

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：10101
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23651245
研究課題名（和文）ツシマヤマネコをモデルとした糞からの生物多様性情報の抽出と種保全への展開
研究課題名（英文）Biodiversity information obtained from feces of mammals including the Tsushima leopard cat and application to species conservation
研究代表者 増田 隆一（MASUDA RYUICHI） 北海道大学・大学院理学研究院・教授 研究者番号：80192748

## 研究成果の概要（和文）：

研究目的は、ツシマヤマネコを含む食肉哺乳類の糞を野外から採集し、遺伝的多様性情報を把握して種保全研究へ展開することであった。ミトコンドリアDNAの遺伝子増幅（PCR）分析により、糞の落とし主がヤマネコと判定された糞DNAについて、マイクロサテライト遺伝子型から個体識別を行った。各糞について2回以上6回程度の再現性確認実験が必要であった。性別判定も加え個体識別の精度を上げた。対馬の限定地域での2年間の採集により、同一個体由来と考えられる糞も検出され、個体の行動域推定も可能となった。さらに、ツシマテンの組織標本を用いて分析法を開発し、成果を論文発表した。これらの技術をキタキツネの糞を用いた個体識別と個体数推定に適用することができ、保全遺伝学的研究への有効性を実証した。

## 研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to obtain genetic information on fecal samples of carnivorous mammals including the Tsushima leopard cat, collected from field, and apply it to species conservation. Individuality test using microsatellite genotyping was performed on the fecal samples, whose species were identified as the leopard cat by using the PCR method of mitochondrial DNA markers. The analytical reproduction of genotypes on one sample was confirmed by two to six replications of analysis. The sex identification was also performed using sex-chromosomal DNA markers, leading to higher success rates of individuality test. By using the fecal samples collected in a restricted area on Tsushima Island during the last two years, some feces from different years were found to be originated from identical individuals of the leopard cats, indicating that the method makes it possible to estimate the ranges of individuals. Additionally, the similar method using microsatellite markers and tissue samples clarified the genetic background of the Tsushima marten, which is a sympatric species with the Tsushima leopard cat, and the result was published in an article. Furthermore, this kind of the non-invasive method was applied to individuality test and estimation of the individual number in a local population of the red fox in Hokkaido, and the successful result shows that the non-invasive method very much contributes to conservation genetic study of carnivorous species.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学

キーワード：非侵襲的手法、遺伝的多様性、種判定、個体識別、性別判定

## 1. 研究開始当初の背景

申請者の研究室では、DNA 情報を用いて遺伝子増幅法(PCR)の種特異的プライマーを設計し、対馬に生息するヤマネコ、イエネコ、テン、イタチ等の糞の落とし主を種判別する方法を既に開発・発表していた。この分析手法によってツシマヤマネコと判定された糞のDNAを用いて個体識別が可能となれば、親子関係、性別、行動範囲、推定個体数などの重要な生物学情報を明らかにできる。海外でも、糞DNAからの個体識別が実施されているが、PCR法によるマイクロサテライトDNAマーカーの遺伝子型の再現性が低いことが分析上の大きな課題となっており、未だ有効な解決策が確立していなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の通りである。

- (1) 糞DNAから種判定、個体識別、性別判定することができるPCRプライマーおよび分析反応条件を改良し、高率に分析できる手法を確立する。
- (2) 絶滅危惧種ツシマヤマネコを含む食肉哺乳類の糞を野外から非侵襲的に採集し、改良した分析手法により、その糞に含まれる遺伝情報を解析する。
- (3) 得られる遺伝情報に基づき、個体識別、行動範囲、個体数推定、集団の遺伝的多様性を解析し、非侵襲的サンプリングの有効性を評価する。

## 3. 研究の方法

- (1) 糞のサンプリングおよびヤマネコ糞の種判定:対馬野生生物保護センター等の協力を得て採集されたツシマヤマネコの糞について、DNAからの種判定法を行い、ヤ

マネコの糞と判定されたサンプルを個体識別の対象とする。比較研究のために、他の食肉類の糞も野外から採集する。

- (2) 個体識別:複数のマイクロサテライト遺伝子座を用いて、ツシマヤマネコが落とし主と判定された糞サンプルの遺伝子型を決定する。
- (3) 性別判定:ヤマネコの性染色体遺伝子の塩基配列について、X染色体とY染色体間で比較し、分子サイズが異なるDNA領域を増幅するPCRプライマーをデザインする。糞DNAを使った反応条件を調整し、雌雄を判別できる方法を確立する。
- (4) 野外から非侵襲的に得られた糞について、種判定、個体識別、性別判定を行う。
- (5) ヤマネコ以外の対象種についても、糞DNA分析以前に集団の遺伝的背景を把握する必要があるため、確実に個体・性別がわかっている動物個体の組織サンプルを用いて、DNA分析法の確実性および集団の遺伝的多様性を明らかにする。

## 4. 研究成果

本研究では、まず、ミトコンドリアDNAのPCR分析により、対馬で採集された糞の落とし主の種判定を行い、DNAが残存している糞を選別することができた。野外で採集された糞の状況は、気温、天候、時間、土壌の環境、糞の内容物などの条件によって千差万別であり、個々に対応して分析して行く必要がある。また、サンプルは、エタノール固定で室温またはそれより低温で保管すると良好な成績が得られることが判明した。

さらに、ツシマヤマネコと判定した糞について、PCRによる複数のマイクロサテライト遺伝子座の遺伝子型分析を行ったところ、サン

プルによって分析成功率にばらつきがみられた。得られた遺伝子型の再現性を確認するために、各糞について2回から6回までの分析を行った結果、残存状況の良好な糞は2回の分析で十分であったが、6回の分析を行っても遺伝子型を決定できないサンプルもあった。また、性染色体上のZFY/ZFX遺伝子のPCR法による性別判定法を開発し、性別を決定することができた。

対馬において、平成23年度に糞を採集した地点と同じ地域で平成24年度も糞を採集し、再現性を確認しながら個体識別データを解析し、行動圏の分析を試みた。その結果、2年間で同一個体由来と考えても矛盾のない糞も検出された。これらの技術を用いて慎重な分析を行うことにより、個体の分布域の推定にも有効であることが判明した。

対馬において、ツシマヤマネコと同所的に生息する食肉目イタチ科ツシマテンの非侵襲的手法を展開して行くために、組織サンプルを用いたマイクロサテライト分析を行い、マーカーDNAや分析手法の有効性を確認しながら、自然集団の遺伝的多様性および地理的変異を明らかにし、論文発表した。また、北海道に生息する近縁種クロテン集団についてマイクロサテライト分析を行い、その結果を論文発表した。

一連の研究において得られた分析技術や分析条件を応用し、北海道のキタキツネ地域集団の糞を用いた非侵襲的解析を行った。その結果、個体識別、性別判定ならびに個体数推定を行うことが可能となり、その手法が保全遺伝学的研究に有効であることを実証した。

以上の成果について、未発表のものは、現在、投稿論文としてまとめているところである。

今後の展望として、野外の自然集団のみではなく、飼育繁殖下にある個体群についても、

糞を用いた非侵襲的手法を適用することにより、生息域外の種保全対策に貢献できるものとする。

#### 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 3 件)

①Kamada, S., Moteki, S., Baba, M., Ochiai, K., and Masuda, R. (2012) Genetic distinctness and variation in the Tsushima Islands population of the Japanese marten, *Martes melampus* (Carnivora: Mustelidae), revealed by microsatellite analysis. *Zoological Science* 29: 827-833. 査読有 (DOI: 10.2108/zsj.29.827)

②Nagai, T., Murakami, T. and Masuda, R. (2012) Genetic variation and population structure of the sable *Martes zibellina* on eastern Hokkaido, Japan, revealed by microsatellite analysis. *Mammal Study* 37: 323-330. 査読有 (DOI: 10.3106/041.037.0406)

③Nagai, T., Raichev, E.G., Tsunoda, H., Kaneko, Y., and Masuda, R. (2012) Preliminary study on microsatellite and mitochondrial DNA variation of the stone marten *Martes foina* in Bulgaria. *Mammal Study* 37: 353-358. 査読有 (DOI: 10.3106/041.037.0410)

[学会発表] (計 6 件)

①天池庸介、村上貴弘、増田隆一：糞 DNA 解析を用いた函館山キタキツネ *Vulpes vulpes schrencki* の個体数推定。日本生態学会第 60 回大会、2013 年 3 月 5-9 日、静岡県コンベンションアーツセンター (グランシップ静岡)。

②増田隆一：“遺伝子から見た四国産哺乳類の多様性：日本固有イタチ科の進化と外来種ハクビシンの由来”。四国自然史科学研究センター設立 10 周年記念シンポジウム「四国の自然は、いま 2012」、2012 年 12 月 16 日、高知大学 (高知市)。

③増田隆一：“はじめに～北海道の動物相 その普遍性と特異性”。日本動物学会第 82 回大会実行委員会企画一般公開シンポジウム「変わりゆく北海道の自然—動物学からの視点」、2011 年 9 月 23 日、旭川市大雪クリスタルホール (旭川市)。

④増田隆一：“北海道における哺乳類の系統地理と自然史”。2011 年度日本動物分類学会

シンポジウム「日本産哺乳類の系統地理」、  
2011年9月21日、神楽市民交流センター  
(旭川市)。

⑤井上友、金子弥生、山崎晃司、姉崎智子、  
谷地森秀二、落合啓二、L.K. Lin、K.J.C. Pei、  
Y.J. Chen、S.W. Chang、増田隆一：新規に  
開発した複合型マイクロサテライトマー  
カーを用いた日本産および台湾産ハクビ  
シンの集団構造解析。日本哺乳類学会 2011  
年度大会，2011年9月9-11日，宮崎市民  
プラザ（宮崎市）。

⑥増田隆一：“糞 DNA 分析からわかること”。  
日本哺乳類学会 2011 年度大会自由集会「食  
性分析から個体群構造まで—食肉目の糞  
分析の新たな展開」、2011年9月8日、宮  
崎観光ホテル（宮崎市）。

[図書] (計 1 件)

①Schwartz, M.K., Ruiz-González, A., Masuda,  
R., and Pertoldi, C.: Conservation genetics of  
the genus *Martes*: Movements, units to  
conserve, and connectivity across ecological  
and evolutionary time. In “Biology and  
Conservation of Martens, Sables, and Fishers:  
A New Synthesis (K.B. Aubry, W.J. Zielinski,  
M.G. Raphael, G. Proulx, and S.W. Buskirk,  
eds.)”, Cornell University Press, 2012, pp.  
398-428.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増田 隆一 (MASUDA RYUICHI)  
北海道大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：80192748

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし