

シカの糞を対象とした DNA メタバーコーディングによる食性解析

山梨大学 学生会員 ○宗形 亮 山梨大学 正会員 原本 英司
山梨大学 正会員 金子 栄廣 栄廣 山梨大学 正会員 八重樫 咲子

1. はじめに

近年、耕作放棄地および森林の拡大に伴い、野生動物とヒトの活動範囲が重なるようになり、野生動物による人間社会への被害が増加している。特に野生動物の中でもシカは繁殖力が非常に高く、人間社会への被害が大きい。シカの個体数はヒトによる捕獲圧の低下、温暖化に伴う環境変動、耕作放棄地の増加に伴う摂食環境の変化に伴い個体数を増やしてきたと考えられている。これに伴い、シカのロードキルやレールキルによる交通被害、食害による農林業への被害も増加している。また、シカを介した人獣共通感染症の拡散リスクも考えられる。

本研究ではシカの行動様式を推定するために、シカ糞を利用した食性解析を行った。シカの行動理由は採餌、逃走、繁殖など様々であるが、時期を問わず採餌行動をしている。そこでシカの食性解析を行うことで、シカがどのような植物を求めて行動しているか明らかにできる可能性がある。従来の食性解析では胃内容物などのエサ残渣から由来となった植物を推定していた。しかしこの手法は、分解が進んだ場合には植物を同定することは難しい。

そこで、本研究ではシカの糞便中に含まれるエサ残渣の DNA メタバーコーディングを行うことで食性の解析を行なった。DNA メタバーコーディングとは、様々な生物を由来とする DNA を大量解読して、DNA 情報から由来となった生物の名前を推定する手法である。シカの糞便中にはシカが食べた様々な植物の残渣が存在している。そこから DNA を抽出して植物の DNA を PCR で増幅し、その塩基配列を NGS (次世代シーケンサー) により大量並列的に解読し、DNA データベースと照合することで DNA の由来となった植物種を同定する。これにより機械的な食性解析が実現できる。

2. 研究方法

2-1 解析サンプル

本研究では実際に狩猟で得られたシカ 2 個体の糞便を用いて食性解析を行った。解析対象のシカには体重と体長がほぼ同等で、狩猟された季節(夏・冬)が異なるオス 2 個体を用いた。

表 1 研究に用いた糞便の由来となったシカの特性

サンプル名	狩猟日	性別	体長(cm)	体重(kg)
夏個体	2021.08.27	オス	130	55
冬個体	2022.01.18	オス	136	55

2-2 シカの糞便由来の DNA のメタバーコーディング

選定した二匹のシカの糞便中の植物由来の DNA を DNeasy Plant Pro kit (Qiagen) を用いて抽出した。

次に植物由来の DNA を増幅する PCR を行った。PCR では、植物の葉緑体 DNA 上にある rbcL 領域の増幅を行った。この領域は植物の DNA メタバーコーディングによく用いられる領域である。PCR 反応液は 1 サンプルあたり、PCR Grade water (Thermo Fisher Scientific) 20.5 μ L, 2.5mM dNTP (TaKaRa) 4 μ L, GC Buffer (New England Bio Lab) 10 μ L の rbcL 領域用 primer Ericson¹⁾ および SI²⁾それぞれ 2.5 μ L, 10% Tween20 (関東化学) 5 μ L, Phusion (New England Bio Lab) 0.5 μ L, 抽出した DNA 5 μ L を加え、全量 50 μ L になるように調節した。

PCR 反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TAKARA) を用いた。PCR サイクルは、95°C3 分で変性反応を行い、95°Cで 30 秒、46°Cで 30 秒、72°C30 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル実施して、72°C3 分の伸長反応を行なった後、4°Cで保存した。

PCR 産物の精製は AMpure XP (Beckman Coulter) を利用した。PCR 産物の DNA 配列の解読は株式会社生物技研に委託し、MiSeq (Illumina) を用いて分析した。得られた配列は Qiime2 を用いてクオリティフィルタリングなどを行った後に、代表配列を作成した。最後に BLAST を利用して各代表配列の由来となった生物種名を検索した。

2-3 データ解析

得られた植物種を草本類および木本類の 2 種類に分類した。そして、夏個体と冬個体で共通して摂食されていた植物種および各個体のみが摂食していた植物種を図示した。

3. 結果と考察

NGS 解析の結果、129,187 配列が得られ、クオリティフィルタリングを通過した配列数は 50,288 配列であった。代表配列は全 177 配列が得られ、BLAST 検索によって 111 種が得られた。

夏個体からのみ検出された種は 47 種、冬個体からのみ検出された種が 34 種、両者共通で検出された種が 30 種となった。夏個体と冬個体の食性解析結果を比べると、植物全体では夏個体からより多くの種が検出された。また、草本類は夏に、木本類は冬に多く摂食されている傾向が見られた。これは、夏ほど多様な総本類が多く、それを選択的に摂食できるが、冬には草本類が減少するため木本類を摂食しているためと考えられる。

a) 植物種全体

b) 草本類

c) 木本類

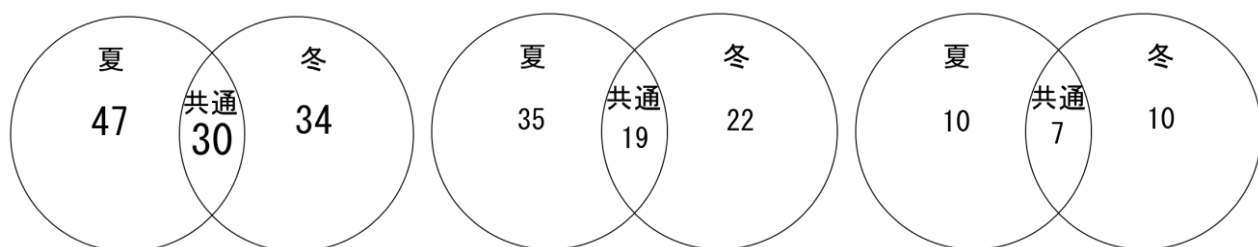


図 1. 植物種全体，分類ごとのベン図

参考文献

- 1) Kress, W.J., D.L. Erickson, F.A. Jones and E. Bermingham, Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama, *PNAS*, 106, 1821-1826, 2009.
- 2) Erickson, D.L., E. Reed, P. Ramachandran, N.A. Bourg, W.J. McShea, and A. Ottesen, Reconstructing a herbivore's diet using a novel rbcL DNA mini-barcode for plants, *AOB PLANTS*, 9, plx015, 2017.

謝辞

本研究は科学研究費補助金（番号：19KK0107）、環境研究総合推進費（5-2006）およびダイバーシティ研究環境イニシアティブ、山梨大学学術・社会変革研究プロジェクトからの資金援助を受けました。また、本研究に用いたサンプルは鈴木一聡氏（(株) boonboon）より提供を受けました。ここに謝意を表します。