

氏名	ふあん しえん ぐお Fang Sheng-Guo
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	乙第48号
学位授与年月日	平成17年 3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Studies on Conservation Genetics of the Giant Panda (ジャイアントパンダの保全(存)遺伝学に関する研究)
学位論文審査委員	(主査) 藤原 勉 (副査) 小澤 忍 菱沼 貢 細井 栄嗣 一戸 俊義

### 学位論文の内容の要旨

At the present time, a global population of the giant panda has been estimated to be ca. 1750 which are mainly restricted to the 6 isolated areas such as the Qinling, Minshan, Qionglai, Daxiangling, Xiaoxiangling and Liangshan mountain ranges in China. Much effort has been expended on the conservation of this species, but the research on genetic background of the giant panda did not receive so much attention though this is the most important factor(s) of the conservation strategies for the species. Therefore, the following 6 experiments were carried out in this study.

As 1st experiment, to synthesize a genetic marker that can be applicable to the giant panda, the author prepared some oligonucleotide sequences and finally succeeded in developing a new probe — (CTCCACCT)<sub>3</sub> for the experiments of genetic analysis. The newly prepared probe, gp2000, produced more clear and more abundant loci than the previous probes and succeeded in identifying homozygotic genes and discriminating the giant panda individual in succession. Its mutation rate was computed as  $4.82 \times 10^{-4}$  per generation following the analysis of DNA banding patterns from 34 parents and 64 offspring. This new approach represented a great opportunity for the detection of genetic diversity and genetic differentiation.

The 2nd experiment was designed to develop methods to extract high molecular weight DNA from the formalin-fixed giant panda tissues. First, the dehydration in a graded series

(30% – 100%) of ethanol was used. The gradual dehydration helped the dissociation of cross-linking of DNA and thus produced DNA fragments larger than 2 kb. However, the remnant formalin still hampered the amplification of larger (> 1.2 kb) DNA fragments. To remove the formalin completely, critical point drying was utilized. The critical point drying method combined with gradual dehydration led to a successful extraction of not only high molecular weight (approximately 20 kb) but also reliable quantity and quality of DNA from the fixed samples. Therefore, this technique settled the problem of large sample size such as the giant panda for genetic analysis. Based on this result, archival specimens and gp2000 probe were subsequently employed to the genetic examination, giving reliable results without any doubt.

For the 3rd experiment, to investigate the effect of small population size on the giant panda survivability, a comparison of the level of genetic diversity between the Minshan A and B populations was performed. The lower heterozygosity and the higher band-sharing values in the small Minshan B group compared with the large Minshan A area showed that the small population size led to the loss of genetic diversity. This suggested that it should be required to enlarge the population size to prevent the giant panda from further decrease in genetic variation.

In the 4th experiment, to study the effect of habitat fragmentation on maintaining populations of the giant panda, the level of genetic diversity between fragmented Xiangling and unfragmented Liangshan groups was compared. Some changes were recognized in genetic diversity of the Xiangling population, such as the declines in total number of DNA bands and heterozygosity, and the increases in band-sharing coefficient and allelic frequency. This also demonstrated that habitat

fragmentation caused the reduction in genetic variation, suggesting the necessity of creating something for increasing genetic diversity.

The 5th experiment was conducted to investigate the effects of population size and habitat fragmentation on the long-term survival of this species. The genetic diversity including band-sharing coefficient, gene frequency, heterozygosity, numbers of alleles and genetic variability was estimated in the Liangshan and Qionglai groups respectively. The isolated Liangshan group presented the lower level of genetic variation, suggesting the reduced number of immigrated individuals from other populations. Contrariwise, the Qionglai group possessed relatively high genetic variation due to a possible gene flow among fragmented populations inside the Qionglai area. This finding denoted that the genetic fragility of the giant panda might be more sensitive to small population size than habitat fragmentation.

In the 6th experiment, the degree of genetic diversity in 6 discrete giant panda

populations was determined to explore genetic differentiation among groups. All of the diversity parameters implied that the 2 largest populations, Minshan and Qionglai groups, had the highest degree of genetic diversity and that the 2 smallest groups, Daxiangling and Xiaoxiangling areas, showed the lowest diversity. In contrast, the Qinling group with a relatively small population size indicated similar genetic variability to the Minshan and Qionglai regions.

The further genetic analysis suggested that a historical habitat fragmentation around 10,000 years ago might have caused the development of Qinling subspecies. Additionally, the habitat fragmentation about 2000 to 5000 years ago probably induced a significant differentiation of the Minshan-Qionglai group from the other Sichuan populations, suggesting that the Minshan-Qionglai and Daxiangling-Xiaoxiangling-Liangshan regions should be managed as 2 separate units.

The results obtained from genetic analysis revealed that both small population size and habitat fragmentation led to the loss of genetic diversity. Furthermore, the small population size caused more serious decrease in genetic diversity than the habitat fragmentation. Because the 6 groups of giant panda populations have already been fragmented into current 30 subpopulations, these 30 small groups are at present suffering from double influences of small population size and habitat separation, leading to the highest extinction risk in this species.

## 論文審査の結果の要旨

現在まで、主として中国の6カ所の森林地帯（秦嶺山脈）に生息（推定約1750頭）しているジャイアントパンダ（以下パンダ）の保存に関する調査・研究は多くなされてきたが、遺伝的な検討はほとんどなされていないのが現状である。この遺伝的な解析は、パンダの保護対策を立てる上で極めて重要であり、このような状況の中で行われた本研究では以下のような成果をあげている。

1. パンダの遺伝子解析に用いる遺伝子マーカーの合成について検討した。種々のプローブについて検討し、いくつかの「オリゴニュークレオチド」を準備して実験を行って最適のプローブ（CTCCACCT）3を決定した。このプローブはgp（gene pair：遺伝子対）2000で、これを用いた場合、これまでのプローブに比較して、遺伝子の正確な位置や多数のホモ接合体を検索することができ、最終的にパンダの個体識別も簡単にできるようになった。この遺伝子の突然変異の割合は、34頭の親パンダと64頭の子パンダからのDNAバンドパターンの解析によって、世代当たり $4.82 \times 10^{-4}$ と推定された。さらに、この新しい手法によってパンダの遺伝的多様性や遺伝的差異も測

定することが可能となった。

2. ホルマリン固定した斃死個体から、高分子量の DNA を効率的に抽出する方法について検討した。まず、30%から 100%のエタノールによる脱水を行って DNA を分離し、2 kb (2000 塩基) 以上の DNA 断片を検出することに成功した。さらに、残存する微量のホルマリンが、1.2kb 以上の DNA の増幅を妨げるため、これを除去する目的で、臨界点乾燥法を応用した。このアルコールと臨界点乾燥法を併用することによって、高分子量 (>20 kb) の DNA の抽出も可能となり、質量ともに優れた DNA を得ることができた。これによって、パンダの遺伝的解析が迅速に実施できるようになった。

3. パンダの集団が小さい場合、パンダの生息数がどのように変化するかを検討した。まず、Minsan A (大集団) グループと B グループ (小集団) について比較した。その結果、小集団である B グループに異質接合性と DNA バンド共有値の増大が見られた。このことは集団が小さい場合に、遺伝子多様性の消失が速いことを示している。さらに、このような小集団に対しては、個体数を増加させる方法を検討する必要があることを示唆している。

4. 生息地域の分断が、パンダの個体数や遺伝的多様性に与える影響について検討するため、分断された Xiaoxiangling 山脈と分断されていない Liangshan 山脈を調査比較した。その結果、Xiaoxiangling 山脈の集団に遺伝的多様性に変化が見られた。例えば、DNA バンド数の減少、異質接合体の減少、DNA バンド共有値の増大、対立遺伝子頻度の増加、などが観察された。このことは、生息地の分断が遺伝子多様性を低下させるので、それを防止するために遺伝的変異を高めるような手段を講じる必要があることを示唆している。

5. 集団の大きさや生息地域の分断が、パンダの遺伝子多様性に対して、どのような影響を及ぼすかについて検討した。遺伝子の多様性、例えば、DNA バンド共有係数、遺伝子頻度、異質接合体性、遺伝子数、遺伝的変異、などを Liangshan 山脈と Qionglai 山脈で比較した。隔離グループである Liangshan 山脈では、遺伝的変異は小さく、他のグループからの個体移入が少ないことを示している。

一方、Qionglai グループは、遺伝的変異が大きく、この地域内で分断されたグループから個体に移入してきたことを示した。このことは、パンダの遺伝的脆弱性は、生息地の分断よりも、集団の大きさによることが大きいことを示している。

6. これまで対象とした 6 カ所のパンダ集団における遺伝的多様性の程度、すなわち遺伝的相違について検討した。全ての遺伝的パラメーターを、大集団である Minsan グループと Qionglai グループについて比較したところ、両集団間の遺伝的多様性に大きな差異が認められた。一方、小集団である Daxiangling グループと Xiaoxiangling グループでは、遺伝的多様性に大きな変化は見られなかった。さらに、解析してみると、今から約 1 万年前に分断されたグループが Qinling 山脈に別の小集団を形成したものと思われる。さらに、約 2 千年から 5 千年前に分断された集団が四川省グループとなり、それらが Minsan グループと Qionglai グループに別れ、最終的に Minsan-Qionglai 山脈と Daxiangling-Xiaoxiangling 山脈の 2 つの集団になったものと推察される。

これらの結果を要約すると、パンダの遺伝子解析によって、個体数の少ない集団と生息地が分断された集団では遺伝子多様性が減少することが明らかとなった。また、この2つの要因のうち、個体数が減少することが極めて重要であることが明らかとなった。

現在では、代表的な6集団が、さらに分断され「30」の小集団になっており、これらは個体数の減少と生息地の分断という2つの障害に遭遇している。このような状況がパンダを絶滅の危機に追いこんでいると考えられる。

本研究の成果は、パンダをより効率的に保護するためには、現在行われている人工繁殖による個体数の増加を促進すると共に、野性の個体数を増加するための緑の回廊を近距離にある生息地域間に早急に設置することが必要である事を示している。もしこれが可能であれば、現在の生息地を大きく、Qinling 山脈、Minsan-Qionglai 山脈、および Daxiangling-Xiaoxiangling-Lingshan 山脈の3地域にして保護することの可能性を示唆するものであり、中国におけるパンダの保護対策に関する貴重な基礎資料となるものであると高く評価し、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。