

氏名	多田智記
学位(専攻分野の名称)	博士(生物産業学)
学位記番号	甲第733号
学位授与の日付	平成29年3月17日
学位論文題目	キタキツネ (<i>Vulpes vulpes schrencki</i>) における新規遺伝マーカーの開発と、その分子生態学的研究への応用
論文審査委員	主査 教授・博士(生物産業学) 亀山祐一 准教授・博士(生物産業学) 和田健太 教授・博士(獣医学) 平山博樹 名誉教授・農学博士 横濱道成

論文内容の要旨

日本に生息するアカギツネ (*Vulpes vulpes*) は、本州に生息するホンDIGツネ (*V. v. japonica*) および北海道に生息するキタキツネ (*V. v. schrencki*) の2亜種に分類されている。このうち北海道の固有亜種であるキタキツネは、豊かな自然環境を維持するための重要な構成員として、重要な野生の動物資源であることと考えられる。その一方で、キタキツネは北海道の風土病として知られるエキノコックス症を媒介する動物として、警戒すべき側面も持つ。このようなキタキツネの重要性にもかかわらず、その行動範囲や食性などの詳細を明らかにした生態学的研究例は少ない。このことは、キタキツネが保全対象とされていないことに加えて、夜行性であり高い警戒心を有すること、さらにキタキツネの生態が生息環境によって多様であることにより、北海道全域におけるキタキツネの行動範囲や食性などの生態学的特性の解明には、多大な労力と研究期間を要するためであると推測される。

一方、分子生物学の飛躍的な発展に伴い、近年では、野生動物の生態学においてもDNAの塩基配列情報が応用されるようになった。また、近年のヒト法医学的研究は、希少種などの個体数が少ない動物種においても個体を傷つけることなく痕跡物を用いたDNA解析を可能にした。

本研究は、キタキツネ分子生態学的研究のためのスタンダードな遺伝マーカーの開発を目的として、第1部ではキタキツネゲノムからの多型マイクロサテライトマーカーの開発とそれらのキャラクタライゼーション、第2部では開発された新規マイクロサテライトマーカーにおける糞由来DNAを用いた有用性の評価を実施した。第3部では、被食動物特異的な遺伝マーカーの開発、ならびにそれに基づく糞中被食者由来DNAを用いた食性解

析法の確立について検討した。

第1部 キタキツネ新規マイクロサテライトマーカーの開発および評価

マイクロサテライト領域は、生物のゲノム上に散在する2-5塩基の繰り返し配列であり、その反復数は高い多型性を示す。このような特性は、個体識別、親子鑑定および集団の遺伝的多様性の評価に有効である。

キタキツネゲノムからマイクロサテライト領域を単離するために、肝臓由来DNAを制限酵素により消化し、磁気ビーズ法によるマイクロサテライトエンリッチゲノムDNAライブラリーを作製した。その結果、28種のマイクロサテライト領域のクローニングによって、それらの塩基配列が決定された。これらの塩基配列はBLASTプログラムによりイヌ (*Canis lupus familiaris*) 相同配列とのアライメントを行い、イヌ-アカギツネ間の比較染色体地図を用いて、アカギツネ染色体上のマイクロサテライト領域の位置を推定した。その結果、27種の塩基配列がアカギツネ常染色体および性染色体上にマッピングできた。次に、キタキツネ7個体の臓器由来ゲノムDNAにおいて、これらマイクロサテライトの多型性を評価した結果、28種のうち、17種のマーカーにおいて明確な多型の存在を確認し、それらの遺伝子型から7個体のキタキツネにおける各マーカーの平均アレル数は4.41、平均ヘテロ接合率の期待値 (H_E) および実測値 (H_O) は、それぞれ0.73および0.72となり、全てのマーカーにおいてHardy-Weinberg equilibrium (HWE) からの有意な逸脱は認められなかった。次に、単離された28種のマイクロサテライト領域について、キタキツネ、イヌ、ウサギ (*Lepus timidus*)、マウス (*Mus musculus*) およびラット (*Rattus norve-*

gicus) の被毛由来 DNA を用いた PCR 増幅の種特異性を検証した結果、28 種のうち 6 種においてキタキツネ特異的な増幅が確認された。以上のことから、本研究の第 1 部では、キタキツネゲノム由来では初めてとなる 17 種の多型マイクロサテライトマーカーの開発に成功し、そのうち 6 種にキタキツネ特異的な PCR 増幅を確認した。

第 2 部 新規マイクロサテライトマーカーを用いた糞由来 DNA への応用

野生動物の分子生態学的研究では、個体を傷つけることなく少量の試料を用いて簡便な手法により、対象種のゲノムを検出できる遺伝マーカーが必要とされる。その非侵襲的サンプルの一つである糞由来 DNA は、自然環境下において DNA の劣化、ならびに糞中の夾雑物により PCR 効率の著しい低下を示す。従って、開発されたマーカーの糞由来 DNA における有用性を検証する必要がある。そこで第 2 部では、第 1 部において開発された新規マイクロサテライトマーカーについて、糞由来 DNA を用いた個体識別について検討した。

糞便は、東京農業大学生物産業学部のファイントレール周辺から 214 個を採集した。キタキツネの糞便は、イヌやネコなどの動物と類似しており、その由来は採集者の主観によって判断されているため、まずアカギツネ、イヌおよびネコの mtDNA にそれぞれ特異的な増幅を示すプライマーセットを設計した。これらのマーカーを用いて採集した 214 個の糞由来 DNA の種判別を実施した結果、そのうち、192 個 (89.7%) においてキタキツネ由来であることを示すバンドが検出され、大部分がキタキツネ由来であった一方で、採集者の主観に基づく判断では、少数の誤ったサンプルを混入する可能性があることも明らかとなった。次に、これらの糞便から抽出されたゲノム DNA を用いて、フラグメント解析を実施した。その結果、22 個の糞由来 DNA において、6 種のマイクロサテライトマーカーにおけるジェノタイピングに成功した。22 個の糞由来 DNA のうち、2 サンプルにおいては 6 種のマーカーの遺伝子型が完全に一致した。このことは、この 2 サンプルの糞便が同一個体由来であることを示しており、ファイントレール周辺には少なくとも 21 個体のキタキツネが生息することと示唆された。また、糞由来 DNA を用いたマイクロサテライトマーカーの特性評価では、それらの平均アレル数は 6.33、 H_E および H_O は、それぞれ 0.68 および 0.48 となった。以上の結果から、予測通り糞由来 DNA を用いた解析の成功率は低かったものの、本研究において開発された新

規マイクロサテライトマーカーのうち 6 種は、糞由来 DNA を用いたジェノタイピングにも応用できる可能性が示された。

第 3 部 キタキツネ食性解析のための遺伝マーカーの開発と応用

キタキツネの食性は、糞便に残存する未消化物の顕微鏡観察によって同定する手法が一般的であるが、それは、種同定まで至らないもの、さらには研究者間によって異なる結果が示される危険性を含んでいる。そこで、被食者に特異的な PCR 増幅を示すマーカーを開発することによって、客観的な被食動物の同定が可能であると考えた。ミトコンドリア DNA (mtDNA) はひとつの細胞に多数のコピーが存在することから、核 DNA よりも効率的に解析できること、多数の動物種において mtDNA 配列の情報は整備されていることから、糞由来 DNA による食性解析に有用であることと推測された。そこで第 3 部では、キタキツネによる捕食が予測される一部の動物種に特異的な増幅を示す mtDNA マーカーの開発、ならびにそのキタキツネ糞由来 DNA を用いた食性解析への応用を試みた。

まず、ファイントレールおよび知床地域で採集されたそれぞれ 211 および 29 個の糞便からゲノム DNA を抽出し、脊椎動物の Cytochrome *b* (*Cytb*) 領域を増幅するユニバーサルプライマーセット (Kocher et al. 1989) を用い PCR を実施した。これらの DNA 断片の塩基配列を決定した結果、BLAST プログラムによって 59 サンプル (30.7%) が被食者の塩基配列であると推測された。確認された DNA 配列は、哺乳類、鳥類、魚類、昆虫類および爬虫類を含み、その割合はそれぞれ 86.4%、5.1%、3.4%、3.4% および 1.7% であった。また、哺乳類のうち齧歯目は、全体の 62.7% を占めていた。この結果から、食性解析を行なう被食者として、キタキツネの捕食が予測されるエゾヤチネズミ (*Myodes rufocanus bedfordiae*)、ヒメネズミ (*Apodemus argenteus*) およびドブネズミ (*Rattus norvegicus*) を選定した。さらに北海道内のキタキツネ由来糞便の分析を実施した一部の研究によって、エゾユキウサギ (*L. t. ainu*) の捕食が示されていることから、本種についても対象種として選定した。まず、これらの動物種について、種特異的な mtDNA マーカーを開発した。これらの mtDNA マーカーを、フラグメント解析により検出した結果、エゾヤチネズミの検出頻度が平均 49.0% となり、網走市八坂および斜里町ウトロの両調査地において最も高頻度で検出された。また、ヒメネズミ、ドブネズミおよびエ

ゾユキウサギの検出頻度は、それぞれ 5.1%、9.0% および 23.7% となった。これらの動物種は、近藤（2013）による同一サンプルを用いた糞分析では検出されておらず、本研究において新たな餌資源として同定された。従って、糞由来 DNA を用いた食性解析法は、顕微鏡を用いた手法よりも高感度で被食者が同定できた。また、エゾユキウサギの検出頻度は、八坂およびウトロにおいて、それぞれ 37.4% および 10.3% となり、その捕食量

には調査地による食性の差異が認められた。

結 論

本研究ではキタキツネゲノムから初めてマイクロサテライトマーカーを開発し、その有用性を明らかにした。加えて、糞便の種同定およびキタキツネ被食者マーカーを開発し、それらの糞由来 DNA を用いた分子生態学的研究への有用性を示した。

審査報告概要

本研究は、キタキツネにおける分子生態学的な研究のための遺伝マーカー開発を目的として、同種ゲノムからの多型マイクロサテライトマーカーの開発とそれらのキャラクタライゼーション、開発された新規マイクロサテライトマーカーにおける糞由来 DNA を用いた有用性の評価、被食動物特異的な遺伝マーカーの開発、ならびにそれに基づく糞中被食者由来 DNA を用いた食性解析法の確立を検討したものである。その結果、キタキツネ

のゲノムから初めてマイクロサテライトマーカーを開発し、その有用性を明らかにしている。加えて、糞便の種同定およびキタキツネ被食者マーカーも開発し、それらの糞由来 DNA を用いた分子生態学的研究への有用性を示している。これらの研究成果などを詳細に検討した結果、審査員一同は博士（生物産業学）を授与する価値があると判断した。