

学 位 論 文 題 名

Molecular Phylogeny and Genetic Variation of the Deer in Japan and China

（日本および中国におけるシカ類の分子系統と遺伝的変異）

学位論文内容の要旨

ニホンジカ *Cervus nippon* の環境収容力を越える生息数の拡大により、日本各地で植生の破壊が社会問題となっている。そのような地域では駆除によって本種の個体数管理が行われているが、適正な保護管理体制については検討の余地が残されている。本研究は、野生生物の保護管理に対する基礎データとしてニホンジカの遺伝的特徴および遺伝的多様性を明らかにすることを目的とした。

まず、中国産シカ類および日本産ニホンジカの分子系統学的解析をすることによって、ニホンジカのシカ類における系統学的位置を明らかにすることを試みた。中国産シカ類 10 種（ジャコウジカ科：3 種、シカ科：7 種）と日本産ニホンジカについてミトコンドリア DNA のチトクローム b 遺伝子を PCR 法で増幅し、塩基配列（352 塩基）を決定した。中国および日本に産するシカ類のチトクローム b における種内変異は同じ程度を示した（1.1%–1.8%）。塩基配列の違いにもとづいて分子系統樹を作製したところ、各科、各亜科および各種はそれぞれのクラスターを形成した。このように中国産シカ類および日本産ニホンジカの分子系統は従来の形態系統分類と一致したため、分子系統進化が形態進化と同調していることが考えられた。

次に、ニホンジカ種内の遺伝的多型および地域系統関係を明らかにするために、日本産ニホンジカについてミトコンドリア DNA チトクローム b 遺伝子（352 塩基）および D-loop 領域（697 塩基）を PCR 法で増幅し、塩基配列を決定した。塩基配列の違いからそれぞれの領域の分子系統樹を作製した。種内の遺伝的多型の検出には、より変異性の高い D-loop 領域の塩基配列の分析がチトクローム b の分析よりも有効であると考えられた。日本産ニホンジカは形態学的な研究から 6 亜種に分類されているが、遺伝的には北日本（北海道および本州）グループと南日本（九州以南）グループの 2 つの系統に明瞭に分かれた。このことから本種は少なくとも 2 つの母系祖先から派生していることが考えられた。対馬個体群については本州の集団（ホンシュウジカ）に含む説や本個体群を別種にする説などさまざまな報告が存在するが、本研究におけるミトコンドリア DNA の分子系統解析から対馬個体群は南日本グループの系統に含まれることが明らかになった。北日本と南日本、

北日本と中国、および南日本と中国の集団間遺伝的距離は同程度だったため、これらの3集団は同一祖先からほぼ同時期（約40–100万年前）に分化したことが示唆された。また、分析した全てのニホンジカのD-loop領域には1回から4回の繰り返し配列（各39塩基）およびそれに隣接し繰り返し配列の一部を持った不完全配列（27塩基）が存在した。北日本グループの個体は3回または4回の繰り返し配列があり、南日本グループの個体は1回または2回の繰り返しをもっていた。繰り返し配列の構造においても南北のグループに明瞭な違いがあった。

ニホンジカ地域集団の遺伝的構成を明らかにするために、北海道集団（エゾシカ）でD-loop領域の塩基配列の多型を検出した。エゾシカ集団（141個体）では602塩基中4ヶ所のみで塩基の置換がみられ、6つのD-loopハプロタイプ（a-fタイプ）が存在した。そのことからエゾシカ集団には少なくとも6つの母系集団の存在が示唆された。塩基配列の違いにもとづいて作製した分子系統樹から、それぞれのタイプは互いに非常に近い関係にあることが示唆された。6タイプのうち、a-タイプ（36.9%）およびb-タイプ（41.8%）が優占しており、エゾシカ集団中に占めるこれら2タイプの割合は合計78.7%だった。それぞれのハプロタイプの分布は異なっており、a-、b-およびc-タイプの分布は北海道における針葉樹林の分布と類似していた。本研究の結果とエゾシカの分布地域拡大の傾向を総合して考察すると、主に3つの集団（阿寒集団、大雪集団、日高集団）をもとに、針葉樹林を経由してエゾシカは分布地域を拡大してきたと考えられた。次に、エゾシカ集団について3つのマイクロサテライトDNA（OarFCB193, INRA040, BOVIRBP）における対立遺伝子を見だし、それぞれの対立遺伝子頻度から平均ヘテロ接合度を算出した。他の集団（千葉集団）との比較を行うことによりエゾシカ集団の遺伝的多様性を検討した。エゾシカ集団はOarFCB193とINRA040では2つ、BOVIRBPでは1つの対立遺伝子を持っていたのに対し、千葉集団はOarFCB193とINRA040では5つ、BOVIRBPでは2つの対立遺伝子を持っていた。さらにエゾシカ集団の平均ヘテロ接合度（0.222）は千葉集団（0.361）より低い値を示した。北海道開拓以前（明治時代以前）エゾシカは道内に広く分布をしていたが、狩猟や1879年の大雪の影響によって一時は絶滅寸前にまで個体数が激減した。しかし近年は、個体数および分布域が急速に拡大している。エゾシカ集団はこのように少なくとも1回のボトルネックを経験しており、エゾシカ集団の相対的に低い多様性は過去に経験したボトルネックの影響を強く受けていることが示唆された。

本研究によって、中国産シカ類と日本産ニホンジカのミトコンドリアDNAの遺伝的多型を検出する分子生物学的手法が確立された。それにより、中国産シカ類と日本産ニホンジカの分子系統およびニホンジカ集団の遺伝的多様性が明らかになった。本研究は中国および日本のシカ類の系統進化や、ニホンジカの亜種分類および集団遺伝学的分析に有用な情報をもたらすものと思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 東 正 剛

副 査 教 授 吉 田 勉 弘

副 査 教 授 阿 部 永 (農学部)

副 査 教 授 大 泰 司 紀 之 (大学院獣医学研究科)

学 位 論 文 題 名

Molecular Phylogeny and Genetic Variation of the Deer in Japan and China

(日本および中国におけるシカ類の分子系統と遺伝的変異)

ニホンジカは繁殖力に富み、日本各地で植生破壊や農作物被害をもたらしており、その個体数管理は野生生物管理上重要な課題の1つとなっているが、その地史的由来や亜種間の系統関係には未だ不明な点が多い。本研究はミトコンドリアDNAやマイクロサテライトDNAを分析することにより、ニホンジカ地域集団およびその近縁シカ類の分子系統関係を明らかにするとともに、野生生物を管理する上で近年重視されつつある集団内遺伝的多様性を明らかにしようとするものである。

本論文は2章からなる。第1章では、まずミトコンドリアDNAのチトクロームb遺伝子をPCR法により増幅して塩基配列(352塩基)を決定し、中国のシカ10種(ジャコウジカ科3種、シカ科7種、中国産ニホンジカを含む)と日本産ニホンジカの分子系統関係を明らかにした。その結果は従来の形態分類にもとづく系統樹とほぼ一致し、これらのシカ類においては形態進化と分子進化がほぼ同調していることが示唆された。中国の研究者との共同研究により、本来入手困難な中国産シカ種の生体組織をこれほど多数手に入れて得られた本成果は評価に値する。

本章では、さらにミトコンドリアDNAのD-loop領域内の697塩基をPCR法で増幅し、ニホンジカ種内の地域系統関係を明らかにした。日本産ニホンジカは体サイズなどの形態差にもとづいてホンシュウジカ、エゾシカ、キュウシュウジカ、ケラマジカ、マゲシカ、ヤクシカの6亜種に分類されているが、ミトコンドリアDNA分析の結果、まず北海道および本州の北日本グループと九州以南の南日本グループの2系統に分類されることが明らかとなった。特に、これまでホンシュウジカの中に含まれていた対馬の集団はむしろ南日本グループに属することや、独立性が高いと考えられていたエゾシカがホンシュウジカにかなり近いことは注目すべき結果である。また、中国産ニホンジカ集団を含む3グループ間の遺伝的距離はほぼ同じであり、これら3集団は同一祖先集団からほぼ同時期分化したことが示唆された。偶蹄類におけるチトクローム遺伝子やD-loop領域の分子進化速度か

ら分化時期は約40万年から100万年前と推定された。

第2章では特にエゾシカ集団に着目し、そのDNA解析を行った。まず、北海道各地から得られた141個体の生体組織からミトコンドリアDNAのD-loop領域内602塩基の配列を決定した。その結果4塩基で多型が検出され、これにもとづいて141個体はaからfまでの6つのハプロタイプに分類されたが、a、b、cの3タイプが全体の90%を占めており、それぞれ阿寒周辺、大雪周辺、日高周辺に分布の中心を有している。これらの地域は針葉樹林の分布中心域でもあり、1880年前後に絶滅寸前まで減少したとされるエゾシカの個体数が針葉樹林域を中心に回復したことを示唆している。

次に、核DNAについてもいくつかのプライマーを用いて分析したところ、3つのマイクロサテライトDNA領域OarFCB193, INRA040, BOVIRBP において多型を検出した。そこで千葉のホンシュウシカ集団についてもこれらの領域の多型を調べたところ、いずれにおいても対立遺伝子数がエゾシカ集団より多く、平均ヘテロ接合度もエゾシカ集団で0.222 だったのに対し、千葉では0.361 というやや高い値を示した。エゾシカ集団における低い遺伝的多様性にも1880年前後に生じたボトルネックの効果が影響しているものと思われる。

以上の結果により、1) 中国および日本産シカ類の分類体系が分子系統解析結果ともほぼ整合すること、2) 日本へのシカの進入が過去に少なくとも2回生じたこと、3) エゾシカ集団の遺伝的多様性は低く、これは恐らく過去に生じたボトルネック効果によるものであり、針葉樹林域を中心に個体数が回復していることなどが明らかとなった。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が研究者として誠実かつ熱心であり、博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。