

食痕 DNA 分析マニュアル

～ツキノワグマによる農作物の食害痕(食痕)からの DNA 採取・分析手法～



目次

1. はじめに
 2. 必要な資材と機材
 - 2-1. サンプルング関連
 - 2-2. 遺伝分析試薬
 - 2-3. 遺伝分析機材
 3. 作業手順と注意事項
 - 3-1. サンプルング方法
 - 3-2. DNA 抽出
 - 3-3. PCR 増幅・フラグメント解析
 - 3-4. 分析エラーへの対処
- 引用文献
付表:食痕サンプルの分析フローチャート

1. はじめに

ツキノワグマ (*Ursus thibetanus*)による農業被害の対処として有害捕獲が実施されている。これまで数多くの有害捕獲が繰り返されているが農業被害は毎年発生しており、捕獲個体を機械的に捕殺しても被害水準は減少していない。効率よく保護管理を行なうには加害個体数を把握して被害対策を講じる必要がある。そこで被害農地に残されたクマの食痕試料に着目して、これを材料とした遺伝子分析手法の開発をおこなった。

2. 必要な資材と機材

2-1. サンプル関連

綿棒 (滅菌する)

→はさみを使わなくても軸が折れるものがよい (○:紙、×:プラスチック、竹ひご)。

ポリプロピレン製チューブ (DNase Free、または滅菌する)

→容量は、1.5 ml~2.0 ml 程度のもの (遠心機で使えるサイズ)を準備すると扱いやすい。

チャック付ポリ袋

→サンプリング済みのチューブを入れるため、ユニパック Cなどを準備する。

手袋

→ラテックス製など使い捨てにできるものを準備する。

消毒用エタノール

→コンタミネーションを予防するために、手などを消毒する。

唐辛子スプレー、ホイッスル、クマよけ鈴ほか

→コーン畑など圃場内は見通しが悪いため、クマとの接触に十分注意する必要がある。

その他

→ハンディ GPS、デジタルカメラ、筆記用具、メジャーほか記録に必要なものを準備する。

2-2. 遺伝分析試薬

(1) DNA 抽出バッファー

以下の試薬を混合して、オートクレーブにかけたものを使用する。

0.1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)

150 mM NaCl

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

(2) フェノール・クロロフォルム抽出 (CIA 処理)

Proteinase K (最終濃度 100ug/ml となるように添加する。)

平衡化中性フェノール (pH 8.0)

CIA(クロロフォルム : イソアミルアルコール = 24:1)

(3) CTAB 抽出

- 2% CTAB (Cetyltrimethylammonium-bromide)
- 0.1 M Tris-HCl (pH 9.5)
- 1.4 M NaCl
- 20 mM EDTA
- CIA(クロロフォルム：イソアミルアルコール= 24:1)

(4) その他

滅菌した超純水、ピペット、チップ、チューブ、ラテックス手袋、消毒用エタノールほかを準備する。

2-3. 遺伝分析機材

- 恒温器
- 遠心分離機
- 分光光度計

→食痕から回収できる DNA 量が少ないため、1 ul から測定できるものがあるとよい。

- サーマルサイクラー
- Genetic Analyzer
- その他

→電子天秤、pH メーターなどの汎用機器は割愛する。

3. 作業手順と注意事項

3-1. サンプルング方法

(1) 事前の準備

- DNA 抽出バッファー800 ul (チューブに分注)。
- 滅菌済み綿棒。
- 被害の連絡体制を整える。

→市役所など関係する機関などに、農作物被害が発生したら直ちに連絡を頂けるよう体制を整える。

(2) サンプルング

- 関係機関などから被害の連絡をうけたら、ただちに現場に向かう。
→被害後 1 日以内にサンプルングすることが望ましい。
- 食痕を選別する。

→被害状況を聞きとり、圃場内の被害状況を観察して、クマの痕跡（足跡、爪あと、糞など）や被害をうけた農作物の状態から、もっとも新しい痕跡がある被害箇所を探す。

参考：農作物の状態の観察例（ただし、地域や気候に応じて基準を変える必要がある）。
コーンの例→クマに倒されたコーンの状態を観察する。例えば、穂先が垂直に起き上がっていれば、被害後1日ほど時間が経過していることがわかる。
リンゴの例→齧られた果実の状態を観察する。例えば、齧り跡の酸化の程度をみると、被害後間もないものほど変色していないことがわかる。
直近の被害箇所を特定できたなら、そこからなるべく泥汚れの少ない食痕を選別する。

□ 選別した食痕を綿棒で拭う。

①綿棒で、齧り跡の表面を拭う。この際、配慮するとよい点を以下に示す。

- ・綿棒に土が付着しないようにする。
- ・農作物に含まれる水分が染み出さない程度の力加減で拭う。
- ・綿棒に農作物片が付着しないように注意する。

②綿棒の先端を、1.5 ml チューブ内の DNA 抽出バッファーに浸る長さで折り入れる。

③チューブにナンバリングして、チャック付ポリ袋に入れる。

→（可能であれば）食痕1個あたりチューブ2本分をサンプリングしておくといよい。

□ サンプルを持ち帰る。

→クーラーボックスなどで保冷する。



写真：食痕を拭う様子。

(3) 保存方法

分析まで4℃で冷蔵する。長期で保存する場合は、-20℃で冷凍する。

3-2. DNA 抽出

(1) 綿棒が入ったままの状態のチューブに Proteinase K を添加して、55℃で1時間ほど保温してタンパク質を消化させる。

(2) フェノール・クロロホルム法により DNA 抽出をおこなう。

① Sambrook and Russel(2001)の方法で、DNA を抽出する。

② 回収した DNA は、滅菌した超純水 (25 ul) で溶解する。

(3) CTAB 法により、農作物由来の多糖類などの夾雑物を除去する。

① Murray and Thompson (1980)の方法で、農作物由来の多糖類などを除去する。

② 回収した DNA は、滅菌した超純水 (25 ul) で溶解する。

(4) 分光光度計により、回収した DNA の濃度（以下、分光値）を測定する。

3-3. PCR 増幅・フラグメント解析

Multiplex 法により PCR 増幅をおこなう。PCR 反応液（ここでは、total 15 ul）に添加する鋳型 DNA の添加量は分光値を指標とする。2009 年当時の試薬（ex-Taq）および分析機器（Genetic Analyzer 310）を使った場合、最適な DNA 濃度は 75 ng-100 ng/15 ul であった。

(1) PCR 増幅

オリゴヌクレオチドプライマー（フォワード側の末端に蛍光標識をつけたもの）

① 個体識別用のプライマー

→核 DNA のマイクロサテライト座位を増幅するプライマーを用いる。調査地に分布する地域個体群に見合った個体識別確率をもつプライマーセットを選別する。プライマーの選別に関しては、ヘア・トラップ法のマニュアルなどを参照されたい。その際、食痕サンプルから回収した DNA は体毛よりも断片化が進んでいることが考えられるため、増幅長が短いプライマーを選択するとよい。

② 性判別用のプライマー

→ウシのアメロゲニン遺伝子を増幅するプライマー SE47・SE48（Ennis and Gallagher 1994）などを用いる。なお、この遺伝子は雌雄ともにバンドが確認できる利点があるが、マイクロサテライト座位に比べて増幅しにくい欠点がある。そのため、この遺伝子は単独で増幅したほうがよいと思われる（2009 年現在）。

Taq ポリメラーゼ → exTaq(TaKaRa)を使用した（2009 年現在）。

PCR バッファー

MgCl₂

dNTP ミックス

鋳型 DNA 溶液（食痕から回収した DNA 溶液）

滅菌した超純水

(2) フラグメント解析

GeneticAnalyzer のマニュアルに従いフラグメント解析をおこなう。

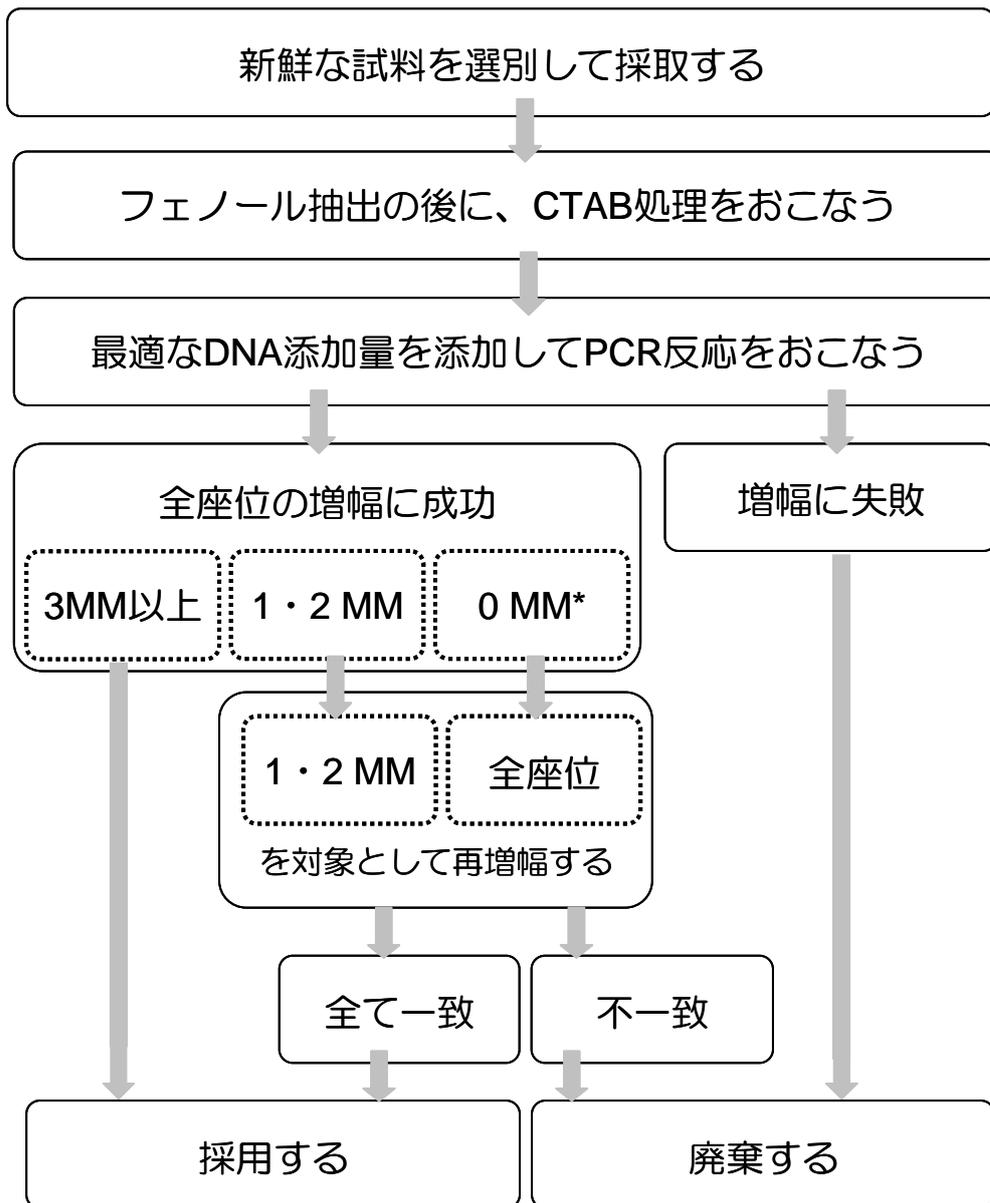
3-4. 分析エラーへの対処

現在の技術段階では、非侵襲的なサンプル（体毛や糞など）を用いた遺伝分析には分析エラーが伴うことが指摘されている。体毛サンプルを用いた遺伝子分析の場合、分析エラーの検出・回避策として Peatkau (2003)が推奨する方法が多くの研究で採用されている。しかし、食痕サンプルは体毛よりさらに回収できる DNA が少ないことが予想されるうえ、DNA の抽出量を調節する（例：体毛の本数を増やす）ことができない。そこで、この方法を食痕 DNA の分析に適用する際に、1) 分光値を指標とした最適 DNA 添加量で PCR 反応をおこなう、2) 1 座位でも増幅されないサンプルはすべて破棄する方針とした。これにより、3) Paetkau(2003)が示したミスマッチ座位を選択的に再増幅する方法を適用することができる。以下に、具体的な作業手順を示す。

① ミスマッチ座位の検索をする。

フラグメント解析で得られた遺伝子型のミスマッチ座位の組み合わせを、プログラム GeneCap (Wilberg and Dreher 2004) を用いて、検索する。

- ② 以下の条件にあてはまったサンプルの再分析をおこなう。
- ・ 遺伝子型が完全に一致した(0 ミスマッチ:MM)サンプルの組み合わせ
 - ・ 1 座位(1MM)もしくは 2 座位(2MM)のみ遺伝子型が異なったサンプルの組み合わせ
- ③ サンプルの採択をおこなう。
- 上記のミスマッチ座位のうち、2 度の分析結果（遺伝子型）が一致したサンプルのみ採用し、一致しなかったサンプルはすべて破棄する。



食痕サンプルの分析フローチャート

*MMは、ミスマッチ座位を示す。0 MMは、個体識別に用いたマイクロサテライト全座位が一致したサンプルの組み合わせを示す。1 MMまたは2 MMは、それぞれ1座位または2座位のミスマッチ座位があるサンプルの組み合わせを示す。

引用文献

- Ennis S. and T.F. Gallagher (1994) A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Animal Genetics*,25:425-427.
- Murray M.G. and W.F. Thompson(1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*,8(19):4321-4326.
- Paetkau D.(2003) An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Molecular Ecology*,12: 1375-1387.
- Sambrook J. and D.W. Russel(2001) *Molecular Cloning vol.2. A laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York.999pp.
- Wilberg M.J. and B.P. Dreher(2004) Genecap: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation. *Molecular Ecology*,4:783-785.

問合せ先 :

東京農工大学農学部附属 フロンティア農学教育研究センター

産官学連携研究員

齊藤 正恵

u0304005@gmail.com