

DNA分析による洞窟性コウモリの種判別について

Cave-dwelling bat species distinction by DNA analysis



中村圭太*・山石海斗*・白子智康*・永井靖弘*・松村弘*・村田 裕**

*いであ株式会社 **独立行政法人水資源機構 朝倉総合事業所

発表内容 洞窟内のコウモリ糞表面に付着するDNAを用いた種判別

背景

- コウモリ類の種の同定は一部のコウモリを除き、鳴き声や直接目視観察で判断することが難しく、捕獲により種を同定することが一般的である(佐野ほか, 2011)。しかし、洞窟では、捕獲することによるディスターブが懸念されることや、長時間の観察が難しいことなどから、新たな手法の開発が課題となっている。
- 本研究では、糞表面に付着するDNA情報を読み取り、コウモリの種判別や利用状況を把握することが出来たことから、その内容の一部を報告する。

調査地・調査対象

- 福岡県朝倉市内の洞窟に生息するコウモリ類。主要な生息種はキクガシラコウモリ(*Rhinolophus ferrumequinum*)。



図1 調査地の位置(★)
福岡県朝倉市内の洞窟



図2 本調査洞窟の主要な生息種であるキクガシラコウモリ



図3 洞窟内の主にキクガシラコウモリが利用する場所の下で確認されたグアノ(糞)

採集日

- 2017年(平成29年)11月15日

採集方法

- グアノから比較的新しい糞(グアノの最上部にあり、ぬめり等により判断)を採集した。糞は計3粒、それぞれ別のグアノから採集して、マイクロチューブに1粒ずつ保管した。

採集方法・分析方法の再検討

上記の調査では糞から種判別することはできなかった。種判別できなかった理由として、洞窟内は多湿であり、グアノ内は多数の細菌が活動し、DNAが損傷しやすいと考えられた。

そこで採集方法・分析方法を以下の通り再検討後、再度現地にて糞の収集を実施した。

採集日

- 2018年(平成30年)7月18日～20日

採集方法

- 洞窟内に合計18個のバットを設置し、既存のグアノと非接触な糞を翌日に採集。これを2回繰り返した。
- 糞は排糞1日後にはDNA抽出を実施した。



図4 バットの設置状況

分析方法2

- キクガシラコウモリの種特異プライマーの設計
DNAの断片化が予想されたため、比較的短い領域(cytb領域152bp)を増幅する種特異プライマーを設計した。
種特異プライマーの精度を確認するため、キクガシラコウモリ、コキクガシラコウモリ、ノレンコウモリ、ユビナガコウモリ、モモジロコウモリ計5種のDNAを増幅させた。
- LAMP法による検出
増幅反応には、阻害に強く増幅効率の高いLAMP法を採用した。その際、等温増幅蛍光測定装置Genie III(ニッポンジーン)を用いて、蛍光検出によりDNA増幅を確認した。



図5 等温増幅蛍光測定装置 Genie III

考察

- グアノから採集した糞から抽出したDNAを、PCR法(分析方法1)によって増幅したが、種判別出来なかった原因として、グアノ内の細菌活動や排糞後の時間経過が考えられる(増田ほか, 2009)。
- 時間の経過に伴うDNA増幅の減少(増幅の阻害)は、本研究でも確認されており(結果2)、排糞から時間が経過していない糞ほど種判別に用いるサンプルとして適していると考えられた(園田ほか, 2014; 田嶋ほか, 2013)。
- また、洞窟内のグアノを採取した場合、PCR法では検出力が弱く、失敗する可能性が高いため、LAMP法が望ましいと考えられた。ただし、洞窟性のコウモリの生息環境は多湿であり、多数の細菌が付着しやすい。また糞の発酵が見られる場合も多く、DNA情報が消失していることが多いと考えられる。そのため、本研究のように、細菌が付着しにくい採集方法を用いて、検出力が高いLAMP法(条件によってはPCR法)を用いることで、洞窟内でのコウモリ類のDNA情報を検出できると考えられた。

分析方法1

- DNA抽出
DNA抽出キット(QIAGEN社 DNeasy Blood & Tissue Kit)によりDNAを抽出した。すべての操作は、抽出キットに添付されたマニュアルに従って実施した。得られたDNA溶液は、PCR増幅に使用するまで-20℃で冷凍保存した。
- PCR増幅
抽出したDNAについて、哺乳類のミトコンドリアDNA(cytochrome b)に特異的なプライマーセットを用いてPCR増幅を行った。
また、cytbでの解析が上手くいかなかった場合には、哺乳類以外も増幅してしまうものの増幅領域がより短いCOI領域の増幅を実施した。

表1 PCR増幅に使用したプライマーセット

対象遺伝子	プライマー名	増幅長	塩基配列
cytb	L14724	486	5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'
	H15149		5'-AAACTGCAGCCCTCAGAATGATATTTGTCTCA-3'
COI	mlCOIintF	313	5'-GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC-3'
	cgHCO2198		5'-TAIACYTCIGRGTGCCRAARAAYCA-3'

- シーケンス解析
PCR増幅産物をGEヘルスケアバイオサイエンス社製ExoProStarにより精製し、塩基配列を決定した。
- DNAデータベース検索による種同定
決定された塩基配列について、公共のDNAデータベースであるDNA Data Bank of Japanに登録されているすべての塩基配列を対象として同源性検索を実施し、種同定を行った。

結果1

- 3サンプルの分析を行ったが種判別できなかった。

PCRの増幅の際に3サンプル中、2サンプルで不明瞭なバンドとなり、配列決定ができなかった。【PCR増幅】△:不明瞭なバンド、×:増幅せず
また、1サンプルはPCRの増幅ができなかった。【配列決定】×:配列の決定が不可能

- DB照合の結果、人間のDNAが検出され、糞回収の際に採集者のDNAが付着した可能性が考えられた。

表2 採集した糞3サンプルの分析結果

No.	PCR増幅	配列決定	領域	DB照合結果	相同性(%)
1	△	×	cytb	人間	98
2	△	×	cytb	-	-
3	×	-	cytb	-	-

結果2

- 【バットを用いた糞の収集】

グアノと非接触の糞、計182粒を採集した。洞窟内の目視確認により、キクガシラコウモリのみが利用しているのを確認した。

表3 糞の採集結果

糞回収日	糞総数	確認個体数
7月19日	19 粒	25
7月20日	163 粒	26
合計	182 粒	



図6 糞回収状況

- 【種特異性の確認】

設計した種特異プライマーを用いて、キクガシラコウモリ、コキクガシラコウモリ、ノレンコウモリ、ユビナガコウモリ、モモジロコウモリのDNAを増幅させた結果、キクガシラコウモリのDNAのみ増幅できた。これにより、種特異性を確認した。

- 【糞の分析結果2-1】

等温増幅蛍光測定装置Genie IIIを用いてDNA増幅を確認した結果、Fluorescenceの増加を確認できた。これにより、糞からDNAを増幅でき、種判別可能であると確認した。

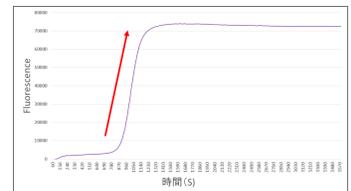


図7 DNAの増幅結果

上記の調査では糞から種判別可能であった。

さらに、排糞後どの程度経過した糞からDNAの抽出が可能であるかを調べるために以下のように処理を行った。

排糞の1日後(上記結果)、7日後、14日後、28日後、45日後、96日後にDNA抽出を実施し、分析を行った。

糞は常温(25度前後)で保管した。

- 【糞の分析結果2-2】

Fluorescenceの増加は排糞の1日後にDNA抽出を行ったサンプルでは、70,000程度であったが、7日後には65,000、14日後には60,000と減少していった。その後、28日後、45日後、96日後にDNA抽出を行ったサンプルでは、Fluorescenceの増加は、55,000程度で微減となった。

この結果から、すべてのサンプルでFluorescenceの増加を確認でき、種判別可能であると確認した。ただし、排糞からDNA抽出までに時間が経過する程、Fluorescenceの増加は減少していった。

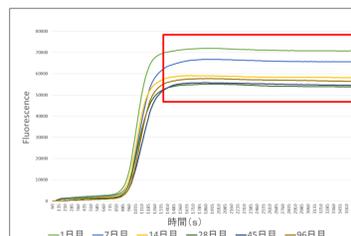


図8 排糞後時間経過した糞からのDNA増幅結果

まとめ

糞を採集する際にグアノと非接触にすること、種特異プライマーを設計し、LAMP法により分析することで、糞に付着するDNAを用いた種判別が可能であることが判明した。

今後の展望

- 本手法は、直接コウモリ類に接触することなく、種を判別することが可能であり、コウモリ調査において非常に有効なツールと考えられた。今後、様々な洞窟でコウモリ類の糞の採集実験を行い、DNA情報の消失期間等を把握することで、調査精度を高めていく予定である。
- 糞から抽出したDNAを用いることで、本研究で行った種判別のほかに、マイクロサテライト領域を用いた個体識別、性染色体上のゲノム情報を用いた雌雄判別、さらにmtDNAのハプロタイプを用いた個体間の近縁関係等についても把握可能であると考えられ、今後実施していく予定である。