

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440240

研究課題名(和文)ニホンカモシカの新しいモニタリング手法の開発 糞DNAに基づく個体識別法

研究課題名(英文) Individual identification of Japanese serow based on the fecal DNA samples

研究代表者

山城 明日香 (Yamashiro, Asuka)

徳島大学・大学院理工学研究部・特別研究員 (RPD)

研究者番号：80645565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、同所的に生息するカモシカとニホンジカの糞DNAを用いて、種や性別、個体識別法の確立を行なった。はじめに組織サンプルを用いてカモシカでは14、ニホンジカでは10のマイクロサテライトマーカーを選定した。つづいて徳島県つるぎ町で194の糞を収集し糞DNAの解析を行なった結果、カモシカでは35サンプル、ニホンジカでは30サンプルについて種を決定した。個体識別の結果、カモシカでは14個体(雄7個体、雌7個体)、ニホンジカでは19個体(雄11個体、雌8個体)を特定することができた。本研究で開発した個体識別法は、野外でも応用することができ今後の精度の高いモニタリングの発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：I established non-invasive molecular techniques for species, sex, and individual identification using fecal of the sympatric species, Japanese serow and sika deer. From screening 19 microsatellites using 52 tissues of two species, we selected 14 and 10 highly polymorphic loci for Japanese serow and sika deer, respectively. I collected 194 fecal samples in Tsurugi, Eastern Shikoku. First, I conducted species identification using two cross-species-amplifiable loci and sex identification based on a partial amelogenin gene sequence and identified 35 Japanese serow and 30 sika deer. In Japanese serow, 14 individuals (7 males and 7 females) were identified using 11 of 14 microsatellites. In sika deer, 19 individuals (11 males and 8 females) were identified using 9 of 10 microsatellites. This non-invasive genetic technique using fecal samples should be useful to study the distribution, gene flow, sex ratio, and population size of sympatric Japanese serow and sika deer.

研究分野：生態・環境

キーワード：カモシカ ニホンジカ 糞DNA 個体識別

1. 研究開始当初の背景

偶蹄類の密度推定には、一定面積に出現した糞塊(糞粒)数を数える「糞塊法(糞粒法)」が用いられているが、2種以上の偶蹄類が同所的に生息する場合、糞塊の誤同定により、密度推定が過大・過小評価されることが知られている。日本には、カモシカとニホンジカの2種の偶蹄類が生息しており、2種が同所的に生息する地域では、ニホンジカとの糞塊の区別が難しく、糞塊の誤同定がかねてより指摘されてきた。申請者は、糞塊の誤同定の問題を解決するために、糞 DNA に着目し、PCR-RFLPs 法を用いた2種の種判定法を確立させ、カモシカのモニタリング調査で種判定を行なった。その結果、カモシカの密度はニホンジカの糞塊の誤同定により、過大評価していることを明らかにした。しかし、糞 DNA を用いた種判定法のみでは、生息密度と生息頭数を推定する以上のデータを得ることができない。そのため、個体の移入・移出率、生存率、死亡率、性比など個体のデータを扱ったより精度の高い調査法を確立する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、カモシカおよびニホンジカの糞 DNA を用いて以下を明らかにすること目的とする。

(1) 個体識別が可能なマイクロサテライトマーカの選択：カモシカとニホンジカ組織サンプルを用いて個体識別が可能なマイクロサテライトマーカの選定を行なう。また、個体識別と同じ手法で種判定、性決定を行う。

(2) 野外での検証：野外で収集した糞サンプルについて、個体識別の可能性を検証する。糞の状態(新しい、古いなど)による PCR の増幅成功率やアレルのエラー率などを求め、PCR 増幅成功率の高い糞の状態を特定する。また、採集した糞サンプルについて個体識別を行い、個体識別および個体の行動範囲特定の実現性を検証する。

(3) カモシカの個体情報のデータベース作成：四国山地のカモシカ生息地において、カモシカの糞の収集と遺伝的解析を行い、個体の情報を蓄積する。

3. 研究の方法

(1) マイクロサテライトマーカの選定

四国山地で得られたカモシカ 22 の滅失個体と徳島県西部で得られたニホンジカ 30 の狩猟個体から DNA を抽出し、19 のマイクロサテライトマーカ(BM203, BM888, BM3628, BM4107, BM6506, CSSM019, ETH10, ETH225, IDVGA55, ILST030Q, ILSTS058, McM527, MM12, OarFCB193, OarHH62, RT27, SPS115, TGLA122, TGLA126)のうち、多型の高いマーカを選定した。また、選定したマイクロサテライトの中でカモシカとニホンジカの種判定ができるマーカを特定した。さらに、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、種判定と性決定が同時にできる遺伝子マーカのセットを選定した。

(2) 野外での検証

2013年~2015年の10月~12月に徳島県つるぎ町一宇で広範囲の糞のサンプリングをおこなった。糞のサンプリングでは、カモシカとニホンジカの糞塊の区別を行なわなかった。また、糞の状況によりランク1(ヌメリがある糞粒)、ランク2(ヌメリはないがテクリがある)、ランク3(1糞塊内の1/2糞粒数に分解が見られる)、ランク4(1糞塊内の1/2以上の糞粒数に分解が見られる)の4つに区分し、ランクごとのPCRの増幅成功率を求めた。また、組織サンプルで選定されたマーカを糞 DNA に用い、PCR 増幅成功率、allelic dropout (ADO), false allele (FA) を求め、PCR 増幅成功率が高く ADO や FA が低いマーカの選定を行なった。また、性決定および種判定を行なった後、CERVUS v.3.03 を用いて個体識別を行なった。さらに個体識別できた糞塊の位置情報から個体の移動範囲を特定した。

(3) カモシカの個体情報のデータベース作成

カモシカが生息する四国東部において新糞のサンプリングと位置データの記録を行なった。

4. 研究成果

カモシカとニホンジカの組織サンプルを用いて 19 のマイクロサテライトのスクリーニングを行なった結果、カモシカでは 14、シカでは 10 のマイクロサテライトを選定することができた(表1)。選定したマイクロサテライトのうち5つの遺伝子座(BM3628, BM4107, ILST030Q, MM12, OarFBC193)が2種間で共

表1. 解析に用いたマイクロサテライト遺伝子座の情報

Locus	Japanese serow								
	size range	N _a	H _O	H _E	PIC	P _{HW}	P _D	P _{Dsub}	
BM3628	241-248	4	0.57	0.70	0.635	0.336	0.150	0.444	
BM4107	152-162	5	0.67	0.74	0.675	0.961	0.125	0.420	
ETH10	214-224	4	0.50	0.63	0.534	0.128	0.219	0.498	
ETH225	151-163	5	0.71	0.72	0.652	0.744	0.140	0.433	
ILST030Q	174-188	7	0.77	0.80	0.745	0.855	0.083	0.381	
ILSTS058	136-156	6	0.91	0.73	0.682	0.032	0.113	0.422	
McM527	160-180	6	0.43	0.74	0.682	0.008	0.129	0.430	
MM12	105-119	7	0.68	0.72	0.674	0.522	0.118	0.426	
OarFCB193	115-123	5	0.86	0.74	0.673	0.076	0.125	0.423	
OarHH62	107-123	6	0.50	0.81	0.755	0.154	0.078	0.376	
RT27	142-160	6	0.63	0.82	0.778	0.149	0.066	0.363	
SPS115	249-263	6	0.50	0.75	0.689	0.149	0.114	0.413	
TGLA122	163-171	5	0.46	0.72	0.652	0.041	0.138	0.435	
TGLA126	193-199	4	0.36	0.36	0.326	0.262	0.446	0.687	

Locus	sika deer								
	size range	N _a	H _O	H _E	PIC	P _{HW}	P _D	P _{Dsub}	
BM203	219-229	3	0.43	0.38	0.333	0.857	0.431	0.670	
BM888	195-203	5	0.77	0.80	0.748	0.611	0.082	0.380	
BM3628	203-215	7	0.59	0.79	0.744	0.078	0.083	0.382	
BM4107	143-169	6	0.72	0.77	0.726	0.010	0.092	0.393	
BM6506	200-216	6	0.83	0.80	0.703	0.368	0.065	0.359	
CSSM019	147-161	8	0.67	0.82	0.708	0.346	0.063	0.363	
IDVGA55	168-180	6	0.61	0.74	0.688	0.145	0.112	0.415	
ILST030Q	161-165	3	0.53	0.46	0.375	0.660	0.377	0.618	
MM12	87-91	3	0.41	0.38	0.331	0.887	0.433	0.668	
OarFCB193	121-137	5	0.67	0.78	0.725	0.515	0.094	0.392	

通していた(表1)

カモシカでは、4-7のアリル(平均5.4アリル)が見られ、ヘテロ接合の観察値(H_o)は0.36-0.91、期待値(H_e)は0.36-0.82であった。一方、ニホンジカでは3-8のアリル(平均5.4)が見られ、ヘテロ接合の観察値(H_o)は0.38-0.83、期待値(H_e)は0.38-0.82であった。カモシカおよびニホンジカでハーディワインベルグ平衡からのずれは確認されなかった。カモシカでは、14遺伝子座を用いた P_D は 9.8×10^{-13} であり、 $P_{D_{sibs}}$ は 1.1×10^{-5} であった。ニホンジカでは、10遺伝子座を用いた P_D は 1.9×10^{-9} 、 $P_{D_{sibs}}$ は 3.4×10^{-4} であった。そのため、選定したマーカは個体を識別することが十分に可能であると言える。

図1. 糞塊のサンプリング位置

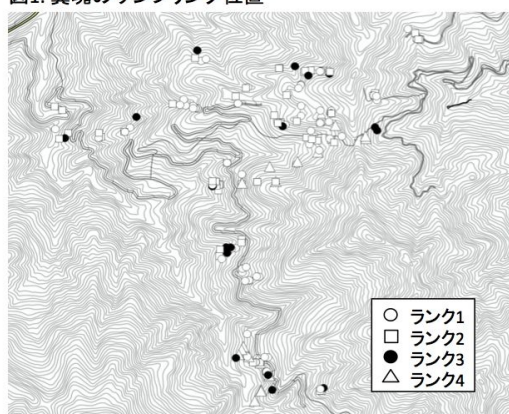


表2. 糞DNAの解析結果

species	PCR success		ADO		FA	
	rank 1	rank 2	rank 1	rank 2	rank 1	rank 2
Japanese serow						
ETH10	0.85	0.69	0.033	0.083	0.000	0.000
ETH225	0.96	0.69	0.083	0.056	0.000	0.000
ILST030Q	0.89	0.61	0.025	0.000	0.000	0.000
ILSTS058	0.83	0.59	0.053	0.000	0.000	0.000
McM527	0.83	0.56	0.156	0.323	0.000	0.000
MM12	1.00	0.74	0.000	0.000	0.000	0.000
OarFCB193	0.89	0.70	0.056	0.143	0.000	0.000
OarHH62	0.83	0.63	0.000	0.000	0.000	0.000
SPS115	0.98	0.74	0.000	0.063	0.000	0.000
TGLA122	0.89	0.61	0.033	0.000	0.000	0.000
TGLA126	0.85	0.48	0.048	0.111	0.000	0.000
SE47/53	0.90	0.69	0.000	0.056	0.000	0.000
sika deer						
BM203	0.94	0.58	0.042	0.000	0.000	0.000
BM888	0.97	0.63	0.000	0.208	0.000	0.000
BM3628	-	-	-	-	-	-
BM4107	1.00	0.54	0.031	0.125	0.000	0.000
BM6506	0.99	0.63	0.036	0.250	0.000	0.000
CSSM019	0.94	0.46	0.038	0.000	0.000	0.000
ILST030Q	1.00	0.54	0.067	0.125	0.000	0.000
IDVGA55	1.00	0.50	0.083	0.000	0.000	0.000
MM12	0.99	0.71	0.000	0.000	0.000	0.000
OarFCB193	0.99	0.63	0.015	0.333	0.000	0.000
SE47/53	0.99	0.58	0.050	0.000	0.000	0.000

続いて徳島県つるぎ町において194の糞塊を採集した(図1)。糞塊は、42糞塊(ランク1)、64糞塊(ランク2)、42糞塊(ランク3)、46糞塊(ランク4)であった。カモシカとニホンジカを区別できる4つのマイクロサテライトマーカのうちの2つのマーカ(ILSTS030とMM12)と性決定マーカ(SE47/53)を用いてマルチプレックスPCR

を行なった。その結果、35サンプルがカモシカ、30がニホンジカの糞塊であった。糞塊の各ランクにおけるPCRの増幅成功率は、ランク1では95.2%、ランク2では39.1%、ランク3とランク4では0%と糞が古くなるにつれてPCRの増幅成功率は急激に低下することが明らかになった(表2)。続いて、PCR増幅に成功し、種の判定ができた糞サンプルについて、カモシカで選定された14のマイクロサテライトマーカ、ニホンジカで選定された10のマイクロサテライトマーカと性決定マーカのPCR増幅を行ない、各マーカのPCR成功率、ADO、FAを求めた。PCR増幅成功率として3回のPCRを行い、その平均を求めた。一方、ADOとFAは、遺伝子型がヘテロの場合は3回、ホモの場合は5回PCRによる増幅を繰り返して求めた。解析の結果、カモシカでは14マイクロサテライトマーカのうち、BM4107とBM3628はPCR増幅に失敗し、RT27は明瞭なピークが見られなかった。一方、ニホンジカでは10のマイクロサテライトマーカのうち、BM3628が明瞭なピークが見られなかった。

カモシカでは35のうち23糞サンプルについて11マイクロサテライト遺伝子座と性決定マーカの増幅に成功した。一方、ニホンジカでは30のうち25糞サンプルについて9マイクロサテライト遺伝子座と性決定マーカの増幅に成功した。PCR成功率は、カモシカとニホンジカともにランク1がランク2に比べて有意に高かった。一方、ADOは2種とも

図2. 個体識別できた糞塊の位置(カモシカ)

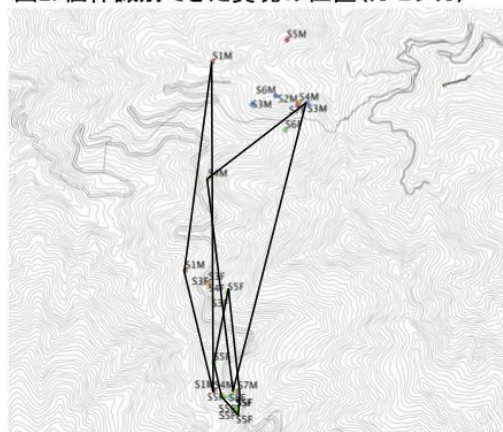
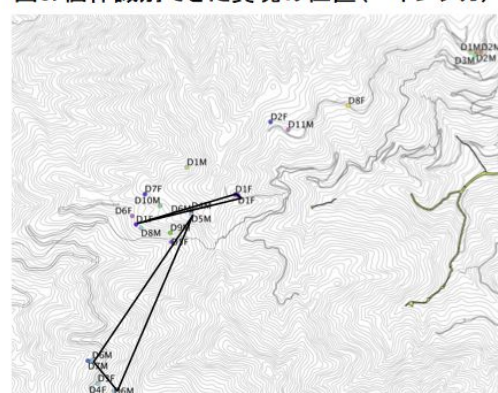


図3. 個体識別できた糞塊の位置(ニホンジカ)



ランク1とランク2間で有意な違いは見られなかった。また、FAは全ての遺伝子座において確認されなかった。

CERVUS v.3.03 を用いて個体識別を行なった結果、カモシカでは14個体(雄7個体、雌7個体)、ニホンジカでは19個体(雄11個体、雌8個体)を識別することができた(図2、3)。また、同じ個体で複数回確認できた個体も見られ、ある程度の行動範囲を明らかにすることができた(表3)。

表3. 糞DNAを用いたカモシカとニホンジカの個体識別の結果

Individual of Japanese serow	Sample number	Individual of sika deer	Sample number
MS1	2	MD1	2
MS2	5	MD2	3
MS3	1	MD3	2
MS4	2	MD4	1
MS5	1	MD5	1
MS6	1	MD6	1
MS7	1	MD7	1
FS1	3	MD8	1
FS2	2	MD9	1
FS3	1	MD10	1
FS4	1	MD11	1
FS5	1	FD1	3
FS6	1	FD2	1
FS7	1	FD3	1
		FD4	1
		FD5	1
		FD6	1
		FD7	1
		FD8	1

MS: 雄のカモシカ, FS: 雌のカモシカ, MD: 雄のニホンジカ, FD: 雌のニホンジカ

カモシカの個体情報のデータベース作成では、個体情報を蓄積することを目的として、四国山地のカモシカ生息地において、カモシカの糞の収集と保存を行なった。

本研究では、野外でカモシカとニホンジカの糞DNAを用いて個体識別が可能であり、本研究で得られた成果は、今後、個体の移入・移出率、生存率、死亡率、性比など個体のデータを扱ったモニタリングが期待できる。

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 1件)

Yamashiro A., Kaneshiro Y., Kawaguchi Y., and Yamashiro T. 2017. Species, sex, and individual identification of Japanese serow (*Capricornis crispus*) and sika deer (*Cervus nippon*) in sympatric region based on the fecal DNA samples. Conservation Genetics Resource 9: 333-338. (査読有)

DOI: 10.1007/s12686-016-0665-1

6. 研究組織

(1)研究代表者

山城 明日香 (YAMASHIRO ASUKA)