

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06377

研究課題名(和文) 日本トキ集団の遺伝的多様性の評価・管理システムの構築

研究課題名(英文) Development of Genetic Diversity Evaluation System for 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：希少動物トキの保全においては、集団の遺伝的多様性の維持が求められる。本研究では、ゲノム情報を利用した日本トキ集団の遺伝的多様性の評価法の開発を進めた。はじめに、次世代シーケンサー(NGS)を利用した手法により、2018年に導入された新規始祖2個体に特異的なDNAマーカーを検出した。また、免疫応答に重要な主要組織適合遺伝子複合体(MHC)領域の多様性の解析では、始祖個体群7羽(従来の5羽と新規2羽)の持つMHC領域のハプロタイプが5種類であることを明らかにした。さらに、272個のDNAマーカーとMHC領域遺伝子型を同時にタイピングするmultiplex-PCR/NGS法をおおよそ確立した。

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、ゲノム情報を利用した遺伝的管理が求められる。250以上のDNA多型マーカーを判定する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と期待される。

研究成果の概要(英文)：The Japanese crested ibis (*Nipponia nippon*) is an endangered avian species. It is an important issue to conserve genetic diversity in the Japanese population of this species. While the Japanese population of *N. nippon* had been originated from 5 founders provided by the Chinese government, additional 2 founders were introduced in 2018. To evaluate effects of novel 2 founders for genetic diversity, we carried out a reduced representation libraries (RRL) and next-generation sequencing (NGS) method using these genome DNAs, resulting the detection of 203 and 485 novel founder-specific alleles. In the analysis of polymorphisms in the major histocompatibility complex (MHC) region among 7 founders, showed that the number of MHC haplotypes containing MHC class II region and one MHC class I gene locus was 5. major A novel genotyping method for MHC genotypes and 272 informative markers including SNPs and STRs were developed using multiplex PCR and NGS.

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 ゲノム DNA多型マーカー 主要組織適合遺伝子複合体
次世代シーケンサー multiplex-PCR

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、研究者個人に帰属します。

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、現在、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。このプロジェクトにおいては、トキが生存可能な環境や生態系を創出・保全することが重要な課題であるが、同時に、トキ集団の遺伝的多様性の維持にも十分な配慮が必要である。このような遺伝的管理の実現には、ゲノムワイドの DNA 多型マーカーを活用した遺伝的多様性の評価法の開発が必須となる。また、免疫系で中心的な役割を持つ主要組織適合遺伝子複合体(MHC)領域の多様性は、集団の生存性に関わる指標として重要視されている。

日本トキ集団は、1999年から2007年に中国から寄贈された5個体を始祖として形成されてきた。我々は、これらの始祖5個体を対象に Reduced representation library(RRL)法と次世代シーケンサー(NGS)を利用した手法を用いて、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))を検出した。さらに、日本トキ集団の遺伝的多様性が極めて低いと予想されることから、ゲノム全域をカバーする数百程度の DNA 多型マーカーを使用することで遺伝的多様性の評価が可能であると想定し、有効なマーカーの選抜および簡便かつ低コストのマーカータイピング法として multiplex-PCR と NGS を組み合わせた新たな手法の開発を進めてきた。また、MHC 領域の多様性の解析では、従来の始祖5個体が持つ MHC クラス II ハプロタイプは3種類のみであることが明らかにした。

しかし、2018年10月に中国より新たに2個体が導入されたため、日本トキ集団の遺伝的多様性や MHC 領域の多様性に対する新規始祖個体導入の影響を調査する必要性が生じた。MHC クラス II 領域の多様性に関しては、新規始祖個体1羽が新たなハプロタイプを持つことが示され、始祖7個体でのハプロタイプ数は4種類であることがあきらかになった。しかし、MHC クラス I 領域を含む MHC 領域全体での多様性については、まだ解析が進んでいなかった。さらに、日本トキ集団の遺伝的多様性の評価法の開発では、新規始祖2個体の影響を考慮したマーカータイピング法の再構築が求められた。

2. 研究の目的

はじめに、2018年10月に新たに導入された新規始祖2個体に対し RRL/NGS 法を実施し、既存の始祖5個体のデータと統合して DNA 多型マーカー候補を検出するとともに、新規始祖個体のみが保有する特異的なマーカーアレルを同定する。次に、得られた全 DNA 多型マーカーの情報を用いて、日本トキ集団の始祖7個体間の遺伝的関係を調査する。さらに、上記の解析で同定された新規始祖個体特異的なアレルを含むマーカーを追加し、合計 200-300 程度の SNP/STR マーカーと MHC ハプロタイプを同時かつ低コスト・簡便に判定する新たなタイピング法を再構築し、遺伝的多様性評価・管理システムを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)新たに導入された始祖2個体に特異的なマーカーアレルの検出

2018年導入された始祖2個体のゲノム DNA をサンプルとして、ゲノムの相同な領域を抽出するために RRL 法(ゲノム DNA を制限酵素 HaeIII または MboI で切断した後、250-350bp のサイズ範囲の DNA 断片を抽出した)を使い、抽出された全 DNA 断片の両端 150 塩基の配列を NGS で決定した。各個体からの RRL は異なるタグ配列を付加することで区別し、個体ごとの各マーカーの遺伝子型情報が得られるようにした。既存の始祖5個体について同じ手法で取得している配列データと統合し、相同領域の配列を比較、さらに一連のフィルタリング処理を実行することでゲノム全域から DNA 多型マーカー候補を検出するとともに、新規始祖個体に特異的なマーカーアレルを同定した。

(2)始祖7個体の MHC ハプロタイプの解析

MHC クラス I 領域の多様性に関しては、中国トキ集団において5つの MHC クラス I 遺伝子座のうち3遺伝子座で多型が検出されている。しかし、日本トキ集団については検討されていない。そこで、日本トキ集団の始祖7個体のゲノム DNA を対象として、MHC クラス II 領域に最も近い MHC クラス I 遺伝子座(UAA)について、中国集団の配列データに基づきアレル特異的な PCR プライマーを設定し、UAA 遺伝子座の多型および MHC クラス II ハプロタイプとの連鎖について検討した。

(3)新たな始祖2個体を加えた始祖7個体間の遺伝的関係の解析

上記の解析で得られた全 DNA 多型マーカーの遺伝子型および MHC ハプロタイプ型情報を用いて、主成分分析などのデータ解析を実施し、始祖7個体間の遺伝的関係を検討した。

(4)multiplex-PCR と NGS を利用した中規模のマーカータイピング法の再構築

従来の始祖5個体を対象として検出された3万個以上の DNA 多型マーカー候補(SNP および

STR)から、日本トキ集団に有効と考えられる約200のDNA多型マーカーを選抜し、これらのDNA多型マーカーの遺伝子型を判定する新規の手法として、multiplex-PCRとNGSを組み合わせたタイピング法の開発を進めてきた。始祖個体が7羽に増加したことに対応するために、新たに導入された始祖2個体特異的マーカー各15種類を追加し、275座位のDNA多型マーカーとMHC領域をタイピングするmultiplex-PCR反応系を再構築した。その際、50種類のプライマーを混合し7本のPCR反応で全マーカーを増幅する場合と、100種類のプライマーを混合し4本のPCR反応で全マーカーを増幅する場合の2種類のmultiplex-PCR条件を設定した。新たな反応系を用いて、新規始祖2個体のゲノムDNAをサンプルとしてmultiplex-PCR/NGS法によるタイピングを実施した。当初、NGSによる配列データの取得は専門業者への委託により実施していたが、2021年度からは別のプロジェクトで共同研究を実施している兵庫県立大地域資源マネジメント研究科内藤研究室にイルミナ社のNGS(iSeq100)が導入されたことから、iSeq100を利用するように計画を変更した。これに伴い、NGSライブラリーの作製法およびiSeq100のラン条件についても検討した。また、NGSで得られた配列データの解析についても、専門業者への委託から遺伝情報処理ソフトウェアGENETYX Ver.15(ゼネティクス社)を使用した自身の研究室内で実行可能な解析法に変更し、エラーデータの削除やマーカー型判定基準の設定など、最適な手法について検討した。

4. 研究成果

(1)新たに導入された始祖2個体に特異的なマーカーアレルの検出

新規の始祖2個体のゲノムをサンプルとしてRRL/NGS法の実施し、各個体について約16Gbの配列データを得た。既存の始祖5個体について同様の方法で取得した配列データと統合してフィルタリング処理を実行した結果、15,647個のSNP候補が検出された。始祖7個体間での各マーカー候補の遺伝子型データの比較から、新規始祖2個体特異的アレルとして203個と485個を同定した。この結果は、新規の始祖2個体の導入が、日本トキ集団の遺伝的多様性の拡大に十分寄与することを示唆した。

(2)始祖7個体のMHCハプロタイプの解析

MHC領域の多様性については、既に始祖7個体ではMHCクラスII領域のハプロタイプが4種類(HP1-4)であることを明らかにしている。今回、MHCクラスII領域近傍のMHCクラスI遺伝子(UAA)を含む領域のハプロタイプの解析を実施した。その結果、UAA遺伝子座には2アレル(UAA01とUAA02)が存在し、HP1に対してはUAA01とUAA02が検出されたが、HP2とHP4はUAA02と、HP3はUAA01と連鎖しており、MHC領域全体でのハプロタイプ数が5であることが示された。

(3)新たな始祖2個体を加えた始祖7個体間の遺伝的関係の解析

上記の解析で得られた15,647個の全マーカーの遺伝子型およびMHCハプロタイプ型情報を用いて始祖7個体間の遺伝的関係を解析した結果、主成分分析において新規始祖個体のうち1羽が他の始祖個体から離れた位置にプロットされ、従来の始祖個体と遺伝的に大きく離れていることが示唆された。

(4)multiplex-PCRとNGSを利用した中規模のマーカータイピング法の開発

各サンプルに対しmultiplex-PCRを実施した後のNGSライブラリーの作製には、NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (NEW ENGLAND BioLabs社)を使用した。1つのサンプルのmultiplex-PCRのPCR反応液を等量ずつ混合した後、Wizard SV G1 and PCR Clean-Up System (Promega社)を用いてPCR産物を精製し、NanoDropにて定量した。その後、上記のLibrary Prep Kitのプロトコルに従い、NGSでのシーケンスに必要なアダプターおよびインデックスを付加した。各サンプルのNGSライブラリーを等量ずつ混合した後、SPRIselect (BeckmanCoulter社)で低分子のDNA断片を除去し、再度Wizard SV G1 and PCR Clean-Up System (Promega社)にて精製したものをiSeq100のサンプルとした。iSeq100にアプライするNGSライブラリー濃度を変え、何回かのiSeq100ランを実施した結果、アプライするNGSライブラリー濃度は200-300pMが適切であることが示唆された。

最終的に、新規始祖2個体に対し2つのmultiplex-PCR条件(プライマー50種類あるいは100種類を混合)の4サンプルでのiSeq100ランでは、各サンプルにつき0.2~0.3Gbの配列データが得られた。

GENETYX Ver.15を使用したデータ解析では、各DNA多型マーカーのすべてのアレル配列をリファレンス配列として、Identity 100%の条件でiSeq100により得られた配列データをマッピングし、それぞれのDNA多型マーカーアレルのマッピングされた配列データの数をカウントすることでタイピングが可能であった。multiplex-PCR条件に関しては、50種類のプライマーを混合した場合に比べ、100種類を混合した場合では増幅されないマーカー座位がいくらか増加したことから、50種類のプライマーを混合する条件がより適切と判断された。

タイピングの結果に関しては、まだ、DNA多型マーカーごとに得られる配列データの量にかなりのばらつきがあり、マッピングされる配列データ数が不十分なマーカー座位が存在するため、タイピング可能なDNA多型マーカー座位数は253個であった。MHCクラスII領域については正しいタイピング結果が得られ、DNA多型マーカーとの同時のタイピングは可能であった。

このように、multiplex-PCR と NGS を利用した中規模のマーカータイピング法の開発に関しては、multiplex-PCR から iSeq100 での配列データ取得までの一連の実験条件、ならびに遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX を使用したデータ解析法までのおおよそのプロトコルを確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷口幸雄、陳泓宇、横井伯英、山田宜永、金子良則、祝前博明
2. 発表標題 2018年に中国より導入されたトキ個体に特異的なSNPアリルの検出
3. 学会等名 日本畜産学会第129回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳泓宇、谷口幸雄、横井伯英、山田宜永、金子良則、祝前博明
2. 発表標題 DNAマーカーを利用した中国から導入されたトキ始祖7個体の遺伝的関係の解析
3. 学会等名 関西畜産学会第70回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口幸雄、横井伯英、山田宜永、金子良則、祝前博明
2. 発表標題 中国より新たに導入されたトキ2個体のMHCクラスIIハプロタイプの解析
3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会第21回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口幸雄、横井伯英、山田宜永、金子良則、祝前博明
2. 発表標題 日本トキ集団の始祖7個体のMHCハプロタイプの解析
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
4. 発表年 2021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
研究分担者	山田 宜永 (YAMADA Takahisa) (40253207)	新潟大学・自然科学系・教授 (13101)	

	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	祝前 博明 (IWAISAKI Hiroaki)	新潟大学・自然再生学研究センター・特任教授 (13101)	
研究協力者	金子 良則 (KANeko Yoshinori)	佐渡トキ保護センター	
研究協力者	横井 伯英 (YOKOI Norihide)	京都大学・農学研究科・教授 (14301)	
研究協力者	陳 泓宇 (Chen Hongyu)	京都大学・農学研究科・大学院生 (14301)	
研究協力者	内藤 和明 (NAITO Kazuaki)	兵庫県立大学・地域資源マネジメント研究科・准教授 (24506)	

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
---------	---------