

ニホンリスの体毛を用いたマイクロサテライト DNA分析手法の改良と野生個体群への適用

井上 莉央南 荒川 征夫
汪 光熙 日野 輝明

名城大学農学部

Improvement of microsatellite DNA analysis method using body hair of Japanese squirrels and its application to wild populations

Riona INOUE, Masao ARAKAWA, Koki WANG and Teruaki HINO

Faculty of Agriculture, Meijo University

はじめに

ニホンリス (*Sciurus lis*) のような樹上性哺乳類は移動能力が限られているため、森林の分断化の影響を受けやすい¹⁾。現在では、森林の分断や劣化により日本全国でその数は減少し、西日本と南日本では絶滅危惧種に指定されている²⁾。生息地が分断され個体群が孤立すると、遺伝的多様性の低下により絶滅の危険性が高まる。そのため、ニホンリス個体群の保全策を講じていくためには、個体群の遺伝的状況を把握する必要がある。本研究の調査地である東谷山は愛知県名古屋市と瀬戸市の境界に位置する都市近郊林であり、道路、鉄道、河川等によって周辺の森林と分断されている。調査地では、これまでニホンリスの種子分散、行動圏、生息環境の研究が行われてきたが^{3),4)}、遺伝分析は行われてきていない。

野生哺乳類の遺伝学的調査では、マイクロサテライトDNAによる分析が行われてきているが、

組織や血液以外の体毛などのサンプルではDNA量が少なく増幅率が低いために、分析手法が確立されていない。しかしながら、生きた野生動物を対象とした組織や血液の採取は個体に対して負荷をかける可能性が高く、また研究者にとっても採取の技術と経験が必要になる。そのため、個体に負荷をかけない非侵襲的かつ簡便な方法で採取したサンプルを用いた遺伝的分析の手法の確立が必要である。

本研究の目的は、東谷山で採取したニホンリス個体からの体毛を用いて、(1) マイクロサテライトDNAの効率的な分析方法の改良を行うこと、(2) 個体群の遺伝的状況を把握することである。

方法

1. 調査地と体毛サンプル採取

調査地である東谷山は、愛知県名古屋市守山区と瀬戸市の境界に位置する標高198mの名古屋市

最高峰の山である。植生はツブラジイ (*Castanopsis cuspidata*) やスギ (*Cryptomeria japonica*) などが優占する森林であり、尾根周辺にはアカマツ (*Pinus densiflora*)、麓にはオニグルミ (*Juglans mandshurica var. sachalinensis*) が生育している。1998年より地元ボランティア団体の守山リス研究会による保全活動によって、毎週8箇所の給餌台で合計640個のオニグルミが給餌されている。

DNA分析に用いたサンプルは、調査地内に設置されている給餌台のかご罫を用いて、2021年から2022年に捕獲された10個体の毛根を含む体毛である。捕獲された個体の胴体からピンセットで引き抜いて1.5mlチューブ半分ほどの量を採取した。サンプルはDNA抽出を行うまで1.5mlチューブに入れて冷凍保存した。

2. 体毛を用いたDNA分析

DNA抽出はISOHAIRマニュアルに沿って実行したが、マニュアル通り体毛を4~5mmに切るとインキュベートをしても完全に溶解せず、その後のプロトコルでDNA抽出液に体毛(タンパク質)が混入してしまうことが多くあった。そこで、体毛サイズを約0.1mmに短くすることで、インキュベート時間を短縮しDNA抽出液の純度を上げることができるかどうかを調べた。

抽出された各サンプルは、先行研究⁶⁾によって開発されたマイクロサテライトDNA7領域(表1)を増幅させた。この研究で示された方法に従って、①変性：96℃30秒、②アニーリング：60℃

60秒、③伸長：72℃30秒、①~③を30サイクル行った後、④インキュベート：72℃10分の手順で行ったが、増幅することができなかった。そこで、PCRの時間条件とサイクル数を、①変性：96℃45秒、②アニーリング：60℃45秒、③伸長：72℃60秒、①~③を40サイクル行った後、④インキュベート：72℃10分と手順の変更を行うことで、増幅率を上げることができるか調べた。

ISOHAIRマニュアルには、毛幹は死細胞であり毛根に比べて劣化が激しいため、DNAの含有量は毛幹より毛根の方が多いと記されている。そこで、毛根の有無によるDNA増幅量の比較を行うために、2個体から採取した体毛を使用して、体毛をハサミで切り取った「毛根なしサンプル」と、ピンセットで引き抜いた「毛根ありサンプル」を採取した。それぞれの体毛からDNAを抽出し、同時にPCRでDNAの増幅を行った。

その後のDNAの精製にはQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を使用し、そのマニュアル (Quick-Start Protocol・QIAGEN) に従って操作を行った。精製したDNAのシーケンス解析は、FASMACに依頼し、解析データをBioEditを使用して確認した。

結果と考察

1. 体毛を用いたDNA分析の改良

DNA抽出において、体毛の長さを約0.1mmに短くすることで、インキュベート時の溶解時間を短縮することができた。今回使用したISOHAIR

表1 本実験で使用したニホンリスのSSRマーカー (Shibata 2003)

遺伝子座	リピートモチーフ	対立遺伝子サイズ	対立遺伝子数	ヘテロ接合度の観察値(H _o)	ヘテロ接合度の期待値(H _e)
Lis 1	(TG) ₇	180-182	2	0.60	0.42
Lis 2	(TG) ₄ CA(TG) ₅	134-138	3	0.50	0.63
Lis 3	(GT) ₁₁	140-160	6	0.50	0.64
Lis 4	(GT) ₁₂	170-178	3	0.41	0.22
Lis 12	(CT) ₂₁	155-211	6	0.50	0.75
Lis 16	(GT) ₇ (GC) ₈	194-196	3	0.30	0.41
Lis 20	(CCAGG) ₃ (GGCAGG)(GGC	143-147	4	0.20	0.58

は、ヒトの体毛を対象として作成されている。マニュアルによると、ヒトの体毛の場合は、2回目のインキュベートで体毛が溶解するまでの時間が5~10分と記されているが、リスの体毛では溶解するまで3~5時間を要した。そのため、体毛の混入を防止するためにも、使用する体サイズは短くして溶解時間を短縮するのが良いと考えられる。

PCRの時間条件とサイクル数を変更することで、増幅率を約50%に上げることができたが、増幅に成功したサンプルの約2割に非特異的増幅が見られた。先行研究⁶⁾のPCR条件では増幅しなかったのは、本研究で使用した体毛では、DNA抽出量が非常に少なかったためだと考えられる。PCRの時間を長くし、サイクル数を増やすことで、増幅率を上げることができたが、その一方で非特異的増幅も増えてしまうため、40回を超える回数は好ましくないだろう。

2個体間で体毛の毛根の有無によるDNA増幅量を比較したところ、毛根の有無よりも個体差が大きいたことが分かった。ヒトに比べてリスの毛根部は小さいため、毛根部の有無に結果が左右されなかったのだと考えられる。そのため、巣や罠に残った体毛を使用する場合も、新鮮であれば毛根が含まれていなくても問題ないであろう。ニホンリス

には年に2回の換毛期（春・秋）があるため、換毛した後の体毛を採取することができればDNA増幅量が上がるかもしれない。

3. 東谷山個体群の遺伝的状況

10個体のマイクロサテライトDNA7領域を調べたところ、全ての個体がほとんど同じ遺伝子型を持っていた（表2）。他個体と異なる対立遺伝子の組み合わせを持っていたのは、F1のLis3とF4・F8・M4のLis16のみであった。また、Lis1、Lis4、Lis12において解析できた全ての個体と同じリピート数のヘテロ接合体であり、Lis2、Lis20においては全ての個体と同じホモ接合体であった。

各マイクロサテライトDNAマーカーの対立遺伝子数を先行研究⁶⁾と比較すると、東谷山個体群は7領域中5領域で先行研究よりも対立遺伝子数が少なかった。対立遺伝子数の平均値は東谷山個体群で2.00(s=0.93)、先行研究では3.86(s=1.46)であり、東谷山個体群の対立遺伝子数は先行研究より有意に少なかった（U=6.5, P<0.05）。

本研究においては、ほとんどの遺伝子座で対立遺伝子数が1~2であったことから、東谷山個体群全体の遺伝子の単一化が進んでいる可能性が高く、遺伝子多様性の顕著な低下が生じていること

表2 ニホンリスの東谷山個体群におけるSSR解析結果

No.	性別	体重	初認年	SSRマーカー														
				Lis1		Lis2		Lis3		Lis4		Lis12		Lis16		Lis20		
F1	メス	270	2019	16	18	20	20	26	26	22	24			32	34B	28	28	
F4	メス	255	2020	16	18	20	20	26	28*	22	24	36	48	30	32	28	28	
F6	メス	290	2021	16	18	20	20			22	24			32	34B	28	28	
F7	メス	280	2021			20	20			22	24	36	48	32	34B			
F8	メス	250	2021			20	20	26	28	22	24			32	34A	28	28	
M4	オス	255	2020	16	18	20	20	26	28*	22	24			32	34A	28	28	
M5	オス	290	2020			20	20									28	28	
M7	オス	255	2021	16	18	20	20											
M8	オス	225	2021	16	18	20	20										28	28
M9	オス		2022			20	20	26	28	22	24			32	34B	28	28	
対立遺伝子数				2		1		2		2		2		4		1		

*一部に置換あり

が明らかになった。これは、分断化にともなう個体群の孤立・縮小により遺伝的浮動の効果が強く働いた結果であると考えられる。また、Lis1、4、12において解析できた全ての個体が同じリピート数のヘテロ接合体であった。このような結果が生じるためには、全ての子の両親が異なるリピート数のホモ接合体同士でなくてはならないことから、個体間同士で自由交配が行われていない可能性が高い。F1は初認年からの推定年齢が3～4歳の高齢のメスであり、保全団体によって設置されている給餌台利用の60%以上を占めていたことが行動調査から分かっている⁴⁾。F1のLis3、Lis20がホモ接合体であること、他の遺伝子座でもいずれかの対立遺伝子を他の個体が保有していることから、これらの個体の母親である可能性が高い。

調査地である東谷山個体群が孤立した要因として、東側に位置する国道と河川が考えられる。ニホンリスは樹上性であるために、地上における移動能力が低いことが推測される。東谷山と北東側の森林との間を分断する国道と河川の幅は合わせて約20-25mであり、ニホンリスが移動するには大きな障壁になっている可能性が高い。さらに調査地の南西側には住宅地など開発された土地が広がっており、分断化した森林・緑地間の移動は困難だと推測される。東谷山では約20年前からの給餌活動によって、ニホンリスの個体数は増加しているが、現在のように遺伝的多様性が低い状態では個体群は存続できない可能性が高い。分断化した都市林におけるニホンリスの保全のために、生息地間での個体の移動が可能になるようにコリドーを設置したり、場合によっては他の個体群からの人為的な移入を行っていく必要があるだろ

う。また、分断化した森林・緑地におけるニホンリスの遺伝的な構造を把握するために、東谷山個体群での継続的な調査を行ってだけでなく、周辺個体群との遺伝的な違いを調べていく必要がある。

謝辞

環境動物学研究室、守山リス研究会の皆様には、現地調査のご協力をいただき、大割部神社の氏子には、神社管内での調査のご許可をいただいた。リスの捕獲は、愛知県環境政策課の許可と名城大学動物実験委員会の承認を受けて行った。本研究は、名城大学研究基盤支援事業費の援助を受けて行った。

引用文献

- 1) Kataoka T & Tamura N (2005) Effects of habitat fragmentation on the presence of Japanese squirrels, *Sciurus lis*, in suburban forests. *Mammal Study* 30: 131-137.
- 2) 環境省 (2020) レッドデータブック2014 絶滅のおそれのある日本の野生生物. 環境省, 東京.
- 3) 大竹朝香・北山克己・日野輝明 (2017) ニホンリス (*Sciurus lis*) の食物運搬に対する重さの効果. *哺乳類科学* 57: 307-313.
- 4) Ishikawa S, Kohno S, Mizuno Y, Masuyama R, Kitayama K and Hino T (in press) Influences of weather conditions, natural food abundance, and the spacing of feeders on the feeding-table use by Japanese Squirrels *Sciurus lis* in a suburban forest. *Mammal study*.
- 5) 渡邊敦史 (2004) マイクロサテライトマーカーの開発と利用. *森林科学* 41: 44-46.
- 6) Shibata K., Bando K., Yaekashiwa N., Matsuzaka T., & Tamate H. (2003) A simple method for isolation of microsatellites from the Japanese squirrel, *Sciurus lis*, without constructing a genomic library. *Molecular Ecology Notes* 3: 657-658.