

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、近藤麻実（北海道立総合研究機構）・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）・鶴野 レイナ（慶應大学）

1. はじめに

本研究では、2010 年 6 月～8 月に岩手県北上山地に設置したヘア・トラップで採取されたツキノワグマの毛サンプルを対象として、マイクロサテライト 6 遺伝子座の多型解析とアメロゲニン遺伝子による性判別を行い、個体数推定を行う遺伝子型データを得ることを目的とした。

2. 研究方法

2-1. 分析方法

2010 年度のヘア・トラップ調査で採取された 2,071 試料を、調査地区別に分析担当機関に 4 分した（表 1）。DNA 抽出及び遺伝子分析は、21 年度に定めた標準プロトコルに基づき行った。

本年度は岩手県北上地域において大規模調査が実施され、膨大なサンプルを対象としなければならないこと、個体数推定モデルの検討段階にあることから、より厳密に個体識別を行う必要があるため、岩手県北上個体群の個体識別により特化したマーカーセットを選定した。まず、本地域における捕獲個体の遺伝子サンプルを用いた分析結果より、Pid 値が低いこと・遺伝子が増幅されやすいこと・分析時の波形が読みやすいことに着目し、マーカーを 16 種類に絞り込んだ。これらのマーカーをそれぞれ組み合わせて、低濃度 DNA を用いた Multiplex PCR でも遺伝子が問題なく増幅され、Pid 値が低く、かつ波形が読みやすいマーカーの組合せを検討した。その結果、これまでに岩手県で使用されてきたマーカーの中で、Pid 値が比較的小さく、遺伝子が増幅されやすい G10C（Paetkau et al., 1995）と 2 塩基反復配列多型マーカーの中で最も Pid 値の低い UarMU23 に UarMU05（Taberlet et al., 1997）を加えた組み合わせが最適であった。近年開発された 4 塩基反復配列多型のマーカーの組合せについては、昨年度選択したマーカーの中に 4 塩基反復ではない対立遺伝子が存在したために、それらを除外し新たな組合せを検討した。その結果、UamD118・UamD2・UamD103 が選定された（Meredith et al., 2009）。以上から、2010 年度調査では、G10C, UarMU05, UarMU23, UamD118, UamD2, UamD103 の 6 種類を用いることとした。加えて、アメロゲニン遺伝子を用いた性判定を行った。

表 1 トラップ設置地区及び分析担当機関、試料数

	北西部（T=69）	北東部（T=61）	南東部（T=56）	南西部（T=59）	計（T=245）
1.担当機関	岩手県環境保健 研究センター	山形大学	野生動物保護 管理事務所	北海道立 総合研究機構	
2.試料採取トラップ数	110	73	43	113	339
3.試料数	747	515	207	602	2071
4.試料数（10 本以上）	348	132	34	245	759

各分析担当機関での分析完了後に、以下の手順でデータの統合を行い、識別個体を決定した。

- (1) 各機関で標準試料8個体の分析を行い、対立遺伝子のサイズが分析機関で異なる場合には、認識個体データの補正を行った。
- (2) 各機関の認識個体データを統合して、フリーのコンピュータプログラムである GENEAP (Wilberg and Dreher, 2004)を用い、試料の1対1の組み合わせ比較による1ヶ所ないし2ヶ所の対立遺伝子の不一致 (mismatch ; それぞれ 1MM、2MM と記す) の検出を行った。
- (3) 6 遺伝子座で全て一致した試料は同一個体と判断し、識別個体とした。
- (4) 1MM と 2MM の試料はデータの再確認・再分析を行った (図 1)。
- (5) 遺伝子型が 3 遺伝子座以上で異なる試料は全て別個体と判断し、識別個体とした。

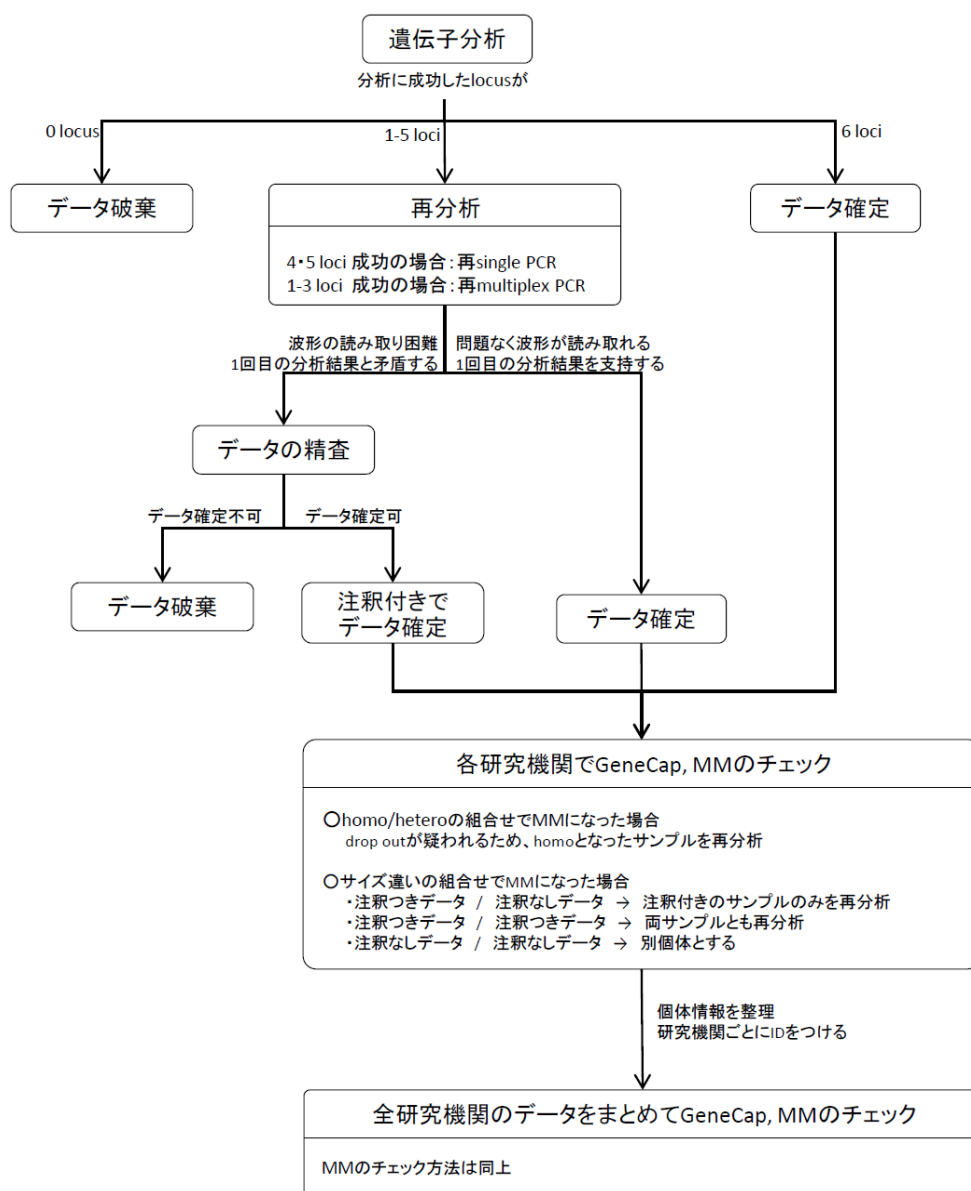


図 1 判定困難な試料に関する再分析の手順

2-2. 分析手順

以下の手順で分析を段階的に進め、(1) 1 トラップ/ 1 試料、(2) 第 1 セッション全試料、(3) 全セッションの 10 本以上の試料の分析までを行った。

(1) 1 トラップ/1 試料の分析

全セッションを通じて、試料が採取されたトラップから各 1 試料 (n=339) を分析する。

これにより、1 トラップ/1 試料のデータに基づく識別個体数を決定した。

(2) 第 1 セッション全試料の分析

第 1 セッションの全試料 (n=259) を分析した。これにより、毛の本数と分析成功率の関係を調べた。

(3) 全セッションの 10 本以上の試料の分析

1 トラップ/ 複数試料のデータに基づく識別個体数を決定した。

(4) 全セッションの 10 本未満の試料の分析

全試料のデータセットを得て、各種要因（毛の本数、セッション、遺伝子座、分析機関等）が分析成功率に及ぼす効果を調べる。

3. 結果と考察

3-1. 1 トラップ/1 試料の分析

全セッションで 1 トラップ当たり 1 試料の分析を行い、6 遺伝子座の遺伝子型を決定した。遺伝子分析に成功した 270 試料について 1 対 1 の組み合わせ比較（36315 通り）を行った結果、199 の組み合わせが完全に一致した。また、1 ヶ所の対立遺伝子で不一致（1MM）が生じた組み合わせは 33（0.09%）、2 ヶ所の対立遺伝子で不一致（2MM）が生じた組み合わせは 95（0.26%）であった。その結果、176 個体が識別された（表 2）。

次に、1MM または 2MM と判定された試料について、図 1 に示す分析フローに従って、分析データの見直しおよび再分析を行った後、一貫した分析結果が得られなかった 1 試料を除外し、269 試料について組み合わせ比較を行った。再分析の結果、1MM は 31 組（0.09%）に、2MM は 96 組（0.27%）となった。遺伝子型が完全に一致した試料の組み合わせは 203 組で、識別個体は 173 個体となった（表 2）。

表 2 1 トラップ/1 試料の分析試料数、識別個体数およびミスマッチ数

	試料数	ミスマッチ数
1.試料採取トラップ数：全セッション	339	-
2.分析成功試料数（成功率）	270（79.6%）	-
3.識別個体数	176	1MM 33, 2MM 95
4.再確認・再分析後識別個体数	173	1MM 31, 2MM 96

再分析でも解消されなかった 1MM の 31 組について精査すると、4 組については、それぞれサイズの異なるヘテロ同士の不一致であり、残りの 27 組は共通の対立遺伝子を持ちながらホモとヘテロという不一致であった。例えば、遺伝子座 UarMU23 において、片方の試料では対立遺伝子 147 と 153 のヘテロであるのに対し、他方の試料では対立遺伝子 147 のホモとなる不一致であっ

た。

ホモとヘテロの不一致は、片方の対立遺伝子が PCR 増幅にかからずドロップアウトすることによって、本来ヘテロであるものが見かけ上のホモになってしまうことでも生じうる。そして、複数遺伝子座の遺伝子型に基づく個体識別では、原則として、試料間で 1 遺伝子座でも対立遺伝子の組み合わせが異なれば、それらの試料は別個体由来の試料と判定される。したがって、同一個体由来の試料にもかかわらず、ドロップアウトによる不一致によって別個体由来の試料と判定されることは、識別個体を過剰に生み出すことになる。

269 試料から識別された 173 個体の中には、1 遺伝子座におけるホモとヘテロの不一致により別個体と判定された個体も含まれた。そこで、1MM の組み合わせのうち、ホモとヘテロの不一致がみられた 27 組について、不一致を解消した状態を仮定し、識別個体数がどう変化するかを試算した。結果は、識別個体が 166 個体、1MM が 2 組、2MM が 95 組となり、識別個体が 7 個体減少する結果となった。

1MM のほとんどがドロップアウトによる不一致を疑わせるものであったのに対し、2MM の 96 組については、23 組が 2 ヶ所でドロップアウトによる不一致を疑わせるような組み合わせであったが、残る 73 組は異なるヘテロを持つ組み合わせであった。この結果は血縁の近い個体など、遺伝子型の類似した個体を多く識別したために生じた結果ではないかと推測される。

3-2. 第 1 セッション全試料の分析

第 1 セッションの全試料を分析した結果について、体毛本数と分析成功数の関係を図 2 に示す。分析効率が良い時期に採集された第 1 セッションのサンプルにおいて、体毛の本数が 10 本以上の試料では成功率が 96%であるのに対して、5 本以下では 66%、3 本以下では 52%となった。

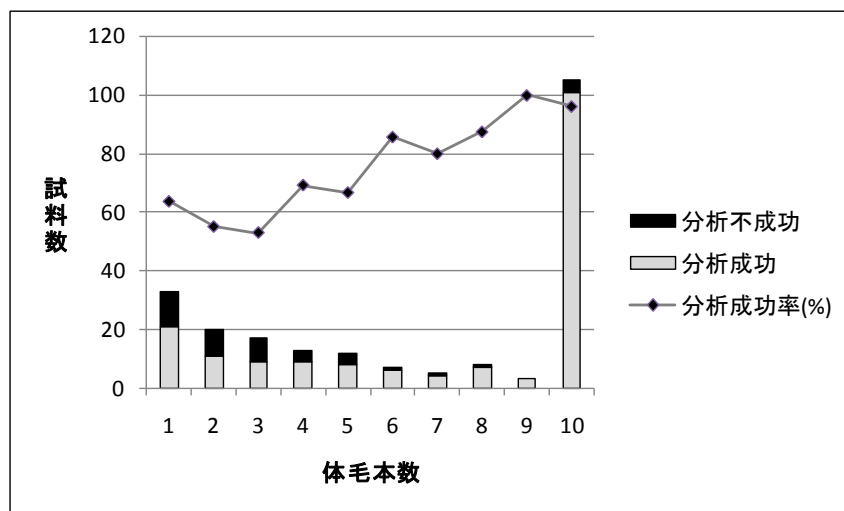


図 2 体毛本数と分析成功・不成功試料数（第 1 セッション）

第 1 セッションの全試料から得られた認識個体数は 184、識別個体数は 68 で、内 1MM は 87 組、2MM は 20 組となった。1MM と 2MM についての再分析は未完了のため、識別個体数は暫定値である（表 3）。

表 3 第 1 セッション全試料分析による認識個体数と識別個体数

	1 トラップ/1 試料	全試料
1.分析試料数	47	259
2.認識個体数（分析成功率）	42（89%）	184（71%）
3.識別個体数	39（確定値）	68（暫定値）
4.1 MM の組み合わせ数	0	87
5.2 MM の組み合わせ数	1	20

3-3. 第 1 セッションのトラップ当たりの識別個体数

第 1 セッションの全試料の識別個体データ（暫定値）から、1 トラップ当たりの識別個体数を調べた。その結果、トラップ当たりの識別個体数は 1～7 で、分析成功試料が得られた 42 トラップの内 33 基では識別個体が 1 頭であった（図 3）。親子の場合など、複数個体が同時期に同じトラップを訪問する可能性は考えられるが、多くの新規識別個体が確認されたトラップについては、アリルドロップアウトなどで個体数を過剰に見積もっている可能性も検証する必要がある。

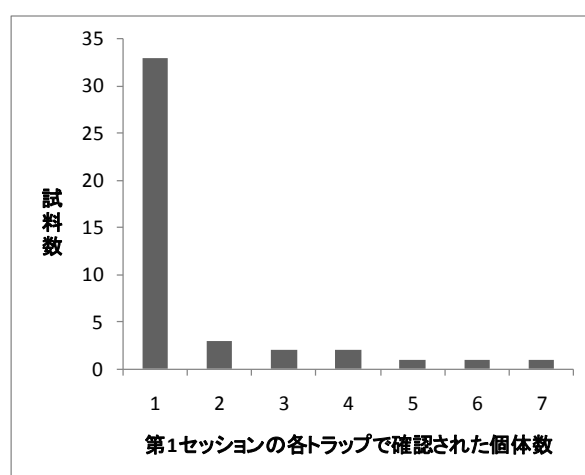


図 3 トラップ当たりの識別個体数（第 1 セッション）

図 4 は、第 1 セッションにおける 1MM または 2MM の個体の割合を示す。第 1 セッションでは、1 トラップ/1 試料の分析において、39 個体が識別された。それに対して、第 1 セッションの全試料の分析では 68 頭が識別されたが、その内で、同一トラップ内において 1MM または 2MM に関わる個体が 17 頭存在する。今後、1MM または 2MM の再確認・再分析が行われれば、識別個体数は更に減る可能性がある。再分析を効率的に進める方法を検討した結果、MM を生じた遺伝子座の遺伝子増幅反応を再度行うよりも、新たな遺伝子座を複数追加して遺伝子型の照合を行う方がより有効であるとの結論に至った。

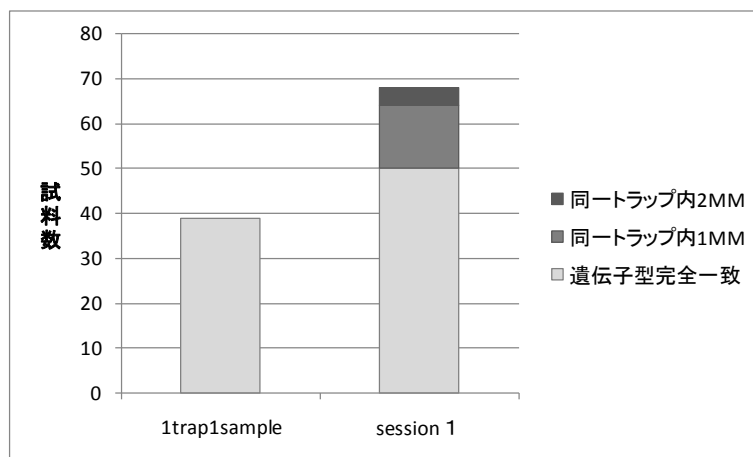


図4 第1セッションの識別個体数

3-4. 全セッションの10本以上の試料の分析

全セッションの10本以上の全試料を分析した結果を表4に示す。認識個体数は280で、1トラップ/1試料の分析で得られた認識個体数173の約1.6倍となった。1MMおよび2MMの再確認・再分析を行う前の識別個体数（暫定値）は215であった。

さらに、1トラップ/1試料の分析で得られた認識個体数（12月中間結果で報告）に、その後分析した第1セッションの残り試料と全セッションの10本以上の試料を加えた認識個体数は342、1MMおよび2MMの再確認・再分析を行う前の識別個体数（暫定値）は252となった。

表4 2011年2月までの分析成功試料数および認識個体数

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	合計
1トラップ/1試料							
試料数	47	46	39	65	61	82	339
分析成功試料数	42	39	27	46	52	61	267
認識個体数（識別個体数）	39	38	25	42	47	50	242(173)
全セッション10本以上試料							
試料数	101	69	78	132	114	247	741
分析成功試料数	98	61	65	117	107	190	638
認識個体数(識別個体数)*	45	41	26	49	47	72	280(215)
全試料							
試料数	259	185	212	440	322	644	2071
分析成功試料数	178	75	74	128	116	203	774
認識個体数(識別個体数)*	64	53	34	59	54	78	342(252)

*暫定値(ミスマッチの再分析が必要)

4. 検討課題

4-1. ミスマッチの取扱い

本研究で使用した 6 遺伝子座のマイクロサテライトマーカーは、2003 年から 2008 年までに岩手県内で捕獲されたツキノワグマの DNA を用いた予備実験によって、高い多型性を持ち十分な個体識別力を持つマーカーとして採用されたものである。しかしながら、最終的に 2 ヶ所の対立遺伝子で不一致 (2MM) の組み合わせが 96 組残る結果となった (表 2)。これらのサンプルについては分析する遺伝子座を増やすことで遺伝子型の類似した他個体由来のサンプルであるか、分析エラーを含むサンプルであるかがより明確になる可能性があると考ええる。

大規模ヘア・トラップ調査により大量のサンプルを分析する場合、技術的に分析エラーの発生は免れられない。分析エラーをできるだけ軽減する努力としては、第 1 に分析成功率を高めるために分析の初期段階でサンプルを厳選することが考えられる。第 2 に分析結果に不確かさの残るサンプルについては可能な限り再分析することが考えられる。しかし、今回の結果が示すように再分析を行っても必ずしも遺伝子型の不一致が解消するとは限らない。よって、今後は分析結果に不確かさを残すサンプルの扱いについて一定のルールを設けることが検討課題の一つとして挙げられる。また、分析結果の不確かさを極力取り除く努力をする一方で、分析結果に不確かさを含む場合と不確かさを極力排除した場合に生じる識別個体数の変化が、生息数の推定値にどの程度の影響を及ぼすかについても把握する必要があると考える。また、サンプルの再分析をどこまで努力するか、分析結果の不確かさをどの程度まで許容するかについては、費用対効果の観点から検討することも必要である。

4-2. 分析成功率に対する各要因の効果の検証

今後の検討課題として、分析成功率に影響を及ぼす要因の分析を行うことも必要である。手順としては、全セッションの採取試料について再検討・再分析をおこなった後、採取試料データに識別個体 ID、1MM、2MM、分析成功・不成功の情報を加えた分析用データセットを作り、分析成功やミスマッチ数等を応答変数として、体毛本数、時期、地点、遺伝子座、分析機関等の効果を検討することが考えられる。

引用文献・資料

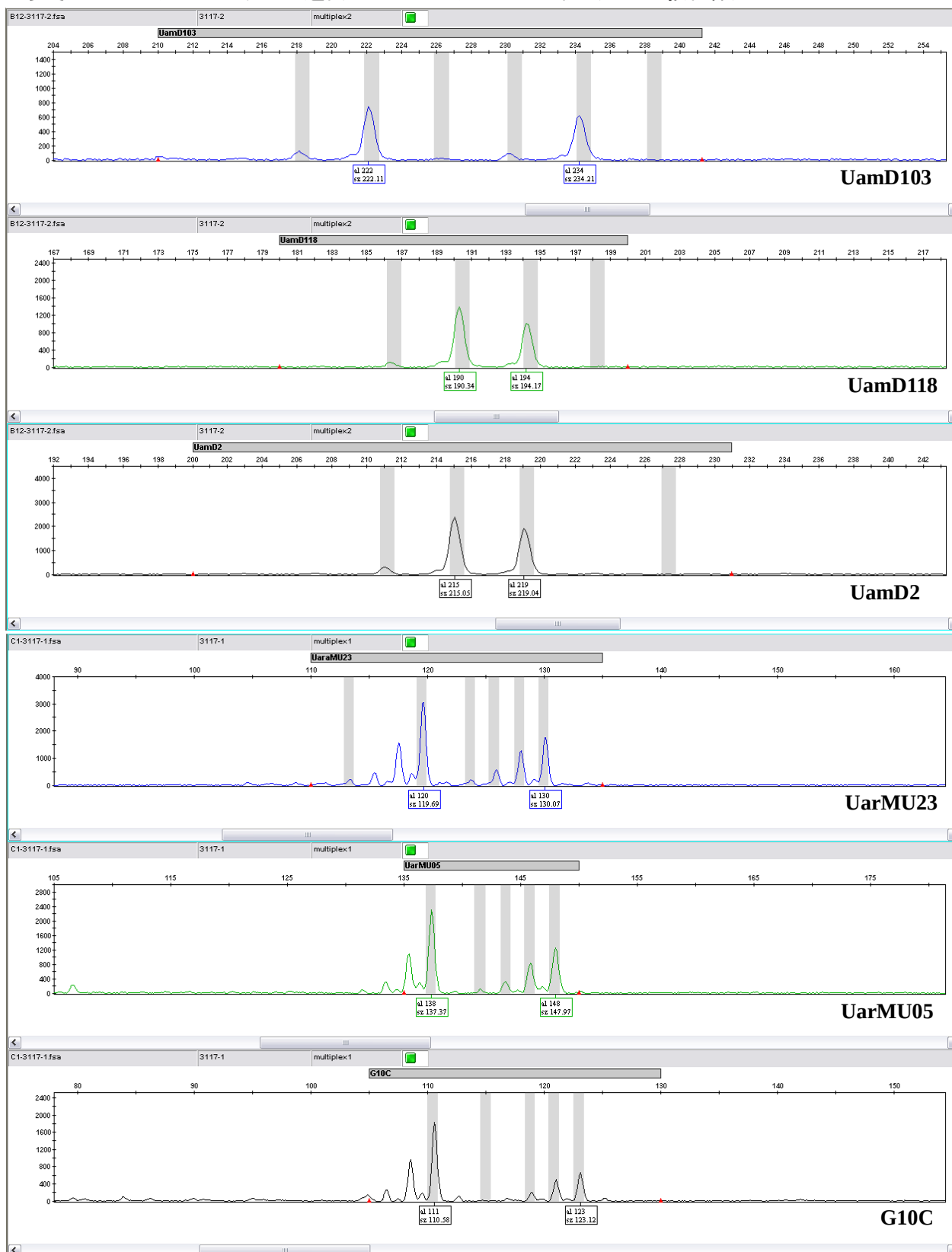
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. and Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-354.
- Taberlet, P., Camarra, J. J., Griffin, S., Uhres, E., Hanotte, O., Waits, L. P., Dubois-Paganon, C., Burke, T. and Bouvet, J. 1997. Noninvasive genetic tracking of endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* 6: 869-876.
- 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.
- 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.
- DeWoody, J., Nason, D. J. and Hipkins, V. D. 2006. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Molecular Ecology Notes* 6: 951-957.
- 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.
- Paetkau, D. 2003. An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Molecular Ecology* 12: 1375-1387.
- Waits, L. P. and Paetkau, D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management* 69: 1419-1433.

参考 1 微量 DNA 試料の分析に伴うエラーに関する考え方

<1MM と 2MM : 微量 DNA 試料の分析に伴うエラーに関する考え方>

既存の DNA 分析技術によって、体毛サンプルのような微量 DNA 試料の分析を行う場合、一般に、PCR 増幅の際に生じるエラーを 100%回避することはできないとされている。そのため、DeWoody *et al.*(2006) に概説されているように、分析上のエラーを発見し、エラーを回避するために様々な方法が考案されている。分析エラーを回避するための最も基本的な方法は、一つのサンプルを繰り返し分析し、一貫した結果が得られることを確認することであるが、サンプル数が多くなった場合、分析の繰り返しには非常にコストがかかる。また、体毛サンプルのように、そもそも得られる DNA 量が少ないサンプルでは、多くの遺伝子座について分析を繰り返すことは事実上不可能である。そこで、クマ類のヘア・トラップによる体毛サンプルの分析では、より実践的な方法として、エラーが疑われるサンプルや遺伝子座に絞って分析の繰り返しを行う方法が考案されている (Paetkau, 2003; McKelvey and Schwartz, 2004; Waits and Paetkau, 2005)。この方法は、多型性の高い複数座位の遺伝子型によって個体を識別した場合、個体間で 1 ヶ所ないし 2 ヶ所の遺伝子座でのみ対立遺伝子の組み合わせに不一致 (それぞれ 1MM、2MM という) が生じる確率は低いこと、一方で、1 ヶ所ないし 2 ヶ所の遺伝子座でのみ不一致が生じる場合、対立遺伝子のドロップアウトなどのエラーが生じている可能性が高いことという確率論と経験則に基づき、個体識別に用いた複数の遺伝子座のうち、1 ヶ所ないし 2 ヶ所の遺伝子座の不一致により別個体と見なされたサンプルについて、不一致の遺伝子座の分析を繰り返すという方法である。

参考2 マイクロサテライト遺伝子型のピークパターン例（ヘテロ接合体）



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 （ヒグマ版：予報）

近藤 麻実、釣賀 一二三、間野 勉（北海道立総合研究機構）

1. はじめに

昨年度までの分析によって、ツキノワグマの体毛回収率や遺伝子分析成功率には季節による変動があることが示された。今年度はヒグマにおいて同様の調査を行い、体毛回収率および遺伝子分析成功率の季節的な変動について検証した。

2. 方法

2-1. 調査地・調査方法

北海道札幌市南区の定山溪地域約 250 km² を調査地とし、5 km メッシュに 1~3 基となるようヘア・トラップを配置した（図 1）。トラップの設置数は、第 1~5 セッションについては 35 基、第 6~8 セッションについては 15 基とした。トラップの構造は有刺鉄線の 1 段張り（地上約 50cm）で、1 辺約 5 m の多角形とした。bait にはサケの切り身を用いた。bait は立木を利用して空中に吊すこととし、ヒグマによって利用されないよう設置した。ヘア・トラップは 2010 年 7 月上旬に設置し、その後約 10 日間に 1 回の頻度で見回りおよび体毛の回収を行った。調査期間は 10 月中旬までの約 3 ヶ月間であった。体毛は有刺鉄線の刺ごとに別々の試料とし、それぞれ封筒に回収して乾燥させた後、分析まで -30℃ で保存した。

2-2. 遺伝子分析

1 試料ごとに実体顕微鏡を用いて毛根の有無を確認し、毛根部のみ最大 10 本を切り取った。1 試料中の体毛が 10 本に満たない場合でも、異なる試料どうしは混ぜないこととした。これらの試料から DNA Extractor FM kit（和光純薬工業株式会社）を用いて DNA を抽出し、マイクロサテライト 8 座位（G10P, G1A, G10B, G10X, UarMU05, UarMU50, UarMU23, UarMU51: Paetkau and Strobeck, 1995; Paetkau and Strobeck, 1998; Taberlet et al., 1997）について分析を行った。併せて、アメロゲニン遺伝子（SE47, SE48）の分析によって雌雄判別も行った。

2-3. 解析方法

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、セッションごとに利用トラップ数を比較した。第 1~5 セッションについては、第 6 セッション以降と比較できるよう、第 6 セッション以降に利用したトラップ 15 基のみのデータを用いた。

試料数の推移についても比較するため、その数をセッションごとに集計した。分析が終了している第 1~5 セッションについて、毛根があり、分析に供することのできた試料の数と、どの体毛にも毛根がなく、分析に供することのできなかった試料の数をそれぞれ集計した。

マイクロサテライト 8 座位とアメロゲニン遺伝子とを併せた 9 遺伝子座について、すべて結果が得られた試料を「分析成功」とし、セッションごとに分析成功数を比較した。なお、昨年度までの分析によって、DNA 抽出に供する毛根数の多寡は分析の成否に影響を及ぼすことが分かって

いる。そのため分析成功数の比較は、体毛 1～6 本分の毛根が確保された試料と 7～10 本分の試料とに分割して検討した。

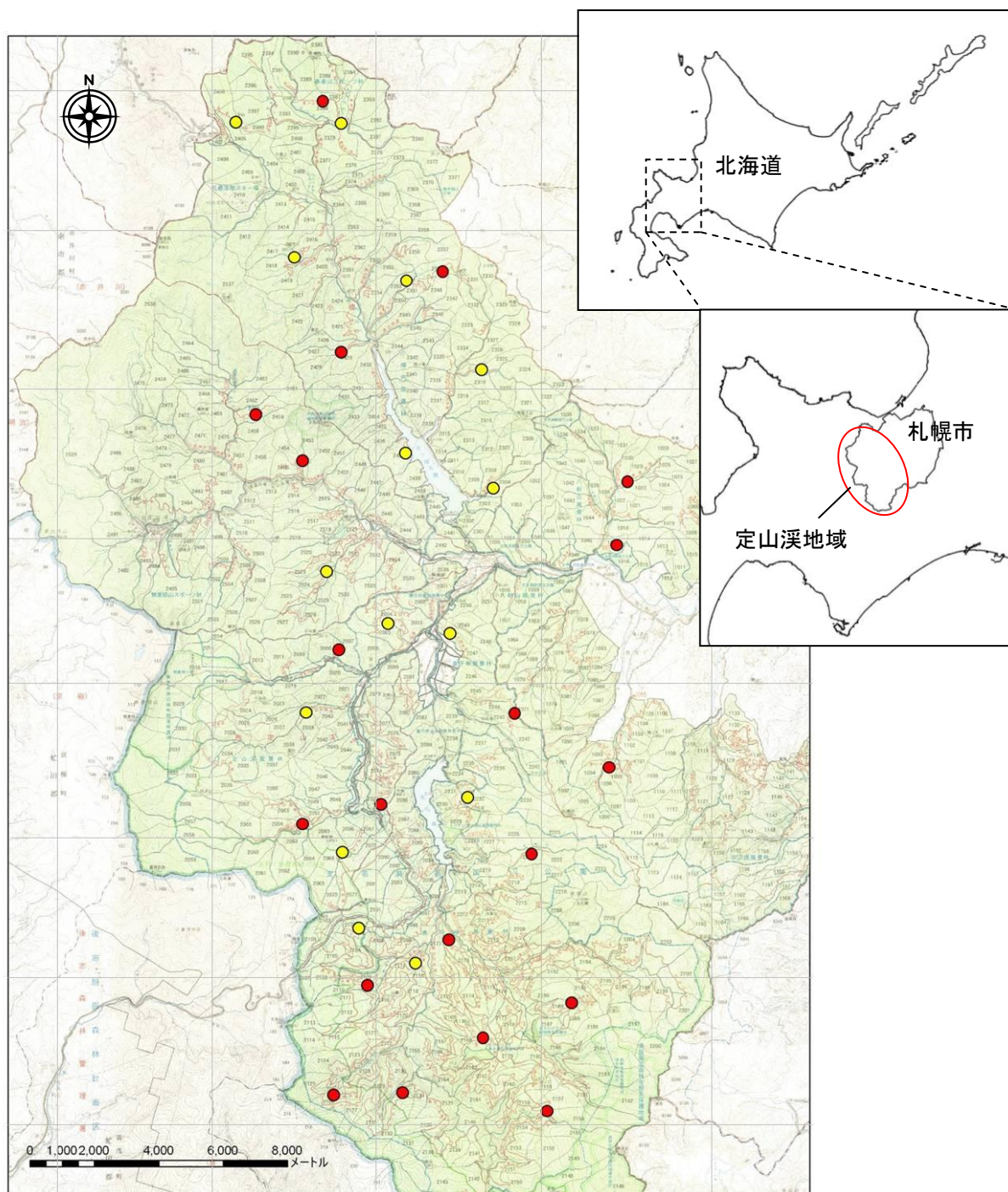


図1 ヘア・トラップ配置図

調査地の位置を右上に、ヘア・トラップの詳細な配置を左下の地図に示した。第1～5セッションは赤・黄丸の位置に、第6～8セッションは黄丸の位置にヘア・トラップを設置した（左下）。

3. 結果

トラップ利用数は第1セッションが最も多く、第3セッションが最も少ない結果となった（図2）。しかしながら、全体として利用トラップ数は15基中3～5基の間を推移し、大きな変動は見られなかった。

試料の数は第1セッションが最も多く、第3・4セッションが少ない結果となった（図3）。回収した試料のうち、毛根がついておらず分析に供することのできなかった試料はどのセッションにも出現した。特に、第1セッションは約半数が毛根の無い試料であった。

体毛7～10本分の毛根が確保された試料は全体に少なく、大半が1～6本分の試料であった（図4, 5）。7～10本分の試料は、そのほとんどで分析に成功したが、1～6本文の試料で分析に成功したものは少なかった。また、セッション数を重ねるにつれて分析成功試料数は減少したが、1～6本分の試料においてその傾向はより顕著であった。

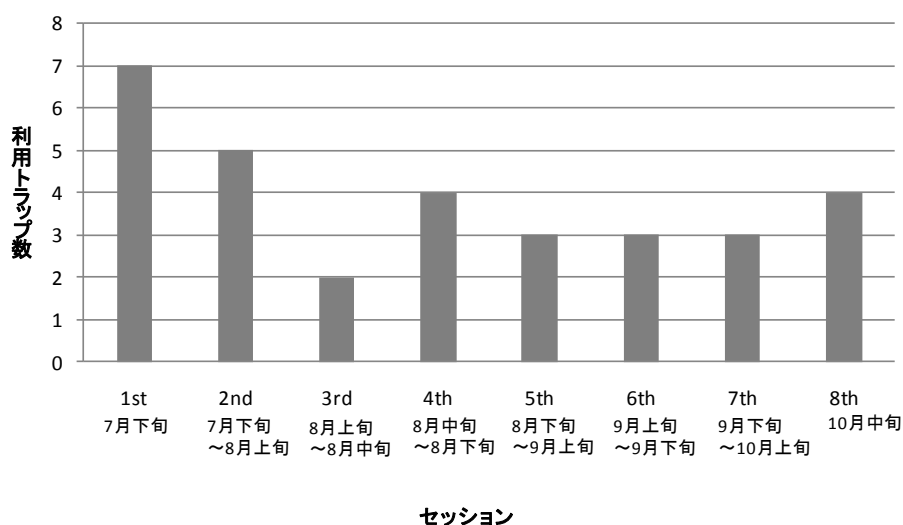


図2 全期間を通して稼働させた15基における利用トラップ数の推移

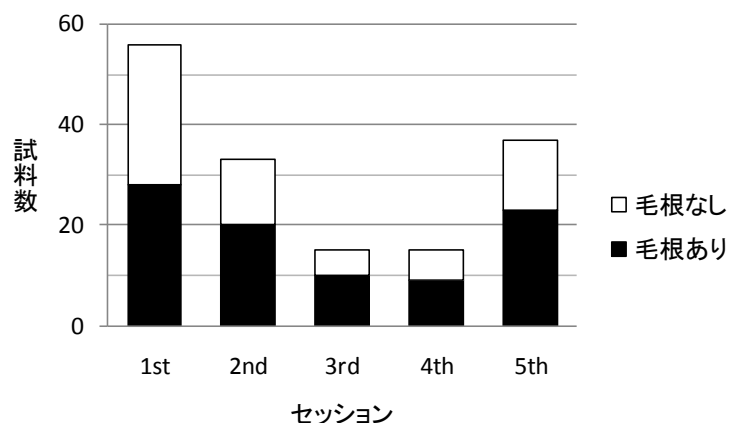


図3 第1～5セッションにおける試料数の推移

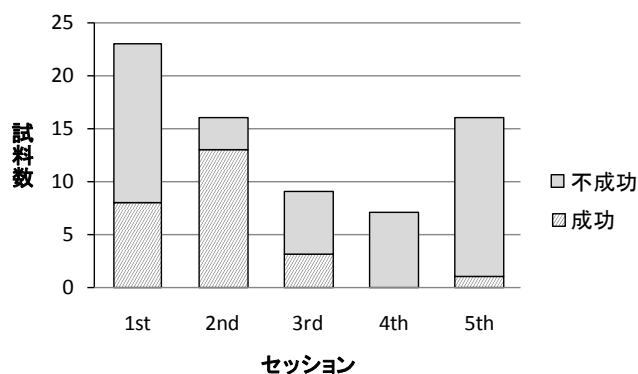


図 4 体毛 1～6 本分の毛根試料における分析成功数の推移

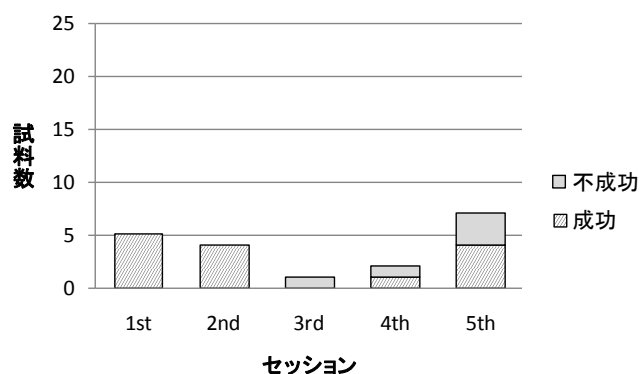


図 5 体毛 7～10 本分の毛根試料における分析成功数の推移

4. 考察

ヒグマにおいては、トラップ利用に関してツキノワグマで見られるような明確な季節性の変化は見られなかった。ヒグマはツキノワグマと比較して生息密度が低いいため、そもそもトラップに遭遇する機会が少ないことが推測される。特に今回の調査地域はヒグマの生息密度が低い地域であるため、利用トラップ数は低い値で推移したと考えた。なお、試料数は第 5 セッションで増加したが、これは、1 トラップあたりに付着した体毛の数が多かったのであり、トラップ利用が増加したわけではない。この時期のヒグマの体毛が抜けやすいかどうかについては情報が無く詳細は不明であるが、この時期（9 月上旬）は冬眠に向けて体毛密度を徐々に高めている時期であると推測される。そのため、特に毛が抜けやすい時期であるとは考えにくく、今回の結果に関しては、偶然多くの刺に体毛がひっかかったものと考えた。トラップ利用に関してはデータ数が少ないため、今後より多くのデータを集めて検証する必要がある。

一方、分析結果に関しては、セッションを重ねるにつれて分析成功試料数が減少するという、ツキノワグマと同様の傾向が読み取れた。ヒグマにおいても分析成功率の季節変動がある可能性が示唆された。ただし、分析結果に関しても試料数が全体に少ないため、明確な傾向を読み取ることは困難であった。なお、今年度は記録的な猛暑であり、札幌市もその例外ではなかった。2010 年 8 月の札幌における平均気温（24.8℃）は過去 30 年間の平均気温（22.2℃）よりも 2℃以上高く、降水量も 213.5mm と過去 30 年の平均（123.8mm）より多かった（気象庁，気象統計情報 <http://www.jma.go.jp/jma/menu/report.html> より）。この夏季の高温多湿が分析成功率を全体に引き下

げた可能性はある。今後の調査においては、より多くの試料を複数年にわたって収集し、ヒグマにおける分析成功率の傾向を検証する必要があると考える。その結果とトラップ利用率の結果との両方の面から検証を進めることで、ヒグマにおける調査適期の解明が期待される。

引用文献

- Paetkau, 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.
- Taberlet, P., Camarra, J. J., Griffin, S., Uhres, E., Hanotte, O., Waits, L. P., Doubois-Paganon, C., Burke, T. and Bouvet, J. 1997. Noninvasive genetic tracking of endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* 6: 869-876.
