

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310170

研究課題名(和文) 絶滅のおそれのあるツキノワグマ孤立個体群におけるMHC遺伝子の多様性評価

研究課題名(英文) Genetic diversity of the MHC DQB gene in black bear populations of western parts of Japan

研究代表者

石橋 靖幸 (Ishibashi, Yasuyuki)

独立行政法人森林総合研究所・関西支所・チーム長

研究者番号：80353580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,100,000円、(間接経費) 2,130,000円

研究成果の概要(和文)：西中国および東中国山地のツキノワグマ個体群は、それぞれ「絶滅のおそれのある地域個体群」に指定されている。ツキノワグマのMHCクラスII DQB遺伝子第2エクソン(270塩基対)の多様性を西日本の6つの地域個体群間で比較した結果、特に西中国個体群において、対立遺伝子の数が少なく、ヘテロ接合度が著しく低いことが明らかになった。また、先行研究との比較から、北近畿以西の地域個体群、及び四国個体群において、20世紀末の個体数減少時にその遺伝的多様性を大きく減らした可能性があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We compared genetic diversity of the second exon (270 bp) of the MHC DQB gene among six black bear populations in western part of Japan. Western-Chugoku population, which is isolated from others, had only three alleles (i.e. sequences) and showed the lowest heterozygosity because of the frequency distribution considerably biased to one of the alleles. Comparison with a precedent study implied that allele numbers decreased quickly in the examined populations, because those populations declined considerably at the end of the last century.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：保全生物 遺伝的多様性 孤立個体群 MHC

1. 研究開始当初の背景

ツキノワグマは国内の生息数が数万頭と推定されているにもかかわらず、狩猟や有害駆除により、毎年1,000～3,000頭の個体が捕殺されている。また、人間活動の影響により各地でツキノワグマの生息地の分断・孤立化が進んでいる。環境省の第4次レッドリスト(2012)では、1950年代以降の確実な生息情報がないために九州地方のツキノワグマは「絶滅」とされ、紀伊半島、東中国地域、西中国地域、四国山地、下北半島のツキノワグマは「絶滅のおそれのある地域個体群」に指定されている。

森林総合研究所関西支所では、西日本各地において狩猟や有害駆除等により捕獲されたツキノワグマの組織標本を多数収集し保存している。これらの標本を対象に中立なDNAマーカー(ミトコンドリアDNAやマイクロサテライトDNA)を用いて行った研究から、東中国と西中国地域の個体群、特に西中国個体群の遺伝的多様性は、本州中部～東北地方に連続的に分布するツキノワグマ個体群と比べて遺伝的多様性が低いことが明らかになっている。だが、タンパク質を作る機能を有する遺伝子(機能遺伝子)の多様性の多寡については、適切な評価手法が確立されていないため、明らかにされていない。

主要組織適合遺伝子複合体(MHC)は、脊椎動物の細胞表面に存在する細胞膜貫通型糖タンパク分子である。外部由来の抗原を認識してT細胞に提示することで、細菌やウイルスなどの病原体の排除に関与するため、免疫反応にとって極めて重要な働きをしている。野生動物の地域個体群においてMHC遺伝子の多様性が低下した場合、様々な種類の病原体に適切に対応できず、集団内に病気が蔓延する可能性がある。そのため、MHC遺伝子は、脊椎動物の機能遺伝子のなかでもっとも多様性に富んでおり、その多様性の維持は野生動物個体群の保全にとって重要である。

2. 研究の目的

脊椎動物のMHCクラスII分子では、ベータ遺伝子の第2エクソン部分を作るタンパク質の部分が多様な病原体を認識する際に特に重要な働きをしている。このため、一般に、この領域をコードする塩基配列の多様性が著しく高い。本研究では、先行研究(引用文献1と2)で示された方法を用いて、MHCクラスIIベータ遺伝子第2エクソン部の塩基配列の多様性を西日本各地の地域個体群に由来するツキノワグマの標本を対象に明らかにする。そして、個体群間で比較することにより、「絶滅のおそれのある地域個体群」の西中国、および東中国個体群におけるこの遺伝子の多様性の多寡を明らかにする。さらに、先行研究との比較によってMHC遺伝子の多様性の経時変化を検討し、個体群の孤立・小集団化がMHC遺伝子の多様性に及ぼす影響について明らかにする。

<引用文献>

1. Yasukochi, Y., et al. (2010). *Genes & Genetic Systems* 85: 147-155.
2. Yasukochi, Y., et al. (2012). *BMC Evolutionary Biology* 12: 230.

3. 研究の方法

(1)1991～2013年の間に集めた434個体分のツキノワグマ標本(筋肉、肝臓、血液)からDNAを抽出し、MHCクラスII DQB遺伝子の第2エクソン部(270塩基対)の塩基配列を解読した。分析に用いた標本の由来する府県とその内訳(採取年と標本数)は以下の通りである: 広島県(2002-2013, n=66)、島根県(2009-2013, n=96)、鳥取県(1998-2013, n=83)、兵庫県(1996-2000, n=18)、京都府(1991-2013, n=83)、滋賀県(1996-2006, n=7)、福井県(1996-2006, n=55)、石川県(2012-2013, n=14)、富山県(2011-2013, n=3)、高知県(2007-2012, n=9)。

(2) 分析対象とした6つの地域個体群を図1に示す。東中国山地個体群 (EC) と北近畿西個体群 (WNK) の境界は円山川、WNK 個体群と北近畿東個体群 (ENK) の境界は由良川である。ENK と北陸個体群 (HOK) の間は、琵琶湖北部に捕獲のない地域があったため、そこを境界とした。6つの地域個体群に含まれる府県の構成は、以下の通りである：WC (広島、島根、鳥取)、EC (鳥取、兵庫)、WNK (兵庫、京都)、ENK (京都、福井、滋賀)、HOK (福井、石川、富山)、SK (高知)。

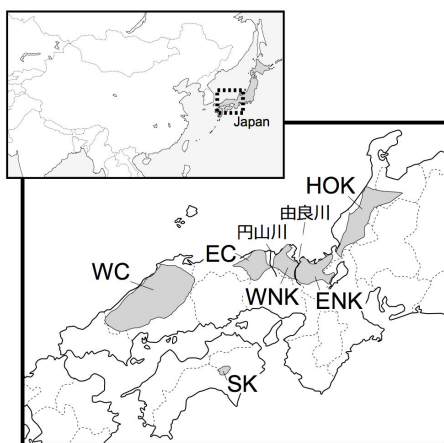


図1. 分析対象とした6つの地域個体群

(3) 先行研究で示された方法に従って PCR 増幅を行い、MHC クラス II DQB 遺伝子の塩基配列を決定した。2012 年度の末までは、Yasukochi ら (2010) のプライマー対 (URDQBex2-F1 と-R1) を用いて、第2エクソン (270 塩基) 及び隣接するイントロン領域の約 400 塩基対を PCR 増幅して、塩基配列を決定した。2013 年度以降に新規に分析した標本については、Yasukochi ら (2012) のプライマー対 (URDQBex2-F4 と-R4) を参考に第2エクソン周辺の約 300 塩基対の PCR 増幅を行って塩基配列を決定した。ただし、2012 年度までに調べた塩基配列の解析から、プライマー URDQBex2-F4 と-R4 が対合する部位に塩基置換を持つ対立遺伝子が存在することがわかってきたため、Yasukochi ら (2012) の URDQBex2-F4 と-R4 の配列の一部を縮重させた縮重プライマー URDQBex2-F4d と-R4d を使

用した。さらに、Yasukochi ら (2012) により、URDQBex2-F1 と-R1 を用いた場合、増幅されない対立遺伝子が生じる可能性が示されたため、先に URDQBex2-F1 と-R1 を用いた解析において同型 (ホモ) 接合体だった個体について、プライマー URDQBex2-F4d と-R4d を用いて、再度、PCR 増幅を行って塩基配列を解読した。

(4) PCR 産物の精製後、ABI 社オートシーケンサー PRISM 310、3100-Avant、あるいは 3130 により塩基配列を決定した。Yasukochi ら (2012) により、国内各地のツキノワグマが保持する対立遺伝子の塩基配列の情報が報告されているため、本研究ではホモ接合の個体のみならず、異型 (ヘテロ) 接合の個体についても、PCR 後のクローン化の過程を経ずにオートシーケンサーの電気泳動図から直接その塩基配列を解読した。

4. 研究成果

(1) 434 個体の MHC クラス II DQB 遺伝子の第2エクソン領域の塩基配列を解読した結果、7 種類の異なるアミノ酸配列をコードする 9 種類の塩基配列が観察された (0101, 0201, 0202, 0301, 0302, 0401, 1401, 2601, 3301)。3301 以外は、全て Yasukochi ら (2012) が報告しているタイプであった。

(2) 北陸個体群 HOK は、他のどの個体群よりも保持している対立遺伝子の数が多く、8 種類の対立遺伝子を保持していた (表 1)。中国山地の東西の個体群 (WC と EC) は、それぞれ 3 種類の対立遺伝子を持ち、どの個体群にも見られる 0101 だけを共通して持っていた。北近畿の 2 つの個体群 (WNK と ENK) は、共通する 4 種類の対立遺伝子を保持していた。EC が保持していた 3 種類の対立遺伝子は全て東隣の WNK でも見つかった。四国個体群 SK は、WC や HOK でも見られた 2 種の対立遺伝子を持っていた。

(3) WC のヘテロ接合度は、他と比べて著しく低かった。一つの対立遺伝子 (0101) が対立遺伝子頻度の 9 割を占めたため、0.2 以下の非常に低いヘテロ接合度を示した。他の 5 つの地域個体群では、ヘテロ接合度は 0.4 以上の値を示した。

(4) MHC 遺伝子にかかる選択圧を調べるため、ハーディー・ワインベルグ平衡の検定を行った。標本を集めた時期のばらつきが検定結果に影響する可能性があるため、2001～2013 年の標本 (n=362) に限定して分析を行ったところ、標本の採取地に偏りがあると思われる HOK では有意なズレが検出されたが ($P < 0.001$)、他の 5 つの地域個体群では平衡からの有意なズレは検出されなかった。

(5) 地域個体群間の遺伝的交流の程度について明らかにするため、2001～2013 年に取られた標本を対象に、本州西部の 5 つの地域個体群の間で遺伝的分化の程度を推定した。現在、他の地域と交流がなく孤立した状態にあると考えられている WC とその東隣の EC の間の遺伝的分化の大きさは、他の組み合わせと比べて著しく高く ($F_{st}=0.2$)、隣接する地域個体群間の組み合わせでは、この値だけが 0 と有意に異なっていた。これまでの中立な DNA マーカーを用いた研究から WC-EC 間の遺伝的交流は非常に少ない状態、つまり EC は孤立した状態にあると考えられてきたが、今回の結果もこの考えを支持している。

(6) Yasukochi ら (2012) は、本研究で対象とした地域個体群に 37 種類の異なる対立遺伝子が存在することを示した。だが、本研究では、彼らと同じ PCR プライマーを用いて塩基配列を決定したにもかかわらず、9 種類しか確認できなかった。また、分析個体数が同数の SK を除き、いずれも分析した個体数は先行研究よりも多いにもかかわらず、本研究

で確認された対立遺伝子数は各個体群において先行研究よりも少なかった (表 1)。Yasukochi ら (2012) は、本研究で用いた標本よりも古い年代の標本を主に用いていた (安河内 私信)。対立遺伝子数の違いは、それぞれの地域個体群に低頻度で存在していた対立遺伝子が、20 世紀の末に個体数が激減した際に遺伝的浮動や近親交配により消失したことを示していると考えられる。

表 1. 対立遺伝子数の Yasukochi ら (2012) との比較。括弧内の数字は、分子が Yasukochi ら (2012) が調べた個体数、分母が本研究で調べた個体数を示している。

個体群	確認された対立遺伝子の数	
	Yasukochi ら (2012)	本研究
WC (53/164)	10	3
EC (8/95)	7	3
NK (23/102)	8	4
HOK (36/64)	18	8
SK (9/9)	6	2

NK は北近畿個体群の WNK と ENK を合わせた集団。

(7) 本研究の成果は、本州西部のツキノワグマ地域個体群の保全に対して重要な視点を与えるものである。これまでの中立な DNA マーカーを用いた研究結果と同様に、西中国個体群 WC において MHC 遺伝子の多様性が著しく低いことが明らかになった。また、北近畿以西の各地域、及び四国のツキノワグマ個体群では、前世紀の末に個体数が減少した際にそれぞれ MHC 遺伝子の多様性が減じたことが示唆された。野生生物の地域個体群の遺伝的多様性は、その種が長い時間を掛けて進化の過程で少しずつ獲得してきたものである。一旦消失すると、他の集団からの移入がない限り、すぐには回復しない。現時点では西日本のツキノワグマに感染症が流行しているとの情報はなく、ハーディー・ワインベルグ平衡の検定結果も個体の生存が特定の対立遺伝子に依存していないことを示唆しているが、MHC 遺伝子が著しく多様性を失った状態にある西中国個体群では、早急に何らかの対策を施して多様性を高める必要があるだろう。西中国個

体群は他との遺伝的交流がほとんどない孤立した状態にあると考えられることから、東方の地域個体群との遺伝的交流を促すため、本州西部の各地域個体群を連続的につなぐようにツキノワグマの生息に適した環境を持つ生態的回廊を作る必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

石橋靖幸、ツキノワグマ孤立個体群の保全にむけて-遺伝的多様性を把握する-、森林総合研究所関西支所研究情報、査読無、104、2012、3

〔学会発表〕(計4件)

Oi T., Tado H., Fujii T., Sawada S., Kanamori H., "Expansion of distribution and spacio-temporal change of density of black bears (*Ursus thibetanus*)." Asian Society of Zoo and Wildlife Medicine Combined Conference 2013、2013年10月26日、Institute of Technical Education College West (シンガポール)

Oi T., Tado H., Fujii T., Sawada S., Kanamori H., "Geographical population structure of the expanding Asiatic black bear population in Japan." 22nd International Conference on Bear Research and Management、2013年9月18日、Brigham Young University (アメリカ)

石橋靖幸、大井徹、澤田誠吾、西信介、中国山地ツキノワグマ個体群におけるMHCクラスII β遺伝子の多様性、日本哺乳類学会2012年度大会、2012年9月21-22日、麻布大(神奈川)

大井徹、西中国山地「絶滅の恐れのあるクマ」のゆくえ、日本クマネットワークシンポジウム(招待講演)、2012年2月26日、広

島市まちづくり市民交流プラザ(広島)

6. 研究組織

(1)研究代表者

石橋 靖幸 (ISHIBASHI YASUYUKI)
森林総合研究所・関西支所・チーム長
研究者番号：80353580

(2)研究分担者

大井 徹 (OI TORU)
森林総合研究所・野生動物研究領域・領域長
研究者番号：10201964