

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08084

研究課題名(和文) 日本トキ集団をモデルとした希少動物保全のための遺伝的多様性評価システムの構築

研究課題名(英文) Development of Genetic Diversity Evaluation System for The Endangered Avian Species, The Japanese Crested Ibis in Japan

研究代表者

谷口 幸雄 (Taniguchi, Yukio)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10252496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：希少動物トキの国内集団を対象として、遺伝的多様性を評価するための中規模のマーカー型判定法の開発を実施した。5万以上のDNA多型マーカー候補から日本トキ集団に有効な222のマーカーを選抜し、multiplexPCRと次世代シーケンサー(NGS)を組み合わせた方法によりタイピングデータを得た。データの解析結果から、multiplexPCR/NGS法によるマーカー型判は実行可能であり、これらのデータを使用し個体識別や親子鑑定が可能であることが示唆された。しかし、より効率的かつ低コストでの判定法を実現するためには、multiplexPCRやNGSライブラリー調製の条件をさらに検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本トキ集団の遺伝的多様性を維持するためには、DNA多型マーカーを利用した遺伝的管理が求められる。200以上のマーカーを判定する今回の新たな手法の樹立は、個体識別や親子判定を可能にするのに加え、集団の遺伝的多様性を維持する交配計画の策定や野外へ再導入する個体の選定にも有用な情報を提供する。

現在、絶滅の危機に瀕している野生生物は多数存在している。我々が実施してきた大規模なDNA多型マーカー開発から本課題での遺伝的多様性評価法樹立までのプロセスは、他の希少動物にも適用可能であり、希少動物の遺伝的管理を実施するための標準的な手法として極めて有用なものになると期待される。

研究成果の概要(英文)：The Japanese crested ibis is an endangered avian species. Understanding genetic diversity in the Japanese population of this species using molecular tools such as a single nucleotide polymorphism (SNP) and a short tandem repeat (STR) is critical for establishment of further effective management for conservation. We previously detected approximately 50,000 of polymorphic marker candidates using a combination of reduced representation libraries and next-generation sequencing (NGS). In this study, 222 informative markers including SNPs and STRs were selected and genotyped by a combination of multiplex PCR and NGS. Analysis of genotyping data indicated that this novel genotyping method was feasible. Moreover, paternity testing/individual identification based on their genotyping data could be available. However, to improve this method more efficiently and cost-effectively, re-construction of multiples PCR reaction conditions and NGS library preparation procedures should be required.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：希少動物の保全 遺伝的多様性 トキ マーカー型判定法 次世代シーケンサー マルチプレックスPCR SNP マイクロサテライト

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本の特別天然記念物である「トキ」は絶滅の危機にある希少動物であり、国家的プロジェクトとして人工飼育による増殖と野生復帰への取組みが進められている。

トキの保全においては、個体数の増加が最も重要な課題であるが、同時に、繁殖性や環境への適応性を低下させないために集団の遺伝的多様性を維持することが求められている。日本生まれのトキはすでに絶滅しており、現在の日本トキ集団は、中国から導入された5個体のみを始祖として形成されている。このことは、始祖5個体間の遺伝的な関係を把握できれば、後代集団において始祖個体群の遺伝的多様性が維持されているか否かを判定する指標を作製することができることを意味している。しかし、始祖個体間の血縁関係については情報が得られていないため、遺伝的多様性の正確な評価のためには、多数のDNA多型マーカーを利用した分子遺伝学的手法を適用する以外に方法はない。

我々は、始祖5個体を対象として Reduced representation library 法と次世代シーケンサー(NGS)を利用した手法により、5万以上のDNA多型マーカー候補(一塩基多型(SNP)および短鎖縦列反復配列(STR))を検出している(文献 )。

日本トキ集団の成立過程を考えれば、その遺伝的多様性は極めて低いと推察される。このため、ゲノム全域をカバーする数百程度のDNA多型マーカーを利用することで、遺伝的多様性の評価が十分可能であると考えられた。この遺伝的多様性評価法を実現するための前提として、数百程度のDNA多型マーカーをタイピングする手法の開発が求められていた。

### <引用文献>

Taniguchi Y, Matsuda H, Yamada T, Sugiyama T, Homma K, Kaneko Y, Yamagishi S, Iwaisaki H. (2013)

Genome-Wide SNP and STR Discovery in the Japanese Crested Ibis and Genetic Diversity among Founders of the Japanese Population.

PLoS ONE 8(8): e72781.

### 2. 研究の目的

本研究課題では、日本トキ集団の遺伝的多様性の評価に必要な数百程度のDNA多型マーカーを選抜するとともに、これらのマーカー型を簡便かつ低コストで判定するための新たなタイピング法を開発することを目的とした。

この開発においては、マルチプレックスPCR(1つのPCR反応系に複数のプライマーペアを添加し、複数のマーカーを同時に増幅する手法)とNGSを組み合わせた新規マーカー型タイピング法の樹立に加え、膨大な数のDNA多型マーカー候補から評価に適したマーカーを選抜する方法についてもあわせて検討した。最終的に、日本トキ集団に有効な200以上のマーカーをタイピングする新たな手法を樹立し、個体識別や親子判定、さらには集団の遺伝的管理にも利用可能な遺伝的多様性評価システムを確立することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) PCRプライマーの設計とその評価

5万以上のDNA多型マーカー候補(SNPおよびSTR)からアレル数が多いマーカーや特定の始祖個体のみが異なるアレルを持っているマーカー候補を優先的に選択し、Primer Searchプログラムを使用して、多型部位を増幅するためのPCRプライマーを設計した。プライマーの設計においては、PCR産物長を100-280bpに、さらに全てのプライマーペアのT<sub>m</sub>値ができるだけ一致するように設定した。

1個体のトキゲノムDNAを用いて、各プライマーペアで個別にPCRを実施し、PCR産物をアガロースゲル電気泳動により検出して、単一のPCR産物が得られるか?、PCR産物長は適切か?、PCR産物の収量は十分か?について評価した。

#### (2) マルチプレックスPCR条件の検討

上記の評価により選抜した215組のプライマーペアを用いて、マルチプレックスPCRの反応条件を検討した。プライマーペアの混合条件として、2つのサンプル(multi20とmulti40)を作製した。

【multi20】215組のプライマーペアを各16~20組混合し、11反応系に分けた。

【multi40】215組のプライマーペアを各36~50組混合し、5反応系に分けた。

1個体のトキゲノムDNAをサンプルとして2つの条件でのマルチプレックスPCRを実行した。マルチプレックスPCRの成否をアガロースゲル電気泳動により判定した後、NGSによるタイピングを実施した(次項3と4を参照)。

#### (3) NGSでのシーケンズデータの取得

各サンプルのマルチプレックスPCRでの産物(multi20では11反応分、multi40では5反応分)を混合した後、PCR産物の両端にアダプター配列を付加し、次世代シーケンサーでの解析用のライブラリーを作製した。比較対象には、各プライマーペアで個別にPCRした産物215種類を混合して作製したライブラリー(singleと表記)を用いた。各ライブラリーは、異なるタ

グ配列を持つアダプターを付加することで区別した。次世代シーケンサーは Illumina 社の MiSeq を使用し、各 PCR 産物の両端からそれぞれ 150 塩基のシーケンズデータ(リードと呼ぶ)を取得した。

#### (4) シーケンズデータの解析

シーケンズデータの解析では、両端からの各 150 塩基のリードを中央の重複配列を考慮して連結し、1本のリードペア配列として処理した。初めに、全リードペアデータをタグ配列により、サンプルごとのデータに分けた。次に、各サンプル内で塩基配列が完全に一致するリードペアごとに分け、そのデータ数をカウントした(以下、同一リードペアのデータカウントを depth と表記する)。さらに、1つのサンプル内の全リードペアを両端のプライマーペア配列を使用して、マーカ候補ごとにデータに分類した。各マーカ候補のリードペア群内で depth が大きな順に1つ(ホモ型の場合)または2つ(ヘテロ型の場合)を真のアリルと判断した。ただしヘテロ型と判断する場合には、2つのアリルの depth が2倍以内であることを条件とした。Depth が2倍以内の範囲に3つ以上のアリルが検出されるマーカ候補は、複数の遺伝子座を増幅していると考えられることから、「有効なマーカではない」と判断し削除した。

#### (5) 複数個体でのタイピングとデータ解析

日本トキ集団の始祖5個体と後代20個体について、multi40の条件でのマルチプレックス PCR と NGS によるタイピングを実施した。これらのタイピングデータの解析により、日本トキ集団に有効なマーカを選抜した。

#### (6) トキドラフトゲノム配列を用いたマーカ間の連鎖に関する検討

近年、データベースに登録されているトキゲノム配列情報が更新されたことから、このトキドラフトゲノム配列を利用し、各マーカのゲノム上での位置について検討した。

#### (7) マーカの遺伝様式の解析

3世代の家系(父方祖父母、父母および子の計5羽)のゲノム DNA サンプルを用いてマルチプレックス PCR と NGS によるタイピングを実施し、親子間での各マーカの遺伝様式について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) PCR プライマーの設計とその評価

STR マーカ候補、一座位あたりのアリル数が多いマーカ候補および一羽の始祖個体に特異的に検出されるアリルを含むマーカ候補を優先的に選択し、多型部位を増幅する PCR プライマーペア 324 組を作製した。各プライマーペアについて個別に PCR を実施し、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物量や単一の PCR 産物が得られるかなどについて評価した結果、215 組を利用可能なプライマーペアとして選抜した。

#### (2) マルチプレックス PCR 条件の検討

トキ1個体のゲノム DNA をサンプルとして、Single、multi20 および multi40 の3つの条件で PCR を実施した後、NGS によるタイピングを実行した。NGS でのシーケンズの結果、各 PCR 条件で得られた全リードペア数は、それぞれ 150,554,253,833 および 282,767 であった。それぞれのマーカ候補において、各アリルの depth が 10 以上である場合、遺伝子型の判定が可能とした結果、遺伝子型が判定可能なマーカ数は single で 196、multi20 で 150、multi40 では 179 となった。この結果からマルチプレックス PCR の条件としては、1反応系にプライマーペアを 36-50 組加えた multi40 の条件で十分であることが示された。

#### (3) 複数個体でのタイピングとデータ解析

トキ1個体の遺伝子型タイピング結果からだけでは、各マーカ候補の有効性が判断できなかったため、始祖5個体と後代20個体のゲノム DNA をサンプルとして、multi40の条件を用いてマルチプレックス PCR/NGS 法によるタイピングを実施した。NGS でのシーケンズの結果、各個体から得られた全リードペア数はおよそ 30 万(265,513-335,976 の範囲)であった。25 個体のタイピングデータの解析から、多型が見られなかったものや複数の遺伝子座を増幅していると考えられるプライマーペアを削除し、有効なマーカ数は 186 となった。1 個体に対し約 30 万のリードペアを取得しおよそ 200 のマーカのタイピングを実施しているため、1 マーカあたりのリードペア数は約 1,500 程度になると期待されるが、実際のデータでは数十のものから 3,000 を超えるものまでと、マーカ候補ごとに大きなばらつきがみられた。また、現状のデータ処理法では、どのマーカにおいてもエラーデータを 20-40%程度含んでおり、データ処理法についても今後検討が必要と考えられた。結果的に、PCR での増幅効率が悪く、個体によっては十分なデータ量が得られないマーカを削除すると有効なマーカ数は 172 となった。

#### (4) トキドラフトゲノム配列を用いたマーカ間の連鎖に関する検討

データベースに登録されているトキドラフトゲノム配列に対し、NGS でのタイピングで得られた各マーカー座位の配列をマッピングし、マーカーのゲノム上での位置について検討した。186 のマーカー内で、0.5Mb 以内に位置するマーカーの組合せが 21 組検出された。これらのマーカー群は強く連鎖しており、1 つの連鎖群に対して 1 つのマーカーのみを残すようにマーカーを選抜した場合、有効なマーカー数は 151 となった。

#### (5) 個体識別への利用に関する検討

前述の後代 20 個体の 151 マーカーのタイピングデータを用いて、これらの遺伝子型データに基づき個体識別が可能であるかどうかについて検討した。すべての 2 個体の組み合わせにおいて、遺伝子型が一致しないマーカーの割合が 22-43% 存在しており、体識別が可能であることが示唆された。

#### (6) マーカーの遺伝様式の検討

3 世代の家系(父方祖父母、父母および子の計 5 羽)のゲノム DNA サンプルを用いてマルチプレックス PCR/NGS 法によるタイピングを実施し、親子間での各マーカーの遺伝様式について検討した。これまでに選抜された 151 の有効なマーカーの遺伝子型データの解析から、各マーカーの遺伝子型はメンデル遺伝に従うことが確認された。これにより、これらのマーカーを用いた親子鑑定も可能であることが示唆された。

#### (7) マーカーの追加

これまでに日本トキ集団に有効として選抜されたマーカー数は、ゲノム上での連鎖も考慮すると 151 となった。151 マーカーを用いた場合でも、個体識別や親子鑑定は可能であることが示唆されたが、遺伝的多様性の評価の観点からはさらにマーカー数を増加させることが望ましいと考えられる。そこで、当初の目標であったマーカー数 200 以上を確保するために、個別での PCR とその PCR 産物のアガロースゲル電気泳動での評価およびゲノム上での位置も考慮し、さらに 80 のプライマーペアを作製した。これらの 80 プライマーペアについて、40 プライマーペア混合でのマルチプレックス PCR×2 反応の条件でサンプルを調製し、NGS によるマーカー型判定を実施した結果、71 プライマーペアは有効なマーカーであると推察された。

全マーカーを用いたタイピングも試みたが、サンプル調製にミスがあり、必要なデータを得ることができなかった。再度データの取得を進めたが、研究期間内に結果を得るまでに至らなかった。

#### (8) 結論

本研究課題において、日本トキ集団に有効な 222 個のマーカーを選抜した。これらのマーカーをタイピングする新たな手法として、マルチプレックス PCR/NGS 法を提案し、この手法が実行可能であることを示した。さらに、これらのマーカーの遺伝子型データに基づいて、個体識別や親子鑑定が可能であることが示唆された。しかし、より効率的かつ低コストでのマーカー型判定を実現するためには、マルチプレックス PCR や NGS ライブラリー調製の条件をさらに検討する必要があると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

池乗乃智・谷口幸雄・永田尚志・杉山稔恵・金子良則・祝前博明・山田宜永  
日本トキ集団における中規模多型マーカータイピング法の開発  
日本畜産学会第 122 回大会  
2017 年 3 月 28 日  
神戸大学鶴甲第 1 キャンパス(神戸市)

依田澄香・谷口幸雄・金子良則・祝前博明・山田宜永  
日本産トキ集団における家系推定に有用な多型マーカー候補の選抜  
日本畜産学会第 124 回大会  
2018 年 3 月 29 日  
東京大学農学部(東京)

特別天然記念物トキ・コウノトリの遺伝的多様性の保全に向けて  
谷口幸雄  
日本動物遺伝育種学会第 19 回大会日本動物遺伝育種学会シンポジウム  
2018 年 9 月 20 日  
京都市動物園(京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：金子 良則

ローマ字氏名：KANEKO, Yoshinori

研究協力者氏名：祝前 博明

ローマ字氏名：IWAISAKI, Hiroaki

研究協力者氏名：山田 宜永

ローマ字氏名：YAMADA, Takahisa

研究協力者氏名：池乗 乃智

ローマ字氏名：IKENORI, Daichi

研究協力者氏名：依田 澄香

ローマ字氏名：YODA, Sumika

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。