

糞を用いたアムールヒョウとシベリアトラの遺伝的解析

環境起学専攻
博士後期課程一年 杉本 太郎
(指導教官 東 正剛)

研究背景と目的

ロシアに生息するアムールヒョウとシベリアトラは、森林伐採、山火事、密猟及び開発などによる影響を受け、現在絶滅の危機に瀕している。両種とも IUCN(国際自然保護連合)レッドリストにおいて絶滅危惧 IA 類 (Critically Endangered) に分類されている。

アムールヒョウは 1900 年代初頭、朝鮮半島、北東中国及びロシア極東一帯に広く生息していたが、生息地減少に伴い 1900 年代中頃にはその分布域が急激に縮小した。過去 10 年間に行われた調査では、個体数は 25 ~ 42 頭とされており、分布域も中国の一部とロシア沿海州南西部に限定されている。

シベリアトラは中国の一部及びロシア極東の沿海州、ハバロフスク州南部に生息が確認されている。19 世紀末頃より盛んに行われたハンティングや森林伐採、山火事などにより、個体数は 1930 年末には 20 ~ 30 頭にまで減少した。その後のハンティングの禁止や密猟の取り締まり強化などにより個体数は回復し、1995-96 年の調査では 415 ~ 476 頭と推定されている (Matyushkin et al. 1999)。

この二種に対する学術的研究が、過去にいくつか行われている。

アムールヒョウに対しては、1993 ~ 96 年にかけて、短期間ではあるがテレメトリー調査が行われている。また、この調査中に捕獲されたアムールヒョウ 7 個体の血液を用いて遺伝的多様性を調べる研究が行われた (Uphyrkina et al. 2002)。マイクロサテライト 25 遺伝子座を調べたこの研究により、遺伝的多様性が極めて低いことが示された。しかしわずか 7 個体の結果であるため、残された個体群の遺伝構造を反映していないことが考えられる。また、アムールヒョウの生態については未だ十分に研究されていない。

シベリアトラに対しては、アメリカとロシアの共同研究により、1992 年からテレメトリー調査が行われており、行動圏や食性など貴重な生態的特徴が明らかになった。また生息地で採集された糞から DNA を抽出し、遺伝的多様性を調べた研究が行われている (Russello et al. 2004)。ミトコンドリア DNA の Dloop 領域約 700bp の塩基配列を決定したこの研究は、ハプロタイプ多様度が低いことを明らかにし、過去に起きたボトルネックが遺伝的多様性の減少を招いたことを示した。

現在、この二種を絶滅から防ぐため、WWF、WCS(Wildlife Conservation Society)や多くの NGO が、一般市民に対する教育活動や密猟取締りグループの結成など様々な取り組みを行っている。またアムールヒョウについては、動物園個体の野生への再導入などを計画している。そこで本研究では、沿海州南西部において採集された糞を用いて、アムールヒョウの残された個体群の遺伝的及び生態的特徴を明らかにすることを目的とする。また、同所的に生息するシベリアトラについても、糞を用いて同様の分析を行う。糞や毛などの試料を DNA ソースとして用いることは、個体を捕獲する必要のある血液や組織試料と異なり、個体に直接触れ

ることなく DNA を採取できるため、個体数の少ない種や、捕まえにくい種には非常に有効である。このような試料を非侵略的サンプル(Noninvasive sample)といい、アムールヒョウやシベリアトラのような絶滅危惧種に対しては実際的な手段といえる。一方で、糞や毛に含まれる DNA は微量であり、抽出される DNA 溶液の質が悪いため、分析に困難を要するといった欠点も存在する。そのため、糞を用いた実験法の確立が重要である。

方法

本年度は、次の四つの項目を行った。

(1) DNA 抽出方法の比較

糞を DNA ソースとして用いる場合、ミトコンドリア DNA 及び核 DNA の増幅が可能な程の質と量の DNA をいかに抽出できるかが大きなポイントとなる。そこで、食肉目動物の糞に対して良い抽出効率を示している二種類の抽出方法[QIAGEN キット(QIAamp DNA Stool Mini Kit)とシリカ法 (Hoss & Paabo 1993; Boom et al 1990)]の比較を糞 102 サンプルを用いて行った。比較の基準は、既に確立している性判定法のプライマーを用いた PCR の成功率とした。

(2) マイクロサテライト DNA マーカーの選択

アムールヒョウ動物園個体 8 頭と野生個体 2 頭の計 10 頭に対して、先行研究(Uphyrkina et al. 2002)で使用された 25 遺伝子座の中から、個体識別に用いる DNA マーカーを、増幅断片長、対立遺伝子の多さ及び波長の読みやすさを基準として選択した。選択する遺伝子座数は、 P_{ID-sib} (Probability of identity (P_{ID}): The probability that two individuals drawn at random from a population have the identical genotype at the loci examined. P_{ID-sib} : P_{ID} among siblings)の値を基準とした。アムールヒョウ 7 個体を分析した先行研究(Uphyrkina et al. 2002)が示した遺伝的多様性($H_o=0.4$)に基づき、 P_{ID-sib} を 0.01(1/100)以下にするため、11 遺伝子座以上を DNA マーカーとして選択することにした(Waits et al. 2001)。

(3) 餌種であるベンガルヤマネコの特定

個体識別に用いるマーカーはイエネコで開発されたものであるため、糞抽出溶液に餌種であるベンガルヤマネコの DNA が含まれる場合、ヤマネコの DNA を増幅する可能性がある。そのため、ベンガルヤマネコに特異的な PCR プライマーを開発し、ヤマネコ DNA を含む糞を特定した。

(4) 選択したマーカーを用いた糞の遺伝子型の決定

性判定に成功したアムールヒョウの糞サンプル(44 個)に対し、選択した DNA マーカーを用いて遺伝子型を決定した。糞や毛のような質の悪いサンプルに対して遺伝子型を決定する場合、Allelic dropout や False allele といったエラーが生じやすい。そのため、繰り返し実験を行い、遺伝子型データを集めた。

結果及び考察

(1) DNA 抽出方法の比較

糞サンプル 102 個中、QIAGEN キットで抽出した DNA サンプルは 48 個(47%)で性判定に成功したのに対し、シリカ法は、71 個(70%)で成功した (Fisher's exact test, $p=0.002$)。DNA 濃度を測定し

た結果、QIAGEN キットの方が高いことから、PCR 阻害物質を十分除去できていないことが考えられる。一方、シリカ法は糞に含まれる PCR 阻害物質を効率よく取り除き、PCR の成功率を高めたと考えられる。

(2) マイクロサテライト DNA マーカーの選択

個体識別に用いる DNA マーカーとして 13 遺伝子座を選択した。先行研究が明らかにした 7 頭の遺伝的多様性から 11 遺伝子座以上調べれば十分な精度が得られると考えられるが、僅か 7 個体の結果であることや、識別の精度を更に上げるため、13 遺伝子座を個体識別用マーカーとした。

(3) 餌種であるベンガルヤマネコの特定

開発したベンガルヤマネコ特異的 PCR プライマーを用いて、アムールヒョウの糞 54 サンプルに対して PCR を行ったところ、すべてに増幅が見られなかったため、糞抽出溶液にはベンガルヤマネコの DNA が含まれていないと考えられた。このことから、個体識別で得られる対立遺伝子情報はすべてアムールヒョウ DNA 由来であるとした。

(4) 選択したマーカーを用いて糞の遺伝子型の決定

性判定に成功した 44 サンプルの内、現時点で 40 サンプルに対して遺伝子型の決定に成功した。得られた 13 遺伝子座の遺伝子型を比較したところ、少なくとも 17 個体が確認された。性比はオス:メス = 11 : 6 であった。このことから最小個体数は 17 頭であり、残された個体群はややオスに偏りのある可能性がある。

今後はアムールヒョウのサンプルだけではなく、シベリアトラの糞サンプルに対しても同様の解析を行う。また、ミトコンドリア DNA の Cytochrome b 遺伝子の塩基配列の一部を決定し、塩基多様度から遺伝的多様性を明らかにする予定である。また、糞抽出溶液に含まれる餌種 DNA を同定し食性も明らかにしたい。

参考文献

- Boom R et al (1990) Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology* **28**: 495-503.
- Hoss M and Paabo S (1993) DNA Extraction from Pleistocene Bones by a Silica-Based Purification Method. *Nucleic Acids Research* **21**(16): 3913-3914.
- Matyushkin EN et al (1999) Distribution and numbers of Amur tigers in the Russian Far East in the mid-1990's. In: *Rare Mammal Species of Russian and Neighboring Territories* (ed Aristova, A. A.), pp. 242-271. Russian Academy of Sciences Therological Society, Moscow.
- Russello MA et al (2004) Potential genetic consequences of a recent bottleneck in the Amur tiger of the Russian far east. *Conservation Genetics* **5**: 707-713.
- Uphyrkina O et al (2002) Conservation genetics of the Far Eastern leopard (*Panthera pardus orientalis*). *Journal of Heredity* **93**(5): 303-311.
- Waits LP et al (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: Cautions and guidelines. *Molecular Ecology* **10**(1): 249-256.