

## 哺乳類の生息状況確認調査における 次世代シーケンサーを用いた糞 DNA による種判別の試み

○パシフィックコンサルタンツ株式会社 正会員 石井 宏章  
 パシフィックコンサルタンツ株式会社 三塚 多佳志  
 パシフィックコンサルタンツ株式会社 正会員 池田 幸資  
 北海道開発局小樽開発建設部 結城 憲明  
 北海道開発局小樽開発建設部倶知安開発事務所 諸橋 雅幸  
 北海道開発局小樽開発建設部倶知安開発事務所 安藤 道男  
 北海道開発局小樽開発建設部倶知安開発事務所 佐々木 泰訓

### 1. はじめに

哺乳類の生息状況確認調査では、捕獲調査、目視調査、自動撮影カメラ、痕跡調査等複数の方法を併用するのが一般的である。目視での確認が難しい哺乳類においては、糞、足跡や食痕等で種判別を行う痕跡調査が重要である。糞での種判別では、発見環境、形態、においや内容物等に基づいて種判別を行うが、特徴が似ているため種判別が難しいものもある。

北海道においては、ニホンイタチ(*Mustela itatsi*)とミンク(*Mustela vison*)、エゾクロテン(*Martes zibellina*)とホンドテン(*Martes melampus*)の糞について、目視での種判別が難しい事が知られている。ニホンイタチ、ホンドテンは国内由来の外来生物、ミンクは特定外来生物であり、在来生態系へ悪影響が懸念されていることから、河川生態系保全の観点からこれらの種の生息確認は重要である。特に、環境省レッドリストで準絶滅危惧種(NT)に指定されているエゾクロテンは道南から侵入したとされるホンドテンとの競合の結果、石狩低地帯以西では生息が確認されなくなるとされており(平川ら, 2015)、仮に共存している場合は種判別が非常に重要になる。

糞の目視による種判別以外の方法として、糞中に含まれる消化管細胞由来のDNAから種判別を行う手法が開発されている(井上, 2015)。塩基配列の決定において従来一般的に使われているサンガー法では、DNA増幅の際にプライマーを用意した種しかDNAを検出できない。一方、新たな手法である次世代シーケンサーを使った種判別は、ユニバーサルプライマーを使うことで、餌生物を含めた糞に含まれているほぼすべての生物のDNAが検出可能となっている。昨今では水に含まれる環境DNAから河川、湖沼や海に生息する生物の検出に用いられるようになってきている一方で、陸上哺乳類における環境影響評価や水辺の国勢調査に代表されるモニタリング調査での適用事例は少ない。

本調査においては、哺乳類の糞を対象に、糞に含まれる動

物のDNAを基にした種判別を、前述した二つの方法で実施した。この二つの方法を比較し、陸上哺乳類の生息確認調査における糞DNAを活用した調査精度向上の可能性を検討する。



写真1 痕跡確認調査で確認された  
ホンドテンの糞(左)とキタキツネの糞(右)

### 2. 方法及び材料

2016年11月に、北海道後志地方の河川堤防上及び堤外地において、目視でホンドテン、キタキツネと種判別した糞を採取した。テン類の糞については、石狩低地帯以西にはエゾクロテンが生息していないという分布情報より、ホンドテンの糞であると判断した。キタキツネの糞はテン類の糞に似ることが知られており、比較のため採取した。糞はその場で無水エタノール液浸標本とし、-10度程度で冷凍保存した。

これらの糞サンプルからFast DNA SPIN Kit for Soil(MP Bio)を用いてDNAを抽出し、下記2つの手法①,②を用いて糞に含まれているDNAに基づいた種判別を行った。

#### 手法①(従来の手法)：サンガー法を用いた種判別

ホンドテンと目視で種判別した糞について、エゾクロテン、ホンドテンに特異的な2種のプライマー(Shimatani et al. 2008)を用いてPCR法によりDNAを増幅させ、サンガー法により塩基対数に基づいて種判別を行った。

#### 手法②(新規手法)：次世代シーケンサーを用いた種判別

ホンドテン、キタキツネと目視で種判別した糞から抽出した

キーワード：糞 DNA、次世代シーケンサー、哺乳類調査、餌生物、自然環境、希少生物

発表者連絡先：札幌市北区北7条西1-2-6 TEL 011-700-5227、FAX 011-727-1012

DNAについて、ユニバーサルプライマーを用いて、ミトコンドリアDNAのCOI領域をPCR法により増幅させ、次世代シーケンサーを用いて塩基配列、DNA量の指標(リード数)を得た。塩基配列については、複数の公開データベースに照会して種判別を行った。

### 3. 結果

サンガー法を用いた種判別により、ホンドテンと目視で種判別した糞から抽出されたDNAの塩基対数(221bp)より、この糞がホンドテンのものである事がわかり、目視での種判別の結果が正しいことが分かった。

次世代シーケンサーを用いた種判別によって得られた結果を表1に示した。サンガー法でテンとされた糞から確認されたDNA(リード数)は、テン(44,281)、オオアシトガリネズミ(1,060)、クモ綱(10)、ヒト(9)、フトミズ科の一種(5)であった。目視でキタキツネと種判別した糞からはエゾシカ(51,500)、キツネ(17,152)、クモ綱(47)、カメムシ目(7)のDNAが確認され、ホンドテン、キタキツネに関して目視での種判別の結果が正しい事が分かった。

表1 次世代シーケンサーを用いて検出された主な生物種

糞をした哺乳類	糞から確認された主な生物とリード数		
	種名	テン	オオアシトガリネズミ
ホンドテン	リード数	44,281	1,060
	種名	エゾシカ	キツネ
キタキツネ	リード数	51,500	17,152

糞をした生物と餌生物のDNA量の指標(リード数)に関しては、ホンドテンの糞ではリード数がテン:オオアシトガリネズミ $\approx$ 9:1と、餌生物のオオアシトガリネズミの方が少なかった一方で、キタキツネの糞では、リード数がキツネ:エゾシカ $\approx$ 1:3と、餌生物であると考えられたエゾシカの方が多く検出された。

### 4. 考察

糞DNAによる種判別において、従来の手法であるサンガー法と、新規手法である次世代シーケンサーとを利用することで、目視での種判別が難しい種について種を確定させることに加え、餌生物を特定することができた。これは、生息確認調査の精度向上のみならず、河川環境保全に関する検討をする上で重要な、種間関係(捕食-被捕食)に関する情報を得ることが可能であることを示している。

サンガー法を用いた種判別ではホンドテンのDNAを検出したが、仮に目視でキタキツネの糞をテン類の糞だと誤同定し、同様の方法でDNAの検出を行った場合、キタキツネのプライマーを使用していないことから、DNAに基づいた種判別は不可能である。予期しない種、既往調査で未確認であった種が確認される可能性を踏まえ、サンガー法を用いて種判別を行う場合は、その地域で確認される可能性のある、痕跡の似た生物についてなるべく多くの種を網羅してプライマーを用意することで、種判別の精度を向上させることができると考えられる。

次世代シーケンサーを用いた種判別において、捕食者に比べ餌生物のDNA量のリード数が小さい場合、大きい場合の両方が確認されたことから、種判別したい種同士が互いに捕食しあっている場合は、DNA量の指標であるリード数の比較だけではどちらが糞をしたのか判別できないことが示唆された。また、サンガー法ではプライマーを用意した種しか検出できないこと、2種以上の生物のDNAを検出してもDNA量の比較ができないことより、餌生物のDNAのみが検出された場合、糞をした動物だと誤って判別してしまう可能性がある。

以上のように、糞DNAによる種判別は、糞をした生物と餌生物の特定が可能のため、目視による種判別結果に伴う不確実性を補うことが出来る。一方で、糞DNAによる種判別手法も、サンガー法と次世代シーケンサーの特性を把握した上で相補的に利用する必要があり、調査精度の向上のためには、糞DNAによる種判別だけでなく、糞の中に毛、骨格、歯等の種判別の根拠が含まれるかの確認など、目視での詳細な確認もあわせて実施する事が重要である。

### 5. 謝辞

現地調査にあたっては、北海道野生動物研究所所長の門崎允昭氏にご指導を頂いた。ここに記して、心より感謝の意を表する次第である。

### 6. 参考文献

- 平川ら, 2015, 拡大・縮小はどこまで進んだか—北海道における在来種クロテンと外来種ニホンテンの分布—, 哺乳類科学 55(2), 155-166
- 井上英治, 2015, 非侵襲的試料を用いたDNA分析—試料の保存、DNA抽出、PCR増幅及び血縁解析の方法について—, 霊長類研究 advpub(0)
- Y Shimatani, T Takeshita, S tatsuzawa, T Ikeda and R Masuda, 2008, Genetic Identification of Mammalian Carnivore Species in the Kushiro Wetland, Eastern Hokkaido, Japan, by Analysis of Fecal DNA. Zoological Science, 25(7):714-720.