

氏名(国籍)	林 志 宏 (中 国)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 甲 第 1,809 号
学位授与年月日	平成 10 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	農 学 研 究 科
学位論文題目	Phylogenetical analysis of animal species in Artiodactyla, especially in the family Camelidae based on molecular genetics (偶蹄目、とくに核脚亜目家畜の分子遺伝学的系統分類に関する研究)
主 査	筑波大学教授 農学博士 金 井 幸 雄
副 査	筑波大学教授 農学博士 高 柳 謙 治
副 査	筑波大学教授 農学博士 生 井 兵 治
副 査	筑波大学教授 理学博士 宗 像 英 輔
副 査	筑波大学併任助教授 理学博士 安 江 博 (畜産試験場)

論 文 の 内 容 の 要 旨

動物遺伝資源を効果的に保全するためには、有用遺伝子の解析とともに動物種間ならびに品種間の遺伝的関係を系統的に把握することが重要である。そこで、本研究では分子遺伝学的手法を用い、偶蹄目に属する動物とくに核脚亜目の家畜を主な対象として、動物種間の遺伝的関係を明らかにしようとした。

1) 二つの構造遺伝子、catalase 遺伝子および a-raf-1 遺伝子の相同性に基づく系統分類

まず、ブタの cDNA ライブラリーからそれぞれ catalase 遺伝子および a-raf-1 遺伝子と思われる cDNA を単離し、それらの塩基配列ならびにコードされる蛋白質のアミノ酸配列（それぞれ503および606アミノ酸残基）を決定した。次いで、これらの配列を既に報告されている他の動物種の catalase 遺伝子および a-raf-1 遺伝子と比較した結果、塩基配列およびアミノ酸配列ともに高い相同性を示したことから、単離された cDNA はそれぞれ catalase 遺伝子および a-raf-1 遺伝子のもつと結論した。また、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法によりブタ染色体上における位置を特定し、catalase 遺伝子は 2 番染色体の p 16-p 15 領域に、a-raf-1 遺伝子は X 染色体の p 11.2-p 13 領域に存在することを明らかにした。次に、ヒトで明らかになっているエクソン・イントロン構造を参考にして、それぞれの遺伝子のプライマーを作製し、PCR 法によりこれらの遺伝子のエクソン部分が偶蹄目の種々の動物のゲノムから増幅できるか否かを調べた。その結果、a-raf-1 遺伝子については、ブタ、ウシ、ビクーナ、ラマ、ラクダおよびカバ、ならびにコントロールとして用いたヒトのゲノムからいずれも予想された長さの断片が増幅され、さらにサザンハイブリダイゼーション法により、これらの増幅断片が a-raf-1 遺伝子の一部であることが確認された。一方、catalase 遺伝子については、予想された断片がブタ、ウシおよびヒトでのみ増幅され、ビクーナ、ラクダおよびラマでは増幅されなかった。

2) 散在性反復配列 (SINEs) の検索とその挿入解析 (insertion analysis) による系統分類

本研究では新たにビクーナおよびカバのゲノムから散在性反復配列の一つである SINEs を分離・同定した。すなわち、ビクーナからは約 175 bp からなる 27 個の配列 (vic-1) を、カバからは約 340 bp からなる 30 個の配列 (hir-1) を単離し、それぞれのコンセンサス配列を DNA データバンクに登録されている塩基配列と比較したところ、ビ

クーナから得られたコンセンサス配列はマウスのアラニン tRNA と75%の相同性を有すること、hir-1から得られたコンセンサス配列はマウスのグルタミン酸 tRNA と72%の相同性を持つこと、また、vic-1およびhir-1配列中にはRNAポリメラーゼⅢプロモータ配列、ならびにポリ(A)およびダイレトリピートが存在すること等を確認し、得られたvic-1およびhir-1配列が、それぞれアラニン tRNA およびグルタミン酸 tRNA に由来するSINE_sであることを証明した。次に、vic-1およびhir-1配列をそれぞれプローブとして用い、種々の動物種のゲノムにおける当該配列の分布について解析した。その結果、hir-1の相同配列はビクーナ、ラマ、ラクダおよびベッカリーを除くすべての偶蹄目の動物種で、一方、vic-1の相同配列はビクーナ、ラマおよびラクダでのみ観察された。さらに核脚亜目の動物種間の進化的分岐順序を推定するため、vic-1の当該ゲノムへの挿入解析を行った。その結果、10個の遺伝子座に由来するvic-1のうち、8個がラクダ、ラマおよびビクーナで検出され、残りの2個のvic-1のうち、1個はラマとビクーナに、他はビクーナのみに検出されることを示し、ラクダが最初に共通祖先から分かれたことを明らかにした。

審査の結果の要旨

これまで家畜における種間および品種間の類縁関係の解析には、主に蛋白多型現象に基づいた遺伝子解析が主体であり、分子レベルの解析が遅れていた。本論文は、遺伝的に保存性の高い二つの構造遺伝子と散在性反復配列の一種であるSINE_sに着目し、主要な家畜を含む偶蹄目の動物種、特に核脚亜目の動物種を中心として分子遺伝学的な視点から動物種間の系統分類を行った研究成果をまとめたものである。

本論文では、まずブタのcatalaseおよびa-raf-1遺伝子のcDNA塩基配列を決定し、それぞれの配列に基づいたプライマーを用いたPCR反応により、核脚亜目（ラクダ、ラマおよびビクーナ）が偶蹄目の他の動物種とは異なる単一グループに分類されることを明らかにした。次いで、ビクーナおよびカバからそれぞれ新規のSINE_s配列を分離し、これら二つのSINE_sの各動物種における増幅結果、ならびにビクーナSINE_sのゲノムDNAへの挿入解析（insetion analysis）により、核脚亜目の共通祖先からまずラクダが分化し、次いでラマおよびビクーナが分化したことを初めて分子レベルで明らかにした。さらにこれらの成績により、ラクダの分化は従来の化石に基づく推定年代よりさらに遡ることなどの新知見を得た。このように、本論文は構造遺伝子および反復配列の塩基配列に基づいた分子レベルの解析が家畜の系統分類に極めて有効であることを実証的に示したものであり、進化の過程で動物ゲノム中に不可逆的に挿入されたと類推される散在性反復配列の解析によって近縁種の類縁関係が系統的に把握できることを示した点は、特に高く評価される。これらの知見は、動物遺伝資源の効果的な保存システムを確立する上で、基礎と応用の両面で今後の研究に役立つことが期待される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。