

タイトル

天然記念物であるニホンヤマネの糞から非侵襲的に食性を分析する遺伝手法を開発

概要

福山大学生物工学科 佐藤淳 教授と、同学科動物学研究室の大学院生(安田皓輝君)および4年生(松田華奈さん、藤田帆香さん)、(一社)ヤマネ・いきもの研究所・ニホンヤマネ保護研究グループの湊秋作博士と饗場葉留果博士は、国の天然記念物であるニホンヤマネ(齧歯目ヤマネ科)の糞から、食性を分析する手法を開発しました。具体的には、まず、山梨県北杜市および島根県隠岐郡の森林に設置した巣箱に残された糞を採取し、遺伝的手法により、ニホンヤマネの糞であることを確認しました。その後、DNAメタバーコーディング分析により、ニホンヤマネの無脊椎動物食性と植物食性を明らかにしました。

天然記念物という特性上、侵襲的な分析が難しいニホンヤマネについて、上記の非侵襲的遺伝手法を適用し、本種が、蛾、ハエ、カメムシ類ほか、多様な無脊椎動物、そして秋に果実のなるサルナシをはじめとした多様な植物を食べていることが明らかになりました。本成果は、2023年8月11日に日本哺乳類学会の国際学術誌「Mammal Study」にオンライン公開されました(オープンアクセス)。プリント版では本誌の2023年10月号に掲載されます(10月末発行予定)。



サラサドウダンを食べるニホンヤマネ(撮影:一社)ヤマネ・いきもの研究所 湊秋作)

背景

ニホンヤマネ (*Glirulus japonicus*) は齧歯目ヤマネ科の哺乳類で、日本固有種です。DNA を使って進化を探る研究から、本種は日本に生息する哺乳類の中で最も古い起源を持つ哺乳類として知られています (Sato 2016)。1975 年には、国の天然記念物に指定されました。本研究では、保護の対象であるニホンヤマネの糞を材料として、種同定と食性分析をするための非侵襲的遺伝手法を開発することを目的としました。

これまでの食性研究においては、本種が保護の対象であるため、採餌行動を直接観察するか、あるいは糞の内容物や事故による数少ない死亡個体の消化管内容物を顕微鏡で観察するという手法が採られてきました。しかし、糞や消化管に残された生物の残骸の観察から餌生物の種を同定することは難しく、森での直接観察は効果的であるが、人が見ることができる対象は限定的であるため、本種の食性の詳細は明らかではない状況にありました (岩渕ら 2008; 湊 2018)。

昨今、次世代シーケンサーの開発とともに、水や土壌、糞などの環境中のサンプルに含まれる生物の残骸から DNA を分析する環境 DNA 技術が発展してきました。DNA をバーコードとみなして、環境サンプル中の DNA から複数の生物種を特定する手法を DNA メタバーコーディング法といいます。著者らはこれまでにアカネズミ、ヒメネズミ、ハタネズミ等の齧歯類の糞を対象に本手法を展開し、遺伝的な食性分析手法を発展させてきました (Sato et al. 2018, 2019, 2021; Murano et al. 2023)。

そこで本研究では森林に設置した巣箱に残された糞を対象に、DNA メタバーコーディング法を用いて分析し、ニホンヤマネの食性を明らかにすることを試みました。このことで、ニホンヤマネが求める餌生物を把握し、本種が生息するためにはどのような森が必要なのかを明らかにすることを目指しました。また、手法の改善のために、開発した手法の問題点の把握に努めました。

参考文献:

- 岩渕真奈美ら (2008) 日本環境動物昆虫学会誌 19(2): 85–89
- 湊秋作 (2018) ニホンヤマネ ー野生動物の保全と環境教育ー 東京大学出版会
- Sato (2016) Species Diversity of Animals in Japan. Springer Japan pp. 49–116.
- Sato et al. (2018) Journal of Mammalogy 99(4): 952–964
- Sato et al. (2019) Mammal Study 44 (4): 221–231

Sato et al. (2021) Mammal Research 67: 109–122 (2022)

Murano et al. (2023) Mammal Study 48(4): DOI: 10.3106/ms2023-0015

研究手法・成果

巣箱にはヒメネズミなど、ニホンヤマネ以外の動物も糞を残す可能性があるため、巣箱に残された糞を排出した生物種を特定するために、ミトコンドリア DNA *Cytb*(チトクローム *b*) 遺伝子の DNA 塩基配列を決定して、種同定をおこないました。具体的には既存のプライマーを用いて、PCR 増幅とサンガー法による DNA 塩基配列の決定を行い、国際 DNA データベースを用いて、生物種を同定しました。分析の結果、サンプルのすべてはニホンヤマネの糞であることが判明し、山梨県北杜市と島根県隠岐郡のヤマネは、過去にそれぞれの地域で検出された DNA と同じ型を持つことがわかりました。このことは、糞サンプルに基づく本手法を使えば、ニホンヤマネを捕獲しなくとも、遺伝分析に基づく系統地理学的な研究や保全単位の設定が可能であることを示唆します。

次にニホンヤマネの糞から食性を分析しました。具体的には、糞に含まれる無脊椎動物のミトコンドリア DNA *COI*(チトクローム *c* オキシダーゼサブユニット I) 遺伝子をターゲットとしたプライマーと、植物の ITS2 (Internal transcribed spacer 2) 領域をターゲットとしたプライマーを用いて、それぞれ PCR 増幅を行い、福山大学に設置された次世代シーケンサー MiSeq を用いて、PCR 増幅産物の DNA の塩基配列を決定しました。得られた塩基配列を国際 DNA データベースで検索し、餌生物の分類群の同定を行いました。その結果、山梨県北杜市では、本種が夏に蛾類と種々の植物を食べており、秋にハエとカメムシ類(アブラムシ)、そしてサルナシを食べていることが明らかとなりました。サルナシの検出時期は果実期と重なりますので、ニホンヤマネはサルナシの果実を食べているものと考えられます。このことは、冬眠前の脂肪蓄積に関与することが示唆されます。サンプル数は少ないですが、島根県隠岐郡では、11 月に蛾類とシイが検出され、山梨県北杜市とは異なる傾向にありました。以上、巣箱に残された糞から保護の対象となる動物の餌生物を検出することが可能であることを示した点に、本研究の重要性があります。

本研究では、DNA メタバーコーディング法により属レベルの餌生物種が明らかとなり、これまでの伝統的な手法と比較して、詳細なニホンヤマネの食性の理解につながりました。しかしながら同時に、本手法における様々な問題点も示唆されました。以下の点は今後の研究で改善すべき点です。

問題点① 糞の排出後のコンタミネーションの可能性

ニホンヤマネは休憩や繁殖のために巣箱を利用しますが、その際にコケなどの植物を持ち込むことが知られています。実際に、本研究でも植物の DNA メタバーコーディング分析でコケを検出しました。さらに、巣箱の糞に後から引き寄せられたハエ類も糞にその痕跡を残す可能性があります。こうした食べていないと思われる検出生物を排除する方法を考えていくことが課題になります。

問題点② 積極的に食べていない餌生物の解釈

食べているものの中には、果実を食べるとともに付随的に口に入るハエなど、積極的に食べていないと考えられる餌生物が存在するため、解釈には注意を要します。また、ヤマネの餌となる無脊椎動物の餌についての情報も、餌の餌が検出される二次的採餌を把握する上で重要です。

問題点③ 国際 DNA データベース情報の解釈

本研究では国際DNAデータベースを使って餌生物の検索を行いました。種まで同定されないDNA塩基配列が多く見られました。糞を採取した地域(今回は、山梨県北杜市と島根県隠岐郡)における無脊椎動物や植物のDNAを分析し、ローカルDNAデータベースを作成することで、より詳細な食性の解明へとつながると考えられます。さらに、国際DNAデータベースには、誤って同定された生物のDNA配列の登録があることも示唆されました。国際 DNA データベースから得られた生物種情報の解釈には注意が必要です。

波及効果、今後の予定

保護の対象であり、そして体サイズが小さなニホンヤマネの食性分析は、基本的には、小さな糞の直接観察以外に方法がありませんでした。本研究は、糞中 DNA の分析により、この課題を克服しようとした初めての研究です。同様の手法は、絶滅の危惧される動物にも応用が可能であり、本手法を改善していくことで、保護の対象となる動物が自然界から食物として何を求めているのかに関する理解を深めることにつながります。

研究プロジェクトについて

本研究は、経団連自然保護協議会助成金(研究代表者 湊秋作)、大成建設自然・歴史環境基金(研究代表者 湊秋作)、北杜市環境保全事業補助金(研究代表者 湊秋作)、福山大学グリーンサイエンス研究センター助成金(研究代表者 佐藤淳)の支援を受けて実施されました。

研究者のコメント

本手法を用いることで、保護対象生物のみならず、普通種の生態系における役割や同所的に生息する他種との競合関係など、生態系における生物間相互作用が少しずつ解明されていくことが期待されます。今後、手法上の課題を克服し、様々な動物に本手法を適応していくことができれば、「生態系とは何か」についての理解が深まると考えています(佐藤淳)。

論文タイトルと著者

タイトル: Noninvasive genetic methods for species identification and dietary profiling of the Japanese dormouse *Glirulus japonicus* from fecal samples. (ニホンヤマネの糞を用いた種同定と食性プロファイリングのための非侵襲的遺伝手法)

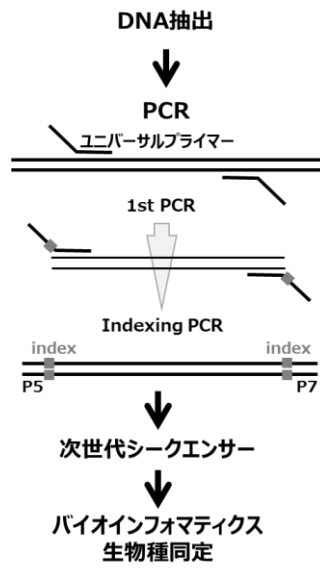
著者: Sato JJ, Matsuda H, Fujita H, Yasuda K, Aiba H, Minato S

掲載誌: Mammal Study

DOI: <https://doi.org/10.3106/ms2023-0003>

参考図

DNA メタバーコーディング法の概略図。2回のPCRを行う。1st PCRでは、COI や ITS2 をターゲットとしたユニバーサルプライマーに挟まれた領域を増幅する。2nd PCR で付与するインデックスはサンプルの識別のためのサンプル固有の DNA 塩基配列で、P5、P7 は次世代シーケンサーで分析するためのアダプターである。



関連キーワード

ニホンヤマネ DNA メタバーコーディング 種同定 食性分析 非侵襲的遺伝手法