

ニホンカモシカとニホンジカの糞・食痕 DNA を用いた識別法についての再検討： カモシカは畑を荒らす犯人なのか？

Faecal and feeding scar DNA based identification of Japanese serow and sika deer: Is Japanese serow the culprit of crop damage?

平野 莉帆（筑波大学 生物学類）

指導教員： Faulks Leanne Kay（筑波大学 生命環境系）

【背景および目的】

多様な野生動物が生息する日本では、近年、野生動物による農林業被害が大きな社会問題となっている。特にニホンカモシカ (*Capricornis crispus*, 以下、カモシカ) は本州・四国・九州に分布する日本固有種であり、過去には狩猟の影響で“幻の獣”と呼ばれ、1955 年以降特別天然記念物として保護されている。しかし近年では狩猟圧からの解放によって中部地方、東北地方の一部の地域では個体数が著しく増加し、自然植生や農林業への被害が顕在化している(環境省 2010)。ニホンジカ(*Cervus nippon*, 以下、シカ)もまた、個体数が著しく増加し、日本の植生や農林業に大きな影響を与えている。しかし、これら 2 種は生息地が重複し、足跡や糞の形状、食痕などが類似していることから、農林業被害地などで残された痕跡から種を特定することが困難なケースもある。例えば、日中も農地に滞在することの多いカモシカは、主に夜間に侵入するシカに比べ、農林業被害に“犯人”として疑われやすい。このようなカモシカの“濡れ衣疑惑”により過剰に捕殺申請されている可能性もある。類似する 2 種の痕跡から種を特定する手法を確立することができれば、これら農林業被害の原因を明確にし、より有効な被害対策を構築することができる。またカモシカおよびシカの分布動態の把握も可能となり、これら種の適切な個体数管理および保全を提案することもできる。

近年、分子生物学の発展により、糞や食痕などの非侵襲性のサンプルから抽出した微量 DNA からでも哺乳類種を特定する技術が確立されつつある。例えばカモシカおよびシカでは、Aikawa et al. (2015)が母性遺伝するミトコンドリア DNA(以下、mtDNA)を対象に、LAMP 法(Loop-Mediated Isothermal Amplification, Notomi et al. 2000)を用いて糞と食痕からの種識別方法を開発している。LAMP 法では、4~6 個のプライマーを用いることで、等温条件下で DNA を増幅させ、また蛍光色素を実験試薬に添加することで、DNA 増幅を蛍光色変化によって目視で確認することができる。そのため、LAMP 法は特別な技術や高価な実験装置、施設を必要としない。またこれにより、PCR 法にくらべ、専門的技術がなくてもより簡易的に、また短時間で行うことができ、研究機関だけでなく行政機関など野生動物管理の現場サイドにおいても有効的なツールになる(Aikawa et al. 2015)。本研究では、より高精度なシカ・カモシカ識別法の確立により、野生動物管理の現場サイドでより活用され、農林業被害の対策に応用されることを目的とし、1)糞と食痕の経過時間と検出精度の関係をさぐり、2)LAMP 法プライマーの追加開発およびその検出能力の評価を行い、3)食害の起きた農地での現場検証を行う。

【材料および方法】

長野市茶臼山動物園で飼育されているニホンカモシカとニホンジカを対象に、新鮮な糞を採取し、採取した糞は容器内のリタース上に放置し定期的にサンプリングし、糞 DNA から種識別の経時的変化評価に用いた。またダイズとキャベツは長野県内で食害

被害のある作物であるため、ダイズおよびキャベツの苗を、これらカモシカおよびシカに与え、食痕サンプルを得た。これら鉢植えの作物は食痕の付いたまま室内で栽培し、糞同様に定期的にサンプリングした。また長野県上田市菅平高原周辺でシカにより食害を受けたササも供試した。糞と食痕サンプルは冷凍保管し、Aikawa et al. (2015)の LAMP 法にもとづいて設計されたニホンジカ・カモシカ識別キット(株式会社ニッポンジーン)を用いて識別した。また LAMP 法プライマー再設計のために GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)に登録されているカモシカおよびシカの mtDNA の D-loop 領域およびシトクロム *b* 遺伝子領域の 17~34 個体の塩基配列情報を取得し、これら取得配列のアライメント等を BioEdit (Hall 1999)で行った。これら配列について SplitsTree4 (Huson and Bryant 2006)で Neighbor-Net (Bryant and Moulton 2004)を構築し、全ての配列の Consensus に最も近縁な配列を参照に PrimerExplorer V5(栄研化学株式会社)を用いてカモシカおよびシカの種内および種間変異も考慮して LAMP 法プライマーを設計した。設計したプライマーのカモシカおよびシカの識別能力については、両種の新鮮な糞から DNA を QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (株式会社キアゲン)により抽出し、濃度調整をした DNA 溶液を用いて評価した。

【結果および考察】

本研究で用いたカモシカおよびシカの糞および食痕由来の DNA サンプルからでもキットを用いて種識別できることを確認した。これまでに、カモシカではダイズについての食痕で摂食後 39 日目、シカでは 16 日目のサンプルでも識別可能であることを確認した。さらにシカにおいては 1 ヶ月以上経過していると考えられるササの葉の食痕からも識別可能であった。今後さらに長期間の調査も含めて、経時的変化についてより詳細な検証を行う。また識別可能であったサンプルの割合はシカの方が高かったが、これについては作物の摂食部位、状況などにより、食痕に残留する唾液量などが変化するため、より詳細な評価が必要である。現場検証については 2020 年冬~初春に長野県内のリンゴ農園での被害情報をもとに行う予定である。

追加プライマー開発ではカモシカの mtDNA の D-loop 領域およびシトクロム *b* 遺伝子領域の 2 領域からそれぞれ 1 セットずつプライマーを開発することができた。これら 2 つのプライマーセット両方でもカモシカおよびシカを識別することができることを確認できた。今後はこれら新しいプライマーセットも用いて、糞、食痕サンプルの状態、経時的変化、対象動物の mtDNA ハプロタイプ、DNA 濃度や LAMP 法反応時間条件なども考慮し、カモシカとシカの識別法について、詳細に検証する。これら一連の研究により、より明確なカモシカおよびシカの識別方法が確立できれば、“特別天然記念物”かつ“害獣”という 2 つの側面をもつカモシカをより適切に保護管理し、“濡れ衣疑惑”も解き明かすことができると期待できる。