

令和 6 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 7 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	12
4.1. 種判別.....	12
4.2. 個体識別.....	12
4.3. ライチョウの捕食.....	13
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へ直結するものと危惧されている。

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。自然環境下においてライチョウは捕食される種であるが、近年高山帯におけるキツネなどの出現頻度が高まっており、捕食数の増嵩が懸念される。

本件調査では、これまで採取された捕食動物の糞の DNA 分析によって、排泄した種及び個体を特定し、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

2024 年 7 月から 10 月にかけて妙高市が採取した捕食者（キツネまたはテン）と思われる 29 個の糞サンプルを分析した。

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 は冷凍（-30℃）で保存した。

- ①糞サンプルと 1 ml の InhibitEX Buffer が入っているチューブを 1 分間ボルテックスでよく混ぜる。

- ②15,000 rpm で2 分間遠心する。
- ③新しいチューブに Proteinase K を 25 μ l 入れる。
- ④ステップ②の上清 600 μ l を③のチューブに移す。
- ⑤Buffer AL 600 μ l を加え、15 秒ほどボルテックスする。
- ⑥70℃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。
- ⑦96-100% 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。
- ⑧ステップ⑦の上清 600 μ l をスピнкаラムに入れ、15,000 rpm で1 分間遠心する。
- ⑨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。
- ⑩ステップ⑧～⑨を2 回繰り返し、全ての上清を移す。
- ⑪カラムに Buffer AW1 を 500 μ l 加え、15,000 rpm で1 分間遠心する。
- ⑫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 を加え、15,000 rpm で3 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、15,000 rpm で再度、3 分間 遠心する。
- ⑭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 DNA1 μ l、Nuclease-free Water 0.77 μ l、Multiplex PCR Buffer 3.0 μ l、Multiplex PCR Enzyme Mix 0.03 μ l、Primer mix 1.2 μ l (Fw Primer と Rv Primer、各プライマーは 1 μ M)、総量 6 μ l で行った。PCR 反応は 94°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アカギツネ、MME-F1/R1 で増幅が確認されたものをニホンテン、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	fox-F1	5'-TGCATTACTGCTATGCCCCATA-3'
(<i>Vulpes vulpes</i>)	fox-R1	5'-TGATAGAAACCCCCACGTTG-3'
ニホンテン	MME-F1	5'-TATCCTGCCCTTCATCGTCTC-3'
(<i>Martes melampus</i>)	MME-R1	5'-TGTCTGGGTCTCCCAGCAGA-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°C 30 秒
ニホンテン (<i>Martes melampus</i>)	MME-F1/R1	55°C 30 秒

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：Amaiike 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を用いて複数の multiplex PCR に分けて増幅を行った（表 3）。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 6 μ l、Multiplex PCR Enzyme Mix 0.06 μ l、primer mix 2.4 μ l（Fw tailed Primer と Rv Primer、各プライマーは 0.33 μ M）、Nuclease-free Water 2.3 μ l、BSA 溶液 0.24 μ l、総量 12 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°C90 秒のアニーリング、72°C1 分の伸長反応、を 30 サイクル行い、72°C10 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、primer mix 2.4 μ l（蛍光 Primer と Rv Primer、各プライマーは 0.33 μ M）、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 1 μ l、Multiplex PCR Buffer 5 μ l、Multiplex PCR Enzyme Mix 0.05 μ l、primer mix 2 μ l（Fw tailed Primer と Rv Primer、

Multiplex A と B では各プライマーは 0.5 μ M、Multiplex C では 0.33 μ M)、Nuclease-free Water 1.75 μ l、BSA 溶液 0.2 μ l、総量 10 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 (Multiplex A, B) または 50°C (Multiplex C) で 30 秒のアニーリング、72°C 30 秒の伸長反応、を 30 サイクル行い、72°C 10 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 2.2 μ l、Multiplex PCR Buffer 4 μ l、Multiplex PCR Enzyme Mix 0.04 μ l、primer mix 1.6 μ l (蛍光 Primer と Rv Primer、Multiplex A と B では各プライマーは 0.5 μ M、Multiplex C では 0.33 μ M)、BSA 溶液 0.16 μ l、総量 8 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°C 45 秒のアニーリング、72°C 45 秒の伸長反応、を 15 サイクル行い、72°C 10 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)
	Mme-2	A	6-FAM	中村ら (2012)
	Ma-8	B	VIC	中村ら (2012)
	Mme-3	B	NED	中村ら (2012)
	Ma-2	C	PET	中村ら (2012)
	Ma-5	C	6-FAM	中村ら (2012)
	Mme-5	C	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、ライチョウのミトコンドリア DNA コントロール領域の L 鎖側プライマー AVEL16760.ra1 (5'-GACTACGGCTTGAAAAGCCATTGTTGTTGT-3') と H 鎖側プライマー AVEH476.ra1 (5'-GTGAAAAGTGAGAAAGTTCAGGAGTTA-3') のプライマーセットを用いて PCR 反応を行った。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 DNA1 μ l、Nuclease-free Water 0.77 μ l、Multiplex PCR Buffer 3.0 μ l、Multiplex PCR Enzyme Mix 0.03 μ l、Primer mix 1.2 μ l（Fw Primer と Rv Primer、各プライマーは 1 μ M）、総量 6 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°C30 秒の熱変性、55°C30 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 PCR Product Cleanup Reagent のプロトコルに従い PCR 産物を精製した。

③シーケンス

糞サンプルから抽出した DNA には、糞を排泄した動物の DNA だけでなく、餌生物や腸内細菌、排糞後に付着した菌類など様々な DNA が含まれていることから、偶発的にプライマーが目的とするライチョウの DNA 以外の DNA に結合し、増幅してしまう可能性も考えられる。そのため、PCR で増幅された DNA が本当にライチョウの DNA かどうかを確かめるために PCR 産物より塩基配列を決定した。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、8 サンプルがキツネ、14 サン

ブルがテン、7 サンプルが不明と判別された（表 4 ; 図 1）。

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 8 サンプルの内 3 サンプル、テンが 14 サンプルの内 10 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 3 個体、テンは 6 個体が識別された（表 4 ; 図 1）。

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 の検出を行ったが、PCR による増幅はみられなかった。

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。ライチョウのプライマーでの遺伝子増幅の有無は、PCR によって増幅が検出されたサンプルを○、検出されなかったサンプルを×と示した。

サンプル番号	調査日	報告書記載種類	Sample ID	種判別結果	個体識別結果	ライチョウ のプライマー での遺伝子 増幅の有無
1	2024 年 7 月 2 日	テン	MY24-01	不明		×
2	2024 年 7 月 2 日	テン	MY24-02	テン		×
4	2024 年 7 月 2 日	テン	MY24-03	不明		×
6	2024 年 7 月 2 日	キツネ	MY24-04	キツネ		×
7	2024 年 7 月 2 日	キツネ	MY24-05	キツネ		×
8	2024 年 7 月 2 日	キツネ	MY24-06	キツネ		×
1	2024 年 7 月 23 日	中型哺乳類	MY24-07	キツネ		×
2	2024 年 7 月 23 日	中型哺乳類	MY24-08	キツネ		×
3	2024 年 7 月 23 日	テン	MY24-09	不明		×
4	2024 年 7 月 23 日	キツネ	MY24-10	キツネ		×
5	2024 年 7 月 23 日	テン?	MY24-11	テン	テン A	×
6	2024 年 7 月 23 日	テン	MY24-12	テン		×
7	2024 年 7 月 23 日	テン	MY24-13	テン	テン B	×
8	2024 年 7 月 23 日	キツネ?	MY24-14	不明		×
9	2024 年 7 月 23 日	テン?	MY24-15	不明		×

10	2024 年 7 月 23 日	中型哺乳類	MY24-16	テン	テン C	×
11	2024 年 7 月 23 日	テン？	MY24-17	テン	テン B	×
12	2024 年 7 月 23 日	中型哺乳類	MY24-18	キツネ		×
1	2024 年 10 月 24 日	中型哺乳類	MY24-19	不明		×
2	2024 年 10 月 24 日	テン	MY24-20	テン	テン D	×
3	2024 年 10 月 24 日	テン	MY24-21	テン	テン E	×
4	2024 年 10 月 24 日	中型哺乳類	MY24-22	テン		×
5	2024 年 10 月 24 日	テン？	MY24-23	テン		×
6	2024 年 10 月 24 日	キツネ？	MY24-24	キツネ		×
7	2024 年 10 月 24 日	テン	MY24-25	テン		×
8	2024 年 10 月 24 日	テン	MY24-26	テン	テン F	×
9	2024 年 10 月 24 日	キツネ？	MY24-27	不明		×
10	2024 年 10 月 24 日	テン	MY24-28	テン	テン B？	×
11	2024 年 10 月 24 日	キツネ？	MY24-29	テン		×

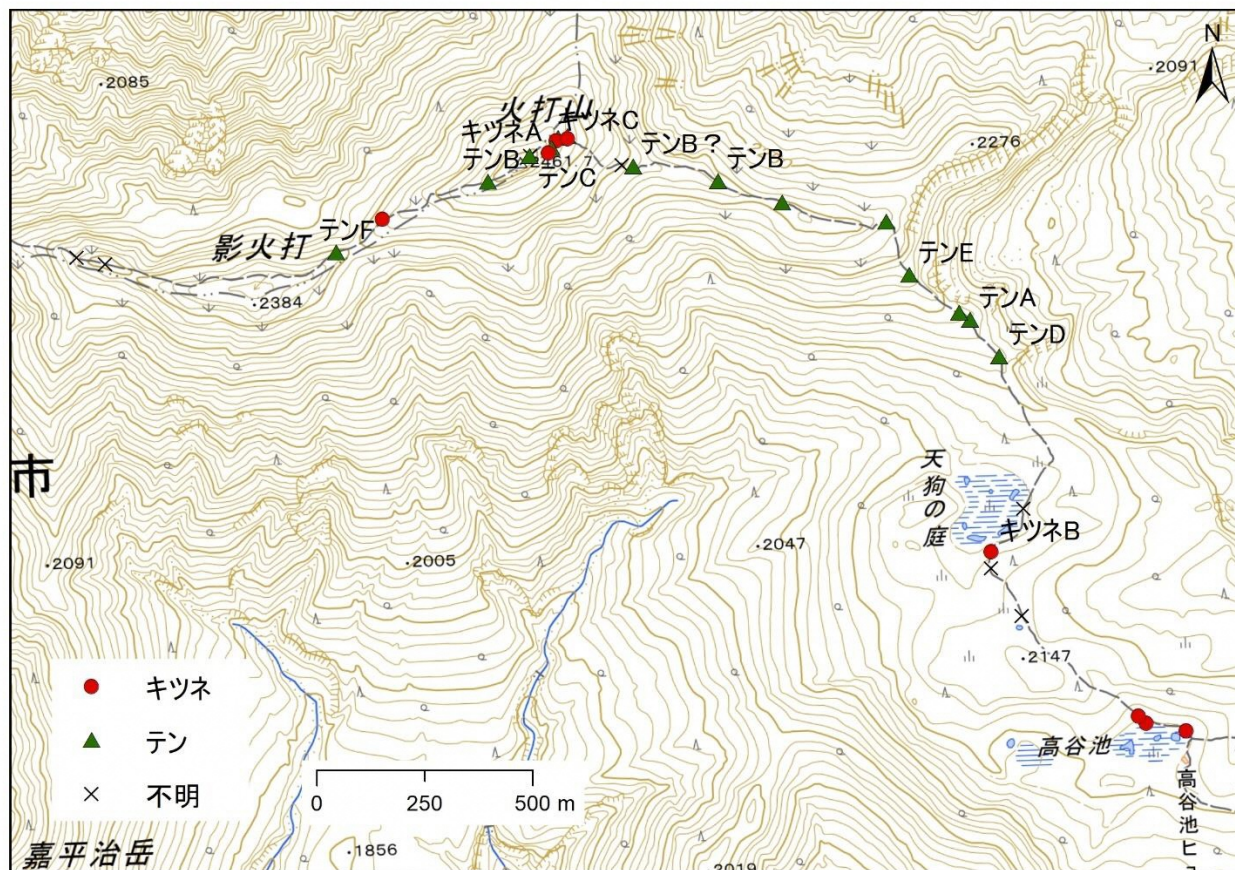


図 1. 野外で採取された糞サンプルの位置と糞 DNA 分析結果。DNA 分析によって判別された種名を示し、個体識別まで成功したサンプルについては個体名を示した。なお、座標が不明であった 9 サンプルについては記していない。背景には国土地理院の地形図を使用した。

4. まとめ

4.1. 種判別

本分析では採取された糞の半数がテンであった。昨年度は採取されたサンプルのほとんどがキツネであったが、今年度はテンの方が多かった。中型食肉目においても個体群は年変動することが考えられ、捕食者相を評価する際には複数年度で実施する必要があるかもしれない。いずれにしても、両種とも鳥類を餌として利用することが知られていることから、ライチョウにとっては脅威となる可能性がある。今回は7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

本分析により、最低でもキツネ3個体、テン6個体がいることが確認された。なお、反復して採取されたのはテンBのみであった。これらの個体はいずれも昨年度確認された個体とは別個体であった。個体識別できたサンプルは限られていたものの、同じ個体から反復してサンプルが採取されることはほとんどなかったことから、個体識別された個体数よりも多くの個体がこの地域を利用していると考えられる。ただし、採取された多くの糞サンプルについてはマイクロサテライトマーカが増えなかったことから、個体数の解釈は慎重に行う必要がある。このジェノタイピング率の低さには、山地特有の強い紫外線や雨量の多さによるDNAの劣化が関係している可能性がある。個体数をより正確に推定するためにジェノタイピングの成功率をあげるためには、調査頻度を

増やして新しい糞のみを採取するなど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。

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切れない。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.