

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658050

研究課題名（和文） 野生草食動物における新たな食性研究法（DNA feed profiling）

研究課題名（英文） A new feed profiling using DNA information for wild-herbivores

研究代表者

白石 進（SHIRAIISHI SUSUMU）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：70226314

研究成果の概要（和文）：

野生草食性動物の食性研究を推進するために糞を用いた簡便な食性調査法の開発を行った。葉緑体 DNA 上にある複数の遺伝子間スペーサー領域（*trnD-trnY*, *trnF-trnL*, *trnP-trnW* など）の塩基長多型を使用することにより、採食された植物の種同定が可能であることが示され、従来の DNA バーコーディング法に代わる新たな研究法が確立された。また、植物種の同定を行う上で必要となるスペーサー領域の塩基配列長多型に関するデータベースの構築を行った。

研究成果の概要（英文）：

To facilitate the studies on wild-herbivore feeding, a simple feed profiling based on feces' DNA analysis was developed using several sequence length polymorphisms recognized in chloroplast intergenic spacer regions (*trnD-trnY*, *trnF-trnL*, *trnP-trnW*, etc.) instead of DNA barcoding. A database on the sequence length polymorphism in these spacer regions was constructed for identifying the fed plant species quickly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	480,000	3,580,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：草食性動物、シカ、食性、DNA塩基長多型、葉緑体DNA、DNAバーコーディング

1. 研究開始当初の背景

野生動物は生態系の中で重要な役割を果たしているが、その食性研究は極めて少ない。また、世界的に森林はその採食活動によって大きな影響を受けている。わが国でも、ニホンジカの個体数の増加や分布域の拡大によって森林生態系の破壊、生物多様性の減少や林業・農業における経済的被害が問題となっ

ている。これらの問題を解決するためには、シカの生態を十分に解明する必要があり、中でも食害と密接に関係する食性の解明は特に重要である。シカは多種多様な環境に適応して食性を柔軟に変えるとされ、それぞれの地域におけるシカの食性に関する知見の蓄積が不可欠となっている。

野生草食性動物の食性研究法には、(1) 食

痕を利用して摂食前後の植生を比較する方法、(2) 糞、胃内容物中の植物組織を形態学的に識別する方法（クチクラ断片の顕微鏡観察、クチクラワックスのアルカン分析、近赤外反射分光分析）がある。しかし、特徴のない植物群では種の同定が難しく、科や目など大まかな分類に留まっているのが現状である。

近年、動物の食性研究への DNA 分析手法の導入が試みられ、排泄物（糞）中に含まれる被食植物の DNA 分析を行い、その種の同定とその採食量の解明が始まっている。しかし、現行の DNA 分析は多大な時間と経費を要することから広く普及するまでには至っていない。

2. 研究の目的

現在の DNA 情報を活用した食性研究では、DNA バーコーディング（特定の遺伝子領域の短い塩基配列（DNA バーコード）情報を用いて生物種を同定する方法）の利用を前提とした研究法が使われている。野生生物の糞等の排泄物／胃内容物から採取した DNA を用いて、塩基配列情報を得るためには多くの時間と多大なコストが必要となる。このため、検体数が少数の場合には利用可能であるが、生態学的研究のような非常に多くの検体（個体数）データが要求される研究では実施が極めて困難である。

一方、ゲノム中には、突然変異（塩基の挿入／欠失）により塩基配列長に高い変異性（多型性）のある DNA 領域が存在しており、これらの塩基配列長多型を植物種の同定に利用することが可能である。また、塩基配列長多型は、自動蛍光 DNA シーケンサ（キャピラリー電気泳動装置）を用いて簡便かつ高精度で分析することができる。

本研究は、現在行われている生物種間の塩基配列（DNA バーコード）の差異をベースとした研究法に代わり、ゲノム中に存在する塩基配列長多型を活用し、極めて効率的で安価な新研究法（DNA feed profiling）を確立する。

3. 研究の方法

本研究での DNA 分析は次の手順で行われる。

- ① 糞サンプルの収集
- ↓
- ② DNA の抽出
- ↓
- ③ PCR（遺伝子増幅）
- ↓
- ④ フラグメント解析
（塩基配列長多型分析）
- ↓
- ⑤ データ解析

本手法を確立する上で必要となる、次の点

について技術開発を行った。

- (1) 上記③の PCR における分析対象領域の検討、および PCR における反応系の検討
- (2) ⑤のデータ解析で不可欠となる塩基配列長データベースの構築
- (3) ②の DNA 抽出法の検討

4. 研究成果

(1) DNA feed profiling に適した DNA 領域の探索

葉緑体ゲノム中から塩基配列長に高い変異性を有するスペーサー領域のスクリーニングを行い、種間変異性と種内変異性の評価を行った。

①DNA feed profiling に最適な DNA 領域の抽出

排泄物（糞）・胃内容物から高分子（劣化していない）DNA を採取することは困難なことから、スペーサー／イントロン領域長が 600 塩基対（bp）以下で、かつ、両脇の遺伝子の塩基配列が裸子植物、被子植物、シダ植物、コケ植物間でよく保存されている（変異性が極めて低い）DNA 領域を葉緑体ゲノム中から、DDBJ 等の DNA データベース情報（被子植物 75 種、裸子植物 18 種、その他 12 種）を活用して抽出した。その結果、全種では、*trnD-trnY*、*trnF-trnL*、*trnP-trnW*、*rps11-rpl36*、*rps8-rpl14* の 5 領域が存在した。また、有用林業樹種の多くを含んでいる針葉樹（裸子植物）だけでは、上記 5 領域の他に 12 領域が該当した。

②ユニバーサルプライマーの設計

DNA データベースに登録されている塩基配列情報を用いて、これらすべての植物群に共通して利用できる PCR プライマー対を、*trnD-trnY*、*trnF-trnL*、*trnP-trnW* の 3 領域ごとに設計した。各プライマー対は、16 種のゲノム DNA を用いて PCR 増幅を行い、設計プライマー対のユニバーサル性を評価した結果、供試したすべての植物種で PCR 増幅に使用できることが確認された（図-1～3）。

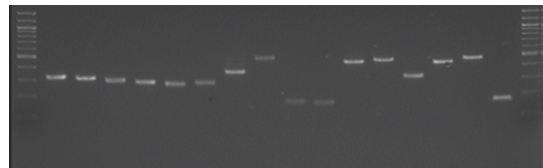


図-1 16 植物種の *trnD-trnY* スペーサー領域における塩基配列長多型

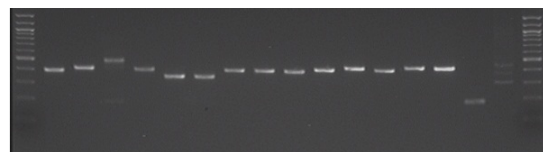


図-2 16 植物種の *trnF-trnL* スペーサー領域における塩基配列長多型（同上）

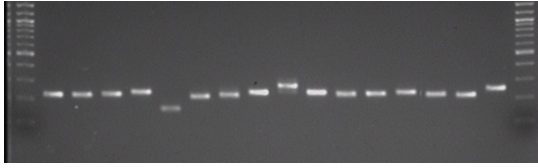


図-3 16 植物種の *trnP-trnW* スペーサー領域における塩基配列長多型 (同上)

(2) DNA feed profiling データベースの構築

DNA feed profiling を実用化するためには、植物種の各領域における塩基配列長に関するデータが不可欠となることから、北九州地域に分布する主要植物種 (約 200 種) の 3 DNA 領域における塩基長のデータベース (DNA feed profiling DB) を作成した (各領域における塩基長多型の概要を表-1 に示す)。

表-1 DNA feed profiling 分析対象領域における変異性評価結果の概要

	分析対象領域		
	trnD - trnY	trnF - trnL	trnP - trnW
調査種数	190	191	192
平均塩基長	327.6	410.8	264.9
標準偏差	139.4	59.9	38.2
最大塩基長	557.3	528.7	440.0
最小塩基長	146.0	126.6	149.0
ユニーク配列長数	161	173	165

また、主要林業樹種であるスギ、ヒノキ、クロマツ、アカマツ、カラマツ、トドマツ、アカエゾマツの 7 種については各樹種 96 個体を用いて種内変異を調査した。その結果、

trnD-trnY では、ヒノキ (2 alleles) とトドマツ (2 alleles) で、*trnF-trnL* では、トドマツ (2 alleles) で、*trnP-trnW* では、トドマツ (2 alleles) とアカエゾマツ (2 alleles) で種内変異が認められた。種内変異の頻度は低く、種内変異を把握すると共に、複数 DNA 領域を併用することにより誤った種同定を防ぐことが可能である。

(3) 糞 DNA の抽出と PCR 増幅法の確立

糞からの DNA の抽出は、採集した糞サンプルを凍結乾燥した後、粉碎し、ISOFEAL (Nippon gene) を用いて抽出することにより、PCR の鋳型 DNA に使用可能な良質の DNA サンプルが得られた。また、PCR に使用する DNA ポリメラーゼとしては、KOD FX Neo DNA Polymerase (TOYOBO), Tks Gflex DNA Polymerase (TAKARA) が適していた。

(4) DNA feed profiling 法の実用性評価 (I)

採食履歴のあるシカ糞の DNA feed profiling を行い、糞分析の結果と採食履歴が一致したことから、本手法の有効性が示された。

(5) DNA feed profiling 法の実用性評価 (II)

シカ被害を受けている北九州地域の人工林から糞を採取し、実際に DNA feed profiling 分析を行った。北九州地域 (福岡県嘉麻市) の 2 林分から糞を 9 月、10 月、1 月、3 月、5 月、7 月、9 月の 7 回に渡り採集し、採食された植物種および相対的採食量の季節変化を調査した。

本研究で確立した DNA feed profiling 法は、図-4 の通りである。この分析系では、DNA バーコーディングを利用した分析系において多くの時間、労力、コストを要する DNA 組換え実験 (クローニング) と塩基配列決定分析 (シーケンシング) を行う代わりに、自動蛍光 DNA シークエンサを用いて PCR 産物を直接キャピラリー電気泳動することにより、

DNA feed profiling 法による食性解析

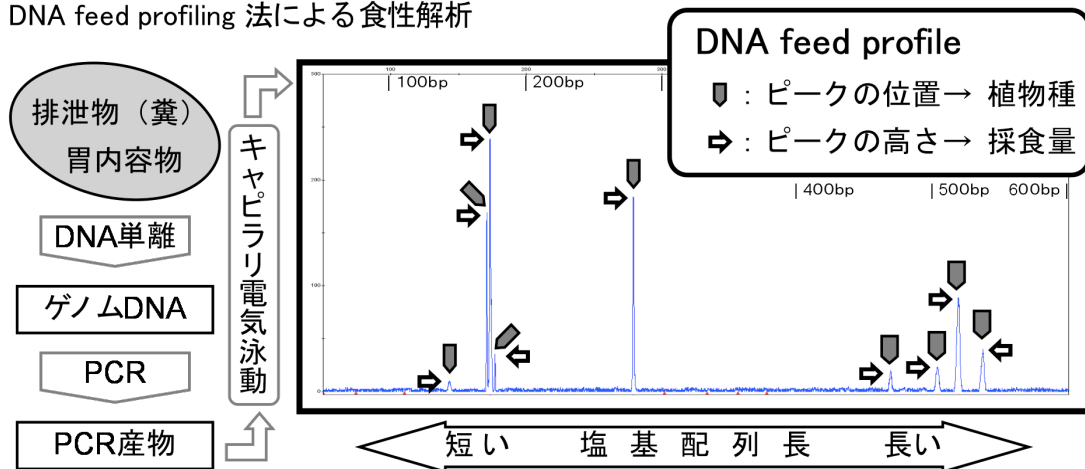


図-4 草食性動物における食性研究のための DNA feed profiling 分析系

採食した植物種の同定と採食量の定量が可能であることから、今後の野生草食性動物の食性研究に新たな研究法を提供できたと考える。

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)

[学会発表] (計2件)

① 盛島 司, 堀野眞一, 野宮治人, 白石進: 採食履歴のあるシカ糞の DNA Feed Profile 分析. 第 122 回日本森林学会大会, 2011 年 3 月, 静岡 (静岡大学)

② 盛島 司, 川邊 縫, 川副まり子, 白石進, 池田浩一: 糞サンプルを用いた草食性動物の簡便な食性プロファイリング. 第 121 回日本森林学会大会, 2010 年 4 月, つくば (筑波大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 進 (SHIRAISHI SUSUMU)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：70226314