

令和5年度

ライチョウ捕食動物の糞便遺伝子解析による

モニタリング調査業務委託

報告書

令和6年2月

受入先：山形大学農学部

文責：斎藤昌幸・榎本孝晃

目次

1. 背景・目的	1
2. 分析方法	1
2.1. 分析したサンプル.....	1
2.2. DNA の抽出	1
2.3. 種の判別.....	2
2.4. 個体識別.....	4
2.5. ライチョウ DNA の検出.....	6
3. 結果	7
3.1. 種判別.....	7
3.2. 個体識別.....	8
3.3. ライチョウ DNA の検出.....	8
4. まとめ	11
4.1. 種判別.....	11
4.2. 個体識別.....	11
4.3. ライチョウの捕食.....	12
5. 引用文献	13

1. 背景・目的

火打山のニホンライチョウは 20–30 羽程度の群れで生息しており、その群れの小ささから、様々な環境変化が絶滅に繋がるのが懸念されている。

ライチョウの生息数に影響を与える要因の一つに、捕食動物がある。自然環境においてライチョウは被食者であるが、近年高山帯においてアカギツネなどの出現頻度が高まっており、捕食数の増加が予想される。

本調査では、これまでに採取された捕食動物の糞の DNA 分析によって、排泄した種および個体を特定し、現在の火打山においてライチョウを捕食する動物の現状をモニタリングするとともに、糞の内容物からライチョウの捕食状況を確認する。

2. 分析方法

2.1. 分析したサンプル

妙高市が採取した 31 サンプルを分析した。内訳は、2021 年が 4 サンプル、2022 年が 20 サンプル、2023 年が 7 サンプルであった。

2.2. DNA の抽出

各糞サンプルからの DNA の抽出は、QIAGEN 社の QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit を使用した。手順は kit 付属のプロトコルを一部改訂し、以下の手順で行った。回収した DNA は、Nanodrop で定量した後、冷凍 (-30°C) で保存した。

①糞サンプルの表面 (約 200 mg) をチューブに入れる。

②1 ml の InhibitEX Buffer とビーズを加え、1 分間ボルテックスでよく混ぜる。

- ③15,000 rpm で2 分間遠心する。
- ④新しいチューブに Proteinase K を 25 μ l 入れる。
- ⑤ステップ③の上清 600 μ l を④のチューブに移す。
- ⑥Buffer AL 600 μ l を加え、15 秒ほどボルテックスする。
- ⑦70°Cで 15 分間インキュベートする。その後、15,000 rpm で1 分だけ遠心する。
- ⑧96-100% EtOH を 600 μ l 加え、ボルテックスでよく混合した後、スピンドウンする。
- ⑨ステップ⑧の上清 600 μ l をスピんカラムに入れ、15,000 rpm で1 分間遠心する。
- ⑩ろ液の入ったチューブを捨て、カラムを新しいチューブにセットする。
- ⑪ステップ⑨～⑩を2 回繰り返す、全ての上清を移す。
- ⑫カラムに Buffer AW1 (エタノール添加済み) を 500 μ l 加え、15,000 rpm で1 分間遠心する。
- ⑬ろ液の入ったチューブを捨て、カラムを新しいチューブにセットし、500 μ l の Buffer AW2 (エタノール添加済み) を加え、15,000 rpm で3 分間遠心する。
- ⑭ろ液の入ったチューブを捨て、カラムを新しいチューブにセットし、15,000 rpm で再度、3 分間 遠心する。
- ⑮サンプル ID を記した DNA LoBind Tube にカラムをセットし、100 μ l の Buffer ATE を添加する。室温で3 分ほど待ったあと、6,000 rpm で3 分遠心する。

2.3. 種の判別

種判別は以下の①～②の手順で行った。

①PCR 増幅

先行研究 (Shimatani et al. 2008) に従い種特異的プライマー (表 1) を用いた PCR 増幅を行った。PCR 増幅には Takara Bio の Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 を使用した。PCR 溶液の組成は、抽出した DNA 1 μ l、Ultra Pure Water 1.065 μ l、Multiplex PCR Buffer 3.5 μ l、Multiplex PCR Enzyme Mix 0.035 μ l、Fw Primer (2 pmol) 0.7 μ l、Rv Primer (2 pmol) 0.7 μ l、総量 7 μ l で行った。PCR 反応は 95°C 3 分のインキュベーションを行った後、94°C 1 分の熱変性、アニーリング (表 2)、72°C 1 分の伸長反応、を 45 サイクル行い、72°C 10 分の最終伸長を行った。

②電気泳動

各 PCR 産物に対してアガロースゲルを用いた電気泳動により、目的 DNA 断片の増幅を確認した。fox-F1/R1 で増幅が確認されたものをキツネ、MME-F1/R1 で増幅が確認されたものをテン、どちらのプライマーセットでも増幅が確認されなかったものは不明とした。

表 1. PCR に用いたプライマー

対象種	プライマー名	配列
アカギツネ (<i>Vulpes vulpes</i>)	fox-F1 fox-R1	5'-TGCATTACTGCTATGCCCCATA-3' 5'-TGATAGAAACCCCCACGTTG-3'
ニホンテン (<i>Martes melampus</i>)	MME-F1 MME-R1	5'-TATCCTGCCCTTCATCGTCTC-3' 5'-TGTCTGGGTCTCCCAGCAGA-3'
ニホンイタチ (<i>Mustela itatsi</i>)	IT-F1 IT-R1	5'-GTA CTTCGTGCATTACTGGCT-3' 5'-GCCAGGTATAGTTTCATGATAGA-3'
アメリカミンク (<i>Neovison vison</i>)	VI-F2 VI-R1	5'-TTTCCTCACCACCATTTTTTCA-3' 5'-GTAGGATTGGATTGAGGACTAT-3'

表 2. 各種のアニーリング条件

対象種	プライマーセット	アニーリング条件
アカギツネ (<i>Vulpes vulpes</i>)	fox-F1 /R1	60°C30 秒
ニホンテン (<i>Martes melampus</i>)	MME-F1/R1	55°C30 秒
ニホンイタチ (<i>Mustela itatsi</i>)	IT-F1/R1	57°C1 分
アメリカミンク (<i>Neovison vison</i>)	VI-F2/R1	57°C1 分

2.4. 個体識別

排糞個体の識別は以下の①～②の手順で行った。

①PCR

個体識別は種判別された糞のみを対象に行った。先行研究 (キツネ : Amaike et al. 2018, テン : 灰野ら 2020) を参考に個体識別が可能なマイクロサテライトマーカー (表 3) を用いて PCR 増幅を行った。また、先行研究 (Cao et al. 2012) を参考に M13 プライマーを用いて 2 段階にわけて PCR を行った。PCR には Takara Bio の Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 を使用した。

キツネについて、1st PCR の PCR 溶液の組成は、DNA 1 μ l、Multiplex PCR Buffer 4 μ l、Multiplex PCR Enzyme Mix 0.04 μ l、Fw tailed Primer (2 pmol) 0.8 μ l、Rv Primer (2 pmol) 0.8 μ l、Ultra Pure Water 1.2 μ l、BSA 溶液 0.16 μ l、総量 8 μ l で行った。PCR 反応は 95°C 15 分のインキュベーションを行った後、94°C 30 秒の熱変性、57°C 90 秒のアニーリング、72°C 1 分の伸長反応、を 30 サイクル行い、60°C 30 分の最終伸長を行った。

2nd PCR の PCR 溶液の組成は、1st PCR の PCR 産物 3.3 μ l、Multiplex PCR Buffer 6 μ l、Multiplex PCR Enzyme Mix 0.06 μ l、蛍光 Primer (2 pmol) 1.2 μ l、Rv Primer (2 pmol) 1.2 μ l、BSA 溶液 0.24 μ l、総量 12 μ l で行った。PCR 反応は 94°C 5 分のイン

キュベーションを行った後、94°C 30 秒の熱変性、53°C45 秒のアニーリング、72°C45 秒の伸長反応、を 15 サイクル行い、72°C10 分の最終伸長を行った。テンについて、1st PCR の PCR 溶液の組成は、DNA 1µl、Multiplex PCR Buffer 4µl、Multiplex PCR Enzyme Mix 0.04µl、Fw tailed Primer (2 pmol) 0.8µl、Rv Primer (2 pmol) 0.8µl、Ultra Pure Water 1.2µl、BSA 溶液 0.16µl、総量 8µl で行った。PCR 反応は 95°C 15 分のインキュベーションを行った後、94°C 30 秒の熱変性、57°C (Multiplex A) または 50°C (Multiplex B) で 30 秒のアニーリング、72°C30 秒の伸長反応、を 30 サイクル行い、60°C30 分の最終伸長を行った。

2nd PCR の PCR 溶液の組成は、1st PCR の PCR 産物 2.2µl、Multiplex PCR Buffer 4µl、Multiplex PCR Enzyme Mix 0.04µl、蛍光 Primer (2 pmol) 0.8µl、Rv Primer (2 pmol) 0.8µl、BSA 溶液 0.16µl、総量 8µl で行った。PCR 反応は 94°C 5 分のインキュベーションを行った後、94°C 30 秒の熱変性、53°C45 秒のアニーリング、72°C45 秒の伸長反応、を 15 サイクル行い、72°C10 分の最終伸長を行った。各サンプルに対し、独立に 3 回の PCR を行い遺伝子型を決定した (Lampa et al. 2013)。

②フラグメント解析およびジェノタイピング

フラグメント解析は FASMAC 社に依頼した。フラグメントデータは peak scanner2 (Applied Biosystems) を用いてフラグメント長の確認を行い、遺伝子型を決定した。

表 3. 個体識別に使用したマイクロサテライトマーカー

種	遺伝子座	Multiplex	蛍光色素	参照
アカギツネ	DB1	A	6-FAM	Lada et al. (1996)
	V374	A	NED	Wandeler and Funk (2006)
	V468	A	PET	Wandeler and Funk (2006)
	DB4	B	PET	Lada et al. (1996)
	V402	B	VIC	Wandeler and Funk (2006)
	V602	B	6-FAM	Wandeler and Funk (2006)
	DB3	C	VIC	Lada et al. (1996)
	DB6	C	6-FAM	Lada et al. (1996)
	V142	C	NED	Wandeler and Funk (2006)
ニホンテン	Ma-1	A	VIC	中村ら (2012)
	Ma-8	A	VIC	中村ら (2012)
	Mme-2	A	6-FAM	中村ら (2012)
	Mme-3	A	NED	中村ら (2012)
	Ma-2	B	PET	中村ら (2012)
	Ma-5	B	6-FAM	中村ら (2012)
	Mme-5	B	6-FAM	中村ら (2012)

2.5. ライチョウ DNA の検出

糞サンプルからのライチョウ DNA の検出は以下の①～③の手順で行った。

①PCR 増幅

先行研究 (Baba et al. 2001, 豊岡ら 2017) を参考に、AVEL16760.rai (5'-GACTACGGCTTGAAAAGCCATTGTTGTTGT-3') と AVEH476.rai (5'-GTGAAAAGTGAGAAAGTTCAGGAGTTA-3') のプライマーセットを用いて PCR 反応を行った。PCR は全サンプルに対し 2 回ずつ行った (1 回目: Takara Bio の Multiplex PCR Assay Kit Ver.2、2 回目: TOYOBO の KOD FX Neo)。

1 回目の PCR について、PCR 溶液の組成は、DNA 1 μ l、2×Multiplex PCR Buffer

3.5 μ l、Multiplex PCR Enzyme Mix 0.035 μ l、Fw Primer (2 pmol) 0.7 μ l、Rv Primer (2 pmol) 0.7 μ l、総量 7 μ l で行った。PCR 反応は 94°C2 分のインキュベーションを行った後、94°C15 秒の熱変性、50°C15 秒のアニーリング、72°C30 秒の伸長反応、を 40 サイクル行い、72°C7 分の最終伸長を行った。

2 回目の PCR について、PCR 溶液の組成は、DNA 1 μ l、2 \times PCR Buffer for KOD FX Neo 5 μ l、2mM dNTPs 2 μ l、Fw Primer (2 pmol) 0.9 μ l、Rv Primer (2 pmol) 0.9 μ l、KOD FX Neo 0.2 μ l、総量 10 μ l で行った。PCR 反応は 94°C2 分のインキュベーションを行った後、94°C15 秒の熱変性、55°C30 秒のアニーリング、68°C1 分の伸長反応、を 40 サイクル行い、72°C7 分の最終伸長を行った。

②電気泳動および増幅産物の精製

各 PCR 産物に対してアガロースゲルを用いた電気泳動により、目的 DNA 断片の増幅を確認した。増幅が確認されたものについては、ExoSAP-IT Express PCR Product Cleanup を 1 μ l 加え、37°Cで 30 分、80°Cで 20 分の処理をサーマルサイクラーで行った。

③シーケンス

DNA シーケンス解析は FASMAC 社に依頼した。得られた配列についてアメリカ国立生物工学情報センターが提供する BLAST 検索により種を決定した。

3. 結果

3.1. 種判別

糞 DNA から種判別した結果、31 サンプルの内、27 サンプルがキツネ、2 サン

ブルがテンと判別された（表 4）。残りの 2 サンプルについては、次の候補であるニホンイタチとアメリカミンクとも照合したが、いずれの種としても判別されなかった。そのため、これら 2 サンプルは不明と判断された（表 4）。

3.2. 個体識別

遺伝子座を少なくとも 1 座以上決定できた糞サンプルは、キツネが 27 サンプルの内 10 サンプル、テンが 2 サンプルの内 1 サンプルであった。1 座以上決定できたサンプルを対象にジェノタイピングした結果、キツネは 6 個体、テンは 1 個体が識別された（表 4）。複数回にわたって糞がサンプリングされた個体は、キツネ A、キツネ B、キツネ F であった。このうちキツネ A については、2021 年と 2023 年の糞サンプルから個体が識別された。

3.3. ライチョウ DNA の検出

31 サンプルすべてにおいてライチョウ DNA の検出を行ったところ、PCR による増幅が見られたものが 3 サンプルあった。しかし、BLAST 検索により種を同定したところ、いずれも菌類でありライチョウは検出されなかった。

表 4. 各糞サンプルにおける種判別、個体識別、ライチョウの DNA 検出の結果。種判別結果は、糞 DNA による同定結果を示す。個体識別結果の異なるアルファベットは異なる個体であることを示す。ライチョウ PCR は○が検出されたサンプル、×が検出されなかったサンプルを示す。ライチョウ DNA は×が BLAST 検索の結果ライチョウ以外の種だと同定されたサンプルを示し、括弧内は同定された種を示す。

通番号	検体番号	報告書番号	調査日	報告書記載種類	sampleID	種判別結果	個体識別結果	ライチョウ PCR	ライチョウ DNA
1	9	31	2021年10月27日	タヌキ?	My-01	アカギツネ	キツネ A	×	
2	10	32	2021年10月27日	テン?	My-02	アカギツネ		×	
3	11	33	2021年10月27日	テン	My-03	アカギツネ		×	
4	12	37	2021年10月28日	テン	My-04	アカギツネ		×	
5	11	11	2022年9月12日	ツキノワグマ?	My-05	アカギツネ		×	
6	12	12	2022年9月12日	中型哺乳類	My-06	アカギツネ		×	
7	13	13	2022年9月12日	中型哺乳類	My-07	アカギツネ		×	
8	14	14	2022年9月12日	テン	My-08	アカギツネ		×	
9	15	15	2022年9月12日	中型哺乳類	My-09	アカギツネ		×	
10	16	16	2022年9月12日	テン?	My-10	アカギツネ		○	× (Lelliottia sp.)
11	17	17	2022年9月12日	テン	My-11	アカギツネ	キツネ B	×	
12	18	18	2022年9月12日	ツキノワグマ?	My-12	アカギツネ		×	
13	19	19	2022年9月12日	中型哺乳類	My-13	アカギツネ	キツネ B	×	
14	20	20	2022年9月12日	キツネ?	My-14	アカギツネ		×	
15	21	21	2022年9月12日	テン	My-15	不明		×	

16	22	22	2022年9月12日	テン	My-16	アカギツネ	キツネ C	×	
17	23	23	2022年9月12日	中型哺乳類	My-17	アカギツネ		×	
18	24	24	2022年9月12日	中型哺乳類	My-18	アカギツネ	キツネ D	○	× (Citrobacter tructae)
19	25	25	2022年9月12日	中型哺乳類	My-19	アカギツネ		×	
20	26	26	2022年9月12日	中型哺乳類	My-20	アカギツネ		○	× (Cedecea neteri)
21	27	27	2022年9月12日	テン	My-21	アカギツネ	キツネ B	×	
22	17	60	2022年10月27日	キツネ?	My-22	アカギツネ	キツネ E	×	
23	18	61	2022年10月27日	テン	My-23	アカギツネ		×	
24	19	62	2022年10月27日	テン	My-24	不明		×	
NA	5	NA	2023年9月14日	テン?	My-25	アカギツネ		×	
NA	7	NA	2023年9月14日	テン?	My-26	アカギツネ		×	
NA	8	NA	2023年9月14日	中型哺乳類	My-27	アカギツネ	キツネ A	×	
NA	9	NA	2023年9月14日	オコジョ?	My-28	ニホンテン		×	
NA	10	NA	2023年9月14日	中型哺乳類	My-29	アカギツネ	キツネ F	×	
NA	9	NA	2023年10月23日	テン	My-30	アカギツネ	キツネ F	×	
NA	11	NA	2023年10月23日	テン	My-31	ニホンテン	テン A	×	

4. まとめ

4.1. 種判別

本分析では多くのサンプルについて種判別を行うことができ、ほとんどがキツネの糞であったことが示された。在来中型食肉目の中ではキツネが最も肉食の傾向があるため、ライチョウにとっては脅威となる可能性がある。

また、本分析から採取した糞を目視によって種同定した場合に、誤った種として判別してしまう可能性も示された。誤同定を防ぐためには、DNAによる種判別は有効な手段の一つだと考えられる。また、今回は2つの不明サンプルが存在したが、これはDNAの分解が進んでいた可能性と、テンやキツネ、イタチ、ミンク以外の種の糞であった可能性がある。

本分析では、種特異的プライマーによるPCRと電気泳動を用いた種判別を行ったが、それでも誤同定の可能性はあるので、より正確に同定する場合は、制限酵素処理や塩基配列を読むなどの方法も必要になると考えられる。

4.2. 個体識別

本分析ではキツネ6個体、テン1個体が識別された。キツネについては複数年にわたって確認された個体も存在した（キツネA）。毎年、他の地域から火打山を訪問しているのか、火打山周辺に通年いるのかは不明であるが、少なくとも同一個体が異なる年の秋頃に存在していることは示された。また、2022年と2023年には複数個体の糞が採取されたことも明らかとなり、一定数のキツネが火打山周辺を利用していることが示された。

一部の糞サンプルについては半数以上のマーカーで増えなかったものや1座違いのものが存在した。そのため、同一個体を別個体として識別されてしまっている可能性もゼロではないため、解釈は慎重に行う必要がある。また、DNA

の分解が進んでいるものが多く、個体識別をより正確にしたり、成功率をあげたりするためには、糞のサンプリング方法を検討する必要があるかもしれない。調査頻度を増やして新しい糞のみを採取することや、サンプリング時に DNA の分解が抑えられるように糞をバッファーやエタノールに漬けるなどの方法が考えられる。

4.3. ライチョウの捕食

今回の糞サンプルからはライチョウの DNA は検出されなかった。日本のキツネやテンの主要な餌資源は小型哺乳類、昆虫類、果実類である (Enomoto et al. 2023)。また、高山地帯のキツネやテンの食性研究においてもこの傾向は同様である (例えば、上馬・徳野 2001)。そのため、ライチョウはキツネやテンの主要な餌資源ではなかった可能性がある。ただし、今回のサンプリング期間は夏と秋だけである。キツネやテンは季節によって食性を柔軟に変化させ、鳥類の利用は春や冬にやや増えることがあるため (Enomoto et al. 2023)、サンプリング期間以外にライチョウを捕食している可能性はある。

今回はライチョウの捕食が検出されなかったが、仮に出現頻度が小さくても、ライチョウへのインパクトが小さいとは言いきれない。ライチョウの個体数が少ない場合、1羽が捕食されただけでも、個体群には大きな負の影響を与えるかもしれない。

一般的に高山帯におけるキツネ・テンの生息数は多くないと考えられるが、今後、生息数が増えた場合は、機会主義的な採食戦略をもつキツネやテンがライチョウを捕食する可能性は増加すると予想される。そのため、今後もキツネやテンの継続的な食性調査が必要であると考えられる。

5. 引用文献

- Amaike, Y., Murakami, T., & Masuda, R. (2018). Low genetic diversity in an isolated red fox (*Vulpes vulpes*) population on Mt. Hakodate, Japan, revealed by microsatellite analyses of fecal samples. *Mammal study*, 43(3), 141–152.
- Baba, Y., Fujimaki, Y., Yoshii, R., & Koike, H. (2001). Genetic Variability in the Mitochondrial Control Region of the Japanese Rock Ptarmigan *Lagopus mutus japonicus*. *Japanese Journal of Ornithology*, 50(2), 53–64.
- Cao, Y., Tian, L., Gao, Y., & Liu, F. (2012). Genetic diversity of cultivated and wild Ussurian Pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.) in China evaluated with M13-tailed SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59, 9–17.
- Enomoto, T., Watabe, R., & Saito, M. U. (2023). Seasonal variation in dietary patterns and trophic niche overlap among three sympatric medium-sized carnivores in a cool-temperate zone. *Journal of Vertebrate Biology*, 72, 23021.
- 灰野巴瑠, 井上英治, 下岡ゆき子. (2020). ニホンテンの非侵襲的な糞由来 DNA による個体識別を用いた個体数・行動域推定と縄張り行動について. *帝京科学大学紀要*, 16, 25–32.
- Lade, J. A., Murray, N. D., Marks, C. A., & Robinson, N. A. (1996). Microsatellite differentiation between Phillip Island and mainland Australian populations of the red fox *Vulpes vulpes*. *Molecular Ecology*, 5(1), 81–87.
- Lampa, S., Henle, K., Klenke, R., Hoehn, M., & Gruber, B. (2013). How to overcome genotyping errors in non-invasive genetic mark-recapture population size estimation—A review of available methods illustrated by a case study. *The Journal of Wildlife Management*, 77(8), 1490–1511.
- 中村匡聡, 松村弘, 田悟和巳, & 荒井秋晴. (2012). マイクロサテライト DNA 多

- 型解析によるテン *Martes melampus* の個体識別. DNA 多型, 20, 334–339.
- Shimatani, Y., Takeshita, T., Tatsuzawa, S., Ikeda, T., & Masuda, R. (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.
- 豊岡由希子, 松田勉, & 山崎裕治. (2017). 立山のライチョウにおける糞を用いた遺伝的多様性の評価. *保全生態学研究*, 22(1), 219–228.
- 上馬康生, & 徳野力. (2001). 白山の登山道におけるキツネ, テン, オコジョの糞の内容 (2001 年) . 石川県白山自然保護センター研究報告, 28, 7–11.
- Wandeler, P., & Funk, S. M. (2006). Short microsatellite DNA markers for the red fox (*Vulpes vulpes*). *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 98–100.