

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15177

研究課題名(和文)絶滅したニホンカワウソの博物館標本から解き明かす系統分類と集団形成史

研究課題名(英文)Elucidation of Phylogenetic Status and Natural History from Museum Specimen of the Extinct Japanese Otter

研究代表者

和久 大介(WAKU, DASIUKE)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：60793578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究計画当初に予定していた10個体のニホンカワウソ標本の解析を実施した。その結果、複数個体から目的のミトコンドリアゲノム配列を決定した。このように、本研究実施により新たなデータを得られた。また、当研究計画期間中に日本国内において生きたカワウソが見つかり、その糞からもミトコンドリアゲノム配列を得ることができた。さらに、本研究計画の進行中に全ゲノムによる解析を目指し、ユーラシアカワウソ・コツメカワウソ・ピロードカワウソからドラフトゲノム配列のもととなるデータを得た。これらの結果は今後国際誌に投稿予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで日本列島の全域のニホンカワウソ個体群を対象に行ったDNAの研究は無かった。本研究の結果は明らかにされてこなかった日本列島の絶滅動物の自然史に新たな洞察を与える。さらに、本研究では当初の計画を発展させ全ゲノム解析を目指し、ニホンカワウソの近縁種からドラフトゲノム配列を得るためのデータを得て、ニホンカワウソの全ゲノム解析に挑戦し成果を出しつつある。ヒトや家畜以外の出土試料を用いた全ゲノム解析は世界でも多くなく意義はい大きい。社会的にも注目されており、新聞や商業誌や公園で一般の方々が研究について目にする機会も多かった。日本の動物を理解することは一般の方々も求めていることが改めて認識できた。

研究成果の概要(英文)：I analyzed ten specimens of the extinct Japanese otter, which was planned at the beginning of this project, was carried out. As a result, the mitochondrial genome sequence was determined from several individuals. In this way, we obtained new data through this study. In addition, the living otter was found in Japan (Tsushima) during the project period, and we determined the mitochondrial genome sequence from the feces. Furthermore, to analyze the whole genome, I obtained shotgun sequence data from Eurasian, Asian small-clawed, and smooth-coated otters. These results will be submitted to an international journal in the future.

研究分野：野生動物

キーワード：野生動物 絶滅動物 古代DNA 全ゲノム カワウソ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

絶滅したニホンカワウソは形態学的研究から日本固有種 *Lutra nippon* (本州・四国集団) と、ユーラシアカワウソ日本亜種 *Lutra lutra whiteleyi* (北海道集団) の2系統に分類されてきた (Imaizumi and Yoshiyuki, 1989)。分子系統学的研究も実施され、愛媛県産ニホンカワウソからミトコンドリア DNA の 224bp が調べられ、愛媛県産が日本独自の系統であることが示された (Suzuki et al., 1996)。形態学的研究の成果は哺乳類分類でよく引用される Mammal Species of the World (2005) に採用されている。しかし、国際自然保護連合のカワウソ専門家グループはこの分類を、情報不足を理由に見送っている。このように、本種の分類は世界的に一致した見解を得られていない。加えて、北海道・本州・四国集団の各集団から遺伝子を調べた研究は無く、日本列島内のカワウソ集団の形成史は全く分かっていなかった。本研究代表者は2個体 (神奈川県産・高知県産) の博物館標本からミトコンドリアゲノム (mtgenome) 配列 (約 16400bp) を決定し、分子系統解析により本州産個体はユーラシアカワウソ中国系統 (*Lutra lutra*) で、四国産個体は日本固有系統 (*L. nippon* もしくは *L. l. nippon*) と評価できる可能性を示した (Waku et al., 2016)。しかし、ここまでの研究では解析個体数が各系統1個体のみ、北海道個体が含まれていない。また、mtgenome では母系遺伝のみの系統類縁関係しか分からない。以上のように、これまでの研究データは限定的なデータにとどまっており、不十分な点が多い。

2. 研究の目的

本研究ではニホンカワウソの解析個体を増やし、集団内の遺伝的多様性をある程度網羅することで、ニホンカワウソ集団を理解することを目的とした。計画開始時点で北海道、本州、四国から合計10個体のニホンカワウソ標本試料を収集しており、それらの試料から mtgenome と一部の核 DNA 配列を調べ父系と母系の両系統から遺伝的な情報を得て、分子系統学的・集団遺伝学的知見からニホンカワウソの位置づけを明らかにすることを目的とした。当初の計画に加え、計画途中から研究員として所属した研究室で古代 DNA の全ゲノム解析手法を学習したため、一部の核 DNA 配列に限らず全ゲノムによる解析 (Whole Genome Analysis) による知見の取得を試みることも目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、古試料と現生種試料から DNA 抽出を行い、基本的に次世代シーケンサー (NGS) を用いてリードデータ取得し、解析に用いた。また、日本列島にて野生のカワウソが発見され、その糞試料もマルチプレックス PCR とダイレクトシーケンスを組み合わせ解析した。古試料・現生種試料ともに死亡個体を用いているため本研究のために動物の安楽死などは行っていない。

(1) DNA の抽出

古試料

博物館の標本試料から DNA 抽出を行う際は、現代の試料以上にコンタミネーションに気をつけなければならない。これは、博物館試料が作成者や管理者 (ヒト)、バクテリアやカビなどにより既に汚染されているうえ、薬剤と経年劣化で DNA が断片化し、総量も大きく減少しているからである。そこで本研究では、ニホンカワウソの試料からの DNA 抽出はすべてクラス 100 クリーンベンチ内もしくは東京大学の古代 DNA 専用クリーンルーム内で行った。クリーンベンチでは長手袋を、クリーンルームでは防塵服など組み合わせ新たなコンタミネーションが起きないよう細心の注意を払い行った。試料の部位は肉球・肉片・体毛・骨 (歯) を用いた。肉球や肉片試料からの DNA 抽出は Waku et al. (2016) で用いられた Qiagen の Blood and Tissue kit による抽出と、ヒト *Homo sapiens* の古試料からの DNA 抽出に用いられる限外ろ過の手法 (Gamba et al., 2014) を改変し行った。体毛試料の場合も Gamba et al. (2014) の手法を体毛試料の特性に合わせて改変して DNA 抽出を行った。骨試料からの DNA 抽出は Gamba et al. (2014) の手法にほぼ準拠して行った。DNA 抽出液は DNA ライブラリを作成するまで -80℃ で管理した。

現生種試料

ニホンカワウソに近縁とされる現生種のユーラシアカワウソ *Lutra lutra*、コツメカワウソ *Aonyx cinereus*、ピロードカワウソ *Lutrogale perspicillata* からドラフトゲノムデータを得るために、日本動物園水族館協会から試料を提供していただき解析した。試料は死亡個体の肉片か血液で、すべて Qiagen の Blood and Tissue kit を用いて抽出した。

日本で発見された野生のカワウソ試料

2017 年に対馬で発見された野生のカワウソの糞を収集し、Qiagen の QIAamp DNA Stool Mini Kit を用いて DNA を抽出した。

(2) DNA ライブラリの作成 (古試料と現生種試料)

古試料から NGS でリードデータを得るために必要な DNA ライブラリの作成は Waku et al. (2016) と同様に NEBNext Ultra ii DNA Library Prep kit for illumina を用いて行った。DNA ライブラリを作成する際に重要な DNA のインサート DNA は 60~300 塩基と古代 DNA のなかでは長鎖を対象とした場合と、古人骨と同様に 30~100 塩基と短く設定した 2 通りの方法を併用した。インサート DNA のサイズ選択は Bioanalyzer による抽出 DNA の断片長情報をもとに行った。

現生種試料の解析では PCR バイアスのない解析を目指し、TruSeq DNA PCR-Free を用いて DNA ライブラリを作成した。なお、現生種試料の DNA は長鎖のため illumina 社の NGS による解析に不向きのため超音波機器により適切な長さに切断し使用した。

(3) NGS による解析 (古試料と現生種試料)

古試料の DNA ライブラリ解析では illumina 社の MiSeq と HiSeq を併用して行った。DNA ライブラリのインサート DNA が比較的長い (~300 塩基) 場合は MiSeq を用い、インサート DNA が短い (~100 塩基) 場合は HiSeq による解析を行った。

現生種試料の解析では、インサートサイズによらず大量のデータを得るために illumina 社の HiSeq を選択して解析した。

(4) リードデータの初期解析 (古試料と現生種試料)

illumina 社の NGS による解析で得られたリードデータ (.fastq.gz) を FastQC プログラムでクオリティチェックしたのち、AdapterRemoval プログラムによるアダプター配列の特定・除去を行いリード配列から不要部分を除去した。不要部分が除去されたリードデータを bwa プログラムにより参照配列へのマッピングを行い、算出された sam データを samtools プログラムによってファイル形式調整をおこない bam データを得た。bam データは picard プログラムによるクリッピングデータの除去、DNA ライブラリ作成時の PCR により生じた重複リードの除去を行った。重複リードを除去した bam データを再度 FastQC プログラムにてクオリティチェックしマッピングされたリードデータがカワウソ由来であることを確かめ、mapDamage プログラムを用いて古代 DNA に特徴的なインサート DNA 末端のシトシン (C) 塩基のチミン (T) 塩基への化学的な変異度合いを確認した。

(5) マッピングされて得られた合意配列の確認 (古試料と現生種試料)

初期解析で得られた bam データを IGV プログラムで表示しマッピング状況を確認後、GenomeAnalysisToolKit を用いて SNP の抽出しマッピングの際に使用した参照配列との違いを反映した合意配列を得た。

(6) マルチプレックス PCR とダイレクトシーケンス (日本で発見された野生のカワウソ試料)

糞試料から抽出した DNA は Waku et al. (2016) で示されているマルチプレックス PCR のプライマーで DNA を増幅し、増幅産物をダイレクトシーケンスしミトコンドリア DNA の配列を得た。ダイレクトシーケンスで得られた配列データを連結し mtgenome 配列を決定した。

4. 研究成果

本研究の当初の目標は、ニホンカワウソ 10 個体を解析し mtgenome と一部の核 DNA 配列を得ることだった。本研究を実施した結果、複数個体から mtgenome 配列を決定した (成功個体数等は未公表のため非表示)。目標としていた一部の核 DNA 配列の取得は、研究期間途中で代表者がゲノム解析を行う研究室に転属しヒトの全ゲノム解析手法を学んだことから、全ゲノム解析に大きく変更を行った。一部の核 DNA 配列では父系をたどる解析にデータが足りなかった可能性が高いが、全ゲノム解析により父系情報を探る精度は飛躍的な向上が望める。その一方で、全ゲノム解析では当初の予定の何万倍のデータ量 (mtgenome のみであれば 1 万リード程度のところ、本研究の全ゲノム解析では数千万から最大 8 億リード) を扱うため、研究期間終了までに最終結果を出すことができなかった。そこで、ここでは公表済みの対馬で発見された野生カワウソの解析結果と、未公表データのうち示すことができる全ゲノム解析の途中結果を示す。

(1) 対馬で発見された野生カワウソの系統学的位置づけと周辺集団との関係

対馬で 2017 年に発見された野生のカワウソの糞を収集し、糞 DNA からカワウソの mtgenome 配列を決定し、系統解析を行った。さらに韓国や台湾・金門島のカワウソのミトコンドリア DNA ハプロタイプと比較し、今回発見されたカワウソの由来に迫った。

分子系統解析の結果、対馬で発見さ

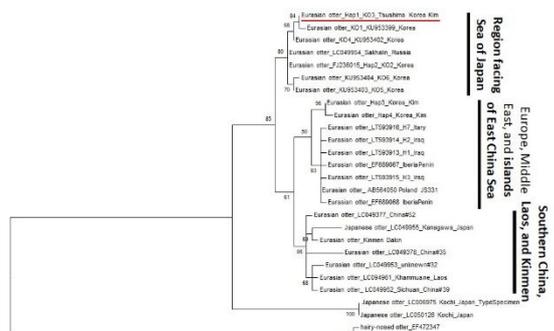


図 1. ユーラシアカワウソの系統樹。赤下線が対馬で発見された野生カワウソを示す。

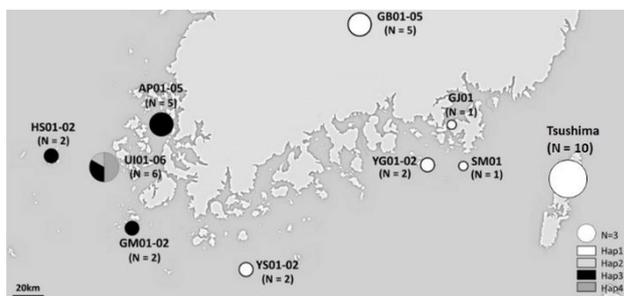


図 2. 対馬と韓国に生息するユーラシアカワウソのミトコンドリア DNA ハプロタイプ分布。N 数は個体数ではなく糞試料の個数を示す。

れた野生カワウソは、韓国に生息する集団と単系統群を形成した(図1)。さらにミトコンドリア DNA ハプロタイプの比較を行ったところ、半島とその東寄りの離島に生息する集団と同じことが判明した(図2)。このことから、2017年から対馬で生息が確認されているカワウソは、対馬に近い韓国の島々に生息している集団と非常に近縁と言える。また、ハプロタイプが同じことから、対馬と韓国の集団が何万年も隔離されている可能性も低い。このことから、今回対馬で発見された野生のカワウソは、かなり近い時代(数か月から数百年)に対馬に流れ着いた個体かその子孫と考えられる。これらの結果は現在、日本・韓国・台湾の共同研究グループで論文の投稿準備中である。

(2) 全ゲノム解析の途中経過

全ゲノム解析ではデータ量と計算量が莫大なため、国立遺伝学研究所の解析用スーパーコンピュータを利用し解析を進めている。本項目ではその途中経過を報告する。

mtgenome 配列決定と同様に全ゲノム配列の解析でも参照配列(リファレンス配列)が必要であるため、近縁種のユーラシアカワウソ、コツメカワウソ、ピロードカワウソのドラフトゲノム配列を得ることを試みている。上記三種類のカワウソから作成した DNA ライブラリをそれぞれ HiSeq の 1 レーンを用いて 90~100 ギガ塩基分のリードデータを得た。すなわち、約 300 ギガ塩基分のデータを得ている。これらのリードデータを、Beichman et al. (2019)で示されたオオカワウソ *Pteronura brasiliensis* とラッコ *Enhydra lutris* のゲノム配列にマッピングし、ドラフトゲノム配列を得ようとしている。3種から得たリードデータは PCR Free で作成した DNA ライブラリを解析したため重複配列はない。Bwa プログラムでマッピングした結果、約 30 カバレッジ(読み取り深度)のデータを得ている。

上記のように得られたドラフトゲノム配列のうち、ユーラシアカワウソの配列を参照配列としてニホンカワウソのリードデータを bwa プログラムでマッピングしたところ、状態がよくコンタミネーションが少ない個体からは 2 カバレッジに近い結果を得ている。また、全ゲノムをマッピングしたデータに古代 DNA が含まれるかを mapDamage で確認したところ C から T への変異を確認した(図3)。ただし、精査できていないドラフトゲノム配列を用いているため、カバレッジや C から T への変異度合いは今後変わる可能性も十分にある。しかし、現状のデータからだけでも、全ゲノム解析に最低限必要な生データを取得できたことがわかっている。今後も精力的に解析を進めていく。

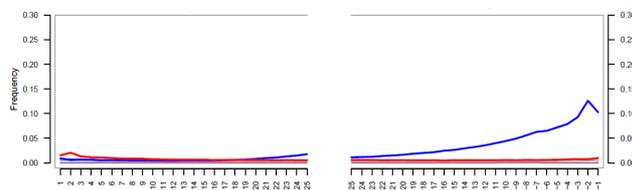


図3. ドラフトゲノムにマッピングされたニホンカワウソ DNA における C から T への変異度合い。図右側の青色線の立ち上がりはマッピングされたインサート DNA 末端における C から T への変異度合いを示す。

< 引用文献 >

- Beichman, A.C. et al. (2019) Aquatic Adaptation and Depleted Diversity: A Deep Dive into the Genomes of the Sea Otter and Giant Otter. *Mol Biol Evol.* 36:2631-2655
- Gamba, C. et al. (2014) Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nat. Commun.* 5:5257
- Imaizumi, Y. and Yoshiyuki, M. (1989) Taxonomic status of the Japanese otter (Carnivora, Mustelidae), with a description of new species. *Bull Natn Sci Mus, Tokyo, Ser A.* 15:177-188
- Suzuki et al. (1996) Phylogenetic position of the Japanese river otter *Lutra nippon* inferred from the nucleotide sequence of 224bp of the mitochondrial cytochrome b gene. *Zool Sci.* 13(4):621-626
- Waku, D. et al. (2016) Evaluating the phylogenetic status of the extinct Japanese otter on the basis of mitochondrial genome analysis. *PLoS one*, 11(3):e0149341.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 和久大介・佐々木剛 | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 生き物のいま ニホンカワウソ(1)複雑な成立過程を示唆するデータも:最新機器によるミトコンドリアDNA解析から | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 BIOSTORY | 6. 最初と最後の頁 49, 56 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 和久大介 | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 日本に生息していたカワウソの分類 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 ANIMATE | 6. 最初と最後の頁 52, 56 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 和久大介・関口猛・佐々木浩 |
| 2. 発表標題 対馬で発見されたカワウソの 分子系統学的位置づけ |
| 3. 学会等名 日本進化学会第20回大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 佐々木浩・関口猛・伊澤雅子・中西希・和久大介 |
| 2. 発表標題 長崎県対馬におけるカワウソの生息状況 |
| 3. 学会等名 日本哺乳類学会2018年度大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 寺田知功・吉田真也・和久大介・小川博 |
| 2. 発表標題 ムササビ (<i>Petaurista leucogenys</i>) の鳴き声に関する研究 |
| 3. 学会等名 日本哺乳類学会2018年度大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小嶋愛香・清水海渡・和久大介 |
| 2. 発表標題 ムササビ (<i>Petaurista leucogenys</i>) の糞DNA抽出法確立 |
| 3. 学会等名 日本哺乳類学会2018年度大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sasaki, H., Sekiguchi, T., Izawa, M., Nakanishi N., Waku, D., Yamane, A. |
| 2. 発表標題 Discovery of the Eurasian otter <i>Lutra lutra</i> in Japan |
| 3. 学会等名 14th International Otter Congress |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 和久大介・米澤隆弘・中野敬太・姉崎智子 |
| 2. 発表標題 2010年から2012年の群馬県 ツキノワグマのミトコンドリアDNA部分配列 に基づいた遺伝的集団構造の動態 |
| 3. 学会等名 日本哺乳類学会2017年度大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|-----------------------------|
| 1. 発表者名 和久大介 |
| 2. 発表標題 日本に生息していたカワウソの分類 |
| 3. 学会等名 農大動物研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 和久大介・佐々木剛・谷本真樹・米澤隆弘・姉崎智子 |
| 2. 発表標題 群馬県ツキノワグマのマイクロサテライト遺伝子座を用いた集団構造解明へ |
| 3. 学会等名 ぐんまの自然の「いま」を伝える報告会 2017 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 井上達彦 | 4. 発行年 2017年 |
| 2. 出版社 株式会社ニュートンプレス | 5. 総ページ数 160 |
| 3. 書名 月刊科学雑誌Newton 2017年11月号 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | | | |