

氏名	和久大介
学位(専攻分野の名称)	博士(バイオセラピー学)
学位記番号	甲第729号
学位授与の日付	平成28年3月21日
学位論文題目	ミトコンドリアDNAに基づいたユーラシアカワウソおよびニホンカワウソの保全遺伝学的研究
論文審査委員	主査 教授・博士(理学) 佐々木 剛 教授・博士(畜産学) 小川 博 准教授・博士(理学) 松林 尚志 博士(理学) 米澤 隆弘* 農学博士 安藤 元一**

論文内容の要旨

第1章. 序論

カワウソ亜科 Lutrinae (Mammalia, Carnivora) の現存種は7属13種に分類されており、4大陸(ユーラシア、アフリカ、北米、南米)に広く分布する半水生の中型哺乳類である。このうち *Lutra* 属の現存種は2種(ユーラシアカワウソ *Lutra lutra* およびスマトラカワウソ *Lutra sumatrana*) だが、20世紀以降に絶滅したニホンカワウソ *Lutra nippon* を含めるとかつては3種で構成されていたと考えられている。現在、*Lutra* 属のこれらの種は複数の国や地域で絶滅が危ぶまれ、その保全に向けた対策が急がれているが、その一方で種内地域集団およびカワウソ亜科内での種の系統類縁関係が未だ解明されていないことが問題としてあげられる。

Lutra 属の保全のため解決すべき具体的な問題として以下の2つが挙げられる。(1) ユーラシアカワウソの地域絶滅が起きている現状を踏まえて動物園や水族館は本種の繁殖を実施し域外保全を行っている。しかしながら飼育個体に亜種間交雑が疑われる系統が欧州と日本の動物園および水族館に存在しており、亜種を考慮した繁殖計画を立てる障害となっている。(2) 我が国で絶滅したニホンカワウソはカワウソ亜科内における系統的立場が不明である。ニホンカワウソは先行研究により日本固有種 *L. nippon* とされる一方で、国際自然保護連合(IUCN) Red List (2015) ではユーラシアカワウソの異名(シノニム)として扱われ分類は混乱している。

上記問題の解決手段として分子レベルで系統類縁関係を明らかにする方法がある。その解析ツールとしてミトコンドリアDNA(mtDNA)は分子系統学的研究や系

統地理学的研究で広く用いられており、それらは保全遺伝学に応用されている。mtDNAは核DNA(nDNA)と比べると進化速度が早いため種内変異の検出が可能である。また、1細胞中に1コピーのnDNAと比べてmtDNAは1細胞中に数十から数千のコピーが含まれているため、DNAが断片化し減少している絶滅した動物の博物館標本試料などでも比較的容易にDNA配列を得ることが可能である。このようにして得られたmtDNA配列は遺伝的多様性の評価、系統解析および分岐年代推定が可能であるため上記に示した *Lutra* 属に関する問題の解決に活用できる。

そこで本研究はmtDNAを用いてユーラシアカワウソおよびニホンカワウソを分子レベルで解析し、上記に示した *Lutra* 属に関する問題の解決を試みた。分子レベルで個体の特徴を調べることにより、日本動物園水族館協会(JAZA)の管理するユーラシアカワウソの遺伝的背景を考慮した繁殖計画の提案と、現生種およびニホンカワウソの系統類縁関係を解明し、地理的な情報を加えることで系統地理学的な新しい洞察を与えることを目標とした。

第2章. 日本動物園水族館協会の管理するユーラシアカワウソの遺伝的多様性と繁殖計画

欧州と日本の動物園や水族館ではユーラシアカワウソの欧州亜種 *L. l. lutra*、東南アジア亜種 *L. l. barang*、中国亜種 *L. l. chinensis* などが飼育されている。欧州動物園水族館協会(EAZA)に所属する園館にはA-line(*L. l. lutra*)とB-line(*L. l. lutra*と*L. l. barang*が交

* 復旦大学 生命科学学院 副教授

** ヤマザキ学園大学 動物看護学部 教授

雑した可能性がある系統) という2つの line が存在し、JAZA 所属園館にもこの2つの line が導入されている。保全遺伝学的観点から繁殖を行う際は地域絶滅が起きている欧州亜種内で繁殖を行うべきであるが日本では本種の個体数が少ないため A-line と B-line を掛け合わせる繁殖がおこなわれている。Iwata et al. (2014) は B-line の遺伝的特徴を評価し、B-line と A-line 間の Cytochrome *b* (*cytb*) 遺伝子部分配列 (307bp) に違いがあることを示した。しかし Iwata et al. (2014) では解析配列が短く配列情報が少ないこと、比較に用いた配列の亜種を精査していないことが問題として挙げられる。そこで本研究では B-line の由来を明らかにするために A-line、B-line 各1個体と中国亜種2個体の計4個体から mtDNA の *cytb* 全長配列 (1140bp) を新たに決定し、先行研究で決定された欧州産、中国産、B-line および韓国産各1個体の *cytb* 配列の計4配列を加えて亜種を考慮した配列比較と系統解析をおこなった。

A-line および B-line それぞれの特徴的な塩基配列を見出すため上記に示した8配列の比較を行った。その結果、A-line および B-line それぞれが特徴的な塩基配列を示したが、中国亜種を A-line および B-line と識別できる特徴的な塩基配列は確認されなかった。

A-line と B-line の系統を明らかにするため最尤法により無根系統樹を構築した。その結果、先行研究と同様に A-line と B-line は異なるクレイドを形成した。B-line は先行研究で決定された中国産および B-line とクレイドを形成し、A-line は欧州産とクレイドを形成し欧州亜種独自のクレイドとして示された。JAZA がまとめたユーラシアカワウソ国内血統登録を精査したところ、本研究で解析した B-line 個体の繁殖に中国産個体は関わっていないことが確認された。すなわち本研究で解析した B-line の mtDNA は東南アジア亜種に由来する可能性が考えられる。

本研究では先行研究よりも多くの配列情報を得て亜種を考慮した配列比較と系統解析を行い、A-line と B-line の遺伝的差異および B-line における亜種間交雑をさらに強く示唆した。2015年現在、日本で飼育されている B-line 個体は全て本研究で解析した B-line 個体の子や孫で、中国亜種も A-line と異なるクレイドを形成し遺伝的な分化を示唆した1系統が残るのみである。日本の園館では A-line、B-line および中国亜種それぞれを識別し、国内の B-line は本種の繁殖と維持に活用しつつ、A-line および中国亜種の純系統を維持することで域外保全への貢献が期待される。

第3章. 絶滅したニホンカワウソの系統類縁関係の評価

ニホンカワウソは日本の北海道、本州、四国、九州に生息していたが1979年以降に野生下で目撃されておらず、2012年に環境省が絶滅を宣言した。形態と分子の形質に基づく系統分類学的研究でニホンカワウソは日本固有種 *L. nippon* とされ、Mammal Species of the World (2005) の中で Wozencraft はこの分類を採用している。一方、IUCN Red List ではニホンカワウソをユーラシアカワウソの異名とし、環境省も日本の Red List (2012) でユーラシアカワウソの亜種 *L. l. nippon* として扱い、本種の分類は現在も論争の最中である。本研究ではニホンカワウソとされる神奈川県産1個体 (JO1) および高知県産1個体 (JO2) の合計2個体を用い、次世代シーケンサー (NGS) により mtDNA ゲノム (mtgenome) 配列 (約16,400bp) を決定した。さらに、中国やサハラに由来するユーラシアカワウソ5個体から MPCR 法やロング PCR 法を用いて mtgenome 配列を決定した。そして、本研究で決定した配列と先行研究 (Koepfli and Wayne, 1998; Koepfli et al., 2008) で報告されたカワウソ亜科 mtDNA 配列とともに以下の解析をおこなった: 1) mtDNA 部分配列を用いたカワウソ亜科11種との系統解析, 2) mtgenome に基づいたニホンカワウソとユーラシアカワウソの系統解析と分岐年代推定。

ニホンカワウソに近縁な種を明らかにするため、ニホンカワウソとカワウソ亜科11種の mtDNA 部分配列に基づき系統解析をおこなった。解析の結果、ニホンカワウソはユーラシアカワウソと単系統群を形成し、ユーラシアカワウソと最も近縁であることが判明した。ニホンカワウソとユーラシアカワウソの近縁性は、先行研究で形態と分子の形質から示唆された結果と一致する。

ニホンカワウソとユーラシアカワウソの詳細な系統関係を推定するため、mtgenome に基づき系統解析を行った。解析の結果、神奈川県産の JO1 はユーラシアカワウソの単系統群に内包され、中国産ユーラシアカワウソと単系統となった (100% BP)。このことから JO1 はユーラシアカワウソの一系統と判明した。その一方で、高知県産の JO2 は JO1 を含むユーラシアカワウソ単系統群と姉妹群関係となり、日本独自の系統であると示された。この結果は愛媛県産ニホンカワウソの *cytb* 遺伝子部分配列 224bp に基づきニホンカワウソが独立した系統とする Suzuki et al. (1996) で示唆された結果と一致する。以上のことから JO2 は日本固有種もしくは日本固有亜種として扱うことが妥当と思われる。

JO1 および JO2 それぞれの系統における進化の時間

的尺度を推測するため、分岐年代を推定した。推定の結果、JO2の祖先は前期更新世にあたる約127万年前、JO1の祖先は後期更新世にあたる約10万年前に分岐したと推定された。JO2系統に似た分岐年代を示す動物では、mtgenome配列に基づく解析でツキノワグマが約146万年前(Wu et al., 2015)に日本へ移住したと推定されている。地質学の研究から、前期更新世(170-80万年前)の氷期に陸橋で大陸と日本列島が接続していたと示唆されている(北村・木元, 2004)。このことからJO2系統は前期更新世に陸橋を渡って日本列島に移住したと考えられる。JO1系統が分岐した年代はJO2系統が示した分岐時期と比べ比較的最近の出来事であると分かった。JO1系統と似た分岐年代を示す動物はイノシシがおり、14-25万年前に陸橋を渡って移住してきたと示唆され(Watanobe et al., 2003)、JO1系統も同じように移住してきたとも考えられる。しかしながら地質学的に後期更新世に大陸と日本列島が接続していた証拠はない。JO1が採取された神奈川県城ヶ島は明治時代から遠泳漁業の基地で、漁師により国外(ユーラシア大陸)から持ち込まれた個体である可能性もある。

本研究により、日本産のカワウソ標本2個体は*Lutra*属であると再確認された。しかし、同じ日本産のJO1とJO2でもそれぞれ異なる進化史を示した。高知県産JO2はユーラシアカワウソとは遺伝的に異なる日本独自の系統で日本固有種*L. nippon*もしくは日本固有亜種*L. l. nippon*として扱うことが妥当であった。それに対し、神奈川県産JO1はユーラシアカワウソと同種レベルの系統類縁関係を示した。

第4章. 総論

本研究はmtDNAに基づいて*Lutra*属における問題を解決し保全遺伝学へ応用することを目的とした。欧州と日本の動物園および水族館で飼育されているユーラシアカワウソのA-line(欧州亜種)、B-line(欧州亜種と東南アジア亜種の亜種間交雑が疑われる系統)および中国亜種の*cytb*遺伝子全長配列に基づき亜種を考慮した

配列比較と系統解析を行った。解析の結果、これまで示されなかったB-lineの遺伝的特徴と欧州亜種(A-line)との系統の違いが示され、B-lineのmtDNAは東南アジア亜種に由来することが示唆された。保全遺伝学ではmtDNAが集団間ではっきりとした分化を示し、集団がそれぞれ単系統で、またnDNAの遺伝子座でもアリル頻度に明確な分化を示す場合、それらの集団を進化的に重要な単位(ESU)として扱う(Moritz, 1995)。それらESUは種内の管理単位として別々に管理されるべきとされる。本研究ではmtDNAによりA-lineとB-lineおよびA-lineと中国亜種は別系統で遺伝的に分化することが示唆された。今後nDNAの遺伝子座を調べる必要はあるが、A-line、B-lineおよび中国亜種をそれぞれ別の管理単位とすることが保全上好ましいと考えられた。また、ニホンカワウソの系統類縁関係の評価ではmtgenome配列に基づき系統解析と分岐年代推定を行った。解析したJO1(神奈川県産)とJO2(高知県産)のニホンカワウソはそれぞれ異なる進化史を示した。JO1系統はユーラシアカワウソが形成する単系統群に内包され、分岐年代も約10万年前と非常に若いことが判明した。その一方で、JO2系統はユーラシアカワウソがアジアと欧州に拡がった時期よりも早い約127万年前に日本へ移住した日本固有の系統であることが判明した。JO2が示した分岐年代は他の陸生動物で推定された分岐年代や日本列島への移住時期に一致するとともに、地質学的な証拠とも矛盾しない結果であった。以上の結果から、JO2系統は日本固有種もしくは日本固有亜種として扱ることが妥当であろう。保全遺伝学的観点から、大陸にJO2系統と同じ系統の集団が現存していれば重要な保全対象となりうるが、本研究ではその存在は示されなかった。本研究は本州と四国のニホンカワウソ各1個体を解析したものであり、ニホンカワウソ集団の遺伝的多様性を網羅しておらず今後は北海道、本州、四国および九州それぞれの集団から複数個体を解析することにより、ニホンカワウソ集団の持つ遺伝的多様性をある程度網羅した系統学的位置づけが解明されるだろう。

審査報告概要

本研究は動物園水族館における生息域外保全に向けた繁殖計画の提案と絶滅したニホンカワウソの系統分類学的評価を行った。日本の園館で飼育されているユーラシアカワウソのミトコンドリアDNA*cytb*遺伝子配列を解析し、亜種の遺伝的分化と交雑系統を明らかにした。こ

れにより亜種の保全に向けた生息域外保全への具体的道筋を作った。さらにニホンカワウソの博物標本からDNAを抽出しミトコンドリアゲノム配列を決定し解析を行った。その結果、日本には120万年前から生息する独自の系統が存在することを明らかにした。これにより

ニホンカワウソの生物学的価値の見直し（分類の再検討）を提案した。本研究は世界各地で絶滅が危惧されるカワウソ類の保全および絶滅したニホンカワウソの自然史に迫る重要な知見をもたらし、生物保全の意義と生物

多様性の価値を追求するバイオセラピー学の学術に貢献する成果である。

よって、審査員一同は博士（バイオセラピー学）の学位を授与する価値があると判断した。