



ケリの初毛羽を用いた CHD 遺伝子による性判定

脇坂英弥^{1,*}・脇坂啓子²・中川宗孝³・伊藤雅信⁴

¹ 兵庫県立大学大学院環境人間学研究科 〒670-0092 兵庫県姫路市新在家本町 1-1-12

² 京都工芸繊維大学大学院応用生物学部門 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町 1

³ 巨椋野外鳥類研究会 〒610-0111 京都府城陽市西富野南垣内 13

⁴ 京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター, 昆虫バイオメディカル研究センター
〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町 1

(2013 年 5 月 25 日受付; 2013 年 10 月 30 日受理)

キーワード: ケリ, CHD 遺伝子, 初毛羽, 性判定.

日本鳥学会誌

Japanese Journal of
Ornithology

© The Ornithological Society
of Japan 2014

Hideya WAKISAKA^{1,*}, Keiko WAKISAKA², Munetaka NAKAGAWA³, Masanobu ITOH⁴. 2014. Molecular sexing using DNA extracted from the natal down of the Grey-headed Lapwing *Vanellus cinereus*. Jpn J Ornithol 63: 43–47.

Abstract. To establish a simple and strict method for molecular sexing of Grey-headed Lapwing chicks, we attempted to extract DNA from natal down. Sex-linked CHD genes were successfully amplified with the DNA samples as templates in PCR. DNA extracted from natal down was shown to be sufficient for this purpose. Using this method, of 30 chicks from 17 nests, each of 14 females and 16 males were clearly sexed. Obtaining DNA from natal down is not only easy for researchers, but also one of the least invasive methods for the study of chicks.

Key words: Grey-headed Lapwing, CHD gene, Natal plumage, Molecular sexing.

¹ Human Science and Environment, University of Hyogo, Shinzaike-Honmachi, Himeji, Hyogo 670-0092 Japan.

² Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki 1, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585 Japan.

³ Ogura Wild Bird Research Club, Minami-Kakiuchi 13, Nishi-Tono, Jyoyo, Kyoto 610-0111 Japan.

⁴ Center for Bioresource Field Science, and Insect Biomedical Research Center, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki 1, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585 Japan.

ケリ *Vanellus cinereus* は、本州北部・中部・南西部から九州にかけて繁殖する大型のチドリである (日本鳥学会目録編集委員会 2012)。これまでのケリについては、京都府の巨椋干拓地における広汎な観察と捕獲調査、および飼育 (奥川ら 1970)、モビングが捕食者としてのカラスの行動に与える防衛効果の実験的検証 (Ohno 1996)、野外観察に基づく繁殖行動と繁殖成功率の解析 (Takahashi & Ohkawara 2007) などが行われてきた

が、本種の生息分布、生活史、生息環境の選好性、繁殖生態などにはまだ不明な点が多い。またケリの外部形態に見られる雌雄差は小さく、外見の観察によって雌雄を見分けることができない。ケリの前肢翼爪は雄の方が雌より大きいことが知られているが (小林 1956)、詳細な外部形態の測定と組み合わせたとしても、雌雄判別率は 0.81 にとどまる (Wakisaka et al. 2006)。

近年、分子生物学的手法により個体の遺伝子配列を知ることが容易になり、二次性徴の顕著でない鳥類の性を染色体構成 (雌 ZW, 雄 ZZ) に基づいて判別することが可能になった (Fridolfsson &

* E-mail: hk-wakisaka@nifty.com

doi:10.3838/jjo.63.43

JOI:JST.JSTAGE/jjo/63.43

Ellegren 1999; 梶田 1999; 西海 1999). DNA の構造多型に基づく分子性判定の標的として最も広く用いられるのが, Chromo Helicase DNA binding (CHD) 遺伝子である. W 染色体上の CHD-W 遺伝子は Z 染色体上の CHD-Z 遺伝子とはイントロンの長さが異なるので, ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; Polymerase Chain Reaction) により得られるこの領域の増幅断片の大きさから, 個体の性別を正確に知ることができる (Fridolfsson & Ellegren 1999). 鳥類の分子性判定に用いる DNA は通常, 赤血球, 口腔細胞, 羽毛の羽軸基部に付着した細胞などから抽出される (Murata et al. 1998; 梶田 1999; Hayashi et al. 2000; Seki 2003). Wakisaka et al. (2006) は, ケリの翼下面の静脈を注射針でわずかに傷つけ, そこから回収した血液から得られた DNA 試料を用い, CHD 遺伝子の多型に基づいて 26 検体を雌 12 個体・雄 14 個体に区別した. この結果はケリに対する DNA を用いた性判定の有効性を示したが, その対象は成鳥に限られたものであり, 翼が小さく静脈の位置が確認しにくい本種の雛に同じ手法を用いることは容易でない.

鳥の羽衣は, 雛・幼鳥・成鳥への成長段階に応じて, 初毛羽から, 幼羽を経て成鳥羽へと段階的に変化する (尾崎・坂根 2004). 孵化直後のケリ雛は柔らかな初毛羽に覆われている. 初毛羽は正羽の先端にあり, 正羽が伸長し幼羽となるときに自然に脱落する (尾崎・坂根 2004) が, 軽い力を加えることで簡単に皮膚から脱落する. 本研究では, 個体をできる限り傷つけない性判定法の確立を目指し, 初毛羽の基部に付着した細胞から抽出した DNA による性判定の有効性を検証した.

方 法

1) 羽毛の採取

2012 年の繁殖期に京都府南部 (京都市・宇治市・久世郡久御山町・京田辺市) の農地を巡回しケリの営巣を確認した. 巣は水田に営まれ, 雛は 2012 年 3 月下旬から 5 月中旬に孵化した. 4 月 28 日, 5 月 6, 12, 20 日, 6 月 1 日の 5 日間に, 21 の巣から 40 個体の雛を素手で捕獲し, エタノール滅菌したピンセットで羽毛を軸ごと採取した. 雛 1 個体あたり, 全身を初毛羽に覆われた 0-1 週齢個体からは胸の初毛羽 20 枚 (図 1a, b), 正羽の伸長が始まった 2-5 週齢個体からは初毛羽 10 枚およびコントロールとして風切羽 1 枚を得た. 採取した羽毛サンプルは速やかに 70% エタノール中に

液浸するとともに太陽光を遮断するアルミ製バックに入れて保管し, 後に冷凍保存した.

2) DNA 抽出と CHD 遺伝子による性判定

各個体から採取した 0-1 週齢個体の初毛羽 20 枚 (無処理), 2-5 週齢個体の初毛羽 10 枚の基部約 2 mm, あるいは 2-5 週齢個体の風切羽 1 枚の羽軸の基部約 2 mm から, それぞれ DNA 抽出キット (Gen Elute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich Co.)) を用いて DNA を抽出した. 羽毛サンプルをライシスバッファー中で磨砕し, Proteinase K を加えて 56°C で約 24 時間保温, さらに RNase A を加えて 37°C で 1 時間保温した. その後 99% エタノールを加え, 添付のカラムに吸着させた. 混入物を洗浄した後, Tris 緩衝液 (10 mM Tris/1 mM EDTA (pH 8.0)) 20-50 μ l にて DNA を溶出した. 得られた DNA の濃度と精製状態を 0.7% アガロースゲル電気泳動により確認した. サイズおよび定量マーカーとして λ DNA HindIII マーカーを用いた.

得られた DNA (1-20 ng) を鋳型として, DNA ポリメラーゼ (KOD-FX, TOYOBO) 0.25 units, プライマー 2550F (5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3') および 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') (Fridolfsson & Ellegren 1999) をそれぞれ 0.3 μ M, および dNTP mix (0.4 mM) を含む混合溶液 (全量 20 μ l) にて CHD 遺伝子を PCR 増幅した. PCR は変成 (98°C, 10 秒間), アニーリング (53°C, 30 秒間), 伸長 (68°C, 30 秒間) を 35 サイクル繰り返した. PCR 後の溶液 2 μ l を 3% アガロースゲルにて電気泳動し, 増幅産物を確認した. なお, 初毛羽から得られた DNA 量を比較するために, 同様の方法でショウジョウバエ 1 個体から DNA 抽出した.

結果と考察

採取したケリの羽毛サンプルは 40 個体分で, その内訳は初毛羽が 30 個体 (0-1 週齢が 7 個体, 2-5 週齢が 23 個体), 風切羽が 10 個体であった. 0-1 週齢 3 検体から DNA の抽出量を算出したところ, 初毛羽 20 枚から平均 18.8 ng (範囲 13-25 ng) の DNA が回収された. よって初毛羽 1 枚あたり約 0.9 ng の DNA が得られたことになる. 同様に, 2-5 週齢の初毛羽 10 枚からは 20-200 ng, 風切羽 1 枚からは約 20 μ g の DNA 量が回収された (図 1c). 0-1 週齢の初毛羽 20 枚からはショウジョウバエ 1 個体とほぼ同量の DNA が得られた (図 1c,

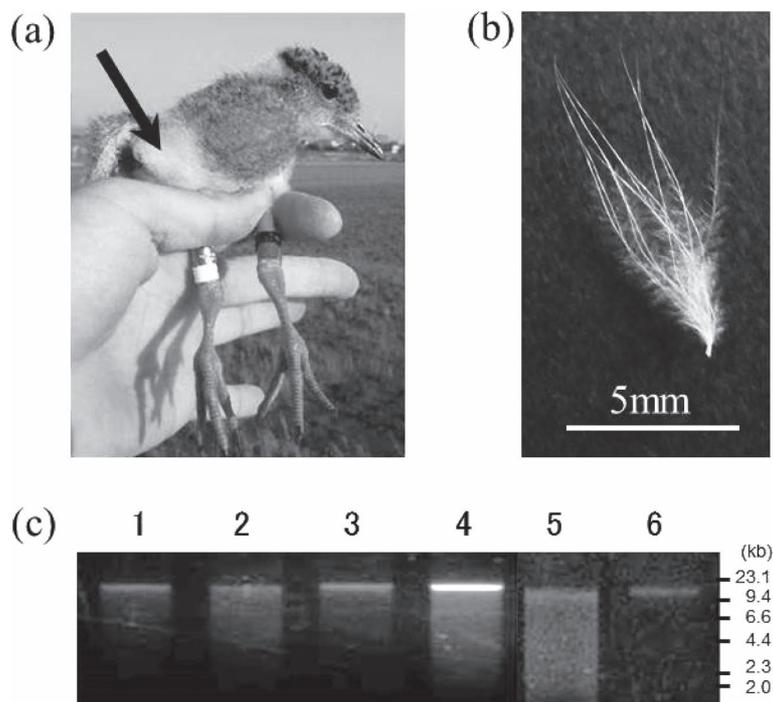


図1. ケリの初毛羽からのDNA抽出。
 (a) 捕獲したケリ (0-1 週齢). 矢印は採取した初毛羽の位置を示す. (b) ケリ (0-1 週齢) の胸から採取した初毛羽1枚. (c) 抽出したDNAのアガロース電気泳動の例. 材料は, ケリ 0-1 週齢1個体の初毛羽20枚 (Lane 1-3), 2-5 週齢1個体の初毛羽10枚 (Lane 4), 2-5 週齢1個体の風切羽1枚 (Lane 5), キイロシヨウジョウバエ *Drosophila melanogaster* 成虫1個体 (Lane 6). 20 μ l のDNA抽出液のうち Lane 1-4・6 は2 μ l, Lane 5 は0.05 μ l を泳動した. 右側の数字はDNAのサイズを示す.

Fig. 1. Genomic DNA preparation from natal down of Grey-headed Lapwing
 (a) A Grey-headed Lapwing chick (0-1 week old). The arrow indicates the position of natal down used for DNA extraction. (b) A natal down feather from a Grey-headed Lapwing (0-1 week old). (c) Extracted DNA from 20 natal down feathers from a 0-1 week old chick (Lane 1-3), from 10 natal down feathers from a 2-5 week old chick (Lane 4), from a contour feather of a 2-5 week old chick (Lane 5), or from one adult *Drosophila melanogaster* (Lane 6). Only 2 μ l (Lane 1-4, 6) or 0.05 μ l (Lane 5) were loaded on the gel. Sizes of DNA markers are indicated at the right side of the gel.

Lane 1-3, 6).

次に, 回収したDNAを鋳型としてCHD遺伝子のPCR増幅を試みた結果, 京都府南部の21巣から得たケリ雛40個体全てのDNAからPCR産物が得られた. 21個体からは450 bpのDNA断片のみ, 残り19個体からは450 bpと600 bpの2種類のDNA断片が確認され, 前者21個体を雄(ZZ), 後者19個体を雌(ZW)と判別できた(図2). このうち初毛羽サンプルを用いた30個体(17巣)の内訳は雌14個体, 雄16個体となった. この結果から鋳型DNAの由来が0-5週齢の初毛羽であっても風切羽であっても, 支障なく性判定ができることがわかった. また, 0-1週齢雛の初毛羽から

得たDNAを鋳型としても明瞭な結果が得られたことから(図2), ここで得たDNA 20 ng程度はCHD遺伝子のPCR増幅の鋳型として十分であることが示された. 近年, 分子性判定の技術向上により多くの種で孵化直後の雛の性を判別できるようになった(西海1999). しかしながら, これまでに初毛羽から得たDNAを用いた報告はなく, 本研究の結果からケリの初毛羽からPCRに使用可能なDNAを得られることが示唆された. 血液や風切羽の採取に比べて, 初毛羽の採取は個体にほとんど外傷を与えない点で雛への影響が少なく, また調査者が簡便かつ短時間で処理できることから, 放鳥後の雛が親鳥と合流するのを容易にする効果

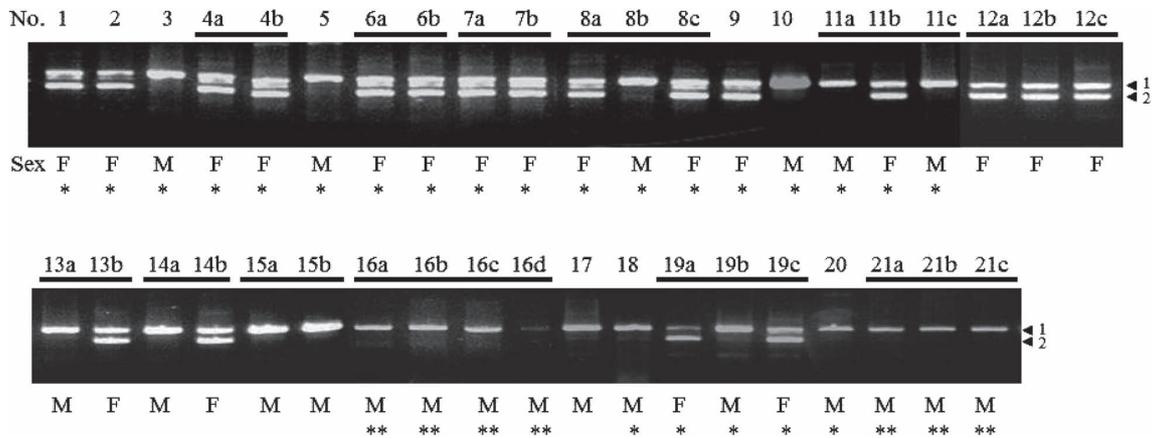


図2. ケリ羽毛 DNA を用いた分子による性判定.

40 個体の雛から得た DNA を用いた CHD 遺伝子の PCR 増幅の結果. 各レーンの上に巣の番号 (1–21) を示し, 同巣個体は下線でつなぎ a-d のアルファベットで区別した. ゲル右端の矢頭は DNA 断片のサイズを (1: 600 bp, 2: 450 bp), ゲル下には性判定の結果を示す (F: 雌, M: 雄). 用いた鋳型 DNA は, 0–1 週齢雛の初毛羽由来 (**), 2–5 週齢雛の初毛羽由来 (*), または風切羽由来 (印なし) である.

Fig. 2. Molecular sexing using DNA prepared from natal down or contour feathers.

Amplified CHD genes from 40 Grey-headed Lapwing chicks. Numbers indicate each of the nests studied (#1–21); siblings are underlined and distinguished by letters (a-d). Arrows indicate the sizes of DNA fragments (1: 600 bp, 2: 450 bp). The sex of each chick F (female) or M (male), is given beneath the gel. The origin of the DNA used as a template is indicated: from natal down of 0–1 week old chicks by double asterisks, from 2–5 week old by single asterisks, or from contour feathers by no symbols.

があると思われる. 以上のことから初毛羽を利用した CHD 遺伝子による性判別は, ケリ雛に与えるストレスを抑える手法として有効と考えられる. 今後, この手法を用いてケリ雛の性別を把握するとともに, 色足環による個体識別と組み合わせて長期的に個体追跡することで, 本種の分散様式や繁殖開始年齢, 寿命などを雌雄ごとに解析する途が開けるものと期待される.

本稿をまとめるにあたり, おふたりの匿名の査読者と編集幹事から有益なご助言をいただきました. 心より感謝申し上げます.

摘 要

ケリの生活史や繁殖生態を理解するためには, 成長段階の早い時期からケリ雛の性別を知る必要がある. 本研究では, 簡便かつ確実なケリ雛の性判定法を確立するために初毛羽の基部からの DNA 抽出を試みた. その結果, 初毛羽から PCR 増幅に十分量の DNA を得ることができた. 加えて, この方法により京都府南部における 17 巣 30 個体のケリ雛の性を, 雌 14 個体, 雄 16 個体に判別することができた. 即ち, 初毛羽からの DNA 採取の手法は簡便であるだけでなく, 雛へのストレスを軽減する手法として有効であることが示された.

引用文献

- Fridolfsson AK & Ellegren H (1999) A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J Avian Biol* 30: 116–121.
- Hayashi Y & Nishida-Umehara C (2000) Sex Ratio among Fledglings of Blakiston's Fish Owls. *Jpn J Ornithol* 49: 119–129.
- 梶田 学 (1999) DNA を利用した鳥類の系統解析と分類. *日鳥学誌* 48: 5–45.
- 小林桂助 (1956) ケリ. 原色日本鳥類図鑑. 保育社, 大阪.
- Murata K, Itoh Y, Ogawa A & Mizuno S (1998) Sexing the oriental White Stork *Ciconia boyciana* by PCR using a single plucked feather as a source of DNA. *Jpn J Ornithol* 46: 157–162.
- 仁部富之助 (1979) 野の鳥の生態. 1 巻. 大修館書店, 東京.
- 日本鳥学会目録編集委員会 (2012) 日本鳥類目録 改訂第 7 版. 日本鳥学会, 三田.
- 西海 功 (1999) 鳥類の性配分に関する研究と DNA による性判定. *日鳥学誌* 48(1): 83–100.
- Ohno Y (1996) Effects of nesting Grey-headed Lapwings *Microsarcops cinereus* on the intensity of the artificial nest predation by Carrion Crows *Corvus corone*. *Jpn J Ornithol* 45: 91–99.
- 奥川一之助・石井照昭・三野 衛・長谷川 茂・柄本和子・青木皆子・山下幸夫・山本早苗 (1970) 京都府巨椋干拓農地に繁殖するケリ (チドリ科) の生態調査資料. *京都教育大学紀要* 37: 3–87.

尾崎清明・坂根隆治 (2004) 羽衣. 山岸 哲・森岡弘之・樋口広芳 (監) 鳥類学辞典. 昭和堂, 京都.

Seki S-I (2003) Molecular sexing of individual Ryukyu Robins *Erithacus komadori* using buccal cells as a non-invasive source of DNA. *Ornithol Sci* 2: 135–137.

Takahashi M & Ohkawara K (2007) Breeding behavior and

reproductive success of Grey-headed Lapwing *Vanellus cinereus* on farmland in central Japan. *Ornithol Sci* 6: 1–9.

Wakisaka H, Nakagawa M, Wakisaka K & Itoh M (2006) Molecular sexing and sexual difference in carpal spur length of the Gray-headed Lapwing *Vanellus cinereus* (Charadriidae). *Ornithol Sci* 5: 133–137.