

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K14604  
研究課題名(和文) 無脊椎動物を用いた哺乳類の個体群調査法の確立

研究課題名(英文) Census of mammal population using iDNA

## 研究代表者

半谷 吾郎 (Hanya, Goro)

京都大学・霊長類研究所・准教授

研究者番号：40444492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、長年にわたって哺乳類の個体数調査を実施してきた屋久島で、ヒルおよびハエを収集し、哺乳類についての情報を得るために、どのような動物をどのような遺伝子情報の解析に用いるのが最適かを、明らかにする。ヒルは、消化管を解剖して取り出してからすりつぶし、DNAを抽出すると、容易に宿主である哺乳類の種が同定できることが分った。解析に成功した40試料すべてがシカの配列だった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the validity of iDNA, DNA included in invertebrates that collect mammal DNA, for the purpose of genetic monitoring of mammals. We conducted this study in Yakushima, where we have continued census of mammals for two decades. Host of leech was genetically easily known, by dissecting their gut, extract DNA, and amplify barcoding region of mammals. All (40/40) of the hosts were identified as sika deer.

研究分野：動物生態学

キーワード：個体数調査 iDNA 哺乳類 DNAバーコーディング

## 1. 研究開始当初の背景

野生動物の長期間モニタリングでは、省力化が必須である。また、個体数(密度)に加え、遺伝的多様性についての情報は、集団内の繁殖単位の分化、遺伝子流動の解析など、さまざまな目的に使われる。また、個体識別可能な領域の解析により、個体レベルの貴重な情報をもたらされる。捕獲の難しい野生動物では、遺伝子資料の収集や健康のモニタリングは、従来糞を用いて調べられてきた。しかし、糞に含まれる DNA は少量で、増幅阻害物質を含むため、実験で困難を伴う。また、分解が早く糞の採取そのものが極めて困難な場合もある。

吸血性の動物、糞食・腐肉食性の無脊椎動物に含まれる、脊椎動物由来の DNA (iDNA) は、個体群モニタリングにかかわる困難を一挙に解決してくれる、有望な試料である。ハエは、分解速度の速い糞にすばやく到達し、吸血性動物は、研究者にとってはきわめて入手が困難な野生の脊椎動物の血液を食物とする。これらの動物は、採取者(ヒト)、人糞、市販の家畜の肉などをつかって容易に採取することができる。実際、最近、ハエとヒルを用いて、その地域の哺乳動物相を明らかにした二つの研究が独立に発表された。

申請者らは、屋久島の上部域で、2000 年から毎年夏に哺乳類の個体数調査を行ってきた。(1) 定点調査法による 30 の定点周辺でのニホンザル集団密度の推定、(2) 5 つの識別群の構成の把握、(3) 糞塊法によるニホンシカの個体数推定、(4) 遺伝子解析のためのサル・シカ糞の収集、(5) カメラトラップ調査を行っている。複数の異なる分類群の哺乳類を対象として、これだけ精密な個体数調査が長年行われている調査地は、世界的にも稀である。先行する少数の iDNA の研究事例にはない、本研究のもうひとつの斬新な点は、この新しい方法の補完・比較対象として、個体群モニタリングとしては最上の資料が用意されているということである。

## 2. 研究の目的

申請者らが長年哺乳類の個体群モニタリング調査を行ってきた屋久島上部域で、従来の方法と組み合わせて、吸血・糞食動物を対象とした iDNA の調査を行う。哺乳類についての情報を得るために、どのような動物をどのような遺伝子情報の解析に用いるのが最適化を、明らかにする。また、従来用いられてきた糞試料からも遺伝子を抽出し、個体群調査に有益な情報が得られるか検討することを、第二の目的とした。

## 3. 研究の方法

2015 年および 2016 年 8 月に、屋久島西部の標高 800-1300m の 7.5km<sup>2</sup> の調査域で、

哺乳類の個体数調査を行った。調査地を 500m 四方の区画に分け、1 区画に 1 つ、合計 30 の定点を設置した。そこに一人の調査員を配置し、各定点で 7 日間調査を行い、ニホンザル集団の発見頻度を調べ、生息密度を推定した。同時に、ニホンザルの群れの追跡を行い、識別された 5 群の構成を確定した。シカについても同様に 30 の定点付近に 4m×50m の区画を設置し、そこにある糞塊数から絶対密度を推定した。糞塊調査区画の近傍にカメラトラップを 1 年間設置して哺乳動物を撮影した。

定点調査者は、調査中に出現したヒルおよびハエを採取した。ヒルは、調査員の体に付着していない個体だけを採取し、100% エタノールに保存した(下写真)。ハエは、捕虫網で捕獲し、エタノールを噴霧して殺したあと、エタノールを完全に揮発させてから、界面活性剤 SDS を含む lysis buffer 内に保存した。2 年間の調査で、ヒル 78 個体、ハエ 805 個体を採取した。

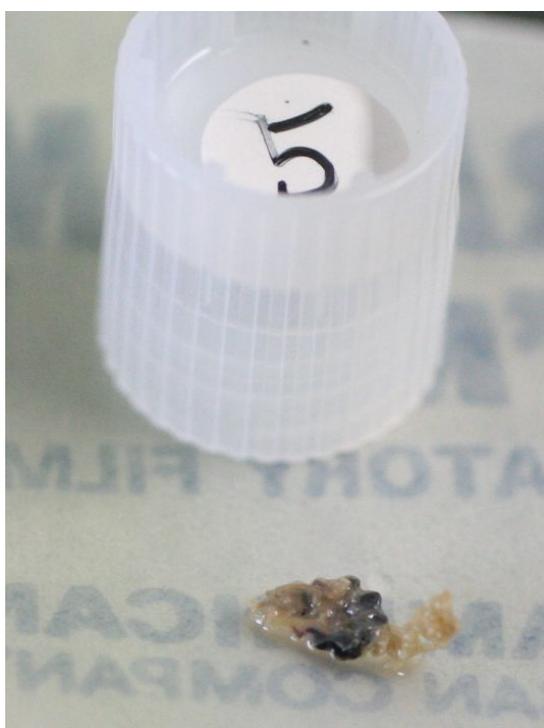


2015 年 10 月に、屋久島海岸部でシカの追跡を行い、排泄行動を目撃したら、そのときに排泄された新鮮な糞を採取した。糞の表面を界面活性剤 SDS を含む lysis buffer に浸した滅菌済み綿棒で拭き、糞表面に付着しているシカの体細胞を lysis buffer に保存した。これらの糞を、野外に放置し(下写真)、半月後、1 月後、2 月後に再度同様に遺伝子試料を採取した。



## 4. 研究成果

ヒルは、2012年の調査で採取した個体については、解剖して消化管を取り出し、それをすりつぶして、DNAを抽出した。



消化管のほとんどは中身が入っていないように見えたが、中には上の写真のように、食物である宿主の血液残滓と思われる黒い部分が残っているものもあった。

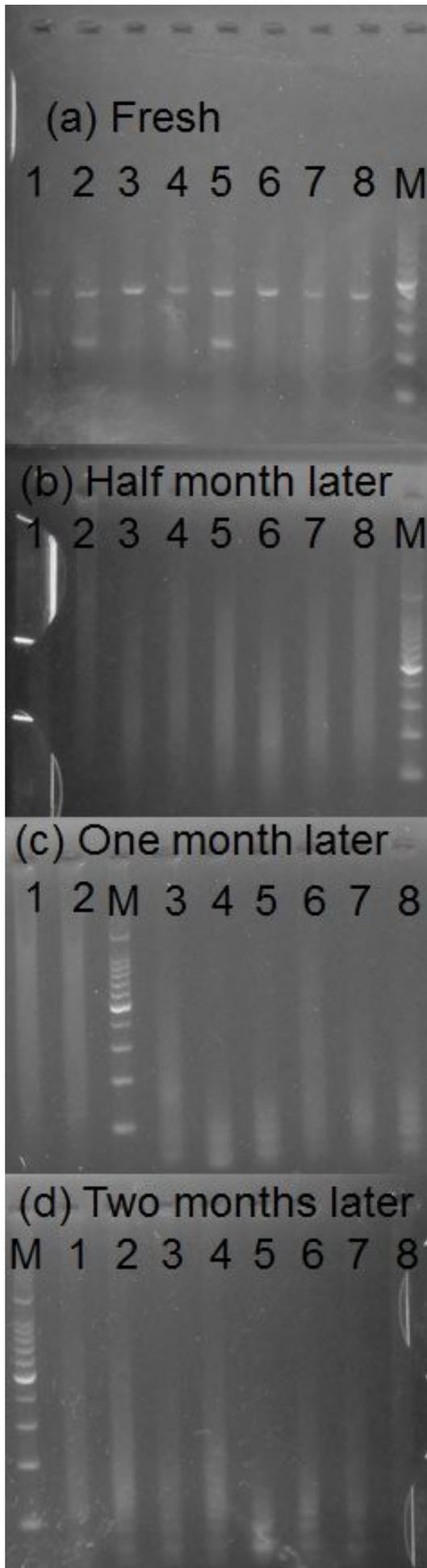
ヒルから抽出したDNAを、哺乳類のバーコード配列である SCPH02500 (5'-TTACCAAAACATCACCTCT-3') および SCPL02981 (5'-ATCCAACATCGAGGTCGTAA-3') で増幅し、サンガーシーケンス法で配列を解読した。48試料中40試料で解読に成功し、そのすべてがシカの配列だった。

カメラトラップによる調査で、哺乳類は、ニホンジカ、ニホンザル、ネズミ(アカネズミもしくはヒメネズミ)、イタチ、コウモリ、外来種であるイヌとネコが撮影された(写真)。



カメラトラップ、およびサルの定点調査、シカの糞塊調査をもとに推定した各哺乳類の生息数をもとに、ヒルがランダムに吸血していた場合の、各哺乳類の配列がヒルから検出される期待値が計算できる。40試料すべてがシカだったという本研究の結果は、この期待値とは統計的に有意に異なっており、ヒルはシカを選択的に採食していることが分かった。

2015年に採取したヒルについては、解剖して消化管を取り出さず、そのまますりつぶしてDNAを抽出した。消化管を解剖して取り出した試料と同様のプライマで哺乳類のバーコード領域を増幅したところ、標的となる100-200塩基対の配列のほかにも、800塩基対ほどの配列も一緒に増幅した。それぞれのゲルを切り出して配列を解読すると、100-200塩基対の配列は、シカまたはヒトであり、800塩基対の配列は、環形動物のものであること



が分った。SCPH02500 および SCPL02981 にも

哺乳類のバーコード領域にプライマを設計し、配列を解読したが、いずれの場合も、消化管を解剖して DNA を抽出した場合に比べて、配列解読の成功率は低かった。効果的な哺乳類の遺伝子試料を得るためには、ヒルを解剖して消化管だけを取り出すことが有効であることが分った。

なお、調査中に採取した八工については、遺伝子解析をまだ行っていない。

排泄を確認して採取したシカの糞について、性染色体上の遺伝子 ZFX/F, forward: 5' -ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT-3'; ZFX/F, reverse: 5' -GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT-3'; SRY, forward: 5' -CCCATGAACGCATTTCATTGTGTGG-3'; SRY, reverse: 5' -ATTTTAGCCTTCCGACGAGGTCGATA-3' を同時に増幅し、電気泳動を行った。排泄直後の新鮮な糞では、59%の試料で電気泳動によってバンドが確認された。それによって判定された性別は、排泄個体の観察中に確認された性別と、ほとんどの場合一致した。一方、排泄後半月、1 月、2 月の糞についても同様の解析を行ったが、いずれも、増幅は見られなかった(右写真)。

糞塊調査で採取されるシカの糞は、おそらくそのほとんどは、排泄後半月以上経過しているものだと考えられる。したがって、糞塊調査によって、遺伝子解析に耐えうるシカの遺伝子試料を手に入れることはできないことがわかった。

##### 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. Hamada A, Hanya G (2016) Frugivore assemblage of *Ficus superba* in a warm-temperate forest in Yakushima, Japan. *Ecological Research* 31: 903-911. DOI: 10.1007/s11284-016-1398-z
2. Hanya G, Bernard H (2016) Seasonally consistent small home range and long ranging distance in *Presbytis rubicunda* in Danum Valley, Borneo. *International Journal of Primatology*: 37:390-404. DOI: 10.1007/s10764-016-9907-z
3. Ando H, Setsuko S, Horikoshi K, Suzuki H, Umehara S, Yamasaki M, Hanya G, Inoue-Murayama M, Isagi Y (2016) Seasonal and inter-island variation in the foraging strategy of the critically endangered

Red-headed Wood Pigeon *Columba janthina nitens* in disturbed island habitats derived from high-throughput sequencing. *Ibis* 158: 291-304. DOI: 10.1111/ibi.12345

4. Ushida K, Tsuchida S, Ogura Y, Hayashi T, Sawada A, Hanya G (2016) Draft genome sequences of *Sarcina ventriculi* isolated from wild Japanese macaques in Yakushima island. *Genome Announcements* 4: e01694-15. DOI:10.1128/genomeA.01694-15

5. Kurihara Y, Hanya G (2015) Comparison of feeding behavior between two different-sized groups of Japanese macaques (*Macaca fuscata yakui*). *American Journal of Primatology* 77: 986-1000. DOI: 10.1002/ajp.22429

6. Hanya G, Bernard H (2015) Different roles of seeds and young leaves in the diet of red leaf monkeys (*Presbytis rubicunda*): Comparisons of availability, nutritional properties and associated feeding behavior. *International Journal of Primatology* 36: 177-193. DOI: 10.1007/s10764-015-9819-3

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 栗原洋介、半谷吾郎 屋久島に生息するニホンザルの高順位個体は採食競合による利益を得ているか。第 64 回日本生態学会大会, 2017 年 3 月。

2. 本田剛章、半谷吾郎 屋久島山頂部におけるヤクシマザルの季節移動。第 64 回日本生態学会大会, 2017 年 3 月。

3. 栗原洋介、半谷吾郎 屋久島海岸域に生息するニホンザルにおけるエネルギー収支の季節変化。第 32 回日本霊長類学会大会, 2016 年 7 月。

4. 半谷吾郎, Henry Bernard ボルネオ島・ダナムバレーのレッドリーフモンキーの遊動パターン。第 32 回日本霊長類学会大会, 2016 年 7 月。

5. 栗原洋介・半谷吾郎 屋久島に生息するニホンザルにおけるエネルギーバランスの季節変化。第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月。

6. 肥後悠馬, 本田剛章, 半谷吾郎, 梶村恒 屋久島における植生の垂直分布に着目した森林性野ネズミの種構成と生態特性の比較。第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月。

7. 半谷吾郎 低密度下でのシカと植生の関

係: 屋久島のヤクスギ林の場合。第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月。

8. 栗原洋介・半谷吾郎 ニホンザルは行動圏の周縁で食物パッチ利用を変化させる。第 31 回日本霊長類学会大会, 2015 年 7 月。

9. Kurihara Y, Hanya G Japanese Macaques Change Food Patch Use on the Periphery of the Home Range. Vth International Wildlife Management Congress, 2015 年 7 月。

10. 半谷吾郎, 宮田晃江, 好廣眞一, 高畑由起夫, 古市剛史, 栗原洋介, 早石周平 屋久島のニホンザル分布の過去 20 年間の変化。第 31 回日本霊長類学会大会, 2015 年 7 月。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/shakai-seitai/ecolcons/hanya/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

半谷 吾郎 (HANYA, GORO)  
京都大学・霊長類研究所・准教授  
研究者番号: 4 0 4 4 4 4 9 2

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし