

ミヤマオウム *Nestor notabilis* の性別判定 Molecular sexing in Kea *Nestor notabilis*

米田 一裕

Kazuhiro Yoneda

有限会社 米田遺伝子型研究所 大阪府高槻市 569-1017

Yoneda Genotyping laboratory Ltd. Takatsuki, Osaka 569-1017, Japan

はじめに

世界で確認されている約9000種類の鳥類の約半分の種では、性は外部形態によって識別できず、雛の性も同様に外部形態によって判別することは困難である。

最近のペットブームにより多くの鳥類が、愛玩鳥として輸入、販売されている。また、自家繁殖による生産も盛んになり、特に、輸入が制限される鳥類においても国内ブリーダーの技術の向上により生産可能な個体や鳥種が増えてきていることから雌雄判別された個体の必要性が増加した。

外部形態から性の判別が可能な多くの鳥類の特徴として、雌雄間での体型や羽色の違いがある。採卵用のニワトリやウズラといった家禽において雌雄判別は、性によって飼育目的が異なるため、早期に区別する必要があることから重要な作業の1つである。すなわち、初生雛の段階で採卵用のメス個体と肉用のオス個体の選別を行う必要がある。そこで、以前は初生雛鑑別師による肛門鑑別法によって性別が行われていたが、近年では、伴性遺伝形質を導入した品種を用いることで雛の羽色鑑別や羽性鑑別によって性別されている。また、愛玩用の文鳥は、幼鳥では性別による外見的な差は全くみられないが、性成熟した成鳥では、雄の方が雌よりもくちばしの形が盛り上がり、色が濃くなる。さらに、目の周りの赤い模様も濃くなっていくことから、ペア形成時にはこの違いから性別しているが、実際には中間的な個体も多く、性別は、非常に困難でペアリングの成功率は6~7割程度であると報告されている(市川ら2006)。また、野性のアカヒゲも幼鳥では性別による外見的な差は全くみられないが、成鳥は、スズメ位の大きさで、雄は首から胸にかけて黒い羽色を示す外部形態によって識別されている(関2003)。

一方、外部形態によって判別することが困難な鳥類の中でも愛玩鳥としてオウム、インコ類や猛禽類が多く流通している。そして、性が明らかな個体は、販売時に有意に選択されることや価格もまた比較的高価に取引される傾向があることから、販売業の視点からも性別の必要性が挙げられている。

従来、外部形態による性別が不明な場合、より確実に性別を見分けるために雄のさえずりや求愛

ダンスなどの行動から判断していたが、観察に時間と労力を費やすため生産や販売の現場では実用的ではなかった。しかし、雌雄の簡易判別は極めて重要な技術となっており、さらに雛や若齢時に性別ができれば、繁殖候補鳥の飼育羽数の縮小、ペアリング失敗の回避による省力化や生産コストの削減などが期待できる。

近年では生化学的手法の発達にともない、鳥類の性別にDNAを用いる多数の方法が報告されている(Fridolfsson et al., 1998; Dvorak et al., 1992; Hori et al., 2000; Huynen et al., 2002; Itoh et al., 2001; Kloet and Kloet, 2003; Kloet and Kloet, 2005)。鳥類では雌が異型配偶子(WZ)、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、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、走鳥類以外の様々な鳥種の研究に用いられている(Bermúdez-Humarán et al., 2002; Fridolfsson and Ellegren, 2000; Griffiths et al., 1998; Kahn et al., 1998)。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、それぞれの鳥種で性別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、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(Shizuka and Lyon, 2008)。

ミヤマオウム(*Nestor notabilis*)は、オウム科に分類されるニュージーランドの固有種であり、生息数の減少から保護の対象となっている。わが国にも数羽のミヤマオウムが飼育されているが、外部形態からの性の判別は困難である(図1)。そこで、ミヤマオウムの性別を行うために、多くのオウム、インコ類で判別可能なCHD遺伝子部分と同じプライマーセットでの性別の可能性を検討した。

材料方法

性別検査は、ミヤマオウム2羽(オス1羽、メス1羽)と性が不明のミヤマオウム2羽と対照としてヨウム2羽(オス1羽、メス1羽)の羽根を用いた。各個体の羽軸の根部から常法に従ってProteinase K処理後、フェノール・クロロホルム法でDNAを抽出した。



図1 ミヤマオウム (ペア)

トリ性判別用マーカーは、*CHD*遺伝子の雌雄間で変異が認められる部分を増幅する

Bermúdez-Humaránら(2002)が報告しているプライマーA (P2, P3) とItoら(2003)が報告しているプライマーB (MP, NP) の2組のプライマーを用いた。

各トリ性判別用マーカーのプライマーセットのうち、片方のプライマー5'末端に蛍光色素で標識し、PCR反応液としてGoTaq® Master Mix (Promega Corporation, Madison, WIS, USA)を用いて添付のプロトコールに従って調整し、GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)にて目的の配列を増幅した。PCRの反応条件は94°C 3分間で予備変性を行った後、94°C 60秒間、55°C 30秒間、72°C 60秒間のサイクルを35回繰り返し、最後に72°C 5分間の伸長を行った。プライマーAで反応したPCR増幅産物は、制限酵素*Hae*IIIで37°C 120分間消化した。

各マーカーのPCR増幅産物は、ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER (Applied Biosystems)で電気泳動を行い、GeneScan 350 ROX Size Standard (Applied Biosystems)に基づいて、GeneScan Analysis (Applied Biosystems)によりサイズを測定した。配

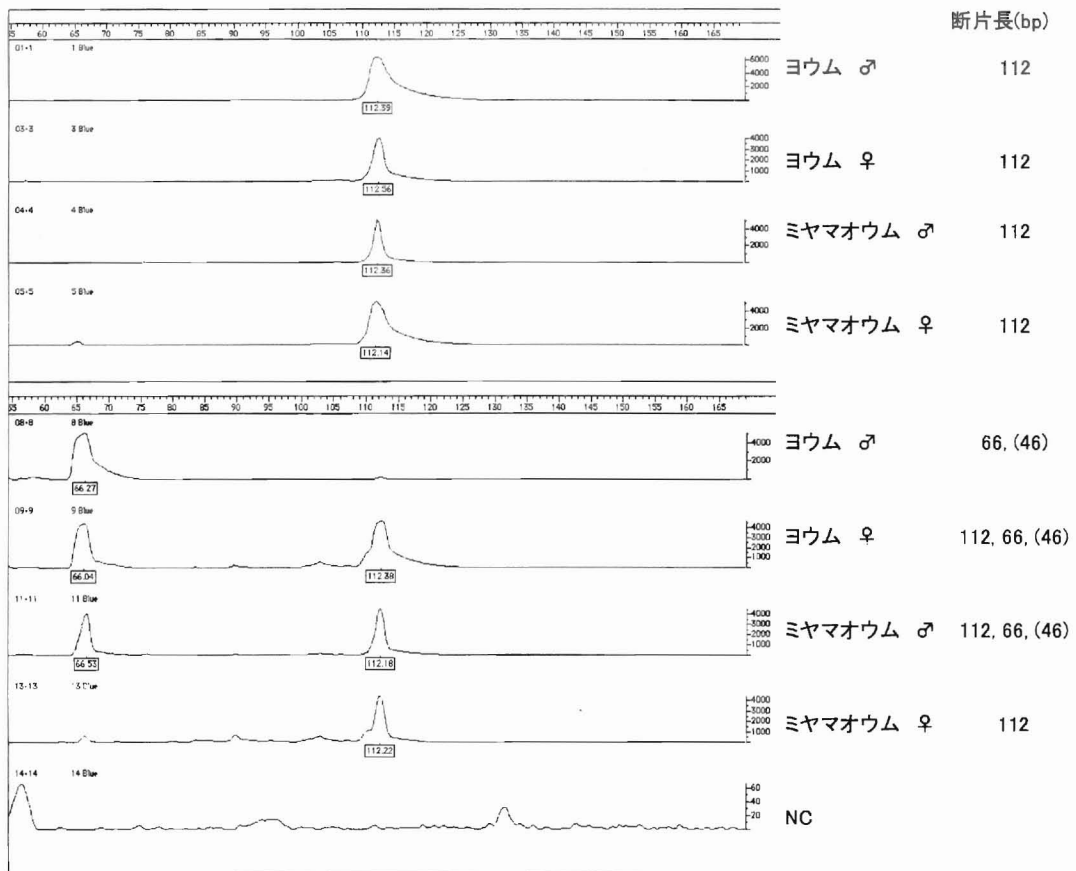


図2 プライマーAの増幅断片(上)と*Hae*III消化後の断片(下)

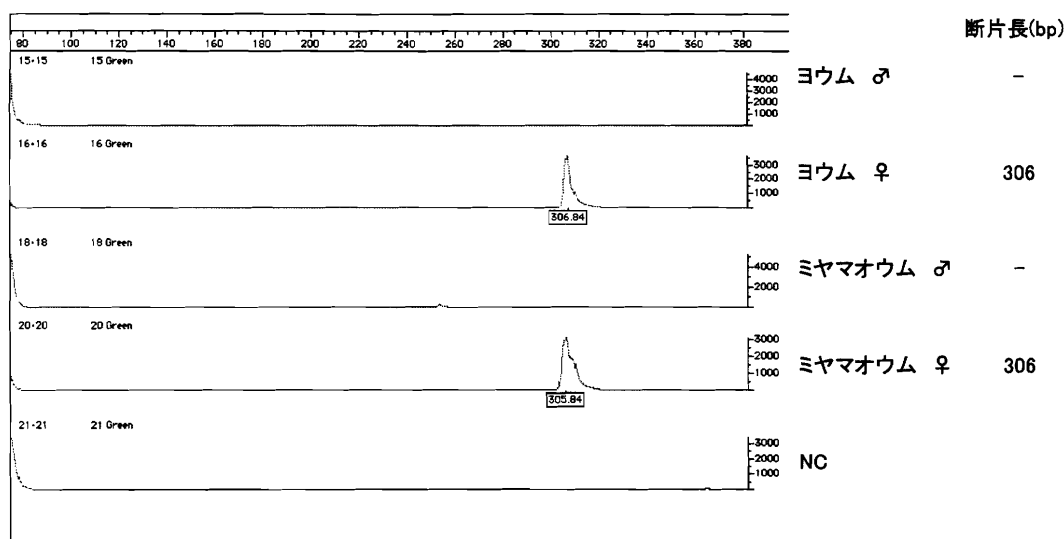


図3 プライマーBの増幅断片

個体の型の確定には、Genotyper (Applied Biosystems)を使用した。

結果

ミヤマオウムとヨウムのDNAを用いたPCR増幅産物を電気泳動した結果について、各個体で認められる断片の長さが、ピークの位置で表されているエレクトロフェログラムで示した(図2、3)。

プライマーAを用いた結果、両鳥種の断片長は112bpであった。そこで、各性染色体上のCHD遺伝子の塩基配列の違いを見るためにHaeIIIによる制限酵素反応を行った結果、オウム、インコ類のZ染色体由来のCHD遺伝子断片は66bp、46bpに分断され、W染色体由来のCHD遺伝子断片は分断されないことから、メス(WZ)は、112bp、66bp、46bpとオス(ZZ)は、66bp、46bpの断片長になるが、オス、メスそれぞれの46bp断片は、蛍光色素が修飾されていない断片になるためピークが認められなかった。したがって、ヨウムの配偶子型は、メスは112bp、66bpとオスは66bpの断片長を示した。一方、ミヤマオウムでは、メスは112bp、オスは112bpと66bpとなり、通常のおウム、インコ類で示す配偶子型と異なる断片長を雌雄間で示した(図2)。

次にCHD遺伝子上の雌雄間の塩基配列上にある一塩基多型を利用してAmplification refractory mutation system (ARMS)によりW染色体由来の

CHD遺伝子部分のみが増幅されるように設定したプライマーBを用いたPCR増幅産物を電気泳動した結果、ミヤマオウムとヨウムのそれぞれのメス個体のみ増幅産物(306bp)が認められた(図3)。そこで、プライマーBを用いて性別の不明な2個体のミヤマオウムについて性別判定を行ったところ、一方の個体のみ増幅産物が認められたことから、オスとメスであると判定された。以上のことから、ミヤマオウムの性が正しく判別されることが明らかとなった(表1)。

考察

ミヤマオウムの性別判定では、プライマーBを用いることにより雌雄が判別され、プライマーAの増幅により各個体のDNAの存在を確認することができる。したがって、今後、2組のプライマーを用いることで判別結果の信頼性は高くなると考えられた。これまでの外見上の判断では、性成熟を迎えた繁殖期の個体の行動でしか性別判定できなかった。また、繁殖期以外の季節では性差がわかりにくいいため、性別判定ができるまでに長い時間を要したが、今後は本研究の手法を用いて孵化後の卵殻膜からのDNA抽出による雛の性別を評価することも可能であると考えられる。

プライマーBは、主にワシやタカ類の性別判定に用いられているが(Ito et al., 2003)、本研究の結果よりオウム、インコ類をはじめとする他の鳥種についても、Z染色体の塩基配列部分に変異が保存され

表1 各プライマーの検出された断片長(bp)

| プライマー | ミヤマオウム | | ヨウム | |
|-----------------|-------------|-----|--------|-------------|
| | オス | メス | オス | メス |
| プライマーA | 112 | 112 | 112 | 112 |
| HaeIII digested | 112, 66, 46 | 112 | 66, 46 | 112, 66, 46 |
| プライマーB | - | 306 | - | 306 |

ている可能性が考えられた。また、この領域はイントロン部分も含まれており、ワシやタカ類の断片長(286-330bp)には、雌雄間で2-20bpの差異があり、種間でも40bp以上の違いが確認されていることから (Ito et al., 2003)、鳥種によって断片長が異なることが予想された。本研究で用いたミヤマオウムとヨウムでは、共に306bpの断片長が認められた。

一方、プライマーAでのPCR増幅産物の制限酵素による消化では、通常のオウム、インコ類の雌雄間でそれぞれ認められる断片長が、同じオウム科に分類されるミヤマオウムで異なることが明らかとなった。すなわち配偶子の型が、従来の鳥類のメスで認められるものがミヤマオウムのオスで認められ、ミヤマオウムのメスでは予想される断片長が認められなかったことから、通常のオウム、インコ類の*CHD*遺伝子の塩基配列とは部分的に異なることが示唆された。特に、この部分は*CHD*遺伝子のDNA-binding領域にあたる保存性の高い領域であることから (Kahn et al., 1998)、今後シーケンスにより性染色体にある*CHD*遺伝子の塩基配列上の違いを明らかにするとともに機能的な違いの有無についても調査する必要があると考えられた。

要約

DNAによる性判別法のミヤマオウムへの利用を目的として、鳥類の性染色体上に存在する*CHD* (chromo-helicase-DNA binding protein) 遺伝子を標的とする2種類のプライマーセットについて検討した。その結果、ミヤマオウムでは、2種類のプライマーセットでDNAの増幅が認められた。しかし、オウム、インコ類において性判別の報告があるプライマーAの雌雄間で認められる型が異なることから判別ができなかった。一方、ワシ、タカ類の*CHD-W*の配列を基に設計されたプライマーBを用いた方法では、ミヤマオウムのW染色体由来の増幅産物のみが検出されることから性判別が可能となった。また、対照として用いたヨウムは、2種類のプライマーセットで性判別が可能であったことから、プライマーBは、他の鳥種でも性判別のできる可能性が示唆された。

参考文献

Bermúdez-Humarán L G, García-García A, Leal-Garza C H, Riojas-Valdes V M, Jaramillo-Rangel G, Montes-de-Oca-Luna R (2002) Molecular sexing of monomorphic endangered *Ara* birds. *Journal of Experimental Zoology* 292, 677-680.
Dvorak J, Halverson J L, Gulick P, Rauen K A, Abbott U K, Kelly B J, Shultz F T (1992) cDNA cloning of a Z- and W-linked gene in gallinaceous birds. *Journal of Heredity* 83, 22-25.

Fridolfsson A -K, Cheng H, Copeland N G, Jenkins N A, Liu H C, Raudsepp T, Woodage T, Chowdhary B, Halverson J, Ellegren H (1998) Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8147-8152.
Fridolfsson A -K and Ellegren H (2000) Molecular evolution of the avian *CHD1* genes on the Z and W sex chromosomes. *Genetics* 155, 1903-1912.
Griffiths R, Double M C, Orr K, Dawson R J G (1998) A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7, 1071-1075.
Hori T, Asakawa S, Itoh Y, Shimizu N, Mizuno S (2000) *Wpkci*, encoding an altered form of *PKCI*, is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryos: Implication of its role in female sex determination. *Molecular Biology of the Cell* 11, 3645-3660.
Huynen L, Millar C D, Lambert D M (2002) A DNA test to sex ratite birds. *Molecular Ecology* 11, 851-856.
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。愛知県農業総合試験場研究報告 38, 175-180.
Ito H, Sudo-Yamaji A, Abe M, Murase T, Tsubota T (2003) Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes. *Zoological Science* 20, 339-344.
Itoh Y, Suzuki M, Ogawa A, Munechika I, Murata K, Mizuno S (2001) Identification of the sex of a wide range of Carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences. *The Journal of Heredity* 92, 315-321.
Kahn N W, John J S T, Quinn T W (1998) Chromosome-specific intron size differences in the avian *CHD* gene provide an efficient method for sex identification in birds. *The Auk* 115, 1074-1078.
Kloet R S de and Kloet S R de (2003) Evolution of the spindlin gene in birds: independent cessation of the recombination of sex chromosomes at the spindlin locus in neognathous birds and tinamous, a palaeognathous avian family. *Genetica* 119, 333-342.
Kloet R S de and Kloet S R de (2005) The evolution of the spindlin gene in birds: Sequence analysis of an intron of the spindlin W and Z gene reveals four major divisions of the Psittaciformes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36, 706-721.
関 伸一 (2002) 森林性希少鳥類アカヒゲの DNA による性判別。九州森林研究 55, 171-172.
Shizuka D and Lyon B E. (2008) Improving the reliability of molecular sexing of birds using a W-specific marker. *Molecular Ecology Resources* 8, 1249-1253.