

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	Nasrin Sultana
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>Phylogenetic relationship and population structure of Asian tiger frogs (genus <i>Hoplobatrachus</i>) from Bangladesh and neighboring countries elucidated by mtDNA and microsatellite markers (ミトコンドリア DNA 及び、マイクロサテライトマーカーに基づくバングラデシュとその周辺諸国に産するトラフガエル類の系統関係及び集団構造に関する研究)</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>無尾目・ヌマガエル科・トラフガエル属 <i>Hoplobatrachus</i> には、アジアからアフリカにかけて分布する 5 種のカエルが存在するが、その起源はアジアとされている。そのうち、インドトラフガエル <i>H. tigrinus</i> と <i>H. litoralis</i>、<i>H. chinensis</i>、<i>H. crassus</i> の 4 種は南アジアを中心に、アジア広域に分布する。近年これらのカエルの生息環境は急激に変化しており、各分布地の個体群の大きさは減少著しいと考えられている。実際、インドトラフガエルは、バングラデシュにおいては絶滅のおそれのある野生動植物種の国際取引に関する条約 (CITES) で II 類に指定されており、早急な保全対策が必要である。しかしながら、保全を行う上で必要不可欠な情報であるトラフガエル類の各種内における遺伝的多様性の実体や、その多様性を生じさせた過程及び要因については、これまでほとんど研究されていなかった。</p> <p>申請者は、トラフガエル類の保全に資する集団遺伝学・分子生態学的研究を実施することを目的に、第一に集団間の遺伝解析を可能とするマイクロサテライト遺伝子座の単離と、遺伝マーカーとしての特徴を明らかにする研究を行った。本研究においては、まず、インドトラフガエルについて、Ion Torrent PGM 次世代シーケンサーによるゲノムショットガンシーケンスを行い、得られた配列データからマイクロサテライト遺伝子座を特定した上で、54 座について増幅プライマーをデザインした。さらに、それらの遺伝子座のうち、集団遺伝学的解析において有用な多型性のある座位を選別するため、複数のトラフガエル個体について遺伝子型を決定した。その結果、27 座が十分な多型性を示し、そのうち 8 座は、トラフガエル属の他の種でも遺伝的マーカーとして用いることが可能であった。最終的に、この研究によって、インドトラフガエル種内だけでなく、複数種のトラフガエル類に利用可能なマイクロサテライトマーカーが確立された。これらのマーカーはアジア広域に分布するトラフガエル類について、集団形成過程の解明及び種の保全を目的とした集団遺伝学・分子生態学的研究に大いに役立つと期待される。</p> <p>次に、これまでアジアのトラフガエル属内の系統関係は十分に解明されておらず、本属の種分化に関する基礎的知見及び、持続的な種の保全に必要な集団遺伝学的知見も乏しいことから、上記で開発した 27 のマイクロサテライトマーカーの 21 座と、ミトコンドリアチトクロ</p>			

ム *B* (*cytb*) 遺伝子を指標に、分子系統解析及び集団遺伝学的解析を行った。*cytb* 遺伝子による系統解析の結果、アジア産のトラフガエル属の 4 種はそれぞれ単系統群となった。また、インドトラフガエルと *H. chinensis* は独自のクレードをつくることから、他集団からの隔離が示唆された。

バングラデシュ産のインドトラフガエルについては、*cytb* 遺伝子及び 21 のマイクロサテライト遺伝子座を用いて、集団遺伝学的解析を行った。まず、*cytb* 遺伝子のハプロタイプを決定したところ、南北でのハプロタイプ頻度の若干の違いがみられたが、先行研究と同様に不明確であった。一方、マイクロサテライトマーカーにおける遺伝子頻度に基づいた集団間の遺伝的距離を算出したところ、全体的に遺伝的距離の値は低いものの、地理的距離との正の相関が見られた。さらに、各個体の遺伝子型を用いてベイズ法に基づく集団構造解析 (STRUCTURE 解析) を実施したところ、バングラデシュ東西を分ける主要な河川 (ジャヌア川及びメグナ川) によって隔てられるバングラデシュ西部と東部の集団間には、明瞭な遺伝的分化が存在することが見出された。このことは二つの行列間 (遺伝的距離に対する地理的距離もしくはバリアー行列) の相関関係を検定する統計テスト (マンテルテスト) によっても支持された。したがって、バングラデシュにおけるインドトラフガエルの遺伝的集団構造は、河川幅が 8~10 km という巨大な河川が移動分散の障壁となっていることが考えられた。一方でデルタ地帯となっている南部の集団では、北部で見られた明確な集団構造が一部で不明確になっていた。河川の水流通体には個体を下流に押し流す効果があると考えられ、特にバングラデシュ南部では河川の氾濫及び洪水が頻発すると同時に、時代及び季節によっても河川流域が変化することから、これらのことがら南部集団の構造に強く影響していると考えられる。メグナ川の河口デルタに位置する Vo 集団は DPR 解析によって、他の地理的距離に対して遺伝的距離が小さい集団として同定されており、Vo 集団はこうした環境の攪乱によって他集団からの移住頻度が高くなる典型的なケースと推察された。

最終的な結論として、本研究では、絶滅の危機にあるインドトラフガエルおよび、個体数が減少しているトラフガエル類の遺伝的調査を実施可能とする有用な分子マーカーを開発し、さらにそれらのマーカーを用いて、インドトラフガエルの遺伝的構造と、それをもたらした環境要因を明らかにした。これらの情報は、トラフガエル類の保全を実施して行く上で必須の情報である。また、アジア広域に渡っての絶滅危惧両生類の遺伝構造解析はほとんど進んでいない。このため、本研究は、今後のアジア地域における両生類の分子生態学及び、保全遺伝学的研究のモデルケースの一つになり得るものと考えられる。

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

公表論文

1. Inter- and intra-specific genetic divergence of Asian tiger frogs (genus *Hoplobatrachus*), with special reference to the population structure of *H. tigerinus* in Bangladesh
Sultana, N., Igawa, T., Islam, M. M., Hasan, M., Alam, M. S., Komaki, S., Kawamura, K., Khan, M. M. R. and Sumida, M.
Genes & Genetic Systems, 2016, in press
2. Development and characterization of 27 new microsatellite markers for the Indian bullfrog *Hoplobatrachus tigerinus* and its congeneric species
Sultana, N., Igawa, T., Nozawa, M., Islam, M. M., Hasan, M., Alam, M. S., Khan, M. M. R. and Sumida, M.
Genes & Genetic Systems, 89: 137-141, 2014