

## 速報

## 森林性希少鳥類アカヒゲの DNA による性判別\*1

関 伸一\*2

キーワード：アカヒゲ, DNA, 性判別

## I. はじめに

鳥類における条件的性比操作は、生活史研究において魅力的な分野の一つである(西海, 1999)。ところが、ほとんどの種では、雛の性は外部形態によって識別できず、研究を進める上での障害となっていた。そのため、近年では生化学的手法の発達にともない、性判別に DNA を用いる多数の方法が報告された(江口, 1999; 西海, 1999に総説)。鳥類では雌が異型配偶子(ZW)を雄が同型配偶子(ZZ)を持つため、この性染色体の違いを調べることで性の判別ができる。なかでも、性染色体上のCHD(chromo-helicase-DNA-binding)遺伝子の塩基配列の違いをPCRによって検出するいくつかの手法は、方法が簡便で大量のサンプル処理が可能であり、また汎用性が高いため、様々な種の研究に用いられている(江口, 1999)。しかし、技術的な問題が完全に解決されているわけではなく、それぞれの種で性判定の信頼性を高めるためには、いくつかの方法を組み合わせたり、性が既知のサンプルで信頼性を確認したりする必要がある(西海, 1999)。

アカヒゲ(*Eritacus komadori*)でも雛の性を外部形態によって判別することは困難である。その一方で、アカヒゲの雛の帰還数には性差があること、1歳以降の生存率には性差が認められることなどから、巣立ち後一年目の分散・生存率等を評価する上では雛の性を判別する必要がある(関, 2002)。また、個体群性比や、環境条件の変化による条件的性比操作の可能性に関するデータは、種の保全をはかる上で重要である(Hayashi *et al.*, 2000)。そこで、外部形態により性がわかっているアカヒゲ成鳥について、血液から抽出したDNAを用いて性判別が可能かどうか検討した。また、アカヒゲの雛の採血については、文化庁と鹿児島県教育委員会により非常に厳しく制限されているため、より影響の少ないサンプルとして排泄物からのDNA抽出と性判別を試みた。

## II. 材料および方法

アカヒゲからの標本採取は、屋久島と奄美大島の間に位置する

トカラ列島中之島の、クロマツ・スダジイの二次林で行った。2002年5月に、営巣が確認されている成鳥の雌雄各10羽を、カスミ網を用いて捕獲し、約20 $\mu$ lの血液を毛細管を用いて採取した。血液はGenTLE solution I (Takara)と攪拌して常温保存し、10日以内にキット(QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。また、各個体の排泄直後の排泄物から、表面の尿部分を採取した。鳥類では尿と糞が同時に排泄されるが、表層の白色部分(尿)にはアカヒゲの腸内粘膜細胞が比較的多く含まれ、餌由来の他の真核生物の細胞の含有率が低いと考えられる。採取には滅菌した綿棒を用い、綿棒をそのまま保存バッファー(150mM NaCl, 10mM EDTA)に入れて冷蔵した(Yamauchi *et al.*, 2000)。排泄物からの試料は、採取から1ヶ月以内に、フェノール・クロロホルム法でDNAを抽出した。

血液から抽出したDNAは、3組のプライマー(2945F/cfR & 3224R Ellegren, 1996; 3007F/3112R, Ellegren & Fridolfsson, 1997; 2550F/2718R, Fridolfsson & Ellegren, 1999)を用いてPCRで増幅し、電気泳動によって性判別を試みた。PCRの条件はEllegren (1996)およびFridolfsson & Ellegren (1999)による。泳動には3%アガロースゲルを用いた。その結果、アカヒゲの性判別に最も適していると判断された方法を用いて、排泄物から得られたDNAの増幅と泳動を行い、性判別が可能であるかどうか試験した。

## III. 結果

プライマー2945F/cfR & 3224Rを用いたPCRでは、雌雄ともZ染色体由来のDNA断片のみが増幅され、雌のW染色体由来の断片は増幅されなかった。そのため、電気泳動パターンには雌雄ともに1本のバンドのみがみられ、性の判別はできなかった。プライマー3007F/3112Rを用いた場合には、Z染色体およびW染色体由来の長さの異なるDNA断片が増幅されたことにより、電気泳動では雄で1本、雌で2本のバンドが検出された。これにより、20個体すべてで性が正しく判別された(図-1)。プライマー2550F/2718Rでは雌雄ともDNA断片の増幅がみられず、全くバ

\*1 Seki, S-I: Molecular sexing of individual Ryukyu Robin, *Eritacus komadori*

\*2 森林総合研究所九州支所 Kyushu Res. Center, For. and Forest Prod. Res. Inst., Kumamoto 860-0862

ンドが検出されなかった。

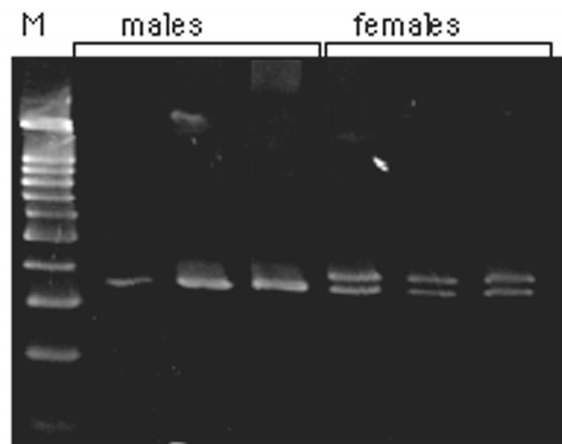


図-1. プライマー 300Fと3112Rにより増幅されたDNA断片の泳動パターン

プライマー 300F/3112Rを用いて、排泄物から得たDNAでPCRを行った結果、雄では10個体中の2個体、雌では10個体中の1個体で、DNA断片が増幅され性が正しく判別された。それ以外の17個体では、明瞭なバンドが検出されず雌雄の判定はできなかった。また、雌雄間違っって判別された個体はなかった。

#### IV. 考 察

アカヒゲでは、プライマー 300F / 3112RとFridolfsson & Ellegren (1999) のPCR条件を用いることにより性が判別され、判別結果の信頼性は高いと判断された。今後はこの手法を用いて雛の性判別を行うことにより、0歳齢での年生存率や分散距離などを性別に評価することが可能となる。

しかし、非侵襲的なDNAサンプリング手法として検討した排泄物の利用は、通常の抽出・増幅手順では困難であった。これは、排泄物中に含まれるアカヒゲの腸内粘膜細胞が微量でDNAの取量が少ないこと、餌由来の他の真核生物のDNAが多く含まれていること (Nota & Takenaka, 2000)、排泄物中にはPCRを阻害する物質が含まれていること (Yamauchi *et al.*, 2000) などによると考えられる。排泄物サンプルを用いた性判別の信頼性を高めるには、今後、これらの問題点を軽減する手法を併用する必要がある。

鳥類の生体からDNAを得る場合には、血液の採取が最も一般的な方法として使われており、他の手法の検討は進んでいない。これは、鳥類の赤血球には核があるために極微量の血液から十分なDNAが得られること、採血手法が確立されその影響がそれほど大きくないと確かめられていることによる (Wingfield, 1999)。Wingfield (1999) では、羽根・卵膜などからのDNA抽出例についても紹介しているが、雛のように成長中の羽根を採集した場合には出血に注意が必要であることを指摘しており、必ずしも採血より影響の少ない方法とは言えない。ヒト、霊長類、家畜、実験動物などを対象とした遺伝的研究では非侵襲的サンプルの利用が進んでおり (Hashimoto, 1996)、今後は鳥類においても非侵襲的で信頼性の高いサンプリング手法の検討が必要であると考えられた。

なお、調査にあたって十島村役場および村役場中之島支所、十島村教育委員会には格別の便宜を図っていただいた。また、川路則友、山根明弘、山内貴義、小倉豪、三谷奈保の各氏には捕獲と性判別についてご助力をいただいた。鹿児島県教育委員会および鮫島正道、井上友里の両氏には捕獲に関して多大なご指導をいただいた。ここに厚く御礼申しあげる。この研究の一部は科学研究費 (若手B) 課題番号14760108によって行われた。

#### 引用文献

- 江口和洋 (1999) 日本生態学会誌 46 : 105-122.  
 Ellegren, H. (1996) Proc. R. Soc. Lond. B. 263 : 1635-1641.  
 Ellegren, H. and Fridolfsson, A. -K. (1997) Nature Genet. 17 : 182-184.  
 Fridolfsson, A. -K. and Ellegren, H. (1999) J. Avian Biol. 30 : 116-121.  
 Hashimoto, C. *et al.* (1996) Primates 37 : 305-318.  
 Hayashi, Y. *et al.* (2000) Jpn. J. Ornithol. 49 : 119-129.  
 西海功 (1999) 日本鳥学会誌 48 : 83-100.  
 Nota, *et al.* (2000) Molecular Ecology 8 : 1235-1238.  
 関伸一 (2002) 九州森林研究 55 : 171-172.  
 Wingfield, J. C. (1999) Minor Manipulative Procedure, (*In* Guidelines to the use of wild birds in research, 2nd ed. Gaunt, A. S. and Oring, L. W. (eds.) 59pp The Ornithological Council, Washington, D. C.), 29-34.  
 Yamauchi, K. *et al.* (2000) J. Vet. Med. Sci. 62 : 669-671.

(2002年12月4日 受理)