCCG	GTGGTGGCCG
	001.1
	002
	003
	004
	005
	006
	007
ペンギン	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
Sphu-	001	AGCTCCCTGC	CCCAAGCCG	CAGGCTGGT	TGCTACGTGA	CGGGCTCTA	CCCGCCGAG	ATCGAGTGA	AGTGGTCAA	GAACGGGCG	GAGGAGCG	AGCGGCTGG	GTCCACGAC	GTGATCCAGA
	001.1
	002
	003
	004
	005
	006
	007
ペンギン	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	810			
Sphu-	001	GAOCACCCAG	GTGCTGGTGA	TGCTGGAAC	CGCCCGGAG	CGCGGGGACA	CCTACGGTG	CCAGGTGGAG	CAGCTCAGCC	TGCACACC	CGTCAACCAG	CAACTGGG		
	001.1		
	002		
	003		
	004		
	005		
	006		
	007		

図 2-2 ペンギン類 MHC クラス II DRB 様遺伝子 exon 2～exon 3 の塩基配列比較。
 ファンボルトペンギンから得られた 8 アリル (Sphu-001～007) の全塩基配列を並べ、その下に既報のアデリーペンギン属およびヒコガタペンギン属の exon 2 内 198 bp の配列を比較のために並べた (Tsuda *et al.* 2001). 「・」はファンボルトペンギンの 001 アリル配列と一致する塩基を意味する。縦長の四角は特徴的な多型部位を示す。

		pen1 →	30	40	50	60	70	← pen4
			+++	++	+	++	++	
フンボルト ペンギン	Sphu001	NGTERVR	YVERDIYNRQ	QDVHFDSVDG	QFVADTPLGE	PDAKYWNSQT	DLLEQRRAEV	DTYCRHNYGV
	0011	
	002	F...K...V
	003		F.V.....	.N.....I...DE..A.
	004		F.V.....F...S...A.
	005		F...Y.....	.N.....	YY.....F...K...I
	006		L.....	.Y.....	YY.....	.S.....	.I...A...A.
	007		F.V.....	.N.....I...DE..A.
アデリー ペンギン	AB029994		..V.....	..L.....	RY.....	..D.....	.F.....	..F
	AB029998		..V.A.....	..L.....	LE.....F...K...A.	..I
	AB043601		..V.....	.F.....	RH.....	.I...D...R.	.I...R...A.	..I
	AB043605		..V.....	.F.....	RY.....	..D.....	.F...A...A.
ヒゲ ペンギン	AB043556		...Y.....	.YA.....	LY.....P	...R.....	..V
	AB043558		FLV.N.H...	.F.....	LY.....P	...R...Q.	..V
	AB043559		FLV.N.H...	.L.....	LY.....	.I...DF..R.	.I...R.....	..V
ジェンツー ペンギン	AB043590		...H...Y	..Y.....	HY.....R.....
	AB043591		F...Y.....	MF.....	HY.....	...D...R.	...A...A.	..F
	AB043593		...H...Y	..Y.....	HY.....R.....
	AB043594		F...Y.H...	.F.....	HY.....	...D...R.	...A...A.
	AB043595		...Y.H...	.Y...I.M.	HY.....	.S.....	...K...A.	..F
	AB043597		F.V.....	.Y.....	HY.....	...D.....	.I...R.....
	AB043598		...Y.H...	.Y...I.M.	HY.....A...A.	..F
	AB043599		F.V.....	.Y.....	HY.....	...D.....	.I...R.L...
	AB043600		...Y...Y	...I.M.	HY.....	.S.....	...K...A.	..F
コガタ ペンギン	AB060946		F.V.N....	.YA.....	HY.....	.S.....	.I...RK...	..V
	AB060947		F.V.K....	EYA.....	HY.....	.S...HL...	.I.....
	AB060948		F.V.K....	EYA.....	YY.....	.I...L...	.V...DA..A.
	AB060949		F.V.....	HY.....I...RK...	..V

図 2-3 ペンギン 5 種の MHC クラス II DRB 様遺伝子のアミノ酸配列比較。

決定したフンボルトペンギンの DRB 様遺伝子 exon 2 の塩基配列からアミノ酸配列を推定し、その内 pen1/4 プライマーセットの増幅領域である 53 アミノ酸残基の連続配列をアデリーペンギン属 3 種とコガタペンギンのアミノ酸配列 (Tsuda *et al.* 2001) と比較した。「・」はフンボルトペンギンの 001 アリル配列と一致するアミノ酸を意味する。「*」はフンボルトペンギンに特徴的な多型部位を示す。種名の右側に、フンボルトペンギンのアリル名または既報配列のアクセッション番号を示した。上段のアミノ酸サイトの番号は、Brown *et al.* (1993) で示されている番号を採用した。「+」は、鳥類や哺乳類で明らかになっているペプチド結合領域 (PBR) を示す (Brown *et al.* 1993; Promerova *et al.* 2013)。

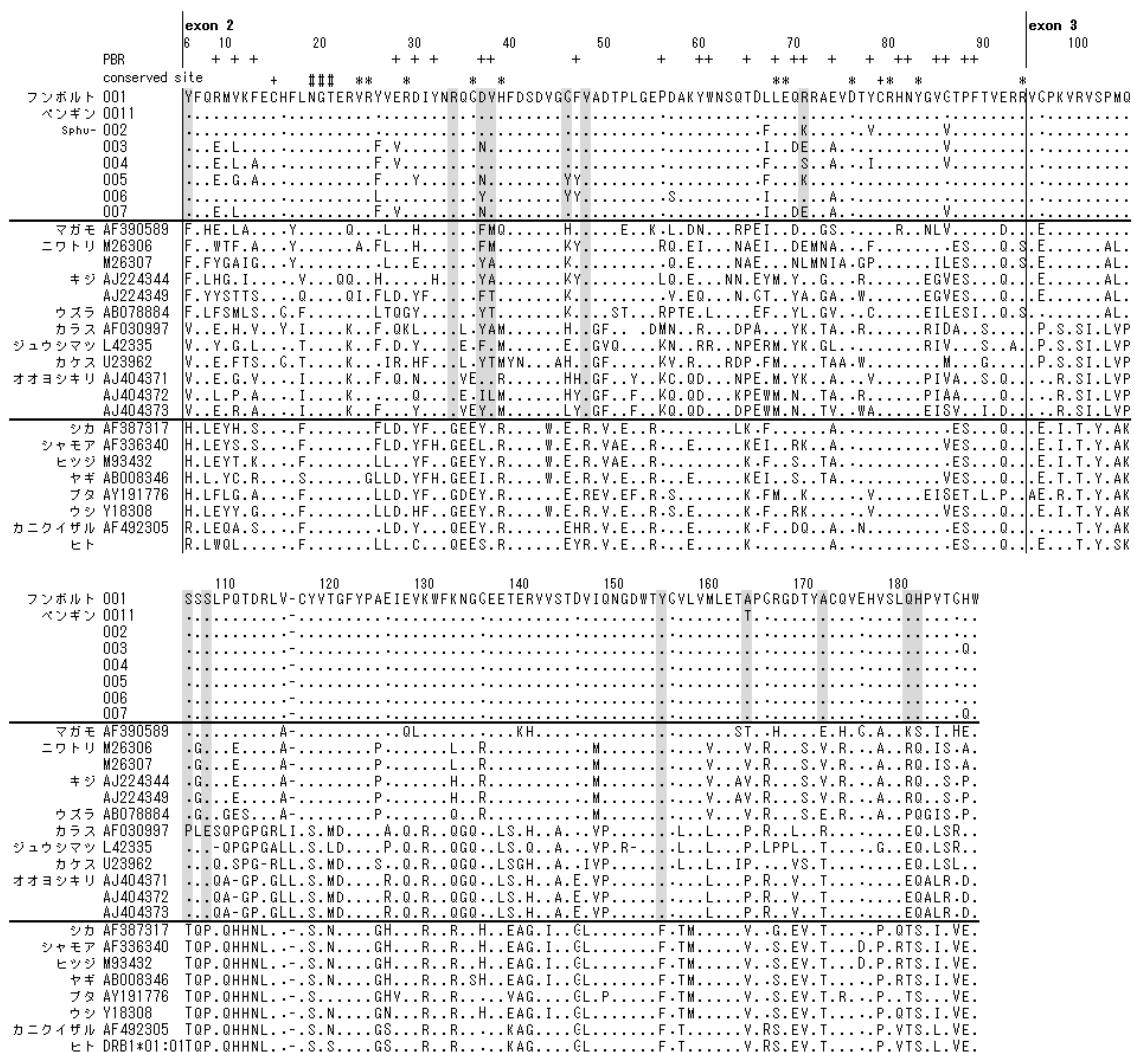


図2-4 フンボルトペンギンと他の動物種のMHCクラスII遺伝子 exon 2 および exon 3 アミノ酸配列比較。

フンボルトペンギン MHC クラス II DRB 様遺伝子のアレル番号，鳥類および哺乳類における既知配列のアクセション番号 (GenBank) を種名の右側に示した. 上部に示したアミノ酸サイトの番号は，Brown et al. (1993) で示されている番号を採用した. 「PBR」はペプチド結合領域を示す (Brown et al. 1993; Promerova et al. 2013). 「Conserved site」は，哺乳類の古典的 MHC クラス II 遺伝子上で共通に保存されているサイトを示す (Zoorob et al. 1993). そのうち，「+」は MHC ドメインを結ぶシステイン残基，「#」は N グリコシル化サイトを指す. グレーハイライトは，フンボルトペンギンもしくはフンボルトペンギンおよび鳥類に特徴的な多型部位を示す.

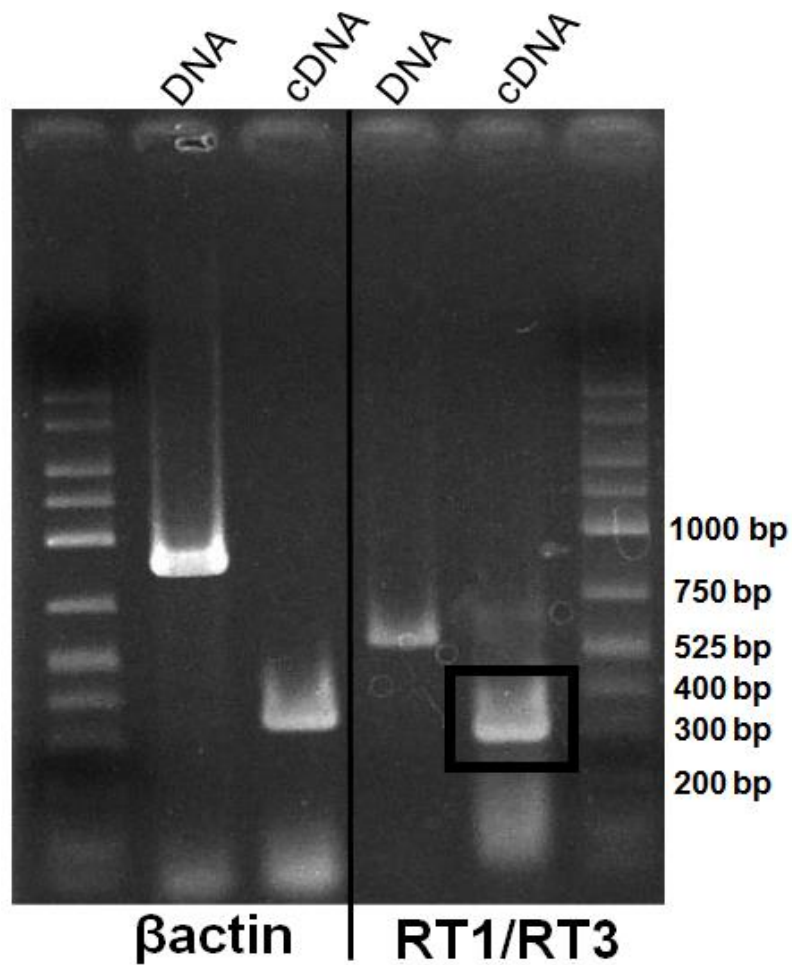


図 2-5 RT-PCR 法による MHC クラス II 遺伝子発現解析.

フンボルトペンギンの肝臓組織から抽出した DNA と cDNA を鋳型として, RT1/RT3 プライマーセットで PCR 反応を行った. ハウスキーピング遺伝子である β -actin 遺伝子を増幅するプライマーも使用した. RT1/RT3 プライマーセットの結果, ゲノム DNA からは 568 bp, cDNA からは 313 bp の増幅産物が得られた. β -actin プライマーセットでは, ゲノム DNA からは 887 bp, cDNA からは 353 bp の予想したサイズの増幅産物が得られた.

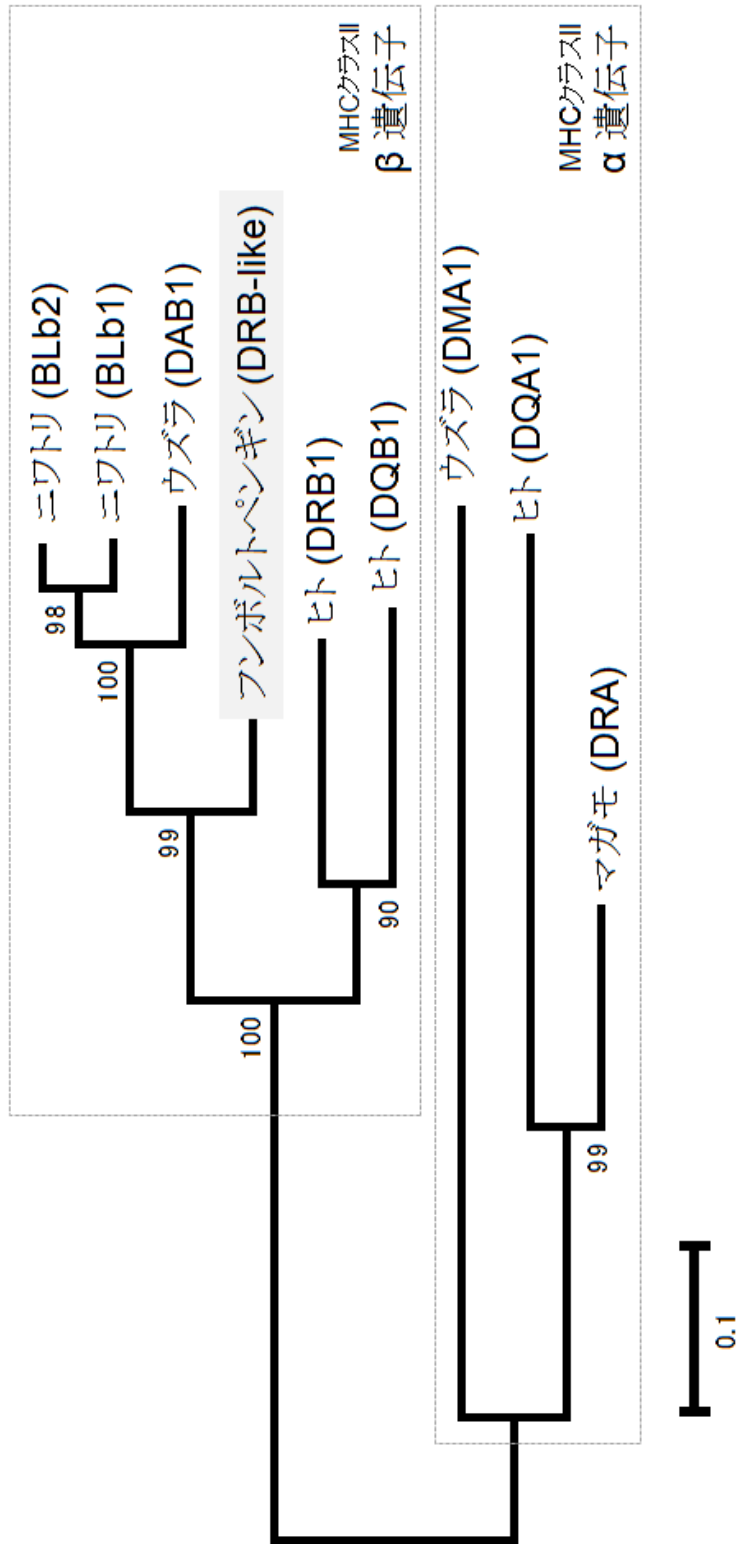


図2-6 フンボルトペンギン、ヒトおよび鳥類のMHCクラスII遺伝子の塩基配列に基づく系統樹。
 フンボルトペンギン (Sphu0011) およびニワトリ (*Gallus gallus*, M29763), ウズラ (*Coturnix japonica*, AB078884), マガモ (*Anas platyrhynchos*, HM070250), ヒトMHC (DRB1*01:01, DQB1*05:01 およびDQA1*01:01) の塩基配列をもとに、近隣接合法の kimura 2-parameter モデルを用いて作製した。枝の数字はブーツストラップ値 (%) を示す。5000 回再構築。

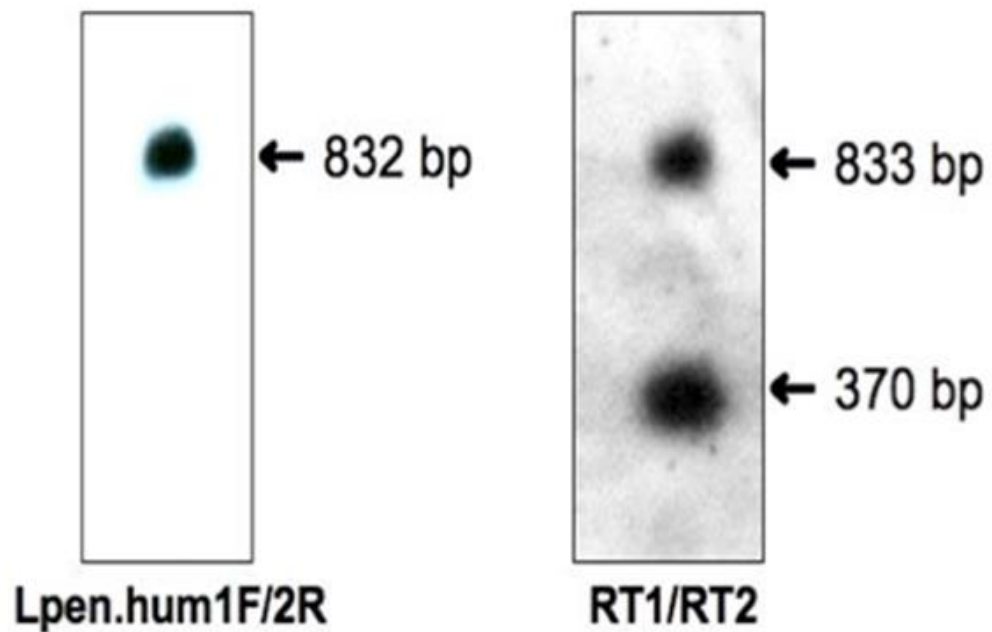


図 2-7 フンボルトペンギンゲノム DNA を用いたゲノム DNA サザンブロット分析.
左のパネルは, Lpen.hum1F/2R プローブとハイブリダイズした 832 bp のシングルバンドを示した. 右のパネルは RT1/RT2 プローブの結果を示し, 配列内に PstI の切断サイトがあるため, 833 bp と 370 bp の 2 つのバンドが得られた.

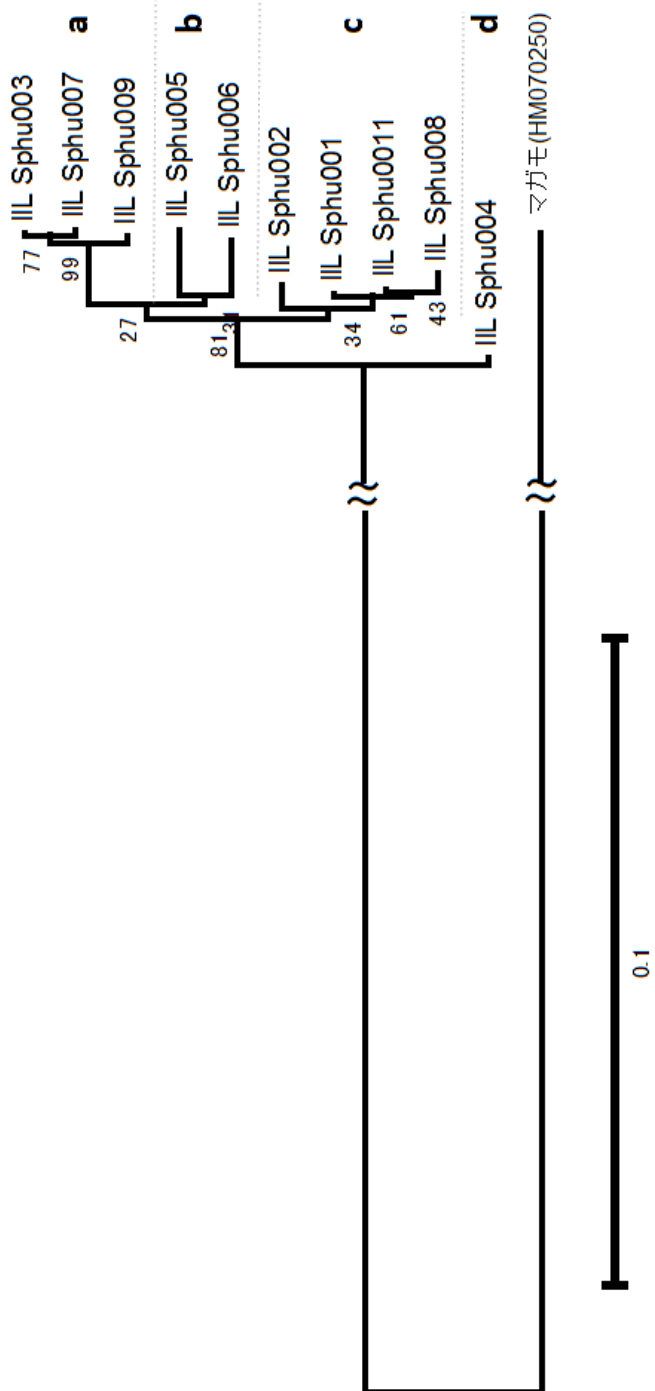


図 2-8 フンボルトペンギン MHC クラス II DRB 様遺伝子アリルの系統樹。フンボルトペンギン集団から得られたアリルの塩基配列をもとに、近隣接合法の kimura 2-parameter モデルを用いて作製した。枝の数字は、ブーツストラップ値 (%) を示す (5000 回再構築)。アウトグループ (外群) には、マガモ (*Anas platyrhynchos*, HM070250) の DRA 遺伝子の塩基配列を用いた。

第4節 考察

(1) フンボルトペンギン MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造

MHC 遺伝子は、多様性の高い古典的 MHC 遺伝子と多様性の低い非古典的 MHC 遺伝子に分類される (The MHC sequencing consortium 1999) (表 2-1). また, MHC クラス II 分子は, α 鎖と β 鎖が非共有結合したヘテロ二量体の糖タンパク質であるが, α 鎖 (α ドメイン) は多様性に乏しく, 抗原特異性を決定するとされる β 鎖 (β ドメイン) は高い多様性をもつ (猪子ら 2004; Brown *et al.* 1993). そのため, 複数存在する古典的 MHC クラス II 遺伝子の中でも β ドメインをコードするクラス II β 遺伝子 (例えば DRB1 遺伝子, DQB1 遺伝子, DPB1 遺伝子) は高度な多型性を保持することが知られている (表 2-1). そのため, MHC 遺伝子を指標とした多様性解析では, 古典的 MHC クラス II β 遺伝子を標的としている (Eimes *et al.* 2011; Moreno-Santillán *et al.* 2016).

本章における相同性検索, 系統樹解析, 発現解析およびアミノ酸配列の解析により, 決定したフンボルトペンギンの塩基配列が, 古典的 MHC クラス II 遺伝子配列であることが示唆された. また, 相同性検索では MHC クラス II β 遺伝子との相同性が高く, 系統解析では α 遺伝子ではなく β 遺伝子の分岐群に位置したことから, 決定したフンボルトペンギンの配列は, 古典的 MHC クラス II 遺伝子の中でもとくに多様性の高い β 遺伝子であることが示唆された. 以上のことから, ペンギン MHC 遺伝子の多様性解析に最適で高度な多型性を保持する領域を決定することができた.

(2) ゲノム DNA サザンブロット分析による解析領域の評価

MHC 遺伝子群は, 遺伝子重複や偽遺伝子の生成が進化の過程で高確率に生じる領域であることが鳥類を含む脊椎動物の研究で明らかになっている (Kaufman *et al.* 1999; Shiina *et al.* 2004b; Wolfe & ÓhUigín 2016). 背景で示したようにニワトリやウズラにおいても複数の MHC クラス II 遺伝子が同定されている. 本章において実施したヒトや鳥類を加えた分子系統解析の結果からも, 各種が保有する MHC クラス II 遺伝子間の高い相同性が示された (図 2-6). そのため, PCR 解析では複数の MHC クラス II 遺伝子を同時に増幅する可能性を考慮する必要がある.

本章で実施したゲノム DNA サザンブロット分析では、標的とする遺伝子を単一に増幅している証拠となる目的のバンドが得られた (図 2-7). このことから、本研究において設計した PCR プライマーが複数の MHC クラス II 遺伝子を増幅している可能性が否定され、本章で解析している領域が単一の MHC クラス II 遺伝子に由来する塩基配列であることが示唆された.

(3) フンボルトペンギン MHC クラス II 遺伝子の多様性

通常、遺伝子内の突然変異は、遺伝子を不活化する可能性のある非同義置換よりも同義置換が多く認められる (Kimura 1977). しかし、MHC 領域内では、環境適応に有利なアミノ酸レベルの多型を獲得するために非同義置換が優位を占めることが知られている

(Hughes & Nei 1988). そして、その非同義置換は、病原体を含む環境因子への適応に対する正の選択作用により PBR 領域に集中することが明らかになっている (Hughes & Nei 1988; Promerova *et al.* 2013; Wolfe & Ó'hUigin 2016). 本章におけるフンボルトペンギン MHC クラス II 遺伝子の多型解析の結果、本塩基配列上にも高い非同義置換率が確認され、他の脊椎動物と同様に積極的にアミノ酸多型を蓄積している可能性が示唆された. さらに、その多型は PBR にも確認されたことから、フンボルトペンギンの MHC クラス II 遺伝子にも正の選択が作用している可能性が考えられた.

さらに、各種または個体が暴露される環境因子は地理的分布によって異なる可能性があり、病原体を含む抗原の認識に関わる PBR には地域に限定された適応パターンが反映される可能性がある (Gonzalez-Quevedo *et al.* 2016). 本研究において、実際に PBR に相当するとされる位置に、フンボルトペンギンに特徴的な多型が確認された (図 2-3, 図 2-4). そのため、これらの部位がフンボルトペンギンにおいても PBR に相当するアミノ酸残基である可能性および解析集団の環境適応に関与する多型である可能性が示唆された. さらに、種内で最も多様な多型性を示した 71 番目のアミノ酸残基は、PBR に位置していたことから、フンボルトペンギンの抗原認識において重要な役割をもつアミノ酸残基である可能性が推察された.

(4) 飼育下フンボルトペンギン集団における MHC クラス II 遺伝子の多様性評価

フンボルトペンギンは IUCN のレッドリストにおいて絶滅危惧種（絶滅危惧 II 類）に指定され、急激な個体数減少を経た経歴があり現在も減少傾向にある（Paredes *et al.* 2003）。それに対し、フンボルトペンギンの日本国内における飼育数は多く、生息域外保全が最も進んでいる種である。しかし、飼育下集団において免疫に関わる重要な遺伝子である MHC 遺伝子の遺伝的多様性の評価は実施されていない。

本章において、3つの評価項目を用いて、国内飼育下フンボルトペンギン集団の MHC クラス II 遺伝子における多様性を評価した。その結果、遺伝的多様度およびアレル分布の両評価により、国内全体で評価した場合は多様性が保たれていたが、一部の施設では多様性の低いことが明らかになった。また、ヘテロ接合度が 0.4 よりも高い数値であった施設でアレル分布の偏りが認められるなど、両評価の結果が一致しない施設があった。このことから、アレル分布の情報が多様性の評価項目として重要であることが示唆された。アレルの偏りが確認された施設に対しては多様性低下の原因究明や遺伝的多様性を考慮した管理が必要であると考えられる。唯一高評価であった 1 施設は（施設 ID: A01）遺伝的多様性に配慮した管理を実施している施設で、個体交換などの対策を積極的に行っている施設であったため、このことが今回の結果に影響している可能性が考えられた。

また、施設集団内で頻度の高い共通アレルは施設ごとに異なることが明らかになった。このことから、一部施設集団で確認した MHC 遺伝子の多様性低下の要因として、繁殖貢献度の高いペアが少ないなどの理由から施設内集団に限られた血縁で構成されている可能性が示唆された。よって、施設内の遺伝的多様性を保持するためには、単純な個体交換ではなく国内の飼育集団全体を対象にアレルを指標とした遺伝的管理の必要性が示された。

さらに、ヘテロ接合度やアレル分布の評価から国内全体では多様性が高いと判定したが、系統解析の結果は（図 2-8）、遺伝的距離の近いアレルが多く存在することを示している。背景に示したソウゲンライチョウの解析から、多様性を保持する傾向にある MHC 遺伝子が多様性減少に働く遺伝的浮動の影響を受ける場合があることが報告されている。そのため、1塩基置換程度の多様性では、何らかのストレスが集団に生じた時にアレル多様性が低下する可能性が考えられる。そのため、他のアレルと遺伝的距離の遠いアレルを増やす対策も必要であると考えられる。

第5節 小括

本章では、日本国内で最も生息域外保全が進んでいるフンボルトペンギン (*Spheniscus humboldti*) を対象に、MHC クラス II 遺伝子の多型情報を保全に応用することを目的として、情報の少ないペンギン MHC クラス II 遺伝子の構造解明を試みた。そして次に、確立した本遺伝子の多型解析手法を用いて飼育下フンボルトペンギン集団の多様性解析を行った。その結果、フンボルトペンギン MHC クラス II DRB 様遺伝子の主要なエクソンを含むゲノム構造を明らかにすることに成功した。さらに、決定した配列は、免疫系において主要な働きをもち多型性に富むことで知られる古典的 MHC クラス II β 遺伝子であることが示唆された。また、ペンギン MHC クラス II 遺伝子領域の多様性を明らかにしたことで、本遺伝子上に PBR に相当する領域が存在することを示唆するとともに環境適応に関与する可能性のある多型を確認した。

フンボルトペンギン特有の PCR プライマーが設計できたことで、本分類群の MHC クラス II 遺伝子の多様性解析手法を確立することに成功した。本手法を用いた国内飼育施設のフンボルトペンギン集団における多様性評価では、半数以上の施設でアليل分布の偏りによる遺伝的多様性の低下が確認され、その要因の1つとして、1部施設集団が少数血縁で構成されている可能性を示唆した。

以上により、日本国内の生息域外保全が進んでいるとされているフンボルトペンギンにおいて遺伝的多様性の損失が進行している可能性を明らかにした。このことから、MHC クラス II 遺伝子の解析手法とアليل情報が、域外保全における遺伝的多様性の評価に有用であることが示唆された。

なお、本章の内容は Kikkawa *et al.* (2005) の論文をもとに構成した。

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

第1節 はじめに

フンボルトペンギン属は4種で構成され (Baker *et al.* 2006; Clarke *et al.* 2007; Jouventin 1982), フンボルトペンギン (*Spheniscus humboldti*) とマゼランペンギン (*S. magellanicus*) は南アメリカの沿岸や沖合の島々, ケープペンギン (*S. demersus*) は南アフリカの沿岸に分布し, ガラパゴスペンギン (*S. mendiculus*) は熱帯のガラパゴス諸島に生息する (Williams 1995; The IUCN Red List of Threatened Species) (図 1-1). 各種は地理的に異なる生息分布を示すが, 温暖な気候に適応し, 形態的な類似性を持ち, 穴状の営巣を行うなど生態的にも多くの共通する特徴をもつ. さらにフンボルトペンギン属は, 種間雑種が確認されているため (McCarthy 2006; Thumser & Karron 1994; Williams 1995), 遺伝的に近縁である可能性が考えられる.

絶滅の恐れのある野生生物レッドリスト (国際自然保護連合: IUCN) は7段階で評価されている: 絶滅 (Extinct, EX), 野生絶滅 (Extinct in the wild, EW), 絶滅危惧 IA 類 (Critically endangered, CR), 絶滅危惧 IB 類 (Endangered, EN), 絶滅危惧 II 類 (Vulnerable, VU), 準絶滅危惧 (Near Threatened, NT) および軽度懸念 (Least Concern, LC). このうち, CR, EN, VU の3ランクが絶滅危惧種とされている. フンボルトペンギン属4種は, 野生集団の個体数が減少傾向にあるためレッドリストに記載され, 内3種は絶滅危惧種に指定されている (表 1-1). フンボルトペンギンは, 20世紀後半におよそ20,000個体から3,300個体まで減少した (Paredes *et al.* 2003). その後, 個体数は回復し, 現在はおよそ30,000個体と安定した個体数を維持している (Wallace & Araya 2015). しかし, 繁殖コロニー数の縮小や著しい個体数の変動が認められるため絶滅危惧種 (VU) に指定されている. 一方, ケープペンギンは28年間で61%個体数が減少し, 現在野生集団の個体数はおよそ26,000ペアと見積もられている (Crawford *et al.* 2011). そして, ガラパゴスペンギンは, 過去40年間でおよそ70%減少し現在の推定個体数は1,200~1,800個体とされ, ほぼ全ての個体が1箇所繁殖している (Vargas *et al.* 2005, 2007). 上述の2種 (ケープおよびガラパゴスペンギン) は, 絶滅危惧種 (EN) に指定されている. 4種の中では軽度な準絶滅危惧種 (NT) に指定されるマゼランペンギンは, 全体的に減少傾向にあるものの総個体数は1,000,000ペア以上と見積もられている (Pütz *et al.* 2007). 繁殖コロニーによって状況が異なり, 個体数が激減している

コロニーや増加しているコロニーなどさまざまである。フンボルトペンギン属の個体数減少理由としては、商業的な漁業を含む海洋環境の変化やエルニーニョ・南方振動（ENSO：El Niño-Southern Oscillation）による気候変動などが関与していると考えられる（Akst *et al.* 2002; Vargas *et al.* 2007; Williams 1995）。そのため、今後予想される ENSO の頻度および強度の増加が、種の存続に影響する可能性のあることが報告されている（Vargas *et al.* 2007）。しかし、フンボルトペンギン属の絶滅回避を目的とした種保全計画を遂行するための遺伝学的情報は多くない（Akst *et al.* 2002; Bouzat *et al.* 2009）。

前章において、飼育下フンボルトペンギン集団の保全を目的とした遺伝的多様性の評価に MHC(主要組織適合遺伝子複合体) 遺伝子の多型情報が有用であることを明らかにした。同時に、フンボルトペンギンを対象とした古典的 MHC クラス II DRB 様遺伝子における多型解析手法の確立に成功した。古典的 MHC クラス II 遺伝子の中でも DRB 遺伝子は多型を豊富に蓄積していることが知られるため（Cai *et al.* 2015; Doxiadis *et al.* 2006; Hosomichi *et al.* 2006; Kaufman *et al.* 1999; O'Brien *et al.* 1985），近縁種間の多型解析に対する有用なマーカーとされている（Bollmer *et al.* 2007; Cutrera & Lacey 2007）。

以上のことから本章では、第 2 章で確立した MHC クラス II 遺伝子解析手法を用いて、共通する特徴の多い希少種フンボルトペンギン属 4 種を対象に集団内の遺伝的多様性を評価することを目的とした。同時に、4 種における MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造や多型性の違いを比較した。

第2節 材料と方法

2.1 供試検体およびDNA抽出

日本と韓国の水族館または動物園で飼育されているペンギン 24 個体と、チリ・アルゼンチン・ガラパゴス諸島に生息する野生ペンギン 10 個体から血液検体を得た (表 3-1)。フンボルトペンギン 20 検体 (飼育下 15 検体, 野生 5 検体), ケープペンギン飼育下 6 検体, マゼランペンギン 5 検体 (飼育下 3, 野生 2), ガラパゴスペンギン野生 3 個体の計 34 検体の末梢血細胞から, Proteinase K 処理およびフェノールクロロホルム法を用いてゲノム DNA を抽出した (Inoko *et al.* 1986)。フンボルトペンギン 20 検体は, 第 2 章で使用した検体と同一のものを供試した (Kikkawa *et al.* 2005)。

2.2 フンボルトペンギン属 MHC クラス II 遺伝子の塩基配列決定

第 2 章で確立した解析手法を用いてフンボルトペンギン属 4 種における MHC クラス II DRB 様遺伝子内の主要なエクソン (exon 2 および exon 3) を含む領域の塩基配列を決定した。

(1) PCR 法による MHC クラス II 遺伝子の増幅

PCR プライマーは, 前章で設計した 3 セットを用いた (LP1 / Lpen.hum 2R, Lpen.hum 1F / 3R および Lpen.hum 1F2 / 3R2) (図 2-1)。フンボルトペンギン属 4 種 (34 検体) の DNA を試料として以下の条件で PCR 反応を行った。PCR 反応液は, 50-100 ng のゲノム DNA, 10× NH₄ buffer 2.5 μl, 50mM MgCl₂ 1 μl, 2mM dNTP 2 μl, 各 10μM プライマー (上記 3 セット) 0.3 μl, 0.02units BIOTAQ DNA Polymerase (BIO LINE 社) を滅菌水で合計 25 μl に調整した。PCR 条件は, 96°C で 3 分間の熱変性後, 96°C 3 0 秒間の熱変性, 61°C 30 秒間のアニーリング, 72°C 2 分間の伸長反応を 35 サイクル行った後, 72°C 5 分間反応させた。hum1F2 / 3R2 プライマーセットはアニーリング温度を 67°C へ変更した。

得られた PCR 産物は, 前章と同様の方法で電気泳動し増幅サイズを確認した。PCR 産物

は、クローニング用に 2 μ l を使用し、残りはダイレクトシーケンスに用いた。

(2) クローニング

アリル配列を決定するために、得られた PCR 産物の一部は、Ligation convenience kit (株式会社ニッポン・ジーン) を用いてマニュアルに従いライゲーションした。得られたライゲーションサンプルは、前章と同様の方法で形質転換を行い白色コロニーを得た。

(3) コロニーPCR

各 PCR 産物につき、10 個以上の白色コロニーを PCR 反応に用いた。PCR プライマーは、ベクター配列上に位置するプライマーセット (T7/SP6 promoter) (図 2-1) およびインサート配列を増幅したプライマーセット (LP1 / Lpen.hum 2R または Lpen.hum 1F / 3R または Lpen.hum 1F2 / 3R2) を使用した。例えば LP1 / Lpen.hum 2R 産物から得られたコロニーは、LP1 および Lpen.hum 2R を PCR プライマーとしてコロニーPCR を実施した。PCR 反応液は、10 \times NH₄ buffer 2.5 μ l, 50mM MgCl₂ 1 μ l, 2mM dNTP 2 μ l, 各 10 μ M プライマー (上記の各 2 セット) 0.3 μ l, 0.02 units BIOTAQ DNA Polymerase (BIO LINE 社) を滅菌水で合計 25 μ l に調整した。8 連 PCR チューブのウェル底に 1 コロニーを少量塗布し、調整した反応液 25 μ l を各ウェルに加えた。ベクタープライマーの PCR 条件は、96 $^{\circ}$ C で 3 分間の熱変性後、96 $^{\circ}$ C 30 秒間の熱変性、55 $^{\circ}$ C 30 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C 2 分間の伸長反応を 35 サイクル行った後、72 $^{\circ}$ C 5 分間で反応させた。インサート配列を増幅したプライマーセットを PCR プライマーとした場合は、本章 2.2 (1) と同様の温度条件で行った。得られた PCR 産物は、前章と同様の方法で電気泳動し増幅サイズを確認した。

コロニーPCR 産物は、ExoSAP-IT For PCR Product Clean-UP (Affymetrix 社) を用いてマニュアルに従い精製した。酵素反応および酵素失活反応は、GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher SCIENTIFIC K. K.) を用いて行った。ダイレクトシーケンス用とした 34 検体の各 PCR 産物 3 種 (LP1 / Lpen.hum 2R, Lpen.hum 1F / 3R および Lpen.hum 1F2 / 3R2) についても同様に精製した。

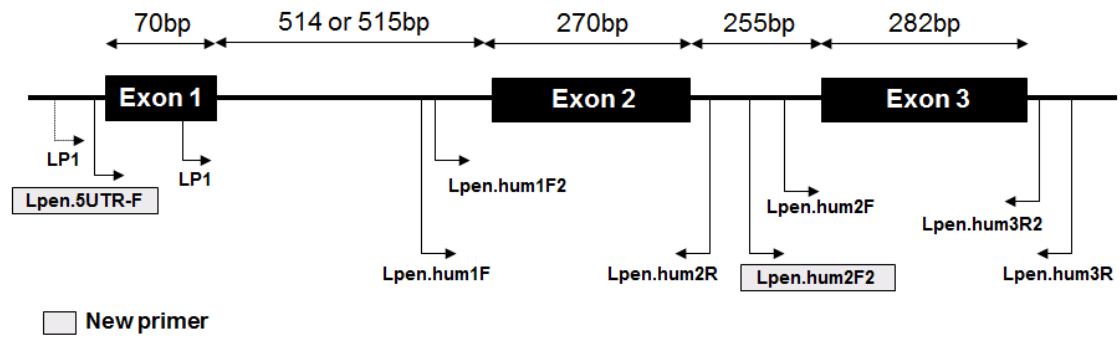
(4) 塩基配列決定および解析

シーケンスプライマーは、インサート配列の増幅と同様のプライマーを使用した。シーケンス解析は、ExoSap 処理済 PCR 産物の 2 μ l を用いて前章と同様の方法で行い、塩基配列を決定しアリルを特定した。得られた配列情報の精度を確認するために、ダイレクトシーケンスおよびクローニングにより得られた塩基配列が一致するかを確認した。

ゲノム構造比較には、ニワトリ (*Gallus gallus*, M29763) およびマガモ (*Anas platyrhynchos*, HM070250) の塩基配列を用いた。非同義置換率 (dN) および同義置換率 (dS) は、MEGA 2 ソフトウェアを用いて Nei-Gojobori モデル (Nei & Gojobori 1986) で算出した。ヘテロ接合度の算出および分子系統樹の作成は、前章と同様の方法で行った。系統比較のために、前章でも使用したペンギン 4 種の塩基配列を用いた (アデリーペンギン (*Pygoscelis adeliae*), ヒゲペンギン (*P. antarcticus*), ジェンツーペンギン (*P. papua*) およびコガタペンギン (*Eudyptula minor*) ; Tsuda *et al.* 2001) (図 2-3)。また、ヒトの HLA-DRB1 遺伝子のアミノ酸配列上で明らかになっている超可変領域の存在をフンボルトペンギン属の配列上で確認した (Brown *et al.* 1993; Stern *et al.* 1994)。参考配列として DRB1*01:01 のアミノ酸配列を用いた (IMGT : <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>)。決定した塩基配列情報は、第 2 章と同様の方法で登録番号を得た。

(5) MHC クラス II 遺伝子 exon 1 および intron 1 の配列情報の取得

LP1 / Lpen.hum 2R プライマーセットを用いて得られた PCR 産物のダイレクトシーケンスにより 5'UTR~intron 2 を含むフンボルトペンギンの塩基配列が得られた。得られた 5'UTR の配列上に新たに設計した Lpen.5'UTR-F プライマー (図 3-1) および前章で設計した Lpen.hum 2R のプライマーセットを用いて前述通りの方法で 34 検体の塩基配列を決定した。



プライマー名	配列情報 (5' to 3')	長さ	位置	方向	参考配列
Lpen.5UTR-F	GTGGCAGGAGACCTCAGGTG	20 mer	5'UTR	sense	フンボルトペンギン
Lpen.hum2F2	TCCCCTGCAGCCTCCCTG	18 mer	Int 2	sense	

図 3-1 フンボルトペンギン MHC クラス II DRB 様遺伝子領域内に設計した PCR プライマー情報.

第3節 結果

3.1 MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造

フンボルトペンギン属 4 種の MHC クラス II DRB 様遺伝子の塩基配列を決定した結果、前章で設計したフンボルトペンギンに特有な PCR プライマーがペンギン 3 種にも適応可能であることが明らかになった。また、前章で鳥類の塩基配列をもとに exon 1 上に設計した LP1 プライマーを用いて増幅した PCR 産物の 1 つから、exon 1 および intron 1 全長に加え 5'UTR (41 bp) を含む塩基配列が得られた。

本章で新たに得た 5'UTR 塩基配列上に設計したプライマー (Lpen.5UTR-F) を用いて、フンボルトペンギン属 4 種の MHC クラス II DRB 様遺伝子の 3 つのエクソン (exon 1, exon 2 および exon 3) および 2 つのイントロン (intron 1 および intron 2) を含む 5'UTR から intron 3 までの約 1.5 kb の塩基配列を決定することに成功した。図 3-1 に、フンボルトペンギンで明らかになった各エクソンおよびイントロンの塩基長を示した。本章において初めて明らかにした exon 1 および intron 1 の塩基配列を 4 種間で比較した結果、フンボルトペンギンから得られた一部の intron 1 配列上に、1 箇所の欠失 (94 番目の intron 1 上) と 11 bp 以上のシトシン連続鎖 (351~361 または 352~362 番目) を確認した (図 3-1, 図 3-2)。よって、フンボルトペンギンにおける intron 1 の全塩基長は、514 または 515 bp と推定した。マゼランペンギンの intron 1 塩基配列上にも 8 または 9 bp の欠失を認めた。以上のことから、フンボルトペンギン属 4 種は、intron 2 および exon 1, 2, 3 については同じゲノム構造をもつが、intron 1 の配列上には個体レベルの変異があることが明らかになった。また、他の鳥類との塩基長を比較した結果、フンボルトペンギン属では exon 1 が 70 bp および intron 1 が約 514 bp であったのに対し、ニワトリの BLb2 遺伝子では exon 1 が 91 bp および intron 1 が 208 bp、マガモの DRA 遺伝子では exon 1 が 73 bp および intron 1 が 363 bp であった。

3.2 MHC クラス II 遺伝子の多型解析

(1) 塩基配列の多型解析

フンボルトペンギン属 4 種 (計 34 検体) の MHC クラス II DRB 様遺伝子内 5'UTR~intron 3 の塩基配列から 22 アリルを特定した。22 アリルの塩基配列を比較した結果、確認した一塩基多型は exon 2, 3 および intron 1, 2, 3 配列内に位置したが、その 71% (65 塩基中 46 塩基) が exon 2 配列上に集中していることが明らかになった (図 3-2)。それに対し、exon 1 (塩基長 70 bp) の塩基配列は 4 種の全個体で完全に一致した。全アリル間の多型の平均は、18.3 箇所 (0~29) であった。また、exon 2 内の種内多型の平均は、フンボルトペンギンでは 13.6 箇所 (1~19)、マゼランペンギンでは 15.1 箇所 (5~21)、ケープペンギンでは 20.3 箇所 (8~28)、ガラパゴスペンギンは 9 箇所であった。4 種の中では、ケープペンギンの種内多型が最も多いことがわかった。

フンボルトペンギン属 4 種の置換率を算出した結果、exon 2 内のほぼ全ての種内多型が非同義置換であることが明らかになった (表 3-2)。具体的には、フンボルトペンギンの exon 2 内で確認した多型の 92% が非同義置換で、ペンギン他 3 種では非同義置換が 100% であった。それに対し exon 3 領域内においては同義置換率と非同義置換率に大きな違いは認められなかった。

(2) アミノ酸配列を用いた多型解析

上述の 4 種 (34 検体) から検出した 22 アリルのアミノ酸配列を図 3-3 に示した。本章で決定した配列内には、フレームシフト変異またはストップコドンは検出されなかった。22 アリルにおけるアミノ酸多型の平均は、10.5 箇所 (0~18) であった。種内における多型の平均は、フンボルトペンギンでは 9.7 箇所 (0~14)、マゼランペンギンでは 10.7 箇所 (0~15)、ケープペンギンでは 12.7 箇所 (5~18)、ガラパゴスペンギンは 7 箇所であった。塩基配列の結果同様に、4 種の中でケープペンギンの種内アミノ酸多型が最も多いことがわかった。また、検出されたアミノ酸多型の多くが、ヒトの DRB1*01:01 アリルにおいて確認されている 3 箇所の超可変領域 (hypervariable region : HV1~3) に集中していることが明らかになった (図 3-3)。

3.3 MHC クラス II 遺伝子の多様性評価

(1) ヘテロ接合度

フンボルトペンギン属 4 種の MHC クラス II 遺伝子におけるヘテロ接合度は、フンボルトペンギンの全解析個体で 0.66，野生集団で 0.34，飼育下集団で 0.71 であった。マゼランペンギンの全解析個体では 0.86，野生集団で 0.75，飼育下集団で 0.78 であった。ケープペンギンの飼育下集団では 0.42，ガラパゴスペンギンの野生集団では 0.53 であった。0.4 以下の数値が得られ多様性が低いと評価したのは、フンボルトペンギン野生集団およびケープペンギン飼育下集団であった。マゼランペンギンにおいては、野生および飼育下集団ともに高いヘテロ接合度が得られ、多様性が保持されていることが明らかになった。

(2) アリル分布

フンボルトペンギン属 4 種の MHC クラス II DRB 様遺伝子アリル数は、フンボルトペンギン 20 個体から 8 アリル，ケープペンギン 6 個体から 4 アリル，マゼランペンギン 5 個体から 8 アリル，そしてガラパゴスペンギン 3 個体から 2 アリルであった（表 3-3）。フンボルトおよびマゼランペンギンから最も多くのアリルが検出された。

各種内のホモ接合率は、フンボルトおよびケープペンギンが 50%，マゼランペンギンが 20%，ガラパゴスペンギンは 67% となり（表 3-1），ガラパゴスペンギン集団でホモ接合型の個体が最も多いことが明らかになった。また、マゼランペンギン以外の 3 種でアリル分布の偏りが認められた（表 3-1）。フンボルトペンギンでは飼育下および野生の両集団において Sphu001 アリルの出現頻度が最も高く，飼育下集団では 20 個体中 9 個体が保有し，野生集団では全個体が保有していた。同様に，ケープおよびガラパゴスペンギンにおいても 1 つのアリル頻度が高く，全個体が同一アリルを保有していた。

以上により，MHC クラス II 遺伝子のアリル分布による多様性の評価では，マゼランペンギンが最も多様性を保持していることがわかった。他 3 種においては，アリル分布に偏りが認められ，ケープペンギンおよびガラパゴスペンギンでは全個体が同一アリルを保有し，ガラパゴスペンギンはホモ接合率も高かった。フンボルトペンギンにおいても野生集団に限定した評価では全個体が同一アリルを保有していた。

(3) アリル間の遺伝的距離

塩基配列に基づく分子系統樹において、フンボルトペンギン属から検出された 22 アリルは、4つの分岐群 (A~D) に大別された (図 3-4)。分岐群 A にはフンボルトペンギン 3 アリルおよびケーブペンギン 2 アリル、分岐群 B にはフンボルトペンギン 1 アリルおよびマゼランペンギン 3 アリル、分岐群 C にはペンギン 4 種の計 7 アリルが位置し、分岐群 D にはフンボルトペンギン 2 アリル、マゼランおよびケーブペンギンが 1 アリルずつ位置した。フンボルトペンギンのアリルは全ての分岐群に位置した。また、マゼランペンギンとケーブペンギンアリルは 3 つの分岐群に分類され、ガラパゴスペンギンの 2 アリルは 1 つの分岐群に位置した。フンボルトペンギンの野生集団内で出現頻度の低い 2 つの稀なアリル (Sphu003, 007) は分岐群 D に属し、遺伝的に近縁であることがわかった。この 2 つの稀なアリルの 5'UTR~intron 3 領域における塩基多型は 1 塩基のみ (1/1488 bp) であり (図 3-2)、アミノ酸配列は完全に一致した (図 3-3)。それに対し、同一分岐群に位置したガラパゴスペンギンの 2 アリル間の塩基多型は 10 塩基で (10/1503 bp)、アミノ酸配列上でも 7 残基異なる (7/207 残基)。そのため、フンボルトペンギン野生集団と比べると、ガラパゴスペンギン集団ではアリルの遺伝的距離が遠く保たれていることが明らかになった。

3.4 フンボルトペンギン属 4 種の近縁関係

フンボルトペンギン属 4 種の MHC クラス II DRB 様遺伝子の多型解析の結果、種間でアリル共有が確認された。具体的には、フンボルトペンギンから検出された Sphu004 とマゼランペンギンの Spma001 は 5'UTR から intron 3 までの全塩基配列が完全に一致していた。この配列 (Sphu004 および Spma001) は、マゼランペンギンの Spma007 と 1.5 kb 中 3 塩基の違いがあったが、その全多型は intron 領域に位置したため、exon 1, 2, 3 のアミノ酸配列は 3 アリルで完全に一致した。この種間共有アリルは、飼育下個体から検出され、いずれもホモ接合型で保有していた (表 3-1)。

さらに系統解析では、ペンギン 4 種のアリルが分岐群内で混在することが明らかになった (図 3-4)。塩基配列が完全に一致した 2 アリル (マゼランペンギン Spma001, フンボル

トペンギン Sphu004) は、マゼランペンギンの 2 アリル (Spma006, Spma007) とともに分岐群 B に位置した。また、ペンギン 4 種を加えた系統樹においても、アデリーペンギン属 3 種 (アデリーペンギン, ジェンツーペンギン, ヒゲペンギン) は種ごとに異なる分岐群に位置したのに対し、フンボルトペンギン属 4 種は 1 つの分岐群内に混在した (図 3-5)。

表 3-1 フンボルトペンギン属の計 34 個体における DRB 様対立遺伝子詳細と生息地

種名	個体 番号	野生(W) / 飼育(C)	対立遺伝子	生息地/施設ID
フンボルトペンギン	82	W	Sphu001, -	チリ
	83	W	Sphu001, 003	チリ
	84	W	Sphu001, 007	チリ
	85	W	Sphu001, -	チリ
	86	W	Sphu001, -	チリ
	60	C	Sphu001, -	国内施設 1
	61	C	Sphu001, 006	国内施設 1
	62	C	Sphu003, -	国内施設 1
	63	C	Sphu001, 005	国内施設 1
	64	C	Sphu001, -	国内施設 1
	127	C	Sphu0011, 002	国内施設 1
	128	C	Sphu001, 003	国内施設 1
	129	C	Sphu004, -	国内施設 1
	130	C	Sphu001, 003	国内施設 1
	131	C	Sphu003, -	国内施設 1
	151	C	Sphu003, 005	国内施設 1
	152	C	Sphu001, -	国内施設 1
	153	C	Sphu001, 005	国内施設 1
154	C	Sphu001, 003	国内施設 1	
155	C	Sphu005, -	国内施設 1	
ケープペンギン	23	C	Spde001, 002	国内施設 2
	24	C	Spde001, -	国内施設 2
	25	C	Spde001, -	国内施設 2
	27	C	Spde001, 003	国内施設 2
	m196	C	Spde001, -	韓国
	m197	C	Spde001, 004	韓国
マゼランペンギン	222	W	Spma002, 003	アルゼンチン
	224	W	Spma004, 008	アルゼンチン
	67	C	Spma006, 007	国内施設 3
	68	C	Spma001, -	国内施設 3
	m56	C	Spma004, 005	国内施設 4
ガラパゴスペンギン	212	W	Spme001, -	ガラパゴス諸島
	214	W	Spme001, -	ガラパゴス諸島
	215	W	Spme001, 002	ガラパゴス諸島

表 3-2 フンボルトペンギン属各種の DRB 様遺伝子における非同義置換率 (dN) および同義置換率 (dS).

	ex 2			ex 3		
	d _N (%)	d _S (%)	d _N :d _S	d _N (%)	d _S (%)	d _N :d _S
フンボルトペンギン	10.39	0.94	11:1	0.72	0.27	3:1
ケーブペンギン	15.78	0	16:0	0	0	-
マゼランペンギン	12.00	0	12:0	0.57	0.53	1:1
ガラパゴスペンギン	10.33	0	10:0	0	0	-

表 3-3 フンボルトペンギン属の DRB 様遺伝子のアリル頻度

アリル	全個体		野生		飼育下		Accession ID
	n	%	n	%	n	%	
フンボルトペンギン (n=20)	20	50.0	8	80.0	12	40	AB154393, AB301947
Spheu001	9	22.5	1	10.0	8	26.7	AB154396, AB301949
Spheu003	5	12.5	-	-	5	16.7	AB154398, AB302087
Spheu005	2	5.0	-	-	2	6.7	AB154397, AB301950
Spheu004 *	1	2.5	-	-	1	3.3	AB154394, AB302090
Spheu0011	1	2.5	-	-	1	3.3	AB154395, AB301948
Spheu002	1	2.5	-	-	1	3.3	AB154399, AB302088
Spheu006	1	2.5	1	10.0	-	-	AB162144, AB302089
Spheu007	1	2.5	-	-	-	-	-
total	40	100.0	10	100.0	30	100.0	
ケープペンギン (n=6)	9	75.0	-	-	9	75.0	AB301478
Spde001	1	8.3	-	-	1	8.3	AB301944
Spde002	1	8.3	-	-	1	8.3	AB301945
Spde003	1	8.3	-	-	1	8.3	AB301946
Spde004	1	8.3	-	-	1	8.3	AB301946
total	12	100.0	-	-	12	100.0	
マゼランペンギン (n=5)	2	20.0	-	-	2	33.3	AB302843
Spma001 *	2	20.0	1	25.0	1	16.7	AB303943
Spma004	1	10.0	1	25.0	-	-	AB302844
Spma002	1	10.0	1	25.0	-	-	AB303942
Spma003	1	10.0	-	-	1	16.7	AB325529
Spma005	1	10.0	-	-	1	16.7	AB303944
Spma006	1	10.0	-	-	1	16.7	AB303945
Spma007	1	10.0	1	25.0	-	-	AB325530
Spma008	1	10.0	-	-	-	-	-
total	10	100.0	4	100.0	6	100.0	
ガラパゴスペンギン (n=3)	5	83.3	5	83.3	-	-	AB302190
Spme001	1	16.7	1	16.7	-	-	AB302191
Spme002	6	100.0	6	100.0	-	-	-
total	6	100.0	6	100.0	-	-	

* : Spheu004 と Spma001 は塩基配列が完全に一致した.

	6	10	20	30	40	50	60	70	80	90
PBR	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	*	*	**	* * * *	* * * *	* * * *
ファンボルト	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
ベンギン	Q	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Sphu001	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Sphu002	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Sphu003	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Sphu004	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Sphu005	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Sphu006	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Sphu007	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
ケープ	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spde001	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spde002	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spde003	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spde004	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
マゼラン	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spma001	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spma002	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spma003	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spma004	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spma005	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spma006	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spma007	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spma008	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
ガラバゴス	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spme001	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Spme002	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F
ヒト DRB1*01:01	R	L	L	L	L	L	L	L	L	L

図 3-3 ファンボルトペンギン属 4 種のクラス II 遺伝子アミノ酸配列の比較。
ファンボルトペンギン属 4 種から得られた DRB 様遺伝子 22 アミノ酸領域の比較。図上のアミノ酸部位の番号は、Brown *et al.* (1993) で示されている番号を参考とした。PBR はペプチド結合領域を示す (Brown *et al.* 1993; Promerova *et al.* 2013)。グレーのハイライトで示した 3 配列 (Sphu004 と Spma001, 007) は同一のアミノ酸配列であった。DRB1*01:01 配列上の四角はヒトで明らかにされている超可変領域 (hypervariable region I (HV1), hypervariable region II (HV2), hypervariable region III (HV3)) を示す。

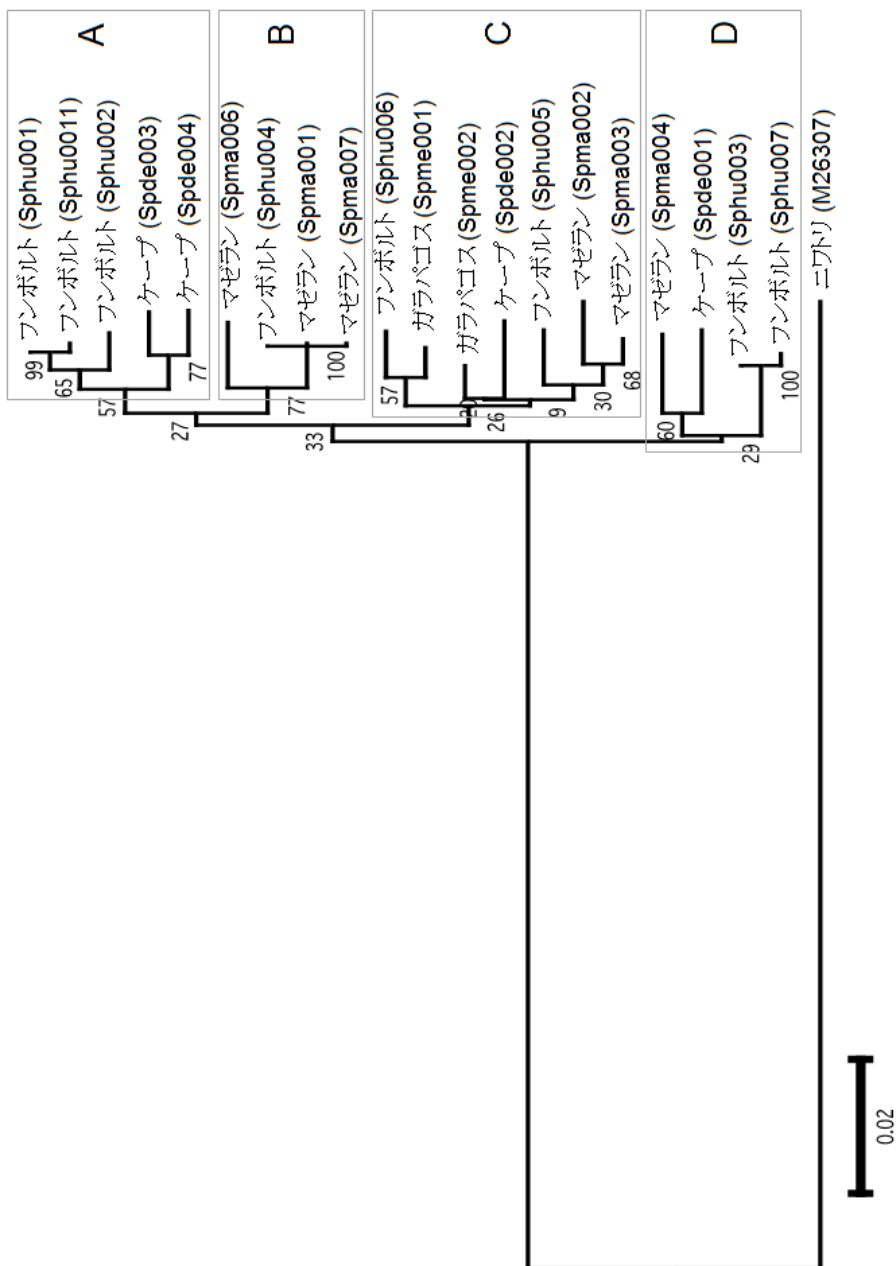


図 3-4 フンボルトペンギン属 4 種の DRB 様遺伝子の系統樹解析。
 フンボルトペンギン属 4 種の DRB 様遺伝子の exon 1, 2, 3 の塩基配列 (622 bp) をもとに構築した系統樹。NJ 法の kimura2paramater モデルを用いて作製した。アウトグループとしてニワトリのクラス II b 配列を用いた (M26307; Xu *et al.*1989)。枝上の数値は、ブーツストラップ値 (1000 回再構築) を示す。対立遺伝子名は、フンボルトペンギンを「Sphu」、マゼランペンギン「Spma」、ケーペンギン「Spde」、ガラパゴスペンギンを「Spme」とした。

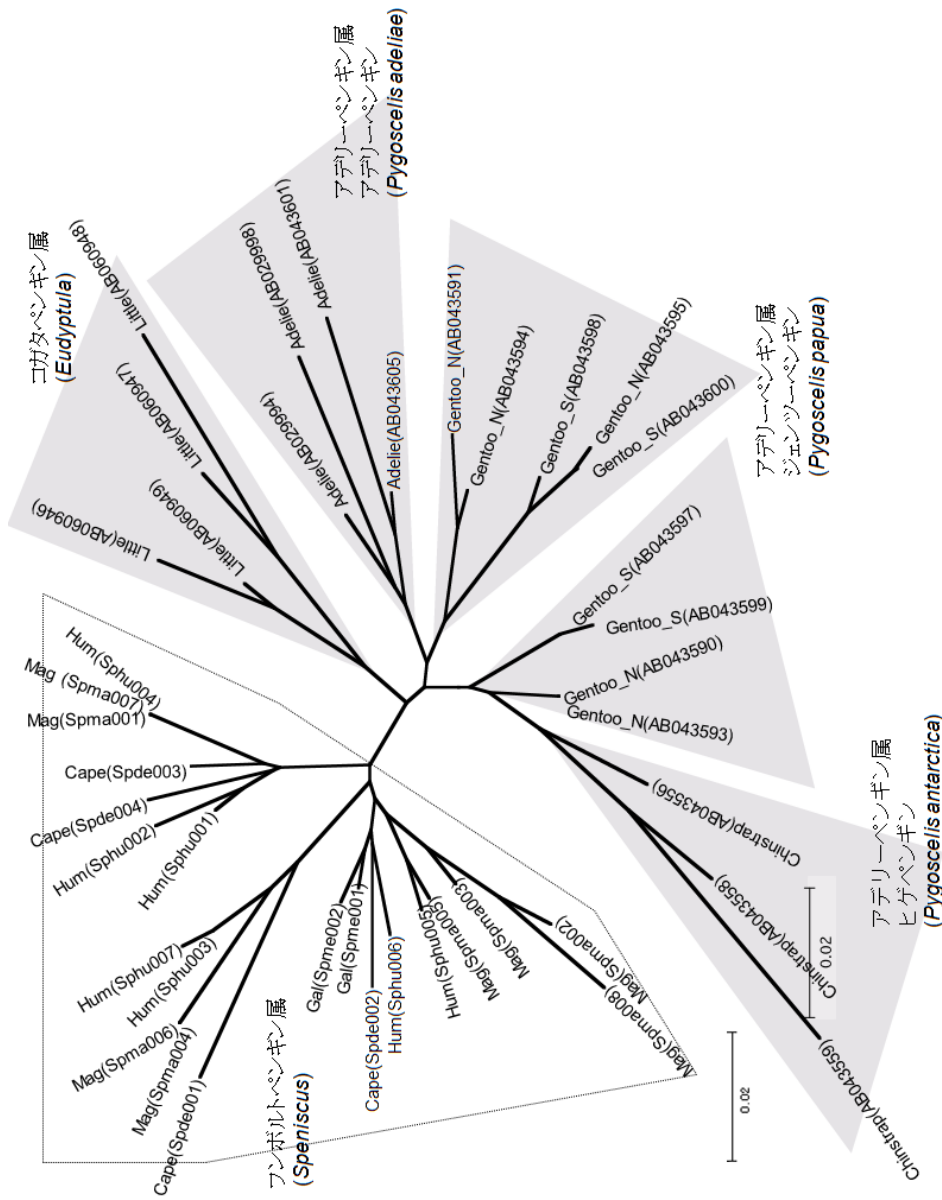


図 3-5 フンボルトペンギン属 4 種と他の 4 種のペンギンのクラス II 遺伝子塩基配列の無根樹
 フンボルトペンギン属 4 種と他の 4 種のペンギン (Tsuda *et al.* 2001) の DRB 様遺伝子 exon 2 内の 198 bp 塩基配列をもと
 に構築した無根樹. NJ 法の kimura 2-parameter モデルを用いて作製した. ジェンツーペンギンは 2 つの亜種が確認されて
 いるが, アリルの「Gentoo_N」はキタジェンツー, 「Gentoo_S」はミナミジェンツーを意味する.

第4節 考察

(1) MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造および多様性

第2章では、フンボルトペンギンの古典的 MHC クラス II DRB 様遺伝子の exon 2～intron 3 のゲノム構造を明らかにした。さらに、他の脊椎動物における MHC 多様性の特徴と同様に (Hughes & Nei 1988; Promerova *et al.* 2013; Wolfe & Ó'hUigín 2016), PBR を含む exon 2 配列上に高い非同義置換率を確認し、飼育下フンボルトペンギン集団の MHC クラス II 遺伝子にも正の選択が作用している可能性を述べた。

本章において、第2章で設計したプライマーを用いて exon 1 全長を含む塩基配列を新たに決定することに成功した。要因としては、鳥類の配列をもとに設計した LP1 プライマーと類似した配列が 5'UTR 領域内に存在した可能性が考えられた。前章で得られた結果がフンボルトペンギンに特化した特徴であるかを確認した結果、決定した MHC クラス II 遺伝子 5'UTR～intron 3 のゲノム構造はフンボルトペンギン属 4 種でほぼ一致し、その多様性の特徴はフンボルトペンギンと同様に、PBR に非同義置換が集中していることが明らかになった。さらに本章において、フンボルトペンギン属のアミノ酸多型が、ヒトで同定されている PBR を含む超可変領域上に集中していることが明らかになった (図 3-3)。ヒト DRB1 遺伝子の超可変領域は、様々な病原体ペプチドとの結合部位に相当することが知られている (Klein 1986)。加えて、中立的な遺伝子座で想定されるよりもはるかに高い非同義置換率を示す MHC クラス II DRB 遺伝子のアレルバリエーションの多さは、平衡選択 (balancing selection) が要因であることが示唆されている (Hughes & Nei 1988, 1989a, b)。以上のことから、フンボルトペンギン属 4 種の DRB 様遺伝子配列上にも平衡選択が作用したと考えられる超可変領域の存在が示唆された。

(2) フンボルトペンギン属における MHC クラス II 遺伝子の多様性評価

温暖な地域に生息するフンボルトペンギン属 4 種は ENSO などによる気候変動の影響を強く受けている種であり、個体数は減少傾向にあるため、野生集団内の遺伝的多様性の低下が危惧されている (Akst *et al.* 2002)。本研究では、生息域内外の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可能性を目的として、前章において MHC 遺伝子の

中でも多様性解析マーカーとして広く活用されている古典的 MHC クラス II β 遺伝子に着目し (Alcaide *et al.* 2008; Cai *et al.* 2015; Yang *et al.* 2005), フンボルトペンギン飼育下個体を対象に多様性解析を試みた。その結果, 生息域外保全における遺伝的多様性解析に, MHC クラス II 遺伝子マーカーが有用であることを明らかにした。そこで, 次のステップとして, 野生集団を含む他種ペンギン類 (フンボルトペンギン属 4 種) においても同様の多様性評価が可能であるかを検討した。

本章の結果により, フンボルトペンギン飼育下集団を対象として確立した MHC クラス II 遺伝子の多様性解析手法が, ペンギン類 3 種にも適用可能であることが明らかになった。また, 3 つの多様性評価項目を総合的に評価したところ, マゼランペンギンが最も多様性が高く, フンボルトペンギン野生集団で低いという結果になった。ケープペンギンにおいては, アリル分布やヘテロ接合度からは多様性が低いと評価したが, アリル間の遺伝的距離は遠く保たれており, 塩基置換数も 4 種の中で最も多かった。ガラパゴスペンギンにおいては, アリル分布の結果から多様性が低いと評価したが, ヘテロ接合度は 0.4 よりも高い数値を示した。しかしながら, マゼランペンギンを除く 3 種においては, 集団内の個体間で同一アリルの共有が認められた (表 3-1)。この 3 種は, 過去に大幅な個体数減少を経験している種であることから (第 1 節 背景), アリル分布の偏りの 1 要因として解析集団における過去のボトルネックが影響している可能性が推察された。また, MHC 遺伝子は環境適応に関与するため, 進化の過程で生息環境に適合したアリルは集団内に普及し一般化する可能性がある (Ujvari & Belov 2011)。そのため, フンボルトペンギン属集団における MHC クラス II アリルの画一化の要因として, 外来性抗原を起因とした環境適合の結果である可能性も考えられる。しかしこれらの仮説を評価するためには, 生息環境に影響されない遺伝子群 (中立マーカーなど) を用いた多様性評価を視野に入れた, さらなる解析が必要と考える。

また, アリル間の遺伝的距離に基づく多様性評価では, フンボルトペンギン野生集団が最も多様性が低いという結果となった。集団内で遺伝的に距離のある多くの MHC クラス II アリルを保有することは, 多くの種類の外因性病原体や外因ストレスに対抗できるため, 種および集団の存続にとって有利とされている (Ekblom *et al.* 2007; Radwan *et al.* 2010; Sommer 2005)。フンボルトペンギン野生集団では 3 つのアリルが検出されたが, 1 つのアリ

ルは全個体が保有し (Sphu001), 残り 2 アリルはそれぞれ 1 個体のみが保有していた (Sphu003, Sphu007). 2 つの稀なアリルはアミノ酸配列が完全に一致したため, 同じ種類の病原体抗原にしか対応できないと推測する. しかし, 高頻度なアリル (分岐群 A) と稀なアリル群 (分岐群 D) は 22 アリルの中でも遺伝的距離が離れているため, これら稀なアリルはアリル分布の偏りのある集団において有益となることが示唆された. また, ガラパゴスペンギンの全個体が保有するアリル (Spme001) と 1 個体が保有する稀なアリル (Spme002) は同一分岐群に属したが, フンボルトペンギンの場合よりも塩基多型は多く, その多型は PBR に集中していた (図 3-3). この 2 つのアリル (Spme001, Spme002) は PBR 領域に多型をもつため, それぞれが発現する MHC クラス II 分子は異なる種類の病原体抗原を認識し排除できると考えられる. しかし, 個体数が減少した小集団の MHC 遺伝子に対し遺伝的浮動 (genetic drift) が作用する可能性があることが示唆されているため (Eimes *et al.* 2011), 稀な MHC アリルはランダムな drift によって消失する可能性が考えられる (Radwan *et al.* 2010). そのため, 頻度の低いアリルを保有する個体を増やすなど, 集団内に多種類のアリルが保持されるような対策が必要であると考えられる.

(3) フンボルトペンギン属の近縁関係

温暖な地域に生息する 3 種 (フンボルト, マゼラン, ケープペンギン) は, 外見的にも大変似通っており, 生息地が離れているフンボルトとケープペンギンは飼育下での種間交雑例が確認され, 繁殖地が重なるフンボルトとマゼランペンギンは野生下で種間雑種が報告されている (Simeone *et al.* 2009). これらの雑種個体の生存率と繁殖率は低いため, 各種が固有に分化し, ある程度の遺伝的距離を持ち始めていると考えられた. しかし, MHC 遺伝子におけるフンボルトペンギン属 4 種の遺伝的違いを確認したところ, 系統解析では 4 種のアリルが分岐群内で混在したことや (図 3-4, 図 3-5), フンボルトペンギンとマゼランペンギン間で共通アリルが確認されたことから (図 3-2, 図 3-3), 4 種は遺伝的にきわめて近縁であることが明らかになった.

MHC クラス II 遺伝子の同一アリルが異種間で共有される例は, 霊長類 (Doxiadis *et al.* 2006; Kenter *et al.* 1992; Otting *et al.* 2002), ヨーロッパバイソン (Radwan *et al.* 2007), フンボルトとマゼランペンギン (Bollmer *et al.* 2007) などで報告されている. Bollmer *et al.* (2007)

は共有アレル存在の理由として、この2種（フンボルトおよびマゼランペンギン）が一部の繁殖地を共有するために、祖先個体の交雑イベントにより生じたと考察している。しかし、種間におけるアレルの共有は、近年の種分化、遺伝子変換（gene conversion）、あるいは平衡選択からも説明が可能と考えられる（Meyer-Lucht *et al.* 2008）。また、Baker *et al.* (2006) は核 DNA（RAG-1 遺伝子）やミトコンドリア DNA にもとづく系統解析から、フンボルトペンギン属の種分化は、2,500 万年前にコガタペンギン属から分岐し長い年月を経た後、ケープおよびマゼランペンギン群と、ガラパゴスおよびフンボルトペンギン群の分岐が 400 万年前以内の近年に生じたと示唆している。以上のことから、フンボルトペンギン属内の種間共有アレルの要因として、祖先集団が保有していたアレルが近年の種分化により未だ各種内に保持されている可能性が考えられた。そして、近縁種間で共有される MHC アレルが、中立進化よりも遥かに長い期間保持される要因として、環境因子と個体の相互作用により生じる平衡選択の関与が示唆されている（Cutrera & Lacey 2007; Klein 1987; Takahata 1993）。したがって、同じ南アメリカに生息し生息環境が類似するフンボルトペンギンおよびマゼランペンギンにおいて祖先集団から引き継いだアレルが環境適応による平衡選択によって各種内に保持されている可能性が考えられた。

第5節 小括

第2章において、生息域外保全の遺伝的多様性評価における MHC クラス II 遺伝子の有用性を明らかにし、その解析手法を確立した。本章では、その手法を用いて野生個体を含むフンボルトペンギン属 4 種を対象に MHC クラス II 遺伝子の塩基配列決定を試みた。その結果、フンボルトペンギン属の MHC 研究で得られた最も長い MHC クラス II β 遺伝子配列 (946~1,586 bp) を決定することに成功した。そして、フンボルトペンギン以外の同属 3 種においても、フンボルトペンギンと同様の MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造を有し、高度な多型性を維持していることが明らかになった。フンボルトペンギン属における本遺伝子のゲノム多様性は、exon 1 および exon 3 領域に高い配列保存性を示す一方、exon 2 領域内に高度な多型性を保持していた。さらに、ヒトにおいて知られる超可変領域がフンボルトペンギン属の MHC クラス II 遺伝子領域内にも存在する可能性が示唆された (Hughes & Nei 1988, 1989a, b)。

フンボルトペンギン属 4 種は互いに多くの類似点を持ち、遺伝的にきわめて近縁であることが示唆された。フンボルトペンギン属内で確認された共通アレルの存在もその裏付けとなる (Bollmer *et al.* 2007)。種間で共有するアレルが確認されたことは、4 種の分岐がごく最近生じ、種分化以前に存在したアレルを分岐後も保持している可能性や、4 種が温暖な地域に生息するため環境因子の類似により選択的に共有アレルが保持されている可能性を示唆した。一方で、フンボルトペンギン属のきわめて近縁な関係は、動物園・水族館等におけるフンボルトペンギン属混合飼育の問題性も提示した。

フンボルトペンギン 4 種においては、気候変動などの影響により個体数が減少傾向にあるため、集団内の遺伝的多様性の低下が危惧されていた (Akst *et al.* 2002)。MHC クラス II 遺伝子における多様性評価の結果、3 種 (フンボルト、ケーブ、ガラパゴスペンギン) ではアレル分布の偏りから多様性が低いと評価され、一方マゼランペンギンでは高い多様性が確認された。マゼランペンギン以外の 3 種は過去に急激な個体数減少を経ていることから、アレル分布の偏りの要因としてボトルネックの影響が示唆された。別の要因として、種内の共通アレルが環境適応の結果として集団内に普及した可能性も考えられた。

MHC クラス II 遺伝子の解析によりヘテロ接合度では見出せなかった多様性低下を明らか

にし、その結果は IUCN の絶滅危険度と類似した。以上により、フンボルトペンギン属の生息域内保全における MHC 遺伝子の多様性解析の有用性と、集団内におけるアレル分布や遺伝的距離に関する情報の重要性を明らかにした。

なお、本章の内容は、Kikkawa *et al.* (2009) の論文をもとに構成した。

第4章

ペンギン MHC クラス I の構造および多様性の解明

第1節 はじめに

保全遺伝学における遺伝的多様性の評価には、マイクロサテライトやミトコンドリア DNA を併用するなど複数の中立 DNA マーカーが活用されている (Akst *et al.* 2002; Ariani *et al.* 2013). しかし、それだけでは不十分とされ、保全戦略への信頼性のある証拠を得るためには複数の遺伝子を対象とした評価が必要であり、とくに多型性が高い MHC 遺伝子は多くの研究者により多様性評価に必要不可欠であると述べられている (Ujvari & Belov 2011). 実際に、中立マーカーと MHC 遺伝子を併用した研究 (Hawley & Fleischer 2012) や複数の MHC 遺伝子を解析している研究報告 (Kjøglum *et al.* 2006; Hill *et al.* 1991; O'Brien *et al.* 1985) も多い. 以上の背景から、より正確なペンギン類の遺伝的多様性評価を行うために、複数の MHC 遺伝子の解析手法を確立することは重要である. MHC 遺伝子群には前述の通り、外来抗原の提示を担うクラス II 分子、内因性抗原を提示するクラス I 分子をコードする遺伝子が存在し、いずれも高い多型性を示すことが報告されている (Ujvari & Belov 2011). 本論文第 2, 3 章において、MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造を明らかにし、多様性解析手法を確立した. そこで本章では、細胞内寄生生物に関連性の高い MHC クラス I 遺伝子に着目した. MHC クラス I 分子はほとんど全ての有核細胞表面に発現し、ウイルスや細胞内寄生生物などの内因性抗原を免疫細胞へ提示する役割をもつ. そのため、MHC クラス I 分子をコードするクラス I 遺伝子はマラリアを含む様々な感染症との相関が多数報告されている (Aguilar *et al.* 2016; Bonneaud *et al.* 2006; Gonzalez-Quevedo *et al.* 2016; Kaiser *et al.* 2003). 飼育下ペンギン集団において鳥マラリアを含む感染症は主な死亡要因の一つと報告されているため (Clarke & Knowles 1993; Stoskopf & Beier 1979; Xavier *et al.* 2007), MHC クラス I 遺伝子の情報はペンギン類の生息域外保全 (Ex situ conservation) における遺伝的多様性評価だけでなく、感染症に対する相関解析などへの有益な情報になると考える. しかしながら、ペンギン類の MHC クラス I 遺伝子に関する研究報告はなく、本遺伝子のゲノム構造および多様性は明らかにされていない.

そこで本章ではペンギン類の MHC クラス I 遺伝子に着目し、飼育下フンボルトペンギンを対象に、(1) MHC クラス I 遺伝子のゲノム構造の解明、(2) MHC クラス I 遺伝子領域の多様性解明、(3) 国内飼育下集団における多様性評価を目的とした.

第2節 材料および方法

2.1 供試検体

飼育下フンボルトペンギン（日本国内の動物園または水族館 12 施設）のゲノム DNA 39 検体を用いた（第2章と同一検体）。同様に、RT-PCR に使用した cDNA は、第3章で合成した検体を用いた。

2.2 ペンギン類 MHC クラス I 領域の塩基配列情報の獲得

(1) RT-PCR および塩基配列決定

PCR プライマーは、鳥類数種の古典的 MHC クラス I 遺伝子 exon 2 および exon 4 上の共通配列をもとに設計し（MHC-IL_F2 および MHC-IL_R1）（表 4-1）、以下の条件で PCR 反応を行った。PCR 反応液は、フンボルトペンギンの肝臓由来 cDNA 1 μ l またはゲノム DNA 50 ng, 5 \times PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 3.2 μ l, 2.5mM dNTPs 1.6 μ l, 各 30 μ M Primer 0.16 μ l, PrimeSTAR HS DNA Polymerase（タカラバイオ株式会社）0.3 μ l を滅菌水で合計 16 μ l に調整した。PCR 条件は、94°C 3 分間の熱変性後、98°C 10 秒間の熱変性、60°C 5 秒間のアニーリング、72°C 1 分間の伸長反応を 30 サイクル後、72°C 3 分間の伸長反応を行った。本章における全ての PCR 増幅は GeneAmp PCR System 9700（ThermoFisher SCIENTIFIC K. K.）を用いた。得られた PCR 産物は、第2章と同様の方法で、泳動、精製および DNA 濃度を測定した。

シーケンスプライマーは PCR 増幅で使用したプライマー（MHC-IL_F2 および MHC-IL_R1）を用い、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer（Thermo Fisher SCIENTIFIC K. K.）にて第2章と同様の方法で塩基配列を決定し、inverse PCR 法（iPCR）の基礎配列とした。

2.3 inverse PCR 法による MHC クラス I 領域の塩基配列情報の獲得

フンボルトペンギン MHC クラス I 遺伝子の塩基配列は、従来法を改良した inverse PCR (iPCR) によって決定した。従来の制限酵素サイトに依存する方法 (Benkel & Fong 1996; Nolan & Bustin 2013; Stemmer & Morris 1992) やリンカーを用いた方法 (Singh *et al.* 2014; Trinh *et al.* 2012) から煩雑な作業を省いたシンプルな手法で行える iPCR 法を考案した (図 4-1)。

(1) 環状化 DNA ライブラリーの作製

飼育下フンボルトペンギンのゲノム DNA (10 µg/100 µl) を 1 ml シリンジおよび 27G 注射針 (テルモ株式会社) を用いて繰り返し針内に通すことでせん断した。

次に、せん断後 DNA 断片の末端平滑化を以下の条件で行った。DNA 断片の全量 (10 µg/100 µl) に T4 DNA Polymerase (New England Biolabs Inc.) 4 µl (12 unit), 添付 buffer 11 µl, 20mM dNTPs 0.6 µl を添加し、12°C で 15 分間反応させた (GeneAmp PCR System 9700)。反応後、直ちに QIAquick PCR Purification kit (株式会社キアゲン) を用いてマニュアルに従い精製し、最終的に buffer EB 100 µl で DNA 断片を回収した。

回収した DNA 断片溶液のうち 50 µl に、T4 DNA Ligase (New England Biolabs Inc.) 4 µl, Ligase 添付 Buffer 400 µl を添加し滅菌水で合計 4 ml に調整した。その後、16°C で 5 時間インキュベートし、4°C で 15 時間以上反応させることで DNA 断片を環状化した。

反応後、QIAquick PCR Purification kit (株式会社キアゲン) に添付されている Buffer PB 20 ml を加え混和し、DNA 濃縮のため全溶液を数回に分けて 1 本の QIAquick スピンカラムに通した。その後の方法はマニュアルに従い行った。最終的に buffer EB 100 µl で回収し、前述と同様に DNA 濃度を測定した。

回収した環状化 DNA は、エタノール沈殿法により濃縮した。環状化 DNA 溶液 100 µl に 3M 酢酸ナトリウム 11 µl, 5 mg/ml Glycogen 4 µl, エタノール 280 µl を加え、良く転倒混和した後、20000xg にて 15 分間遠心した。分離後上清を除去し、70%エタノール 1 ml 添加し、最高速度で 5 分間遠心した。分離後室温でペレットを乾燥させ、TE buffer (10mM Tris pH8.0, 0.1mM EDTA) を用いて、エタノール沈殿前の濃度を参考に 500 ng/µl の濃度に調整し、環

状化 DNA ライブラリーを完成させた。

(2) inverse PCR および切り出し

RT-PCR で決定した基礎配列内の intron 2 上に外向きの PCR プライマーを設計した (CLSI_in2_2030_F および CLSI_in2_2031_R) (表 4-1, 図 4-2)。設計したプライマーを用いて、環状化 DNA ライブラリーを鋳型に iPCR を実施した。PCR 反応液は、環状化 DNA ライブラリー 0.5 μ l, 5x PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 3 μ l, 2.5mM dNTPs 1.5 μ l, 各 3 μ M Primer 1 μ l, PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) 0.3 μ l を滅菌水で合計 15 μ l に調整した。PCR 条件は、94°C 20 秒間の熱変性後、98°C 10 秒間の熱変性、68°C 10 分間のアニーリングおよび伸長反応を 30 サイクルで行った。

GelStar (ロンザジャパン株式会社) をマニュアル通りの濃度で添加した 1% の TAE 低融点アガロースゲル (SeaPlaque GTG アガロース, ロンザジャパン株式会社) に iPCR 産物の全量をアプライし、アガロースゲル電気泳動装置および電気泳動用電源 (アトー株式会社) を用いて電気泳動した。Blue LED ランプ (Clare Chemical) およびディスポスカルペルを用いて、スメア状の iPCR 産物から 5 kb 以上の断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (株式会社キアゲン) を用いてマニュアルに従い精製した。

(3) Nested PCR および塩基配列確認

iPCR 用プライマーの位置から外側の配列上に、外向きのプライマーを Nested PCR 用に設計した (CLSI_ex3_2032_F および CLSI_ex2_2033_R) (表 4-1, 図 4-2)。Nested PCR の反応液は、10 倍希釈の iPCR 産物 1 μ l 用いて、iPCR と同様の条件で調整した。PCR 条件は、94°C 20 秒間の熱変性後、98°C 10 秒間の熱変性、68°C 2 分 30 秒間のアニーリングおよび伸長反応を 30 サイクルで行った。また、予備を含め合計 90 μ l 程度の PCR 産物を得るために、6 ウェルで同じ反応を実施した (同一 PCR 産物 15 μ l \times 6 ウェル)。

得られた Nested PCR 産物の 2 ウェル分 (30 μ l) を、前述と同様に 5 kb 以上の DNA 断片の切り出し、精製およびエタノール沈殿法を実施し、最終的に TE buffer (10mM Tris pH8.0, 0.1mM EDTA) 5 μ l に溶解した。このうち 3 μ l を用いて、Nested PCR 産物内に標的とする領域 (基礎配列およびその周辺配列) が含まれているかを確認するために、基礎配列上に新

たにシーケンスプライマーを設計し (CLSI_ex4_2034_R) (表 4-1), 第 2 章と同様に塩基配列を決定した.

(4) dA 付加および切り出し

TA クローニングにおいて, 3'末端にデオキシリボチミジン (dT) が一塩基付加した T ベクターに PCR 産物をライゲーションするため, Nested PCR 産物の末端にデオキシリボアデノシン (dA) を付加した. Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (タカラバイオ株式会社) に添付されている A-overhang mixture kit を使用して, 以下の通り実施した. Nested PCR 産物 (残り 4 ウェル分; 56 μ l) に 10x Buffer 7 μ l, dATP 3.5 μ l, A-overhang enzyme 3.5 μ l を加え, 65°C で正確に 10 分間反応させた (GeneAmp PCR System 9700, ThermoFisher SCIENTIFIC K. K.).

反応後, 直ちに前述と同様のエタノール沈殿法を行い, 最終 2.5 μ l の滅菌水に溶解した.

(5) クローニング

dA 付加後産物 0.75 μ l, pT7Blue T vector (10 ng/ μ l, Merck Millipore) 0.15 μ l, 2 \times Ligation mix 0.9 μ l を混合し 1.8 μ l 反応系に調整し, 16°C で 1 時間以上インキュベーションした. 2 \times Ligation mix は, 25% ポリエチレングリコール (Sigma-Aldrich) 2 μ l, T4 DNA Ligase (New England Biolabs Inc.) 1 μ l, 10 \times T4 DNA ligase buffer (NEB) 1 μ l, 滅菌水 1 μ l を混合した溶液である.

ライゲーションサンプル全量に, JM109 コンピテントセル (研究室作製) 100 μ l を添加し, 氷上で 30 分間, 42°C で 45 秒間の後, 氷上で 5 分間インキュベートした.

菌液に, 37°C に加温した SOC Medium (Thermo Fisher SCIENTIFIC K.K.) を 500 μ l 添加し, ウォーターバスで 37°C 1 時間振とう培養した. この後の操作は第 2 章と同様の方法で行い, コロニーを得た.

(6) コロニーPCR

ベクター配列に特異的なプライマー (pT7Blue_2042_F および pT7Blue_2041_R) (表 4-2) を新たに設計し, 50 個の白色コロニーを鋳型としてコロニーPCR を行った. 同時に, 基礎配列を含む領域がクローニングされているか確認するために, 同一コロニーに対して基礎

配列内に新たに設計したプライマー (CLSI_ex3_2032_F および CLSI_ex4_2034_R) (表 4-2) を用いてコロニーPCR を行った. PCR 反応液は, 5x PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 3 µl, 2.5mM dNTPs 1.5 µl, 各 3µM Primer 1 µl, PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) 0.3 µl を滅菌水で合計 15 µl に調整した. 8 連 PCR Tube のウェル底に 1 コロニーを少量塗布し, 調整した反応液 15 µl を各ウェルに加えた. PCR 条件は, 94°C 20 秒間の熱変性後, 98°C 10 秒間の熱変性, 68°C 6 分間のアニーリングおよび伸長反応を 25 サイクルで行った. 基礎配列内のプライマー (CLSI_ex3_2032_F/ex4_2034_R) を用いた場合は, アニーリングおよび伸長反応を 20 秒間に変更した.

得られた PCR 産物は, 0.8% (pT7Blue_2042_F/2041_R) または 2% (CLSI_ex3_2032_F/ex4_2034_R) の TAE アガロースゲル (SeaKem LE Agarose, ロンザジャパン株式会社) を用いて, 第 2 章と同様の方法でゲル画像を取得した.

(7) 制限酵素処理によるクローン選抜およびプラスミド抽出

コロニーPCR 産物を制限酵素で処理することで, 異なる切断パターンを示すクローンを 50 クローンの中から選択した. 酵素反応液は, コロニーPCR 産物 (pT7Blue_2042_F/2041_R) 0.4 µl, Hinf I (New England Biolabs Inc.) 0.15 µl, 1.2× buffer 4.45 µl で合計 5 µl に調整し, 37°C で 1 時間インキュベートした (GeneAmp PCR System 9700).

反応後, 1× Loading Buffer (研究室作製) 2 µl を添加し, 1.5% TBE アガロースゲル (SeaKem LE Agarose, ロンザジャパン株式会社) を用いて, 第 2 章と同様の方法で電気泳動しゲル画像を取得した.

異なる切断パターンを示すクローンを 1 クローンずつ選択し, QIAprep Spin Miniprep Kit (株式会社キアゲン) を用いてマニュアルに従いプラスミド DNA を抽出した.

(8) ドラフト塩基配列決定およびマッピング

得られたプラスミド DNA の塩基配列を決定するために, 基礎配列内に 2 つのシーケンスプライマーを新たに設計した (CLSI_ex2_2045_R および CLSI_ex4_2046_F). プラスミド DNA 1.5 µl を用いて, 第 2 章と同様の方法で塩基配列を決定した.

同一シーケンスプライマーで取得した複数プラスミドクローンの塩基配列を比較する

ことでジャンクションサイトを特定し (図 4-1), プラスミドクローンのサイズを参考にマッピングした (図 4-3 A). 例えば, CLSI_ex2_2045_R シークエンスプライマーで得た 6 クローンの塩基配列をアライメントした場合, クローン 1 の配列のみ途中から異なった場合, その位置がクローン 1 のジャンクションサイトとなる.

(9) ゲノム PCR による MHC クラス I 遺伝子の塩基配列決定

決定した断片的な塩基配列のうち (図 4-3 A), 基礎配列から最も遠い配列上に新たに 2 つの PCR プライマーを設計した (CLSI_up_2076_F および CLSI_down_2052_R) (表 4-1). 設計したプライマーと基礎配列上のプライマーを組み合わせた 2 つのプライマーセット (CLSI_up_2076_F/CLSI_ex2_2033_R および CLSI_ex3_2032_F/CLSI_down_2052_R) を用いて PCR 反応を行った. PCR 反応液は, フンボルトペンギンのゲノム DNA 50 ng を鋳型として, (2) の iPCR と同様に調整した. PCR 条件は, 94°C 20 秒間の熱変性後, 98°C 10 秒間の熱変性, 68°C 1 分 30 秒間のアニーリングおよび伸長反応を 30 サイクルで行った.

得られた PCR 産物は, 第 2 章と同様に電気泳動により増幅サイズを確認後, PCR 増幅に用いたプライマーをシークエンスプライマーとして塩基配列を決定した. 得られた塩基配列の末端にシークエンスプライマーを設計し, 再度同一 PCR 産物の塩基配列を決定するウォーキング法を用いて PCR 産物の全長を決定した. 最終的に MHC クラス I 遺伝子の全長を決定するために使用したシークエンスプライマーは, 新たに設計した 5 種を含め計 10 種を用いた (表 4-2, 図 4-3 B).

(10) データ解析

鳥類複数種 MHC クラス I 遺伝子のゲノム構造を参考に, 得られたフンボルトペンギン塩基配列のゲノム構造を推定した. 参考にした配列の種名, 学名および GeneBank Accession number は, コオバシギ (*Calidris canutus*, KC205115), アカハシギンカモメ (*Larus scopulinus*, HM008713), マガモ (*Anas platyrhynchos*, AY885227) およびニワトリ (*Gallus gallus*, AL023516) である.

決定した配列が, 古典的 MHC 遺伝子であるかを確認するために, 哺乳類の古典的 MHC クラス I 遺伝子に特徴的なアミノ酸残基を確認した (GENETYX-MAC). 具体的には MHC

分子の構造を安定化させる塩橋サイト，ドメイン間の結合に関与するシステイン残基およびNグリコシル化サイトを含む合計33か所のアミノ酸残基を確認した(Aoyagi *et al.* 2002)。

鳥類数種の古典的 MHC クラス I 遺伝子との類似性を確認するために，決定した塩基配列を用いて相同性検索を行った (NCBI blast <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

分子系統樹は，フンボルトペンギンの intron 1～intron 4 の塩基配列をもとに第2章と同様の方法で作成した。アウトグループ (外群) にはヒトおよび鳥類の既知 MHC クラス I 遺伝子塩基配列を用いた。種名，学名および GeneBank Accessin number は，カモ目に属するハイイロガン (*Anser anser*, AY387655) およびマガモ (*Anas platyrhynchos*, AY885227)，チドリ目に属するコオバシギ (*Calidris canutus*, KC205115) およびアカハシギンカモメ (*Larus scopulinus*, HM008713)，キジ目に属するニワトリ (*Gallus gallus*, AL023516 for BF1 and AM282698 for BF2)，クロライチョウ (*Lyrurus tetrix*, JQ028669 for BF1)，キジ (*Chrysolophus pictus*, JQ440366)，七面鳥 (*Meleagris gallopavo*, DQ993255) およびウズラ (*Coturnix japonica*, AB078884)，そしてヒト MHC は HLA-A*01:01:01 (HG794373.1)，HLA-B*07:02:01 (HG794392.1) および HLA-C*01:02:01 (HG794388.1) である。

2.4 飼育下フンボルトペンギン集団における MHC クラス I 遺伝子の多型解析

決定した配列をもとにフンボルトペンギンに特有な MHC クラス I 多型解析用プライマーを設計した。標的領域は，MHC クラス I 遺伝子内で最も多型性を示すことで知られる exon 2 および exon 3 を含む領域とした (Cloutier *et al.* 2011)。

(1) PCR 法による MHC クラス I 遺伝子の増幅

フンボルトペンギン MHC クラス I 遺伝子 exon 2～exon 4 を増幅させるプライマーを5種設計した (表 4-1)。5'UTR 配列上に1つ，exon 1 上に1つ，そして exon 5 上に2つ設計し，これらを組み合わせて多型解析用プライマー3セットを使用した (図 4-3 B)。

日本国内12施設から得たフンボルトペンギン39検体を試料として各検体2ウェルずつ (15 μ l \times 2) 以下の条件で PCR 反応を行った。PCR 反応液は，ゲノム DNA 50 ng，5 \times PrimeSTAR GXL Buffer 4 μ l，2.5mM dNTP mixture 1.6 μ l，各 10 μ M プライマー (Lpen.hum1F/3R)

0.3 μ l, PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) 0.3 μ l を滅菌水で合計 20 μ l に調整した。PCR 条件は、94°C 20 秒間の熱変性後、98°C 10 秒間の熱変性、68°C 1 分間のアニーリングおよび伸長反応を 30 サイクル反応させた。得られた PCR 産物は、第 2 章と同様に電気泳動により増幅サイズを確認した。

PCR 産物の 1 ウェル分 (15 μ l) はクローニング用として、前述と同様にエタノール沈殿法を行い、泳動画像上のバンド蛍光強度を参考に TE buffer (10mM Tris, 0.1mM EDTA, 和光純薬工業株式会社) 0.5~2 μ l に溶解した。もう 1 ウェル分は、ダイレクトシーケンス用として QIAquick PCR Purification kit (株式会社キアゲン) を用いてマニュアルに従い精製し、前述通り DNA 濃度を測定した。

(2) クローニング

精製 PCR 産物 0.18 μ l に、pMD20-T プラスミドベクター (50 ng/ μ l, Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR, タカラバイオ株式会社) 0.12 μ l および 2x Ligation mix 0.3 μ l を混和し、16°C で 1 時間以上インキュベートすることでライゲーションを行った。2x Ligation mix は、25%ポリエチレングリコール (Sigma-Aldrich) 2 μ l, T4 DNA Ligase (New England Biolabs Inc.) 1 μ l, 10x buffer 1 μ l, 滅菌水 1 μ l を混合した溶液である。

ライゲーションサンプル全量に、JM109 コンピテントセル (研究室作製) 25 μ l を加え氷上で 30 分間インキュベート後、ウォーターバスで 42°C 45 秒間ヒートショックし、直ちに氷上で 5 分間静置した。その後 SOC Medium (Thermo Fisher SCIENTIFIC K.K.) 150 μ l を加え、ウォーターバスで 37°C 1 時間振とう培養した。この後の手順は第 2 章と同様に行い、コロニーを得た。

(3) コロニーPCR

T7Blue_2042_F および pT7Blue_2041_R プライマーセット (表 4-2) を用いて、各検体につき 10 個のコロニーを鋳型としてコロニーPCR を以下の条件で行った。PCR 反応液は、5 \times PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 3 μ l, 2.5 mM dNTPs 1.5 μ l, 各 10 μ M Primer 0.3 μ l, PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) 0.3 μ l を滅菌水で合計 15 μ l に調整した。8 連 PCR Tube のウェル底に 1 コロニーを少量塗布し、調整した反応液 15 μ l を各ウェルに加

えた。PCR 条件は、94°C 5 分間の熱変性後、98°C 10 秒間の熱変性、68°C 2 分間のアニーリングおよび伸長反応を 30 サイクルで行った。

得られた PCR 産物は、第 2 章と同様の方法で電気泳動、精製および DNA 濃度を測定した。

(4) シークエンス解析およびデータ解析

ダイレクトシークエンス PCR 産物およびコロニー-PCR 産物のシークエンス解析を行った。シークエンスプライマーは、表 4-2 に多型解析用として示したプライマー 5 種を用い、第 2 章と同様の方法で塩基配列を決定後、アリルを特定した。得られた配列情報の精度を確認するために、ダイレクトシークエンスおよびクローニングによりそれぞれ得られた塩基配列が一致するかを確認した。

GENETYX-MAC (株式会社ゼネティクス) を用いて、多型解析を行った。決定した塩基配列からアミノ酸配列を推測し、ヒト MHC クラス I 遺伝子で同定されたペプチド結合領域 (PBR : peptide-binding region, Bjorkman *et al.* 1987) に相当するサイトを確認した。

非同義置換率 (dN) および同義置換率 (dS) は、各エクソン、PBR および非 PBR を対象に、MEGA 2 ソフトウェアの Nei-Gojobori モデル (Nei & Gojobori 1986) を用いて算出し、 ω 値 (dN / dS) を得た。 $\omega < 1$ ならば配列保存、 $\omega > 1$ ならば多様化選択である正の選択が作用したとする説に基づき、検出した多型を評価した (松井ら 2008; Rocha *et al.* 2006; Wolfe & ÓhUigín 2016)。分子系統樹は、決定した塩基配列の全長を用いて第 2 章と同様の方法で作成した。

飼育下フンボルトペンギン集団の多様性評価は、第 2 章と同様に行った。

表 4-1 ペンギンクラス I 領域 PCR プライマー情報

プライマー名	位置	方向	配列情報 (5'→3')	設計配列
● RT-PCR用				
MHC-IL_F2	exon 2	F	TGGATCAGCAGTACTGGG	RT-PCR
MHC-IL_R1	exon 4	R	AGCCAGCTGATGGTGATG	
● inverse PCR用				
CLSI_in2_2030_F	intron 2	F	CCAGGCTTCACAGAGTGCTGGAGTGA	1 st PCR
CLSI_in2_2031_R	intron 2	R	GGTGGCTGGGAGCCCTCTGATAATG	
CLSI_ex3_2032_F	exon 3	F	CACCTGCATCGAGTGGCTGAGGAAGTA	Nested PCR, genome PCR
CLSI_ex2_2033_R	exon 2	R	CGCAGTGTGCCAGGTCCACTTG	
CLSI_up_2076_F	上流	F	CTCTGTGTGCTGACTGCTCAGCAGTGA	genome PCR
CLSI_down_2052_R	下流	R	GCACACTGCTGTGCCGTACATCTCTGTA	
● 多型解析用				
CLSI_5utr_2104_F	5'UTR	F	GCGGCTCGGGCTGCCATTG	primer set 1
CLSI_ex5_2R	exon 5	R	CACCGCCAGCACGATGGTTAACAG	
CLSI_ex1_F	exon 1	F	GCTGGGGTCTCTCGGCGG	primer set 2
CLSI_ex5_R	exon 5	R	GCAACCACCGCCAGCACGAT	
CLSI_in1_F	intron 1	F	GATCTGCTCCCCTGGGACCTCCA	primer set 3
CLSI_ex5_R	exon 5	R	GCAACCACCGCCAGCACGAT	
vector_long primer_R	pMD20-T,	R	TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGA	colony PCR
vector_long primer_F	pSTBlue-1	F	CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTA	

プライマーの向きは、F は Forward, R は Reverse を意味する。

表 4-2 ペンギンクラス I 領域シーケンスプライマー情報

プライマー名	位置	方向	配列情報 (5'→3')
● RT-PCR用			
MHC-IL_F2	exon 2	F	TGGATCAGCAGTACTGGG
MHC-IL_R1	exon 4	R	AGCCAGCTGATGGTGATG
● inverse PCR用			
CLSI_up_2076_F	上流	F	CTCTGTGTGCTGACTGCTCAGCAGTGA
CLSI_down_2052_R	下流	R	GCACACTGCTGTGCCGTACATCTCTGTA
CLSI_ex2_2045_R	exon 2	R	AGTGTGCCAGGTCCACTTG
CLSI_ex3_2032_F	exon 3	F	CACCTGCATCGAGTGGCTGAGGAAGTA
CLSI_ex4_2046_F	exon 4	F	CGGGACCCTGACCTTGTACTG
CLSI_ex4_2034_R	exon 4	R	TGGGCTCCTCCCCGACACTC
CLSI_in1_2049_R	intron 1	R	AGGTCCCAGGGGAGCAGATC
CLSI_5utr_2104_F	5'UTR	F	GCGGCTCGGGCTGCCATTG
CLSI_in1_2103_R	intron 1	R	CGCGGTGCGCAGGGATGAAG
CLSI_in6_2102_F	intron 6	F	TGGGGACGTATGGAAGAGGTCGTGTCT
CLSI_down_2123_R	Gap上流	R	GAGCAAACGTCTCACCTGCCTGATG
CLSI_down_2075_R	Gap下流	R	TGGGAATTGCTCGACAGCAACTG
pT7Blue_2042_F	pT7Blue-T vector	F	ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC
pT7Blue_2041_R	pT7Blue-T vector	R	TGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACA
● 多型解析用			
CLSI_ex5_R	exon 5	R	GCAACCACCGCCAGCACGAT
CLSI_ex4_R	exon 4	R	GGCATAGTAGGTGCCGTCGCTGTTG
CLSI_in2_2031_R	intron 2	R	GGTGGCTGGGAGCCCTCTGATAATG
CLSI_in2_R	intron 2	R	GCCTGGAGCCCACAGCACT
CLSI_ex3_R	exon 3	R	CCATGTGCGAAGGCGATGAAG

第3節 結果

3.1 ペンギン MHC クラス I 遺伝子の塩基配列決定

(1) RT-PCR および塩基配列決定

RT-PCR およびゲノム PCR (MHC-IL_F2/MHC-IL_R1) により, フンボルトペンギンの肝臓由来 cDNA から 481 bp, ゲノム DNA からは 1.3 kb の PCR 産物を得た. 得られた PCR 産物のシーケンスの結果, cDNA 由来の PCR 産物は intron 2 および intron 3 を除く exon 2, exon 3 および exon 4 の連続配列で構成されていたのに対し, ゲノム由来の PCR 産物は, exon 2, intron 2, exon 3, intron 3, exon 4 の配列で構成されていた.

以上により, 決定したフンボルトペンギン MHC クラス I 遺伝子配列の発現が明らかとなった. 同時に, iPCR 法で用いる基礎配列を得ることに成功した.

(2) inverse PCR 法による塩基配列決定

iPCR 法により制限酵素の切断パターンが異なる 2 kb~5 kb の 6 つのプラスミドクローンを得た (Q926~Q936) (図 4-3 A). その塩基配列を決定することで, 断片的なフンボルトペンギン MHC クラス I 遺伝子のドラフト配列を得た. その配列をもとに設計したプライマーを用いたゲノム PCR およびダイレクトシーケンス法により, 基礎配列 (exon 2~exon 4 領域) から 2 kb 上流および 4.2 kb 下流に亘るおよそ 7 kb の塩基配列 (約 1 kb の Gap を含む) を決定することに成功した. Gap から下流を省いた塩基配列データ (図 4-4) は, DDBJ データベースに登録した (登録番号: LC159138).

3.2 MHC クラス I 遺伝子のゲノム構造

鳥類複数種の既知 MHC クラス I 遺伝子のゲノム構造を参考にフンボルトペンギンのゲノム構造を推定した結果, 決定したおよそ 7 kb の塩基配列内に 7 つのエクソンを同定した (図 4-3). 図 4-5 に示すように, エクソンの塩基長は他の鳥類とほぼ一致したが, イントロンは鳥類種によって異なった.

得られた配列が古典的 MHC 遺伝子に相当するかを確認するために、合計 33 アミノ酸残基を確認した結果 (Aoyagi *et al.* 2002), ドメイン同士がジスルフィド結合をするために必要な 4 カ所のシステイン残基が (C-99, 161, 199, 255), フンボルトペンギンのアミノ酸配列上にも位置することを明らかにした (図 4-6). また, N 結合型複合糖鎖が $\alpha 1$ ドメインと結合する際に必要な N-グリコシル化サイトに相当する 3 つのアミノ酸残基 (N-85, Q-86, S-87) もフンボルトペンギン exon 2 の末端配列上に確認した. タンパクの高次構造を安定化する塩橋サイトや T 細胞と相互作用するサイトの 18 残基は, ニワトリとは 17 カ所, ヒトとは 16 カ所, ニジマスとは 14 カ所一致した. MHC 分子が抗原ペプチドの末端と結合するサイトに相当する 8 残基 (Y-7, Y-58, R-83, T-140, K-143, W-144, Y-156, Y-168) は, ヒトとは 7 カ所一致し, ニワトリおよびニジマスとは完全に一致した. 結果, フンボルトペンギンの配列上で確認した 23 アミノ酸残基は, ニワトリとは完全に一致し, ヒトおよびニジマスとは 21 カ所一致した.

3.3 相同性検索および系統解析

決定したフンボルトペンギンの塩基配列を用いた相同性検索の結果, 複数鳥類の MHC クラス I 遺伝子配列と高い相同率が示された. チドリ目に属するアカハシギンカモメ MHC クラス I Lasc-UBA 遺伝子 (*Larus scopulinus*, HM008714.1) と 81% (一致した塩基数/比較した塩基数=1573/1944 bp), コオバシギ MHC クラス I Caca-UA 遺伝子 (*Calidris canutus*, KC205116.1) とは 80% (1541/1931 bp) の相同性を示した. また, ペリカン目に属するトキ MHC クラス I 遺伝子 (*Nipponia nippon*, KR995142.1) とは 87% (649/745 bp) の相同性であった. 参考としてアカハシギンカモメの MHC クラス I 遺伝子の相同性検索を実施した結果, コオバシギとは 83% (2370/2843 bp), トキと 87% (1352/1558 bp) の相同性を示し, フンボルトペンギンにおける結果と同等の数値が得られた.

フンボルトペンギン, ヒトおよび鳥類の MHC クラス I 遺伝子配列を用いた系統解析の結果, 各動物種が種および目ごとに分岐群を形成し, フンボルトペンギンはチドリ目の分岐群に位置した (図 4-7).

3.4 飼育下フンボルトペンギン集団における MHC クラス I 遺伝子の多型解析

(1) MHC クラス I 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の多型性

飼育下フンボルトペンギン 39 個体の MHC クラス I 遺伝子 intron 1~intron 4 (完全な exon 2, 3, 4 を含む) に亘る約 2 kb の塩基配列を決定することに成功した。組み換えクローンから得られた塩基配列データが、各個体のダイレクトシーケンス配列データと一致していることを確認した。フンボルトペンギン 39 個体から、合計 24 アリルを特定した (表 4-3)。

24 アリル間の一塩基多型数と割合 (%) は、exon 2 (264 bp) で 26 箇所 (9.8%)、exon 3 (273 bp) で 34 箇所 (12.5%)、exon 4 (273 bp) で 5 箇所 (1.8%)、intron 2 (805~807 bp) で欠失を含み 36 箇所 (4.5%)、intron 3 (77 bp) で 2 箇所 (2.6%) であった (図 4-8)。解析領域内では、exon 2 および exon 3 に多型が集中していることが明らかになった。

24 アリルのアミノ酸配列における多型数と割合 (%) は、exon 2 (88 アミノ酸) で 14 箇所 (16%)、exon 3 (91 アミノ酸) で 21 箇所 (23%)、exon 4 (90 アミノ酸) で 2 箇所 (2%) であった (図 4-9)。exon 2 および exon 3 で確認した 35 箇所の多型のうち 19 箇所は、ヒトで同定されている PBR に位置した。

(2) 非同義置換率 (dN) および同義置換率 (dS)

24 アリル間の ω 値 (dN/dS 比率) は、exon 2 および exon 3 で 1 以上の高い数値を示し、exon 4 では 1 以下であった (表 4-4)。同時に、exon 2 および exon 3 ($\alpha 1$ と $\alpha 2$ ドメインに相当) 上の PBR および非 PBR 領域の ω 値はそれぞれ 6.45 と 0.75 であった。

以上により、exon 2 および exon 3 で検出された多型の多くが非同義置換であり、とくに PBR に相当する領域に非同義置換が集中していることを明らかにした。

3.5 飼育下フンボルトペンギン集団の MHC クラス I 遺伝子の多様性評価

国内 12 施設で飼育されているフンボルトペンギン (39 個体) を対象に、国内全体および施設ごとに MHC クラス I 遺伝子の多様性評価を試みた。評価方法は、第 2 章の MHC クラス II 遺伝子と同様に、ヘテロ接合度、アリル分布およびアリル間の遺伝的距離の 3 項目と

した。尚、12 施設中 2 施設（施設 ID: Z06, Z08）は検体数が判定基準に満たなかったため、施設ごとの多様性評価では除外した。

(1) ヘテロ接合度

解析した全個体（39 個体）におけるヘテロ接合度は 0.89 で遺伝的多様性は高いと評価した。施設ごとでは（10 施設 37 個体）、3 施設で多様性が高く（施設 IDA01: 0.87, A03: 0.75, Z09: 0.75）、1 施設で多様性が低い（Z07: 0.38）と評価した。それ以外の 6 施設では 0.50～0.69（A02: 0.66, Z01: 0.50, Z02: 0.67, Z03: 0.66, Z04: 0.69, Z05: 0.63）であった。

(2) アリル分布

全 39 個体 24 アリルの分布を評価した結果、28 個体がヘテロ接合型（71.8%）、11 個体がホモ接合型（28.2%）であった（表 4-5）。

施設ごとでは（10 施設 37 個体）、2 施設（施設 ID : Z01, Z07）において全個体が同一アリルを保有し（表 4-5）、他 2 施設（Z03, Z04）は 4 個体中 3 個体が同一アリルを保有していた。具体的な、集団内における同一アリル保有個体の割合は以下の通りである；0%が 3 施設（A03, Z05, Z09）、38%が 1 施設（A01）、60%が 1 施設（A02）、67%が 1 施設（Z02）、75%が 2 施設（Z03, Z04）、100%が 2 施設（Z01, Z07）。また、各施設で確認された共通アリルの種類は、施設ごとで異なった。

(3) アリル間の遺伝的距離

各アリルの塩基配列をアミノ酸配列に変換し作成した系統樹を図 4-10 に示した。国内飼育下フンボルトペンギン集団から得られた 24 アリルは、5 つの分岐群に分類され（a～e）（図 4-10）、分岐群 a と分岐群 b は姉妹群を形成した。24 アリル間で最も遺伝的距離のあるアリルは 27 アミノ酸多型（CLS1*0901 と 1201）であった。5 群の中でアリル間の枝長が最も短い分岐群 b は、アリル間のアミノ酸多型が 0 箇所（CLS1*0202 と 0203）～5 箇所（CLS1*0202 と 0204）のアリルで構成されていた。姉妹群である分岐群 ab 間の遺伝的差異は、7 箇所（CLS1*0204 と 0303）～13 箇所（CLS1*0101 と 0204）であった。

各施設で検出されたアリルを確認した結果（図 4-10）、検出アリルが 5 つの異なる分岐群

に属した施設は、1施設のみであった（施設 ID: A01）。検出アレルが3つの分岐群に属した施設は5施設確認し（A03, Z02, Z04, Z05, Z09）、遺伝的に近縁な姉妹群に属するアレルのみで構成されていたのは3施設（Z01, Z03, Z07）であった。

表 4-3 フンボルトペンギンの MHC クラス I アレル情報。

アレル名	Accession No.
CLSI*01010101	LC126119
CLSI*01010102	LC126133
CLSI*0201	LC126122
CLSI*0202	LC126125
CLSI*0203	LC126138
CLSI*0204	LC126126
CLSI*0205	LC126128
CLSI*0301	LC126137
CLSI*0302	LC126121
CLSI*0303	LC126139
CLSI*0304	LC126130
CLSI*0401	LC126123
CLSI*0402	LC126134
CLSI*0501	LC126136
CLSI*0601	LC126129
CLSI*0602	LC126135
CLSI*0701	LC126132
CLSI*0702	LC126142
CLSI*0801	LC126120
CLSI*0901	LC126127
CLSI*1001	LC126140
CLSI*1101	LC126131
CLSI*1201	LC126124
CLSI*1301	LC126141

MHC クラス I アレルの塩基配列は DDBJ により登録番号 を得た。

表 4-4 MHC クラス I アリル間同義置換率と非同義置換率.

	exon 2	exon 3	exon 4	PBR	non-PBR
d_s	15.1±0.08	17.9±0.07	11.8±0.06	11.8±0.06	34.6±0.13
d_N	34.7±0.16	56.7±0.15	0.29±0.02	76.0±0.22	25.9±0.07
d_N/d_s	2.3	3.16	0.24	6.45	0.75

数値データは平均値±標準誤差 (SE) を示す. PBR は exon 2 および exon 3 内の PBR 配列から算出した数値で, no PBR は exon 2 および exon 3 内の PBR 以外の配列から算出した数値である.

表 4-5 各個体の MHC クラス I アリル情報.

No.	個体 ID	性別	施設ID	CLS1*	CLS1*
1	60	-		CLSI*0302	CLSI*0201
2	62	-		CLSI*0801	-
3	63	-		CLSI*0302	CLSI*0204
4	127	-	A01	CLSI*0401	CLSI*0702
5	129	-		CLSI*1201	-
6	130	-		CLSI*01010101	CLSI*0801
7	131	-		CLSI*0801	CLSI*0202
8	151	-		CLSI*0204	CLSI*0901
9	NM001	♂		CLSI*0205	-
10	NM010	♀		CLSI*0402	CLSI*0602
11	NM020	♀	A02	CLSI*0205	-
12	NM021	♀		CLSI*0402	CLSI*0501
13	NM022	♂		CLSI*0205	CLSI*0501
14	NM025	♂	Z01	CLSI*0302	-
15	NM026	♂		CLSI*0302	CLSI*0201
16	NM027	♂		CLSI*0302	CLSI*0204
17	NM030	♂		CLSI*0601	-
18	NM031	♀	Z02	CLSI*0302	CLSI*0203
19	NM032	♂		CLSI*0205	CLSI*0601
20	NM033	♂		CLSI*0201	CLSI*0303
21	NM034	♀	Z03	CLSI*0201	CLSI*0204
22	NM035	♀		CLSI*0302	CLSI*0204
23	NM036	♀		CLSI*0204	-
24	NM037	♀		CLSI*0201	CLSI*0301
25	NM038	♀	Z04	CLSI*0204	CLSI*1201
26	NM039	♀		CLSI*0302	CLSI*1201
27	NM040	♀		CLSI*1201	-
28	NM043	♂	Z05	CLSI*0304	CLSI*1101
29	NM044	♀		CLSI*0204	-
30	NM046	♀	Z06	CLSI*0302	CLSI*0205
31	NM049	♀		CLSI*0302	CLSI*0204
32	NM050	♂	A03	CLSI*0701	CLSI*0303**
33	NM052	♀		CLSI*0204	-
34	NM053	♂	Z07	CLSI*0204	-
35	NM054	♀		CLSI*0204	CLSI*01010102
36	NM055	♀		CLSI*0204	CLSI*01010102
37	NM057	♂	Z08	CLSI*0204	CLSI*0601
38	NM060	♂	Z09	CLSI*0204	CLSI*1001
39	NM062	♀		CLSI*01010102	CLSI*1301

施設 ID の「Z」は動物園, 「A」は水族館を示す. 異なる施設は番号によって区別した. 「-」はホモ接合型を意味する. 各施設で頻度の高いアリルをグレーハイライトで示した.

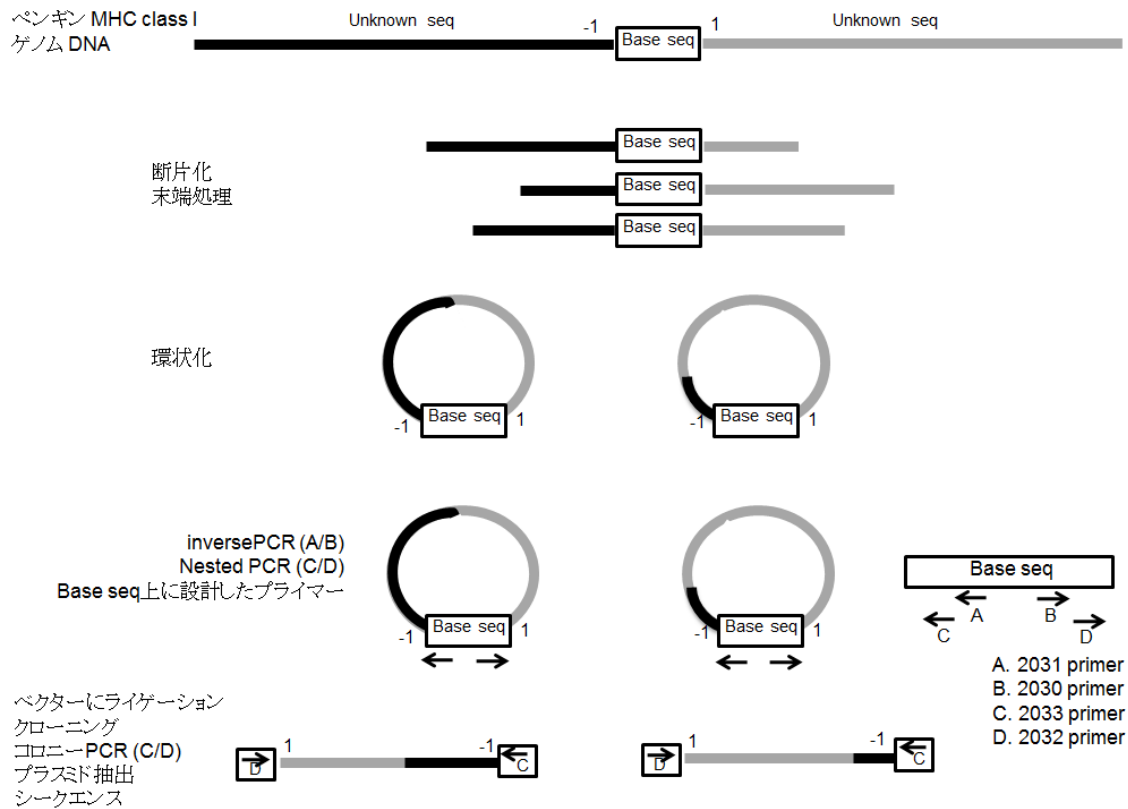


図 4-1. 改良 inverse PCR 法の略図.

一番上に示した図は、基礎配列 (exon 2~exon 4) を含むペンギン MHC クラス I 遺伝子の DNA 領域を示している。exon 2 の上流と exon 4 の下流の未知配列は、それぞれ黒色と灰色の太線で示した。フンボルトペンギンのゲノム DNA は、物理的に切断し、平滑化後、ライゲーションにより環状化した。環状化 DNA を鋳型に、exon 2、intron 2 および exon 4 (Base seq) 上に位置する外向きのプライマーを用いて iPCR を実施した。iPCR 産物は、Nested PCR の鋳型として用い、得られた Nested PCR 産物はプラスミドベクターにクローン化し、大腸菌に導入した。インサート DNA を持つ組み換え型クローンはコロニーPCRによって増幅サイズを確認し、2 kb 以上のインサート DNA を含むクローンの塩基配列を決定した。

MHC-IL F2

1 TGGATCAGCAGTACIGGGA CAGCCAGACCCAGATATGGCAGGGTAA TCAGCAGGTTGGA CAAAGTGGACCTGGGCACACACI GCGGGGGCCCGCTACAA CCGAGAG
 1-----G-C-----
 1-----G-C-----
 1-----G-C-----

ex 2 | intron 2

101 CCGGGGTAAAGTGGGGGCTGGGTGGGGCTGGGACTCCGTGGGACAGGAGAGTTCTTGCCCCCTGCCCCCCCTCCAAGATCCTGCG
 genome-1
 genome-2
 cDNA-1
 cDNA-2

201 CCTGCCCCCATGGCACATGCCCTGCCCTGGCTGGCCGGGCCCTCCCTGCCCTGGTGGCAITATCAGAGGGGCTCCGAGCCACCCCTGTGCCCCAGGCCGAGGGGGGTCC
 genome-1
 genome-2
 cDNA-1
 cDNA-2

301 CCGGTGCCCTGCCCTAGCCCCACAGTGTGGGATCCCTTGTCCAGAGCCGGGGGGGCTTCTGGCCACCCCATCCCGTCCCATCCCA CCCCCACAGT
 genome-1
 genome-2
 cDNA-1
 cDNA-2

401 GCCCAGCACCCCATCCCAAGGACTGGGAGGCTCCTGGTGCCCATCCAGCCCTCGCTGCCCTGCAAGCTCCTGGTGCCCTGCCAGGCCCCCGGCG
 genome-1
 genome-2
 cDNA-1
 cDNA-2

501 ATCCCCATGGCAGTTGAGACCCCCAGAACCCAGAGGGGCTCCCTGGCTCTTGCCCTCCGCATGGTGCTCAGGCCCCCATCCCGGAGCCAGGGGGCTTCC
 genome-1
 genome-2
 cDNA-1
 cDNA-2

601 CCGCCCCCATCCCATCTCCTTGTCCCCCCCATGGCATTCGGGACCCCATCTGTCCGTGCCATGGGGCTGGGTGCCATCCTAGCCCATGCC
 genome-1
 genome-2
 cDNA-1
 cDNA-2

701 TGGGTGCAGGGGGTCTGCATCATGGCTTTACATGACCCCCCTGAGTGCTGTGGGTCCAGGCA GGCAGGGGGG.CAGCCCTCGTGTGGTGCCTGATCC
 genome-1
 genome-2
 cDNA-1
 cDNA-2

← CLSI_ex2_2033_R
 ← CLSI_in2_2031_R

```

genome-1 701 TGGGTGCAGGGGGTCTGCATCATGGCTTTACATGACCCCCCTGAGTGTGGCTCCAGGAGGACGGGGGG.CAGCCCTCGTGTGGTGCCTCCGATCC
genome-2 701 -----G-----
cDNA-1 108 .....
cDNA-2 108 .....

genome-1 800 CCACAGGCTTACACAGAGTCTGGAGTGAAGGGGTGCTGCCGGGGGTCGGTCCACCTGAAGGCCACGGGTGCGGCAGCCCTCAGCTCCGCTCCCTG
genome-2 801 -----C-----
cDNA-1 106 .....
cDNA-2 106 .....

genome-1 900 GTCGGGTTTCAAGGGCTCACHCGGTGCAGAGAAATGGTGGGCTGTAACTCTGGGGAGGATGGTAGGACCAGGGGGTTTTATCAGGGTGGCCATGATGGGAG
genome-2 901 -----G-----
cDNA-1 106 .....GAT--TAC--GAA--CT--G--
cDNA-2 106 .....GAT--TAC--GAA--CT--G--

genome-1 1000 GGACTTCATCGCCTTCGACATGGACACGATGACGTTCAACCAGGCGGCGACGAGAAATCAACAGGAAAGTGGGAGGACGAGGGTGTCCCTGAG
genome-2 1001 -----A-----
cDNA-1 194 .....T--G--
cDNA-2 194 .....T--G--

genome-1 1100 CGGCAGAAAGAGTACCTGGAGACACCTGGATCGGCTGAGGCTGAGGCTACGGGCAGGCCACCGCTGGAGGAAAAGGTGAGGCGGAGACGG
genome-2 1101 A-TG-----
cDNA-1 284 .....
cDNA-2 294 A-TG-----

genome-1 1200 GGACCCTGGGACCGTCCAGGACCGGTGGGTGCGGGTCTCCTACTGTCAACCCCTCCCAAGACTCCCAATGGTCCGAGTGTCCGGGACGAGGCCCCAC
genome-2 1201 -----
cDNA-1 379 .....
cDNA-2 379 .....

genome-1 1300 GGGACCCCTGACCTGTACTGGCGGTGCTTACGGCTTCTACCCAGCGGCTCAACCAICAGGCTGGCT
genome-2 1301 -----I-----
cDNA-1 417 .....
cDNA-2 417 .....T-----

                                     MHC-IL_R1

```

図 4-2 フンボルトペンギン MHC クラス I 遺伝子のゲノム DNA および cDNA の塩基配列アライメント。
 ペンギン MHC クラス I の cDNA クローニングの塩基配列は、RT-PCR の PCR 産物のクローニングによって得られた。同じプライマー
 セットでゲノム DNA においてもクローニングによって塩基配列が決定された。クローニングの塩基配列は、T7Blue-T ベクタープライ
 マーによって得られた。2つのゲノム配列 (genome-1 および genome-2) と 2つの cDNA 配列 (cDNA-1 および cDNA-2) はアライメ
 ントされた。縦線は、イントロンとエクソンの区切り位置を示す。「-」は genome-1 と一致する塩基を示す。「•」は配列の欠失部
 を示す。

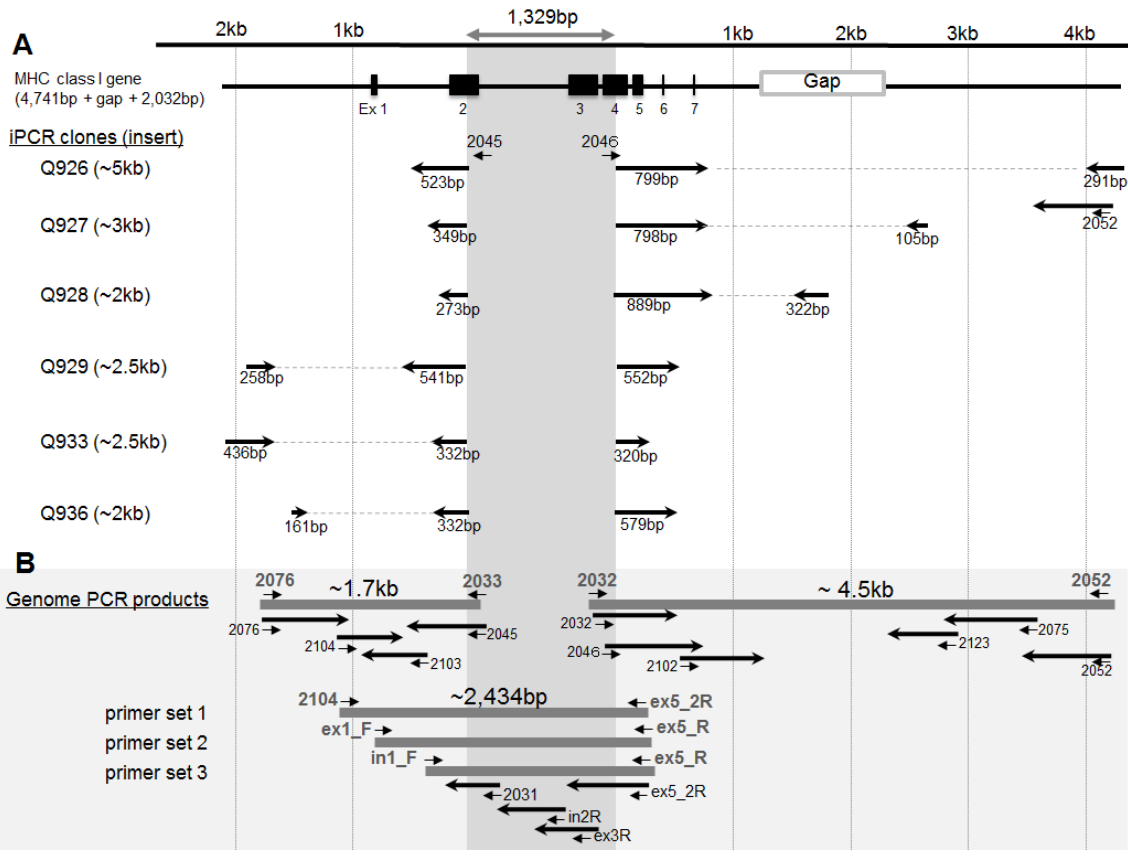


図 4-3 ペンギン MHC クラス I 遺伝子領域の略図。
 A) iPCR の基礎配列 (グレーのボックス) を含むゲノム構造を示した。「Gap」は塩基配列が未決定の領域を示す。「iPCR clones」は iPCR 法で得たクローン ID および塩基配列長に加え、2 種のシーケンスプライマー (2045, 2046) により決定した各クローンの決定塩基配列領域 (矢印) およびその塩基長を示した。
 B) MHC クラス I 遺伝子塩基配列を決定するためのシーケンス戦略を示した。太い矢印は各シーケンスプライマー (小さな矢印で示す) で決定した配列を示した。3 つのプライマーセットは多型解析用に設計した。

GTTAGACTCTAATATACAGTACGGCAAGCAAGCCCATGGCAAGCACAGGAGCTGCCAATTAATAGCTAAACAGCTATAACAGGTATAAATTCGATCTAGCACATTCACATCAA
 ACCTGTATTATCTCGAACCTTCGGGCCCCACGTTGGGCGCCAAAAGGACTGTGTGGTTAACTCAGCTGGCAACTAAGCACCCAGCCGCTCGCTCACTCCCCCCCC
 CAGTTGGATGGGGGAGAAAATCGGAAGGGTAAAAGTGAAGCTGATGCCATATGCTGAGGAATATCCCTTTGGTCTCTGGGGTCACTGTCCCGGCTGTGTCCCTCCCACTT
 CTTGTGCCCCCAGCTGCTCGTGGTGGGGTGGGGTGAAGAAGCAGAAAAGCCCTTGACTCTGTGTGACAGCTGCTCAGCAGTATGAAAAATCTCTGTATTACAATGCTGT
 TTTCCAGCAAAATCCAAACACAGCCCATAGTAGTACTGTGAAGAAAATTAATCTATCCAGCCAAAACAGGACACAGGCAACAAGGGCCACTGGGCTGCGGGACACCTC
 CCAAGCCCGGGGGGGCCCTCACTCCCGGCAATATTTACCCTTTCCAGCTTTTACCATAAAACCGAGGGCGGAGAGCCGGGGTGGGGCGGTGGGGAGAGCT
 GTGGGGTGGCGAACCTGGGTCTCCCCCGGGTGGGCAGGACGCGGGGTCCCGGGTGGCCAGGGGGAAGGGGCAAGACCGGGGCCGGGGGAAAGGGGGGCTGCG
 GCTTGGGGGACAGGGGTGACCCCGCTGGGGGGGACACGGGCAAGTGGGGGCTGGCGGGACTCGGGCCCTGAGGAGGGGGCCGGGGGGGCTGAGGGTGGGC
 TGCACCTGGGGGTCCCGGCCGGGGTACCGGGGGCTGCGGGTCCCGGGGATCCCGGGGTCCCTGTCCCGCCCGCCCGCCCGGCTGCTCCGGCCTTTG
 CTTTCCCTCTCCCACTGCGGAGCCGGATCTGCCCGGCCCGGTGACCTCGAAGCGCTGGGCTGCTTGGCGGGCGGGAGGCGCGGCCAATCGCGGGGAGG
 GGCGGGCTGGAGCGGGCTTGGGCGGGCGAGACTCGCGGGTCCGTCCGGAGCGGAGCGGAGCCAGCAGAGCGGAGGGATGAGGCTGTGCCGGGCTGGG
CTGGGCTGGGCTGGGCTGCTGCTGGGGTCTCGGGGGGGCGGAGCGGTGAGCGGGCGGACCCGGGACCCCTGCACCCCTTTCCCGGGCACCGG
 ACCCCCCCTTAACCCCCCTTATCCCTGCGCACCGCGCCCCCGGACTCTTTCCCGGGCACAGGGACCCCGGACTCCCTTTCCGACACCCCGTCCCCCTC
 CCGGGTAGCAGCACCCCTGAGGTGCCCCCTCCCGGCTCCCGTCCCGGGATCCCGCTGGGCTCTGGACCTCTTTTCGGGAACCGCCCCCCCCCTCAGACCCCC
 TCCCGGCCCTCCCGGGTGTCTTCTTGACACCGGACCCCGCTGGATCCCGGTTCCCGGGACCCCGGGTCCCGACCCCGACAGCCCCCTTTCTTGGACCGG
 GACCCCGGGCTCCCTTCCAGGAACAGGACCCCTGTCTGAGGACCTCGGTCCCAAGATCCCGCCAGTCAATYTCCTGAAGCTGCCCCYSCCCCCCCCC
 CGATGCTCCCTGGAGCTCACCCAGCCCTGCCACCCCGGACCTGGGACCTCACMCCYGTGCCCCCAAGCCCTGCCCCCCACCTCTCAYRCCCCCG
 CGTCCYGCAGGGCCCACTCTTGCATCTCKATGTTGGGKTTCGGAGCCAGCCCGGGGTGCCGAGTTCGTARCCGTGGGCTACGTGGACGGGAAC
GTCATCGCCCGTACGACAGCGAGACGGGGAGGRCRGTGCTGGGGCGGACTGGATGGCAGAAAACCTGGATCAGCAGTACTGgGACAGGCASACCCAGAT
ATSGCAGGGTWTACGACGRTRGWCAAGTGGACCTGGGCACACTCGGGCGCGCTACAACAGAGCGGGGTAAAGGGGGCTGGGTGGGGCTCCGTGGG
 CTGGGCTGGGACTCCGTGGGACAGGAGTCTTCCCTGCCCCCTCCCGCTCAAGATCTGCTGCCCTGCCCTGGCACTGCCCTGCTTGGCGGGCCCTTCCCTGCTGTTG
 CATTATCAGAGGCTCCAGCCACCTGTCCCCAGGCGAGGGGTCCCGGTGCCCTGCTCAGCCACAGKCTTGGATCCCTGTCCAGAGCCGGGGGGGGCTTC
 TGGCCACCCCTCCGTCATCCACCCACAGTGCCAGCACCCCATCCAGGACTGGGAGGCTCTGGCTGCCCATCCAGCTCTCGCTGCTGAGCTCTGGCT
 GCTTCCCGGCCATCCATCCCTGTCCCCCATGGCATTCCGGACCCATYGTGCTGTCCAGGGTGCATGGGGTGGGTGCCATCTAGCCATGCCCTGGGTGC
 AGGGGTCTGCATCTGCTTACATGACCCCTGAGTGTGTGGGCTCCAGGACGAGCGGGGGGACCCCTGCTGCTGGTGGCCGATCCCCAGGCTCACAGAGTGC
 TGGAGTGAAGGCTGCTGCCGGGGTCCGTGCCCACTGAAGGCCAGGGCTCGGCAGCCCTCAGCYCGTCTCCCTGGTGYGTTTCAGGGGCTCACCGGTGAGR
RWATGTACGGCTGRAMMTCYKGGAGGATGGTRGGACAGCGGGTTTATCAGGKGGCTATGATGGGAGGGACTTCATCGCCTTCGACATGGACACGAW
GACRTTACCGCGGCAGWCRYGGSAGCAGAAATACCAAGAGGAAGTGGGAGGACGAGGGTGWSCITGATCAGTGAAGCAGTACCTGGAGAGCACCTGC
ATCGAGTGGCTGAGGAAGTACGTGAGTACGGGACGGCCAGCTGGAGAGGAAAGGTGAGGGCGAGACGGGGACCTGGGACCGTCCAGCACGCTGCTGTGC
 CGGTCTCACTGTACCCCTCCCGAGCTCCCATGGTCCGAGTGTGGGGAGGAGGCCACGGGACCCTGACCTGTACTGCCGTGTAYGGCTTACCC
CACGGCTCATCACCATCAGTGGCTGAAGAACGGCGAGGTGAGGGACAGGAGACCAGCGGGGAGCATGTCGCCAACAGCGACCGCACCTACTATGCC
TGGGCTCCATCGAGGCCCGCCGGAGGATAAGGACAAGTACCCTGCTGGAGCATGCCAGCATGCTTGGCCCGGGCTTTGCGTGGGTGAGGCC
 GGTTGCTTGGGACGTGGAGTGGTGGGCTGGGGTGGTCCCTTCCCTTCTCACAGTCTGCTCTCCCTCAGAGCCGGAGTCCAACCTGTAAACCATGCTGTGGGG
TGGTTGCTGCCATCGTGGCTGTCATCATCATCGCCGGGTTGCGCTTCTGGAAGTACAATTTGGTAAAGCACCGGGCCGGTGAAGCAGAGGGGTGGGGAGG
 AAGGCAGGGCTGGGGCCCATGAGGGGCTGACGGCACGAGCCGCTGTGCTTGGGACGCCCCGAGCTGGCGGTGAAGCGCGGTGGATGCTGATGCTCTTTCTCTGCA
 GAGAAGAAGAAGGGCTACGGCTGGCATCAAGTGAATACCGCGGAGGTGCTGCTCAGCCGCTGCCGGTGGCGGGTGGTCTGTTGGTCCGGTTGTGGCC
 GCTGCCAGATTTCCCAATCCCGTCTCCCTGTGCTGCCCTTTAAAGCCCTGTTGGTGGGAGCTATGGAAGAGTGTGTCTCCCTGTGTTGCTCACGGTGCATGCTC
 CTCTCCAGTGGCTGACGCGGGCGTGGCTCCTGGGCGGGCTCTGGCACGTGACCTGTGCCGTAGCGAGCACGGGGTGGCAGCTCACGGCTGTCTCTCTCGAGGCA
CAGATGGGGAGTCTGGCGGCTGGGCACAGTACGGTGTGGGACAGGGCGGGTGGACRGGGCGGCCAGGTCTCCGTGCTCCCCGTGGGACCCCGAGCCGGAGC
 AACACCAGGCTTGYGGAGGGGTCAACGAGGCCCCAGAGCAGAGATTTGGGACAGGGCCGTGGCGCTGGGTGACAGTCTCTCTCCCGTCCCTGACAGCATCAACGCT
 AACCGCTCCAGAGGACCGGCACGTGGCTGGATGCGGCCCTGCCCTCACCAGGCTGGAGCAGACATGTGCTGGAGGAGGCTGGGAGTGCCTGACAGAGAGCTTGT
 AACTGCGCTGCCACCCCGGCTACGGTGGTGGCTCTTGGCTGGTGAATCYCTATTTCCRATGCTTTAAATTGAGCACCAATATATTGATTTTTTTTGG

図 4-4 iPCR 法によって決定した MHC クラス I 遺伝子の塩基配列。
 エクソン領域を太字で示し、iPCR の基礎配列はアンダーラインで示した。

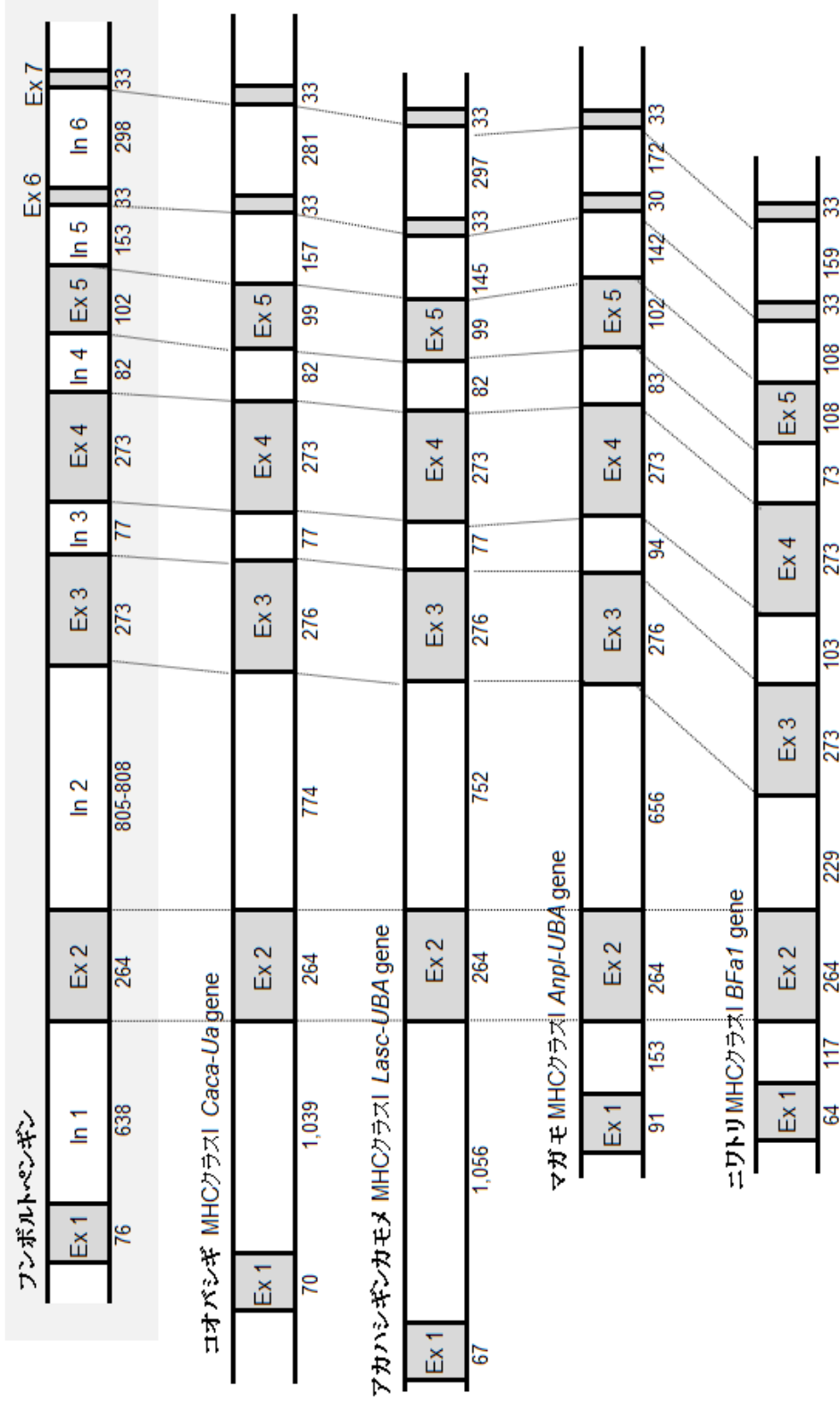


図 4-5 鳥類間の MHC クラス I 遺伝子ゲノム構造の比較。
 Funboletta pennigini の MHC クラス I 遺伝子のゲノム構造を Coccothraupis cacaui (KC205115), Akahashigini kamome (HM008713), Magamo (AY885227) および Nirotori (AL023516) の構造と比較した。

α1 (exon 2) 10 20 30 40 50 60 70 80

ペンギン GPHSLR[FYAVSEPSGVPQFVA[G]YV[GV]GNV[ARIYDSE TGRAVPGADWMAENLD QQYMDRHTQIQGYYQQVGGVLDGLTLRRR[RYNQSG
ニワトリ ELHTRLRY[IQTAMTDPGPGQPFVTVGYVDGELFVHYNST ARRYVPRTEWIAAKAD QQYMDGGTQIQGGNEQIDRENLGIQLRR[RYNQSTG
ヒト GSHSMRY[FFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWI ELEG PEYMDGETRKVKAKHSQTHRVLDLGLR[RYNQSEA
ニジマス VTHSLK[YEYFTASS EVPNFPFV[VGMV]GMVGMVHYDSN SQRMVPRQDWMNKAAETLPQY[WE]SQTGILKGTQQT[KASIDIVKQ[R]FNQSG

α2 (exon 3) 90 100 110 120 130 140 150 160 170

ペンギン GAHTVQRMYG[CNLWED GRTSGFYQVAYDGRD[FIAFMDTKTFTAAVTAAEIT[KR]KWEDE GEPDQW[KQY]LESTCI[E]WLR[K]VSYGQATLERK
ニワトリ GSHTVQMMYGCDILEG GPIRGYYQMA[YGDRDFTAFDKGTMFTAAVPEAVPT[KR]KWEDE SEPERWKNY[LEETC]VEWLR[RY]VEY[GK]AELGRR
ヒト GSHTVQRMYGCDVGS[DW]RFLRGYHQYAYDGGKDYIALKEDLRSWTAADMAAGT[KH]KWEAA HVAEQLRAY[LE]GTCVEWLR[RY]LENGKETLQRT
ニジマス GVHTFQNMYGCEWDDDTGATEGFFQYGDG[EDFLALDLKTKKWIAPTPGAVIT[KH]K[WD]SNTANEERR[KHYL]TQECI[E]WLR[K]YLDYGKSTLMRT

α3 (exon 4) 190 200 210 220 230 240 250 260

ペンギン ELPMVRVSGKEA HGTLTL[CYRAYGFY]PRLITISWLNKNGEVRDQET[ER]GSIYVNSDGTYYAWASIEARPE[KD KYRCRVEHASMLEPGLFA
ニワトリ ERPEVRRVWGKEA DGILTLSCRAHG[FY]PRPIVVS[WLK]DGA[VR]GQDAHSGGIVPNGDGT[YHTW]TIDAQPGDGD KYQCRVEHASLPQPGLYS
ヒト DAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALS[FY]PAEITLTWQRDGEDQTDTEL[VETRPAGDGT]FQKWA[VV]VPSGQEQ RYTCHVQHEGLPKPLTLR
ニジマス VPPSVFLLQKT PTSPV[TC]HATG[FY]PSDYMVS[WQ]KDGQDHHEDVEYGETLPNDDGT[FQ]KSIHLTMTPEDRKNNKYQC[VV]QVKGIKEDFIGV

図 4-6 古典的 MHC クラス I 遺伝子に特徴的なアミノ酸残基。
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重要なアミノ酸残基が種間で共通に保存されている (Aoyagi *et al.* 2002)。ファンボルトペンギンの MHC クラス I 遺伝子のアミノ酸配列 (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。グレーボックスは塩橋サイトや T 細胞と相互作用するサイトを示す。黒枠の四角はペプチド末端と MHC 分子が結合する部位、アスタリスク (*) はドメインの結合に関与するシステイン残基を示した。exon 2 の末端には、N-グリコシル化サイトを確認した。

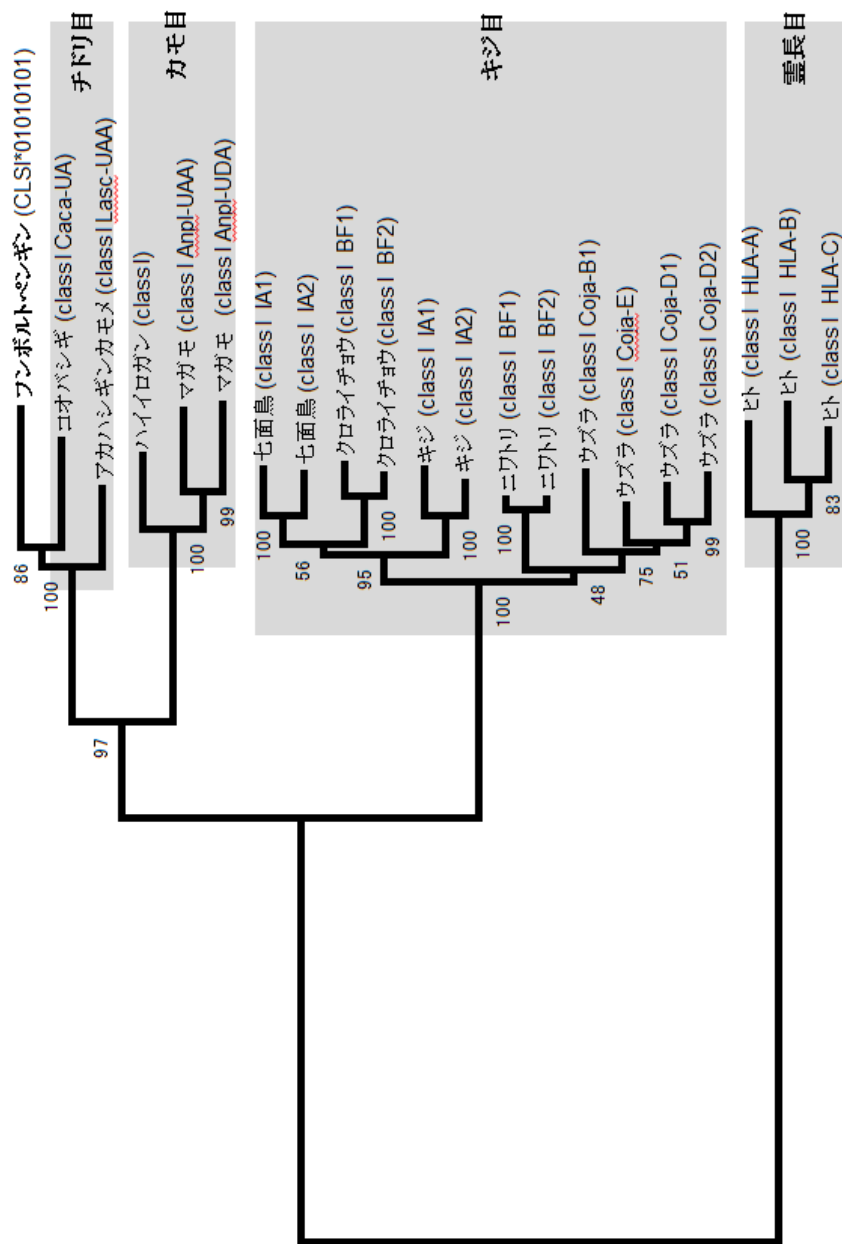


図 4-7 フンボルトペンギンおよび他の動物種 MHC クラス I 遺伝子における系統解析。 exon 1~intron 4 の塩基配列に基づく系統樹 (NJ 法, kimura 2-parameter モデル)。枝上の数字は、ブーツ トラップ値を示す (5000 回反復)。系統比較に用いた既知 MHC クラス I 遺伝子の塩基配列は、GeneBank から得た。配列の詳細は本文に記載した。

	in 1	ex 2	in 2	in 3	ex 4	in 4
CLSI*01010101	ACTCGCTGATATGCCCGAGAGGCCAGTAGGAGCGGATACACCCCAATCCCAGCGATCTCGTCGGTGG*TT					
CLSI*01010102						
CLSI*0201						
CLSI*0202						
CLSI*0203						
CLSI*0204						
CLSI*0205						
CLSI*0301						
CLSI*0302						
CLSI*0303						
CLSI*0304						
CLSI*0401						
CLSI*0402						
CLSI*0501						
CLSI*0601						
CLSI*0602						
CLSI*0701						
CLSI*0702						
CLSI*0801						
CLSI*0901						
CLSI*1001						
CLSI*1101						
CLSI*1201						
CLSI*1301						
CLSI*01010101	GAGATACACCTGGAGTCAGTACCAGAGTATGGAGCCTCCTCCT					
CLSI*01010102						
CLSI*0201						
CLSI*0202						
CLSI*0203						
CLSI*0204						
CLSI*0205						
CLSI*0301						
CLSI*0302						
CLSI*0303						
CLSI*0304						
CLSI*0401						
CLSI*0402						
CLSI*0501						
CLSI*0601						
CLSI*0701						
CLSI*0702						
CLSI*0801						
CLSI*1001						
CLSI*1101						
CLSI*1201						
CLSI*1301						

図 4-8 MHC クラス I 遺伝子アレル間の塩基配列比較。

24 アレルの 5'UTR ~ intron 4 内の多型部位のみを示した。上段の数字は exon 2 の 1 塩基目からカウントした数字である。ハイフン (-) は CLSI*01010101 の塩基配列との同一性を示し、アスタリスク (*) は塩基の欠失部を示す。ブランクは未決定な配列を示す。

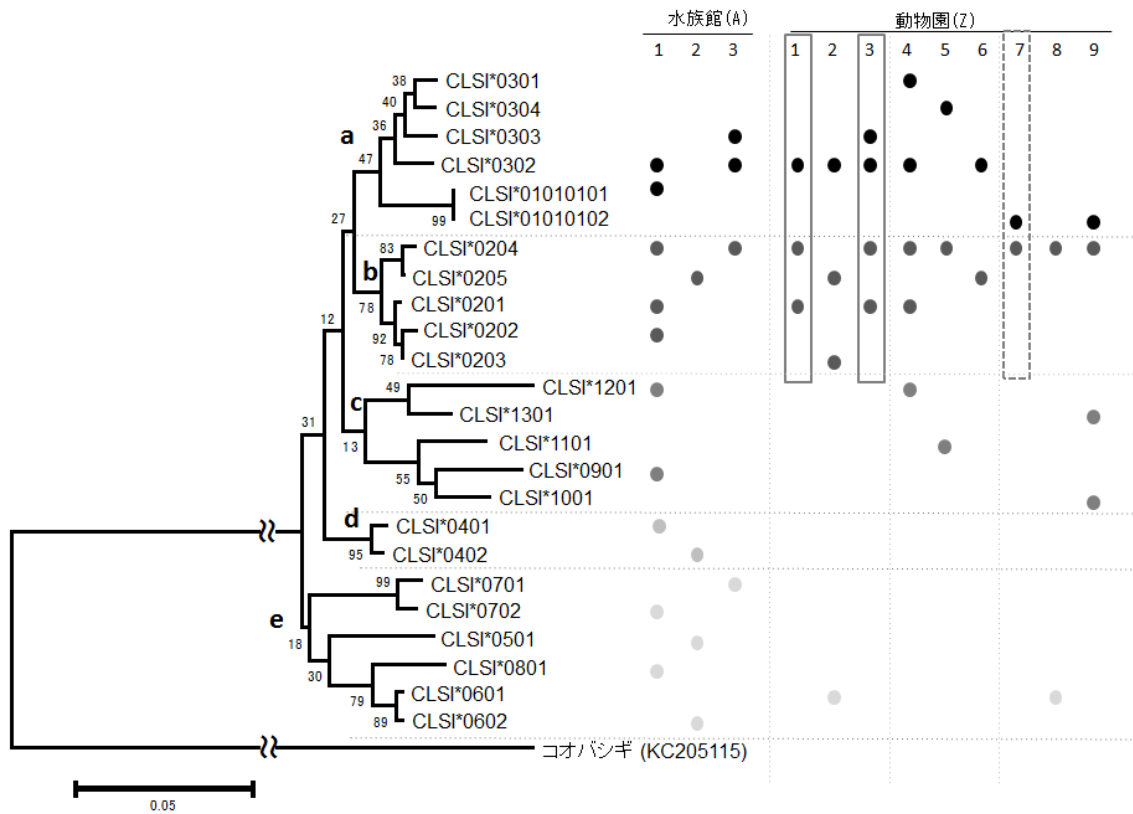


図 4-10 MHC クラス I 遺伝子アレルの系統樹および施設間分布の比較。
 24 アレルのアミノ酸配列に基づく系統樹 (NJ 法, Kimura 2-parameter モデル). 水族館 3 施設および動物園 9 施設ごとのアレル分布を丸印で示した. 動物園 1, 3, 7 の解析集団内では, 遺伝的に近縁なアレルのみ検出された.

第4節 考察

(1) 改良 inverse PCR 法

inverse PCR 法は既知配列に隣接する未知配列を決定する方法として広く活用されている (Tonooka & Fujisima 2009). 従来の iPCR 法としては, 制限酵素を用いた標準的な iPCR 法 (Benkel & Fong 1996; Nolan & Bustin 2013; Stemmer & Morris 1992) やリンカーを線状 DNA に結合後 PCR 増幅を行う方法 (Singh *et al.* 2014; Trinh *et al.* 2012) が知られている. 一方, 本研究で確立した iPCR 法の特徴は, 制限酵素サイトに依存しないため基礎配列を自由に選択できることと, Nested PCR を行うことで高い特異性を持つことである. 信頼性を高めるために Nested PCR を実行したが, 実際には 1 回の PCR で確実に標的領域の解析が可能であることを確認している. 以上のことから, 本 iPCR 法は, 従来の方法と比較して, 融通性と選択性において優れている.

本章において, iPCR 法とそれに続くダイレクトシーケンス法によって, ペンギン MHC クラス I 遺伝子の 7 kb に亘る塩基配列を決定することに成功した. このことから, 本方法が未解明な遺伝子構造を決定する方法として有用であることが証明された.

(2) MHC クラス I 遺伝子のゲノム構造

MHC クラス I 遺伝子は発現の程度に基づいて 3 つのグループ (古典的 MHC クラス I 遺伝子, 非古典的 MHC クラス I 遺伝子および偽遺伝子) に分類される (Hughes & Nei 1989b). 古典的 MHC クラス I 遺伝子は全ての有核細胞に発現し多型性に富むが, 非古典的 MHC クラス I 遺伝子は限られた細胞に発現し多型性に乏しく単型 (monomorphic) の遺伝子も多い. そのため, MHC クラス I 遺伝子の多型解析においては, 古典的 MHC クラス I 遺伝子が主に解析対象とされている (表 1-2, Alcaide *et al.* 2009). 古典的 MHC クラス I 遺伝子の抗原ペプチド結合部位には, 脊椎動物で共通のアミノ酸が保存されている (Aoyagi *et al.* 2002). よって, 解析領域が古典的 MHC クラス I 遺伝子か判断する基準として, ①全有核細胞で発現しているか, ②多型性に富むか, ③共通アミノ酸が保存されているかが挙げられる. 本章で解析した遺伝子は, 全組織における発現は未解析であるが, RT-PCR の結果から肝臓で発現する遺伝子であることが明らかになった. さらに古典的 MHC クラス I 遺伝子に特徴的

なアミノ酸残基が保存されていたことが明らかとなり、高度な多型性も確認した。他の組織における発現を確認する必要はあるが、以上の証拠により本章で決定したフンボルトペンギン配列が古典的 MHC クラス I 遺伝子であることが示唆された。

また、MHC クラス I 分子は 3 つの α ドメインをもつが、古典的 MHC クラス I 分子の抗原特異性は $\alpha 1$ および $\alpha 2$ ドメインのアミノ酸の違いによって決定されるため、これらドメインをコードする exon 2 および exon 3 に多型が豊富に蓄積していることが知られている (猪子ら 2004; Bjorkman *et al.* 1987)。本章において、フンボルトペンギン MHC クラス I 遺伝子の exon 2 および exon 3 を含む領域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において、高度な多型性をもつ遺伝子における最も多型の集中する領域の塩基配列を決定したことにより、ペンギン類の MHC クラス I 遺伝子に基づく多様性解析のための最適な情報が得られたと考える。

(3) MHC クラス I 遺伝子の多様性

MHC 遺伝子は、機能遺伝子の中で最も高度な多様性を示すことで知られている (Bodmer *et al.* 1997; Bollmer *et al.* 2012; de Bakker & Raychaudhuri 2012)。MHC 遺伝子の多型は主に PBR に集中するため、この多型の特徴が各 MHC 分子の提示する抗原性ペプチドのレパートリーの決定に関与していると考えられている (Bjorkman *et al.* 1987)。

本章において、フンボルトペンギン MHC クラス I 遺伝子 exon 2 および exon 3 の塩基配列から算出した ω 値は 2 以上の数値を示し、とりわけ、これらの領域内に位置する PBR では 6 以上の高い数値を示した (表 4-4)。PBR に非同義置換が集中した結果は、抗原提示に直接関与する領域の特徴として知られるように (Hughes & Yeager 1998)、ペンギン MHC クラス I 遺伝子の PBR に相当する領域にも正の選択が作用したことを示唆している。このことは、フンボルトペンギン集団の MHC クラス I 遺伝子において、アミノ酸レベルの多様性保持が有利に働いていることを意味し、他の動物種同様に (Gonzalez-Quevedo *et al.* 2016) フンボルトペンギンにおいても、免疫応答を通じた環境への適応に対して MHC クラス I 分子の多様性が関与している可能性が示唆された。

(4) 飼育下フンボルトペンギン集団における MHC クラス I 遺伝子の多様性評価

ヘテロ接合度による多様性評価では、解析した全個体を1つの集団とした場合は多様性が保持されていたが、施設ごとで評価した場合は1施設で多様性が低いことが示唆された。しかし、解析した10施設中4施設の評価は可能であったが、残り6施設では多様性の高低は判断できなかった。アレル分布の評価では、10施設中4施設でアレル分布の偏りが生じていることが示唆された。アレル間の遺伝的距離の評価では、3施設が姉妹群のアレルのみ保有していたが、姉妹群間で7~13箇所のアミノ酸多型があるため全10施設で多様性は保持されていると考える。

3項目の総合評価では、ヘテロ接合度による評価で多様性が高いと判断した3施設(A01, A03 および Z09)は、アレル分布でも偏りは認められず、両評価は一致した。それに対し、ヘテロ接合度およびアレル分布の両評価ともに多様性が低いと判定した施設は1施設認められた(施設ID: Z07)。ヘテロ接合度が0.4以上であってもアレル分布に偏りが認められた施設が3施設(Z01, Z03, Z04)認められた(表4-5)。また、遺伝的距離の近いアレルのみ検出された3施設(Z01, Z03, Z07)は、アレル分布の偏りが確認された施設でもあった。以上のように、一部飼育下集団においてMHCクラスI遺伝子のアレル分布の偏りによる多様性の低下が生じている可能性が示唆された。第2章のMHCクラスII遺伝子による評価においても同様の結果が得られ、両遺伝マーカーの結果が一致したことから、各施設において限られた家系の個体数増加による多様性の低下が生じている可能性は高いと考える。この現状を容認することは、集団内のMHCクラスIアレルの均一化を促進し、その結果として細胞内に潜伏するウイルスなどを起因とする感染症による死亡率を高める可能性が考えられる。

集団内で頻度の高いMHCクラスIアレルは、過去に流行した感染症に抵抗性をもつなど生息環境に適応した生存に有利なアレルであることが示唆されている(de Campos-Lima *et al.* 1993)。しかし、ヒトや野生生物種のMHC研究において抵抗性アレルは感受性アレルとほぼ同程度観察されることから(Bonneaud *et al.* 2006; Segal & Hill 2003)、ある感染症に対し抵抗性をもつアレルが他の感染症に対し感受性をもつような拮抗的な効果をもつと考えられている(Apanius *et al.* 1997)。そのため、様々な感染症や内因性抗原によるストレスに対して抵抗力をもつ飼育下集団を維持するためには、MHCクラスI遺伝子のアレルバリエーション

ョンを集団内で豊富に保つ必要があると考える。そのためには、ヘテロ接合型の個体を増やすことや、アレル分布の偏りをなくすことに加え、突然変異や遺伝的浮動による多型損失を避けるために遠縁のアレルを施設内で増やす必要がある (Sutton *et al.* 2011)。24 アレル間の遺伝的距離を確認した結果、1 組はアミノ酸配列が完全に一致し (CLSI*01010101 と 01010102)、4 組は 1 アミノ酸が異なるのみであった (CLSI*0203 と 0201 もしくは 0202, 0204 と 0205, 0601 と 0602)。しかし、20 以上のアミノ酸多型をもつアレルも 47 組あったことから、国内集団全体を対象とした遺伝的管理により遠縁のアレルを保有する個体を国内および施設内で増やしていくことは可能であると考えられる。また、MHC 遺伝子は mtDNA と比べても突然変異率が低いことから、集団の MHC 多様性が大幅に減少した後の遺伝的多様性の再構築が遅いと予測されている (O'Brien 1994; Parham & Ohta 1996)。そのため、本研究により多様性が低いと判断した施設においては、さらなる多様性低下が生じる前に早急な対策が必要であると考えられる。

第5節 小括

本研究第2章および第3章においてペンギン類におけるMHCクラスII遺伝子の多型解析を行い、本遺伝子領域における多型解析がペンギン類の保全に有用であることを明らかにした。しかし、種の保全を遺伝的観点から考慮する際には、1種の遺伝子情報では不十分であり、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ことは明らかである。そこで、本章ではペンギン類において未解明なMHCクラスI遺伝子のゲノム構造と多様性を明らかにすることを目的とした。さらに、フンボルトペンギンMHCクラスI遺伝子の多型解析手法の確立と、飼育下フンボルトペンギン集団の多様性評価を試みた。その結果、ペンギン類において未解明であった古典的MHCクラスI遺伝子のゲノム構造および多様性の特徴を世界で初めて明らかにした。また、本領域においてとくに多型性に富んだ領域(exon 2および3)の塩基配列を決定する手法を確立したことで、MHCクラスII遺伝子だけでなくMHCクラスI遺伝子のフンボルトペンギンを対象とした多様性評価が可能となった。これら2種のMHC遺伝子情報は、多型の有無や生存適応能力の評価だけでなく、集団内の遺伝的多様性評価の確実性を高めるために役立つと考える。

本手法を用いた日本国内の飼育下フンボルトペンギン集団における多様性評価において、解析した39個体の結果は、ヘテロ接合度も高く、集団内の遺伝的多様性は保持されていた。しかしながら、施設集団ごとの評価では数施設において多様性の低下が確認された。施設内の数個体による結果ではあるが、MHCクラスII遺伝子を含む2種のMHC遺伝マーカーによる結果が一致したことから、国内の一部施設においてMHCの遺伝的多様性が低下している可能性はきわめて高いと考える。今後、さらなるアレル均一化を避け、アレルバリエーションの豊富な飼育下集団を国内に維持するために、集団内のアレル分布および遺伝的距離に基づくアレル多様化およびヘテロ接合化などの遺伝的管理が必要である。

なお、本章の内容は、Kikkawa *et al.* (2016) の論文をもとに構成した。

第 5 章

ペンギン類 7 種における MHC クラス I 多様性の評価

第1節 はじめに

絶滅の恐れのある野生生物レッドリスト（国際自然保護連合：IUCN）において、アデリーペンギン属ジェンツーペンギン (*Pygoscelis papua*) およびエンペラーペンギン属エンペラーペンギン (*Aptenodytes forsteri*) は、準絶滅危惧 (NT) に指定されており、キガシラペンギン属キガシラペンギン (*Megadyptes antipodes*) は絶滅危惧 II 類 (VU) に指定されている (第3章)。ジェンツーペンギンは、亜南極の島々や南極半島で繁殖し、個体数は 387,000 ペアと見積もられている。個体数は減少傾向にあると言われているが、南部の一地域において増加が確認されている (Lynch *et al.* 2012)。エンペラーペンギンは、現存するペンギン種の中でもっとも大型であり、南極圏の冷たい海域に分布している (Williams 1995, 1999)。総個体数は、595,000 個体と見積もられており、安定した個体数を維持している (Fretwell *et al.* 2012)。しかし、温暖化による海氷の縮小で、次の3世代において急激な個体数減少を引き起こす可能性が報告されている (Ainley *et al.* 2010)。キガシラペンギンは1属1種のニュージーランド固有種であり、総個体数は 5,930~6,970 個体と見積もられている (Moore 1992)。生息環境の悪化やヒトが導入した捕食生物などの影響で、過去40年間で75%の個体数が減少し、ニュージーランド本島部では絶滅の可能性がきわめて高いとされている (King *et al.* 2012; Williams 1995)。

第4章において、フンボルトペンギンの配列情報をもとにMHCクラスI遺伝子の多様性を評価する手法を確立した。本章では、MHCクラスII遺伝子の多様性を明らかにしたフンボルトペンギン属4種 (第3章) および新たなペンギン3種について、MHCクラスI遺伝子の解析手法が適用可能かを検討するとともに、その多様性の特徴を明らかにすることを目的とした。さらに、本遺伝子多型を指標としたペンギン複数種における集団内の多様性評価を試みた。

第2節 材料および方法

2.1 供試検体

ペンギン7種29検体を用いた。内訳は、フンボルトペンギン属フンボルトペンギン (*Spheniscus humboldti*) 5検体 (野生由来5検体)、フンボルトペンギン属マゼランペンギン (*S. magellanicus*) 5検体 (野生3, 飼育2)、フンボルトペンギン属ケーブペンギン (*S. demersus*) 4検体 (飼育4)、フンボルトペンギン属ガラパゴスペンギン (*S. mendiculus*) 4検体 (野生4)、アデリーペンギン属ジェンツーペンギン4検体 (野生2, 飼育2)、エンペラーペンギン属エンペラーペンギン3検体 (飼育3)、キガシラペンギン属キガシラペンギン5検体 (野生5) のゲノムDNAを共同研究者 (謝辞にて感謝の意を表す) から譲り受けた。フンボルトペンギン4検体中3検体は第4章で解析した個体と同一検体である。

2.2 ペンギン7種のMHCクラスI遺伝子における多型解析

フンボルトペンギン属4種, ジェンツーペンギン, エンペラーペンギンおよびキガシラペンギンの7種を対象に, MHCクラスI遺伝子の塩基配列を決定した。得られた情報をもとに, 各種における多型性の特徴を明らかにし, 3項目による多様性評価を試みた。

(1) PCR法によるMHCクラスI遺伝子の増幅

MHCクラスI遺伝子のPCR増幅には, 2種のプライマーセットを用いた。1つは, 前章で設計した exon 2~exon 4 (約1.3 kb) を増幅するプライマーセットで

(MHC-IL_F2/MHC-IL_R1) (表4-1), 一部を除くフンボルトペンギン属 (表5-2) 10検体のゲノムDNAを鋳型に前章と同様の条件でPCR反応を行った (第4章3.2)。もう1つは, DNAの保存状態が万全でない検体があったため, 短い領域を増幅させるプライマーを設計した。標的領域は, MHCクラスI遺伝子内で最も多型性の高い exon 3全体を含む intron 2~exon 4領域 (453 bp) とした。プライマーの塩基配列情報は以下の通りである;

MHCI_in2_2F: 5'-CACAGAGTGCTGGAGTGAGGGGTG-3'および MHCI_ex4_R:

5'-GAAGGAGGCCACGGGACCCTGA-3'. このプライマーを用いて、一部のフンボルトペンギン属 8 検体およびペンギン 3 種（ジェンツーペンギン，エンペラーペンギン，キガシラペンギン）12 検体の PCR 増幅を行った（表 5-2）. PCR 反応液は，前章と同様に調整した（第 4 章 2.2）. PCR 条件は，94°C 3 分間の熱変性後，98°C 10 秒間の熱変性，60°C 5 秒間のアニーリング，72°C 30 秒間の伸長反応を 30 サイクル後，さらに 72°C 3 分間の伸長反応を行った. 得られた PCR 産物は，第 2 章と同様の方法で電気泳動，精製および DNA 濃度を測定した.

(2) クローニング

PCR 産物のライゲーションは，Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR（タカラバイオ株式会社）を用いてマニュアルに従い行った. 得られたライゲーションサンプルは，第 2 章と同様の方法で形質転換および培養を行い，白色コロニーを得た.

(3) コロニーPCR

コロニーPCR は，ベクター配列に特異的なプライマー（T7/SP3）（図 2-1）を用いて以下の条件で行った. PCR 反応液は，5x PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 3.2 μl, 2.5mM dNTPs 1.6 μl, 各 30μM Primer 0.16 μl, PrimeSTAR HS DNA Polymerase（タカラバイオ株式会社）0.3 μl を滅菌水で合計 16 μl に調整した. 8 連 PCR Tube のウェル底に 1 コロニーを少量塗布し，調整した反応液 16 μl を各ウェルに加えた. PCR 条件は，94°C 3 分間の熱変性後，98°C 10 秒間の熱変性，55°C 5 秒間のアニーリング，72°C 1 分間の伸長反応を 30 サイクル後，72°C 3 分間で最終的な伸長反応を行った. 得られた PCR 産物は，第 2 章と同様の方法で電気泳動し，ExoSAP-IT For PCR Product Clean-UP（Affymetrix 社）を用いてマニュアルに従い精製した.

(4) 塩基配列決定および解析

精製した PCR 産物は，第 3 章と同様の方法で塩基配列を決定し，アリルを特定した. シークエンスプライマーは，各産物を増幅した PCR プライマー（MHC-IL_F2/MHC-IL_R1 または MHCI_in2_2F/MHCI_ex4_R）を使用した.

多型解析は解析用ソフトウェア（GENETYX-MAC，株式会社ゼネティクス）を用いて行った。ヘテロ接合度の算出および分子系統樹の作製は，第2章と同様の方法で行った。分子系統樹には，第4章でフンボルトペンギン飼育下集団から得られたアليل情報の一部も使用した。決定した塩基配列情報は，第2章と同様の方法で登録番号を得た。

第3節 結果

3.1 ペンギン7種における MHC クラス I 遺伝子の多型性

ペンギン7種の MHC クラス I 遺伝子塩基配列 (453 bp) を決定した。その結果、フンボルトペンギン5個体から4アリル、マゼランペンギン5個体から9アリル、ケープペンギン4個体から6アリル、ガラパゴスペンギン4個体から1アリル、ジェンツーペンギン4個体から4アリル、エンペラーペンギン3個体から3アリル、キガシラペンギン5個体から3アリルの合計30アリルの塩基配列が得られた (表 5-1 および表 5-2)。フンボルトペンギン野生個体から得られた4アリル中3アリルの塩基配列は、第4章で飼育下集団から得られたアリルと一致した。すなわち Sphu002 配列は CLSI*0204, Sphu004 配列は CLSI*0801, Sphu010 配列は CLSI*0901 と完全に一致し、Sphu005-1 配列は新規アリルであった。

各種内の塩基置換数 (453 bp 中) は、フンボルトペンギン4アリル間の平均が17箇所 (13~21箇所)、マゼランペンギン9アリル間では13.5 (2~27)、ケープペンギン5アリル間は16.6 (3~24)、ジェンツーペンギン4アリル間では13.8 (3~18)、エンペラーペンギン3アリルでは31 (30~32)、キガシラペンギン3アリル間では6.7 (1~10) であった。参考に算出した日本人集団で頻度の高い MHC クラス I 遺伝子 (HLA-A) 7アリル間では13.2 (5~21) であった。

検出した多型のうち数箇所は、各種属に特異的な多型であることが明らかになった (図 5-1)。その数は、フンボルトペンギン属で6箇所、ジェンツーペンギンで1箇所、エンペラーペンギンで5箇所、キガシラペンギンで6箇所確認した。特異的な多型の位置は、フンボルトペンギン属およびジェンツーペンギンではエクソン内で確認したのに対し、キガシラペンギンでは50%、エンペラーペンギンでは100%の多型がイントロン内に認められた。アミノ酸配列比較においても、属に特異的な多型を示すサイト (126番目) を1箇所確認し、このサイトは各属で明確に異なるアミノ酸多型を示した。また、フンボルトペンギン属に特異的なアミノ酸多型を2箇所 (159, 160番目) 確認した。

ヒトにおいて同定されている古典的 MHC クラス I 遺伝子に特徴的なアミノ酸部位を確認した結果 (第4章)、exon 3 領域内に位置する13箇所はペンギン4種で全て保存されていた

が、フンボルトペンギン、マゼランペンギンおよびエンペラーペンギンでは1箇所が多型を確認し、保存されていたアミノ酸部位は12箇所であった。

3.2 ペンギン7種におけるMHCクラスI遺伝子の多様性評価

(1) ヘテロ接合度

ヘテロ接合度は、ガラパゴスペンギンが0.4以下で多様性が低く、マゼランペンギンおよびケープペンギンは、野生および飼育下集団において0.8以上で多様性が高い評価となった(表5-3)。他の4種は0.50~0.67となり、遺伝的多様性の高低は判断できなかった。

(2) アリル分布

各解析集団において、アリルをヘテロ接合型でもつ個体の割合は、マゼランペンギンおよびジェンツーペンギンは100%、フンボルトペンギンは80%、ケープペンギン75%、キガシラペンギン60%、ガラパゴスペンギンおよびエンペラーペンギンは0%であった(表5-2)。マゼランペンギン集団は、1アリルのみ2個体が保有していたが(Spma003)、それ以外は野生および飼育下集団ともに全個体が異なるアリルを保有していた。ジェンツーペンギンは、全個体が同一アリルを保有し(Pypa002)、そのうち野生集団は同一アリルセットを保有していた(Pypa002, Pypa004)。また、ガラパゴスペンギン集団は全個体が同一アリル(Spme001)のホモ接合型であった。エンペラーペンギン集団は全個体が異なるアリルを保有していた。フンボルトペンギン集団ではアリル2種の分布頻度が高く(Sphu004, Sphu002)、5個体中4個体がSphu004アリルを保有していた。ケープペンギン集団では、1アリル(Spda004)が2個体から検出されたが、それ以外のアリルはそれぞれ1個体のみ保有していた。また、キガシラペンギン集団は2種のアリル分布頻度が高く(Mean001, Mean002)、同一のアリルセットをもつ個体が2組認められた(Mean002のホモ接合型:2個体, Mean001, Mean002のヘテロ接合型が2個体)。

(3) アリル間の遺伝距離

各アリルの塩基配列に基づく系統樹を図5-3に示した。ペンギン4属はそれぞれ独立した

分岐群を形成した。フンボルトペンギン属は、大きな1つの分岐群の中で、ペンギン4種のアリルが混在する4つの分岐群に大別された(分岐群 a, b, c, d)。分岐群 a と b は姉妹群を形成した。フンボルトペンギン野生集団が保有する4アリルは3つの分岐群(分岐群 a, b, d)に位置した。姉妹群である分岐群 a と b にそれぞれ属する Sphu005 と Sphu010 アリル間の多型数は17塩基(図 5-1) および9アミノ酸残基(図 5-2)であった。

マゼランペンギン野生集団が保有する6アリルは姉妹群である分岐群 a および b に属し、飼育下集団の4アリルは3つの分岐群に位置した(b, c, d)。分岐群 b に属した野生集団の2アリル(Spma008, Spma009)間のアミノ酸置換は2箇所のみであった。また、飼育下集団の2アリル(Spma002, Spma003)間の差は1アミノ酸のみであった。

ケープペンギン集団の保有する6アリルは、3つの分岐群に位置した(b, c, d)。分岐群 c に属する Spde001 と Spde006 のアミノ酸配列は完全に一致し、2アリル間の塩基多型は intron 2 上の1塩基欠失のみであった。

キガシラペンギン野生集団が保有する3アリルのうち、Mean001 アリルと分岐群内で近縁であった Mean003 アリル間の置換数は1塩基および1アミノ酸のみで、遠縁であった Mean002 アリル間では10塩基および7アミノ酸であった。

ジェンツーペンギンは、1つの大きい分岐群内に2つの分岐群が形成され、野生および飼育下集団のアリルは、それぞれ両分岐群に属した。1つの分岐群に属する2つのアリル(Pypp001 および Pypp002)間の塩基置換数は3箇所あったが全て intron 3 内に位置したため、2アリルのアミノ酸配列は完全に一致した。

p-distance 法により算出した遺伝的距離の平均は、エンペラーペンギンが 0.068, キガシラペンギンが 0.015, 他4種は 0.030~0.037 であった。

表 5-1 ペンギン7種の MHC クラス I アリル情報.

種	アリル名	Accession Number*	解析領域
フンボルトペンギン属 フンボルトペンギン	Sphu005-1	LC015458	1.3 kb
	Spma001	LC015466	1.3 kb
	Spma002	LC015467	1.3 kb
	Spma003	LC015468	1.3 kb
フンボルトペンギン属 マゼランペンギン	Spma004	LC015469	1.3 kb
	Spma005	LC015470	1.3 kb
	Spma006	LC015471	1.3 kb
	Spma007	LC015472	1.3 kb
	Spma008	LC015479	453 bp
	Spma009	LC015480	453 bp
	Spde001	LC015473	1.3 kb
	Spde002	LC015481	453 bp
フンボルトペンギン属 ケープペンギン	Spde003	LC015474	1.3 kb
	Spde004	LC015475	1.3 kb
	Spde005	LC015476	1.3 kb
	Spde006	LC015477	1.3 kb
フンボルトペンギン属 ガラパゴスペンギン	Spme001	LC015478	1.3 kb
	Pypa001	LC015482	453 bp
アデリーペンギン属 ジェンツーペンギン	Pypa002	LC015483	453 bp
	Pypa003	LC015484	453 bp
	Pypa004	LC015485	453 bp
エンペラーペンギン属 エンペラーペンギン	Apfo001	LC015489	453 bp
	Apfo002	LC015490	453 bp
	Apfo003	LC015491	453 bp
キガシラペンギン属 キガラシペンギン	Mean001	LC015486	453 bp
	Mean002	LC015487	453 bp
	Mean003	LC015488	453 bp

* : DDBJ データベース登録番号

表 5-2 各ペンギン個体の MHC クラス I アリル

種	ID	由来	アリル1	アリル2	解析領域
フンボルトペンギン属 フンボルトペンギン	82	野生	Sphu004	Sphu005-1	1.3 kb
	83	野生	Sphu004	-	453 bp
	84	野生	Sphu002	Sphu010	1.3 kb
	85	野生	Sphu002	Sphu004	453 bp
	86	野生	Sphu002	Sphu004	453 bp
フンボルトペンギン属 マゼランペンギン	67	飼育下	Spma001	Spma002	1.3 kb
	68	飼育下	Spma003	Spma004	1.3 kb
	222	野生	Spma005	Spma006	1.3 kb
	223	野生	Spma003	Spma007	1.3 kb
	224	野生	Spma008	Spma009	453 bp
フンボルトペンギン属 ケープペンギン	23	飼育下	Spde001	Spde006	1.3 kb
	24	飼育下	Spde002	-	453 bp
	25	飼育下	Spde003	Spde004	1.3 kb
	27	飼育下	Spde004	Spde005	1.3 kb
フンボルトペンギン属 ガラパゴスペンギン	212	野生	Spme001	-	453 bp
	213	野生	Spme001	-	453 bp
	214	野生	Spme001	-	453 bp
	215	野生	Spme001	-	1.3 kb
アデリーペンギン属 ジェンツーペンギン	8	飼育下	Pypa001	Pypa002	453 bp
	9	飼育下	Pypa002	Pypa003	453 bp
	15	野生	Pypa004	Pypa002	453 bp
	16	野生	Pypa004	Pypa002	453 bp
エンペラーペンギン属 エンペラーペンギン	101	飼育下	Apfo001	-	453 bp
	102	飼育下	Apfo002	-	453 bp
	103	飼育下	Apfo003	-	453 bp
キガシラペンギン属 キガシラペンギン	367	野生	Mean002	-	453 bp
	368	野生	Mean001	Mean002	453 bp
	369	野生	Mean002	-	453 bp
	370	野生	Mean001	Mean002	453 bp
	371	野生	Mean003	Mean001	453 bp

表 5-3 ヘテロ接合度

属	種	遺伝的多様度(ヘテロ接合度)		
		全個体	野生	飼育下
フンボルトペンギン属	フンボルトペンギン		0.64	
	マゼランペンギン	0.88	0.83	0.75
	ケープペンギン	-	-	0.81
	ガラパゴスペンギン	-	0.00	-
キガシラペンギン属	キガシラペンギン	-	0.54	-
アデリーペンギン属	ジェンツーペンギン	0.66	0.50	0.63
エンペラーペンギン属	エンペラーペンギン	-	0.67	-

		exon 3									
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		100	120	140	160						
アンボルト	Sphu002	AHTVQRMVGCN	LWEDGRTSGFYQVAYDGRDFIAFDMDTMTFTAADAAAEITKRKWEDEGVPERKQKYLESTCIEWLRKYVSYGQATLERK								
ペンギン	Sphu004	-D-Y-EIL	-G	-VG	-DQW						
	Sphu005-1	-Y	-G	-L	-E-D-W						
	Sphu010	-Y	-R-S	-M	-G	-QY					
マゼラン	Spma001	-L-E-Y-EIL	-G-S	-K	-VT	-E-R					
ペンギン	Spma002	-Q				-R					
	Spma003	-Y				-R					
	Spma004	-Y	-M	-VG-G	-E						
	Spma005	-Y	-G	-VG	-QY						
	Spma006	-	-G	-L	-D-Y						
	Spma007	-Q		-K	-VT	-D-W				-N	
	Spma008	-Y	-G	-L	-QF						
	Spma009	-Y	-G	-L	-DQW						
カーブ	Spde001	-Y	-R-S	-M	-G	-E-R					
ペンギン	Spde002	-Y	-R-S	-M	-G	-E-L				-MN	
	Spde003	-D-F-EIL	-G	-M	-VG						
	Spde004	-D-Y-EIL	-G	-A	-VK	-D-W				-MN	
	Spde005	-Q		-K	-VT	-R				-MN	
	Spde006	-Y	-R-S	-M	-G	-E-R					
ガラハロス	Spme001	-Y	-G	-T	-K	-VT					
ジエンツ	Pypa001	-L-E-F-E-L	-M	-S	-Q	-AE-D-W					
ペンギン	Pypa002	-L-E-F-E-L	-M	-S	-Q	-AE-D-W					
	Pypa003	-L-Y-Y-E-L	-T	-S	-Q	-R					
	Pypa004	-L-Y-Y-E-L	-A	-T	-Q	-QW				-G	
エンペラー	Apta001	-L-E-Y-DIL	-G	-G	-Q	-GTRA-EL					
ペンギン	Apta002	-L-E-YS-D	-L	-M	-VV	-GA-ADGR-HC				-V	
	Apta003	-L-T-Y-K-L	-G	-M	-KG-Q	-READ					
キガンラ	Mean001	-H-Y-EIL	-A	-R	-Q	-E-DQL					
ペンギン	Mean002	-Y-EIL	-A	-R	-Q	-GTWA-EL					
	Mean003	-Y-EIL	-A	-R	-Q	-E-DQL					

図 5-2 ペンギン MHC クラス I 遺伝子領域のアミノ酸配列比較。
 ペンギン 7 種から得られた 30 アリルの exon 3 塩基配列から推定したアミノ酸配列を示した。ハイフン (-) は Sphu002 のアミノ酸配列との同一性を示す。プラス (+) は古典的 MHC クラス I 遺伝子で保存されているアミノ酸部位を示す (Aoyagi *et al.* 2002)。星印は種に特異的なアミノ酸部位を示す。

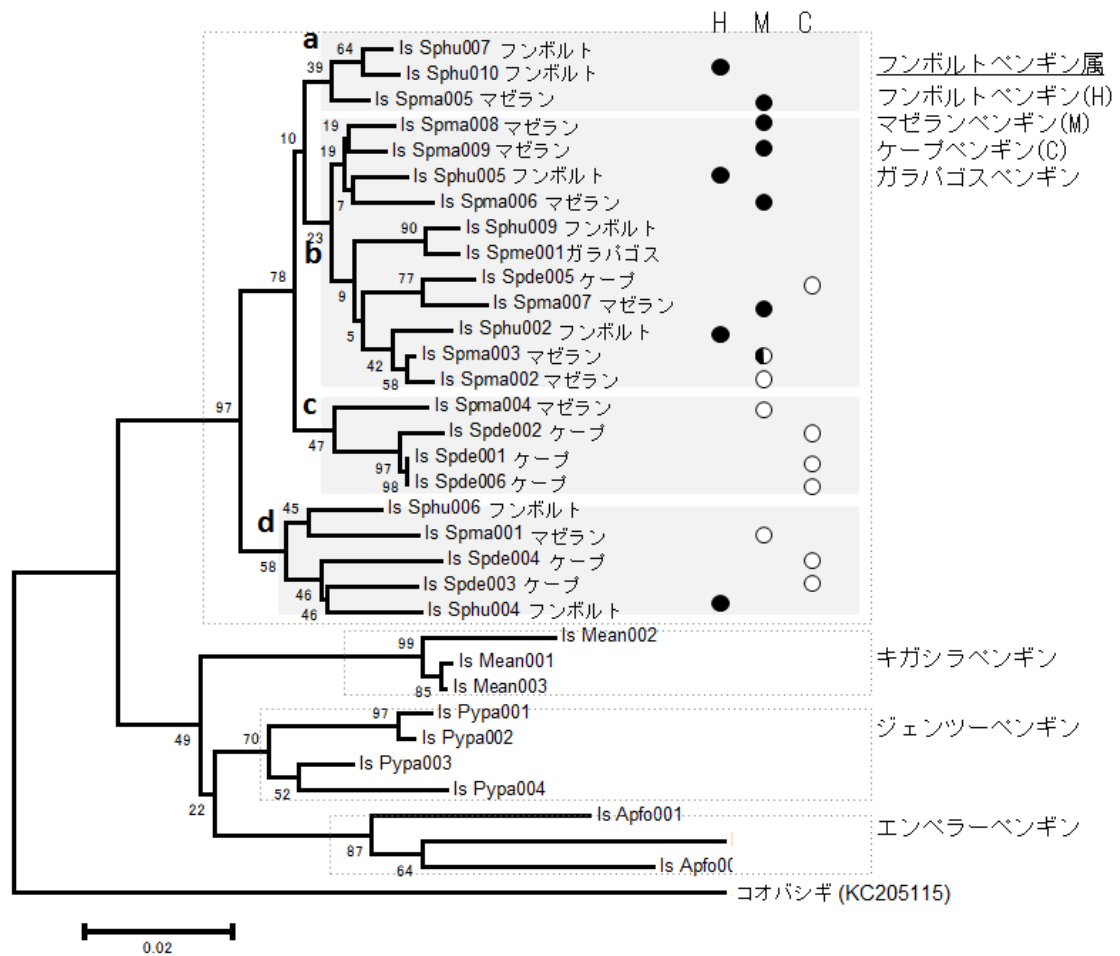


図 5-3 MHC クラス I 遺伝子アリの系統樹と野生および飼育下集団内分布の比較。ペンギン 7 種の解析集団内で確認されたアリの塩基配列に基づく系統樹と集団内のアリ分布を示した。系統樹は近隣接合法 (NJ 法, kimura 2-parameter モデル) で作成した。

第4節 考察

(1) ペンギン7種のMHCクラスI遺伝子の特徴

本論文第4章で決定したフンボルトペンギンのMHCクラスI遺伝子の塩基配列をもとに設計したプライマーを用いて、ペンギン6種の塩基配列を決定することに成功した。また、決定したペンギン6種の塩基配列が古典的MHCクラスI遺伝子であることが明らかになり、とくに多型性に富む領域を解析していることが示唆された。実際に、ガラパゴスペンギンを除く6種に複数の種内多型が認められ、解析領域内に著明な多様性が保持されていることが明らかになった(図5-1)。アミノ酸配列上の種内多型は、ニジマスやヒトで同定されているペプチド結合領域(PBR)にも確認したが(Aoyagi *et al.* 2002; Bjorkman *et al.* 1987)、それ以外の領域にも多数確認された(図5-2)。このことから、ペンギン類のexon 3内に位置するペプチド結合領域がヒトとはわずかに異なることや、ペンギン類においてはexon 3領域に変異が生じやすいことが考えられた。また、検出した多型を比較した結果、属間で明確に異なるアミノ酸部位を検出した。環境適応に関与するとされるMHC遺伝子のコーディング領域内の多型は、生息地域に特有の特徴を示すことが示唆されている

(Gonzalez-Quevedo *et al.* 2016)。exon 3上に各属に特徴的なアミノ酸多型を確認したことで、環境適応に関与する可能性が示唆された(図5-2)。また、属に特有な多型が多数確認されたことや(図5-1)、系統解析で属ごとに分岐群を形成したことから(図5-3)、イントロンを含む塩基配列情報が属もしくは種判別、そして論争の絶えないペンギン類の種分類や系統関係の解明に活用できる可能性が考えられた。

(2) ペンギン7種におけるMHCクラスI遺伝子の多様性評価

3つの評価項目(ヘテロ接合度、アليل分布およびアليل間の遺伝的距離)をもとにペンギン7種のMHCクラスI遺伝子における多様性を評価した結果、多様性が高いと示唆された種はマゼランペンギンおよびケープペンギンで、多様性が低い種はガラパゴスペンギンおよびキガシラペンギンであった。またアليل系統樹において近縁な分岐群を形成したケープペンギンの2アليل間(Spde001とSpde006)、そしてジェンツーペンギンの2アليل間(Pypa001とPypa002)の多型は、それぞれイントロンに位置したためアミノ酸配列は完

全に一致した (図 5-2, 図 5-3). MHC 遺伝子における多型は, 突然変異 (点変異) や組み換えにより生じるとされている (Richman *et al.* 2003; She *et al.* 1991). ジェンツーペンギンの Pypa002 アリルは, 解析した全個体が保有する高頻度なアリルであるのに対し, Pypa001 アリルは 1 個体のみ保有する稀なアリルであった. 以上のことから, Pypa001 アリルは点変異によって Pypa002 アリルから形成されたアリルである可能性が推測された. 近縁な分岐群を形成したキガシラペンギンの Mean001 と Mean003 アリル間は 1 アミノ酸多型のみであるが, その多型は PBR に位置した (図 5-2). このことから, 集団内の稀なアリルである Mean003 アリルが高頻度な Mean001 アリルから形成され, PBR に多型を獲得したことが推測された.

多様性が高いと評価したマゼランペンギンおよびケープペンギンにおいては, ヘテロ接合度で 0.8 以上の数値が得られ (表 5-3), アリル分布も多様であった (表 5-2). 両種ともに近縁アリルが確認されたが, それ以外のアリル間の遺伝的距離は, 解析集団の中でも平均的であった (p-distance: マゼランペンギン 0.030, ケープペンギン 0.037). 3 項目全ての評価で, 2 種は遺伝的多様性が保持されていることが示された. マゼランペンギンは, 気候変動などの要因により減少傾向にあるが, 長く安定した個体数を維持しボトルネックを越えていないと考えられている (Bouzat *et al.* 2009; Pütz *et al.* 2007). 中立マーカー (マイクロサテライトおよびミトコンドリア DNA) による結果でも, マゼランペンギンの野生 9 集団で多様性が保持されていることが明らかにされている (Bouzat *et al.* 2009). 要因としては, 近年の個体数増加や集団間の高い連結性が示唆されている. 本研究の MHC 遺伝子による解析でも, マゼランペンギン野生集団で多数のアリルが得られ, 多様性を認めた. 同時に, 野生集団の保有するアリルの多くが近縁な関係にあることを明らかにした (図 5-3). これまで述べてきたように, 理想的な遺伝的多様性は, 集団内におけるアリルバリエーションの保持, 偏りのないアリル分布, そしてアリル間の遺伝的距離が遠く保たれていることなどが考えられる. そのため, マゼランペンギン野生集団においては近縁アリルのみが集団内に広まらないようにするなどの遺伝的管理が必要であると考えられる. また, 本解析によって, アリル分布や遺伝的距離などの中立的遺伝マーカーでは得られない有益な情報が得られたことから, MHC 遺伝子の保全遺伝学における有用性が示された. さらに, 多様性の有無が不明であったマゼランペンギンの国内飼育下集団においても野生と同等の遺伝的多様性が

保たれていることを初めて明らかにした。飼育下集団における多様性が高いことの要因としては、野生集団から飼育下へ導入された創始個体群の遺伝的多様性がきわめて高かったためと推察される。

本研究において、ケープペンギン飼育下集団においても、多様性を保持していることが明らかになった。しかし、フンボルトペンギンにおいて飼育下集団の多様性は高いが野生集団の多様性が乏しかったように、ケープペンギンにおいても野生集団で多様性が低下している可能性も考えられる。本章において、ケープペンギンを対象とした MHC クラス I 遺伝子の解析が可能となり、複数のアレル情報が得られた。この方法および情報をもとに野生集団の解析を行い、絶滅危惧種に指定されているケープペンギン野生集団においても多様性が保持されているかを調査する必要があると考える。また、ケープペンギンは鳥マラリア感染が報告される種であるが、病原体を標的とした研究が多く、宿主のゲノム DNA 情報は乏しく、保全を目的とした遺伝学的研究は見当たらない (Grim *et al.* 2004)。そのため、感染症と関連のある MHC クラス I 遺伝子の情報は、盛んに行なわれているケープペンギンのマラリア研究への応用が期待できる。

ガラパゴスペンギンは多様性が乏しいと評価したが、1 アレルのみの情報であったため、アレル間における遺伝的距離の評価が不可能であった。野生集団内の 5 個体の結果ではあるが、解析集団内において、単一アレルしか保持していない集団 (単型, monomorphic) である可能性も考えられる。MHC 遺伝子が単型化したチーター集団 (*Acinonyx jubatus jubatus*) において示された致死腹膜炎ウイルスへの 100% 罹病率および 60% 死亡率の様な感染率と高い感受性が、単一 MHC アレルの影響である可能性が報告されている (O'Brien *et al.* 1985, 1994)。そのため、ガラパゴスペンギン集団において MHC クラス I 遺伝子の単型化が生じていた場合、単一 MHC 分子の免疫反応を回避する感染性ウイルスなどによる絶滅のリスクが考えられる。ガラパゴス諸島に生息するガラパゴスペンギンにおいて、近年鳥マラリアに感染した個体が確認されている (Levin *et al.* 2009)。マラリア原虫は、宿主の免疫系に対抗するために抗原を多様化することが報告されているため (Hughes 1991)、MHC クラス I 遺伝子のアレルバリエーションの少ない集団は鳥マラリアに対する抵抗力が低いと考える。さらに、ペンギン類はウイルス感染症に対して重症化しやすく (福井ら 2009)、感受性が高い (naïve) と考えられている (Levin *et al.* 2009)。以上のことから、本章において解析し

た MHC が単型であったガラパゴスペンギン集団においては鳥マラリアを含め新興病原体などを起因とした感染症による絶滅の危険性が高いと考える。

多様性が乏しかったキガシラペンギンは、ガラパゴスペンギン同様に絶滅の危険性が高い種とされている (Williams 1995)。中立マーカー (マイクロサテライト) による解析により、遺伝的多様性の低い集団の存在が報告されている (Boessenkool *et al.* 2009, 2010)。本章の結果でも 80%の個体が共通アリルを保有し、さらに 5 個体中 2 個体が共通アリルをホモ接合型で保有するなど、遺伝的な偏りが生じていることが明らかになった。前述したようにキガシラペンギン集団内で確認した近縁な 2 アリル (Mean001, Mean003) 間の多型は PBR に位置するため、本集団内で異なる種類の病原体ペプチドに対応できる 3 種類の MHC クラス I 分子を発現できる可能性が示唆されたことから、ガラパゴスペンギン集団よりも多様性があると推察した。

高い遺伝的多様性が保たれていたマゼランペンギンと同等の準絶滅危惧種 (NT) に指定されるジェンツーペンギンおよびエンペラーペンギンは、異なる多様性の特徴を示した。ジェンツーペンギンは全個体が同一アリルを保有し (Pypa002)、アリル分布の偏りが確認された (表 5-2)。野生 2 個体と同じアリルセットをもつことから、集団内における遺伝的多様性は乏しいと推察される (表 5-2)。それに対し、エンペラーペンギンは 3 個体全てがホモ接合型で異なるアリルを保有していた (表 5-2)。エンペラーペンギン集団の 3 アリル間の置換数は平均 31 箇所、アリル間の遺伝的距離は解析した種の中で最も遠かった

(*p*-distance 0.068)。各個体が異なるアリルをホモ接合型でもつ不自然な結果は (表 5-2)、きわめて豊富な多型がプライマー領域に影響し、増幅できないアリルがある可能性も否定できない。しかし少ない個体数に対して得られたアリル数は多く、アリル間の遺伝的距離も他の解析した種と比較して大きいことから、エンペラーペンギンにおける MHC 遺伝子上の多様性は高度に保たれていることが示唆された。今回の解析対象は飼育下集団であったため、高い多様性は、野生集団から導入された創始個体の影響であることが考えられる。野生のエンペラーペンギンは、現在準絶滅危惧種 (NT) とされているが、長年レッドリストにおいて絶滅危険度の最も低い軽度懸念 (LC) に指定されていた。以上のことから、未解析なエンペラーペンギン野生集団においても、高い多様性が保持されている可能性があると推察した。

第5節 小括

絶滅危惧種に分類されるペンギン7種 (29 個体) について MHC クラス I 遺伝子領域内できくに多型性の高い exon 3 を中心とした 453 bp の塩基配列を決定し、この解析情報をもとに各ペンギン種における遺伝的多様性の評価を試みた。その結果、本章にて初めてペンギン2種 (エンペラーペンギンおよびキガシラペンギン) における MHC 遺伝子の多様性を明らかにした。また、他4種 (フンボルトペンギン属3種およびジェンツーペンギン) は初めて MHC クラス I 遺伝子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においては、飼育下集団全体では多様性が保たれていたが (第4章)、野生集団ではアレル分布の偏りによる多様性の低下が示唆された。ガラパゴスペンギンを除くペンギン6種の MHC クラス I 遺伝子内の exon 3 および周辺のイントロン領域には、種内多型が豊富に蓄積していることが明らかになった。MHC クラス I アレル情報に基づく多様性評価では、種ごとに異なる特徴を示し、最も多様性が乏しかった種はガラパゴスペンギンで、単型化が生じている可能性が示唆された。感染症との相関が報告される MHC クラス I 遺伝子の多様性低下は病原体への適応の可能性を損なうことが示唆されている (O'Brien *et al.* 1985)。そのため、多様性が低いと評価したキガシラペンギン集団とともに、内因性ウイルスなどが関与する感染症に対する感受性が高いと推測され、アレルバリエーションを増やすなどの遺伝的管理は欠かせないと考える。

本章の解析個体数は少なく、exon 3 を中心とした短い領域を標的としているが、得られた情報は多く、各種で有用な結果が得られた。また、本研究で設計したプライマーがペンギン7種に適用できたことから、未解析のペンギン種に対しても活用できる可能性が考えられた。

本章は、2015年に執筆した論文 (吉川枝里 他, 2015) を参考に構成した。

第6章

総括

個体数減少や生息地の分断化は、集団の孤立化による遺伝的交流の低下や近親交配率の増加による遺伝的均一化を招き、集団内の遺伝的多様性を損失する可能性がある (Ujvari & Belov 2011). 遺伝的多様性の低下は、環境適応能力を減少させ種の存続を脅かす可能性があるため (Allendorf *et al.* 2010; Greig 1979), 個体数が激減しているペンギン集団において遺伝的多様性の維持や評価は不可欠である. また, その際に必要な多様性を評価する遺伝マーカーは, 中立的遺伝子や MHC 遺伝子など複数のマーカーを使用することで確実性を高め, さらに各遺伝子における多様性の特徴を理解する必要がある (Hedrick 2001). そこで, 本研究では, 複数の MHC 遺伝子情報をペンギン類の保全に役立てるために, ペンギン類において未解明な 2 種類の MHC 遺伝子についてゲノム構造を明らかにし, 多型解析手法を確立することを目的とした. さらに, 確立した手法を用いて, ペンギン類の MHC 遺伝子における多様性評価を試みた.

(1) MHC 遺伝子のゲノム構造および多様性の解明

未解明なペンギン MHC 遺伝子構造を明らかにするために, フンボルトペンギン (*Spheniscus humboldti*) を試料として, MHC 領域内に位置するクラス I およびクラス II 遺伝子の塩基配列決定を試みた. その結果, 第 2 章では, ペンギン MHC クラス II DRB 様遺伝子の 5'UTR~intron 3 までの約 1.5 kb の塩基配列を決定した. 第 4 章では, 本研究において確立した改良 inverse PCR 法を活用し, MHC クラス I 遺伝子 exon 1~exon 7 を含む約 7 kb の塩基配列を決定した. 系統解析, 相同性検索および比較解析により, 両遺伝子ともに得られた配列は, MHC 遺伝子の中で最も多型性の高い古典的 MHC 遺伝子であることが示唆された. 実際に, ペンギン類の MHC クラス I およびクラス II 遺伝子上に豊富な種内多型が確認され, その多型のほとんどが非同義置換であることが明らかになった. フンボルトペンギン属 4 種の MHC クラス II 遺伝子 exon 2 においては, 92% もしくは 100% の非同義置換率が示された (表 3-2). ヤマウズラ (*Perdix perdix*) の同一領域においてはおよそ 61% の非同義置換率であることから (Promerova *et al.* 2013), フンボルトペンギン属の非同義置換率がきわめて高いことがわかる. MHC クラス I 遺伝子においても高い非同義置換率が得られていることから (表 4-4), ペンギン類の MHC 遺伝子領域は, 変異が生じやすい可能性が示唆された.

以上により、ペンギン類の MHC 遺伝子領域において、これまでで最長の古典的 MHC クラス II 遺伝子のゲノム構造, および世界初となる古典的 MHC クラス I 遺伝子のゲノム構造 および両遺伝子における多様性の特徴を明らかにすることに成功した.

(2) MHC 遺伝子の多型解析手法の確立

MHC クラス I およびクラス II 遺伝子の多型が豊富な領域を増幅する複数プライマーセットを用いたペンギン類の多様性解析手法を確立することに成功した. MHC クラス II 遺伝子の exon 2~exon 3 領域および MHC クラス I 遺伝子の exon 1~exon 3 領域を解析する手法は, フンボルトペンギン属 4 種に適用可能であることが明らかになった. また, MHC クラス I 遺伝子の exon 3 領域を解析する手法はペンギン 7 種に有用であった.

MHC 領域には相同性の高い遺伝子が複数位置していることから (Kaufman *et al.* 1999; Hess & Edwards 2002), MHC 領域の全容が明らかにされていない種の単一遺伝子を標的とした多型解析手法を確立することは困難とされている (Alcaide *et al.* 2008). いくつかの研究は複数の MHC 遺伝子座を同時に増幅し, MHC クラス I もしくはクラス II の全遺伝子を網羅的に解析する手法を選択している (Westerdahl *et al.* 2005). しかし, 偽遺伝子の増幅を避けるために RNA を使用する必要があることや, 全ての遺伝子を増幅できていない可能性が高く, 万全な方法ではない. また, マルチ遺伝子解析において解析対象の保有する MHC 遺伝子数が不明な場合は, 得られる最低限のアリル数も不明であるため, アリル数を指標とした多様性評価は難しいと考える. それに対し単一遺伝子座が対象の場合は, 得られるアリル数は 1 つもしくは 2 つであるためアリル数による評価は容易である. また, 両方法においてアリル分布の偏りは確認できるが, マルチ遺伝子解析の場合は, 全個体が保有するアリルが多型性の少ない非古典的 MHC 遺伝子由来なのか, 多様性の低下した古典的 MHC 遺伝子由来なのかは判断が困難と考える. そのため, 多くの多様性評価における研究では単一遺伝子を増幅させる手法を確立し活用している (Alcaide *et al.* 2008). 本研究において設計したプライマーが単一遺伝子を増幅しているかを評価した. その結果, (1) cDNA とゲノム DNA の配列が, 2 つのアリル由来の多型を含むエクソン配列において同一であった, (2) MHC クラス I 遺伝子では iPCR で得られた配列が, 同一個体のダイレクトシーケンシングとクローニングにより得られた 2 アリルの結果と矛盾が認められなかった, (3) フンボ

ルトペンギン 39 個体から得られた MHC 遺伝子配列が各個体について 1 つまたは 2 つであった, (4) 異なる位置に設計した複数のプライマーセットから得られた各 PCR 産物の塩基配列が一致した. 以上のことから, 本研究において決定した配列は, 単一の MHC 遺伝子由来である可能性がきわめて高いことが示唆された. しかし, 本章で設計した PCR プライマーで増幅できていないアレルが存在する可能性を否定することはできなかった. そのため, アレル数による多様性評価は慎重に行う必要があるが, アレル分布を評価する上では支障はないと考える.

(3) 飼育下フンボルトペンギン集団における多様性評価

国内飼育下フンボルトペンギンは, 1950 年代に野生や海外から定期的に導入され, 国内の繁殖技術の向上に伴う国内産の個体数増加により, 2007 年には 1,779 個体まで増加した (森角 2009). しかし, これまで遺伝的管理は実施されていなかったことや, フンボルトペンギンの血統台帳においても数世代前の情報はなく, 来歴不明個体が多くを占めるため, 遺伝的多様性の評価が求められている.

国内 10 施設で飼育されるフンボルトペンギン 37 個体について, MHC クラス I およびクラス II 遺伝子の多様性評価を試みた. その結果, 両遺伝子における結果は一致し, 全解析個体を対象とした場合は多様性が保持されていたが, 一部施設ではアレル分布の偏りによる多様性低下が生じている可能性が示唆された. 確認された共通アレルが各施設で異なるため, 多様性低下の要因は施設内集団において繁殖貢献度の高い限られた血縁に属する個体の割合が多い可能性が示唆された. 日本におけるペンギン飼育下繁殖技術は世界でも高い評価を得ているため, 生息域外保全の成功によりフンボルトペンギンの個体数は年々増加している (Williams 1999). しかし, 遺伝的多様性を考慮しない繁殖は, 限られた血統に属する個体の割合を増加させることによる, アレルの均一化やホモ接合化を生じさせる可能性が考えられる. 低下した MHC 遺伝子の多様性を回復するには多くの時を要するとされているため (O'Brien *et al.* 1994; Parham & Ohta 1996), 早急な対応が必要である.

飼育下集団の MHC クラス I 遺伝子とクラス II 遺伝子の評価を比較すると, 3 項目の評価全てにおいて MHC クラス I 遺伝子の方が多様性が高いという結果になった. このことは, 解析したフンボルトペンギン集団の MHC 遺伝子において内因性抗原による選択の影響が

強い可能性や、解析集団がウイルスなどの内因性の抗原に多く暴露されてきた可能性が推察できる。しかし、MHC クラス I は、ヒトにおいても MHC クラス II より多様性が高く（表 2-1）、多型が保持されている領域（クラス I 遺伝子：exon 2, 3, 図 4-8, クラス II 遺伝子：exon 2, 図 2-2）も広範囲である。以上の理由から、ペンギン類においても両遺伝子の多様に元より差がある可能性が考えられた。

飼育下ペンギン類の主な死亡原因として鳥マラリアやアスペルギルス症などの感染症が挙げられる（Ejiri *et al.* 2009; Xavier *et al.* 2007; 津田 2011; 福井ら 2009）。前述したように、MHC 遺伝子は免疫系における病原体の排除に関与し、ウイルスや細胞内寄生物などの内因性抗原に対しては MHC クラス I 遺伝子が、細菌や毒素などの外来抗原に対しては MHC クラス II 遺伝子が働くことが知られている（Kjøglum *et al.* 2006; 猪子ら 2004）。そのため、細胞内寄生物を起因とする鳥マラリアは MHC クラス I 遺伝子との関連報告が多く

（Bonneaud *et al.* 2006; Westerdahl *et al.* 2005）、真菌を原因とし毒素を産生するアスペルギルス症は、MHC クラス II 遺伝子との関連研究が報告されている（Chauhan *et al.* 2000）。そのため、各 MHC クラスの遺伝子における豊富なアレルバリエーションを集団内に保有することで、関連する病原体に対する抵抗力が強化されることが推測される（第 4 章）。また、MHC 遺伝子は環境適応遺伝子であるため、集団内で一般的になったアレルが病原体に対して抵抗性をもつなど生息環境に有利な多型をもつアレルである可能性が示唆されている（de Campos-Lima *et al.* 1993）。そのため、日本国内の飼育下集団において一般化したアレルが環境に適応したアレルである可能性も推察される。しかしながら、適応進化には長い時間軸が必要であること、地理的に近い環境に位置する各施設内における共通アレルが異なることや、多くの施設でアレル分布の偏りが認められることから、施設内で特定のアレルが一般化した要因は環境適応ではなく血縁の偏りによる可能性がきわめて高いと考える。

(4) 複数ペンギン種における遺伝的多様性評価

フンボルトペンギンを含む複数ペンギン種に対して MHC 遺伝子の多様性評価を試みた。MHC クラス II 遺伝子を解析した種は、フンボルトペンギンと同属であるフンボルトペンギン属ケーブペンギン (*S. demersus*)、マゼランペンギン (*S. magellanicus*)、ガラパゴスペンギン (*S. mendiculus*) の 3 種およびフンボルトペンギン野生集団で、本遺伝子領域の exon 1,

2, 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。MHC クラス I 遺伝子を解析したのは、フンボルトペンギン属 4 種、ジェンツーペンギン (*Pygoscelis papua*)、キガンラペンギン (*Megadyptes antipodes*)、エンペラーペンギン (*Aptenodytes forsteri*) の 7 種で、本遺伝子領域の exon 2~exon 4 (1.3 kb) もしくは intron 2~exon 4 (453 bp) の塩基配列を決定した。

フンボルトペンギン属 4 種における 2 種類の MHC 遺伝子の結果は、種間で共有するアレルの存在を明らかにし、系統解析では 4 種が 1 つの分岐群内で混在した (図 3-4, 図 5-3)。この結果は、形態的に別種とされる 4 種が遺伝的にきわめて近縁であることを示唆した。フンボルトペンギン属の飼育下および野生集団では種間雑種が報告されていることから本章の結果が支持され (Simeone *et al.* 2009)、これら近縁種の混合飼育における雑種形成の問題を遺伝子レベルから指摘した。種間の共有アレルの要因としては、祖先集団が保有していたアレルが近年の種分化により未だ各種内に保持され、類似した生息環境下での平衡選択により各種内に保持されたことが推察された。

ペンギン 7 種の MHC 遺伝子における多様性評価の結果、マゼランペンギンが最も多様性が保持されており、高いヘテロ率に加え、全個体が異なるアレルを保有した (表 3-1, 表 5-2)。しかし、野生集団において遺伝的に近いアレルが認められた。マゼランペンギンは、準絶滅危惧種に指定され個体数は減少傾向にあるが、解析した種の中で最も野生における残存個体数が多い種であり、サンプリングしたアルゼンチンのいくつかのコロニーでは急激な個体数の増加が確認されている (Pütz *et al.* 2007)。そのため、遺伝的に近縁なアレルの存在は、近年の急激な個体数増加による突然変異が関与している可能性が示唆された。一方、最も多様性が低いと評価したのはガラパゴスペンギンで、MHC クラス I 遺伝子においては 1 アレル、クラス II 遺伝子においては 2 アレルのみ検出された。ガラパゴスペンギンはガラパゴス諸島エクアドルの固有種で、総個体数は 2,000 羽足らずと見積もられている (Vargas *et al.* 2007) が、生息域外保全は行われていない。病原体認識で重要な役割を演じる MHC 遺伝子の多様性減少は、外来性病原体やウイルス性感染症などへの適応の可能性を減少させることが示唆されているため、絶滅危惧集団の重要な絶滅危険因子の 1 つとなるとされている (Ejsmond & Radwan 2011; Ujvari & Belov 2011)。また、MHC 遺伝子の単型化が感染症に対する感受性に影響を与えることが報告されている (O'Brien *et al.* 1985, 1994) ため、解

析したガラパゴスペンギン集団では、感染症などによる絶滅リスクが高いことが示唆された。そのため、病原体などの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生息域外保全の必要性が示された。ガラパゴスペンギン以外にもフンボルトペンギン野生集団、ジェンツーペンギンおよびキガシラペンギンの3種で、集団内におけるアليل分布の偏りを起因とした遺伝的多様性の低下を確認した（表 5-2）。これら3種の野生集団の個体数は減少傾向にあり、今後の継続的な集団縮小により更なる多様性低下が進行する可能性が考えられる。そのため、MHC 遺伝子の多様性が低下している種に関しては、アليلバリエーションを増加させることで偏りのないアليل分布を集団内に保持するような遺伝的管理が必要である。

また、両 MHC 遺伝子において、各属および種に特有な多型が複数確認された（図 2-2, 図 5-1）。環境適応遺伝子とされる MHC 遺伝子上の種に特有な多型は、種が分岐したのち各種が異なる微生物環境に曝された結果として、生息地域もしくは飼育された地域に適応した多型であると推測できる（Sommer 2005）。そのため、ペンギン類においても他の動物種同様に MHC 遺伝子が環境適応指標となる可能性が示唆された（Bracamonte *et al.* 2015; Cai *et al.* 2015; Hedrick 2001; Sommer 2005）。

飼育下集団と同様に、温暖な地域に生息する野生集団においても鳥マラリアが主な死亡原因となっている（Levin *et al.* 2009; Vanstreels *et al.* 2016）。今回解析したガラパゴスペンギン、ケープペンギンおよびキガシラペンギンの野生集団において鳥マラリアの感染が確認されている（表 6-1）。一方ではヒゲペンギンやジェンツーペンギンのような寒冷地域に生息する種もマラリアに罹患しやすいことが飼育下個体により証明されている（表 6-1）。このことは、温暖化による寒冷地域へのマラリア媒介生物の移入が、寒冷地ペンギン種に感染症被害を与える可能性を示唆している。前述したように感染症と MHC の関連研究は多く、鳥マラリアを含む感染症に対する抵抗性および感受性 MHC アليلの存在が多数報告されていることから（Bonneaud *et al.* 2006; Gonzalez-Quevedo *et al.* 2016; Hill *et al.* 1991; Segal & Hill 2003; Westerdahl *et al.* 2005）、MHC 遺伝子の解析手法および解析情報はペンギン類の生息域内保全においても役立つと考える。また、フンボルトペンギンの塩基配列を基に設計した PCR プライマーがその他のペンギン種にも適用できることが明らかになり、未解析な他のペンギン種にも有用である可能性が示唆された。

(5) MHC 遺伝子情報のペンギン保全における有用性

本研究において、複数種のペンギンに対して有用な MHC 遺伝子の解析手法の確立に成功した。本手法による解析結果は、中立マーカーを用いた同様の研究での結果と一致した (Akst *et al.* 2002; Boessenkool *et al.* 2010)。さらに、本研究論文を参考とした他の研究者による報告により、本解析手法および解析データの多様性評価における有用性が実証された (Bollmer *et al.* 2007; Knafler *et al.* 2012)。以上のことから、中立マーカーとともに MHC 遺伝子の遺伝情報がペンギン集団および個体のより確実な遺伝的多様性の評価を実現するための重要な遺伝マーカーの 1 つになりうることが示唆された。さらに、3 項目による多様性評価を試みたところ、従来広く活用されている遺伝的多様度の評価法 (ヘテロ接合度) よりも MHC 遺伝子解析の方がより詳細な情報を提示できることが示された。集団内におけるアレルバリエーションの保持、偏りのないアレル分布、そしてアレル間の遺伝的距離が遠く保たれているかなどの詳細な多様性評価は、ペンギン類の遺伝的保全において重要な評価基準になることが示唆された。

前述のように、気候変動や生息環境の悪化などにより個体数が激減しているペンギン類において、遺伝的多様性の低下が危惧されている。実際に、本研究結果において飼育下および野生集団において MHC 遺伝子アレル分布の偏りによる遺伝的多様性の低下が確認された。そのため、解析した半数以上の種で生息域内外における遺伝的多様性管理の必要性が示された。遺伝的多様性の減少した小集団に対する多様性の回復手段 (遺伝的救出, genetic rescue) として、「個体の人為的移入」や「連絡通路設置による移住個体の増加」などが有効であるとされている (Edmands 2007; Tallmon *et al.* 2004)。実際に個体の導入が小集団の遺伝的多様性の低下を回復させ、個体数増加に繋がったことが報告されている (Hedrick & Fredrickson 2008; Vilà *et al.* 2003)。絶滅が危惧されたヨーロッパクサリヘビ (*Vipera berus*) 小集団へのオス 20 匹の導入が、個体数増加、MHC 遺伝子の多様性回復、遺伝的変異の誘発および劇的な子孫生存能力の増加へ導いたことが報告された (Madsen *et al.* 1999, 2004)。そのため、ペンギン類においても MHC 遺伝子の多様性を回復させる対策として、小集団への個体もしくは受精卵の人為的移入が有効である可能性が示唆された。ガラパゴスペンギンのように MHC 遺伝子が単型化している可能性のある種に関しては、人為的な遺伝的救出

は手遅れであり、前述したように外敵ストレスから保護するなどの対策のみと考える。そのため、MHC 遺伝子の多様性が乏しいと評価した種においては、多様性が喪失する前に遺伝的管理や多様性回復の対策を実施すべきと考える。

本研究において、これまで未解明であったペンギン MHC 遺伝子の構造を世界で初めて明らかにした。多重遺伝子を保有するとされる MHC 遺伝子領域内から、古典的 MHC クラス I およびクラス II 遺伝子を選択的に増幅するプライマーを用いたペンギン MHC 遺伝的多様性の解析手法を確立した。これら 2 種の遺伝子は、異なる免疫機能を持つが、ウイルス性感染症との相関が示されるクラス I 遺伝子と外界の微生物環境との関連が示唆されるクラス II 遺伝子は、いずれもペンギン類の保全を考える上で重要であると考えられる。そのため、両者の解析手法を確立したことはペンギン類における MHC 遺伝子研究の今後の発展に大きく貢献すると考える。有能で有益な特質をもつ適応性 MHC 遺伝子の情報は、将来の野生および飼育下ペンギンにおける保全活動において役立つと考える。本研究により確立した MHC 遺伝子の多様性解析手法は、その情報を得るために適しており、生息域内外の遺伝的多様性評価や疾患関連研究への寄与が大いに期待できる。さらに本手法は多型が集中する多様な領域を解析標的としており、種ごとに特徴的な多型が確認されたことから、個体識別・親子鑑定・種判別などにも活用できる多機能な手法である。

表 6-1 マラリア原虫を含む住血寄生虫のペンギンにおける感染状況.

属	種	マラリア原虫 Plasmodium	ロイコチトゾオン属 Leucocytozoon	ヘモプロテウス属 Haemoproteus
フンボルトペンギン属	ケープペンギン	W, C, R	R	
	フンボルトペンギン	C		W
	マゼランペンギン	C, R		
	ガラパゴスペンギン	W		W
アデリーペンギン属	アデリーペンギン			
	ヒゲペンギン	C		
	ジェンツーペンギン	C		
コガタペンギン属	コガタペンギン	W, C	C	
	ハネジロペンギン			
エンペラーペンギン属	エンペラーペンギン			
	キングペンギン	C		
マカロニペンギン属	南イワトビペンギン	C		
	北イワトビペンギン	W		
	マカロニペンギン	C	C	
	フィヨルドランドペンギン		W, R	
	スネアーズペンギン	W		
	ロイヤルペンギン			
キガシラペンギン属	キガシラペンギン	W	W	

Vanstreels *et al.* (2016) により報告された表を引用した。「W」は野生ペンギン、「C」は飼育下で感染が確認されたことを意味する。「R」は保護されリハビリ中のペンギンの感染を意味する。

要約

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の変遷（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。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。

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。

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。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。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レ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レルのみが検出された。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 アレ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 のアレルバリエーションを豊富に保ち、遠縁のアレルを施設内で増やすなどの対策が必要であると考えられる。

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レ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レルのみ検出された。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、アレ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られる。

第 6 章：総括

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、飼育下集団に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、アレ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、多様なアレ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 遺伝子アレ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られる。

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 遺伝子のアレ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。

謝 辭

本研究を完遂するまで、終始にわたりご指導を賜りました、日本大学生物資源科学研究部動物資源科学科野生動物学研究室の村田浩一教授に深甚なる謝意を表します。また、本論文内容を学位審査の副査として査読していただき貴重なご意見とご指導を賜った日本大学生物資源科学部動物資源科学科伴侶動物学研究室の甲斐 藏教授、同学部獣医学科魚病学研究室の中西照幸教授、元同学部生命化学科植物栄養生理学研究室の長谷川 功教授に心より御礼申し上げます。さらに、本研究に対して多くの有益な御助言およびご鞭撻を賜りました東京医科歯科大学難治疾患研究所難治病態研究部門分子病態分野の木村彰方教授および同研究室の成瀬妙子先生、日本大学生物資源科学部くらしの生物学科の炭山大輔先生に心より感謝致します。

最後に、本研究を遂行するにあたり多くの御助言を賜りました東海大学医学部基礎医学系分子生命科学の猪子英俊教授、同研究室の田中正史先生、徳島文理大人間生活学部の津田とみ教授に感謝いたします。そして、貴重なペンギン検体を提供していただきました社団法人日本動物園水族館協会生物多様性委員会ペンギン類別調整者であり東京都葛西臨海水族園の福田道雄先生、名古屋港水族館の栗田正徳氏、Swansea 大学 (イギリス) の Dr. Rory P. Wilson, Strasbourg 大学 (フランス) の Dr. Yvon LE MAHO ならびに関係者の皆さまに篤く御礼申し上げますとともに、これまでのご厚意に深く感謝致します。

引用文献

- Aguilar J, Westerdahl H, Puente J, Tomas G, Martinez J, Merino S (2016) MHC-I provides both quantitative resistance and susceptibility to blood parasites in blue tits in the wild. *J. Avian Biol.*, 47(5):669-677. doi:10.1111/jav.00830.
- Ainley D, Russell J, Jenouvrier S, Woehler E, Lyver PO, Fraser WR, Kooyman GL (2010) Antarctic penguin response to habitat change as Earth's troposphere reaches 2 C above preindustrial levels. *Ecol. Monogr.*, 80(1):49-66.
- Akst EP, Boersma PD, Fleischer RC (2002) A comparison of genetic diversity between the Galapagos Penguin and the Magellanic Penguin. *Conserv. Genet.*, 3:375-383.
- Alcaide M, Negro JJ, Serrano D, Tella JL, Rodríguez C (2005) Extrapair paternity in the lesser kestrel *Falco naumanni*: a re-evaluation using microsatellite markers. *Ibis*, 147:608-611.
- Alcaide M, Edwards SV, Negro JJ, Serrano D, Tella JL (2008) Extensive polymorphism and geographical variation at a positively selected MHC class II B gene of the lesser kestrel (*Falco naumanni*). *Mol. Ecol.*, 17:2652-2665.
- Alcaide M, Edwards SV, Cadahía L, Negro JJ (2009) MHC class I genes of birds of prey: isolation, polymorphism and diversifying selection. *Conserv. Genet.*, 10:1349. doi:10.1007/s10592-008-9653-7.
- Allendorf FW, Hohenlohe PA and Luikart G (2010) Genomics and the future of conservation genetics. *Nat. Rev. Genet.*, 11:697-709.
- Aoyagi K, Dijkstra JM, Xia C, Denda I, Ototake M, Hashimoto K, Nakanishi T (2002) Classical MHC class I genes composed of highly divergent sequence lineages share a single locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Immunol.*, 168(1):260-273.
- Apanius V, Penn D, Slev PR, Ruff LR & Potts WK (1997) The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Crit. Rev. Immunol.*, 17:179-224.
- Ariani CV, Pickles RSA, Jordan WC, Lobo-Hajdu G, Rocha CFD (2013) Mitochondrial DNA and microsatellite loci data supporting a management plan for a critically endangered lizard from Brazil. *Conserv. Genet.*, 14(5):943-951.
- Baker AJ, Pereira SL, Haddrath OP, Edge KA (2006) Multiple gene evidence for expansion of extant penguins out of Antarctica due to global cooling. *Proc. Biol. Sci.*, 273:11-17.
- Benkel BF, Fong Y (1996) Long range-inverse PCR (LR-IPCR): extending the useful range of inverse PCR. *Genet. Anal.*, 13:123-127.
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC (1987) The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329: 512-518.

- Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Dupont B, Erlich HA, Fauchet R, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI (1997) Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Tissue Antigens*, 49:297-321.
- Boersma PD (2008) Penguins as marine sentinels. *Bioscience*, 58:597-607.
- Boessenkool S, Star B, Waters JM, Seddon PJ (2009) Multilocus assignment analyses reveal multiple units and rare migration events in the recently expanded yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Mol. Ecol.*, 18(11):2390-2400.
- Boessenkool S, Star B, Seddon PJ, Waters JM (2010) Temporal genetic samples indicate small effective population size of the endangered yellow-eyed penguin. *Conserv. Genet.*, 11:539–546.
- Bollmer JL, Vargas FH, Parker PG (2007) Low MHC variation in the endangered Galapagos penguin (*Spheniscus mendiculus*). *Immunogenetics*, 59:593-602.
- Bollmer JL, Dunn PO, Freeman-Gallant CR, Whittingham LA (2012) Social and extra-pair mating in relation to major histocompatibility complex variation in common yellowthroats. *Proc. Biol. Sci.*, 279: 4778-4785.
- Bonneaud C, Pérez-Tris J, Federici P, Chastel O, Sorci G (2006) Major histocompatibility alleles associated with local resistance to malaria in a passerine. *Evolution*, 60(2):383-389.
- Bouzat JL, Walker BG, Boersma PD (2009) Regional genetic structure in the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) suggests metapopulation dynamics. *Auk*, 126(2):326-334.
- Bracamonte SE, Smith S, Hammer M, Pavey SA, Sunnucks P, Beheregaray LB (2015) Characterization of MHC class IIB for four endangered Australian freshwater fishes obtained from ecologically divergent populations. *Fish Shellfish Immun.*, 46:468-476.
- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*, 364:33-39.
- Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV (2003) The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends Ecol. Evol.*, 18:249-256.
- Cai R, Shafer AB, Laguardia A, Lin Z, Liu S, Hu D (2015) Recombination and selection in the major histocompatibility complex of the endangered forest musk deer (*Moschus berezovskii*). *Sci. Rep.*, 25(5):17285. doi: 10.1038/srep17285.
- Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K, O'Brien SJ (1999) HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science*, 283(5408):1748-1752.

- Chauhan B, Santiago L, Hutcheson PS, Schwartz HJ, Spitznagel E, Castro M, Slavin RG, Bellone CJ (2000) Evidence for the involvement of two different MHC class II regions in susceptibility or protection in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 106(4):723-729.
- Clarke JR & Knowles RK (1993) Diseases and parasites of penguins. *Korean J. Palar Res.*, 4(2):79-96.
- Clarke JA, Ksepka DT, Stucchi M, Urbina M, Giannini N, Bertelli S, Narváez Y, Boyd CA (2007) Paleogene equatorial penguins challenge the proposed relationship between biogeography, diversity, and Cenozoic climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(28):11545-11550.
- Cloutier A, Mills JA, Baker AJ (2011) Characterization and locus-specific typing of MHC class I genes in the red-billed gull (*Larus scopulinus*) provides evidence for major, minor, and nonclassical loci. *Immunogenetics*, 63(6):377-394. doi:10.1007/s00251-011-0516-x.
- Crawford RJM, Altwegg R, Barham BJ, Barham PJ, Durant JM, Dyer BM, Makhado AB, Pichegru L, Ryan PG, Underhill LG, Upfold L, Visagie J, Waller LJ, Whittington PA (2011) Collapse of South Africa's penguins in the early 21st century. *Afr. J. Mar. Sci.*, 33:139–156.
- Cutrer AP, Lacey EA (2007) Trans-species polymorphism and evidence of selection on class II MHC loci in tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Immunogenetics*, 59:937-948.
- de Bakker P, Raychaudhuri S (2012) Interrogating the major histocompatibility complex with high-throughput genomics. *Hum. Mol. Genet.*, 21: R29-36.
- de Campos-Lima PO, Gavioli R, Zhang QJ, Wallace LE, Dolcetti R, Rowe M, Rickinson AB, Masucci MG (1993) HLA-A11 epitope loss isolates of Epstein-Barr virus from a highly A11+ population. *Science*, 260(5104):98-100.
- Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M (2005) Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102:7922-7927.
- Doxiadis GG, Rouweler AJ, de Groot NG, Louwse A, Otting N, Verschoor EJ, Bontrop RE (2006) Extensive sharing of MHC class II alleles between rhesus and cynomolgus macaques. *Immunogenetics*, 58:259-268.
- Edmands S (2007) Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Mol. Ecol.*, 16(3):463-475.
- Edwards SV, Hedrick PW (1998a) Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. *Trends Ecol. Evol.*, 13:305-311.
- Eimes JA, Bollmer JL, Whittingham LA, Johnson JA, VAN Oosterhout C, Dunn PO (2011) Rapid

- loss of MHC class II variation in a bottlenecked population is explained by drift and loss of copy number variation. *J. Evol. Biol.*, 24: 1847-1856.
- Ejiri H, Sato Y, Sawai R, Sasaki E, Matsumoto R, Ueda M, Higa Y, Tsuda Y, Omori S, Murata K, Yukawa M (2009) Prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at a zoological garden in Japan. *Parasitol. Res.*, 105(3):629-633.
- Ejmond MJ, Radwan J (2011) MHC diversity in bottlenecked populations: a simulation model. *Conserv. Genet.*, 12:129-137.
- Ekblom R, Saether SA, Jacobsson P, Fiske P, Sahlman T, Grahn M, Kalas JA, Hoglund J (2007) Spatial pattern of MHC class II variation in the great snipe (*Gallinago media*). *Mol. Ecol.*, 16:1439-1451.
- Fredsted T, Pertoldi C, Schierup MH, Kappeler PM (2005) Microsatellite analyses reveal fine-scale genetic structure in grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*). *Mol. Ecol.*, 14:2363-2372.
- Fretwell PT, Larue MA, Morin P, Kooyman GL, Wienecke B, Ratcliffe N, Fox AJ, Fleming AH, Porter C, Trathan PN (2012) An emperor penguin population estimate: the first global, synoptic survey of a species from space. *PLoS ONE*, 7(4):e33751. doi: 10.1371/journal.pone.0033751.
- Godoy JA, Negro JJ, Hiraldo F, Donazar JA (2004) Phylogeography, genetic structure and diversity in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*, L.) as revealed by mitochondrial DNA. *Mol. Ecol.*, 13:371-390.
- Gonzalez-Quevedo C, Davies RG, Phillips KP, Spurgin LG, Richardson DS (2016) Landscape scale variation in an anthropogenic factor shapes immune gene variation within a wild population. *Mol. Ecol. Online Version*.
- Greig JC (1979) Principles of genetic conservation in relation to wildlife management in Southern Africa. *S. Afr. J. Wildl. Res.*, 9:57-78.
- Grim KC, McCutchan T, Li J, Sullivan M, Graczyk TK, McConkey G, Cranfield M (2004) Preliminary results of an anticircumsporozoite DNA vaccine trial for protection against avian malaria in captive African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *J. Zoo. Wildl. Med.*, 35:154-161.
- Hawley DM, Fleischer RC (2012) Contrasting epidemic histories reveal pathogen-mediated balancing selection on class II MHC diversity in a wild songbird. *PLoS ONE*, 7: e30222.
- Hedrick PW (2001) Conservation genetics: Where are we now? *Trends. Ecol. Evol.*, 16:629-636.
- Hedrick PW, Lee RN, Garrigan D (2002) Blackwell Science, Ltd Major histocompatibility complex variation in red wolves: evidence for common ancestry with coyotes and balancing selection. *Mol. Ecol.*, 11:1905-1913.

- Hedrick PW, Fredrickson R (2008) Captive breeding and the reintroduction of Mexican and red wolves. *Mol. Ecol.*, 17(1):344–350. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03400.x.
- Hess CM, Edwards SV (2002) The Evolution of the Major Histocompatibility Complex in Birds. *BioScience*, 52(5):423-431.
- Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM (1991) Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, 352(6336):595-600.
- Hosomichi K, Shiina T, Suzuki S, Tanaka M, Shimizu S, Iwamoto S, Hara H, Yoshida Y, Kulski JK, Inoko H, Hanzawa K (2006) The major histocompatibility complex (MHC) class IIB region has greater genomic structural flexibility and diversity in the quail than the chicken. *BMC Genomics*, 7:322.
- Hughes AL, Nei M (1988) Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*, 352:167-170.
- Hughes AL, Nei M (1989a) Nucleotide substitutions at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:958-962.
- Hughes AL, Nei M (1989b) Evolution of the major histocompatibility complex: independent origin of nonclassical class I genes in different groups of mammals. *Mol. Biol. Evol.*, 6:559-579, Review.
- Hughes AL (1991) Circumsporozoite protein genes of malaria parasites (*Plasmodium spp.*): evidence for positive selection on immunogenic regions. *Genetics*, 127(2):345-353.
- Hughes AL, Yeager M (1998) Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annu. Rev. Genet.*, 32:415-435.
- Inoko H, Ando A, Ito M, Tsuji K (1986) Southern hybridization analysis of DNA polymorphism in the HLA-D region. *Hum. Immunol.*, 16:304-313.
- Jouventin P (ed) (1982) Visual and vocal signals in penguins, their evolution and adaptive characters. Parey, Berlin. *Fortschritte der Verhaltensforschung*, Vol 24, 148.
- Kaiser P, Underwood G, Davison F (2003) Differential cytokine responses following Marek's disease virus infection of chickens differing in resistance to Marek's disease. *J. Virol.*, 77(1):762-768.
- Kaufman J, Milne S, Gobel TWF, Walker BA, Jacob JP, Auffray C, Zoorob R, Beck S (1999) The chicken B locus in a minimalessential major histocompatibility complex. *Nature*, 401:923-925.
- Kenter M, Otting N, Anholts J, Leunissen J, Jonker M, Bontrop RE (1992) Evolutionary relationships among the primate MHC-DQA1 and DQA2 alleles. *Immunogenetics*, 36:71-78.

- Kikkawa EF, Tsuda TT, Naruse TK, Sumiyama D, Fukuda M, Kurita M, Murata K, Wilson RP, LeMaho Y, Tsuda M, Kulski JK, Inoko H (2005) Analysis of the sequence variations in the MHC DRB1-like gene of the endangered Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*). *Immunogenetics*, 57:99-107.
- Kikkawa EF, Tsuda TT, Sumiyama D, Naruse TK, Fukuda M, Kurita M, Wilson RP, LeMaho Y, Miller GD, Tsuda M, Murata K, Kulski JK, Inoko H (2009) Trans-species polymorphism of the Mhc class II DRB-like gene in banded penguins (*genus Spheniscus*). *Immunogenetics*, 61: 341-352.
- Kikkawa E, Tanaka M, Naruse TK, Tsuda TT, Tsuda M, Murata K, Kimura A (2016) Diversity of MHC class I alleles in *Spheniscus humboldti*. *Immunogenetics*, doi:10.1007/s00251-016-0951-9.
- Kimura M (1977) Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution. *Nature*, 267:275–276.
- King SD, Harper GA, Wright JB, McInnes JC, van der Lubbe JE, Dobbins ML, Murray SJ (2012) Site-specific reproductive failure and decline of a population of the Endangered yellow-eyed penguin: a case for foraging habitat quality. *Mar. Ecol.*, 467:233-244.
- Kjøglum S, Larsen S, Bakke HG, Grimholt U (2006) How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.*, 21(4):431-441.
- Klein J (1986) Natural history of the histocompatibility complex. Wiley, New York.
- Klein J (1987) Origin of the major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis. *Hum. Immunol.*, 19:155-162.
- Knafler GJ, Clark JA, Boersma PD, Bouzat JL (2012) MHC diversity and mate choice in the magellanic penguin, *Spheniscus magellanicus*. *J. Hered.*, 103(6):759-768.
- Kobayashi KS, van den Elsen PJ (2012) NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2012 Dec;12(12):813-820.
- Kulski JK, Shiina T, Anzai T, Kohara S, Inoko H (2002) Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. *Immunol. Rev.*, 190:95-122.
- Lambert DM, Ritchie PA, Millar CD, Holland B, Drummond AJ, Baroni C (2002) Rates of evolution in ancient DNA from Adelie penguins. *Science*, 295:2273-2279.
- Levin II, Outlaw DC, Vargas FH, Parker PG (2009) Plasmodium blood parasite found in endangered Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). *J. Parasitol.*, 142(12):3191-3195.

- Lowe A, Harris S, Ashton P (2004) Ecological genetics: design, analysis, and application. Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd.
- Lynch HJ, Naveen R, Trathan PN, Fagan WF (2012) Spatially integrated assessment reveals widespread changes in penguin populations on the Antarctic Peninsula. *Ecology*, 93(6):1367-1377.
- Madsen T, Shine R, Olsson M & Wittzell H (1999) Conservation biology: Restoration of an inbred adder population. *Nature*, 402:34-35. doi:10.1038/46941.
- Madsen T, Ujvari B, Olsson M (2004) Novel genes continue to enhance population growth in adders (*Vipera berus*). *Biol. Conserv.*, 120:145-147.
- Marsh SGE, Parham P, Barber LD (2000) The HLA factsbook. Academic, San Diego.
- Martínez-Cruz B, Godoy JA, Negro JJ (2004) Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Mol. Ecol.*, 13:2243-2255.
- McCarthy EM (2006) Handbook of avian hybrids of the world. Oxford University US Press, Oxford, pp 194-195.
- Meyer-Lucht Y, Otten C, Püttker T, Sommer S (2008) Selection, diversity and evolutionary patterns of the MHC class II DAB in free-ranging Neotropical marsupials. *BMC Genet.*, 9:39.
- Mills K, Vargas H (1997) Current status, analysis of census methodology, and conservation of the Galapagos Penguin (*Spheniscus mendiculus*). *Noticias de Galapagos*, 58:8-15.
- Moore PJ (1992) Population estimates of yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*) on Campbell and Auckland Islands 1987–90. *Notornis*, 39:1-15.
- Moreno-Santillán DD, Lacey EA2, Gendron D3, Ortega J (2016) Genetic Variation at Exon 2 of the MHC Class II DQB Locus in Blue Whale (*Balaenoptera musculus*) from the Gulf of California. *Public Library of Science one* 11(1):e0141296. doi: 10.1371/journal.pone.0141296.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70(12):3321-3323.
- Nei M, Gojobori T (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions, *Mol. Biol. Evol.*, 3: 418-426.
- Nolan T, Bustin SA (2013) PCR Technology: Current Innovations, Third Edition. In: Cotesman *et al.* (eds) *Chromosome Walking by inverse PCR*, pp 299-305.
- O'Brien SJ, Roelke ME, Marker L, Newman A, Winkler CA, Meltzer D, Colly L, Evermann JF, Bush M, Wildt DE (1985) Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science*, 227(4693):1428-1434.
- O'Brien SJ (1994) A role for molecular genetics in biological conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U.S.A., 91(13):5748-5755.
- Otting N, de Groot NG, Doxiadis GG, Bontrop RE (2002) Extensive MHC-DQB variation in humans and non-human primate species. *Immunogenetics*, 54:230-239.
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.*, 4:347-354.
- Paredes R, Zavalaga CB, Battistini G, Majluf P, McGill P (2003) Status of the Humboldt Penguin in Peru, 1999-2000. *Waterbirds*, 26(2):129-138.
- Parham P, Ohta T (1996) Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science*, 272(5258):67-74.
- Penn DJ, Damjanovich K, Potts WK (2002) MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:11260-11264.
- Promerova M, Kralova T, Bryjova A, Albrecht T, Bryja J (2013) MHC class IIB exon 2 polymorphism in the Grey partridge (*Perdix perdix*) is shaped by selection, recombination and gene conversion. *PLoS ONE*, 23:8.
- Pütz K, Schiavini A, Rey AR, Lüthi BH (2007) Winter migration of magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) from the southernmost distributional range. *Mar. Biol.*, 152:1227-1235.
- Radwan J, Kawalko A, Wojcik JM, Babik W (2007) MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*. *Mol. Ecol.*, 16:531-540.
- Radwan J, Biedrzycka A, Babik W (2010) Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? *Biol. Conserv.*, 143(3):537-544.
- Richman AD, Herrera LG, Nash D, Schierup MH (2003) Relative roles of mutation and recombination in generating allelic polymorphism at an MHC class II locus in *Peromyscus maniculatus*. *Genet Res*, 82(2):89-99.
- Ritchie PA, Lambert DM (2000) A repeat complex in the mitochondrial control region of Adélie penguins from Antarctica. *Genome*, 43:613-618.
- Rocha EP, Smith JM, Hurst LD, Holden MT, Cooper JE, Smith NH, Feil EJ (2006) Comparisons of dN/dS are time dependent for closely related bacterial genomes. *J. Theor. Biol.*, 239:226-235.
- Ropert-Coudert Y, Kato A, Meyer X, Pellé M, MacIntosh AJJ, Angelier F, Chastel O, Widmann M, Arthur B, Raymond B and Raclot T (2015) A complete breeding failure in an Adélie penguin colony correlates with unusual and extreme environmental events. *Ecography*, 38:111-113.
- Segal S, Hill AVS (2003) Genetic susceptibility to infectious disease. *Trends Microbiol.*, 11:445-448.
- She JX, Boehme SA, Wang TW, Bonhomme F, Wakeland EK (1991) Amplification of major

- histocompatibility complex class II gene diversity by intraexonic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88(2):453-457.
- Shiina T, Inoko T, Kulski JK (2004a) An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens*, 64:631-649.
- Shiina T, Shimizu S, Hosomichi K, Kohara S, Watanabe S, Hanzawa K, Beck S, Kulski JK, Inoko H (2004b) Comparative genomic analysis of two avian (quail and chicken) MHC regions. *J. Immunol.*, 172:6751-6763.
- Shimizu S, Shiina T, Hosomichi K, Takahashi S, Koyama T, Onodera T, Kulski JK, Inoko H (2004) MHC class IIB gene sequences and expression in quails (*Coturnix japonica*) selected for high and low antibody responses. *Immunogenetics*, 56:280-291.
- Simeone A, Hiriart-Bertrand L, Reyes R, Halpern M, Dubach J, Wallace R, Pütz K and Lüthi B (2009) Heterospecific Pairing and Hybridization between Wild Humboldt and Magellanic Penguins in Southern Chil. *The Condor*, 111(3):544-550.
- Singh S, Shih SJ, Vaughan AT (2014) Detection of DNA double-strand breaks and chromosome translocations using ligation-mediated PCR and inverse PCR. *Methods Mol. Biol.*, 1105:399-415.
- Slate J, Kruuk LEB, Marshall TC, Pemberton JM, Clutton-Brock TH (2000) Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Proc. Biol. Sci.*, 267:1657-1662.
- Sommer S (2005) The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Front. Zool.*, 2:16. doi:10.1186/1742-9994-2-16.
- Stemmer WP, Morris SK (1992) Enzymatic inverse PCR: a restriction site independent, single-fragment method for high-efficiency, site-directed mutagenesis. *BioTechniques*, 13:214-220.
- Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1994) Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, 368:215-221.
- Stoskopf MK, Beier J (1979) Avian malaria in African black-footed penguins. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 175(9):944-947.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends. Ecol. Evol.*, 15:199-203.
- Sutton JT, Nakagawa S, Robertson BC, Jamieson IG (2011) Disentangling the roles of natural selection and genetic drift in shaping variation at MHC immunity genes. *Mol. Ecol.*,

20:4408-4420.

- Takahata N (1993) Relaxed natural selection in human populations during the Pleistocene. *Jpn. J. Genet.*, 68:539-547.
- Tallmon DA, Luikart G, Waples RS (2004) The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends Ecol. Evol.*, 19(9):489-496.
- The MHC Sequencing Consortium (1999) Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401:921-923.
- The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/>. IUCN ver. 3.1. Thumser NM, Karron JD (1994) Patterns of genetic polymorphism in five species of penguin. *Auk*, 111:1018-1022.
- Tonooka Y, Fujishima M (2009) Comparison and critical evaluation of PCR-mediated methods to walk along the sequence of genomic DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85:37-43.
- Trathan PN, García-Borboroglu P, Boersma D, Bost C-A, Crawford RJM, Crossin GT, Cuthbert RJ, Dann P, Davis LS, De La Puente S, Ellenerg U, Lynch HJ, Mattern T, Pütz K, Seddon PJ, Trivelpiece W, Wienecke B (2015) Pollution, habitat loss, fishing, and climate change as critical threats to penguins. *Conserv. Biol.*, 29(1):31-41.
- Trinh Q, Xu W, Shi H, Luo Y, Huang K (2012) An A-T linker adapter polymerase chain reaction method for chromosome walking without restriction site cloning bias. *Anal. Biochem.*, 425:62-67.
- Tsuda TT, Tsuda M, Naruse T, Kawata H, Ando A, Shiina T, Fukuda M, Kurita M, LeMaho I, Kulski JK, Inoko H (2001) Phylogenetic analysis of penguin (Spheniscidae) species based on sequence variation in MHC class II gene. *Immunogenetics*, 53:712-716.
- Ujvari B, Belov K (2011) Major Histocompatibility Complex (MHC) markers in conservation biology. *Int. J. Mol. Sci.*, 12(8):5168-5186. doi:10.3390/ijms12085168.
- Van Tuinen M, Butvill DB, Kirsch JA, Hedges SB (2001) Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 268:1345-1350.
- Vanstreels RET, Braga EM, Catão-Dias JL (2016) Blood parasites of penguins: a critical review. *Parasitology*, 143(8):931-956.
- Vargas H, Loughheed C, Snell H (2005) Population size and trends of the Galapagos Penguin *Spheniscus mendiculus*. *Ibis*, 147:367-374.
- Vargas FH, Harrison S, Rea S, Macdonald DW (2006) Biological effects of El Niño on the Galápagos penguin. *Biol. Conserv.*, 127(1):107-114.
- Vargas FH, Lacy RC, Johnson PJ, Steinfurth A, Crawford RJ, Boersma PD, Macdonald DW (2007)

- Modeling the effect of El Niño on the persistence of small populations: The Galápagos penguin as a case study. *Biol. Conserv.*, 137:138-148.
- Vilà C, Sundqvist AK, Flagstad Ø, Seddon J, Björnerfeldt S, Kojola I, Casulli A, Sand H, Wabakken P, Ellegren H (2003) Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proc. Biol. Sci.*, 270(1510):91-97.
- Wallace RS, Araya B (2015) Humboldt Penguin *Spheniscus humboldti* population in Chile: counts of moulting birds, February 1999-2008. *Mar. Ornithol.*, 43:107-112.
- Westerdahl H, Waldenström J, Hansson B, Hasselquist D, von Schantz T, Bensch S (2005) Associations between malaria and MHC genes in a migratory songbird. *Proc. Biol. Sci.*, 272(1571):1511-1518.
- Williams TD (1995) The penguins Spheniscidae. Oxford University Press, Oxford.
- Williams TD (1999) ペンギン大百科. 平凡社 (Williams TD 1995, The penguins Spheniscidae 翻訳) .
- Wolfe K, Ó'hUigín C (2016) Significance of positive selection and gene duplication in adaptive evolution: in memory of Austin L. Hughes. *Immunogenetics* , 68(10):749-753.
- Xavier MO, Soares MP, Meinerz ARM, Nobre MO, Osório LG, da Silva Filho RP, da Silva Filho MCA (2007) Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive magellanic penguins. *Braz. J. Microbiol.*, vol.38 no.3. doi.org/10.1590/S1517-83822007000300018.
- Yang G, Yan J, Zhou K, Wei F (2005) Sequence variation and gene duplication at MHC DQB loci of baiji (*Lipotes vexillifer*), a Chinese river dolphin. *J. Hered.*, 96(4):310-317.
- Zoorob R, Bernot A, Renoir DM, Choukri F, Auffrey C (1993) Chicken major histocompatibility complex class II genes: analysis of interallelic and interlocus sequence variance. *Eur. J. Immunol.*, 23:1139-1145.
- 猪子秀俊, 笹月健彦, 十字猛夫 (2004) 移植・輸血検査学. 講談社サイエンティフィック.
- 吉川枝里, 津田とみ, 細道一善, 津田道雄他 (2015) MHC クラス I 遺伝子におけるペンギン科 7 種の分子進化的解析. 日本組織適合性学会, 22:156-163.
- 小池裕子, 松井正文 (2003) 保全遺伝学. 東京大学出版会.
- 津田良夫 (2011) 蚊の疾病媒介生態に関する野外研究: 特に都市域における最近の研究. *Medical Entomology and Zoology*, 62(4):211-224.
- 福井大祐, 坂東元, 中村亮平 (2009) ペンギンの臨床 (特集 ペンギンの保全医学). 獣医畜産新報, 62(7): 555-560.
- 松井淳, 宝来聰, 長谷川政美 (2008) 霊長類のミトコンドリア DNA における進化速度. 統計数理, 56:101-116.

森角興起 (2009) ペンギンの飼育史考 (特集 ペンギンの保全医学). 獣医畜産新報, 62(7): 549-554.