

白神山地周辺におけるニホンジカの胃内容物

顕微鏡分析と DNA バーコーディングの異なる 2 つの手法を用いて

坂田ゆず

秋田県立大学 生物資源科学部 生物環境科学科

近年急速に分布域を拡大しているニホンジカ（シカ）が森林の植生や生態系に与える影響を予測するためには、シカの植物種に対する嗜好性を把握することが重要であるが、シカの侵入初期の低密度時における食性に関する知見はほとんどない。本研究では、シカの侵入初期の地域の一つである白神山地周辺のシカの食性を記録することを目的とした。白神山地周辺でロードキルおよび捕獲されたシカ 2 個体の胃内容物を顕微鏡分析と DNA バーコーディングの二つの異なる手法を用いて、複合的にシカの胃内容物を明らかにした。顕微鏡分析の試料中の内容物は、2 個体ともに双子葉の葉がそれぞれ 31.4%と 30.5%、種子や果実が 30.2%と 24.0%と最も多くを占めていた一方で、ササなどのグラミノイドは少なかった。DNA バーコーディングにおいて、28 科 50 種の多様な植物分類群が検出された。以上により、侵入初期の植生が豊富な場所においては、シカは幅広い植物分類群を採食しており、その中でも特に多く採食している分類群があることが明らかになった。今後、糞などを用いることでサンプル数を増やし、植生調査と合わせて、シカの食害に対する植物各種の脆弱性を明らかにしていく必要がある。

キーワード：ニホンジカ、白神山地、胃内容物、DNA バーコーディング、顕微鏡分析

近年、日本各地でニホンジカ（以下シカ）の急激な分布の拡大及び密度の増加が見られ、分布域は 2011 年から 2014 年までに約 1.2 倍に拡大している（環境省 2016）。特に北東北においては、過去 5 年間に岩手県北部、秋田県、青森県において初めてシカが目撃された場所が急速に増加している（環境省 2016, 東北森林管理局 2015）。

シカが過密化した森林では、広い範囲で植生が衰退・消失し、植物と昆虫や鳥類との相互作用を崩壊させ、生態系機能にまで波及する影響が危惧されている（荒木・横山 2011）。森林の植生や生態系の変化を予測し、適切に管理するためには、シカの影響が顕在化する前に、シカの植物種に対する嗜好性を把握することが重要である。しかし、シカが侵入初期の低密度時における食性に関する知見はほとんどない。

秋田県と青森県ではシカが明治時代に絶滅したと

言われてきたが、白神山地世界遺産地域内およびその周辺地域において、最近になってシカが目撃が増加しており、2016 年と 2017 年にそれぞれ 15 件以上の目撃があった（秋田県 2017）。白神山地の森林生態系への影響が危惧されている。これまで北東北においてシカの食性について調べられた例はないため、本研究では、シカの侵入初期の地域の一つである白神山地周辺のシカの食性を記録することを目的とした。

これまでシカの食性に関する研究の多くは、顕微鏡を用いた糞分析や胃内容物分析が主であったが、正確な同定は調査者の経験が必要であり、バイアスも生じやすい上に、種までの同定が難しい。近年、サンプルに含まれる DNA 塩基配列を解読し、これをデータベース化された塩基配列と比較することで、分類群の同定を行う DNA バーコーディングが食性解析に用いられることが多くなってきている。DNA バ

ーコーディングは従来の方法と比較して、同定精度が高く、観察者のバイアスを受けずに多数のサンプル分析が可能であるという長所を持つ(Nochols *et al.* 2016). 草食動物の食性解析で *trnL*(UAA) intron P6 loop 領域(以下 *trnL*)が広く用いられている(Raye *et al.* 2011). この領域は非常に短く、野外環境中の試料に有用であることが証明されているため、糞のような劣化した野外サンプルに用いることができる強みを持つ(Valentini *et al.* 2009). 本研究では、顕微鏡分析と DNA バーコーディングの二つの異なる手法を用いて、複合的にシカの胃内容物を明らかにした。

材料と方法

胃内容物の回収

秋田県八峰町および青森県深浦町の周辺における地域は、冷温帯落葉広葉樹が優占し、白神山地世界遺産地域に近接する。2016年11月に秋田県八峰町八森字横間台地内においてオスジカのロードキル個体1頭と、2017年11月に青森県西津軽郡深浦町風合瀬において有害捕獲されたオスジカ1頭の第一胃から均等に内容物を500g回収し、70%エタノールで保存した。

顕微鏡分析

胃内容物のタイプは、双子葉の落葉広葉樹・草本、種子・果実、木本および草本の茎、ササ、ササ以外のグラミノイド、針葉樹、その他に区分した。量的評価は Takatsuki (1978) および Leader-Williams (1981) に準じた。すなわち、内容物を 2mm のふるい上で水洗し、残留物を少量の水とともに底面に 5mm 格子が施されたシャーレに広げ、肉眼および実体顕微鏡により内容物タイプを判定し、また植物片に覆われた格子点を 500 点計数し、各内容物タイプの割合を求めた。実体顕微鏡で判断がつかなかった場合は、光学顕微鏡で観察し内容物タイプを判定した。

DNA バーコーディング

1頭あたり約 5g の胃内容物をアルミカップに入れ、高温乾燥機を用いて 65°C で約 3 時間、乾燥させた。乾燥させたサンプルは乳鉢に入れ、液体窒素で凍結

させ、乳棒で粉々になるまですり潰した。DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて植物 DNA を抽出した。抽出した DNA は、MiSeq (Illumina) 用のシーケンスプライマーを連結した *trnL* g-h プライマー (Taberlet *et al.* 2007) を用いて PCR 増幅を行った。反応液の組成は、抽出した 50ng/μl の DNA を 1μl, Extaq を 0.1μl, ExTaq Buffer を 1μl, dNTPs を 0.8μl, 400μmol/L の *trnLh* プライマー, 400μmol/L の *trnLg* プライマーである。PCR 条件は、初期変性を 94°C 5 分、熱変性を 94°C 30 秒、アニーリングを 55°C 45 秒、伸長反応を 72°C 30 秒で 35 サイクル、最終伸長を 72°C 7 分で行った。PCR 産物を AMPure XP Kit (Beckman Coulter) を用いて精製した後、各サンプルを識別するインデックス配列と MiSeq 用のアダプター領域を付加するための PCR を行った。PCR 条件は、初期変性を 94°C 5 分、熱変性を 94°C 30 秒、アニーリングを 55°C 45 秒、伸長反応を 72°C 30 秒で 10 サイクル、最終伸長を 72°C 7 分で行った。その後再び AMPure で精製し、Qubit® 2.0 Fluorometer (Life technologies) を用いて PCR 産物の濃度を測定した。シーケンスは MiSeq V2 Nanokit (300cycle) を用いて秋田県立大学バイオテクノロジーセンターに委託した。

シーケンシングの結果得られた DNA 配列は、Clident (Tanabe and Toju 2013) を用いてインデックス配列でサンプルごとに識別した。全ての配列はキメラチェック後、97%類似度でクラスタリングを行った。これを OTU (Opetation Taypnomi Unit) として、調査地で見られる種子植物を中心とする計 378 種において、同じ DNA 領域の塩基配列のローカルデータベースと分けられたデータを照合した。データベースと照合する際は、E-value が 1×10^{-25} 以下のものと配列の類似率が 96%未満のものを除去するフィルタリングを行った。シカ飼育個体において採餌試験を行い DNA バーコーディングの有用性を確かめた研究によると、少数の配列(サンプル内の全配列のうち 1%以下)は餌として与えていない植物がデータベースに当てはまる場合があることが示された (Nakahara *et al.* 2015)。そのため、サンプルごとに得られた全配列数のサンプル間の平均配列数の 1%以下は除去するフィルタリングを行い、シーケンスエラーと思われる配列を除去した。

結果と考察

DNA バーコーディングにおいて、28 科 50 個の植物分類群が検出された。このうち 38 分類群は種まで同定が可能であった。顕微鏡分析の試料中の内容物は、八峰町と深浦の両個体において、双子葉の葉がそれぞれ 31.4%と 30.5%，種子や果実が 30.2%と 24.0%と最も多くを占めていた（表 1, 図 1）。DNA バーコーディングにおいても、双子葉の植物片がそれぞれ 94.6%と 99.0%を占めていた（表 2, 図 2）。中でも、ハナタデ、ミゾソバ、オオイタドリなどのタデ科の草本が多く見られた。種子や果実は、八峰町の個体はクリとノブドウが最も多く次いでミズナラなどの堅果、深浦の個体はノイバラが最も多く、両個体ともマメ科やイネ科などの小さな種子が見られた。DNA バーコーディングにおいても、八峰町ではブドウ属やコナラ属やクリ、深浦ではノイバラの植物片がそれぞれ多く検出され、2 つの手法で一致した結果が得られた。生活形で分類すると、八峰町の個体はすべての分類群がそれぞれ均等に割合を占めていたが、深浦の個体は低木が優勢し次いで多年性草本が多く、その他の分類群はわずかにしか見られなかった（図 3）。これは、八峰町では前述したハナタデ（一年性草本）、コナラ属（高木）、ノブドウ（ツル性）などの異なる生活形の特定の種が多く見られたのに対して、深浦ではノイバラ（低木）とオオイタドリ（多年性草本）が優勢していたためだと考えられる（表 2）。

顕微鏡分析において、ササ以外のグラミノイドは、それぞれ 18.2%と 20.3%を占め、ササは両個体とも少なく 3%程度であった（図 1）。一方で、DNA バーコーディングにおいて、ササ以外のグラミノイドは 5.1%であり、ササはほとんど検出されなかった（図 2）。この不一致については、顕微鏡分析でのグラミノイドの判定に誤りがあり過大評価していたか、あるいはグラミノイドは PCR で増加しにくいなどの植物分類群特有の現象により（Nichols et al. 2016）、2 つの手法で異なる結果を示した可能性が考えられる。東北の五葉山や九州山地の研究例において、秋のシカの顕微鏡分析を用いた糞分析結果では、それぞれササが 20%程度占めていたのに対して

（Takatsuki et al. 2010）、本試料においては 3%程度と極めて低い割合を示した。一般に北日本のシカでは、タンパク質含有率が比較的強く大量に生育するイネ科やカヤツリグサ科などの草本（グラミノイド）を中心に採食するグレーザー型の傾向があると言われている（高槻 2006）。また、本試料からはスギなどの針葉樹の葉片は観察されなかった。採取されたのが 11 月であったことや人里近くに滞在していたこともあり、種子や果実が占める割合が高く、グラミノイドが低い結果になったと可能性が考えられる。本研究から、顕微鏡分析と DNA バーコーディングという 2 つの手法を組み合わせることで、それぞれの手法の欠点を補い、植物を種レベルでかつ量的評価することにつながると考えられる。

以上により、侵入初期の植生が豊富な場所においては、シカは幅広い植物分類群を採食しており、その中でも特に多く採食している分類群があることが明らかになった。シカは嗜好性が強いものから採食していくという先行研究（大橋ら 2007）から示唆されている特性を反映している可能性がある。今後、嗜好性の強い種をリスト化することで、植物種レベルでの適切な保全策を考えていくことが重要だろう。また、シカの侵入初期の森林において、胃内容物に加えてシカの糞を用いることでサンプル数を増やし、植生調査と合わせて、シカの食害に対する植物各種の脆弱性を明らかにしていく必要があると考えられる。

謝辞

本研究の分析において、青木雅紘氏、上倉優氏、北村芽唯氏にはご協力いただきました。岡野邦宏博士には実験にあたりご協力いただきました。ここに記して謝意を表します。本研究は、秋田県立大学平成 29 年度産学連携推進事業の支援を受けて行われました。

文献

秋田県（2017）「ニホンジカを目撃箇所」
<https://www.pref.akita.lg.jp/pages/archive/6075>

荒木良太・横山典子 (2011) 「ニホンジカが森林生態系に与える影響」『森林科学』 61:25-29

大橋春香, 星野義延, 大野啓一 (2007) 「東京都奥多摩地域におけるニホンジカ (*Cervus nippon*) の生息密度増加に伴う植物群落の種組成変化」『植生学会誌』 24:123-151.

環境省 (2016) 「統計手法による全国のニホンジカ及びイノシシの個体数推定等について」
<http://www.env.go.jp/press/102196.html>

Leader-Williams N, Scott TA, Pratt RM (1981) Forage selection by introduced reindeer on south Georgia, and its consequences for the flora. *Journal of Applied Ecology* 18:83-106.

Nakahara F., Ando H., Ito H., Murakami A., Morimoto N., Yamasaki M., Takayanagi A., Isagi Y. (2015) . The applicability of DNA barcoding for dietary analysis of sika deer. *DNA Barcodes* 3 : 200-206

Nichols R. V., Åkesson M., Kjellander, P. (2016). Diet Assessment Based on Rumen Contents: A Comparison between DNA Metabarcoding and Macroscopy. *PloS one* 11: e0157977.

Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Miquel C., Valentini A., Vermet T, Corthier G, Brochmann C, Willerslev, E. (2007) . Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic acids research*, 35: e14

Takatsuki (1978) Precision of fecal analysis: a feeding experiment with penned sika deer. 『哺乳動物学雑誌』 7:167-180.

高槻成紀(2006) 「ニホンジカを俯瞰する」『シカの生態誌』 480pp.東京大学出版会,東京 331-378.

Takatsuki S, Fuse S, Ito T. (2010) A comparison of diet and digestion between sika deer and Japanese serow in northern Japan. *Mammal Study* 35:257-263.

Tanabe A. S., Toju, H. (2013). Two new computational methods for universal DNA barcoding: A benchmark using barcode sequences of bacteria, archaea, animals, fungi, and land plants. *PloS one*, 8(10), e76910.

東北森林管理署 (2015) 「ニホンジカ影響調査・簡易チェックシート調査」

http://www.rinya.maff.go.jp/tohoku/apply/publicsale/koukoku_kyoku/H27_cheltukusiitosyuuukei.html

Rayé G, Miquel C., Coissac E., Redjadj C., Loison A., Taberlet P. (2011). New insights on diet variability revealed by DNA barcoding and high-throughput pyrosequencing: chamois diet in autumn as a case study. *Ecological Research*, 26(2), 265-276.

Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 110-117.

表と図

表 1. シカの胃内容物の植物片のサンプル数

内容物タイプ	八峰町	深浦
落葉広葉樹・双子葉草本	157	154
双子葉	146	148
枯葉	11	6
果実・種子	151	121
堅果	57	0
果実	33	22
種子	61	99
茎(樹木・草本)	95	91
グラミノイド	91	120
ササ以外	73	101
ササ	18	19
針葉樹	0	14
その他	6	0
計	500	500

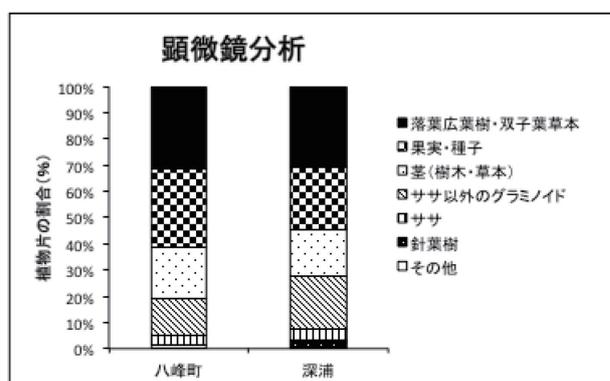


図 1 顕微鏡分析で得られた植物片の割合.

表 2. DNAバーコーディングで検出された植物分類群とその出現頻度 (%)

科	植物分類群	八峰町	深浦
アカネ科	オククルマムグラ	0.02	0.00
イネ科	チシマザサ	0.09	0.39
イネ科	チジミザサ	0.02	0.00
ウコギ科	キツタ	0.15	0.00
ウコギ科	タラノキ	0.17	0.00
ウコギ科	ヤマウコギ	0.06	0.00
ウルシ科	ウルシ属 sp.	0.08	0.04
オオバコ科	オオバコ	0.08	0.00
カタバミ科	カタバミ	0.02	0.00
カツラ科	カツラ	0.00	0.00
カバノキ科	シデ・ハシバミ属 sp.	0.13	0.00
キク科	オニアザミ	0.00	0.46
キク科	キク科 sp.	8.54	0.07
キク科	シオン属 sp.	0.25	0.00
キク科	ヒヨドリバナ属 sp.	0.02	0.00
クロウメモドキ科	ケケンポナシ	0.32	0.04
クワ科	ヤマゲワ	0.99	0.49
サクラソウ科	ヌマトラノオ	0.00	0.18
スイカズラ科	タニウツギ	0.00	0.00
スミレ科	スミレサイシン	1.71	0.00
タデ科	オオイタドリ	0.06	27.10
タデ科	タニタデ	0.02	0.00
タデ科	ハナタデ	35.83	0.35
タデ科	ミズヒキ	0.23	0.00
タデ科	ミゾソバ	5.63	0.00
タデ科	ヤノネグサ	0.02	0.00
ツユクサ科	ツユクサ	0.06	0.00
トチノキ科	トチノキ	0.74	0.00
ニシキギ科	ツルウメモドキ	0.00	0.04
ニシキギ科	ニシキギ	0.02	0.21
ニシキギ科	マサキ・マユミ	0.28	2.57
バラ科	キイチゴ属 sp.	0.99	0.00
バラ科	ノイバラ	5.69	66.98
バラ科	バラ科 sp.	0.00	0.07
バラ科	ヒメヘビイチゴ	0.06	0.00
バラ科	サクラ属 sp.	0.57	0.04

表 2 の続き

ブドウ科	ブドウ属 sp.	15.71	0.21
ブナ科	クリ	0.55	0.00
ブナ科	コナラ属 sp.	14.85	0.00
マタタビ科	マタタビ属 sp.	0.00	0.35
マツ科	アカマツ	0.08	0.00
マメ科	クズ	0.49	0.00
マメ科	フジ	0.21	0.21
マメ科	ヤマハギ	0.00	0.04
ミズキ科	ヒメアオキ	0.06	0.18
ミズキ科	ミズキ	0.04	0.00
ムクロジ科	カエデ属 sp.	0.04	0.00
ユキノシタ科	トリアシショウマ	0.08	0.00
ユリ科	チゴユリ	5.08	0.00
レンプクソウ科	ガマズミ属 sp.	0.00	0.00

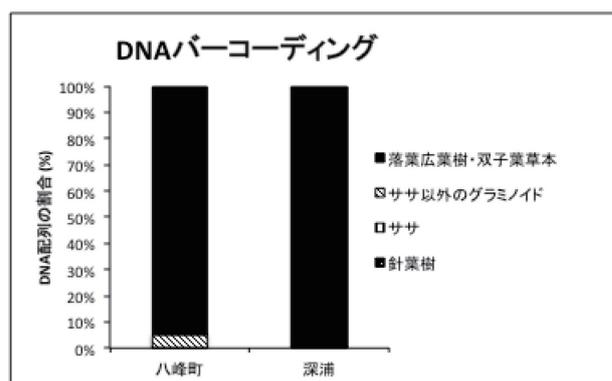


図 2 DNA バーコーディングで得られた植物の DNA 配列を顕微鏡分析と同じ分類群で示した割合.

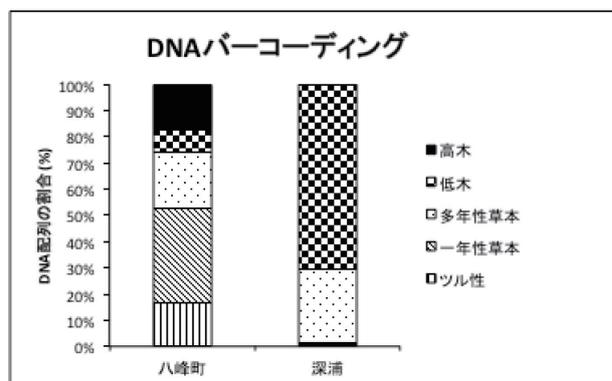


図 3 DNA バーコーディングで得られた植物の DNA 配列を生活形で分類した割合.

〔 平成 30 年 6 月 30 日 受付
平成 30 年 7 月 10 日 受理 〕

Rumen contents of sika deer in Shirakami mountain revealed through microanalyses and DNA barcoding

Yuzu Sakata

Department of Biological Environment, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

The population expansion of sika deer (*Cervus nippon*) in Japan and the consequent heavy browsing by this species have severely affected forest vegetation. However, the feeding habits of sika deer in recently invaded forests remains unknown. We aimed to document the feeding habits of sika deer in one of the areas where it has recently invaded, the Shirakami mountains in northwestern Japan. We used two different methods, microscopic analysis and DNA barcoding, to analyze the rumen samples of two individuals of sika deer. The microscopic analysis revealed that 31.5% and 30.5% of the each rumen samples contained leaves of dicots, and 30.2% and 24.0% of the each rumen samples contained seeds and fruits. On the other hand, graminoids such as dwarf bamboo (*Sasa* sp.) was less contained in both rumen samples. We detected 98 plant taxa by means of DNA barcoding. Overall, these results suggest that the diet of the sika deer in recently invaded forests with a rich understory include various plant taxa but consisted of a few predominant plant species. Future studies involving quantitative analysis of more samples by investigating feces, and by vegetation surveys of forest understory plants are necessary to elucidate the vulnerability of the different plant species to browsing by sika deer.

Keywords: sika deer, rumen contents, Shirakami mountains, DNA barcoding