

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06087

研究課題名(和文) モンゴル高山域に生息する大型草食動物の遺伝的多様性評価と保全単位の提言

研究課題名(英文) Examining genetic diversity and identifying management units of wild ungulates in mountainous areas of Mongolia

研究代表者

杉本 太郎 (Sugimoto, Taro)

兵庫県立大学・自然・環境科学研究所・特任助教

研究者番号：20570493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：モンゴルの山岳環境には希少な大型草食動物が生息しているが、生息地までのアクセスや試料採集の難しさなどから学術研究は遅れていた。本研究では生息地で採集した糞試料を活用し、十分なサンプル数に基づく解析を初めて実施した。ミトコンドリアDNA及び核DNAの解析から、野生ヤギの遺伝的多様性は高く、遺伝構造は存在するがボトルネックの痕跡はなく、安定した集団であることが示唆された。観察された地域集団を保全単位とし、地域集団間のコリドーを今後も維持することが保全上重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、野生ヤギの遺伝的多様性や遺伝構造について、十分なサンプル数に基づいた解析から明らかにすることができた。生息地で採集した糞からは、核DNAの解析に耐えうる十分なDNA量が抽出され、今後のモニタリング調査においても糞試料が有用であることが示された。野生ヤギは遺伝的多様性の高い、安定した集団であることが示唆されたが、生息地では鉱山開発やそれに伴う道路整備が進んでいることから、本研究の成果をベースに、今後も調査研究を継続することが重要である。

研究成果の概要(英文)：Studying the ecology of wild ungulates in the mountainous areas of Mongolia has been challenging due to difficulties in accessing their habitats and collecting analytical samples. This study, for the first time, investigated genetic diversity and genetic structure of endangered wild goats based on the sufficient number of samples. Mitochondrial and nuclear DNA analyses revealed that the wild goat population held a high level of genetic diversity with no bottleneck signatures and that genetic structure existed with a moderate level of connectivity among the observed genetic clusters. Given the ongoing habitat destruction due to exploitation of mineral resources and development, it is essential to conserve the corridor among the genetic clusters for protecting this species.

研究分野：保全生物学

キーワード：モンゴル アイベックス 糞DNA 遺伝的多様性

1. 研究開始当初の背景

(1) モンゴルのアルタイ山脈には高山性大型草食動物である野生ヤギ(アイベックス)や野生ヒツジ(アルガリ)が生息している。IUCNのレッドリストでは軽度懸念(アイベックス)と準絶滅危惧(アルガリ)に指定され、モンゴルでは両種とも保護対象種であり、狩猟は禁止されている(商業狩猟は除く)。生息地では、鉱山開発(主に石炭)やそれに伴う道路建設、密猟、カシミアの世界的な需要増による家畜頭数の増加などにより、生息環境は急速に悪化している。採掘される石炭は、国内需要を除くとほぼ全て中国に輸出されており、モンゴル西部・南部地域では中国へ伸びる舗装道路が急速に整備され、生息地の分断化が懸念されている。

(2) 鉱山開発と道路建設による生息地の分断化、密猟や商業狩猟、家畜頭数の増加による植生の劣化など、高山性大型草食動物の存続にとって危機的な状況であるにもかかわらず、パッチ状に分布する生息地間の連結性や遺伝的多様性に関する研究はこれまで行われてこなかった。研究が遅れている要因は、険しい山岳環境に起因する研究環境の厳しさや、警戒心が強いため近距離での観察や捕獲が困難な点などが挙げられる。

2. 研究の目的

(1) モンゴルの高山性大型草食動物の保全のためには、地域集団間の連結性を維持し、孤立化を防ぐことが重要である。集団の孤立化は、近親交配や遺伝的浮動による遺伝的多様性の喪失や劣性有害遺伝子の固定化を引き起こす。地域集団間の連結性を確保する保全対策のためには、各地域の遺伝的多様性、生息地間の遺伝的な連結性、そして環境要因が移動・分散に与える影響の解明が不可欠である。本研究では、モンゴルのアルタイ山脈に生息する大型草食動物の遺伝的多様性や遺伝構造を解明し、優先保護対策地域や保全単位の特を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 解析に用いる試料は、共同研究機関である WWF モンゴルのレンジャーを中心に、モンゴル西部のアルタイ山脈全域から採集した。見晴らしの良い尾根や山頂付近にフィールドスコープを設置し、野生ヤギ及び野生ヒツジの探索を行い、発見した場合はその場所まで移動して新鮮な糞を約 10 粒ほど採集した(図 1)。調査地で死骸を発見した場合は、筋肉組織が残っていればその一部を採集した(図 2)。採集した試料はプラスチックバッグに入れ、調査期間中は常温で保存し、調査終了後は DNA 抽出の実施まで冷凍庫で保存した。本研究では野生ヤギと野生ヒツジを研究対象としたが、調査地では野生ヒツジを観察することが難しく、採集した試料が僅かであったことから、野生ヤギに絞って解析を実施した。



図 1. 調査地で採集した野生ヤギの糞



図 2. 調査地で発見された野生ヤギの死骸

(2) 筋肉組織からの DNA 抽出は、QIAGEN 社製の組織用 DNA 抽出キットを使用した。糞からの DNA 抽出では、まず溶解バッファーに浸した綿棒で糞の表面を拭き、2ml チューブ内の溶解バッファーで数秒攪拌して糞表面に付着している細胞を採取した。抽出では筋肉組織と同様に、QIAGEN 社製の組織用 DNA 抽出キットを使用した。

調査地域は家畜のヤギやヒツジが放牧されているため、糞には家畜のものが含まれている可能性がある。そこでミトコンドリア DNA のチトクローム b 領域の一部を増幅するマーカー (Sugimoto et al. 2018) を用いて、塩基配列を決定することで種判定を行った。

(3) 遺伝的多様性はミトコンドリア DNA の Dloop 領域の塩基配列と、核 DNA のマイクロサテライト 18 遺伝子座の多型から調べた。塩基配列の決定では、ヤギ属で増幅が報告されている既存のマーカーに加えて、本研究で作製した内部プライマーを使用し、Dloop 領域全体の塩基配列を決定した。マイクロサテライトマーカーは、ヤギ属とヒツジ属で増幅が報告されているマーカー 18 個を選択し、5 つのマルチプレックス PCR で全遺伝子座の増幅が可能な実験系を構築した。組織試料の場合は 2 回、糞試料の場合は 3 回の遺伝子型決定を行い、データの精度を確保した。

Dloop の全塩基配列に基づく分子系統樹は、近隣結合法を用いて解析し、MEGA ソフトウェア 7.0.21 (Kumar et al. 2016) を使用して作成した。遺伝構造解析では、試料を地域的にまとめ

ることが難しいため、集団を仮定しない Structure 解析 (Pritchard 2000) 及び TESS 解析 (Chen et al. 2007) を実施した。

4. 研究成果

(1) 糞からの DNA 抽出では溶解バッファーと綿棒を用いて実施したが、糞表面をナイフで削りとり糞用 DNA 抽出キットを使用する方法よりも手間がかからず、迅速に作業が可能だった。また新鮮な糞試料であれば核 DNA の増幅は安定しており、糞試料の DNA 抽出では糞表面を拭う方法が有効であることが示唆された。

(2) ミトコンドリア DNA の塩基配列は 40 個体で決定し、18 種類のハプロタイプを確認した。系統樹は北と南で二つの系統に分かれたが、中間地域では両系統の個体が確認され、明瞭な境界は確認できなかった。

核 DNA のマイクロサテライトの遺伝子型は 45 個体で決定した。18 遺伝子座の内、1 遺伝子座で多型がなく、17 遺伝子座でまとめた場合、平均ヘテロ接合度の期待値は 0.69、平均対立遺伝子数は 7.8 であった (表 1)。マイクロサテライトの多型からは、ボトルネックの痕跡は確認されなかった。

遺伝構造解析では 3 つの遺伝的クラスターが支持された。ミトコンドリア DNA の解析と同様に、アルタイ山脈の北と南で異なる遺伝的クラスターとなった。山岳環境が連続して続く地域は一つのクラスターとしてまとめ、独立した山塊は別のクラスターとなり、低標高域に広がる平原が遺伝子流動に影響を与えていることが示唆された。

(3) ミトコンドリア DNA 及び核 DNA の解析から、アルタイ山脈の北と南の二つの地域を保全の単位としてとらえることが可能である。二つの地域間では遺伝子流動があり、地域間の連結性を今後も維持していくことが重要である。

全体で見れば遺伝的多様性の高い安定した集団であるが、山脈本体から離れた独立した山塊の集団は遺伝的多様性がやや低かった。この集団固有の対立遺伝子は無かったことから、山脈本体からの移住個体により形成されたシンク集団の可能性が高い。シンク集団は他にも複数存在している可能性が高く、ネットワーク構造の理解には、さらに範囲を広げた調査が今後必要である。現時点ではソース集団を優先保護対象とし、集団間のコリドーを維持しながらモニタリングを継続することが保全上重要であると考えられる。

< 引用文献 >

Chen C, Durand E, Forbes F, François O, Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study, *Molecular Ecology Notes*, 7, 2007, 747-756

Kumar S, Stecher G, Tamura K, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Molecular Biology and Evolution*, 33, 2016, 1870-1874

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P, Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*, 155, 2000, 945-959

Sugimoto T, Ito TY, Taniguchi T, Lkhagvasuren B, Oyunsuren T, Sakamoto Y, Yamanaka N, Diet of sympatric wild and domestic ungulates in southern Mongolia by DNA barcoding analysis, *Journal of Mammalogy* 99, 2018, 450-458

表 1. マイクロサテライト 17 遺伝子座の多様性

マーカー	ヘテロ接合度 期待値	ヘテロ接合度 観察値	対立遺伝 子数
1	0.89	0.82	14
2	0.88	0.69	13
3	0.85	0.78	12
4	0.85	0.93	12
5	0.85	0.91	9
6	0.82	0.84	10
7	0.82	0.91	10
8	0.74	0.47	5
9	0.74	0.67	6
10	0.67	0.69	7
11	0.63	0.51	5
12	0.64	0.67	7
13	0.59	0.53	6
14	0.57	0.42	5
15	0.57	0.42	5
16	0.44	0.29	3
17	0.11	0.11	4
平均	0.69	0.63	7.8

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉本太郎・Buyanaa Chimeddorj・Sergelen Erdenebaatar・Bayandonoi Gantulga・Ochirjav Munkhtogtokh
2. 発表標題 モンゴル高山域に生息するアイベックスの遺伝的多様性
3. 学会等名 日本DNA多型学会第30回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齊 恵元, 井上-村山美穂, 杉本太郎, 木下こづえ
2. 発表標題 血液および糞を用いた国内飼育下ユキヒョウの遺伝的多様性の解析（予報）
3. 学会等名 日本DNA多型学会第28回学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	ブヤナ チムドルジ (Buyanaa Chimeddorj)	WWF モンゴル	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

モンゴル	WWFモンゴル			
------	---------	--	--	--