

# 中型哺乳類の糞の DNA 分析

大井 和之\*

## 1. 序論

野生の哺乳類は容易に姿を確認できないものも多い。そのため、生息状況調査ではトラップ等を用いた捕獲、センサーカメラによる写真撮影、糞や足跡などの痕跡（生息痕、フィールドサイン）調査などにより対象種が生息していることを把握している。特に調査範囲が広い場合、調査者が対象地をくまなく踏査して得られる痕跡の情報量は、他の調査手法には代え難いものがある。

痕跡調査で難しいのは、その痕跡を残した種の同定である。特に、糞では、形や大きさ、残された場所、内容物が植物質か動物質かなどで判断するが、熟練しないと判定は難しい。さらに、在来種のイタチ (*Mustela itatsi*) と外来種のチョウセンイタチ (*M. sibirica*) のように、形態による判別がほぼ不可能な場合もある。イタチ類の糞 (図 1) は細くねじれた形で、路傍などの開けたところで見つけることができるが、同じイタチ科のテン (*Martes melampus*) も同じような細長い形の糞をするため、テンの糞をイタチの糞と誤認する可能性もある。このように不

確実さが残る糞の種同定の精度を向上することができれば、有効な野外調査データが増えて調査の効率化にもつながる。

糞には、餌生物や腸内微生物だけでなく、腸壁から剥がれ落ちた粘膜の細胞などの落とし主の動物の DNA も含まれている。糞から DNA を抽出し、特定の生物の DNA だけを増幅して分析すれば、落とし主の種類を識別することができる。既に、中型哺乳類の食肉目 (ネコ目) でも糞の DNA 分析が実施されており、①種特異的 Primer の使用、② PCR-RFLP (制限酵素断片長多型)、③塩基配列決定、の 3つの方法が主に使われている (増田ら (2009))。

糞中 DNA の分析では、通常筋肉片等から抽出した DNA の分析とは異なり、以下の点に注意が必要である。(1)糞が採集されるまで数日間屋外に放置されていた可能性もあり、DNA の断片化によって長い DNA 断片の PCR 増幅は難しい場合がある。PCR 増幅は 200~400 塩基対程度が良好である。(2)糞は餌生物など多数の生物の DNA が混在した試料であり、糞の落とし主の種同定には分析したい分類群に特化したプライマーを用いる必要がある。

日本のイタチ類では、Masuda and Yoshida (1994) がイタチ、チョウセンイタチ、テンの 3種の標本から得た DNA についてミトコンドリアの cytochrome b 遺伝子領域の塩基配列を決め、各種間の塩基配列の違いの程度を明らかにした。これ以来、これら 3種の識別は、同領域の塩基配列を決めてデータベースに登録されている配列と比較する方法が用いられてきた。ただし、前述のとおり糞試料では餌生物



チョウセンイタチの糞

テンの糞

図 1 イタチ類の糞

\*一般財団法人 九州環境管理協会 環境部

(例えばアカネズミ) の DNA が含まれている可能性があり、哺乳類全般の汎用プライマーではなく、Namba ら (2007) で用いられたようなイタチ類に特化したプライマーを用いる必要があった。

最近、Sekiguchi ら (2010) が、ミトコンドリアの D-Loop 領域の塩基配列からイタチ、チョウセンイタチ、テンのそれぞれに特異的なプライマーを設計した。しかし、PCR 増幅の有無だけで判定する方法は簡便であるが、糞試料では、反応条件によってどのプライマーセットでも増幅されないなど、判定ができない場合がある。

そこで、アガロースゲル電気泳動だけで判定できて、塩基配列決定を行うよりも低コスト分析法を開発した。これは、特異的プライマーを用いるよりも確実な判定ができる PCR-RFLP 法で、九州北部の環境調査でよく出現する中型哺乳類を識別することができる。食肉目 (図 2) の中で、イタチ、チョウセンイタチ、テンの 3 種で良好に増幅し、餌であるネズミや鳥類の DNA では増幅されないようなプライマーを設計し、系統的にイタチ類から少し離れた

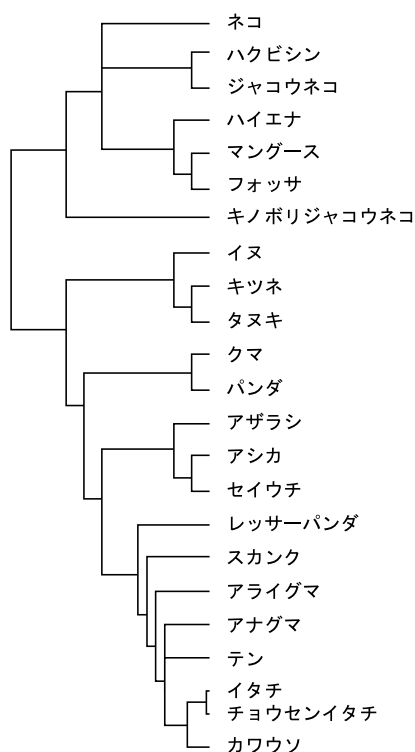


図 2 食肉目の DNA 分析による系統関係 (Flynn ら (2005) をもとに作成)

群であるイヌ科のキツネやタヌキへの適用可能性も検証した。

## 2. 方法

### 2.1 試料の採取と保存

糞は、開けた場所の土の上や道路上などで形の崩れていないものを採取した。糞を見つけたら、写真撮影や位置の記録をした後、使い捨ての割り箸を使用して、1 つずつ新しいチャック付きビニール袋へ入れた。これらの道具は滅菌しておく必要はないが、試料の汚染防止のため必ず毎回新しいものを使った。試料袋に日付や採取地等を記入し、DNA 抽出まで冷蔵又は冷凍で保存した。試料は少々古くて乾燥していても分析可能だが、新鮮な糞を持ち帰ってすぐに DNA 抽出した方が、確実に PCR 増幅ができる試料が得られた。増田ら (2009) は、糞をエタノール液中に保存する方法がよいとしているが、糞試料が液に分散してしまい、抽出作業を行いにくい場合があったため、冷蔵保存した試料を用いて、採取後 2 ~ 3 週間以内に DNA 抽出を行った。

### 2.2 DNA 抽出

糞からの DNA 抽出は QIAGEN 社の QIAamp DNA Stool Kit を用い、マニュアルにしたがって実施した。

抽出に用いる試料は、保存していた糞から植物の種等をあまり含まないように、およそ 200mg (5mm 角程度の大きさ) を使い捨ての割り箸や爪楊枝を用いてチューブに入れ、キット付属の溶解液に懸濁した。懸濁液は、夾雑物を除いたのち、タンパク質分解酵素で細胞を分解し、DNA を含む水溶液を得た。この液にエタノールを添加して専用のフィルターを通して、DNA だけをフィルターに吸着し、不純物を流し去った。最後にエタノールを含まない水でフィルターから DNA を溶出して DNA 溶液を得た。

### 2.3 PCR および塩基配列の分析

Polymerase Chain Reaction (PCR) 反応は、試料 DNA に耐熱性 DNA 合成酵素 Ex Taq (TaKaRa) と 1 対の 20 ~ 25 塩基程度の合成 DNA (プライマー)

表 1 PCR反応液の組成

	原液濃度	反応液100μLあたり	最終濃度
ExTaq buffer	10x	10μL	1x
dNTPs	2.5mM	8μL	20μM
順方向Primer	10μM	1μL	100nM
逆方向Primer	10μM	1μL	100nM
BSA	20mg/mL	0.5μL	0.1μg/μL
ExTaq	5U/μL	0.5μL	0.25U/μL
滅菌水	-	79μL	-

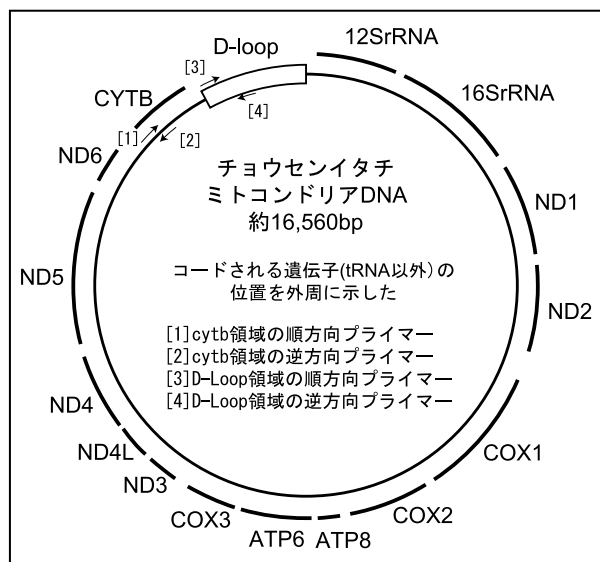


図 3 プライマーの位置

表 2 分析に使用したプライマー

名称	配列 (5'→3')	配列長	Tm (°C)	位置	出典
MIF1	GCGGATTTTCAGTAGATAAAGCTACCC	27	60	[1]	Nambaら (2007)
MMF1	ATAACCCCTCAGGAATCCCCTCC	23	61	[1]	
MUR1	GGGTTGGCGGGGATGTAGTTGT	22	61	[2]	
ItatsiLd	CAGTATGTATTTTCTTTTC	20	45	[3]	Sekiguchiら (2010)
ItatsiLr	GATCTAAGTGAAATGGATAC	20	49	[4]	
SibiricaLd	GTATCCTCTCCCCCTTCTTT	20	55	[3]	
SibiricaLr	CCCGGAGCGAGAAGAGGTGT	20	62	[4]	
MelampusLd	TTCCTCTCCCCATGACTTAA	20	53	[3]	
MelampusLr	ATCTAGGTGAAGTGCACGAA	20	53	[4]	本研究
DL1F	TCAAGGAAGAAGCGACAGC	19	55	[3]	
DL1R	AGGATTAGTAGGATTGGGTTGAGG	24	58	[4]	
DL2F	AGCACCCAAAGCTGACATTCT	21	56	[3]	
DL2R	GGTTTCTCGAGGCATGGTGA	20	57	[4]	

位置は図3のミトコンドリアDNA上の位置を示す。

表 3 PCR反応の温度条件

プログラム名	温度条件	適用プライマー
Mustela52°C	94°C5分+ (94°C30秒-52°C30秒-72°C30秒)×40回+ 72°C7分	ItatsiLd-Lr, MelampusLd-Lr
Mustela57°C	94°C5分+ (94°C30秒-57°C30秒-72°C30秒)×40回+ 72°C7分	MIF-MUR, MMF-MUR, SibiricaLd-Lr, DL1F-R, DL2F-R

を添加し、サーマルサイクラー (TaKaRa) によって温度を変化させて、DNA2本鎖の解離、プライマーとの対合、相補DNA鎖の合成を連続的に行うものである。1本鎖に解離したDNAは、配列固有の温度(Tm)付近でプライマーと相補する鎖と対合する。本研究で新たに設計したプライマーは、DNA Data Bankに登録されているチョウセンイタチの塩基配

列に基づき、D-Loop領域の一部を挟む200～500塩基離れた位置で組になり、Tmが60°C程度になる一対の配列を、探索ソフト“primer3plus”を用いて探索した。ミトコンドリアゲノム上の遺伝子の配置とプライマーの位置関係は図3に示した。

PCR反応液の組成、プライマーの塩基配列、反応の温度条件は表1～3にまとめた。糞から抽出

したDNAには反応を阻害する物質が含まれるため、反応液にはBovine Serum Albumin(BSA)を添加した。反応の温度条件は、プライマーのT<sub>m</sub>によって、アニーリング温度57°Cと52°Cに使い分けた。

PCR産物は0.5×TBEバッファー中で2% LO3アガロース(TaKaRa)ゲル電気泳動を行い、臭化エチジウムで染色し、紫外線を照射して赤色の蛍光を観察した。プライマーDL2F-DL2RのPCR産物は、塩基配列の違いを分析するため、PCR産物4μLを、10×制限酵素バッファー1μLと滅菌水5μL、制限酵素0.1μLを含む液と混合し、37°Cに60分以上おいて制限酵素処理を行ったのち、低分子量の分解能がよい4% NuSieve 3:1アガロース(Seakem)ゲルで電気泳動を行った。使用した制限酵素を表4に示した。

一部のPCR産物はQIAquick PCR purification kitを用いて精製し、DNAシーケンサーによって塩基配列を解析した。

表4 分析に使用した制限酵素

酵素名	認識配列	処理条件
<i>Dde</i> I	5'...C▼TNA G...3' 3'...G ANT▲C...5'	37°C60分
<i>Scr</i> FI	5'...CC▼N GG...3' 3'...GG N▲CC...5'	37°C60分
<i>Bst</i> UI	5'...CG▼CG...3' 3'...GC▲GC...5'	65°C4時間

### 3. 結果と考察

#### 3.1 種特異的プライマーによる種同定の検証

九州内で採集したイタチ類の糞4検体(サンプル1~4)、イタチとは異なる「ため糞」から採集した2検体(サンプル5,6)のDNAを用い、対照として、別に同定済みの標本から得たイタチとチョウセンイタチのDNAを使用して、先行研究で用いられた種特異的プライマーによる種同定について検証した。

Cytochrome b領域のプライマー(Nambaら(2007))は、原論文の67°Cよりも低い57°Cのアニーリング温度条件でPCRを行った(図4右下)。イタチのプライマー(MIF1-MUR1)では、イタチ類でない

考えられるサンプル3~6でも薄く増幅がみられ、テンのプライマー(MMF1-MUR1)では、テンと考えられるサンプル3,4の他にイタチの標本DNAから増幅がみられた。なお、このプライマーで増幅されるcytb領域では、イタチとチョウセンイタチの塩基配列の違いが少ないため、両種を識別するためにはMIF1-MUR1のPCR産物の塩基配列を決定する必要がある。

D-Loop領域のイタチ、チョウセンイタチ、テン特異的プライマー(Sekiguchiら(2010))で増幅し、PCR産物を電気泳動した結果は図4(左上・左下・右上)に示した。DNAが増幅されたプライマーの組み合わせから、サンプル2がチョウセンイタチ、サンプル3と4がテンであることがわかったが、サンプル1はイタチで弱い増幅がみられるものの、この泳動像だけでイタチであると断定することは難しかった。増幅が弱くなったのは、プライマーitatsiLdとitatsiLrのT<sub>m</sub>が低く、相同配列に結合しづらいためと考えられる。また、チョウセンイタチ特異的プライマーでは、非特異的に短いDNA断片が見えるが、これはsibiricaLdとsibiricaLrのT<sub>m</sub>が7°C異なるため、ゴーストが発生したのと考えられる。このように、種特異的なプライマーでは、糞DNAの状態や反応の温度条件によってバンドが出たり出なかったりすることがあり、種の識別が不確実になることがあった。

#### 3.2 塩基配列の決定とプライマーの設計

D-Loop領域についてプライマー部位探索ソフトウェアで得たプライマー候補配列のうち、約400塩基のDNAを増幅するDL1FとDL1Rの組ではイタチ、チョウセンイタチ、テン、アナグマの試料で増幅が確認され、塩基配列解析を行った。得られた塩基配列に、データベース上のキツネ、タヌキの塩基配列を加えて整列する(図5)と、DL2FとDL2Rの組ではこれらの種も増幅可能であることがわかる。実際にキツネとタヌキの糞から得たDNAでPCRを行うと、イタチ類より若干長いDNA断片の良好な増幅が確認できた(図6左)。



図4 種特異的プライマーでのPCR産物の泳動像

図5に示した6種の塩基配列を比較すると、塩基配列の欠失があるため、チョウセンイタチに比べてイタチは5塩基、テンは7塩基、アナグマは9塩基短い。しかし、アガロースゲル電気泳動ではこの長さの違いを判別することは困難である。そこで、塩基配列解析ソフト（BioEdit）で、6種の塩基配列について各種の制限酵素の切断位置を探索したところ、*DdeI*でチョウセンイタチ特異的な切断部位、*ScrFI*でアナグマ特異的な切断部位とイタチ、チョウセンイタチに特異的な切断部位、*BstUI*でキツネ特異的な切断部位が見つかった。

### 3.3 アガロースゲル電気泳動による判定

DL2F-DL2RのPCR産物を制限酵素処理した後の電気泳動像を図6（中，右）に示した。全ての検体で数十塩基～約250塩基の長さのDNA断片が1ないし2本確認できた。塩基配列から想定される断片長（表5）のとおり、*DdeI*と*ScrFI*の同時処理（図

6中）では、39塩基の短い断片が確認しづらいためテンとキツネが類似したパターンになるものの、他の4種はそれぞれ種ごとに異なったパターンとなった。キツネについては別途*BstUI*処理して電気泳動する（図6右）ことで、他種と区別が可能であった。

## 4. まとめ

哺乳類の生息分布域を把握するために行う調査で、対象種の直接観察が困難な場合に、痕跡調査は重要な手段であるが、糞の形態等では種の同定が困難な場合も少なくなかった。糞中のDNA分析は、このような場合に有効であるが、分析にコストと時間がかかることが課題であった。

種特異的なプライマーによるPCR増幅の有無による検出は、最も簡便で、コスト、時間ともに抑えることができるが、試料によってはうまく増幅できない場合や、プライマーと温度条件によっては本来

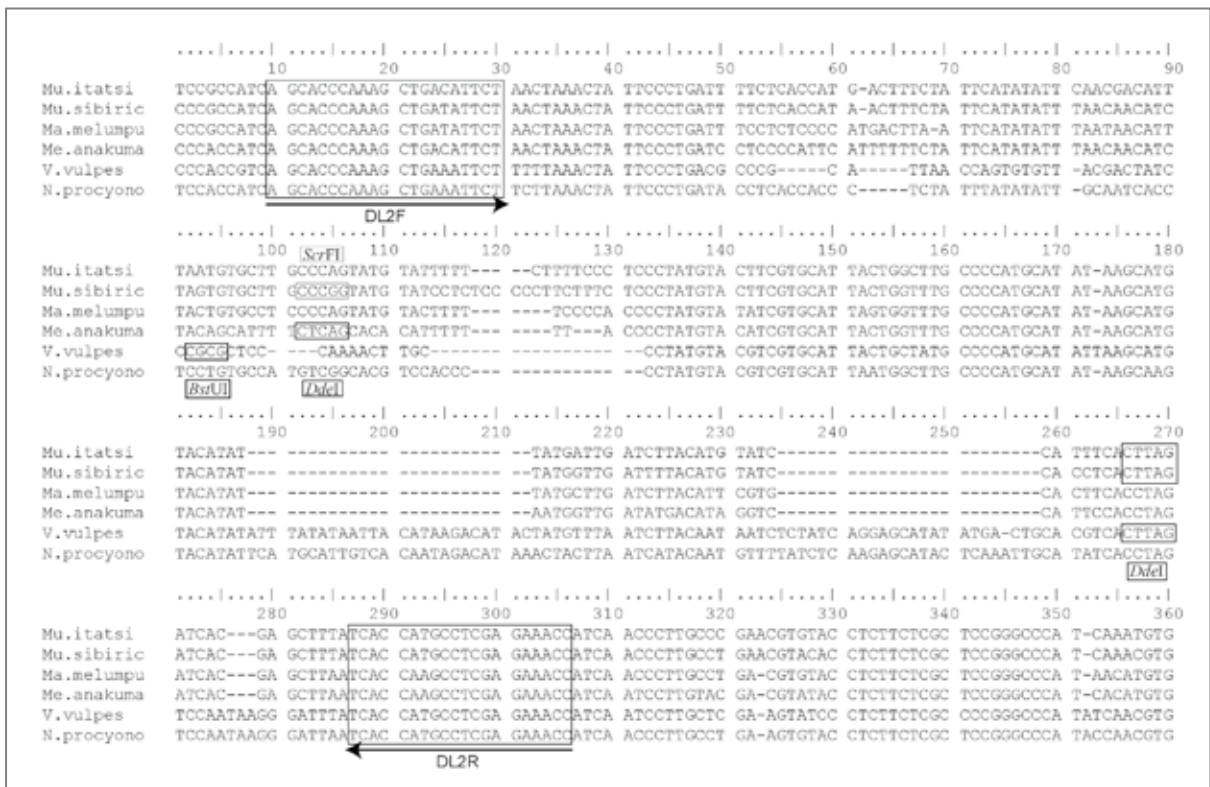


図5 D-Loop領域の塩基配列とプライマー、制限酵素切断位置

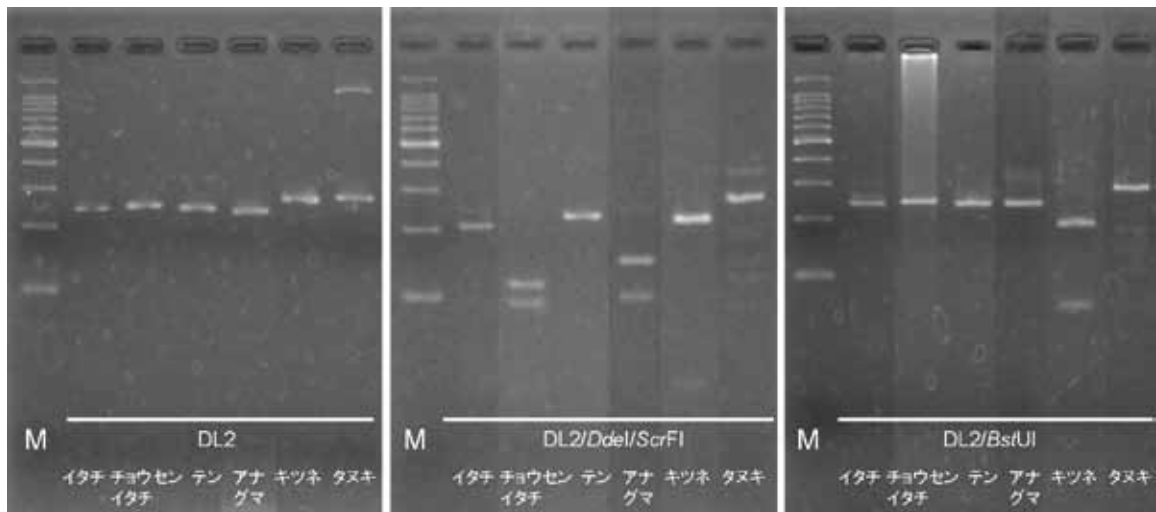


図6 DL2F-DL2RのPCR産物の制限酵素処理前後の電気泳動像

表5 計算上のDNA断片長

	イタチ	チョウセンイタチ	テン	アナグマ	キツネ	タヌキ
DL2	238	243	236	234	262	275
DL2/ <i>DdeI</i> / <i>ScrFI</i>	202		236		223	275
		104		140		
		94		94		
	36	36			39	
DL2/ <i>BstUI</i>	238	243	236	234		275
					188	
					74	

単位:塩基対(bp)

増えないはずの試料で増幅がみられる場合もあり、結果の安定性に課題があった。一方、塩基配列の違いを直接シーケンスする分析には、検体数に比例して高いコストがかかった。

今回新たに開発したプライマー DL2F-DL2R は、食肉目イヌ亜目に含まれる複数種で、良好に PCR 増幅ができることを確認した。また、PCR 産物の長さは約 240 塩基と短い、種間の塩基配列の変異が大きい領域であり、3 種の制限酵素を使用して 6 種の識別が可能であった。

今回開発した糞中 DNA の PCR- 制限酵素処理による分析法は、1 つの PCR 産物を制限酵素で処理して電気泳動するだけで、痕跡調査で頻出する 6 種の識別が可能であり、低コストで糞の種同定に有効と考えられる。今回対象とした種の他にも、分布拡大が問題となる外来種のアライグマなどについても適応可能かどうか検討中であり、引き続き環境調査での活用を進めていくこととしている。

## 引用文献

1) 増田隆一ら (2009) “食肉目の遺伝子分析を目

的としたサンプリング法, 遺伝子分析技術, 遺伝情報の解析法及び研究事例” 哺乳類科学 49(2), 283-302.

- 2) Masuda, R. & Yoshida, M.C. (1994) “Nucleotide sequence variation of cytochrome b genes in three species of weasels *Mustela itatsi*, *Mustela sibirica*, and *Mustela nivalis*, detected by improved PCR product-direct sequencing technique” *J. Mamm. Soc. Japan*, 19(1), 33-43.
- 3) Namba, T. et al. (2007) “A new method for the identification of *Martes melampus* in Honshu by a multiplex PCR for fecal DNAs” *Mammal Study* 32, 129-133.
- 4) Sekiguchi, T. et al. (2010) “New methods for species and sex determination in three sympatric Mustelids, *Mustela itatsi*, *Mustela sibirica* and *Martes melampus*” *Molecular Ecology Resources* 10, 1089-1091
- 5) Flynn, J.J. et al. (2005) “Molecular Phylogeny of the Carnivora (Mammalia): Assessing the Impact of Increased Sampling on Resolving Enigmatic Relationships” *Syst. Biol.* 54, 317-337