

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：84315  
 研究種目：若手研究  
 研究期間：2019～2021  
 課題番号：19K15861  
 研究課題名(和文) 域内保全に向けたゲノムワイド・エピゲノム解析による希少動物の遺伝管理方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of genetic management methods for endangered animals by genome-wide and epigenome analysis for in situ conservation.

研究代表者  
 伊藤 英之 (Ito, Hideyuki)

京都市動物園・生き物・学び・研究センター・研究教育係長(獣医師)

研究者番号：10779648

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)：希少動物の保全には様々な知見が必要であり、遺伝子情報重要である。本課題では重要絶滅危惧種であるツシマヤマネコ、ヤブイヌ、フンボルトペンギン、グレビーシマウマのリファレンスゲノムを作製・公開した。  
 ツシマヤマネコについて、全ゲノム、マイクロサテライトマーカー、およびゲノムワイド解析の一つであるGras-Di解析を用いて遺伝的多様性の評価、ベンガルヤマネコ他集団との比較を行い、ツシマヤマネコが他集団よりも遺伝的多様性が低いことを明らかにした。チンパンジーとニホンザルにおいて、DNAの後天的な修飾であるDNAメチル化を指標とした年齢推定法を作成した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、多くの種が絶滅の危機にあり、これらの種の保全は重要な課題である。希少動物の保全には様々な知見が必要であり、遺伝情報の把握も重要である。  
 本調査では絶滅危惧種4種(ツシマヤマネコ、ヤブイヌ、グレビーシマウマ、フンボルトペンギン)の全ゲノム情報を取得し、リファレンスゲノムを作製・公開した。また、複数個体の全ゲノム情報を取得し、遺伝子の多様性に関する情報を取得した。全ゲノムから得られた遺伝的情報は、これまでの少数のDNAマーカーから得られた情報よりも、有用性が高く、遺伝的多様性の把握や疾患に関連する遺伝子の特定など、今後の遺伝管理に有益な情報になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Genetic information is important for the conservation of endangered animals because various findings are necessary for the conservation of endangered animals. In this project, reference genomes of the Tsushima leopard cat, bush dog, Humboldt penguin and Grevy's zebra, which are important endangered species, were produced and made public.  
 For the Tsushima leopard cat, we evaluated genetic diversity using whole genome, microsatellite markers, and Gras-Di analysis, a genome-wide analysis, and compared the Tsushima leopard cat with other Bengal leopard cat populations, and found that the Tsushima leopard cat has lower genetic diversity than other populations. In chimpanzees and Japanese macaques, we created an age estimation method using DNA methylation, an acquired employment of DNA, as an indicator.

研究分野：保全遺伝学、獣医学

キーワード：集団遺伝 絶滅危惧種 ツシマヤマネコ 年齢推定 全ゲノム解析 エピゲノム解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界自然保護連合 (IUCN) レッドリスト (2016 年 2 月) において、哺乳類 1208 種、鳥類 1375 種が絶滅危惧種に分類されている。

域外保全の繁殖計画において主な遺伝的目標は、ファウンダーの遺伝的多様性の保持、近親交配の回避、異系交配の回避、有害形質の回避、飼育環境への適応の回避である。域外保全のもっとも重要な拠点である動物園では、遺伝的多様性を保持するために家系情報 (血統登録) をもとに、繁殖計画を立案している。しかし、多くの種において血縁情報が不明確な個体が認められることや、野生集団の遺伝的多様性が不明であること、野生下から飼育下に導入したファウンダー個体の血縁関係の有無により、血統登録上の遺伝的多様性と実際に保持している遺伝的多様性に乖離が生じることがあり、正確な遺伝的多様性の把握は重要な課題となっていた。また、域外保全においては有害形質や飼育環境への適応については回避すべき課題であり、これらの形質と関連する遺伝的要因の特定が望まれている。しかし、飼育個体数・発症個体数が少数であるため、特定は困難であり、多くの有害形質の特定には至っていない。近年、遺伝子多型に依存しない後天的な修飾 (エピゲノム) や Copy Number Variants (CNV) と表現型との関連や、エピゲノムと近交弱勢との関連が示唆されているが (Vergeer et al., 2012) 報告されている種はまだ少なく、希少動物においてはエピゲノムや CNV と表現型との関連性を解析した例はほとんど見られなかった。

### 2. 研究の目的

従来の家系情報に基づく遺伝管理では不十分なことが示されており、分子遺伝学情報との統合が重要な課題となっている。また、次世代シーケンスの普及により、一度に数万単位の遺伝子型判定が可能となり、より詳細な遺伝子解析が可能となっている。希少動物の保全においても遺伝子解析からゲノム解析へと移行により、より適切な繁殖計画の立案が可能になると考えられる。有害形質関連遺伝子・適応関連遺伝子についても、従来の遺伝子解析では不可能であったが、ゲノムワイドな解析により関連する遺伝子を含む遺伝子領域であれば特定が可能であると考えられる。また、エピゲノム修飾や CNV などのゲノム情報は SNP 情報よりも多くの重要性を含んでいると考えられ、領域情報の集積は、表現型との関連解析や遺伝的多様性評価の新たな指標として、今後の遺伝管理に有用な情報を与えると考えられる。

本調査では、域外保全に求められる遺伝的管理の課題を解決するために、ゲノムワイドな遺伝子解析と従来の家系解析との統合モデルの確立、有害形質・適応関連遺伝子探索を目的とする。また、新たな遺伝的管理の指標となりうるエピゲノム・CNV について、ほとんど情報のない希少種において、エピゲノム修飾・CNV 情報を集積し、遺伝管理への応用の検討を目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、ゲノムワイドな遺伝子解析と従来の家系解析との統合モデルの確立、有害形質・適応関連遺伝子探索、エピゲノム情報の集積・遺伝管理への応用を目的に実施する。対象種は、野生個体群との比較が可能で国内における保全の優先度が高いツシマヤマネコ (*Prionailurus bengalensis euptilurus*)、ファウンダー数が少なく、複数個体から有害形質 (潜在精巢) が認められているヤブイヌ (*Speothos venaticus*)、申請者が個体群管理者であり、統合モデルを基に繁殖計画の立案が可能でグレビーシマウマ (*Equus grevyi*) の 3 種を中心に行った。

#### (1) ゲノム解析

次世代シーケンスにより遺伝解析の基盤となるリファレンスゲノムを作製した。ツシマヤマネコ、グレビーシマウマ、フンボルトペンギンではより詳細なリファレンスゲノムを作製するために、ショートリードシーケンスとロングリードシーケンスを行った。複数個体の全ゲノム情報を取得し、作製したリファレンスゲノム、データベースに登録された近縁種のゲノム情報を基に遺伝的多型情報を取得した。得られた遺伝情報を基に、ヘテロ接合率や血縁係数などの遺伝的多様性指標を算出した。

#### (2) エピゲノム解析

エピゲノム解析を用いた年齢推定法の確立では、フンボルトペンギン、チンパンジー、ニホンザルを対象とした。血液、糞の試料から DNA を抽出し、バイサルファイト処理によりメチル化シトシンをチミンに変化させた後、PCR 増幅やシーケンスし、メチル化の程度を検出し、年齢による差異を調べた。DNA メチル化の検出は、フンボルトペンギンでは全ゲノムのメチル化率を調べる全ゲノムバイサルファイトシーケンス、チンパンジーとアカゲザルでは PCR 産物の融解曲線の違いを利用してメチル化率を算出する High-Resolution Melting (HRM) 解析を

用いた。HRM は対象領域をリアルタイム PCR で増幅し、その配列の中のメチル化シトシンの割合を検出する。パイロシーケンスよりも正確性に劣るが、より安価で短時間に多数の試料を解析することができる。

#### 4. 研究成果

##### (1) ツシマヤマネコの遺伝的多様性

国内希少動物であるツシマヤマネコの野生個体を対象に、マイクロサテライト解析とゲノムワイド解析の一つである Genotyping by Random Amplicon Sequencing-Direct (GRAS-di 解析) を実施した。ベンガルヤマネコの韓国個体群の個体の塩基情報を基に作製されたマイクロサテライトマーカーを用いて、ツシマヤマネコの遺伝的多様性解析を行った結果、ツシマヤマネコは韓国集団と比較して、著しく低い遺伝的多様性しか有していなかった。Structure 解析及び主座標分析 (Principal Coordinate Analysis; PCoA) の結果、韓国個体群とは遺伝的分化が認められた (Ito and Murayama, 2019)。ツシマヤマネコの飼育集団と野生集団について、ネコ科動物で広く応用されているマイクロサテライトマーカーと GRAS-di 解析を用いて遺伝的多様性の評価を行った。いずれの方法においても野生集団と飼育集団では保持している遺伝的多様性にほとんど差がないことが示された (図 1, 表 1) (Ito et al., 2020, 2022)。

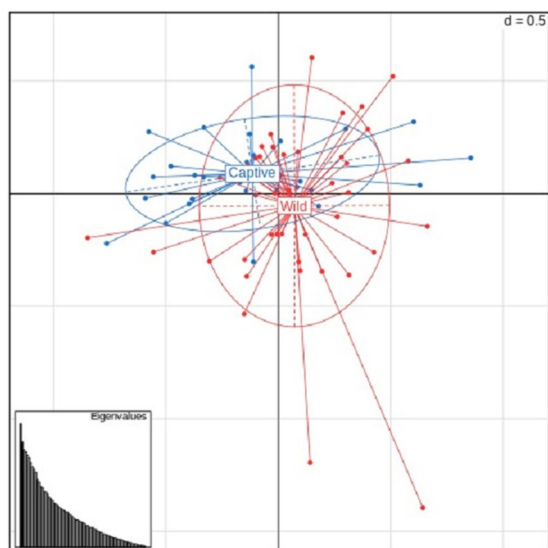


図 1 GRAS-Di 解析で特定した SNP を用いた主成分分析

表 1 飼育・野生集団の遺伝的多様性指標の比較

	<i>N</i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>A<sub>r</sub></i>	<i>PE</i>	<i>PID</i>	<i>PID-sib</i>
飼育	26.360	0.069	0.065	1.67	0.987	9.8E-09	1.1E-04
野生	44.424	0.076	0.074	1.82	0.993	7.2E-10	3.0E-05

*N*: 遺伝子型判定された個体数の平均, *H<sub>o</sub>*: ヘテロ接合観察値, *H<sub>e</sub>*: ヘテロ接合期待値, *A<sub>r</sub>*: アリル多様度, *PE*: 除外確立, *PID*: 個体を特定できる確率, *PID-sib*: 近縁個体で個体を特定できる確率

2018 年に DNA データベースに登録したツシマヤマネコドラフトゲノムの精度向上のために、ロングリードシーケンスを追加で実施し、リファレンスゲノムを更新・公開した。ツシマヤマネコ 4 検体の全ゲノム解析を実施し、ベンガルヤマネコのその他の集団 (や亜種) とヘテロ接合率と近交係数の比較を行った結果、ツシマヤマネコが他集団と比較し低いヘテロ接合率 (高い血縁係数) を持つことを明らかにした。また、Pairwise Sequential Markovian Coalescent (PSMC) 解析により、個体群動態を解析した。結果、100 万年前から 1 万年前にかけての個体群動態を明らかにし、100 万年前から 10 万年前にかけて、個体群サイズが増大し、10 万年前から 1 万年前にかけて個体群サイズが減少していることを明らかにした (図 2)。

本研究によりツシマヤマネコのゲノムレベルでの遺伝的多様性が明らかになった。また、飼育集団と野生集団の比較により、飼育集団の保持する相対的な遺伝的多様性が明らかになったことにより、遺伝管理の指針となると考えられる。

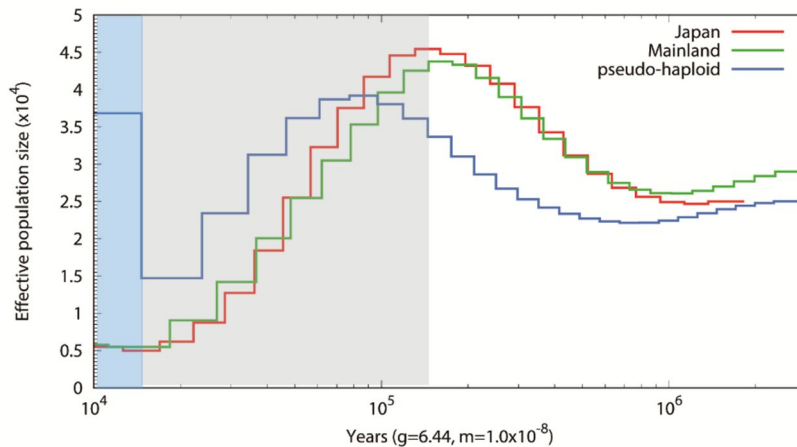


図2 ツシマヤマネコおよびベンガルヤマネコ（韓国個体群）の集団有効サイズの推移

#### (2) フンボルトペンギンのゲノム解析・エピゲノム解析

フンボルトペンギン 1 個体について、ショートリードによる NGS 解析を行い、リファレンスゲノムを作製し、公共データベースに登録・公開した。また、ロングリードシーケンスを追加で実施し、リファレンスゲノムを更新した（データは登録準備中）。

DNA メチル化の加齢における変化について、フンボルトペンギン 1 個体について全ゲノムバイサルファイトシーケンスを行った。フンボルトペンギンにおいてはゲノム全体のメチル化率は加齢により上昇することを示した（CpG は 66.5% から 68.6%、CHG は 2.2% から 2.5%、CHH は 2.7% から 2.9%）。

DNA のメチル化を指標とした年齢推定は、鳥類での報告例はまだ少ない。今後、メチル化率の大きく変動した部位を対象に多個体で解析することにより、フンボルトペンギンの年齢推定を実施する予定であり、得られたデータや方法は他の鳥類の性判別法の確立にも有用であると考えられる。

#### (3) ヤブイヌのゲノム解析

ヤブイヌ 1 個体について、ショートリードによる NGS 解析を行い、リファレンスゲノムを作製し、公共データベースに登録・公開した。4 個体の全ゲノム情報を取得した。

#### (4) グレビーシマウマのゲノム解析

グレビーシマウマ 1 個体について、ショートリードシーケンスおよびロングリードシーケンスを実施し、リファレンスゲノムを作製した。作製したゲノム情報は登録準備中である。

#### (5) 霊長類のエピゲノム解析

ニホンザルおよびチンパンジーの糞から抽出した DNA を用いて、DNA メチル化を指標とした年齢推定法の確立を試み、ニホンザルでは実年齢との誤差 5.51 年、チンパンジーでは 4.95 年の年齢推定が可能であった（中野ら、2019, 2020）。

DNA メチル化の測定によく用いられるパイロシーケンス法よりも安価な HRM 法を用い、非侵襲サンプルである糞から抽出した DNA を用いて、精度はまだ不十分ではあるが、年齢推定ができたことは非常に意義があると考えられる。本調査で用いた方法は他の野生動物でも応用可能であり、種の生態の解明などに有用であるとされる。

#### 文献

Ito H, Nakajima N, Onuma M, Inoue-Murayama M. Comparison of the Genetic Diversity of the Captive and Wild Populations of the Tsushima Leopard Cat Using a GRAS-Di Analysis. *Animals (Basel)*. 2022;12(11):1464. doi: 10.3390/ani12111464.

Ito H, Inoue-Murayama M. The Tsushima leopard cat exhibits extremely low genetic diversity compared with the Korean Amur leopard cat: Implications for conservation. *PeerJ*. 2019; 7:e7297 <https://doi.org/10.7717/peerj.7297>

Ito H, Nakajima N, Onuma M, Murayama M. Genetic Diversity and Genetic Structure of the Wild Tsushima Leopard Cat from Genome-Wide Analysis. *Animals*. 2020; 10(8):1375. <https://doi.org/10.3390/ani10081375>

中野 勝光、伊藤 英之、濱野 悠也、玉木 敬二、鷓殿 俊史、平田 聡、井上 - 村山 美穂：チンパンジーの糞試料由来の DNA を用いたメチル化解析による年齢推定, *DNA 多型* 27: 59-61, 2019.

中野 勝光、伊藤 英之、玉木 敬二、鈴木 崇文、井上 - 村山 美穂：ニホンザルにおける野生個体由来 DNA のメチル化解析による年齢推定. *DNA 多型* 28: 22-25, 2020.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ito Hideyuki, Nakajima Nobuyoshi, Onuma Manabu, Murayama Miho	4. 巻 10
2. 論文標題 Genetic Diversity and Genetic Structure of the Wild Tsushima Leopard Cat from Genome-Wide Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 1375 ~ 1375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ani10081375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 中野 勝光, 伊藤 英之, 玉木 敬二, 鈴木崇文, 井上-村山 美穂	4. 巻 28
2. 論文標題 ニホンザルにおける野生個体由来DNAのメチル化解析による年齢推定	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 21-25
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 -
1. 著者名 Ito Hideyuki, Inoue-Murayama Miho	4. 巻 7
2. 論文標題 The Tsushima leopard cat exhibits extremely low genetic diversity compared with the Korean Amur leopard cat: Implications for conservation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e7297 ~ e7297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7717/peerj.7297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 中野 勝光, 伊藤 英之, 濱野 悠也, 玉木 敬二, 鶴殿 俊史, 平田 聡, 井上-村山 美穂	4. 巻 27
2. 論文標題 チンパンジーの糞試料由来のDNAを用いたメチル化解析による年齢推定	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 59-61
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 ITO Hideyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Organization of Research and Education at the Kyoto City Zoo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine	6. 最初と最後の頁 109 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5686/jjzwm.24.109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Naoko, Saito Miho, Ito Hideyuki, Tanaka Masayuki, Yamanashi Yumi	4. 巻 38
2. 論文標題 Sleep related behaviors in zoo housed giraffes ( Giraffa camelopardalis reticulata ): Basic characteristics and effects of season and parturition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoo Biology	6. 最初と最後の頁 490 ~ 497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/zoo.21511	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Hideyuki, Nakajima Nobuyoshi, Onuma Manabu, Inoue-Murayama Miho	4. 巻 12
2. 論文標題 Comparison of the Genetic Diversity of the Captive and Wild Populations of the Tsushima Leopard Cat Using a GRAS-Di Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 1464 ~ 1464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ani12111464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ito H, Nakajima N, Onuma M, Murayama M
2. 発表標題 The genetic diversity, structure and demographic history in Tsushima leopard cat ( <i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i> ).
3. 学会等名 第14回アジア保全医学会・第27回日本野生動物医学会 2021年合同大会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mayako Fujihara, Kodzue Kinoshita, Hideyuki Ito, Satoshi Kusuda, Ryoma Otsuka, Takehito Kaneko, Takashi Nagamine, Manabu Onuma, Yumiko Nakaya, Takaharu Kawashima, Miho Inoue-Murayama
2. 発表標題 Ex situ conservation of endangered wildlife, Tsushima leopard cats and Okinawa rails, using germ cells.
3. 学会等名 第14回アジア保全医学会・第27回日本野生動物医学会 2021年合同大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤英之
2. 発表標題 ツシマヤマネコの遺伝子解析
3. 学会等名 公開シンポジウム「知りたい！ツシマヤマネコ保全の最前線」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野 勝光, 伊藤 英之, 濱野 悠也, 玉木 敬二, 鶴殿 俊史, 平田 聡, 井上-村山 美穂
2. 発表標題 霊長類における糞を用いたDNAメチル化解析による年齢推定
3. 学会等名 第35回日本霊長類学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 英之, 長尾 充徳, 釜鳴 宏枝, 岡橋 要, 和田 晴太郎
2. 発表標題 第二度無月経を呈したニシゴリラ ( <i>Gorilla gorilla</i> ) へのホルモン療法の一 例
3. 学会等名 第25回日本野生動物医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 英之, 村山 美穂
2. 発表標題 ツシマヤマネコにおける遺伝的多様性の評価 アムールヤマネコ韓国個体群 との比較
3. 学会等名 第25回日本野生動物医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野 勝光, 伊藤 英之, 玉木 敬二, 鈴木 崇文, 井上 村山 美穂
2. 発表標題 二ホンザルにおける野生個体由来 DNA のメチル化解析による年齢推定
3. 学会等名 DNA多型学会第28回学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 京都市動物園生き物・学び・研究センター	4. 発行年 2020年
2. 出版社 小さ子社	5. 総ページ数 176
3. 書名 いのちをつなぐ動物園	

〔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

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