

平成 28 年度 博士論文

キタキツネ (*Vulpes vulpes schrencki*) 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
**Development of novel genetic markers
for molecular ecological study
in the Ezo red fox (*Vulpes vulpes schrencki*)**

指導教授 亀山 祐一

東京農業大学大学院 生物産業学研究科

生物産業学専攻

動物資源管理学研究室

47614002 多田 智記

| | |
|----------------------------------|----|
| 序章 | 1 |
| 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 | 5 |
| 第1章 緒論 | 5 |
| 第2章 材料および方法 | 7 |
| 第1節 キタキツネ新規マイクロサテライトマーカーの開発 | 7 |
| 第1項 ゲノム DNA 抽出 | 7 |
| 第2項 マイクロサテライトエンリッチライブラリの作製 | 7 |
| 第3項 マイクロサテライト領域のスクリーニング | 10 |
| 第4項 マイクロサテライト領域を標的としたプライマーの設計 | 12 |
| 第2節 新規マイクロサテライトマーカーの評価 | 12 |
| 第1項 ゲノム DNA 抽出 | 12 |
| 第2項 PCR によるマイクロサテライト領域の増幅 | 13 |
| 第3項 フラグメント解析およびジェノタイピング | 14 |
| 第3章 結果 | 17 |
| 第1節 キタキツネ新規マイクロサテライトマーカーの開発 | 17 |
| 第1項 マイクロサテライト領域の単離 | 17 |

| | | |
|-----|--|----|
| 第2項 | マイクロサテライト領域増幅プライマーの設計 | 17 |
| 第2節 | 新規マイクロサテライトマーカの評価 | 26 |
| 第1項 | フラグメント解析およびジェノタイピング | 26 |
| 第4章 | 考察 | 32 |
| | | |
| 第2部 | 新規マイクロサテライトマーカを応用した糞由来 DNA からの個体 識別 | 34 |
| 第1章 | 緒論 | 34 |
| 第2章 | 材料および方法 | 36 |
| 第1節 | キタキツネ糞便の採集 | 36 |
| 第1項 | 糞便の採集 | 36 |
| 第2項 | 糞由来ゲノム DNA 抽出 | 36 |
| 第2節 | キタキツネ糞便の種判別 | 39 |
| 第1項 | 種判別プライマーの設計 | 39 |
| 第2項 | PCR による糞便の種判別 | 41 |
| 第3節 | キタキツネ糞由来 DNA からの個体識別 | 41 |

| | | |
|-----|-----------------------|----|
| 第1項 | PCRによるマイクロサテライト領域の増幅 | 41 |
| 第2項 | フラグメント解析およびジェノタイピング | 42 |
| 第3項 | 遺伝子型に基づく個体識別 | 42 |
| 第3章 | 結果 | 43 |
| 第1節 | キタキツネ糞便の採集 | 43 |
| 第1項 | 糞便の採集およびゲノムDNA抽出 | 43 |
| 第2節 | キタキツネ糞便の種判別 | 43 |
| 第1項 | 種判別プライマーの設計 | 43 |
| 第2項 | PCRによる糞便の種判別 | 46 |
| 第3節 | キタキツネ糞由来DNAからの個体識別 | 46 |
| 第1項 | フラグメント解析およびジェノタイピング | 46 |
| 第2項 | 遺伝子型に基づく個体識別 | 50 |
| 第4章 | 考察 | 53 |
| 第3部 | キタキツネ食性解析遺伝マーカーの開発と応用 | 55 |
| 第1章 | 緒論 | 55 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 第2章 材料および方法 | 57 |
| 第1節 キタキツネ被食者種特異的マーカーの開発 | 57 |
| 第1項 被食者種特異的プライマーの設計 | 57 |
| 第2節 キタキツネ糞由来 DNA からの食性解析 | 57 |
| 第1項 糞由来ゲノム DNA の抽出 | 57 |
| 第2項 PCR による被食者ミトコンドリア DNA 断片の増幅 | 60 |
| 第3項 フラグメント解析による DNA 断片の検出 | 60 |
| 第3章 結果 | 61 |
| 第1節 キタキツネ被食者種特異的マーカーの開発 | 61 |
| 第1項 被食者特異的プライマーの設計 | 61 |
| 第2節 キタキツネ糞由来 DNA からの食性解析 | 61 |
| 第1項 フラグメント解析による DNA 断片の検出 | 61 |
| 第2項 DNA 断片の検出頻度に基づく食性解析 | 61 |
| 第4章 考察 | 67 |
| 総合討論 | 71 |

| | |
|---------|----|
| 要約 | 76 |
| 謝辞 | 78 |
| 引用文献 | 80 |
| Summary | 94 |

序章

アカギツネ (*Vulpes vulpes*) は、北極圏、南アメリカ、北アメリカ、ヨーロッパ、北アフリカおよびアジアに分布する中型哺乳類である。本種の分布域は、北半球に生息する食肉目の中でも最も広く、約 7,000 万 km² に及ぶ (Larivière and Pasitschniak-Arts 1996)。アカギツネは日本列島においても広く分布し、本州に生息するホンドギツネ (*V. v. japonica*) および北海道に生息するキタギツネ (*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ギツネは、豊かな自然環境を維持するための重要な構成員として、我が国における重要な野生の動物資源であると考えられる。その一方で、キタギツネは北海道の風土病であるエキノコックス症を媒介することも知られており、ヒトとの関係において注意が必要な動物でもある (Oku and Kamiya 2003)。本亜種の生息環境は多様であり、森林地帯から都市部まで幅広い環境に適応することで極めて広域的に分布している (Tsukada, 2005)。このことは、キタギツネが生態系の頂点に位置する捕食者であること、雑食性で幅広い食性を示すこと、および生息環境で食性が変化することが背景とも考えられる (Misawa 1979)。加えて、都市部および観光地においては、都市ギツネおよび観光ギツネと呼ばれる個体も

あり、餌付けなどによる個体数増加を原因とする自然生態系の攪乱、ならびにヒトとの接触によるエキノコックス症の伝播が懸念されている (Oku and Kamiya 2003)。

以上のような生態系への重要性にもかかわらず、キタキツネは個体数が多く、保全生物学分野からの注目度が低いため、詳細な生態学および遺伝学的情報が乏しい。また、キタキツネが夜行性であること、警戒心が強く、北海道の環境の異なる広域にわたって生態を明らかにすることに多大な労力と研究期間を必要とすることも、前記要因の一つであると推測される。しかし、キタキツネの生態学および遺伝学的な基礎情報は、本種に加えて被食者となる餌資源の個体群動態や、ヒトとの共存を考える上でも必須な情報となる。

1987年に Mullis らによって開発された Polymerase Chain Reaction (PCR) は、分子生物学の飛躍的な発展をもたらし (Mullis *et al.*, 1987; Saiki *et al.*, 1988)、最近ではそれが野生動物にも応用され、その DNA 情報の充実化が進められてきた (Munguia-Vega *et al.*, 2009; Hemmilä *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2014; Stange *et al.*, 2016)。さらに PCR は、少量の組織から DNA 解析を行うことを可能にし (Hagelberg and Sykes, 1989)、これにより調査対象種の生息環境から得られた痕

跡物由来 DNA を用いた分子生態学が発展してきた。一般的に、分子生態学に用いられる痕跡物は、非侵襲的試料である被毛および糞便が主流であり (Eggert *et al.*, 2005)、これらから採取できる対象種および被食者の組織・細胞より DNA が得られる (Taberlet *et al.*, 1999)。現在までに、これらの DNA を用いた多数の分子生態学的研究が報告されており、その有用性が示されてきた (Taberlet *et al.*, 1997; Kohn *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2004; Sastre *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2011; Ebert *et al.*, 2012; Baumgardt *et al.*, 2013; Vesterinen *et al.*, 2013)。

上記の分子生態学的手法は、キタキツネのような広域にわたって多様な環境に生息する動物種においては、従来の伝統的な生態学的研究のみでは困難な集団の遺伝的多様度やメタ個体群構造、複数の個体における行動範囲の推定、ならびに詳細な食性とその季節変化などを明らかにする上で極めて有用と考えられる。しかしその一方で、糞由来 DNA は自然環境下における劣化、ならびに夾雑物が多く含まれることから、PCR による DNA 断片増幅効率が著しく低い (Inoue, 2015)。この状況を打開するためには、特異性の高いプライマーセットの選定が必要となる。

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

一の開発を目的として、まず第 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-の開発とそれらの特異性評価を行なった。続く第 2 部では糞由来DNAからの個体識別における新規マイクロサテライトマーカ-の有用性を評価した。最後の第 3 部では、被食動物特異的な遺伝マーカ-の開発、ならびにそれに基づく糞中被食者由来DNAを用いた被食者の種同定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スの開発および評価

第1章 緒論

マイクロサテライトは、2-5塩基のモチーフで構成される反復配列であり、個体間において反復回数に高頻度な多型が認められる (Tautz, 1989)。このマイクロサテライト領域に認められる多型性は、生物の遺伝的多様性への利用が可能である (O'Connell *et al.*, 1997)。このことから、多型性に富み、検出手法も簡便であるマイクロサテライトマーカーは、分子生態学的研究において最も頻繁に用いられる遺伝マーカーの一つである (Mowat and Strobeck, 2000; Creel *et al.*, 2003; Eggert *et al.*, 2003; Prugh *et al.*, 2005; Piggott *et al.*, 2006)。アカギツネ属においてもいくつかのマイクロサテライトマーカーは開発されており、局所集団の遺伝的多様性ならびに集団の遺伝的構造に関する報告がある (Wandeler and Funk, 2006; Yan *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2015)。その一方で、一般的にマイクロサテライト領域はゲノム上の介在配列やイントロンなどに存在するため、マイクロサテライト近傍の塩基配列は遠縁になるにつれて、種間における保存性が低下することが報告されている (Moore *et al.*, 1991; Primmer *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2000)。このことから、マイクロサテライトマーカーを用いた場合、近縁種同士でも PCR

増幅の失敗、ならびにそれに伴う高いヌルアレルの検出頻度を引き起こす可能性がある (Oishi *et al.*, 2011)。

そこで第 1 部では、キタキツネ臓器由来 DNA からマイクロサテライトエンリッチライブラリーを構築し、そのライブラリーからのマイクロサテライト領域のクローニングを試みた。加えて、新たに単離されたキタキツネゲノムにおける新規マイクロサテライト領域の特性評価を行った。

第2章 材料および方法

第1節 キタキツネ新規マイクロサテライトマーカーの開発

第1項 ゲノム DNA 抽出

マイクロサテライト領域単離のためのゲノム DNA は、東京農業大学動物資源管理学研究室に保蔵されていた 1 個体のキタキツネ肝臓からフェノール抽出およびエタノール沈殿法によって精製した。

第2項 マイクロサテライトエンリッチライブラリの作製

マイクロサテライトエンリッチライブラリの作製は、Glenn and Schable (2005) によって開発された磁気ビーズ法に従って実施した (Glenn and Schable, 2005; Seki *et al.*, 2012)。キタキツネ肝臓由来ゲノム DNA の平滑末端化は、1× T4 Ligase buffer、20U *Xmn*I (New England Biolabs)、10U *Rsa*I (New England Biolabs)、0.03 pM BSA、50 mM NaCl および 5 µg のゲノム DNA に滅菌純水を加え、最終容量を 100 µl とした反応溶液を、37°C で 2 時間反応させることで実施した。反応後のゲノム DNA は、1%アガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイド染色の後に、300 bp から 1 kb の範囲をメスで切り出した。切り出したゲルは 4%アガロ

ースゲルに包埋し、低分子側を陰極側に設置し、15 分間の電気泳動を行なった。

泳動後の 4%アガロースゲルから、1%アガロースゲルとの境界付近を切り出し、MonoFas® DNA 精製キット I (ジーエルサイエンス) のプロトコルに沿って DNA 断片を精製した。

二本差 SNX24 Linkers は、10 μ M SuperSNX24 Forward (5'-GTT TAA GGC CTA GCT AGC AGA ATC-3'), 10 μ M SuperSNX24+4P Reverse (5'-p-GAT TCT GCT AGC TAG GCC TTA AAC AAA A-3') および 100 mM NaCl に滅菌純水を加え、最終容量を 200 μ l とした反応溶液を、95°C で 5 分間および室温で 30 分間インキュベートすることにより作製した。

精製された DNA と SNX24 Linkers とのライゲーションは、3.5 μ l の二本差 SNX24 Linkers、1 \times T4 Ligase buffer、400 U T4 DNA Ligase (New England BioLabs) および 4.5 μ l の DNA 精製溶液を混合し、最終容量を 10 μ l とした反応溶液を、16°C で一晩反応させることで実施した。

PCR は、2 μ l の SNX24 Linkers とライゲーション後の DNA 溶液を鋳型として、1 \times PCR Gold buffer、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTPs、0.8 μ M SuperSNX24 Forward および 0.5 U AmpliTaq Gold Polymerase (Thermo Fisher Scientific) に滅菌純水を加

え、最終容量 25 μl で実施した。PCR 反応は、95°C で 10 分間変性した後に、94°C で 30 秒、60°C で 30 秒および 72°C で 1 分 30 秒のサイクルを 30 回繰り返すことで実施した。

PCR 産物とビオチン修飾 GT プローブのハイブリダイゼーションの反応溶液は、10 μl の PCR 産物、1 μM Biotinylated MS (GT₁₂) probe および 1× Hyb solution (6× SSC および 0.1% SDS) に滅菌純水を加え、最終容量を 50 μl とした。反応条件は、95°C で 5 分間インキュベートし、70°C から 50.2°C まで 5 秒ごとに 0.2°C ずつ下げた後に、50°C で 10 分間インキュベートし、50°C から 40°C まで 5 秒ごとに 0.5°C ずつ下げるタッチダウンとした。

ビオチン吸着に用いる 50 μl の Dynabeads (Thermo Fisher Scientific) は、250 μl の TE buffer (pH 8.0) を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した。攪拌溶液は、マグネットスタンド上で 3 分間インキュベートした後、ピペットで上清を除去した。さらに、これに対して 150 μl の TE buffer を加え、タッピングの後に、マグネットスタンド上で 3 分間インキュベートし、ピペットで上清を除去した。次に、150 μl の 1× Hyb solution を加え、タッピングした後に、マグネットスタンド上で 3 分間インキュベート、ピペットで上清を除去し、再び 150 μl の 1× Hyb

solution を加えた。

上記の処理を行なった Dynabeads にハイブリダイズ後のサンプルを全量加え、ローテーターで 1 時間攪拌後、マグネットスタンド上で 3 分間インキュベートし、ピペットで上清を除去した。続いて、400 μ l の Wash solution 1 (2 \times SSC および 0.1% SDS) を用いて 2 回洗浄を行ない、ピペットで上清を除去した。さらに、50 $^{\circ}$ C に温めた 400 μ l の Wash solution 2 (1 \times SSC および 0.1% SDS) を用いて 2 回洗浄を行ない、ピペットで上清を除去した。次に、200 μ l の TLE buffer (10 mM pH 8.0 Tris-HCl および 50 μ M pH 8.0 EDTA) を加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌後、95 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベート、マグネットスタンド上で 3 分間インキュベートし、上清を回収した。回収した上清は、エタノール沈殿後、25 μ l の TLE buffer に溶解することでマイクロサテライトエンリッチライブラリとした。

第 3 項 マイクロサテライト領域のスクリーニング

PCR は、2 μ l のマイクロサテライトエンリッチライブラリ溶液を鋳型とした。

反応溶液は、1 \times Gold buffer、2 mM MgCl₂、0.2 mM dNTPs、0.5 μ M SuperSNX24

Forward および 0.5 U AmpliTaq Gold に滅菌純水を加え、最終容量を 50 μ l とした。

PCR 反応は、95°C で 10 分間変性した後に、94°C で 30 秒、60°C で 30 秒および 72°C で 1 分 30 秒のサイクルを 35 回繰り返すことで実施した。PCR 産物は、Montage Centrifugal Filter Devices (MILLIPORE) を用いて 20 μ l に精製した。

精製された PCR 産物のうち、7 μ l を pT7Blue T-vector (Novagen) へライゲーションした。ライゲーションサンプルは、ECOS Competent *E.coli* JM109 (NIPPON GENE) に形質転換し、得られた陽性コロニーをピッキングして、コロニーダイレクト PCR を行った。コロニーダイレクト PCR の反応溶液は、1 \times KAPA Taq Buffer、0.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTP Mix、2.6 μ M M13 P7 (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') および 2.6 μ M M13 P8 (5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA AAC-3') に滅菌純水を加え、最終容量を 20 μ l とした。PCR 反応は、95°C で 2 分間変性した後に、94°C で 10 秒、60°C で 10 秒および 72°C で 20 秒のサイクルを 40 回繰り返し、72°C で 30 秒伸長することで実施した。PCR 産物は、2%アガロースゲルを用いて、100V で 35 分間電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。次に、フラグメントサイズが 500 bp 以上の PCR 産物を選別し、それを ExoSAP IT (Affymetrix) により精製後、ダイレクトシーケンシ

グによって塩基配列を決定した。

第4項 マイクロサテライト領域を標的としたプライマーの設計

第3項において決定された塩基配列から、マイクロサテライト配列を検索し、その近傍にプライマーセットを設計した。また、決定された塩基配列はアライメント後、重複するクローンを除いた後に National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録した。

第2節 新規マイクロサテライトマーカーの評価

第1項 ゲノム DNA 抽出

マイクロサテライトマーカーの特異性を検証するためのサンプルは、2012年6月に得られたキタキツネの事故死亡個体、イヌ (*Canis lupus familiaris*)、マウス (*Mus musculus*) およびラット (*Rattus norvegicus*) の生体、ならびにウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) の剥製から採取した被毛を用いた。これらの毛幹部から QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN) を用いて、添付マニュアルに準じてゲノム DNA を抽出した。

マイクロサテライトマーカ－の特性評価には、網走、斜里およびウトロにおいて、2012年6～10月に得られたキタキツネ事故死亡個体7サンプルを、供試材料として用いた。得られた個体は、エキノコックス虫卵を死滅させるために、-70℃で24時間以上インキュベートした。その後、室温で一晩解凍した後に、肝臓を一部摘出し、-80℃で保存した。これらの肝臓からのDNA抽出には Genra Puregene Tissue Kit (QIAGEN) を用い、添付マニュアルに準じて実施した。

第2項 PCRによるマイクロサテライト領域の増幅

特異性検証のためのPCRにおけるポジティブコントロールには、アカギツネ、イヌ、ウサギ、マウスおよびラットで完全に一致するミトコンドリアDNA (mtDNA) 上の Cytochrome *b* (*Cytb*) 配列をターゲットとするプライマーセット (PM_L1741; 5'-AAC TGG GAT TAG ATA CCC CAC-3'および PM_1892; 5'-CGA TTA TAG AAC AGG CTC CTC-3') を設計して用いた。PCRは1 µlの毛幹部由来DNAを鋳型として、1× reaction buffer、0.8 mM dNTPs Mixture、1M Betaine、0.5 U Prime Taq DNA Polymerase (エムエステクノシステムズ) および 2.6 µM *DvNok* プライマーセット (Table.1) に滅菌純水を加え、最終容量を10 µlとしてPCR

を行った。PCR 反応は、94°C で 5 分間変性した後に、94°C で 30 秒、A°C で 30 秒および 72°C で 30 秒のサイクルを B 回繰り返す、72°C で 30 秒伸長すること
で実施した (A および B の値は、プライマーセットごとに最適化 ; Table.1)。PCR
産物は、2%アガロースゲルを用いて、100V で 35 分間電気泳動し、エチジウム
ブロマイド溶液を用いて染色後、トランスイルミネーター上でバンドの有無を
確認した。

マイクロサテライトマーカーの特性評価のための PCR は、0.13~0.05 µg のキ
タキツネ肝臓由来 DNA を鋳型として、1× PCR Gold buffer、0.2 mM dNTPs、1.5 mM
MgCl₂、1M Betaine、0.5 U *AmpliTaq* Gold DNA Polymerase および蛍光標識
(Beckman Dye 2, 3 および 4; Sigma-Aldrich) した 2.6 µM *DvNok* プライマーセッ
ト (Table.2) に滅菌純水を加え、最終容量を 10 µl とした。PCR 反応は、95°C
で 10 分間変性した後に、94°C で 30 秒、55°C で 30 秒および 72°C で 1 分のサイ
クルを 55 回繰り返す、72°C で 5 分間伸長することで実施した。

第 3 項 フラグメント解析およびジェノタイピング

第 2 項において増幅されたキタキツネ肝臓由来 DNA 断片は、CEQ8000 Genetic

Table.1 PCR condition for DvNok markers.

| Locus | Annealing tmp. | No. of cycles |
|----------------|----------------|---------------|
| <i>DvNok1</i> | 55 | 50 |
| <i>DvNok2</i> | 63 | 40 |
| <i>DvNok4</i> | 55 | 50 |
| <i>DvNok5</i> | 63 | 40 |
| <i>DvNok6</i> | 55 | 50 |
| <i>DvNok7</i> | 63 | 45 |
| <i>DvNok8</i> | 55 | 50 |
| <i>DvNok10</i> | 63 | 43 |
| <i>DvNok11</i> | 63 | 40 |
| <i>DvNok12</i> | 63 | 40 |
| <i>DvNok15</i> | 63 | 40 |
| <i>DvNok16</i> | 63 | 43 |
| <i>DvNok18</i> | 67 | 45 |
| <i>DvNok19</i> | 67 | 45 |
| <i>DvNok20</i> | 55 | 45 |
| <i>DvNok21</i> | 63 | 40 |
| <i>DvNok22</i> | 63 | 40 |
| <i>DvNok23</i> | 63 | 40 |
| <i>DvNok24</i> | 63 | 40 |
| <i>DvNok25</i> | 63 | 40 |
| <i>DvNok26</i> | 63 | 40 |
| <i>DvNok27</i> | 63 | 42 |
| <i>DvNok28</i> | 63 | 42 |

Locus indicates microsatellite marker name.

Annealing tmp. indicates the temperature of the annealing step (referred to as A); no. of cycle indicates repeat number of PCR cycle (referred to as B). DvNok3, 9, 13, 14, and 17 were excluded from chapter 1, due to non-amplification.

Analyzer (Sciex) を用いてフラグメント解析を実施した。これにより決定された遺伝子型に基づき、Number of allele (N_A)、ヘテロ接合率 (H_E および H_O) およびハーディー・ワインベルグ平衡 (HWE) を GENEPOP 4.2 (Rousset, 2008) により求めた。

第3章 結果

第1節 キタキツネ新規マイクロサテライトマーカーの開発

第1項 マイクロサテライト領域の単離

マイクロサテライト領域を含む DNA 断片の単離を試みた結果、1 個体のキタキツネ肝臓由来 DNA から、28 種のマイクロサテライト配列が決定された。これらの塩基配列を BLAST プログラムによって相同性検索を行った結果、イヌゲノム配列との高い相同性が認められた。イヌとキタキツネの高い相同性に基づき、イヌ-アカギツネ間の比較染色体地図 (Kukekova *et al.*, 2007) を用いてアカギツネゲノム上への当該マイクロサテライト領域のマッピングを行った。その結果、単離されたマイクロサテライト領域は、全てのマーカーがアカギツネ常染色体である第 1、2、3、6、7、8、9、10、11、12、13、14 および 16 番染色体および性染色体である X 染色体に広くマッピングされた (Fig.1)。

第2項 マイクロサテライト領域増幅プライマーの設計

第1項において決定されたマイクロサテライトの近傍に、合計 28 対のプライマーセットを設計し (Table.2)、マイクロサテライトマーカーとして以後の実験に用いた。また、マイクロサテライトマーカーを増幅するプライマーセットの

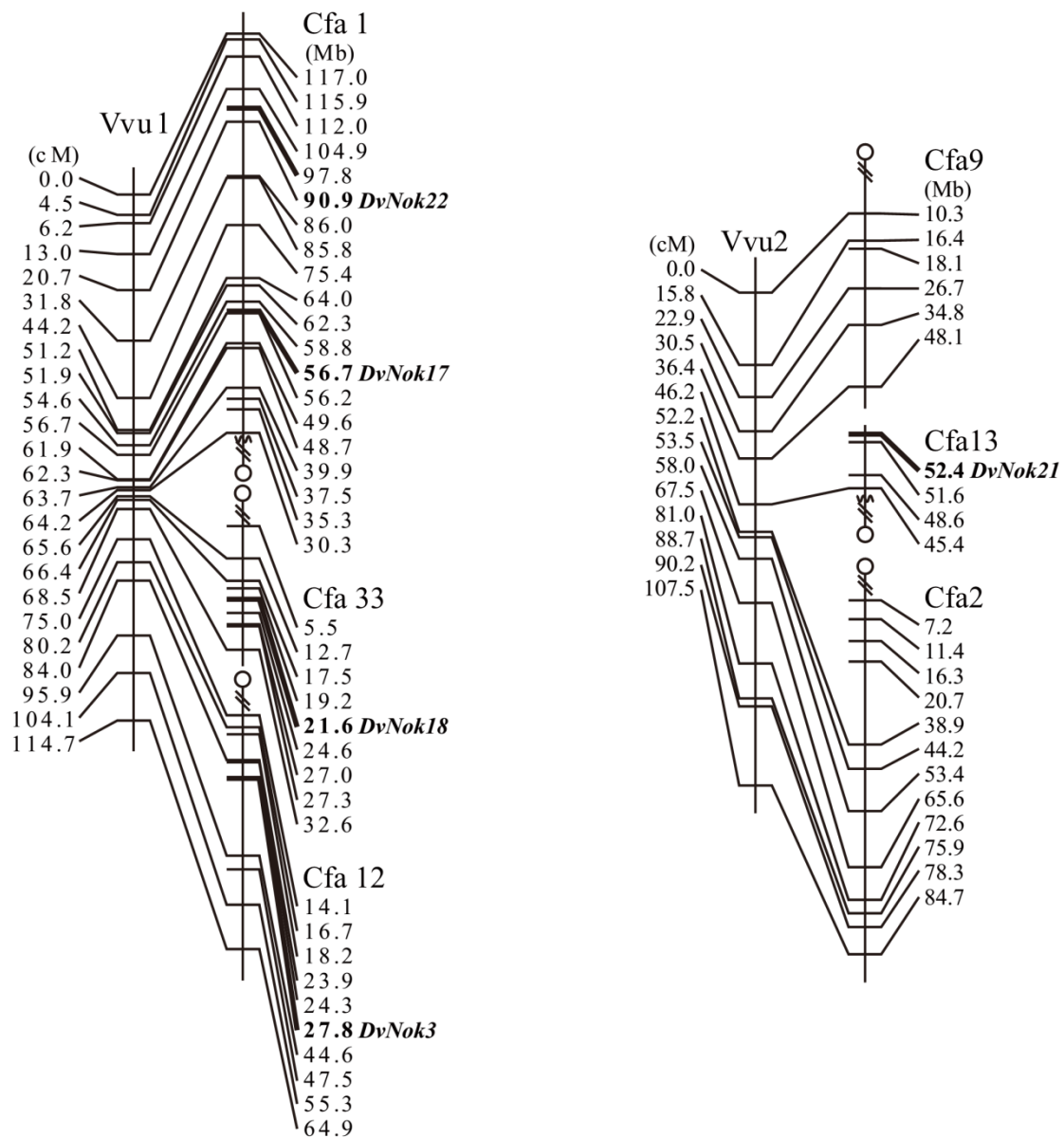


Fig.1 The putative chromosomal localization of the 28 microsatellite regions isolated from the red fox (*Vulpes vulpes*). The genetic maps were visualized using a comparative linkage map between dogs (*Canis familiar*) and red foxes as reported by Kukekova *et al.* (2007). Vvu and Cfa indicate red fox and dog chromosomes, respectively.

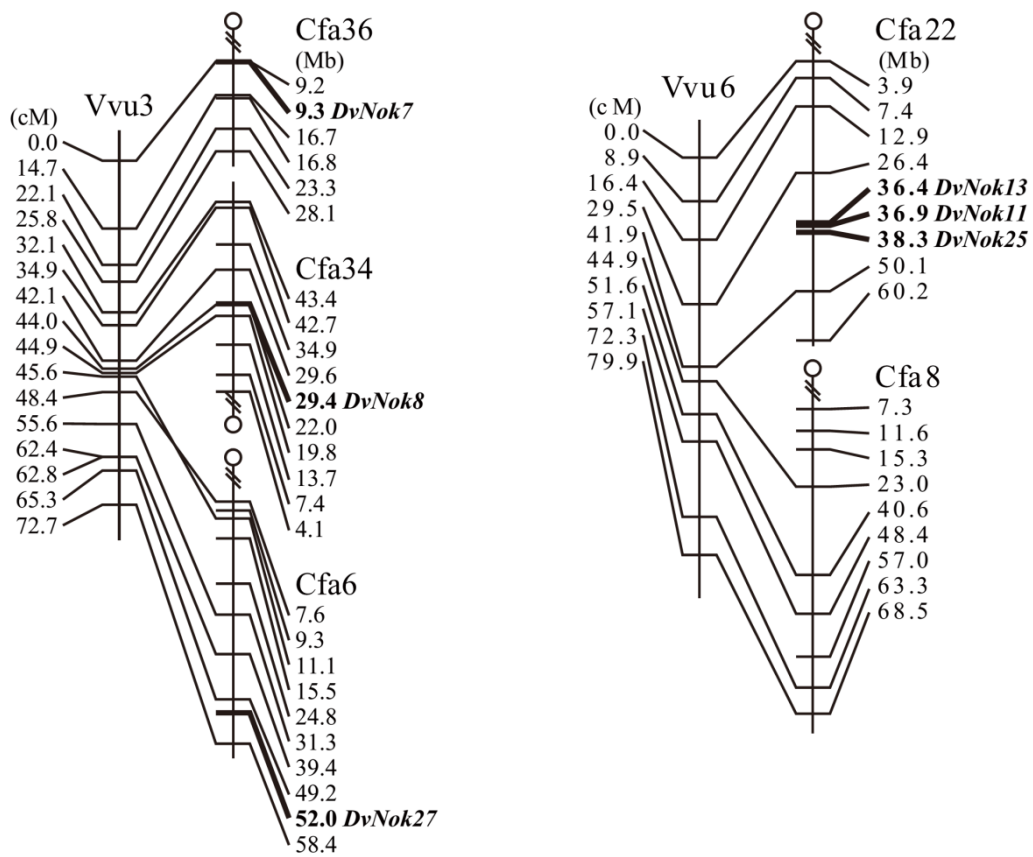


Fig.1 Continued from previous page.

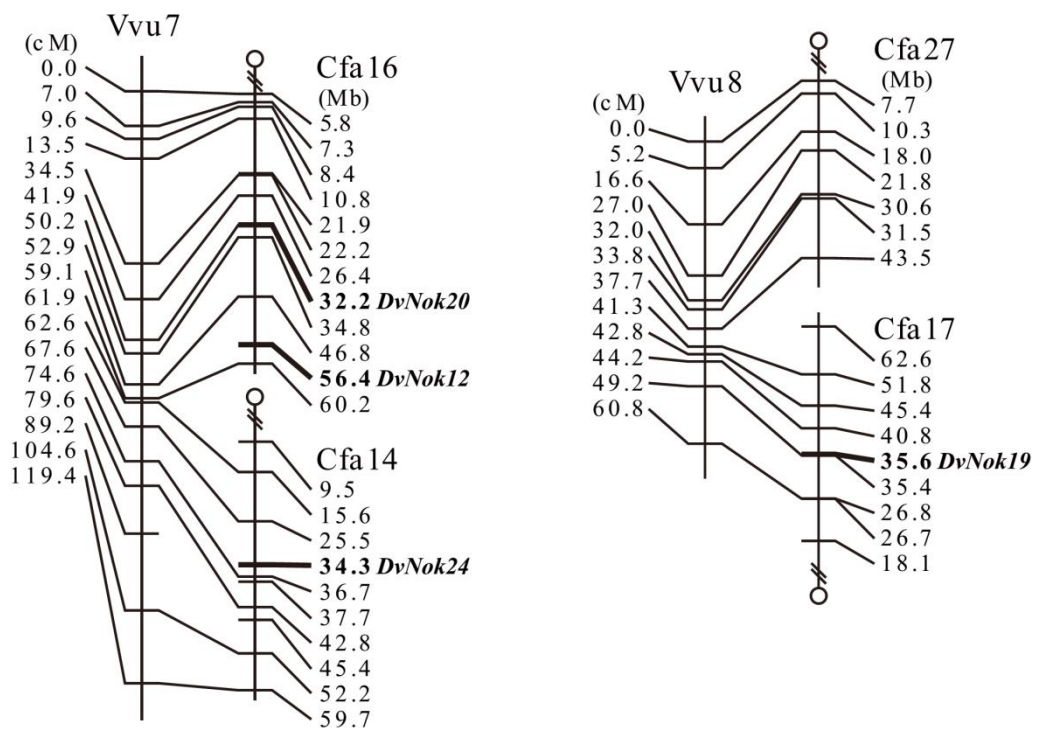


Fig.1 Continued from previous page.

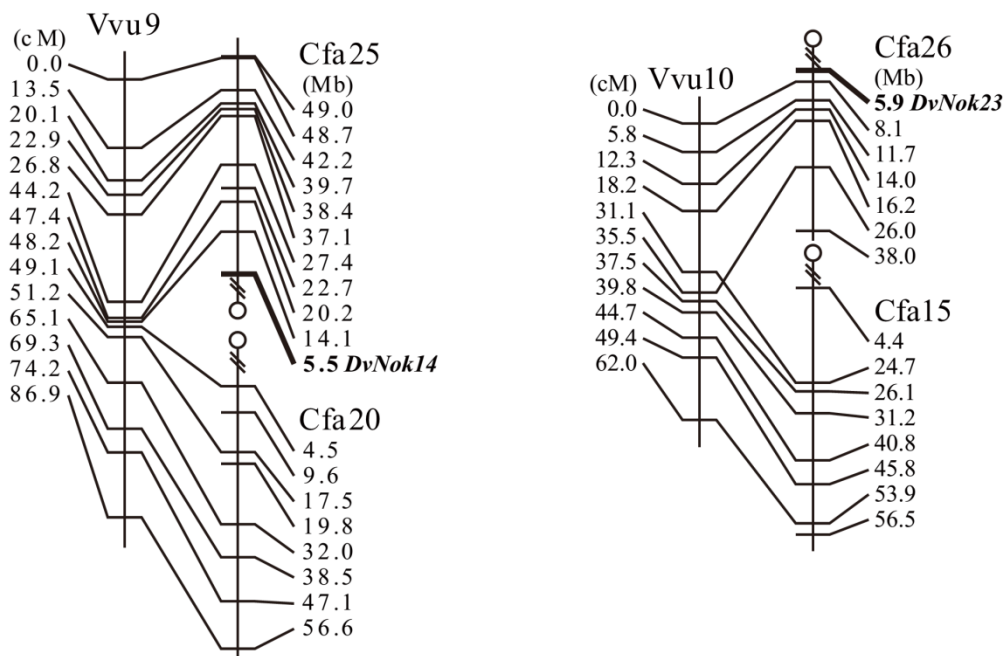


Fig.1 Continued from previous page.

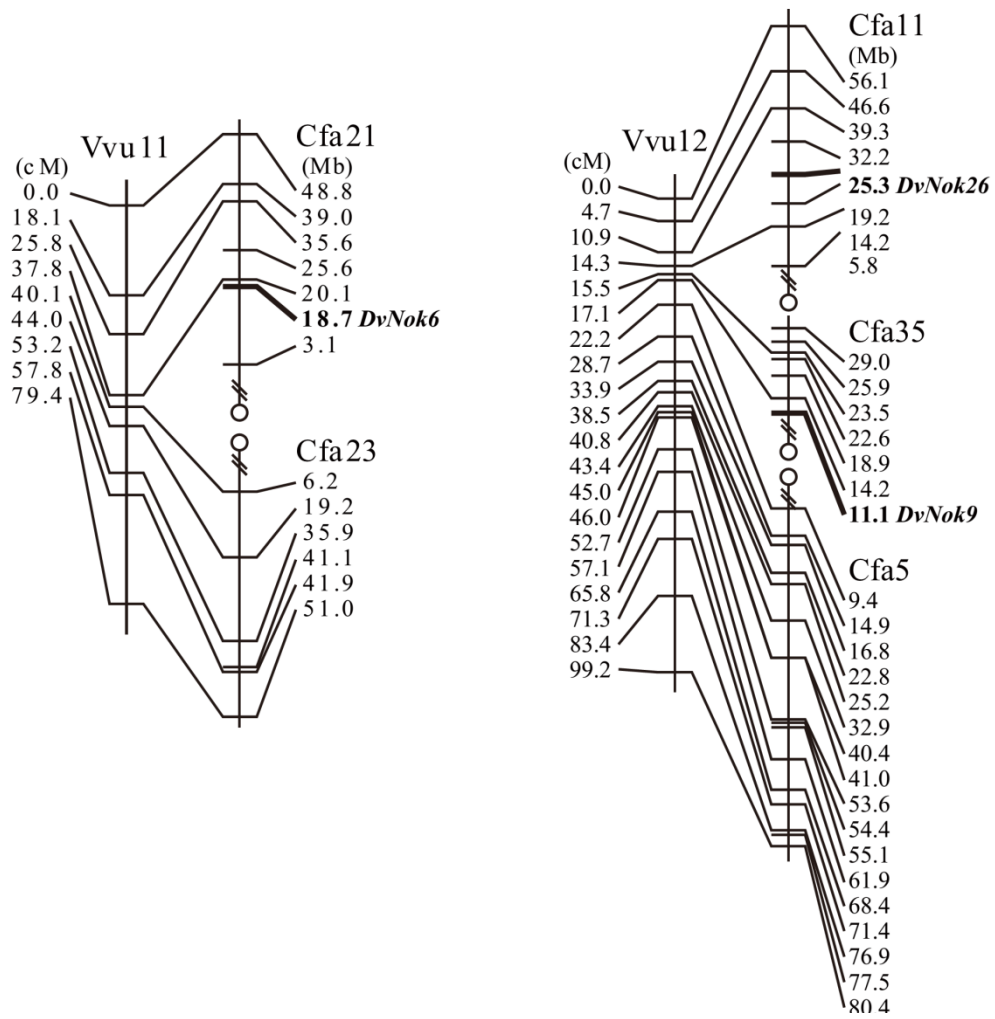


Fig.1 Continued from previous page.

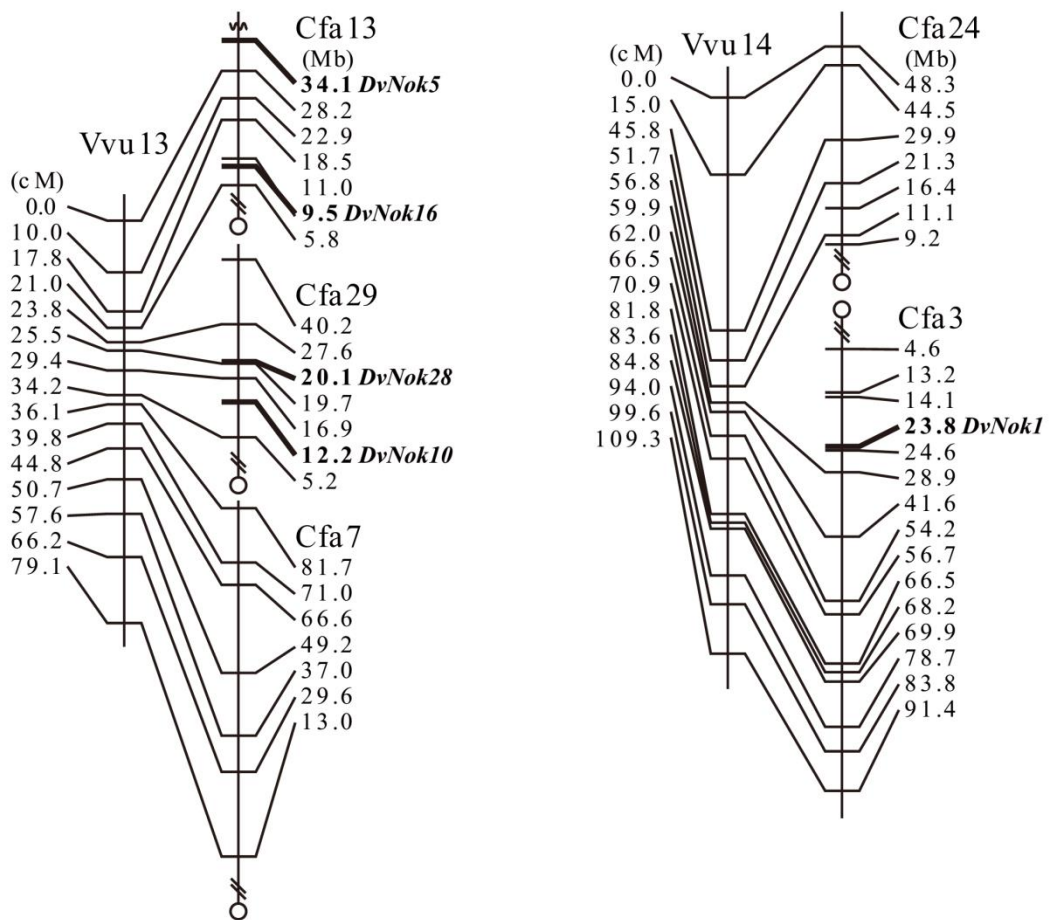


Fig.1 Continued from previous page.

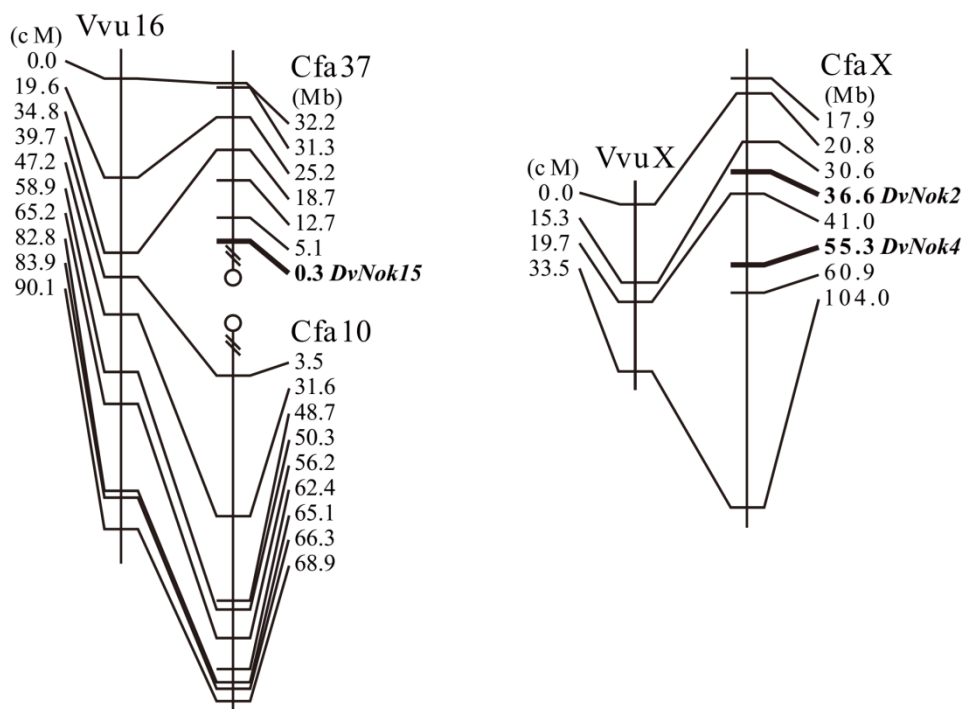


Fig.1 Continued from previous page.

Table.2 Established primer sets for microsatellite region.

| Locus | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') |
|----------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>DvNok1</i> | GAAAGTGCTGCACCAGAAGTC | CAGGAACCGTGTAATGCTTG |
| <i>DvNok2</i> | GGTGAGGAAGGCTACTGGTAATTG | CAATGTGCTGGTGAACATCC |
| <i>DvNok3</i> | TGAAGCCATCAAATCCAGAAC | TCCGATTGTTTAAGGCCTAGC |
| <i>DvNok4</i> | GACTTAGGCTGCTCAGGCTTC | AAGCCGAGGAATGAGTGAAT |
| <i>DvNok5</i> | GGCATGTGTATGTCATGTGAGC | GTTCTGACTGCCTAGCCACA |
| <i>DvNok6</i> | GATTTCCCTCCCTCCCTAC | TCAGCTTCCTCATCCTCACTC |
| <i>DvNok7</i> | CAGAAAGGCTTAGCCAAGGAC | TTGGAAGCTGAGGAGAGAGG |
| <i>DvNok8</i> | CACATTCAATGCAAAATGTGG | CCATGTTGTTGCAAGTGGTAAG |
| <i>DvNok9</i> | TCCCCAGGTGAGGAAAGTAG | AGTGAATTCGAGCTCGGTAC |
| <i>DvNok10</i> | CTGGGATAGAGATGGAGGTCTG | CACCATCCATTCTGAGGTT |
| <i>DvNok11</i> | GTGTCACTCGTGTTTTGACATC | TTGGTCCCCTACCTCATAACAAC |
| <i>DvNok12</i> | CTCCCTCTGTAGCCAGATGC | TATTGCTCTCAGGCACCGTA |
| <i>DvNok13</i> | AAGGGGTCCGATTTAGTTCC | CACTTCAGGCTCCCAGCAT |
| <i>DvNok14</i> | GGGTGGCTCAGTGGTTTAGTG | TCGCTTAGAATTAACCTCCA |
| <i>DvNok15</i> | CATCTGACCTTCCACTTGAGC | AGGCAATTCAGACTGGGTGA |
| <i>DvNok16</i> | GAATGCGAAAGCAGAGATGC | TGCATCGAGCCTGCTTCT |
| <i>DvNok17</i> | GTCATATGGATTAAGGCTGTG | AATGGCACATCACAGCAGAG |
| <i>DvNok18</i> | CAGGGGACAGGAATGCTCATA | AGGCAGTAGGCTGCACTGGT |
| <i>DvNok19</i> | CTGCCAGGTGGGTATACAGG | AAGTGAGATTAGCTGCCACTCC |
| <i>DvNok20</i> | CGGAATGGCTAACTTTGACG | AGATCTGCGTGGTGTGTTGTG |
| <i>DvNok21</i> | TCTTAGGGATCCCTGGATGAC | GGCCACATGAAAAACCCATA |
| <i>DvNok22</i> | GGTGTGATCCTGGAGACCTG | ACTGCCTTTTAACCATCCATCC |
| <i>DvNok23</i> | TTCTCATCTCCCTGGCTGAC | GACTTTTCCCAGGCTGCTG |
| <i>DvNok24</i> | TCAACCCACACTTTTCCTTCTC | GCCTGCTTCTCCCTCTACCT |
| <i>DvNok25</i> | GCTGAGGAAAATGCCTAACACC | GAACCTCCTAGGACCCATCAG |
| <i>DvNok26</i> | CCTGGCCTACCTATGGTTCAC | CTTCTCCCTCTGCCTGTGTC |
| <i>DvNok27</i> | TAGCTCCACCCATGTCCTG | TGTCCATTGGCTGGTGAGTA |
| <i>DvNok28</i> | AACAGAAGCTGGACCCAGAAG | TGTGAGCCTGAAGGGAAGTG |

Locus indicates microsatellite marker names. Forward and reverse primers indicate a sequence's primer set.

うち、フォワードプライマーをそれぞれ蛍光標識 (Beckman Dye 2、3 および 4) した。

第 2 節 新規マイクロサテライトマーカークの評価

第 1 項 フラグメント解析およびジェノタイピング

第 1 節第 2 項において設計されたプライマーセットを用いて PCR を行った結果、キタキツネでは 23 種のマイクロサテライト領域において増幅が認められた (Fig. 2)。また、キタキツネ、イヌ、ウサギ、マウスおよびラットの毛幹部由来 DNA を用いた PCR の結果、*DvNok6*、*DvNok10*、*DvNok11*、*DvNok16*、*DvNok21* および *DvNok23* の 6 種のマーカーにおいてキタキツネ特異的な DNA 断片の増幅が認められた。

次に、7 個体のキタキツネ肝臓由来 DNA について 23 種のマイクロサテライト領域の PCR を実施した結果、17 種のマイクロサテライトマーカーにおいて明確な多型の存在が認められた。また、これらのマーカーにおいてフラグメント解析によるジェノタイピングを実施した結果、各遺伝子座で最も高頻度に検出されたフラグメントサイズは、*DvNok1* において 243 bp (33.3%)、*DvNok2* において 285 bp および 293 bp (28.6%)、*DvNok5* において 162 bp (100.0%)、*DvNok6*

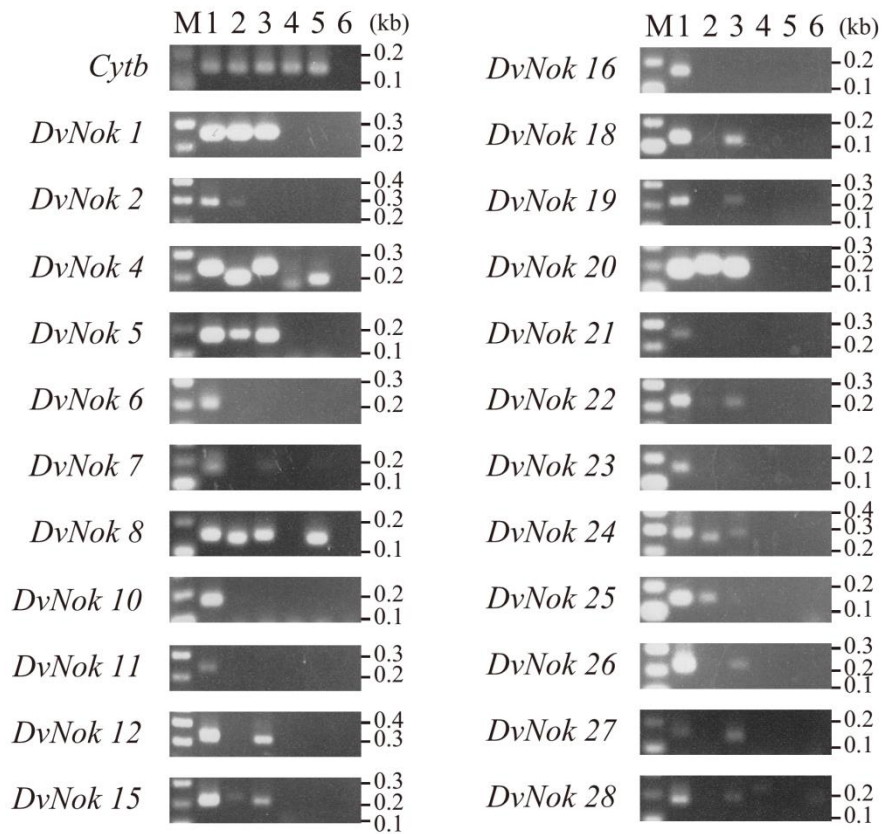


Fig.2 PCR amplification of 23 microsatellite regions in 5 mammal species, including the Ezo red fox. *Cytb* was used as internal control to estimate DNA quality. Lanes are shown as follows: 100-bp ladder (M); Ezo red fox (*Vulpes vulpes schrencki*; 1); dog (*Canis familiaris*; 2); rabbit (*Oryctolagus cuniculus*; 3); mouse (*Mus musculus*; 4); rat (*Rattus norvegicus*; 5); negative control (6).

において 181 bp および 185 bp (42.9%)、*DvNok7* において 153 bp (50.0%)、*DvNok10* において 164 bp (42.9%)、*DvNok11* において 227 bp (57.1%)、*DvNok12* において 306 bp (85.8%)、*DvNok13* において 150 bp (42.9%)、*DvNok14* において 265 bp (50.0%)、*DvNok16* において 153 bp (42.9%)、*DvNok18* において 116 bp (42.9%)、*DvNok19* において 213 bp (40.0%)、*DvNok21* において 249 bp (50.0%)、*DvNok22* において 227 bp (35.7%)、*DvNok23* において 151 bp (50.0%)、*DvNok24* において 238 bp および 279 bp (28.6%) および *DvNok28* において 169 bp (35.7%) であった (Table 3, 4)。また、多型が認められたマイクロサテライトマーカー17種の平均アレル数は 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、全てのマーカーで Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) からの有意な逸脱は見られなかった (Table.5)。

Table.3 Fragment size of 17 microsatellite regions detected in 7 individuals of the Ezo red fox.

| Locus | Individual number | | | | | | | | | | | |
|----------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | | | | |
| <i>DvNok1</i> | 241 | 243 | 229 | 239 | 241 | 243 | 224 | 239 | 241 | 243 | N/A | |
| <i>DvNok2</i> | 285 | 293 | 285 | 285 | 289 | 296 | 285 | 293 | 296 | 285 | 296 | 298 |
| <i>DvNok5</i> | 162 | 162 | 162 | 162 | 162 | 162 | 162 | 162 | 162 | 162 | 162 | 162 |
| <i>DvNok6</i> | 181 | 187 | 181 | 185 | 181 | 187 | 181 | 185 | 181 | 185 | 181 | 185 |
| <i>DvNok7</i> | 153 | 161 | 153 | 165 | 153 | 159 | 153 | 159 | 153 | 157 | 153 | 159 |
| <i>DvNok10</i> | 164 | 164 | 164 | 166 | 164 | 166 | 164 | 166 | 166 | 166 | 164 | 152 |
| <i>DvNok11</i> | 218 | 227 | 227 | 233 | 227 | 227 | 227 | 227 | 227 | 227 | 227 | 223 |
| <i>DvNok12</i> | 306 | 306 | 306 | 306 | 306 | 306 | 306 | 306 | 306 | 313 | 306 | 324 |
| <i>DvNok13</i> | 146 | 148 | 146 | 148 | 150 | 154 | 148 | 152 | 148 | 152 | 148 | 150 |
| <i>DvNok14</i> | 261 | 265 | 259 | 265 | 261 | 261 | 263 | 265 | 265 | 265 | 259 | 265 |
| <i>DvNok16</i> | 151 | 153 | 148 | 153 | 148 | 151 | 151 | 153 | 151 | 153 | 151 | 153 |
| <i>DvNok18</i> | 116 | 118 | 118 | 118 | 116 | 116 | 116 | 124 | 116 | 124 | 116 | 120 |
| <i>DvNok19</i> | 213 | 215 | 213 | 213 | N. A. | N. A. | 276 | 276 | 225 | 397 | N. A. | |
| <i>DvNok21</i> | N. A. | N. A. | N. A. | N. A. | N. A. | N. A. | 249 | 249 | 249 | 254 | 251 | 251 |
| <i>DvNok22</i> | 223 | 227 | 223 | 227 | 223 | 240 | 227 | 240 | 227 | 227 | 217 | 225 |
| <i>DvNok23</i> | 151 | 163 | 151 | 163 | 151 | 165 | 151 | 157 | 151 | 157 | 151 | 159 |
| <i>DvNok24</i> | 277 | 279 | 275 | 275 | 238 | 282 | 238 | 279 | 238 | 277 | 238 | 277 |
| <i>DvNok28</i> | 124 | 169 | 169 | 175 | 173 | 175 | 167 | 169 | 169 | 175 | 179 | 182 |

Locus indicates microsatellite marker names. Numbers in *italics* indicate fragment size detected in 7 individuals. N. A.: not amplified.

Table.4 Allele frequencies of 17 microsatellite markers in 7 Ezo red fox individuals.

| Locus | Fragmet size (frequency; %) | |
|----------------|-----------------------------|---|
| <i>DvNok1</i> | 224 (8.3) | 229 (8.3) 239 (25.0) 241 (25.0) 243 (33.3) |
| <i>DvNok2</i> | 285 (28.6) | 289 (7.1) 293 (28.6) 296 (21.4) 298 (14.3) |
| <i>DvNok5</i> | 162 (100.0) | |
| <i>DvNok6</i> | 181 (42.9) | 185 (42.9) 187 (14.3) |
| <i>DvNok7</i> | 153 (50.0) | 157 (7.1) 159 (21.4) 161 (7.1) 165 (14.3) |
| <i>DvNok10</i> | 152 (21.4) | 164 (42.9) 166 (35.7) |
| <i>DvNok11</i> | 218 (14.3) | 223 (14.3) 227 (57.1) 233 (14.3) |
| <i>DvNok12</i> | 306 (85.7) | 313 (7.1) 324 (7.1) |
| <i>DvNok13</i> | 146 (14.3) | 148 (28.6) 150 (42.9) 152 (7.1) 154 (7.1) |
| <i>DvNok14</i> | 259 (14.3) | 261 (28.6) 263 (7.1) 265 (50.0) |
| <i>DvNok16</i> | 148 (14.3) | 151 (35.7) 153 (42.9) 155 (7.1) |
| <i>DvNok18</i> | 116 (42.9) | 118 (28.6) 120 (14.3) 124 (14.3) |
| <i>DvNok19</i> | 213 (40.0) | 215 (10.0) 225 (20.0) 276 (20.0) 397 (10.0) |
| <i>DvNok21</i> | 249 (50.0) | 251 (33.3) 254 (16.7) |
| <i>DvNok22</i> | 217 (21.4) | 223 (21.4) 225 (7.1) 227 (35.7) 240 (14.3) |
| <i>DvNok23</i> | 151 (50.0) | 157 (14.3) 159 (7.1) 163 (21.4) 165 (7.1) |
| <i>DvNok24</i> | 238 (28.6) | 275 (14.3) 277 (21.4) 279 (28.6) 282 (7.1) |
| <i>DvNok28</i> | 124 (14.3) | 167 (7.1) 169 (35.7) 173 (7.1) 175 (21.4) 179 (7.1) 182 (7.1) |

Locus indicates microsatellite marker names. Numbers in bold show allele frequencies in the major alleles at each locus.

Table.5 Characteristics of the 18 microsatellite markers developed for Ezo red fox.

| Locus | Repeat motif | Product size (bp) | Accession no. | Organ derived-DNA (7)* | | | | Feces derived-DNA (22)* | | | |
|----------------|--------------------------------------|-------------------|---------------|------------------------|-------|-------|------|-------------------------|-------|-------|--|
| | | | | N_A | H_E | H_O | HWE | N_A | H_E | H_O | |
| <i>DvNok1</i> | (CA) ₂₃ | 243 | AB901086 | 5 | 0.82 | 1.00 | 0.22 | 9 | 0.82 | 0.55 | |
| <i>DvNok2</i> | (CA) ₂₂ | 291 | AB829492 | 5 | 0.82 | 0.57 | 0.43 | | N. A. | | |
| <i>DvNok5</i> | (GT) ₇ | 161 | AB901089 | 1 | | N. C. | | 2 | 0.21 | 0.05 | |
| <i>DvNok6</i> | (AC) ₈ | 185 | AB829493 | 3 | 0.66 | 0.86 | 0.32 | | N. A. | | |
| <i>DvNok7</i> | (AC) ₁₃ | 156 | AB901090 | 5 | 0.73 | 1.00 | 0.62 | 6 | 0.80 | 0.82 | |
| <i>DvNok10</i> | (TA) ₇ (AC) ₈ | 164 | AB829494 | 3 | 0.69 | 0.57 | 0.48 | 5 | 0.52 | 0.32 | |
| <i>DvNok11</i> | (AC) ₁₁ | 216 | AB829495 | 4 | 0.66 | 0.57 | 0.25 | | N. A. | | |
| <i>DvNok12</i> | (CA) ₁₁ | 305 | AB829496 | 3 | 0.27 | 0.29 | 1.00 | | N. A. | | |
| <i>DvNok13</i> | (CA) ₁₁ | 143 | AB829497 | 5 | 0.76 | 0.71 | 0.35 | | N. A. | | |
| <i>DvNok14</i> | (CT) ₁₂ | 261 | AB829498 | 4 | 0.69 | 0.71 | 0.85 | | N. A. | | |
| <i>DvNok16</i> | (GA) ₉ | 159 | AB829499 | 4 | 0.71 | 0.86 | 0.84 | | N. A. | | |
| <i>DvNok18</i> | (CA) ₈ | 121 | AB829500 | 4 | 0.75 | 0.71 | 0.87 | | N. A. | | |
| <i>DvNok19</i> | (GT) ₁₃ | 212 | AB901095 | 5 | 0.82 | 0.60 | 0.33 | | N. A. | | |
| <i>DvNok21</i> | (TG) ₁₂ | 247 | AB901097 | 3 | 0.73 | 0.33 | 0.20 | | N. A. | | |
| <i>DvNok22</i> | (CT) ₁₄ | 169 | AB829501 | 5 | 0.81 | 0.71 | 0.47 | | N. A. | | |
| <i>DvNok23</i> | (CA) ₁₀ | 152 | AB901098 | 5 | 0.73 | 1.00 | 0.61 | 8 | 0.87 | 0.55 | |
| <i>DvNok24</i> | (CA) ₁₀ (GA) ₈ | 271 | AB829502 | 5 | 0.82 | 0.71 | 0.42 | 8 | 0.83 | 0.59 | |
| <i>DvNok28</i> | (AC) ₂₄ | 184 | AB829503 | 7 | 0.85 | 1.00 | 0.55 | | N. A. | | |

*Numbers in parentheses indicate number of analyzed samples. NA, HE, HO, and HWE indicate the number of alleles, expected heterozygosity, observed heterozygosity, and Hardy-Weinberg equilibrium, respectively. N. C.: not calculated. N. A.: not amplified.

第4章 考察

本研究において 28 種のマイクロサテライトマーカーが単離され、このうち 18 種の特性を評価した (Table.3, 4)。北海道の南部、中央部、北部、東部および南東部におけるキタキツネのマイクロサテライト領域 12 種での平均アレル数は、4.78、7.11、8.22、6.33 および 5.22 であることが報告されている (Oishi *et al.*, 2011)。本研究では、Oishi ら (2011) と比較して平均アレル数は 4.11 と低いものの、少ない個体数 (n=7) でマイクロサテライトマーカーを評価したにもかかわらず多型の認められたマーカーのアレル数は 3-7 種となり、同程度のアレル数の検出が可能であった (Table.5)。従って、本研究で開発したマイクロサテライトマーカーは、キタキツネ集団の遺伝学的解析において有用なツールとなることが推測された。また、*DvNok5* では観察されたアレル数が 1 種だけであったため、HWE からの逸脱について P 値は算出されなかったものの、多検体における解析ではマイクロサテライトマーカーとなる可能性もある。

近年では、次世代シーケンサーを用いることで、生物の網羅的な DNA 情報を得ることが可能となっており、この手法を用いたマイクロサテライトマーカーの開発も行なわれている (Rico *et al.*, 2013)。アカギツネでは、次世代シーク

エンサーを用いることで、65,562,274bp の塩基配列から 200 種類の繰り返し配列が同定され、25 種の新規マイクロサテライトマーカーが開発されている (Yu *et al.*, 2015)。今後は、キタキツネにおいてもこのような網羅的な解析を実施する必要があり、そのデータは本亜種ならびに周辺環境を保全する上での重要なツールになると思われる。

第 2 部 新規マイクロサテライトマーカーを応用した糞由来 DNA からの個体識別

第 1 章 緒論

排泄された野生動物の糞便は、腸内壁の組織を含んでいる (Paxinos *et al.*, 1997; Wasser *et al.*, 1997)。このような腸内壁組織から抽出される DNA は、調査対象種に接触することなく回収することが可能であり、分子生態学的研究において極めて有用な試料となる。一方、糞由来 DNA は糞便の暴露された環境条件によって、品質に差異があることも明らかとなっている (Farrell *et al.*, 2000; Nsubuga *et al.*, 2004; Piggott, 2004; Brinkman *et al.*, 2010)。個体識別に有用なマイクロサテライト領域を含む核 DNA は直鎖状二本鎖であるため、排泄後 3-7 日で解析効率の著しい低下が見られる (Piggott, 2004; Santini *et al.*, 2007; Brinkman *et al.*, 2010; Panasci *et al.*, 2011)。一方、ミトコンドリア DNA は環状二本鎖であるため、解析効率の低下は排泄後 8-30 日で認められる (Fernando *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2007)。また、自然環境下より得られた糞由来 DNA には、調査対象とする動物種以外にも、被食された生物のゲノムが多量に含まれている (Poinar *et al.*, 2001; Jarman *et al.*, 2004)。従って、糞由来 DNA を用いた分子生態学的研究では、低品

質かつ夾雑物が含まれるゲノムから、より効率的に遺伝子型を判定できる遺伝マーカーが必要とされる。キタキツネは、雑食性が強いため、種特異的かつ PCR 効率の良い遺伝マーカーの報告例は知る限りではない。

そこで第 2 部では、第 1 部で開発したマイクロサテライトマーカーの応用として、キタキツネ糞由来 DNA におけるジェノタイピングを試みた。

第2章 材料および方法

第1節 キタキツネ糞便の採集

第1項 糞便の採集

糞便は、東京農業大学オホーツクキャンパス（北海道網走市）のファイントレールおよびその周辺の舗装路で採集した（Fig.3）。採集期間は、2008年8月～2009年10月、2010年2月～10月とした。採集の際、直接触れないように裏返したチャック付きポリ袋で糞便を掴み、再びポリ袋を裏返して封をした。採集した糞便は、エキノコックス虫卵を死滅させるため、 -70°C で24時間以上インキュベートした。

第2項 糞由来ゲノム DNA 抽出

糞由来 DNA は QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用い、添付のマニュアルに準じて糞便の表面を中心とした 200 mg から抽出した。抽出した DNA は低濃度であり、分光光度計を用いた濃度測定が不可能であった。このため、脊椎動物の *Cytb* 領域に特異的なプライマーセット、L14841 (5'-AAA AAG CTT CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3') および H15149 (5'-AAA CTG CAG

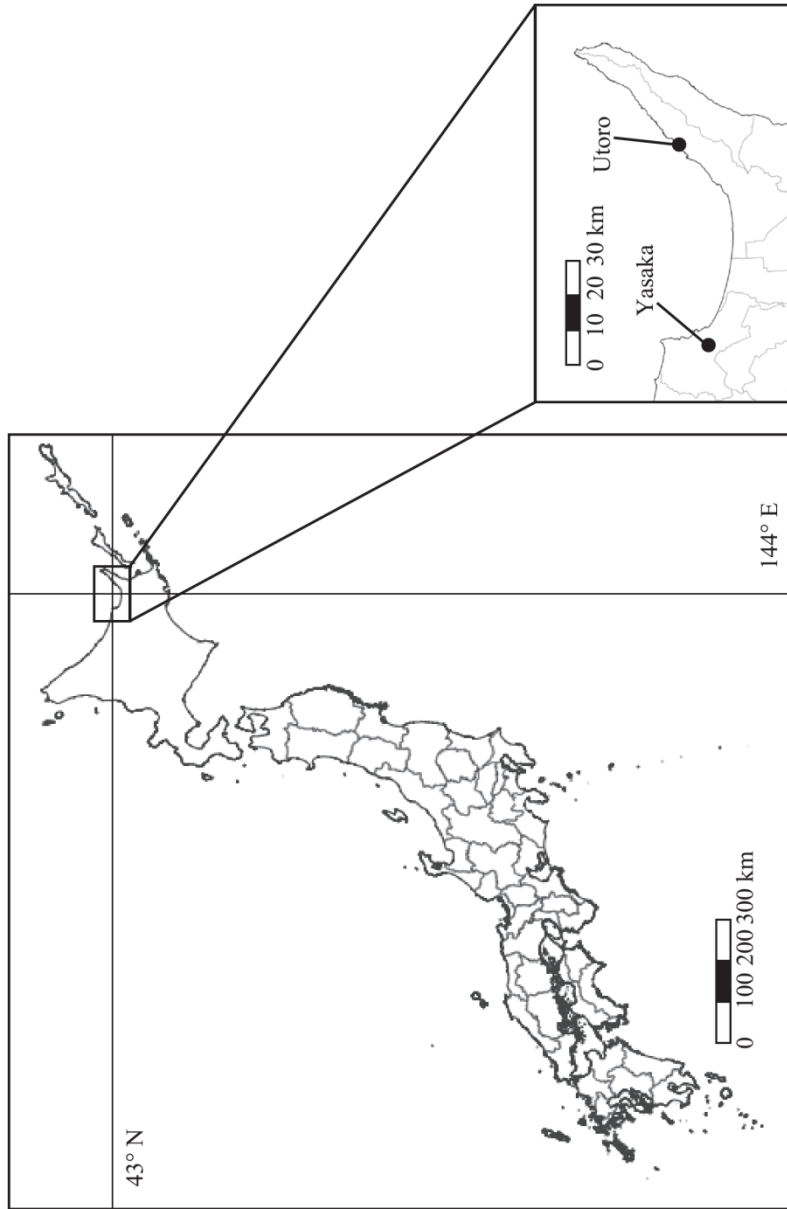


Fig.3 Sampling sites for Ezo red fox feces collection. Data obtained from feces collected in Yasaka are discussed in chapters 2 and 3. Samples from Utoro are used to identify prey species in chapter 3 only.

CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A-3') (Kocher *et al.*, 1989) による PCR 増幅の有無で DNA の品質を評価した。DNA 品質評価のための PCR は、2 μ l の糞由来 DNA を鋳型として、1 \times PCR Gold buffer、0.2 mM dNTPs、1.5 mM MgCl₂、0.03 pM BSA、0.5 U *AmpliTaq* Gold DNA Polymerase および 2.6 μ M のプライマーセットに滅菌純水を加え、最終容量を 10 μ l とした。PCR 反応は、95°C で 10 分間変性した後に、94°C で 30 秒、50°C で 1 分および 72°C で 1 分のサイクルを 45 回繰り返し、72°C で 5 分間伸長することで実施した。増幅された PCR 産物の電気泳動は、第 1 部と同様に行なった。

第2節 キタキツネ糞便の種判別

第1項 種判別プライマーの設計

体格の類似した食肉目が複数種生息する地域では、誤って目的とする種以外の糞便を採取する可能性がある (Farrell 2000)。そこで、採集した糞便がキタキツネ由来であることを確認するため、NCBI からアカギツネ、イヌおよびネコのミトコンドリア DNA 配列にそれぞれ特異的なプライマーセットを設計した (Fig.4)。これらのプライマーセットによる PCR 産物はアカギツネ、イヌおよびネコでそれぞれ 294 bp、337 bp および 440 bp で、アガロースゲル電気泳動で判別が可能となるように設計した。また、各プライマーの塩基配列は種特異的な増幅になるように設計した。設計されたプライマーセットの特異性を評価するための PCR は、第1部で抽出した 1 μ l のキタキツネ、イヌ、ウサギ、マウスおよびラットの毛幹部由来 DNA を鋳型として、1 \times PCR Gold buffer、0.2 mM dNTPs、2.0 mM MgCl₂、0.008% BSA、0.5 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase および 2.6 μ M プライマーセットに滅菌純水を加え、最終容量を 10 μ l とした。PCR 反応は、95°C で 10 分間変性した後に、94°C で 30 秒、62°C で 45 秒および 72°C で 1 分のサイクルを 45 回繰り返して、72°C で 5 分間伸長することで実施した。増

Fox primer set (14299-14592)

| | Forward (5' -3') | Reverse (5' -3') |
|-----|--|--------------------------------------|
| Fox | TGTATGCCTTATTCTACAGATTGCA | TATGGGCTACGTTTTACCGTGAGG |
| Dog | AGTATGCTTGATTCTACAGATTCTA | CATGGGCTATGTACTACCATGAGG |
| Cat | AGTCTGCCTAACCTTACAAATCCTC | TATGGGATACGTCCTACCATGAGG |
| | ** ** * * * * * * * | * * * * * * * * * * * * * * * |

Dog primer set (9056-9392)

| | Forward (5' -3') | Reverse (5' -3') |
|-----|---|--------------------------------------|
| Fox | CTCGGGGGTTGCTGGCCACCCACT | TGTCTGCTTTATGCGACAACTGC |
| Dog | CTTGGGGGTTGCTGGCCTCCTACC | CGTGTGCTTCCTCCGACAGCTAT |
| Cat | CTAGGAGGATGCTGACCACCAACA | TGTATGCTTCTTACGCCAATTA |
| | * * * * * * * * * * * * * * * | * * * * * * * * * * * * * * * |

Cat primer set (5200-5639)

| | Forward (5' -3') | Reverse (5' -3') |
|-----|---|--------------------------------------|
| Fox | CTGGCTTCAATCTAGCTTCTCCCGCCGT | ATTTGGGAACTGATTAGTCCC |
| Dog | CTGGCTTCAATCTACCTTCTCCCGCCGC | CTTTGGAACTGACTAGTGCCG |
| Cat | CTGGCTTCAATCCA - CTTCTCCCGCCGT | GTTGCGGAACTGATTGGTCCCA |
| | * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * | * * * * * * * * * * * * * * * |

Fig.4 Primer sets designed for specific amplification of red fox, dog, and cat mtDNA regions, respectively. Numbers in parentheses indicate primer position on mtDNA (nt). DNA sequences in bold indicate intended primer binding site. Asterisks indicate identical nucleotide loci among 3 species.

幅された PCR 産物の電気泳動は、第 1 部と同様に行なった。

第 2 項 PCR による糞便の種判別

糞便の種判別のための PCR は、第 1 項において設計されたプライマーセットを用い、2 μ l の糞由来 DNA を鋳型として、第 1 項と同様の条件によって行なった。

第 3 節 キタキツネ糞由来 DNA からの個体識別

第 1 項 PCR によるマイクロサテライト領域の増幅

第 1 部において特性が評価されたマイクロサテライトマーカーのうち、*DvNok1*、*DvNok5*、*DvNok7*、*DvNok10*、*DvNok23* および *DvNok24* を用い、3 μ l のキタキツネ糞由来 DNA を鋳型とした PCR を実施した。反応溶液は、1 \times PCR Gold buffer、0.2 mM dNTPs、1.5 mM MgCl₂、1M Betaine、0.5 U *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* および蛍光標識した 2.6 μ M *DvNok* プライマーセットに滅菌純水を加え、最終容量を 10 μ l とした。PCR 反応は、95 $^{\circ}$ C で 10 分間変性した後に、94 $^{\circ}$ C で 30 秒、55 $^{\circ}$ C で 30 秒および 72 $^{\circ}$ C で 1 分のサイクルを 55 回繰り返し、72 $^{\circ}$ C で

5 分間伸長することで実施した。

第 2 項 フラグメント解析およびジェノタイピング

第 1 項において得られた PCR 産物は、第 1 部でフォワードプライマーに付加した蛍光標識をもとに Dye2、3 および 4 の組み合わせで混合し、3 μ l を、CEQ8000 Genetic Analyzer (Sciex) によるフラグメント解析に用いた。これにより決定された遺伝子型は、GENEPOP 4.2 (Rousset, 2008) を用いて解析した。

第 3 項 遺伝子型からの個体識別

第 2 項において決定されたフラグメントサイズをアレルとして、マイクロサテライトマーカーごとにアルファベットに置き換えて、個体ごとのハプロタイプを比較した。

第3章 結果

第1節 キタキツネ糞便の採集

第1項 糞便採集およびDNA抽出

合計 214 個の糞便を採集し、そのすべてからゲノム DNA を抽出した。これら糞由来 DNA の品質を *Cytb* を標的とした PCR で評価した結果、201 サンプル (93.9%) の糞由来 DNA から DNA 断片が増幅された。従って、これらの DNA サンプルが以降の実験で使用できる品質であることが示された。

第2節 キタキツネ糞便の種判別

第1項 種判別プライマーの設計

糞便の由来動物種判定のための種特異的プライマーは、アカギツネ、イヌおよびネコのミトコンドリア DNA で設計した (Table.6)。これらのうち、アカギツネ特異的プライマーセットを用い、キタキツネ、イヌ、ウサギ、マウスおよびラットの毛幹部由来 DNA を鋳型とした PCR を実施した結果、キタキツネにおいてのみ増幅が認められた (Fig.5)。

Table.6 Primer sets of mtDNA markers for identification of predatory animals.

| Primer name | Primer sequense (5'-3') | Strand |
|-------------|-------------------------------------|--------|
| Fox_m_F2 | TGT ATG CCT TAT TCT ACA GAT TGC A | L |
| Fox_m_R2 | CCT CAC GGT AAA ACG TAG CCC ATA | H |
| Cat_m_F1 | CTG GCT TCA ATC CAC TTC TCC CGC CGT | L |
| Cat_m_R1 | TGG GAC CAA TCA GTT TCC GAA C | H |
| Dog_m_F1 | CTT GGG GGT TGC TGG CCT CCT ACC | L |
| Dog_m_R1 | ATA GCT GTC GGA GGA AGC ACA CG | H |

Strand indicates light (L) or heavy (H) chain.

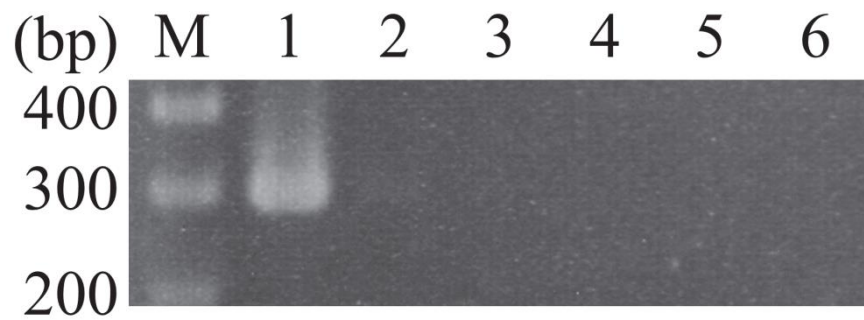


Fig.5 Specific amplification of mtDNA fragments in the Ezo red fox. Lanes are shown as follows: 100-bp ladder (M); Ezo red fox (*Vulpes vulpes schrencki*; 1); dog (*Canis familiaris*; 2); rabbit (*Oryctolagus cuniculus*; 3); mouse (*Mus musculus*; 4); rat (*Rattus norvegicus*; 5); negative control (6).

第2項 PCRによる糞便の種判別

第1項において設計された種特異的プライマーセットを用い、糞由来DNAにおけるPCRを実施した。その結果、201サンプルの糞由来DNAのうち、192サンプル(95.5%)がキタキツネ由来のものであることを確認した(Fig.6)。従って、マイクロサテライトマーカーを用いたフラグメント解析には、本実験によってキタキツネ由来DNAと同定された192サンプルを用いた。

第3節 キタキツネ糞由来DNAからの個体識別

第1項 フラグメント解析およびジェノタイピング

第2節第2項においてスクリーニングされた糞由来DNAの192サンプルを用い、PCRおよびフラグメント解析を実施した結果、22サンプルにおいて*DvNok1*、*DvNok5*、*DvNok7*、*DvNok10*、*DvNok23* および *DvNok24* のPCR増幅断片が認められた(Table.7)。フラグメント解析で得られたフラグメントサイズは、アルファベットへ置き換えることで分類し、遺伝子型とした結果、各マーカーにおいてそれぞれ2-9種の遺伝子型が認められた(Table.8)。

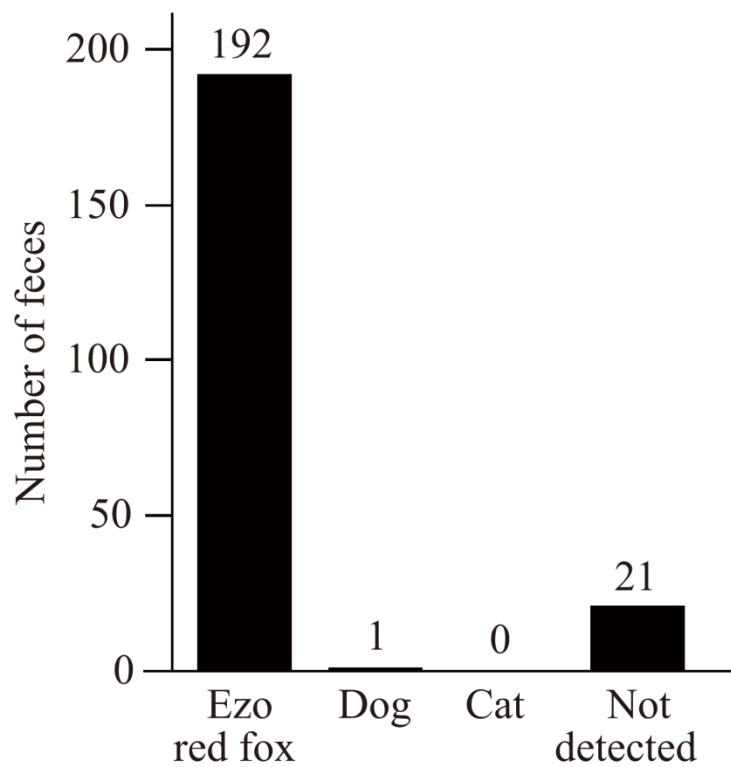


Fig.6 Identification of prey species based on fecal DNA. Bar graph labels indicate the number of fecal samples in which PCR amplification using specific primers successfully identified putative prey animals.

Table.7 Fragment sizes in Ezo red fox-derived fecal DNA.

| Sample No. | Locus | | | | | | | | | | | |
|------------|---------------|-----|---------------|-----|---------------|-----|----------------|-----|----------------|-----|----------------|-----|
| | <i>DvNok1</i> | | <i>DvNok5</i> | | <i>DvNok7</i> | | <i>DvNok10</i> | | <i>DvNok23</i> | | <i>DvNok24</i> | |
| 66 | 223 | 241 | 161 | 161 | 148 | 158 | 162 | 162 | 156 | 164 | 252 | 250 |
| 77 | 237 | 241 | 161 | 161 | 148 | 160 | 164 | 166 | 160 | 164 | 274 | 286 |
| 87 | 237 | 241 | 161 | 161 | 148 | 160 | 164 | 166 | 164 | 164 | 274 | 286 |
| 100 | 223 | 223 | 161 | 161 | 158 | 160 | 162 | 162 | 154 | 156 | 252 | 250 |
| 109 | 223 | 239 | 159 | 159 | 152 | 158 | 158 | 164 | 164 | 164 | 274 | 278 |
| 115 | 239 | 241 | 161 | 161 | 158 | 160 | 164 | 164 | 150 | 152 | 278 | 278 |
| 123 | 233 | 235 | 161 | 161 | 150 | 152 | 162 | 162 | 160 | 160 | 280 | 280 |
| 129 | 221 | 221 | 161 | 161 | 152 | 158 | 162 | 162 | 154 | 156 | 250 | 290 |
| 131 | 237 | 237 | 161 | 161 | 158 | 160 | 164 | 164 | 150 | 152 | 250 | 250 |
| 140 | 237 | 237 | 161 | 161 | 148 | 148 | 164 | 164 | 152 | 152 | 252 | 250 |
| 141 | 241 | 243 | 161 | 161 | 158 | 160 | 164 | 164 | 154 | 156 | 274 | 274 |
| 144 | 241 | 241 | 161 | 161 | 152 | 160 | 158 | 164 | 152 | 152 | 252 | 250 |
| 145 | 223 | 229 | 161 | 161 | 152 | 158 | 156 | 164 | 154 | 164 | 252 | 250 |
| 147 | 241 | 241 | 161 | 161 | 160 | 160 | 164 | 164 | 158 | 160 | 274 | 274 |
| 150 | 223 | 223 | 161 | 161 | 158 | 160 | 164 | 164 | 154 | 156 | 238 | 238 |
| 154 | 221 | 221 | 161 | 161 | 158 | 158 | 164 | 164 | 158 | 158 | 252 | 286 |
| 159 | 241 | 241 | 161 | 161 | 152 | 160 | 162 | 164 | 156 | 156 | 252 | 278 |
| 161 | 241 | 241 | 161 | 161 | 156 | 156 | 164 | 164 | 158 | 164 | 250 | 250 |
| 162 | 241 | 243 | 159 | 161 | 150 | 152 | 164 | 164 | 158 | 158 | 236 | 236 |
| 170 | 237 | 243 | 161 | 161 | 148 | 160 | 164 | 164 | 160 | 160 | 252 | 250 |
| 172 | 237 | 243 | 161 | 161 | 148 | 160 | 164 | 164 | 160 | 160 | 252 | 250 |
| 204 | 239 | 241 | 159 | 159 | 148 | 160 | 162 | 164 | 162 | 164 | 250 | 250 |

Numbers indicate fragment size detected by capillary gel electrophoresis.

Table.8 Fragment sizes in Ezo red fox-derived fecal DNA.

| Sample No. | Locus | | | | | | Individual name |
|------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| | <i>DvNok1</i> | <i>DvNok5</i> | <i>DvNok7</i> | <i>DvNok10</i> | <i>DvNok23</i> | <i>DvNok24</i> | |
| 66 | <i>CJ</i> | <i>CC</i> | <i>AF</i> | <i>DD</i> | <i>EI</i> | <i>DD</i> | Yasaka 01 |
| 77 | <i>HJ</i> | <i>CC</i> | <i>AG</i> | <i>DE</i> | <i>GI</i> | <i>FL</i> | Nodai 01 |
| 87 | <i>HJ</i> | <i>CC</i> | <i>AG</i> | <i>DE</i> | <i>II</i> | <i>FL</i> | Nodai 02 |
| 100 | <i>CC</i> | <i>CC</i> | <i>FG</i> | <i>CC</i> | <i>DE</i> | <i>DD</i> | Nodai 03 |
| 109 | <i>CI</i> | <i>CC</i> | <i>CF</i> | <i>BD</i> | <i>II</i> | <i>FH</i> | Yasaka 02 |
| 115 | <i>IJ</i> | <i>CC</i> | <i>FG</i> | <i>DD</i> | <i>BC</i> | <i>HH</i> | Nodai 04 |
| 123 | <i>FG</i> | <i>CC</i> | <i>BC</i> | <i>CC</i> | <i>GG</i> | <i>IJ</i> | Yasaka 03 |
| 129 | <i>BB</i> | <i>CC</i> | <i>CF</i> | <i>CC</i> | <i>DE</i> | <i>DN</i> | Yasaka 04 |
| 131 | <i>HH</i> | <i>CC</i> | <i>FG</i> | <i>DD</i> | <i>BC</i> | <i>DD</i> | Yasaka 05 |
| 140 | <i>HH</i> | <i>CC</i> | <i>AA</i> | <i>DD</i> | <i>CC</i> | <i>DD</i> | Nodai 05 |
| 141 | <i>JK</i> | <i>CC</i> | <i>FG</i> | <i>DD</i> | <i>DE</i> | <i>FF</i> | Yasaka 06 |
| 144 | <i>JJ</i> | <i>CC</i> | <i>CG</i> | <i>BD</i> | <i>CC</i> | <i>DD</i> | Yasaka 07 |
| 145 | <i>CE</i> | <i>CC</i> | <i>CF</i> | <i>AD</i> | <i>DI</i> | <i>DD</i> | Nodai 06 |
| 147 | <i>JJ</i> | <i>CC</i> | <i>GG</i> | <i>DD</i> | <i>FG</i> | <i>FF</i> | Nodai 07 |
| 150 | <i>CC</i> | <i>CC</i> | <i>FG</i> | <i>DD</i> | <i>DE</i> | <i>BB</i> | Nodai 08 |
| 154 | <i>BB</i> | <i>CC</i> | <i>FF</i> | <i>DD</i> | <i>FF</i> | <i>DL</i> | Nodai 09 |
| 159 | <i>JJ</i> | <i>CC</i> | <i>CG</i> | <i>CD</i> | <i>EE</i> | <i>DH</i> | Yasaka 08 |
| 161 | <i>JJ</i> | <i>CC</i> | <i>EE</i> | <i>DD</i> | <i>FI</i> | <i>DD</i> | Yasaka 09 |
| 162 | <i>JK</i> | <i>BC</i> | <i>BC</i> | <i>DD</i> | <i>FF</i> | <i>BB</i> | Nodai 10 |
| 170 | <i>HK</i> | <i>CC</i> | <i>AG</i> | <i>DD</i> | <i>GG</i> | <i>DD</i> | Nodai 11 |
| 172 | <i>HK</i> | <i>CC</i> | <i>AG</i> | <i>DD</i> | <i>GG</i> | <i>DD</i> | Nodai 11 |
| 204 | <i>IJ</i> | <i>CC</i> | <i>AG</i> | <i>CD</i> | <i>HI</i> | <i>DD</i> | Nodai 12 |

Detected alleles were converted from fragment size to alphanumeric labels. Each label shows alleles detected in 22 fecal DNA samples.

第 2 項 遺伝子型からの個体識別

フラグメント解析の結果から、*DvNok1*、*DvNok5*、*DvNok7*、*DvNok10*、*DvNok23* および *DvNok24* において、それぞれ 9、2、6、5、8 および 9 種の対立遺伝子が確認された。解析した 22 サンプルのうち、2 サンプルにおいて遺伝子型が完全に一致し、同一個体の糞便であることが示唆された。このことから、網走市八坂は少なくとも 21 個体のキタキツネによって利用されていることが示された。次いでこれらのジェノタイピングデータより、マイクロサテライトマーカークの評価を実施した。本解析でのマイクロサテライトマーカークごとにみたジェノタイピング成功率は、*DvNok1*、*DvNok5*、*DvNok7*、*DvNok10*、*DvNok23* および *DvNok24* で、それぞれ 33.3%、55.7%、30.2%、35.4%、24.5% および 34.4% となった。また、*DvNok1*、*DvNok5*、*DvNok7*、*DvNok10*、*DvNok23* および *DvNok24* で、最も高頻度に検出されたフラグメントサイズは、それぞれ 241 bp (34.1%)、161 bp (88.6%)、160 bp (31.8%)、164 bp (65.9%)、164 bp (20.5%) および 250 bp (31.8%) であった。これらの結果からジェノタイピング成功率と平均フラグメントサイズの間における関連を検定した結果、有意な相関は認められなかった (Table.9)。

Table.9 Relationship between success rate of genotyping and average size of DNA fragments in fecal DNA.

| Locus | Genotyping success rate (%) | Average of fragment size (bp) |
|----------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <i>DvNok1</i> | 33.3 | 233.8 |
| <i>DvNok5</i> | 55.7 | 161.2 |
| <i>DvNok7</i> | 30.2 | 154.2 |
| <i>DvNok10</i> | 35.4 | 164.5 |
| <i>DvNok23</i> | 24.5 | 157.2 |
| <i>DvNok24</i> | 34.4 | 259.9 |

Locus gives microsatellite marker names. Genotyping success rate and average of fragment size were calculated using all fragment analysis data. No significant correlation between success rate and fragment size was observed.

また、平均アレル数は 6.33 であり、 H_E および H_o は、それぞれ 0.68 および 0.48

であった (Table.5)。

第4章 考察

第2部では、第1部において開発されたマイクロサテライトマーカーを、糞由来DNAを用いた個体識別に応用した。その結果、ジェノタイピング成功率は35.5%となり、192サンプルの糞由来DNAから22サンプル(11.4%)の遺伝子型が、6つのマーカー全てにおいて決定された(Table.7)。糞由来DNAは、自然環境下において様々な条件で劣化が引き起こされる。これまでの報告では、降水量および気温が糞由来DNAでの解析効率に影響することが明らかになっている(Farrell *et al.*, 2000; Nsubuga *et al.*, 2004; Piggott, 2004; Brinkman *et al.*, 2010)。また、糞由来DNAには、植物由来の多糖類、胆汁類およびビリルビンなどのPCR阻害物質が含まれていることが多い(Zhang *et al.*, 2006)。従って、本研究におけるジェノタイピング成功率の低下は、PCR法の成功率が低いことに起因していると考えられた。ジェノタイピングの結果に影響を及ぼすPCR成功率は、フラグメントサイズが大きいほど低下するとされている(Frantzen *et al.*, 1998)。しかし、本研究の糞由来DNAを用いたフラグメント解析では、ジェノタイピング成功率と平均フラグメントサイズとの間に有意な相関は認められなかった(Table.9)。従って、糞由来DNAにおいて、ジェノタイピング成功率に関わる

マイクロサテライトマーカーの特性を検証することは、分子生態学的研究におけるマーカー開発において有用な情報になると考えられた。また、マイクロサテライトマーカーを用いたキタキツネの個体識別は、本研究において初めて実施されたものであり、今後のキタキツネ分子生態学的研究において極めて有用な手法となりうる。第2部において糞由来 DNA におけるジェノタイピングに成功した6種のマイクロサテライトマーカーは、キタキツネ糞由来 DNA を用いた分子生態学的研究において有力なツールとなることが期待された。

第3部 キタキツネ食性解析遺伝マーカーの開発と応用

第1章 緒論

キタキツネは、北海道において極めて広く分布している。本亜種の食性は幅広く、排泄物集の未消化物を同定した報告では、哺乳類、鳥類、魚類、昆虫類、果実および人為物を利用していることが明らかにされている (Misawa, 1979; Kondo and Shiraki, 2013)。しかしこれらの顕微鏡を用いた被食者の種同定では、採餌方法や未消化物の消化の程度によって、同定に至らないものも存在する。捕食者および被食者間の個体群動態などを明らかにする目的で行われる食性調査は、近年まで胃内容物あるいは排泄物中の未消化物を目視により同定することで実施されてきた (Miller and Mcewen, 1995; Ciucci *et al.*, 2004)。しかし、このような手法における未消化物の分析は、近縁種を同定することが困難であることに加え、出現数のカウントを誤る可能性がある (Deagle *et al.*, 2007)。一方、PCR 法が開発されたことにより (Mullis *et al.*, 1987; Saiki *et al.*, 1988)、生物の種判別が可能な DNA 情報が整備されてきたため、最近では生態学分野においても DNA を利用した報告がされている (Murphy *et al.*, 2003; Deagle *et al.*, 2007; Gerwing *et al.*, 2016)。このような遺伝マーカーを用いれば、キタキツネでも目視

観察よりも正確かつ高感度な被食者の同定が可能と考えられる。キタキツネの環境適応性の評価ならびに、本亜種を取り巻く環境を評価する上で、このような詳細な食性プロフィールは重要な情報となりうる。しかし、キタキツネにおいて、分子生態学的な食性解析についての報告は無く、その食性プロフィールは目視観察に基づくもののみとなっている。

そこで第 3 部では、キタキツネの捕食が確認されているエゾヤチネズミ (*Myodes rufocanus bedfordiae*) に加えて、その捕食が予測されるヒメネズミ (*Apodemus argenteus*)、ドブネズミ (*Rattus norvegicus*) およびエゾユキウサギ (*Lepus timidus ainu*) について遺伝マーカーを開発し、これら被食者に関する食性を解析した。

第 2 章 材料および方法

第 1 節 キタキツネ被食者種特異的マーカーの開発

第 1 項 被食者種特異的プライマーの設計

キタキツネ糞由来 DNA より、エゾヤチネズミ、ヒメネズミ、ドブネズミおよびエゾユキウサギを検出するためのプライマーセットを設計するために、NCBI からそれぞれの種の塩基配列を取得した。得られた塩基配列は、Custalx 2.1 (Larkin *et al.*, 2007) を用いてアライメントを行ない、種特異的になるようにプライマーセットを設計した (Fig.7)。設計したプライマーのうちフォワードプライマーを、蛍光標識 (Beckman Dye 2、3 および 4) した。

第 2 節 キタキツネ糞由来 DNA からの食性解析

第 1 項 糞由来 DNA の抽出

キタキツネの糞便は、第 2 部で用いたサンプルに加え、2011 年 8 月から 11 月に斜里町ウトロにおいて採集されたサンプルを用いた (Fig.3)。採集およびエキノコックス虫卵の死滅は、第 2 部第 2 章に準じて行なった。DNA 抽出は、QIAamp DNA Stool Mini Kit のプロトコルに沿って実施した。抽出した糞由来 DNA は、

Myodes rufocanus bedfordiae primer set (14440-14664)

| | | |
|------------------------------------|--|-----------------------------------|
| | Forward (5' -3') | Reverse (5' -3') |
| <i>Myodes rufocanus bedfordiae</i> | GGCGTCTACTACGGCTCCTACAACA | ATTTTCAGTAGATAAAGCCACCCCTC |
| <i>Apodemus argenteus</i> | GGTATATATACTACGGATCCTATACAT | CTTCTCAGTAGACAAAAGCCACCCCTA |
| <i>Rattus norvegicus</i> | GGACTATACTATGGATCCTACACTT | CTTCTCAGTAGACAAAAGCCACCCCTA |
| <i>Mus musculus</i> | GGCTTATAATTATGGATCATAATACAT | CTTCTCAGTAGACAAAAGCCACCTTG |
| <i>Vulpes vulpes</i> | GGCTTATAATTATGGATCTTATGTAT | CTTCTCAGTAGACAAAAGCCACCCCTA |
| | ** * ** * ** * ** * ** * ** * | ** * ** * ** * ** * ** * ** * |

Apodemus argenteus primer set (14463-14756)

| | | |
|------------------------------------|---|--------------------------------|
| | Forward (5' -3') | Reverse (5' -3') |
| <i>Myodes rufocanus bedfordiae</i> | CCTCCACGTTGGGCGAGGCGTCTAC | GCCCTTCATTTATCAGGCCCTTGT |
| <i>Apodemus argenteus</i> | TCTCCATGTAGACGAGGTATATAC | TCCATTCAATTTGCAGCCCTAGT |
| <i>Rattus norvegicus</i> | CCTCCATGTGGGACGAGGACTATAC | CCCATTCATTTATCGCCGCCCTTGC |
| <i>Mus musculus</i> | CCTTCATGTGGGACGAGGCTTATAT | ACCATTTTATTTATCGCGGCCCTTAGC |
| <i>Vulpes vulpes</i> | CATGCACGTTGGGACGAGGCTTATAT | TCCATTCAATTCATCGCAGCATTAGC |
| | * ** * ** * ** * ** * ** * ** * | ** * ** * ** * ** * ** * ** * |

Fig.7 Primers designed for mtDNA for specific amplification of prey species, respectively. Numbers in parentheses indicate primer position on mtDNA (nt). DNA sequences in bold indicate intended primer binding site. Asterisks show identical nucleotide loci among species.

Rattus norvegicus primer set (5242-5551)

| | Forward (5' -3') | Reverse (5' -3') |
|--------------------------|--|---------------------------------|
| <i>Rattus norvegicus</i> | CCCGCC - TATCAGAAAGA - GGCG | TGAACTAGGACAGCCAGGGCCTCC |
| <i>Mus musculus</i> | ACCGCC - GAAAAAAAAAAAAATGGCG..... | AGAA TTAGGTCAACCCAGGTGCACITTT |
| <i>Vulpes vulpes</i> | CCCGCCGTGTAGGAAAAAAAAAGGCG..... | CGAA TTAGGTCAACCCGGCACCTTAT |
| | ***** * **** | *** ***** ** ** * * |

Lepus timidus primer set (14801-14957)

| | Forward (5' -3') | Reverse (5' -3') |
|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| <i>Lepus timidus</i> | CCAAATAACCCATCAGGTATCC | CGGAGACCCAGACAACTACAC |
| <i>Myodes rufocanus bedfordiae</i> | CCAAACAACCCCAACAGGCCTAA..... | CGGAGACCCAGATAAATTATAC |
| <i>Apodemus argenteus</i> | CCAAACAACCCCTACCGGCCTAA..... | AGGAGACCCAGATAA TTATAT |
| <i>Rattus norvegicus</i> | CAAAATAACCCCAACAGGATTA..... | AGGAGACCCAGACAA TTATAC |
| <i>Mus musculus</i> | CAAAACAACCCCAACAGGATTA..... | AGGAGACCCAGACAACTACAT |
| <i>Vulpes vulpes</i> | CCAAACAATCCTTCAGGAATCA..... | AGGAGACCCAGACAA TTATAC |
| | * ** ** * * * * * | ***** ** ** * * |

Fig.7 Continued from previous page.

第2部で用いた糞便の種判別法により、スクリーニングを行なった。この結果、本実験では網走市八坂および斜里町ウトロより得られた240個の糞便から抽出されたDNAを用いることができた。

第2項 PCRによる被食者ミトコンドリアDNA断片の増幅

被食者判定のためのPCRは、2 μ lのキタキツネ糞由来DNAを鋳型として、1 \times PCR Gold buffer、0.2 mM dNTPs、2.0 mM MgCl₂、0.008% BSA、0.5 U *AmpliTaq Gold* DNA Polymerase および蛍光標識化した2.6 μ M プライマーセットに滅菌純水を加え、最終容量を10 μ lとした。PCR反応は、95 $^{\circ}$ Cで10分間変性した後に、94 $^{\circ}$ Cで30秒、55 $^{\circ}$ Cで45秒および72 $^{\circ}$ Cで1分のサイクルを45回繰り返し、72 $^{\circ}$ Cで5分間伸長することで実施した。

第3項 フラグメント解析によるDNA断片の検出

第1項で得られたPCR産物は、第2章第1節でフォワードプライマーに付加した蛍光標識をもとにDye2、3および4の組み合わせで混合し、3 μ lをCEQ8000 Genetic Analyzerによるフラグメント解析に用いた。

第3章 結果

第1節 キタキツネ被食者種特異的マーカーの開発

第1項 被食者特異的プライマーの設計

エゾヤチネズミ、ヒメネズミ、ドブネズミおよびエゾユキウサギのプライマーセットは、第2章の第1節第1項において得られた配列に対して設計した (Table.10)。また設計したプライマーセットを用いた PCR の結果、それぞれのプライマーセットにおいて目的サイズ同じ DNA 断片が得られ (Fig.8)、塩基配列も一致した。

第2節 キタキツネ糞由来 DNA からの食性解析

第1項 フラグメント解析による DNA 断片の検出

240 サンプルの糞由来 DNA を用いたフラグメント解析の結果、エゾヤチネズミ、ヒメネズミ、ドブネズミおよびエゾユキウサギいずれかの DNA 断片が検出されたサンプルは、175 サンプル (72.9%) であった。

第2項 DNA 断片の検出頻度に基づく食性解析

Table.10 Primer sets used for diet analysis.

| Primer name | Primer sequense (5'-3') | Strand |
|-------------|------------------------------------|--------|
| Yachi_m_F1 | GGC GTC TAC TAC GGC TCC TAC AAC A | L |
| Yachi_m_R1 | GAG GGT GGC TTT ATC TAC TGA AAA T | H |
| Rat_m_F2 | CCC GCC TAT CAG AAA AGA GGC G | L |
| Rat_m_R2 | GGA GTG CGC CTG GCT GTC CTA GTT CA | H |
| Hime_m_F2 | TCT CCA TGT AGG ACG AGG TAT ATA C | L |
| Hime_m_R2 | ACT AGG GCT GCA ATA ATG AAT GGA | H |
| Lepus_L | CTA ATA ACC CAT CAG GTA TCC | L |
| Lepus_H | GTG TAC TTG TCT GGG TCT CCG | H |

Strand indicates light (L) and heavy (H) chain.

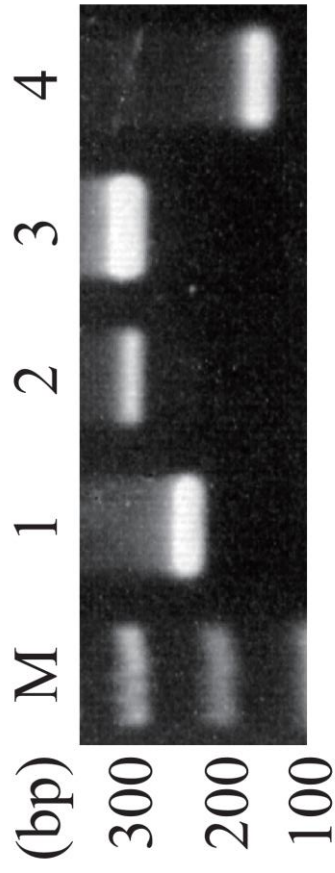


Fig.8 Amplification of fecal DNA using species-specific mtDNA primer sets. Lanes are shown as follows: 100-bp ladder (M); *Myodes rufocanus bedfordiae* (1); *Apodemus argenteus* (2); *Rattus norvegicus* (3); *Lepus timidus* (4).

八坂での被食者検出頻度は、エゾヤチネズミ、ヒメネズミ、ドブネズミおよびエゾユキウサギで、それぞれ 42.7、3.3%、7.6%および 37.4%であった。一方ウトロでは、それぞれ 55.2%、6.9%、10.3%および 37.4%であり、両調査地においてエゾヤチネズミが最も高頻度で検出された。さらに、エゾヤチネズミの月毎の検出頻度の推移は、同一サンプルを用いた顕微鏡での食性解析報告（Kondo and Shiraki, 2013）と類似しており、Spearman の順位相関分析により強い正の相関が示された（ $r = 0.783$; $P = 0.003$; Fig.9, Fig.10）。

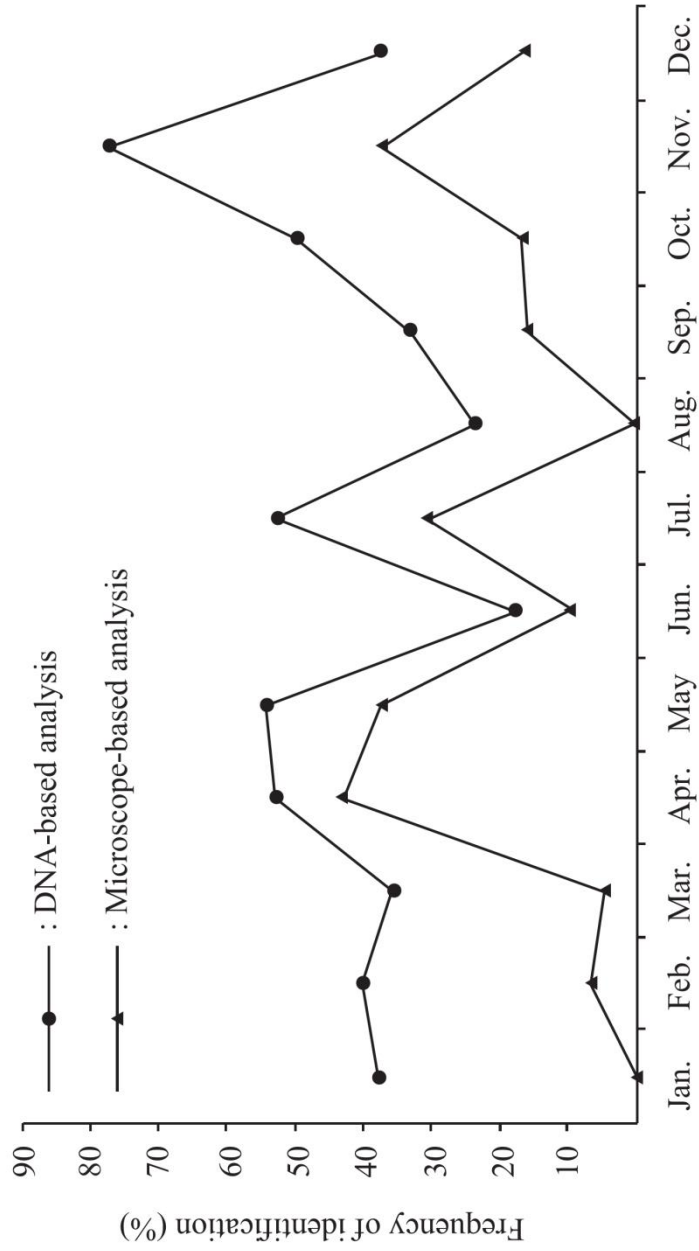


Fig.9 Comparing the detected pattern of *Myodes rufocanus bedfordiae* using DNA- and microscopy-based methods. Circles and triangles indicate the detected frequency of *M. r. bedfordiae* by DNA- and microscopy-based analysis, respectively.

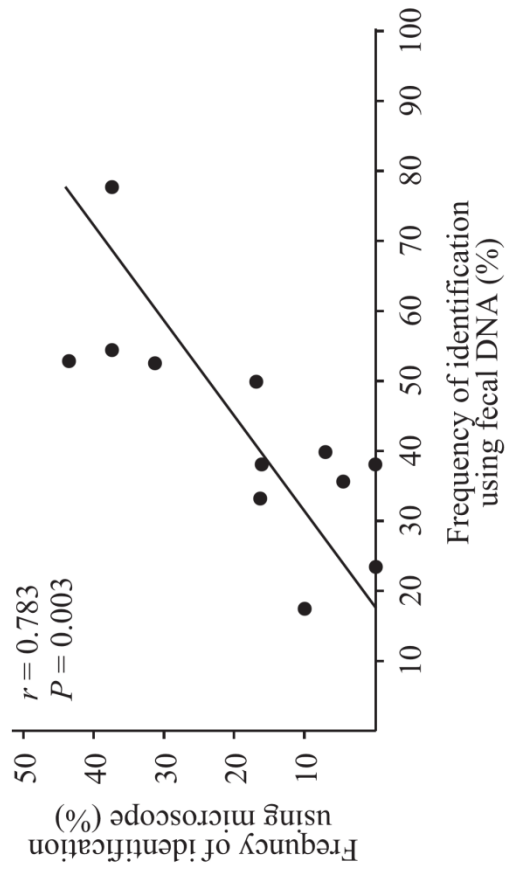


Fig.10 Scatter plot of detection frequency of *Myodes rufocanus bedfordiae* using DNA- and microscopy-based methods. Horizontal and vertical axes indicate results of DNA- and microscopy-based analysis in the detection frequency of *M. r. bedfordiae*, respectively. The r -value was calculated using Spearman's rank correlation test. P was calculated using a test of no correlation.

第4章 考察

本研究において、175 サンプルの糞由来 DNA から被食者由来ゲノムが検出され、その割合は 72.9%であった。糞由来 DNA をサンプルとして用いた場合、PCR 成功率は核 DNA では著しく低下するが、ミトコンドリア DNA では比較的良好的な成功率が得られる (Frantzen *et al.*, 1998)。これはミトコンドリア DNA のコピー数が、核 DNA を上回っているためとされている (Takenaka, 1993)。従って、本研究ではミトコンドリア DNA を遺伝マーカーとして用いたことから、PCR 成功率が向上したと考えられた。

食性解析の結果では、八坂およびウトロの両調査地において、エゾヤチネズミ由来ゲノムが最も高頻度に検出された。北海道北部、南部、東部および中部を調査地とした捕獲調査では、エゾヤチネズミ、エゾアカネズミ (*Apodemus speciosus ainu*)、ヒメネズミおよびミカドネズミ (*Clethrionomys rutilus mikado*) が捕獲され、全ての調査地でエゾヤチネズミが優占種であることが明らかになっている (Nakatsu, 1981)。同様に、本研究のサンプリング期間中に林業試験場によって実施された野ネズミ類の捕獲調査でも、エゾヤチネズミの捕獲割合が全道およびオホーツク管内ともに最多となっている。これらに対し、八坂およ

び小清水町を調査地とした捕獲調査では、エゾヤチネズミおよびエゾアカネズミが捕獲され、エゾヤチネズミはこれらの地域において優占種ではないことが明らかになっている (Kondo and Shiraki, 2013)。これらの結果は、エゾヤチネズミが局地的に個体数を変動させるという報告を支持している (Yoneda, 1983)。

一方、野外給仕実験ではキタキツネがエゾヤチネズミへの選好性を示すことが明らかとなっている (Kondo and Shiraki, 2012)。また、本研究において用いた糞便を顕微鏡で観察した報告でも、同様にエゾヤチネズミが最も高頻度で検出されている (Kondo and Shiraki, 2013)。従って、本研究におけるエゾヤチネズミの検出結果は、キタキツネの選好性を正確に反映していることが示された。さらに、顕微鏡観察 (Kondo and Shiraki, 2013) によるエゾヤチネズミの月毎の検出頻度の推移は、本研究の結果と強い正の相関を示した (Fig.9, 10)。本研究におけるエゾヤチネズミの検出結果は、これらの報告を支持するとともに、既存の報告よりも多くの糞便からエゾヤチネズミを検出している (Fig.9)。従って、今回確立されたキタキツネの食性解析法は、高感度かつ高い信頼性を有することが明らかとなった。

また、ヒメネズミ、ドブネズミおよびエゾユキウサギは、調査地内におい

て新たにキタキツネによる利用が確認された種である。本研究においてヒメネズミの検出頻度が低いことから、顕微鏡を用いた食性解析 (Kondo and Shiraki, 2013) では、本種の未消化物を検出できなかつたと推測された。ドブネズミおよびエゾユキウサギは、その体のサイズから、キタキツネに骨を除いた体の一部が採食されると推測され、このため、両種は顕微鏡下において種の同定が不可能であったと考えられた。以上のことから、本研究における食性解析法は、新たな被食者の同定にも応用可能であることが示された。

糞由来 DNA を用いた食性解析は、より多くの糞便におけるエゾヤチネズミの検出ならびに新たな被食者の同定を可能にした。従って、この食性解析法は、キタキツネの新たな食性を明らかにする上で、極めて有効な手法となることが期待された。一方で、キタキツネは強い雑食性を示すことから (Misawa, 1979; Tsukada, 1997)、その糞便は個体が捕食した多様な餌資源の DNA を含んでいると推測される。従って、糞由来 DNA からの食性解析は、高い特異性を持つプライマーセットが必要となる。

近年の研究では、野生動物の糞由来 DNA を用いた食性解析に、次世代シーケンサーを使用した例が報告されている (Ando *et al.*, 2013; Gerwing *et al.*,

2016)。次世代シーケンサーを用いた糞由来 DNA からの食性解析は、網羅的かつ定量的な解析を可能とする。しかし、この解析は高コストであることに加え、得られるデータを専門的に処理する技術と設備が必要となる。また同定された餌資源を種レベルにまで絞り込む、または同定された動物種が調査対象種の糞便に含まれていることを裏付けるための手段も必要とする。そのため、本研究において用いられた、簡便かつ低コストである遺伝マーカーの検出法は、野生動物の食性解析法として極めて重要かつスタンダードな手法となることが期待される。

一方、遺伝マーカーを用いた食性解析法は、プライマーを設計する上で調査対象種、あるいは近縁種の既存食性プロフィールを必要とする。従って、本手法の発展は、より大きな分類群の糞由来クローニングライブラリーからの塩基配列決定法の確立を必要とすると考えられた。本研究において確立された手法は、簡便かつ正確性の高いものであることから、他の動物種の食性解析にも応用可能であると考えられ、今後の分子生態学分野において有用なツールのひとつになることが期待される。

総合討論

キタキツネは、環境適応能力の高さや個体数の多さから保全対象とならず、学術的な報告が少ない現状にある。このような状況から、第 1 部ではキタキツネ新規マイクロサテライトマーカーの開発を行なった。本研究において、キタキツネ臓器由来 DNA より 28 種のマイクロサテライト領域が単離され、これらの塩基配列は NCBI のデータベースにキタキツネ由来ゲノムのマイクロサテライト領域として初めて登録された。また、7 個体のキタキツネ肝臓由来 DNA を用いて新規マイクロサテライトマーカーの評価を実施した結果、18 種のマーカーにおいて遺伝子型が決定された (Table.3)。現在、アカギツネにおけるマイクロサテライト配列は、NCBI において 119 件登録されている。しかしこれらの配列は、キタキツネ由来ゲノムから開発されたマーカーではないため、本亜種に対しては必ずしも高い特異性を有していないことも考えられた。本研究によって特性が評価されたマイクロサテライトマーカーは、キタキツネに対して特異性を示すものも認められた (Fig.2)。また、それぞれの遺伝子座では過去の報告 (Oishi *et al.*, 2011) と比較して同程度から高頻度の多型が認められた (Table.5)。従って、本研究において開発されたマイクロサテライトマーカーは、キタキツ

ネの遺伝的多様性ならびに集団構成の評価において有用なツールになることが期待される。

第 2 部では、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を用い、糞由来 DNA からの個体識別を行なった。本研究では、22 サンプルの糞由来 DNA から、6 種の遺伝子座において遺伝子型を決定した (Table.7, 8)。これにより、網走市八坂地域には、少なくとも 21 個体のキタキツネが生息することと推測された (Table.8)。また、第 1 部においてキタキツネ種特異性を示し (Fig.2)、第 2 部において糞由来 DNA の遺伝子型決定が可能であった *DvNok10* および *DvNok23* は (Table.8)、キタキツネを対象とした分子生態学的研究において極めて有用なマーカーであると考えられた。一方、糞由来 DNA のうち、核 DNA を用いた PCR では、成功率の低下が報告されている (Frantzen *et al.*, 1998)。本研究においても、核 DNA をターゲットとしたために遺伝子型の決定効率は低かったが、一部のマイクロサテライトマーカーで良好な解析効率が示された (Table.9)。低品質な糞由来 DNA で高い PCR 成功率を得るためにも、このようなマイクロサテライトマーカーにおける共通点を見出し、多数のマーカー開発を進めることが望まれる。また、アカギツネに対する既存のマイクロサテライ

トマーカは、糞由来 DNA を用いた研究報告がない状況にあり、その解析効率は不明である。本研究では糞由来 DNA を用い、新規マイクロサテライトマーカ一の評価を行なうことで、分子生態学におけるマーカ一の有用性を示した。これらのことから、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一は、キタキツネの生体あるいは糞由来 DNA を用いた遺伝的多様性評価において、有用なツールになることが期待できる。

第 3 部では、キタキツネの被食者特異的ミトコンドリア DNA マーカ一の開発ならびに、それらを用いた食性の解析を行なった。キタキツネの食性解析では、顕微鏡を用いた糞分析法により、哺乳類に対する利用プロフィールが明らかにされてきた (Misawa, 1979; Tsukada, 1997; Kondo and Shiraki, 2013)。しかしこの手法を用いた報告では、齧歯目の分類の不明確性、ならびに検出動物種の出現頻度が、研究者によって変動する危険性がある。これは、研究者の分類学的知識の差異、あるいは対象動物種の捕食方法の違いによって生じていると考えられ、これらの影響が少ない手法の開発が望まれる。本研究では、キタキツネがエゾヤチネズミを最も高頻度に利用していることが DNA 解析から明らかとなった。キタキツネのエゾヤチネズミへの嗜好性は、既存の報告においても示され

ている (Kondo and Shiraki, 2012)。また、本研究において用いた糞中の被食者を、顕微鏡下において同定した研究においてもエゾヤチネズミが最も多く検出されており (Kondo and Shiraki, 2013)、その推移は強い正の相関を示した (Fig.10)。さらに、本研究ではこれまでの顕微鏡下による糞分析では検出されなかったヒメネズミ、ドブネズミおよびエゾユキウサギの捕食の客観的な証明に成功した。以上の結果から、糞由来 DNA を用いることで、より高感度な被食者の同定が可能であることが明らかとなった。従って、我々が開発した遺伝マーカーによる被食者の同定法は、顕微鏡観察による食性解析の問題点を解決する上でも極めて有用な手法であると考えられた。さらに本研究では、八坂およびウトロのキタキツネ集団間に、エゾユキウサギの検出頻度の差異を認めた。エゾユキウサギの体サイズを考慮すると、キタキツネは本亜種の一部を採食していると考えられる。しかしこのような被食者でも、糞由来 DNA を用いることで、地域間の利用頻度の差異を明らかにできる可能性が示された。この仮定を明確にするためには、両調査地における餌資源量ならびに、キタキツネの餌資源利用可能性について明らかにし、比較する必要があると考えられた。一方近年では、次世代シーケンサーを用いた糞由来 DNA からの食性解析が実施されているが

(Ando *et al.*, 2013; Gerwing *et al.*, 2016)、これらのデータを裏付けるためには PCR による被食者同定が必要である。この裏付けを行なうための PCR において、本研究で確立されたキタキツネの食性解析法は、極めて有効なものになると期待できる。

本研究では、個体識別および食性解析のためのマーカーを新たに開発し、キタキツネ糞由来 DNA においてその有用性を評価した。これにより、核 DNA をマーカーとした場合、PCR 成功率の低下が起こるが、マーカーによっては遺伝子型の効率的な決定が可能であることが明らかとなった (Table.9)。また、mtDNA をマーカーとした場合、核 DNA よりも PCR 成功率は高くなり、個体識別を必要としない食性解析においては極めて有効な手段であることが示された。以上のことから、糞由来 DNA を用いた分子生態学的研究を実施する上で、目的に合わせたマーカーを選択することが極めて重要であると考えられた。そのためには、糞由来 DNA に最適化されたマーカー開発の継続ならびに技術発展が必要であり、これらが将来の分子生態学分野に大きく寄与すると期待される。

要約

キタキツネは、北海道の固有亜種であり、重要な遺伝資源のひとつである。本亜種は環境適応能力が高く、森林から都市部まで様々な環境に適応して生息している。これに伴い個体数も多く、またエキノコックス症を媒介し、夜行性であり警戒心が強いという特徴から、集団構成や食性についての学術的な研究報告が少ない。痕跡物から DNA を抽出することで、遺伝的情報を得ることのできる分子生態学的手法は、キタキツネに対して特に有効であると考えられるが、これを実施するための基礎的な遺伝情報は乏しい。そこで本研究では、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応用ならびに、糞由来 DNA からの食性解析法の確立を目指した。マイクロサテライトマーカーは、キタキツネ肝臓由来 DNA より 28 種が開発された。このうち 17 種は、7 個体のキタキツネにおいて多型が認められた。これらのマイクロサテライトマーカーを用いた糞由来 DNA からの個体識別では、少なくとも 21 個体のキタキツネによって調査地が利用されていたことを明らかにした。さらに、このうち 2 種のマイクロサテライトマーカーは、糞由来 DNA において遺伝子型の決定が可能であり、キタキツネに対して強い特異性を示した。従って、これらのマーカーは、キタ

キツネの集団遺伝学的研究において、有用なマーカーであると考えられた。糞由来 DNA からの食性解析では、2 調査地の両方において、キタキツネがエゾヤチネズミを最も高頻度に利用している可能性が示唆された。さらにこの結果は、同じ糞便を用いた顕微鏡下における食性解析報告と強い正の相関を示したことから、本研究における食性解析法は支持されることが考えられた。本研究では、顕微鏡下では同定されなかったヒメネズミ、ドブネズミおよびエゾユキウサギの利用を、糞由来 DNA より明らかにした。従って、糞由来 DNA を用いた食性解析法は、従来の手法に比べてより高感度を実施できることが示された。以上の結果から、本研究において開発された遺伝マーカーは、キタキツネならびに本亜種を取り巻く環境を保全するための分子生態学的研究において、重要なツールになると言える。

謝辞

本論文を作成するにあたり、多大なるご指導ならびにご助言を賜りました本研究の指導教授である東京農業大学大学院生物産業学研究科・教授、亀山祐一博士（生物産業学）に厚く御礼申し上げます。

本研究のすべての遂行、論文執筆など、終始多大なる実験および研究指導ならびに援助を頂いた東京農業大学生物産業学部・准教授、和田健太 博士（生物産業学）に深く感謝の意を表す。同時に、実験遂行と論文執筆に対して多くのご助言を賜った、元東京農業大学大学院生物産業学研究科・准教授、現公益財団法人東京都医学総合研究所・プロジェクトリーダー、吉川欣亮 博士（畜産学）に御礼申し上げます。

また、ご退官後も数々のご指導ならびにご助言を賜った、東京農業大学・名誉教授・横濱道成 農学博士に御礼申し上げます。

さらに、調査指導ならびにサンプリングにご協力頂きました、那須野が原博物館・学芸員・近藤 慧 氏、マイクロサテライトマーカー単離の実験指導にご協力頂きました、公益財団法人東京都医学総合研究所・関優太 博士（生物産業学）に感謝の意を表す。

また、サンプリングならびに実験遂行にご協力頂きました、平成 22 年度卒業生であります松井遥沙 氏、平成 23 年度卒業生の織井保匡 氏、平成 24 年度卒業生の田中 花 氏および吉田宏平 氏、平成 25 年度卒業生の泉 龍馬 氏および土屋 有伽里 氏、平成 26 年度卒業生の畑 智基 氏、平成 27 年度卒業生の川下 康行 氏および東京農業大学生物産業学部 4 年・小川隼矢 氏に感謝の意を表する。

最後に、本研究は、平成 26 年度東京農業大学大学院博士後期課程支援制度、平成 28 年度東京農業大学大学院博士後期課程支援制度および東京農業大学先端研究プロジェクト A の支援のもとで行った。ここに感謝の意を表する。

引用文献

1. Ando H., Setuko S., Horikoshi K., Suzuki H., Umehara S., Inoue-Murayama M. and Isagi Y. 2013. Diet analysis by next-generation sequencing indicates the frequent consumption of introduced plants by the critically endangered red-headed wood pigeon (*Columba janthina nitens*) in oceanic island habitats. *Ecology and Evolution*, **3**, 4057-4069.
2. Baumgardt J. A., Goldberg C. S., Reese K. P., Connelly J. W. and Musil D.D. 2013. A method for estimating population sex ratio for sage-grouse using noninvasive genetic samples. *Molecular Ecology Resources*, **13**, 393-402.
3. Brinkman T. J., Schwartz M. K., Person D. K., Pilgrim K. L. and Hundertmark K. J. 2010. Effects of time and rainfall on PCR success using DNA extracted from deer fecal pellets. *Conservation Genetics*, **11**, 1547-1552.
4. Ciucci P., Tosoni E. and Boitani L. 2004. Assessment of the point-frame method to quantify wolf *Canis lupus* diet by scat analysis. *Wildlife Biology*, **10**, 149-153.
5. Creel S., Spong G., Sands J. L., Rotella J., Zeigle J., Joe L., Murphy K. M. and Smith D. 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone

- noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology*, **12**, 2003-2009.
6. Deagle B. E., Gales N. J., Evans K., Jarman S. N., Robinson S. Trebilco R. and Hindell M. A. 2007. Studying seabird diet through genetic analysis of faeces: A case study on macaroni penguins (*Eudyptes chrysolophus*) . *PLoS ONE*, **2**, e831.
 7. Ebert C., Knauer F., Spielberger B. and Hohmann U. 2012. Estimating wild boar *Sus scrofa* population size using faecal DNA and capture-recapture modelling. *Wildlife Biology*, **18**, 142-152.
 8. Eggert L. S., Eggert J. A. and Woodruff D. S. 2003. Estimating population sizes for elusive animals: The forest elephants of Kakum National Park, Ghana. *Molecular Ecology*, **12**, 1389-1402.
 9. Eggert L. S., Maldonado J. E. and Fleischer R. C. 2005. Nucleic acid isolation from ecological samples-animal scat and other associated materials. *Method Enzymology*, **395**, 73-87.
 10. Farrell L. E., Roman J. and Sunquist M. E. 2000. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology*, **9**, 1583-1590.

11. Fernando P., Pfrender M. E., Encalada S. E. and Lande R. 2000. Mitochondrial DNA variation, phylogeography and population structure of the Asian elephant. *Heredity*, **84**, 362-372.
12. Frantzen M. A. J., Silk J. B., Ferguson J. W. H., Wayne R. K. and Kohn M. H. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*, **7**, 1423-1428.
13. Gerwing T. G., Kim J.-H., Hamilton D. J., Barbeau M. A. and Addison J. A. 2016. Diet reconstruction using next-generation sequencing increases the known ecosystem usage by a shorebird. *Auk*, **133**, 168-177.
14. Glenn T. C. and Schable N. A. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, **395**, 202-222.
15. Guo Y., Hu Y., Qi D., Zhan X., Bruford M. W. and Wei F. 2011. Genotyping faeces of red pandas (*Ailurus fulgens*): Implications for population estimation. *European Journal of Wildlife Research*, **57**, 1231-1235.
16. Hagelberg E., Sykes B. and Hedges R. 1989. Ancient bone DNA amplified, *Nature*, **342**, 485.

17. Hemmilä S., Kumara M., Ravikanth G., Gustafsson S., Vasudeva R., Ganeshaiyah K. N., Uma Shaanker R. and Lascoux M. 2010. Developmet of eleven microsatellite markers in the red-listed tree species *Myristica malabarica*. *Conservation Genetics Resources*, **2**, 305-307.
18. Harrison R. L., Clarke P.-G. S. and Clarke C. M. 2004. Indexing Swift Fox Populations in New Mexico Using Scats. *American Midland Naturalist*, **151**, 42-49.
19. Inoue E. 2015. DNA analysis using noninvasive samples: methods of sample collection, DNA extraction, PCR amplification and kinship analysis. *Primate Research*, **31**, 3-18.
20. Jarman S. N., Deagle B. E. and Gales N. J. 2004. Group-specific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. *Molecular Ecology*, **13**, 1313-1322.
21. Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A., Edwards S. V., Paabo S., Villablanca F. X. and Wilson A. C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 6196-6200.

22. Kohn M. H., York E. C., Kamradt D. A., Haught G., Sauvajot R. M. and Wayne R. K. 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **266**, 657-663.
23. Kondo A. and Shiraki S. 2012. Preferences for specific food species of the red fox *Vulpes vulpes* in Abashiri, eastern Hokkaido. *Mammal Study*, **37**, 43-46.
24. Kondo A. and Shiraki S. 2013. Relation between food habits and food resource of the red fox *Vulpes vulpes schrencki* in Abashiri, Eastern Hokkaido. *Bulletin of the Shiretoko Museum*, **35**, 47-58.
25. Kukekova A. V., Trut L. N., Oskina I. N., Johnson J. L., Temnykh S. V., Kharlamova A. V., Shepeleva D. V., Gulievich R. G., Shikhevich S. G., Graphodatsky A. S., Aguirre G. D. and Acland G. M. 2007. A meiotic linkage map of the silver fox, aligned and compared to the canine genome. *Genome Research*, **17**, 387-399.
26. Larivière S. and Pasitschniak-Arts M. 1996. *Vulpes vulpes*. *American Society of Mammalogists*, **537**, 1-11.
27. Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A.,

- McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J. and Higgins D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947-2948.
28. Miller C. K. and McEwen L. C. 1995. Diet of nesting Savannah Sparrows in interior Alaska. *Journal of Field Ornithology*, **66**, 152-158.
29. Misawa E. 1979. Change in the Food habits of the red fox, *Vulpes vulpes schrencki* KISHIDA according the habitat conditions. *Journal of the Mammalogical Society of Japan*, **7**, 311-320.
30. Moore S. S., Sargeant L. L., King T. J., Mattick J. S., Georges M. and Hetzel D. J. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, **10**, 654-660.
31. Mowat G. and Strobeck C. 2000. Estimating population size of grizzly bears using hair capture, DNA profiling, and mark-recapture analysis. *Journal of Wildlife Management*, **64**, 183-193.
32. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. and Erlich H. 1986. Specific

- enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**, 263-273.
33. Munguia-Vega A., Pelz-Serrano K., Goode M. and Culver M. 2009. Eleven new microsatellite loci for the tiger rattlesnake (*Crotalus tigris*). *Molecular Ecology Resources*, **9**, 1267-1270.
34. Murphy M. A., Kendall K. C., Robinson A. and Waits L. P. 2007. The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification. *Conservation Genetics*, **8**, 1219-1224.
35. Nakatsu A. 1981. Regional differences in population property of the Bedford's red-backed vole, *Clethrionomys rufocanus bedfordiae* (THOMAS). *Bulletin of the Government Forest Experiment Station*, **314**, 59-69.
36. Nsubuga A. M., Robbins M. M., Roeder A. D., Morin P. A., Boesch C. and Vigilant L. 2004. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Molecular Ecology*, **13**, 2089-2094.
37. O'Connell M., Danzmann R. G., Cornuet J.-M., Wright J. M. and Ferguson M. M.

1997. Differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations in Lake Ontario and the evaluation of the stepwise mutation and infinite allele mutation models using microsatellite variability. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**, 1391-1399.
38. Oishi T., Uruguchi K., Takahashi K. and Masuda R. 2011. Population structures of the red fox (*Vulpes vulpes*) on the Hokkaido Island, Japan, revealed by microsatellite analysis. *Journal of Heredity*, **102**, 38-46.
39. Oku Y. and Kamiya M. 2003. Biology of *Echinococcus*. *Progress of Medical Parasitology in Japan*, **8**, 293-318.
40. Panasci M., Ballard W. B., Breck S., Rodriguez D., Densmore III L. D., Wester D. B. and Baker R. J. 2011. Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success. *Journal of Wildlife Management*, **75**, 1616-1624.
41. Paxinos E., Mcintosh C., Ralls K. and Fleischer R. 1997. A noninvasive method for distinguishing among canid species: Amplification and enzyme restriction of DNA from dung. *Molecular Ecology*, **6**, 483-486.

42. Piggott M. P. 2004. Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA. *Wildlife Research*, **31**, 485-493.
43. Piggott M. P., Bellemain E., Taberlet P. and Taylor A. C. 2004. A multiplex pre-amplification method that significantly improves microsatellite amplification and error rates for faecal DNA in limiting conditions. *Conservation Genetics*, **5**, 417-420.
44. Piggott M. P., Banks S. C., Stone N., Banffy C. and Taylor A. C. 2006. Estimating population size of endangered brush-tailed rock-wallaby (*Petrogale penicillata*) colonies using faecal DNA. *Molecular Ecology*, **15**, 81-91.
45. Poinar H. N., Kuch M., Sobolik K. D., Barnes I., Stankiewicz A. B., Kuder T., Spaulding W. G., Bryant V. M., Cooper A. and Pääbo S. 2001. A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 4317-4322.
46. Primmer C. R., Møller A. P. and Ellegren H. 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, **5**, 365-378.
47. Prugh L. R., Ritland C. E., Arthur S. M. and Krebs C. J. 2005. Monitoring coyote

- population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology*, **14**, 1585-1596.
48. Rico C., Normandeau E., Dion-Côté A.-M., Rico M. I., Côté G. and Bernatchez L. 2013. Combining next-generation sequencing and online databases for microsatellite development in non-model organisms. *Scientific Reports*, **3**, 3376.
49. Ross C. T., Weise J. A., Bonnar S., Nolin D., Satkoski Trask J., Smith D. G., Ferguson B., Ha J., Kubisch H. M., Vinson A. and Kanthaswamy S. 2014. An empirical comparison of short tandem repeats (STRs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) for relatedness estimation in Chinese rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology*, **76**, 313-324.
50. Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103-106.
51. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T. Mullis K. B. and Erlich H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
52. Santini A., Lucchini V., Fabbri E. and Randi E. 2007. Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf (*Canis lupus*) excremental DNA samples.

Molecular Ecology Notes, **7**, 955-961.

53. Sastre N., Francino O., Lampreave G., Bologov V. V., López-Martín J. M., Sánchez A. and Ramírez O. 2009. Sex identification of wolf (*Canis lupus*) using non-invasive samples. *Conservation Genetics*, **10**, 555-558.
54. Seki Y., Yokohama M., Ishikawa D., Ikehara N., Wada K., Nomura K., Amano T. and Kikkawa Y. 2012. Development and characterization of 260 microsatellite loci in the domestic goat, *Capra hircus*. *Animal Genetics*, **43**, 365-366.
55. Stange M., Aguirre-Fernández G., Cooke R. G., Barros T., Salzburger W. and Sánchez-Villagra M. R. 2016. Evolution of opercle bone shape along a macrohabitat gradient: species identification using mtDNA and geometric morphometric analyses in neotropical sea catfishes (Ariidae). *Ecology and Evolution*, **6**, 5817-5830.
56. Taberlet P., Camarra J.-J., Griffin S., Uhrès E., Hanotte O., Waits L. P., Dubois-Paganon C., Burke T. and Bouvet J. 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology*, **6**, 869-876.
57. Taberlet P., Luikart G. and Waits L. P. 1999. Noninvasive genetic sampling: look

- before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, **14**, 323-327.
58. Takenaka O. 1993. DNA polymorphisms reveal kin relationships among chimpanzees. What DNA shows and how collected. *Primate Research*, **9**, 125-134.
59. Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, **17**, 6463-6471.
60. Tsukada H. 1997. On external shape, breeding season, litter size, survival rate and food habit of fox, *Vulpes vulpes schrencki* in Shiretoko national park. *Bulletin of the Shiretoko Museum*, **18**, 35-44.
61. Tsukada H. 2005. Foraging behavior of red foxes and echinococcosis. *Mammalian Science*, **45**, 91-98.
62. Vesterinen E. J., Lilley T., Laine V. N. and Wahlberg N. 2013. Next generation sequencing of fecal DNA reveals the dietary diversity of the widespread insectivorous predator Daubenton's Bat (*Myotis daubentonii*) in Southwestern Finland. *PLoS One*, **8**, e82168.
63. Wandeler P. and Funk S. M. 2006. Short microsatellite DNA markers for the red fox (*Vulpes vulpes*). *Molecular Ecology Notes*, **6**, 98-100.

64. Wasser S. K., Houston C. S., Koehler G. M., Cadd G. G. and Fain S. R. 1997. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology*, **6**, 1091-1097.
65. Yan S. Q., Bai C. Y., Qi S. M., Li Y. M., Li W. J. and Sun J. H. 2015. Development of novel polymorphic microsatellite markers for the silver fox (*Vulpes vulpes*). *Genetics and Molecular Research*, **14**, 5890-5895.
66. Yoneda M. 1983. Influence of Red fox predation upon a local population of small rodents. III. Seasonal changes in predation pressure, prey preference and predation effect. *Applied Entomology and Zoology*, **18**, 1-10.
67. Yu J. N., Chung C. U., Oh K. H. Lee B. K. and Lim C. E. 2015. Development of novel microsatellite markers for conservation genetic studies of *Vulpes vulpes* (Canidae) by using next-generation sequencing method. *Genetics and molecular research*, **14**, 3980-3983.
68. Zhang B. W., Li M., Ma L. C. and Wei F. W. 2006. A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples. *Biochemical genetics*, **44**, 503-512.
69. Zhu Y., Queller D. C. and Strassmann J. E. 2000. A phylogenetic perspective on

sequence evolution in microsatellite loci. *Journal of Molecular Evolution*, **50**,

324-338.

Summary

Development of novel genetic markers for molecular ecological study in the Ezo red fox (*Vulpes vulpes schrencki*)

Tomoki Tada

Graduate School of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture

The red fox (*Vulpes vulpes*) is one of the most widely distributed terrestrial carnivores in the world, occurring throughout most of North America, Europe, Asia, and North Africa. The Japanese red foxes can be subdivided into two subspecies—the Japanese red fox (*V. v. japonica*) and the Ezo red fox (*V. v. schrencki*)—based on their habitat differences. The Ezo red fox is an endemic subspecies on the island of Hokkaido, located at the north end of Japan, and is a known final host of the tapeworm *Echinococcus multilocularis*, which causes the serious zoonotic alveolar echinococcosis. To manage the population size of the Ezo red fox and prevent the spread of tapeworm infection, it is important to characterize the ecological features of this subspecies. However, detailed ecological features of the Ezo red fox, such as its social structure and

home range at the population level, have not yet been clarified. In this study, we developed novel genetic markers to establish standard methods for the molecular ecological study of the Ezo red fox.

1. Characterization and application of newly developed polymorphic microsatellite markers in the Ezo red fox

Polymorphic genetic markers are useful tools for ecological studies of wild animals. A microsatellite marker is composed of one to six nucleotide repeats, and it is advantageous for molecular ecology research owing to its high polymorphism and easy allele detection compared with other DNA markers. Several microsatellite markers have been developed for foxes belonging to the genus *Vulpes*. These markers enable analysis of local genetic diversity and population structure of *Vulpes* spp. However, polymerase chain reaction (PCR) failure is occasionally observed when markers developed for different species are used in the analysis of localized subpopulations, indicating the existence of sequence differences in the flanking DNA of repeat regions. Therefore, polymorphic microsatellite markers specific to the Ezo red fox genome are required for

accurate identification of species and characterization of population structure and ecological features.

To this end, we isolated 28 microsatellite regions from the genome of the Ezo red fox, and developed 18 novel polymorphic microsatellite markers. We confirmed that several of these markers could be amplified from feces-derived DNA. First, we used a basic local alignment search tool (BLAST) to identify unreported DNA fragments within the cloned genomic DNA sequences, obtaining 18 novel microsatellite regions within the genome of Ezo red fox. Based on a comparative genetic map between *Canis familiaris* and *V. vulpes*, 18 sequences could be broadly mapped onto the autosomal and sex chromosomes, with the exceptions of chromosomes 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 and X of the Ezo red fox. Using genomic DNA extracted from the livers of 7 Ezo red fox individuals, the 18 microsatellite regions were amplified. Polymorphisms were identified in 17 of the 18 regions, with *DvNok5* excepted. The number of alleles per locus ranged from 3 to 7, with an average of 4.41. H_E ranged from 0.27 to 0.85 (average: 0.73), and H_O ranged from 0.29 to 1.00 (average: 0.72). Except for *DvNok5*, all of the analyzed markers showed no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium

(HWE; $P > 0.1$). The deviation of *DvNok5* from HWE was attributed to its low polymorphism and the small sample size used in this analysis. Although we genotyped only a few individuals, a moderate number of alleles (3–7) was detected for all 18 markers. Thus, we successfully developed highly polymorphic microsatellite markers for the Ezo red fox.

To verify the utility of these markers, we performed PCR using feces-derived DNA obtained from the fecal samples collected from natural fields. Non-invasive sampling methods such as the one employed in the present study often risk contamination, and the DNA extracted from such samples can be of low quality and quantity. This can lead to reduced PCR success rates. We attempted to amplify 18 microsatellite markers using 192 fecal DNA samples, and we successfully genotyped 6 markers in 22 fecal DNA samples. The number of alleles per locus ranged from 2 to 9, with an average of 6.33. H_O ranged from 0.05 to 0.82 (average: 0.48), and H_E ranged from 0.21 to 0.87 (average: 0.68). Although a relatively low genotyping success rate was observed in our study, these novel markers enabled genotype determination using fecal DNA samples. Therefore, the results suggest that 6 of our 18 newly developed

microsatellite markers are useful for ecological research on the Ezo red fox. To the best of our knowledge, this is the first report on the development of microsatellite markers for the Ezo red fox, and includes a microsatellite marker-based analysis of its genome using feces-derived DNA.

2. Development and application of molecular methods for identification of prey species in the Ezo red fox.

A diet analysis was performed based on microscopic observation of undigested tissues from feces in the Ezo red fox. However, this method frequently requires considerable effort for observation and knowledge of taxonomy, and may still yield unidentifiable rodent prey. To more easily identify prey species of the Ezo red fox, it is preferable to develop a standard method for identification of prey species and for detection of their seasonal and locational changes. In the present study, we attempted to identify prey species from the feces of the Ezo red fox via PCR and capillary gel electrophoresis using specific primer sets for mitochondrial DNA (mtDNA) labeled by

fluorescence dye for several putative prey animals, *Myodes rufocanus bedfordiae*, *Apodemus argenteus*, *Rattus norvegicus*, and *Lepus timidus ainu*.

First, we carried out PCR in 211 and 29 fecal DNA samples from sites in Yasaka and Utoro (Fig. 3), respectively, using a universal primer set for cytochrome *b* (*Cytb*) amplification. Sequences revealed that 59 of 211 samples (30.7%) exhibited nucleotide sequences derived from the putative prey species. This included mammals (86.4%), birds (5.1%), fishes (3.4%), insects (3.4%) and reptiles (1.7%). In mammals, rodents constituted 62.7% of 59 samples. These results suggest that *M. r. bedfordiae*, *A. argenteus*, and *R. norvegicus*, which are commonly found in the sampling areas, are putative prey animals for the Ezo red fox. In addition to these rodents, we predicted that *L. t. ainu* is another candidate prey animal for the Ezo red fox, due to its commonality in the study regions. The species-specific mtDNA markers identified that the most frequently detected species from fecal DNA in Yasaka and Utoro were *M. r. bedfordiae* (49.0%). In addition, mtDNA fragment derived from *A. argenteus*, *R. norvegicus*, and *L. t. ainu* were also detected, contributing 5.1%, 9.0%, and 23.7% of the samples, respectively. These prey animals were not visually detected in microscopy-based diet

analysis, suggesting that newly developed mtDNA markers could be more effective in detecting these prey animals.

Thus, this investigation enables straightforward detection of these species using PCR, and is the first to demonstrate three of them as important prey for the Ezo red fox in Yasaka and Utoro. In comparing DNA- and microscopy-based diet analysis, both methods indicate high correlation with patterns of seasonal occurrence in *M. r. bedfordiae* ($r = 0.783$; $P = 0.003$). Moreover, the detection frequencies of *L. t. ainu* showed a large difference between Yasaka (37.4%) and Utoro (10.3%). Therefore, we suggest that diet analysis based on fecal DNA sampling is better able to predict the differences in predatory dependence on prey species across several locations.

Conclusion

In this study, we developed novel genetic markers and confirmed their utility for molecular ecology in the Ezo red fox, especially in fecal-based analyses. These genetic markers can contribute to characterization of Ezo red fox ecology.