

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06892

研究課題名(和文) ツシマヤマネコ保全に向けた食物連鎖の解明及び腸内細菌叢と個体特性との関連解析

研究課題名(英文) Elucidation of the food chain for conservation of Tsushima leopard cat, and relation analysis between gut microbiome and individual characteristics

研究代表者

伊藤 英之 (Ito, Hideyuki)

京都大学・野生動物研究センター・特任研究員

研究者番号：10779648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ツシマヤマネコは長崎県対馬にのみ生息している。生息地の破壊等により、生息数が減少している。

非侵襲的な手法である糞を用いた解析は、野生個体の解析に非常に有用である。食性の正確な情報は、域内保全や飼育個体の飼育管理に極めて有用である。また、免疫等に関連する腸内細菌叢の解析は種の保全に有用な情報となりうる。本研究では、次世代シーケンサーを用い、食性解析及び腸内細菌叢のメタゲノム解析を実施した。

飼育下個体及び野生下の糞便からDNAを抽出し、次世代シーケンス用ライブラリー作成を目的にPCR、タグ標識を実施したが、最終ライブラリー濃度が低く、条件の再検討が必要であった。

研究成果の概要(英文)：Tsushima leopard cat inhabits only in Tsushima island, Nagasaki Prefecture. Due to various factors (eg. destruction of habitats), the number of population is decreasing.

Analysis using feces which is a noninvasive technique is very useful for analysis of wild animals. Accurate information on food is extremely useful for in situ and ex situ conservation and captive breeding management. Analysis of gut microbiome which is related to animal health (eg. immunity and fat) can be useful information for conservation. In this study, we analyzed food and metagenome analysis of gut microbiome using the next generation sequencer.

DNA was extracted using feaces from captive individuals and wild individuals, and PCR and tag labeling were conducted for the purpose of preparing a library for the next generation sequence, but the concentration of the final library was low and the conditions had to be reexamined.

研究分野：保全遺伝学

キーワード：ツシマヤマネコ 食性解析 腸内細菌叢 次世代シーケンス 遺伝的多様性

1. 研究開始当初の背景

世界自然保護連合 (IUCN) レッドリスト (2015年2月)において、哺乳類 1200種、鳥類 1373種が絶滅危惧種に分類されている。絶滅危惧種の保全には、生態学、繁殖学、生理学、遺伝学や栄養学など多くの知見が必要となるが、近年、一度に大量の塩基情報を取得できる利点から、次世代シーケンズが集団構造の解析、種・亜種判別、細菌叢の解析など保全分野に応用されるようになってきている。申請者らもこれまでに次世代シーケンズを用い、グレビーシマウマやニホンイヌワシのマイクロサテライトマーカーの開発やニホンジカの食性解析などを行っている (Ito et al., 2013 Conservation Genetics Resources, Ito et al., 2015 Scientific Reports など)。

ツシマヤマネコ (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) はベンガルヤマネコ (*P. bengalensis*) の一亜種で、長崎県対馬にのみ生息している。生息地の破壊等により、生息数が 80-110 頭に減少し、絶滅危惧種 IA 類に指定されている。保全対策として生息地域の環境を整備するとともに、野生個体群の維持及び増加を図るために、動物園等において生息域外保全の取組が行われている。しかし、域内保全では生息数が少なく、詳細な生態については不明であり、域内保全では繁殖 (特に飼育下で繁殖した個体) が順調に進んでいないのが現状である。

食性の正確な情報は、域内保全や飼育個体の飼育管理に極めて有用である。食性解析は動物の直接観察、胃内容物や糞の解析により行われるが、希少種では直接観察が困難であり、胃内容物解析は動物に対する侵襲性が高く、事故などによる死亡個体しか評価できない。そのため、非侵襲的な手法である糞の解析は、非常に有用である。糞を用いた解析では、顕微鏡観察、近赤外線スペクトル法、DNA 解析などがあるが、DNA 解析は食物 (動物・植物) の形態的特徴の知識がなくても解析できる。さらに次世代シーケンズを用いれば、大量の配列情報を得ることができ、より詳細な食性の解析が可能となる。ツシマヤマネコのみでなく捕食されている動物種の食性を調査することにより、ツシマヤマネコを頂点とする生態系の解明、さらにはツシマヤマネコ保全のための適切なえさ場の創出が可能であると考えられる。また、動物の腸内には非常に多くの腸内細菌が存在しており、それらは動物の健康にとって重要な役割を果たしており、抗生剤投与等による腸内細菌叢の変化は致死的な疾患につながることもある。さらに、腸内細菌と肥満、免疫、寿命、脳・個体の行動との関連性について報告されている。個体の健康や行動は、繁殖に関与する要因であるため、個体の腸内細菌叢を解析し、個体情報 (飼育個体・野生個体、繁殖の有無) との関連性を調査することは、域外保全の一助となりうると思われる。

これらの背景から本研究では、絶滅危惧種であるツシマヤマネコの保全に資する目的で、次世代シーケンズを用い、食性解析及び腸内細菌叢のメタゲノム解析を実施する。

2. 研究の目的

希少種であるツシマヤマネコ保全に資する目的で、遺伝子解析によりツシマヤマネコの詳細な食性解析と対馬に生息する多種の食性についても解析し、ツシマヤマネコを頂点とする生態系ネットワークを解明する。また、腸内細菌叢の解析を行い、個体間 (飼育下・野生下) の細菌叢を比較することにより、腸内細菌叢と繁殖や疾病との関連性を明らかにする。

食性解析

- (1) 次世代シーケンズを用い、野生下ツシマヤマネコの糞から詳細な食性を解析する
- (2) 季節・成熟度・地域間の違いがあるかを明らかにする
- (3) 捕食されている動物の食性を解析し、食物連鎖を明らかにする
- (4) 上記で得られた情報をもとに最適なえさ場の条件を検討する
- (5) 同様に飼育下での飼料管理ガイドラインを作成する

腸内細菌叢の解析

- (1) 野生下・飼育下の個体の腸内細菌叢を解析し、健康個体の腸内細菌叢を把握する
- (2) 腸内細菌叢と各種要因 (出自、成長、疾病、繁殖歴など) との関連性について、一般化線形モデル法で解析する。

3. 研究の方法

試料の収集

以下の試料を採取し、DNA を抽出する。

ツシマヤマネコ

野生個体：対馬野生生物保護センターに保護された個体について保護後・給餌前の糞

飼育下個体：動物園で飼育されている個体の糞

その他対馬野生動物

対馬野生生物保護センターに保護された個体について保護後・給餌前の糞

現地にてトラップにより捕獲した個体の捕獲

DNA 抽出・次世代シーケンズ条件の検討
試料採取に先行して、当センターが保有するツシマヤマネコ糞便由来の DNA を用いて実施する。

食性解析

- (1) 脊椎動物の mtDNA 16S rRNA を増幅するユニバーサルプライマーで PCR (サーマルサイクラ、現有設備) を行い、アンプリコンライブラリーを作製する。次世代シーケンズを行う。ツシマヤマネコ由来の DNA 増幅を抑制するためブロッキングオリゴヌクレ

オチド (Shehzad et al. 2012. Mol.Ecol.) を利用する。

(2) 同様に非脊椎動物 mtDNA16S rRNA のユニバーサルプライマー、植物葉緑体 DNA のユニバーサルプライマーを用いて同様に次世代シーケンス解析を行う(ブロッキングオリゴは用いない)。

(3) データ処理・解析: 次世代シーケンスにより得られた配列について、LinuxPC を用いて、トリミング、アセンブル、相同性検索を行い、種特定をし、被食動植物を特定する。

腸内細菌叢の解析

(1) 細菌の 16s リボソーム RNA 増幅用ユニバーサルプライマーに標識タグをつけて、PCR を行い、アンプリコンライブラリーを作製する。プロトコールに従い、次世代シーケンスを行う。

(2) データ処理・解析: 次世代シーケンスにより得られた配列について、LinuxPC を用いてトリミング、アセンブル、相同性検索を行い、種(種特定が困難なものについては属レベル)の特定を行う。

食物連鎖の解明

(1) ツシマヤマネコおよび被食動物の糞便から抽出した DNA を用いて、食性を解析する。

(2) 被食動物・植物を明らかにし、ツシマヤマネコを頂点とする対馬の生態系ネットワークを明らかにする

(3) ツシマヤマネコについては主成分分析・クラスター分析を行い、個体、地域、季節の違いを調査し、資源利用の変化を把握する

(4) 解明した生態系情報を域外保全・域内保全へ応用する

腸内細菌叢と繁殖や疾病との関連性の解析

(1) 次世代シーケンスによる塩基配列解析

細菌の 16s リボソーム RNA 増幅用ユニバーサルプライマーに標識タグをつけて、PCR を行い、アンプリコンライブラリーを作製する。プロトコールに従い、次世代シーケンスを行う。

(2) データ処理・解析

次世代シーケンスにより得られた配列について、LinuxPC を用いてトリミング、アセンブル、相同性検索を行い、種(種特定が困難なものについては属レベル)の特定を行う。

(3) 繁殖・疾病との関連性の解析

野生個体と飼育下個体の腸内細菌叢の比較し、UniFrac 解析・主成分分析・クラスター分析を行う。また、飼育下個体については繁殖成績や疾病との関連性を調査するために一般化線形モデル分析を行う。また、健康時の腸内細菌叢を把握し、健康管理の基礎的

資料とする。

ツシマヤマネコの遺伝的多様性の解析及び生態把握への応用

(1) ベンガルヤマネコにおいて開発されたマイクロサテライトマーカーを用い、ツシマヤマネコ野生集団において遺伝子型判定を行う。

(2) ヘテロ接合度、アリル多様度及び個体識別率など遺伝的多様性指標を算出する。

(3) 先行研究の大陸集団と遺伝的多様性指標の比較を行う。

(4) 遺伝構造解析及び主座標解析を行い、地域集団間の遺伝構造の比較・遺伝的分化を調査する。

(5) 野生下で採取した便の個体識別を実施し、個体・年齢・性別による食性の違いを把握する。

4. 研究成果

飼育下個体の糞便 72 検体(一部の個体では、採取・保存条件を変えて採取)、野生下の糞便 64 検体から DNA を抽出した。飼育下個体については、飼育状況(出自、移動歴、出産歴、給餌内容、抗生剤・整腸剤使用の有無)についてアンケートを実施した。野生採取糞便のうち、63 検体はベンガルヤマネコ配列を増幅する PCR において増幅が確認された。腸内細菌叢、食性解析とも次世代シーケンス用ライブラリー作成を目的に次世代シーケンスライブラリー作成プロトコールに従い、PCR、タグ標識を実施しライブラリー作成を行った。しかし、最終ライブラリー濃度が低く、ポリメラーゼの変更や PCR 阻害物質抑制物質(T4 プロテイン)の使用など条件を変更し実施したが、良好な増幅は得られず、条件の再検討が必要であった。

また、野生下において、季節や成長による腸内細菌叢の変化を把握するために、ベンガルヤマネコにおいて開発されたマイクロサテライトマーカー(12 マーカー)を用いて、個体識別及び遺伝的多様性の評価を行った。結果、ツシマヤマネコは大陸に生息するベンガルヤマネコと比較し、ヘテロ接合度、アリル多様度などの遺伝的多様性指標は極めて低い値であり、12 マーカーのみでは個体識別は不可能であった。また、集団内及び集団間の遺伝構造解析及び主座標解析(Principal Coordinate Analysis; PCoA)においては、いずれの解析でも大陸集団とツシマヤマネコは明確に分離され、遺伝的な分化が認められた(図 1、図 2)(Ito et al., under review)。

今回の調査では、糞便から抽出された DNA 濃度は低く、数個体では次世代シーケンスのライブラリー作製が困難と考えられたが、多くの個体で、次世代シーケンス解析に供する濃度に達しなかった。今後、条件の再検討とともに、濃度不足を補うため、解析サンプル数を減らして、再解析を実施したい。また、ツシマヤマネコにおいては遺伝的多様性が

大陸集団と比較し、極めて低く個体識別ができなかったため、新たにゲノム解析を実施した。今後、得られたデータをもとに、ツシマヤマネコにおいて新たなマイクロサテライトマーカーの開発を試みる。



図1 ベンガルヤマネコ2地域の遺伝構造解析(緑:ツシマヤマネコ、赤:大陸集団)

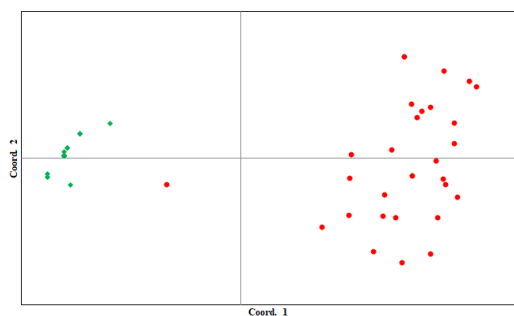


図2 ベンガルヤマネコ2地域の主座標分析(緑:ツシマヤマネコ、赤:大陸集団)

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 7件)

1. Ito H, Ogden R, Langenhorst T, Inoue-Murayama M. Contrasting results from molecular and pedigree-based population diversity measures in captive zebra highlight challenges facing genetic management of zoo populations. *Zoo Biology*, 36: 87-94, 2017 (査読有)
doi: org/10.1002/zoo.21342

2. Ramadan S, Inoue-Murayama M. Advances in camel genomics and their applications: A review. *The Journal of Animal Genetics* 45 (2): 49-58. 2017 (査読有)
doi: org/10.5924/abgri.45.49

3. Hiramatsu C, Paukner A, Kuroshima H, Fujita K, Suomi SJ, Inoue-Murayama M. Short poly-glutamine repeat in the androgen receptor in New World monkeys Primates. *Meta Gene*. 14:105-113. 2017 (査読有)
doi: 10.1016/j.mgene.2017.08.006.

4. Abe H, Aoya D, Takeuchi H, Inoue-Murayama M. Gene expression patterns of chicken. neuregulin 3 in association with copy number variation and

frameshift deletion. *BMC Genetics* 18: 69, 2017. (査読有)
doi: 10.1186/s12863-017-0537-z

5. Sato Y, Ogden R, Komatsu M, Maeda T, Inoue-Murayama M. Integration of wild and captive genetic management approaches to support conservation of the endangered Japanese golden eagle. *Biological Conservation* 213: 175-184, 2017. (査読有)
doi: org/10.1016/j.biocon.2017.07.008

6. 青木孝平、藤本卓也、田島日出男、井上-村山美穂. ニホンザル飼育下閉鎖集団における血縁個体間の交尾回避. *日本動物園水族館雑誌* 58(3): 52-58, 2017. (査読有)
DOI:なし

7. Ando H, Suzuki S, Horikoshi K, Suzuki H, Umehara S, Yamasaki M, Hanya G, Inoue-Murayama M, Isagi Y: 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, 2016. (査読有)
DOI: 10.1111/ibi.12345

[学会発表](計13件)

1. 村上清香, 楠田哲士, 木仁, 伊藤英之, 森角興起, 下川優紀, 秋葉由紀, 高原由妃, 落合絵美, 佐藤安優美, 高桑省吾, 鈴木貴久, 土井 守. 国内飼育下グレビーシマウマにおける卵巣活動と妊娠状況の全頭調査. 第22回日本野生動物医学会大会(2016, 宮崎)

2. Hideyuki Ito. Genetic diversities in the two captive grey's zebra populations The 6th International Seminar on Biodiversity and Evolution: Wildlife Science by New Biologging studies (2017, 京都)

3. 岡部光太, 河村あゆみ, 竹中靖典, 伊藤英之, 中野和彦, 田中正之. 飼育管理方法の改善に向けたキリンの夜間伏臥位休息時間の調査 行動2017 (2017, 東京)

4. 島田かなえ, 中原文子, 中藪初音, 西村みのり, 中野和彦, 伊藤英之. 夏期教育プログラムの一部変更と実施結果について平成29年度公益社団法人日本動物園水族館協会 近畿ブロック動物園技術者研究会(2017, 兵庫)

5. 伊藤英之, 佐藤悠, 小林宏美, 森村成樹, 大沼学, 村山(井上)美穂. 京都大学野生動物研究センターにおける Genetic resource bank の概要及び応用例. 第23回日本野生動物

物医学会大会 (2017, 東京)

6 . Hideyuki Ito, Rob Ogden, Tanya Langenhorst, Miho Murayama-Inoue. Genetic polymorphisms of candidate genes related to behavior traits in zebra species 11th International Conference on Behaviour, Physiology and Genetics of Wildlife, Berlin (2017, ベルリン)

7 . Kota Okabe, Kazuhiko Nakano, Hideyuki Ito. "Sense of Wonder": Animal awareness summer educational program for Children. The 6th AZEC & 33rd ASET Joint International Conference Taiwan 2017(2017, 台湾)

8 . 田中正之, 伊藤英之, 山梨裕美, 櫻庭陽子, 瀬古祥子. 京都市動物園「夜の図書館カフェ DE トーク」やっています. 第 20 回 SAGA シンポジウム (2017, 愛知)

9 . 櫻庭陽子, 伊藤二三夫, 板東はるな, 瀬古祥子, 伊藤英之, 田中正之, 山梨裕美. 京都市動物園博物館実習におけるエンリッチメント実習の試み. 第 20 回 SAGA シンポジウム (2017, 愛知)

10 . 岡部光太, 奥埜のぞみ, 中野和彦, 伊藤英之. "The Sense of Wonder"を育てる小学生飼育体験の実施. 第 58 回日本動物園水族館教育研究会大阪大会 (2017, 大阪)

11 . 村山美穂, 伊藤英之, 森村成樹. 京大大学野生動物研究センター (WRC) の性判別研修会について 2017. 動物園大学 7 (2017, 愛媛)

12 . 岡部光太, 河村あゆみ, 佐藤元治, 渡辺英博, 竹中靖典, 伊藤英之, 中野和彦, 田中正之. 同居グレイビーシマウマ, キリンにおける社会行動の同居方法による変化. 日本家畜管理学会・応用動物行動学会 2018 年度合同研究発表会 (2018, 東京)

13 . 伊藤英之. 第 65 回動物園技術者研究会開催記念シンポジウム. 動物園の動物を絶やさなために. (2017, 京都)

〔図書〕(計 件)
該当なし

〔産業財産権〕
該当なし

出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
京都市動物園一般来園者向け講演
2017 年 11 月 26 日 伊藤英之「動物園の動物を絶やさなために」

6 . 研究組織
(1) 研究代表者
伊藤 英之 (ITO, Hideyuki)
京都大学・野生動物研究センター・特任研究員
京都市動物園・生き物学び研究センター・研究教育係長
研究者番号 : 10779648

(2) 研究分担者
なし

研究者番号 :

(3) 連携研究者
村山 美穂 (MURAYAMA Miho)
京都大学・野生動物研究センター・教授
研究者番号 : 60293552

(4) 研究協力者
佐藤 大樹 (SATO Hiroki)
環境省・九州地方環境事務所 対馬自然保護官事務所 (対馬野生生物保護センター)・首席自然保護官

箕浦 千咲 (MINOURA Chisa)
環境省・九州地方環境事務所 対馬自然保護官事務所 (対馬野生生物保護センター)・獣医師

高木 直子 (TAKAGI Naoko)
京都市動物園・種の保存展示課・飼育員

安井 早紀 (YASUI Saki)
京都市動物園・種の保存展示課・飼育員