2.1 個体数推定に関わる DNA 分析法の確立

玉手 英利(山形大学)・釣賀 一二三(北海道環境科学研究センター)・山内 貴義(岩手県環境保 健研究センター)・湯浅 卓(野生動物保護管理事務所)・鵜野 レイナ(慶応大学)・近藤麻実(岐 阜大学)

1. はじめに

21 年度の本研究では、ヘア・トラップ法で用いる遺伝子分析の効率及び精度の向上を目的として、分析に関する諸条件を検討し、標準的な分析手順(プロトコール)を定めた。

ヘア・トラップ法で用いる遺伝子分析については、これまで実験手法やデータ管理に関して様々 な検討がなされており(森光,2008;佐藤・湯浅,2008;釣賀,2008;佐藤・湯浅,2008;山内・斎 藤,2008;湯浅・佐藤,2008;Itoh et al.,2009)、環境省や自治体等が実施する生息調査において活 用されてきた。これらの先行研究によって、遺伝子分析の基本的方法論はほぼ確立されたが、日 本のクマ類の生息調査方法として実用化するためには、以下のような問題が残されている。

- (i) 各試験研究機関で用いる遺伝マーカーの種類等の分析条件が異なるので、各道府県の調査 で得られた遺伝子データの互換性が乏しい。そのため、異なる調査で得られたデータを統 合したメタ解析による広域的な個体数推定ができない。
- (ii) サンプリング時期や遺伝子増幅反応の条件の違いにより、遺伝子分析の成功率が大きく左 右されることが経験的に知られているが、最適な分析条件が定まっていない。
- (iii) 大規模調査で得られる多数のサンプルを効率的に処理し精度管理を行うために必要となる、 国内の試験研究機関の連携体制が整備されていない。

上記の課題を解決するために、本研究では、先ず、国内の各試験研究機関で現在用いられているへアサンプルの分析条件を整理した(**付表1**)。その中から、各機関で分析条件が大きく異なる、サンプリング時期、DNA 抽出方法、遺伝子増幅反応の条件、遺伝マーカーの種類、精度管理方法について効率を検討し、標準的な分析条件を定めた。以下にその結果を述べる。

2. ツキノワグマの DNA 個体識別手法の標準化

2-1. 遺伝マーカーの検討

国内でヘア・トラップ調査が始められた90年代は、利用できる遺伝マーカーが、Paetkau et al. (1995)のG series; Kitahara et al. (2000)の MSUT series; Taberlet et al. (1997)のUarMU series などに限られていた。そのため、現在でも多くの自治体では、これらの90年代に開発されたマーカーが主に用いられている。しかし、これらの遺伝子座の変異は2塩基反復配列多型であるため、対立遺伝子の判別を注意深く行う必要がある。それに対し、対立遺伝子の読み取りがより容易な4塩基反復配列多型のUT series (Shih et al., 2009)、UA series (Sanderlin et al., 2009)、Uam series (Meredith et al., 2009)が、新たなクマ類のマイクロサテライトマーカーとして開発された。そこで、本研究では、新たに開発されたUT、UA、Uamの各マーカーから、原報で多型性が高いことが記載されている遺伝子座で対立遺伝子サイズが250bpより小さいものを選び、従来用いられてきたG、UarMU、MSUTマーカーと合わせて、個体識別効率を比較する基準となる対立遺伝子数およびPid

(Probability of Identity) と Pid(sib)を測定した。Pid は調査対象集団が大集団で任意交配している

場合に、サンプルされた異なる 2 個体が同一の遺伝子型を持つ確率を表す指標である。一方、 Pid(sib)は血縁個体の存在を考慮した Pid であり、小集団では Pid に比べてより実用的な指標とさ れる(Waits et al., 2001)。サンプルとして、岩手県で 2003 年から 2008 年までに捕獲されたツキノ ワグマ 42 個体の筋肉から抽出した DNA を用いた。PCR 等の条件は、それぞれのマーカーを記載 した原著論文に従って設定した。その結果を**表1**に示す。

表 1 マイクロサテライトマーカーの Probability of identity (Pid) 、対立遺伝子数、対立遺伝子座サイズ およびアニーリング温度

G1A 0.1374/256 0.43171306 7 198-227 at as of the state of the stat	لأ	這伝子座	Pid	Pid(sib)*	対立遺伝子数	対立遺伝子サ イズ (bp)	アニーリング 温度(℃)	備考	reference
GiD 00102/0788 0.05432009 2 192-196 58 G series GiD 0.170501031 0.457166074 5 112-124 50-55 Paetkau et al. (1995) G iD 0.2224537158 0.510641092 5 81-97 50-55 Paetkau et al. (1995) G iD 0.53142213 0.73417753 3 134-150 58 G iD 0.5314221408 5 199-209 54 G iD 0.124540914 0.414073033 4 186-202 54 MSUT-1 0.222691420 0.06110003 5 86-88 94 Kitahara et al. (2000) MSUT-6 0.20699376 0.442331229 3 184-190 49 U.thibetanue MSUT-7 0.20699376 0.442331229 3 184-190 49 U.thibetanue MSUT-7 0.20699376 0.442331229 3 182-128 50-55 Jack MSUT-7 0.20693776 0.4423329 0.609510246 3 37-141 50-55 Jack <td></td> <td>G1A</td> <td>0.137842956</td> <td>0.431711306</td> <td>7</td> <td>199-227</td> <td><u>加度(0)</u> 65</td> <td></td> <td></td>		G1A	0.137842956	0.431711306	7	199-227	<u>加度(0)</u> 65		
G 10B G series C 10B G 10C G 10J G 10H G 10H		G1D	0.910270798	0.954325069	2	192-196	58		
GibC 0.170501031 0.487168074 5 112-124 50-55 Peethau et al. (1995) GibH - - - 50-55 Peethau et al. (1995) L/americanus GibH - 0.5314/223 0.734187753 3 134-150 58 GiDM 0.148473635 0.442244486 5 199-209 54 GiDV 0.212150414 0.414030333 4 168-188 - GIDV 0.212071995 0.487075085 4 168-202 54 MSUT-2 0.212084142 0.560819005 5 86-98 50 MSUT-5 1 1 126 50 5 MSUT-6 0.40843032 0.70030066 3 110-121 43 MSUT-7 0.48430322 0.70030066 3 110-121 43 UarMu0 0.302690615 0.58171463 3 118-126 50-55 UarMu3 0.61820065 0.48230392 0.191491753 0.1791414 129-138 5		G10B	0.277196664	0.566748146	5	147-165	65		
G series GiOu GIOH GIOH GIOH GIO GIO GIO GIO GIO GIO GIO GIO GIO GIO		G10C	0.170501031	0.457166074	5	112-124	50-55		
G series G DH District Construct District Construct District Construct G DL GDL 0.514 22213 0.734187753 3 134-150 58 GDM 0.114873835 0.432244486 5 199-209 54 GDM 0.212054921 0.54325721 3 176-179 58 MSUT-2 0.212084921 0.54325721 3 176-179 58 MSUT-5 0.212089412 0.550825721 3 176-179 58 MSUT-5 0.206899782 0.769420063 4 93-99 44 Kitahara et al. (2000) MSUT-5 0.20689796 0.4331329 3 184-190 49 43 MSUT-7 0.4443032 0.700300686 3 110-121 43 43 UarMu0 0.326059015 0.55717143 3 118-126 50-55 Jacrotos UarMu1 0.372842839 0.66162901 2 186-188 50-55 Jacrotos UarMu50 0.173847514 0.66		G10J	0.224537158	0.510641092	5	81-97	50-55		Paetkau et al. (1995)
GIOL GIM 0.53142213 0.121540814 0.734187753 0.414030353 3 134-150 189-188 58 GIOP 0.121540814 0.414030353 4 169-188 GIOP 0.121540814 0.414030353 4 169-188 MSUT-1 0.212071995 0.481075085 4 189-202 54 MSUT-2 0.2106414 0.56110605 5 86-98 50 MSUT-3 0.210621412 0.56110605 5 86-99 44 Kitahara et al. (2000) MSUT-5 1 126 50 U.thibitatus 126 50 U.thibitatus MSUT-7 0.48331322 0.70930068 3 110-121 43 UarMu05 0.18200653 0.4425835 4 146-156 50-65 UarMu10 0.372848239 0.609510246 3 137-141 50-65 UarMu10 0.372848239 0.445230597 7 216-532 50-65 U.arctos UarMu10 0.372848239 0.609510246 3 137-141 50-65 U.a	G series	G10H -			-				II americanus
GIDM 0.1348/3835 0.432244486 5 199-209 54 GIDV 0.2107/1995 0.4870/35085 4 186-202 54 MSUT-1 0.2720/4927 0.54257921 3 175-179 58 MSUT-2 0.210/1995 0.4870/35085 4 93-99 44 Kitahara et al. (2000) MSUT-5 1 126 50 U.thbetanus MSUT-5 1 126 50 U.thbetanus MSUT-7 0.4483052 0.76092086 3 181-120 43 UarMu5 0.12200685 0.4821717463 31-128 50-55 U.thbetanus UarMu5 0.327048239 0.606510246 3 137-141 50-55 U.arMu5 UarMu5 0.3270472181 0.01118411 128-138 50-55 U.arCos UarMu5 0.370473080 0.46520197 2.216-232 50-55 U.arCos UarMu5 0.21680212 0.44967304 4.249-257 50-55 U.arctos UarMu5 <td></td> <td>G10I</td> <td>0 531422213</td> <td>0 734187753</td> <td>3</td> <td>134-150</td> <td>58</td> <td></td> <td>er untertouride</td>		G10I	0 531422213	0 734187753	3	134-150	58		er untertouride
CIOP 0.121540914 0.414030833 4 168-188 GIOX 0.2105709505 4 186-202 54 MSUT-1 0.212064142 0.5643297821 3 175-179 58 MSUT-2 0.21286412 0.5643297821 3 175-179 58 MSUT-5 1 1 126 50 J.thetanus MSUT-5 1 1 126 50 J.thetanus MSUT-7 0.4443932 0.700300668 3 110-121 43 UarMu0 0.360590615 0.587171463 3 113-126 50-55 UarMu1 0.37264239 0.606170246 3 37-141 50-55 J.therku23 UarMu2 0.44186734 0.617161841 4 128-138 50-55 J.therku33 UarMu3 0.017384758 0.46823097 7 216-232 50-55 J.therku33 UarMu4 0.44180714 0.44060821 2 217-228 57.55 212-228 UarMu51<		G10M	0 134873635	0 432244486	5	199-209	54		
Giox 0.210711995 0.487075085 4 186-202 54 MSUT-1 0.27204427 0.5420721 3 175-179 58 MSUT-2 0.212084142 0.56610605 5 86-85 50 MSUT-5 1 126 50 U.thbetanus MSUT-6 0.20680782 0.764920983 1126 50 U.thbetanus MSUT-7 0.4483052 0.70300686 3 118-190 43 UarMu5 0.122006615 0.687171463 318-120 50-55 U.thbetanus UarMu5 0.327248239 0.005510246 3 1137-141 50-55 U.arMu5 0.370647902 6 118-134 50-55 U.arMu5 U.arMu5 0.370647902 6 118-134 50-55 U.arctos		G10P	0 121540914	0 414030353	4	168-188	01		
MSUT-1 0.22204027 0.442257821 3 175-176 56 MSUT-2 0.2120442 0.50110605 5 86-98 50 MSUT-5 0.569887932 0.764920963 4 93-99 44 Kitahara et al. (2000) MSUT-6 0.206899786 0.483313289 184-190 49 Uthibetanus MSUT-7 0.42430932 0.700300686 3 110-121 43 MAMU5 0.182006853 0.44259334 146-156 50-55 UarMu19 0.360390615 0.587171463 3 118-126 50-55 UarMu28 0.01593975 0.370647902 6 118-134 50-55 UarMu28 0.01593975 0.370647902 6 118-134 50-55 UarMu28 0.441867514 0.66162901 2 186-188 50-55 UarMu31 0.179347558 0.465230597 7 216-232 50-55 UarMu31 0.97661477 2 208-212 50-55 UarMu31 0.975661477 2 208-212 50-55 UarMu31 0.334062317		G10X	0 210771995	0 487075085	4	186-202	54		
MSUT series MSUT-2 0.212084142 0.56987932 0.764920963 4 98 - 99 50 MSUT series MSUT-4 0.569887932 0.764920963 4 93 - 99 44 Kitahara et al. (2000) MSUT-5 0.56989793 0.483313289 3 184 - 190 49 MSUT-6 0.206899786 0.4825935 4 146 - 156 50 - 55 UarMu0 0.382006051 0.58717481 0.61717481 3 118 - 126 50 - 55 UarMu1 0.372248239 0.609510246 3 137 - 141 50 - 55 UarMu2 UarMu2 0.4727481 0.617161941 4 128 - 138 50 - 55 UarMu5 UarMu5 0.173847588 0.465230597 7 216 - 232 50 - 55 UarMu5 UarMu5 0.210682012 0.48673904 4 249 - 257 50 - 55 UarMu6 UarMu61 0.2573506 0.37661477 2 208 - 212 57 - 55 5 5 UarMu61 0.2573506		MSUT-1	0 272804927	0.543257921	3	175-179	58		
MSUT -series MSUT -4 MSUT -5 MSUT -5 0.569887932 1 0.764320983 1 4 1 1 1 1 1 <th< td=""><td></td><td>MSUT-2</td><td>0.212084142</td><td>0.506110605</td><td>5</td><td>86-98</td><td>50</td><td></td><td></td></th<>		MSUT-2	0.212084142	0.506110605	5	86-98	50		
MSUT series MSUT-5 Closed Disk File MSUT-6 Closed Disk File MSUT-6 Closed Disk Closed Disk <thclosed disk<="" th=""> <thclosed disk<="" th=""></thclosed></thclosed>		MSUT-4	0 569887932	0.764920963	4	93-99	44		Kitabara et al (2000)
MSUT-6 0.206899786 0.483313289 1 1 123 30 D. Disclambs MSUT-7 0.4430932 0.700300686 3 110-121 43 UarMu05 0.182006653 0.4825935 4 146-156 50-55 UarMu10 0.372484239 0.600910246 3 137-141 50-55 UarMu26 0.07159375 0.370647902 6 118-134 50-55 UarMu26 0.441867514 0.66162901 2 186-188 50-55 UarMu26 UarMu26 0.173934758 0.46612901 2 186-188 50-55 UarMu5 UarMu51 0.179030463 0.459298432 4 117-125 50-55 UarMu64 UarMu64 0.2669249 0.563300106 5 156-174 57, 55 2step UarMu64 0.26906064 0.527350197 3 185-191 50-55 104 UarMu64 0.26906064 0.577350197 3 185-191 57.55 2step	MSUT series	MSUT-5	0.000007002	0.704020000	1	126	50		II thibetonus
MSUT-7 0.4430392 0.700300686 3 110-121 43 UarMu09 0.36200663 0.4623935 4 146-156 50-55 UarMu10 0.372441 0.017161941 4 128-138 50-55 UarMu15 0.3702419223 0.609510246 3 137-141 50-55 UarMu15 0.370241902 6 118-134 50-55 UarMu50 0.17384756 0.370647902 6 118-126 50-55 UarMu50 0.17384756 0.498673904 4 228-55 UarMu50 0.17384756 0.498673904 4 219-232 50-55 UarCos UarCos UarMu61 0.95377806 0.498673904 4 249-257 50-55 UarCos UarCos UarMu61 0.95377806 0.57861477 2 208-212 50-55 UarCos UarMu61 0.95377806 0.56330106 5 156-114 57.55 2step UarMu61 0.95377806 0.56438115 4 173-175 75.55 2s		MOUT_6	0 206200706	0 493313390	2	194-100	40		D. tribetanus
Missi P Understand Construction Construction <thconstruction< th=""> Construction</thconstruction<>		MSUT-7	0.200033730	0.400010209	3	104-190	49		
UarMUD 0.12200033 0.0323333 4 110-103 30-33 UarMU 0.12200033 0.060510246 3 137-141 50-55 UarMU 0.07153375 0.370447902 6 118-126 50-55 UarMu5 0.07153375 0.370647902 6 118-134 50-55 UarMu50 0.17384758 0.465230597 7 216-232 50-55 Uarctos UarMu51 0.17030463 0.459298432 4 117-125 50-55 Uarctos UarMu61 0.93377080 0.937681417 2 208-212 50-55 Uarctos UarMu61 0.93377080 0.937681417 2 208-7174 57.55 2step UamM02 0.118714149 0.448067301 5 116-124 57.55 2step UamB102 0.118714149 0.46800531 5 127-228 57.55 2step UamB2 0.318714161 0.480060231 5 127-123 57.55 2step UamB102			0.40430932	0.4625025	3	146-156	40 50-55		
UarMU10 0.3072848239 0.009510246 3 118-120 50-35 UarMU10 0.372848239 0.009510246 3 137-141 50-55 UarMU26 0.411867514 0.601510246 3 118-134 50-55 UarMu26 0.411867514 0.6612901 2 186-188 50-55 UarMu59 UarMu59 0.173847558 0.465230597 7 216-232 50-55 UarCos UarMu51 0.173047638 0.455239597 7 216-232 50-55 UarCos UarMu51 0.17304758 0.455230597 7 216-232 50-55 UarCos UarMu61 0.95377060 0.97661477 2 208-212 50-55 UarCos UarMu61 0.95377060 0.527350197 3 185-191 50-55 UarMu64 UarMu62 0.187814619 0.447691819 5 10-206 57, 55 2step UarMu64 0.228201003 0.566128315 4 173-197 57, 55 2step <td></td> <td>UarMu00</td> <td>0.102000000</td> <td>0.4023333</td> <td>-</td> <td>110_106</td> <td>50-55</td> <td></td> <td></td>		UarMu00	0.102000000	0.4023333	-	110_106	50-55		
UarMU 0.3/244239 0.00370241 0.0-33 0.0-35 UarMU 1arMu23 0.071593875 0.370647902 6 118-134 50-55 1arMu20 0.414867514 0.6612901 2 186-188 50-55 12.47026 1arMu50 0.173647558 0.465230597 7 216-232 50-55 12.47026 1arMu51 0.1790347558 0.465230597 7 216-232 50-55 12.47056 1arMu61 0.95037806 0.976681477 2 200-55 12.47026 1arMu61 0.95937806 0.976681477 2 200-55 12.47026 1arMu61 0.95937806 0.976681477 2 200-55 12.47026 1arMu61 0.95937806 0.567330197 3 185-11 50-55 12.4702 1arMu62 0.187814619 0.44961815 5 109-206 7,55 2step 1amD12 0.187814619 0.44961815 1190-206 7,55 2step 12.47046 1amB103		Uariviu09	0.300390013	0.00510246	3	107 141	50-55 50 55		
UarMu13 0.368/1/2461 0.301/16/19/11 4 128-136 30-33 UarMu23 0.071593875 0.370647092 6 118-134 50-55 Taberlet et al. (1997) UarMu50 0.17893475 0.466162901 2 188-188 50-55 UarMu51 UarMu51 0.17893475 0.49867904 4 249-257 50-55 UarMu51 UarMu61 0.93377806 0.976681477 2 208-212 50-55 UarMu64 UarMu64 0.25300054 0.527350197 3 185-191 50-55 UarMu64 0.253000106 5 156-174 57, 55 2step UarMu50 0.318875029 0.56623815 4 173-197 57, 55 2step Uarmb10 0.31847514 0.43661819 5 190-206 57, 55 2step Uarmb2 0.318475029 0.566238315 4 173-197 57, 55 2step Uarmb103 0.33406217 0.595562064 3 151-123 57, 55 2step		Uariviu 10	0.372646239	0.609310246	3	100 100	50-55 50 55		
UarMU UarMu26 0.0/1393/3 0.5/04/3/2 0 1/8/134 50-35 Taberlet et al. (1997) series UarMu26 0.4/1867514 0.66162901 2 186-184 50-55 U.arctos UarMu50 0.173847558 0.455230597 7 216-232 50-55 U.arctos UarMu51 0.179030463 0.459298432 4 17-125 50-55 U.arctos UarMu61 0.9337806 0.976681477 2 208-212 50-55 20-55 UarMu64 0.225006054 0.527350197 185-191 50-55 20-55 UamD2 0.187816419 0.49060201 5 156-174 57.55 2step UamD2 0.149610815 0.447691819 5 190-206 57.55 2step UamB2 0.21870175 0.530475321 3 148-164 57.55 2step UamB103 0.234962519 0.5661503 6 123-144 60-495.5 60wn U.americanus UamD13 0.2428101			0.303772401	0.017101941	4	110 104	50-55 50 55		
series UarMu20 0.44169/34 0.00102901 2 1087168 50-53 U. arctos UarMu51 0.17384758 0.465220597 7 216-232 50-55 0.46 0.45 0.46 0.45 0.46 0.46 0.45 0.46 0.46 0.46 </td <td>UarMU</td> <td></td> <td>0.071093675</td> <td>0.370047902</td> <td>0</td> <td>106 100</td> <td>50-55 50 55</td> <td></td> <td>Taberlet et al. (1997)</td>	UarMU		0.071093675	0.370047902	0	106 100	50-55 50 55		Taberlet et al. (1997)
DarMusio 0.173934738 0.43523039 7 216-22 30-35 UarMusii 0.179030463 0.45523039 4 117-125 50-55 UarMusii 0.95377806 0.976681477 2 208-212 50-55 UarMu64 0.25906054 0.527350197 185-191 50-55 UarMu64 0.25906054 0.552350197 185-191 50-55 UarMu64 0.25906054 0.527350197 185-191 50-55 UarMu52 0.187814619 0.480060231 5 212-228 57, 55 2step UamD2 0.187814619 0.480060231 5 212-228 57, 55 2step UamB2 0.313975029 0.566238315 4 175-123 57, 55 2step UamB103 0.334062317 0.595562064 115-123 57, 55 2step Uarmu54 UarM D13 0.286201003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U armericanus UamD13 0.091388989 0.387926612 7	series		0.441607314	0.00102901	2	100-100	50-55 50 55		U. arctos
UarMusi 0.1/930343 0.439298432 4 117-123 30-35 UarMusis 0.210682012 0.498298432 4 249-217 50-55 UarMudi 0.9377806 0.976681477 2 208-212 50-55 UarMudi 0.259060654 0.527350197 3 185-191 50-55 UamN107 0.316692449 0.563300106 5 156-174 57, 55 2step UamD102 0.187814619 0.480060231 5 127-228 57, 55 2step UamD2 0.319375029 0.566238315 4 173-197 57, 55 2step UamB2 0.313476231 0.48006815 3 115-123 57, 55 2step UamD3 0.664980568 0.81944809 3 229-237 57, 55 2step UamD3 0.664980568 0.81944809 3 229-237 57, 55 2step UamD13 0.34076453 0.6057365 3 151-159 57, 55 2step UamD14			0.170020462	0.400230097	1	210-232	50-55		
UarMus 0.21082012 0.49607304 4 249-237 30-33 UarMu61 0.9537306 0.976681477 2 208-212 50-55 UarMu64 0.259060654 0.527350197 3 185-191 50-55 UarMu707 0.316692489 0.563300106 5 156-174 57, 55 2step UarMu20 0.187814619 0.480060231 5 212-228 57, 55 2step UamD2 0.187814619 0.480060231 5 190-206 57, 55 2step UamB2 0.319375029 0.566238315 4 173-197 57, 55 2step UamB103 0.334062317 0.595562064 3 115-123 57, 55 2step UamD13 0.29456019 0.855975116 2 160-168 57, 55 2step U. americanus UamD13 0.29456019 0.85797516 2 160-168 57, 55 2step U. americanus UamD13 0.664980568 0.81944809 3 229-237			0.1/9030403	0.409296432	4	11/-125	50-55 50 55		
UarMu61 0.937/806 0.97068/47/7 2 206-212 30-33 UarMu64 0.2530/6064 0.527350197 3 185-191 50-55 UamD102 0.187814619 0.480060231 5 212-228 57, 55 2step UamD2 0.148610815 0.447691819 5 190-206 57, 55 2step UamB2 0.319375029 0.566238315 4 173-197 57, 55 2step UamB2 0.319375029 0.566238315 4 173-197 57, 55 2step UamB103 0.334062317 0.595562064 3 115-123 57, 55 2step Uam Series UamD11 0.282801003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U. americanus UamD13 0.664980568 0.81944009 3 229-237 57, 55 2step UamD13 0.91388989 0.387926612 7 214-238 57, 55 2step UamD112 0.114224445 0.410525726 6 141-160 </td <td></td> <td></td> <td>0.210082012</td> <td>0.4960/3904</td> <td>4</td> <td>249-207</td> <td>50-55 50 55</td> <td></td> <td></td>			0.210082012	0.4960/3904	4	249-207	50-55 50 55		
UarMu64 0.29906054 0.52730197 3 185-191 50-35 UarMu64 0.316692489 0.563300106 5 156-174 57, 55 2step UarMu64 0.31682489 0.563300106 5 156-174 57, 55 2step UarMu62 0.149610815 0.447691819 5 190-206 57, 55 2step UarmB102 0.149610815 0.447691819 5 190-206 57, 55 2step UarmB103 0.334062317 0.595562064 3 115-123 57, 55 2step UarmB103 0.334062317 0.595562064 3 115-123 57, 55 2step UarmD1a 0.228201003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U. americanus UarmD1a 0.282801003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U. americanus UarmD13 0.664980568 0.81944809 3 229-237 57, 55 2step UarmD13 0.20509947 0.486790835 4			0.93377800	0.9/00814//	2	200-212	50-55		
UamD2 0.31032439 0.3030100 5 130-174 51, 55 2step UamD2 0.187814619 0.480060231 5 212-228 57, 55 2step UamB2 0.319375029 0.566238315 4 173-197 57, 55 2step UamB5 0.261870175 0.530745321 3 148-164 57, 55 2step UamB103 0.334062317 0.595562064 3 115-123 57, 55 2step UamD1a 0.228201003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U. americanus UamD13 0.664980568 0.81944809 3 229-237 57, 55 2step UamD13 0.091388989 0.387926612 7 214-238 57, 55 2step UamD112 0.114224445 0.410925726 6 141-160 57, 55 2step UA = BM3-P1B05U 0.2065039647 0.486790835 4 190-202 57, 55 2step UA = SM3-P1B05U 0.20650396 9 224-2		UarMub4	0.259060654	0.52/35019/	<u> </u>	150 174	50-55		
UamD2 0.187814619 0.440000231 5 212-226 51, 53 23tep UamD102 0.149610815 0.447691819 5 190-206 57, 55 2step UamB2 0.319375029 0.566238315 4 173-197 57, 55 2step UamB3 0.261870175 0.530745321 3 148-164 57, 55 2step UamB103 0.334062317 0.595562064 3 115-123 57, 55 2step UamD1a 0.2282601003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U. americanus UamD1a 0.282801003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U. americanus UamD13 0.091389899 0.381926612 7 214-236 57, 55 2step UamD112 0.114224445 0.46090857 3 151-159 57, 55 2step UamD118 0.202509847 0.480790835 4 190-202 57, 55 2step UA = BM4-P2403U 0.202771535 0.480256376<			0.310092409	0.000000000	5	100-1/4	57, 55 Zstep		
Uamb102 0.143010313 0.447031313 0.3113 0.30200 0.3, 32 step UamB2 0.31375029 0.566238315 4 173-191 57, 55 2step UamB5 0.261870175 0.530745321 3 148-164 57, 55 2step UamB103 0.334062317 0.595562064 3 115-123 57, 55 2step UamD14 0.228201003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U.americanus UamD1a 0.282801003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U.americanus UamD13 0.664980568 0.81944809 3 229-237 57, 55 2step UamD13 0.091388989 0.387926612 7 214-238 57, 55 2step UamD112 0.114224445 0.410925726 6 141-160 57, 55 2step UamD118 0.202099847 0.480790835 4 190-202 57, 55 2step UA-BM3-P1H010U 0.202771535 0.480250816 <td< td=""><td></td><td></td><td>0.10/014019</td><td>0.460000231</td><td>5</td><td>212-220</td><td>57, 55 Zstep</td><td></td><td></td></td<>			0.10/014019	0.460000231	5	212-220	57, 55 Zstep		
Uamb2 0.3183/3023 0.302028313 4 17/3-197 51, 53 2518p Uamb5 0.261870175 0.530745321 3 148-164 57, 55 2step Uam Series UamC11 0.729456019 0.855975116 2 160-168 57, 55 2step Meredith et al. (2009) Uam D1a 0.282801003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U. americanus UamD1a 0.282801003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U. americanus UamD13 0.664980568 0.81944809 3 229-27 57, 55 2step UamD13 0.091388989 0.387926612 7 214-238 57, 55 2step UamD112 0.114224445 0.410925726 6 141-160 57, 55 2step UamD118 0.20509847 0.486790835 4 190-202 57, 55 2step UA-BM3-P1B05U 0.09680394 0.440593066 9 224-250 60-49.5 down Sanderlin et al. (2009) UA-BM4-P2E11U 0.229664463 0.547766252 6 236-266			0.149010010	0.447091019	3	170 107	57, 55 Zstep		
Uamb3 0.261870173 0.53074321 3 148-164 57, 55 2step Uam 50 0.320462317 0.5395562064 3 115-123 57, 55 2step Meredith et al. (2009) Uam D1a 0.282801003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U.amcricanus UamD1a 0.282801003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U.amcricanus UamD13 0.064980568 0.81944809 3 229-237 57, 55 2step UamD13 0.091388989 0.387926612 7 214-238 57, 55 2step UamD112 0.114224445 0.410925726 6 141-160 57, 55 2step UamD118 0.205099847 0.486790835 4 190-202 57, 55 2step UA-BM3-P1B05U 0.096830394 0.404593086 9 224-250 60-49.5 down Sanderlin et al. (2009) UA-BM4-P2A03U 0.24919256 0.542071651 6 250-270 60-49.5 down U.americanus UA series UA-BM4-P2E1H0 0.202771535 0.480258376 3			0.019375029	0.500236315	4	1/3-19/	57, 55 Zstep		
Uam B103 0.334062317 0.595520544 3 115-123 57, 55 25tep Meredith et al. (2009) Uam series Uam D1a 0.2822801003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U. americanus Uam D3 0.664980568 0.81944809 3 229-237 57, 55 2step U. americanus Uam D103 0.091388989 0.387926612 7 214-238 57, 55 2step U. americanus Uam D112 0.114224445 0.41092726 6 141-160 57, 55 2step Uam D13 0.340746453 0.6057365 3 151-159 57, 55 2step Uam D14 0.202771535 0.480290835 4 190-202 57, 55 2step Uam D18 0.202771535 0.480256376 3 258-266 60-49.5 down Uam D19 UA-BM3-P1H010 0.202771535 0.480256376 3 258-266 60-49.5 down Uamericanus UA-BM4-P2110 0.28964463 0.547756252 6 236-256 60-49.5 down U. americanus U			0.2618/01/5	0.530745321	3	148-164	57, 55 Zstep		
Uam series UamC11 0.729456019 0.855975116 2 160-168 57, 55 2step Uamota mericanus UamD1a 0.282801003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down U.americanus UamD3 0.664980568 0.81944809 3 229-23 57, 55 2step UamD13 0.091388989 0.387926612 7 214-238 57, 55 2step UamD112 0.114224445 0.410925726 6 141-160 57, 55 2step UamD113 0.340746453 0.6057365 3 151-159 57, 55 2step UA-BM3-P1B05U 0.20989847 0.48059086 9 224-250 60-49.5 down UA-BM4-P1H10U 0.202771535 0.480256376 3 258-266 60-49.5 down Sanderlin et al. (2009) UA-BM4-P2A03U 0.2049919256 0.542071651 6 250-270 60-49.5 down U.americanus UA-BM4-P2A03U 0.201498395 0.495385937 6 108-179 49 U.americanus		UamB103	0.334062317	0.595562064	3	115-123	57, 55 2step		Meredith et al (2009)
UamD1a 0.282801003 0.566165103 6 123-144 60-49.5 down 61 anticidade UamD3 0.664980568 0.81944809 3 229-237 57, 55 2step UamD103 0.091388989 0.387926612 7 214-238 57, 55 2step UamD112 0.114224445 0.410925726 6 141-160 57, 55 2step UamD113 0.340746453 0.6057365 3 151-159 57, 55 2step UamD118 0.205099847 0.486790835 4 190-202 57, 55 2step UA-BM3-P1B05U 0.096830394 0.404593086 9 224-250 60-49.5 down UA-BM4-P2H01U 0.202771535 0.480266376 3 258-266 60-49.5 down UA-BM4-P2A03U 0.249919256 0.542071651 6 250-270 60-49.6 down U. americanus UA-BM4-P2E1H0 0.20864463 0.547756252 6 236-256 60-49.5 down U. americanus UA-BM4-P2E1H0 0.201498395 0.495385937 6 108-179 49 UT1 1 1 17	Uam series	UamC11	0.729456019	0.855975116	2	160-168	57, 55 2step		II americanus
UamD3 0.664980568 0.81944809 3 229-237 57, 55 2step UamD103 0.091388989 0.387926612 7 214-238 57, 55 2step UamD112 0.114224445 0.410925726 6 141-160 57, 55 2step UamD113 0.340746453 0.6057365 3 151-159 57, 55 2step UAmBM3-P1B050 0.09680394 0.404593086 9 224-250 60-49.5 down UA-BM3-P1B10U 0.202771535 0.480256376 3 258-266 60-49.5 down UA-BM4-P2A03U 0.249919256 0.542071651 6 250-270 60-49.5 down UA-BM4-P2E11U 0.289664463 0.547756252 6 236-256 60-49.5 down U. americanus UA-BM4-P2E11U 0.289664463 0.547756252 6 236-256 60-49.5 down U. americanus UA-BM4-P2E11U 0.289664463 0.547756252 6 236-256 60-49.5 down U. americanus UA-BM4-P2E11U 0.289664463 0.547756252 6 108-179<		UamD1a	0.282801003	0.566165103	6	123-144	60–49.5 down		er unieneunde
UamD103 0.091388989 0.387926612 7 214-238 57, 55 2 step UamD112 0.114224445 0.410925726 6 141-160 57, 55 2 step UamD113 0.340746453 0.6057365 3 151-159 57, 55 2 step UamD118 0.205099847 0.486790835 4 190-202 57, 55 2 step UA-BM3-P1B05U 0.096830394 0.404593086 9 224-250 60-49.5 down UA-BM4-P1H10U 0.202771535 0.480256376 3 258-266 60-49.5 down Sanderlin et al. (2009) UA-BM4-P2A03U 0.24919256 0.542071651 6 250-270 60-49.5 down U. americanus UA-BM4-P2E10U 0.289664463 0.547756252 6 236-256 60-49.5 down U. americanus UA-BM4-P2E10U 0.201498395 0.495385937 6 108-179 49 UT1 1 1 1 170 64 U. americanus Ut series UT29 0.30675243 0		UamD3	0.664980568	0.81944809	3	229-237	57, 55 2step		
UamD112 0.114224445 0.410925726 6 141-160 57, 55 2step UamD113 0.340746453 0.6057365 3 151-159 57, 55 2step UamD118 0.20599847 0.486790835 4 190-202 57, 55 2step UA-BM3-P1B05U 0.096830394 0.440593086 9 224-250 60-49.5 down UA-BM4-P1H10U 0.202771535 0.480256376 3 258-266 60-49.5 down UA-BM4-P2E11U 0.202771535 0.480256376 3 258-266 60-49.5 down UA-BM4-P2E11U 0.284919256 0.542071651 6 250-270 60-49.5 down U. americanus UA-BM4-P2E11U 0.284919256 0.542071651 6 236-256 60-49.5 down U. americanus UA-BM4-P2E10U 0.201498395 0.495385937 6 108-179 49 UT1 1 1 1 170 64 U. americanus Ut series UT4 0.087652642 0.386850802 6 145-162 </td <td></td> <td>UamD103</td> <td>0.091388989</td> <td>0.387926612</td> <td>7</td> <td>214-238</td> <td>57, 55 2step</td> <td></td> <td></td>		UamD103	0.091388989	0.387926612	7	214-238	57, 55 2step		
UamD113 0.340746453 0.6057365 3 151-159 57, 55 2 step UamD118 0.205099847 0.486790835 4 190-202 57, 55 2 step UA-BM3-P1B05U 0.096830394 0.446790835 4 190-202 57, 55 2 step UA-BM3-P1B05U 0.096830394 0.440593086 9 224-250 60-49.5 down UA-BM4-P2H10U 0.202771535 0.480256376 3 258-266 60-49.5 down UA-BM4-P2E11U 0.289664463 0.542071651 6 220-270 60-49.5 down U. americanus UA-RM3-P2H03U 0.249919256 0.542071651 6 236-256 60-49.5 down U. americanus UA-RM3-P2H03U 0.201498395 0.495385937 6 108-179 49 UT1 1 1 1 170 64 Utamericanus UT4 0.087652642 0.386850802 6 145-162 56 Shih et al. (2009) UT35 0.123571318		UamD112	0.114224445	0.410925726	6	141-160	57, 55 2step		
UamD118 0.205099847 0.486790835 4 190-202 57, 55 2step UA-BM3-P1B05U 0.096830394 0.404593086 9 224-250 60-49.5 down UA-BM4-P1H10U 0.202771535 0.480256376 3 258-266 60-49.5 down UA-BM4-P2A03U 0.249919256 0.542071651 6 250-270 60-49.6 down U.americanus UA-BM4-P2A03U 0.249919256 0.542071651 6 250-270 60-49.6 down U.americanus UA-BM4-P2E11U 0.289664463 0.547756252 6 236-256 60-49.5 down U.americanus UT1 1 1 1 170 64 U.americanus U.americanus Ut series UT29 0.300675243 0.562081363 6 170-214 64 U.thibetanus UT35 0.123571318 0.419923442 6 198-218 64 U.thibetanus		UamD113	0.340746453	0.6057365	3	151-159	57, 55 2step		
UA-BM3-P1B05U 0.096830394 0.404593086 9 224-250 60-49.5 down UA-BM4-P1H10U 0.202771535 0.480266376 3 258-266 60-49.5 down Sanderlin et al. (2009) UA-BM4-P2A03U 0.202771535 0.480266376 3 258-266 60-49.5 down Sanderlin et al. (2009) UA-BM4-P2E11U 0.289664463 0.547756252 6 236-256 60-49.5 down U. americanus UA-BM3-P2H03U 0.201498395 0.495385937 6 108-179 49 UT1 1 1 1 170 64 Ut series UT29 0.300675243 0.562081363 6 170-214 64 U. thibetanus UT35 0.123571318 0.419923442 6 198-218 64 U. thibetanus		UamD118	0.205099847	0.486790835	4	190-202	57, 55 2step		
UA series UA-BM4-P1H10U UA-BM4-P2A03U 0.202771535 0.480256376 3 258-266 60-49.5 down Sanderlin et al. (2009) UA series UA-BM4-P2A03U 0.249919256 0.542071651 6 250-270 60-49.5 down U.americanus UA-BM4-P2E11U 0.289864463 0.547756252 6 236-256 60-49.5 down U.americanus UA-RM3-P2H03U 0.201498395 0.495385937 6 108-179 49 UT1 1 1 170 64 UT4 0.087652642 0.386850802 6 145-162 56 UT series UT29 0.300675243 0.562081363 6 170-214 64 U.thibetanus UT35 0.123571318 0.419924422 6 198-218 64 U.thibetanus		UA-BM3-P1B05U	0.096830394	0.404593086	9	224-250	60-49.5 down		
UA series UA-BM4-P2A03U UA-BM4-P2E11U 0.249919256 0.289664463 0.542071651 6 250-270 60-49.6 down Uarmine Call (2009) UA-BM4-P2E11U 0.289664463 0.547756252 6 236-256 60-49.5 down U americanus UA-RM3-P2H03U 0.201498395 0.495385937 6 108-179 49 49 UT1 1 1 170 64 UT4 0.087652642 0.386850802 6 145-162 56 Shih et al. (2009) UT35 0.123571318 0.419923442 6 198-218 64 U. thibetanus		UA-BM4-P1H10U	0.202771535	0.480256376	3	258-266	60–49.5 down		Sandarlin at al (2009)
UA-BM4-P2E11U 0.289664463 0.547756252 6 236-256 60-49.5 down D. aniencands UA-RM3-P2H03U 0.201498395 0.495385937 6 108-179 49 UT1 1 1 170 64 UT4 0.087652642 0.386850802 6 145-162 56 UT29 0.300675243 0.562081363 6 170-214 64 U.thibetanus UT35 0.123571318 0.419923442 6 198-218 64 U.thibetanus	UA series	UA-BM4-P2A03U	0.249919256	0.542071651	6	250-270	60–49.6 down		
UA-RM3-P2H03U 0.201498395 0.495385937 6 108-179 49 UT1 1 1 170 64 UT2 0.087652642 0.386850802 6 145-162 56 UT35 0.123571318 0.49922442 6 198-218 64 UT35 0.123571318 0.49922442 6 198-218 64		UA-BM4-P2E11U	0.289664463	0.547756252	6	236-256	60-49.5 down		0. americanus
UT1 1 1 170 64 UT4 0.0875642 0.386850802 6 145–162 56 Ut series UT29 0.300675243 0.562081363 6 170–214 64 Shih et al. (2009) UT35 0.123571318 0.419923442 6 198–218 64 U. thibetanus		UA-RM3-P2H03U	0.201498395	0.495385937	6	108-179	49		
UT4 0.087652642 0.386850802 6 145-162 56 Shih et al. (2009) Ut series UT29 0.300675243 0.562081363 6 170-214 64 U. thibetanus UT35 0.123571318 0.419923442 6 198-218 64 U. thibetanus		UT1	1	1	1	170	64		
Ut series UT29 0.300675243 0.562081363 6 170-214 64 Similar and the constraint of the		UT4	0.087652642	0.386850802	6	145-162	56		Shih et al. (2009)
UT35 0.123571318 0.419923442 6 198-218 64 0. University of the second se	Ut series	UT29	0.300675243	0.562081363	6	170-214	64		11 thibetonus
		UT35	0.123571318	0.419923442	6	198-218	64		O. LINDELAINUS
U138 0.053139229 0.3498////8 10 166-210 56	-	UT38	0.053139229	0.349877778	10	166-210	56		

* Pid (sib)は血縁個体の存在を考慮した Pid

調査した 50 種類のマーカーのうち、Pid が 0.25 以下となるマーカーが 23 種類見られた。これ までのヘア・トラップ調査で用いられてきた G、MSUT、UarMU の各マーカーの中には、比較的 に高い Pid 値を示す遺伝子座が見られた一方、4 塩基反復配列の Uam series では、Pid 値が 0.1 以 下と特に低いマーカーが 3 種類、確認された。

個体数推定のために遺伝子分析を行う場合、どれくらいの数の遺伝子座を用いるべきかについては、データの正確性と費用対効果の両面から論議されている(Creel et al., 2003; McKelvey and Schwartz, 2004, Paetkau, 2004)。使用する遺伝子座の数が少ない場合には異なる個体を同一個体と

誤判定する可能性が増える。一方、遺伝子座の数が多い場合には、遺伝子型の読み取り間違いに よって同一個体を異なる個体と誤判定する可能性が増え、分析コストも増加する。本研究では、 上述の先行研究を参考にして、国内のヘア・トラップ調査で使用されている遺伝子座が 6~9 種類 であること(**付表 1**)、一調査当たり数百以上のサンプルを処理することを考慮して、使用する遺 伝子座数を6と定めた。さらに、調査対象地域の遺伝的多様性が低く6遺伝子座では個体識別が 困難な場合には、必要に応じて3種類の遺伝子型を追加で分析することとした。最初に分析する 6 遺伝子座は、地域集団において Pid が低い遺伝子座から順に選び、3 遺伝子座を 1 set とする multiplex PCR により遺伝子型を判定する手順とした。Multiplex の組み合わせとして可能なマーカ ーセット(multiplex A, B, C sets)を表2に示し、multiplex PCR の標準的な手順(標準プロトコール) を章末に記載した(M-1)。Multiplex A set と B set では、これまでの各試験研究機関の調査におい てデータが蓄積されてきた G, MSUT, UarMU series の中から、比較的に Pid が低いマーカーを選択 した。これらのセットは、従来の調査で得られたデータとの継続性を考慮したものである。 Multiplex C set は、より検出感度(Pid)の良いマーカーを組み合わせた新たなセットで、使用で きる遺伝子座が費用面で限られている場合や、対象集団の遺伝的多様性が低下している場合に効 果的であるように考慮している。なお、実地適用にあたっては、本研究の結果を参考にして、対 象集団の遺伝的多様性のレベルに応じて、用いるマーカーの組み合わせを選択することが望まし い。

遺伝子座	対立遺伝子サイズ	蛍光ラベル (G5 set)	蛍光ラベル (C set)	multiplex set	アニーリング 温度
A		FAM	FAM		
С		PET	TET	٨	40~50°C
MSUT6		NED	HEX	~	49.0390
		VIC			
Х		FAM	FAM		
Р		PET	TET	D	55°C
Μ		NED	HEX	D	55 C
		VIC			
UamD103		FAM	FAM		
UT35		PET	TET	0	56°C
UT38		NED	HEX	U	50 C
		VIC			

表 2 Multiplex PCR のマーカーセット(組み合わせ例)

2-2. PCR 反応条件の検討

体毛から得られる DNA は微量であり、回収状況によっては劣化している場合もある。そのため、 PCR で用いる耐熱性 DNA polymerase の種類によって、遺伝子型判別の成功率が大きく左右される 可能性がある。現在、国内のヘア・トラップ調査で用いられている耐熱性 DNA polymerase は、Ex Taq (TaKaRa)、Ex Taq HS (TaKaRa)、PrimeSTAR GXL (TaKaRa)、KOD FX (TOYOBO)、Ampli Taq Gold (Applied Biosystem Inc)などであるが (付表 1)、それらの酵素の性能に関する網羅的な比較は行わ れていなかった。そのため、本研究では、上述の6種類の酵素に加えて、Blend Taq-Plus- (TOYOBO)、 AccuPrime GC-Rich (Invitrogen)の酵素と、マイクロサテライト分析用試薬キットとして市販されて いる QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN)の合計8種類の酵素を用いて、微量 DNA をサンプルに した場合の、PCR 成効率を比較した。PCR 効率を調べるための標準 DNA サンプルとして、山形 県で捕獲されたツキノワグマ 4 個体の筋肉から抽出した DNA を用いた。ヘア・トラップでは、 PCR に用いるサンプル DNA の量が数 pg のオーダーになることを考慮して、標準 DNA を 1 反応 あたり 10ng、1ng、100pg の 3 段階に希釈したものを用いた。

まず、最初に single PCR での比較を行った。マイクロサテライトマーカーG1A を増幅し、反応 後は全サンプルを 2% Ultra low range agarose gel (BioRad 社)を用いた電気泳動により分析して、 PCR 反応産物の有無を確認して増幅成功率を求めた (表 3-1、表 3-2)。TaKaRa Ex Taq、Qiagen microsatellite kit が最も成績がよく、PrimeSTAR、TaKaRa Ex Taq HS、Blend Taq-Plus-がそれに次ぐ 結果となった。

酸素の薄類	1反応あたりのサンプルDNA量				
肝系の性類	10ng	1ng	100pg		
PrimeSTAR	100	100	75		
TaKaRa EX HS	100	100	75		
TaKaRa EX	100	100	100		
QIAGEN microsatellite Kit	100	100	100		
KOD FX	100	100	0		
Blend Taq -Plus-	100	100	75		
AccuPrime GC-rich	100	75	0		
AmpliTaq Gold	100	100	75		

表 3-1 Single PCR における PCR 用酵素の増幅成功率

酵素の薄精	<u>1反応あたりのサンフルDNA重</u>				
肝赤の住丸	10ng	1ng	100pg		
PrimeSTAR	100	100	75		
TaKaRa EX HS	100	100	0		
TaKaRa EX	100	100	25		
QIAGEN microsatellite Kit	100	100	0		
KOD FX	100	100	25		
Blend Taq -Plus-	100	100	50		
AccuPrime GC-rich	100	50	0		
AmpliTaq Gold	100	100	25		

表 3-2 Single PCR における PCR 用酵素の増幅成功率

同様に、Multiplex B set で PCR を行い、増幅成功率を求めた。PrimeSTAR がもっとも成績が良 く、TaKaRa Ex Taq、KOD FX、Blend Taq-Plus-の成績が良かった。TaKaRa EX Taq の増幅成功率は 高いが、非特異的増幅(スメア)が確認されることから、必ずしもマイクロサテライト分析に適 するとは結論づけられなかった。一方、PCR 開始時に 94℃5 分以上の熱変性を行うことで抗体が 非活性化して反応が開始される TaKaRa EX Taq HS では、PCR 産物にスメアは確認されないが、 Taq と比較した場合、増幅成功率は低かった。

本研究の結果では、ヘア・トラップ調査で得られるクマ類の微量 DNA の増幅には、Single PCR と Multiplex PCR のいずれでも、PrimeStar、Blend Taq-Plus-が安定した結果を与えることが明らか になった。また、TaKaRa Ex Taq については、増幅効率は優れているが、非特異的増幅が生じる場合があるため、マイクロサテライト分析では必ずしも推奨されない。

2-3. 性判別方法の検討

ヘア・トラップで捕捉された個体の性が判れば、個体情報として個体数推定に役立つと考えら れる。しかし、毛サンプルから得られる DNA は微量であることと、性判別のためのコストが増え るため、ヘア・トラップ調査では、性判別は副次的に行われるにとどまっている(付表1)。しか し、性判別はサンプルの個体識別にも役立つことから、本研究では性判別をヘア・トラップで必 ず実施すべき調査項目と位置付けて、サンプルの消費やコストを考慮した効率的な性判別の作業 手順を定めることを検討した。

遺伝マーカーを用いたクマ類の性判別では、SRY 遺伝子、ZF 遺伝子、アメロゲニン遺伝子を用 いる方法がある(Yamamoto et al., 2002; Pages et al., 2009, for review)。本研究では、PCR 産物のサ イズがマイクロサテライトマーカーとほぼ同じ範囲にありフラグメント長の違いで雌雄が区別で きるアメロゲニン遺伝子を用いた性判別法を標準法として採用した。性判別のためにサンプルを 分割する手順と、アメロゲニン遺伝子を増幅する手順を、標準プロトコールとして取りまとめた (別添 M-2)。

2-4. 精度検証方法の検討

ヘア・トラップ法では遺伝子型の誤判定が個体数推定の精度に大きく影響を与える。エラーデ ータを生じる主な原因としては、遺伝子型の読み取り間違いや allelic dropout や null allele による 対立遺伝子の未検出があげられる。そのため、本研究では、遺伝子型の読み取り間違いを防ぐた めに、標準サンプルを用いたサイズによるデータ較正の手順(2-4-1)を定めた。また、ヘア・ト ラップ調査で得られた遺伝子型データから、エラーデータを検出して、再解析する手順(2-4-2) を定めた。

2-4-1. 対立遺伝子サイズを較正する方法の検討

ヘア・トラップサンプルの遺伝子分析に複数の試験研究機関が関わる場合、分析機関によって 読み取られる対立遺伝子サイズが異なる場合がある。この違いを生じる原因としては、ジェネテ ィックアナライザの使用環境の違いや、サイズスタンダードの違いなどが考えられる。同じ対立 遺伝子を複数の分析機関で異なるサイズとして読み取った場合にはエラーデータを生じるため、 その防止策として、本研究では標準サンプルによるサイズ較正方法を定めた。

そのために、まず、ツキノワグマ 8 個体(2006 年から 2009 年に山形県鶴岡市及び酒田市で捕 獲されたオス 3 個体、メス 5 個体)の筋肉からフェノール・クロロホルム法を用いて、純度の高 い DNA を大量に抽出し、小分けしてサイズ較正用の標準サンプルとした。この標準サンプルを山 形大学、(株)野生動物保護管理事務所、岩手県環境保健研究センター、北海道環境科学研究セン ターの 4 機関で同時に分析して、対立遺伝子サイズの同一性を検証したところ、遺伝子座によっ ては機関により読み取りサイズが異なる例が見られた。この結果を参考にして、ヘア・トラップ 調査に関わる試験研究機関に対する標準サンプルの配布体制を整備するとともに、以下のように 対立遺伝子サイズを較正する手順を定めた。

- (i) 対立遺伝子サイズのデータ較正を希望する試験研究機関は、自然環境研究センターを通じ て山形大学から標準サンプルを入手する。
- (ii) 各機関の分析環境で、標準サンプルの対立遺伝子サイズを決定する。
- (iii) 分析結果を、事前に測定されている標準サンプルの遺伝子型データと比較することにより、

読み取りサイズを較正する。サイズの補正については COMBI.PI (Täubert et al., 2008)を使用 する。

次年度から、標準サンプルの配布に関する情報を、自然環境研究センターが開設する HP 上で 公開する予定で、配布用として 100 回分の標準サンプルを山形大学で保管している。

2-4-2. エラーデータの検出方法と再解析手順の検討

遺伝子型の誤判定率(エラーレート)が事前に分かっていれば、エラーデータを考慮した個体 数推定ができる(Dreher et al., 2007)。しかし、実際にはヘア・トラップ調査の真の誤判別率を知 ることは困難であることが多い。したがって、本研究では、Peatkau (2003)に基づき、ヘア・トラ ップ調査で得られた遺伝子型データからエラーデータを検出して、修正または除外する方法を選 んで、その手順を以下のように定めた。

- (i) GENECAP (Wilberg and Dreher, 2004)を用いて、サンプル中から1または2遺伝子座のみ 遺伝子型が異なっているサンプルを検出する。
- (ii) 遺伝子型の読み取りミスが無いか、元データを確認する。
- (iii) 読み取りミスが無い場合には、不一致の遺伝子座について、single PCR で再解析を行い、 データを修正する。
- (iv) 分析エラーが含まれているか、Ezamining-Biomodality Test と Difference-in-Capture History Test (Mckelvey and Schwartz, 2004) で確認する。この解析には DROPOUT (Mckelvey and Schwartz, 2005) を使用する。null allele の有無を Micro-checker (van Oosterhout et al., 2003) で確認する。
- (v) 分析エラーが含まれていると判定された遺伝子座については、さらに再解析を行うか、 個体数推定にもちいるデータから除外する。
- (vi) 再解析用サンプルが残っている場合には、新たな multiplex PCR set により、新たな遺伝 子座を分析する。

2-5. 標準的な分析手順(プロトコール)の検討

標準的な分析手順を次のように定めた (図1)。

- (i) DNA サンプルの分割・保存
 ヘア・トラップで得られる DNA は微量であるため、サンプルを消費・汚染する可能性がある分光光学的定量は行わずに、サンプルを分析用と予備用に分割し、予備用は-20 度で保存する。
- (ii) 遺伝子増幅

マイクロサテライト遺伝子座6種類を2 sets の multiplex PCR で増幅する。前節 2-2-4-2 の 手順でデータチェックを行い、再解析または新たなマイクロサテライト遺伝子座の PCR を行 う。標準プロトコール (M-1)

(iii) 性判別

アメロゲニン遺伝子による性判別を行う。標準プロトコール(M-2)



図 1 ヘア・トラップで得られたサンプル DNA の分析手順 (サンプル量 10ul あたりの例を示す)

引用文献

- Creel, S., Spong, G., Sands, J. L., Rotella, J., Zeigle, J., Joe, L., Murphy, K. M. and Smith, D. 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-porne noninvasive microsatellite genotypes. Molecular Ecology 12: 2003-2009.
- Dreher, B. P., Winterstein, S. C., Scribner, K. T., Lukacs, P. M., Etter, D. R., Rosa, G. J. M., Lopez, V. A., Libants, S. and Filcek, K. B. 2007. Noninvasive estimation of black bear abundance incorporating genotyping errors and harvested bear. Journal of Wildlife Management 71: 2684-2693.
- Itoh, T., Sato, Y., Mano, T. and Iwata, R. 2009. Estimating a suitable microsatellite marker set for individual identification and parentage tests of brown bear (*Ursus arctos*) in the Akan-Shiranuka region, eastern Hokkaido, Japan. Journal of Forest Research 14: 117-122.
- Kitahara, E., Isagi, Y., Ishibashi, Y. and Saitoh, T. 2000. Polymorphic microsatellite DNA markers in the Asiatic black bear *Ursus thibetanus*. Molecular Ecology 9: 1661-1662.
- McKelvey, K. S. and Schwartz, M. K. 2004. Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. Journal of Wildlife Management 68: 439-448.
- McKelvey, K. S. and Schwartz, M. K. 2005. DROPOUT: a program to identify problem loci and samples

for noninvasive genetic samples in a capture-mark-recapture framework. Molecular Ecology Notes 5:716-718.

- Meredith, E. P., Rodzen, J.A., Banks, J. D. and Jones, K. C. 2009. Characterization of 20 tetranucleotide microsatellite loci in black bear (*Ursus americanus*) for used in forensic and population applications. Conservation Genetics 10: 693-696.
- 森光由樹 2008 各都道府県のヘア・トラップ調査の実施状況と長野県における実施例 哺乳類 科学 48:133-138.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. and Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. Molecular Ecology 4: 347-354.
- Peatkau, D. 2003. An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. Molecular Ecology 12: 1375-1387.
- Paetkau, D. 2004. The optimal number of markers in genetic capture-mark-recapture studies. Journal of Wildlife Management 68: 449-452.
- Pages, M., Maudet, C., Bellemain, E., Taberlet, P., Hughes, S. and Hanni, C. 2009. A system for sex determination from degraded DNA: a useful tool for palaeogenetics and conservation genetics of ursids. Conservation Genetics 10: 897-907.
- Sanderlin, J. S., Faircloth, B. C., Shamblin, B. and Conroy, M. J. 2009. Tetranucleotide microsatellite loci from the black bear (*Ursus americanus*). Molecular Ecology Resources 9: 288-291.
- 佐藤喜和、湯浅卓 2008. ヘア・トラップを用いたクマ類の個体数推定法:概要と注意点 哺乳 類科学 48:101-107
- Shih, C. C., Huang, C. C., Li, S. H., Hwang, M. H. and Lee, L. L. 2009. Ten novel tetranucleotide microsatellite DNA markers from Asiatic black bear, Ursus thibetanus. Conservation Genetics (on line)
- Taberlet, P., Camarra, J. J., Griffin, S., Uhres, E., Hanotte, O., Waits, L. P., Dubois-Paganon, C., Burke, T. and Bouvet, J. 1997. Noninvasive genetic tracking of endangered Pyrenean brown bear population. Molecular Ecology 6: 869-876.
- Taubert, H. and Bradley, D. G. 2008. COMBI.PL: a computer program to combine data sets with inconsistent microsatellite marker allele size information. Molecular Ecology Resources 8, 572–574.
- 釣賀一二三、間野勉 2008. 北海道渡島半島におけるヒグマ保護管理計画とモニタリング 哺乳 類科学 48:91-100
- 湯浅卓、佐藤喜和 2008. ヘア・トラップを用いたクマ類の個体数推定法における課題—国内外 の事例の比較検討— 哺乳類科学 48:109-118.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. and Shipley, P. 2004. MICRO=CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4: 535-538.
- Waits, L. P., Luikart, G. and Taberlet, P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. Molecular Ecology 10: 249-256.
- Wilberg, M. J. and Dreher, B. P. 2004. GENECAP: a program for analysis of nuclear data for capture-recapture population estimation. Molecular Ecology Notes 4: 783-785.
- Yamamoto, K., Tsubota, T., Komatsu, T., Katayama, A., Murase, T., Kita, I. and Kudo, T. 2002. Sex identification of Japanese black bear, Ursus thibetanus japonicas, by PCR based on amelogenin gene.

Journal of Veterinary Medical Sciences 64: 505-508.

- 山内貴義、斎藤正恵 2008. 岩手県におけるヘア・トラップの実施状況と今後の課題. 哺乳類科学 48:125-131.
- 山内貴義、佐藤宗孝、辻本恒徳、青井俊樹 2008. 岩手県のツキノワグマ保護管理に関わるモニ タリング調査とその課題 哺乳類科学 48:83-89

クマ類の体毛 DNA 分析標準プロトコール

M1. Multiplex PCR によるマイクロサテライト遺伝子の増幅

M1-1 反応溶液の組成

template DNA	1.0 µL	
10x PCR buffer	1.5 μL	
dNTP mix	1.2µL	
1.5mM MgCl ₂	0.9 µL	
0.1% BSA	0.75 μL	
Primer A-forward	0.075µL	(注1、2)
Primer A-reverse	0.075µL	
Primer B-forward	0.05µL	
Primer B-reverse	0.05µL	
Primer C-forward	0.075µL	
Primer C-reverse	0.075µL	
Taq polymerase	0.15 μL	(注3)
H ₂ O	9.1 μL	
Total volume	15 µL	

注 1. primer の原液濃度は 100µM

注 2. primer A、B、C の組合せを表 2-2 から選択する

注 3. 使用する DNA polymerase を表 2-4 から選択する

M1-2 PCR の反応条件

1. 変性	97°C, 3分
2. 変性	97℃, 30秒
3. アニーリング	53~63℃,90秒 (注1)
4. 伸長	72℃, 30秒
(2から4のステップを	15 サイクル繰り返す)
5. 変性	97℃, 30秒
6.アニーリング	55~65℃,90秒 (注2)
7. 伸長	72℃, 30秒
(5から7のステップ	を 15 サイクル繰り返す)
8. 伸長	72℃, 30分
9. 反応停止	4°C

注1. 使用するプライマーセットのアニーリング温度(表 2-2, 第1 サイクル用)を使用する 注2. 使用するプライマーセットのアニーリング温度(表 2-2, 第2 サイクル用)を使用する

M2. Amelogenin 遺伝子の増幅

M2-1 反応溶液の組成

		-
template DNA	1.0 µL	
10x PCR buffer	1.5 μL	
dNTP mix	1.2 µL	
1.5mM MgCl ₂	0.9 μL	
SE47	0.075µL	(注1)
SE48	0.075µL	
Taq polymerase	0.15 µL	(注2)
H ₂ O	4.65 μL	
		_
Total volume	15 μL	

注 1. GeneScan を用いて波形解析を行う場合は、SE47の蛍光プライマーを用いる。

注 2. 使用する DNA polymerase を表 2-4 から選択する

M2-2 PCR の反応条件

1.	変性	97℃,3分
2.	変性	97℃, 30秒
3.	アニーリング	60℃,90秒
4.	伸長	72℃, 30秒
(27	から4のステップを	30 サイクル繰り返す)
5.	伸長	72℃, 30分
6.	反応停止	4°C

M2-3 読み取り

アメロゲニン遺伝子は歯のエナメル質を形成するタンパク質として X 染色体、および Y 染色体の 両方に存在している。X 染色体上と Y 染色体上のアメロゲニン遺伝子の塩基長が異なるため、PCR 産物を電気泳動した際に、オスの場合は2つのバンド、メスの場合は一本のバンドが検出される。



図 M2-1 アガロースゲル電気泳動を用いたアメロゲニン遺伝子の雌雄判別



図 M2-2 フラグメント解析によるアメロゲニン遺伝子の雌雄判別

2.1 DNA 分析法の確立

付表 道府県におけるヘア・トラップ調査で用いられた遺伝子分析の条件

付表1 道府県におけるヘアトラップ調査で用いられた遺伝子分析の条件

旧未工作		作業工程
------	--	------

作業工程		1					1		1	1	
	北海道(2005年)	富山県(2008年)	群馬県(2008年)	神奈川県(2008年)	山梨県(2008年)	奈良県(2008年)	京都府(2008年)	滋賀県(2007年)	岐阜県(2008年)	山形県(2008年)	宮城県(2008年)
1 毛の回収・保存											
クマ毛同定の方法	光学顕微鏡で観察	実体顕微鏡で観察	実体顕微鏡で観察	実体顕微鏡で観察	実体顕微鏡で観察	実体顕微鏡で観察	実体顕微鏡で観察	実体顕微鏡で観察	肉眼・実体顕微鏡で観察	実体顕微鏡で観察	実体顕微鏡で観察
保存方法	紙封筒にいれ冷凍	紙封筒にいれ室温乾燥の 後、冷蔵	紙封筒にいれ室温乾燥の 後、冷蔵	紙封筒にいれ室温乾燥の 後、冷蔵	紙封筒にいれ室温乾燥の 後、冷蔵	紙封筒にいれ室温乾燥の 後、冷凍	紙封筒にいれ室温乾燥の 後、冷凍	紙封筒にいれ室温乾燥の 後、冷凍	紙封筒に入れ乾燥後、冷凍 (マイナス30℃)	紙封筒にいれ冷蔵	紙封筒にいれ冷凍
2 DNA抽出											
使用する毛の本数/サンプ ル	1~3本	1本以上 10本以下	1本以上 10本以下	1本以上 10本以下	1本以上 10本以下	1本以上 10本以下	1本以上 10本以下	1本以上 10本以下	3本以上10本以下	4本以内	4本以内
使用する部位	基部からおよそ5mm	基部から1~2ミリ	基部から1~2ミリ	基部から1~2ミリ	基部から1~2ミリ	基部から1~2ミリ	基部から1~2ミリ	基部から1~2ミリ	毛根部のみ(実体顕微鏡下 で切断)	基部から1センチ	基部から1センチ
毛の状態	毛根の確認されたものだけ 使用	白い紡錘形の毛根部、もしく は黒い鉤状・ヒゲ状の毛根部	白い紡錘形の毛根部、もしく β は黒い鉤状・ヒゲ状の毛根部	白い紡錘形の毛根部、もしく なまい鉤状・ヒゲ状の毛根部	白い紡錘形の毛根部、もしく は黒い鉤状・ヒゲ状の毛根部	白い紡錘形の毛根部、もしく は黒い鉤状・ヒゲ状の毛根部	白い紡錘形の毛根部、もしく は黒い鉤状・ヒゲ状の毛根部	白い紡錘形の毛根部、もしく は黒い鉤状・ヒゲ状の毛根部	毛根のついているもののみ 使用	毛根の有無にかかわらず使 用	毛根の有無にかかわらず使 用
毛のタイプ	guard hairとunder hairの種 類に関わらず使用	guard hairとunder hairの種 類に関わらず使用	guard hairとunder hairの種 類に関わらず使用	guard hairとunder hairの種 類に関わらず使用	guard hairとunder hairの種 類に関わらず使用	guard hairとunder hairの種 類に関わらず使用	guard hairとunder hairの種 類に関わらず使用	guard hairとunder hairの種 類に関わらず使用	guard hairとunder hairの種 類に関わらず使用	guard hairとunder hairの種 類に関わらず使用	guard hairとunder hairの種 類に関わらず使用
抽出方法	phenol/chloroform	DNA Extractor FM Kit (Wako)	DNA Extractor FM Kit (Wako)	DNA Extractor FM Kit (Wako)	DNA Extractor FM Kit (Wako)	DNA Extractor FM Kit (Wako)	DNA Extractor FM Kit (Wako)	DNA Extractor FM Kit (Wako)	DNA Extractor FM Kit (Wako	ISOHAIR	ISOHAIR
 DNA定量	行わず	行わず	行わず	行わず	行わず	行わず	行わず	行わず	分光高度計で定量	行わず	行わず
	冷蔵	冷凍			冷凍		冷凍	冷凍	冷蔵	冷凍	冷凍
3 遺伝マーカー	L					I	L			1	
必ず使うlocus	G1A, G10P, G10X, UarMU05, UarMU23, UarMU50, UarMU51	G1A, G10B, G10M, G10X, MSUT2, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G1A, G10B, G10X, MSUT2, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G1A, G10B, G10C, G1D, G10L, G10X, MSUT2, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G1A, G10B, G10C, G1D, G10L, G10X, MSUT2, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G1A, G10B, G10C, G1D, G10L, G10X, MSUT2, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G1A, G10B, G10X, MSUT2, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G1A, G10B, G10X, MSUT2, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G10C, G10L, G10B, G10P, G10X, G10M	G1A, G10B, G10L, G10X, MSUT1	G1A, G10B, G10L, G10X, MSUT1
上記以外で使うlocus	(Amelogenin)	なし	UarMU50	MSUT4, UarMU50	なし	なし	G10C, G1D, G10L	なし	なし	G10P, MSUT6	G10P, MSUT6
読み取りが容易なlocus		G1A, G10B, G10M, G10X, MSUT2, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G1A, G10B, G10X, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G1A, G10B, G10C, G1D, G10L, G10X, MSUT2, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G1A, G10B, G10C, G1D, G10L, G10X, MSUT2, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G1A, G10B, G10C, G1D, G10L, G10X, MSUT2, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G1A, G10B, G10C, G1D, G10L, G10X, MSUT2, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G1A, G10B, G10X, MSUT2, MSUT6, UarMu05, UarMU23	G10L	G1A	G1A
読み取りが困難なlocus		G10P, MSUT4	G10M, G10P, MSUT4	G10M, G10P	なし	なし	G10P, MSUT4	G10P, MSUT4	G10X, G10M	G10P	G10P
塩基配列の改変の有無	原報どおり	原報どおり	原報どおり	原報どおり	原報どおり	原報どおり	原報どおり	原報どおり	原報どおり	原報どおり	原報どおり
<mark>4 PCRの条件</mark>											
酵素(キット)の種類	AmpliTaq Gold	TaKaRa PrimeSTAR HS DNA polymerase, KOD FX (TOYOBO)	KOD FX (TOYOBO)	KOD FX (TOYOBO)	KOD FX (TOYOBO)	KOD FX (TOYOBO)	KOD FX (TOYOBO)	KOD FX (TOYOBO)	TaKaRa Ex Taq	TaKaRa Taq EX	TaKaRa Taq EX
反応液量	25ul	25ul	25ul	25ul	25ul	25ul	25ul	25ul	15ul	10ul	10ul
鋳型DNA/反応	得られたDNAサンプル(20ul) の5%(1ul)	得られたDNAサンプル(30ul) のうち1ul~3ul	得られたDNAサンプル(30ul) のうち1ul~3ul	得られたDNAサンプル(30ul) のうち1ul~3ul	得られたDNAサンプル(30ul) のうち1ul~3ul	得られたDNAサンプル(30ul) のうち1ul~3ul	得られたDNAサンプル(30ul) のうち1ul~3ul	得られたDNAサンプル(30ul) のうち1ul~3ul	10ng以上	得られたDNAサンプル(10ul) の1割(1ul)	得られたDNAサンプル(10ul) の1割(1ul)
特別な反応条件	hot start(single)	基本はhot start(single), 一部 はhot start(multiplex)	hot start(multiplex)	hot start(multiplex)	hot start(multiplex)	hot start(multiplex)	hot start(multiplex)	hot start(multiplex)	なし	なし	なし
<mark>5 対立遺伝子サイズの測</mark>	定										
サイズスタンダードの種類	GeneScanROX350	GeneScan500LIZ	GeneScan500LIZ	GeneScan500LIZ	GeneScan500LIZ	GeneScan500LIZ	GeneScan500LIZ	GeneScan500LIZ	GeneScan 600 LIZ Size	Promega Internal	Promega Internal
GeneMapper/Genotyper	使用せず	GeneMapper	GeneMapper	GeneMapper	GeneMapper	GeneMapper	GeneMapper	GeneMapper	GeneMapper	使用せず	使用せず
アリルドロップアウト	検定しない	検定しない	検定しない	検定しない	検定しない	検定しない	検定しない	検定しない	検定しない	検定しない	検定しない
6 個体識別											
個体識別の判断基準	1遺伝子座のミスマッチを許 容(アリルドロップアウトの場 合のみ)	全ての遺伝子座が一致する こと	全ての遺伝子座が一致する こと	全ての遺伝子座が一致する こと	全ての遺伝子座が一致する こと	全ての遺伝子座が一致する こと	全ての遺伝子座が一致する こと	全ての遺伝子座が一致する こと	1遺伝子座のミスマッチを許 容+自動撮影カメラの結果も 考慮	全ての遺伝子座が一致する 'こと	全ての遺伝子座が一致する こと
7 再分析											
再分析方法	まず3遺伝子座の分析を実施し、2遺伝子座について増幅が確認されたものについてそれ以降の分析を実施。だめなものは再抽出を行う。決定できなかった遺伝子座、読み取りにくい遺伝子座のみシングルPCR。だめなら結果から除去。ミスマッチについてもシングルPCRで再確認。	決定できなかった遺伝子座 はシングルPCR。2遺伝子座 以下でミスマッチのサンプル についてもシングルPCR。	決定できなかった遺伝子座 はシングルPCR。2遺伝子座 以下でミスマッチのサンプル についてもシングルPCR。	決定できなかった遺伝子座 はシングルPCR。2遺伝子座 以下でミスマッチのサンプル についてもシングルPCR。	決定できなかった遺伝子座 はシングルPCR。2遺伝子座 以下でミスマッチのサンプル についてもシングルPCR。	決定できなかった遺伝子座 はシングルPCR。2遺伝子座 以下でミスマッチのサンプル についてもシングルPCR。	決定できなかった遺伝子座 はシングルPCR。2遺伝子座 以下でミスマッチのサンプル についてもシングルPCR。	決定できなかった遺伝子座 はシングルPCR。2遺伝子座 以下でミスマッチのサンプル についてもシングルPCR。	決定できなかった遺伝子座 が複数あればマルチPCRで 再分析。1座位であればシン グルPCR。再分析で読めなけ れば諦める	決定できなかった遺伝子座 のみシングルPCR。2回マル チPCRをしてだめならば、あ きらめる。	決定できなかった遺伝子座 のみシングルPCR。2回マル チPCRをしてだめならば、あ きらめる。

2.2 クマ類体毛サンプルからの DNA 抽出と分析効率の季節性

山内 貴義(岩手県環境保健研究センター)・近藤 麻実(岐阜大学)

1. はじめに

これまで、ツキノワグマのヘア・トラップ調査は複数の都府県で実施されてきた。その結果、 ヘア・トラップの利用率や遺伝子分析の成功率は調査時期・季節によって異なることが示唆され ている (Sato 2002; 上馬・中谷内 2006; 山内・齊藤 2008)。ヘア・トラップ法による個体数推定 は標識再捕獲法 (Bookhout, 1996)の原理を応用しており、トラップ利用率および分析成功率は原 則として一定であることが前提となる。そのため、両者ともに調査期間中に大きく変動すること は避けなくてはならない。さらに、より精度の高い推定のためには当然多くのサンプルを確保す ることが不可欠であり、そのためにはヘア・トラップ利用率および遺伝子分析成功率ともに高い 値であることが望ましい。これまでの日本でのヘア・トラップ調査の報告では、トラップ利用率 や遺伝子分析の成功率、クマの体毛タイプの季節変化による分析精度の変動などについての基礎 的検討はほとんど行われていない。そこで、我々は調査時期と遺伝子分析成功率との関係に着目 し、ヘア・トラップ調査を行う上で最適な時期を探ることを目的としてモデル地域にヘア・トラ ップを設置し、高頻度・長期間にわたる調査を実施した。

2. 調査地·調査方法

2-1. 調査地

岩手県雫石町の岩手大学御明神演習林(N39°40′, E140°55′)を調査地とした。演習林の総面積は 1,024ha である。図1に示すように、演習林内の3地点にヘア・トラップを5基ずつ設置した(合 計 15 基)。それぞれのトラップ間の距離は 100m 以内である。調査期間は、2009 年 5 月 22 日にへ ア・トラップの設置を開始し同年12月3日に撤去するまでの約7ヵ月間であった。1~2週間を1 セッションとして体毛の回収と誘引餌の交換を行い、全体として 23 セッションを実施した。へ ア・トラップは有刺鉄線を上下2段に張る構造を基本形とし、誘引餌にはりんごとハチミツを同 時に用いた(図2)。有刺鉄線は立木を利用して設置したが、周囲に適当な立木が無い地点では立 木の代わりに園芸用プラスチックポールを地面に挿して利用した。有刺鉄線は下段が地面から約 30~40cm、上段がその上約20~30cmの高さになるよう設置した。地表面の凹凸の状態によって、 クマが容易に通り抜けられる部分があると予想されたトラップに関しては、クマの体毛を確実に 採取するため有刺鉄線の一部を3段にして高さを調節した。このとき最上段の有刺鉄線は2段目 の上 20~30cm になるよう設置した。トラップの 1 辺の長さは立木の位置によってトラップごと に異なるが、それぞれ約2~4mであった。体毛は有刺鉄線の刺ごとに別々の封筒に回収し、近接 した刺から回収された体毛に関してはその封筒に互いに目印をつけた。この目印は、後の遺伝子 分析においてサンプルを選択する場合に利用した。サンプルを選択する必要がある場合とは、1 つの刺からでは分析に十分な体毛本数を確保できない場合であり、そうした場合には近接した刺 から回収した体毛どうしを併せて1サンプルとする。このとき、どの体毛どうしを併せるかとい う組み合わせを選択するために封筒の目印を利用した。このように選択的に体毛を利用したのは、 近接した刺から回収された体毛どうしは同一個体に由来する体毛である可能性が高いと考えられ、 併せて1サンプルとしても複数個体の遺伝子によるコンタミネーションが起こりにくいと予想されたからである。また、体毛の回収時にクマとその他の動物との区別がつかない体毛についても同様に回収した。回収した体毛は研究室まで室温で移送し、研究室に到着後すぐに封筒ごと乾燥機に入れて完全に乾燥させた。その後、遺伝子分析を行うまで-20℃で保存した。



図1 岩手大学御明神演習林およびヘア・トラップ設置位置図 右下図の青線は自動車道.を示す。ヘア・トラップは演習林内3ヵ所に5基ずつ合計15基を設置した(左上図青丸)。



図2 ヘア・トラップ模式図

2-2. 遺伝子分析方法

まずは回収した体毛を目視によって観察し、色・形態・キューティクルの形状などからクマの 体毛かその他の動物の体毛かを判断した。実体顕微鏡を用いて観察してもクマか他の動物か判別 困難な体毛については原則サンプルとしなかった。

図3に示すようにクマ体毛を体毛タイプによって分類した。太くて長く、色素が濃くしなやかな ものを剛毛(guard hair; 以下 G)、細くて短く、色素の薄い柔らかいものを下毛(underfur; 以下 U)、 それ以外の太さや長さが中間的な体毛を中間毛(Intermediate hair; 以下 I) とした(Ryder, M. L., 1973)。封筒ごとにそれぞれの体毛タイプの本数をカウントし、同時に毛根の有無も記録した。体 毛タイプごとに最大10本を1サンプルとし、実体顕微鏡下で毛根を切り取った。1つの封筒だけ では体毛本数が10本に満たない場合は、近接した刺から回収された体毛と併せて10本とした。 複数の刺から回収された体毛を併せても10本に満たない場合は、本数を記録して他のサンプルと 同様の分析を行った。これらのサンプルは DNA Extractor FM kit (和光純薬工業株式会社) を用 いて DNA を抽出した後、マイクロサテライト 6 座位(G10C, G10L, G10B, G10P, G10X, G10M: Paetkau and Strobeck, 1995; Paetkau and Strobeck, 1998) を増幅するプライマーペアを用いて polymerase chain reaction (PCR) を行った(表1)。PCR は複数のプライマーを添加するマルチプ レックス PCR とし、6座位をi)G10C・G10L・G10B およびii)G10 P・G10X・G10M の2つのマル チプレックス系に分けて行った。それぞれのマルチプレックス系について、template DNA 10ng<、 dNTP 0.5µM, MgCl2 1.5mM, BSA 1.0mg/mL, Ex Taq (TaKaRa) 0.05unit/µL, プライマー0.5µM (G10C, G10L, G10M) および 1.0 µM (G10B, G10P, G10X) を合計 15µL になるよう調整し、表2の温度条 件で PCR を実施した。増幅後、マルチプレックス系 i)を 100 倍に、ii)を 150 倍に希釈し、この希 釈溶液各 1µL にホルムアミド 7.75µL および 8 倍希釈した GeneScan 500LIZ Size Standard (Applied Biosystems) 0.25 µL を加えた。ABI PRISM[®] 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にてサン プルを泳動し、GeneMapper V. 4.0 software package (Applied Biosystems)を用いてフラグメント解 析を行った。





表1 プライマー配列

Locus	5' primer	3' primer
G10C	F-AAAGCAGAAGGCCTTGATTTCCTGG	GGGGACATAAACACCGAGACAGC
G10L	V-GTACTGATTTAATTCACATTTCCC	GAAGATACAGAAACCTACCCATGC
G10B	F-GCCTTTTAATGTTCTGTTGAATTTG	GACAAATCACAGAAACCTCCATCC
G10P	V-ATCATAGTTTTACATAGGAGGAAGAAA	TCATGTGGGGAAATACTCTGAA
G10X	F-CCACCTTCTTCCAATTCTC	TCAGTTATCTGTGAAATCAAAA
G10M	V-TTCCCCTCATCGTAGGTTGTA	AATAATTTAAGTGCATCCCAGG

5'側の各プライマーには蛍光標識をつけた。表中では FAM を F, VIC を V と表記した。

表 2 PCR プロトコル

	温度	加熱時間(分)	
最初の熱変性	97°C	3:00	
増幅反応(1回目)			
熱変性	97°C	0:30	
アニーリング	55°C	1:30	imes 15
伸長反応	72°C	0:30	
増幅反応(2回目)			
熱変性	90°C	0:30	
アニーリング	55°C	1:30	$\times 30$
伸長反応	72°C	0:30	
最終的な伸長反応	60°C	30:00	

2-3. 解析方法

誘引餌がクマによって食べられた、もしくは有刺鉄線にクマの体毛がついていたトラップを「利 用トラップ」とした。全15トラップ中の利用トラップの割合を「ヘア・トラップ利用率」として 調査日ごとに算出した。遺伝子分析の結果については、すべての座位でピークが読み取れたもの を「分析成功」、同じ座位に3本以上のピークが検出されたもの(複数個体のコンタミネーション)、 もしくは1座位でもピークが検出されなかったものを「分析失敗」とした。このフラグメント解 析の一例は図4に示した。そして、分析に用いたすべてのサンプル数のうち、分析に成功したサ ンプル数の割合を分析成功率として調査日ごとに算出した。分析成功率と各条件(封筒のカテゴ リ(詳細は後述)・体毛本数・調査日・体毛タイプ)との関係を解析するため、統計ソフト R (http://www.r-project.org/)を用いて、分析成功率を目的変数、各条件を説明変数とした二項分布 のロジスティックモデルで解析を行った。説明変数とした封筒のカテゴリとは、分析した体毛が 1つの封筒から抽出されたものか複数の封筒から抽出されたものかということを表す。1つの封筒 から抽出されたサンプルについては mono、複数のサンプルから抽出されたサンプルについては multi と入力し、mono を基準として変数を評価した。その他の変数については分析成功率の良か ったものを基準とし、調査日は6月10日、体毛タイプはGを基準として各変数の評価を行った。 また、分析した座位によって遺伝子の増幅のしやすさに違いが見られるため、その結果が分析成 功率に影響を及ぼしていると考えられた。そこで、分析成功率と分析座位との関係についても統 計ソフトRを用いて解析を行った。解析は分析成功率を目的変数、分析座位を説明変数とした二 項分布のロジスティックモデルで行い、分析成功率の高い G10L を基準として変数を評価した。

3. 結果

現在のところ、遺伝子分析成功率の解析については 2009 年 8 月末まで終了しており、本報告で はこの時期までの結果のみを示す。一方、ヘア・トラップ利用率については全調査期間の解析結 果を報告する。

ヘア・トラップ利用率の推移を図5に示す。ヘア・トラップ利用率は調査開始の6月上旬で約80%と比較的高い値であったが、7月にかけてさらに上昇した。7月および8月は全調査期間中もっとも高い値を示し、ほぼ100%で推移した。9月になると利用率は急激に低下し、12月初旬の調査期間終了時まで低下し続けた。

体毛タイプ別のサンプル数の推移を図6に示す。7月頃から野外調査で回収できた体毛の数は 増加したが、7月後半から毛根の無い体毛の割合も徐々に増加したため、回収した体毛の数と遺 伝子分析に供したサンプル数は必ずしも比例関係にはならなかった。また、Gは6月に少なく8 月に多いなど、体毛タイプによってはほとんど回収されない時期があった。これらの結果として、 サンプル数は時期によって大きく変動した。GはI・Uと比較して本数が少なく、サンプル数も全 体に少なかった。7月にGのサンプル数は増加したが、その後毛根の無い体毛も増加したため、8 月のサンプル数は減少に転じた。I・Uについても7月後半から毛根の無い体毛が増えたが、回収 できた総数が多かったため、8月に入っても安定して一定のサンプル数が確保できた。

体毛タイプ別の分析成功率の推移を図7に示す。すべての体毛タイプにおいて、6月および7 月前半の遺伝子分析成功率は80~100%と高い値で推移した。しかし、7月後半から分析成功率は ゆるやかに低下し始め、8月にはさらに低下した。これらの分析成功率の変動に対する要因を解 析するため、各変数(封筒のカテゴリ・体毛本数・調査日・体毛タイプ)を用いて二項分布のロ ジスティックモデルで解析を行った。その結果は**表**3に示した。解析の結果、体毛の本数が多い ほど分析成功率は有意に改善された。調査時期に関しては、6月10日と比較して7月29日以降 の成功率は有意に低い値となった(7月29日・8月5日:p<0.05,8月19日・26日:p<0.01)。体毛 タイプに関しては、G,I,Uの順に分析成功率が有意に低下した(I:p<0.05,U:p<0.001)。しかし体 毛タイプ別の8月の分析成功率を見ると、GよりもIの分析成功率の方が高くなった(図7)。そ こで、8月のみのデータを抽出し、同様の解析を行った。その結果は表4に示した。解析の結果 有意差は無かったものの、8月の分析成功率は高い順にI,G,Uとなった。

今回分析したマイクロサテライト座位について二項分布のロジスティックモデルで解析し、座 位ごとに分析成功率を比較した。その結果は表5に示した。分析成功率はG10Lでもっとも高い 結果となった。G10Lと比較して、G10P,G10XおよびG10Mの3座位は有意に分析成功率が低か った(G10P:p<0.001,G10X・G10M:p<0.01)。



それぞれの座位を灰色のバーで示した。座位ごとに検出された対立遺伝子を矢頭 (√)▼で指し示した。 i) 分析成功, ii) 分析失敗(複数ピーク; 黒矢頭 ▼), iii)分析失敗(ピーク無し)



図5 ヘア・トラップ利用率の推移



図6 体毛タイプ別サンプル数の推移



図7 体毛タイプ別分析成功率の推移

	推定値	標準誤差	z値	p值
切片	1.92367	0.81996	2.346	0.018974 *
封筒のカテゴリ (multi)	-0.41454	0.28669	-1.446	0.148199
体毛本数	0.23934	0.04456	5.371	7.82E-08 ***
6/3	-1.08517	0.91099	-1.191	0.233573
6/17	-0.05842	1.30062	-0.045	0.964175
6/24	-0.97936	0.93983	-1.042	0.297382
7/1	-0.27653	1.00421	-0.275	0.78303
7/8	-0.86016	1.02998	-0.835	0.403651
7/15	-1.13021	0.91469	-1.236	0.2166
7/22	-1.21542	0.88803	-1.369	0.171103
7/29	-1.87852	0.87182	-2.155	0.031186 *
8/5	-1.72242	0.85989	-2.003	0.045171 *
8/19	-2.34637	0.8502	-2.76	0.005784 **
8/26	-2.52548	0.86197	-2.93	0.003391 **
中間毛(I)	-0.83069	0.39037	-2.128	0.033339 *
下毛 (U)	-1.48795	0.39945	-3.725	0.000195 ***

表3 各変数と分析成功率との検定結果(全調査期間)

p<0.001: ***, p<0.01: **, p<0.05: *

それぞれの有意差は、封筒のカテゴリは mono, 調査日は 6/10, 体毛タイプは 剛毛(G)を基準にしたものである。

	推定値	標準誤差	z値	p値
切片	0.71599	0.61402	1.166	0.2436
封筒のカテゴリ (multi)	-0.20948	0.4265	-0.491	0.6233
体毛本数	0.07165	0.07314	0.98	0.3273
8/19	-0.75571	0.48579	-1.556	0.1198
8/26	-1.21532	0.54147	-2.244	0.0248 *
中間毛(I)	0.24374	0.61756	0.395	0.6931
下毛(U)	-0.7902	0.60775	-1.3	0.1935

表4 各変数と分析成功率との検定結果(8月のみ)

p<0.05: *

それぞれの有意差は、封筒のカテゴリは mono, 調査日は 8/5, 体毛タイプは 剛毛(G)を基準にしたものである。

	推定值	標準誤差	z値	p値
切片	2.615	0.1994	13.116	< 2e-16 ***
G10C	-0.3342	0.2637	-1.267	0.20498
G10B	-0.2497	0.2682	-0.931	0.35185
G10P	-1.2192	0.2357	-5.173	2.30E-07 ***
G10X	-0.7417	0.248	-2.991	0.00278 **
G10M	-0.6975	0.2495	-2.796	0.00518 **

表 5 マイクロサテライト座位と分析成功率の検定結果

p<0.001: ***, p<0.01: **, p<0.05: *

有意差は G10L を基準にしたものである。

4. 考察

今回の結果から、ヘア・トラップ利用率は6月から8月にかけて高く、9月以降低下すること が示された。クマの行動域は広大であり、時期によって広範囲に移動するなど生息状況が異なる ことが知られている(Izumiyama, 2004; 上馬・山田, 2008 など)。そのため、9月以降のトラップ 利用率の低下はクマが調査地を利用しなかったことに起因する可能性も考えられた。しかし、9 月以降も本調査地内ではクマの目撃例があり、糞などの痕跡も多く見つかった。自動撮影カメラ でもクマが確認されていることから、クマが調査地を利用していたことに相違なかった。図8は 10月に自動撮影カメラで確認されたクマの写真であり、トラップ内に侵入したクマが数分間にわ たって撮影された。しかし、このクマはトラップ内に侵入・滞在したにも関わらず誘引餌を食べ なかった。これらのことから、9月以降はクマがトラップに誘引されにくくなることが示された。 同時期に周囲で確認された糞の内容物から、この時期のクマはおそらく堅果類を選択的に摂取し ているものと推察された。また、堅果類を多く利用できる年には行動域が狭くなることも示唆さ れている(岐阜大学応用生物科学部獣医学講座野生動物医学研究室内 21 世紀 COE プログラムプ ログラム事務局, 2004)。したがってクマがトラップを発見する確率が低下した結果、秋季のトラ ップ利用率が低下した可能性も考えられた。堅果類の少ない凶作年には秋季のトラップ利用率が 高くなるかもしれないが、安定したサンプル数を確実に確保するためにも秋以降の調査設計は不 適であると考える。

二項分布のロジスティックモデルによる解析の結果から、分析に供した体毛の本数が多いほど 遺伝子分析成功率が有意に高くなることが示された。つまり、体毛サンプルに含まれる DNA 量が 分析成功率に強く影響を与えていることが示唆された。これまでの研究報告の中には、複数個体 のコンタミネーションを回避するために少ない体毛から DNA を抽出しているものがある(株式会 社野生動物保護管理事務所, 2007; 森光, 2008; 釣賀, 2008 など)。しかし、最近では 30 本以上の体 毛を DNA 抽出に用いている例もあり、高い分析成功率を示している(Mowat, et al., 2002;山内私 信)。Paetkau (2003) が提唱するように複数本を DNA 抽出に用い、複数個体のコンタミネーショ ンが見られた場合にはそのサンプルを破棄する、という手法の方が最終的には分析成功率の向上 に貢献できると考えられた。体毛タイプ別の分析成功率は、G, I, Uの順に有意に低下した。体毛 の太さ(毛根の大きさ)が体毛タイプによって大きく異なることから、これもサンプルの DNA 含 量が分析成功率に影響をおよぼした結果と考えられた。しかし、表4や図7のように8月の体毛 タイプ別の分析成功率は I が G より高くなっており、8 月に入ると図 6 のように G のサンプル数 が急減した。我々は採取した体毛の毛根の有無も記録しているが、途中で切れて毛根が無い状態 の体毛の割合が8月のGで急増したことを確認している(データ未掲載)。図9は自動撮影カメ ラによる8月の写真であるが、有刺鉄線がクマの背中に当たっていたにも関わらず、このとき体 毛はまったく回収できなかった。これらのことから、8月頃から体毛の状態が変化する可能性が 考えられた。また、6・7月は体毛サンプル数が少ないにも関わらず(図 6)、高い分析成功率を維 持した(図7)。反対に、8月以降のサンプル数は多いが分析成功率は低下した。この現象もクマ の体毛の状態が8月頃から変化することを示唆しており、この時期がサンプル数と分析成功率の 推移が大きく変化する分岐点である可能性が示された。これらのことを勘案すると、分析成功率 を可能な限り一定に保つためには、7月末頃までに調査が終了する計画を立てる必要があると推 測された。我々は本研究内容とは別に、有害捕獲されたクマから体毛サンプルを皮膚ごと採取し ている。このサンプルから皮膚組織切片を作成し、体毛の状態や毛根と皮膚との接続関係などを 検証する準備を現在進めており、今後はこのような組織学的知見も加味しながら考察を進めてい きたい。

マイクロサテライト座位と分析成功率との関係について二項分布のロジスティックモデルによ る解析を行った結果、G10P, G10X および G10M の 3 座位は分析成功率が低いことが示された。こ の 3 座位は G10C, G10L および G10B よりもフラグメントサイズが大きい。つまり、フラグメント サイズが大きくなるほど分析成功率は低くなるということが示唆された。法科学分野において、 陳旧血痕試料を用いたマルチプレックス PCR 系では、増幅断片長の長いものの増幅効率は悪くな ることが明らかになっている(吉田ら, 2002)。ヘア・トラップで扱う体毛サンプルは DNA 含量が 少なく、さらに回収されるまで野外で長期間放置されていることから DNA の劣化が進行している ため、DNA 増幅断片長が大きい座位については検出されにくいことが推察される。近年、クマの マイクロサテライト解析に関して新しくプライマーがいくつか発表されているが(Meredith et al, 2009; Sanderlin et al, 2009 など)、それらのプライマーを導入する際には対立遺伝子の多様性だけで なく、分析のしやすさも十分考慮に入れてフラグメントサイズの小さいものを優先的に選択した 方が良いと考えられた。

以上のように、本研究によってヘア・トラップの調査時期は6・7月が適期であることが示された。今後は9月以降の解析を進め、年間を通じた解析によって調査適期をより詳しく検証する予定である。



図8 トラップ内に入ったクマ(2010年10月18日撮影) このクマはトラップ内にしばらく滞在したが誘引餌はどれも食べなかった。



図9 トラップ内に入ったクマ(2010年8月6日撮影) クマの背中が有刺鉄線に押しつけられるようにあたっているが、このとき体毛は1本もとれなかった。

引用文献

- Bookhout, T. A. 1996. Research and management techniques for wildlife and habitats. The wildlife Society, Bethesda. 邦訳: Bookhout, T. A. 編(日本野生動物医学会・野生生物保護学会監訳, 鈴木正嗣編訳, 2001) 野生動物の研究と管理技術, 文永堂出版, 東京, pp. 505-511.
- 岐阜大学応用生物科学部獣医学講座野生動物医学研究室内 21 世紀 COE プログラム事務局. 2004. 岐阜県本巣郡根尾村ツキノワグマ生息実態調査報告書 平成 14 年度. 岐阜県におけるツキノワ グマの生態と保護管理に関する資料.
- Izumiyama, S. and Shiraishi, T. 2004. Seasonal changes in elevation and habitat use of the Asiatic black bear (Ursus thibetanus) in the Northern Japan Alps. Mammal Study 29: pp. 1-8.
- 株式会社野生動物保護管理事務所. 2007. 平成 18 年度希少動物モニタリング委託業務報告書, pp. 27-44.
- Meredith, E. P., Rodzen, J. A., Banks, J. D. and Jones, K. C. 2009. Characterization of 29 tetranucleotide microsatellite loci in black bear (*Ursus americanus*) for use in forensic and population applications. Conservation Genetics 10: pp. 693-696.
- Ryder, M. L. 1973. The Institute of Biology's Studies in Biology No. 41: Hair. Esward Arnold, London. 邦 訳: M. L. ライダー著(加藤淑裕・木村資亜利訳, 1980) 毛の生物学, 朝倉書店, pp. 46-47.
- 森光由樹. 2008. 各都道府県のヘア・トラップ調査の実施状況と長野県における実施例. 哺乳類科 学 48: pp. 133-138.
- Mowat, G, Poole, K. G, Seip, D. R., Heard, D. C., Smith, R. and Paetkau, D. 2002. Grizzly and black bear densities in interior British Columbia. Auroa Wildlife Research.
- Paerkau, D. and Strobeck, C. 1995. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. Molecular Ecology 4: pp. 519-520.
- Paetkau, D. and Strobeck, C. 1998. Ecological genetics studies of bears using microsatellite analysis. Ursus 10: pp. 299-306.
- Paetkau, D. 2003. An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. Molecular Ecology 12: pp. 1375-1387.
- Sanderlin, J. S., Faircloth, B., C., Shamblin, B. and Michael, J. C. 2009. Terranucleotide microsatellite loci from the black bear (*Ursus americanus*). Molecular Ecology 9: 288-291.
- Sato, Y. 2002. An ecological study on human-bear conflicts in Urahoro, Hokkaido. Ph. D thesis. The University of Tokyo, 91.
- 釣賀一二三.2008. 北海道渡島半島におけるヘア・トラップ調査の実施例. 哺乳類科学 48:119-123.
- 上馬康生・中谷内修.2006. 石川県におけるツキノワグマのヘアートラップ調査(2006年). 石川 県白山自然保護センター研究報告 33:33-40.
- 上馬康生・山田孝樹. 2008. 白山地域のツキノワグマの行動圏と冬眠場所の年変化. 石川県白山自 然保護センター研究報告 35: 23-34.
- 山内貴義・齊藤正恵. 2008. 岩手県におけるヘア・トラップの実施状況と今後の課題. 哺乳類科 学 48:125-131.
- 吉田日南子,千住弘明,藤井宏治,笠井賢太郎,佐藤元. 2002. 市販の多座位 STR 検出キットを用いた法科学的試料からの DNA 型検出. DNA 多型 9: 335-338.

2.3 ヒグマの DNA 個体識別手法の標準化(予報)

釣賀 一二三(北海道環境科学研究センター)

1. はじめに

体毛から抽出した遺伝子の分析による個体識別を応用したヘア・トラップ法は、限られた労力 で、広域に多くの個体に関する情報を扱うことが可能であり、北海道のヒグマ生息動向の把握あ るいは生息密度の推定へ応用すべく、様々な試みが行われてきた。北海道では2000年以降6年間 に亘ってこの手法をヒグマに応用するための検討が実施されており、本報告では、これまでに得 られた知見のうち、特に DNA 分析に関して紹介すると共に、今回新たに取り組んだ内容について 述べる。

2. これまでの取り組み

G10M

G10P

G10X

ヘア・トラップ法を北海道のヒグマに応用するに当たって、最初に選択されたマイクロサテラ イト領域は Paetkau and Strobeck (1994)や Paetkau et al. (1995)で報告された 8 つの遺伝子座(G1A、 G1D、G10B、G10C、G10L、G10M、G10P、G10X)であった。これらの遺伝子座が用いら れたことは、既にヒグマ捕獲個体を用いた遺伝的多様性の評価に応用されつつあり、増幅や対立 遺伝子に関する情報が蓄積されていたことがその理由と考えられる。実際に、ヘア・トラップ法 の試行が行われていた渡島半島地域の電波標識個体 30 頭の DNA を分析したところ、これらの遺 伝子座における分析結果からは、個体識別に十分な遺伝的多様性が検出されており (P_(ID)=3.04×10⁻⁷、P_{(ID)sib}=1.70×10⁻³)(表1)、渡島半島地域のヒグマに対してヘア・トラップ法が 実用可能であることが示唆されている(釣賀、2008)。

- の刈立退1	ムナ奴、ハノロ按	ロ皮の労付値、 $P_{(\mathrm{ID})}$ のよし	ア _{(ID)sib**} (剄貝、	2008より以変)
遺伝子座	対立遺伝子数	ヘテロ接合度の期待値	$P_{(\mathrm{ID})}$	$P_{(\mathrm{ID})\mathrm{sib}}$
G1A	6	0.802	0.078	0.375
G1D	2	0.381	0.461	0.678
G10B	5	0.650	0.183	0.476
G10C	4	0.619	0.231	0.503
G10L	6	0.680	0.139	0.450

0.303

0.062

0.169

0.558

0.360

0.456

0.543

0.825

0.684

表 1 渡島半島地域における電波標識個体のマイクロサテライト分析から得られた、各遺伝子座におけ る対立遺伝子数、ヘテロ接合度の期待値、P_(ID)*および P_{(ID)sib**}(釣賀、2008 より改変)

* P(ID), probability of identity: 2 個体の遺伝子型が偶然一致する確率

4

7

4

** P(ID)sib、 probability of identity among sibs: 血縁関係のある2個体の遺伝子型が偶然一致する確率

一方、Paetkau et al. (1995)以降、クマ類を対象としたマイクロサテライト領域が数多く報告され ており、渡島半島地域を対象にヘア・トラップ調査を実施するに当たって、より個体識別精度の 高い遺伝子座の組み合わせが検討された。前述の 8 遺伝子座を含めた 25 遺伝子座(Paetkau and Strobeck 1994; Paetkau et al. 1995; Taberlet et al. 1997; Paetkau et al. 1998)を用いて 30 頭の電波標識 個体を分析したところ、多様性の高い7 遺伝子座(G1A、G10P、UarMU05、UarMU23、UarMU26、 UarMU50、 UarMU51)を組み合わせることによって、これまでの 8 遺伝子座を用いた場合より も高い識別能 ($P_{(ID)}=5.29\times10^{-9}$ 、 $P_{(ID)sib}=5.72\times10^{-4}$)を示すことが明らかになった(釣賀、2008、表 2)。

表 2 25 遺伝子座のマイクロサテライト領域から選択された 7 遺伝子座について、渡島半島地域の電 波標識個体で得られた各遺伝子座における対立遺伝子数、ヘテロ接合度の期待値、P(ID)*およ び P(ID)sib**(約賀、2008 より改変)

• • ()===				
遺伝子座	対立遺伝子数	ヘテロ接合度の期待値	$P_{(\mathrm{ID})}$	$P_{(\mathrm{ID})\mathrm{sib}}$
G1A	6	0.802	0.078	0.375
G10P	7	0.825	0.062	0.360
UarMU05	4	0.725	0.133	0.427
UarMU23	8	0.780	0.086	0.388
UarMU26	4	0.724	0.135	0.428
UarMU50	7	0.761	0.095	0.399
UarMU51	4	0.742	0.123	0.416

同様の検討は他の地域においても実施されている。 Itoh et al., (2009) は、個体識別と血縁関係の解析を目的に、道東地域の浦幌地区で捕殺されたヒグマ 38 個体について 24 遺伝子座のマイクロサテライト領域を分析し、**表 3** に示した 7 遺伝子座(G1A、G10B、G10L、UarMU05、UarMU23、UarMU50、UarMU51)の組み合わせが高い個体識別能を示し($P_{(ID)}=3.17\times10^{-7}$ 、 $P_{(ID)sib}=2.23\times10^{-3}$ 、個体識別に有効であることを報告している。

さらに、間野ら(2009)は、積丹・恵庭地域で捕殺された 45 個体を対象として 12 遺伝子座の 分析を行い、表4に示した7遺伝子座(G1A、G10B、G10P、UarMU23、UarMU50、UarMU51、 UarMU59)を用いることによって十分に個体識別が可能であること ($P_{(ID)}=1.41\times10^7$ 、 $P_{(ID)sib}=1.87\times10^{-3}$)を報告している。

表 2~4 を見比べてわかるとおり、渡島半島、積丹・恵庭と道東地域といった異なる 3 地域個体 群を対象とした分析において、高い多型性を示す遺伝子座には共通のものが多く見られた (G1A、 UarMU23、 UarMU50、 UarMU51)。また、Itoh et al. (2008) では、G10P が選択された 7 遺伝子 座に次いで高い多型を示していることが報告されており、この遺伝子座は他の 2 地域では有効な 組み合わせの中に選択されている。このことは、北海道の多くの地域でこれらの遺伝子座を用い た個体識別が有効である可能性があることを示しているが、その一方で、それぞれの遺伝子座が 示す多型性の程度には地域によって差があることも事実である。渡島半島地域や浦幌地域で高い 多型性を示した UarMU05 は、積丹・恵庭地域ではそれ程多型を示さなかった。このことは、より 精度の高い結果を得るために、調査対象地域で捕獲個体などを用いた基礎的な分析が重要である ことを示唆している。

95

表 3	24 遺伝子座のマイクロサテライト領域から選択された7遺伝子座について、浦幌地区の捕殺個
	体で得られた各遺伝子座における対立遺伝子数、ヘテロ接合度の期待値、P(ID) *および
	P(ID)sih**(Itoh et al 2009より改変)

()	· · · · · · · · · · · · · · · ·			
遺伝子座	対立遺伝子数	ヘテロ接合度の期待値	$P_{(\mathrm{ID})}$	$P_{(\text{ID})\text{sib}}$
G1A	7	0.727	0.117	0.421
G10B	6	0.773	0.091	0.391
G10L	6	0.691	0.133	0.442
UarMU05	4	0.701	0.156	0.430
UarMU23	6	0.764	0.102	0.399
UarMU50	5	0.766	0.098	0.397
UarMU51	4	0.709	0.144	0.436

表 4.12 遺伝子座のマイクロサテライト領域から選択された7遺伝子座について、積丹・恵庭地域の捕殺個体で得られた各遺伝子座における対立遺伝子数、ヘテロ接合度の期待値、P(ID)*および P(ID)sib**(間野ら 2009 より改変)

遺伝子座	対立遺伝子数	ヘテロ接合度の期待値	$P_{(\mathrm{ID})}$	$P_{(\mathrm{ID})\mathrm{sib}}$
G1A	6	0.783	0.086	0.384
G10B	6	0.809	0.069	0.367
G10P	7	0.799	0.073	0.373
UarMU23	8	0.714	0.123	0.428
UarMU50	9	0.761	0.099	0.399
UarMU51	5	0.696	0.154	0.444
UarMU59	5	0.658	0.175	0.468

3.4塩基繰り返しのマイクロサテライト領域に関する検討

近年、これまで主流であった2塩基繰り返しのマイクロサテライト領域とは異なり、4塩基(例 えば、AAAGやTAGAなど)繰り返しの遺伝子座が報告されるようになった(Meredith et al., 2009; Sanderlin et al., 2009; Shin et al., 2009)。これらは従来の2塩基繰り返しと比較して対立遺伝子間の 断片長の差が大きく、対立遺伝子を判別する際の間違いを軽減するのに有効であると考えられる。 多数の試料とデータセットを扱うへア・トラップ法では、DNA分析データの判読におけるエラー を極力押さえることが重要であり、新たに報告された4塩基繰り返しの遺伝子座が高い多型を示 すかどうかを検証することは大きな意味を持つ。

北海道のヒグマにおいて4塩基繰り返しの遺伝子座が示す多型性を検討するのに先立って、PCR による増幅や DNA 断片の検出に関する検討を行った。

分析対象のマイクロサテライト領域は、2009年に報告のあったものから、増幅断片長が概ね 250 塩基対以下の 23 遺伝子座を選択した。材料には積丹・恵庭地域で捕殺された 6 個体を用い、これ までに用いた 2 塩基繰り返しの遺伝子座と同様の増幅条件(95℃10分に続いて、94℃30秒、50℃20 秒、72℃20秒を 30 サイクル、72℃10分の後 4℃)で PCR を行った。結果として、23 のうち UamA107 を除く 22 の遺伝子座で対立遺伝子が検出された(ABI PRISM 310、Applied Biosystems、 USA を 用いて検出された波形データは、資料参照)。表5 には、6 個体から検出された対立遺伝子の一覧 を示したが、対立遺伝子が検出できなかった UamA107 と多型の確認できなかった UamC11 を除 いて、ほとんどの遺伝子座において複数の対立遺伝子が確認された。わずか 6 個体の分析によっ て複数の対立遺伝子が確認できたことは、これらの遺伝子座が個体識別に有用である可能性を示 唆している。今後より多くの個体を分析することによって、多型の程度を明らかにする必要があ る。

遺伝子座	対立遺伝子数	検出された断片長	備考
UamA107	-	-	増幅確認できず
UamB2	2	165, 169	
UamB5	3	152, 156, 160	
UamB103	3	111, 115, 119	
UamC11	1	148	
UamD1a	4	112, 116, 120, 121	1塩基違いの対立遺伝子
UamD2	4	195, 199, 203, 207	
UamD3	2	225, 229	
UamD102	6	179, 180, 183, 184, 187, 188	1塩基違いの対立遺伝子
UamD103	4	165, 167, 171, 176	1、 2塩基違いの対立遺伝子
UamD112	4	123, 127, 131, 135	
UamD113	3	147, 151, 156	
UamD118	3	182, 186, 190	
BM3-P1B05U	3	215, 219, 223	
BM4-P1H10U	3	287, 288, 291	1塩基違いの対立遺伝子
BM4-P2A03U	3	244, 248, 260	
BM4-P2E11U	4	248, 252, 256, 260	
RM3-P2H03U	7	162, 163, 167, 174, 175, 179, 180	1、 2塩基違いの対立遺伝子
UT1	3	198, 200, 202	2塩基違いの対立遺伝子
UT4	4	136, 140, 144, 148	
UT29	3	169, 173, 177	
UT35	3	185, 193, 197	
UT38	3	177, 181, 185	

表 5 6個体を用いて検出された 22遺伝子座の対立遺伝子(UamA107は増幅を確認できず)

多型性を示す遺伝子座が多く存在することが期待される一方で、1 塩基あるいは 2 塩基異なる 対立遺伝子が検出された遺伝子座もいくつか存在し、マイクロサテライト領域内に不規則な変異 が存在したり、マイクロサテライト領域外に変異が存在したりすることが推測された。これらの 対立遺伝子の存在は、結果の判読を困難にする可能性があることから、今後より多くの個体を用 いて分析を実施し、その結果によってヘア・トラップ法への応用について検討すべきと思われる。 また、UamD103、UamD112、UT1 および UT29 については、対立遺伝子の分析像において波形が 割れており、特に UT1 と UT29 には多くのピークの存在が確認された(付図参照)。これらに関し ては、多型性の評価と共に増幅条件の検討を行う必要がある。

4. 今後の課題

来年度以降は、これまで実施されたヘア・トラップ法の試行で用いられた遺伝子座と今回新た に分析を試みた遺伝子座から、多型性や対立遺伝子の判読のしやすさ、あるいは増幅のしやすさ などを評価し、ヒグマのヘア・トラップ法に最適な遺伝子座の選択を進める必要がある。また、 候補として選択した遺伝子座については、いくつかの地域個体群を対象に十分な個体識別能があ るかどうかの検証を実施しなければならない。さらに分析の効率化にむけて、マルチプレックス PCRの条件検討をする必要がある。

97

引用文献

- Itoh, T., Sato, Y., Mano, T. and Iwata, R. 2009. Estimating a suitable microsatellite marker set for individual identification and parentage tests of brown bear (*Ursus arctos*) in the Akan-Shiranuka Region, eastern Hokkaido, Japan
- 間野勉・釣賀一二三・石田千晶・高田雅之.2009. ヒグマの遺伝的多様性と生息地の連続性の評価. (北海道生物多様性保全モニタリングに関する研究,平成 20 年度(2008 年度)研究報告書) pp.49-54. 北海道環境科学研究センター・北海道立林業試験場・北海道中央農業試験場・札幌 市立大学.
- Meredith, E. P., Rodzen, J. A., Banks, J. D. and Jones, K. C. 2009. Characterization of 29 tetranucleotide microsatellite loci in black bear (*Ursus americanus*) for use in forensic and population applications. Conservation Genetics 10: 693-696.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. and Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. Molecular Ecology 4: 347-354.
- Paetkau, D. and Strobeck, C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. Molecular Ecology 3: 489-495.
- Sanderlin, J. S., Faircloth, B. C., Shamblin, B. and Conroy, M.J. 2009. Tetranucleotide microsatellite loci from the black bear (*Ursus americanus*). Molecular Ecology Resources 9: 288-291.
- Shih, Chih-Chin, Huang, Chuan-Chin, Li, Shou-Hsien, Hwang, Mei-Hsiu and Lee, Ling-Ling. 2009. Ten novel tetranucleotide microsatellite DNA markers from Asiatic black bear, Ursus thibetanus. Conservation Genetics 10: 1845-1847.
- Taberlet, P., Camarra, J.-J., Griffin, S., Uhres, E., Hanotte, O., Waits, L. P., Dubois-Paganon, C., Burke, T. and Bouvet, J. 1997. Noninvasive genetic tracking of endangered Pyrenean brown bear population. Molecular Ecology 6: 869-876.
- 釣賀一二三. 2008. 北海道渡島半島地域におけるヘア・トラップ調査の実施例. 哺乳類科学 48: 119-123.
- Waits, L. P., Luikart, G. and Taberlet, P. 2001. Estimating the probability of identify among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. Molecular Ecology 10: 249-256.

ヒグマの DNA 個体識別法の標準化:付図(アーウ) 1/8

ア. UamB2

ウ. UamB103

ヒグマの DNA 個体識別法の標準化:付図(エーカ) 2/8

⊥. UamC11

ヒグマの DNA 個体識別法の標準化:付図(キーケ) 3/8

+. UamD3

ケ. UamD103

ヒグマの DNA 個体識別法の標準化:付図 (コーシ) 4/8

□. UamD112

シ. UamD118

ヒグマの DNA 個体識別法の標準化:付図(スーソ)5/8

ス. BM3-P1B05U

ソ. BM4-P2A03U

ヒグマの DNA 個体識別法の標準化:付図 (ターツ) 6/8

9. BM4-P2E11U

チ. RM3-P2H03U

ツ. UT1

ヒグマの DNA 個体識別法の標準化:付図(テーナ) 7/8

テ. UT4

ナ. UT35

ヒグマの DNA 個体識別法の標準化:付図(二) 8/8

二. UT38

2.4 有害駆除個体を利用した有効集団サイズの推定方法の検討

玉手 英利 (山形大学)・鵜野 レイナ (慶応大学)

1. はじめに

クマ類の有害駆除サンプルから個体数変動に関する情報を得るための試みとして、本研究では 有効集団サイズ(effective population size, Ne)の利用可能性を検討した。有効集団サイズは、次世 代に受け継がれる遺伝子プール(gene pool)の大きさを示す数値で、繁殖集団の大きさを比較す る指標として用いることができる。Neから人口学的な集団サイズを推定することは通常は困難だ が、個体数が大きく変動する場合には、その増減傾向(トレンド)を Ne の変動によって把握でき る可能性が考えられる。例えば、2006年の山形では、県推定生息数の約46%に相当する692頭が 捕獲された。このように集団サイズが大きく変動する場合には、Ne も変化する可能性が考えられ る。そこで、本研究では、Ne を個体数変動の指標として利用する可能性について検討した。

有効集団サイズの推定に関しては、遺伝子頻度の時間的変動から推定する方法(Temporal method; Anderson et al., 2000; Waples, 1989; Waples and Yokota, 2007)(TM法)、連鎖不平衡から推定 する方法(Linkage disequilibrium method; Waples, 2006)(LD法)、観察された遺伝的多様度が得ら れる集団サイズをベイズ法で推定する方法(Summary statistics method; Tallmon et al., 2007)など 様々な方法が提案されている。本年度はこれらのうち、TM法とLD法を有害駆除サンプルに適用 するための基本的条件を検討した。

2. 有効集団サイズの推定

2-1. 有害駆除個体サンプルと遺伝子マーカー

サンプルとして、山形県で 2004 年から 2008 年までに有害駆除で捕獲されたツキノワグマ 117 個体の筋肉から抽出した DNA を用いた。年ごとの個体数は、それぞれ 11 (2004 年)、22 (2005 年)、56 (2006 年)、61 (2007 年)、27 (2008 年) である。2004 年~2006 年のサンプルについては、 G1A、G10B、G10L、G10M、G10X、MSUT1、MSUT6 のマイクロサテライト 6 遺伝子座の遺伝 子型を決定した。2007 年のサンプルについては、G1A、G10L、G10M、MSUT1、MSUT6 の 5 遺 伝子座、2008 年のサンプルについては G1A、G10L、G10M、MSUT1 の 4 遺伝子座について、そ れぞれ遺伝子型を決定した。PCR 等の条件は、それぞれのマーカーを記載した原著論文に従って 設定した。全サンプルについて遺伝子型が決定されたので、欠測値を含まないデータセットを Ne の推定に用いた。

2-2. Ne の推定

2-2-1.Temporal method (TM)による推定

TM (Waples, 1989; Waples and Yokota, 2007)は、Ne が小さいほど遺伝子頻度の時間的変動が大き くなる関係に基づいて Ne を推定する方法で、1 世代以上の間隔をおいて複数回、遺伝子頻度を測 定する必要がある。本研究で用いたサンプルは 2004 年から 2008 年までの捕獲個体に限られてい たので、仮に 2005 年を第1 世代、2008 年を第2 世代として Ne 推定を行った。マイクロサテライ ト4 遺伝子座(G1A、G10L、G10M、MSUT1)のデータセットをもとに、Anderson et al.(2000)の 方法により、Ne=30 から Ne=600 まで 10 の増分で、それぞれの Ne の尤度を計算した。その結果、 Ne=90 が最尤値となった (log likelihood=-149.341)。TM 法による推定値は、各世代の Ne の平均 値(調和平均)と考えられる。

2-2-2.Linkage disequilibrium method (LD)による推定

LD(Hills, 1981)は、小集団ではより連鎖不平衡が生じることを利用した推定方法で、TMより も精度が低いとされるが(Wang, 2009)、TMとは異なり1回のサンプリングで推定値が得られる。 各年度で分析された遺伝子座数が異なるので、それぞれ別にNeを推定した(表1)。

表1 LD による Ne 推定値

Year	2004 (n=11)	2005	2006	2007	2008
		(n=22)	(n=56)	(n=61)	(n=27)
7 loci data	20.7 (9.9-171.8)	32.0 (19.1-74.4)	33.1 (24.1-48.4)	ND	ND
5 loci data	24.2 (8.0-infinity)	58.3	26.2 (17.8-41.4)	26.3 (18.6-38.8)	ND
		(20.5-infinity)			
4 loci data	12.42	59.7	35.2 (19.4-81.9)	22.6 (14.9-36.3)	95.3
	(9.2-infinity)	(16.7-infinity)			(22.6-infinity)

n, number of samples; numbers in parentheses are the 95% confidence intervals for Ne estimates; ND, not determined.

2-3. Ne 推定に関する問題点

TM は不連続世代からのサンプリングを前提としているが、連続世代でも齢査定が可能な場合 やサンプリング間隔が長い場合には適用可能とされている(Waples and Yokota, 2007)。したがって、 TM により中長期の Ne 変動を記録するためには、有害駆除個体の齢査定を必ず行い、数年間隔で サンプリングを行うことが望ましいと考えられる。LD については、サンプル数が少ない場合に精 度が大きく低下することが指摘されている(England et al., 2006)。本研究においてもサンプル数や 遺伝子座が少ない場合に信頼区間の上限が定まらなかった。また、TM と LD のいずれもランダム サンプリングを前提としているが、有害駆除個体は比較的狭い地域で集中的に捕獲されることが あるので(鵜野ら、2009)、この前提条件が満たされない可能性もある。これらの問題に対しては、 駆除個体の齢査定や有害駆除個体の組織サンプルの提出を義務づけるなどの対処が必要と考えら れる。

引用文献

- Anderson, E. C., Williamson, E. G. and Thompson, E. A. 2000. Monte Carlo evaluation of the likelihood for Ne from temporally-spaced samples. Genetics 156: 2109-2118.
- England, P. R., Cornuet, J-M., Berthier, P., Tallmon, D. A. and Luikart, G. 2006. Estimating effective population size from linkage disequilibrium: severe bias in small samples. Conservation Genetics 7: 303–308.
- Hill, W. G. 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. Genet. Res. 38: 209–216.
- Tallmon, D. A., Koyuk, A., Luikart, G. and Beaumont, M. A. 2007. ONeSAMP: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation. Molecular Ecology Resources 8:

299-301.

- 鵜野レイナ,東英生,玉手英利. 2009. 親子判定で明らかになったツキノワグマ幼獣の単独行動. 哺乳類科学 49: 217-223.
- Wang, J. 2009. A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. Molecular Ecology 18: 2148–2164.
- Waples, R. S. 1989. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. Genetics 121: 379–391.
- Waples, R. S. 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. Conservation Genetics 7: 167–184.
- Waples, R. S. and Yokota, M. 2007. Temporal estimates of effective population size in species with overlapping generations. Genetics 175: 219-233.