

■原 著■ 2020 年度 神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

DNA メタバーコーディング解析で推定されたニホンジカの 採食植物：神奈川大学湘南ひらつかキャンパスの例

岩崎貴也^{1,2,3,7} 奥田真未² 安藤温子⁴ 松尾 歩⁵ 陶山佳久⁵ 中濱直之⁶
泉 進^{1,2}

Foraging Plants of Japanese Deer Estimated by DNA Metabarcoding
Analysis: Examples from the Shonan Hiratsuka Campus
of Kanagawa University

Takaya Iwasaki^{1,2,3,7}, Mami Okuda², Haruko Ando⁴, Ayumi Matsuo⁵,
Yoshihisa Suyama⁵, Naoyuki Nakahama⁶ and Susumu Izumi^{1,2}

¹ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ Natural Science Division, Faculty of Core Research, Ochanomizu University, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610, Japan

⁴ Center for Environmental Biology and Ecosystem Studies, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba City, Ibaraki 305-8506, Japan

⁵ Kawatabi Field Science Center, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Osaki City, Miyagi 989-6711, Japan

⁶ Institute of Natural and Environmental Sciences, University of Hyogo, Sanda City, Hyogo 669-1546, Japan

⁷ To whom correspondence should be addressed. E-mail: iwasaki.takaya@ocha.ac.jp

Abstract: Vegetation damage caused by the rapid increase of Japanese sika deer (*Cervus nippon*) has become a major problem in many areas of Japan. Deer have preferences for plant species, which change according to the region, season, and surrounding vegetation. Therefore, to clarify the impact of deer on local vegetation, it is important to understand the overall trend in other areas and then further investigate the behavior and feeding habits of deer in those areas. The Shonan Hiratsuka Campus of Kanagawa University is a place with a high plant diversity where the pre-construction satoyama environment still remains. However, deer have begun to invade this area. In this study, we used DNA metabarcoding technology on deer feces to identify the foraging plants of deer in this area with two cpDNA regions (*rbcL* and *trnL*). In total, OTUs identified as Fagaceae, Asteraceae, Poaceae, and Oxalidaceae were detected with many sequence reads. These groups contain many species that are considered to be deer-preferred plants, which is consistent with the results of this study. In addition, the species that we could identify such as *Impatiens textorii*, *Persicaria thunbergii*, *Pueraria lobata*, and *Carex japonica*, were also known to be deer-preferred plants. While spring sample included a variety of families such as Poaceae, Rosaceae, and Urticaceae, half of the reads from the early summer sample were identified as Asteraceae, and half of the reads from the autumn sample were Fagaceae, showing seasonal differences. This result suggests that deer may use new buds and new leaves in spring, flowers in early summer, and nuts and litter in autumn as a guide when selecting plants to feed on.

Keywords: sika deer, DNA metabarcoding, foraging plants, *rbcL*, *trnL*

序論

近年、ニホンジカ *Cervus nippon* (以下、シカ) の個体数が急増し、その過度な採食による植生被害が日本各地で報告されている¹⁾。過去 20 年間でシカの分布範囲は 70% 近く拡大したとされており、多種多様な植物を摂食し、かつ群れで行動する²⁾。そのため、天然林や人工林、高山植物、湿原といった様々な植生に大きな影響を与えている³⁾。一般に、植物には、シカに嗜好されやすい種 (嗜好性植物) から、ほとんど採食の対象にならない種 (不嗜好性植物) が存在することが知られている³⁻⁵⁾。全国の文献をまとめた研究では、キク科やバラ科、イネ科などにシカの嗜好性植物が多く含まれている一方で、同じくキク科、そしてサトイモ科、シソ科に不嗜好性植物が多く含まれていたことが報告されている⁶⁾。一方で、北日本では笹やイネ科などを採食する grazer で、南西日本では常緑樹の葉や果実を採食する browser といったように、大きな地域差が存在することも指摘されている⁷⁾。また、嗜好性植物として報告される場合と不嗜好性植物として報告される場合の両方が混在する植物種が少なからずみられること⁷⁾も、シカの嗜好性には大きな地域差が存在することを示唆している。また、群馬県赤城山では、春から秋にかけて草本類とグラミノイドを、秋から春にかけてはグラミノイドと広葉樹の枯葉、堅果類、液果類を多く利用しており、こうした食性の季節変化は各地でも同様に報告されている⁸⁻¹¹⁾。さらに、過度の採食圧によって変化した植生に応じて、嗜好性の高い植物から低い植物へと食性を柔軟に変化させることも知られている^{12, 13)}。したがってシカの食性は一概にはまとめることは困難である。対象地域の植生に対するシカの影響を明らかにするためには、他地域での全体的な傾向を把握した上で、さらにその場所でのシカの行動や食性を個別に調べることで重要であると思われる。

神奈川県平塚市土屋にある神奈川大学湘南ひらつかキャンパスは、キャンパスの外縁部の多くが建設前から維持された雑木林になっており、周辺の森林とも繋がった自然豊かな里山環境が現在も残されている。キャンパス建設前の 1986 年に行われた環境影響予測評価ではシカの生息は確認されていなかったが¹⁴⁾、2019 年のカメラトラップ法による調査により、キャンパス内へシカがしばしば侵入してきていることが報告されている¹⁵⁾。カメラトラップでの撮影頻度から推測したところ、シカの侵入は比較的低頻度とされ、キャンパス内において明らかな植生被害はまだ観察されていない¹⁵⁾。一般的に、これまでにシカの食性を調べた多くの研究は、高密度にシカが生

息している場所や、シカによる植生被害が深刻化しつつある場所で行われていることが多い。したがって、このようなシカの侵入初期段階にある場所で、どのような植物が採食されているかという情報は、シカ個体群の増加に伴う植生変化の経過を調べていくための重要な基礎情報となることが考えられる。

近年、自然界で動物が何を食べているかを調べる方法として、その糞の中に残る餌の DNA を抽出し、その餌 DNA の塩基配列情報から種を同定する糞の DNA メタバーコーディングと呼ばれる手法が広く用いられるようになってきている¹⁶⁻¹⁸⁾。シカについても既にいくつかの研究が行われており、その有用性が確かめられている^{11, 19)}。メタバーコーディング解析は比較的容易に植物種の同定まで行うことができるため、今後、様々な地域で研究例が蓄積していくと期待される。

そこで本研究では、シカによる植生被害がまだ深刻化していない神奈川大学湘南ひらつかキャンパスを対象に、メタバーコーディング解析によってシカの採食植物を明らかにし、この場所におけるシカの植物嗜好性を明らかにする。また、シカの糞をすり潰した後の実験手法についての検討も行い、今後の解析のためのより良い手法を確立する。

材料と方法

シカ糞の採集

2019 年 4 月 15 日、6 月 26 日、10 月 9 日に、神奈川大学湘南ひらつかキャンパス内の東の湿地近くにある乾いた草地で、各日にそれぞれ 1 つの新鮮な糞塊 (Sample-0415, Sample-0626, Sample-1009) から、各 10 粒のシカ糞を採集した。調査は早朝から朝のうちに行い、採集したシカ糞はできるだけ速やかに -30°C の冷凍庫で冷凍保存した。採取時に用いるピンセットは、事前に滅菌しておいた上で、さらにエタノールによる消毒と、ライターによる火炎滅菌を頻繁に行い、外来 DNA の混入が最小限になるように注意した。

シカ糞からの植物 DNA 抽出

-30°C で冷凍保存していたシカ糞を取り出し、液体窒素で凍結状態を維持しながら、滅菌したメスを用いて表面を削ぎ取った。これは、野外で採集前に糞が触れていた土や植物からのコンタミネーションを防ぐためである。その上で、糞の中心部だけを 10 粒分集め、継続して液体窒素で凍結状態を維持しながら、すり鉢の中で完全な粉状になるまで乳棒ですり潰した。粉状になった糞塊から薬さじ 1 杯分を 2.0 ml チューブに移し、再度、-30°C で保存した。その際に

は、すり潰した糞塊の中のばらつきを評価するため、Sample-0415 と Sample-0626 については 3 サンプル (rep-1、rep-2、rep3)、Sample-1009 については 2 サンプル (rep-1、rep-2) のチューブを独立に用意し、糞塊段階での反復とした。

DNA 抽出は、冷凍しておいた粉碎済みの糞入りのチューブに、滅菌済みの 4 mm のステンレスビーズを 1 つ追加した上で、ビーズ破砕機 μ T-12 (TAITEC 社) を用いて完全に粉々になるまで粉碎した。その後、DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN 社) を用い、キット標準のプロトコルに従って DNA を抽出した。得られた DNA 溶液は、次の実験に用いるまで -30°C 冷凍庫で保存した。

メタバーコーディング解析

シカ糞中の植物 DNA は、シカ体内の消化酵素などによって断片化されていることが考えられる。そこで我々は、断片化された植物 DNA からの PCR 増幅の成功率を高めるため、比較的短い領域をバーコーディング領域として用いることにした。植物 DNA バーコーディングでよく用いられる *rbcL* 遺伝子と、短い領域の中に多くの変異がみられることが知られている *trnL* (UAA) intron の P6loop 領域では、それぞれ 263 bp、10–143 bp の比較的短い断片を増幅するためのプライマーが既に開発されている^{20, 21)}。本研究では、ゲノムワイドな一塩基多型情報の解析のために考案された MIG-seq 法²²⁾ の 2nd PCR 用プライマーを活用することを前提として 1st PCR 用プライマーを設計した。具体的には、先行研究のプライマーの 5' 末端側に、MIG-seq 法と共通の配列を付加したものを 1st PCR 増幅に用いた (表 1)。最初の 1st PCR の条件は、プライマーが本研究用のセットであること以外は、基本的に MIG-seq²²⁾ のものと同じだが、アニーリング温度は 55°C に、サイクル数は 33 に変更した。*rbcL* 領域と *trnL* 領域の増幅は別々に行い、PCR 後にはアガロースゲル電気泳動を行うことで増幅を確認した。また、PCR 増幅によるバイアスを評価するため、それぞれの DNA サンプルについて、同じ DNA からの独立した 1st PCR を 3 回行い、それぞれを混ぜずにそのまま 2nd PCR 以降の

操作を行った。1st PCR 後には、Agencourt AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter Life Sciences) を用いて、PCR 産物の濃度の標準化と短い断片の除去を行った。2nd PCR 以降の操作は、MIG-seq²²⁾ と同じ方法で行った。ラン前には、ライブラリの DNA 濃度測定を行い、同じランの中で DNA 濃度ができるだけ均一になるように調整した。作製した *rbcL* 領域のライブラリは MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500 Cycle) を、*trnL* 領域のライブラリは MiSeq Reagent Nano Kit v2 (300 Cycle) を用い、それぞれ MiSeq (illumina) の Paired-end ラン 1 回で、フォワードとリバースでオーバーラップするように塩基配列データを得た。

データ解析

得られた塩基配列データは、それぞれの領域データについて、ソフトウェア Claident ver.0.2.2019.05.10 (<https://www.claident.org/>) を用いて、タグ配列によるサンプルごとのデータ振り分け、フォワード配列とリバース配列の連結、低品質配列の除去 (minqual = 30)、キメラ配列の除去 (*trnL* ではエラー回避のために実施せず)、類似性の高い配列のクラスタリング (類似度 97% 基準) による OTU (Operation Taxonomic Unit) への分類など、種同定の前の処理を行った。また、Sample-0415 の rep2、Sample-0626 の rep2 と rep3 については、PCR 反復 3 回のうちの 1 回で十分なデータが得られなかったために、2 回分のデータのみで解析を行った。最終的に反復を含めて 21 サンプルを解析に用い、得られた OTU の中で、リード数が全 21 サンプルの合計で 30 に満たないもの、1 サンプルでしか検出されないものについては、コンタミネーションや増幅エラーの可能性が高いと判断し、その後の解析から除外した。

得られた OTU 配列については、Claident に実装されている Lowest common ancestor (LCA) algorithm^{23, 24)} を用いて、植物種を同定した。この際、植物の科レベルで同定できなかった OTU については、コンタミネーションや増幅エラーの可能性が高いと判断し、その後の解析から除外した。最終的に、*rbcL* と *trnL*

表 1. 本研究で用いた *rbcL* および *trnL* (UAA) intron 領域の情報

領域	プライマー配列 ¹⁾	長さ (bp)	Original information
<i>rbcL</i>	Fw: 5'-CGCTCTTCCGATCTCTG(N*)TATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCC-3'	263	<i>rbcL</i> -F3 ²⁰⁾
	Rv: 5'-TGCTCTTCCGATCTGAC(N*)GATTCGCAGATCCTCCAGACGTAGAGC-3'		<i>rbcL</i> -R3 ²⁰⁾
<i>trnL</i> (UAA) intron	Fw: 5'-CGCTCTTCCGATCTCTG(N*)GGGCAATCCTGAGCCAA-3'	10–143	<i>trnL</i> -g ²¹⁾
	Rv: 5'-TGCTCTTCCGATCTGAC(N*)CCATTGAGTCTCTGCACCTATC-3'		<i>trnL</i> -h ²¹⁾

¹⁾ (N*)部分は、増幅したい領域とのミスマッチを防ぐために、Nを0~3個付加した。5'末端から(N*)までの間は、2nd PCR以降にアダプターを結合させるための共通配列。

それぞれの結果について、種・属・科レベルで同定できた OTU を、得られたリード数とともに集計した。その際、同じ DNA から独立に 1st PCR を行った反復については、得られた結果がほぼ同じであったため、集計時に糞塊の反復 (rep-1、rep-2、rep-3) のレベルまでデータをまとめた。種まで同定できた場合の学名は、Y-List (<http://ylist.info>) に従った。また、それぞれの領域について、OTU を科レベルでまとめた集計も行った。

結果

rbcL 領域を用いた採食植物の推定結果

rbcL 領域を用いた解析の結果、合計 161,007 リードのデータに基づき、全部で 33 の OTU が検出された (表 2)。最もリード数が多かったのはブナ科と同定された OTU (29,773 リード、全体の 18.5%) で、次

いでキク科 OTU (27,684 リード、17.2%)、セリ科のオキシボリス属 OTU (18,651 リード、11.6.2%)、タデ科のスイバ属 OTU (17,156 リード、10.7%)、イネ科 OTU (12,756 リード、7.9%)、イラクサ科 (11,912 リード、7.4%)、カタバミ科 (10,229 リード、6.4%) タデ科イヌタデ属のミゾソバ *Persicaria thunbergii* (Siebold et Zucc.) H.Gross (9,438 リード、5.9%) の順が多かった。種まで同定できたのはミゾソバ、クワ科クワクサ属のクワクサ *Fatoua villosa* (Thunb.) Nakai、ツリフネソウ科ツリフネソウ属のツリフネソウ *Impatiens textorii* Miq. の 3 種のみであったが、33 の OTU のうちの 16 で、属以上のレベルまで同定することができた。

糞塊からの反復では、低頻度の OTU の一部では反復間で食い違いがみられたが、比較的高頻度の OTU ではほとんど同じ結果が得られた。

表 2. *rbcL* 領域の塩基配列情報から推定されたニホンジカの採食植物リスト

<i>rbcL</i> ID	Species	和名 ¹	Total reads	Number of reads							
				Sample-0415			Sample-0626			Sample-1009	
				Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-1	Rep-2
1	Fagaceae sp.1	ブナ科 sp.1	29773			5	5635	2641	2878		
2	Asteraceae sp.1	キク科 sp.1	27684	325	287	527	11315	4063	11167		
3	<i>Oxypolis</i> sp.1	オキシボリス属 sp.1 (セリ科)	18651	5348	4852	8441				9	1
4	<i>Rumex</i> sp.1	スイバ属 sp.1 (タデ科)	17156	5083	4287	7783	2		1		
5	Poaceae sp.1	イネ科 sp.1	12756	3813	2516	6379		48			
6	Urticaceae sp.1	イラクサ科 sp.1	11912	3396	3033	3314				910	1259
7	Oxalidaceae sp.1	カタバミ科 sp.1	10299				3671	1344	4412	653	219
8	<i>Persicaria thunbergii</i> (Siebold et Zucc.) H.Gross	ミゾソバ (タデ科イヌタデ属)	9438							4330	5108
9	Rosaceae sp.1	バラ科 sp.1	4566	2322	1129	1103				12	
10	Fabaceae sp.1	マメ科 sp.1	2874				1408	416	794	256	
11	<i>Fatoua villosa</i> (Thunb.) Nakai	クワクサ (クワ科クワクサ属)	2338							1098	1240
12	Euphorbiaceae sp.1	トウダイグサ科 sp.1	2254				724	318	1164	48	
13	<i>Potentilla</i> sp.1	キジムシロ属 sp.1 (バラ科)	1955	510	476	969					
14	<i>Vicia</i> sp.1	ソラマメ属 sp.1 (マメ科)	1387	504	233	650					
15	<i>Impatiens textorii</i> Miq.	ツリフネソウ (ツリフネソウ科ツリフネソウ属)	1202							876	326
16	<i>Lotus</i> sp.1	ミヤコグサ属 sp.1 (マメ科)	976	6			349		193		428
17	Asparagaceae sp.1	キジカクシ科 sp.1	765	4	5		229	316	178	33	
18	Poaceae sp.2	イネ科 sp.2	605	91	90	38	118	76	192		
19	<i>Eurya</i> sp.1	ヒサカキ属 sp.1 (サカキ科)	590							175	415
20	<i>Veronica</i> sp.1	クワガタソウ属 sp.1 (オオバコ科)	548	193	145	210					
21	Lardizabalaceae sp.1	アケビ科 sp.1	494	115	152	227					
22	<i>Toxicodendron</i> sp.1	ウルシ属 sp.1 (ウルシ科)	492							177	315
23	Fabaceae sp.2	マメ科 sp.2	427				60		367		
24	Arecaceae sp.1	ヤシ科 sp.1	385	133	133	119					
25	<i>Cornus</i> sp.1	ミズキ属 sp.1 (ミズキ科)	311	3	1	1	85	7	62	23	129
26	<i>Aucuba</i> sp.1	アオキ属 sp.1 (アオキ科)	286	13	6	43		83		141	
27	Sapindaceae sp.1	ムクロジ科 sp.1	229	4		7	94			124	
28	Amaranthaceae sp.1	ヒユ科 sp.1	147				109	14		24	
29	<i>Plantago</i> sp.1	オオバコ属 sp.1 (オオバコ科)	131			9	122				
30	<i>Stachyurus</i> sp.1	キブシ属 sp.1 (キブシ科)	130					5	53	72	
31	Vitaceae sp.1	ブドウ科 sp.1	102		1					101	
32	Smilacaceae sp.1	シオデ科 sp.1	83		3		80				
33	<i>Cardamine</i> sp.1	タネツケバナ属 sp.1 (アブラナ科)	61	17	20	24					

¹ 属あるいは種のレベルまで同定できた場合は、括弧内に科や属の情報を記した。

科ごとに OTU を集計した結果、全体ではブナ科 (18.5%)、キク科 (17.2%)、タデ科 (16.5%)、イネ科 (8.3%)、イラクサ科 (7.4%) の割合が高かった (図 1)。Sample-0415 では、セリ科 (27.0%)、タデ科 (24.8%)、イネ科 (18.7%)、イラクサ科 (14.1%)、バラ科 (9.4%) の割合が高かった。Sample-0626 ではキク科 (48.4%) が半分近くを占めており、ブナ科 (20.4%)、カタバミ科 (17.2%)、マメ科 (6.5%) などの割合も比較的高かった (図 1)。Sample-1009 では、ブナ科 (50.2%) が半分以上を占めており、残りの更に半分がタデ科 (25.4%) で、クワ科 (6.3%) やイラクサ科 (5.8%) など比較的多かった (図 1)。

trnL 領域を用いた採食植物の推定結果

rbcL 領域を用いた解析では、合計 11,147 リードのデータに基づき、全部で 30 の OTU が検出された

(表 3)。最もリード数が多かったのはキク科と同定された OTU (2,370 リード、全体の 21.3%) で、次いでカタバミ科のカタバミ属 OTU (1,333 リード、12.0%)、ブナ科 sp.1 (1,291 リード、11.6%)、ブナ科 sp.2 (890 リード、8.0%)、イラクサ科 OTU (743 リード、6.7%)、ブナ科 sp.3 (563 リード、5.1%) の順で多かった。種まで同定できたのはマメ科クズ属のクズ *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi、カヤツリグサ科スゲ属のヒゴクサ *Carex japonica* Thunb. の 2 種のみであった。30 の OTU のうち、6 のみで、属以上のレベルまでの同定を行うことができた。

糞塊からの反復では、低頻度の OTU の一部では反復間で食い違いがみられたが、比較的高頻度の OTU ではほとんど同じ結果が得られた。

科ごとに OTU を集計したところ、全体ではブナ科 (24.6%)、キク科 (24.5%)、カタバミ科 (12.4%)

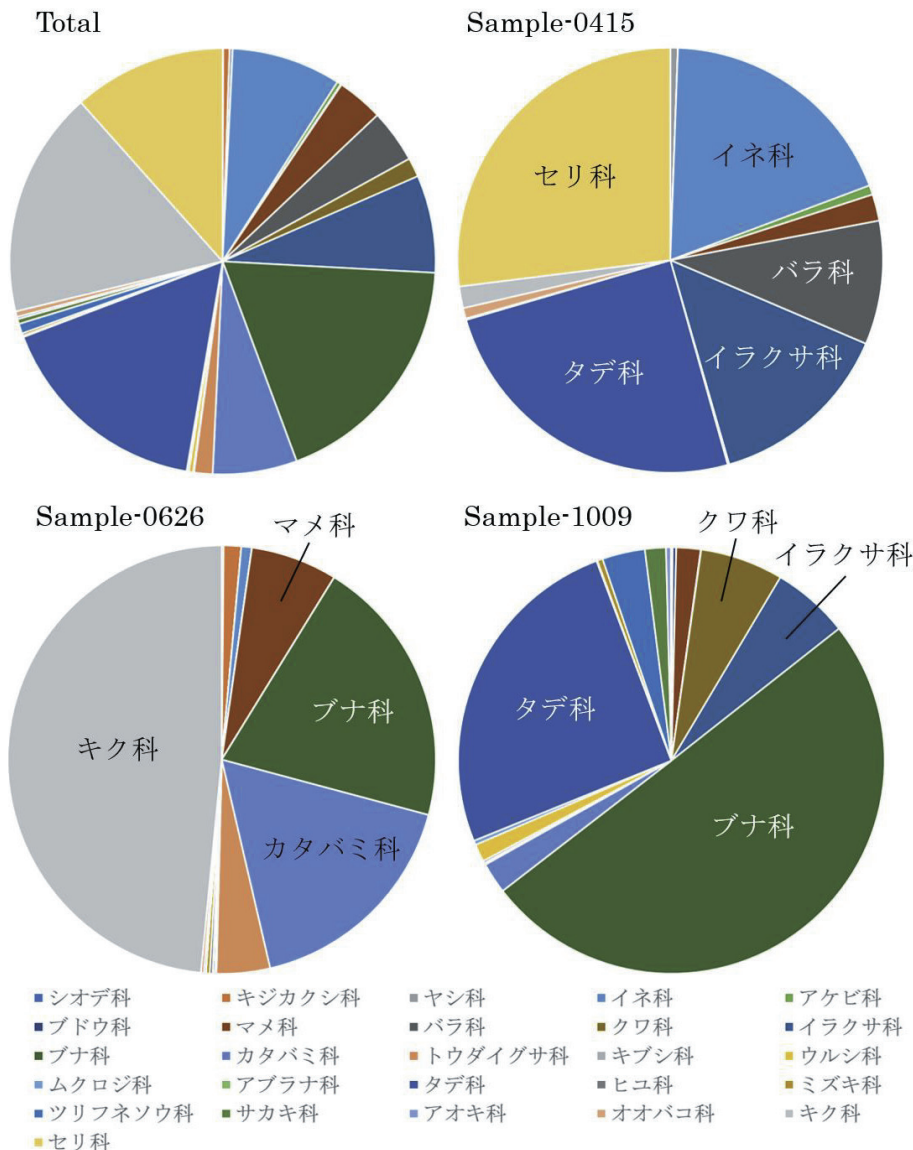


図 1. rbcL 領域を用いて推定されたシカ採食植物について科ごとに集計したリードの割合。

の3科の割合が特に高く、残りはかなりばらけた構成となっていた(図2)。Sample-0415では、イラクサ科(32.6%)、イネ科(22.4%)、カヤツリグサ科(21.9%)、バラ科(14.3%)の割合が高かった。Sample-0626ではキク科(50.3%)が半分以上を占めていたが、カタバミ科(25.1%)、ブナ科(11.5%)、マメ科(10.0%)の割合も比較的高かった(図2)。Sample-1009では、ブナ科(59.0%)が半分以上を占め、残りの中ではツリフネソウ科(10.7%)、バラ科(7.9%)、クワ科(6.6%)、マメ科(6.0%)、イラクサ科(5.4%)が比較的高頻度であった(図2)

討論

シカの採食植物

本研究で得られた*rbcL*と*trnL*の2領域による採食

植物の同定結果は、一部の植物グループで違いがみられたものの、全体としてはよく似た傾向を示した。全体として、採食植物はどちらもブナ科、キク科、イネ科、カタバミ科などが多かった。また、バラ科やマメ科も比較的高い割合であった。イネ科やキク科、バラ科には、嗜好性植物とされる種が多く含まれていることが知られており⁶⁾、今回の結果はこれまでの知見とも一致する。ブナ科についても、秋にシカガリターや堅果をよく利用することが報告されており^{25, 26)}、本研究対象のキャンパス内にもブナ科樹木が多く生育していることから、妥当な結果であると思われる。カタバミ科についても、少ない数ではあるが、嗜好性植物としての報告があり⁶⁾、本研究の結果と矛盾はみられない。

種まで同定できたツリフネソウ、ミゾソバ、クズ、

表3. *trnL* (UAA) intron 領域の塩基配列情報から推定されたニホンジカの採食植物リスト

<i>trnL</i> ID	Species	和名 ¹	Total reads	Number of reads							
				Sample-0415			Sample-0626			Sample-1009	
				Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-1	Rep-2
1	Asteraceae sp.1	キク科 sp.1	2370				910	834	626		
2	<i>Oxalis</i> sp.1	カタバミ属 sp.1 (カタバミ科)	1333				430	547	290	56	10
3	Fagaceae sp.1	ブナ科 sp.1	1291				255	230	111	346	349
4	Fagaceae sp.2	ブナ科 sp.2	890			1				476	413
5	Urticaceae sp.1	イラクサ科 sp.1	743	325	187	230					1
6	Fagaceae sp.3	ブナ科 sp.3	563				4	2	2	294	261
7	<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	クズ (マメ科クズ属)	531				211	153	158	4	5
8	<i>Carex japonica</i> Thunb.	ヒゴクサ (カヤツリグサ科スゲ属)	498	180	154	164					
9	<i>Impatiens</i> sp.1	ツリフネソウ属 sp.1 (ツリフネソウ科)	388							216	172
10	Poaceae sp.1	イネ科 sp.1	379	122	84	138	5	14	16		
11	Rosaceae sp.1	バラ科 sp.1	331	11	8	5	7		14	163	123
12	Asteraceae sp.2	キク科 sp.2	315	12	12	15	97	95	75	2	7
13	Urticaceae sp.2	イラクサ科 sp.2	193							109	84
14	Moraceae sp.1	クワ科 sp.1	189							115	74
15	Rosaceae sp.2	バラ科 sp.2	133	61	29	43					
16	Caryophyllaceae sp.1	ナデシコ科 sp.1	117	50	35	32					
17	Fabaceae sp.1	マメ科 sp.1	116							53	63
18	Rosaceae sp.3	バラ科 sp.3	108	57	23	28					
19	Poaceae sp.2	イネ科 sp.2	106	51	12	27	3	5	8		
20	Poaceae sp.3	イネ科 sp.3	71	22	15	34					
21	Rosaceae sp.4	バラ科 sp.4	60	20	13	27					
22	Poaceae sp.4	イネ科 sp.4	58				26	13	16	1	2
23	Fabaceae sp.2	マメ科 sp.2	55							27	28
24	Moraceae sp.2	クワ科 sp.2	52							28	24
25	<i>Oxalis</i> sp.2	カタバミ属 sp.2 (カタバミ科)	49				15	19	13	2	
26	<i>Stachyurus</i> sp.1	キブシ属 sp.1 (キブシ科)	46							25	21
27	Asteraceae sp.3	キク科 sp.3	44	16	15	12		1			
28	Poaceae sp.5	イネ科 sp.5	44	1	1	4	13	18	7		
29	Fabaceae sp.3	マメ科 sp.3	38							23	15
30	Vitaceae sp.1	ブドウ科 sp.1	36		1	1	1			15	18

¹ 属あるいは種のレベルまで同定できた場合は、括弧内に科や属の情報を記した。

ヒゴクサ、キブシ（バーコーディングではキブシ属とまでしか同定できていないが、分布状況からこの種と推測できる）についても、既に複数の研究でシカの嗜好性植物であることが示唆されているものであった⁶⁾。特にツリフネソウは、キャンパス内で限られた湿地にしか生育しておらず、侵入してくるシカの個体数が急増した場合には、すぐに消失してしまう可能性があるため、注意が必要である。クワクサについては、これまでに採食植物としての報告がされておらず、新規の発見であると思われる。

一方、タデ科やセリ科などの一部の科は *rbcL* 領域だけで、カヤツリグサ科とナデシコ科は *trnL* 領域だけで検出された。また、*rbcL* 領域の方が、属や種などの深い階層まで同定しやすい傾向がみられた。これらの原因としては、参考にしたデータベースへの

登録状況が領域によって異なることが影響した可能性が考えられる。対象地域の全植物について、DNAメタバーコーディングで使用する領域を事前にシーケンスし、ローカルなデータベースを作成すれば、種同定の精度は大きく向上することが期待される¹⁸⁾。また、今回用いた *trnL* 領域は、分類群によって断片長が大きく異なることが知られており、それによってPCR時の増幅効率にばらつきが生じた可能性も考えられる。これらの結果は、1領域だけを用いて解析を行うと、一部の植物グループについては過小評価してしまう可能性があることを示唆している。自身が研究対象とする場所や目的に合わせて、慎重に使用領域を選択する、あるいは今回のように複数の領域を同時に使用していく必要があると思われる。

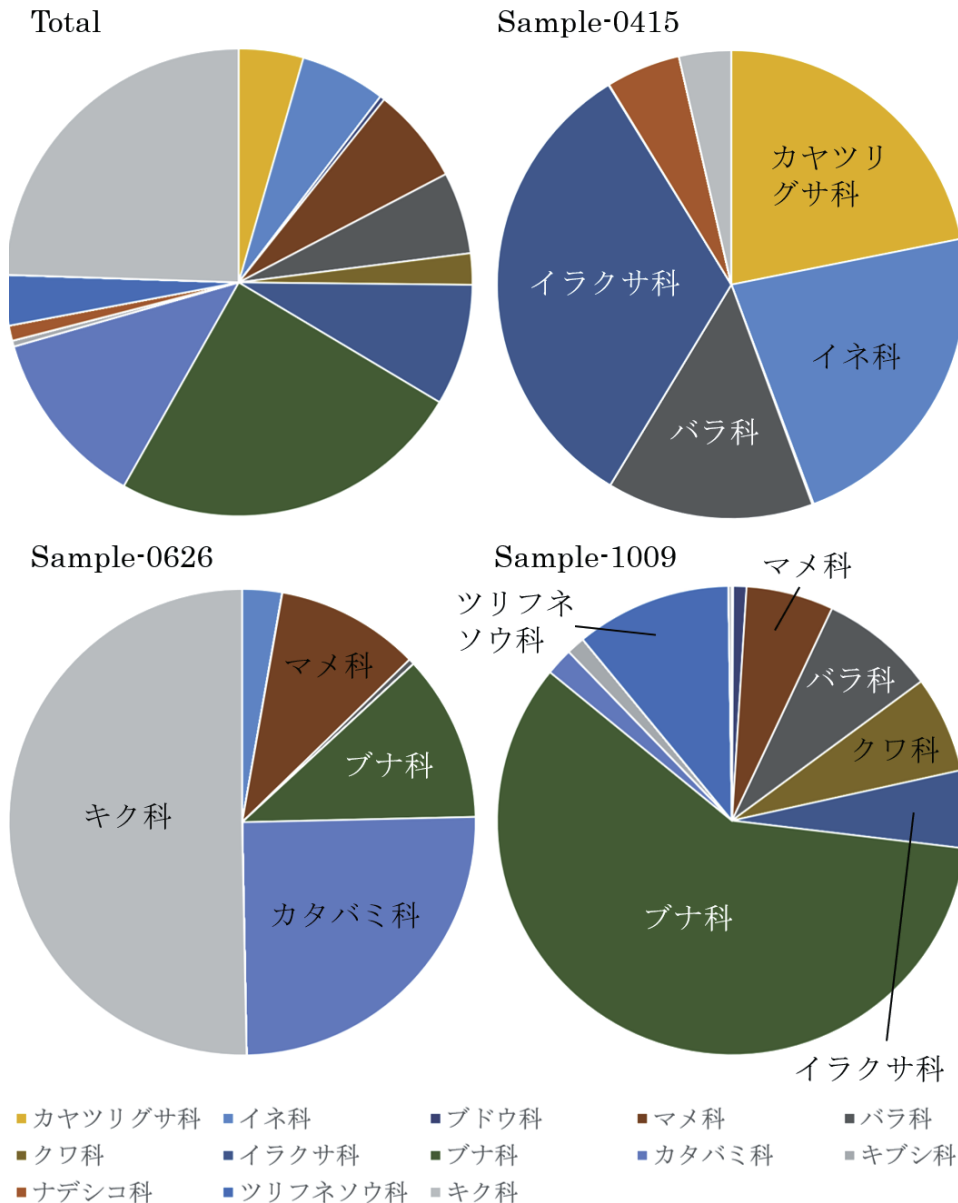


図 2. *trnL* 領域を用いて推定されたシカ採食植物について科ごとに集計したリードの割合。

シカの嗜好性の季節変化

本研究は各季節1サンプルしか糞塊を解析していないため、厳密には季節変化を見ているのか、単に糞塊間のばらつきを見ているだけなのかを判断できない。しかし、本研究結果とキャンパスの植生情報からは、次のようなシカの嗜好性の季節変化を予測することができる。春(4月)にシカは、イネ科やバラ科、イラクサ科、タデ科、セリ科、カヤツリグサ科などの多様な植物をバランスよく食べている。新葉や新芽が出て、おそらくシカにとって食べやすい状態ではあるものの、量自体が少ないために様々なグループの植物を食べていると考えられる。初夏(6月)の前後には、キク科やカタバミ科の花が多数咲くため、その花を目安に食べている可能性がある。秋(10月)には、キャンパス内のブナ科(コナラ、クヌギなど)が落葉してリターとなるほか、堅果も多数落とすため、主にブナ科に栄養を依存する。また、湿地のツリフネソウもキャンパス周辺ではちょうど花期であり、主に花を目安に食べていると思われる。これらは全てまだ予測に過ぎず、今後、サンプル数や調査時期を増やして検証する必要があるだろう。

手法の検討と今後について

本研究のDNAメタバーコーディング解析で用いた糞塊反復、PCR反復は、両方でかなり高い再現性を示した。反復無しで解析した場合、一部の低頻度OTUはばらついてしまう可能性があるが、主要な高頻度OTUの変化は完全に追うことができると考えられる。従って、特に高頻度のもので地域間や季節間での違いや傾向を見るのであれば、実験上の反復を増やすよりも、シカの糞塊自体の採集数を増やした方が得られる情報は大きくなる可能性が高いと思われる。

謝辞

本研究は、研究課題「ニホンジカの植物への嗜好性の季節変化と植物フェノロジーとの関係」に対する2020年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS202006)の支援を受けて行われました。ここに深く謝意を表します。

シカ糞の採取時には、神奈川大学の志村映実氏にサポートをして頂きました。また、シカ糞からのDNA抽出時には、同じく神奈川大学の海老澤梓氏に多くのサポートをして頂きました。これらの方々にも心より感謝申し上げます。

文献

- 1) 植生学会企画委員会 (2011) ニホンジカによる日本の植生への影響—シカ影響アンケート調査(2009～2019)結果—。 *植生情報* **15**: 9-30.
- 2) Takatsuki S (2009) Effects of sika deer on vegetation in Japan: a review. *Biol. Conserv.* **142**: 1922-1929.
- 3) 高槻成紀 (1989) 植物および群落に及ぼすシカの影響。 *日本生態学会誌* **39**: 67-80.
- 4) 辻野 亮, 松井 淳, 丑丸敦史, 瀬尾明弘, 川瀬大樹, 内橋尚妙, 鈴木健司, 高橋淳子, 湯本貴和, 竹門康弘 (2007) 深泥池湿原へのニホンジカの侵入と植生に対する採食圧。 *保全生態学研究* **12**: 20-27.
- 5) 阪口翔太, 藤木大介, 井上みずき, 山崎理正, 福島慶太郎, 高柳敦 (2012) 日本海側冷温帯性針広混交林におけるニホンジカの植物嗜好性。 *森林研究* **78**: 71-80.
- 6) 橋本佳延, 藤木大介 (2014). 日本におけるニホンジカの採食植物・不嗜好性植物リスト。 *人と自然* **25**: 133-160.
- 7) Takatsuki S (2009) Geographical variations in food habits of sika deer: the northern grazer vs. the southern browser. In: *Sika Deer: Biology and Management of Native and Introduced Populations*. McCullough D R, Takatsuki S and Kaji K, eds., Springer, Japan. pp. 231-237.
- 8) 丸山直樹, 遠竹行俊, 片井信之 (1975) 表日光に生息するシカの食性の季節性。 *哺乳動物学雑誌* **6**: 163-73.
- 9) 姉崎智子 (2015) 群馬県赤城山におけるニホンジカの食性の季節変化。 *群馬県立自然史博物館研究報告* **19**: 5-9.
- 10) 姉崎智子 (2017) 群馬県片品村におけるニホンジカの食性変化。 *群馬県立自然史博物館研究報告* **21**: 101-04.
- 11) Nakahama N, Furuta T, Ando H, Setsuko S, Takayanagi A and Isagi Y (2021) DNA metabarcoding revealed that sika deer foraging strategies vary with season in a forest with degraded understory vegetation. *Forest Ecol. Manag.* **484**: 118637.
- 12) 藤木大介 (2017) 兵庫県におけるニホンジカの嗜好性植物・不嗜好性植物リスト。 *兵庫 ワイルドライフモノグラフ* **9**: 118-34.
- 13) 高槻成紀, 梶谷敏夫 (2019) 丹沢山地のシカの食性—長期的に強い採食圧を受けた生息地の事例—。 *保全生態学研究* **24**: 1-12.
- 14) 神奈川大学 (1987) *神奈川大学湘南平塚キャンパス建設計画環境影響予測評価書*。神奈川大学, 神奈川。
- 15) 岩崎貴也, 奥田真未, 渡部凌我, 斎藤昌幸, 土田彩加, 志村映実, 泉 進 (2021) カメラトラップで確認された神奈川大学湘南ひらつかキャンパスにおける哺乳類相とキャンパス建設前後の変化。 *神奈川自然誌資料* **42**: 71-75.
- 16) Ando H, Setsuko S, Horikoshi K, Suzuki H, Umehara S, Inoue-Murayama M and Isagi Y (2013) Diet analysis by next-generation sequencing indicates the frequent consumption of introduced plants by the critically endangered red-headed wood pigeon (*Columba janthina nitens*) in oceanic island habitats. *Ecol. Evol.* **3**: 4057-4069.
- 17) 安藤温子, 小村健人, 向井喜果, 安藤正規, 井鷲裕司 (2020) 趣旨説明: DNAメタバーコーディングによる野生動物の食性解析手法。 *日本生態学会誌* **70**: 71-75.
- 18) 安藤温子, 安藤正規, 井鷲裕司 (2020) 植物食性動物

- を対象とした食性解析手法. *日本生態学会誌* **70**: 77-89.
- 19) Nakahara F, Ando H, Ito H, Murakami A, Morimoto N, Yamasaki M, Takayanagi A and Isagi Y (2015) The applicability of DNA barcoding for dietary analysis of sika deer. *DNA Barcodes* **3**: 200-206.
 - 20) 松木吏弓, 阿部聖哉, 竹内 亨, 梨本 真, 島野光司, 矢竹一穂 (2004) ノウサギ糞からの DNA 解析による餌植物同定. *DNA 多型* **12**: 20-26.
 - 21) Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Miquel C, Valentini A, Vermat T, Corthier G, Brochmann C and Willerslev E (2007) Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res.* **35**: e14.
 - 22) Suyama Y and Matsuki Y (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Sci. Rep.* **5**:16963.
 - 23) Huson D H, Auch A F, Qi J and Schuster SC (2007) MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res.* **17**: 377-386.
 - 24) Tanabe AS and 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**: e76910.
 - 25) Miyaki M and Kaji K (2004) Summer forage biomass and the importance of litterfall for a high-density sika deer population. *Ecol. Res.* **19**: 405-409.
 - 26) 岡崎重史, 辻野 亮 (2017) 奈良公園におけるニホンジカの空間分布の季節変動. *奈良教育大学自然環境教育センター紀要* **18**: 45-54.