

機関番号：82105

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380094

研究課題名（和文） 枯葉をねぐらとするコウモリの森林空間利用と社会構造の解明

研究課題名（英文） Study of forest space use and social structure of the bats that use dead leaves for roosts

研究代表者

平川 浩文（HIRAKAWA HIROFUMI）

独立行政法人森林総合研究所・北海道支所・主任研究員

研究者番号：30353824

研究成果の概要（和文）：6-7月の出産・子育て期、コテングコウモリのメスは樹冠部を、オスは樹冠より低い位置のねぐらを利用すること、秋には雌雄とも地上部近い枯葉ねぐらを利用すること、晩秋になると樹洞の利用があること、冬には雪中で越冬している可能性が高いことが明らかとなった。マイクロサテライト DNA 配列の8座でプライマーを新たに設計した。新設計含め、適用した12種類のうち、7座のプライマーが研究に利用できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The females of Ussurian tube-nosed bats use roosts in tree crowns during parturition and child-rearing period in June and July. In contrast, males use roosts below tree crowns in this period. In Autumn, both males and females use roosts close to the ground mostly less than 2 m from the ground. In late autumn, use of roosts in tree cavities were observed. During winter, it is highly likely that they hibernate within snow. PCR primers were newly designed and synthesized to amplify eight microsatellite DNA loci in the Ussurian tube-nosed bat. Of 12 primer pairs including the new primers and primers derived from other bat species, seven seemed to be applicable to Ussurian tube-nosed bats as molecular DNA markers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	5,400,000	1,620,000	7,020,000

研究分野：野生生物管理学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：森林生物・コウモリ・枯葉・ねぐら・社会

## 1. 研究開始当初の背景

(1) コテングコウモリの森林空間利用の解明  
コテングコウモリは、木や草の「枯葉」を主なねぐらとする。葉にねぐらをとるコウモリは世界的に見ても数が少なく、中でも枯葉を主なねぐらとするものは世界でこれまで数種しか報告がない。こうしたコウモリの社

会については知見に乏しいが、洞窟・家屋・樹洞など閉鎖空間内部に高密度の集団をつくるコウモリ類とはかなり異なる形態の社会を持つことが予想される。先行研究において、コテングコウモリは森林空間内を季節や性別によって使い分けていることが示唆されている。

(2) コテングコウモリ用遺伝マーカーの開発  
近年、翼手目の配偶様式や社会構造に関する研究が盛んである。血縁度や親子関係の推定方法として、マイクロサテライト DNA と呼ばれる繰り返し配列における多型性が遺伝マーカーとして利用できるようになったためである。だが、コテングコウモリでは、マイクロサテライト DNA 増幅に利用出来る PCR プライマーは報告されていない。予備実験で近縁種の PCR プライマーをコテングコウモリに応用したところ、全く増幅できないものは少なかったが、同時に2つ以上の DNA 領域が増幅されるものや、増幅できない対立遺伝子 (null allele) を高頻度で持つものが多いことがわかった。増幅できない対立遺伝子が多い座はこのままでは研究に利用できない。また、使える遺伝マーカーの数が少なくは、地域集団の持つ遺伝特性を正しく評価することができず、血縁関係の推定も精度が低くなる。

## 2. 研究の目的

(1) コテングコウモリの森林空間利用の解明  
枯葉を主なねぐらとするコテングコウモリについて、各個体の森林空間内のねぐら位置とその移動、個体間相互の位置関係・血縁関係を調べることにより、森林空間の利用形態とその社会の成り立ちを明らかにする。これにより、コウモリ類の生息環境として森林が持つ未知の側面を明らかにし、コウモリ類の保全へ資する。

(2) コテングコウモリ用遺伝マーカーの開発  
翼手目の近縁種で報告されているマイクロサテライト DNA マーカーを参考に、コテングコウモリのマイクロサテライト DNA 増幅のための PCR プライマーを開発する。さらに、これをコテングコウモリの野外集団に実際に応用することにより、得られたプライマーの有用性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) コテングコウモリの森林空間利用の解明  
ラジオテレメトリー法を用い、多くの個体のねぐら場所を活動期 (春から秋) を通じて特定し、ねぐらの森林空間内分布・種類・執着度 (同じねぐらをどの程度連続して利用するか)・雌雄差・季節変化などを明らかにする。これによって、コテングコウモリの森林空間利用の全体像を把握する。

同一地域内で捕獲を強度に継続的に行い、個体識別と採取皮膚膜による血縁分析によって、コテングコウモリの地域集団のサイズ・構成・血縁度を推定する。

出産・子育て期に、ラジオテレメトリー法

によって観察した、メス個体間相互のねぐらの位置関係から1繁殖集団を構成する複数個体を特定し、その血縁関係からメス繁殖集団の特性を明らかにする。

## (2) コテングコウモリ用遺伝マーカーの開発

翼手目4種 (*Myotis myotis*, *Myotis sodalis*, *Nyctalus noctula*, *Eptesicus fuscus*) のマイクロサテライト DNA を増幅するための PCR プライマー対18種類を用いて、次の手順でクローニングを行い、コテングコウモリのプライマーを開発した。1) 他種で開発されたプライマー、または他種の塩基配列を参考にして設計したプライマーを用いて、コテングコウモリのゲノム DNA を鋳型に PCR 増幅を行う。2) 得られた PCR 産物を挿入したクローニングベクターでバクテリアを形質転換する。3) 単離したバクテリアを培養する。4) ベクターの DNA を精製し、PCR 産物部分の塩基配列を解読する。5) 配列をもとにコテングコウモリのプライマーを設計する。

得られたプライマーを用いてコテングコウモリ野外集団の遺伝特性を調べた。分析に用いた DNA は、札幌市豊平区に位置する森林総合研究所北海道支所の実験林において2008-2010年に捕獲された105個体 (オス40、メス64、不明1) の皮膚の一部から抽出した。

得られたプライマーがコテングコウモリ以外の種に利用できるかどうか調べた。対象は、科が異なるコキクガシラコウモリ (*Rhinolophidae*, *Rhinolophus cornutus*, 標本数1) と、同じヒナコウモリ科 *Myotis* 属のカグヤコウモリ (*Myotis frater*, 標本数3) とヒメホオヒゲコウモリ (*M. ikonnikovi*, 標本数3)、そして同じ *Murina* 属のテングコウモリ (*Murina hilgendorfi*, 標本数1) の4種である。

## 4. 研究成果

(1) コテングコウモリの森林空間利用の解明  
ラジオテレメトリー調査の結果、6月から7月にかけてメスのねぐらはすべて樹冠部にあったが、オスのねぐらの多くは樹冠より低い位置にあった。雌雄のねぐらが森林空間内で階層的に分離していることが明らかとなった。また、オスは同じねぐらを何日も続けて利用することが多かったが、メスはほぼ毎日ねぐら場所を移動した。樹冠より低い位置にあったオスのねぐらはすべて枯葉であった。樹冠部のねぐらは正確な部位が特定できないことが多かったが、特定されたねぐらはオスもメスもすべて枯れ葉であった。高さは高いものでは11mあった。利用された枯葉はシラカンバ・ハリギリ・ヤマブドウの枯

葉などであった。

夏から秋にかけて、メスのねぐらも樹冠より下に移動した。晩秋には、樹洞の利用が2個体で確認された。冬季をどこで過ごすのかについては最終的な確認は今後の課題だが、春先に残雪上で見つかる個体の分析から雪中で過ごしている可能性が非常に高いことが明らかとなった。

秋9月から10月にかけて地上近くの枯葉ねぐらを利用する数個体でねぐらの利用状態を調べたところ、日没後30分ほどの間に出巢し、日の出前30分ほどの間に戻り、ほぼ一晩中枯葉ねぐらに戻らず、活動していることがわかった。この状態は、落葉期も過ぎて気温がかなり低下し、飛翔昆虫の活動もほとんどなくなるまで続いた。バットディテクター（コウモリ音声変換機）によってもコウモリの飛翔活動はほとんど確認できず、この時期コウモリがどのような活動を行っているのかが、今後の課題として残された。

なお、発信機をつけたメス個体がアオダイショウに発信機ごと捕食される例が確認され、樹冠部に枯葉ねぐらにいる間に捕食された可能性が高いと考えられた。

札幌市豊平区にある森林総合研究所北海道支所の羊ヶ丘実験林内の約2haの範囲で、3年間にのべ130頭のコテングコウモリを捕獲した。初年度は41回捕獲を行い、のべ48頭を捕獲した。2年目は76回捕獲を行い、のべ70頭捕獲した。前年までに標識したものが9個体、初めて標識したものが39個体あった。既標識9個体のうち、5個体は1回、4個体は2回、1個体は3回捕獲された。初標識39個体のうち、28個体は1回、8個体は2回、2個体は3回、1個体は5回捕獲された。2回以上捕獲された個体が占める割合は既標識個体で56%、初標識個体で28%であった。メスの数は既標識9個体中7個体に対して、初標識39個体中20個体であった。2回以上捕獲された個体は初標識のオス19個体中4個体で21%、メス20個体中7個体で35%であった。3年目はのべ26回の捕獲を行い、のべ22頭のコテングコウモリを捕獲した。このうち、昨年までに標識したものが5個体、今年の初めて標識したものが16個体あった。昨年までの標識5個体のうち、オス1個体、メス4個体であった。オスは1回のみ、メスは多いものでは過去4回の捕獲記録があった。

3年間の捕獲の結果、捕獲されやすさに性差がないと仮定すると、年内でも年をまたいでもメスの定着率あるいは生存率が高いことが示唆された。また、狭い範囲に多くの個体の出入りがみられること、ラジオテレメトリの結果から、これらの個体は遠くてもせいぜい1km以内にねぐらを持っていることが明らかとなった。再捕獲率を考慮すると、実

際の捕獲個体数の数倍を超える集団が調査地を利用しているとみられ、非常に高い密度でコテングコウモリが生息していることが明らかとなった。

血縁関係の分析は計画通りできなかった。計画よりも捕獲が難航し、出産・子育ての7月より前に母親となる個体の捕獲が十分にできなかったこと、当年生まれの子も9月になるとその判定が難しくなったことからである。しかし、新たに開発した遺伝マーカーを用いて分析した結果、研究対象とした集団にはハーディ・ワインベルグ平衡がみられ、任意交配集団であることが示唆された。

メスは出産・子育て期に樹冠部にねぐらをとるため、子育て場所が樹冠部にあることが確実であったが、具体的にその場所を特定するには至らなかった。しかし、ねぐら場所をほぼ毎日移動することから、子育て場所は樹洞など、限定された場所ではなく、枝先の枯葉など、比較的普通に存在する部位であることが示唆された。

## (2) コテングコウモリ用遺伝マーカーの開発

本研究において、翼手目 *Murina* 属のマイクロサテライト DNA 遺伝子の塩基配列が初めて解読された。他種由来の18種類のプライマーで増幅されたPCR産物中、12種類にマイクロサテライト DNA 配列が含まれていた。増幅された DNA 配列は、プライマーが由来する種の配列と良く似ていた。12種類の遺伝子座 (*MurusMS01-12* と命名) のうちの5座 (*MS02, 04, 06, 08 & 10*) では、プライマーを新規に設計することができなかった。

12種類の遺伝子座についてコテングコウモリ105個体分の標本を対象に多型性の分析を行った。新規にプライマーを作ることができなかった5座には、他種由来のプライマーをそのまま使用した。

3つの遺伝子座 (*MS01, 05 & 09*) では、*null alleles* が高頻度で存在することがわかった。*MS01* と *MS09* は、異種由来プライマーを用いた予備実験の際にも *null allele* の存在が示唆されていた。今回新規に開発されたプライマーを使っても同様の結果となったことから、これらの座には繰り返しの近傍に欠失のある対立遺伝子が多数存在していると考えられた。3塩基を単位とした繰り返し配列を持つ *MS04* は、全個体が同じ対立遺伝子をホモ接合の状態を持ち、多型性を示さなかった。また、GT繰り返し配列を持つ *MS07* では、1塩基違いの長さの対立遺伝子が混在しており、使用したシーケンサーの分解能が低いため、正しい遺伝子型を決定することができなかった。

残る7遺伝子座 (*MS02, 03, 06, 08, 10, 11 & 12*) は、それぞれ5-21種類の対立遺伝子

を持っていた。これらの座は、2009年に捕獲された成獣(31個体)において0.42-0.74のヘテロ接合度を示した。遺伝子型の観察頻度は、MS6と11の2つの座を除いて、ハーディ・ワインベルグ平衡時の期待値との間に有意な違いが見られなかった。この結果は分析対象としたコテングコウモリの集団が任意交配集団であることを示唆した。MS06はヘテロ接合度の観察値が期待値より高い値を示したが、MS11は逆に観察値が期待値より低かった。MS11を増幅できない個体が2個体いたが、この2個体の他の座については問題なく増幅できたことから、これらの個体はMS11ではnull alleleがホモ接合の状態になっていると推察された。つまり、この座には集団中にnull alleleが低頻度で存在していて、一方の対立遺伝子が増幅されないヘテロ接合体の個体のいくらかが見かけ上ホモ接合体として数えられ、そのためにヘテロ接合度の観察値が期待値よりも低くなっているらしい。低頻度でnull alleleを持つと考えられるMS11を含めて、これら7つの座を増幅するプライマーはコテングコウモリの配偶様式や社会構造の研究に利用できるだろう。

12種類のプライマー対を他種へ応用した結果、近縁な種ほど増幅できる座の数が多かった。同じMurina属のコテングコウモリでは12種類すべてのプライマーで増幅が可能であった。対象標本は1つだけだったが、多くの座において異なる対立遺伝子が検出され、多型性があった。同じヒナコウモリ科のMyotis 2種では、9または10の座で増幅でき、多くの座で複数の対立遺伝子が検出された。しかし、科の異なるコキクガシラコウモリでは、2つの座(MS01とMS06)を除いて、増幅できなかった。Murina属では他種においても、12種のプライマーの多くが遺伝マーカーとして利用できるだろう。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

① Dai Fukui, Toshihide Hirao, Masashi Murakami, Hirofumi Hirakawa, Effects of treefall gaps created by windthrow on bat assemblages in a temperate forest, Forest Ecology and Management, 査読有、261巻、2011、1546-1552

② Hirofumi Hirakawa, Dai Fukui, Roost use and activity of an Ussurian tube-nosed bat (*Murina ussuriensis*) during late autumn in Hokkaido, 東洋蝙蝠研究所紀要、査読有、8巻、2009、45-51

③ 平川浩文, 小阪健一郎、初冬に雪中で発見されたコテングコウモリ (*Murina*

*ussuriensis*) の記録とその意味、森林総合研究所研究報告、査読有、8巻、2009、175-178

④ Dai Fukui, Hirofumi Hirakawa, Kuniko Kawai, Kyle Armstrong, Recent records of bats from south-western Hokkaido, 東洋蝙蝠研究所紀要、査読有、8巻、2009、9-27

⑤ Hirofumi Hirakawa, Dai Fukui, Predation by a Rat Snake (*Elaphe climacophora*) on a Foliage-roosting Bat (*Murina ussuriensis*) in Japan, Bat Research News, 査読有、49巻、2008、37-39

⑥ 平川浩文、森林に棲むコウモリ類のねぐら調査の可能性-6. コテングコウモリ *Murina ussuriensis* のねぐら探索から何がわかってきたか。哺乳類科学、査読無、48巻、2008、187-188

[学会発表] (計5件)

① 平川浩文、福井大、コテングコウモリは雪中で冬眠するのか、日本哺乳類学会 2010年度大会、2010年9月18日、岐阜大学(岐阜市)

② Hirofumi Hirakawa, Dai Fukui, Bats in snow: do they hibernate?, The 15th International Bat Research Conference, 2010年8月27日、チェコ: プラハ

③ 福井大、平川浩文、D. A. Hill, 森林の物理的空間構造が食虫性コウモリ類の活動におよぼす影響、日本哺乳類学会 2009年度台北大会プログラム、2009年11月、台湾大学(台北)

④ 福井大、平川浩文、村上正志、平尾聡秀、森林ギャップがコウモリ群集におよぼす影響、第55回日本生態学会、2009年3月、福岡コンベンションセンター(福岡市)

⑤ 平川浩文、コテングコウモリのねぐら選択-森林空間内における階層的な雌雄分離、日本哺乳類学会 2008年度大会、2008年9月、山口大学(山口市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平川 浩文 (HIRAKAWA HIROFUMI)

独立行政法人森林総合研究所・北海道支所・主任研究員

研究者番号: 30353824

### (2) 研究分担者

石橋 靖幸 (ISHIBASHI YASUYUKI)

独立行政法人森林総合研究所・北海道支所・主任研究員

研究者番号: 80353580

揚妻 直樹 (AGETSUMA NAOKI)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号: 60285690