

短 報

ホンシュウジカと和歌山県沖ノ島（友ヶ島）の移入ジカを 識別するための核遺伝マーカーの開発

総合研究大学院大学生命科学研究科
大阪府立環境農林水産総合研究所

松 本 悠 貴
幸 田 良 介

Establishing nuclear genetic markers to discriminate native Japanese sika deer and introduced sika deer on Okinoshima (Tomogashima) Island. Yuki Matsumoto* (*School of Life Science, SOKENDAI*) and Ryosuke Koda (*Research Institute of Environment, Agriculture and Fisheries, Osaka Prefecture*)

要旨 : 2016 年 7 月に、ホンシュウジカ (*Cervus nippon centralis*) の非生息地である大阪府泉南郡岬町でメスジカが捕獲され、遺伝解析の結果、この個体がホンシュウジカとタイワンジカ (*C. n. taiouanus*) の交雑個体である可能性が示唆されている。捕獲地点に近い和歌山県沖ノ島（友ヶ島）には人為的に導入されたタイワンジカが生息していること、付近の海上をシカが泳いでいるところが目撃されていることから、本州側への侵入が発生しているものと推察される。ホンシュウジカ固有の特徴を維持するためには、遺伝子攪乱状況を早急に把握し、対策を行う必要がある。本研究では、沖ノ島のシカとホンシュウジカの集団の判別に有用な遺伝マーカーを開発することを目的として、データベースに登録されているシカ科とウシの核ゲノム情報を用いた遺伝解析と分子生物学的実験を行った。沖ノ島のシカ ($n = 4$) とホンシュウジカ ($n = 3$) から得られたサンプルを対象に、新たに開発した 5 つの遺伝マーカーを用いて塩基配列を調べた。その結果、5 つのうち 2 つのマーカーで配列の決定に成功した。また、その両方の遺伝マーカーで、沖ノ島のシカとホンシュウジカの間で異なる配列が検出された。この結果は、本研究で開発した 2 つの遺伝マーカーが、上記 2 集団の判別に有効であることを示唆する。今後、解析を行うサンプル数を増やすことで、これらの遺伝マーカーの有効性をさらに詳細に検証する必要がある。

キーワード : 遺伝マーカー, 次世代シーケンサー, 種判定, タイワンジカ, 友ヶ島（沖ノ島）

Keywords : Formosan sika deer, Genetic marker, High-throughput sequencer, Species identification, Tomogashima (Okinoshima) Island

はじめに

2016 年 7 月に、ホンシュウジカ (*Cervus nippon centralis*) の非生息地である大阪府泉南郡岬町でメスジカが捕獲された。遺伝子解析の結果、捕獲個体からホンシュウジカとタイワンジカ (*C. n. taiouanus*) と同一の遺伝子配列が検出された（松本ほか、非公開データ）。捕獲地点に近い和歌山

県沖ノ島（友ヶ島）には、1955 年に人為的に導入されたタイワンジカが生息していることと（福島ほか、1983）、その個体群が本州側へ逸出している可能性が指摘されていることから（立澤、2000）、沖ノ島のシカが島外へ逸出し、ホンシュウジカと交雑した可能性が高い。先行研究により、沖ノ島のシカからはタイワンジカに加え、アカシカ (*C. elaphus*)、タイワンサンバー (*C. unicolor*)

swinhoei) の遺伝的特徴が検出されており、沖ノ島に導入されたシカ个体群は台湾の養鹿施設に由来している可能性が示唆されている (Matsumoto et al., 2015)。そのため、逸出个体を通じて、複数の外来種の遺伝的特徴がホンシュウジカに流入する可能性が高く、その遺伝子攪乱の影響は大きい。

一方で、これまで逸出の可能性については注視されていなかったため、外来シカの遺伝子流入状況の現状把握は全く行われていない。以前から逸出が頻繁に発生していたのであれば、既に友ヶ島周辺部を中心に、ホンシュウジカ个体群の遺伝的多様性が攪乱されている可能性も考えられ、早急に現状を把握する必要がある。

種判別の成功率は、解析に用いる遺伝マーカー数を増やすことで高めることができる (Dupuis et al., 2012)。しかし、これまでの研究から、沖ノ島のシカとホンシュウジカの集団の判別には有用な遺伝マーカーは、ミトコンドリア DNA のシトクローム b 遺伝子と、核 DNA の α ラクトアルブミン遺伝子の二つの遺伝子座に限られていた (Matsumoto et al., 2015)。ミトコンドリア DNA は母系に由来する単一の遺伝様式であることから、種判別の成功率を高めるには、核 DNA を対象とした遺伝マーカーの開発が必要である。

本研究*では、友ヶ島のシカとホンシュウジカの集団の判別をより正確に行うことを目的として、データベース上で登録されている核ゲノム情報を用いた解析により、新たに核遺伝マーカーの開発を行った。

材料と方法

DNA サンプル

本研究では、沖ノ島とホンシュウジカの2集団に由来する組織サンプルを用いた。沖ノ島のシカのサンプルは、2014年から2017年に得られた自



図 1. サンプルング地点。

然死した4個体から各1サンプルを得た。また、ホンシュウジカのサンプルとして、和歌山県南部の日高町と田辺市、および兵庫県南あわじ市で捕獲されたシカに由来するサンプルを1個体ずつの計3サンプルを用いた (図1)。各個体から耳もしくは筋組織を採取したのち、99%エタノール中に保存した。各サンプルを1cm四方程度に断片化させ、そのうちの一つの断片を用いて、プロテナーゼ K / フェノール・クロロホルム法により DNA を抽出した。

遺伝マーカーの開発

新規遺伝マーカーの設計には、NCBI の Sequence Read Archive (SRA) データベースで利用できる次世代シーケンサーのゲノム配列情報を用いた。ゲノム配列情報は、オジロジカ (*Odocoileus virginianus*) (SRR4069803 ~ SRR4069820) とトールエルク (*Cervus canadensis nannodes*) (SRR4340974 ~ SRR4340981) の2種をダウンロードした。また、参照となるゲノム配列としてウシ (*Bos taurus*) (UMD3.1) のデータをウシゲノムデータベース (The Bovine Genome Database) からダウンロードして用いた。

2種のゲノムデータを用いて、bwa 0.7.15 (Li & Durbin, 2009) によりウシゲノムへのマッピングを行った。その後、samtools v1.3.1 (Li, 2011) と vcftools v0.1.15 (Danecek et al., 2011) により2種

のシカの一塩基多型 (SNP) 情報を抽出した。次に、自作の R スクリプトを用いて、2 種のシカの間で SNP が多く存在するゲノム領域を特定した。ここでは、遺伝子配列の決定を効率的に行うため、1,000bp 以内での SNP の数を定量し、当該領域の位置と配列を記録した。記録した領域を対象として、EMBOSS cons (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cons> 2018.1 参照) により二種のシカにおけるコンセンサスシーケンスを得た。

次に、Primer3 (Untergasser et al., 2012) を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行うための遺伝マーカーを設計した。一度のシーケンシングで変異を検出し、さらに塩基配列を効率よく増幅するため、四つの条件 (① PCR 産物は 300 から 600bp の間の長さ、② 遺伝マーカーの各プライマーのサイズを 18-25bp、③ Tm 値を 60℃ から 65℃ の間で、かつ違いが 1℃ 以内に収まる、④ プライマーの GC 含量が 40 から 60 の間に収まる) を設定した。上記のコンセンサスシーケンスを用いて、設定した条件を指定して Primer3 を実行し、それぞれの遺伝マーカーを設計した。

PCR に使用する酵素には、Tks Gflex DNA Polymerase (Takara Bio Inc.) を用いた。PCR 条件は、10μl (鋳型 DNA 1μl, 2pM プライマー各 0.2μl, 2 × Gflex PCR Buffer 5.0μl, Tks Gflex DNA Polymerase 0.2μl, 滅菌水 3.4μl) を 94℃ で 1 分間

インキュベートした後、98℃ 30 秒, 62℃ 10 秒, 68℃ 30 秒を 30 サイクル, 72℃ での伸長反応を 3 分間で行った。

増幅した PCR 産物の遺伝子配列を決定するため、まず、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。その後、EtOH 沈殿により精製を行い、乾燥後に Hi-Di formamide を添加・混和した。調整済みのサンプルは、3730xl DNA Analyzer (50cm Capillary, POP-7 Polymer) によりシーケンス反応を行った。得られた塩基配列の波形データを用いて目視による確認を行い、最終的な塩基配列を決定した。

結果および考察

一連の解析と実験の結果、オジロジカとトールエルクの間で変異率が高い遺伝領域 Highly Polymorphic Region (HPR) を 5 つ同定した (HPR1 ~ HPR5) (表 1)。それらの二種の間で推定される塩基置換数は、5 ~ 16 塩基だった。すべての領域を増幅する遺伝マーカーを設計し、沖ノ島とホンシュウジカのサンプルを用いて実験を行ったが、5 つの遺伝マーカーのうち、PCR 反応で増幅に成功したのは HPR4 (トリミング後, 278bp) と HPR5 (同, 395bp) と 2 つの領域に限られた。

表 1. 開発した遺伝マーカーの詳細.

領域	推定塩基置換数	プライマー名	方向	Tm 値	配列	推定される PCR 産物の長さ
HPR1	6	HPR1L	Forward	60.12	TTTCCTTCCCCATTTTAGGG	431bp
		HPR1R	Reverse	60.38	AGCCTGGAGACAAAGATTGAGA	
HPR2	16	HPR2L	Forward	60.15	CTGTCTGTCTGGAAAATCTTGG	324bp
		HPR2R	Reverse	60.79	CCTGAGGAAACAGGATGCAG	
HPR3	5	HPR3L	Forward	60.58	TGGTGTACAAATCCACAGC	462bp
		HPR3R	Reverse	60.03	TTGGATGAGTCACCCTGGA	
HPR4	9	HPR4L	Forward	61.34	ATGACACCTCTCCCCAGACC	334bp
		HPR4R	Reverse	60.3	GAGAGGTGGTGTCTCACTGGA	
HPR5	5	HPR5L	Forward	60.48	TACCTCCCAGACCTGCAT	416bp
		HPR5R	Reverse	60.06	GTCTCATGGGAGACTGGATGA	

表 2. ホンシュウジカと沖ノ島のシカにおける HPR4 と HPR5 領域の遺伝子配列.

集団	個体 ID	HPR4 (279bp)						HPR5 (395bp)							
		15	42	58	185	229	236	27	40	120	122	137	254	275	364
ホンシュウジカ	和歌山 1	G	A	C	A/G	C	C	C	C	C	A/G	A/G	A/G	A/G	C
	和歌山 2	G	A	C	A/G	C	C	C	C	C	A/G	A/G	A/G	A/G	C
	淡路島 1	G	A	C	A/G	C	C	C	C	C	A/G	A/G	A	A/G	C
沖ノ島のシカ	沖ノ島 1	A/G	A/G	C/T	G	C/T	C/T	C/T	C/A	C/A	G	G	A/G	G	C/T
	沖ノ島 2	A/G	A/G	C/T	G	C/T	C/T	C/T	C/A	C/A	G	G	A/G	G	C/T
	沖ノ島 3	A/G	A/G	C/T	G	C/T	C/T	C/T	C/A	C/A	G	G	A/G	G	C/T
	沖ノ島 4	A/G	A/G	C/T	G	C/T	C/T	C/T	C/A	C/A	G	G	A/G	G	C/T

* 数字はアライメントした後で 5' 末端の共通した塩基を起点とした番号を示す. ここでは多型のあるサイトのみを示す.

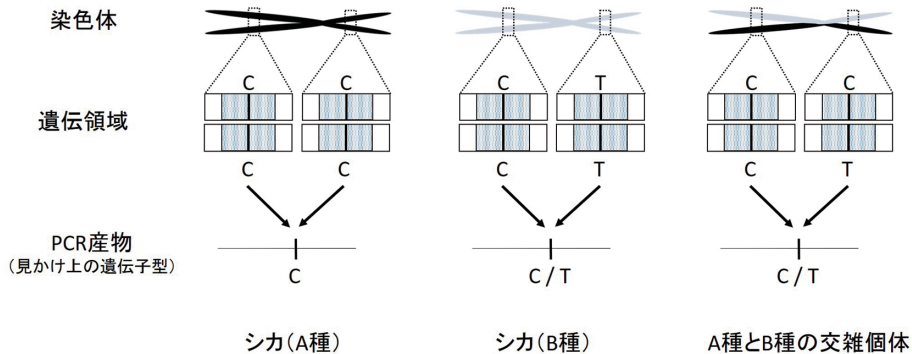


図 2. 重複配列と見かけ上の遺伝子型に関する例. 網掛けはゲノム中に存在する重複配列を示す. 網掛けの内側にある縦線は重複配列のうちの単一の塩基を示す. A 種では重複配列は完全に同じ塩基配列であるが, B 種では, C から T に置換した重複配列を持っている. この場合, A 種の遺伝子型は, 見かけ上は C のホモであるが, B 種では C/T のヘテロになる. また, A 種と B 種の交雑個体でも, 見かけ上の遺伝子型は C/T のヘテロとなり, B 種と区別することができない.

HPR4 と HPR5 で友ヶ島のシカとホンシュウジカの塩基配列を比較した結果, 2 集団の間で違いが検出されたのはそれぞれ 6, 8 塩基であった. HPR5 の 254 番目の塩基を除き, ホンシュウジカと沖ノ島のシカの集団間で異なる遺伝子配列が検出された (表 2). この結果は, HPR4 と HPR5 の遺伝マーカーが沖ノ島のシカとホンシュウジカの集団の判別に有効であることを示唆する. HPR5 の 254 番目の塩基の変異は淡路島の個体のみから検出されたため, 淡路島集団に特異的な変異の可能性がある. しかし, 淡路島集団は一個体のみが解析対象であったため, 254 番目の変異の淡路島集団内での独自性を調べるためには, 解析個体数

を増やす必要がある.

HPR4 と HPR5 の遺伝子配列で違いがあったすべての塩基でヘテロが検出された. HPR5 の 254 番目を除き, 片方の集団でのみヘテロが検出された. このため, これらの遺伝領域では, 異なる対立遺伝子が集団中で維持されている可能性がある. また, その他の可能性として, これらの塩基配列がゲノム上で複数に重複し, 領域間で異なる変異が蓄積した結果, 見かけ上, 単一の配列として PCR で増幅された可能性がある (図 2). この場合, ホンシュウジカと沖ノ島のシカの 2 集団の間の交雑個体では, 見かけ上, どちらかの種と同一の配列となるため, 本研究で開発した方法では,

この2集団間での交雑を検出することはできないと考えられる。HPR4とHPR5が重複配列かどうかを明らかにするためには、ホンシュウジカや近縁種のシカを対象として、次世代シーケンサーのリード情報を用いた詳細な解析や、完全なゲノム配列の決定を行う必要がある。

本研究で用いたサンプルは、沖ノ島のシカが4サンプル、ホンシュウジカのサンプルが3サンプルであった。沖ノ島の現在の推定個体数は50頭程度（松本・幸田，2017；野生動物保護管理事務所，2017），和歌山県本土のシカの推定個体数が中央値で48,227頭（環境省，<https://www.env.go.jp/press/files/jp/26912.pdf> 2017.12 参照），淡路島のシカの推定個体数が中央値で5,130頭である（岸本ほか，2012）。そのため、HPR4とHPR5でより多くの多型がそれぞれの集団に存在する可能性がある。以上のことから、本研究で開発した遺伝マーカーの有効性をさらに検証するためには、当該地域におけるより多くのシカを対象として解析を行う必要がある。これらの遺伝マーカーの有効性が検証されたのち、関西一円のホンシュウジカ個体群に適用し、遺伝子攪乱状況を詳細に調べることが望まれる。

謝辞

本研究を行うにあたり、関西自然保護機構2017年度研究助成の助成を受けた。友ヶ島海の家吉田夫妻と友ヶ島管理事務所の皆さまには友ヶ島のシカのサンプルの収集や野外調査で多大なご協力をいただいた。また、和歌山県のシカのサンプルの収集は、紀州ジビエ生産販売企業組合と（一社）和歌山鳥獣保護管理捕獲協会にご協力いただいた。本稿執筆にあたっては、国立遺伝学研究所の田邊彰博士から有益なコメントをいただいた。これらの方々に深くお礼申し上げる。

引用文献

- Danecek, P., A. Auton, G. Abecasis, C. A. Albers, E. Banks, M. A. DePristo, R. E. Handsaker, G. Lunter, G. T. Marth, S. T. Sherry, G. McVean, R. Durbin & 1000 Genomes Project Analysis Group. 2011. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27 : 2156-2158.
- Dupuis, J. R., A. D. Roe & F. A. Sperling. 2012. Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: one marker is not enough. *Molecular Ecology*, 21 : 4422-4436.
- 福島成樹・三浦慎悟・羽澄俊裕・菊池ゆり子・田中 均・丸山直樹. 1983. 友ヶ島におけるタイワンジカの生息状況，とくに生息頭数について。「友ヶ島学術調査」（関西自然保護機構編），pp. 67 - 77. 和歌山市. 和歌山.
- 岸本康誉・関香菜子・坂田宏志. 2012. ニホンジカの個体群動態の推定と将来予測（淡路島2011年）. 兵庫ワイルドライフレポート，1 : 17 - 31.
- Li, H. 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, 27 : 2987-2993.
- & R. Durbin. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25 : 1754-1760.
- Matsumoto, Y., Y. T. Ju, T. Yamashiro & A. Yamashiro. 2015. Evidence of pre-introduction hybridization of Formosan sika deer (*Cervus nippon taiouanus*) on Okinoshima, Wakayama Prefecture, Japan, based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Conservation Genetics*, 16 : 497-502.
- 松本悠貴・幸田良介. 2017. 和歌山県友ヶ島の外来種タイワンジカをとりまく過去と現在. 生物

- 学史研究, 96 : 64 – 66.
- 立澤史郎. 2000. 大阪近郊の哺乳類 (5) ニホンシカⅢ. *Nature Study*, 46 : 6.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm & S. G. Rozen. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40 : e115.
- 野生動物保護管理事務所. 2017. 平成 28 年度瀬戸内海国立公園友ヶ島におけるシカ属生息状況等調査業務報告書. 53pp. 野生動物保護管理事務所. 野田.