

糞からの環境 DNA を利用したアカミミガメの食性解析 Analysis of food habit for the red-eared sliders using environmental DNA extracted from their feces

○小出水規行・森 淳・嶺田拓也・澤田英司*・渡部恵司・竹村武士

Koizumi, N., Mori, A., Mineta, T., Sawada, E., Watabe, K. and Takemura, T.

1. はじめに

生きものたちが何を食べているのか？食性解析は生物の食う・食われるの関係を解き明かすだけでなく、その関係を援用した生物保全や生態系解明、ひいては農村環境の適正管理に向けた重要な情報を提供し得る。従来から行われてきた食性解析では、対象生物の胃内容物を取り出し、顕微鏡等で直接観察する方法がよく用いられる。しかし、個体を生かした状態で胃内容物を取り出す作業や消化されたものからの生物種同定には、高度な技術や専門知識等が必要となる。著者らは近年、農業水路の水から抽出した DNA(環境 DNA と呼ばれる、以下、eDNA) を用いて、対象生物種の DNA を検出することで、その種の存在や生息状況を評価する手法確立に取り組んでいる。

本発表では、これまで実施してきた eDNA 解析の応用として、ミシシippアカミミガメ (*Trachemys scripta elegans*) の糞から抽出した eDNA を用いて、その食性を明らかにする。現在、本種は在来カメ類の生存を脅かし、要注意外来生物に指定されている。さらにハス田における食害の可能性も指摘され、食性についての実態解明が求められている。



図1 アカミミガメ(左)と DNA 抽出に用いた糞(右)
Photos of the red-eared slider (left) and the slider feces used for DNA extraction (right)

表1 サンプルに用いたカメ個体の背甲長 mm, 体重 g, 糞量 g, 抽出された DNA 濃度 ng/μL
Carapace length, body weight, feces volume and extracted DNA concentration of the slider sample

個体番号	背甲長	体 重	糞 量	DNA 濃度
1	180	870	0.16	5.5
2	195	1,075	0.41	7.5
3	209	1,330	0.24	10.6
4	201	1,235	0.20	14.3
5	160	520	0.39	5.4
6	178	870	0.27	38.3
7	221	1,765	0.32	4.7
8	199	1,335	0.20	8.6

表2 分析対象植物種の略名, 学名, PCR 増幅される rbcL 遺伝子の DNA サイズ (塩基対)

Abbreviated name, scientific name of targeted plant and its DNA size of rbcL gene amplified using PCR

種名	略名	学名	サイズ
ヨシ	ヨシ	<i>Phragmites australis</i>	202
タガラシ	タガ	<i>Ranunculus sceleratus</i>	462
ケムシクサ	ケム	<i>Veronica peregrine f. xalapensis</i>	258
スズメノカタビラ	スズ	<i>Poa annua</i>	167
カワヂシャ	カワ	<i>Veronica undulate</i>	259
タネツケバナ	タネ	<i>Cardamine scutata</i>	192
マコモ	マコ	<i>Zizania latifolia</i>	335
コマツブウマゴヤシ	コマ	<i>Medicago lupulina</i>	125
ハス	ハス	<i>Nelumbo nucifera</i>	174

2. 材料と方法

1) 分析サンプルと DNA 抽出 徳島県鳴門市の農業水路でミシシippアカミミガメ 8 個体(背甲長平均 193mm, 体重平均 1,125g) を捕獲し(図 1 左, 表 1), 無給餌飼育中に採取した糞をサンプルとした。糞サンプルは 99.9%エタノールで固定し, -30°C で保管した。市販の DNA 抽出キットを利用して

農村工学研究所 (National Institute for Rural Engineering), *徳島県立農林水産総合技術支援センター (Tokushima Agriculture, Forestry and Fisheries Technology Support Center)

キーワード: PCR, 要注意外来生物, 農業水路

各個体の糞サンプル平均 0.27g から平均 11.9ng/μL の DNA を抽出した (図 1 右, 表 1).

2) 対象植物種と eDNA 解析 水路の植生分布を調査し, 優占度が高く, 餌となる可能性のある植物 9 種を PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 分析の対象とした (表 2). eDNA 解析は次の手順①~③で実施し, カメ個体の糞サンプルの eDNA から対象植物種の DNA (遺伝子) を増幅できた場合, その個体は該当する植物種を摂餌した可能性があるかと推察した. 手順①: 葉緑体 DNA 中の rbcL 遺伝子について, 種特異的に増幅できる PCR プライマーを植物種ごとに設計した (表 2). 手順②: プライマーごとに各糞サンプルの eDNA を鋳型とする PCR を 4 回繰り返して実施した. 各繰り返しにおいては同一の eDNA サンプルを用いた. 手順③: PCR 終了後, 遺伝子の増幅 (存在) 状況を確認するため電気泳動を行った.

3. 結果とまとめ

1) 電気泳動像における植物種の遺伝子の増幅確認 電気泳動の結果の例として, カメ個体番号 6, 7 の糞サンプルの eDNA について分析したカワジシャ遺伝子の電気泳動像を図 2 に示す. 個体 6 については PCR 4 回中, 全ての回で当植物種の遺伝子増幅を表すバンド (図中の矢印) を確認した. 個体 7 では個体 6 で見られたバンドは 1 回も出現しなかった. このような電気泳動像における増幅バンドの出現状況から, 個体 6 は当植物種を摂餌し, 個体 7 は摂餌していなかったと推察できる.

2) eDNA 分析に基づくカメ個体の食性 各カメ個体の糞サンプルの eDNA を分析し, 電気泳動像から確認できた対象植物 9 種の遺伝子増幅回数 (0~4 回) を表 3 に示す. 個体別にみると (表 3 の種数計), どの個体もいずれかの植物種で遺伝子が増幅され, 少ない個体では 2 種 (個体 7, 8), 多い個体では 5 種 (個体 2~5) となった. 植物種別にみた場合 (個体数計), ヨシとコメツブウマゴヤシの遺伝子が 7 個体で出現し, 次いでマコモとハスが 5 個体で確認された. 糞の eDNA 解析により, カメ個体は複数の植物種を摂餌し, 個体によって摂餌する植物種が異なる可能性が明らかとなった. 今後は解析サンプル数を増やすことにより, 摂餌植物種の選好性の定量化や個体の成長による違い等について解析を進める予定である.

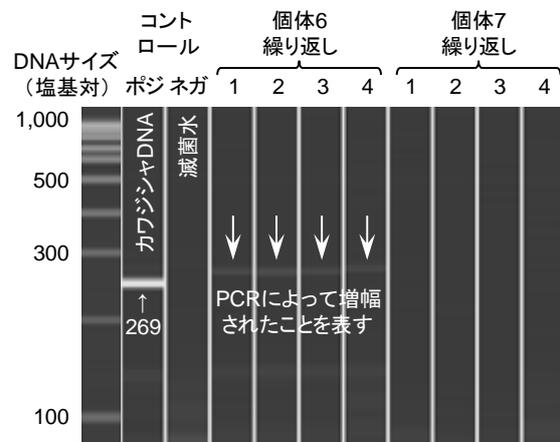


図 2 PCR によってカメ個体の eDNA から増幅されたカワジシャ遺伝子の電気泳動像
Electrophoresis profile for DNA fragment of *V. undulate* amplified from the slider eDNA using PCR

表 3 各カメ個体の eDNA について行った PCR4 回繰り返しにおける植物種遺伝子の増幅回数
Frequency of DNA fragment of target plant amplified from each slider eDNA in four PCR replications

個体番号	植物種 (略名)									種数計
	ヨシ	タガ	ケム	スズ	カワ	タネ	マコ	コメ	ハス	
1	1	0	0	0	0	1	1	4	0	4
2	4	0	0	1	0	0	1	3	4	5
3	2	0	0	0	4	0	2	2	1	5
4	1	0	0	1	4	0	0	2	4	5
5	3	0	0	1	0	0	1	1	1	5
6	1	0	0	0	4	0	0	1	0	3
7	0	0	0	0	0	0	1	2	0	2
8	1	0	0	0	0	0	0	0	3	2
個体数計	7	0	0	3	3	1	5	7	5	7