

研究成果報告書（第27回学術研究助成）

2020年 3月 17日

公益財団法人 藤原ナチュラルヒストリー振興財団

理事長 野村茂樹 殿

所属機関名 公立大学法人大阪 大阪市立大学

職 名 准教授

氏 名 名波 哲

1. 研究課題

森林性鳥類の糞に含まれるDNA情報による種同定方法の確立と野生群集への応用

2. 共同研究者

なし

3. 研究報告

I. 研究の目的

鳥類は、種子を糞とともに排泄することにより森林植物の更新を助ける。目的は、(1)森林に落ちている鳥類の糞からDNAを抽出し、その配列情報から落とし主の鳥類種を同定する手法を確立すること、(2)その糞の中に含まれる植物の種子を同定し、鳥類が、いつ、どの樹種の果実を、どのくらい食べているのかを明らかにし、森林維持に対する貢献を評価することである。研究代表者らは、奈良県春日山照葉樹林において、年間を通じて鳥類相を把握した。続いて、鳥類の採食行動の直接観察により、種子散布ネットワークの一部を明らかにしている。ただしこれは「ある植物の果実を採食する鳥類群」の調査であり、詳細を把握するためには、鳥類側から見たデータ、つまり「ある鳥類が採食する植物群」の調査も必要である。しかし、鳥類の採食行動の追跡は困難なので、森林内から集めた糞から落とし主の鳥類種を同定することが有効だと考えた。

II. 研究の方法

- (1) 大阪市立大学植物園において、定期的にかすみ網を用いて鳥類を捕獲した。捕獲した鳥類を布袋の中に5分間程度入れたのちに放鳥した。その後、袋の中に糞が残されていた場合、それを採集した。袋は個体ごとに新しいものに取り換えた。
- (2) 大阪市立大学植物園において、低木のシャシャンボやヒサカキ等の結実木の樹冠が写るようにセンサーカメラ (Ltl-6210MC、Ltl-Acorn社) を設置し、訪れた鳥類を撮影した。それらの結実木の葉の上に新しい糞が残されていた場合、すべて採集した。さらに、大阪市立大学構内に柑橘類を置いた餌台を設置し、鳥類の誘因を試みた。餌台の前にはセンサーカメラを設置して訪れた鳥類を確認するとともに、餌台に残された糞を採集した。
- (3) 採集した糞をstool lysis buffer (Buffer ASL, Qiagen社) 1,000 μ Lを入れた1.5 mLチューブに入れて、室温で保管した。
- (4) 3通りの方法でPCRに用いる鋳型DNAの抽出を試みた。すなわち、DNA stool mini kit (QIAGEN社) またはUniversAll™ Extraction Buffer II (Yeastern Biotech 社) による抽出、さらに糞を浸したstool lysis bufferの原液の使用である。
- (5) PCRには、KOD -Plus- NEO (TOYOBO社) と2組のプライマー、Hebert et al. (2004)、González-Varo et al. (2014)を用いた。また、奈良県春日山で観察例のある84種の鳥類の配列情報を基に、本研究で独自にユニバーサルプライマー1組を設計してPCRに用いた。さらに、公開されているメジロの塩基配列を基に、種 (メジロ) に特異的なプライマー1組を設計して、PCRに用いた。
- (6) PCR産物を2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、目的の断片の増幅を確認した。

- (7) 電気泳動の結果、目的のもの以外の断片の増幅も見られた場合は、ゲルカッターで目的の断片を切り出し、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (TaKaRa社)により精製した。
- (8) DNA断片の塩基配列はオートシーケンサー (Applied Biosystems社) により結成した。
- (9) 得られた塩基配列情報とデータベース上 (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) の塩基配列を比較した。最も可能性の高い種と塩基配列の一致度を記録した。得られた.ab1形式のファイルをソフトウェア FinchTV で開き、波形の明瞭さ(読み取り易さ)や複数の波形の重複の有無を評価した。

III. 研究結果

(1) 鳥類の糞の採集

かすみ網による捕獲調査によって、メジロなど留鳥、オオルリなどの夏鳥、シロハラなどの冬鳥の糞を採集した。ただし、この方法では主要な果実食鳥類であるヒヨドリの捕獲と糞の採集に成功しなかった。一方、大阪市立大学構内に設置した餌台の前のセンサーカメラには複数のヒヨドリが訪れたことが記録されていたため、餌台に残された糞はヒヨドリのものだと判断した。

(2) DNA断片の増幅

PCRの結果、Hebert et al. (2004)、González-Varo et al. (2014)のいずれのプライマーの組み合わせについても、目的とするサイズ以外のDNA断片の増幅も見られた(図1)。これらの目的以外のバンドの増幅を抑えるために、まず、まずアニーリング温度を上げた。しかしその結果、すべてのバンドの増幅が得られなくなった。次に、PCR反応液にBSA(ウシ血清アルブミン)の添加して再度PCRを試みたが、結果は変わらずBSAの効果は特に認められなかった。

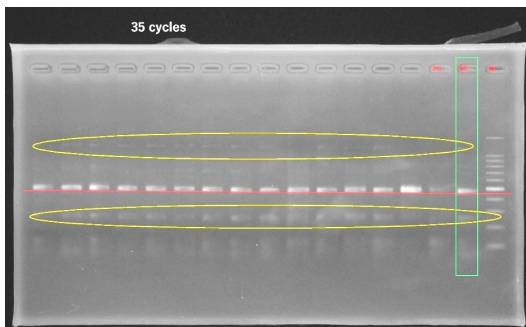


図1. プライマーCOI-fsdF (GCATGAGCCGGAAT AGTRGG)とCOI-fsd (TGTGA-KAGGGCAGGTGGTT T-30) (González-Varo et al. 2014)を用いたPCRの結果。アニーリング温度は54℃、サイクル数は35、目的のDNA断片は赤線で示された464 bpのバンド。しかし黄色の楕円で囲まれた約250 bpと1000 bp超のバンドの増幅も見られた。

(3) 塩基配列の決定と種同定

Hebert et al. (2004)、González-Varo et al. (2014)のプライマーを用いたPCR産物から期待通りの種が同定された場合もあったが、多くは異なる種と判定され目的は達成されなかった(表1)。次に、目的のサイズの断片をゲルから切り出し精製したPCR産物の塩基配列を決定した場合も、重複は消えず、正しく種同定することはできなかった(表2)。一方、メジロを対象として種特異的に設計されたプライマーを用いた場合は、糞から抽出されたDNAであっても正しく種同定でき、成功率は100%ではなかった。

IV. 考察

Hebert et al. (2004)、González-Varo et al. (2014)のプライマーを用いた場合、望ましい結果が得られなかった。このことから、前者は北米の、後者は地中海地方の1鳥類種の配列に基づいて設計したものであることが原因の1つとして考えられた。そのため、日本産の鳥類に適合するプライマーの設計が必要であると考え、奈良県春日山の鳥類を対象にプライマーを設計した。しかし、電気泳動の結果では複数の長さのDNA断片の増幅が確認された。そのためDNA断片中から目的の配列を得るためにターゲットのサイズに合致するバンドのみを切り出したが、波形のパターンを見ると、同程度の長さをもつ複数の断片が増幅されており、正しい種同定には至らなかった。原因として考えられることは、(1)糞の中に当該鳥類以外の生物のDNAが含まれたこと、(2)ユニバーサルなプライマーであるため、特定の種のDNAであっても複数のサイトにプライマーが結合したこと、が考えられる。

V. 成果発表

永見侑大, 名波哲, 伊東明(大阪市立大学) 果実の成熟に伴う鳥類の採食行動の変化. 第67回日本生態学会大会(名古屋), 2020年3月, 一般講演(ポスター発表)

VI. 今後の課題

メジロを対象に設計された種特異的なプライマーであっても、種同定の成功率は100%ではなく、その原因は抽出の段階で増幅に十分な量のDNA が得られなかったからかもしれない。今後の研究では、サンプル採集からDNA抽出までの複数の手法の検討と比較、新規プライマーの再設計が必要である。

表1. プライマー (González-Varo et al. 2014) を用いたシーケンスと種同定の結果。「種」は捕獲した鳥類、「波形」はシーケンス画像の読み取りやすさ、「BLAST」はデータベース検索の結果、Ident. は読むことができた塩基数のうち期待される種の塩基と一致した塩基の数と百分率を示す。

種	波形	BLAST	Ident.	Notes
スズメ	明瞭	スズメ	414/421 (98%)	
スズメ	明瞭	スズメ	383/404 (95%)	
アカハラ	明瞭	アカハラ	426/428 (99%)	
モズ	明瞭	ハシブトガラス	412/415 (99%)	
シロハラ	明瞭	ハシブトガラス	409/414 (99%)	
ウグイス	明瞭	ハシブトガラス	397/402 (99%)	
シジュウカラ	明瞭	キジバト	391/400 (98%)	
シジュウカラ	明瞭	ハシブトガラス	412/416 (99%)	
シジュウカラ	明瞭	ハシブトガラス	416/422 (99%)	
ヒヨドリ	明瞭	ハシブトガラス	415/422 (98%)	
ヒヨドリ	明瞭	ヒヨドリ	321/338 (95%)	190塩基程度が重複
シジュウカラ	明瞭	シジュウカラ	341/344 (99%)	100塩基程度が重複
シジュウカラ	明瞭	ハシブトガラス	237/241 (98%)	190塩基程度が重複
シジュウカラ	明瞭	ハシブトガラス	237/241 (98%)	190塩基程度が重複
シジュウカラ	明瞭	ハシブトガラス	237/241 (98%)	190塩基程度が重複
シジュウカラ	明瞭	ハシブトガラス	237/241 (98%)	190塩基程度が重複
ソウシチョウ	明瞭	ハシブトガラス	233/237 (98%)	190塩基程度が重複
エゾムシクイ	明瞭	ハシブトガラス	237/241 (98%)	190塩基程度が重複
アオゲラ	明瞭	ハシブトガラス	234/237 (99%)	190塩基程度が重複
ウグイス	明瞭	ハシブトガラス	232/235 (99%)	190塩基程度が重複
キビタキ	明瞭	ハシブトガラス	236/241 (98%)	190塩基程度が重複
キビタキ	明瞭	ハシブトガラス	231/242 (95%)	190塩基程度が重複
エゾムシクイ	明瞭	ハシブトガラス	225/233 (97%)	190塩基程度が重複
キビタキ	明瞭	ハシブトガラス	229/232 (99%)	190塩基程度が重複
オオルリ	明瞭	ハシブトガラス	234/237 (99%)	190塩基程度が重複
メジロ	明瞭	ハシブトガラス	235/242 (97%)	190塩基程度が重複
メジロ	明瞭	ハシブトガラス	234/240 (98%)	190塩基程度が重複
メジロ	明瞭	ハシブトガラス	236/242 (98%)	190塩基程度が重複
ヤマガラ	明瞭	ハシブトガラス	234/242 (97%)	190塩基程度が重複

表2. 奈良県春日山で観察例のある84種の鳥類の公開配列情報を基に、本研究で設計したユニバーサルプライマー (フォワードプライマー [5' CCCCMGACATAGCATTYC -3'], リバースプライマー [5' - DAGACRAATAGDGGDGTGGT -3']) を用いたPCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、目的のサイズ (292 bp) の断片を切り出して精製後にシーケンスと種同定を行った結果。各列の内容は、表2と同じである。

種	波形	BLAST	Ident	Notes
シジュウカラ	不明瞭	—	—	重複
シジュウカラ	不明瞭	—	—	重複
シジュウカラ	不明瞭	—	—	重複
ヒヨドリ	明瞭	—	—	重複
ヒヨドリ	不明瞭	—	—	重複
ヒヨドリ	不明瞭	—	—	重複
ソウシチョウ	不明瞭	—	—	重複
エゾムシクイ	不明瞭	—	—	重複
アオゲラ	不明瞭	—	—	重複
ヒヨドリ	不明瞭	—	—	重複
ウグイス	不明瞭	—	—	重複
キビタキ	不明瞭	—	—	重複
メジロ	明瞭	—	—	重複
メジロ	明瞭	Pseudomonas sp.	158/200 (79%)	重複