

研究成果報告書（第29回学術研究助成）

2022年 11月 7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 東北大学大学院生命科学研究科
職 名 修士課程2年
氏 名 田谷 昌仁

1. 研究課題

アオバズクとコノハズクの繁殖適地の違いとは？-DNAと安定同位体比による食性の詳細な解析

2. 共同研究者

細谷淳・鳥類標識協会・野外調査補助

3. 研究報告

I. 研究の目的

本研究の目的は、夏季に日本で繁殖する小型フクロウ類2種を題材として、環境変動に起因する繁殖戦略の時空間変動機構を解明することである。夜行性フクロウ類のアオバズク *Ninox japonica* とコノハズク *Otus sunia* はともに東南アジアで越冬し、夏季に日本へ飛来して森林に形成される樹洞を利用して繁殖する。過去の記述では、アオバズクは落葉広葉樹林、針葉樹林、人家付近の林など幅広い環境で繁殖するとされている一方、コノハズクは主にスギ・ヒノキなどの針葉樹林で繁殖するとされている（清棲 1952）。しかし、2017年からの申請者らの東北地方南部での予備調査では、過去と比較してアオバズクの繁殖地環境はあまり変化していない一方で、コノハズクは針葉樹林から原生の広葉樹林へと繁殖地環境の変化が起きていることが示唆された。さらに、全国鳥類繁殖分布調査で記録された繁殖メッシュ数は、コノハズクは1970年台から2020年台に至るまで一貫して減少し続けているのに対し、アオバズクは1990年台以降増加に転じている（植田ら 2021 *Bird Res.*）。

夏鳥として飛来し、夜行性で樹洞営巣するという生活様式が類似しているこの2種において、なぜ繁殖環境やメッシュ数に異なる傾向の変化が起ったのだろうか？私たちは、食性の違いに注目して以下の仮説を立てた：アオバズクは食性に関してジェネラリストであり、樹洞さえあれば幅広い環境で繁殖できる一方、コノハズクは食性に関してスペシャリストであり、繁殖分布が餌環境に強く規定される。そこで本研究では、この仮説を検証するため、アオバズクとコノハズクが同所的に繁殖している地点において、2種の食性を詳細に調べることによりこの仮説を検証する。

なお、申請当初の研究計画では食性解析にDNAメタバーコーディングと安定同位体比分析を用いることを予定していたが、途中研究計画を変更し、DNAメタバーコーディングのみによる食性解析を行うこととした。

II. 研究の方法

(1) コノハズク・アオバズクの標識調査

2021年6月から8月、および2022年6月から8月にかけて、アオバズクとコノハズクが同時に生息する4地点（山形県、福島県奥羽山脈、福島県阿武隈山地、宮城県）においてコノハズクとアオバズクを対象に捕獲・標識調査を行った。捕獲にはかすみ網を使用し、固有の番号を付した環境省金属足環を装着し放鳥した。上記期間の調査とそれより前に行っていた調査を合わせ、合計でコノハズク17個体、アオバズク12個体を捕獲した。

(2) フンの採取

前述の標識調査の際、副次的に得られるフンを採取した。フンを採取する際には火炎滅菌したピンセットまたはミクロスパーテルを用いた。採取したフンはその場で99.5%エタノール中に入れ、調査終了後すぐに-30°Cの冷凍庫内に入れ分析まで保管した。再捕獲によって得られたフンも含め、コノハズクより24サンプル、アオバズクより12サンプルのフンを採取した。

(3) フンのDNAメタバーコーディングによる食性解析

DNA抽出にはQIAGEN QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) を用いた。抽出DNAはQuantus Fluorometer (Promega) を用いてdsDNA assayにより定量した。先行研究で提唱されているCO1遺伝子と18S rRNA遺伝子を增幅するユニバーサルプライマー(CO1: Meusnier et al. 2008 *BMC Genomics*; 18S: Amaral-Zettler et al. 2009 *PLoS One*)を用いて1st PCRを行った。ただし、illuminaシーケンサのフローセル上の塩基多様度を高めるため、5'末端と3'末端の読み出しの6塩基が混合塩基Nとなるようにプライマーを改変して作成した。PCR酵素にはKOD FX neo (TOYOBIO) を用い、PCRの反応条件は上記先行研究に従った。その後、1st PCR産物を鋳型DNAとして2nd PCRを行い、各サンプルに固有のインデックス配列とNexteraアダプタ配列をPCR産物の5'末端および3'末端に付加した。2nd PCR酵素にもKOD FX neoを用い、PCRの反応条件は [94°C 2min, 13 cycles of 98°C 10sec, 55°C 30sec, and 68°C 30sec, and final extention of 68°C 5min]とした。その後AMPure XPにより精製を行い、濃度調整をした上でマルチプレックスを行い、150bpペアエンドの設定でillumina MiSeqによるシーケンシングを行った。

得られたシーケンスデータはbcl2fastq (illumina) (https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/bcl2fastq-conversion-software.html) を用いてベースコーリングを行い、Claident (Tatabe and Toju 2013 *PLoS One*; <https://www.claident.org/>) を用いてデマルチプレックス、低品質配列とキメラ配列の除去、OTUクラスタリングの処理を行った。OTUクラスタリングの閾値は99%とした。GenBankに登録されている配列の少なさにより、分子同定によりいずれかのランクの分類群名が与えられたOTUは40ほどにとどまった。そのため、今回の餌群集解析は分類群名のついていないOTUの状態で行うこととした。

(4) 餌群集解析

(3) で得られた情報を元に、サンプルごとの各OTUの出現表を作成した。(3) の配列解析の時点ではOTUにホスト生物も含まれるが、アオバズク由来のCO1と18Sの配列がGenBankに登録されていなかったため、アオバズク由来のOTUを見分けることができなかつたことから、ホスト生物由来OTUを除去せずに群集解析を行った。

得られたOTU出現表を用いて、サンプル間の類似度を示すJaccard指数を計算することでサンプル間のβ多様性を算出した。サンプル間のβ多様性の違いがホスト種の違い(アオバズク、コノハズク)によって説明されるのか、調査地の違い(山形、宮城、福島、阿武隈)によって説明されるのかをPERMANOVAによって確かめた。繰り返し計算の回数は1000回とした。また、各調査地の間でサンプル間のβ多様性の分散が異なるかを分散分析により検定した。全ての計算はRのveganパッケージを用いて行った。

III. 研究結果

上記の分析を行い、最終的にCO1増幅産物より86,947リード、18S増幅産物より253,503リードの配列を取得した。また、それらのリードは99%の閾値のもとでCO1で170OTU、18Sで403OTUにクラスタリングされた(図1)。CO1に基づく餌群集では、サンプル間β多様性のばらつきをホスト生物が有意に説明していたのに対し、地点の効果は有意ではなかった。一方で18Sに基づく餌群集では、サンプル間β多様性はホスト生物と地点の両方によって有意に説明された(表1)。さらに、β多様性の分散はCO1、18Sとともに地点間で有意に異なっていた(表2)。

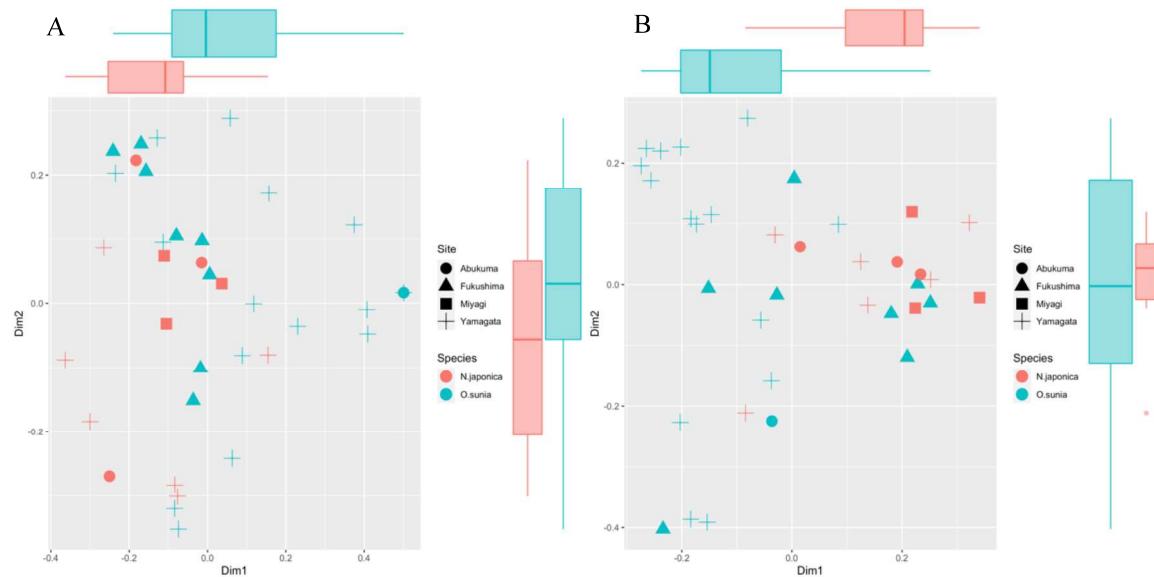


図1 (A) CO1増幅産物 (B) 18S増幅産物によるOTUクラスタリングに基づく餌生
物群集の主座標解析 (PCoA) によるプロット

表1 サンプル間β多様性に対するホスト種または地点の効果。1000回の繰り返し計算に基づくPERMANOVAによる。 **: P-value < 0.01 *** : P-value < 0.001

		Df	Sum of Sq	R2	F	P-value	
1	CO1 Species	1	0.8385	0.5733	2.0677	0.001998	**
2	CO1 Site	3	1.3041	0.08916	1.0442	0.3047	
3	18S Species	1	0.8307	0.05933	2.1446	0.000999	***
4	18S Site	3	1.4474	0.10339	1.23	0.006993	**

表2 サンプル間β多様性の地点間の分散分析。*: P-value < 0.05 *** : P-value < 0.001

		Df	Sum Sq	Mean Sq	F	P-value	
1	CO1 Site	3	0.063242	0.021081	4.1088	0.01421	*
2	18S Site	3	0.081492	0.027164	14.18	4.74×10 ⁻⁶	***

IV. 考察

フンのDNAメタバーコーディングによる餌群集解析により、アオバズクとコノハズクの餌群集組成は有意に異なるものであることが確かめられた。一方で、18Sではフクロウ種間で有意に分かれているだけでなく、サンプル間β多様性の分散も地点の違いによる影響を有意に受けている。すなわち、PERMANOVAにより示された餌群集組成の違いが、地点間でサンプリングの網羅度に違いが生じたことにより検出されているのか、実際にホスト生物の餌群集の幅広さの違いを反映しているのかが不明瞭である。これを解決するためには、今後の調査により地点ごとのサンプル数を増やすことや、分子同定をより充実させ、餌生物を科や目レベルといったより高次の分類体系でまとめることによる群集解析を行うことなどが必要であると考えられる。

また、今回の分析で用いた2つの遺伝領域でも復元される餌群集の特性が異なっていた。これは領域の違いによる分類群間の增幅効率の違いを反映したものと考えられる。例えは今回使用したCO1のマーカーは無脊椎動物全般を增幅するユニバーサルプライマーとして開発されているが、分類群間の增幅効率に違いがあることが知られている (Clarke et al. 2014 *Mol. Ecol. Res.*)。食性解析の研究において複数マーカーの間で検出される餌生物の分類群が大きく異なることもある (Huang et al. 2022. *Env. DNA*)。增幅されやすかったり、種の違いを反映しやすかったりする遺伝領域は分類群によって異なるため、DNAメタバーコーディングを用いた食性解析では、今回のように複数領域を用いることが網羅的な餌群集組成の解明に効果的であると言える。

V. 成果発表

今後、シーケンス解析（特に分子同定）や群集解析をより充実させ、日本生態学会大会での発表やEnvironmental DNA誌等での成果の論文発表を計画している。

VI. 今後の課題

今後は、バイオインフォマティクス解析をより進め、できるだけ多くのOTUで分類群名を同定することにより、地点の影響を減らした群集解析を行う必要がある。もしこの課題がバイオインフォマティクスの手法で十分に解決されない場合、調査地に生息している潜在的餌群集を直接採集してバーコード領域をシーケンシングし、カスタムデータベースを作成することも必要かもしれない。特に、ホスト生物の配列がGenBankに登録されていないためにホスト生物由来のOTUを除去できないという問題があるため、アオバズクやコノハズクの組織サンプルを採取する必要がある。また、地点によっては捕獲できた両種の個体数が少ないところもあり、今後の調査でのサンプリングによりこれを補完する必要がある。

これらの課題を解決することにより、現段階よりも解像度の高い餌群集解析を行うことができるため、コノハズクとアオバズクの食性のジェネラリスト・スペシャリスト性を評価し、仮説をより直接的に検証できるだろう。