

DNA を用いた生息地分断影響予測モデルに関する研究

Studies on the impact prediction model of habitat fragmentation using fecal DNA

(研究期間 平成 20～22 年度)

環境研究部 緑化生態研究室
Environment Department
Landscape and Ecology Division

室長 松江 正彦
Head Masahiko MATSUE
研究官 園田 陽一
Researcher Yoichi SONODA

In order to develop DNA technique for road environmental assessment, we identified Japanese hare (*Lepus brachyurus*) individuals and sex using fecal DNA. A study area was both sides on the Route 289 road kashi in Fukushima prefecture. We sampled 96 fecal pellets on the tracks of individuals and identified 13 individual hares (6 males and 7 females) were identified. As a result, it is estimated that two hares crossed under the Karasawa bridge.

[研究目的及び経緯]

道路事業における野生哺乳類の環境影響評価では、目視または痕跡調査によって、事業エリアの周辺部に生息する動物種をリストアップする。その結果、重要な種あるいは注目種が確認された場合には分布範囲を推定し、計画路線が移動経路を横断すると予測される場合には道路敷地内への侵入防止柵と橋梁、ボックス等の横断施設が設置が検討される。

しかし、分布範囲や移動経路は、痕跡調査と一部ラジオテレメトリー調査により得られる個体レベルの行動圏や移動パターンの断片的なデータから推定しており、簡易にかつ高精度の調査手法の開発が求められている。さらに道路による分断において、どの程度の個体及び個体群間の交流が行われれば、保全目標とする種が存続可能であるのかといった予測評価手法の開発も求められている。

近年では、野生動物の糞や獣毛からの微量な DNA を抽出し、個体識別による生息数の推定や個体群間の遺伝的交流を予測・評価する手法が確立されつつある。この方法は、直接観察や捕獲を伴う行動圏調査と比較すると、サンプリングが容易であり、DNA を標識として利用できるため、半永久的な個体の追跡が可能であるといった利点がある。

本研究では、DNA 分析により調査エリア内に生息するニホンノウサギ *Lepus brachyurus* の個体数、性比の把握や個体ごとの行動パターンの把握、さらには生息地の分断化に伴うノウサギ個体群への影響を解明するために、DNA 分析がどこまで活用できるかを探り、道路事業における環境影響評価技術手法として、DNA 分

析を活用した新たな技術手法の方向性等を明らかにすることを目的とした。

[研究内容]

(1) ノウサギの糞の回収

福島県南会津郡下郷町の国道 289 号線甲子道路周辺周囲約 1km において、ノウサギの糞抽出 DNA 用のサンプルを 2009 年 1 月 6 日～8 日にかけて採取した。なるべく新鮮な糞を回収することに努め、足跡上から新鮮な糞が見つからない場合には、やや古い糞を回収した。なお、甲子道路両側の平坦地においてノウサギの各個体の足跡をトレースし、雪表面にある糞を新鮮な糞とし、雪中に沈んでいる糞を古い糞とした。糞を回収する際に位置情報を GPS (Garmin 社製) により記録した。会津田島の気象データ (気象庁) によると 2009 年 1 月 3 日の午前ころまで降雪があり、その後の降雪が記録されていないことから、ノウサギの糞は 3 日午後～6 日の早朝に排泄された糞であることが推測される。

(2) 糞抽出 DNA による個体識別

ノウサギの糞 (全 96 検体) (写真 1) から DNA を抽出し (写真 2)、①mtDNA ハプロタイプの決定、②マイクロサテライトマーカー (sat5, sat12, sat13, sol8, sol130, sol133, sol144) による個体識別、③雌雄判別 (ZFX・ZFY 遺伝子および Sry 遺伝子) を行った。DNA 分析の方法は松木ら (2000, 2004) に従った。ただし、ノウサギの DNA 配列から D-Loop 領域の一部を増幅するためのプライマーは松木ら (2004) を参考に新たに設計した (表 1)。また、ハプロタイプの決定とマイクロサテライトによる個体識別、雌雄判別における PCR 反応条件は、Ampdirect Plus (島津製作所) を使用した調整方

法を採用した。

(3) ノウサギの道路横断施設の利用実態調査

道路横断施設に対するノウサギの利用状況を明らかにするために、2008年10月～2009年3月まで道路横断施設に赤外線センサーカメラ（Field note II；麻里府商事製）を設置し、施設を利用する野生哺乳類のモニタリングを行った。また、既存文献から過去の生息種を確認し、2008年10月24日、11月20日、2009年1月16日に糞、足跡、食痕による痕跡調査を行い、現在甲子道路周辺に生息している哺乳類の同定を行った。なお、カメラの設置施設はアーチカルバート2箇所、橋梁3箇所、600mm×600mmボックスカルバート1箇所とし、計6台のカメラを設置した（写真）。

(4) 糞抽出 DNA による個体識別結果による行動パターンの評価

GPSにより記録したノウサギの糞採取地点を個体識別の結果により分類し、行動パターンを視覚化した。道路両側で糞が発見された個体が利用したと考えられる横断施設について、カメラによる道路横断施設の利用状況調査とのDNAによる個体識別結果による行動パターンとの関係から考察を行った。

[研究成果]

(1) ノウサギの糞の回収

ノウサギの糞は個体の足跡上、餌場など91箇所にて回収を行った。餌場のように1箇所にて複数個体の足跡が混在し、糞が大量に散在している場合には、1箇



写真1 ノウサギの糞サンプル (一部)



写真2 抽出されたノウサギ糞 DNA サンプル

所から5個程度を1粒ずつ回収した。

(2) 糞抽出 DNA による個体識別

すべての糞サンプルから分析に十分な量と質のDNAが得られた。得られた塩基配列のうち、松木ら(2004)の解析領域に該当する347bpの配列を使用し、mtDNAのハプロタイプを分類した。分析を行った全96検体から計7種類のハプロタイプ(Hp01～Hp07)が検出された(表2)。そのうち、Hp02及びHp04は、複数の個体から確認された。さらに、7つのマイクロサテライトマーカー座について各対立遺伝子のサイズを調べた結果、全ての検体の全てのマーカー座でデータが得られた。これらのデータを解析した結果、全96検体から13個体を識別した。また、ZFX/ZFY遺伝子のPCR増幅産物を電気泳動した結果、すべての検体で目的のバンド(DNA断片)が検出され、さらにSry遺伝子のPCR産物を電気泳動した結果、32検体で目的のバンドが確認された。これを個体識別結果に当てはめると、識別された13個体のうち、雄は6個体、雌は7個体であることが明らかとなった。

(3) 道路横断施設におけるノウサギの利用状況

カメラでの道路横断施設の利用の結果はアーチカルバート1、柄沢橋においてノウサギの利用頻度が高かった(表3)。

(4) ノウサギの道路横断施設の利用実態

最も採集サンプル数が多かったのは個体番号No.6の21検体、最も少なかったのは個体番号No.11、No.12及びNo.13の1検体であった。図1に個体の分布を示した。その結果、No.1、No.4、No.5、No.6の4個体の横断が確認された。2個体(No.1とNo.5)は柄沢橋下を横断していることが推測された。No.4、No.6がどの横断施設を利用したのかは明確ではないが、カメラによる道路横断施設の利用状況調査の結果から、アーチカルバート1あるいは柄沢橋を利用しているものと推測される。

[成果の活用]

道路環境影響評価の技術手法の改定時にDNAを用いた影響評価手法として新たな提案を行う。

[参考文献]

- 1) 松木吏弓・矢竹一穂・梨本真(2000) DNA多型を利用したノウサギの個体識別. 電力中央研究所報告U00016、18pp.
- 2) 松木吏弓・矢竹一穂・竹内亨・阿部聖哉・石井孝・梨本真(2004) イヌワシを頂点とする生態系の解明-DNA解析を利用したノウサギの生息数推定法の開発. 電力中央研究所報告U03066、25pp.

表1 mtDNA 分析に使用したプライマーセット

遺伝子座名	プライマー名	塩基配列	得られるPCR産物の長さ
D-Loop領域	LepusDL678-F	5'-TGTAACCAGAAACGGAGAT-3'	678bp
	LepusDL678-R	5'-TGGGCTGATTAGTCATTAG-3'	

写真3 甲子道路（国土交通省直轄区間）における道路横断施設



表2 mtDNA ハプロタイプの分析結果

ハプロタイプ名	Hp01	Hp02	Hp03	Hp04	Hp05	Hp06	Hp07
検出された検体数	17	16	4	46	10	2	1
松木ら(2004)の分類	—	—	—	A07	—	—	A21

表3 赤外線センサーカメラによる横断施設の利用実態調査
 数字は、赤外線センサーカメラによる撮影回数を示す。

哺乳類種			周辺環境		道路横断施設					
目	科	種	既存資料*	生息痕跡	アーチカル パート1	柄沢橋	600×600 Box	アーチカル パート2	雨沼橋	観音川橋
モグラ	トガリネズミ	ジネズミ					4			
		トガリネズミ	○							
	モグラ	ヒミズ アズマモグラ	○ ○							
コウモリ		コウモリ目的一種					1			
サル	オナガザル	ニホンザル	○							
ウサギ	ウサギ	ノウサギ	○	○	31	22			4	1
		ニホンリス	○	○	1					
ネズミ	リス	ホンドモモンガ	○							
		ムササビ	○							
	ヤマネ	○								
	ネズミ	スミスネズミ	○							
		アカネズミ	○	○			43	1		
		ヒメネズミ	○							
ネコ	クマ	ツキノウグマ	○							
		キツネ	○	○						
	イヌ	タヌキ	○	○	6	6	2	2	3	5
		テン	○	○		8	18		2	2
	イタチ	イタチ	○	○	1	7	5		1	2
		ホンドオコジョ	○							
		アナグマ	○							
ジャコウネコ		ハクビシン	○		4	3	16	3	1	
ウシ	ウシ	ニホンカモシカ	○	○		1				
	シカ	ニホンジカ	○							

* H10年度甲子道路報告書

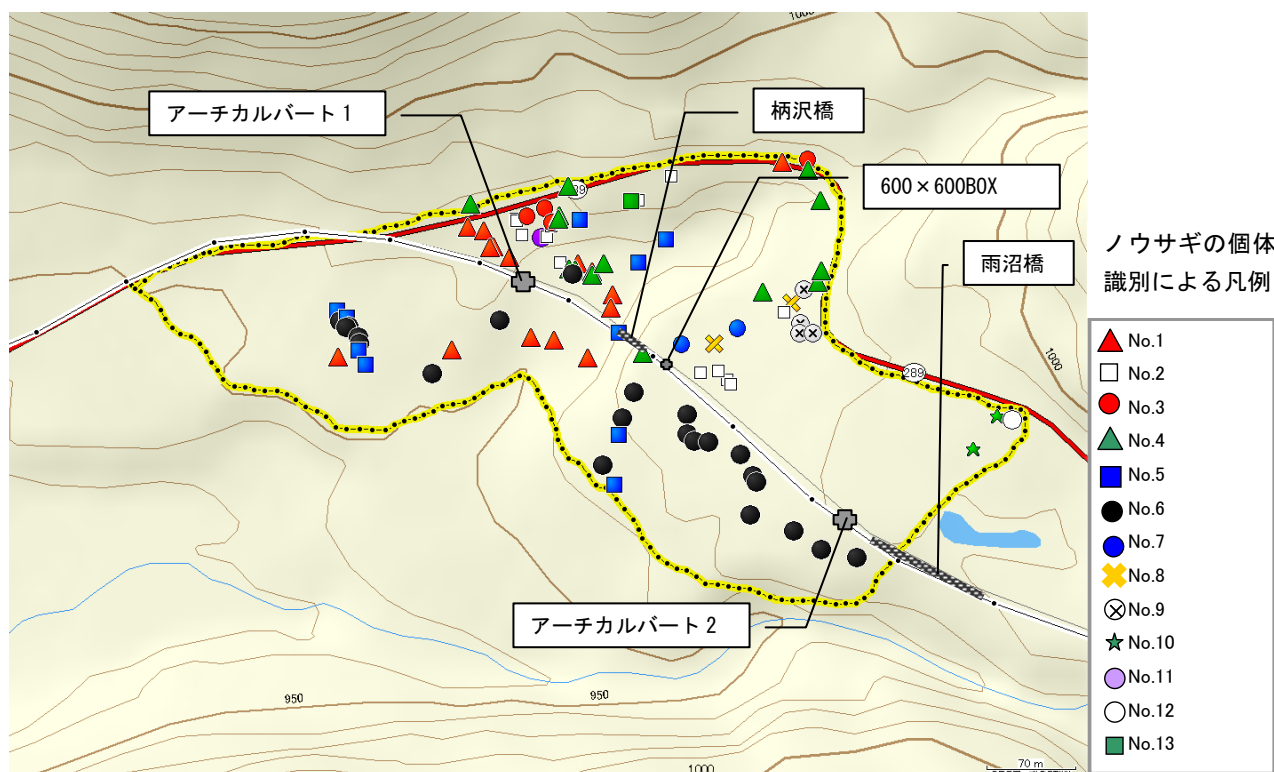


図1 ノウサギの個体識別の結果
 赤線は旧道、黄色点線は調査範囲、白色点線は甲子道路