

私立大学研究ブランディング事業
「瀬戸内海 しまなみ沿岸生態系に眠る多面的機能の解明と
産業支援・教育」

①-1 生態系 2018年度進捗報告

1. テーマ ①-1 生態系

テーマ①：本学に導入された次世代シーケンサーを用いて、環境 DNA および食性分析を行うための実験手技・バイオインフォマティクスを整備する。島をモデルとして森、水系、沿岸域の生態系を分析する。また、バイオロギングを用いて、沿岸域に棲む貝食性魚類の行動からアサリ等の二枚貝類の食害への関与を調査する。また、汽水域に棲む魚類の行動から、河川と沿岸海域との移動パターンを調査する。

2. 研究目的

【担当：佐藤 淳】

「島嶼森林生態系の野ネズミを対象とした
DNA メタバーコーディング法による食性分析」

私立大学研究ブランディング事業課題では、しまなみ沿岸生態系を持続可能とすることを一つの目的としている。そのためには、沿岸生態系と陸域の島嶼森林生態系とのつながりを明らかにすることが重要である。本研究では、島嶼森林生態系における食物網を解明するため、野ネズミの糞を対象として次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディングを行い、採餌動植物を分析する。H30 年度には2つの目標を設定した。一つ目は、H29 年度末に本学に導入されたイルミナ次世代シーケンサーMiSeq の利用に関わる実験手技とバイオインフォマティクスの確立である（以下、次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディング法の確立）。二つ目は、島嶼のアカネズミ *Apodemus speciosus* の食性を分析することで、本種の森林生態系における役割を解明することである。以下、2018 年 9 月にオーストラリア留学から帰国した後の成果を報告する。

【担当：渡辺 伸一】

「バイオリギングを用いた瀬戸内に生息する動物の行動生態学的研究」

河川、干潟、海洋、島の各生態系における高次消費者の移動パターンを研究する。節足動物（カブトガニ）、魚類（クロダイ、ナルトビエイ）、鳥類（オオミズナギドリ、アマツバメ）、哺乳類（スナメリ）とさまざまな分類群を対象に研究する。いずれも各生態系で重要な役割を担っていることが予想される種である。多くは、季節的あるいは生活史の段階に応じて、各生態系を行き来する。こうした高次消費者の移動を調査し、時間的・空間的利用パターン（ニッチ）から、各生態系に与える影響と生態系間の関連性について評価する。

平成 30 年度では、中国地方を襲った記録的豪雨の影響により、当初予定していた生態調査の計画を大きく変更した。沿岸部と河川下流域で行ったナルトビエイとクロダイの調査では、調査期間中に豪雨が生じたため、調査期間を短縮した。しかし、平成 30 年度に新たに導入した塩分ロガーを用いた環境計測をすることで、豪雨により沿岸域の塩分が低下し、その環境変化が与える海洋生物の行動への影響を調査することができた。また、オオミズナギドリの調査では、データロガーを装着して、海鳥の飛行パターンから海洋観測を行う計画だったが、繁殖島へイノシシが進入し、繁殖地が壊滅的な被害を受け、当初の計画を遂行することができなかった。しかし、イノシシの進入により、瀬戸内海の島嶼生態系へ与える影響を評価するという新たな研究を発展させることができた。

3. 研究成果

3-1. 【担当：佐藤 淳】

（1）次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディング法の確立

H29 年度に投稿した次世代シーケンサーを用いたアカネズミとヒメネズミの食性分析に関する以下の論文がアメリカ哺乳類学雑誌である Journal of Mammalogy に掲載され（2018 年 6 月）、その後、朝日新聞社にも取り上げられた（2019 年 1 月）。このことで、たった 3 粒のネズミの糞から生態系の一端を理解する手法を確立した。

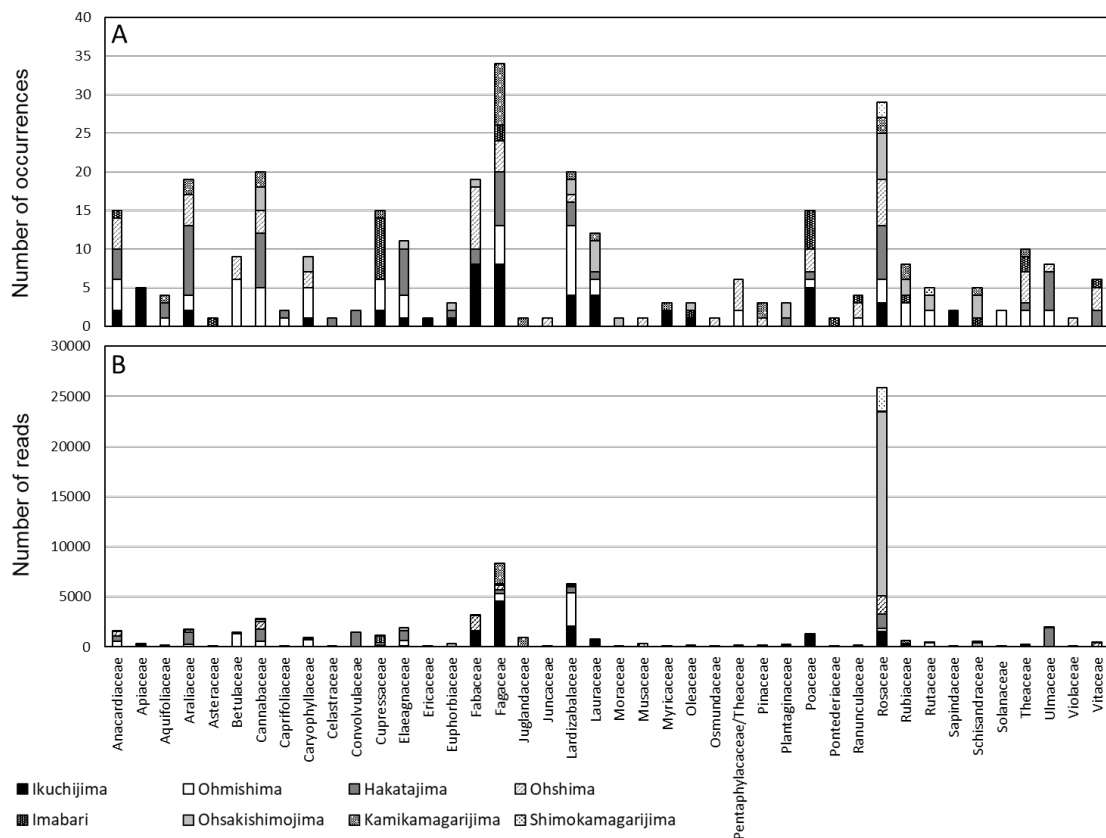
Sato JJ, Shimada T, Kyogoku D, Komura T, Uemura S, Saitoh T, and Isagi Y (2018) Dietary niche partitioning between sympatric wood mouse species (Muridae: Apodemus) revealed by DNA meta-barcoding analysis. Journal of Mammalogy 99 (4): 952-964.

同じく、H29 年度に投稿した次世代シーケンサーを用いた瀬戸内海島嶼のアカネズミの食性分析に関する以下の論文は、現在、Major Revision の裁定を受け、審査中である。

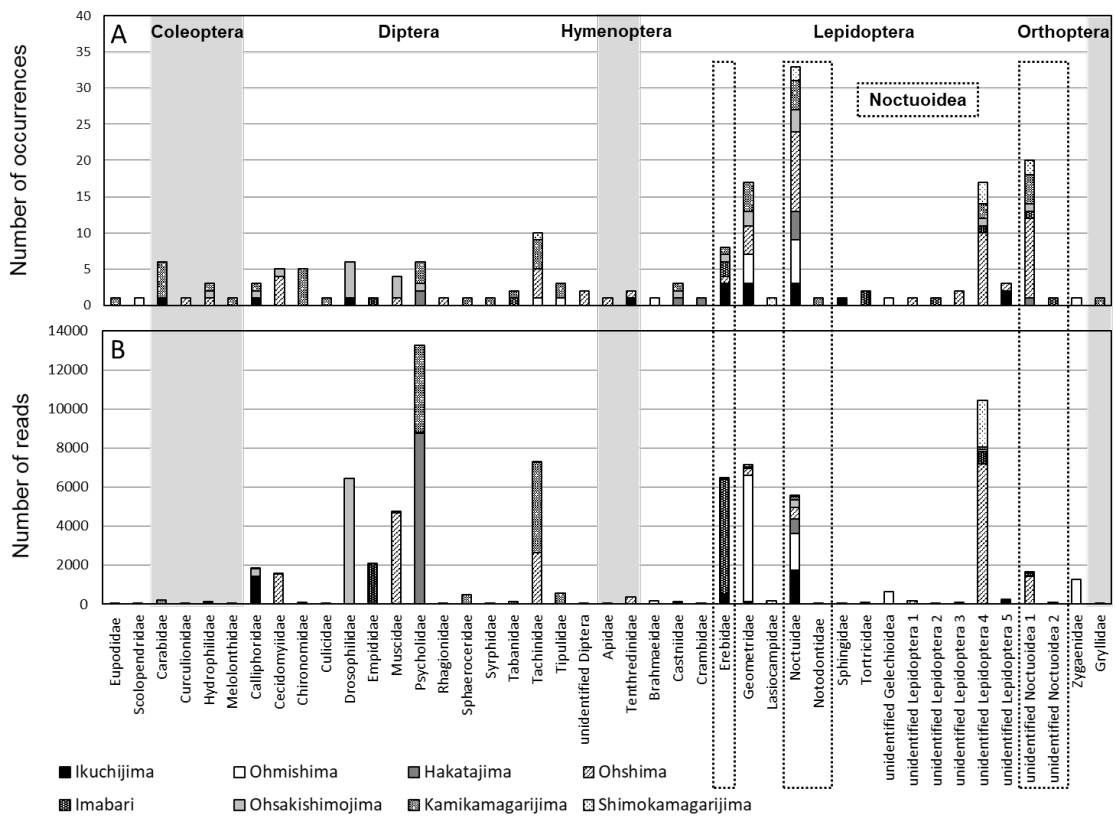
Sato JJ, Kyogoku D, Komura T, Inamori C, Maeda K, Yamaguchi Y, Isagi Y (2019) Potential and pitfalls of the DNA metabarcoding analyses for the dietary study of the large Japanese wood mouse *Apodemus speciosus* (Rodentia: Muridae): A case study on Seto Inland Sea islands. (投稿中)

後者の論文については、査読者に再解析を求められたため、H30 年度に以下のように分析を行った。具体的には、アカネズミが食べたそれぞれの食物アイテムに対して、次世代シーケンサーにおけるリード数 (DNA 塩基配列の数) と、食べたネズミの個体数のデータを比較し、リード数データの利用の可否について議論した。おおむね、リード数と個体数のデータは一致したが、以下に述べるように、結果の解釈には注意を要することが明らかとなった。

以下の図の横軸はアカネズミの食べた植物の科を示している。上段は、その植物を食べたアカネズミの個体数を示し、下段は糞の中に含まれている DNA の量を反映するリード数を示している。上段で主要な食物であると判断された 2 つの食物アイテム (ブナ科とバラ科) は、リード数においても主要であることが示された一方で、その他の上段における主要アイテムの多くは、比較的多くのネズミから検出されたものの、量的には多くないということが明らかとなった。つまり、このことから、リード数のみでは、多くのネズミが食する主要な植物を検出することができないことが分かり、反対に、採餌個体数データだけでは、生態系の中で重要な主要アイテムを見落とす危険性があることが分かった。前年度の報告と同様、瀬戸内のアカネズミは北海道で見られたようにドングリの成るブナ科の植物を主要な食物とする一方、暖かい地域に特徴的なバラ科 (クサイチゴ) も食することが分かった。



一方で、以下の図の横軸は、アカネズミが食べた無脊椎動物を示しており、上段と下段は上図と同じであるが、植物とは異なる傾向が示された。つまり、上段の採餌個体数では主要な食物アイテムとは判定されなかったものが、リード数データでは主要であることが示されている。その事例は全てハエの仲間であり、さらに精査すると、ある1個体か2個体のアカネズミの糞からのみ大量のハエが検出されていることが分かった。おそらくはアカネズミの捕獲後に、トラップの隙間から入り込み、糞に何らかの痕跡を残したハエが検出されたのではないかと考えている。つまり、食物アイテムではなく自然界でのコンタミネーションが生じた可能性がある。主要な食物としては、ヤガ科の蛾が検出されたことは昨年度の報告と同じであり、果樹園被害をもたらす果実吸蛾類の抑制にアカネズミが役割を担っている可能性がある。



これらのデータをもとに、以下のように第1回環境DNA学会で発表をした。

佐藤淳、島田卓哉、京極大助、小村健人、植村滋、山口泰典、齊藤隆、井鷲裕司 (2018) DNA メタバーコーディングで探るアカネズミの食性の普遍性と多様性に与える時空間要因. 第一回環境DNA学会東京大会 (2018年9月29-30日、東京 日本科学未来館、要旨集 p.13)

さらに、因島沿岸域で採取した魚類を対象とした食性分析の実験系の確立を目指した。2018年10月27日に釣りにより、以下の写真の2匹のシロギスを採集し、胃内容物からDNAを抽出した。その後、Leray et al. (2013; Front Zool)に従い、プライマーmlCO1intFとjgHCO2198を用いてミトコンドリアDNA CO1遺伝子の増幅を試みたがこれまでのところ成功していない。現在、DNA抽出法を変更するなどの条件を検討中である。



本学のイルミナ社 次世代シーケンサー MiSeq の実験とバイオインフォマティクスの立ち上げについては、検討を重ね、これらをルーチンワークとすることができた。2019年11月に MiSeq 利用に必要な物品が全て揃ったため、Qubit、PCR、index PCR、E-Gel、バイオアナライザ、MiSeq のプロトコルを作製し、Office365 OneDrive を用いて福山大学利用者で共有した。さらに、バイオインフォマティクスの部分については、Claident パイプラインのコマンド集をまとめ、上記と同様に利用者で共有した。また、次世代シーケンサー (NGS) を学ぶ初学者のための交流会として、「NGS を学ぶ会」を立ち上げ、これまでに世話人として、以下の 3 回のセミナーを実施することで、本学の次世代シーケンサー利用の促進を図った。

第 1 回 NGS を学ぶ会 (2018 年 10 月 15 日 福山大学 28 号館 28101 教室)

演者：佐藤淳 (生物工学科)

演題：環境 DNA と NGS.

第 2 回 NGS を学ぶ会 (2018 年 11 月 22 日 福山大学 34 号館 34317 教室)

演者：高山健人 (薬学科)

演題：MiSeq 虎の巻～実験の組み立て方と注意点～

第 3 回 NGS を学ぶ会 (2018 年 12 月 6 日 福山大学 17 号館 1721 教室)

演者：井上忠雄 (イルミナ株式会社、H13 年 生物工学科卒業生)

演題：NGS の超入門からマーケットトレンドまで：原理の基礎、装置開発の多様性と今後の展望

第1回 NGSを学ぶ会

話題：環境DNAとNGS-第1回には福山大学参加者限定
 演者：佐藤淳 (生物工学科)
 日時：平成30年10月15日 (月) 17時~18時半
 場所：28号館 栄養教育実習室 (28101)
 どなたでも参加できます。



「NGSを学ぶ会」の趣旨
 福山大学グリーンサイエンス研究センターに、イルミナ社 次世代シーケンサー (NGS) MiSeqが導入された。本学の幅広い分野の研究者の利用を促進するために、NGSの原理や技術、バイオインフォマティクス、そしてNGSを応用した研究について、話題提供し、相互に理解を深めるとともに参加者全員がNGSを会得することを目的とする。

発起人：佐藤 (主催)、高山 (協賛)
 連絡先：佐藤淳 (内線4624、E-メールjsato@fukuyama-u.ac.jp)

第2回 NGSを学ぶ会

話題：MiSeq 虎の巻 - 実験の組み立て方と注意点 -
 演者：高山健人 (薬学部薬学科)
 日時：平成30年11月22日 (木) 17時半~19時
 場所：34号館3階学習支援室2 (34317)
 どなたでも参加できます。



「NGSを学ぶ会」の趣旨
 福山大学グリーンサイエンス研究センターに、イルミナ社 次世代シーケンサー (NGS) MiSeqが導入された。本学の幅広い分野の研究者の利用を促進するために、NGSの原理や技術、バイオインフォマティクス、そしてNGSを応用した研究について、話題提供し、相互に理解を深めるとともに参加者全員がNGSを会得することを目的とする。

発起人：佐藤 (主催)、高山 (協賛)
 連絡先：佐藤淳 (内線4624、E-メールjsato@fukuyama-u.ac.jp)

第43回 福山大学グリーンサイエンスセミナー
 兼 第3回NGSを学ぶ会

NGSの超入門からマーケットトレンドまで：原理の基礎、装置開発の多様性と今後の展望
井上 忠雄 さん
 (H13年 生物工学科卒業生)

イルミナ株式会社 営業本部 リサーチ営業本部



日時：平成30年12月6日(木) 16時~17時半(変更)
 場所：生物工学科17号館2階講義室(1721)
 ※教員、大学院生、学部学生など、多くの方にご来聴をお待ちしております

主催：福山大学グリーンサイエンス研究センター(福山商学部内)
 電話：084-935-2112 (内線：4045番本)
 連絡先：佐藤 淳(生物工学科) 電話：084-935-2112 (内線 4624)
 Email: jsato@fukuyama-u.ac.jp

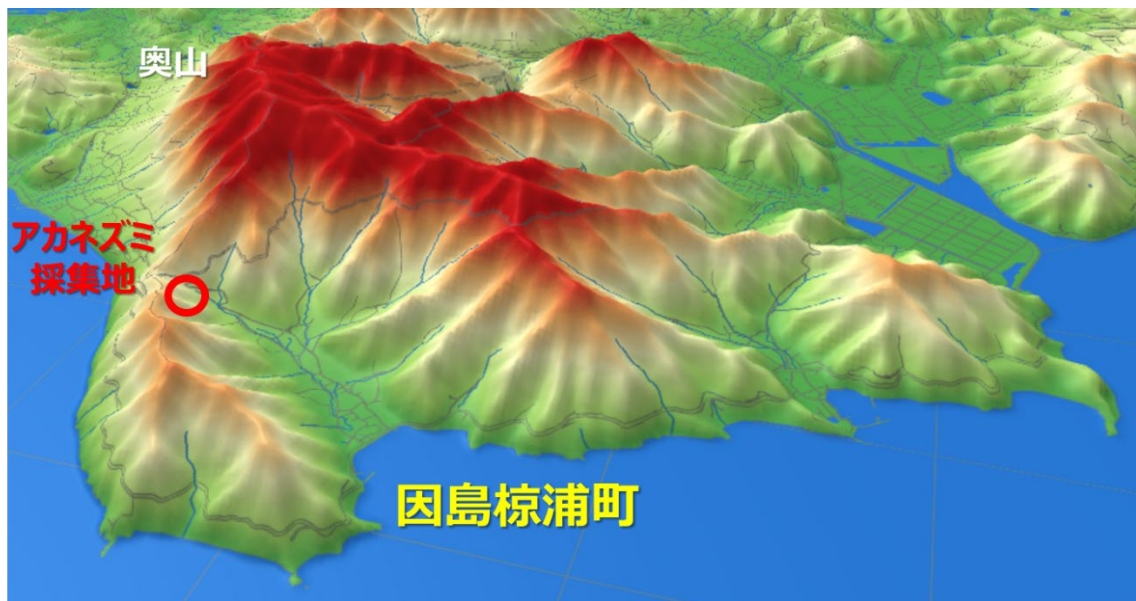
Research Center for Green Science, Fukuyama University

これらの活動により、本学の MiSeq は、2019 年 2 月以降、月に 1~3 回の頻度

で利用されるようになり、実験・解析手技は確立されたと言える。

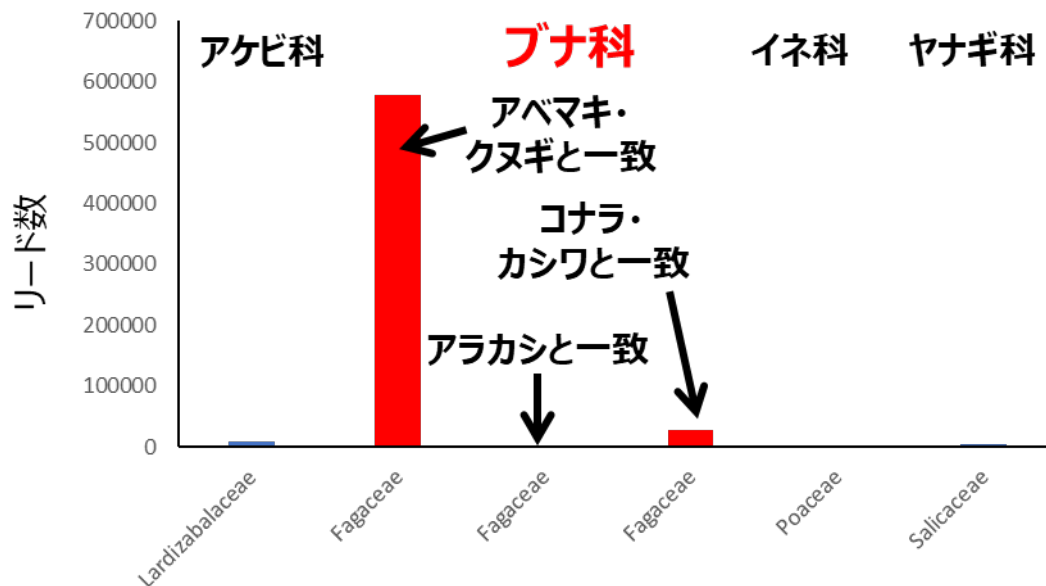
(2) 瀬戸内海島嶼アカネズミの食性分析

沿岸生態系を持続可能とするためには、森海連環の実証が重要であることを、私学研究ブランディングメンバーと議論した。その過程で、因島で最も高い山である奥山から因島棕浦町に流れる水系が、その実証モデルとしてシンプルで分析しやすいポイントであることが分かった。そこで、第一に、DNA メタバーコーディングにより、アカネズミの食性を分析し、森林生態系の一端を明らかにすることを試みた。以下の図（QGIS；海洋生物科学科 渡辺伸一准教授作製）のように、奥山と因島棕浦町の間にある落葉樹林において、アカネズミの捕獲を行った。2019年2月から3月にかけて、3回アカネズミの捕獲調査を行い、3頭のアカネズミの糞サンプルを得ることができた。同時に、現地のトラップ設置ポイント40か所の周辺に落ちていたドングリや葉を収集し、種同定を行った（下記参照）。

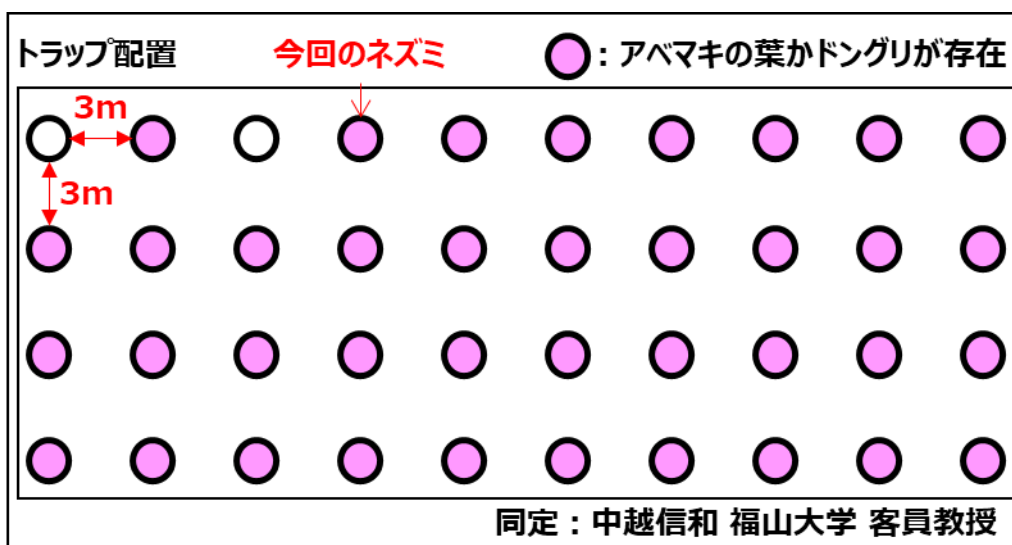


まず、捕獲したアカネズミの中で1頭の糞30粒程度を使い、DNA抽出、PCR、ライブラリ調製等、上述のように確立した次世代シーケンサーを用いたDNAメタバーコーディング法を適用し、植物及び、無脊椎動物の食性を調査した。その結果、植物については、これまで北海道（Sato et al. 2018）や他の瀬戸内海の島で検出されていたように（佐藤、投稿中）、ブナ科の植物が高い頻度で検出された（下図）。ブナ科の中では、アベマキ・クヌギと一致する配列がほぼすべてであったが、中にはアラカシや、コナラ・カシワと一致する配列も見られた。その他、低頻度で、アケビ科、イネ科、ヤナギ科が検出された。トラップ設置ポイ

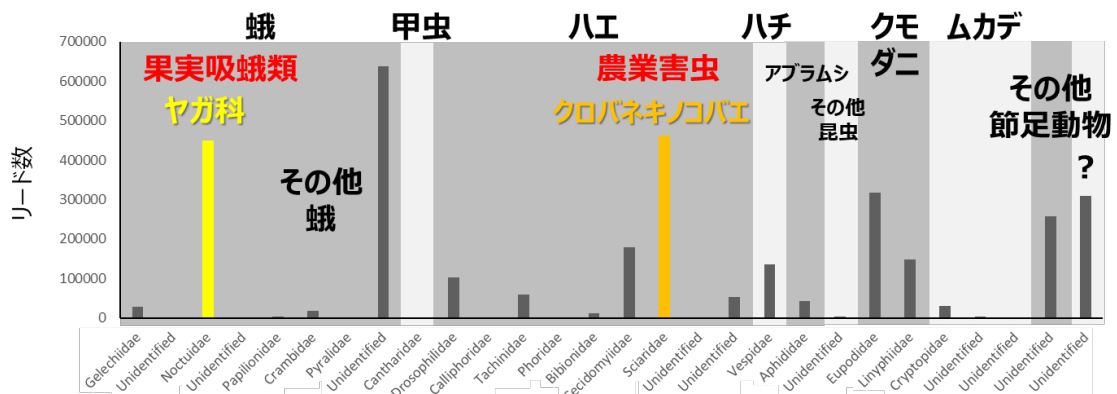
ント周辺には多くのドングリが見られたため、秋から冬を越すのに、このドングリが利用されていた可能性が高い。



グリーンサイエンス研究センターの中越信和客員教授の協力のもと、アカネズミの採集地に落ちていた葉とドングリの同定を行ったところ、以下のようにトラップを設置した 40 か所のほぼすべてでアベマキが検出された。つまり、上記 DNA メタバーコーディング分析において、高頻度で検出されたブナ科の植物はアベマキであるとわかり、それとともに、アカネズミがアベマキの森の更新に関与していることが示唆された。



次に、無脊椎動物の食性を示したのが下図である。これも、これまでの他の瀬戸内海島嶼で見られた傾向と同じように（佐藤、投稿中）、ヤガ科の蛾が高頻度で検出された。椋浦町とこのアカネズミの生息する森の間には、八朔やミカンの果樹園が存在する。上述の議論と同じように、果実吸蛾類を多く含むグループであるヤガ科の蛾が高頻度で検出されるということは、アカネズミが果樹園被害を抑制していると読み取ることが可能である。アカネズミ採集地では、採集日の2月にはほとんど成虫として飛翔している蛾を見つけることができなかった。おそらく、土の中で幼虫を食べているのではないかと推察される。さらに、農業被害をもたらす、クロバネキノコバエも同じく高頻度で検出され、アカネズミの農業生態系における害虫抑制機能を垣間見ることができた。



3-2. 【担当：渡辺 伸一】

(1) ナルトビエイの遊泳・摂餌行動におよぼす水温と塩分の影響

ナルトビエイは、日本からベトナムにかけての海域に生息し、水温が上昇する春から夏にかけて、九州沿岸部などに来遊することが知られている。近年、海水温の上昇に伴って、生息域が北上し、瀬戸内海では1990年以降に来遊が確認されている。瀬戸内海は、水深が浅い閉鎖海域であるため、降雨により淡水が流入すると水温とともに塩分も大きく変動することが予想される。このような環境変動が大きい環境にナルトビエイはどのように適応しているのだろうか。本研究では、記録計を用いて松永湾周辺海域に来遊するナルトビエイの遊泳・摂餌行動に及ぼす水温と塩分の影響について考察した。

2018年5/3～9/7に、松永湾沿岸で定期的にナルトビエイの来遊の有無を観察し、その間の水温・塩分の変動を記録した。5/14以降に発見したエイ14個体に記録計を装着し、放流から71-111時間のエイの行動と経験水温・塩分とを記録した。水温の影響については全14個体のデータから、うち4個体のデータから塩分の影響について分析した。深度・加速度データから摂餌のための掘り返し行動が記録できた海底を摂餌海底と定義し、摂餌海底の水深・水温・塩分の平均値を算出し、その季節変化を調べた(下図)。また、記録中に大雨があった個体(9/7放流)について、大雨後の水温・塩分の変動とエイの行動との関係を詳しく分析した。

5/13(水温18℃)～9/7まで松永湾沿岸に来遊するナルトビエイを確認した。8/3(30℃)までは記録計をつけたほぼすべての個体が松永湾に留まったが、8/4以降はすべての個体が記録期間中に湾外へ移動した。松永湾内ではいずれも5m以浅の海域で摂餌したが、湾外へ出ると水深50mまでの広い深度帯で摂餌した(図上)。摂餌時の水温は湾内では20℃(5/14)～29℃(7/19)まで徐々に上昇し、湾外へ出ると27℃まで低下した(図中)。塩分は湾内に留まった個体で低く(<26)、湾外へ移動した個体でやや高かった(>26、図下)。9/9の降雨後、表層(<3m)の塩分が一時的に低下(<20)し、その6時間後に湾外の深い海域(>5m)へ移動した。

岡山県沿岸におけるナルトビエイの混獲の記録では、水温が19℃を超える5月上旬に初めて混獲が確認され、水温29℃を超えると混獲数は減少している。温帯域に生息するナルトビエイは低水温(18℃未満)だと活発に活動することができないと考えられる。本研究の結果から、20～29℃の範囲において松永湾内で頻繁に摂餌したことから、この水温帯の時期に本種が沿岸へ来遊して摂餌すると考えられる。また、塩分の変動は湾内で大きく、大雨の6時間後に20(海水の58%)まで低下し、その後に塩分の高い湾外へ移動した。ナルトビエイの体

液は海水の 1/3 (11) ほどだと推定される。よって、この塩分低下がナルトビエイの生存に直接影響するとは考えられない。しかし、大雨による急激な塩分の低下により、浸透圧機構を持たず、移動できない二枚貝類は影響を強く受けるかもしれない。以上の結果から、本種は水温や塩分の変化に応じて、広範囲を遊泳して移動することで、生息に適した環境を選択していると考えられる。

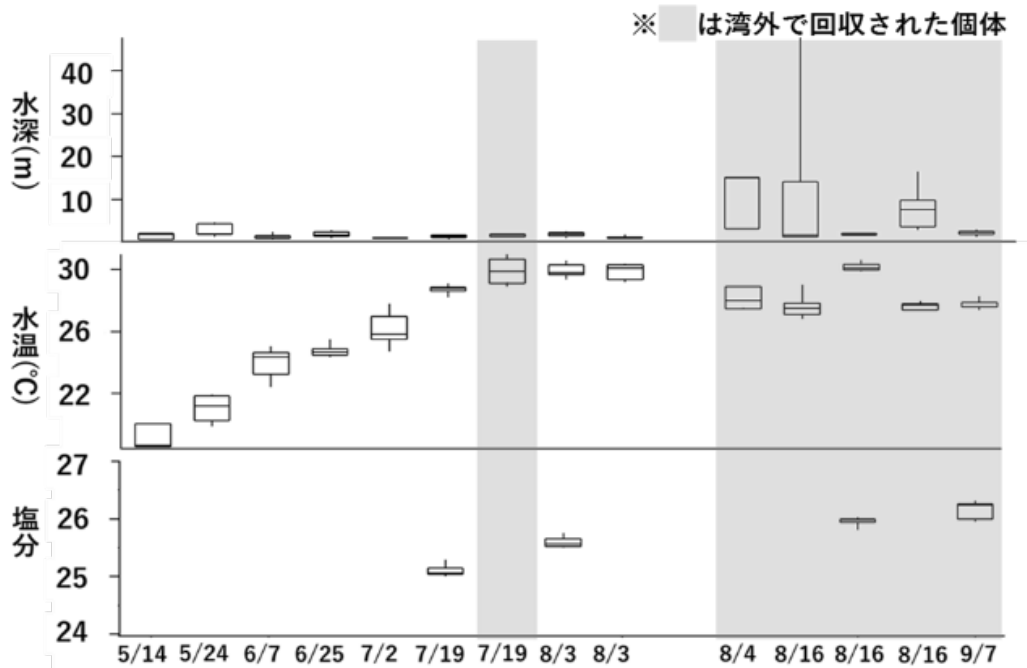


図. ナルトビエイの摂餌場所の水深・水温・塩分の季節変化

(2) ナルトビエイの摂餌行動の日周性の変化

瀬戸内海では、1980年代後半からアサリの資源量が減少しはじめた。さらに、2001年に広島湾のアサリ漁場でナルトビエイによる食害が報告されて以降、各地で二枚貝の資源量が激減している。2009年に岡山県で行われたナルトビエイの食性調査の結果では、アサリは餌となっておらず、巻貝類も含めた様々な貝類が餌となっていることが明らかになった。しかし、各種で分布や習性が異なる貝類をナルトビエイがどのように摂餌するかは明らかになっていない。本研究では、ナルトビエイに記録計を装着し、摂餌の発生時刻と深度の日周性を調べ、貝類の生息水深や日周性と比較して、ナルトビエイの摂餌行動と貝類資源へ与える影響について考察した。

2018年5月～9月に、松永湾沿岸でナルトビエイ 14 個体を釣獲し、記録計を装着した。記録計は放流から 71～111 時間後にタイマーで切り離して回収した。摂餌時にみられる特徴的な加速度データが、海底で記録された場所を摂餌海底とした。摂餌海底を水深によって浅場 (<5m) と深場 (>5m) に分け、摂餌の発生

時刻を昼(6:00~18:00)と夜および満潮からの経過時間で比較した(上図)。

摂餌は、水深 51mまでの広い海域でみられたが、全体の 98%が浅場 (<5m)でみられた。浅場では、摂餌は昼より夜に多く、とくに満潮の 2 時間前後に多かった。一方、深場では摂餌は昼のみにみられ、干潮の 2 時間前後に多かった。

ナルトビエイは幅広い海域で摂餌したが、そのほとんどが 5m 以浅の浅場だった。また、浅場では夜間の満潮前後に特に多く摂餌がみられた。松永湾周辺の浅場はアサリの産地として知られている。また、アサリ等の二枚貝類の多くは 5m 以浅に生息し、夜間の満潮時に海底表面に現れて活動する。そのため、夜間の満潮時には摂餌が容易になると考えられる。よって、ナルトビエイは基本的には餌密度が高い浅場で夜間の満潮時に摂餌すると考えられる。しかし、松永湾周辺では干満差が最大 4m を超えるため、浅場は干潮時には干上がることも多い。また、8 月中の昼間には浅場の水温は 30℃を超える。深場では昼の干潮時のみ摂餌がみられたことから、浅場で摂餌できない高水温下でナルトビエイが深場へ移動して摂餌したと考えられる。以上の結果から、ナルトビエイは貝類の分布や日周性および潮汐周期や水温の季節変化に応じて、摂餌行動を柔軟に変化させていると考えられる。また、摂餌水深や摂餌時間が大きく変化することから、様々な貝類の資源量の低下に影響を与えていることが示唆される。

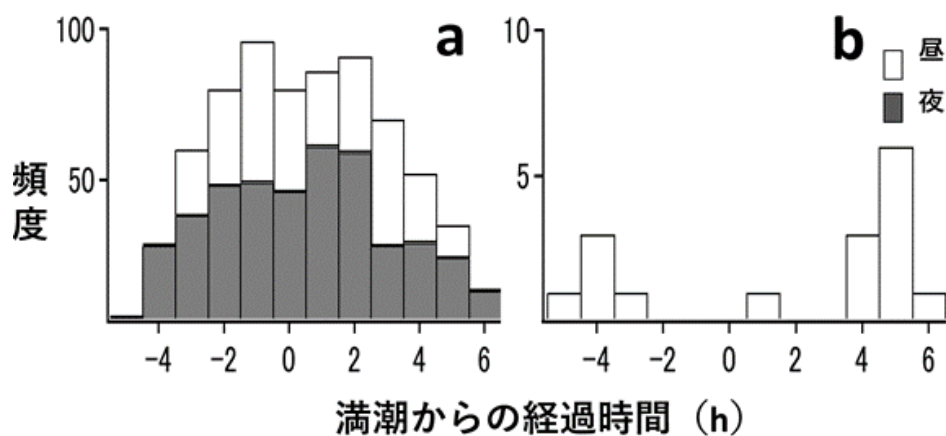


図. 浅場 (a: 水深<5m) および深場 (b: 水深≥5m) における摂餌の発生時間の比較.

(3) ビデオ・加速度ロガーを用いたクロダイの遊泳行動と利用環境

クロダイは瀬戸内海沿岸では高密度で生息しており、海藻類や甲殻類、貝類などの底生生物を主な餌としている。その食性から、クロダイは底生に定着した底魚の印象が強い。しかし、岡山県沿岸で音波発信機を付けたクロダイがわずか 2 日間で水平移動距離 84 km と長距離を移動したことが報告されている。沿岸域におけるクロダイの追跡調査の事例は少なく、回遊中の詳細な行動や利用環境

についての知見は皆無である。また、大型の捕食者であるクロダイの利用環境や他魚種との関係についての知見は、瀬戸内海の沿岸生態系を把握する上で重要な知見となる。本研究では、映像と遊泳行動が記録できる記録計を使って、クロダイの遊泳行動と利用環境および遭遇した他魚種との関係について調べた。

2018年4月に松永湾で映像・加速度記録計をクロダイに装着し、装着2日後の2:00~14:00(12時間)に加速度・深度・水温を記録し、同日6:00~8:00(2時間)の映像を記録した。加速度・深度データから遊泳率と利用深度(平均±標準偏差)を算出し、映像から各魚種の撮影頻度と利用環境(中層、藻場、岩礁)を1秒毎に記録した。また、全体の撮影環境(図上)と各魚種が出現した環境(図下)を比較した。

全体の遊泳率・利用深度は57.3%・ 3.2 ± 1.2 mで、映像記録中は72.7%・ 4.4 ± 1.0 mだった。映像記録中の88%が中層を遊泳中で、12%で海底環境が撮影された。海底環境では、着底して短時間の休息を行い遊泳し続けた。海底環境の76%で海藻藻場だった。魚類は計6種(計3518回)が撮影され、クロダイが全体の86%を占めた。各魚種の出現環境はクロダイ・コノシロ・ボラ・スズキは中層の割合が高く、スズメダイ・ウマズラハギは藻場の割合が高かった。

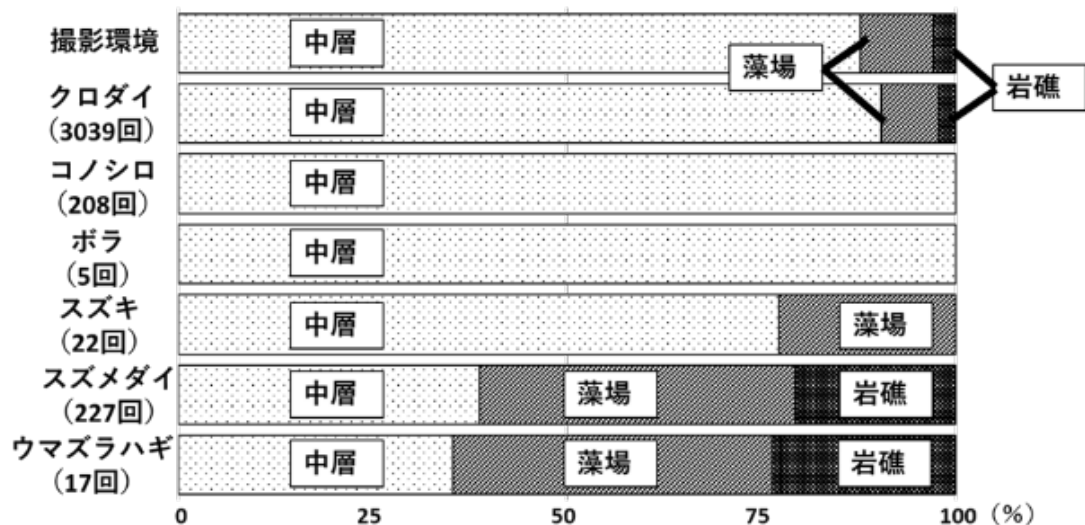


図. 各魚種の撮影された環境の割合

記録全体の遊泳率は6割近く、撮影した8割以上で中層を遊泳した。映像から海底に着底して一時的に休息する様子が確認されたが、クロダイは基本的に中層を泳ぐ回遊性の高い魚類であることが示された。また、他のクロダイが撮影された環境の占める割合が類似したことから、クロダイは中層を遊泳して、海底を一時的に利用するものと考えられる。映像から、海藻藻場が繁茂する岩礁では、クロダイに続いてスズメダイが多く観察された。松永湾内でナルトビエイに映

像記録計を付けた調査では、海底環境のほとんどは砂泥でスズメダイは撮影されていない。よって、撮影された環境は松永湾外である可能性が高い。松永湾内の砂泥域ではクロダイは優占していたが、湾外の岩礁藻場でも、クロダイの撮影割合が高く、優占種であると考えられる。また、同様な環境で見られた魚種と餌や生息場所を巡って種間関係を持つことが示唆される。示した。図中上部の黒いバーは夜間（18：00～6：00）を示す。

（4）塩分ロガーを用いた汽水域におけるクロダイの経験塩分の測定

汽水域に棲む魚類は、塩分が大きく変動する環境に順応するための生理的機構を持ち、さらに好みの塩分の環境水を選択する行動的適応を行う。生理的機構の研究に比べて、魚類の塩分選択に関する行動学的研究は少ない。その理由として、魚類の経験した塩分を計測することが技術的に難しいことが挙げられる。本研究では、広塩性魚として知られるクロダイを対象に 2 種の電気伝導度ロガー（ジオロケータ・ORI400-DTC）を取り付けて、汽水域で魚類が経験した塩分を測定した結果について報告する。

ジオロケータは、塩分を含む環境水でのみ通電することから、淡水域（塩分 0）への進入を記録することができる。ORI400-DTC は、深度・水温のほか電気伝導度を 1 秒間隔で記録することができる高精度のデータロガーである。これらを広島市太田川の下流域で採集したクロダイに装着し、3—4 日間の経験塩分を記録した後に回収した。

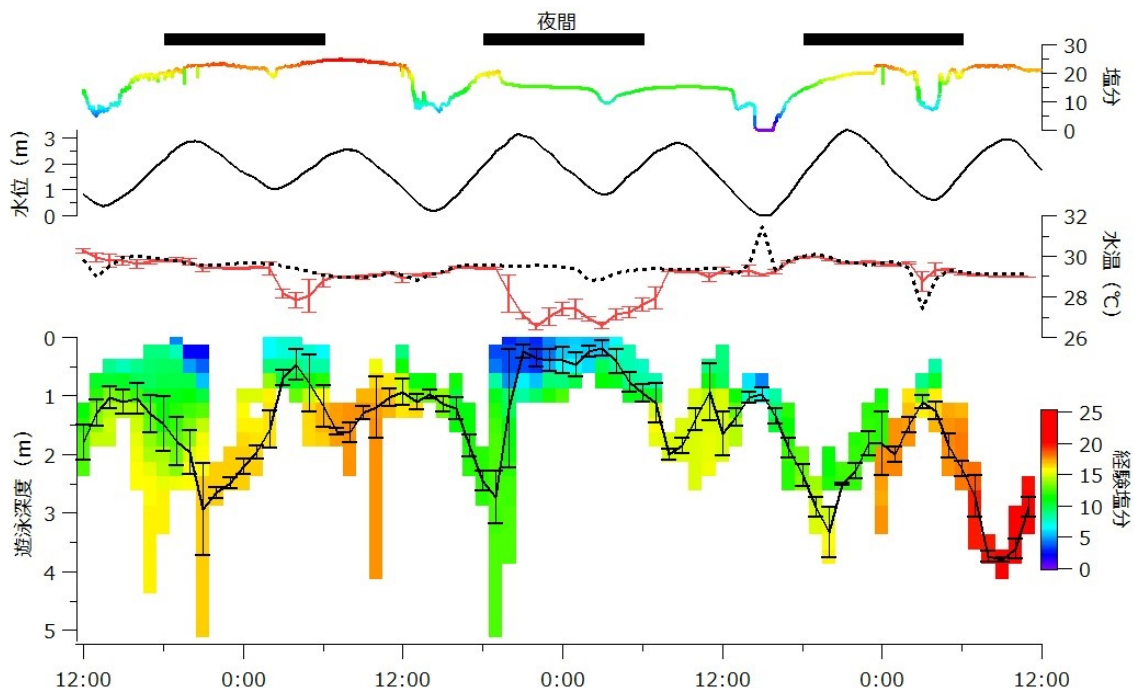


図. 塩分ロガーで記録したクロダイの経験水温・経験塩分・遊泳深度。

ジオロケーターのデータから、記録した 4 日間で、淡水域の利用はみられなかった。よって、クロダイのような海産魚の経験塩分の計測にジオロケーターを使用するのは適切ではないと考えられる。ORI400-DTC のデータからは、記録した 3 日間の内 48% をクロダイの体液より低張の水域で過ごすことが明らかになった。さらにクロダイの経験水温・塩分から水温と塩分の密度躍層を調べた結果、深度 1 m 付近に形成された密度躍層がクロダイの回遊行動に影響を与えていることが示唆された。今後、ORI400-DTC を用いて汽水域の密度躍層の成層と本種の行動への影響を詳しく調べることで汽水生態系の理解が進むことが期待される。

(5) オオミズナギドリとその潜在的捕食種の日周性の比較

オオミズナギドリは地中の巣穴で繁殖する海鳥である。そのため、一般に陸上の捕食者が少ない外洋に面した離島で繁殖する。本種は 6 月中旬に産卵し、8 月中旬まで雌雄が交代で抱卵する（抱卵期）。8 月中旬に雛が孵ると、雌雄ともに日中に海上へ採餌に出かけて夜間に帰巣する（育雛期）。山口県上関町宇和島には、瀬戸内海で唯一の本種の繁殖地が確認されている。これまでに、巣穴に置いたセンサーカメラの映像から、島に飛来するカラスや外来種のネズミ、偶発的に上陸するイノシシによる捕食の影響が懸念されている。そこで、本研究ではカメラの映像から、ミズナギドリと潜在的捕食種と考えられる上記 3 種の撮影頻度や時刻、出現時期をミズナギドリの抱卵期・育雛期で比較することで、それらの捕食リスクを評価した。

2018 年 6～10 月に設置したセンサーカメラ（7～14 台）の映像から、各種の撮影回数を記録した。本研究では、6:00～18:00 までを日中、それ以外を夜間と定義した。また、各種の日周性を詳しく調べるため各時間帯で撮影された日数をミズナギドリの抱卵期（6/21～8/22）と育雛期（8/23～10/12）でそれぞれ集計し、種間で比較した（図）。

ネズミは夜間、カラスは日中に主に撮影されたが、イノシシは日中と夜間の両方で撮影された。また、ネズミとカラスは調査期間を通じて継続して撮影されたが、イノシシはミズナギドリの抱卵後期（7/30）に初めて撮影され、育雛期の 9/14 以降には撮影されなかった。抱卵期には、イノシシは主に日中に撮影されたが、育雛期には主に夜間に撮影された。映像から、ネズミが巣穴に出入りする行動が見られたが、カラスは巣穴内に入る行動は見られなかった。また、ネズミとカラスによるミズナギドリの卵や雛の捕食は確認されなかった。一方、イノシシは抱卵中の巣穴を掘り返し、親鳥を捕食する行動が見られた。本来、育雛期である 8/31 に行った調査では、繁殖地にあるほぼすべての巣穴（101/104 巣）が掘り起こされ、雛を確認することはできなかった。

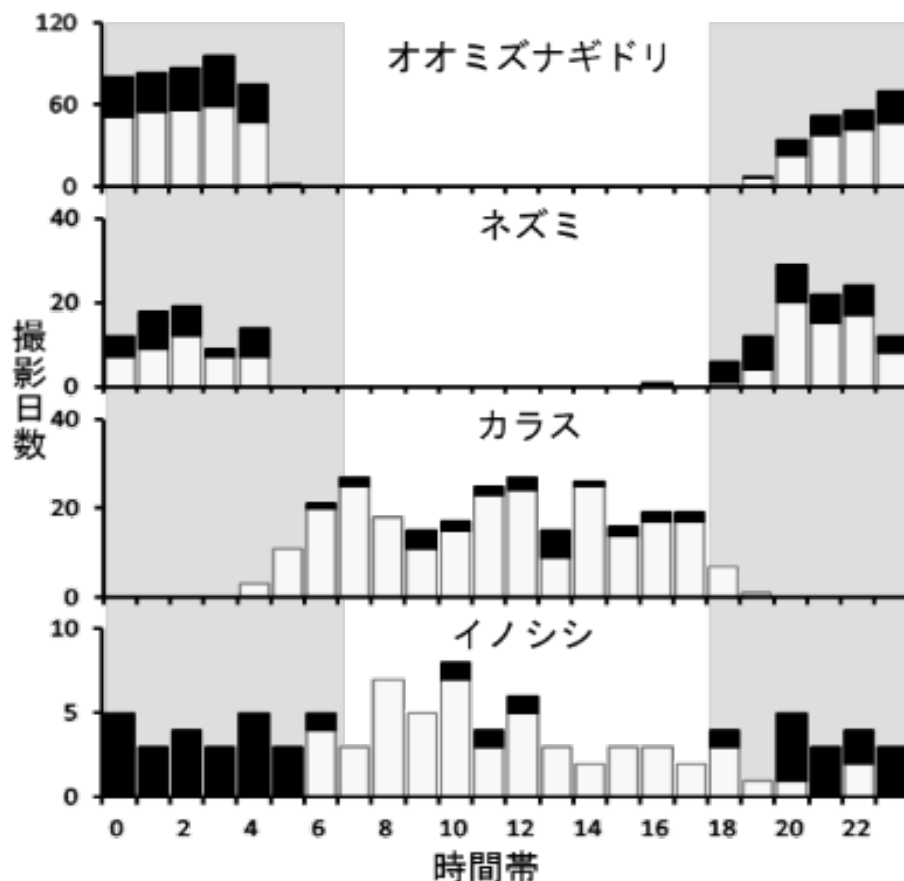


図. オオミズナギドリと潜在的捕食者3種の撮影頻度の日周変化 (□抱卵期 ■育雛期)

カラスはミズナギドリと異なり昼行性で、巣穴に入ることはなかったことから、捕食のリスクは小さいと考えられる。一方、ネズミは夜行性で巣穴へ出入りした。映像から、卵や雛の捕食は確認されなかったが、2017年の観察では、育雛後期の10月中にネズミが雛を捕食し、雛が激減した。2018年にネズミによる直接の雛の捕食が確認されなかったのは、抱卵期に親鳥と卵がイノシシに襲われ、雛がいなかったためだと考えられる。また、イノシシはミズナギドリの帰巣に合わせて抱卵期と育雛期で日周性を変化させて、親鳥を捕食していた。本種の他の繁殖地でも外来種のネズミが卵や雛を捕食し、繁殖率が激減したという報告がある。しかし、イノシシにより本種の繁殖への悪影響があったという報告はない。本研究の結果から、繁殖島に上陸したイノシシは卵や雛だけでなく、巣穴の掘り返しと親鳥の捕食により、一度の上陸でも海鳥の繁殖コロニーに極めて深刻な影響を短期間で与えることが明らかになった。

(6) 瀬戸内海的环境特性が与えるオオミズナギドリの繁殖生態への影響

オオミズナギドリは、主にカタクチイワシのような小魚を餌とし、日本周辺

の離島で繁殖する。本種は、海上風を利用して効率よく飛翔するため、繁殖島周辺だけでなく広域の海洋資源の分布が親鳥の採餌行動と繁殖成功に影響する。太平洋側や日本海側の繁殖地では、餌となるカタクチイワシの分布に応じて採餌海域が繁殖島から数百キロ以上離れた海域に及ぶことが知られている。瀬戸内海では、山口県上関町宇和島でのみ本種の繁殖が確認されている。本研究では、瀬戸内海の海洋環境の特性が高次捕食者であるオオミズナギドリの繁殖成功と採餌行動へ与える影響を考察した。

9 か年（2010～2018 年）の繁殖期のデータから、育雛後期まで生存した雛数をその年の巣立ち雛数として、繁殖成功の指標とした。うち5 か年で育雛中の親鳥に GPS ロガーを装着して、親鳥の採餌行動（トリップ長・飛翔距離・到達距離・飛翔率）を調べた。繁殖期中の瀬戸内海西部海域の海面水温・海上風速・カタクチイワシの漁獲量を他地域と比較して、瀬戸内海的环境特性について評価した。また、3 か年でドブネズミおよびイノシシによる雛および親鳥の捕食が確認された。よって、上記に加えて捕食者の有無を環境要因の一つとして、繁殖成功へ与える影響を評価した。

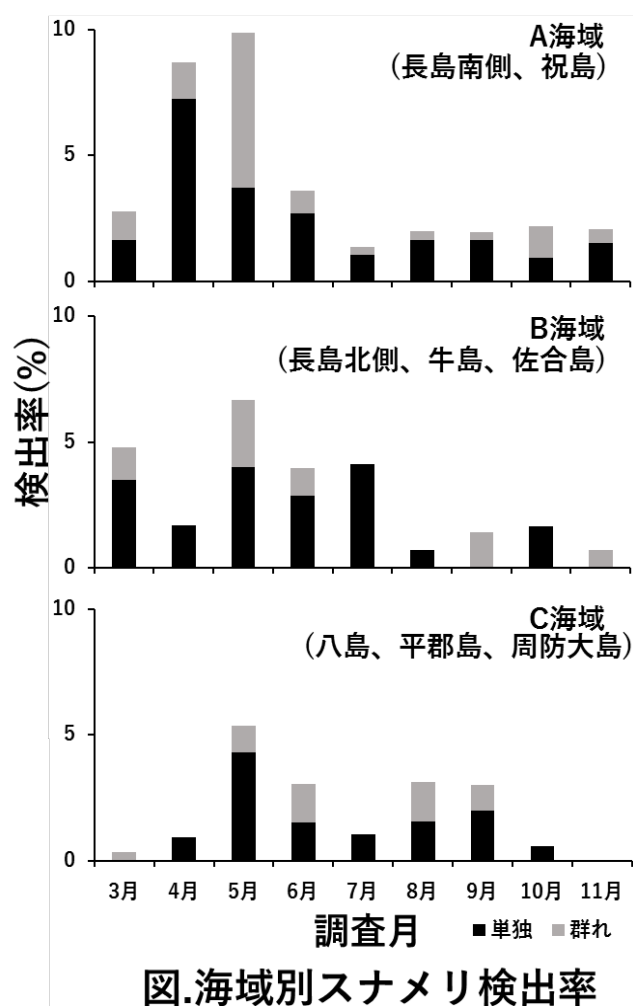
巣立つ雛数は3～32羽と年間で大きく変動し、カタクチイワシの漁獲量が多い年に増加し、捕食者が存在する年に極端に減少した。親鳥の採餌行動は、他地域と比べてトリップ長・飛翔距離・到達距離が短く、飛翔率は低かった。また、2日以上トリップ（長期トリップ）の占める割合（12.5～50%）は年間で大きく変動した。2日未満の日帰りトリップ（短期トリップ）の場合、繁殖島の南方50km以内で採餌した。一方、長期トリップでは瀬戸内海で3～24時間採餌した後に豊後水道を抜けて太平洋側で採餌した。その間の飛翔率は短期トリップ中に比べて高かった。長期トリップへ出るタイミングは個体間で異なり、そのときの海上風速や海水温には関係がみられなかった。

カタクチイワシの漁獲量の少ない年に本種の繁殖成功が低下した。また、主な採餌海域が繁殖島の南方50kmの狭い海域だったことから、この海域におけるカタクチイワシの資源量が本種の繁殖成功に影響していると考えられる。一方、瀬戸内海を抜けて太平洋側で採餌する長期トリップもみられ、長期トリップの占める割合には年変動がみられた。よって、瀬戸内海側で十分な餌が獲得できなかった場合には、太平洋側へと移動して採餌すると考えられる。また、長期トリップへ出るタイミングは個体によって異なり、そのときの海上風速や海水温には関係がみられなかった。よって採餌場所の選択は、より詳細な環境スケールおよび個体の採餌戦略の違いによって生じることが予想される。また、餌資源の増減に加えて、外来生物の侵入により本種の繁殖成功に影響を受けることが明らかになった。とくにイノシシは卵や雛だけでなく親鳥の捕食と巣穴の崩壊をもたらし、今後の繁殖にも甚大な影響を与えていることが予想さ

れる。このように外来生物の侵入が比較的容易であることも、瀬戸内海の離島において本種の繁殖を困難にしている要因であると考えられる。

(7) 周防灘におけるスナメリの利用海域の季節変化

スナメリは日本では仙台湾～東京湾、伊勢湾・三河湾、瀬戸内海、有明海・橘湾、大村湾に生息する小型鯨類である。遺伝子や外部形態、繁殖期が地域間で異なることから、各海域で異なる系群に分かれ、いずれの海域でも生息頭数は減少傾向にある。瀬戸内海東部の大阪湾で行われた目視による分布調査では、4～6月に出現数が増加した。飼育下での出産期(4～6月)と一致することから、スナメリがこの時期に大阪湾で出産し、個体数が一時的に増加すると考えられる。瀬戸内海西部に位置する山口県上関町周辺には、現在もスナメリが比較的高密度で生息する。しかし、個体数の季節変化についての情報は乏しく、出産期は推定されていない。本研究では、当海域において2015～2018年に目視と音響による分布調査を行い、出現頻度の季節変化を調査した。また、さらに調査海域を3つに分けて、単独と2頭以上の群れの検出率を比較することで、スナメリの出産期と出産場所を推定した。



目視と音響調査は小型船で同時に行い、調査ルートを GPS で記録した。目視調査では、船上からスナメリを発見した時刻と頭数を記録した。音響調査では、曳航した音響ロガーの録音データからスナメリの鳴音を検出して、時刻と頭数を記録した。調査した海域を 500mメッシュに区分し、スナメリを目視または音響調査で検出したメッシュの占める割合を検出率として算出した。検出率は単独と群れ(2頭以上)に分け、さらに調査ルートを 3 海域(A・B・C)に分けて、月毎に算出した。

3 海域のほぼ全ての月でスナメリを確認した。いずれの海域でも共通した季節変化がみられ、5月に検出率が最も高く、6月以降に減少した。群れの検出率は、A・B海域で5月に高く、A海域で最も高かった。

年間を通じてスナメリを確認したことから、スナメリは当海域に定住していると考えられる。しかし、検出率には 3 海域で共通した季節変化がみられた。当海域でスナメリの検出率が最も高い 5 月は大阪湾や飼育下のスナメリの出産期と一致する。また、群れの検出率も 5 月に高かった。これらのことから、当海域でもスナメリは 5 月に出産すると考えられる。また、群れの検出率が A 海域で

最も高かったことから、スナメリの出産・育児には A 海域が好適な環境であると考えられる。

(8) 環境 DNA 分析によるカブトガニ DNA の検出精度の検証

近年、環境 DNA と呼ばれる水中に存在する生物由来の DNA 断片を用いて生物の分布を調べる研究が盛んに行われている。特に発見が難しい希少生物については、簡便な調査手法として期待されている。本研究室では、環境 DNA 分析を用いてカブトガニの分布調査を行っている。しかし、環境 DNA は様々な要因で劣化するため、検出手法の確立には未だ課題が多い。一般に環境 DNA は太陽光に含まれる紫外線や高温下での熱変性により分解されやすい。また、環境水は DNA 分解酵素を産生する細菌を多量に含む。この酵素の作用により、環境 DNA は徐々に劣化すると考えられている。本研究では、カブトガニを対象に環境 DNA を劣化させるそれらの 3 要因（光・温度・細菌）に着目し、各要因による環境 DNA の劣化速度を比較して、検出精度を検証した。

カブトガニの飼育水槽から 36 サンプルを採水し、カブトガニ DNA の検出を試みた。採水したサンプルは、光（遮光有・無）、温度（低温・常温保管）、細菌（殺菌剤添加・不添加）の条件を変えて実験した（下表）。DNA 抽出後、リアルタイム PCR でカブトガニ DNA を増幅し、シーケンサーで塩基配列を解析した。解析した塩基配列は BLAST で検索し、カブトガニ DNA の検出の有無を判断した。検出結果は、各条件で検出率（検出数／実験したサンプル数）を比較した。また、採水から DNA 抽出までの日数（1～6 日）を変えて、検出できたサンプルの経過日数から環境 DNA の劣化速度を条件ごとに推定した。

光の影響：①vs③・②vs④で検出率に差はなかった。温度の影響：③vs⑤・④vs⑥で低温保管の方が検出率は高かった。細菌の影響：①vs②・③vs④・⑤vs⑥で殺菌剤添加の方が検出率は高かった。また、不添加（①③⑤）では 3 日までだったが、殺菌剤添加（②④⑥）ではいずれの条件でも 5 日まで検出した。

実験の結果、遮光による検出への影響は見られなかった。よって、光による環境 DNA の劣化への影響は小さいと考えられる。一方、低温保管で検出率が高かったため、高温を避けることで検出率が上がると考えられる。また、殺菌により検出率は上がり、検出できる期間も伸びた。これは殺菌によって DNA 分解酵素を産生する細菌が減少して環境 DNA の劣化速度が弱まったからだと考えられる。また、低温では細菌の活性が弱まるため、殺菌剤を添加しなくても最長 3 日間は環境 DNA を検出することができると考えられる。以上の結果から、環境 DNA の劣化を遅らせて検出精度を上げる採水法として、第一に殺菌剤（塩化ベンザルコニウム）の添加、第二に低温保管により細菌の活性を弱めるという

手段が有効だと考えられる。

| 表.カプトガニDNAの検出結果 | | 経過日数 | | | | | | 検出率 |
|-----------------|--------------|------|---|---|---|---|---|-----|
| 条件 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| ① | — ・ — ・ — | ○ | × | × | × | × | × | 14% |
| ② | — ・ — ・ 添加 | × | × | ○ | ○ | ○ | | 60% |
| ③ | 遮光 ・ — ・ — | ○ | × | × | × | × | × | 14% |
| ④ | 遮光 ・ — ・ 添加 | × | × | ○ | ○ | ○ | | 60% |
| ⑤ | 遮光 ・ 低温 ・ — | ○ | ○ | × | ○ | × | × | 43% |
| ⑥ | 遮光 ・ 低温 ・ 添加 | ○ | × | ○ | ○ | ○ | | 80% |

検出成功：○ 未検出：×

4. 今後の研究計画

【担当：佐藤 淳】

「島嶼森林生態系の野ネズミを対象とした
DNA メタバーコーディング法による食性分析」

H30 年度の瀬戸内海島嶼のアカネズミの食性分析結果は、島嶼森林生態系の解明に資する研究成果であるが、前年度と同様に、サンプル数が少ないこと、ローカルデータベースの不在や DNA バーコードマーカーの情報量不足から種同定率が低いことなどの課題があった。しかし、中越信和客員教授のサポートもあり、ブナ科の植物を種同定することができたことは食性分析の結果の解釈に有益であった。H31 年度は、課題解決に向けて、特に因島の森林生態系に焦点を当て、

サンプル収集、動植物相の把握（特にブナ科の植物と蛾の収集と種同定）とローカルデータベースの構築、新規マーカーの開発を行いたい。

さらに、森と海をつなぐ島嶼陸域水系をターゲットに環境 DNA 分析を行いたい。具体的には、因島の奥山と椋浦町沿岸域の間を結ぶ水系において、アカネズミの糞に含まれる植物の分析に利用した DNA メタバーコーディングマーカーを用いて、ブナ科の植物の検出を目指したい。このことで、森と海の水系におけるブナ科植物の動きを理解することができる。また、同じく DNA メタバーコーディング分析により、沿岸域の魚類の食性を分析することで、沿岸域の生態系も明らかにし、森海連環の実証研究へとつなげたい。

検証すべき仮説は以下の通り。「アカネズミはブナ科の森の更新に重要な役割を果たしている」、「ブナ科の植物は森から海へと流れている」、「ブナ科の植物が流れ込む沿岸域では、そうではない沿岸域と比較して生物多様性が豊かである」。

【担当：渡辺 伸一】

「バイオリギングを用いた瀬戸内に生息する動物の行動生態学的研究」

各対象動物で以下のように計画している。

カブトガニ：環境 DNA をもちいて、笠岡市の干潟および海中に生息するカブトガニ生態および幼生を検出する手法を開発し、湾内外におけるカブトガニの分布を特定する。これまで表層水を採水して環境 DNA の検出を試みてきたが、検出率が低いのが課題だった。次年度では、底層水を採水して環境 DNA の検出を試みることを計画している。

オオミズナギドリ：平成 30 年度中にイノシシの進入により、繁殖地が壊滅的な被害を受けたが、人口巣箱を設置することで、繁殖数が増加するか、定期的なモニタリングを実施する。繁殖数の増加が確認されたら、フライトレコーダーを装着して、採餌中の海洋データの取得を目指す。

ナルトビエイ・クロダイ：今年度開発した行動解析の手法を使い、さらに多くのエイから行動データを得る。得られたデータから、摂餌行動について詳しく解析し、アサリ等の食害対策を講じる。

アマツバメ：繁殖地で糞を採集し、次世代シーケンサーを用いた食性分析を行う。

スナメリ：これまで行ってきた瀬戸内海西部海域での音響ロガーを用いた分布調査に加えて、芸予諸島周辺でも分布調査を行う。また、船上での調査に加えて、ドローンを用いたスナメリの分布調査も計画している。