

「生物分野における定量的 把握手法」の事例紹介

(一財)九州環境管理協会
環境部 生態工学室
大井 和之

自己紹介

大井和之

- 1968年大阪府生まれ
- 東京大学大学院・九州大学大学院修了 博士(理学)(指導教官矢原徹一教授)
- 京都大学生態学研究センター COE研究員
- 地球環境産業技術研究機構 研究員(工業技術院生命工学研究所・現産総研 勤務)
- 2000年から 九州環境管理協会 勤務
- 専門分野:植物進化生態学, DNA分析, GIS, 統計解析

この時間の内容

1. 植物の定量評価技法の事例
九州大学伊都キャンパスの環境アセスメントと保全対策, モニタリング
2. 生態系・生物群集評価の事例
生物生息空間モデル
3. 環境DNA分析の事例
オオサンショウウオの分布調査
4. 動物の行動圏調査の事例
哺乳類・鳥類の個体識別について

この時間の内容

1. 植物の定量評価技法の事例
九州大学伊都キャンパスの環境アセスメントと保全対策, モニタリング
詳細(評価書段階)
植物
2. 生態系・生物群集評価の事例
生物生息空間モデル
概略(配慮書段階)
生態系
3. 環境DNA分析の事例
オオサンショウウオの分布調査
概略～詳細
動物
4. 動物の行動圏調査の事例
哺乳類・鳥類の個体識別について
詳細(評価書段階)
動物～生態系

1. 植物の定量評価技法の事例

九州大学新キャンパス統合移転事業

環境影響評価法・条例施行前の事業(自主アセス)

環境影響評価書での植物調査

- 植生図の作成
- 代表的な植物群落30地点での群落組成調査
- 保全すべき植物群落の選定(老齢の常緑広葉樹林・水生植物群落)

これでは調査が足りない！ ← 矢原徹一教授
(「保全生態学入門」著者)

- 生態系(生きもの同士のつながり)を保つためには、植物種の保全が重要
- 徹底的な植物相調査を行い、保全緑地を活用して新キャンパス内で1種の植物も絶滅させない
- 植物を保全することで昆虫をはじめとする多様な動物相も保全できる

具体的な保全目標を実現するための調査

矢原式小区分ルートセンサス法

- 調査対象地の地形に応じて尾根筋と谷筋にできるだけ密に調査ルートを設定する
- 調査ルートの両側2mずつの範囲に生育している植物の種名を全て記録する
- 調査ルートを10mごとに区切って区画ごとに全ての出現種を記録する

可能な限り多くのデータを取って定量的に評価する

2013年度環境アセスメント学会研究発表

植物調査の精緻化とその効果

大井和之 (一財)九州環境管理協会
矢原徹一 九州大学大学院理学研究科

自然環境項目の「植物」の特徴

- 環境に応じて多くの種が存在
- 移動性が小さい
- ほかの生物の生息基盤・共生関係
- 比較的, 同定・確認が容易

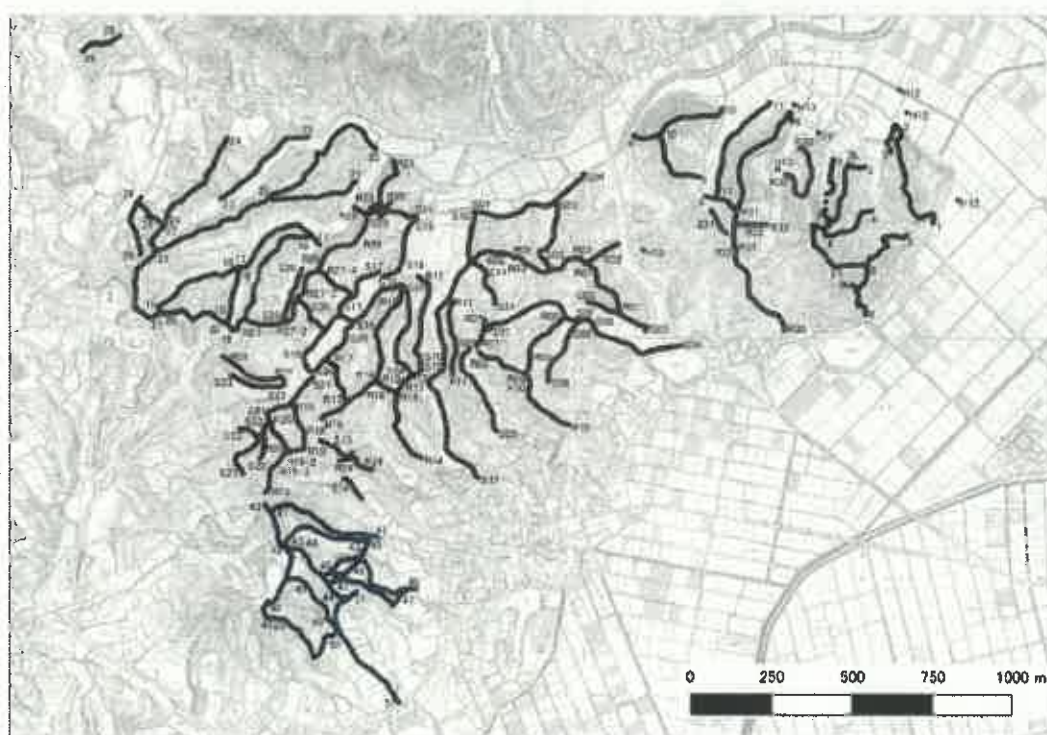


踏査距離を稼げば網羅的な調査が可能

「事業対象地域内に生育する植物を1種も絶滅させない」
(九州大学統合移転事業)

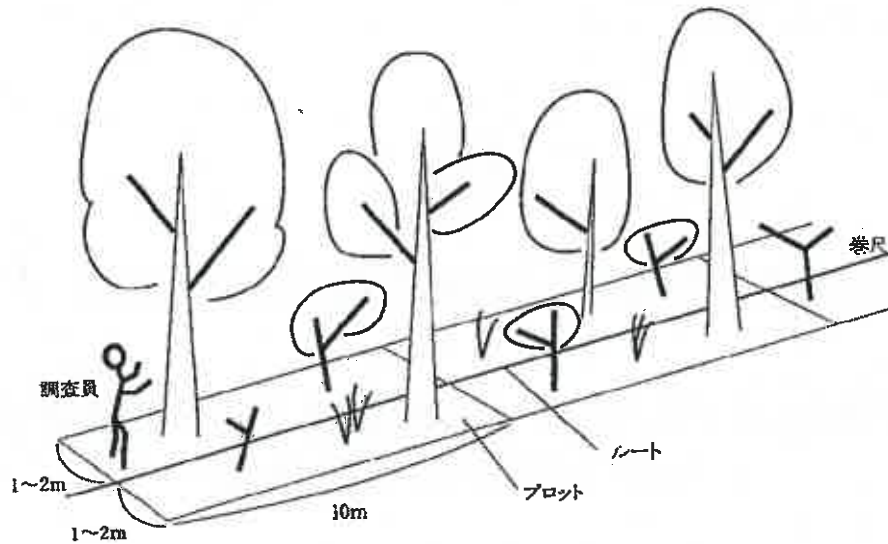
3年かけた植物調査

九州大学伊都キャンパス 275haの用地内に24kmの調査ルート。



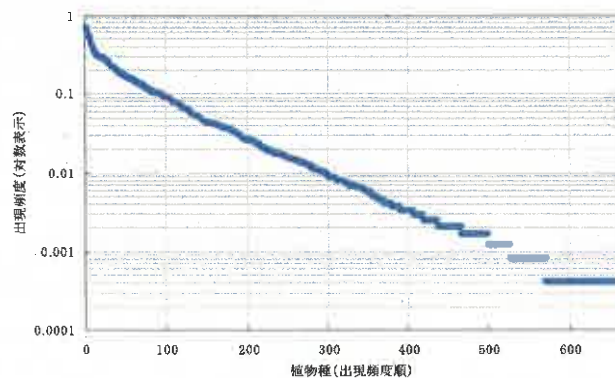
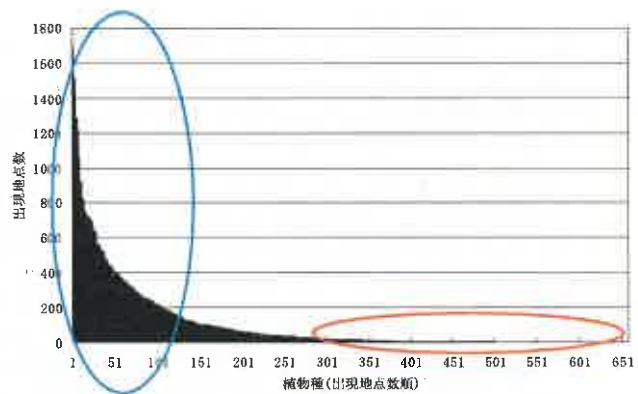
調査方法

- 尾根筋・谷筋に沿って踏査ルートを設定
- ルート上を10mごとに区切って出現種を記録



調査結果

- 658種 × 2398地点
- 7万レコード
- レコードの8割は上位2割, 132種で占める
- 10地点以下でしか確認されていない種が4割
- ロングテール



このデータをどう活用すればよいか

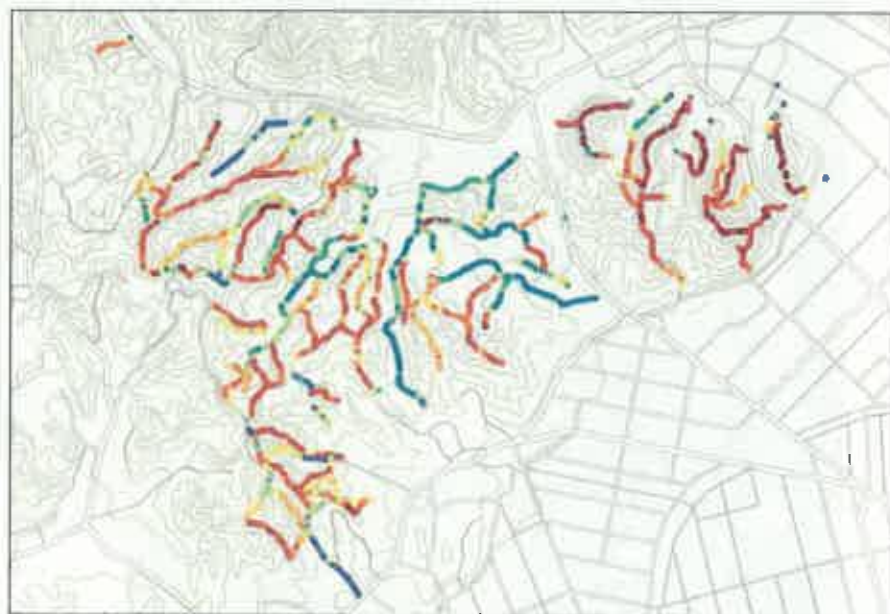


(例1) Twinspanにより出現種で地点を分類:

大きく尾根筋と谷筋で分かれる

尾根筋: 広葉樹二次林 ● (orange) ・ヒノキ人工林 ● (red) ・モウソウチク林 ● (yellow)

谷筋: 路傍 ● (dark blue) ・休耕田 ● (light blue) ・樹林内 ● (green)



優占種をみているだけ。

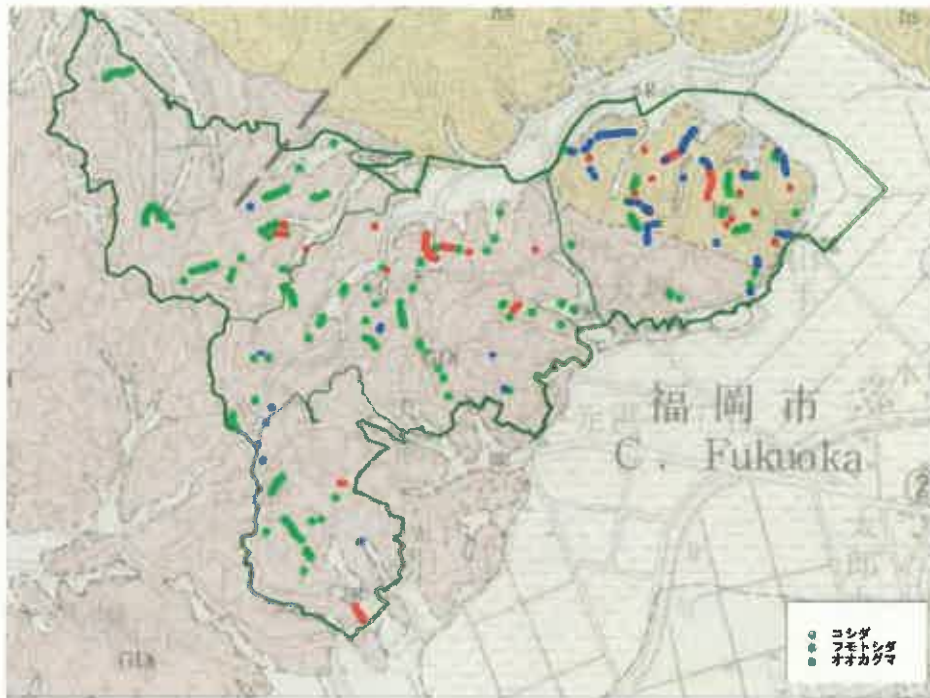
精緻な調査で得た情報をかなり無駄にしているのではないか。



(例2) エゴノキは西側, クチナシは東側に局在,
ヤマツツジは全域に点在



(例3)オオカグマが北東部に局在するのは、土壌・地質と関係あり？

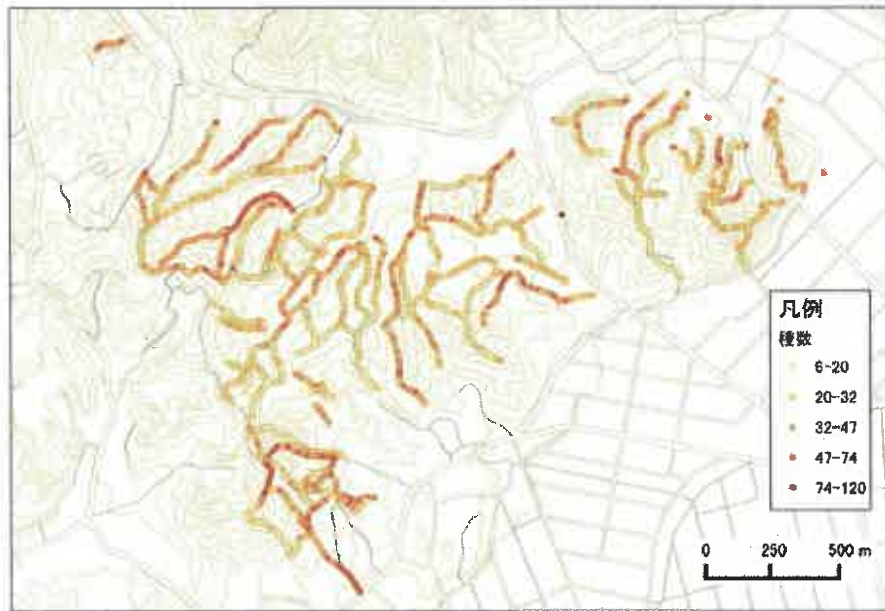


注目種に関しては、興味深い情報を引き出すことができる。

では、どうやって注目種を選び出す？

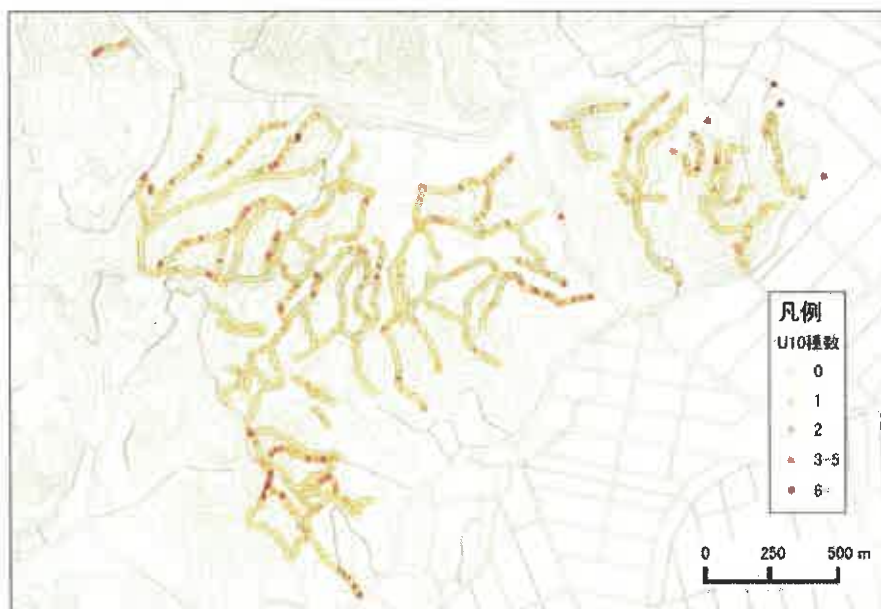


(例4) 地点ごとの出現種数。谷沿いのルート(林縁・明るい草地が多い)で出現種数が多くなる傾向。

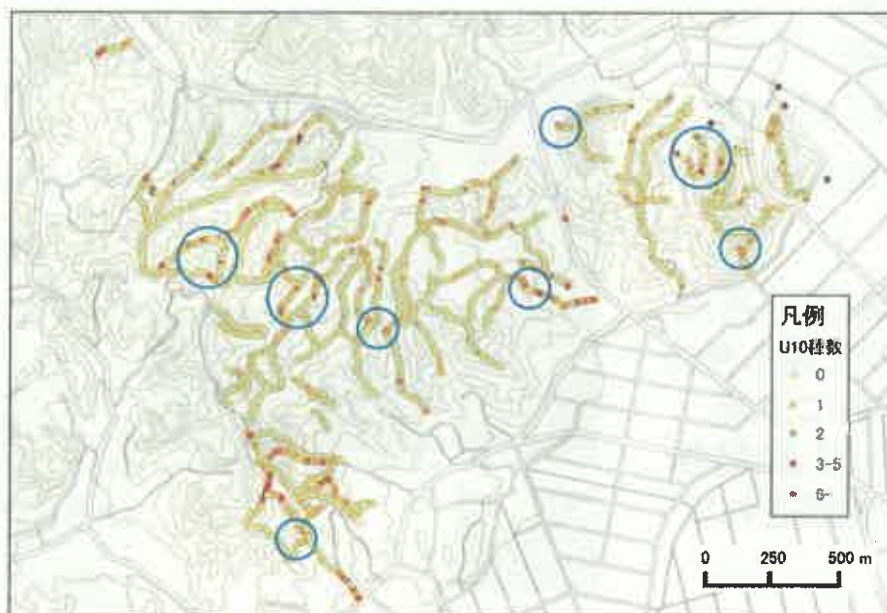


少数派に注目

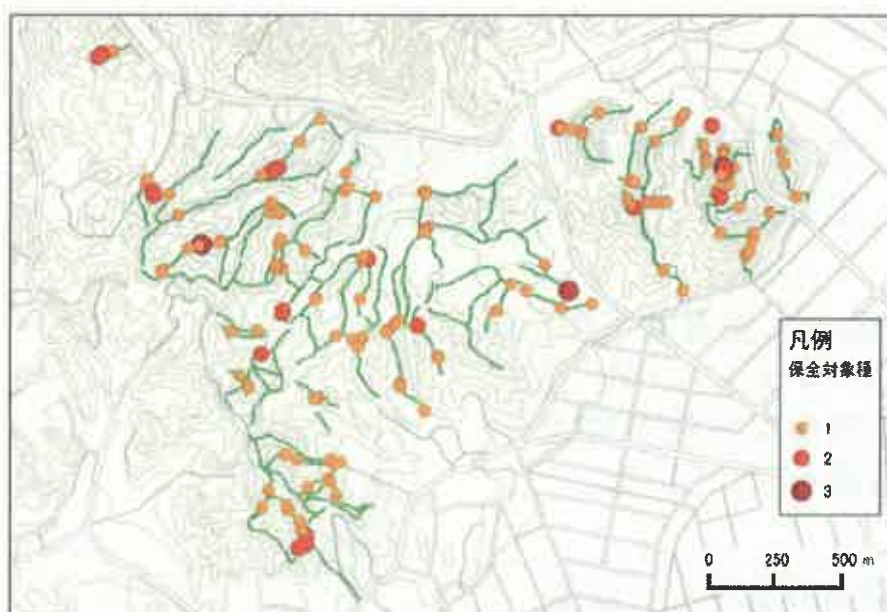
10地点以下でしか記録されなかった289種(希少種)の地点別出現種数。集中している地点(ホットスポット)がある。



希少種(U10)には草本・外来種も多かった。
 一方、尾根筋にも希少種の多い地点があり、そういう地点には、消失するおそれの強い木本植物が生育。



希少種(U10)にはRDB掲載種も含まれる。それ以外にも、
 事業による改変で消失するおそれの強いもの約35種を
 保全対象とした。



保全の実施

- 残置緑地100ha
- 高木移植
- 根株移植
- 林床ブロック移植
- 個別の移植

10年経過して、昆虫や水辺の生物も含めて、造成前に生息・生育していた動植物の多くは維持されている。

九州大学伊都新キャンパス
Home >> キャンパスと周辺地図 >> フォトアーカイブス >> 生物多様性保全ゾーン (その他)
キャンパス紹介 フォトアーカイブ

Photo Archives

樹木の移植

高木移植 (移植中) 高木移植 (移植直後) 回復する高木移植地

根株からの萌芽 根株移植された様子

林床土ブロック (移植前) 林床土移植地 (H14.4) 林床土移植地 (H15.4)

【生物多様性保全ゾーン】

■ 保全緑地と生物多様性保全ゾーン

新キャンパス周辺は、田園や山林等が残る自然に恵まれた地域です。新キャンパス内に建設する施設群と周辺地域の緩衝帯として、キャンパス周辺の緑地を保全し、周辺自然環境や気候環境との調和を図ることを考えています。これらの緑地の保全・活用を図ることに加え、開発によって失われる緑地の回復に努めています。また、用地内で確認されている老齢の常緑広葉樹二次林、ヒノキ人工林等の注目すべき植物群落を保全するとともに、周辺地域の貴重な水源の一つである「差の神」の湧水の西側の沢地を「生物多様性保全ゾーン」として保全し、多様な生物種の保全と生態系の連続性に配慮しました。生物多様性保全ゾーンでは、シヤクモ、ナンゴクデンジソウ、カスマサジョウワオ、ホッケミスムシ、ゲンジボタル等の貴重種をはじめとする野生動物の保全を図っています。

出典：九州大学ホームページ
<http://suisin.jimu.kyushu-u.ac.jp/showcase/photo/biodeversity/ot.html>

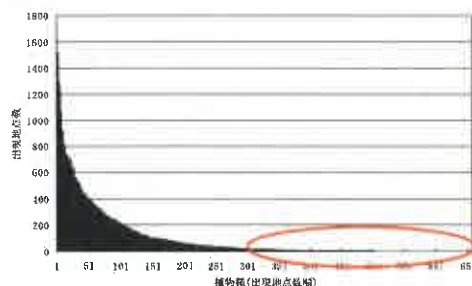
精緻な植物調査によって、RDB等の外部基準によらず当該事業での「重要種」を選定して、保全を実施した。

...

九大移転事業だからできたこと？
どこまでアセスにコストをかけるべき？

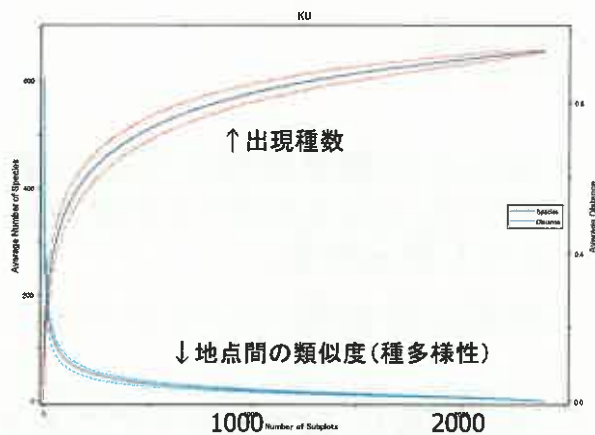
「わずかな地点に生育する多くの植物種」(ロングテール)が、昆虫や菌類等と豊かな生物多様性を形成する基盤となっている。

広いすそ野を見逃さない調査

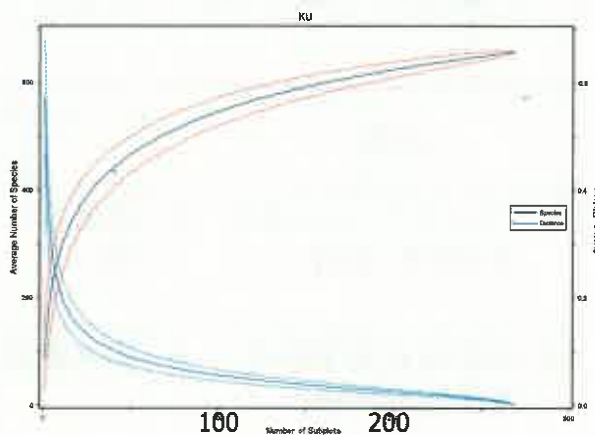


すそ野を拾う調査 10m区画

- 地点数を減らす（距離を短くする）と出現種数が減少する。
- 区画を粗くすると全体に対する部分の種多様性評価が粗くなる。→希少種の抽出力が下がる。
- しかし、今回のデータでは100m区画U5の269種中261種が10m区画U10と共通だった。

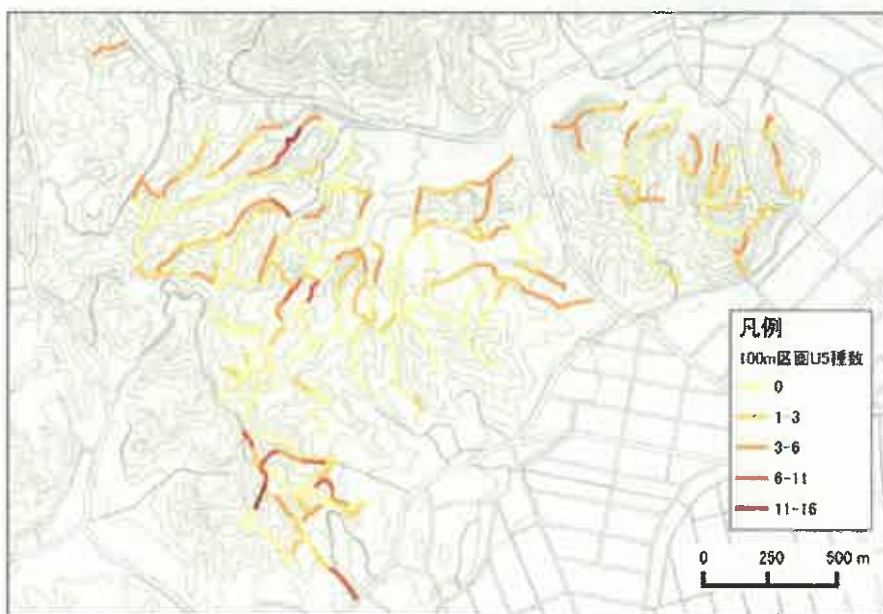


100m区画



踏査距離は可能な限り長さを維持する。
区画の区切りは粗くしてコストダウンが可能。

(100m区画U5の出現種数でもホットスポットを抽出)



まとめ

- 地域の生物多様性の保全に有効な、地域の希少種の分布・ホットスポットの存在は、精緻な植物調査によって得られる。
- 地域の希少種(ロングテール)にもっと注目を！



少数派に目を向けてこそその生物多様性保全

効果	コスト(人・時間)がかかる理由	対策
<ul style="list-style-type: none">● 「ロングテール」種を多く発見・記録	<ul style="list-style-type: none">● 調査ルートが距離が長い	<ul style="list-style-type: none">● 調査ルートは尾根・谷に沿って可能な限り長くとる
<ul style="list-style-type: none">● 出現地点数で種の希少性を評価	<ul style="list-style-type: none">● 調査区画が細かい	<ul style="list-style-type: none">● 区画数が多いければ100m区画に粗くしても評価可能

2. 生態系・生物群集評価の事例

生物生息空間モデル

- 指標種のニッチモデリングと発想は同じ
- 指標種ではなく生物群集を用いた
- 群集のタイプ分け(TWINSPAN)
- 環境データとの関連づけ(分類木)

3. 環境DNA分析の事例

環境DNAとは

- 河川や池、海の水には、生息する生物から剥がれ落ちた皮膚粘膜や排泄物等に含まれる細胞が、微量ではあるが水中に漂っている。
- このような水に懸濁する生体以外の細胞由来のDNAを環境DNAという。
- 水中の懸濁物を濾しとってDNAを抽出し、これを鋳型として特定のDNAだけを増やすPCR反応によって、分析対象種の環境DNAを検出することができる。
- また、最近では特定の対象種のDNAを検出するのではなく、魚類や昆虫類といったレベルで特定の領域のDNAを増幅し、次世代シーケンサーを用いて増幅されたDNAの塩基配列を数万個解析して、その場に生息する生物を網羅的に把握する手法も開発されている。

環境アセスメント学会2014年度研究発表会
9月21日 千葉大学

環境DNA分析の 環境調査への活用



大井和之*, 大城戸博文, 柴田幸次
一般財団法人九州環境管理協会 環境部

環境DNAとは

湖沼や河川の水から直接抽出したDNAを指す。

環境中の水には、大きな生物の老廃物や微生物の細胞が含まれる。

得られたDNAはさまざまな生物由来のDNAの混合物。

近年、淡水域の魚類等の大型生物の生息情報収集に適用されるようになってきた。



出典：土居（広島大）

アセスの生物調査の課題

- 重要種の生息環境への影響低減が求められる。



重要種の生息範囲や行動・生活史の把握が必要。

- 直接観察や捕獲により得られる情報量は多くない。



丁寧な調査をしようとするコストがかかる。

現地では採水するだけで重要種の生息情報が得られるならば調査が効率化すると期待

環境DNA分析の流れ

- (1) 対象種の決定

調査対象となる生物種(重要種)を選定する。予備実験やPositive Controlとして用いるため対象種の標本からDNAを抽出する。

- (2) 既存の知見の整理

データベースを活用して、対象種の遺伝子情報が掲載されている既存の論文やDNA配列データを探索する。

- (3) 予備実験(プライマー設計)

既存論文やDBの塩基配列を参考に、対象種の検出に用いる「プライマー」を設計する。検出能力を評価するために複数の候補を比較しながら条件検討を行う。

- (4) 本実験

採取した水試料からDNAを抽出し、対象種を検出するプライマーを用いて「PCR」または「定量PCR」によりDNAの増幅の有無を試験する。

オオサンショウウオの生息分布調査

- 特別天然記念物のオオサンショウウオの分布状況を知るため、11地点で採水し環境DNAを得た。
- 種特異的プライマーを用いた定量PCRにより、オオサンショウウオDNAを11地点中3地点で確認した。



●川の水を汲んで生きものの分布を調査する



サンプリング

川の水を3Lポリタンクに採取。

47mmまたは90mm径のガラスファイバーフィルターGF/F(有効径0.7 μ m)でろ過。

●川の水を汲んで生きものの分布を調査する



DNA抽出

- 3Lの水をろ過したろ紙をチューブに入れる。
- 溶解液(AL)でひたひたになるように湿らせる。
- 56°Cで1時間。
- 遠心して溶液を下に集める。
- シリカカラムを使ってDNAを抽出・精製。

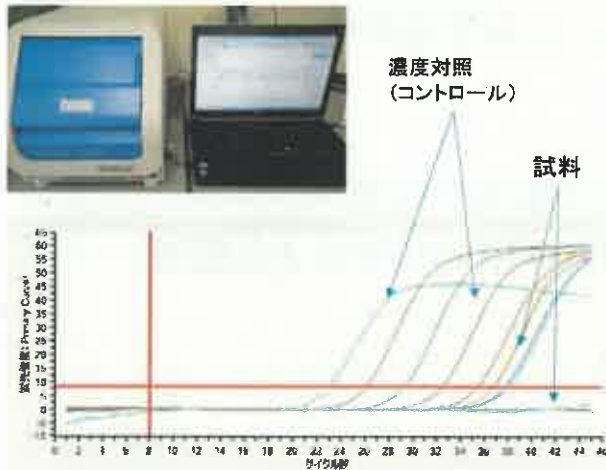


このDNA抽出法を確立したことが研究成果

●川の水を汲んで生きものの分布を調査する

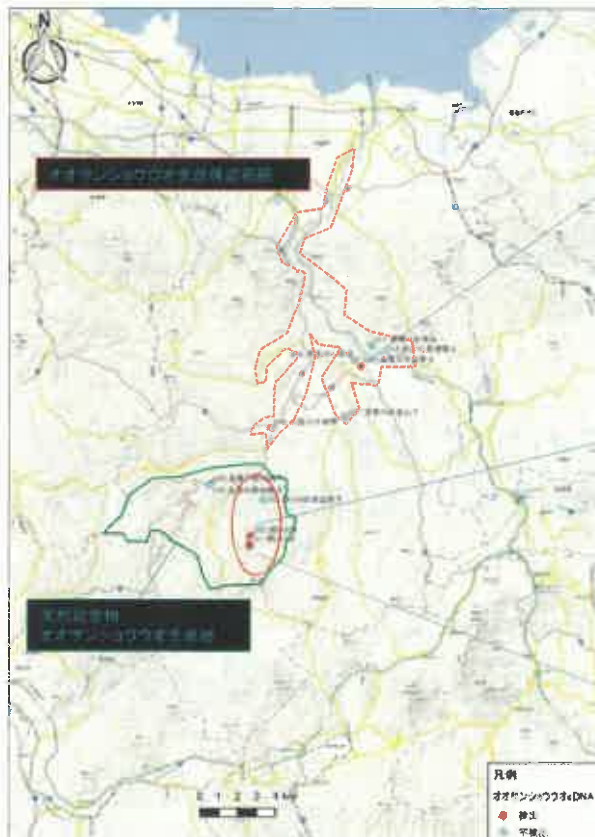
リアルタイムPCR

- 同一試料を3回分析。
- 1回でも検出されれば検出。
- 11地点中3地点で検出。
- これまでの目視確認情報と整合。



地点	検出
U01岡川	○1/3
U02岡川	○1/3
U03岡川	×0/3
U04温見川	×0/3
U05温見川	×0/3
U06日岳川	×0/3
U07深見川	×0/3
U08深見川	×0/3
U09津房川	○1/3
U10佐田川	×0/3
U11津房川	×0/3

●川の水を汲んで生きものの分布を調査する



U09津房川



U02岡川



U01岡川

4. 動物の行動圏調査の事例

哺乳類・鳥類の個体識別について

- 生態系指標種の調査においては、大型動物を個体識別した上で、営巣地・採餌場・なわばり等の行動別利用環境を把握
- 事業による影響は改変区域に生息する個体の利用状況から予測

このため、行動圏調査には個体識別が必要

- 体色や模様、羽根の欠損等の形態的特徴による識別
- DNA分析による個体識別

ネコの個体識別・父親推定

- 福岡県新宮町の相島は漁業の島。人口よりも多いネコが群れを作って生活している。
- 30年以上前から九州大学理学部の動物行動生態学の研究フィールドとなってきた。
- 形態に基づく個体識別
- 何度も交尾が行われる恋の季節を経て、春先に生まれた仔猫、母ネコはわかるけれど父親は誰かわからない。
- そこで、DNA鑑定で父親推定を行う。
- NHK ダーウィンが来た！で2016年に引き続き来週・再来週にも放送。

父親推定 (DNA鑑定)

塩基配列に2塩基または4塩基の繰り返しが生ずる部分が十数回並び、繰り返しの回数がとても変化しやすい部分 (short tandem repeat) を「マイクロサテライト」とよぶ。

マイクロサテライト配列を適切なプライマーを用いてPCRで増幅し、そのDNAフラグメントの長さをDNAシーケンサーを使って分析する。

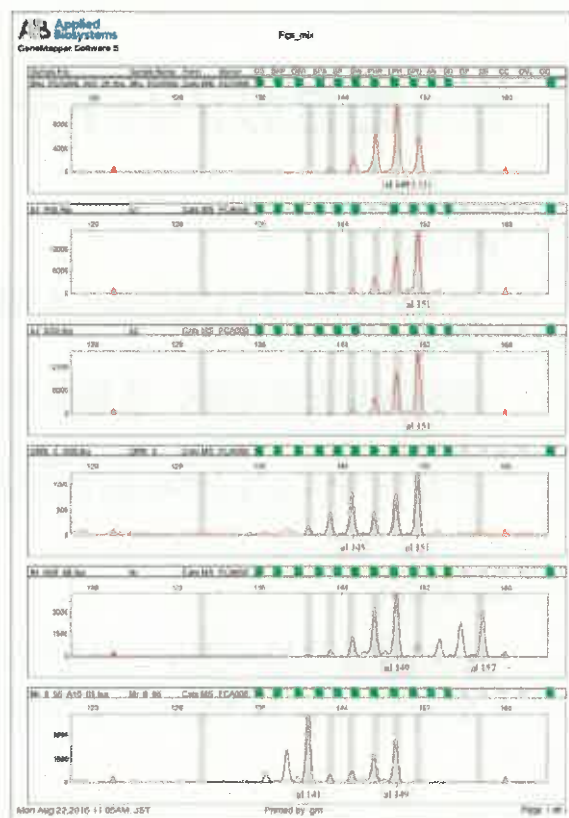
仔猫は母親から1つ、父親から1つの遺伝子を受け継いでいる。仔猫と共通の遺伝子を持たない個体は父親候補から除外する。

複数の遺伝子座で全て除外されなかった個体が父親と推定される。

DNA抽出
↓
PCR
↓
フラグメント解析



DNAシーケンサー



		FGA023	FGA094	F41	FCA240	FCA008	FCA126	FCA078	FCA096	FCA090
母	ミュー	138 140	227 239	176 176	160 170	149 151	145 149	191 191	207 211	111 119
仔1	白	138 140	229 239	176 176	170 ♂	151 151	143 145	191 191	207 211	111 111
父親候補	クロモ	138 148	217 217	171 179	160 ♂	149 157	143 149	198 198	211 211	95 111
父親候補	マルモ	138 144	217 232	171 179	160 ♂	141 149	145 148	196 196	211 211	119 119
父親候補	シンノスケ	128 148	217 239	179 179	170 ♂	148 151	148 148	198 198	211 221	111 119
父親候補	オレンジキジ	138 140	227 239	176 176	170 ♂	145 151	143 149	191 191	205 207	95 111
父親候補	コムキ	138 140	217 239	176 179	160 ♂	141 151	145 148	191 196	211 211	119 119
父親候補	チャー	138 138	217 217	176 179	174 ♂	151 157	143 148	198 198	207 207	95 111
父親候補	オーアンチャン	140 148	239 239	179 180	158 ♂	149 149	143 149	198 198	199 205	119 119
父親候補	ゲン	128 148	227 239	179 179	158 ♂	143 151	148 149	198 198	205 221	119 119
父親候補	シャーム	138 144	235 239	176 176	158 ♂	131 151	145 148	191 198	207 211	111 121
父親候補	チャトラン	128 144	217 227	171 176	174 ♂	143 151	148 148	198 198	207 211	107 119

		FGA023	FGA094	F41	FCA240	FCA008	FCA126	FCA078	FCA096	FCA090
母	ミュー	138 140	227 239	176 176	160 170	149 151	145 149	191 191	207 211	111 119
仔2	黒キジ	138 140	227 239	176 176	180 170	151 151	145 148	191 191	207 207	111 111
父親候補	クロモ	138 148	217 217	171 179	160 ♂	149 157	143 149	198 198	211 211	95 111
父親候補	マルモ	138 144	217 232	171 179	160 ♂	141 149	145 148	196 196	211 211	119 119
父親候補	シンノスケ	128 148	217 239	179 179	170 ♂	148 151	148 148	198 198	211 221	111 119
父親候補	オレンジキジ	138 140	227 239	176 176	170 ♂	145 151	143 148	191 191	205 207	95 111
父親候補	コムキ	138 140	217 239	176 179	160 ♂	141 151	145 149	191 196	211 211	119 119
父親候補	チャー	138 138	217 217	176 179	174 ♂	151 157	143 148	198 198	207 207	95 111
父親候補	オーアンチャン	140 148	239 239	179 180	158 ♂	149 149	143 149	198 198	199 205	119 119
父親候補	ゲン	128 148	227 239	179 179	158 ♂	143 151	148 149	198 198	205 221	119 119
父親候補	シャーム	138 144	235 239	176 176	158 ♂	131 151	145 148	191 198	207 211	111 121
父親候補	チャトラン	128 144	217 227	171 176	174 ♂	143 151	148 148	198 198	207 211	107 119

X染色体上の遺伝子

母ネコの遺伝子型

赤字は遺伝子型の判定が不確実なもの

母ネコ由来の遺伝子型

父ネコ由来の遺伝子型

両親いずれか由来の遺伝子型

仔猫に伝わった可能性のある遺伝子

仔猫に伝わった可能性のある遺伝子

父親候補から除外する根拠

群れのリーダー的個体クロモ、マルモではなく、交尾が観察されていた飼猫のシンノスケでもなく、事前にもあまり観察されていない個体(オレンジキジ)が父親だった。

ネコの遺伝子型判定結果

DNA鑑定のメリットデメリット

メリット

- ・マイクロサテライトマーカーが確立していれば、精度の高い同定が可能
- ・個体識別だけでなく、性別判定、親子鑑定もできる
- ・キツネ、テン、ツキノワグマなど、夜行性で直接観察が難しい哺乳類でも、ヘアトラップや糞で個体識別が可能

デメリット

- ・現地調査(サンプリング)はセンサーカメラなどに比べて大変
- ・分析コストは低下しているがそれなりにかかる