

(2) 公益的機能の高い森林づくりの技術開発

①水源林の公益的機能の評価・検証

- G シカ対策と間伐による下層植生の発達がアカネズミ属の生息密度と食性にもたらす効果
(科研費)

- (1) 課 題 名 Ga 小型哺乳類の糞サンプリング方法の検証と消化・排泄の特性
(2) 研究期間 令和5～7年度
(3) 予算区分 学術研究助成基金助成金（若手研究）
(4) 担 当 者 大石圭太・谷脇 徹

(5) 目的

本事業では、ブナ林での植生保護柵の設置や針葉樹人工林の間伐という異なる林相での各種対策による下層植生の発達の波及効果を森林性野ネズミのであるアカネズミとヒメネズミを指標として検証することを目的としている。その中で、本研究では、糞を試料としたDNAメタバーコーディングによる野ネズミの食性分析の精度を向上させるため、餌以外のDNAの誤検出をもたらすコンタミの可能性を検証した。シャーマントラップに排泄された糞でのコンタミは、主に風媒花植物の花粉やシダ植物の胞子が由来となる可能性が高いと考えられる。そこで本研究では、まだ排泄されずに捕獲個体の直腸に残っており、コンタミの可能性が低い糞(以下、直腸糞)と、すでに排泄された糞(排泄糞)に含まれる植物のDNAを調べた。これらの結果をもとに花粉や胞子の散布時期に風媒花やシダ植物のDNAの検出が排泄糞に集中するか否かを解析し、排泄糞のコンタミの程度を検証した。また、野ネズミが食べたものがどのくらいの時間で、どの程度糞に反映されるかの特性を明らかにするための飼育実験を実施した。これら飼育実験の結果と、直腸糞や排泄糞に含まれる植物の種組成や誘因餌(ヒマワリ)のDNA量(リード数)を合わせて分析したところ、野ネズミの食物の消化の特性に関する興味深い知見が得られたため、コンタミの可能性と合わせて報告する。

(6) 方法

①排泄糞と直腸糞のサンプリング

排泄糞については、2020～2021年の水源地域の堂平、丹沢山地、箱根外輪山、小仏山地での標識再捕獲調査の際に、罠内に排泄されたアカネズミとヒメネズミの糞をサンプリングした。ただし、複数個体の糞便や排泄されて1日以上経過した糞便が混入することを防ぐため、各トラップの最初の捕獲時にのみサンプリングを実施した。直腸糞については、捕獲の際に偶発的に死亡した個体を持ち帰り、解剖により直腸から糞便を抽出した。同一個体の排泄糞と直腸糞はアカネズミとヒメネズミを合わせて11個体から採取できた。これらの糞サンプルは解析まで-20℃以下で保存した。

②給餌実験による糞のサンプリング

丹沢山地の調査地の一つである保全センターの試験林の広葉樹林内で捕獲されたアカネズミ(雄と雌を1個体ずつ)を実験前に3週間以上飼育し、ペレット状の餌(主成分:トウモロコシ、ムギ)、ヒマワリの種、ミルワームを与えた。実験では、ヒマワリの種のみを飼料として与え、3～17時間間隔でケージに排泄された糞を採取し、56時間後までに7回サンプリングを行った。排泄のタイミングが分からない糞が混ざること避けるため、飼育ケージ内の巣材等はサンプリングのたびに新しいものに交換した。これらの糞も解析まで-20℃以下で保存した。

③DNAメタバーコーディング解析

サンプリングした糞便を凍結粉碎し、各種溶液を用いてDNAを抽出した。陸生植物をターゲットとした解析用に開発されたプライマー(解析遺伝子:gPlant(葉緑体のrbcL領域))を用いた2 step tailed PCR法により、解析対象のDNA領域(334bp)を増幅し、各サンプルのライブラリーを作製した。BLAST検索により各ライブラリーに含まれる塩基配列と相溶性の高い植物種の候補をNCBI(The National Center for Biotechnology Information)のデータベースから検索し、各サ

ンプルから検出された生物種候補を抽出し、そのリード数を算出した。なお、DNA メタバーコーディング解析は生物技研(株)に委託して実施した。

(7) ■結果の概要

①排泄糞のコンタミの可能性

直腸糞と排泄糞から検出される風媒花およびシダ植物の検出数の比較の結果、花粉と孢子の散布時期にこれらの種の検出が排泄糞に集中する傾向は認められず（表 1）、また、同一個体の直腸糞と排泄糞から検出される植物の種構成は類似する個体が多いことから（図 1）、今回のようなシャーマントラップを用いたサンプリング方法なら排泄糞のコンタミの影響はそれほど大きくはないと考えられる。

②アカネズミとヒメネズミの消化・排泄の特性

確かに、同一個体の直腸糞と排泄糞の種組成が類似する個体が多かったが、中には同一個体の直腸糞と排泄糞でもかなり離れたクラスターに属する個体も見られた。また、食べた順番通りに排泄されるとすれば、捕獲後に食べられるヒマワリは後に排泄される直腸糞で多いはずであるが、アカネズミ 8 個体では、ヒマワリの割合が直腸糞で多い個体と排泄糞で多い個体が 4 個体ずつであった（図 2）。さらに、飼育実験の糞では、ヒマワリの種のみを与えるようになって 6 時間後の糞はヒマワリの DNA しか検出されなかったが、27 時間後の糞で再びペレットフード由来の DNA が検出された（図 3）。これらのことから、これらの野ネズミに食べられた餌は、必ずしも食べた順番通りに排泄されるわけではなく、餌の種類や餌の組み合わせによって消化時間が変化するのかもしれない。

表 1 風媒花植物の花粉とシダ植物の孢子の散布時期および非散布時期の検出数

	風媒花植物			シダ植物		
	散布時期	非散布時期	計	散布時期	非散布時期	計
排泄糞のみでの検出	4	10	14	8	4	12
直腸糞でも検出	0	6	6	2	3	5
計	4	16	20	10	7	17
Fisher の正確確率検定	p = 0.2675			p = 0.5928		

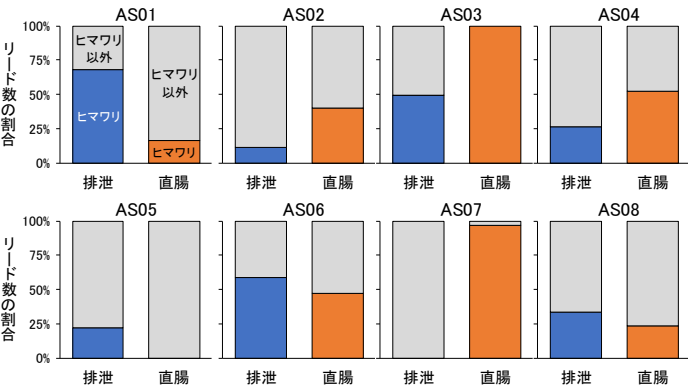


図 2 アカネズミの各個体の排泄糞と直腸糞から検出されたヒマワリのリード数の割合

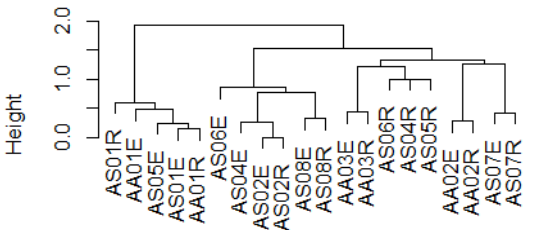


図 1 検出された種構成による各サンプルの Ward 法による階層クラスター分析 (AS はアカネズミ、AA はヒメネズミを示す。同じ数字は同一個体を示す。E は排泄糞、R は直腸糞を示す。非類似度指数には Chao 指数を用いた。)

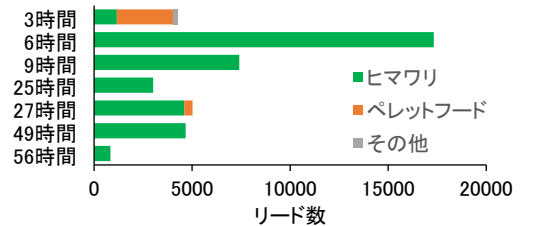


図 3 実験開始からの時間に応じた各餌由来の DNA 断片のリード数

ペレットフード：主成分はトウモロコシやムギ等
その他：バクテリア、アカネズミ(宿主由来)等

(8) ■今後の課題

・今後も飼育実験を継続し、今回明らかとなったアカネズミとヒメネズミの消化・排泄の特性についての一般性を確認する必要がある。

(9) ■成果の発表

大石圭太 アカネズミとヒメネズミの直腸糞と排泄糞の DNA メタバーコーディング解析、日本生態学会第 72 回全国大会 札幌市 2025 年 3 月 口頭発表