

2019 年度
博士学位論文

メタバーコーディング法を活用した
ニホンライチョウ
(*Lagopus muta japonica*)
の植物性餌資源推定法の確立

中部大学大学院
応用生物学研究科 応用生物学専攻

藤井 太一

目次

和文要約	1
1. 緒論	3
2. 調査地概要及び供試試料	6
3. 植物性餌資源推定法の確立	11
3-1. DNA ローカルデータベースを活用したサブクローニング法による葉緑体 rbcL_F3R3 領域からの餌資源推定及びその推定精度確認.....	11
3-1-1. 研究背景及び目的.....	11
3-1-2. 供試試料及び実験方法.....	12
3-1-3. 結果及び考察.....	14
3-2. メタバーコーディング法による葉緑体 rbcL_F3R3 領域と核 ITS2 領域からの植物性 餌資源推定及び植物性餌資源の季節変動.....	21
3-2-1. 研究背景及び目的.....	21
3-2-2. 供試試料及び実験方法.....	22
3-2-3. 結果及び考察.....	31
4. 結論	45
5. 謝辞	46
6. 引用文献	47
7. 研究業績	53
8. 付録	58

和文要約

我が国の特別天然記念物及び環境省の絶滅危惧種 IB 類に指定されているニホンライチョウ (*Lagopus muta japonica*) は、気候変動に伴う生息地環境の劣化が懸念されており、このまま何の保全策も講じなければ将来的に絶滅の危険性が非常に高いことが示唆されている。そのため、保全に向けた対策が急務である。日本における保全活動として、生息域内保全と生息域外保全の連携によって、適切かつ効率的な保全の実現を目指している。この保全計画の実現に向けて、自然環境下における主要な餌資源となっている植物種を把握することは重要である。

最も正確に餌資源を把握可能な手法は胃腸内容物調査であるが、特別天然記念物に指定されていることから殺傷・解剖が不可能なニホンライチョウではこの手法を適用することができない。生息地での目視によるついで観察調査は非侵襲的に調査が可能であるが、植物分類の高度な知識が必要で、目視観察のため誤同定の可能性がある。また、この手法は長期間の追跡調査が必要であり、ニホンライチョウに対してのストレスや高山植生の踏み付けなどによるダメージが懸念される。そこで、近年、野生生物の餌資源推定において広く利用されている糞中植物残渣からのメタバーコーディングを用いて、毎年繁殖が確認されている富山県太郎山に生息するニホンライチョウの植物性餌資源について解析した。また、rarefaction 解析を用いて各糞から得られた解析リード数と出現 ASV (Amplicon Sequence Variant) 数の関係性及び解析糞数と検出植物種数の関係性を明らかにし、ニホンライチョウの餌資源を把握するために必要な解析リード数と糞サンプル数を推定することで、他の生息地でも応用可能な効率的な調査を実施するための指標を提示した。

2015 年 8 月に採取した 33 糞サンプルを用いて、サブクローニング法を用いた葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域による餌資源推定精度の確認及び調査地に生育している植物種 73 種から構築した DNA ローカルデータベースの有用性を検証した。その結果、既存のデータバンクである DDBJ を用いた場合には種レベルの推定精度が 56.5% だったのに対して、DNA ローカルデータベースを用いることによって種レベルでの推定精度が 95.5% と非常に高くなった。しかし、葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域は、一部の植物種 (キク科, スノキ属, ツツジ属) において、DNA 多型が無いいため種レベルでの推定が不可能であった。また、葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域増幅プライマー部の塩基配列の変異のため、植物種毎に PCR 増幅効率が異なり、偽陰性による対象植物の餌資源の過小評価が懸念される。そこで、葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域に加えて核 ITS2 領域も解析領域としてサブクローニング法よりも高感度に餌資源植物が検出されるメタバーコーディングを実施した。メタバーコーディングには、2015 年から 2018 年にかけて採取した糞 107 サンプルを用いた。また、相同性検索には、葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域と新たに構築した核 ITS2 領域の DNA ローカルデータベースを併用した。葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域と核 ITS2 領域で検出される植物種に違いが認められ、単一領域解析による餌資源推定では植物種数を過小評価する危険性が高く、複数領域解析の必要性が示された。そこで、葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域と核 ITS2 領域の相同性検索結果を併用することによって、

種レベル 44 種類 (95.7%), 属レベル 2 種類 (4.3%), 累計 46 種類の植物分類群が推定できた。本研究の結果は、過去の胃内容物観察やついでみ観察と比較して、非侵襲的により多くの植物種を明らかにできた。本調査地においては 7~10 月の期間内に、各月で餌資源の違いは認められず、クロウスゴ (*Vaccinium ovalifolium* var. *ovalifolium*), ガンコウラン (*Empetrum nigrum* var. *japonicum*), スノキ属 (*Vaccinium* sp.), ミネズオウ (*Kalmia procumbens*), シラネニンジン (*Tilingia ajanensis*), チングルマ (*Sieversia pentapetala*) が、この期間の主要な餌資源であることが明らかとなった。また、解析糞サンプル数と出現植物種数の関係性を示す rarefaction 解析より、20 糞サンプルで主要な植物性餌資源の 90% を解析可能であることが明らかとなった。

葉緑体 rbcL_F3R3 領域と核 ITS2 領域を解析領域とし、両領域の DNA ローカルデータベースを用いたメタバーコーディングは、既存の調査手法より高い精度で餌資源を把握することが可能な調査方法である。また、国内外を問わず、多くの生息地で実施可能な汎用性のある調査方法であることから、ニホンライチョウ保全のための基礎的データとなる餌資源推定手法として有用であると結論した。

1. 緒論

ニホンライチョウ (*Lagopus muta japonica*) (図 1-1) は、北極を中心とした周極地方に生息するライチョウ (*L. muta*) の亜種の一つである。ニホンライチョウはライチョウ生息地の南限に生息しており、最終氷河期の終わりと共に、気温の低い日本の高山帯に残存した遺存種である (中村, 2013a)。現在は北アルプスと南アルプスの一部の山脈にのみ生息しており、生息地環境の劣化や個体数の減少が危惧されていることから国の特別天然記念物及び環境省の絶滅危惧種 IB 類に指定されている。かつてニホンライチョウは北アルプス、中央アルプス、南アルプス周囲の山岳で生息が確認されていたが、現在では北アルプス、南アルプスでしか生息が確認できず、中央アルプスや白山では地域絶滅したとされている (花井と徳本, 1978; 羽田, 1979)。羽田ら (1985) は、1980 年代になわばりの数を計測することで日本に生息する個体数を約 3,000 羽と推定しているが、現在では約 1,700 羽にまで減少している (中村, 2007)。この個体数減少の要因は明らかにされていないが、ニホンジカ (*Cervus nippon*) とニホンザル (*Macaca fuscata*) による生息地の損害、アカギツネ (*Vulpes vulpes japonica*) やハシブトガラス (*Corvus macrorhynchos*) による捕食圧の増加 (Suzuki et al., 2013) や登山者による高山植生の踏みつけなどのダメージ (河野, 1999) などが要因と考えられている。また、気候変動に伴い、生息地環境の劣化が懸念されており、Hotta et al. (2019) は 2081~2100 年には生息地は激減し、将来的に絶滅の危険性が非常に高いと予測している。そのため、保全に向けた対策が急務である。

日本における保全活動として、ニホンライチョウ保護増殖事業計画 (環境省, 2012)、ニホンライチョウ生息域外保全実施計画 (環境省, 2014) が実施されている。この事業では生息域内保全として山岳毎の生息状況の調査・モニタリングを実施し、個体群の生態などを解析している。また、生息域外保全として人工飼育や繁殖技術を確立することで、個体数の増加を目標としている。このような生息域内・外保全を連携することによって、適切かつ効率的な保全の実現を目指している。この保全計画の実現に向けて、自然環境下における主要な餌資源となっている植物 (以降、餌資源) を種レベルで把握することができれば (小林と中村, 2011)、生息域外保全における雛の飼育に向けた飼料開発や飼育個体の自然復帰にむけた餌資源選定、生息域内保全における生息地環境整備に向けた基礎データとして貢献可能と考えられる。

野生生物を保全するためには餌となる生物種の把握は重要な調査項目の一つであり、胃腸内容物調査 (千羽, 1965; 里見と湯浅, 1968; Young et al., 1997)、糞分析 (菅, 1979; Burger et al., 1999)、採食イベント調査 (Bowen et al., 2002; 小林と中村, 2011) など様々な調査方法で多様な動物についての調査が行われている。ニホンライチョウの餌資源を最も正確に把握することが可能な手法は胃腸内容物調査であるが、特別天然記念物であることから、この手法を適用することができない。過去には死亡した個体の胃内容物を記載した報告があるが (千羽, 1965; 里見と湯浅, 1968)、解析個体数が限られており、詳細な餌資源を明らかにしたとは言えない。また、糞内容物の顕微鏡観察は非侵襲的に調査可能である

が、種レベルでの推定ができないという問題がある (García-González et al., 2016). 他の非侵襲的手法として、採食イベント調査があり、ニホンライチョウにおいて最も一般的に行われている調査方法で、岐阜県乗鞍岳で行われたついでみ観察調査が報告されている (小林と中村, 2011). しかし、ついでみ観察調査は植物分類の高度な知識が必要で、目視観察のため誤同定の可能性がある。また、長期間の追跡調査が必要であり、ニホンライチョウに対してのストレスや高山植生の踏み付けなどによるダメージが懸念される。ニホンライチョウの餌資源は生息地の植生の違いによって異なることから (中村, 2007), 多数の地域で実施可能で、既報の調査法よりも短期間で詳細な餌資源把握が可能な手法の確立が必要と考えられる。

そこで、近年、野生生物の餌となる生物種の推定において広く利用されている次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer, NGS) を用いた糞中植物残渣のメタバーコーディング (Deagle et al., 2009 ; Soinen et al., 2009 ; Ando et al., 2013 ; Vesterinen et al., 2013 ; Sullins et al., 2018) に着目した。本手法は、顕微鏡観察と比較して餌となった生物種をより高い精度で同定可能であることが明らかになっている (Soinen et al., 2009 ; Ando et al., 2013). また、糞を採取するだけでよいので、長期間の追跡調査を必要としない。そのため、追跡調査と比較して、ニホンライチョウに対してのストレスや高山植生の踏み付けによるダメージを軽減できる利点もある。しかし、メタバーコーディングには、種レベルでの推定精度に課題があり (Staats et al., 2016), 対象生物や DNA 解析領域により種レベルでの推定精度が異なる (Deagle et al., 2009 ; Soinen et al., 2009 ; Ando et al., 2013 ; Vesterinen et al., 2013 ; Sullins et al., 2018). そのため、ニホンライチョウの餌資源に適した解析領域を選定する必要がある。

本研究では、まず解析領域の選定のためにサブクロニング法を用いた餌資源推定精度の確認及び調査地に生育している植物の DNA ローカルデータベース構築の有用性を確認した。その後、解析領域及びローカルデータベースを改善し、NGS によるメタバーコーディングを用いたニホンライチョウの高精度な餌資源推定法の確立を目指し、主要な餌資源を明らかにした。また、rarefaction 解析を用いて各糞から得られた解析リード数と出現 ASV (Amplicon Sequence Variant) 数の関係性及び解析糞数と検出植物種数の関係性を明らかにすることで、ニホンライチョウの餌資源を把握するために必要な解析リード数と糞サンプル数を推定した。本研究で確立された餌資源調査法は、長期間の現地調査を必要とせずに餌資源を把握することが可能となることから、他のニホンライチョウ生息地においても効率的に餌資源調査を行うことができると考えられる。



図 1-1. 調査地である富山県太郎山において撮影されたニホンライチョウ（左：雌，右：雄）（*Lagopus muta japonica*）（撮影日：2016年7月27日）

2. 調査地概要及び供試試料

本調査は、中部山岳国立公園の特別保護区である富山県太郎山（富山県新川郡立山町千寿ヶ原）周囲の高山帯で行った（図 2-1）。太郎山は標高 2,373m の飛騨山脈に属する立山連峰の一つであり、毎年、太郎山周囲でニホンライチョウの育雛が確認されていることから継続的に調査が可能である。本調査地では日本海側から断続的に風が当たる風衝地にガンコウラン（*Empetrum nigrum* var. *japonicum*）やクロマメノキ（*Vaccinium uliginosum* var. *japonicum*）を優占種とした風衝矮性低木、ハイマツ（*Pinus pumila*）やオオシラビソ（*Abies mariesii*）を優占種とした風衝低木、風背地にはアオノツガザクラ（*Phyllodoce aleutica*）やミネズオウ（*Kalmia procumbens*）などの風背矮性低木が生育している。木道沿いの裸地にはダケカンバ（*Betula ermanii*）や歩道整備や登山者に付着した種子由来と考えられるイネ科（Poaceae）の侵入種が生育しており、本調査地に点在する池塘周囲にはイワイチョウ（*Nephrophyllidium crista-galli* subsp. *japonicum*）やモウセンゴケ（*Drosera rotundifolia*）などの湿性植物が生育している（図 2-2）。糞サンプルは 2015 年～2018 年の期間、安全に調査が可能な 7～10 月に追跡調査を行い、目視にて糞排泄行動を確認した地点や休息・採餌のため一カ所に滞在していた地点などを、ニホンライチョウが移動した後に調査し、117 個の糞サンプルを採取した（表 2-1）。また、DNA ローカルデータベース構築のために調査地に生育する 73 種の植物を踏査により採取した（表 2-2）。糞サンプル及び植物は、調査期間中は直射日光の当たらない気温の低い場所に保存し、下山後は全 DNA 抽出まで -20°C で保存した。

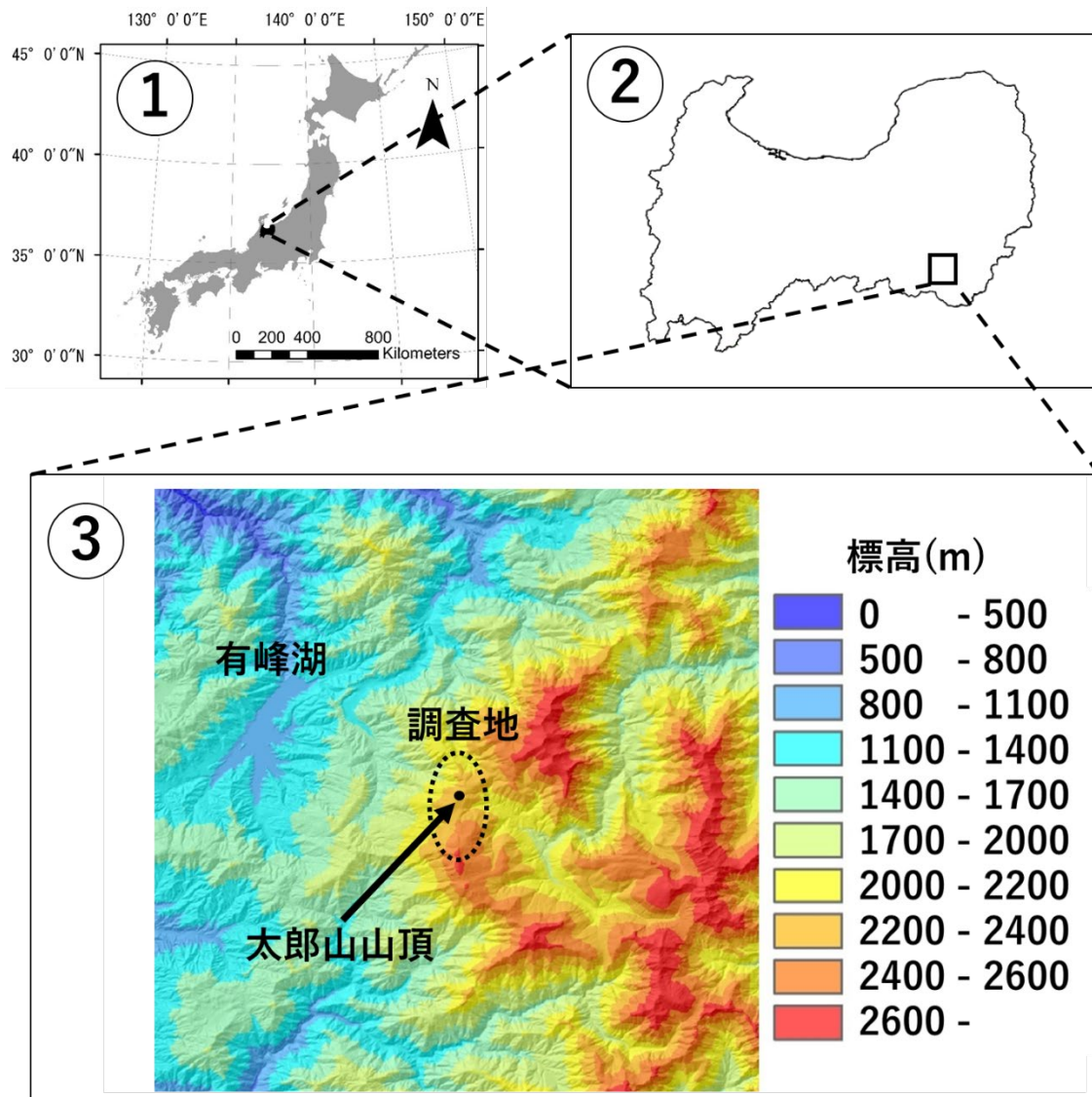


図 2-1. 調査地概要（富山県新川郡立山町千寿ヶ原）

①日本地図における調査地の位置を示す.

②富山県における調査地の位置を示す.

③黒丸が調査地である富山県太郎山の山頂（2,373m: 北緯 36 度 26 分 50.16 秒, 東経 137 度 30 分 49.01 秒), 点線内が調査範囲を示す.

地図データ：国土地理院 基盤地図情報 数値標高モデル（5m）を加工（URL：<https://fd.gd.gsi.go.jp/download/menu.php>）.



図 2-2. 調査地植生概要

風衝地にガンコウラン (*Empetrum nigrum* var. *japonicum*) やクロマメノキ (*Vaccinium uliginosum* var. *japonicum*) を優占種とした風衝矮性低木, ハイマツ (*Pinus pumila*) やオオシラビソ (*Abies mariesii*) を優占種とした風衝低木, 風背地にはアオノツガザクラ (*Phyllodoce aleutica*) やミネズオウ (*Kalmia procumbens*) などの風背矮性低木が生育. 木道沿いの裸地にはダケカンバ (*Betula ermanii*) や歩道整備や登山者に付着した種子由来と考えられるイネ科 (Poaceae) の侵入種, 風衝地や風背地に点在する池塘周囲にはイワイチョウ (*Nephrophyllidium crista-galli* subsp. *japonicum*) やモウセンゴケ (*Drosera rotundifolia*) などの湿性植物が生育.

表 2-1. 糞採取日と各実験に用いた糞サンプル数の内訳

採取日	追跡調査で採取した 総糞サンプル数	サブクローニング に用いた糞サンプル数	メタバーコーディング に用いた糞サンプル数 ¹⁾
2015年8月18~20日	33	33	31
2016年7月8~10日	33	-	31
2016年7月26~28日	18	-	19
2016年10月11~12日	13	-	8
2018年9月13~14日	20	-	18
合計	117	33	107

1) 塩基配列が決定でき、本研究に用いることができた糞サンプル数.

表 2-2. DNA ローカルデータベース構築に用いた 73 種の植物種一覧

科名	学名	和名	ローカルデータベース ¹⁾		
			rbcLF3R3	ITS2	
Apiaceae (セリ科)	<i>Peucedanum multivittatum</i>	ハクサンボウフウ	○	○	
	<i>Tilingia ajanensis</i>	シラネニンジン	○	○	
Aquifoliaceae (モチノキ科)	<i>Ilex sugerokii</i> var. <i>brevipedunculata</i>	アカミノイヌツゲ	○	○	
Asparagaceae (キジカクシ科)	<i>Melantherum dilatatum</i>	マイヅルソウ	○	KP214513	
Asteraceae (キク科)	<i>Anaphalis margaritacea</i> var. <i>margaritacea</i>	ヤマハハコ	○	○	
	<i>Arnica unalaschcensis</i> var. <i>tschonowskyi</i>	ウサギギク	○	○	
	<i>Artemisia sinanensis</i>	タカネヨモギ	○	○	
	<i>Cirsium otayae</i>	タテヤマアザミ	○	○	
	<i>Hieracium japonicum</i>	ミヤマコウゾリナ	○	○	
	<i>Ixeridium dentatum</i> subsp. <i>Kimuranum</i>	クモマニガナ	○	○	
	<i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>asiatica</i>	アキノキリンソウ	○	○	
	Betulaceae (カバノキ科)	<i>Betula ermanii</i>	ダケカンバ	○	○
	Brassicaceae (アブラナ科)	<i>Cardamine nipponica</i>	ミヤマタネツケバナ	○	○
	Celastraceae (ニシキギ科)	<i>Parnassia palustris</i>	ウメバチソウ	○	○
	Cornaceae (ミズキ科)	<i>Cornus canadensis</i>	ゴゼンタチバナ	○	MG218733
Cupressaceae (ヒノキ科)	<i>Juniperus communis</i> var. <i>hondoensis</i>	ホンドミヤマネズ	○	○	
Cyperaceae (カヤツリグサ科)	<i>Carex blepharicarpa</i>	ショウジョウスゲ	○	○	
	<i>C. brunnescens</i>	ヒメカワズスゲ	○	○	
	<i>C. pyrenalca</i> var. <i>altior</i>	キンスゲ	○	○	
	<i>C. nubilgens</i>	ミノボロスゲ	○	○	
	<i>Eriophorum vaginatum</i>	ワタスゲ	○	JX566737	
	Diapensiaceae (イワウメ科)	<i>Schizocodon soldanelloides</i> f. <i>alpinus</i>	コイワカガミ	○	○
	Droseraceae (モウセンゴケ科)	<i>Drosera rotundifolia</i>	モウセンゴケ	○	○
	Ericaceae (ツツジ科)	<i>Andromeda polifolia</i>	ヒメシヤクナゲ	○	○
		<i>Arctous alpine</i>	ウラシマトツジ	○	○
		<i>Elliotia bracteata</i>	ミヤマホツツジ	○	○
<i>Empetrum nigrum</i> var. <i>japonicum</i>		ガンコウラン	○	○	
<i>Eubotryoides grayana</i> var. <i>parvifolia</i>		ヒメハナヒリノキ	○	○	
<i>Gaultheria adenostrix</i>		アカモノ	○	○	
<i>G. pyrolloides</i>		シラタマノキ	○	○	
<i>Kalmia procumbens</i>		ミネズオウ	○	○	
<i>Phyllodoce aleutica</i>		アオノツガザクラ	○	○	
<i>P. nipponica</i>		ツガザクラ	○	○	
<i>Rhododendron brachycarpum</i>		ハクサンシヤクナゲ	○	○	
<i>R. tschonowskii</i> subsp. <i>Trinerve</i>		オオコメツツジ	○	○	
<i>Vaccinium ovalifolium</i> var. <i>ovalifolium</i>		クロウスゴ	○	○	
<i>V. shikokianum</i>		マルバウスゴ	○	○	
<i>V. smallii</i> var. <i>smallii</i>		オオバスノキ	○	○	
<i>V. uliginosum</i> var. <i>japonicum</i>		クロマメノキ	○	○	
Gentianaceae (リンドウ科)		<i>Gentiana makinoi</i>	オヤマリンドウ	○	○
		<i>G. nipponica</i>	ミヤマリンドウ	○	○
		<i>G. thunbergii</i> var. <i>minor</i>	タテヤマリンドウ	○	○
Hypericaceae (オトギリソウ科)	<i>Hypericum senanense</i> subsp. <i>mutloides</i>	イワオトギリ	○	○	
Juncaceae (イグサ科)	<i>Juncus filiformis</i>	エゾホソイ	○	○	
Lentibulariaceae (タヌキモ科)	<i>Pinguicula vulgaris</i> var. <i>macroceras</i>	ムシトリスミレ	○	○	
Melanthiaceae (シュロソウ科)	<i>Halenia orientalis</i>	ショウジョウバカマ	○	—	
Menyanthaceae (ミツガシワ科)	<i>Veratrum stamineum</i> var. <i>stamineum</i>	コバイケイソウ	○	○	
	<i>Neprophyllidium crista-galli</i> subsp. <i>Japonicum</i>	イワイチヨウ	○	○	
Nartheciaceae (キンコウカ科)	<i>Aletris foliata</i>	ネバリノギラン	○	○	
	<i>Nartheclium asiaticum</i>	キンコウカ	○	○	
	<i>Dactylophiza aristata</i>	ハクサンチドリ	○	○	
Orchidaceae (ラン科)	<i>Platanthera tipuloides</i> subsp. <i>Nipponica</i>	コバノトンボソウ	○	○	
	<i>Pedicularis chamissonis</i> var. <i>Japonica</i>	ヨツバシオガマ	○	○	
Orobanchaceae (ハマウツボ科)	<i>P. yezoensis</i>	エゾシオガマ	○	○	
	<i>P. yezoensis</i>	オオシラビン	○	○	
Pinaceae (マツ科)	<i>Pinus pumila</i>	ハイマツ	○	○	
	<i>Pinus pumila</i>	ハイマツ	○	○	
Plantaginaceae (オオバコ科)	<i>Veronica nipponica</i>	ヒメクワガタ	○	○	
Poaceae (イネ科)	<i>Calamagrostis longisetata</i>	ヒゲノガリヤス	○	○	
	<i>Mollinopsis japonica</i>	ヌマガヤ	○	○	
	<i>Sasa kurilensis</i>	チシマザサ	○	—	
Polygonaceae (タデ科)	<i>Persicaria weyrichii</i> var. <i>weyrichii</i>	ウラジロタデ	○	○	
	<i>Rumex alpestris</i> subsp. <i>Lapponicus</i>	タカネスイバ	○	○	
Polytrichaceae (スギゴケ科)	<i>Polytrichum juniperinum</i>	スギゴケ	○	MF180404	
	<i>Anemone narcissiflora</i> subsp. <i>nipponica</i>	ハクサンイチゲ	○	○	
Ranunculaceae (キンポウゲ科)	<i>Coptis trifoliolata</i>	ミツバノバイカオウレン	○	○	
	<i>Ranunculus acris</i> subsp. <i>Nipponicus</i>	ミヤマキンポウゲ	○	○	
	<i>Ranunculus acris</i> subsp. <i>Nipponicus</i>	ヤマブキシヨウマ	○	○	
Rosaceae (バラ科)	<i>Potentilla matsumurae</i>	ミヤマキンバイ	○	○	
	<i>Sieversia pentapetala</i>	チングルマ	○	○	
	<i>Sorbus commixta</i>	ナナカマド	○	○	
	<i>Acer tschonowskii</i>	ミネカエデ	○	○	
Sapindaceae (ムクロジ科)	<i>Acer tschonowskii</i>	ミネカエデ	○	○	
Tofieldiaceae (チシマゼキショウ科)	<i>Trilantha japonica</i>	イワシヨウブ	○	○	
Xanthorrhoeaceae (ススキノキ科)	<i>Hemerocallis dumortieri</i> var. <i>esculenta</i>	ゼンテイカ	○	○	

1) ○：本研究で塩基配列が決定できた植物種。 —：本研究で塩基配列が決定できず、
 DDBJ から塩基配列が取得できなかった植物種。 アルファベット+数字：本研究で塩基
 配列が決定できず、DDBJ より塩基配列を取得した植物種のアクセッション番号。

3. 植物性餌資源推定法の確立

3-1. DNA ローカルデータベースを活用したサブクローニング法による葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域からの餌資源推定及びその推定精度確認

3-1-1. 研究背景及び目的

DNA バーコーディングとは、DNA の特定領域の塩基配列をデータベース化し、生物の検索・同定ツールとして用いることを目的とした手法である（長谷川ら，2008）．参照 DNA データベースが充実している場合、DNA バーコーディングを用いることで、同定が困難な幼体や卵、形態的特徴だけでは他種との識別が困難な種の同定も可能となる（Hebert et al., 2004）．そのため、目視では同定が困難な糞中に残された植物残渣由来の DNA 情報から餌資源を推定することが可能となる．植物の DNA バーコーディングにおいては葉緑体 DNA に含まれる *matK* 領域と *rbcL* 領域が DNA バーコード領域として指定されており、多くの植物種の塩基配列データが DDBJ などの DNA Data Bank に登録されている（CBOL Plant Working Group, 2009）．また、核 ITS 領域や葉緑体 *trnL* 領域も DNA バーコード領域として広く使用されている（Staats et al., 2016）．

フィールド調査で採取された糞由来の DNA は、消化や DNA 抽出までの保存期間中の劣化により、DNA の断片化が懸念される．一般に、保存状態の悪いサンプルからの PCR 増幅効率は、PCR 産物のサイズが大きくなるほど PCR 増幅率が大幅に低下する（Little, 2013）．また、メタバーコーディングを行う際、一般的に使用される次世代シーケンサー MiSeq（illumina, CA）では、最も長い塩基配列を解読可能なキット（MiSeq Reagent Kit v3, illumina, CA）を用いても、片側から 300bp までしか解析できないため MiSeq 解析用のシーケンスプライマーや F 側・R 側を結合させるために必要なオーバーラップ領域を考慮すると解析対象とする PCR 断片長は 500bp が限界である．また、DNA バーコーディングにおいては、参照 DNA データベースの充実度も非常に重要であり、未登録種が多い場合には誤同定の可能性が高くなる．そこで本研究では NGS 解析可能な塩基配列長で、DNA Data Bank への登録数も多い葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域（262bp）を解析対象として（松木ら，2003）、2015 年 8 月 18～20 日に採取した糞 33 サンプルを用いて餌資源推定を実施した（表 2-1）．本解析領域は種の分解能が高く、シダ植物及びカヤツリグサ科など一部の植物種を除きユニバーサル性が高いため DNA バーコーディングに適している領域である（松木ら，2003）．本研究では、まず既存のデータベースの DDBJ に登録されている植物種全塩基配列を参照 DNA データベースとして相同性検索を行い、ニホンライチョウの糞中植物残渣の種推定を行うことで、DDBJ を用いた種推定精度を確認した．さらに、調査地に生育する植物種から葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域の参照 DNA データベース（以降、*rbcL* ローカルデータ）を構築し、DDBJ を用いた場合と種推定精度を比較した．

3-1-2. 供試試料及び実験方法

3-1-2-1. 糞中 DNA からの葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域の塩基配列決定法

2015 年に採取した 33 糞サンプルを、供試試料として用いた (表 2-1)。糞からの全 DNA 抽出は DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) を用いて行い、GeneClean Spin Kit (MP-Biomedicals, CA) で精製し、鋳型 DNA とした。PCR 反応には Mighty Amp DNA Polymerase (TaKaRa, Japan) を用い、PCR 反応液は付属のプロトコールに従い、0.32 μ M の葉緑体 *rbcL_F3R3* プライマー (Forward: 5'-TATCTTGGCAGCATTCGAGTAACTCC-3' 及び、Reverse: 5'-GATTCGCAGATCCTCCAGACGTAGAGC-3') (松木ら, 2003) を含む 50 μ l を調整した。PCR 増幅は DNA サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystem, USA) を用い、熱変性 98°C2 分間 1 回後、熱変性 98°C10 秒間、アニーリング 60°C15 秒間、伸長反応 68°C20 秒間を 1 サイクルとして 30 サイクルの条件で増幅した。増幅確認された PCR 産物をプラスミド (pGEM-T Easy Vevtore System I, Promega, WI) にクローニングし、大腸菌 JM109 (TOYOBO, Japan) に付属のプロトコールに従って形質転換した。インキュベート後、LB 寒天培地から形質転換コロニーを無作為に 1 糞サンプルあたり最大 30 個ピックアップし、PCR 産物の挿入を確認した。シーケンスのための DNA 調整は NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel, Germany) を用いて行い、CEQ DTCS Quick Start Kit (BECKMAN COULTER, CA) を用いてマルチキャピラリー DNA 解析システム (CEQ2000XL, BECKMAN COULTER, CA) で塩基配列を決定した。その後、MEGA6.06 (Tamura et al., 2013) を用いて全塩基配列のアライメントを行った。

3-1-2-2. *rbcL* ローカルデータ構築法

2016 年 7 月 27 日に調査地で採取した 73 種の植物種を、「3-1-2-1. 糞中 DNA からの葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域の塩基配列決定法」で使用した全 DNA 抽出キットを用いて、同様の PCR 条件及びシーケンス条件で葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域の塩基配列を決定した。その後、MEGA6.06 (Tamura et al., 2013) を用いて全塩基配列のアライメントを行い、BioEdit (Hall, 1999) を用いて *rbcL* ローカルデータを構築した。

3-1-2-3. 相同性検索法及び餌候補植物種推定法

糞サンプルから決定できた葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域の塩基配列について、BLASTN アルゴリズムを使用して、DDBJ に登録されている全ての植物種を対象として相同性を検索した。DDBJ には論文発表されている "published" と、塩基配列のみ登録されている "unpublished" が混在しているため、本研究では信頼性の高い "published" されたデータのみを採用した。また、Shirako et al., (2015) と同様に相同性 98% 以上を候補植物種として採用し、北海道から沖縄・小笠原までの日本に自生、帰化している全ての維管束植物と主な栽培植物が登録されている「植物和名-学名インデックス YList」(米倉と梶田, 2003) に学名が登録されている植物種の内、最も相同性が高い植物種を候補植物種として採用した。2 種以上が同じ相同

性で検索された場合には、分類群が同一になるまで分類階層を上げていき、科レベルで推定できなかった場合には、科レベルで推定不可とした (Valentini et al. 2009).

また、糞から決定できた同じ塩基配列について、BioEdit (Hall, 1999) を用いて rbcL ローカルデータと相同性を検索した。候補植物種は DDBJ による相同性検索条件と同様の方法で推定した。DDBJ と rbcL ローカルデータから得られた相同性結果を比較し、相同性が高い方を餌資源として採用した。相同性が同じ場合には、rbcL ローカルデータの結果を採用した。

3-1-3. 結果及び考察

3-1-3-1. rbcL ローカルデータ

採取した 32 科 61 属 73 種の植物種全てから rbcL ローカルデータを構築することができたが、種固有の塩基配列を持っていたのは 65 種 (89.0%) であった。異なる属にも関わらずアキノキリンソウ (*Solidago virgaurea* subsp. *asiatica*), タテヤマアザミ (*Cirsium otayae*), ミヤマコウゾリナ (*Hieracium japonicum*) は同じ塩基配列を有していたことから、推定種はキク科 (Asteraceae) とした。同様に、異なる種にも関わらず同じ塩基配列となったオオバスノキ (*V. smallii* var. *smallii*), クロマメノキ, マルバウスゴ (*V. shikokianum*) の推定種はスノキ属, オオコメツツジ (*Rhododendron tschonoskii* subsp. *trinerve*), ハクサンシャクナゲ (*R. brachycarpum*) の推定種はツツジ属 (*Rhododendron* sp.) とした。

3-1-3-2. 相同性検索結果

糞 33 サンプルから 198 クローンを単離し、葉緑体 rbcL_F3R3 領域の塩基配列を決定した。決定できた塩基配列長は 257~264bp となったが、本来の葉緑体 rbcL_F3R3 領域長は 262bp であることから、一部の塩基配列は PCR 増幅ミスや解析エラーによって誤った塩基配列を解釈している可能性が示唆された。

DDBJ のみを用いた相同性検索結果では、種レベルで 13 種類 (136 クローン : 68.7%), 属レベルで 5 種類 (13 クローン : 6.6%), 科レベルで 4 種類 (25 クローン : 12.6%), 合計 22 の植物分類群が推定され、14 クローン (7.1%) は科レベルで推定不可, 10 クローン (5.1%) は相同性が 98% 未満となった (表 3-1)。rbcL ローカルデータのみを用いた相同性検索結果では、種レベルで 20 種類 (180 クローン : 90.9%), 属レベルで 1 種類 (6 クローン : 3.0%), 12 クローン (6.1%) は相同性が 98% 未満となり、DDBJ の検索結果と比較して、種レベルで推定可能な植物種が 7 種増加した (表 3-2)。両検索結果を比較すると (表 3-3), DDBJ からニイタカシラタマ (*Gaultheria borneensis*), タイワンノギラン (*Aletris glabra*) と検索されたクローンは、rbcL ローカルデータを用いることでシラタマノキ (*G. pyrolloides*), ネバリノギラン (*A. foliata*) に推定種が修正された。このように rbcL ローカルデータベースによってシラタマノキ, ネバリノギランと修正されたのは、両種の葉緑体 rbcL_F3R3 領域が DDBJ に未登録であるため、誤同定されたことが原因であった。また、DDBJ のみを用いた検索で、リンドウ属 (*Gentiana* sp.), オウレン属 (*Coptis* sp.), キジムシロ属 (*Potentilla* sp.), ラン科 (Orchidaceae), イネ科, バラ科 (Rosaceae), 科レベルで推定不可だったクローンについては、rbcL ローカルデータを用いることでいずれも種レベルで推定することができた (表 3-3)。これは、DDBJ を用いた場合、調査地に生育していない近縁種が同じ相同性結果となったことが、推定精度低下の主な原因であった。また、ドロイ (*Juncus gracillimus*), クスノキ属 (*Cinnamomum* sp.), マメ科 (Fabaceae), イネ科, コケモモ (*V. vitis-idaea*) と検索されたクローンは rbcL ローカルデータ構築のために採取した植物に含まれていなかったため DDBJ のみで検出された (表 3-3)。しかし、ドロイと推定されたク

ローンの相同性は 257/262 (98.1%) と比較的低い値となり、クスノキ属と推定されたクローンの相同性は 260/264 (98.5%) となり、本来は 262bp である配列長から 2bp 長くなっていた (表 3-1)。そのため、両クローン共に相同性は 98%以上となったが、PCR 増幅エラーや解析エラーによる配列解読ミスの可能性が示唆された。また、マメ科とイネ科が推定されたクローンの相同性検索結果は、高山帯に生息しないクズモドキ (*Calopogonium mucunoides*)、オオムギ (*Hordeum vulgare*) などの植物種が検出されていたことから、実験操作中のコンタミネーション由来の塩基配列と示唆された。コケモモについては、過去にニホンライチョウの餌資源として報告があり (千羽, 1965; 中村, 2007), 乗鞍岳においては主要な餌資源とされている (中村, 2007)。そのため、本調査地においても餌資源となっていたと考えられるが、rbcL ローカルデータ作成のために採取された植物に含まれていなかったため DDBJ のみからしか検索されなかった。これらの結果より、DDBJ のみで検出された 5 つの植物分類群のうちコケモモを除くドロイ、クスノキ属、マメ科、イネ科は、本研究におけるニホンライチョウの餌資源から除外するのが妥当と考えられた。

DDBJ と rbcL ローカルデータを併用し、ノイズ・コンタミ由来と考えられるドロイ、クスノキ属、マメ科、イネ科を除去することで、2015 年 8 月 18~20 日の餌資源候補植物種として種レベルで 21 種類、属レベルで 1 種類の合計 22 の植物分類群が推定された (表 3-4)。DDBJ のみでは種レベルでの推定精度は 56.5%、rbcL ローカルデータのみでは 95.2%、DDBJ と rbcL ローカルデータを併用した場合は 95.5%となった (表 3-5)。葉緑体 rbcL_F3R3 領域は、ニホンライチョウの餌資源推定の解析対象領域として非常に適していることが示された。また、相同性検索には、DDBJ のみでは誤った餌資源が推定される可能性があるため、調査地由来のローカルデータベース構築が必須である。しかし、調査地で構築した DNA ローカルデータベースは全ての餌資源を網羅的に推定できていない場合もあるので、DDBJ と併用して確認する必要性が示された。

表 3-1. サブクローニング法で DDBJ のみを用いて推定された餌資源植物

科名	学名	推定種	相同性	検出回数	クローン数	
Apiaceae (セリ科)	<i>Tilingia ajanensis</i>	シラネニンジン	259/262~262/262 (98.9~100%)	8	27	
Cornaceae (ミズキ科)	<i>Cornus canadensis</i>	ゴゼンタチバナ	261/262~262/262 (99.6~100%)	2	5	
Ericaceae (ツツジ科)	<i>Empetrum nigrum</i> var. <i>japonicum</i>	ガンコウラン	260/262~262/262 (99.2~100%)	21	61	
	<i>Gaultheria borneensis</i>	ニイタカシラタマ	260/262 (99.2%)	1	1	
	<i>Kalmia procumbens</i>	ミネズオウ	261/262~262/262 (99.6~100%)	3	6	
	<i>Phyllodoce aleutica</i>	アオノツガザクラ	261/262~262/262 (99.6~100%)	1	3	
	<i>Vaccinium</i> sp.	スノキ属	259/262~262/262 (98.9~100%)	3	5	
	<i>V. ovalifolium</i> var. <i>ovalifolium</i>	クロウスゴ	260/262~262/262 (99.2~100%)	7	24	
	<i>V. vitis-idaea</i>	コケモモ	261/262 (99.6%)	1	1	
Gentianaceae (リンドウ科)	<i>Gentiana</i> sp.	リンドウ属	258/2626~260/262 (98.5~99.2%)	4	4	
Juncaceae (イグサ科)	<i>Juncus gracillimus</i>	ドロイ	257/262 (98.1%)	1	1	
Lauraceae (クスノキ科)	<i>Cinnamomum</i> sp.	クスノキ属	260/264 (98.5%)	1	1	
Menyanthaceae (ミツガシワ科)	<i>Nephrophyllidium crista-galli</i> subsp. <i>japoni</i>	イワイチヨウ	262/262 (100%)	2	2	
Nartheciaceae (キンコウカ科)	<i>Nartheclum asiaticum</i>	キンコウカ	261/262~262/262 (99.6~100%)	2	3	
Orchidaceae (ラン科)	<i>Aletris glabra</i>	タイワンノギラン	258/262 (98.5%)	1	1	
	Orchidaceae	ラン科	261/262 (99.6%)	1	1	
Poaceae (イネ科)	Poaceae	イネ科	258/2626~262/262 (98.5~100%)	9	14	
Poaceae (マメ科)	Fabaceae	マメ科	261/262 (99.6%)	2	2	
Ranunculaceae (キンボウゲ科)	<i>Coptis</i> sp.	オウレン属	261/262 (99.6%)	1	1	
Rosaceae (バラ科)	<i>Potentilla</i> sp.	キジムシロ属	261/262~262/262 (99.6~100%)	2	2	
	Rosaceae	バラ科	259/262~261/262 (98.9~99.6%)	4	8	
Tofieldiaceae (チシマゼキショウ科)	<i>Triantha japonica</i>	イワショウブ	262/262 (100%)	1	1	
			科レベルで推定不可	257/262~262/262 (98.1~100%)	5	14
相同性98%未満				8	10	

2015年8月に採取した糞33サンプルから推定.

表 3-2. サブクローニング法で rbcL ローカルデータのみを用いて推定された餌資源植物

科名	学名	推定種	相同性	検出数	クローン数
Apiaceae (セリ科)	<i>Tilingia ajanensis</i>	シラネニンジン	259/262~262/262 (98.9~100%)	8	27
Cornaceae (ミズキ科)	<i>Cornus canadensis</i>	ゴゼンタチバナ	261/262~262/262 (99.6~100%)	2	5
Ericaceae (ツツジ科)	<i>Empetrum nigrum</i> var. <i>japonicum</i>	ガンコウラン	260/262~262/262 (99.2~100%)	21	61
	<i>Gaultheria pyrolloides</i>	シラタマノキ	260/262 (99.2%)	1	1
	<i>Kalmia procumbens</i>	ミネズオウ	261/262~262/262 (99.6~100%)	3	6
	<i>Phyllodoce aleutica</i>	アオノツガザクラ	261/262~262/262 (99.6~100%)	1	3
	<i>Vaccinium</i> sp.	スノキ属	259/262~262/262 (98.9~100%)	3	6
Gentianaceae (リンドウ科)	<i>V. ovalifolium</i> var. <i>ovalifolium</i>	クロウスゴ	260/262~262/262 (99.2~100%)	7	24
	<i>Gentiana nipponica</i>	ミヤマリンドウ	259/262~262/262 (98.9~100%)	3	3
	<i>Gentiana thunbergii</i> var. <i>minor</i>	タテヤマリンドウ	259/262 (98.9%)	1	1
Juncaceae (イグサ科)	<i>Juncus filiformis</i>	エゾホソイ	257/262~262/262 (98.1~100%)	5	14
Menyanthaceae (ミツガシワ科)	<i>Nephrhyllidium crista-galli</i> subsp. <i>japonicum</i>	イワイチョウ	262/262 (100%)	2	2
Nartheciaceae (キンコウカ科)	<i>Nartheclium asiaticum</i>	キンコウカ	99.6~100%	2	3
Orchidaceae (ラン科)	<i>Aletris foliata</i>	ネバリノギラン	258/262 (98.5%)	1	1
	<i>Dactylorhiza aristata</i>	ハクサンチドリ	261/262 (99.6%)	1	1
Poaceae (イネ科)	<i>Sasa kurilensis</i>	チシマザサ	258/262~262/262 (98.5~100%)	7	11
Ranunculaceae (キンボウゲ科)	<i>Coptis trifoliolata</i>	ミツバノバイカオウレン	261/262 (99.6%)	1	1
Rosaceae (バラ科)	<i>Potentilla matsumurae</i>	ミヤマキンバイ	261/262~262/262 (99.6~100%)	2	2
	<i>Sieversia pentapetala</i>	チングルマ	261/262 (99.6%)	4	5
	<i>Sorbus commixta</i>	ナナカマド	259/262~261/262 (98.9~99.6%)	4	8
Tofieldiaceae (チシマゼキショウ科)	<i>Triantha japonica</i>	イワショウブ	262/262 (100%)	1	1
相同性98%未満				9	12

2015年8月に採取した糞33サンプルから推定.

表 3-3. サブクローニング法で DDBJ と rbcL ローカルデータを併用して推定された餌資源植物

	DDBJ	rbcLローカルデータ	検出糞数	クローン数
DDBJとrbcLローカルデータの 相同性検索結果が同じ植物分類群	ガンコウラン	ガンコウラン	21	61
	シラネニンジン	シラネニンジン	8	27
	クロウスゴ	クロウスゴ	7	24
	ミネズオウ	ミネズオウ	3	6
	スノキ属	スノキ属	3	5
	ゴゼンタチバナ	ゴゼンタチバナ	2	5
	イワイチョウ	イワイチョウ	2	2
	キンコウカ	キンコウカ	2	3
	アオノツガザクラ	アオノツガザクラ	1	3
	イワショウブ	イワショウブ	1	1
DDBJとrbcLローカルデータの 相同性検索結果が異なる植物分類群	ニイタカシラタマ	シラタマノキ	1	1
	タイワンノギラン	ネバリノギラン	1	1
	リンドウ属	ミヤマリンドウ	3	3
	リンドウ属	タテヤマリンドウ	1	1
	オウレン属	ミツバノバイカオウレン	1	1
	キジムシロ属	ミヤマキンバイ	2	2
	ラン科	ハクサンチドリ	1	1
	イネ科	チシマザサ	7	11
	バラ科	ナナカマド	4	8
	科レベルで推定不可	エゾホソイ	5	14
DDBJで検出されたが, rbcLローカルデータで 検出されなかった植物分類群	科レベルで推定不可	チングルマ	4	5
	ドロイ	相同性98%未満	1	1
	クスノキ属	相同性98%未満	1	1
	マメ科	相同性98%未満	2	2
	イネ科	相同性98%未満	2	3
	コケモモ	相同性98%未満	1	1
	相同性98%未満	相同性98%未満	4	5

2015年8月に採取した糞33サンプルから推定.

表 3-4. 調査地の植物相とサブクローニング法による DDBJ と rbcL ローカルデータの併用によって推定された餌資源植物

科名	学名	和名	rbcL ローカルデータ ¹⁾	推定精度	データベース ²⁾	検出数	クローン数
Apiaceae (セリ科)	<i>Peucedanum multivittatum</i>	ハクサンボウフウ	○				
	<i>Tilingia ajanensis</i>³⁾	シラネニンジン	○	種	L	8	27
Aquifoliaceae (モチノキ科)	<i>Ilex sugerokii</i> var. <i>brevipedunculata</i>	アカミノイヌツゲ	○				
Asparagaceae (キジカクシ科)	<i>Malanthemum dilatatum</i>	マイヅルソウ	○				
Asteraceae (キク科)	<i>Anaphalis margaritacea</i> var. <i>margaritacea</i>	ヤマハハコ	○				
	<i>Arnica unalascensis</i> var. <i>tschonoskii</i>	ウサギギク	○				
	<i>Artemisia sinanensis</i>	タカネヨモギ	○				
	<i>Cirsium otayae</i>	タテヤマアザミ	○				
	<i>Hieracium japonicum</i>	ミヤマコウゾリナ	○				
	<i>Ixeridium dentatum</i> subsp. <i>kimuranum</i>	クモメコガナ	○				
	<i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>asiatica</i>	アキノキリンソウ	○				
	<i>Betula ermanii</i>	ダケカンバ	○				
	Brassicaceae (アブラナ科)	<i>Cardamine nipponica</i>	ミヤマタネツケバナ	○			
	Celastraceae (ニシキギ科)	<i>Parnassia palustris</i>	ウメバチソウ	○			
Cornaceae (ミズキ科)	<i>Cornus canadensis</i>	ゴゼンタチバナ	○	種	L	2	5
Cupressaceae (ヒノキ科)	<i>Juniperus communis</i> var. <i>hondoensis</i>	ホンドミヤマネズ	○				
Cyperaceae (カヤツリグサ科)	<i>Carex blepharicarpa</i>	ショウジョウソゲ	○				
	<i>C. brunnescens</i>	ヒメカワズソゲ	○				
	<i>C. pyrenaica</i> var. <i>altior</i>	キンソゲ	○				
	<i>C. nubigena</i>	ミノボロスゲ	○				
	<i>Eriophorum vaginatum</i>	ワタソゲ	○				
Diapensiaceae (イワウメ科)	<i>Schizocodon soldanelloides</i> f. <i>alpinus</i>	コイワカガミ	○				
Droseraceae (モウセンゴケ科)	<i>Drosera rotundifolia</i>	モウセンゴケ	○				
Ericaceae (ツツジ科)	<i>Andromeda polifolia</i>	ヒメシャクナゲ	○				
	<i>Arctostaphylos alpina</i>	ウラシマツツジ	○				
	<i>Elliotia bracteata</i>	ミヤマホツツジ	○				
	<i>Empetrum nigrum</i> var. <i>japonicum</i>	ガンコウラン	○	種	L	21	61
	<i>Eubotryoides grayana</i> var. <i>parvifolia</i>	ハナヒリノキ	○				
	<i>Gaultheria adenothrix</i>	アカモノ	○				
	<i>G. pyrolloides</i>	シラタマノキ	○	種	L	1	1
	<i>Kalmia procumbens</i>	ミネズオウ	○	種	L	3	6
	<i>Phyllodoce alautica</i>	アオノツガザクラ	○	種	L	1	3
	<i>P. nipponica</i>	ツガザクラ	○				
	<i>Rhododendron brachycarpum</i>	ハクサンシャクナゲ	○				
	<i>R. tschonoskii</i> subsp. <i>trinerve</i>	オオコメツツジ	○				
	<i>Vaccinium</i> sp.	スノキ属	○	属	L	3	5
	<i>V. shikokianum</i>	マルバウスゴ	○				
	<i>V. smallii</i> var. <i>smallii</i>	オオバノスノキ	○				
	<i>V. uliginosum</i> var. <i>japonicum</i>	クロマメノスノキ	○				
	<i>V. ovalifolium</i> var. <i>ovalifolium</i>	クロウスゴ	○	種	L	7	24
	<i>V. vitis-idaea</i>	コケモモ ⁴⁾	○	種	D	1	1
Gentianaceae (リンドウ科)	<i>Gentiana makinoi</i>	オヤマリンドウ	○				
	<i>G. nipponica</i>	ミヤマリンドウ	○	種	L	3	3
	<i>G. thunbergii</i> var. <i>minor</i>	タテヤマリンドウ	○	種	L	1	1
		<i>Hypericum senanense</i> subsp. <i>mutilloides</i>	イワオトギリ	○			
Hypericaceae (オトギリソウ科)	<i>Juncus filiformis</i>	エゾホソイ	○	種	L	5	14
Juncaceae (イグサ科)	<i>Pinguicula vulgaris</i> var. <i>macroceras</i>	ムシトリスミレ	○				
Lentibulariaceae (タヌキモ科)	<i>Helonias orientalis</i>	ショウジョウバカマ	○				
Melanthiaceae (シュロソウ科)	<i>Veratrum stamineum</i> var. <i>stamineum</i>	コバイケイソウ	○				
Menyanthaceae (ミツガシワ科)	<i>Nephrophyllum crista-galli</i> subsp. <i>Japonicum</i>	イワイチョウ	○	種	L	2	2
Nartheciaceae (キンコウカ科)	<i>Aletis foliata</i>	ネバリノギラン	○	種	L	1	1
	<i>Nartheclum asiaticum</i>	キンコウカ	○	種	L	2	3
Orchidaceae (ラン科)	<i>Dactyloctenium arietatum</i>	ハクサンチドリ	○	種	L	1	1
	<i>Platanthera tipuloides</i> subsp. <i>nipponica</i>	コバトントンボウ	○				
Orobanchaceae (ハマウツボ科)	<i>Pedicularis chamissonis</i> var. <i>japonica</i>	ヨツバシオガマ	○				
	<i>Pedicularis yezoensis</i>	エゾシオガマ	○				
Pinaceae (マツ科)	<i>Abies mariesii</i>	オオシラビソ	○				
	<i>Pinus pumila</i>	ハイマツ	○				
Plantaginaceae (オオバコ科)	<i>Veronica nipponica</i>	ヒメクワガタ	○				
	<i>Calamagrostis longiseta</i>	ヒゲノガリヤス	○				
	<i>Molinopsis japonica</i>	ヌマガヤ	○				
	<i>Sasa kurlensis</i>	チシマザサ	○	種	L	7	11
Polygonaceae (タデ科)	<i>Persicaria weyrichii</i> var. <i>weyrichii</i>	ウラジロタデ	○				
	<i>Rumex alpestris</i> subsp. <i>japonicus</i>	タカネスイバ	○				
Polytrichaceae (スギゴケ科)	<i>Polytrichum juniperinum</i>	スギゴケ	○				
Ranunculaceae (キンボウゲ科)	<i>Anemone narcissiflora</i> subsp. <i>Nipponica</i>	ハクサンイチゲ	○				
	<i>Coptis trifoliolata</i>	ミツバノバイカオウレン	○	種	L	1	1
	<i>Ranunculus acris</i> subsp. <i>nipponicus</i>	ミヤマキンボウゲ	○				
Rosaceae (バラ科)	<i>Arunca dioica</i> var. <i>kamtschaticus</i>	ヤマブキショウマ	○				
	<i>Potentilla matsumurae</i>	ミヤマキンバイ	○	種	L	2	2
	<i>Sieversia pentapetala</i>	チングルマ	○	種	L	4	5
	<i>Sorbus commixta</i>	ナナカマド	○	種	L	4	8
Sapindaceae (ムクロジ科)	<i>Acer tschonoskii</i>	ミネカエデ	○				
Tofieldiaceae (チンマイセキショウ科)	<i>Triantha japonica</i>	イワショウブ	○	種	L	1	1
Xanthorrhoeaceae (ススキノキ科)	<i>Hemerocallis dumortieri</i> var. <i>esculenta</i>	ゼンテイカ	○				
コンタミネーション・ノイズ推定配列							7
相同性98%未満							5
total							198

- 1) 本研究で構築した rbcL ローカルデータの有無
- 2) 植物種推定に使用したデータベース (L: rbcL ローカルデータ, D: DDBJ)
- 3) 太文字は推定された餌資源植物を示す。
- 4) コケモモは rbcL ローカルデータベース構築の際に採取できなかったが、本調査地での生育が確認されているため植物相リストに加えた。

表 3-5. サブクローニング法で用いた各データベースによる推定精度比較

推定レベル	検出植物分類群数		
	DDBJ	rbcLローカルデータ	DDBJ+ rbcLローカルデータ
種	13 (56.5%)	20 (95.2%)	21 (95.5%)
属	5 (21.7%)	1 (4.8%)	1 (4.5%)
科	4 (17.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
科レベルで推定不可	1 (4.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

2015年8月に採取した糞33サンプルから推定.

3-2. メタバーコーディング法による葉緑体 rbcL_F3R3 領域と核 ITS2 領域からの植物性餌資源推定及び植物性餌資源の季節変動

3-2-1. 研究背景及び目的

「3-1. DNA ローカルデータベースを活用したサブクローニング法による葉緑体 rbcL_F3R3 領域からの餌資源推定及びその推定精度確認」において、rbcL ローカルデータを用いた相同性検索を行うことで、95.5%の種推定精度で解析可能であることが明らかとなった。しかし、本研究で使用した葉緑体 rbcL_F3R3 領域は、一部の植物分類群（キク科、スノキ属、ツツジ属）において、種特異的な DNA 多型が無いため種レベルでの推定が不可能であった。そのため、サブクローニング法よりも高感度に餌資源が検出できるメタバーコーディングを用いた場合、種レベルで推定できなかった分類群についても検出できる可能性がある。また、葉緑体 rbcL_F3R3 領域は、増幅プライマー部の塩基配列の変異のため植物種毎に PCR 増幅効率が異なり、偽陰性による対象生物の餌資源の過小評価が懸念された。そのため、葉緑体 rbcL_F3R3 以外の領域についても検討する必要がある。そこで本研究では、葉緑体 rbcL_F3R3 領域に加えて核 ITS2 領域も解析領域として餌資源推定を実施した。核 ITS 領域は疑似遺伝子が存在するため、これまで DNA バーコード領域として利用されてこなかった (Staats et al., 2016)。しかし、近年、種推定精度が非常に高いことが明らかになったことからバーコード領域として利用されるようになった (Staats et al., 2016)。また、土壌中の環境 DNA からのメタバーコーディングによる植物種推定において、葉緑体 matK 領域、葉緑体 rbcL 領域、核 ITS2 領域、葉緑体 trnL P6loop 領域の 4 領域を用いた解析を実施した結果、多くの植物分類群で増幅可能な葉緑体 rbcL 領域と、種分類性能の高い核 ITS 領域の組み合わせが適している報告されている (Nicole et al., 2016)。そこで本研究においても、葉緑体 rbcL_F3R3 領域と核 ITS2 領域を MiSeq (illumina, CA) で解析し、メタバーコーディングを実施することで糞中植物残渣から餌資源推定を実施した。参照 DNA データベースは「3-1-3-1. rbcL ローカルデータ」で構築した rbcL ローカルデータと共に、ITS2 領域のローカルデータベースも構築し、2つのローカルデータベースを併用した。また、糞中に含まれる餌資源をそれぞれ網羅的に解析するためにはサブクローニング法では単離するクローン数が少ないため餌資源数を過小評価している可能性や、PCR 増幅エラーや解読エラーと思われる塩基配列が検出される問題があったが、これらの問題点については NGS を活用することで解決可能である。NGS を用いたメタバーコーディングでは解析サンプル数を調節することで、解析する塩基配列（リード）数の調節が可能である。また、膨大なリード数を解析することで、PCR エラー配列を予測し、鋳型 DNA 由来の塩基配列を統計的に抽出することも可能である (Callahan et al., 2016)。また、ニホンライチョウの効果的な保全のためには、季節的な餌資源の違いよりも、季節の変化に関わらず常に採食されている餌資源を把握することが重要であると考えられる。そこで、本研究では、ニホンライチョウの餌資源として積極的に管理していく必要があることから主要な餌資源となっている植物

種の推定を目指した。そのために、糞サンプリング時期毎に植物種の検出頻度を基に、餌資源の季節変動についても解析した。

また、今後の効率的な餌資源調査に必要な糞サンプル数を推定するため rarefaction 解析を行った。生態学における限られたサンプルから種多様度を推定する場合には interpolation (内挿) と extrapolation (外挿) を併用した rarefaction and extrapolation curve が有効であると報告されている (Anna et al., 2019)。そこで、rarefaction and extrapolation curve を作成し、糞サンプル数と出現植物種数の関係性について解析した。この rarefaction 解析とは、複数のサンプルによって構成されるデータセットから任意のサンプル数 (r) を非復元のリサンプリングによって抽出し、サンプルの中に含まれる種数を計算する手法である (三戸ら, 2017)。採取された糞サンプルとその糞サンプルから検出された植物種から構築されたデータセット (図 4-1①) から、 n 回の非復元のリサンプリングを実行することで、任意の試行回数における期待値と 95%信頼区間を推定できる (図 4-1②, サンプル数 $r=10$, $r=30$ を例として記載)。さらに、実測値データを基にして予測曲線 (extrapolation: 外挿) が構築可能である (Chao, 1984; Chao, 1987; Chao et al., 2014)。最終的に、実測値による曲線 (interpolation: 内挿) と予測曲線 (extrapolation: 外挿) を組み合わせることで rarefaction and extrapolation curve が作成できる (三戸ら, 2017) (図 4-1③)。ただし、本研究では主要な餌資源の把握を目指すことから、検出植物種の出現頻度に重み付けする shannon diveristy を用いた。shannon diveristy による解析では、レアな植物種の影響を軽減した植物種を検出することが可能である (Chao, 1984; Chao, 1987; Chao et al., 2014)。そして、rarefaction and extrapolation curve の外挿解析より推定された真の shannon diveristy (Chao et al., 2014; Hsieh and Chao, 2016) を基にした糞サンプル数に対する餌資源推定種数の網羅率 (%) から本調査地における餌資源推定に必要な糞サンプル数を推定した。

3-2-2. 供試試料及び実験方法

3-2-2-1. 糞からの塩基配列決定

「3-1-2-1. 糞中 DNA からの葉緑体 rbcL_F3R3 領域の塩基配列決定法」で使用した全 DNA 抽出キットを用いて、7~10 月に採取した 117 個の糞サンプル (表 2-1) から全 DNA を抽出し、Qubit3 (Thermo Fisher Scientific, MA) で DNA 濃度を測定後、全サンプル DNA 濃度を $5\text{ng}/\mu\text{l}$ に調整した (ただし、 $5\text{ng}/\mu\text{l}$ 以下のサンプルは希釈せずに使用した)。MiSeq (illumina, CA) によるアンプリコンシーケンスは、葉緑体 rbcL_F3R3 領域 (松木ら, 2003) と核 ITS2 領域 (Cheng et al., 2016) を解析領域とした。アンプリコンシーケンスとは特定のゲノム領域にみられる遺伝的変異を解析する方法であり、PCR 産物を NGS により数千~数万回シーケンスすることで PCR 産物に含まれる希少な塩基配列を含めて網羅的に解読する方法である。MiSeq を用いたシーケンスには PCR 産物の両端にシーケンスのためのプライマー配列、サンプル識別のためのインデックス配列、フローセル結合用の配列を付加する必要がある。さらに、アンプリコンシーケンスでは、同じ PCR 産物を大量に解析

するため、配列間の塩基多様度が低くなり、フローセル上の隣接する配列間で座標位置の誤認識が生じ解析精度が低下する可能性がある（東樹, 2016a）。そこで、NGS 配列決定用プライマーを付加する 1st PCR にはフレームシフト（Lundberg et al., 2013）を起こすことで塩基多様度の向上を図ることが可能なプライマーセット（表 4-1）を用いた。また、アンプリコンシーケンスではポリメラーゼによる塩基配列複製ミスが解析結果に大きく影響し、塩基配列の多様度を最大 15% 過大評価する可能性がある（Oliver et al., 2015）。そこで、PCR 反応には PCR エラー率（誤った塩基配列の混入の確率）が低く、NGS に適している KAPA HiFi（Kapa Biosystems, MA）（Dijk et al., 2014；東樹, 2016b）を用いた。1st PCR 反応液は 1 サンプル当たり KAPA HiFi 6.0 μ l, F・R Primer Mix (10 μ M) 0.7 μ l, Template DNA 2.0 μ l, dH₂O 3.3 μ l を含む 10 μ l を調整した。PCR 増幅は葉緑体 *rbcL_F3R3* 領域では、熱変性 95°C3 分間後、熱変性 98°C20 秒間、アニーリング 56°C15 秒間、伸長反応 72°C30 秒間を 1 サイクルとして 35 サイクル、最後に伸長反応 72°C5 分間行った。核 ITS2 領域では、熱変性 95°C3 分間後、熱変性 98°C20 秒間、アニーリング 55°C15 秒間、伸長反応 72°C30 秒間を 1 サイクルとして 35 サイクル、最後に伸長反応 72°C5 分間行った。PCR 反応後、電気泳動を行い解析対象外のバンド、プライマーダイマーが確認されたサンプルは SPRIselect（BECKMAN COULTER, CA）を用いて不必要な低分子・高分子の PCR 産物を除外し、標的 PCR 産物のみを回収した。

続いて、インデックス配列とフローセル結合配列を付加する 2nd PCR は、2ndPCR 用プライマーセット（表 4-2）と、1st PCR と同様に KAPA HiFi を用いた。2nd PCR 反応液は 1 サンプル当たり KAPA HiFi 12.0 μ l, F Index primer (10 μ M) 2.8 μ l, R Index primer (10 μ M) 2.8 μ l, 1/10 1stPCR 溶液 2.0 μ l, dH₂O 4.4 μ l を含む 24 μ l を調整した。PCR 増幅は熱変性 95°C3 分間後、熱変性 98°C20 秒間、アニーリング 72°C15 秒間を 1 サイクルとして 12 サイクル行い、最後に伸長反応 72°C5 分間行った。その後、SPRIselect を用いて不必要な低分子・高分子の PCR 産物を除外し、標的 PCR 産物のみを回収した。回収された標的 PCR 産物は Library Quantification Kit (illumina, CA) を用いて DNA 濃度を測定後、MiSeq Reagent Kit v3 (illumina, CA) のプロトコールに従い試薬及び各サンプルの DNA ライブラリ濃度を調整し、PCR 産物の両端から 300bp ずつ塩基配列を決定した。

3-2-2-2. 配列データ処理

塩基配列をインデックス配列の組み合わせ(表 4-2)からサンプル毎に振り分ける illumine 社が標準で提供する demultiplexing 機能は、インデックス配列のクオリティー値を評価せずに実行されるため、塩基配列が誤ったサンプルに振り分けられる可能性がある（東樹, 2016c）。そこで、illumina 社が提供する fastq ファイル生成用フリーソフト bcl2fastq version 1.8.4 (illumina, 2013) を用いて未処理の MiSeq BCL 形式ファイル (demultiplexing 前の MiSeq 生データ塩基配列) から fastq ファイルを生成し、メタバーコーディング解析用フリーソフト「claident」(Tanabe and Toju, 2013；田辺, 2018) の `clsplitseq` コマンドを用いて

インデックス配列 (表 4-2) のクオリティー値を評価する demultiplexing を行った。ノイズ・キメラ除去、F・R配列の結合、PCR複製ミスの除去は統計ソフト R の「dada2」パッケージ (Callahan et al., 2016) を用いて Amplicon Sequence Variant (ASV) (“PCR エラーを含まない鋳型 DNA 由来の塩基配列は、PCR エラーを含む配列より繰り返し観測される可能性が高い”という期待に基づき、エラー配列除去を行うことで OUT の欠点を改善した手法で回収された塩基配列) (Callahan et al., 2016) を取得した。従来のアンプリコンシーケンス解析では、類似度が高い配列を特定の閾値 (通常 3%) でまとめる Operational Taxonomic Units (OTU) (Westcott and Schloss, 2015) を作成して解析が行われていた (Callahan et al., 2017)。しかし、OTU には閾値の根拠が無く、1 サンプルあたりの解析リード数が増えると、検出される PCR エラー数の増加に伴い OTU 数も増加し (東と中山, 2015)、既存の DNA データバンクのリファレンス配列を用いた OTU 作成では既存の OTU しか検出できないなど多くの問題点がある (Callahan et al., 2017)。一方、ASV はエラー配列除去を行うことで OUT の欠点が改善されていることから (Callahan et al., 2016)、本研究では dada2 による塩基配列の処理を実施した。dada2 による ASV 取得において、塩基配列のクオリティー値と塩基配列長によるトリムは filterAndTrim 関数を用いた。このとき、葉緑体 rbcL_F3R3 領域は F・R 配列共に読み始め 200bp を、核 ITS2 領域は F・R 配列共に読み始め 250bp を採用した。なお、これらの閾値は各領域の PCR 最大断片長とシーケンスクオリティー値を考慮して設定した。dada2 のパラメトリックエラーモデルを用いた本研究のアンプリコンデータセットのエラーレート学習は learnErrors 関数を用いて実施し、dada 関数を用いて学習したエラーレートから PCR エラー配列を除去した。F・R 配列の結合は mergePairs 関数、キメラ配列除去は removeBimeraDenovo 関数を用い、同じ塩基配列をまとめることで ASV を決定した。非常に高感度に植物種が検出されるメタバーコーディングでは、コンタミネーション由来配列除去のために各サンプルから検出された低頻出 ASV を除去する必要がある (東樹, 2016d)。通常は各サンプルの総解析リード数に対して 0.1% を閾値として低頻出 ASV を除去するが、本研究では野外において植物・土壌・岩の上に落ちた糞サンプルを回収しているため、糞と接した植物種や、土壌・岩表面に付着していた植物片・花粉などが検出する可能性がある。そこで、コンタミネーション由来の植物種の検出をなるべく低減し、糞中に優占していた植物種を検出するために葉緑体 rbcL_F3R3 領域、核 ITS2 領域共に 1.0% を閾値として低頻出 ASV を除去した。また、NGS で多サンプルを解析した場合、サンプル間で得られる総解析リード数にばらつきが生じ、ASV 数に影響を与えるバイアスとなるため、解析リード数を揃える必要がある (東樹, 2016d)。そこで、統計ソフト R の「vegan」パッケージ ver.2.5-5 (Oksanen et al., 2019) の rarecurve 関数を用いて interpolation (内挿) による rarefaction curve を作成し、1,000 リードで各糞サンプルに含まれるコンタミネーション由来の可能性のある低頻度 ASV 除去後の ASV について十分に解析していることを確認した上で (図 4-2)、rrarefy 関数を用いて各サンプルからランダムに 1,000 リードを抽出し、相同性検索のための ASV 代表配列を決定した。

3-2-2-3. 葉緑体 rbcL_F3R3 と核 ITS2 領域のローカルデータベース構築

葉緑体 rbcL_F3R3 領域のローカルデータベースは「3-1-2-2. rbcL ローカルデータ構築法」で構築したものを使用した。核 ITS2 領域は調査地で採取した 73 種の植物種を対象に、「3-2-2-1. 糞からの塩基配列決定」の核 ITS2 領域解析と同様の手法で塩基配列を決定した。このとき、核 ITS2 領域は同一個体内であっても DNA 多型があるため、最も解析リード数が多いものを採用して調査地の核 ITS2 領域の参照 DNA データベース（以降、ITS2 ローカルデータ）を構築した。このとき、「3-1-3-2. 相同性検索結果」より、本研究で構築した調査地の参照 DNA データベースにはコケモモが含まれていなかったため、DDBJ より葉緑体 rbcL_F3R3 領域（アクセッション番号：KF163412）と核 ITS2 領域（アクセッション番号：GU361898）を取得し、それぞれのローカルデータベースに追加した。

3-2-2-4. 相同性検索及び候補植物種の決定

dada2 解析された葉緑体 rbcL_F3R3 領域と核 ITS2 領域の低頻度 ASV を除去した各 ASV の代表配列について、Blast2go (Conesa et al., 2005) を用いて、それぞれのローカルデータベースから相同性検索を実施し、相同性 98%以上の中から最も相同性が高い植物種を餌資源として採用した。ただし、2 種以上が同じ相同性で検索された場合には、分類群が同一になるまで分類階層を上げていき、同一となった分類群を餌資源候補とした (Valentini et al. 2009)。葉緑体 rbcL_F3R3 領域と核 ITS2 領域で検索された植物分類群のレベルが異なった場合には、より下位の分類群で検索された方を採用した。この際、コンタミネーションを防ぐために除去した 1.0%未満の低頻度 ASV の相同性結果も活用した。また、解析領域は、1 つの細胞内やゲノム内に存在するコピー数が種間で大きく異なり、各 ASV のリード数は、採食した植物の存在量とはならない (東樹, 2016d)。そのため、リード数の量的データを用いず検出、未検出の二値形式のデータの変換が推奨されている (東樹, 2016d)。そこで、各 ASV の検出リード数は、0 (未検出) もしくは 1 (検出) のいずれかに変換した。

3-2-2-5. 統計解析

糞 1 サンプル当たりから検出された植物種の有意差検定は、統計ソフト R の「NSM3」パッケージ (Grant et al., 2018) の pSDCFlig 関数を用いた (Steel-Dwass test, $p < 0.05$)。また、検出された植物種構成の違いを示す Jaccard 指数を用いた PCoA (Principal Coordinate Analysis) は、統計ソフト R の cmdscale 関数を用いて算出した。糞サンプリング時期別の植物種構成の違いについては「vegan」パッケージ (Oksanen et al., 2019) の adonis 関数を用いて PERMANOVA を実行した。また、糞サンプル数に対する餌資源の網羅率から、効率的な調査に必要な糞サンプル数を推定するための rarefaction and extrapolation curve は統計ソフト R の「iNEXT」パッケージ (Chao et al., 2009; Chao et al., 2014; Hsieh and Chao, 2016) を用いて算出した。この時、shannon diversity を用いた場合、extrapolation (外挿)

は無限に拡張することが可能であるため (Hsieh and Chao, 2016), 本研究では全てのサンプリング時期において極大になるまで extrapolation (外挿) を構築した. 各統計解析のグラフ化は, 統計ソフト R の「ggplot2」パッケージ (Wickham, 2016) を用いた. 本研究で使
用した統計ソフト R 解析コード及び ubuntu 解析コードは東樹 (2016b), 東樹 (2016c),
DADA2 Tutorial (2019), Zhang et al., (2019) を参考した.

① データセットの作成

植物	糞サンプル			
	糞A	糞B	...	糞x
a	○		...	
b	○	○	...	○
c			...	
d		○	...	
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
x	○		...	○

② サンプル数 r において n 回抽出

データセットから $r=10$ (糞10サンプル抽出) において n 回試行

抽出回数	種数
1	10
2	14
3	12
⋮	⋮
n 回	平均12

データセットから $r=30$ (糞30サンプル抽出) において n 回試行

抽出回数	種数
1	30
2	32
3	29
⋮	⋮
n 回	平均30

期待値・信頼区間を算出

③ $r = 10, 30$ で作成したrarefaction and extrapolation curve

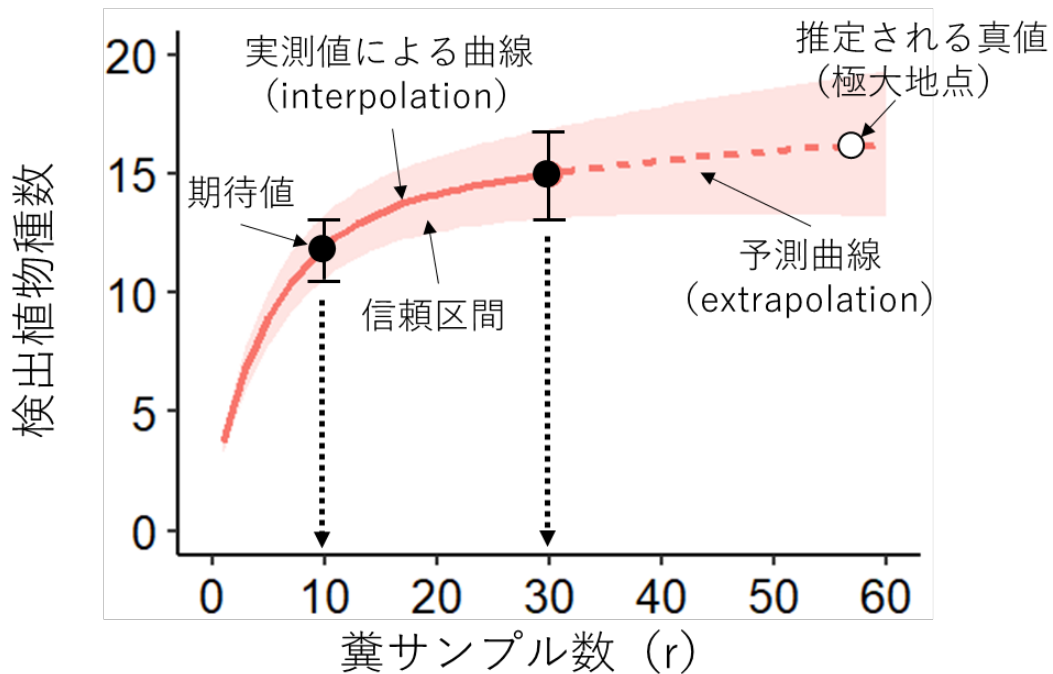


図 4-1. rarefaction and extrapolation curve の概要
三戸ら (2017) を改変.

表 4-1. 1st PCR プライマー配列のリスト

a) 葉緑体 rbcL_F3R3 解析用 primer セット

プライマー名	プライマー配列
rbcL_F3_1	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCC
rbcL_F3_2	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNTATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCC
rbcL_F3_3	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNTATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCC
rbcL_F3_4	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNTATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCC
rbcL_F3_5	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCC
rbcL_F3_6	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNTATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCC
rbcL_R3_1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGATTCGCAGATCCTCCAGACGTAGAGC
rbcL_R3_2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNGATTCGCAGATCCTCCAGACGTAGAGC
rbcL_R3_3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNGATTCGCAGATCCTCCAGACGTAGAGC
rbcL_R3_4	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNGATTCGCAGATCCTCCAGACGTAGAGC
rbcL_R3_5	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNGATTCGCAGATCCTCCAGACGTAGAGC
rbcL_R3_6	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNGATTCGCAGATCCTCCAGACGTAGAGC

b) 核 ITS2 解析用 primer セット

プライマー名	プライマー配列
ITS2-p3-F1	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTYACTCTCGGCAACGGATA
ITS2-p3-F2	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNYGACTCTCGGCAACGGATA
ITS2-p3-F3	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNYGACTCTCGGCAACGGATA
ITS2-p3-F4	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNYGACTCTCGGCAACGGATA
ITS2-p3-F5	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNYGACTCTCGGCAACGGATA
ITS2-p3-F6	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNYGACTCTCGGCAACGGATA
ITS2-u4-R1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTRGTTTCTTTTCTCCGCTTA
ITS2-u4-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNRGTTTCTTTTCTCCGCTTA
ITS2-u4-R3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNRGTTTCTTTTCTCCGCTTA
ITS2-u4-R4	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNRGTTTCTTTTCTCCGCTTA
ITS2-u4-R5	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNRGTTTCTTTTCTCCGCTTA
ITS2-u4-R6	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNRGTTTCTTTTCTCCGCTTA

表 4-2. 2nd PCR プライマー配列リスト

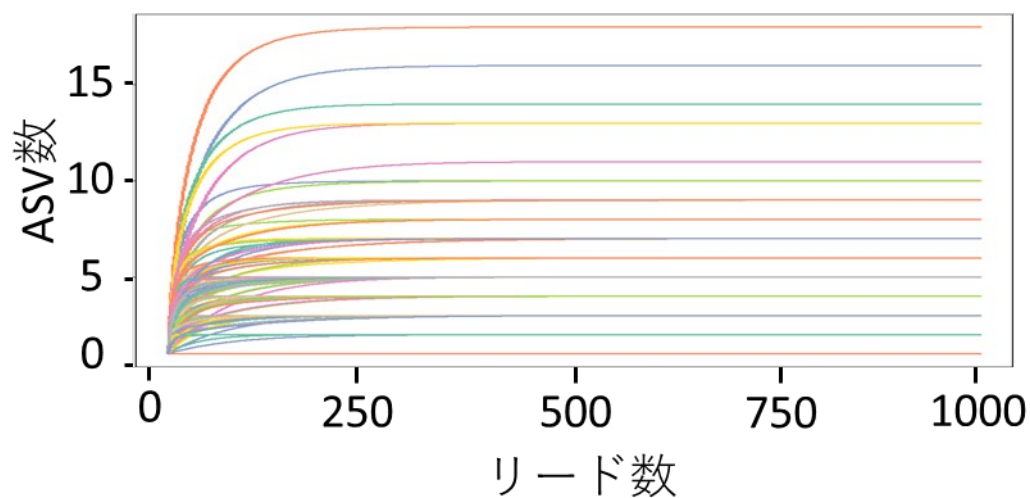
a) 2ndプライマー配列

Forward	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-インデックス配列F-TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
Reverse	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-インデックス配列R-GTGAAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT

b) インデックス配列リスト

サンプル名	rbcL_F3R3領域		ITS2領域		サンプル名	rbcL_F3R3領域		ITS2領域	
	F	R	F	R		F	R	F	R
150818_T1	GACACAAA	ATATGGGT	GACACAAA	ATATGGGT	160709_T21	CAAGGGTT	ACGGAGCA	CAAGGGTT	ACGGAGCA
150818_T2	GTTGTCCG	AAATCCCG	GTTGTCCG	AAATCCCG	160709_T22	CTCTGCGT	CGTCGAAT	CTCTGCGT	CGTCGAAT
150818_T3	GCTACCGT	TGCACCAG	GCTACCGT	TGCACCAG	160709_T23	AGGTATAT	CCACCTCT	AGGTATAT	CCACCTCT
150818_T4	TTGGGTCC	ATCCGCAT	TTGGGTCC	ATCCGCAT	160709_T24	TGACGTCG	TTAACGTT	TGACGTCG	TTAACGTT
150818_T6	GCATCGAG	TATGTGAA	GCATCGAG	TATGTGAA	160710_T1	CCGAAAT	GCCAAAGC	CCGAAAT	GCCAAAGC
150818_T7	GGCAAGGT	AAGGATGA	GGCAAGGT	AAGGATGA	160710_T2	AGGCAATA	CGTGATCA	AGGCAATA	CGTGATCA
150818_T8	AGAGGTGC	AGGCCGAA	AGAGGTGC	AGGCCGAA	160710_T3	GGGCATCA	ACGTAAC	GGGCATCA	ACGTAAC
150818_T9	AAGCCTTC	CTGTTAAA	AAGCCTTC	CTGTTAAA	160726_T1	CTGAGCGT	TCCGACAC	CTGAGCGT	TCCGACAC
150818_T10	AAGAGTAT	TACCTCCC	AAGAGTAT	TACCTCCC	160726_T2	ATCAATCG	CTCACATC	ATCAATCG	CTCACATC
150819_T1	AGAAACCA	ATAGATGT	AGAAACCA	ATAGATGT	160726_T3	CTGGAACA	GCCTGTG	CTGGAACA	GCCTGTG
150819_T2	TAGTCTCT	TTGGAGAC	TAGTCTCT	TTGGAGAC	160726_T4	TCCGCTGT	AGTGCTTC	TCCGCTGT	AGTGCTTC
150819_T3	AGGTCCCG	TTCTCGCG	AGGTCCCG	TTCTCGCG	160726_T5	CTCAAACA	GGACTGGA	CTCAAACA	GGACTGGA
150819_T4	GTCTGCT	CCCGTAAG	GTCTGCT	CCCGTAAG	160726_T6	GATGCAGA	TCATAGCT	GATGCAGA	TCATAGCT
150819_T5	GTACGCTT	GCTACCGT	GTACGCTT	GCTACCGT	160726_T7	ACATGGAC	ACTAGAGC	ACATGGAC	ACTAGAGC
150819_T6	TCCGACAC	AGCACGTA	TCCGACAC	AGCACGTA	160726_T8	ACAATCTT	ACCTGAAG	ACAATCTT	ACCTGAAG
150819_T7	GCGTGCAA	CACAAGTA	GCGTGCAA	CACAAGTA	160726_T9	CATTGCGG	CGGTGAGT	CATTGCGG	CGGTGAGT
150819_T8	ACCAGTTT	AAACCGCC	ACCAGTTT	AAACCGCC	160727_T1	CAGGTTGC	GCACTCAG	CAGGTTGC	GCACTCAG
150819_T9	ACTCATA	GACTAGCG	ACTCATA	GACTAGCG	160727_T2	AAAGAGGC	CCTACGCT	AAAGAGGC	CCTACGCT
150819_T10	CCATCCAC	AAGAGTAT	CCATCCAC	AAGAGTAT	160727_T3	CTCTATAG	TCTAAACT	CTCTATAG	TCTAAACT
150819_T11	GGTAGCCA	ACCCGATT	GGTAGCCA	ACCCGATT	160727_T4	ATCTTGGC	GCATCGAG	ATCTTGGC	GCATCGAG
150819_T12	TGCTTCAT	CAAACATT	TGCTTCAT	CAAACATT	160727_T5	ATTTCCAT	ATGCGGAG	ATTTCCAT	ATGCGGAG
150819_T13	TTGTCGCT	TTGACCCA	TTGTCGCT	TTGACCCA	160727_T6	TTAGCTGC	AACGGTAG	TTAGCTGC	AACGGTAG
150819_T14	AACGATTT	CAGTTTAA	AACGATTT	CAGTTTAA	160727_T7	CGGACTAA	TAATCCAT	CGGACTAA	TAATCCAT
150819_T15	TCCTATAT	TCTATTCC	TCCTATAT	TCTATTCC	160727_T20	CGAACCAG	AAGTGAGA	CGAACCAG	AAGTGAGA
150819_T16	TACTGAAT	CTGTGACC	TACTGAAT	CTGTGACC	160727_T21	TGGTTAAC	AACAGCGG	TGGTTAAC	AACAGCGG
150819_T17	CCTACGCT	AAGGCGCT	CCTACGCT	AAGGCGCT	160728_T1	CAAGGAAT	ACTAATTG	CAAGGAAT	ACTAATTG
150819_T18	CCCGTTCT	CTAGACTA	CCCGTTCT	CTAGACTA	161011_T1	ATTTGTTG	ACATGGAC	ATTTGTTG	ACATGGAC
150820_T1	ACTCGGAA	TTTAGAAC	ACTCGGAA	TTTAGAAC	161011_T2	AGAAAGTG	CCCGTTCT	AGAAAGTG	CCCGTTCT
150820_T2	TATCTGTC	TTCACCTG	TATCTGTC	TTCACCTG	161011_T3	AAAGAAAG	CGACATTT	AAAGAAAG	CGACATTT
150820_T3	CTCCTCCA	AAGTTGTC	CTCCTCCA	AAGTTGTC	161012_T1	CTCACATC	GAGGAGTG	CTCACATC	GAGGAGTG
150820_T4	AGCGTGGT	GAGAAACC	AGCGTGGT	GAGAAACC	161012_T2	TGGCTAGT	AGGGTAAA	TGGCTAGT	AGGGTAAA
150820_T5	CACTAACC	ACATCTCG	CACTAACC	ACATCTCG	161012_T4	GCCAACAT	CCGATACG	GCCAACAT	CCGATACG
160708_T1	ATACTCTC	ATCGCGCT	ATACTCTC	ATCGCGCT	161012_T5	GTAACCAA	ATCAATCG	GTAACCAA	ATCAATCG
160708_T2	AATACATC	GGACTTCT	AATACATC	GGACTTCT	161012_T6	CTAGCACG	GGTCCTAA	CTAGCACG	GGTCCTAA
160708_T3	AGCATGCC	AGCGTGGT	AGCATGCC	AGCGTGGT	161012_T7	CTGTTGTG	AGAAGCTT	CTGTTGTG	AGAAGCTT
160708_T4	TACCCTGC	TGGTTAAC	TACCCTGC	TGGTTAAC	161012_T8	AAGGGACC	CCCTTGCA	AAGGGACC	CCCTTGCA
160708_T5	TTTCAGGT	CATGACGA	TTTCAGGT	CATGACGA	161012_T9	GTCCGTC	ATTTCCAT	GTCCGTC	ATTTCCAT
160708_T6	ATGACAAC	GGAACGAA	ATGACAAC	GGAACGAA	161012_T10	TTATATCG	ATCAGGGA	TTATATCG	ATCAGGGA
160709_T1	GCTCGTAG	AACTGCCT	GCTCGTAG	AACTGCCT	180913_T1	ACGGAGCA	ACAATCTT	ACGGAGCA	ACAATCTT
160709_T2	CGAAGAAG	AAGTCCAA	CGAAGAAG	AAGTCCAA	180913_T2	CTTAGGCC	TCAAATGG	CTTAGGCC	TCAAATGG
160709_T3	TATGTGAA	AGGGACTG	TATGTGAA	AGGGACTG	180913_T3	TCGTGGGT	AACGATTT	TCGTGGGT	AACGATTT
160709_T4	ACTGGTCA	GAAATACG	ACTGGTCA	GAAATACG	180913_T4	GGGATTAC	TCTGATTT	GGGATTAC	TCTGATTT
160709_T5	GAGTGTAC	ATCCTAGT	GAGTGTAC	ATCCTAGT	180913_T5	GATTAAG	AAATAGCA	GATTAAG	AAATAGCA
160709_T6	GTGAGGCA	GGGAGATG	GTGAGGCA	GGGAGATG	180913_T6	AGCACGTA	TATCCACG	AGCACGTA	TATCCACG
160709_T7	CTGGGTAT	CATTTCAT	CTGGGTAT	CATTTCAT	180913_T7	GAATGCGC	TTTGATCA	GAATGCGC	TTTGATCA
160709_T8	AAATAGCA	GGCACTTC	AAATAGCA	GGCACTTC	180913_T8	TGAGCACA	CTCCTCCA	TGAGCACA	CTCCTCCA
160709_T9	GGTTGAGA	TAGGCTTT	GGTTGAGA	TAGGCTTT	180913_T10	GTGTCACC	CGTTGCCT	GTGTCACC	CGTTGCCT
160709_T10	GATACGCA	TCGTTCCC	GATACGCA	TCGTTCCC	180913_T11	GTCTTCTC	CAGACTCG	GTCTTCTC	CAGACTCG
160709_T11	CCGAGATC	GCTCGTAG	CCGAGATC	GCTCGTAG	180914_T10	TCCAGAAG	AGAGAGAC	TCCAGAAG	AGAGAGAC
160709_T12	CCTTTGTC	CGAGGCTA	CCTTTGTC	CGAGGCTA	180914_T11	ATCGCGCT	ACCCTCAA	ATCGCGCT	ACCCTCAA
160709_T14	AAAGCCCG	GATGTGGC	AAAGCCCG	GATGTGGC	180914_T12	TAGCGGAT	CGGCTGTA	TAGCGGAT	CGGCTGTA
160709_T15	AAACACGG	GTCTTCTC	AAACACGG	GTCTTCTC	180914_T14	ATTATTCC	AGTTTGTG	ATTATTCC	AGTTTGTG
160709_T17	TTGTGCGG	TGAATCCT	TTGTGCGG	TGAATCCT	180914_T15	GAGGGTCA	AGGACACA	GAGGGTCA	AGGACACA
160709_T16	ATTGGCCC	AACAGAAC	ATTGGCCC	AACAGAAC	180914_T16	TTAACGTT	CTCTATAG	TTAACGTT	CTCTATAG
160709_T18	TTCACCTG	CAAGGGTT	TTCACCTG	CAAGGGTT	180914_T17	GAGCGGAA	GGCAAGGT	GAGCGGAA	GGCAAGGT
160709_T19	CCATGCAT	GGTCTTTC	CCATGCAT	GGTCTTTC	180914_T18	AGCCATCT	CCTATTTA	AGCCATCT	CCTATTTA
160709_T20	GGTCTTAA	AGGCAATA	GGTCTTAA	AGGCAATA	180914_T19	GCCAAAGC	ATGGGCTC	GCCAAAGC	ATGGGCTC

a) 葉緑体 rbcL_F3R3 の interpolation (内挿) による rarefaction curve



b) 核 ITS2 の interpolation (内挿) による rarefaction curve

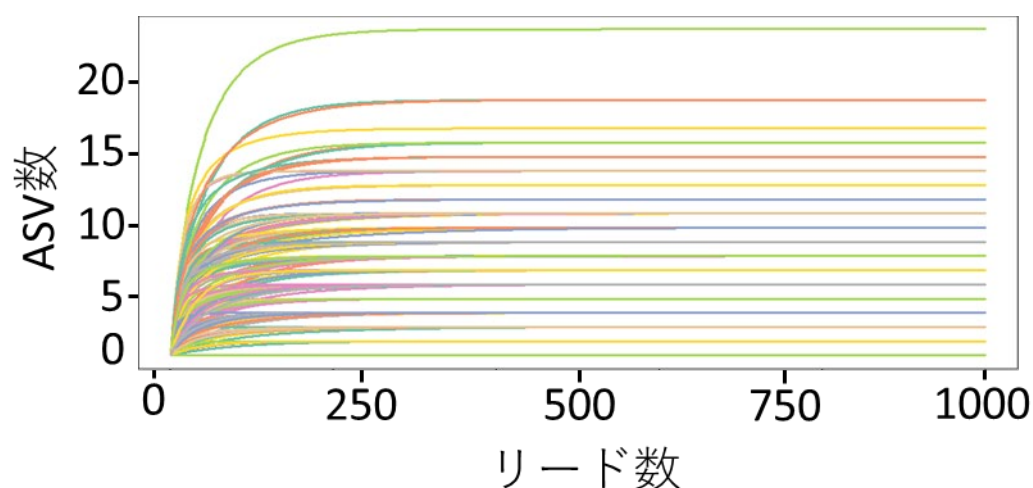


図 4-2. interpolation (内挿) による rarefaction curve を作成した際の各糞中に含まれる ASV 数と解析リード数の関係

図中の曲線は 107 個の糞サンプルから構築された interpolation (内挿) による rarefaction curve を示す。

各糞サンプル中 1.0%未満のリード数を持つ低頻度 ASV は除去した。

3-2-3. 結果及び考察

3-2-3-1. 葉緑体 rbcL 及び核 ITS2 ローカルデータベース

葉緑体 rbcL_F3R3 領域のローカルデータベースは「3-1-3-1. rbcL ローカルデータ」で構築した rbcL ローカルデータにコケモモの葉緑体 rbcL_F3R3 領域の塩基配列（アクセッション番号：KF163412）を付加することで、32科61属74種からなる rbcL ローカルデータを構築した。この74種の内、66種の植物種が種固有の塩基配列であった。核 ITS2 領域は調査地で採取した73種の植物種から PCR 増幅が成功した67種の塩基配列を取得した（表2-2）。マイズルソウ (*Maianthemum dilatatum*), ゴゼンタチバナ (*Cornus canadensis*), ワタスゲ (*Eriophorum vaginatum*), ショウジョウバカマ (*Helonias orientalis*), チシマザサ (*Sasa kurilensis*), スギゴケ (*Polytrichum juniperinum*) は葉緑体 rbcL_F3R3 領域が増幅できたが、核 ITS2 領域は PCR 増幅が成功しなかった。これは使用した ITS2 領域増幅プライマー部位に、DNA 多型が存在したため増幅効率が低下したためと考えられた。そこで、DDBJ に登録されている核 ITS2 領域からマイズルソウ(アクセッション番号:KP214513), ゴゼンタチバナ (アクセッション番号:MG218733), ワタスゲ (アクセッション番号:JX566737), スギゴケ (アクセッション番号:MF180404), また採取できなかったコケモモ (アクセッション番号:GU361898) の塩基配列を取得し、ITS2 ローカルデータに追加した。なお、ショウジョウバカマとチシマザサは DDBJ に未登録であったため、ITS2 ローカルデータに導入することができなかった。以上より、ショウジョウバカマとチシマザサを除く32科59属72種からなる ITS2 データベースを構築した（表2-2）。この72種の内、64種の植物種が種固有の塩基配列であった。

2つのデータベースを併用することで、調査地でローカルベース構築のために採取した74種の内、71種が種レベルで、オオバスのノキ、クロマメノキ、マルバウスゴはスノキ属とする71種1属の分類群が識別可能なデータベースが構築できた。

3-2-3-2. 葉緑体 rbcL_F3R3 及び核 ITS2 領域の NGS 解析結果

糞117サンプルから葉緑体 rbcL_F3R3, 核 ITS2 領域の両領域が PCR 増幅できたのは、107サンプルであった（2015年8月18~20日:31サンプル, 2016年7月8~10日:31サンプル, 2016年7月26~28日:19サンプル, 2016年10月11~12日:8サンプル, 2018年9月13~14日:18サンプル）（表2-1）。PCR 増幅できた107サンプルから MiSeq を用いて葉緑体 rbcL_F3R3 領域を解析した結果、糞1サンプル当たり10,389~231,695（中央値:60,774, 全データの25%~75%:50,718~69,408）リード、累計6,644,771リードの塩基配列を決定した。塩基配列が決定できた葉緑体 rbcL_F3R3 領域の配列群から dada2 を用いて ASV を取得した結果、6,128,766リードを含む853個の ASV が決定できた。一方、核 ITS2 領域を解析した結果、糞1サンプル当たり3,156~72,631（中央値:26,972, 全データの25%~75%:22,864~31,017）リード、累計2,885,974リードの配列を決定した。塩基配列が決定できた核 ITS2 領域の配列群から dada2 を用いて ASV を取得した結果、

2,323,426 リードを含む 2007 個の ASV が決定できた。各糞サンプルから 1.0%未満の低頻度 ASV を除去し、統計ソフト R の「vegan」パッケージの `rrarefy` 関数を用いて各糞サンプルから葉緑体 rbcL_F3R3、核 ITS2 領域共にランダムに 1,000 リードを抽出することで、全糞サンプルの解析リード数を統一した。最終的に残った rbcL_F3R3 領域 115 個、ITS2 領域 331 個の ASV について、葉緑体 rbcL_F3R3 及び核 ITS2 ローカルデータを用いた相同性検索を行った。

葉緑体 rbcL_F3R3 領域において 115 個の ASV の内、相同性 98%以上となった ASV は 78 個 (67.8%)、相同性 98%未満となった ASV は 37 個 (32.2%) であった。相同性 98%以上となった 78 個の ASV から、種レベル 36 種類 (94.7%)、属レベル 1 種類 (2.6%)、科レベル 1 種類 (2.6%)、合計 38 種類の植物分類群が推定された。一方、核 ITS2 領域において 331 個の ASV の内、相同性 98%以上となった ASV は 194 個 (58.6%)、相同性 98%未満となった ASV は 137 個 (41.4%) であった。相同性 98%以上となった 194 個の ASV から、種レベル 31 種類 (91.2%)、属レベル 3 種類 (8.8%) 合計 34 種類の植物分類群が推定された。葉緑体 rbcL_F3R3、核 ITS2 領域共に相同性 98%未満となった ASV について DDBJ で相同性検索した結果、98%よりもさらに低い相同性や高山帯に生息していない植物種が検出された。これは、`dada2` を用いても完全に PCR エラーを除去できていない、もしくは非常に高感度な NGS 解析において実験室内の DNA 汚染由来の配列が検出されている可能性 (Laura et al., 2018) が示唆された。これは 1.0%という比較的厳しい閾値を用いて低頻度 ASV を除去してもコンタミ由来の配列やノイズ配列が検出されたことを示している。このことから、メタバーコーディングを実施するためには、コンタミ防止のため非常に厳密なサンプル管理の重要性が示された。また、核 ITS2 領域からは微生物も検出されていた。これは、本研究で使用した核 ITS2 増幅プライマーが、糞サンプル中の微生物も増幅したためと考えられた。葉緑体 rbcL_F3R3 と核 ITS2 領域の解析結果を併用した結果、種レベルで 44 種類 (95.7%)、属レベルで 2 種類 (4.3%)、合計 46 種類の植物分類群が推定された (表 4-3)。スノキ属を除く植物種が種レベルで推定可能なローカルデータを構築していたが、ツガザクラ属 (*Phyllodoce* sp.) のみ属レベルでの推定に留まった ASV が存在した。これは、核 ITS2 領域でツガザクラ属が検出されていた糞から葉緑体 rbcL_F3R3 でアオノツガザクラ及びツガザクラ (*P. nipponica*) が検出できなかったためである。本研究結果は、過去に報告されているメタバーコーディングを用いた餌資源推定結果と比較して、95.7%と非常に高い種レベルでの推定精度であった (表 4-4)。これは、調査地の詳細なローカルデータを構築し葉緑体 rbcL_F3R3 と核 ITS2 の 2 領域を用いて相同性検索を実施したため考えられた。

次に、葉緑体 rbcL_F3R3 領域と核 ITS2 領域における 1 糞サンプル当たりの検出植物種数を比較した結果、核 ITS2 領域のみ、葉緑体 rbcL_F3R3 領域のみ、葉緑体 rbcL_F3R3 領域と核 ITS2 領域の併用の順に検出植物種数が有意に高くなった (Steel-Dwass test, $p < 0.05$) (図 4-3)。これは本研究で使用した核 ITS2 領域増幅プライマーが、植物だけでなく微生物も

増幅するユニバーサルプライマーであること、偽遺伝子も増幅していること、葉緑体 rbcL_F3R3 領域と比較して ITS2 領域の PCR 増幅長が長いなどの理由より各糞サンプル中に含まれる微量の植物由来の DNA の増幅効率が葉緑体 rbcL_F3R3 解析と比較して相対的に低下し、コンタミ配列除去のための低頻出 ASV 除去において取り除かれたためと考えられた。また、葉緑体 rbcL_F3R3 と核 ITS2 領域の併用結果が最も検出植物種数が高くなったのは、葉緑体 rbcL_F3R3 と核 ITS2 領域におけるプライマー部の DNA 多型の頻度の相違により、特定の植物種では領域毎に増幅効率が大きく異なることが原因と考えられた。これは単一領域解析による餌資源推定では餌資源を過小評価する危険性が高いことを示しており、複数領域解析の必要性が示された。以降は、最も検出植物種数が高くなった葉緑体 rbcL_F3R3 と核 ITS2 領域の併用結果のみを解析対象とする。

3-2-3-3. メタバーコーディングと既存の報告との比較

調査地で構築した葉緑体 rbcL_F3R3 と核 ITS2 領域のローカルデータベースを用いて両領域を解析対象としたメタバーコーディングを実施することで、糞 107 サンプルから種レベル 44 種類 (95.7%)、属レベル 2 種類 (4.3%)、累計 46 種類の植物分類群が推定された (表 4-3)。過去のニホンライチョウの餌資源調査報告では、1926 年から 1928 年の 7~10 月の期間に胃内容物から 17 種 (千葉, 1965)、1967 年 10 月の雄の胃内容物から 5 種の植物種が確認されている (里美と湯浅, 1968) (表 4-5)。本研究では、胃内容物観察と比較して非侵襲的により多くの植物種を明らかにできた。また、岐阜県乗鞍岳において、2009 年 7~10 月に累計 43 日間に渡ってついで観察調査を実施することで、34 種類の植物分類群の採食が確認されている (小林と中村, 2011)。本研究ではのべ 13 日間の糞サンプル採取で、累計 43 日間のついで観察調査より短い期間で多くの餌資源を明らかにできた (表 4-5)。また、本研究において種レベルで推定された 44 種の植物種内、27 種が 7~10 月の餌資源として過去に報告されていない植物種であった (千葉, 1965; 湯浅と里美, 1968; 小林と中村, 2011) (表 4-3)。また、草丈の高い植物の中に生育している小型の高山植物であるクモマニガナ (*Ixeridium dentatum* subsp. *kimuranum*)、ホンドミヤマネズ (*Juniperus communis* var. *hondoensis*)、アカモノ (*G. adenothrix*)、シラタマノキ、スギゴケ、ミツバノバイカオウレン (*Coptis trifoliolata*) などの植物種は本研究において複数のサンプリング時期から検出されているが (表 4-3)、過去の報告にはない (千葉, 1965; 湯浅と里美, 1968; 小林と中村, 2011)。これらの結果より、胃腸内容物調査やついで観察では利用頻度の低い植物種や小さい植物種などを見落としている可能性が示唆された。本調査地に生育が確認された植物種の中で過去に報告が有るが本研究で検出できなかった植物種は、ウラシマツツジ (*Arctous alpina*)、マルバウスゴ、オオバスノキ、クロマメノキ、ヨツバシオガマ (*Pedicularis chamissonis* var. *japonica*)、ミヤマキンポウゲ (*Ranunculus acris* subsp. *nipponicus*) であった (表 4-3)。この内、マルバウスゴ、オオバスノキ、クロマメノキが検出できなかったのは、本研究で使用した葉緑体 rbcL_F3R3 領域と核 ITS2 領域では種まで

推定することができなかつたためスノキ属として推定されているためである。ウラシマツツジ（ツツジ科）、ヨツバシオガマ（ハマボウフウ科）、ミヤマキンポウゲ（キンポウゲ科）については、本調査でそれぞれ同じ科の植物種が検出されており（表 4-3）、プライマー部の塩基配列の変異のため増幅効率が低下しているとは考えにくい。そのため、これらの植物種は本調査地で利用されていない可能性が示唆された。以上より、糞中植物残渣を活用したメタバーコーディングは胃内容物観察やついでみ観察と比較して、ニホンライチョウに対してのストレスや高山植生の踏み付けなどによるダメージをより軽減しながら、より詳細な餌資源を明らかにできる手法であることが明らかとなった。

3-2-3-4. 本調査地における保全対策について

本調査地で過半数の糞サンプルから検出されたクロウスゴ（69.2%、糞 107 個からの検出頻度、以降同様）、ガンコウラン（67.3%）はいずれもツツジ科の植物であり、本調査地において主要な餌資源と考えられた。過去の研究においてもガンコウランは主要な餌資源として報告されているが（千葉，1965；小林と中村，2011）、本調査地で最も多くの糞サンプルから検出されたクロウスゴについては、いずれの報告でも採食頻度は低いと報告されている。また、本研究で検出頻度が高かった ミネズオウ（42.1%）、シラネニンジン（33.6%）、チングルマ（29.0%）（*Sieversia pentapetala*）なども過去の研究（千葉，1965；小林と中村，2011）では利用頻度が低い植物種であった（表 4-3）。一方、ついでみ観察調査（小林と中村，2011）では 6 番目に優先して採食されていたハイマツが、本研究では、糞サンプル 107 個中 1 サンプル（0.9%）のみの検出に留まった。ニホンライチョウはマイクロサテライト解析により遺伝的に北アルプス、南アルプス、火打山・焼岳の 3 つの集団に分けることができ（中村，2013b）、火打山・焼岳の集団においては、一夫二妻による繁殖の確認や、ハイマツの根元以外の環境で営巣し抱卵するなど、他の集団とは異なる個生態が報告されている（中村，2013c）。このように、ニホンライチョウは生息地が山岳毎に隔離分布しているため、山岳環境の違いに適応した生態を有している可能性が考えられる。このため、餌資源においても、生息地による違いが存在している可能性が示された。より多くの生息地において餌資源調査を実施し、山岳環境と餌資源の関係性について調査し、生息地環境に適合した植生環境整備が必要と考えられた。

本調査地における糞サンプリング時期別の植物種構成の違いについて調べるために PCoA 解析を実施した結果、各時期の 95% 確率楕円はサンプリング時期毎に重なっており（図 4-3）、サンプリング時期毎の植物種構成に大きな違いがなかった。しかし、PERMANOVA の結果では異なるサンプリング時期間で有意に植物種構成に違いが認められた（ $p < 0.05$ ）。この違いは、調査地の高山植生のフェノロジーの相違もしくは、時期毎に解析している糞サンプル数の違いにより検出植物数が異なること（表 4-3）が影響していると考えられた。このことから、本調査地における餌資源はサンプリング時期によって大きな違いはなく、ニホンライチョウ保全のためには植物種の多様性以上に、主要な餌資源の保全

の重要性が示唆された。時期別の餌資源の特徴については、すべての季節を通してクロウスゴ (*V. ovalifolium* var. *ovalifolium*)、ガンコウラン、スノキ属、ミネズオウ、シラネニンジン (*Tilingia ajanensis*)、チングルマの6種類の植物分類群が検出した植物種の過半数を占めており、これらの植物種が本調査地における主要な餌資源と考えられた (図 4-5)。これらの植物種は本調査地においては風衝地に優占して生育している植物分類群であることから、ニホンライチョウの採食地として風衝地環境の重要性が示唆された。また、池塘周囲に生育している湿性植物などの利用頻度は低いことも明らかになった。以上より、本調査におけるニホンライチョウを保全するためには、風衝地に優占して生育しているクロウスゴ、ガンコウラン、スノキ属、ミネズオウ、シラネニンジン、チングルマの生育環境を整備し、保全していく必要があることが明らかとなった。

また、時期別の餌資源の違いについて調査した結果、ナナカマド (*Sorbus commixta*)、チシマザサ、エゾホソイ (*J. filiformis*) は2015年8月18~20日、イワショウブ (*Triantha japonica*) は2016年7月26~28日に採食頻度が高い傾向が認められた (図 4-5)。また、本調査地で餌資源として保全対象種と考えられたクロウスゴ、ガンコウラン、スノキ属、ミネズオウ、シラネニンジン、チングルマの6種類の植物分類群においても、各時期で採食頻度には違いが認められた (図 4-5)。ニホンライチョウは周囲の高山植物のフェノロジー変化に合わせて利用する植物種が変化することが報告されていることから (小林と中村, 2011)、メタバーコーディング解析においても季節による高山植生のフェノロジー変化による餌資源の違いが検出されていると考えられた。本研究では糞サンプリング調査を2015~2018年まで年度を跨いで実施しているため、単純な季節変動を捉えることが困難であるが、年を跨がず定期的に糞サンプリング調査を実施することで、高山植生のフェノロジー変化に伴う利用植物種の変化や、目視観察を併用することによってメタバーコーディング法では困難な利用部位の推定なども実施可能と考えられた。

3-2-3-5. 餌資源推定に必要な糞サンプル数推定

shannon diversity による rarefaction and extrapolation curve を構築した結果、本調査地における主要な餌資源は十分に網羅されていた (図 4-6) が、サンプリング時期によっては、検出されていない植物種が存在している可能性が示唆された。しかし、各サンプリング時期別における解析糞サンプル数と推定された餌資源網羅率 (%) の関係性について調査した結果、本調査地では糞 20 サンプルで主要な餌資源については約 90% 解析可能と推測された (表 4-6)。また、ASV 数と解析リード数との関係性を示す interpolation (内挿) による rarefaction curve を作成することで、糞 1 サンプル当たり葉緑体 *rbcL_F3R3* と核 *ITS2* 領域共に、低頻度な ASV を除外した場合には 1,000 リード解析することで各糞サンプルに含まれる ASV を十分に解析できることが確認されている (図 3-2)。MiSeq Reagent Kit v3 では約 2,500 万リードを出力可能なので、最大 384 サンプル同時解析可能なインデックス配列キット (Nextera XT Index Kid) を用いて、葉緑体 *rbcL_F3R3* と核 *ITS2* 領域を同時解析し

ても 1 サンプル当たりそれぞれ約 3 万リードの生データが期待できる。生データからタグの品質処理, ノイズ・キメラ配列処理, BLAST による低相同性結果の除去を考慮しても十分に本研究と同等の解析結果が得られると考えられた。以上の結果より, 解析糞サンプル数と推定網羅率 (%), 解析必要リード数の指標ができたことから, 本調査地において, 既存の調査法よりも効率的に餌資源調査が可能となると考えられた。今後, 他のニホンライチョウの生息地においても同様の餌資源調査を実施し, 調査地の面積や植生の多様性と推定された調査に必要な糞サンプル数の関係性について明らかにしていくことで, さまざまなニホンライチョウ生息地に適用可能な解析に必要な糞サンプル数の指標を掲示することが可能となる。

表 4-3. メタバーコーディングで推定されたニホンライチョウの季節別植物性餌資源

科名	学名	和名	検出データベース ¹⁾	過去の報告の有無 ²⁾	検出サンプル数					累計 (n=107)	107個 当たりの 検出頻度
					7月	7月	8月	9月	10月		
					2016年 7月8-10日 (n=31)	2016年 7月26-28日 (n=19)	2015年 8月18-20日 (n=31)	2018年 9月13-14日 (n=18)	10月11-12日 (n=8)		
Apiaceae (セリ科)	<i>Peucedanum multivittatum</i> ³⁾	ハクサンボウフウ	rbcL_F3R3 and ITS2	有	10	-	-	-	-	10	9.3%
	<i>Tilingia ajanensis</i>	シラネニンジン	rbcL_F3R3 and ITS2	有	16	4	11	5	-	36	33.6%
Aquifoliaceae (モチノキ科)	<i>Ilex sugerokii</i> var. <i>brevipedunculata</i>	アカミノイヌツゲ									
Asparagaceae (キジカクシ科)	<i>Melanthemum dilatatum</i>	マイヅルソウ	ITS2	有	4	-	1	-	1	6	5.6%
Asteraceae (キク科)	<i>Anaphalis margaritacea</i> var. <i>margaritacea</i>	ヤマハハコ									
	<i>Arnica unalascensis</i> var. <i>tschonoskyl</i>	ウサギギク	ITS2	有	1	-	-	-	-	1	0.9%
	<i>Artemisia sinanensis</i>	タカネヨモギ									
	<i>Cirsium otayae</i>	タテヤマアザミ									
	<i>Hieracium japonicum</i>	ミヤマコウゾリナ									
	<i>Isolidum dentatum</i> subsp. <i>kimuranum</i>	クモニガナ	rbcL_F3R3 and ITS2	無	4	1	1	1	1	8	7.5%
	<i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>asiatica</i>	アキノキリンソウ	ITS2	無	-	-	1	-	2	3	2.8%
Betulaceae (カバノキ科)	<i>Betula ermanii</i>	ダケカンバ	rbcL_F3R3 and ITS2	有	4	-	2	4	2	12	11.2%
Brassicaceae (アブラナ科)	<i>Cardamine nipponica</i>	ミヤマタネツケバナ									
Celastraceae (ニシキギ科)	<i>Parnassia palustris</i>	ウメバチソウ									
Cornaceae (ミズキ科)	<i>Cornus canadensis</i>	ゴゼンタチバナ	rbcL_F3R3 and ITS2	無	1	-	6	-	2	9	8.4%
Cupressaceae (ヒノキ科)	<i>Juniperus communis</i> var. <i>hondoensis</i>	ホンドミヤマネズ	rbcL_F3R3 and ITS2	無	1	2	-	-	-	3	2.8%
Cyperaceae (カヤツリグサ科)	<i>Carex blapharicarpa</i>	ショウジョウソグ	ITS2	無	3	6	1	-	1	11	10.3%
	<i>C. brunescens</i>	ヒメカワズグ									
	<i>C. pyrenalca</i> var. <i>altior</i>	キンスゲ	ITS2	無	-	1	1	-	-	2	1.9%
	<i>C. nubigena</i>	ミノボロスゲ									
	<i>Eriophorum vaginatum</i>	ワタスゲ	ITS2	無	5	-	5	-	-	10	9.3%
Diapensiaceae (イワウメ科)	<i>Schizocodon soldanelloides</i> f. <i>alpinus</i>	コイワカガミ	rbcL_F3R3	有	1	-	1	-	-	2	1.9%
Droseraceae (モウセンゴケ科)	<i>Drosera rotundifolia</i>	モウセンゴケ									
Ericaceae (ツツジ科)	<i>Andromeda polifolia</i>	ヒメシャクナゲ	rbcL_F3R3 and ITS2	無	-	3	-	-	-	3	2.8%
	<i>Arctous alpina</i>	ウラシマツツジ									
	<i>Elliottia bracteata</i>	ミヤマホツツジ	rbcL_F3R3 and ITS2	有	1	-	1	-	-	2	1.9%
	<i>Empetrum nigrum</i> var. <i>japonicum</i>	ガンクウラン	rbcL_F3R3 and ITS2	有	15	8	28	14	7	72	67.3%
	<i>Eubotryoides grayana</i> var. <i>parvifolia</i>	ハナヒリノキ									
	<i>Gaultheria adenostrix</i>	アカモノ	rbcL_F3R3	無	-	-	-	3	1	4	3.7%
	<i>G. pyrolloides</i>	シラタマノキ	rbcL_F3R3	無	-	-	3	-	1	4	3.7%
	<i>Kalmia procumbens</i>	ミネオウ	rbcL_F3R3 and ITS2	有	5	16	11	7	6	45	42.1%
	<i>Phylloce sp.</i>	ツガザクラ	ITS2	有	1	-	1	1	-	3	2.8%
	<i>P. aleutica</i>	アオノツガザクラ	rbcL_F3R3	有	4	-	4	2	4	14	13.1%
	<i>P. nipponica</i>	ツガザクラ	rbcL_F3R3	有	1	2	1	-	-	4	3.7%
	<i>Rhododendron brachycarpum</i>	ハクサンシャクナゲ									
	<i>R. tschonoskii</i> subsp. <i>trinerve</i>	オオコメツツジ									
	<i>Vaccinium sp.</i>	スノキ属	rbcL_F3R3 and ITS2	有	18	10	14	12	5	59	55.1%
	<i>V. ovalifolium</i> var. <i>ovalifolium</i>	クロウスゴ	rbcL_F3R3	有	28	11	19	8	8	74	69.2%
	<i>V. shikokianum</i>	マルバウスゴ									
	<i>V. smallii</i> var. <i>smallii</i>	オオバスノキ									
	<i>V. uliginosum</i> var. <i>japonicum</i>	クロマメノキ									
	<i>V. vitis-idaea</i>	コケモモ	rbcL_F3R3 and ITS2	有	6	2	7	3	3	21	19.6%
Gentianaceae (リンドウ科)	<i>Gentiana makinoi</i>	オヤマリンドウ									
	<i>G. nipponica</i>	ミヤマリンドウ	rbcL_F3R3	無	-	-	1	-	-	1	0.9%
	<i>G. thunbergii</i> var. <i>m/nor</i>	タテヤマリンドウ	rbcL_F3R3 and ITS2	無	-	-	1	-	-	1	0.9%
Hypericaceae (オトギリソウ科)	<i>Hypericum senanense</i> subsp. <i>mutiloides</i>	イワオトギリ									
Juncaceae (イグサ科)	<i>Juncus filiformis</i>	エゾホソイ	rbcL_F3R3 and ITS2	無	-	1	7	-	-	8	7.5%
Lentibulariaceae (タヌキモ科)	<i>Pinguicula vulgaris</i> var. <i>macroceras</i>	ムシトリスミレ									
Melanthiaceae (シュロソウ科)	<i>Helonias orientalis</i>	ショウジョウバカマ									
	<i>Veratrum stamineum</i> var. <i>stamineum</i>	コバイケイソウ	ITS2	無	-	-	-	-	1	1	0.9%
Menyanthaceae (ミツガシク科)	<i>Nephrrophyllum crista-galli</i> subsp. <i>japonicum</i>	イワイチョウ	rbcL_F3R3 and ITS2	無	3	7	1	1	-	12	11.2%
Nartheciaceae (キンコウカ科)	<i>Aletia foliata</i>	ネバリノギラン	rbcL_F3R3	無	1	-	-	-	-	1	0.9%
	<i>Narthecium asiaticum</i>	キンコウカ	rbcL_F3R3	無	-	-	1	-	-	1	0.9%
Orchidaceae (ラン科)	<i>Dactylophiza aristata</i>	ハクサンチドリ	rbcL_F3R3	無	-	1	3	-	-	4	3.7%
	<i>Platanthera tipuloides</i> subsp. <i>nipponica</i>	コバノトシソウ	ITS2	無	-	-	1	-	-	1	0.9%
Orobanchaceae (ハマウツボ科)	<i>Pedicularis chamissonis</i> var. <i>japonica</i>	ヨツバシオガマ									
	<i>Pedicularis yezoensis</i>	エゾシオガマ	rbcL_F3R3 and ITS2	無	2	1	-	-	-	3	2.8%
Pinaceae (マツ科)	<i>Abies mariesii</i>	オオシラビソ									
	<i>Pinus pumila</i>	ハイマツ	rbcL_F3R3 and ITS2	有	1	-	-	-	-	1	0.9%
Plantaginaceae (オオバコ科)	<i>Veronica nipponica</i>	ヒメクワガタ									
	<i>Calamagrostis longiseta</i>	ヒゲノガリヤス	rbcL_F3R3	無	-	-	6	-	1	7	6.5%
	<i>Mollinopsis japonica</i>	ヌマガヤ									
	<i>Sasa kurliensis</i>	チシマザサ	rbcL_F3R3	無	1	1	13	-	-	15	14.0%
Polygonaceae (タデ科)	<i>Persicaria weyrichii</i> var. <i>weyrichii</i>	ウラジロタデ	rbcL_F3R3 and ITS2	無	1	-	-	-	-	1	0.9%
	<i>Rumex alpestris</i> subsp. <i>japonicus</i>	タカネスイバ									
Polytrichaceae (スギゴケ科)	<i>Polytrichum juniperinum</i>	スギゴケ	ITS2	有	5	3	4	-	-	12	11.2%
Ranunculaceae (キンポウゲ科)	<i>Anemone narcissiflora</i> subsp. <i>Nipponica</i>	ハクサンイチゲ	ITS2	有	1	-	-	-	-	1	0.9%
	<i>Coptis trifoliolata</i>	ミツバノバイカオウレン	rbcL_F3R3 and ITS2	無	-	1	2	-	-	3	2.8%
	<i>Ranunculus acris</i> subsp. <i>nipponicus</i>	ミヤマキンポウゲ									
Rosaceae (バラ科)	<i>Aruno diolcus</i> var. <i>kamtschaticus</i>	ヤマブキショウマ									
	<i>Potentilla matsumurae</i>	ミヤマキンバイ	rbcL_F3R3 and ITS2	有	2	1	1	2	-	6	5.6%
	<i>Sloanea pentapetala</i>	チングルマ	rbcL_F3R3 and ITS2	有	17	1	9	2	2	31	29.0%
	<i>Sorbus commixta</i>	オナカマド	rbcL_F3R3 and ITS2	有	-	-	13	2	1	16	15.0%
Sapindaceae (ムクロジ科)	<i>Acer tschonoskii</i>	ミネカエデ									
Tofieldiaceae (チシマゼキショウ科)	<i>Trientalis japonica</i>	イワショウブ	rbcL_F3R3 and ITS2	無	-	5	1	-	-	6	5.6%
Xanthorrhoeaceae (ススキノキ科)	<i>Hemerocallis dumortieri</i> var. <i>esculenta</i>	ゼンテイカ									
検出した植物の総数					163	88	183	67	49	550	
検出植物種数					30	22	35	15	18	46	

- 1) 葉緑体 rbcL_F3R3 は rbcL ローカルデータでのみ検出, 核 ITS2 は ITS2 ローカルデータでのみ検出, rbcL_F3R3 and ITS2 は両ローカルデータで検出.
- 2) 既報 (小林と中村, 2011 ; 里美と湯浅, 1968 ; 千葉, 1965) での採食の有無.
- 3) 太文字は本研究より推定された餌資源植物を示す.

表 4-4. 本研究及びその他の生物種におけるメタバーコーディングによる餌資源推定精度比較

対象生物	解析領域	ローカルデータベースの有無	種推定精度
ニホンライチョウ (本研究)	葉緑体rbcL_F3R3+核ITS2	有	95.7%
アカガシラカラスバト (Ando et al., 2013)	葉緑体trnL intron (P6loop)	有	79.2%
アカネズミ・ヒメネズミ (Sato et al., 2018)	葉緑体trnL intron (P6loop)	無	43.0%
ノルウェーレミング (Soininen et al., 2013)	葉緑体trnL intron (P6loop)	有	38.0%
ヨアケオオコモリ (Lim et al., 2018)	葉緑体rbcL+核ITS2 ¹⁾	無	67.3%

1) 本研究とは異なるプライマー配列を使用.

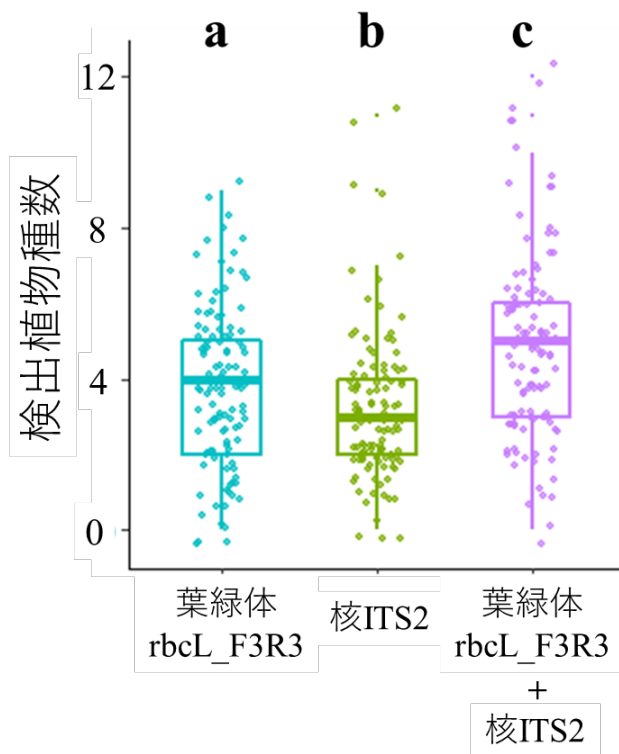


図 4-3. ボックスプロットによる本研究において糞 1 サンプルから検出された植物種数比較
 図中点は 107 個の糞サンプルを示す.

図中アルファベットは Steel-Dwass test の結果を示し, 異なるアルファベット間で有意差 ($p < 0.05$) があることを示す.

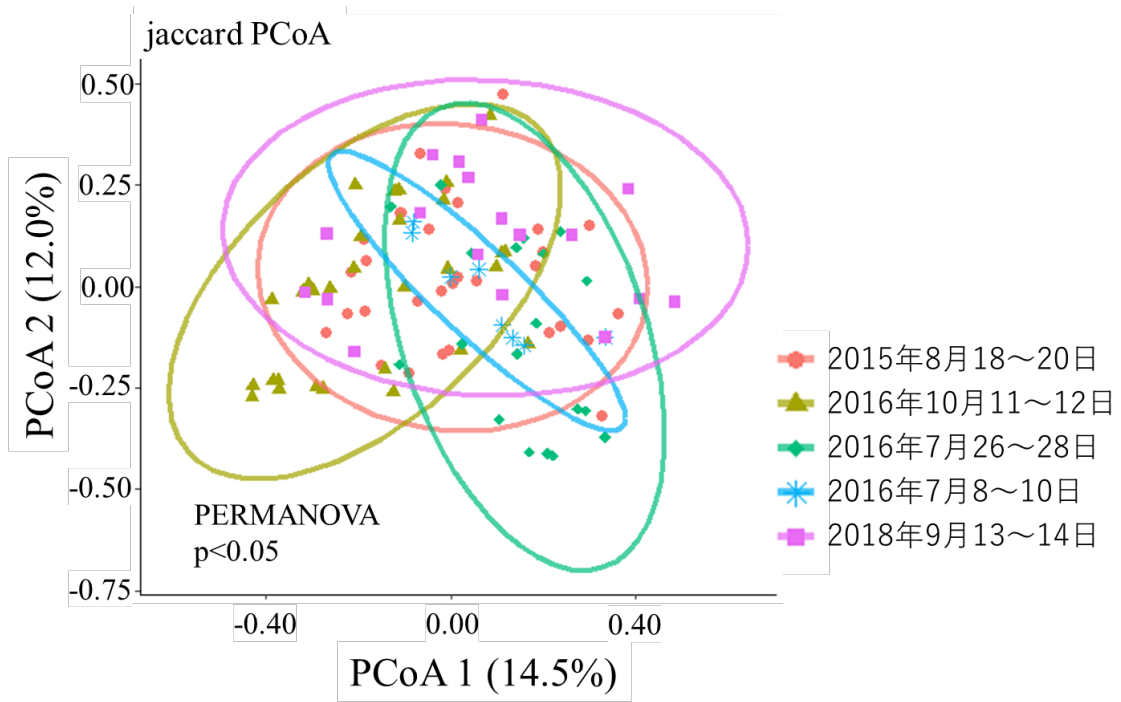


図 4-4. NGS を用いた jaccard 指数による糞サンプリング時期別の PCoA 解析
 図中の円は 95% 確率楕円を示す.

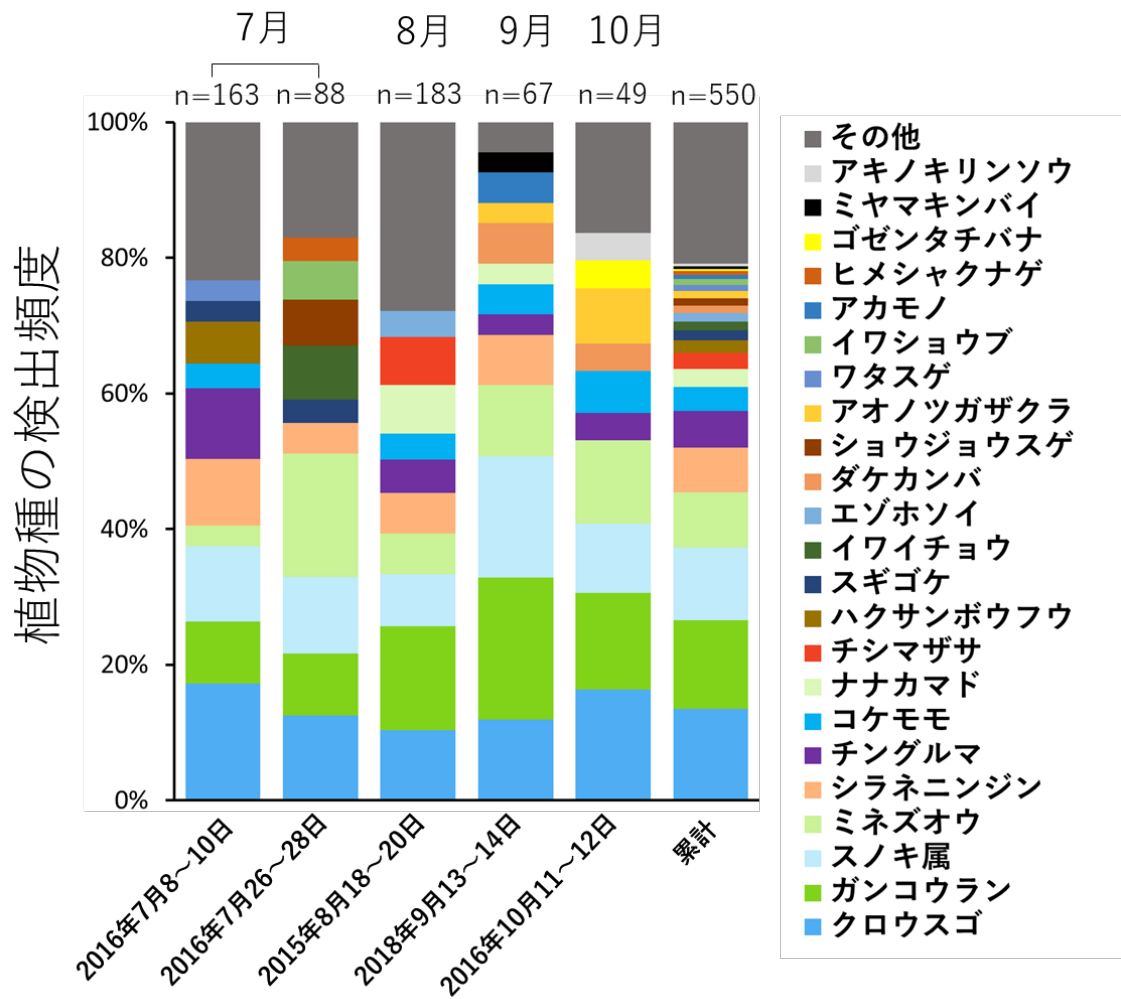


図 4-5. 糞サンプル中より検出された季節別の植物種の 100%積み立て棒グラフ
 糞サンプリング時期毎に植物種の検出頻度の高い順に上位 10 位までは種名を記載し，上位 10 位未満はその他とした．図中の n は各糞サンプリング時期毎に検出した植物の総数を示す（表 4-3）．

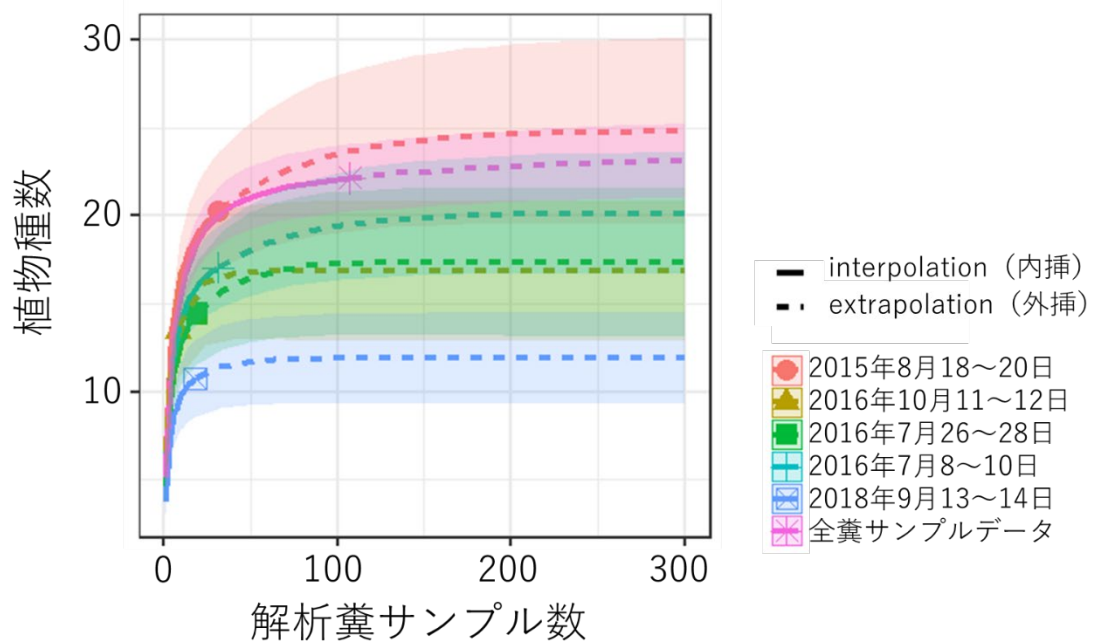


図 4-6. 全糞サンプルデータを用いたサンプリング時期別 shannon diversity による rarefaction and extrapolation curve

実線は実測値による曲線 (interpolation : 内挿), 点線は予測曲線 (extrapolation : 外挿) を示す.

陰影部は 10,000 回ブートストラップにおける 95%信頼区間を示す.

表 4-5. 本研究と既存の報告とのニホンライチョウの植物性餌資源植物種数比較

調査季節	メタバーコーディング 本研究			つばみ観察 (小林と中村, 2011)		胃内容物観察 (里見と湯浅, 1968)			胃内容物観察 (千羽, 1965)		
	サンプリング日	日数 ¹⁾	検出数 ²⁾	日数 ¹⁾	検出数 ²⁾	日数 ¹⁾	個体数 ³⁾	検出数	日数 ¹⁾	個体数 ³⁾	検出数
7月	2016年7月8~10日	3	30	13	26	-	-	-	不明	9	9
	2016年7月26~28日	3	22								
8月	2015年8月18~20日	3	35	13	29	-	-	-	不明	19	10
9月	2018年9月13~14日	2	15	11	23	-	-	-	不明	4	7
10月	2016年10月11~12日	2	18	6	14	不明	1	5	不明	7	10
累計		13	46	43	35	不明	1	5	不明	39	17

- 1) 調査に要した日数.
- 2) 調査で確認されたニホンライチョウの餌資源となった植物分類群数.
- 3) 胃腸内容物調査に用いたニホンライチョウの個体数.

表 4-6. サンプルング時期別の推定された真の shannon diveristy と解析糞サンプル数との関係

調査季節	サンプリング日	糞サンプル数	検出植物種数	実測値による shannon diveristy	推定された真の shannon diveristy	推定された真のshannon diveristyに対する網羅率と 予想された解析に必要な糞サンプル数				
						80%	85%	90%	95%	99%
7月	2016年7月8～10日	31	30	17.1	20.2	7	10	17	65	211
7月	2016年7月26～28日	19	22	14.4	17.4	7	10	17	38	82
8月	2015年8月18～20日	31	35	20.3	24.9	7	10	20	97	291
9月	2018年9月13～14日	18	15	10.7	11.9	6	8	11	16	27
10月	2016年10月11～12日	8	18	13.4	16.9	5	6	11	16	28

4. 結論

調査地に生育する植物の葉緑体 rbcL_F3R3 領域と核 ITS2 領域のローカルデータベースを構築し、これら 2 領域を併用してメタバーコーディングを実施することで、ニホンライチョウの高精度な植物種推定が可能となった。調査地である太郎山では風衝地に優占していたクロウソゴ、ガンコウラン、スノキ属、ミネズオウ、シラネニンジン、チングルマが7～10月を通じて利用頻度が高くなっており、餌資源として保全対象となる植物分類群と考えられた。また、ASV数と解析リード数との関係性を示す rarefaction 解析より、糞1サンプル当たり葉緑体 rbcL_F3R3 領域と核 ITS2 領域共に 1,000 リード解析することで各糞サンプルに含まれる低頻度を除去した ASV を十分に解析していることが確認できた。さらに、糞 20 サンプルで調査地の主要な餌資源については 90%解析することが可能であった。このように、統計手法の一つである rarefaction 解析を用いることで、効率的な調査に向けた指標データを提示することができた。本研究において確立したメタバーコーディングによる餌資源推定法は、ニホンライチョウ保全のための基礎的データである餌資源推定手法として有用であると結論した。

5. 謝辞

中部大学大学院応用生物学研究科教授南基泰農学博士には指導教員として本研究遂行の機会を与えて頂き、遂行にあたり終始ご指導ご助言をいただきました。また、同研究科教授村上哲生理学博士及び同研究科准教授上野薫学術博士には副指導教授として本研究の批評ならびご助言を頂きました。ここに深く深謝の意を表します。また、太郎山における円滑な調査実施に当たり、さまざまなご協力を頂いた太郎平小屋スタッフ一同に深謝いたします。いであ株式会社の白子智康氏にはNGS解析のご協力・ご支援、中部大学応用生物学環境生物科学科南研究室実験補助員森高子氏、同大学南研究室卒業生の皆様には様々なご協力を頂きました。

本研究は、JSPS 科学研究費補助金 (C) (助成金番号:16K00639)、中部大学助成金 (P) (助成金番号:30M03P) および日本生態学会中部地区会平成 31 年度研究助成のサポートを受けて実施されました。また、ニホンライチョウの糞回収及び植物採取は自然公園法に準じて実施した。

6. 引用文献

- Ando H., Suzuki 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, *Ecology and Evolution* 3 (12): 4057-4069, DOI: 10.1002/ece3.773.
- Anna B., Agnieszka Ł. and Krzysztof S. (2019) The use of rarefaction and extrapolation as methods of estimating the effects of river eutrophication on macrophyte diversity, *Biodiversity and Conservation* 28 (2): 385-400, DOI: 10.1007/s10531-018-1662-3.
- Bowen W.D., Tully D., Boness D.J., Bulheier B.M. and Marshall G.J. (2002) Prey-dependent foraging tactics and prey profitability in a marine mammal, *Marine Ecology Progress Series* 244: 235-245, DOI: 10.3354/meps244235.
- Budka A., Łacka A. and Szoszkiewicz K. (2019) The use of rarefaction and extrapolation as methods of estimating the effects of river eutrophication on macrophyte diversity, *Biodiversity and Conservation* 28 (2): 385-400, DOI: 10.1007/s10531-018-1662-3.
- Burger J.C., Patten M.A., Rotenberry J.T. and Redak R.A. (1999) Foraging ecology of the California gnatcatcher deduced from fecal samples, *Oecologia* 120 (2): 304-310, DOI: 10.1007/s004420050862.
- Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A. and Holmes S.P. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data, *Nature Methods* 13: 581-583, DOI: 10.1038/nmeth.3869.
- Callahan B.J., McMurdie P.J. and Holmes S.P. (2017) Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis, *the ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 11: 2639-2643, DOI: 10.1038/ismej.2017.119.
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (31): 12794-12797, DOI: 10.1073/pnas.0905845106.
- Chao A. (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population, *Scandinavian Journal of Statistics* 11: 165-270, DOI: 10.1111/sjos.12343.
- Chao A. (1987) Estimating the population size for capture recapture data with unequal catchability, *Biometrics* 43: 783-791, DOI: 10.2307/2531532.
- Chao A., Colwell R.K., Lin C.W. and Gotelli N.J. (2009) Sufficient sampling for asymptotic minimum species richness estimators, *Ecology* 90 (4): 1125–1133, DOI: 10.1890/07-2147.1.
- Chao A., Gotelli N.J., Hsieh T.C., Sander E.L., Ma K.H., Colwell R.K. and Ellison A.M. (2014)

- Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: A unified framework for sampling and estimation in biodiversity studies, *Ecological Monographs* 84 (1): 45–67, DOI: 10.1890/13-0133.1.
- Cheng T., Xu C., Lei L., Li C., Zhang Y. and Zhou S. (2016) Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity, *Molecular Ecology Resources* 16 (1): 138-149, DOI: 10.1111/1755-0998.12438.
- Conesa A., Götz S., García-Gómez J.M., Terol J., Talón M. and Robles M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research, *Bioinformatics* 21 (18): 3674-3677, DOI: 10.1093/bioinformatics/bti610.
- DADA2 Tutorial (2019) "dada2", <https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>.
- Deagle B.E., Kirkwood R., Jarman S.N. (2009) Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces, *Molecular Ecology* 18 (9): 2022-2038, DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04158.x.
- Dijk E.L.V, Jaszczyszyn Y. and Thermes C. (2014) Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias, *Experimental Cell Research* 322 (1): 12-20, DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.01.008.
- Eisenhofer R., Minich J.J., Marotz C., Cooper A., Knight R. and Weyrich L.S. (2018) Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies: Issues and Recommendations, *Trends in Microbiology* 27 (2): 105-117, DOI: 10.1016/j.tim.2018.11.003.
- Fahner N.A., Shokralla S., Baird D.J. and Hajibabaei M. (2016) Large-Scale Monitoring of Plants through Environmental DNA Metabarcoding of Soil: Recovery, Resolution, and Annotation of Four DNA Markers, *PLoS ONE* 11 (6): e0157505, DOI: 10.1371/journal.pone.0157505.
- García-González R., Aldezabal A., Laskurain N.A., Margalida A. and Novoa C. (2016) Factors affecting diet variation in the Pyrenean rock ptarmigan (*Lagopus muta pyrenaica*): Conservation Implications. *PLoS ONE* 11 (2): e0148614, DOI: 10.1371/journal.pone.0148614.
- Grant S., Eric C. and Rachel B. (2018) NSM3: functions and datasets to accompany hollander, wolfe, and chicken - Nonparametric Statistical
- Hall T. (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- 花井正光, 徳本 洋 (1978) 白山におけるニホンライチョウ, *Lagopus mutus japonicus* の絶滅について, 石川県白山自然保護センター研究報告 3: 95-105.
- 羽田健三 (1979) 中央アルプスに於けるニホンライチョウの生息実態と移植について, 中央アルプス太田切川流域の自然と文化総合学術報告書 341-366.

- 羽田健三, 中村浩志, 小岩井彰, 飯沢 隆, 田嶋一善 (1985) 南アルプス白根三山におけるニホンライチョウ *Lagopus mutus* のなわばり分布と生息個体数, 鳥 34: 33-48, DOI: 10.3838/jjo1915.34.33.
- 長谷川雅美, 梨本 真, 松木吏弓, 伊藤元己 (2008) エンドユーザーからみた DNA バーコードプロジェクトの将来展望, 日本生態学会誌 58 (2): 103, DOI: 10.18960/seitai.58.2_103.
- Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H. and Hallwachs W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101 (41): 14812-14817, DOI: 10.1073/pnas.0406166101.
- 東佳那子, 中山二郎 (2015) 進化する次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の解析, 腸内細菌学雑誌 29 (3): 135-144, DOI: 10.11209/jim.29.135.
- Hotta M., Tsuyama I., Nakao K., Ozeki M., Higa M., Kominami Y., Hamada T., Matsui T., Yasuda M. and Tanaka N. (2019) Modeling future wildlife habitat suitability: serious climate change impacts on the potential distribution of the Rock Ptarmigan *Lagopus muta japonica* in Japan's northern Alps, BMC Ecology 19: 23, DOI: 10.1186/s12898-019-0238-8.
- Hsieh, T.C., Ma K.H. and Chao A. (2016) iNEXT: An R package for interpolation and extrapolation of species diversity (Hill numbers), <http://chao.stat.nthu.edu.tw/blog/software-download>.
- illumina (2013) "bcl2fastq Conversion Software v1.8.4", illumina ホームページ, http://support.illumina.com/downloads/bcl2fastq_conversion_software_184.html.
- 環境省 (2012) ニホンライチョウ保護増殖事業計画: <https://www.env.go.jp/nature/kisho/hogozoushoku/pdf/jigyokeikaku/raicho.pdf> (2019年12月06日閲覧).
- 環境省 (2014) ニホンライチョウ生息域外保全実施計画: <https://www.env.go.jp/press/files/jp/25429.pdf> (2019年12月06日閲覧).
- 河野昭一 (1999) 北アルプス立山における自然環境の破壊と保全: 長期モニタリング調査結果の評価, 日本生態学会誌 49 (3): 313-320, DOI: 10.18960/seitai.49.3_313.
- 小林 篤, 中村浩志 (2011) ニホンライチョウ *Lagopus mutus japonicus* の餌内容の季節変化, 日本鳥学会誌 60 (2): 200-215, DOI: 10.3838/jjo.60.200.
- Laura S.W., Andrew G.F., Raphael E., Luis A.A., Jennifer Y., Caitlin A.S., Matilda H., Christina J.A., James B. and Alan C. (2018) Laboratory contamination over time during low - biomass sample analysis, Molecular Ecology Resources 19 (4): 982-996, DOI: 10.1111/1755-0998.13011.
- Lim V., Ramli R., Bhassu S. and Wilson J. (2018) Pollination implications of the diverse diet

- of tropical nectar-feeding bats roosting in an urban cave, PeerJ 6: e4572, DOI: 10.7717/peerj.4572.
- Little, D.P. (2014) A DNA mini-barcode for land plants, Molecular Ecology Resources 14: 437-446, DOI: 10.1111/1755-0998.12194.
- Lundberg D.S., Yourstone S., Mieczkowski P., Jones C.D. and Dangl J.L. (2013) Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing, Nature Methods 10: 999-1002, DOI: 10.1038/nmeth.2634.
- 松木吏弓, 島野光司, 阿部聖哉, 矢竹一穂, 竹内 亨, 白木彩子, 石井 孝, 梨本 真 (2003) イヌワシを頂点とする生態系の解明—DNA解析による野生動物の糞内容物からの餌植物同定—, 中央電力研究所報告 U03008: 1-22.
- 三戸勇吾, 細川真也, 菅野孝則, 井上徹教, 池田高則, 箕作幸治 (2017) 松永湾における底生生物の種の豊富さと相補性の評価, 土木学会論文集 B2 (海岸工学) 73 (2): 1351-1356, DOI: 10.2208/kaigan.73.I_1351.
- 中村浩志 (2007) ニホンライチョウ *Lagopus mutus japonicus*, 日本鳥学会誌 56(2): 93-114, DOI: 10.2326/jjo.56.93.
- 中村浩志 (2013a) はじめに, 土屋健二 (編), 2 万年の奇跡を生きた鳥ニホンライチョウ, 農山漁村文化協会, pp. 6-8.
- 中村浩志 (2013b) 10 章 日本列島での進化と絶滅の歴史, 土屋健二 (編), 2 万年の奇跡を生きた鳥ニホンライチョウ, 農山漁村文化協会, pp. 133-145.
- 中村浩志 (2013c) 11 章 日本最小の集団の謎, 土屋健二 (編), 2 万年の奇跡を生きた鳥ニホンライチョウ, 農山漁村文化協会, pp. 145-162.
- Nicole A.F., Shadi S., Donald J.B., Mehrdad H. (2016) Large-scale monitoring of plants through environmental DNA metabarcoding of soil: recovery, resolution, and annotation of four DNA markers, PLOS One 11(6): e0157505, DOI: 10.1371/journal.pone.0157505.
- Oksanen J., Blanchet F.G., Friendly M., Kindt R., Legendre P., McGlenn D., Minchin P.R., O'Hara R.B., Simpson G.L., Solymos P., Stevens M.H.H., Szoecs E. and Wagner H. (2019) vegan: Community Ecology Package, R package version 2.5-5, <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Oliver A.K., Brown S.P., Callahan M.A. and Jumpponen A. (2015) Polymerase matters: non-proofreading enzymes inflate fungal community richness estimates by up to 15 %, Fungal Ecology 15: 86-89.
- 里見信生, 湯浅純孝 (1968) 雷鳥の食餌植物, 北陸の植物 16 (3): 84-90.
- Shirako T., Ishizawa Y., Ajioka Y., Aichi M., Ueno K., Hoa D.T., Hai B.T., Thanh T.V., Yamada M. and Minami M. (2015) Identification of Muridae species and their food resources using dna barcoding in Cat Tien National Park, Vietnam, Mammal Study 40 (4): 217-229, DOI: 10.3106/041.040.0403.

- Soininen E.M., Valentini A., Coissac E., Miquel C., Gielly L., Brochmann C., Brysting A.K., Sønstebo J.H., Ims R.A., Yoccoz N.G. and Taberlet P. (2009) Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures, *Frontiers in Zoology* 6: 16, DOI: 10.1186/1742-9994-6-16.
- Staats M., Arulandhu A.J., Gravendeel B., Holst-Jensen A., Scholtens I, Peelen T, Prins T.W. and Kok E. (2016) Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (17): 4615-4630, DOI: 10.1007/s00216-016-9595-8.
- 菅 朋子 (1979) 糞によるエゾヤチネズミとミカドネズミの食性分析, *日本応用動物昆虫学会誌* 24 (2): 71-80, DOI: 10.1303/jjaez.24.71.
- Sullins D.S., Haukos D.A., Craine J.M., Lautenbach J.M., Robinson S.G., Lautenbach J.D., Kraft J.D., Plumb R.T., Reitz J.H., Sandercock B.K. and Fierer N. (2018) Identifying the diet of a declining prairie grouse using DNA metabarcoding, *The Auk: Ornithological Advances* 135 (3): 583-608, DOI: 10.1642/AUK-17-199.1.
- Suzuki A., Kobayashi A., Nakamura H. and Takasu F. (2013) Population viability analysis of the Japanese rock ptarmigan *Lagopus muta japonica* in Japan, *Wildlife Biology* 19 (4): 339-346, DOI: 10.2981/13-021.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729, DOI: 10.1093/molbev/mst197.
- Tanabe A.S. 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, DOI: 10.1371/journal.pone.0076910.
- 田辺晶史 (2018) ”生態学のためのメタバーコーディングと DNA バーコーディング”, URL: <https://www.fifthdimension.jp/documents/metabarcodingtextbook/metabarcodingtextbook.ja.pdf> (2019 年 12 月 06 日閲覧).
- 千羽晋示 (1965) ニホンライチョウの食物分析, *山階鳥類研究所研究報告* 4(3-4): 184-197, DOI: 10.3312/jyio1952.4.184.
- 東樹宏和 (2016a) 第 6 章 生物群集調査－PCR プライマー設計編－, 占部城太郎, 日浦勉・辻和希 (編), DNA 情報で生態系を読み解く 環境 DNA・大規模群集調査・生態ネットワーク, 共立出版, pp. 46-62.
- 東樹宏和 (2016b) 第 7 章 生物群集調査－PCR・次世代シーケンシング編－, 占部城太郎, 日浦勉・辻和希 (編), DNA 情報で生態系を読み解く 環境 DNA・大規模群集調査・生態ネットワーク, 共立出版, pp. 63-77.
- 東樹宏和 (2016c) 第 8 章 生物群集調査－バイオインフォマティックス編－, 占部城太

- 郎, 日浦 勉・辻 和希 (編), DNA 情報で生態系を読み解く 環境 DNA・大規模群集調査・生態ネットワーク, 共立出版, pp. 78-100.
- 東樹宏和 (2016d) 第 9 章 生物群集調査ーデータ準備編ー, 占部城太郎, 日浦 勉・辻 和希 (編), DNA 情報で生態系を読み解く 環境 DNA・大規模群集調査・生態ネットワーク, 共立出版, pp. 101-112.
- Valentini A., Miquel C., Nawaz M.A., Bellemain E., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Cruaud C., Nascetti G., Wincker P., Swenson J.E. and Taberlet P. (2009) New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach, *Molecular Ecology Resources* 9 (1): 51-60, DOI: 10.1111/j.1755-0998.2008.02352.x.
- Vesterinen E.J., Lilley T., Laine V.N. and Wahlberg N. (2013) Next generation sequencing of fecal DNA reveals the dietary diversity of the widespread insectivorous predator Daubenton's Bat (*Myotis daubentonii*) in Southwestern Finland. *PLoS One* 8 (11): e82168, DOI: 10.1371/journal.pone.0082168.
- Westcott S.L. and Schloss P.D. (2015) De novo clustering methods outperform reference-based methods for assigning 16 S rRNA gene sequences to operational taxonomic units, *PeerJ* 3: e1487, DOI: 10.7717/peerj.1487.
- Wickham H. (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, Springer-Verlag New York.
- Young J.W., Lamb T.D., Le D., Bradford R.W. and Whitelaw A.W. (1997) Feeding ecology and interannual variations in diet of southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*, in relation to coastal and oceanic waters off eastern Tasmania, Australia, *Environmental Biology of Fishes* 50: 275-291, DOI: 10.1023/A: 1007326120380.
- 米倉浩司, 梶田 忠 (2003) “BG Plants 和名ー学名インデックス” (YList)”, <http://ylist.info>.
- Zhang J., Liu Y-X., Zhang N., Hu B., Jin T., Xu H., Qin Y., Yan P., Zhang X., Guo X., Hui J., Cao S., Wang X., Wang C., Wang H., Qu B., Fan G., Yuan L., Garrido-Oter R., Chu C. and Bai Y. (2019) NRT1.1B is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice, *nature biotechnology* 37: 676-684.

7. 研究業績

7-1. 本研究に関連する研究業績

[学術論文・査読有・筆頭]

Taichi Fujii, Kaoru Ueno, Motoyasu Minami (2019) Identification of Food Plants in the Diet of Japanese Ptarmigan (*Lagopus mutus japonicus*) in the Japan's Northern Japan Alps using DNA Barcoding, *Wildlife and Human Society* 6(2): 13-18.

[学術論文・査読無・筆頭]

Taichi Fujii, Kaoru Ueno, Motoyasu Minami (2019) Plant-derived food resources of Japanese rock ptarmigan (*Lagopus muta japonica*) identified by DNA barcoding using rbcL local database constructed from alpine plants found in the Northern Japan Alps, Japan, *Grouse News* 57: 13-19.

藤井太一, 南 基泰, 白子智康, 田中真規子 (2019) メタバーコーディング法によるアサリ餌料推定：碎石敷設が生息地の生物相及びアサリ消化管内容物組成に与える影響，中部大生生物機能開発研究所紀要 19：94-100.

[国内学会発表・筆頭]

藤井太一, 橋本知英, 加賀春香, 上野 薫, 南 基泰 (2017) DNA バーコーディング法を用いた北アルプスに生息するニホンライチョウの餌資源推定，第 64 回日本生態学会大会 (2017 年 3 月，東京).

[国内学会発表・共同]

鈴木雄祐, 鈴木景子, 藤井太一, 上野薫, 南基泰 (2016) 北アルプス太郎山におけるニホンライチョウの糞中植物残渣からの餌資源推定，2016 年度生態学会中部地区大会 (三重).

橋本知英, 加賀春香, 藤井太一, 上野 薫, 南 基泰 (2015) 北アルプス太郎山におけるニホンライチョウの糞中植物残渣からの餌資源推定，2015 年度生態学会中部地区大会 (岐阜).

[シンポジウム発表・国内・筆頭]

藤井太一, 橋本知英・加賀春香・南 基泰 (2015) 糞の DNA 情報から野生生物が食べたものを探る，名古屋国際会議場開館 25 周年記念事業シンポジウム「時代につなぐ環境～あいち・なごやの取り組み」“市民と産学官をつなぐーネットワーク・セッション”(2015 年 11 月，愛知)

[シンポジウム発表・国内・共同]

梶山剛至, 藤井太一, 上野薫, 南基泰 (2017) 北アルプス太郎山におけるニホンライチョウの糞中植物残渣からの餌資源推定，愛知県農業総合試験場と研究協定締結 3 大学の合同研究交流会 (2017 年 12 月，愛知).

鈴木雄祐, 鈴木景子, 藤井太一, 上野 薫, 南 基泰 (2016) 北アルプス太郎山におけるニホンライチョウの糞中植物残渣からの餌資源推定，愛知県農業総合試験場と研究協定締結 3 大学の合同研究交流会 (2017 年 12 月，愛知).

[研究費・補助金取得実績]

日本生態学会中部地区会平成 31 年度研究助成採択 (2019 年 4 月 19 日)

研究科題名：ニホンライチョウの採餌環境嗜好性評価のための次世代シーケンサーを駆使した餌資源推定

助成金額：50,000 円

[共同研究実績]

理化学研究所 (つくば) バイオリソースセンターと協同研究を実施

朝鮮人参栽培圃場の微生物叢について次世代シーケンサーを用いてメタバーコーディング解析し、有用菌を同定・単離し、微生物肥料開発を目指すプロジェクトに参加。現在、朝鮮人参圃場の微生物群集解析及び単離試験を実施中 (2019 年 6 月 25 日～2019 年 7 月 30 日までバイオリソースセンターにて実験) (2018 年より現在に至る)。

いであ (株) と共同研究を実施

富山県太郎山に生息するニホンライチョウおよび愛知県知多半島臨海工業地帯に生息するアカネズミについて次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディング解析を行い、採食している植物種の推定を実施 (2019 年 4 月 8～2019 年 4 月 16 日までいであ (株) 環境創造研究所にて実験) (2019 年より現在に至る)。

熊本県有明海干潟に生息するアサリについて次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディング解析を行い、餌資源に配慮したアサリ生息地適性向上のため碎石敷設効果を調査 (2017 年より実施し、中部大学生物機能開発研究所紀要に投稿)。

7-2. その他の研究業績

[学術論文・査読有・筆頭]

藤井太一, 川本宏和, 白子智康, 上野 薫, 南 基泰 (2016) 愛知県知多市臨海工業地帯企業緑地におけるカメラトラップ法による哺乳類調査, 日本緑化工学会誌 42(2):320-329.

[学術論文・査読有・共著]

Motoyasu Minami, Misaki Yasueda, Tomoyasu Shirako, Tetuo Murakami, Takako Mori, Taichi Fujii, Toshiyuki Atsumi, Toshiro Shibata, Yuichi Kadota (2019) Ecological, phylogenetical, and pharmacognostical characteristics of *Aconitum kiyomiense* endemic to Hida highlands, Takayama city, Gifu Prefecture, Japan, Journal of Natural Medicines 73(3): 523-532.

[学術論文・査読無・筆頭]

藤井太一, 川本宏和, 白子智康, 南 基泰 (2020) 出光興産 (株) 愛知製油所企業緑地におけるタヌキのハビタット適性指数 (Habitat Suitability Index, HSI) モデル構築, 中部大学生物機能開発研究所紀要 20 (印刷中)。

[学術論文・査読無・共著]

- 南 基泰, 高垣美紗, 藤井太一, 水島秀二, 加藤健太, 岩田朋子 (2019) カメラトラップ法を用いた高速道路周辺における哺乳類調査, 道路生態研究会誌 3 (3): 10.
- 南 基泰, 水越翔太, 上野薫, 藤井太一 (2018) 愛知県春日井市築水の森におけるカメラトラップ法を用いた哺乳類調査, 中部大学生物機能開発研究所紀要 18 : 83-93.
- 今井優紀子, 今泉貴暉, 大保郁美, 若尾啓汰, 藤井太一, 南 基泰 (2016) 平成 27 年度近代化産業遺産「愛岐トンネル群」動物調査報告会, 中部大学生物機能開発研究所紀要 16 : 74-89

[国内学会発表・筆頭]

- 藤井太一, 上野 薫, 南 基泰 (2018) 企業緑地は生態系ネットワークに貢献できるのか?, 日本哺乳類学会 2018 年度全国大会 (2018 年 9 月, 長野).
- 藤井太一, 川本宏和, 白子智康, 南 基泰 (2016) DNA バーコーディング法を用いたアカネズミの植物性餌資源の網羅的推定に必要な個体数の検討, 2016 年度生態学会中部地区大会 (三重).
- 藤井太一, 川本宏和, 白子智康, 南 基泰 (2016) DNA バーコーディング法を用いたアカネズミの植物性餌資源推定に必要な糞サンプル数の検討, 日本哺乳類学会 2016 年度大会 (茨城).
- 藤井太一, 川本宏和, 白子智康, 上野 薫, 南 基泰, 橋本良樹 (2015) 愛知製油所グリーンベルトに生息する小型哺乳類の糞中植物残渣からの餌資源推定, 2015 年度生態学会中部地区大会 (岐阜).
- 藤井太一, 丹羽直美, 岡本絵里奈, 加藤美の里, 柴田あかね, 川本宏和, 白子智康, 上野 薫, 南 基泰, 貝嶋誠司, 山本明宏, 橋本良樹, 藤森誠治 (2014) 愛知県知多半島臨海工業地帯に生息する小型哺乳類の糞中植物残渣からの餌資源推定, 2014 年度生態学会中部地区大会 (長野).

[国内学会発表・共同]

- 金子奈央, 藤井太一, 南 基泰 (2016) 近代化産業遺産「愛岐トンネル群」におけるカメラトラップ法で確認された哺乳類相, 2016 年度生態学会中部地区大会 (三重).
- 山田晴裕, 勝 彪太, 藤井太一, 南 基泰 (2016) 近代化産業遺産「愛岐トンネル群」におけるアカネズミ, ヒメネズミの遺伝的多様性, 2016 年度生態学会中部地区大会 (三重).
- 山川佳琳, 藤井太一, 南 基泰, 白子智康, 田中真規子 (2016) DNA バーコーディング法を用いた山中湖周辺におけるハチミツの蜜源植物推定, 2016 年度生態学会中部地区大会 (三重).
- 川本宏和, 岡本絵里奈, 加藤美の里, 柴田あかね, 丹羽直美, 藤井太一, 白子智康, 上野 薫, 南 基泰, 橋本良樹 (2014) 出光興産 (株) 愛知製油所におけるカメラトラップ法による中型哺乳類相調査, 2014 年度生態学会中部地区大会 (長野).
- 柴田あかね, 藤井太一, 丹羽直美, 岡本絵里奈, 加藤美の里, 川本宏和, 白子智康, 上野薫,

南基泰, 貝嶋誠司, 山本明宏, 橋本良樹, 藤森誠治 (2014) 愛知県知多半島臨海工業地帯企業緑地におけるシャーメントラップによる小型哺乳類捕獲調査, 2014 年度生態学会中部地区大会 (長野).

[シンポジウム発表・国内・筆頭]

藤井太一, 上野 薫, 南 基泰 (2018) 企業緑地は生態系ネットワークに貢献できるのか?, 木村資生記念第 2 回進化学セミナー (2018 年 9 月, 東京)

藤井太一, 南 基泰 (2017) DNA バーコーディング法を用いたアカネズミの植物性餌資源の網羅的推定に必要な個体数の検討, 愛知県農業総合試験場と研究協定締結 3 大学の合同研究交流会 (2017 年 12 月, 愛知)

藤井太一, 川本宏和, 白子智康, 南 基泰 (2016) DNA バーコーディング法を用いたアカネズミの植物性餌資源の網羅的推定に必要な個体数の検討, 愛知県農業総合試験場と研究協定締結 3 大学の合同研究交流会 (2016 年 12 月, 愛知)

[シンポジウム発表・国内・共同]

石川世奈, 加藤真章, 藤井太一, 南 基泰 (2017) 近代化産業遺産「愛岐トンネル群」におけるカメラトラップ法で確認された哺乳類相, 愛知県農業総合試験場と研究協定締結 3 大学の合同研究交流会 (2017 年 12 月, 愛知).

野田奈津季, 白井朋実, 藤井太一, 南 基泰 (2017) 近代化産業遺産「愛岐トンネル群」におけるアカネズミ, ヒメネズミの遺伝的多様性, 愛知県農業総合試験場と研究協定締結 3 大学の合同研究交流会 (2017 年 12 月, 愛知).

金子奈央, 藤井太一, 南 基泰 (2016) 近代化産業遺産「愛岐トンネル群」におけるカメラトラップ法で確認された哺乳類相, 愛知県農業総合試験場と研究協定締結 3 大学の合同研究交流会 (2016 年 12 月, 愛知).

山田晴裕, 勝彪太, 藤井太一, 南基泰 (2016) 近代化産業遺産「愛岐トンネル群」におけるアカネズミ, ヒメネズミの遺伝的多様性, 愛知県農業総合試験場と研究協定締結 3 大学の合同研究交流会 (2017 年 12 月, 愛知).

山川佳琳, 藤井太一, 南基泰, 白子智康, 田中真規子 (2016) DNA バーコーディング法を用いた山中湖周辺におけるハチミツの蜜源植物推定, 愛知県農業総合試験場と研究協定締結 3 大学の合同研究交流会 (2017 年 12 月, 愛知).

[海外プレゼン発表]

生物多様性保全・海外学生派遣プログラム (2019) に参加し, 中国江蘇省にて愛知県の生物多様性保全の取り組み及び自身の企業緑地を用いた生物多様性保全活動について発表した (2019 年 8 月, 江蘇省).

[受賞経歴]

藤井太一 (2019) 中部大学学長表彰 (2019 年 1 月).

藤井太一, 上野 薫, 南 基泰 (2018) 企業緑地は生態系ネットワークに貢献できるのか?, 日本哺乳類学会 2018 年度全国大会 (2018 年 9 月, 長野), 優秀ポスター賞 受賞.

藤井太一, 上野 薫, 南 基泰 (2018) 企業緑地は生態系ネットワークに貢献できるのか?,
木村資生記念第2回進化学セミナー (2018年9月, 東京), ポスター賞 受賞.

[海外留学]

中部大学とアジア工科大学院大学が実施するアジアサマースクール 2016 に参加し, 2016年8月8日~26日の約3週間の短期留学中, アジアの持続的開発に関わる諸問題と GIS (地理情報システム) について修学した.

8. 付録

8-1. 富山県太郎山で採取した糞サンプルの採取 GPS 情報

サンプル名	GPS		サンプル名	GPS	
	北緯	東経		北緯	東経
150818T1	N36° 26′ 43.36″	E137° 30′ 47.82″	160709T20	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″
150818T2	N36° 26′ 43.36″	E137° 30′ 47.82″	160709T21	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″
150818T3	N36° 26′ 43.36″	E137° 30′ 47.82″	160709T22	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″
150818T4	N36° 26′ 43.36″	E137° 30′ 47.82″	160709T23	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″
150818T5	N36° 26′ 43.11″	E137° 30′ 47.39″	160709T24	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″
150818T6	N36° 26′ 43.11″	E137° 30′ 47.39″	160710T1	N36° 26′ 47.1″	E137° 30′ 48.6″
150818T7	N36° 26′ 43.11″	E137° 30′ 47.39″	160710T2	N36° 26′ 47.2″	E137° 30′ 49.1″
150818T8	N36° 26′ 42.86″	E137° 30′ 47.39″	160710T3	N36° 26′ 47.2″	E137° 30′ 49.1″
150818T9	N36° 26′ 44.80″	E137° 30′ 46.84″	160726T1	N36° 27′ 49.6″	E137° 30′ 25.5″
150818T10	N36° 26′ 47.31″	E137° 30′ 41.65″	160726T2	N36° 27′ 49.2″	E137° 30′ 24.4″
150819T1	N36° 26′ 44.80″	E137° 30′ 37.20″	160726T3	N36° 27′ 48.9″	E137° 30′ 24.2″
150819T2	N36° 26′ 45.36″	E137° 30′ 43.88″	160726T4	N36° 27′ 48.2″	E137° 30′ 24.3″
150819T3	N36° 26′ 44.60″	E137° 30′ 45.16″	160726T5	N36° 27′ 48.2″	E137° 30′ 24.4″
150819T4	N36° 26′ 44.41″	E137° 30′ 44.95″	160726T6	N36° 27′ 48.1″	E137° 30′ 24.4″
150819T5	N36° 26′ 47.42″	E137° 30′ 44.60″	160726T7	N36° 27′ 48.1″	E137° 30′ 24.4″
150819T6	N36° 26′ 47.91″	E137° 30′ 45.03″	160726T8	N36° 27′ 48.1″	E137° 30′ 24.4″
150819T7	N36° 26′ 48.79″	E137° 30′ 45.03″	160726T9	N36° 27′ 48.1″	E137° 30′ 24.4″
150819T8	N36° 26′ 48.71″	E137° 30′ 45.02″	160727T1	N36° 26′ 42.0″	E137° 30′ 42.7″
150819T9	N36° 26′ 48.72″	E137° 30′ 45.06″	160727T2	N36° 26′ 42.0″	E137° 30′ 42.7″
150819T10	N36° 26′ 50.40″	E137° 30′ 47.60″	160727T3	N36° 26′ 42.0″	E137° 30′ 42.7″
150819T11	N36° 26′ 49.93″	E137° 30′ 49.54″	160727T4	N36° 26′ 42.0″	E137° 30′ 42.7″
150819T12	N36° 26′ 49.78″	E137° 30′ 50.19″	160727T5	N36° 26′ 42.0″	E137° 30′ 42.7″
150819T13	N36° 26′ 49.78″	E137° 30′ 50.19″	160727T6	N36° 26′ 42.0″	E137° 30′ 42.7″
150819T14	N36° 26′ 49.78″	E137° 30′ 50.19″	160727T7	N36° 26′ 42.0″	E137° 30′ 42.7″
150819T15	N36° 26′ 50.20″	E137° 30′ 49.17″	160727T21	N36° 26′ 43.0″	E137° 30′ 49.9″
150819T16	N36° 26′ 50.23″	E137° 30′ 48.94″	160728T1	N36° 26′ 33.2″	E137° 30′ 35.3″
150819T17	N36° 26′ 50.23″	E137° 30′ 48.94″	161011T1	N36° 26′ 50.7″	E137° 30′ 52.7″
150819T18	N36° 26′ 48.73″	E137° 30′ 45.71″	161011T2	N36° 26′ 50.0″	E137° 30′ 51.6″
150820T1	N36° 26′ 49.11″	E137° 30′ 45.51″	161011T3	N36° 26′ 51.4″	E137° 30′ 53.7″
150820T2	N36° 26′ 49.11″	E137° 30′ 45.51″	161012T1	N36° 26′ 49.8″	E137° 30′ 52.3″
150820T3	N36° 26′ 49.11″	E137° 30′ 45.51″	161012T2	N36° 26′ 49.8″	E137° 30′ 52.3″
150820T4	N36° 26′ 49.99″	E137° 30′ 45.07″	161012T3	N36° 26′ 49.8″	E137° 30′ 52.2″
150820T5	N36° 26′ 49.99″	E137° 30′ 45.07″	161012T4	N36° 26′ 49.8″	E137° 30′ 52.2″
160708T1	N36° 26′ 54.4″	E137° 30′ 54.3″	161012T5	N36° 26′ 49.8″	E137° 30′ 52.2″
160708T2	N36° 26′ 57.4″	E137° 30′ 51.5″	161012T6	N36° 26′ 49.8″	E137° 30′ 52.2″
160708T3	N36° 26′ 57.5″	E137° 30′ 51.0″	161012T7	N36° 26′ 49.8″	E137° 30′ 52.2″
160708T4	N36° 26′ 57.5″	E137° 30′ 51.0″	161012T8	N36° 26′ 49.8″	E137° 30′ 52.2″
160708T5	N36° 26′ 57.5″	E137° 30′ 51.0″	161012T9	N36° 26′ 49.6″	E137° 30′ 53.4″
160708T6	N36° 26′ 57.5″	E137° 30′ 51.0″	161012T10	N36° 26′ 49.6″	E137° 30′ 53.4″
160709T1	N36° 27′ 01.7″	E137° 30′ 52.1″	180913T1	N36° 27′ 18″	E137° 30′ 47″
160709T2	N36° 27′ 01.7″	E137° 30′ 52.1″	180913T2	N36° 27′ 18″	E137° 30′ 47″
160709T3	N36° 26′ 50.1″	E137° 30′ 51.7″	180913T3	N36° 27′ 18″	E137° 30′ 47″
160709T4	N36° 26′ 50.1″	E137° 30′ 51.7″	180913T4	N36° 27′ 21″	E137° 30′ 46″
160709T5	N36° 26′ 49.0″	E137° 30′ 51.1″	180913T5	N36° 27′ 21″	E137° 30′ 46″
160709T6	N36° 26′ 51.2″	E137° 30′ 53.2″	180913T6	N36° 27′ 21″	E137° 30′ 46″
160709T7	N36° 26′ 51.2″	E137° 30′ 53.3″	180913T7	N36° 27′ 21″	E137° 30′ 46″
160709T8	N36° 26′ 51.2″	E137° 30′ 53.3″	180913T8	N36° 27′ 21″	E137° 30′ 46″
160709T9	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″	180913T9	N36° 27′ 21″	E137° 30′ 46″
160709T10	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″	180913T10	N36° 26′ 48″	E137° 30′ 50″
160709T11	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″	180913T11	N36° 26′ 46″	E137° 30′ 51″
160709T12	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″	180914T10	N36° 26′ 44″	E137° 30′ 48″
160709T13	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″	180914T11	N36° 26′ 44″	E137° 30′ 48″
160709T14	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″	180914T12	N36° 26′ 44″	E137° 30′ 48″
160709T15	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″	180914T14	N36° 26′ 47″	E137° 30′ 49″
160709T16	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″	180914T15	N36° 26′ 47″	E137° 30′ 49″
160709T17	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″	180914T16	N36° 26′ 47″	E137° 30′ 49″
160709T18	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″	180914T17	N36° 26′ 47″	E137° 30′ 49″
160709T19	N36° 26′ 54.5″	E137° 30′ 58.7″	180914T18	N36° 26′ 47″	E137° 30′ 49″
			180914T19	N36° 26′ 47″	E137° 30′ 50″

8-3. NGS データ解析

8-3-1. インデックス配列による demultiplexing

```
[Ubuntu]
#作業ディレクトリを指定
    cd /Miseq出力データの直上フォルダ名

#bcl2fastqでfastqファイルを出力
#MiseqでF・Rそれぞれ300bp, タグ配列8bp解析した場合の設定
    bcl2fastq ¥
    --processing-threads 16 ¥ PCのスレッド数を指定
    --barcode-mismatches 0 ¥ 許容されるミスマッチ数
    --create-fastq-for-index-reads ¥
    --use-bases-mask Y300n,I8,I8,Y300n ¥
    --runfolder-dir Miseq出力フォルダ名 ¥
    --output-dir 結果フォルダ名

#作業ディレクトリを指定
    cd /結果フォルダの直上フォルダ名

#clsplitseqでインデックス・プライマー配列を基にdemultiplexingを実施
#タグ品質値を考慮したdemultiplexingファイルが出力フォルダ名内部に出力される。
    clsplitseq ¥
    --runname= O ¥ ランネームを記載
    --index1file=インデックス配列R逆相補ファイル.txt ¥
    --index2file=インデックス配列Fファイル.txt ¥
    --primerfile=Fプライマー配列ファイル.txt ¥
    --reverseprimerfile=Rプライマー配列ファイル.txt ¥
    --minqualtag=30 ¥
    --numthreads=16 ¥ PCのスレッド数を指定
    --truncateN=enable ¥
    結果フォルダ名_S0_L001_R1_001.fastq.gz ¥
    結果フォルダ名_S0_L001_I1_001.fastq.gz ¥
    結果フォルダ名_S0_L001_I2_001.fastq.gz ¥
    結果フォルダ名_S0_L001_R2_001.fastq.gz ¥
    出力フォルダ名
```

- ・ 解析コードは田辺 (2018) を参考とした。
- ・ bcl2fastq を用いる際、Windows Subsystem for Linux (WSL) 機能を用いて windows10 上で構築した ubuntu 環境では動作が安定しないので注意する。
- ・ 解析コードは田辺 (2018) を参考にしたが、bcl2fastq コマンド--use-bases-mask で指定する値を Y300n,Y8,Y8,Y300n から Y300n,I8,I8,Y300n に変更した。Y は使用するリードとして出力される塩基配列、I はインデックス配列の指定する。つまり、Y300n,I8,I8,Y300n は 300bp のペアエンドシーケンスを実施し、Index 配列の長さが 8bp であることを示す。
- ・ cd は作業フォルダを指定するコマンドであり、解析データを格納したフォルダ(例：

tesuto_Folder)がDドライブ直下に有る場合(D:\tesuto_Folder), "cd /mnt/d/ tesuto_Folder"をubuntuの端末(ターミナル)に入力することで、解析対象フォルダ内のデータにアクセス可能となる。

- ・ --runname は任意の名前を記載する。
- ・ bcl2fastq 及び clsplitseq の導入は田辺 (2018), Tanabe and Toju (2013) を参考とした。

8-3-2. dada2 による ASV 出力及び結果一覧表の作成

```
[統計ソフトR]
# dada2のインストール
  if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
    install.packages("BiocManager")
  BiocManager::install("dada2", version = "3.9")
# dada2の呼び出し
  library(dada2)

# clsplitseqでdemultiplexingを行ったフォルダに接続
  setwd("O")

# バスを格納
  path <- getwd()
  list.files(path)

# demultiplexing 済みのF・R配列フォルダ名を取得し格納
  fnFs <- sort(list.files(path, pattern="F.forward.fastq.gz", full.names = TRUE))
  fnRs <- sort(list.files(path, pattern="F.reverse.fastq.gz", full.names = TRUE))

#出力ファイル名を取得
#ファイル名がrbcl-data__MiseqIndex_R097__rbcl262bp_F.forward.fastq.gzの場合の例
#ファイル名はclsplitseqの出力フォルダ名で変更可能
  sample.names <- sapply(strsplit(basename(fnFs), "_"), `[`, 4)
  filtFs <- file.path(path, "filtered_rbcl", paste0(sample.names, "_F_filt.fastq.gz"))
  filtRs <- file.path(path, "filtered_rbcl", paste0(sample.names, "_R_filt.fastq.gz"))

# Quality値を確認 (9個のデータを表示)
  plotQualityProfile(fnFs[1:9])
  plotQualityProfile(fnRs[1:9])

# Quality結果を見てF側, R側それぞれOリードで抽出しoutに格納
# 使用リード数は任意で設定できるが, オーバーラップ領域を考慮して実施する
  out <- filterAndTrim(fnFs, filtFs, fnRs, filtRs, truncLen=c(O, O),maxLen=300,
    maxN=0, maxEE=c(2,2), truncQ=2, rm.phix=TRUE,
    compress=TRUE, multithread=TRUE,verbose=TRUE)
```

```

#鋳型DNA由来の配列はPCRエラーを含む配列より繰り返し観測される可能性が高いという期待に基づき,
#配列のクオリティー値を活用して塩基配列解読エラー率を算出・学習
errF <- learnErrors(filtFs, multithread=TRUE)
errR <- learnErrors(filtRs, multithread=TRUE)

#配列のエラー率のグラフ化
plotErrors(errF, nominalQ=TRUE)

#エラーの結果を活用してASV配列の取得
derepFs <- derepFastq(filtFs, verbose=TRUE)
derepRs <- derepFastq(filtRs, verbose=TRUE)
names(derepFs) <- sample.names
names(derepRs) <- sample.names
dadaFs <- dada(derepFs, err=errF, multithread=TRUE)
dadaRs <- dada(derepRs, err=errR, multithread=TRUE)

#F・R配列の結合
mergers <- mergePairs(dadaFs, derepFs, dadaRs, derepRs, verbose=TRUE)

#dada2解析により除去されたリード数と破棄されなかったリード数を記載した表 (track.csv) の作成
seqtab <- makeSequenceTable(mergers)
dim(seqtab)
table(nchar(getSequences(seqtab)))
seqtab.nochim <- removeBimeraDenovo(seqtab, method="consensus", multithread=TRUE,
    verbose=TRUE)
dim(seqtab.nochim)
sum(seqtab.nochim)/sum(seqtab)
getN <- function(x) sum(getUniques(x))
track <- cbind(out, sapply(dadaFs, getN), sapply(dadaRs, getN), sapply(mergers, getN),
    rowSums(seqtab.nochim))
colnames(track) <- c("input", "filtered", "denoisedF", "denoisedR", "merged", "nonchim")
rownames(track) <- sample.names
head(track)
write.csv(track, "track.csv")

#分類群の割り当て (結果出力のためにダミーで実施)
tax <- assignTaxonomy(seqtab.nochim, "/RDP_LSU_fixed_train_set_v2.fa.gz",
    multithread=TRUE)
taxa <- addSpecies(tax, "/rdp_species_assignment_LSU_v2.fa.gz")

#各サンプルのASV配列割り当て表 (seqtab_final.csvとaxa.csv) を出力
saveRDS(seqtab.nochim, "seqtab_nochim.rds")
saveRDS(taxa, "taxa.rds")
write.csv(seqtab.nochim, "seqtab_final2.csv")
write.csv(taxa, "taxa.csv")

```

```

#結果一覧表 (ASV_original.csv) の作成
seqtab.nochim <- readRDS("seqtab_nochim.rds")
taxa <- readRDS("taxa.rds")
seqtab.trans <- t(seqtab.nochim)
bac <- data.frame(taxa, seqtab.trans)
set.seed(123)
library(vegan)
rm(ID)
ID <- list()
ID <- paste(ID,"ASV_", formatC(1:nrow(bac), width = 3, flag = "0"), sep = "")
rownames(bac) <- ID
write.csv(bac,"ASV_original.csv")

```

・ 解析コードは DADA2 Tutorial (2019) を参考とした。

8-3-3. サンプル間のリード数の統一

```

[統計ソフトR]
#必要パッケージのインストール
install.packages("vegan")
install.packages("RClorBrewer")

#必要パッケージの呼び出し
library(vegan)
library(RClorBrewer)

#作業フォルダの指定 (Dドライブ直下のRフォルダに解析データがある場合)
setwd("D:/R")

#解析データの呼び出し
ASV_data <- read.table("ASV_original.csv", header = T, na.string = "", sep = ",", row.names = 1)
ASV_data2 <- ASV_data [,-c(1:7)]

# NAが入っている行の削除
ASV_data2 <- na.omit(ASV_data2)
ASV_data2 <- t(ASV_data2) # 行列変換

#空の行・列の削除
ASV_data3 <- t(subset(t(ASV_data2), rowSums(t(ASV_data2))>0))
input.cleaned <- subset(ASV_data3, rowSums(ASV_data3)>0)

```

```

#低頻度ASV (1%以下) の除去
threshold.fraction <- 0.01
filtered <- data.frame(input.cleaned)
for (i in 1:nrow(filtered)){
    filtered[i,][which(filtered[i,] < rowSums(filtered[i,])* threshold.fraction)]
    <- 0
}
filtered.cleaned <- t(subset(t(filtered),rowSums(t(filtered))>0))

# rarefaction curveの描画
color <- rep(brewer.pal(8,"Set2"), times=200)
rarecurve(filtered.cleaned, label=F, xlab="Numbers of reads", ylab="Number of ASVs", col=color,
          lwd = 3)

# リード数の統一 (全データのrarefaction curveの描画結果から使用するリード数を決定)
#本研究では1,000リードに統一
subsamplesize <- 1000 #1,000リードを指定
tobe.rarefied <- subset(filtered.cleaned, rowSums(filtered.cleaned) >= subsamplesize)
rarefied <- rrarefy(tobe.rarefied, subsamplesize)
rarefied.cleaned <- t(subset(t(rarefied),rowSums(t(rarefied)) > 0))

#指定したリード数でのrarefaction curveの描画
rarecurve(rarefied.cleaned, label=F, xlab="Numbers of reads", ylab="Number of ASVs",
          col=color, lwd = 3)

#リード数1,000にした結果一覧表 (1000_ASV_original.csv) の作成
ASV <- merge(bac[,c(1:7)],t(rarefied.cleaned),by=0)
write.csv(ASV,paste(subsamplesize,"_ASV.csv", sep=""))

```

・解析コードは東樹 (2016b), 東樹 (2016c) を参考とした.

8-3-4. ボックスプロットによるニホンライチョウ糞1サンプルから検出した植物種数比較

```
[統計ソフトR]
#必要パッケージのインストール
  install.packages("ggplot2")
  install.packages("NSM3 ")

#必要パッケージの呼び出し
  library(ggplot2)
  library(NSM3)

#解析用データのインポート
  design = read.table("NGS_species.txt", header=T, sep="¥t")

#Steel-Dwass testの実施
  Steel_Dwass_result = pSDCFlig(design$species_richness, design$method,
                                method="Monte Carlo")
  Steel_Dwass_result #Stell-Dwass testの結果の表示

#ボックスプロットの作成
  m = "species_richness"
  p = ggplot(design, aes(x=method, y=design[[m]], color=method)) +
    geom_boxplot(alpha=1, outlier.size=0, size=1, width=0.5, fill="transparent") +
    labs(x="method", y=paste(m)) +
    geom_jitter( position=position_jitter(0.17), size=1, alpha=0.7)+
    scale_color_manual(values = color)+
    theme_classic() +
  p #ボックスプロット図の出力

#ボックスプロット出力結果の表示
  rbcL_F3R3 = design$species_richness[1:114]
  5.8S_ITS2 = design$species_richness[115:228]
  rbcL_ITS = design$species_richness[229:342]
  summary(rbcL_F3R3)
  summary(5.8S_ITS2)
  summary(rbcL_ITS)
```

・インポートデータ「NGS_species.txt」の内部データ構造（カンマ区切りデータとする）
エクセルでテーブルを作成し，名前を付けて保存から CSV（カンマ区切り）で出力可能

sampleID	species_richness	method
150818_T1	3	rbcL
150818_T2	2	rbcL
⋮	⋮	⋮
180914_T19	5	rbcL_ITS

sampleID：糞サンプル名

species_richness：各サンプルから検出した植物種数

method：解析に使用した領域名（rbcL: rbcL_F3R3, ITS: 5.8S_ITS2）

8-3-5. 糞サンプリング時期別の PCoA 解析及び PERMANOVA 解析

```
[統計ソフトR]
#必要なパッケージのインストール
install.packages("vegan")
install.packages("ggplot2")

#必要なパッケージの呼び出し
library(vegan)
library(ggplot2)

#解析データのインポート
sub_design = read.table("PCoA_design.txt", header=T, row.names=1, sep="¥t")
sub_design$group=sub_design$groupID
sub_beta_PCoA = read.table("PCoA_bata_data.txt", header=T, row.names=1, sep="¥t")
sub_beta = vegdist(sub_beta_PCoA, method="jaccard") #jaccard指数による各サンプル間の類似度を算出
head(sub_beta) #出力データの確認

#PCoA解析
m = "jaccard"
pcoa = cmdscale(sub_beta, k=6, eig=T)
points = as.data.frame(pcoa$points)
head(points)
eig = pcoa$eig
levels(sub_design$group)=c("2015年8月18~20","2016年7月8~10","2016年7月26~28",
                           "2016年10月11~12","2018_09/13-14")
points = cbind(points, sub_design$group)
#cmdscaleで指定したkの値の分のPC名を記載する
colnames(points) = c("PC1", "PC2", "PC3", "PC4","PC5","PC6","group")
Colors = c("#4F00FF", "#00C1F5", "#FF0D5B", "#FFD700", "#14FF2A")

#グラフ化
p = ggplot(points, aes(x=PC1, y=PC2, color=sub_design$group,shape=sub_design$group)) +
  geom_point(alpha=1, size=10) +
  scale_shape_manual(values = c(16,17,18,8,15))+
  scale_fill_manual(values = Colors) +
  labs(x=paste("PCoA 1 (", format(100 * eig[1] / sum(eig), digits=4), "%)", sep=""),
       y=paste("PCoA 2 (", format(100 * eig[2] / sum(eig), digits=4), "%)", sep=""),
       title=paste(m," PCoA",sep="")) +
  theme_classic()
p = p + stat_ellipse(level=0.95, size=2, alpha=.5) #信頼楕円の指定
p #図の描画

#adonis(PERMANOVA)解析
adonis_resalt = adonis(formula = sub_beta_PCoA ~ groupID, data = sub_design, permutations = 10000)
adonis_resalt
```

- ・インポートデータ「nMDS_design.txt」の内部データ構造（カンマ区切りデータとする）

sampleID	groupID
150818_T1	A150818
150818_T2	A150818
⋮	⋮
180914_T19	E180913

sampleID：糞サンプル名

groupID：サンプリング時期

- ・インポートデータ「PCoA_bata_data.txt」の内部データ構造（カンマ区切りデータとする）

	シラネニンジン	ガンコウラン	…	イワショウブ
150818_T1	0	1	…	0
150818_T2	0	1	…	0
⋮	⋮	⋮	…	⋮
180914_T19	0	1	…	0

8-3-6. 糞サンプリング時期別の rarefaction and extrapolation curve 解析及び推定された真の shannon diveristy を基にした餌資源推定種数の網羅率 (%) の算出

```
[統計ソフトR]
#必要なパッケージのインストール
install.packages("iNEXT")
install.packages("ggplot2")

#必要なパッケージの呼び出し
library(iNEXT)
library(ggplot2)

#解析データのインポート
rare1 <- read.table("rarefaction_NGS_150818-20.csv", header = T, na.string = "", sep = ",")
rare2 <- read.table("rarefaction_NGS_160708-10.csv", header = T, na.string = "", sep = ",")
rare3 <- read.table("rarefaction_NGS_160726-28.csv", header = T, na.string = "", sep = ",")
rare4 <- read.table("rarefaction_NGS_161011-12.csv", header = T, na.string = "", sep = ",")
rare5 <- read.table("rarefaction_NGS_180913-14.csv", header = T, na.string = "", sep = ",")
rare6 <- read.table("rarefaction_NGS_all.csv", header = T, na.string = "", sep = ",")

#解析にいらぬデータの除去
rare1 <- rare1[,-c(1:1)]
rare2 <- rare2[,-c(1:1)]
rare3 <- rare3[,-c(1:1)]
rare4 <- rare4[,-c(1:1)]
rare5 <- rare5[,-c(1:1)]
rare6 <- rare6[,-c(1:1)]

#データのリスト化
L=list(rare1,rare2,rare3,rare4,rare5,rare6)
names(L) <- c("2015年8月18～20","2016年7月8～10","2016年7月26～28","2016年9月24～27",
"2016年10月11～12","全糞サンプルデータ")
head(L)

#rarefaction curveの実行
out <- iNEXT(L, q=1, datatype="incidence_raw", knots= 100, nboot= 10000)
out #結果の表示

#rarefaction and extrapolation curveのグラフ作成
ggiNEXT(out, type=1, facet.var="order", color.var="site")+
  theme_bw(base_size= 18)+
  theme(legend.position="right")
```

#餌資源推定網羅率 (%) の出力

```
CR80 <- estimateD(L, datatype="incidence_raw", base="coverage", level=0.8)
CR85 <- estimateD(L, datatype="incidence_raw", base="coverage", level=0.85)
CR90 <- estimateD(L, datatype="incidence_raw", base="coverage", level=0.9)
CR95 <- estimateD(L, datatype="incidence_raw", base="coverage", level=0.95)
CR99 <- estimateD(L, datatype="incidence_raw", base="coverage", level=0.99)
```

・インポートデータ「rarefaction_NGS_○.csv」の内部データ構造（カンマ区切りデータとする）

検出植物名	150818T1	150818T2	...	150820T5
シラネニンジン	0	0	...	1
ガンコウラン	1	1	...	1
⋮	⋮	⋮	...	⋮
イワショウブ	0	0	...	0

8-4. NGS 出力リード数

サンプル名	葉緑体rbcL_F3R3領域		核ITS2領域		サンプル名	葉緑体rbcL_F3R3領域		核ITS2領域	
	Miseq 出力リード数	ASVリード数	Miseq 出力リード数	ASVリード数		Miseq 出力リード数	ASVリード数	Miseq 出力リード数	ASVリード数
150818_T1	61,081	50,029	23,560	9,799	160709_T21	55,905	54,990	30,992	27,322
150818_T2	65,669	57,295	23,277	16,251	160709_T22	95,809	84,548	19,057	15,322
150818_T3	42,399	36,071	20,022	9,689	160709_T23	53,368	52,740	18,957	16,130
150818_T4	60,562	54,739	25,020	9,669	160709_T24	46,643	45,364	8,151	3,756
150818_T6	45,713	41,853	22,593	8,613	160710_T1	38,512	37,763	8,698	5,561
150818_T7	53,372	50,189	22,609	9,251	160710_T2	61,828	57,756	26,044	23,371
150818_T8	58,956	49,963	23,509	15,062	160710_T3	51,094	50,191	26,735	23,054
150818_T9	47,288	40,182	35,530	25,775	160726_T1	60,192	58,345	28,628	26,103
150818_T10	53,106	51,825	32,883	31,104	160726_T2	14,495	14,189	30,633	27,358
150819_T1	95,762	91,869	35,632	31,447	160726_T3	76,248	69,678	23,108	20,074
150819_T2	54,947	50,843	33,676	29,522	160726_T4	47,875	44,408	28,100	23,294
150819_T3	24,499	22,115	31,866	27,276	160726_T5	76,188	68,047	26,382	20,844
150819_T4	44,941	41,908	12,721	4,248	160726_T6	75,151	73,721	33,930	31,228
150819_T5	44,067	42,074	8,544	6,096	160726_T7	59,815	58,754	25,641	23,402
150819_T6	55,844	54,614	25,316	22,888	160726_T8	51,190	46,167	23,607	19,778
150819_T7	50,291	45,777	17,598	13,376	160726_T9	53,041	51,659	49,618	45,539
150819_T8	69,460	61,216	32,186	27,819	160727_T1	57,003	54,789	50,475	41,181
150819_T9	86,601	83,665	26,886	24,885	160727_T2	83,440	81,951	72,631	53,464
150819_T10	75,529	66,330	33,637	26,783	160727_T3	65,650	64,302	53,111	45,177
150819_T11	71,102	61,373	39,171	31,245	160727_T4	58,253	56,941	53,406	36,912
150819_T12	72,778	59,702	37,720	28,328	160727_T5	45,920	45,174	46,758	29,641
150819_T13	54,320	52,935	25,901	24,086	160727_T6	54,615	50,648	43,576	32,549
150819_T14	72,794	69,062	30,375	27,200	160727_T7	50,341	48,812	56,722	46,524
150819_T15	63,744	62,105	38,643	36,490	160727_T21	68,265	64,744	25,349	21,430
150819_T16	65,385	62,340	32,556	31,024	160728_T1	72,578	63,446	26,318	20,851
150819_T17	66,442	59,320	31,379	26,974	161011_T1	46,710	38,830	25,039	19,878
150819_T18	59,495	57,761	32,035	29,736	161011_T2	49,709	41,339	27,464	22,127
150820_T1	57,421	49,948	29,977	24,444	161011_T3	64,204	53,224	31,200	24,737
150820_T3	75,653	64,103	22,959	19,969	161012_T2	60,952	50,917	25,690	20,526
150820_T4	10,389	10,259	27,572	26,434	161012_T4	58,624	45,959	26,467	20,319
150820_T5	10,641	10,458	14,246	10,311	161012_T5	47,713	40,640	26,691	20,303
160708_T1	28,417	26,658	17,510	8,365	161012_T7	40,331	39,381	25,791	21,188
160708_T2	44,172	42,940	20,711	17,222	161012_T9	34,933	32,758	3,156	771
160708_T3	63,812	60,085	23,938	18,309	161012_T10	45,189	44,067	7,075	4,412
160708_T4	142,619	130,289	25,919	19,872	180913_T1	60,774	55,587	32,443	26,076
160708_T5	67,156	65,970	25,333	19,624	180913_T2	42,717	40,548	25,010	19,383
160708_T6	33,662	31,847	28,069	22,671	180913_T3	48,754	47,768	20,261	17,362
160709_T1	70,148	66,598	27,284	23,082	180913_T4	52,581	50,878	22,505	19,645
160709_T2	57,150	56,180	22,993	20,192	180913_T5	67,246	66,072	18,958	17,021
160709_T3	67,456	62,043	25,534	20,884	180913_T6	66,962	65,968	17,753	14,794
160709_T4	57,032	51,859	28,526	22,797	180913_T7	60,913	59,959	24,143	21,717
160709_T5	65,366	64,117	25,315	20,295	180913_T10	63,282	61,997	22,769	20,579
160709_T6	231,695	191,145	23,008	16,625	180913_T11	55,840	54,350	21,002	18,608
160709_T7	72,389	68,604	29,891	22,612	180914_T10	88,344	79,686	16,846	15,692
160709_T8	93,897	83,507	32,136	22,102	180914_T11	86,684	79,511	24,875	20,889
160709_T9	83,336	72,747	30,514	23,191	180914_T12	73,226	68,915	23,270	21,654
160709_T10	69,174	59,213	24,749	17,621	180914_T14	66,716	55,918	20,072	18,353
160709_T11	61,226	51,450	24,938	18,494	180914_T15	65,755	62,757	5,816	3,599
160709_T12	55,989	53,976	31,672	24,614	180914_T16	61,013	60,143	23,044	20,687
160709_T14	97,548	92,308	21,607	18,955	180914_T17	44,596	43,775	17,562	16,157
160709_T15	73,379	63,127	19,238	15,301	180914_T18	78,188	63,774	23,370	21,206
160709_T17	69,356	62,032	26,562	22,736	180914_T19	62,394	61,272	23,534	22,204
160709_T18	65,332	63,011	23,474	21,251	累計	6,644,771	6,128,766	2,885,974	2,323,426
160709_T19	81,682	79,304	31,041	26,837	平均値	62,101	57,278	26,972	21,714
160709_T20	54,758	52,713	27,980	24,228					

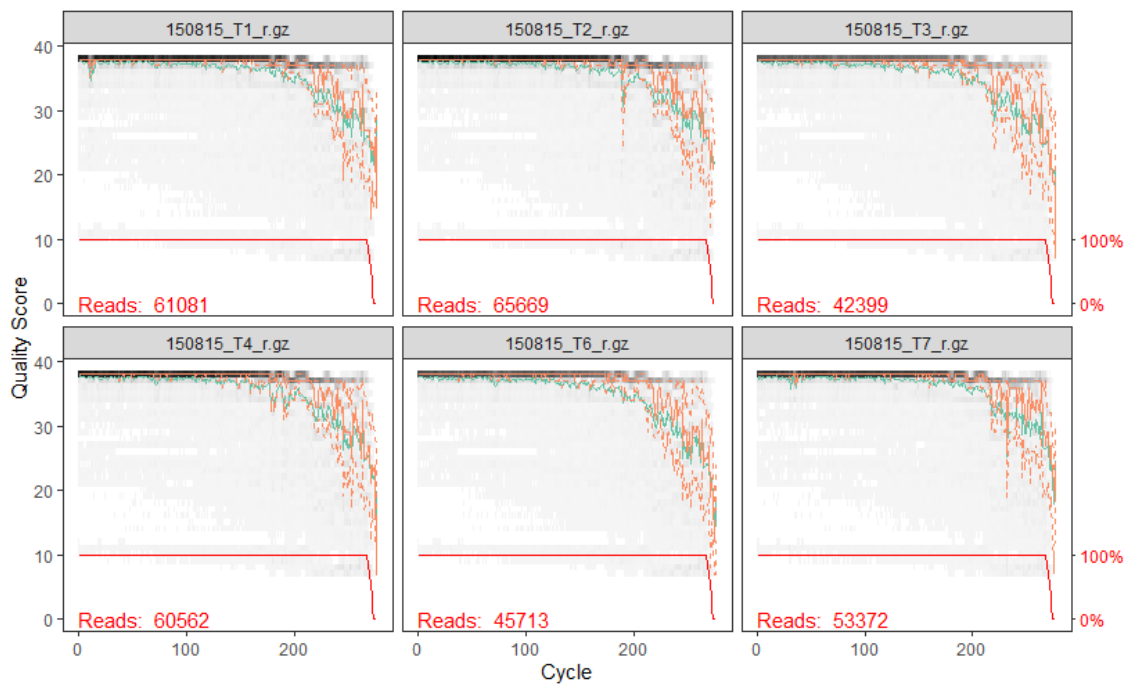
8-5. NGS 出力配列のクオリティ値

8-5-1. rbcL_F3R3 領域

• forward 配列

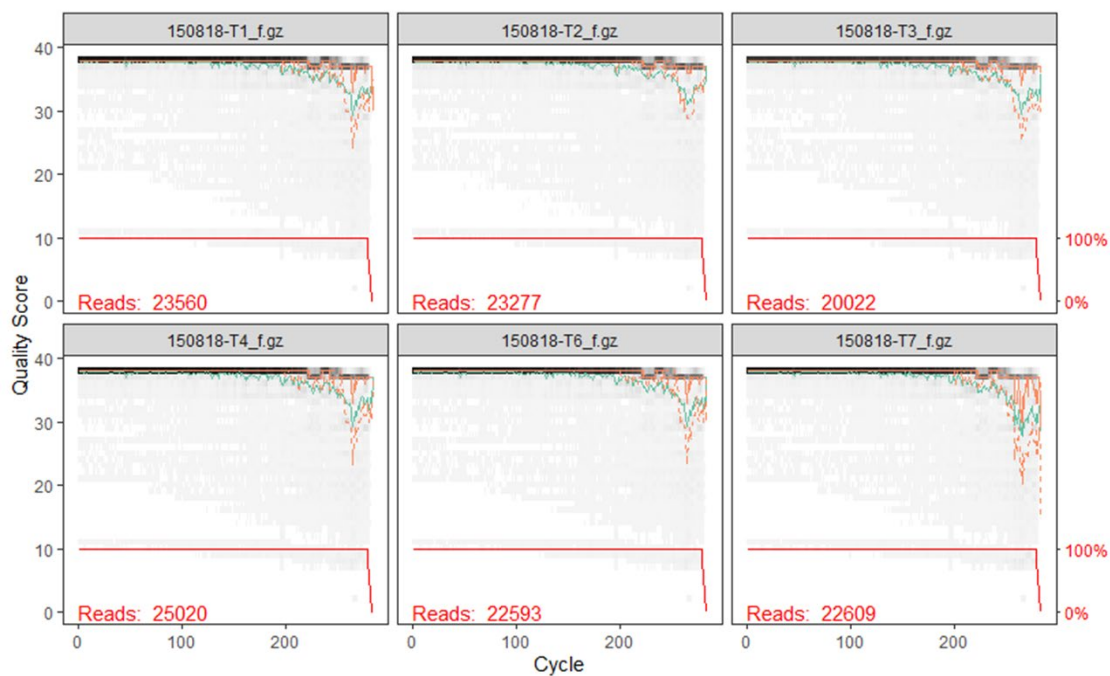


• reverse 配列

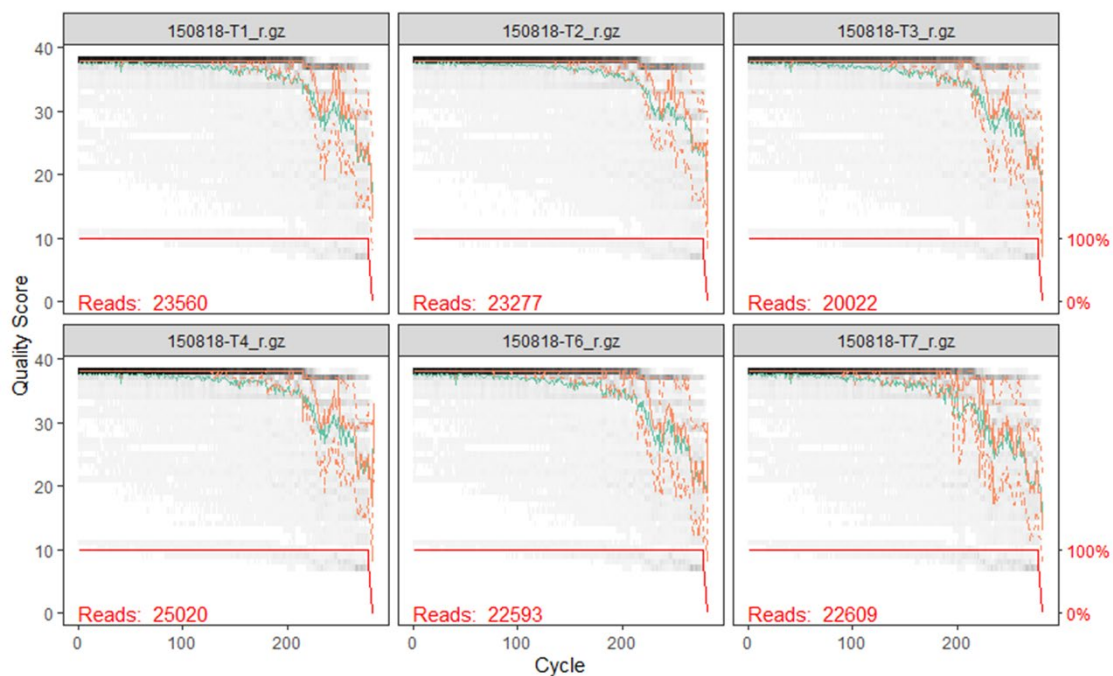


8-5-2. ITS2 領域

• forward 配列



• reverse 配列



d) 2016年10月11-12日の糞8サンプル解析結果

科名	学名	和名	161012										累計		
			T_1	T_2	T_3	T_2	T_4	T_5	T_7	T_10					
Apiaceae	<i>Tilingia ajanensis</i>	シラネニンジン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Peucedanum multivittatum</i>	ハクサンボウフウ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Asparagaceae	<i>Misanthemum dilatatum</i>	マイヅルソウ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Asteraceae	<i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>asiatica</i>	アキノキリンソウ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	<i>Arnica unalascensis</i> var. <i>tshononskyi</i>	ウサギギク	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Isoldium dentatum</i> subsp. <i>Kimurenum</i>	クモマニガナ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Betulaceae	<i>Betula ermanii</i>	ダケカンバ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Cornaceae	<i>Cornus canadensis</i>	コセンダチバナ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Cupressaceae	<i>Juniperus communis</i> var. <i>hondoensis</i>	ホントミヤマナズ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Cyperaceae	<i>Carex pyrenaica</i> var. <i>altior</i>	キンスゲ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>C. blepharicarpa</i>	シヨウジョウウスガ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Eriophorum vaginatum</i>	ワタスゲ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Diapensiaceae	<i>Schizocodon soldanelloides</i> f. <i>alpinus</i>	コイワカガミ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Ericaceae	<i>Empetrum nigrum</i> var. <i>Japonicum</i>	ガンコウラン	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
	<i>Gaultheria edonothrix</i>	アカモノ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>G. pyrolides</i>	シラタマノキ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Vaccinium</i> sp.	スノキ属	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>V. ovalifolium</i> var. <i>ovalifolium</i>	クロウスゴ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
	<i>V. vitis-idaea</i>	コケモモ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	<i>Phyllocece</i> sp.	ツカサクラ属	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>P. leutica</i>	アオノツツガザクラ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
	<i>P. nipponica</i>	ツカサクラ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Andromeda polifolia</i>	ヒメジャクナガ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Kalmia procumbens</i>	ミネズオウ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6
	<i>Elliptia bracteata</i>	ミヤマボツツジ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Gentianaceae	<i>Gentiana thunbergii</i> var. <i>minor</i>	タヤマリンドウ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>G. nipponica</i>	ミヤマリンドウ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Junaceae	<i>Juncus filiformis</i>	エノボソイ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Melanthiaceae	<i>Veratrum stamineum</i> var. <i>stamineum</i>	コバイケイソウ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Menyanthaceae	<i>Nephtrophyllum crista-galli</i> subsp. <i>Japonicum</i>	イワイチヨウ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Nartheciaceae	<i>Narthecium asiaticum</i>	キンコウカ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Aleris foliata</i>	ネバリノギラン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Orchidaceae	<i>Platanthera tipuloides</i> subsp. <i>Nipponica</i>	コバノトンボソウ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Dactylocriza aristata</i>	ハクサンチドリ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Orobanchaceae	<i>Pedicularis yezoensis</i>	エノシオガマ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Pinaceae	<i>Pinus pumila</i>	ハイマツ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Poaceae	<i>Sasa kuziensis</i>	チシマザサ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Calamagrostis longisetata</i>	ヒゲノガリヤス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Polygonaceae	<i>Persicaria weyrichi</i> var. <i>weyrichi</i>	ウラジロタデ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Polytrichaceae	<i>Polytrichum juniperinum</i>	スキゴケ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Ranunculaceae	<i>Anemone narcissiflora</i> subsp. <i>nipponica</i>	ハクサンイチゲ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Coptis trifoliolata</i>	ミツバノハクオウレン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Rosaceae	<i>Sieversia pentapetala</i>	チンダルマ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	<i>Sorbus commixta</i>	ナナカマド	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Potentilla matsumurae</i>	ミヤマキンハイ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Toniellaceae	<i>Triantha japonica</i>	イワシヨウブ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

1) 1 は糞から検出した植物を示す。
 サンプル名は表 4-2 を参照。

