



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

分子生物学的手法を基盤とした希少動物における繁殖情報の検出と応用に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高見, 一利 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2471">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2471</a>

氏名（国籍）	高見一利（兵庫県）
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	農博甲第130号
学位授与年月日	平成10年9月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	分子生物学的手法を基盤とした希少動物における 繁殖情報の検出と応用に関する研究
審査委員	主査 静岡大学教授 番場 公雄 副査 静岡大学教授 森 誠 副査 岐阜大学教授 上吉 道治 副査 信州大学教授 太田 克明 副査 鹿児島大学教授 吉田 光敏

## 論文の内容の要旨

本論文は、雌雄判別が困難である哺乳類（第1章）や鳥類（第2章）について、採取が容易である羽毛あるいは羽軸を検体として性判別を行う方法を確認し、また、現在、3亜種に分類されているコアラ（*Phascolarctos cinereus*）について、ミトコンドリアDNAチトクロムb遺伝子領域の塩基配列から遺伝的な多様性を明らかにし（第3章）、これらの情報を希少動物の繁殖計画に応用することを目的としている。

### 第1章 哺乳動物における体毛を用いた性判別

5頭のオオアリクイ（*Myrmecophaga tridactyla*）、4頭のココノオビアルマジロ（*Dasyurus novemcinctus*）および4頭のシマハイエナ（*Hyaena hyaena*）より体毛を採取し、毛根からDNAを抽出した。ヒトY染色体上に見いだされたSex-determining Region of chromosome Y（SRY）遺伝子をもとに設計されたプライマーを用いてpolymerase chain reaction（PCR）を実施した結果、雄ではDNAフラグメントの増幅が認められたが、雌では認められなかった。雄に特異的なDNAフラグメントの増幅は、1本の毛根より抽出したDNAを試料とした場合でも明瞭に検出できた。オオアリクイにおいて、このフラグメントの塩基配列を決定したところ、ヒトのSRY遺伝子の塩基配列と高い相同性を示した。

### 第2章 鳥類における羽毛を用いた性判別

鳥類の羽軸から抽出したDNAを用いて、性判別を試みた。

まず、ニワトリ（*Gallus gallus domesticus*）W染色体特異反復配列遺伝子をもとに

設計されたプライマーを用い、10目11科14種16品種の鳥類の雌雄から調製したDNAについてPCRを行った。その結果、ニワトリの3品種を除き、雌特異的DNAフラグメントの増幅は認められず、本法はニワトリの雌雄判別にのみ有効であることが明らかとなった。つぎに、シジュウカラ (*Parus major*) において見いだされた avian chromodomain-helicase-DNA-binding W-linked(CHD-W) 遺伝子と CHD non W-linked(CHD-NW) 遺伝子をもとに設計したプライマーを用いてPCRを実施した後、制限酵素処理により雌雄差の検出を試みた。CHD-W遺伝子は多くの鳥類のW染色体上に存在し、また同遺伝子と相同的なCHD-NW遺伝子は雌雄共通に存在する。PCRにより、対象としたすべての種で、増幅されたフラグメントによる標的バンドが雌雄ともに1本認められた。6目7科9種の鳥類について制限酵素 *Dde*I 処理を行ったところ、キジ科 (*Phasianidae*) とインコ科 (*Psittacidae*) に属する4種では雌個体のみ2本のバンドが確認され、雌雄の判別が可能であったが、他の科に属する種においては雌雄とも2本のバンドが形成され、判別は不可能であった。一方、9目10科12種の鳥類について制限酵素 *Hae*III 処理を行ったところ、キーウイ (*Apteryx australis*) を除き、雄では標的バンドの消失とともに2本の新たなバンドの形成が形成され、雌では標的バンドに加えて2本の新たなバンドが形成され、雌雄の判別が可能であった。なお、キーウイでは雌雄ともに標的バンドの変化は認められなかった。本研究で検討した羽軸を用いた性判別法は胸峰類には有効であるが、平胸類への適用は困難であることが分かった。

### 第3章 コアラにおけるミトコンドリアDNAチトクロムb遺伝子の遺伝的多様性

3亜種、27個体のコアラから体毛、血液あるいは肝臓を検体として採取し、DNAを調製後、有袋類のチトクロムb領域塩基配列をもとに設計したプライマーを用いてPCRを実施した。得られた増幅産物の塩基配列をダイレクトDNAシーケンス法を用いて調べた。その結果、対象としたチトクロムb遺伝子領域の307塩基対の配列には4塩基の置換が存在することを明らかにした。対象とした個体は3種のDNAハプロタイプに分類され、さらに2種のアミノ酸タイプに大別できた。しかし、これらの分類は従来の亜種分類とは一致しなかった。

本研究で有効性が確認された雌雄判別方法や遺伝的多様性の評価方法は、野生動物の繁殖計画を策定するうえで広く利用できることが示唆された。

## 審査結果の要旨

平成10年7月31日(金)に、静岡大学農学部において、5名の審査委員を含め関連教官及び学生の出席のもとに、高見一利氏の論文公開発表会を行った。引き続き論文内容を中心に審査を行った。本論文の概要と審査結果は下記のとおりである。

本研究は、希少野生動物の繁殖計画を策定するうえで重要な性判別や個体群の遺伝的多様性の解析を、分子生物学的手法を用いて行うことを目的としている。

学位論文の第1章及び2章は、外見上性判別の難しい哺乳類と鳥類について、サンプル採取が容易な体毛あるいは羽軸を用いて行う性判別法に関する研究成果を、第3章は、3亜種に分類されているコアラ (*Phascolarctos cinereus*) について、ミトコンドリアのチトクロムb遺伝子をもとに、遺伝的な違いを解明した研究成果をまとめたものである。

第1章：外見上の性判別の困難な動物として、オオアリクイ (*Myrmecophaga tridactyla*)、ココノオビアルマジロ (*Dasypus novemcinctus*) およびシマハイエナ (*Hyaena hyaena*) を対象とし、毛根からDNAを抽出し、sex-determining region of chromosome Y (SRY) 遺伝子をもとに設計したプライマーを用いて、polymerase chain reaction (PCR) で増幅を行った。その結果、いずれの動物においても雄ではDNAフラグメントの増幅が認められたが、雌では認められなかった。また、雄に特異的なフラグメントは、1本の毛根を試料とした場合も明瞭に検出が可能であった。さらに、オオアリクイにおいてこのフラグメントの塩基配列を決定したところ、ヒトのSRY遺伝子塩基配列と高い相同性を示した。

オオアリクイに関する成果は、J. Repr od. Dev. (日本繁殖生物学会英文誌) 第44巻第1号、73-78頁に掲載された。

第2章：14種の鳥類の羽軸根からDNAを抽出し、ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) W染色体特異反復配列遺伝子をもとに設計したプライマーを用いてPCRを実施した結果、雌に特異的なDNAフラグメントの増幅がニワトリにおいてのみ認められたが、他の種においては認められなかった。ついで、シジュウカラ (*Parus major*) で発見されたavian chromodomain-helicase-DNA-binding W-linked (CHD-W) 遺伝子と、CHD non W-linked (CHD-NW) 遺伝子をもとに設計したプライマーを用いてPCRを実施した。PCR増幅産物を制限酵素 *Hae* III 処理し、DNA断片の変化から、対象とした胸峰類鳥類の全種において性判別が可能であることを明らかにした。

第3章：コアラは生息地域により、外部形態が異なり、現在3亜種に分類されている。これら3亜種について、ミトコンドリアDNAチトクロムb遺伝子の塩基配列をPCR及びダイレクトDNAシーケンス法を用いて決定し、遺伝的多様性を調べた。チトクロムb遺伝子領域の307塩基対の配列には4塩基の置換が存在することを明らかにした。対象とした27個体は3種のDNAハプロタイプに分類され、さらに2種のアミノ酸タイプに大別できた。しかし、これらの分類は従来の亜種分類とは一致しなかった。

これらの結果は、J. Vet. Med. Sci. (日本獣医学会会誌) 第60巻第10号に掲載される予定である。

本研究は、内容的にも新規性があり、開発された手法は、申請者が勤務する動物園での飼育動物や、絶滅の危機に瀕する野生動物の繁殖計画を策定するうえで今後、大きく寄与するものと思われる。

審査員全員が一致して、本論文を高く評価し、岐阜大学大学院農学研究科の学位論文として価値あるものと認定した。