

高知大学学位授与記録

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目 次

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
甲総黒博第48号	寺山 佳奈	Effects of sampling regime on the estimation of animal space use (調査の頻度と期間が野生動物の行動範囲の推定に与える影響)	1
甲総黒博第49号	Vacarizas Joshua Magnaye	Development of chromosomal FISH markers and molecular cytogenetic analysis for scleractinian corals (有藻性サンゴのFISHマーカーの開発およびそれを活用した分子細胞遺伝学的解析)	4

ふりがな	てらやま かな
氏名（本籍）	寺山 佳奈 (大阪府)
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	甲総黒博第48号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	令和5年3月23日
学位論文題目	Effects of sampling regime on the estimation of animal space use (調査の頻度と期間が野生動物の行動範囲の推定に与える影響)
発表誌名	(1) <u>Kana Terayama</u> , Hiroshi Ebihara, Hironori Seino, Motomi Genkai-Kato (2022). Estimation of the maximum utilization area including home range and peripheral sites. Ecology and Evolution, 12, e8893
	審査委員 主査 講師 加藤 元海 副査 講師 比嘉 基紀 副査 教授 飯國 芳明

論文の内容の要旨

野生動物は採餌や繁殖などを行なうために、一定の行動範囲をもっている。動物の行動範囲は、GPS発信機などの電子機器を個体に装着して得られた位置情報を基に推定される。取得できる位置情報の数は電池寿命によって制限を受けるため、測位の頻度と期間の間にはトレードオフの関係がある。動物の行動範囲には幾つかの概念があるが、本研究では行動圏 (home range) と最大利用範囲 (maximum utilization area) に着目している。行動圏は野生動物の基礎生態学において重要な概念で、日常生活で使用する範囲を表し、稀にしか訪れない場所は含まれない。最大利用範囲は、動物が利用する可能性のある全ての範囲を表し、採餌などの日常生活で使用する範囲に加えて稀にしか訪れない場所も含む。行動圏の外側にある稀にしか利用しない周辺地域では、捕食による死亡率が高かったり、人間との軋轢が生じたりすることから、最大利用範囲は応用生態学的に重要な概念である。これまでの研究では、行動範囲推定で使用される位置情報は、調査の頻度や期間が研究ごとに異なることが多い。調査の頻度や期間が異なると、行動範囲を直接比較する事が難しい。これまでのところ、異なる頻度や期間で推定された行動範囲を比較する方法は提唱されていない。本研究では、調査の頻度や期間が異なるデータを比較するために必要な知見として、頻度と期間を変化させると行動範囲推定にどのような影響を与えるのかをニホンザルをモデル種として明らかにすることを目的としている。

本論文は4章から構成されており、第1章では研究の背景と目的、第4章では総合的な考察を行なっている。第2章では、四国を含む西日本から中部地方にかけて生息するニホンザル6群れの位置情報を基に、最大利用範囲に関して、従来の方法より精度の高い推定方法を提唱した。第3章では、四国を含む西日本から中部地方にかけて生息するニホンザル9群れの位置情報を基に、行動圏と最大利用範囲 (第2章で提唱された方法を適用) に関して、調査の頻度と期間がこれら行動範囲の推定に与

える影響を解析した。

第2章では、野生動物の最大利用範囲を推定するにあたって、従来推定方法（累積法）に代わるより精度の高い推定方法（平均法）を提唱した。最大利用範囲は、位置データの最も外側にある点を囲んで面積を求める最外郭法を使って計算することからデータ数の増加とともに単調増加するが、動物の行動範囲には限りがあるため最終的に増加が頭打ちとなる。従来の方法では、データを調査1日目から2日目、3日目と増やしていくにつれて面積が累積して増加する。この場合、動物の活動状態（妊娠など）や環境条件（天候）によっては、データを取得した調査期間内では増加曲線が頭打ちにならないことがしばしば起こりうる。ここでは、調査期間内の全てのデータを用いて計算し、計算結果を平均することによって、予見しづらい動物の活動状態や環境条件などの影響を受けにくい最大利用範囲の推定方法を開発した。この内容は以下の参考論文となった。

Kana Terayama, Hiroshi Ebihara, Hironori Seino, Motomi Genkai-Kato (2022). Estimation of the maximum utilization area including home range and peripheral sites. *Ecology and Evolution*, 12: e8893.

第3章では、野生動物の位置情報を得るために必要な調査の頻度と期間がニホンザルの行動圏と最大利用範囲の推定に与える影響について解析した。最大利用範囲を計算するにあたっては、予見しづらい効果によって増加曲線が飽和せずに発散することを回避するため、第2章で開発した方法（平均法）を適用した。解析の結果、最大利用範囲に関しては、ニホンザルなどの中型哺乳類の場合、調査期間が3か月程度以上あれば、調査の頻度や期間の影響を受けず、一定の面積を安定して推定できることを明らかにした。行動圏に関しては、頻度が減少すると推定面積が増加する一方、期間が減少すると推定面積が減少し、頻度と期間では面積推定に対して正反対の効果があることを明らかにした。また、頻度と期間を同時に減少させると、この正反対の効果がある程度打ち消されることも明らかにした。

第4章の総合考察では、本研究で得られた知見が、野生動物の行動範囲に関する研究に対して、どのように貢献するのかを考察した。動物の行動範囲に関する過去の研究では、調査の頻度と期間が研究ごとに異なっているのが現状であるが、これまでに得られた野生動物の行動範囲を相互に比較するにあたって本研究の知見は重要な指針となる。また、将来、野生動物の行動範囲を研究するにあたって、本研究結果は調査体制を計画する際に考慮すべき知見である。

地球上の生態系は、ニホンザルや人間が住む陸域生態系と黒潮の流れる海域生態系は、河川生態系を通して繋がっている。自然と人間社会が共生する黒潮圏域を保全するには、どの生態系においても、その基礎生態学と応用生態学の知見を蓄積することは黒潮圏科学として重要な使命である。近年、ニホンザルは農業被害をもたらす有害鳥獣の1種とされていることから、この種の行動範囲に関して重要な知見を提供した寺山佳奈氏の提出論文は黒潮圏科学の博士論文として相応しい。

審査の結果の要旨

令和5年1月25日に公開審査会が開催され、学位論文提出者によって、MS-Teamsを用いたオンラインにより研究内容が発表された。質疑応答を含めた約1時間で、本学位論文の内容が説明され、質問やコメントに対し、学位論文提出者から相応の回答がなされた。

同日、対面にて最終試験を実施した。この試験では、「黒潮圏総合科学専攻学位論文審査等に関する実施要領」にしたがって、専門性や学術性に関する口頭諮問を実施した。寺山佳奈氏はいずれの質問に対しても、的確に回答し、学位に値する専攻学術の能力を有していることが認められた。

公開審査会とあわせて、学位論文提出者の学識は博士（学術）として研究を遂行していく上で備わっているものと認め、審査委員全員で合格と判定した。

ふりがな	ウアカリザス ジョシュア マグナエ
氏名（本籍）	Vacarizas Joshua Magnaye (フィリピン共和国)
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	甲総黒博第 49 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位論文題目	Development of chromosomal FISH markers and molecular cytogenetic analysis for scleractinian corals (有藻性サンゴの FISH マーカーの開発およびそれを活用した分子細胞遺伝学的解析)
発表誌名	(1) <u>Vacarizas, J.</u> , Taguchi, T., Mezaki, T., Okumura, M., Kawakami, R., Ito, M., & Kubota, S. (2021). Cytogenetic markers using single-sequence probes reveal chromosomal locations of tandemly repetitive genes in scleractinian coral <i>Acropora pruinosa</i> . <i>Scientific Reports</i> , 11(1), 11326. https://doi.org/10.1038/s41598-021-90580-1
	審査委員 主査 教授 久保田 賢 副査 准教授 難波 卓司 副査 准教授 西尾 嘉朗

論文の内容の要旨

熱帯・亜熱帯の浅海域に発達するサンゴ礁地形を形成する刺胞動物の有藻性イシサンゴは、世界の海洋動物の中で多様な生物の一つである。この有藻性イシサンゴは、天然の防波堤として沿岸保護に寄与したり、魚類や他の海洋無脊椎動物の稚魚の育成場を提供したりするなど、人類の社会生活に対する様々な生態系サービスの提供に関与している。しかしながら、20 世紀後半以降、数十年にわたり世界のサンゴ礁の面積が減少していることが明らかにされている。この減少には、気候変動がもたらす海洋の温暖化や酸性化などが関与しているとされている。一方、温帯域では海水温の上昇等の影響により、有藻性イシサンゴの種の増加や生息域の拡大が観察されており、新たな環境への適応についても同時に進行している。このように、ダイナミックな変動を示すことも有藻性イシサンゴのもう一つの特徴として挙げられる。

有藻性イシサンゴは、遺伝的・形態的な変異が大きく、現存する種は約 1,300 種に上るとされる報告もある。しかしながら、形態と DNA 配列に基づく分子分類が示す結果が矛盾するケースも見出されており、未だに種や属レベルで分類が変更されており、その体系化についてはいまだに議論の途上にある。2011 年にコユビミドリイシの全ゲノム DNA 配列が報告されて以降、2023 年 1 月時点で約 30 種類の有藻性イシサンゴゲノム配列が解析されている。しかしながら、そのゲノム DNA が分配され凝縮し、種の維持や多様化に関わる染色体については、不明な点が多かった。

2005 年頃から、有藻性イシサンゴの染色体の標本作成法の改善を重ね、染色体の長さやその他の形態情報に基づき並べて、染色体数や性染色体等の推定を可能にする核型の作成方法を確立し、染色体数や

均一染色領域 (HSR) の存在について明らかにした。この標本作製法の応用として、染色体の特定の位置に存在する遺伝子配列を検出する蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法を用いて、数種の有藻性イシサンゴの染色体上の、リボソーム RNA 遺伝子、ゲノム上の散在配列である Alu リピートや染色体先端に位置するテロメアなどを検出し、有藻性イシサンゴの染色体に関する新しい情報を提供してきた。しかし、これらの研究で得られた FISH プローブは、特定の遺伝子に対して 1 つまたは 2 つの PCR プライマーを用いて増幅された様々な長さの増幅産物の混合物から調製されたものであった。そのため、ハイブリダイゼーションシグナルが観測された染色体上の特定の DNA 配列情報の特徴化ができていなかった。DNA 分子の解析を含む染色体研究である分子細胞遺伝学は、細胞核内の凝縮した DNA (クロマチン、染色体) の構造を研究する遺伝学とともにゲノム科学の一分野である。その基本となる核型により、ゲノムの構造や構成の理解が進むとともに、生殖様式の解明や既知の遺伝病の原因となる染色体異常を特定などの応用に用いられている。

このような背景に基づき本研究では、DNA 配列を確認した単一の PCR 増幅産物から FISH プローブを調製し、遺伝子座の特徴を明らかにすることを可能にする様々な FISH プローブを開発し、有藻性サンゴの遺伝学やゲノム科学の発展に寄与する解析方法の確立を目的とした。論文は、3 つの研究から構成されている。第 1 の研究は、ヒメエダミドリイシ (*Acropora pruinosa*) のタ反復配列遺伝子の単一塩基配列を用いた FISH プローブの開発である。第 2 の研究は、開発した FISH プローブを用いた、数種のみドリイシ属サンゴの倍数性の検討である。また、第 3 の研究として、雌雄異体のサンゴであるキクメハナガササンゴ (*Goniopora djiboutiensis*) を対象種として選択し、性決定遺伝子として知られる *dmrt* 遺伝子の部分配列の遺伝子クローニングを行ない、その配列から FISH プローブを作成して、性染色体の同定を試みた。

第 1 章では、有藻性イシサンゴの概要や分子細胞遺伝学的研究の重要性に加え、本論文の概要が紹介されている。

第 2 章では、また、ヒメエダミドリイシ (*Acropora pruinosa*) の染色体構造・構成を FISH により解析し、その特徴を明らかにした。染色体ペアの同定には、直列に反復する 5S リボソーム RNA 遺伝子をコードする配列からの短い塩基プローブを使用した。両プローブは FISH で強いシグナルを発生し、染色体ペアを識別した。5S リボソーム RNA 遺伝子の座位は第 5 染色体上にあり、コアヒストンのそれは第 8 染色体上にあった。5S rDNA プローブの配列は、U1, U2 スプライソソーム snRNA 遺伝子とそのインター Spacer を中心に、5S rDNA の短い配列で挟まれた構成になっていた。これは刺胞動物において 5S rDNA と U1 および U2 snRNA との配列が直列に反復して連結していることを示す初めての報告である。また、全ゲノムハイブリダイゼーション法により、最長の染色体対 (1 番染色体) が異型であることを示した。このプローブは他のみドリイシ属有藻性イシサンゴの染色体とも有効にハイブリダイズしたことから、集団遺伝学的解析の対象となる個体群や種を超えて使用できる可能性があることが示された。この成果 "Cytogenetic markers using single-sequence probes reveal chromosomal locations of tandemly repetitive genes in scleractinian coral *Acropora pruinosa*" は、Scientific Reports 誌, 11(1), 11326. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90580-1> (2021) に掲載された。

第 3 章では、有藻性イシサンゴの中で最も多様なみドリイシ属を対象としたの倍数性についての観察である。様々な種の有藻性イシサンゴの標本を観察する中で、多くの種の染色体数が 28 本 ($2n=28$) である一方で、27 本や 29 本を示す細胞や 40 本を超える染色体数を示す細胞も存在することに気づいた。倍数体は、異常な細胞分裂によって生じる全ゲノムの重複の結果、染色体セットが増加することによって引き起こされる。倍数体は、進化の原動力として、動物よりも植物でよく知られている。本研究では、

ミドリイシ属有藻性イシサンゴにおける染色体重複の可能性を初めて示した。第2章で開発したプローブを用いて、染色体セットの重複を遺伝子座の数から判断した。4種のみドリイシ（ナンヨウミドリイシ：*A. hyacinthus*, ニホンミドリイシ：*A. japonica*, ホソエダミドリイシ：*A. valida*, ミドリイシ：*A. solitaryensis*）の細胞は、2つの座位の存在を示し、 $2n=28$ または $2n=29$ の2倍体細胞であることが示された。一方、スギノキミドリイシ（*A. muricata*）については、異なるシーズンに採取された胚において、42本の染色体を持つ細胞が最も多く、さらにFISHにより3つの座位を示したことから、3倍体（ $3n=42$ ）である可能性が示された。また、コユビミドリイシ（*A. digitifera*）では、異なる年に採取された胚で、染色体が56本の細胞が最も多い結果を示した。有藻性イシサンゴの繁殖様式として無性生殖も知られており、3倍体の存在が特殊な条件に限らない可能性もあるが、スギノキミドリイシおよびコユビミドリイシともに、2倍体を示す観察結果も得られていることから、今後の研究の展開が期待される。

第4章では、性決定遺伝子のクローニングを試み、性染色体の同定や性決定様式の推定を試みた。多くの有藻性イシサンゴは、精子と卵を包含したバンドルを放出し、海中で他群体が放出した精子や卵と受精する生殖様式を取る。しかしながら、キクメハナガササンゴを含む一部の種では雌雄異体であることが知られており、本研究の対象種として選択した。他の動物の性決定に関わるとされている *Dmrt*（doublesex and mab-3-related transcription factor）遺伝子群の保存されたアミノ酸配列を足掛かりに、3つの新規遺伝子のクローニングに成功した。このうち1種については、オスのゲノムDNAでのみ存在することが確認された。染色体を形成するメタフェース細胞33個の分析から、2種類の核型に分類できることを明らかにした。対の染色体がない最も長い染色体（異型染色体）を含む核型A（52%）と、その相同染色体が観察される核型B（48%）のFISHの結果、A型の1本の短い染色体のみに *dmrt* 遺伝子の座位が存在し、B型には座位がないことが判明した。このことから、A型で座位を示した1本の染色体がY染色体である可能性が示唆された。この座位を示したY染色体特異的な *dmrt* の推定タンパク質配列は、雄の性決定や分化に関与することで知られる *dmrt1* と最も相同性が高いことがわかった。これは、刺胞動物の性染色体を細胞遺伝学的情報に基づいて同定した最初の報告である。

第5章では、第2章から第4章の内容の総括に加え、有藻性イシサンゴの分子細胞遺伝学的研究のさらなる発展による、効果的な有藻性イシサンゴの分類、生殖様式の解明や性決定機構の解明など、多岐にわたる応用について将来展望を論じている。このように本研究は、有藻性イシサンゴの分子細胞遺伝学的な知見を蓄積するという基礎科学的な側面だけではなく、今後の保全活動にも大きく寄与するものであることから、黒潮圏科学の理念に適合した学位研究であると評価できる。

審査の結果の要旨

「黒潮圏総合科学専攻学位論文審査等に関する実施要項」第 10 条に定められた「公開審査会」が令和 5 年 1 月 25 日にオンラインで開催され、Vacarizas 氏により学位研究内容が発表された。内容の説明ならびに質疑応答が適切に行なわれた。

「黒潮圏総合科学専攻学位論文審査等に関する実施要領」第 11 条に定められた「最終試験」を令和 5 年 1 月 25 日にオンラインで実施した。口頭試問において、Vacarizas 氏はそれぞれの質問に対して的確に回答した。

学位論文審査委員会で「公開審査会」および「最終試験」の説明や回答等に基づき Vacarizas 氏の学位論文に関する学識や研究遂行能力について総合的に検討し、博士（学術）の学位授与に相当するものと判断し、合格と判定した。