

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830144

研究課題名(和文) 免疫関連遺伝子に基づく絶滅危惧両生類の疫学的リスク予測とツボカビ耐性機構の検証

研究課題名(英文) Epidemiological risk prediction and validation of fungal resistance mechanism of threatened amphibian species based on immunity related genes

研究代表者

井川 武 (Igawa, Takeshi)

広島大学・国際協力研究科・助教

研究者番号：00507197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では西南諸島産両生類絶滅危惧種であるイシカワガエル種群、オットンガエル、ホルストガエル、ハナサキガエル種群、イボイモリについて、カエルツボカビをはじめとした病原性微生物に対する抵抗性に関する遺伝子の多様性と分子進化のパターンを検証することを目的として、獲得免疫を代表する主要組織適合遺伝子複合体(MHC)と自然免疫に関連した遺伝子の同定及び、分子進化の程度を明らかにした。本研究の結果、本研究の結果、6種すべてにおいて、MHC遺伝子及び、抗菌ペプチドなどの自然免疫関連遺伝子が同定され、種間での免疫関連遺伝子の多様性及び発現パターンが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：For validation of diversity and molecular evolution of immunity related genes which contribute to resist to pathogenic microorganisms such as fungal diseases by *Batrachochytrium dendrobatidis*, we identified major histocompatibility complex (MHC) and natural immune system related genes in endangered amphibian species (Ishikawa's frogs, Otton frog, Holsti's frog, Ryukyu tip-nosed frogs and crocodile newt) distributing in South-Western islands in Japan. As the results of this study, we identified multiple MHC I and II genes and natural immunity related genes in all six species and also elucidated diversities and different expression patterns among different species.

研究分野：進化遺伝学

 キーワード：両生類 絶滅危惧種 西南諸島 主要組織適合遺伝子複合体 MHC トランスクリプトーム 発現解析
分子進化

1. 研究開始当初の背景

近年、生息域の破壊や地球温暖化、ツボカビ感染などにより、両生類が減少しており、IUCNによれば、約6,200種のうちの3分の1が絶滅の危機に瀕している。日本産両生類についても半数以上が絶滅危惧種に該当し、多くが西南諸島固有種に集中している。危急種であるIUCNの絶滅危惧B1類に限っても6種(イシカワガエル・オットンガエル・ホルストガエル・ナミエガエル・コガタハナサキガエル・イボイモリ)が該当し、早急な保護が求められている。そこで、申請者はこれらの絶滅危惧両生類の保全単位の指針として遺伝的多様性の解明を試み、その結果、狭小な島嶼内にも遺伝的に異なる多様な集団が存在していることを解明してきた(図1、Igawa et al., 2013a)。

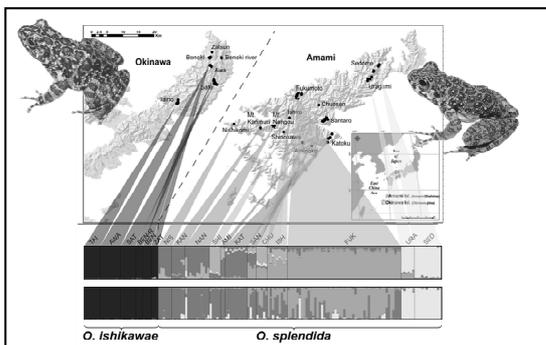


図1 イシカワガエル種群において明らかになった遺伝的集団構造。奄美大島内に複数の異なる集団が存在する

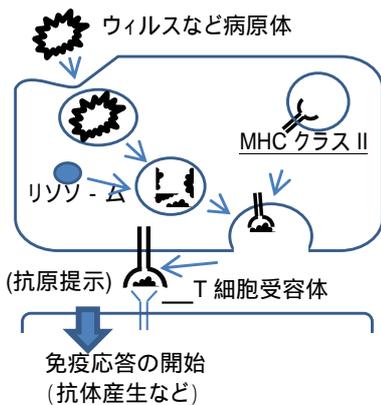


図2 MHC クラスII分子の獲得免疫における役割。病原体由来のペプチドを認識し、T細胞受容体に提示する。

しかし、それと同時に、個々の集団は地形によって隔離されており、個体数の少ない小集団であることも分かってきた。このような集団では環境適応に関する遺伝的変異も少なく、環境が変化した際に一気に大絶滅が起こる可能性がある。特に両生類で問題となるのは、ラナウイルス、カエルツボカビといった新たな病原体の出現である。最初にツボカビ感染が確認された北米においては、9割以上の集団が絶滅した種もある。幸いにも日本産両生類は在来のツボカビの種類がかなり多様であるにも関わらず、抵抗力があるとされており、これによる集団の減少は現在のところ確認されていない(Goka et al., 2009)。

ところが、最近、日本産と同様にツボカビに対して抵抗力があるとされたヨーロッパ産の一部の種において、外来株による大量絶滅が確認され始めている(Walker et al. 2010)。したがって、未知の病原体に関しては日本産両生類についてもリスクは皆無ではなく、むしろ、集団サイズの小さな西南諸島産絶滅危惧種のリスクは非常に高い可能性も十分に考え得られた。

このような集団としての病原体に対する感染被害の頻度、すなわち疫学的リスクを測るための根拠ある指標の一つとして、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の対立遺伝子の多様性が挙げられる。MHCは脊椎動物の獲得免疫系における重要な分子で、病原体に由来するタンパク質などの外来抗原と結合し、T細胞に提示することで免疫応答を開始させる。したがって、MHCのレパートリーによって、免疫系が対処できる病原体の種類が決まり、MHC対立遺伝子の多様性は集団及び個体の生存率に大きく影響すると考えられている。実際、対立遺伝子頻度は平衡化淘汰によって進化的にも多様性が維持されており(Satta et al., 1994)、哺乳類などの野生個体群においてもMHCの異なる対立遺伝子の数と、生存力の間に関連があることが分かっている。しかも最近になって、北米のカエルのツボカビへの感受性に関して、MHCの遺伝子型との関連が明らかされた(Savage et al., 2011)。一方、本邦産両生類においては、MHCに関する知見は皆無で単離もされていない。そのため、まず最も両生類絶滅危惧種が多い西南諸島産の両生類についてMHC遺伝子を単離し、その多様性に基づいて疫学的リスクを推定する必要性が考えられた。

また、先述のように、本邦産両生類についてはツボカビの蔓延による急激な減少は報告されていないが、これは成体の表皮に関する観察事実にのみ基づいている。両生類の生活環全体、特にタマジラクシ幼生期からの発生段階におけるツボカビの影響は明らかになっていない。北米のケースほど強い影響は考えにくいですが、MHCの遺伝子型あるいは、多様性とツボカビに対する抵抗力の間にある程度の相関があるとすれば、本邦産両生類が保有しているMHC遺伝子のレパートリーがツボカビ耐性に寄与している可能性がある。したがって、MHCの遺伝子型とツボカビ存在下での生存力との生活環全体における関係性を解明し、最終的にはツボカビ耐性に寄与するMHCのレパートリーについても早急に解明を試みる必要性が考えられた。

申請者は、すでに6種のうちイボイモリについては着手しており、2種あるMHCのうち、クラスIIと呼ばれる、主に外来性のタンパク質の抗原提示に関わる遺伝子の単離に成功していた。集団のサンプリングについても、6種のうちナミエガエルを除く5種については、分布域全体を網羅したサンプルを収集しており、すでにマイクロサテライト遺

伝子座を用いて遺伝的背景を明らかにしていた。さらに、申請者が所属していた広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設（以下、両生類研）においては、1980年代に採集したサンプルが多数、凍結保存されており、これら30年以上前の集団と現在の集団との間に、どのような遺伝的变化が起きているのかも実証可能であると考えられた。また、両生類研では、現在、絶滅危惧種の飼育下繁殖にも取り組んでおり、本研究の対象である6種のうち、イシカワガエル、オットンガエル、ホルストガエル、イボイモリについて、人工繁殖に成功している(eg., Igawa et al., 2013b)。したがって、交配実験及び、飼育実験を容易に行える環境にあった。

2. 研究の目的

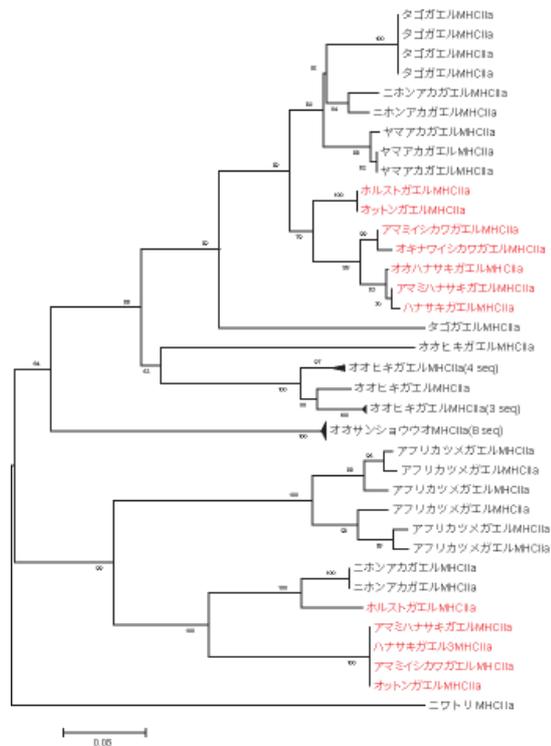
本研究では、西南諸島の両生類絶滅危惧種6種（イシカワガエル・オットンガエル・ホルストガエル・ナミエガエル・コガタハナサキガエル・イボイモリ）について、獲得免疫の機能を司る重要な遺伝子である主要組織適合遺伝子複合体（MHC）遺伝子と様々な自然免疫遺伝子を単離し、ツボカビ耐性に関わる遺伝学的基盤の解明を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

本件研究では、まず、MHCクラスII遺伝子のcDNA全長配列を決定することを目的として、研究開始当初は、すでにカエル類5種の属するアカガエル科、イボイモリに近縁なクシイモリ科において、いくつかの既知cDNA配列が報告されているため、これに基づいて断片を増幅した後に5'および3'-RACE法により全長配列を得ようと考えた。しかしながら、研究開始後にシーケンス解析の技術進歩が認められたため、方針を変更し、まず、6種のRNA-seqを超並列シーケンサー（HiSeq2000）いわゆる次世代シーケンサーにて解読した。具体的にはMHC遺伝子の単離を目的に脾臓と、自然免疫関連遺伝子の単離を目的に皮膚組織からmRNAを抽出し、それらをシーケンサーに供した。その結果得られた大規模データについては、解析プログラムを用いて、cDNA配列を再構築するとともに、各種ゲノムデータベースを用いて遺伝子の同定を行った。また、同時にそれぞれの遺伝子の発現量解析も行った。

4. 研究成果

本研究の結果、6種すべてにおいて、MHC遺伝子及び、抗菌ペプチドなどの自然免疫関連遺伝子が同定された。これらの塩基配列及びアミノ酸配列に基づいて分系統解析を行ったところ、二つの主なグループに属するMHC class II遺伝子が得られたことが分かった（図3・赤字）。



二つのグループのうち一方はそれぞれの種に共通した保存的な配列を有しており、他方は変異に富んでいた。

また、様々な免疫関連遺伝子の同定にも成功し、これらの遺伝子について各種での相同性を決定し、さらに発現量を比較した。その結果、奄美大島及び沖縄島に生息する姉妹種の間での発現遺伝子の類似性と、それぞれの島の中での他種との違いが明らかとなった。また、すべての種において発言していた遺伝子のセットについて、配列比較によってそれぞれの遺伝子の進化速度の比較を行った。その結果、血球関連遺伝子などにおいて分子進化速度の加速が観察された。

また、MHCにおける解析については、比較対象として本州産のアカガエル類についてもMHC遺伝子を決定し、その多様性を検証した。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文(すべて査読有)〕(計 19 件)

- 1) Okamiya H*, Igawa T, Nozawa M, Sumida M, Kusano T (2017) Development and Characterization of 23 Microsatellite Markers for the Montane Brown Frog (*Rana ornativentris*). *Current Herpetology* **36**: 63–68.
- 2) Komaki S, Lin S-M, Nozawa M, Oumi S, Sumida M, Igawa T (in press). Fine-scale

- demographic processes resulting from multiple overseas colonization events of the Japanese stream tree frog, *Buergeria japonica*. *Journal of Biogeography*.
- 3) Sumida M, Islam MM, Igawa T, Kurabayashi A, Furukawa Y, Sano N, Fujii T, Yoshizaki N (2016). The first see-through frog created by breeding: description, inheritance patterns, and dermal chromatophore structure. *Scientific Reports* **6**: 24431.
 - 4) Lau Q, Igawa T, Komaki S, Satta Y (2016). Characterisation of major histocompatibility complex class I genes in Japanese Ranidae frogs. *Immunogenetics* **68**: 797–806.
 - 5) Matsunami M, Igawa T, Michimae H, Miura T, Nishimura K (2016). Population Structure and Evolution after Speciation of the Hokkaido Salamander (*Hynobius retardatus*). *PLoS One* **11**: e0156815.
 - 6) Komaki S, Lau Q, Igawa T (2016). Living in a Japanese onsen: field observations and physiological measurements of hot spring amphibian tadpoles, *Buergeria japonica*. *Amphibia-Reptilia*: **37**: 311-314.
 - 7) Nasrin S‡, Igawa T‡*, Islam MM, Hasan M, Alam MS, Komaki S, Kawamura K, Khan MMR, Sumida M (2016). Inter- and intra-specific genetic divergence of Asian tiger frogs (genus *Hoplobatrachus*), with special reference to the population structure of *H. tigerinus* in Bangladesh. *Genes & Genetic Systems* **91**: 217-228. (‡equal contribution)
 - 8) Komaki S, Igawa T, Lin S-M, Sumida M (2016). Salinity and thermal tolerance of Japanese stream tree frog (*Buergeria japonica*) tadpoles from island populations. *Herpetological Journal* **26**: 209–213.
 - 9) Komaki S, Igawa T, Lin S-M, Tojo K, Min M-S, Sumida M (2015). Robust molecular phylogeny and palaeodistribution modelling resolve a complex evolutionary history: glacial cycling drove recurrent mtDNA introgression among *Pelophylax* frogs in East Asia. *Journal of Biogeography*: **42**: 2159-2171.
 - 10) Takahara T, Endo S, Takada M, Oba Y, Nursal WI, Igawa T, Doi H, Yamada T, Okuda T (2015). Radiocesium accumulation in the anuran frog, *Rana tagoi tagoi*, in forest ecosystems after the Fukushima Nuclear Power Plant accident. *Environmental Pollution* **199**: 89–94.
 - 11) Igawa T, Watanabe A, Suzuki A, Kashiwagi A, Kashiwagi K, Noble A, Guille M, Simpson DE, Horb ME, Fujii T, Sumida M (2015). Inbreeding Ratio and Genetic Relationships among Strains of the Western Clawed Frog, *Xenopus tropicalis*. *PLoS One* **10**: e0133963.
 - 12) Uno Y, Nishida C, Takagi C, Igawa T, Ueno N, Sumida M, Matsuda Y (2015). Extraordinary Diversity in the Origins of Sex Chromosomes in Anurans Inferred from Comparative Gene Mapping. *Cytogenetic and Genome Research*. **145**: 218-229.
 - 13) Igawa T, Nozawa M, Nagaoka M, Komaki S, Oumi S, Fujii T, Sumida M (2015). Microsatellite Marker Development by Multiplex Ion Torrent PGM Sequencing: a Case Study of the Endangered *Odorrana narina* Complex of Frogs. *Journal of Heredity* **106**: 131–137.
 - 14) Kakehashi R, Igawa T, Sumida M (2015). Genetic population structure and demographic history of an endangered

- frog, *Babina holsti*. *Conservation Genetics* **16**: 978–1000.
- 15) Igawa T, Komaki S, Takahara T, Sumida M (2015). Development and Validation of PCR-RFLP Assay to Identify Three Japanese Brown Frogs of the True Frog Genus *Rana*. *Current Herpetology* **34**: 89–94.
 - 16) Matsunami M, Igawa T, Nozawa M, Michimae H, Miura T, Nishimura K (2015). Development and Characterization of 12 Microsatellite Markers for the Hokkaido Salamander (*Hynobius retardatus*). *Current Herpetology* **34**: 177–181.
 - 17) Sultana N, Igawa T, Nozawa M, Islam MM, Hasan M, Alam MS, Khan MR, Sumida M (2014). Development and characterization of 27 new microsatellite markers of Indian Bullfrog, *Hoplobatrachus tigerinus* and its congeneric species. *Genes & Genetic Systems* **89**: 137–141.
 - 18) Komaki S, Igawa T, Nozawa M, Lin S-M, Oumi S, Sumida M (2014). Development and characterization of 14 microsatellite markers for *Buergeria japonica* (Amphibia, Anura, Rhacophoridae). *Genes & Genetic Systems* **89**: 35–9.
 - 19) Hasan M, Islam MM, Khan MR, Igawa T, Alam MS, Djong HT, Kurniawan N, Joshy H, Sen YH, Belbut DM, Kurabayashi A, Kuramoto M, Sumida M (2014). Genetic divergences of South and Southeast Asian frogs: a case study of several taxa based on 16S ribosomal RNA gene data with notes on the generic name *Fejervarya*. *Turkish Journal of Zoology* **38**: 1–22.
- 〔学会発表〕(計 7 件)
- 1) Igawa T, Watanabe A, Suzuki A, Kashiwagi A, Kashiwagi K, Noble A, Guille M, Simpson DE, Horb ME, Fujii T, Sumida M “Genetic relationships and inbreeding ratio among strains of the western clawed frog, *Xenopus tropicalis*” Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology (ICZ) & the 87 th meeting of the Zoological Society of Japan (ZSJ) (14-19th November, 2016, Okinawa, Japan)
 - 2) Lau Q, Igawa T, Satta Y “Identifying immune genes from Japanese frogs (Genus *Rana*)” Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology (ICZ) & the 87 th meeting of the Zoological Society of Japan (ZSJ) (14-19th November, 2016, Okinawa, Japan)
 - 3) Igawa T, Matsunami M, Lau Q, Sumida M “Comparative transcriptome analyses of eight endangered amphibians in Ryukyu Archipelago” The 8th World Congress of Herpetology (15-21st August, 2016, Tonglu, China)
 - 4) Lau Q, Igawa T, Komaki S, Satta Y “Selection acting on MHC class I genes in Japanese Ranidae frogs” Society for Molecular Biology and Evolution (3-7th July, 2016, Gold Coast, Australia)
 - 5) Igawa T, Matsunami M, Lau Q, Sumida M “Comparative transcriptome analyses of eight endangered amphibians in Ryukyu Archipelago” Society for Molecular Biology and Evolution 2017 (3-7th July, 2016, Gold Coast, Australia)
 - 6) Igawa T "Landscape genetics of endangered amphibians in Ryukyu Archipelago" The 1st Symposium on South East Asia Herpetology and

Envenomation (28-29th August, 2015,
Malang, Indonesia) (Invited)

- 7) Igawa T "Conservation genetics of
endangered amphibians in Ryukyu
Archipelago" "MHC evolution and Human
evolution" symposium (26-27th July, 2014,
Hayama, Japan) (Invited)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井川 武 (TAKESHI IGAWA)

広島大学・国際協力研究科・助教

研究者番号：00507197