

羽毛サンプルを用いた遺伝子鑑定による カワウ *Phalacrocorax carbo* Linnaeus の性判別

谷 良夫*

Chromosome-specific intron size differences in the CHD gene
provide an efficient method for sex identification
in Great Cormorant *Phalacrocorax carbo* Linnaeus.

Yoshio Tani*

Abstract : PCR-based approaches for sex discrimination in the Great Cormorant *Phalacrocorax carbo* were tested using 13 individuals and many sets of primers (Xho1/Xho2, P2/P8, 2550F/2718R and 1237L/1272H) for the amplification of the avian sex-specific CHD (chromo-helicase-DNA-binding protein) gene. We designed new primer sets named Z001F/Z640R and W035L/W428R. We also evaluated each set of primers in providing the sex for each individual. For DNA extraction, we just collected natal downs from the individual that we released after ringing. Even in samples of low DNA yield, Z001F/Z640R and W035L/W428R provided a band pattern for each sex, easily distinguishable with agarose gel electrophoresis, which correctly identified all the individuals. But the other primer sets did not produce reliable results. Compared with the other primer sets that have been reported, the Z001F/Z640R and W035L/W428R primer sets are more accurate, less invasive and widely applicable for sex discrimination in the Great Cormorant.

はじめに

SSH (スーパーサイエンスハイスクール) の指定を受けている兵庫県立尼崎小田高等学校では、8 人の生徒(小阪田悠生, 北浦大樹, 田崎渚, 福嶋直人, 今村拓未, 大塚輝人, 田中健太, 入江祐樹)で鳥類研究班をつくっており、毎月 1 回西宮市と尼崎市の境界を流れる武庫川下流と西宮市の甲子園浜の鳥類観察を行っている。カワウ *Phalacrocorax carbo* は毎回観察することができる大型水鳥である。尼崎市の北側に位置する伊丹市昆陽池にはカワウの集団営巣地があり、カワウの幼鳥に対する標識調査とカラーリングの装着が毎年行われている(須川ほか 2004)。

カワウの羽装は雄雌でほとんど差はない(高野 2007)。

雄は雌よりも少し大きい、野外で見分けることは困難である(福田 2002)。しかし新鮮なカワウの死体の頭骨を 3 箇所測定し、判別式を用いれば成長・幼鳥ともに性判別が可能である(福田 2014)。

性的二型が見られない鳥類については、近年、遺伝子診断による性判別法が試みられてきた(Clinton *et al.* 2001; Griffiths *et al.* 1998; Fridolfsson & Ellegren 1999; Kahn *et al.* 1998; Thanou *et al.* 2013)。鳥類の雌は性染色体 Z と W を持ち、雄は 2 本の Z 染色体を持つ。PCR 法による性判別には、W 染色体の Xho1 領域を増幅する方法があり、汎用プライマーセット Xho1/Xho2 (Clinton *et al.* 2001) が報告されている。Xho1 領域を増幅する場合は W 染色体 (W バンド) のみが増幅される。この場合、W バンドが検出されれば雌 (ZW) で、W バンドが増幅されなければ雄 (ZZ) と判別する。

また性染色体 (Z と W) 上に存在する CHD1Z (Z'

* 兵庫県立尼崎小田高等学校

Hyogo Prefectural Amagasaki-Oda High School

2016年3月31日受理

chromo-helicase/ATPase-DNA binding protein 1) 領域と CHD1W 領域を増幅する方法があり、汎用プライマーセット P2/P8 (Griffiths *et al.* 1998), 2550F/2718R (Fridolfsson & Ellegren 1999) および 1237L/1272H (Kahn *et al.* 1998) などが鳥類性判別用に報告されている。この場合は Z 染色体 (Z バンド) と W 染色体 (W バンド) の両方を同時に増幅する。このため Z 染色体と W 染色体で標的イントロンの塩基長の違いが十分あれば Z バンドと W バンドとして、Z 染色体と W 染色体を区別して検出することができる。バンドが 2 本検出されれば雌 (ZW) で、Z バンドのみ 1 本検出されれば雄 (ZZ) と判別できる。ヨーロッパのウ科 3 種の性判別の際にプライマー 2550F/2718R が有効であると示されている (Thanou *et al.* 2013)。

筋肉 (Thanou *et al.* 2013) や血液 (市川ほか 2006) サンプルから DNA を抽出し、遺伝子解析を行うことが一般的であるが、脇坂ほか (2014) 最近では初羽毛サンプルからの DNA によってケリの性判別を行い、研究材料をできる限り傷つけない方法として確立しつつある (脇坂ほか 2013)。

以上の方法を適用し、鳥類研究班の生徒たちとともに、伊丹市昆陽池に生息するカワウの羽毛を材料として、遺伝子による性判別を行ったので、ここに取りまとめて報告する。

方法

2015 年 5 月 23 日、兵庫県伊丹市昆陽池のカワウ集団営巣地において行われた鳥類標識調査に参加し、カワ

表 1 解析個体一覧表
標識地点は兵庫県伊丹市昆陽池公園であった。
GR : 金属足環のサイズ番号, CR : カラーリング, NW : 自然翼長 (mm), W : 体重 (g), TL : 跗蹠長 (mm)

GR	CR	NW	W	TL
13D-08003	青-232	112	1100	58.3
13D-08012	青-241	235	2000	64.0
13D-08013	青-242	215	1900	66.0
13D-08015	青-244	220	2000	65.1
13D-08016	青-245	206	1500	62.0
13D-08017	青-246	177	1400	61.4
13D-08018	青-247	230	1850	63.8
13D-08019	青-248	255	2100	66.6
13D-08020	青-249	249	2250	67.2
13D-08021	青-270	165	1250	59.4
13D-08022	青-271	179	1550	62.3
13D-08023	青-272	240	1800	65.0
13D-08024	青-273	240	2150	63.8

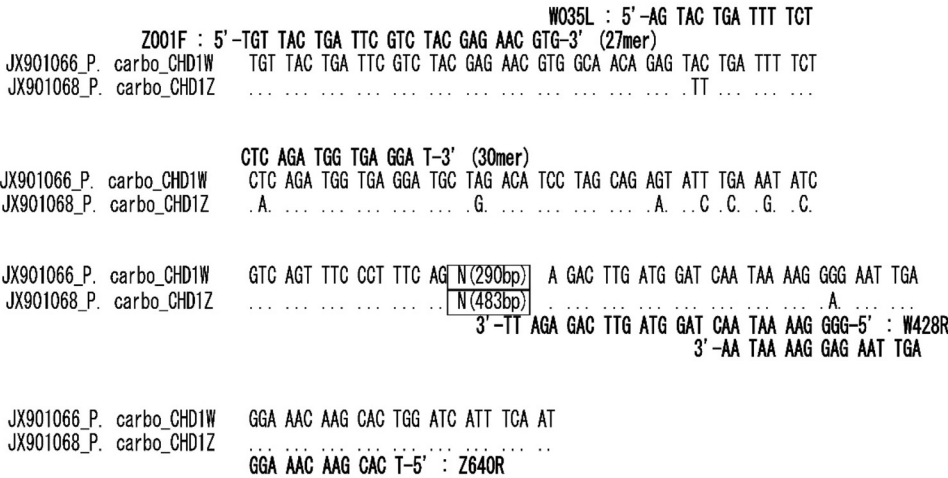


図 1 プライマー (Z001F/Z640R と W035L/W428R) および CHD1 領域の塩基配列
CHD1W のイントロンは 290bp, CHD1Z のイントロンは 483bp であった。

ウの幼鳥 13 個体 (表 1) から羽毛を採取した。本調査は鳥類標識調査員片岡宣彦氏・須川恒氏がカワウの移動範囲を調べる目的でカラーリングを装着する調査の一環として行った。カワウのカラーリング装着や羽毛等の DNA サンプル採取の学術許可は兵庫県から取得済である。採取した羽毛は茶封筒に個別に厳封し、帰校後エタノール中に保存した。DNA エキストラクター FM キット (和光純薬) を用いて DNA 抽出を行った。

データベースよりカワウの CHD1Z 領域のデータ (JX901068) をダウンロードし, Primer 3 (v. 0.4.0) によりプライマーセット Z001F/ Z640R (Z001F : 5'-TGTTACTGATTTCGTCTACGAGAACGTG-3', Z640R :

5'- AGTGCTTGTTTCCTCAATTCTCCTTTTATT -3') (図 1) および Z072F/ Z640R (Z072F : 5'- ATCCTAGCAGAATATCTCAAGTACCGTCAG-3', Z640R : 5'-AGTGCTTGTTTCCTCAATTCTCCTTTTATT -3') を設計した。CHD1W 領域のデータ (JX901066) をダウンロードしプライマーセット W035L / W428R (W035L : 5'- AGTACTGATTTTCTCTCAGATGGTGAGGAT -3', W428R : 5'- CCCCTTTTATTGATCCATCAAGTCTCTAA -3') を設計した (図 1)。

PCR 反応液は 10 μ M プライマーを各 2 μ L (2 $\times$ 2 μ L = 4 μ L), 2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX Neo 10 μ L, KOD FX Neo (1 U/ μ l) 0.5 μ L, 鋳型 DNA 溶液 2 μ L, 2 μ M dNTPs 3.5 μ L をよく攪拌し計 20 μ L 調整

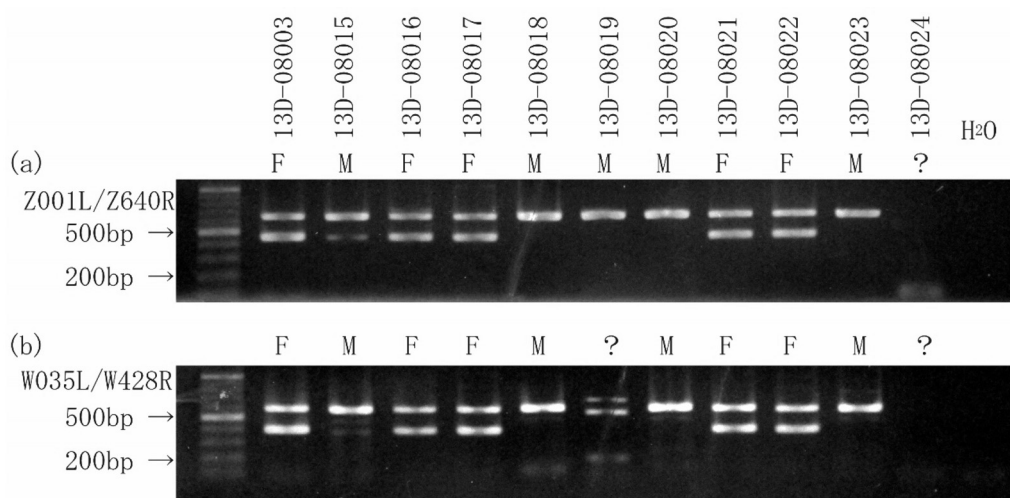


図 2 プライマー Z001F/Z640R および W035L/W428R による DNA 増幅結果

アニーリング温度は (a) : 60 $^{\circ}$ C, (b) : 55 $^{\circ}$ C。増幅サイクルは共に 45 サイクル。H₂O はネガティブコントロール。13D はリングサイズ, 080** はサンプル番号 (リング番号)。M (雄) および F (雌) は性判別結果。

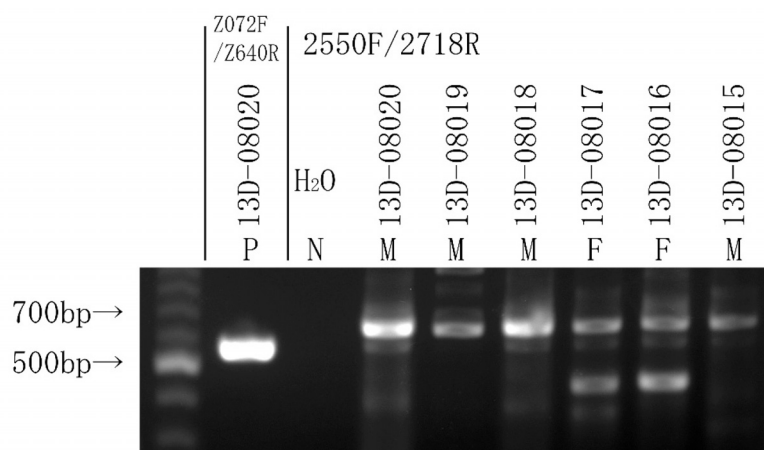


図 3 汎用プライマー 2550F/2718R による DNA 増幅結果

アニーリング温度は 50 $^{\circ}$ C。増幅サイクルは 40 サイクル。

13D はリングサイズ, 080** はサンプル番号 (リング番号)。M (雄) および F (雌) は性判別結果。N (H₂O) はネガティブコントロール。P (13D-08020) はポジティブコントロール。P のプライマーは Z072F/Z640R。

した。0.2mL PCR チューブに注入し、ASTEC 製サーマルサイクラーPC-708 を用いて PCR 反応を行った。この反応液を 94℃ 4 分間初期加熱した後、94℃ 15 秒の熱変性・50℃ から 60℃ 15 秒のアニーリング・68℃ 30 秒の伸長反応を 38 から 45 サイクル行った後、68℃ 7 分間伸長反応を行い、10℃ で保存した。2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、Z および W バンドを確認した。

切り出したバンドを Roche High Pure PCR Product Purification Kit を用いて精製し、北海道システムサイエンス社に委託して上流と下流から塩基配列を解読した。データは MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS 6 (MEGA6, Tamura *et al.* 2013) でアラインメントし、上流と下流から解読したデータが完全に一致する部分を解析に用いた。National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いてデータベース検索を行った。

結 果

新たに設計したプライマー Z001F/Z640R と W035L/W428R を用いた性判別を行った。両者の結果はすべて一致した。13 個体すべてについて約 600bp の Z バンドが確認された。さらに個体 08003・08016・08017・08021・08022 の 5 個体については約 400bp の W バンドが確認された (図 2, 表 2)。うまくバンドが見られなかった個体 (08019, 08024) についても、再度 DNA 抽出と PCR 法による DNA 増幅を行うことで良い結果が得られた (表 2)。PCR 法による DNA 増幅においてアニーリング温度を 50℃ から 60℃ の間で変化させたが、すべての温度条件で同じ性判別結果が得られた。サイクル数は 38 サイクルから 45 サイクルの間で変化をさせたが、すべての条件で同じ結果が得られた。

個体 08021 および 08022 の W バンド (約 400bp)、個体 08022 および 08023 の Z バンド (約 600bp) を上流と下流からシーケンスした結果、個体 08021 および 08022 の W バンドでは、276bp についてノイズもなく上流と下流で配列が一致した。また両個体の塩基配列は完全に一致した。NCBI の BLAST を用いてデータベース検索をおこなったところ、カワウの CHD1W 領域のデータ (アクセッション番号 ; JX901066) と 100 % 一致した。個体 08023 の Z バンドについては 568bp についてノイズもなく上流からと下流からの配列が一致した。検索をおこなったところ、カワウの CHD1Z 領域のデータ (JX901068) と 99% 一致した。今回解読した各配列は DNA Data Bank of Japan (DDBJ) を通じて国際塩基配列データベース (International Nucleotide Sequence Database : INSD) に登録した (LC122685-LC122687, 表 2)。個体 08022 の Z バンドについては、ノイズが入り配列の解読は困難であった。

既報の各性判別プライマー Xho1/Xho2, P2/P8, 1237L/1271H および 2550F/2178R による DNA 増幅では、はっきりとしたバンドが出ないか、もしくは Z バンドのみが検出され、同時に不明なバンドやスミア (いろいろな長さの DNA が数多く増幅された結果、雲のように光る現象) が多く見られた (図 3)。ただし、プライマー 2550F/2178R による DNA 増幅では、条件と DNA サンプルによっては Z バンドおよび W バンドが見られた (図 3)。個体 08016 と 08017 ではアニーリング温度 50℃ で Z および W の 2 本のバンドが確認できた (図 3) が、55℃ に上げると Z バンドはより強調され、W バンドは非常に薄くなった。

考 察

Z および W バンドの配列データをデータベースと照合した結果から、今回設計したプライマーは目的通り CHD1 領域を増幅したと考えられる。よって、個体番号 08003, 08016, 08017, 08021, 08022 の 5 個体は Z および W 染色体を持つ個体であり雌 (ZW) であると推測できる (表 2)。個体番号 08012, 08013, 08015, 08018, 08019, 08020, 08023, 08024 の 8 個体は、Z 染色体のみを持つ個体であり雄 (ZZ) であると推定できる (表 2)。

いろいろな条件で実施した結果を踏まえ、以下のカワウの性判別用プロトコルを推奨する。アニーリング温度は 58℃、サイクル数は 38 サイクルで PCR 法による DNA 増幅を行う。結果が出なかったサンプルは再度 DNA 抽出と DNA 増幅をやり直す。

既報の各汎用プライマーによる性判別では、あまり良い結果が得られなかった。先行研究では血液や筋肉から抽出した DNA サンプルが主に解析されていたが、今回は初羽毛から抽出した DNA サンプルであったことが原因であろう。DNA 濃度が低かったのではないかと思われる。2550F/2178R については、抽出に用いる羽毛の量を増やすなど、実験条件を再検討して実施すれば、的確に性判別を行えるようになるかもしれない。ただしこの 2550F/2178R については、アニーリング温度を上げると W バンドが出にくくなるので、雌 (ZW) を雄 (ZZ) と誤認することがないように慎重に実験を実施する必要がある。

鳥類標識調査と並行して行う場合は、個体に負担をかけないことから羽毛サンプルからの DNA 抽出が適していると思われる。今回設計した Z001F/Z640R および W035L/W428R は種特異的であり、かつ塩基長が長いので、低濃度の DNA サンプルでも、またいろいろな DNA 増幅実験条件でも、安定した結果を得ることができたと考えられる。

既報の性判別プライマーは長い間利用されてきた実績のあるプライマーである。今後、Z001F/Z640R および W035L/W428R の信頼性を高めるために、解剖に

より性別がはっきりしたサンプルを使って確認する必要がある。

CHD1 領域の配列はよく似ているため、プライマー 2550F/2178R はヨーロッパ産ウ科に広く利用できる (Thanou *et al.* 2013) ことが報告されている。今回設計したプライマー Z001F/Z640R および W035L/W428R もカワウ以外の日本産ウ科 (ウミウ *Phalacrocorax capillatus* Temminck & Schlegel, チシマウガラス *Phalacrocorax urile* Gmelin, ヒメウ *Phalacrocorax pelagicus* Pallas など) に利用できる可能性があるため、今後、生徒と一緒に確かめていきたい。

兵庫県伊丹市昆陽池における標識調査では野外観察可能なカラーリングも金属足環と同時に装着しており、昆陽池および近くを流れる武庫川などでは複数個体を識別することが可能である。標識調査と並行して調査個体を傷つけない遺伝子解析による性判別を行うことにより、より詳細な、野外観察などによる生態解明が期待される。

今回の活動を通して野鳥観察班の鳥類標識に対する理解と認識は深まった。これからもこの輪を広げ、兵庫県下の高校生の鳥類標識調査に対する理解と認識を深めるとともに、地域の生物多様性の保全に貢献していきたい。

謝 辞

カワウの調査に参加させていただき丁寧にご指導いただいた龍谷大学の須川恒氏、(株)鳥類環境の片岡宣彦氏、伊丹市みどり自然課の高津一男氏をはじめとする調査スタッフの方々に感謝する。また遺伝子解析のご指導をいただいた兵庫教育大学の笠原恵氏、兵庫県立大学大学院環境人間学研究科の脇坂英弥氏に感謝の意を表す。

引用文献

Clinton, M., L. Haines, B. Belloir and D. McBride. 2001. Sexing chick embryos : a rapid and simple protocol. *Bri. Pol. Sci.*, 42 : 134-138.

Fridolfsson, A.-K. and H. Ellegren. 1999. A simple and

universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J. Avian Biol.*, 30 : 116-121.

福田道雄. 2002. カワウ *Phalacrocorax carbo*. 野生生物のダイオキシン類蓄積状況等調査マニュアル, 10-16. <http://www.env.go.jp/chemi/report/h14-06/10-24.pdf>, (2016年2月9日現在)

福田道雄. 2014. カワウの頭骨計測による骨格の性別判定. *Bird Research*, 10 : 25-28.

Griffiths, R., M. C. Double, K. Orr and R. J. G. Dawson. 1998. A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.*, 7 : 1071-1075.

市川あゆみ・市村卓也・中村明弘・野田賢治・加藤泰之. 2006. 遺伝子診断による文鳥の性判別技術. *Res. Bull. Aichi Agric. Res.*, 38 : 175-180.

Kahn, N. W., J. S. John and T. W. Quinn. 1998. Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds. *Auk*, 115 : 1074-1078.

須川恒・片岡宣彦・植田潤・和田岳. 2004. 昆陽池と竹生島にあるカワウのコロニーにおける標識調査. http://www.bird-research.jp/1_katsudo/jiyu/yoshi/yoshi_sugawa.html, (2016年2月9日現在)

高野 伸二. 2007. フィールドガイド 日本の野鳥. 374 pp. 日本野鳥の会, 東京.

Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30 : 2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197 PMID: 24132122

Thanou, E., S. Giokas, V. Goutner, V. Liordos and S. Fraguadakis-Tsolis. 2013. Efficiency and accuracy of PCR-based sex determination methods in the European *Phalacrocoracidae*. *Ann. Zool. Fenn.*, 50 : 52-63.

脇坂英弥・脇坂啓子・中川宗孝・伊藤雅信. 2014. ケリの初毛羽を用いたCHD遺伝子による性判定. *日本鳥学会誌*, 63 : 43-47.