

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06420

研究課題名（和文）急激な個体数減少がカモシカ集団の遺伝的構造に与える影響の解明

研究課題名（英文）Evaluation of the effect of rapid decline on genetic structure of Japanese serow population

研究代表者

山城 明日香（YAMASHIRO, Asuka）

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学域）・徳島大学専門研究員

研究者番号：80645565

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：個体数が減少しつつある四国山地に生息するカモシカについて、糞DNAに着目し約10年間の遺伝的多様性の変化を解析した。9つのマイクロサテライト遺伝子座の解析の結果、個体数が減少し始めた2010年以降、アリル数、アレリックリッチネス、ヘテロ接合の観測値が徐々に低下していた。また、2020年は2010年に比べて、ヘテロ接合の観測値が有意に低下していた。近交係数は、2010年に負の値を示していたが2010年以降、正の値を示しホモ接合体の過剰を示した。これらの結果より、カモシカの個体数減少に伴い、遺伝的多様性の低下や近親交配が徐々に高まりつつ状況にあることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大型野生動物集団の遺伝的研究は、組織サンプルの入手が困難なため広範囲でかつ長期的な調査は十分に行われていない。本研究は、カモシカの糞DNAに着目し約10年間の長期的な遺伝的多様性について解析した。研究の成果として、カモシカの個体数減少に伴い、遺伝的多様性が徐々に低下していることを明らかにした。本研究では、糞DNAを用いた調査の有効性を実証することができ、大型野生動物の保全において長期的な遺伝的モニタリングの重要性を提案する。

研究成果の概要（英文）：In Shikoku, Japanese serow population has been declining in recent years. This study analyzed a long term genetic diversity of Japanese serow population using fecal DNA. The result of 9 microsatellite analysis showed reductions in the values of the number of allele, allelic richness, and observed heterozygosity since 2010. There was only significant difference in observed heterozygosity values between 2010 and 2020. Although a breeding coefficient value was negative in 2010, this values changed positives since 2014. This study suggests that genetic diversity gradually decrease as Japanese serow population declines. Furthermore, this study proposes the effectiveness of analysis using fecal DNA and the importance of continuous genetic monitoring of Japanese serow.

研究分野：保全遺伝学

キーワード：カモシカ 糞DNA マイクロサテライト 遺伝的多様性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カモシカ (*Capricornis crispus*) は、ウシ科ヤギ亜科の動物で、北海道と中国地方を除いた本州・四国・九州の山岳地帯に生息する日本の固有種である。明治から昭和初期にかけ乱獲により個体数が激減したが、「特別天然記念物」に指定され保護されてきた結果、個体数は回復した。しかし、近年、環境の変化およびニホンジカの個体数増加により、全国的に個体数が減少傾向にある。特に四国山地では 2003 年に 2700 頭であったカモシカの個体数が 2011 年には 1600 頭と急激に個体数が減少した。

ボトルネックを経験し遺伝的多様性が低い集団では、環境の変化に対する適応能力が低下し、人口学的揺らぎや突発的事象の影響により絶滅のリスクを高めることが知られている (Amos and Balmford 2001)。過去に個体数減少を経験した集団は、遺伝的多様性が低いことも多くの研究で報告されている (Goossens et al. 2006)。しかし、遺伝的多様性の低下が個体数減少のどの時点で起きるかについて明らかにした研究は少ない。特に、野外で組織サンプルの入手が難しい大型の野生動物では、個体数減少過程と遺伝的多様性の時間的変化を長期間調査した研究も非常に限られている。

2. 研究の目的

本研究では、四国山地に生息するカモシカについて、2008 年以降、約 10 年間収集・保存してきたカモシカの糞サンプルを用いて、マイクロサテライト遺伝子座による集団の遺伝的解析を行い、個体数減少と遺伝的多様性との関係について明らかにすることを目的とした。また、糞 DNA を用いた遺伝的解析は、野生動物のモニタリングに画期的な手法であるが、カモシカでは比較的近年確立されたため、その可能性について未知な部分が多い。本研究では、糞 DNA を用いた解析手法の野外調査への応用・発展性について明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1)カモシカの糞サンプルの収集

DNA 解析に用いたカモシカの糞サンプルは、2008 年から 2017 年に四国山地で収集した 441 糞サンプルを用いた (図 1A)。また、新たに 2018 年から 2020 年にかけて四国山地に生息するカモシカ 157 糞サンプルの収集を行った。さらに、2008 年から 2020 年に収集したカモシカの滅失 36 個体の組織サンプルを解析に加えた (図 1A)。収集した糞は、コニカルチューブに入れエタノールで保存した。その際、日付と糞の新旧を記入した。また、保存様式の違いによるフラグメント解析の成功率を評価するために、2017 年の一部のサンプルについては、ユニパックに入れて冷凍保存した。

(2)フラグメント解析

糞および組織サンプルは、DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて DNA の抽出を行った。フラグメント解析では、カモシカで報告されているマイクロサテライト遺伝子座の 12 のうち、9 のマイクロサテライト座 (ETH10, ETH225, ILSTS030, ILSTS058, MM12, OarHH62, SPS115, TGLA122, TGLA126) を選定した。性決定では、アメロゲニン遺伝子を増幅できるプライマー-SE47/53 (Kim et al. 2008) のうち、SE47 に蛍光色素を添加したプライマーを用いた。これらの遺伝子マーカーの中から、アリルのサイズレンジが他のマーカーと重複しないマーカーの組み合わせ SET1 (OarHH62, ILSTS058, ETH10, ETH225) と SET2 (MM12, SPS115, ILSTS030, TGLA126, SE47/53) を作成し、マルチプレックス PCR を行った。PCR の反応条件は、95 5 分, [95 30 秒, 60 90 秒, 72 30 秒] 28 サイクル, 60 30 分である。PCR 産物は Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic Analyzer を用いてフラグメントサイズの決定を行った。糞サンプルでは、DNA の劣化に伴う allelic dropout (ADO) や false allele (FA) が確認されることから 1 サンプルにあたり 3 ~ 5 回独立に PCR 増幅を繰り返して遺伝子型を決定した。

得られた遺伝子型についてそれぞれの遺伝子座のアリル数 (A_N)、ヘテロ接合度の観測値 (H_0) と期待値 (H_E) を GeneA1Ex 6.51 (v.6.5b: Peakall and Smouse 2012) により算出した。アレリックリッチネス (A_R) は FSTAT ver. 2.9.3 (Goudet, 2001) を用いて算出した。また、ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) からの逸脱の有無、遺伝子座間における連鎖不平衡の有無については、GENEPOP (Raymond and Rousset, 1995) を用いて検定を行った。HWE の検定時に求めた確率には Bonferroni 補正 (Rice, 1989) を施した。さらに、最近生じたボトルネックの有無を検出するために、Bottleneck v.1.2.02 (Piry et al. 1999) を用いてヘテロ接合度の過剰を推定した。

(3)カモシカ集団の遺伝的多様性の年変化

各年度における A_N , A_R , H_E と H_0 , F_{IS} の差は、R version 3.6.1 (R Core Team, 2019) の Kruskal-Wallis 検定を行った。また、2010 年と 2020 年の 10 年後における A_N , A_R , H_E と H_0 , F_{IS} の違いを Mann-Whitney の U 検定を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 糞の保存期間および保存様式の違い

DNA 抽出を行った 598 糞サンプルと 36 個体の滅失個体の採集地点, 9 マーカー全てのマイクロサテライト遺伝子座を決定できたサンプル採集地点を図 1B に示した。糞 598 サンプルのうち, 遺伝子座を決定できたサンプル数は, 2013 年で 33 サンプル, 2014 年 22 サンプル, 2015 年 29 サンプル, 2016 年 7 サンプル, 2017 年 35 サンプル, 2018 年 12 サンプル, 2020 年 17 サンプルの計 155 サンプルであった。このうち 2013 年では 8 サンプル, 2014 年では 6 サンプル, 2015 年では 4 サンプル, 2017 年では 1 サンプルの遺伝子型が同一パターンを示したため同じ個体として解析から削除した。2009 年から 2012 年のサンプルについては遺伝子型を決定できたサンプルはなかった。この期間のサンプルの中で, 一部の遺伝子座について PCR 増幅できたサンプルもあったが, 複数回の PCR 増幅の結果アリルが一致しなかった。雌は 52 個体, 雄は 93 個体であった。

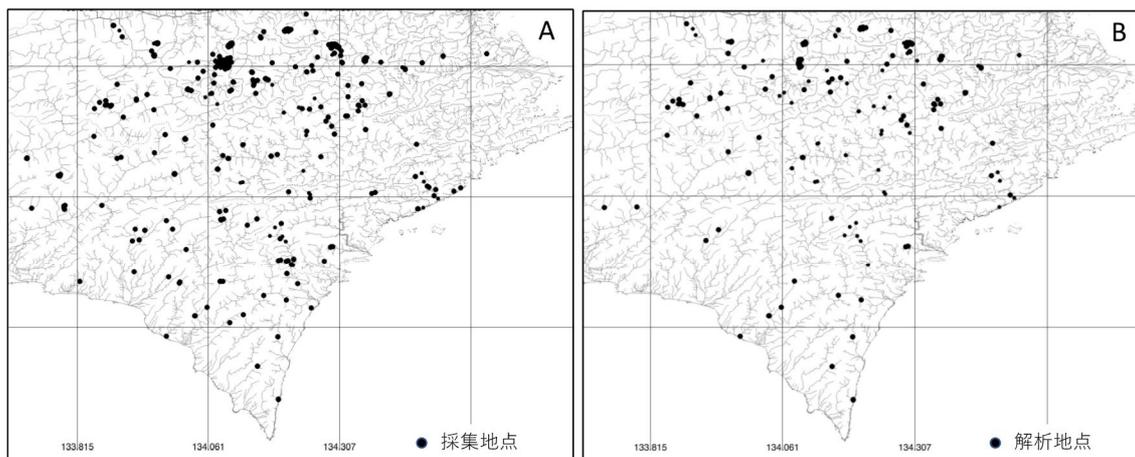


図1. カモシカの糞および組織の採集地点 (A)と解析に用いた糞と組織の採集地点 (B)

糞の保存期間とフラグメント解析による全 9 マーカーの遺伝子型特定成功率 (%) との関係を図 2 に示した。採集後, 一年以内に DNA を抽出し解析した場合, 成功率は 72.7% と高かった。しかし, 保存期間が長くなるにつれて成功率は低くなっていき, 8 年以上エタノールで保存した場合, 遺伝子型を特定できたサンプルはなかった (図 2)。

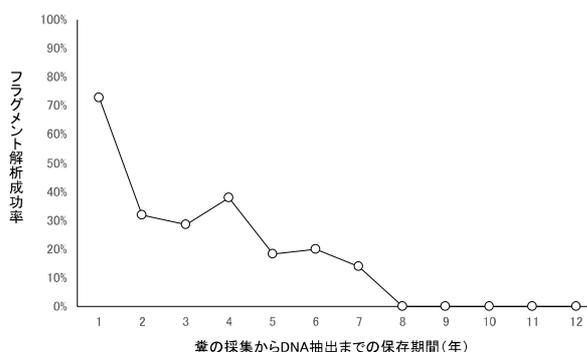


図2. 糞の保存期間とフラグメント解析成功率

糞をエタノールで保存場合と冷凍で保存した場合の遺伝子型特定成功率を図 3 に示した。遺伝子型特定成功率は, エタノールで保存した場合 31.3%, 冷凍で保存した場合 3.2% であり, 冷凍保存した場合, 極端に DNA 抽出率が悪くなることが明らかとなった (図 3)。

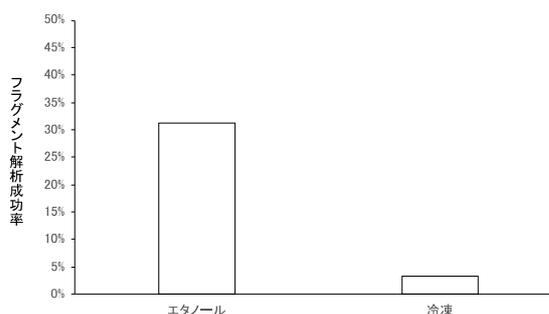


図3. 保存様式の違いにおけるフラグメント解析成功率

これらの結果をまとめると, 糞サンプルからの DNA 抽出・遺伝子型特定成功率は, 採集後の保存期間, 保存様式 (エタノール保存, 冷凍保存) に大きく影響を受けると考えられる。食肉目では, 糞の採集後, できる限り早くエタノールで固定することが推奨されており (増田 2009), カモシカにおいても同様にエタノールで固定し, 一年以内に DNA 抽出し遺伝子解析を行うことが望ましいと言える。

(2) フラグメント解析

解析を行った 9 遺伝子座の A_N , A_R , H_E と H_0 , F_{IS} の平均を表 1 に示した。 A_N は 2010 年に 5.00 と最も高く, 2010 年以降では 3.56~4.56 と低下したが, 年度間で有意差は見られなかった (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$)。 A_R は 2010 年に 3.73 と最も高く, 2010 年以降では 3.40~3.63 と低下したが, 年度間で有意差は見られなかった (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$)。 続いて, H_E は 2015 年に 0.66 (範囲: 0.53-0.82) と最も高く, 2016 年に 0.60 (範囲: 0.44 -0.71) と最も低かった。 また, H_0 は 2010 年に 0.65 (範囲: 0.33-0.83) と最も高かったが, 2010 年以

降では 0.47~0.55 と低下した。しかし、 H_E および H_0 については年度間で有意差は見られなかった (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$)。 F_{IS} は、2010 年は -0.02 であったのに対して 2010 年以降は 0.17~0.26 とプラスの値を示した。しかし、 F_{IS} においても年度間で有意差は見られなかった (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$)。一方、2010 年と 2020 年との 10 年後の比較では、 A_N 、 A_R 、 H_E で有意差は見られなかったが (Mann-Whitney U test, $p > 0.05$)、 H_0 と F_{IS} において有意差が見られた (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$)。

ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) からの逸脱は 2013 年と 2020 年において 1 つ遺伝子座で確認された。2013 年と 2020 年以外の年では全ての遺伝子座で HWE からの逸脱は確認されなかった。

表 1. フラグメント解析結果

年	N(糞/組織)	雌/雄	A_N	H_E	H_0	A_R	F_{IS}
2010	18(0/18)	10/8	5.00	0.65	0.65	3.73	-0.02
2013	26(25/1)	4/18	4.56	0.63	0.49	3.49	0.23
2014	20(16/4)	8/10	4.22	0.62	0.47	3.40	0.25
2015	28(25/3)	5/18	4.56	0.66	0.55	3.50	0.17
2016	7(7/0)	1/5	3.56	0.60	0.46	3.44	0.26
2017	36(34/2)	15/11	4.56	0.61	0.49	3.41	0.19
2018	15(12/3)	4/5	4.44	0.64	0.49	3.63	0.25
2020	22(17/5)	5/18	4.33	0.63	0.51	3.52	0.21

サンプル数(N), 対立遺伝子数(A_N), 期待値(H_E), ヘテロ接合の観測値(H_0), アレリックリッチネス(A_R), 近交係数(F_{IS})

図 4 に 2010 年から 2020 年における 9 つのマイクロサテライト遺伝子座の H_E と H_0 を示した。全期間の中で、2010 年の H_E は 3 つの遺伝子座 (0arHH62, TGLA122, ILSTS030) で、 H_0 は 2 つの遺伝子座 (TGLA122, ILSTS030) で他の年よりも高かった。また、2020 年では 2010 年に比べて TGLA126 以外の 8 つのマーカーの H_0 の値が低かった。

遺伝的ボトルネックの有無について検定を行ったところ、2014 年および 2020 年に SMM と TPM の両モデルにおいて有意なヘテロ過剰が認められただけでなく ($p < 0.05$)、Mode sift test においても近年におけるボトルネックの存在 (sifted mode) が示唆された。

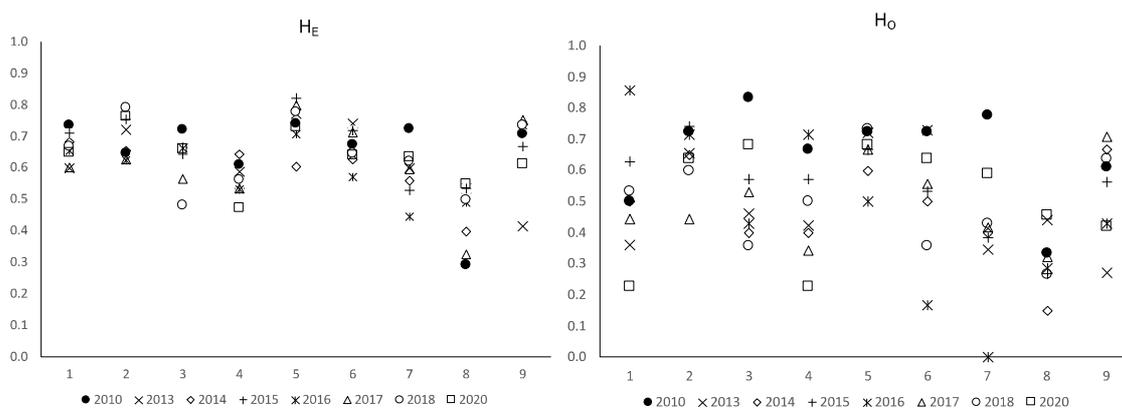


図4. 2010年~2020年における各遺伝子座におけるヘテロ接合の期待値(H_E)と観測値(H_0)
1:0arHH62, 2:ILSTS058, 3:TGLA122, 4:ETH10, 5:MM12, 6:ETH225, 7:ILSTS030, 8:TGLA126, 9:SPS115

四国山地のカモシカの個体数は、1994 年~1995 年に 1500 頭、2002 年~2003 年に 2700 頭、2010 年~2011 年に 1600 頭、2018 年~2019 年 700 頭と推定され、近年個体数が減少しつつある (徳島県・高知県教育委員会 2020)。今回、およそ 10 年間という長期間におけるカモシカ集団の遺伝的多様性の変化について解析した結果、ヘテロ接合の期待値(H_E)に有意差は無いものの、2010 年に比べて 2020 年はヘテロ接合の観測値 (H_0) が有意に低下していた。また、近交係数 (F_{IS}) は 2010 年は負の値であったのに対してそれ以降、正の値を示した。近郊係数が正の値に傾くことは、ハーディ・ワインベルグ平衡の状態よりもホモ接合体が多いことを示している (津村・戸丸, 2001)。さらに、近年におけるボトルネックの存在が示唆された。これらの結果をまとめると、カモシカの個体数減少に伴い、遺伝的多様性の低下や近親交配が徐々に高まりつつ状況にあることが推測される。今回、野外での糞 DNA を用いて性判定、マイクロサテライト遺伝子座の解析を行い、長期的なカモシカ集団の遺伝的モニタリングに応用することが十分に可能であることを明らかにした。今後は、サンプル数を充実させ、長期的なカモシカの遺伝的モニタリング調査を継続して行う必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------