

短	報
Note	

体毛から抽出した DNA を用いた オオアシトガリネズミ *Sorex unguiculatus* の 性判別

亀山祐一*[†]・黒田高光**・木村 慧*・沖本康平**・下井 岳*・橋詰良一*

(平成 26 年 1 月 23 日受付/平成 26 年 6 月 6 日受理)

要約：オオアシトガリネズミは外見による性判別が難しい上に、保定による外部生殖器の観察が野生由来の飼育個体に多大なストレスを与える可能性もある。そこで本研究では、同種の体毛を材料とした PCR による性判別法について検討した。毛による性判別に先立ち、解剖して生殖腺で性別を確認した個体から肝臓を採取し、肝臓由来のゲノム DNA で性判別を行った。雄特異的プライマーはヨーロッパトガリネズミで雄特異的産物の検出が報告されている DBY8, 雌雄共通プライマーはスunks (ジャコウネズミ) における Aqp3 の相補的 DNA 配列からデザインした AQP3 を用いた。その結果, DBY8 では雄, AQP3 では雌雄の両者において明瞭な 1 本バンドの PCR 産物が検出され, それらによる性判別の結果は, 解剖で確認した性別と一致した。次いで体毛に由来するゲノム DNA で性判別を行ったところ, 解剖で確認した性別と完全に一致した。以上より, 生体から反復して簡便に採取できる体毛を材料として, PCR によるオオアシトガリネズミの性判別法を確立した。

キーワード：オオアシトガリネズミ, 性判別, PCR, 体毛, DBY, AQP

1. 緒 言

トガリネズミ形目における実験動物は, ジャコウネズミ (実験動物名スunks, *Suncus murinus*) が開発され, 動揺刺激による嘔吐反応, 配偶子の形態や受精過程, 母子のキャラバン行動などで多くのユニークな特性が見出されている^{1,2)}。しかし, その他のトガリネズミ形目における実験動物はヒメコミトガリネズミが開発途上の段階にあるだけで¹⁾, 比較生物学的な問題がある。また, スunks は基礎代謝が齧歯目の 2 倍近くあり, 熱帯原産で脂肪の蓄積がほぼ皆無であるため, 低温耐性の著しく低い問題がある¹⁾。このため, 温帯または寒帯原産のトガリネズミ形目におけるモデル動物の開発が必要とされている。

オオアシトガリネズミ (*Sorex unguiculatus*) は北海道におけるトガリネズミ形目の最優占種であるために安定して生体を確保でき, 同目における寒帯産のモデル動物となる可能性がある。

オオアシトガリネズミは特に若い個体で生殖器官を含めた外貌による性判別が難しく³⁾, 生態調査, 飼育繁殖の障害となっている。また, 性判別のための長時間の保定は, 野生から捕獲した未馴化の個体に多大なストレスを与える可能性もある。

体毛は動物を大きく傷つけることなく, 反復して採取で

きる生体材料である。また, 痕跡として残された体毛を利用すれば, 動物と採取者双方の安全が確保され, 非侵襲的に採取しうる。このため, 体毛からゲノム DNA (gDNA) を抽出し, 性判別や個体識別に利用する試みが野生動物⁴⁾ や展示飼育⁵⁾ で行われている。トガリネズミ形目では, オオアシトガリネズミ, バイカルトガリネズミ, ヒメトガリネズミ, アズミトガリネズミ, ヤミトガリネズミ, チビトガリネズミ, ヨーロッパトガリネズミにおいて, gDNA から Y 染色体上の Sry HMG ボックスを PCR で増幅し, 雄を選抜するための雄特異的な PCR プライマーが開発されている^{6,7)}。このうち, ヨーロッパトガリネズミで DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked 遺伝子を増幅することが報告されている DBY8 は霊長目, 食肉目, 偶蹄目, 奇蹄目でも増幅が確認されているため⁷⁾, 哺乳動物で雄を検出するために汎用性の高いプライマーとなり得る。しかし, これらの報告は雌雄に共通する塩基配列を増幅するプライマーで, 同時に PCR を実施していない。したがって, DNA 抽出, PCR 自体に問題のあったサンプルはすべて雌と判定され, 雌と判定された中に, 誤判定された雄の入っている可能性がある。また, これらの報告では gDNA を抽出した生体材料が明記されておらず, 体毛を材料とした場合における性判別の効率は不明である。

そこで本研究は, オオアシトガリネズミの生体に大きな

* 東京農薬大学生物産学学部生物生産学科

** 東京農薬大学大学院生物産学専攻

[†] Corresponding author (E-mail : y-kameya@bioindustry.nodai.ac.jp)

ストレス、障害を与えることなく、反復して確実に性別を判定できる方法を開発するため、体毛を材料とした PCR による性別判別を検討することにした。

2. 材料および方法

オオアシトガリネズミは鳥獣の保護及び狩猟の適正化に関する法律に基づいた捕獲許可の申請を行った上で（オホーツク総合振興局第他 3~8, 11, 12, 22, 23, 40, 41 号）、北海道網走市の天然林で墜落岳を用いて捕獲した。捕獲した生体は多孔板を蓋としたプラスチック製のケースで 1 頭ずつ飼育した。体毛に餌や糞が付着していた場合、餌由来の DNA がクロスコンタミネーションする可能性があるため、餌について記述する。餌はジャンボミルワーム、フタホシコオロギ、ヨーロッパイエコオロギ、自家製配合飼料⁶⁾を給与した。飼育室は 20±2℃, 12L:12D に設定した。

捕獲時および飼育中の死亡個体は解剖して生殖器および副生殖器で性別を判定した後、一部の個体で肝臓を摘出、凍結保存した。凍結保存した肝臓は、High Pure Template Preparation kit (Roche) を用い、マニュアルに準じて gDNA を抽出した。体毛は上記の死亡個体または飼育中の生体から毛抜きで 1.5ml チューブに採取し、ISO-HAIR (NIPPON GENE) でマニュアルに準じて gDNA を抽出した。

PCR による性別判別は、雄特異的 DNA 配列と雌雄共通 DNA 配列を増幅して行った。雄特異的な DNA 配列を増幅するプライマー（以下、雄特異的プライマー）は、DBY8 (Forward : 5'-CCC CAA CAA GAG AAT TGG CT-3', Reverse : 5'-CAG CAC CAC CAT AKA CTA CA-3')⁷⁾を用いた。雌雄共通の DNA 配列を増幅するプライマー（以下、雌雄共通プライマー）は、スunks の Aqp3 遺伝子の配列 (GenBank : AB275385.1) でデザインした AQP3 (Forward : 5'-TCC TCG TGA TGT TCG GCT GT-3', Reverse : 5'-TGT CTG AGC CAG GGC ATA GA-3')を用いた。PCR は KAPA Taq Extra (KAPA BIOSYSTEMS) を使用し、肝臓由来の gDNA は通常のプログラム、体毛由来の gDNA はタッチダウン PCR で行った。通常の PCR のプログラムは、最初の変性を 94℃ で 2 分、変性 94℃ 25 秒、アニーリング 50℃ 15 秒、伸長 72℃ 1 分を 35 サイクル、最後の伸長を 72℃ で 1 分とした。タッチダウン PCR のプログラムは、最初の変性を 94℃ で 2 分、タッチダウンによる増幅を 40 サイクル、最後の伸長を 72℃ で 1 分とした。タッチダウンによる増幅は DBY8 の原報⁷⁾を参考にして、変性を 94℃ 25 秒、アニーリングを 60℃ から 50℃ までサイクルごとに 0.5℃ 下げた後、50℃ に固定して各 30 秒、伸長を 72℃ 30 秒で行った。PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して観察した。一部の PCR 産物はゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) でマニュアルに準じて DNA を抽出、精製した。精製した DNA は PCR と同じプライマーを使い、ダイレクトシーケンスを行った。相同性の検索は、Reverse プライマーによる結果の逆相補鎖を Forward プライマーによる結果と繋いだ後、BLAST 上で行った。

3. 結果

解剖の際、生殖器と副生殖器で性別を確認したオオアシトガリネズミから肝臓を摘出し、肝臓から抽出した gDNA で PCR による性別判別を行った。その結果は、図 1 に示す通りである。雄特異的プライマーの DBY8 では、雄においてのみ、ヨーロッパガリネズミ⁷⁾と同様、約 200bp の PCR 産物が、明瞭なシングルバンドとして検出された。また、雌雄共通プライマーの AQP3 では、雌雄の両者において約 500bp の PCR 産物が、明瞭なシングルバンドとして検出された。AQP3 はスunks の相補的 DNA (cDNA) で 227bp の PCR 産物が得られるように設計したが (図 2)、得られた産物はそれよりも長い断片であった。

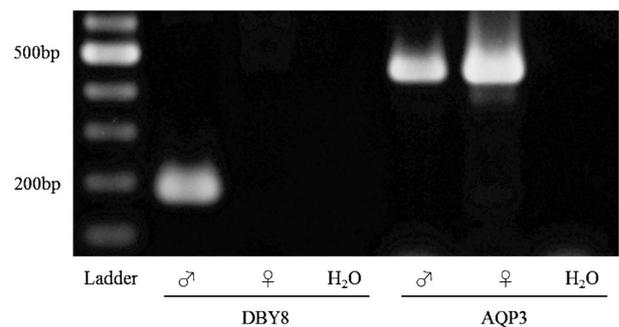


図 1 肝臓由来 gDNA による PCR

(1) スunks AQP3cDNA によるプライマー設計

```
ATCCTCGTGA TGTTCCGGCTG TGGCTCTGTG GCCCAGGTTG
TGCTCAGCCG GGGCACCCAC GGGGGCTTCC TCACCATCAA
CCTGGCCTTC GGCCTTGCTG TCACATTGGC CATCCTGGTC
GCAGGCCAGG TATCAGGAGC CCACCTCAAC CCAGCTGTTA
CCTTTGCCAT GTGCTTCCTG GCACGGGAAC CCTGGATCAA
ACTGCCTGTC TATGCCCTGG CTCAGACACT
```

下線はプライマー設計領域、60~280 番の配列のみ表示

(2) AQP3 による PCR 産物のシーケンス

```
CTTCCTCACC ATCCCGGGGC ACCCACGGGG GCTTCCTCAC
CATCAACCTG GCCTTCGGCT TTGCCGTAC GCTGGCCATC
CTGGTCTCGG GCCAGGTGTC AGGTAAGGCC TGAGCCATA
ACCCCATGG TTGTGCCCTG GGCAAGAGTA AGTCCCCC
CCACCGCCCC CGCCTCCTTC CTGCCCCCC CCTTCAGCC
CAATCTCGGC AGAACCATCA AGGATTCCCG TTAGCCTGTT
ACACTGTCCA GCCGCTGCCT TTGGAACCTC CCTCCTTATG
CCCAGGGCAG GGGGGCCCC CCTGGCTGCC TTGGCTGATC
CATCCACCT CCCTCTGCT CAGGAGCCCA CCTCAACCCA
GCCGTGACCT TTGCCATGTG CTTCTGGCC CGAGAACCGT
GGATCAAGCT GCCCGTCTAT GCC
```

多くの検体で一致した配列を示した

下線は(3)からイントロンと想定された領域

(3) (2)を BLAST に入れて検出されたヨーロッパガリネズミ AQP3cDNA との相同性 (Query が PCR 産物)

肝臓由来 gDNA で得られた DBY8 と AQP3 の PCR 産物でシーケンスを行った。DBY8 による PCR 産物はマウ

スの Y 染色体上にある DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box poly-peptide 3, Y-linked (Ddx3y) をコードする領域とのみ 75~78% (4 検体) の相同性が検出された。AQP3 による PCR 産物 (8 検体) は、ヨーロッパガリネズミの Aqp3 cDNA (GenBank : XM_004600197) と極めて高い相同性が検出された (図 2)。このため、AQP3 はオオアシトガリネズミのゲノムにおいても、Aqp3 の領域を増幅したと考えられた。

AQP3 による PCR 産物が想定したよりも長かったのは cDNA でプライマーを設計し、gDNA で PCR を行ったので、イントロンも増幅されたためと考えている。オオアシトガリネズミと高い相同性が観察されたヨーロッパガリネズミの Aqp3 の cDNA は、不明な塩基配列が存在するものの、8 つのエクソンで構成されることが知られている (Ensembl : ENSART0000001518)。

生体から抜いた体毛の gDNA で性別判定し、それら個体の供試時あるいは死亡時に剖検して、判定した性別との整合性を確認した。体毛由来 gDNA でも、明瞭な PCR 産物を安定して観察できた (図 3)。PCR で判定した性別は、雄 41 頭、雌 20 頭の全例で、生殖器と副生殖器の観察で判定した性別と一致した。

4. 考 察

本研究で検出を試みた Dby 領域 (Ddx3Y) は、Y 染色体上に存在し、遺伝子変異がある場合に男性不妊症やセトリ細胞唯一症候群、重度の造精機能障害を起こすことから精子形成過程に重要な働きをされると考えられている⁹⁾。この領域は、哺乳動物の雄で多種にわたって保存されており、人やマウスで検出されている⁷⁾。さらに、オオアシト

ガリネズミと同じトガリネズミ科であるヨーロッパトガリネズミの雄でも 200bp のバンドが確認されたことから⁷⁾、オオアシトガリネズミにおける雄の検出に利用できると思定した。

雄特異的プライマー DBY8 は、肝臓 gDNA による PCR とシーケンスの結果から、雄の Y 染色体上にある領域のみを増幅することが分かった。哺乳類の性決定遺伝子は種を超えて保存されているものの、動物種によってかなりの塩基置換が生じており、その相同性は 7~9 割とされている¹⁰⁾。今回はマウスの Dby と 78% の相同性が検出されたため、DBY8 はオオアシトガリネズミでも Dby を増幅したと思われる。DBY8 は雄のみで約 200bp の位置に PCR 産物を検出でき、雌では PCR 産物が検出されなかったことから、雄の検出に利用できることが示された。

雌雄共通プライマー AQP3 は、スunks の塩基配列を用いて設計した。オオアシトガリネズミは、マウスのようにゲノム情報が分かっていない。そのため、同じトガリネズミ形目に属し、唯一実験動物化に成功しているスunks のゲノム情報を使用した。AQP3 は Aqp3 cDNA からデザインした。Aqp3 は細胞膜を介した水移動において機能する膜の水チャンネル蛋白質の一種¹¹⁾ で、哺乳類の多くで遺伝的な情報が保存されていると思定した。AQP3 はオオアシトガリネズミで一本の明瞭な DNA バンドを検出できたことから、トガリネズミ形目トガリネズミ科であれば雌雄共通プライマーとして使用できる可能性がある。また、AQP3 は DBY8 と同じアニーリング温度で使えるため、雄特異的プライマーと雌雄共通プライマーを 1 回の PCR で増幅できて使いやすい。

体毛 gDNA で判定した性別は、すべての検体において、解剖で確認した性別と一致した。しかし、体毛 gDNA によるバンドは、肝臓 gDNA を使用した際のバンドよりも薄く、PCR 産物をまったく検出できないことも稀にあった。その原因としては、供試した体毛の本数が少なく、DNA 収量の低くなったことがまず考えられる。また、体毛に含まれるメラニンは PCR 反応を阻害するため (ISOHAIR マニュアル)、毛根部以外を多く採取して溶出した場合は、PCR 反応に障害を及ぼす可能性もある。体毛から抽出した DNA では、低い回収量と変成が問題となる。しかし、ジャイアントバンダでは PCR 産物の長さを 170bp 以下にすることにより、体毛から抽出した DNA による性別判定の一致率を 100% に改善している¹³⁾。本研究における高い一致率も、PCR 産物の長さがあまり長くなかったことが寄

PREDICTED: *Sorex araneus* aquaporin 3 (Gill blood group) (AQP3), mRNA
Sequence ID: ref|XM_004600197.1| Length: 873 Number of Matches: 2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
167 bits(90)	9e-38	90/90(100%)	0/90(0%)	Plus/Plus

Range 1: 147 to 236

Query	14	CCGGGGCACCCACGGGGGCTTCCTCACCATCAACCTGGCCTTCGGCTTTGCGTCACGCT	73
Sbjct	147	CCGGGGCACCCACGGGGGCTTCCTCACCATCAACCTGGCCTTCGGCTTTGCGTCACGCT	206

Query	74	GGCCATCCTGGTCTCGGGCCAGGTTCAGG	103
Sbjct	207	GGCCATCCTGGTCTCGGGCCAGGTTCAGG	236

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
150 bits(81)	1e-32	83/84(99%)	0/84(0%)	Plus/Plus

Range 2: 232 to 315

Query	340	TCAGGAGCCACCTCAACCCAGCCGTGACCTTCGCCATGTGCTTCCTGGCCGAGAACCG	399
Sbjct	232	TCAGGAGCCACCTCAACCCAGCCGTGACCTTCGCCATGTGCTTCCTGGCCGAGAACCG	291

Query	400	TGGATCAAGCTGCCCCGTCTATGCC	423
Sbjct	292	TGGATCAAGCTGCCCCGTCTATGCC	315

図 2 AQP3 プライマーによる PCR 産物のシーケンス

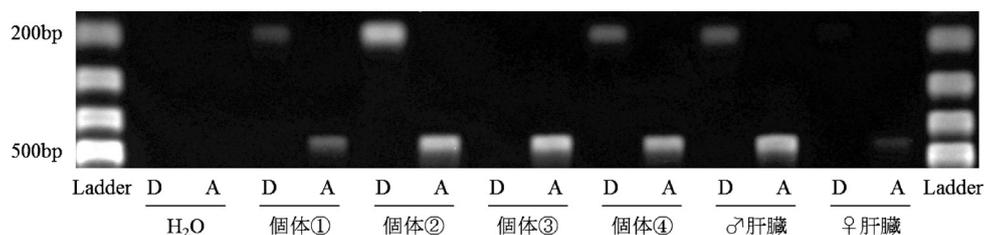


図 3 体毛由来 gDNA による性別判定 D : DBY8, A : AQP3, 個体①②④は雄、個体③は雌と判定

与したと考えている。

本研究では gDNA 抽出の材料に体毛を使用した。糞便を使用すると動物にとってより非侵襲的となる。体毛の採取は動物を保定する必要があること、体毛の毛根細胞を使用することから完全に非侵襲的方法ではない。抜け落ちた体毛を使った場合は DNA の変成が懸念され、他個体の体毛が混入する可能性もある。糞便は同一個体から何回もサンプル採取が可能で、採取時に当該動物のみならず採取者のリスクも少ないため、誰でも容易に採取できる利点がある。しかし、糞便から抽出した DNA には、被食種の組織片、寄生虫、バクテリア、ウイルスなどの DNA も混在している¹²⁾。また、PCR 反応の阻害物質の含有、DNA の断片化なども懸念され、糞に由来する DNA の解析は技術的な困難を伴うことが多い¹³⁾。

以上より、外見では性判別が困難なオオアシトガリネズミにおいて、簡便かつ反復して採取でき、採取時に個体への侵襲度が低いと思われる体毛を材料とした PCR による性判別の開発に成功した。この性判別法は動物園を含めた飼育個体のみならず、フィールド調査における放獣個体にも適応でき、今後の実験動物化に向けて有用な技術になると思われる。

謝辞：本研究の一部は平成 23 年度公益信託乾太助記念動物科学研究助成基金（研究題名：トガリネズミ形目における新規モデル動物の開発）を受けて行った。オオアシトガリネズミの捕獲と飼育については、東京都多摩動物公園の菊地文一氏、霧多布湿原センターの河原淳氏（いずれも当時）、実験動物中央研究所の江袋進氏に数多くのアドバイスをいただいた。東京農業大学動物資源管理学研究室の和田健太助教には、投稿前の原稿にコメントをいただいた。この場を借りて、厚く御礼申し上げる。

参考文献

- 1) 磯村源藏監修(2011) スンクスの生物学. 学会出版センター, 東京.
- 2) 近藤恭司監修 (1985) スンクスー実験動物としての食虫目

- トガリネズミ科動物の生物学-. 学会出版センター, 東京.
- 3) INOUE T (1988) A new method for sexing young of the big-clawed shrew, *Sorex unguiculatus* (Dobson). *J. Mamm. Soc. Japan* **13**: 143-145.
- 4) WAITS L P, PAETKAU D (2005) Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: A review of applications and recommendations for accurate data collection. *J. Wildl. Manage.* **69**: 1419-1433.
- 5) DURNIN M E, PALSBØLL P J, RYDER O A, MCCU- LLOUGH D R (2007) A reliable genetic technique for sex determination of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) from non-invasively collected hair samples. *Conserv. Genet.* **8**: 715-720.
- 6) MATSUBARA K, ISHIBASHI Y, OHDACHI S, MATSUDA Y (2001) A new primer set for sex identification in the genus *Sorex* (Soricidae, Insectivora). *Mol. Ecol. Notes* **1**: 241-242.
- 7) HELLBORG L, ELLEGREN H Y (2003) Y chromosome conserved anchored tagged sequences (YCATS) for the analysis of mammalian male-specific DNA. *Mol. Ecol.* **12**: 283-291.
- 8) OHDACHI S (1994) Total activity rhythms of the three soricine species in Hokkaido. *J. Mamm. Soc. Japan* **19**: 89-99.
- 9) LARDONE M, PARODI D, VALDEVENTO R, EBENSPERGER M, PIOTTANTE A, MADARIAGA M, SMITH R, POMMER R, ZAMBRANO N, CASTRO A (2007) Quantification of DDX3Y, RBMY1, DAZ and TSPY mRNAs in testes of patients with severe impairment of spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* **13**: 705-712.
- 10) 影山聡一 (1992) 家畜の性決定遺伝子 (SRY) 保存領域の PCR 法による増幅と塩基配列の種差. 日畜会報. **63**: 1059-1065.
- 11) MATSUZAKI T, HATA H, OZAWA H, TAKATA K (2009) Immunohistochemical localization of the aquaporins AQP1, AQP3, AQP4, and AQP5 in the mouse respiratory system. *Acta Histochem. Cytochem.* **42** (6): 159-169.
- 12) 増田隆一, 嶋谷ゆかり, 大石琢也, 合田直樹, 田島沙羅, 佐藤丈寛 (2009) 食肉目の遺伝子分析を目的としたサンプリング法, 遺伝子分析技術, 遺伝情報の解析法および研究事例. 哺乳類科学. **49**: 283-302.
- 13) 松木吏弓, 竹内 亨, 阿部聖哉, 矢竹一穂, 梨本 真 (2004) 糞の DNA 解析によるノウサギの生息密度の推定. 哺乳類科学. **44**: 113-116

Sexing of Long-Clawed Shrew (*Sorex unguiculatus*) by Using Genomic DNA from the Hair

By

Yuichi KAMEYAMA*[†], Takamitsu KURODA**, Satoshi KIMURA*, Kohei OKIMOTO**,
Gaku SHIMOI* and Ryoichi HASHIZUME*

(Received January 23, 2014/Accepted June 6, 2014)

Summary : Sexing of the long-clawed shrew based on its external features is relatively difficult. And physical restraint to observe their external genitalia often causes extreme levels of stress, because the wild shrews are unaccustomed to handling. In this study, we employed polymerase chain reaction (PCR) analysis of genomic DNA (gDNA) from the hair of the shrews as an alternative method for sexing. In the preliminary experiment, the sexes of the shrews were confirmed by observing their gonads after dissection, prior to PCR analysis using gDNA extracted from the livers. DBY8, a male-specific primer set for the European shrew, was utilized as the male-specific primer set. AQP3, designed from the complementary DNA sequence of Aqp3 from musk shrew, was utilized as the gender-neutral primer set. A single, clear PCR product was detected in the gDNA from males by using DBY8 and from both sexes by using AQP3 after electrophoresis. The results of sexing by PCR analysis of the hair gDNA were completely consistent with the sexing as confirmed by observing the dissected gonads. In conclusion, we developed a reliable method of sexing by using PCR analysis of gDNA extracted from the hair of the long-clawed shrew, which is a specimen that can be collected non-invasively and repeatedly.

Key words : long-clawed shrew, sexing, PCR, hair, DBY, AQP

* Department of Bioproduction, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture

** Department of Bioproduction, Graduate School of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture

[†] Corresponding author (E-mail : y-kameya@bioindustry.nodai.ac.jp)