

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	掛橋 竜祐
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
<p style="text-align: center;">Development of molecular markers for the endangered <i>Babina</i> species (Anura: Ranidae) and classification of its phylogenetic position</p> <p style="text-align: center;">(絶滅危惧種無尾類 <i>Babina</i> 属 (アカガエル科) に関する分子マーカーの開発と系統学的位置の解明)</p>			
論文審査担当者			
主 査	教 授	矢尾板芳郎	
審査委員	教 授	安井 金也	
審査委員	教 授	山口富美夫	
〔論文審査の要旨〕			
<p><i>Babina</i> 属はアカガエル科の分類群で、現在主流の分類体系では 10 種を含むとされている。そのうち、日本では、南西諸島にホルストガエル (<i>B. holsti</i>)、オットンガエル (<i>B. subaspera</i>)、ヤエヤマハラブチガエル (<i>B. okinavana</i>) の 3 種が分布している。これまでの研究で、ホルストガエルとオットンガエルは、系統学的に他の 8 種とは別のクレードを形成することが示されている。また、原記載において、<i>Babina</i> 属は、ホルストガエルとオットンガエルのみを含んでいるため、それ以外の種は別属とみなす分類体系もある。このため、本研究では、ホルストガエルとオットンガエルを狭義 <i>Babina</i> 属、それ以外を広義 <i>Babina</i> 属とする。アカガエル科における <i>Babina</i> 属の系統学的位置に関してはいくつかの先行研究がある。しかし、それらの解析では、<i>Babina</i> 属の系統的位置は一致せず、また系統樹の統計的支持率も低いことから、アカガエル科における <i>Babina</i> 属の位置や、本属に最も近縁なアカガエル類についてはこれまで統一見解が得られていなかった。また、本邦産 <i>Babina</i> 属 3 種では、もともとの生息域が狭いことに加え、近年の開発などによる生息地の減少が懸念されており、3 種ともに IUCN のレッドリストで絶滅危惧 IB 類に指定されている。</p> <p>申請者は、<i>Babina</i> 属の未解決系統問題にアプローチするため、豊富な塩基配列情報と、ゲノム構造変化という特殊な系統マーカーが利用できるミトコンドリアゲノム (以下ミトゲノム) に注目した。そして、本邦産 <i>Babina</i> 属全種についてミトゲノム全塩基配列を決定し、アカガエル科内の <i>Babina</i> 属の系統的位置の解明を試みた。さらに、種の効果的な保全を行う上では、管理単位や優先的に保護すべき集団の決定が重要である。これらを規定するためには、遺伝子マーカーを用いて集団構造や遺伝子流動などの生物学的特性を理解する必要がある。ミトゲノムの遺伝子は、保全研究上必須である種内の遺伝子マーカーとして利用できることが知られているため、ミトゲノム遺伝子 (全 37 種) のうち、<i>Babina</i> 属における種内解析に最も有効な遺伝子について検討した。一方で、ミトゲノム遺伝子は母系遺伝要素しかとらえられず、また、単一遺伝子座としてしか扱えないなどの欠点も存在する。そのため、より詳細な種内レベルの研究を行うためには、突然変異率の高い共優性マーカーが必要となる。そこで狭義 <i>Babina</i> 属に注目し、この 2 種に有効なマイクロサテライトマーカーの開発を行った。</p>			

第1章において、本邦産 *Babina* 属 3 種（狭義 2 種、広義 1 種）と、本属の近縁属の一つとされる *Lithobates* 属のウシガエル (*L. catesbeianus*) について、ミトゲノムの全塩基配列を決定した。さらにこれまでにミトゲノムが報告されている他のアカガエル類を加え、ミトゲノムの 37 遺伝子について塩基置換率を比較した。その結果、*nad5* 遺伝子の塩基置換速度が速く、かつ、塩基数も長かったため、この遺伝子が *Babina* 属における種内の遺伝的多様性を調べる上で有効なマーカーとなりうることが分かった。次に、ミトゲノムの全ての ribosomal RNA 遺伝子とタンパク質遺伝子の塩基配列を用いて最尤法および Bayes 法で系統樹を構築した。その結果、*Babina* 属は *Odorrana* 属と単系統群を形成し、さらに *Lithobates* 属がその姉妹群となった。*Babina*+*Odorrana* 属クレードは最尤法のブートストラップ値で 67.8 %、ベイズ事後確率では 98.8 %で支持された。また、*Babina* 属とウシガエルのミトゲノムの構造に関する今回の解析から、ウシガエルではアマガエルやヒキガエルやトノサマガエルなど他の一般的なカエル亜目と同様の遺伝子配置を持っているのに対し、*Babina* 属の 3 種ではそれとは異なり、tRNA-His 遺伝子が D-loop 領域下流へ転座していた（一部 tRNA 遺伝子は偽遺伝子化している）。この構造を *Odorrana* 属と比較したところ、同様の派生的な配置が観察された。この tRNA-His 遺伝子の位置は、*Babina* 属と *Odorrana* 属の共有派生形質であると考えられ、ミトゲノムの構造からも、*Babina* 属の最近縁属が *Odorrana* 属であることが示唆された。

第2章では、狭義 *Babina* 属の 2 種において使用可能であるマイクロサテライト遺伝子座を同定した。オットンガエルにおいては、8 個のマイクロサテライト遺伝子座がすでに報告されていたが、親子鑑定や個体識別といった個体レベルの解析にはさらに多くの遺伝子座を用いることが望ましいため、新たに 8 つの遺伝子座を単離した。オットンガエル集団において、今回新たに単離した 8 個のそれぞれの遺伝子座のアリル数と期待ヘテロ接合度はそれぞれ 5 - 12 および 0.620 - 0.905 であった。さらに、既知の遺伝子座と新しい遺伝子座の合計 16 遺伝子座をホルストガエルで検証したところ、12 遺伝子座において、オットンガエルと同程度の多型性があることが確認された。これらのマイクロサテライト遺伝子座は集団間の研究から個体レベルの研究までさまざまなスケールに対して有効であると思われる。

本研究により、*Babina* 属の系統学的問題を解決することができたことは高く評価される。また、本研究で同定したミトゲノム遺伝子とマイクロサテライト遺伝子座を用いることで、絶滅危惧種である狭義 *Babina* 属の 2 種に対し、保全研究において重要な幅広いスケールの研究を遂行できると期待される。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士（理学）の学位が授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

Takehashi, R., Kurabayashi, A., Oumi, S., Katsuren, S., Hosono, M., & Sumida, M. (2013). Mitochondrial genomes of Japanese Babina frogs (Ranidae, Anura): unique gene arrangements and the phylogenetic position of genus Babina. *Genes & Genetic Systems*, 88(1), 59–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23676710>

Takehashi, R., Igawa, T., Iwai, N., Shoda-Kagaya, E., & Sumida, M. (2013). Development and characterization of new microsatellite loci in the Otton frog (*Babina subaspera*) and cross-amplification in a congeneric species, Holst's frog (*B. holsti*). *Conservation Genetics Resources*, 5, 1071–1073. doi:10.1007/s12686-013-9981-x

参考論文

Kurabayashi, A., Takehashi, R., Tazawa, I., Haramoto, Y., Oshima, T., Ito, Y., & Sumida, M. (2014). Improved Transport of the Model Amphibian, *Xenopus tropicalis*, and Its Viable Temperature for Transport. *Current Herpetology*, 33(1), 75–87. doi:10.5358/hsj.33.75

Shan, X., Xia, Y., Takehashi, R., Kurabayashi, A., Zou, F.-D., & Zeng, X.-M. (2014). Complete mitochondrial genome of *Amolops mantzorum* (Anura: Ranidae). *Mitochondrial DNA*, 1736, 1–3. doi:10.3109/19401736.2014.913152