

ツシマヤマネコの糞等の DNA 分析 (2005-2015)

吉川 亮、斎藤 佳子、三浦 佳奈

Fecal and Tissue DNA Analysis of Tsushima leopard cats (2005-2015)

Akira YOSHIKAWA, Yoshiko SAITO and Kana MIURA

Key words : Tsushima leopard cats, fecal DNA analysis, Identification of species and sex, Microsatellite, Diversity

キーワード : ツシマヤマネコ、糞のDNA分析、動物種と雌雄の判別、マイクロサテライト、多様性

はじめに

ツシマヤマネコ (学名: *Prionailurus bengalensis euptilurus*) は、対馬にのみ生息する野生のネコで、ベンガルヤマネコの亜種とされている¹⁾。ツシマヤマネコの推定生息頭数は、1960年代の調査では250~300頭¹⁾であったが、2010年代前半の調査では70頭又は100頭¹⁾で、環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類(ごく近い将来における野生での絶滅の危険性が極めて高いもの)に選定されている。ツシマヤマネコの生息阻害要因としては、環境変化による生息地の減少、交通事故、錯誤捕獲、イヌによる咬傷、イエネコ由来の感染症などが挙げられている¹⁾。

ツシマヤマネコは1994年に絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律に基づく国内希少野生動植物種に指定された。1995年にはツシマヤマネコ保護増殖事業計画が策定され、ツシマヤマネコが自然状態で安定的に存続できる状態になることを目指し、生息調査、生息環境の改善、飼育下での繁殖、普及啓発など様々な取り組みが行われている¹⁾(表1)。

長崎県は、環境省からの委託を受けてツシマヤマネコの生息状況の動向を的確に把握するための痕跡調査を行っている。痕跡調査は、あらかじめ設定した調査ルート(60ルート程度)をおよそ1ヶ月に1回踏査し、ツシマヤマネコの痕跡(主に糞)を調査するものである。糞がツシマヤマネコのものであるかどうかは、糞の大きさや内容物により判断しているが、より信頼性の高い生息情報とするため、発見された糞の一部についてはDNA

分析を行い、ツシマヤマネコの糞であるかを確認している。さらに、ツシマヤマネコの糞であると判別されたものについては、性判別を実施している。

このような糞のDNA分析による動物種の判別及び性判別は、2002年度から、環境省からの依頼を受け北海道大学が実施していた。2006年度からは、北海道大学から技術的なアドバイスをうけた当センターが、環境省から委託を受けて分析を実施している。さらに、2014年度からは、北海道大学において開発された手法を用いて個体識別も開始しており、今後、データの蓄積が進むことにより、ツシマヤマネコの生息域内での動向や遺伝的關係等について知見が得られることが期待できる。

今回、2006年度(2005年度に採取されたサンプルを含む)から2015年度までに実施した分析結果を取りまとめたので報告する。

表1 ツシマヤマネコ保護の取り組み(環境省)年

| | |
|------|---|
| 1985 | 生息環境等調査(第一次調査)(~1987年) |
| 1994 | 国内希少野生動植物種に指定 第二次生息特別調査(第二次調査)(~1996年) |
| 1995 | 保護増殖事業計画策定 |
| 1997 | 対馬野生生物保護センター開所 |
| 2002 | 生息調査(第三次調査)(~2004年) |
| 2004 | 再導入基本構想発表 |
| 2010 | 生息調査(第四次調査)(~2012年) |
| 2013 | ツシマヤマネコ野生順化ステーション開所 |

調査方法

1 動物種の判別

(1) 材料

環境省からの委託を受けて分析を行うことになった2005年から2015年3月までに環境省対馬野生生物保護センターおよび対馬振興局から当センターへ送付された糞サンプル計2,039検体(年度別のサンプル数は表2参照)を被検材料とした。

(2) 方法

ミトコンドリア DNA の cytochrome b 遺伝子をターゲットとした primer sets によりツシマヤマネコ (FE1、FE2)、イエネコ (FC1、FC2)、テン (MM1、MM2)、イタチ (MS1、MS2) およびイヌ (Dog) の特異的遺伝子を増幅する PCR を用いた Kurose らの報告²⁾に準じて行った。

分析にあたって、使用機器および試薬等が異なるため、PCR のアニーリング温度の検討を行った結果、各 primer sets のアニーリング温度は FE1、FE2、FC1、MS1、MM1 および MM2 で 58 °C、MS2 で 52 °C、Dog で 55 °C が特異性、収量の観点から最適と判断した(図1)。また、FC2 は、他の動物種の DNA でも増幅産物が確認されるため、当センターでは使用しないこととした。

(3) 判定

各検体で、すべての primer sets について PCR をかけた後、電気泳動にて増幅産物が確認できた primer sets を陽性とし、糞をした動物種と判別した。

PCR は検体ごとに 3~5 回繰り返し分析を行い、コンタミネーションがないこと、および再現性があることを確認した。すべての動物種で遺伝子が検出されなかった場合は、再度 DNA を抽出し、再分析を行った。また、複数の動物種の DNA が検出される場合は、再分析もしくは DNA を再抽出するなどによりコンタミネーションがないことを確認した。再分析後も複数の動物種が検出された場合は、両方の動物種の糞と判別した。

特にテンは、他の動物の糞上に糞をすることが知られており、このような検体を数例分析した結果、2種類の動物種(テンとツシマヤマネコなど)が検出されたことから複数の動物種が検出される可能性があることが判明した。

2 雌雄の判別

(1) 材料

動物種を決定後、ツシマヤマネコの DNA が検出

された糞サンプル(動物種の判別に使用した DNA)を用いた(年度別のサンプル数は表3参照)。

(2) 方法

核 DNA をターゲットとした primer sets (XY-1、XY-2)により X 染色体および Y 染色体の特異的 DNA 領域を増幅する Semi-Nested PCR を用いた北海道大学の増田教授らの分析方法に準じて行った。

分析にあたって、使用機器および試薬等が異なるため、PCR のアニーリング温度の検討を行った結果、両 primer sets のアニーリング温度は 55 °C が特異性、収量の観点から最適と判断した(図2)。

(3) 判定

各検体で、Semi-Nested PCR をかけた後、電気泳動にて増幅産物が確認できた場合を陽性とし、増幅産物の大きさ等から雌雄を判別した。また、シークエンサーを活用し、増幅産物の塩基配列を決定した後、BLAST 検索により X 染色体および Y 染色体上の DNA であることを確認し、雌雄を判別することも併用した。判定が困難な場合は、再度 DNA を抽出し、再分析を行った。

PCR は検体ごとに 3~10 回繰り返し分析を行い、コンタミネーションがないこと、および再現性があることを確認した。

3 個体識別

(1) 材料

環境省からの委託を受けて分析を行うことになった2014年に対馬市役所にて採取された21検体および下島、舟志地区周辺で採取された29検体の計50検体の糞サンプル、2015年に対馬市役所にて採取された23検体および下島、舟志地区周辺で採取された27検体の計50検体の糞サンプルとした。

(2) 方法

ツシマヤマネコの集団の多様性をみるために Menotti-Raymond & O'Brien³⁾によって報告された Microsatellite をマーカーにしてその遺伝子型を決定した。

(3) 判定

設定した遺伝子座を可能な限り決定し(3~10 回程繰り返し分析を行い、再現性のある結果のみを採用)、各遺伝子座のアリルの組み合わせにより個体識別を行うこととしているが、現状では、サンプル数が少なく、限られた地域のみでの調査であることから、データの蓄積を主眼において実施した。

< primer sets > ツシマヤマネコ (FE1、FE2)、イエネコ (FC1)、イタチ (MS1、MS2)、テン (MM1、MM2)、イヌ (Dog)

< PCR products (bp) > FE1:316、FE2:230、FC1:212、MS1・MM1:317、MS2・MM2:328、Dog:258

< 組成 >

| | volume | final conc. |
|----------------------------|---------|-------------|
| 10× EX Taq Buffer | 2.0 μL | |
| dNTP mixture (2.5 mM each) | 1.6 μL | |
| Forward primer (25 μM) | 0.2 μL | 0.25 μM |
| Reverse primer (25 μM) | 0.2 μL | 0.25 μM |
| BSA (20mg/ml) | 0.4 μL | |
| DW (DNase/RNase free) | 14.0 μL | |
| TaKaRa EX Taq HS | 0.1 μL | |
| extract DNA | 1.5 μL | |
| total | 20 μL | |

< 反応条件 >

| temp. | time | cycles |
|-------|---------|--------|
| 94°C | 3 min. | 1 |
| 94°C | 30 sec. | 35 |
| 58°C | 30 sec. | |
| 72°C | 1 min. | |
| 72°C | 10 min. | 1 |
| 4°C | ∞ | 1 |

*:MS2 (52 °C)、Dog (55 °C)

図 1 動物種の判別

① 1次増幅反応 (1st PCR) < primer set > XY-1

< 組成 >

| | volume | final conc. |
|----------------------------|---------|-------------|
| 10× EX Taq Buffer | 2.0 μL | |
| dNTP mixture (2.5 mM each) | 1.6 μL | |
| Forward primer (25 μM) | 0.2 μL | 0.25 μM |
| Reverse primer (25 μM) | 0.2 μL | 0.25 μM |
| BSA (20mg/ml) | 0.4 μL | |
| DW (DNase/RNase free) | 10.5 μL | |
| TaKaRa EX Taq HS | 0.1 μL | |
| extract DNA | 5.0 μL | |
| Total | 20 μL | |

< 反応条件 >

| temp. | time | cycles |
|-------|---------|--------|
| 94°C | 3 min. | 1 |
| 94°C | 30 sec. | 45 |
| 55°C | 30 sec. | |
| 72°C | 1 min. | |
| 72°C | 10 min. | 1 |
| 4°C | ∞ | 1 |

② 2次増幅反応 (2nd PCR) < primer set > XY-2

< 組成 >

| | volume | final conc. |
|------------------------------|---------|-------------|
| 10× EX Taq Buffer | 2.0 μL | |
| dNTP mixture (2.5 mM each) | 1.6 μL | |
| Forward primer (25μM) | 0.2 μL | 0.25 μM |
| Reverse primer (25μM) | 0.2 μL | 0.25 μM |
| DW (DNase/RNase free) | 14.4 μL | |
| TaKaRa EX Taq HS | 0.1 μL | |
| 1 st PCR products | 1.5 μL | |
| total | 20 μL | |

< 反応条件 >

| temp. | time | cycles |
|-------|---------|--------|
| 94°C | 3 min. | 1 |
| 94°C | 30 sec. | 30 |
| 55°C | 30 sec. | |
| 72°C | 1 min. | |
| 72°C | 10 min. | 1 |
| 4°C | ∞ | 1 |

図 2 雌雄の判別

表 2 糞の DNA 分析結果 (2005~2015 年)

| | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | total |
|--------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| ヤマネコ | 7 31.8% | 81 52.9% | 56 37.3% | 87 60.8% | 80 39.4% | 60 39.7% | 248 68.7% | 234 64.6% | 63 75.0% | 118 69.8% | 175 72.6% | 1,209 59.3% |
| ヤマネコ イエネコ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ヤマネコ イタチ | 0 | 0 | 2 1.3% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 0.1% |
| ヤマネコ テン | 0 | 0 | 2 1.3% | 2 1.4% | 0 | 1 0.7% | 11 3.0% | 8 2.2% | 2 2.4% | 5 3.0% | 4 1.7% | 35 1.7% |
| ヤマネコ イヌ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| イエネコ | 9 40.9% | 18 11.8% | 17 11.3% | 20 14.0% | 30 14.8% | 15 9.9% | 47 13.0% | 64 17.7% | 3 3.6% | 4 2.4% | 9 3.7% | 236 11.6% |
| イエネコ テン | 0 | 0 | 0 | 1 0.7% | 1 0.5% | 2 1.3% | 3 0.8% | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 0.3% |
| イタチ | 0 | 2 1.3% | 1 0.7% | 1 0.7% | 4 2.0% | 2 1.3% | 0 | 0 | 0 | 2 1.2% | 0 | 12 0.6% |
| テン | 1 4.5% | 32 20.9% | 65 43.3% | 30 21.0% | 74 36.5% | 57 37.7% | 24 6.6% | 29 8.0% | 12 14.3% | 34 20.1% | 44 18.3% | 402 19.7% |
| テン イヌ | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 0.5% | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 0.6% | 0 | 2 0.1% |
| イヌ | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 3.4% | 11 7.3% | 6 1.7% | 15 4.1% | 1 1.2% | 3 1.8% | 4 1.7% | 47 2.3% |
| 不明 | 5 22.7% | 20 13.1% | 7 4.7% | 2 1.4% | 6 3.0% | 3 2.0% | 22 6.1% | 12 3.3% | 3 3.6% | 2 1.2% | 5 2.1% | 87 4.3% |
| total | 22 100% | 153 100% | 150 100% | 143 100% | 203 100% | 151 100% | 361 100% | 362 100% | 84 100% | 169 100% | 241 100% | 2,039 100% |
| 種別別率 | 17/22 =77.3% | 133/153 =86.9% | 143/150 =95.3% | 141/143 =98.6% | 197/203 =97.0% | 148/151 =98.0% | 339/361 =93.9% | 350/362 =96.7% | 81/84 =96.4% | 167/169 =98.8% | 236/241 =97.9% | 1,952/2,039 =95.7% |

表3 DNA分析による性判別の結果(2005~2015年)

| | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | total |
|-------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|---------------------|
| ♂ | 5 71.4% | 20 24.7% | 22 36.7% | 14 15.7% | 13 16.3% | 6 9.8% | 35 13.5% | 31 12.8% | 13 20.0% | 41 33.3% | 51 28.5% | 251 20.1% |
| ♀ | 1 14.3% | 9 11.1% | 7 11.6% | 24 27.0% | 15 18.7% | 11 18.0% | 32 12.4% | 52 21.5% | 24 36.9% | 34 27.6% | 44 24.6% | 253 20.3% |
| 不明 | 1 14.3% | 52 64.2% | 31 51.7% | 51 57.3% | 52 65.0% | 44 72.1% | 192 74.1% | 159 65.7% | 28 43.1% | 48 39.0% | 84 46.9% | 742 59.6% |
| total | 7 100% | 81 100% | 60 100% | 89 100% | 80 100% | 61 100% | 259 100% | 242 100% | 65 100% | 123 100% | 179 100% | 1246 100% |
| 性判別率 | 6/7 =85.7% | 29/81 =35.8% | 29/60 =48.3% | 38/89 =42.7% | 28/80 =35.0% | 17/61 =27.9% | 67/259 =25.9% | 83/242 =34.3% | 37/65 =56.9% | 75/123 =61.0% | 95/179 =53.1% | 504/1,246 =40.4% |

4 交通事故および咬傷事故等のDNA分析

(1) 材料

2011年からは交通事故被害動物(動物種不明)1検体および咬傷部位が確認されたツシマヤマネコの死亡個体10事例49検体(年度別の詳細は表4参照)について、交通事故の場合は、被害動物がツシマヤマネコであるかどうかを、咬傷事故の場合は、咬傷相手の動物種を明らかにするために、環境省からの委託を受けてDNA分析を行った。

交通事故の場合は、被害動物の組織片を、咬傷事故の場合は、咬傷部位を含むツシマヤマネコの組織片や口腔内残毛等を被検サンプルとした。

(2) 方法

交通事故被害動物の組織片及び咬傷部位を含むツシマヤマネコの組織片等より抽出したDNAを用いて、動物種の判別に使用したprimer setsにより動物種の判別を行った。咬傷事故の場合、可能な限り多くの被検サンプルを用いてDNA分析を行った。

(3) 判定

動物種の判別と同様に行い、交通事故では、検出した動物種を交通事故にあった動物とし、咬傷事故の場合は、ヤマネコ以外の動物が検出された場合は、その動物を咬傷相手の動物種と特定し、検出されない場合は不明とした。

表4 交通事故および咬傷事故におけるDNA分析結果(2011~2015年)

| | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | Total |
|-------|------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 咬傷事故 | 事例1 | イヌ 6 | 不明 3 | イエネコ 5 | イエネコ 2 | 49 |
| | 事例2 | イエネコ 2 | イエネコ 2 | | | |
| | 事例3 | 不明 2 | テン 15 | | | |
| | 事例4 | イエネコ 6 | テン 6 | | | |
| 交通事故 | 事例1 | イエネコ 1 | | | | 1 |
| total | 17 | 26 | 5 | 2 | 0 | 50 |

調査結果及び考察

1 動物種の判別結果

過去11年間(2005~2015年)の分析結果を表2に示す。

DNA分析を開始した当初、動物種を特定できた割合(動物種の判別率)は77.3%であったが、年々改善され、2007年以降は95%前後の判別率となった。

判別率向上の理由としては、DNA分析に従事する職員の技術向上、分析方法の改善ならびに平準化(マニュアル化)および多検体処理方法の確立などが考えら

れた。

送付されたサンプルがツシマヤマネコだった割合は、採取年によりバラツキがあるが、ここ数年は70%前後であった。

このバラツキの原因については、サンプル採取者の交代、分析サンプルの選定方針など種々の要因が考えられ、特定の要因のみではなく、複数の要因の積み重なった結果と考えられた。

2 雌雄の判別結果

過去11年間(2005~2015年)の分析結果を表3に

示す。

北海道大学では、3~4 割程度の雌雄判別率であり、当センターも同様(40.4%)の結果であった。

2013 年以降は、判別率が 50%を超えており、繰り返し分析を行ったことと、シーケンサーを併用した成果と考えられる。

3 個体識別結果

Microsatellite による個体識別は、痕跡調査で得られたサンプルであるため DNA の状態が悪いものも含まれ、判定の難しさがあるものの、当センターでも対応可能であった。

2014 年は 50 検体中 47 検体(94%)、2015 年は 50 検体中 44 検体(88%)について、概ね遺伝子座を決定することができた。

現在、環境省対馬野生生物保護センターにて当該分析結果の蓄積、整理を行っている。

4 交通事故および咬傷事故等の DNA 分析結果

過去 5 年間(2011~2015 年)の分析結果を表 4 に示す。

交通事故のサンプルは、イエネコであった。

咬傷事故 10 事例のうち 8 事例で咬傷相手が特定できた。内訳は、イエネコが 5 事例、テンが 2 事例およびイヌが 1 事例であった。

ま と め

- 1 2,039 サンプルを分析した結果、1,952 サンプルについて動物種を判別できた(判別率 95.7%)。
- 2 ツシマヤマネコと判別されたサンプルは、1,209 サンプル(59.3%)であった。他の動物と併せて判別されたサンプルを合わせると 1,246 サンプル(61.1%)であった。
- 3 動物種の判別によりツシマヤマネコと判明した 1,246 サンプルのうち 504(オス:251、メス:253)サンプルについて雌雄判別ができた(40.4%)。
- 4 近年、分析方法の改善により雌雄判別の割合が 50%を超えている。
- 5 当センターでも Microsatellite による個体識別は、実施可能であった。
- 6 2014~2015 年の 2 年間で実施した個体識別において、100 検体中 91 検体(91%)で遺伝子座を概ね決定できた。
- 7 糞の DNA 分析を応用した咬傷部組織片等の動物種判別は、概ね分析可能であった。

謝 辞

ツシマヤマネコの糞の DNA 分析に関して、技術的アドバイスをくれた北海道大学大学院理学研究院生物科学部門多様性生物学分野の増田隆一教授ならびに研究室の皆様に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 対馬野生生物保護センターホームページ
- 2) Kurose N., Masuda R. and Tataru M.: Fecal DNA Analysis for Identifying Species and Sex of Sympatric Carnivores: A Noninvasive Method for Conservation on the Tsushima Islands, Japan, *Journal of Heredity*, 96 (6), 688-697, (2005)
- 3) Menotti-Raymond M.A. and O'Brien S.J.: Evolutionary Conservation of Ten Microsatellite Loci in Four Species of Felidae. *Journal of Heredity*, 86 (4), 319-322, (1995)