

総説：鳥類における雌雄鑑別

加藤博己¹、宮下実¹、入谷明¹

要 旨

鳥類は雌ヘテロ型の性染色体構成をとり、哺乳類とは異なった性決定機構を持っている。鳥類の産業的な利用や飼育下の繁殖において、各個体の雌雄判別は非常に大きな課題である。本文では過去から現在に至るまで、実施されてきた種々の鳥類の雌雄鑑別法について総説する。

緒 言

鳥類は、現在では恐竜の獣脚類から進化したと考えられている。鳥類は大部分の哺乳類と同様、個体の保有する性染色体による性決定を行うが、雄ヘテロ型の性染色体構成をとる哺乳類とは異なり、雌ヘテロ型の性染色体構成をとっており、鳥類の雌はZWの性染色体を持ち、雄はZZの性染色体を持つ。鳥類においては、オシドリやクジャクのように、成鳥において羽色などによって同一種内での雌雄個体の区別がつくものもあるが、成鳥においても羽色や体の大きさが雌雄で差が無いものも多く、ましてや、雛の段階では外見ではまったく区別のつかないものが多い。現在、家禽であるニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラなどでは、肉、卵および羽毛が産業的に利用され、愛玩鳥としての、カナリア、文鳥、十姉妹、セキセイインコなどでは、声や姿の美しさが愛玩の対象となり、その他野生・希少種としてのキジ、フラミンゴ、キーウィ、コンゴウインコ類などでは、動物園等において、多くの人々にとって生きた理科教材として展示に供されている。これら、産業用家禽類、愛玩鳥および展示用野生・希少種の鳥類は、人工飼育のもとで繁殖が行われているものが多い。産業用家禽類においては産卵用の雌と産肉用の雄の区別は重要であり、愛玩鳥においてもカナリア等声を楽しむものでは雄の需要が大きく、また、姿を楽しむものにおいても成熟した雄の外見の派手さが好まれる場合が多い。また、特に個体数が少ない野生・希少種の人工飼育においては、孵化する雛の性は大きな関心と呼ぶところであり、近交の回避を含むその後の人工繁殖計画の立案に大きな影響を及ぼす。本論文では近年行われている人工飼育下における家禽、愛玩鳥および希少・野生種の鳥類において行われている雌雄鑑別法を取り上げ、その方法や有用性について論じる。

1. ニワトリの雛の外部形態による雌雄鑑別

ニワトリにおいて雛の雌雄鑑別は、産卵鶏としての雌と産肉鶏としての雄を早期に区別し、それぞれの目的に適した飼養方法をとるために必要な、非常に重要な分岐点である。ニワトリの雛の雌雄鑑別には羽毛または総排泄孔内部の生殖突起の形態による鑑別法の2種類の 방법이用いられている。このうち、羽毛や羽色をもちいた鑑別方法は、伴性遺伝を利用し、羽の伸びる速度の差異や羽色の違いによって雌雄を鑑別するものである。総排泄孔内部の生殖突起の形態による鑑別法は、日本において1924年に遡って開発されたもので、当時の農林省畜産試験場において、増井清博士、橋本重郎博士および大野勇氏の3名によって開発され、肛門鑑別法または指頭鑑別法とも呼ばれる¹⁾。この方法は1927年には実用化が始まり、現

在も行われており、畜産技術協会の初等科コースを経てふ化場で経験を積んだ後、高等考査に合格すると国家資格の一つである初生雛鑑別師の資格を得ることができる。この方法は術者に非常に繊細な指先の感覚が要求されるが、低侵襲的であり熟練者によれば判別精度も非常に高くかつ短時間で可能なため、アヒルなどニワトリ以外の家禽にも用いられている。

2. 細胞培養と染色体標本による雌雄鑑別

鳥類を外部形態の差異によらず雌雄鑑別する方法として発達したのが、個体から採集した細胞を培養し、コルセミドで処理して細胞周期を M 期で停止させ、低張処理によって分散させた後にギムザ染色や各種染色体分染法を用いて染色して観察し、染色体の構成をもとにして雌雄の別を判定するもので、日本においてすでに絶滅してしまったトキ²⁾ やその他の鳥類³⁾ においてその有用性が報告されている。しかし、この方法は性染色体の分化が進んでいないダチョウを含む平胸類（走鳥類、*Ratitae*）には適用し難いという欠点を持つ。また、現生のほとんどの鳥類が含まれる胸峰類（*Carinatae*）においても、種によっては Z および W のそれぞれの性染色体を他の常染色体と識別することが困難であり、染色体標本による雌雄鑑別には慎重を要するものがある⁴⁾。さらに、この方法は、採集した細胞を培養する細胞培養装置を必要とし、かつ、染色体標本作製には技術的習熟を要する。

3. 染色体の蛍光 *in situ* hybridization による雌雄鑑別

上記染色体標本による雌雄鑑別法と近いものであるが、性染色体特異的な DNA 配列をプローブとして用いて、染色体へのプローブの結合によって性染色体の判定を行うもので、特に蛍光 *in situ* hybridization の開発⁵⁾ によって、従来の染色体構成を肉眼的に識別する形態学的手法に対して極めて正確に性染色体の識別が可能となり、その有用性は非常に高いものとなった。鳥類の雌雄鑑別においては、ニワトリの W 染色体特異的な非反復配列を蛍光 *in situ* hybridization のプローブとして用い、また、同時にこのプローブを他の 18 種の胸峰類に属する鳥類のゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーションに用いることより、雌雄鑑別が可能であることが報告されている⁶⁾。さらに、従来、Z および W 性染色体の分化が進んでおらず、染色体の形態学的な差異によっては判別不能であった平胸類においても蛍光 *in situ* hybridization により Z および W 性染色体の判別が可能となり⁷⁾、すべての鳥類において、染色体の蛍光 *in situ* hybridization による雌雄鑑別を行えば、その性を決定できるようになっている。染色体の蛍光 *in situ* hybridization による雌雄鑑別法の問題点としては、操作の手技を正確に行うためには相応の修練を必要とすることと、感度および倍率の高い蛍光顕微鏡を必要とし、そのコストが相当に高いこと、および手技が煩雑なため、一度に多数のサンプルを取り扱うことが困難なことが挙げられる。

4. Flow cytometry による雌雄鑑別

一般に、Z および W 性染色体の分化が進んだ胸峰類においては、Z 染色体と W 染色体の大きさの違いが大きくなっている。これを利用し、細胞中の DNA 量を測定することによって ZZ 型の性染色体をもつ雄と ZW 型の性染色体をもつ雌の区別を行う方法が Flow cytometry による雌雄鑑別法である^{8), 9)}。この方法の利点としては採集した血球を用いた測定が非常に短時間で終了し、多くの個体の鑑別が可能なことである。しかし、この方法では、Z および W 染色体の大きさの差が大きいかほど正確な判別が可能であるものの、Z および W 性染色体の分化が進んでいない平胸類のようにその差が小さいものでは、正確さは小さくなり、実用に適さなくなる。

5. PCR (Polymerase chain reaction) 法による雌雄鑑別

PCR法による雌雄鑑別は哺乳類で先行し、特に雌雄の個体が異なる価値を持つ家畜の分野で発達してきた¹⁰⁾。哺乳類は雄ヘテロ型の性染色体構成をとり、雌はXXの性染色体を持ち、雄はXYの性染色体を持つ。哺乳類のうち真獣類に属する動物のほとんどの種では、雄の持つ性染色体であるY染色体上に存在する*SRY* (Sex-determining region on Y) 遺伝子の発現によって、未分化の生殖腺が精巣へと分化し個体は雄になる^{11), 12)}。この雄特異的な*SRY* 遺伝子の存在とそのDNA塩基配列が明らかとなり、現在では多くの種で*SRY* 遺伝子のDNA塩基配列を基に作成したプライマーを用いて、哺乳類個体や胚の雌雄鑑別が行われている^{13), 14)}。しかし、*SRY* 遺伝子のDNA塩基配列を基に作成したプライマーを用いたPCRによる雌雄判別では、雌のサンプルではDNA断片の増幅がなされないことになり、PCRの失敗によってDNA断片の増幅がなされないこととの区別が付きにくかった。そこで近年では、XおよびY染色体に共通して存在しているが第5エクソン長がXおよびY染色体で異なる*amelogenin* 遺伝子の遺伝子断片のPCRによる増幅を用いた雌雄鑑別も報告されている¹⁵⁾。

鳥類においては、哺乳類の*SRY* 遺伝子に相当する胚の性決定に直接関与する遺伝子はいまだ発見されていない。鳥類の性決定においては、①「W染色体上に胚を雌に誘導するX遺伝子が存在する」という説と、②「Z染色体上に存在するX遺伝子の発現量が性染色体がZZ型である雄胚では、性染色体がZW型である雌胚に比べて2倍であり、その遺伝子の発現量の違いによって胚の雌雄が決定される」との2説が提唱されてきた。近年の3倍体を用いた研究より、②の説が有力視されてきた。そして、Z染色体上に存在する*DMRT1* (doublesex and mab-3-related factor 1) 遺伝子が鳥類において雄の決定に関与するとの報告がなされるに至っている¹⁶⁾。

鳥類におけるPCRによる有効な性鑑別法は、*CHD* (chromobox-helicase-DNA-binding) 遺伝子のDNA塩基配列を基にしてプライマーを作製し、PCRを行うものである^{17), 18)}。*CHD* 遺伝子はZ染色体(*CHD-Z*) およびW染色体(*CHD-W*) の両方に存在する。両者は相同な関係にあるが、両者の間にはいくつかの点突然変異やイントロンの長さの違いが存在する。この違いを利用することによって、*CHD* 遺伝子のDNA塩基配列を基にしたプライマーを用いたPCRによって、ダチョウを含む平胸類以外の鳥類ではほぼPCRによる性鑑別が可能になっている^{18), 19), 20)}。しかし、種によっては*CHD-Z* および*CHD-W* の増幅された遺伝子断片長の差が少ないため、RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 法やSSCP (Single strand conformation polymorphism) 法など、他の方法を組み合わせることによってより正確な雌雄鑑別が可能とする報告もある^{21), 22)}。また、平胸類においても研究が進み、キーウィ (*Apteryx australis mantelli*) のW染色体特異的なDNA塩基配列をクローニングし、その配列を基に作成したプライマーを用いてPCRを行うことによって、平胸類の雌雄鑑別が可能になったという報告もなされている²³⁾。

参考文献

1. 社団法人畜産技術協会ホームページ. <http://jlta.lin.gr.jp>
2. 佐々木本道. (1971). 染色体による鳥類の性判別. どうぶつと動物園. 5:22-23.
3. 尾村嘉昭. (1976). 鳥類の染色体による雌雄判定. Jap. J. vet. Sci. 38:281-288.
4. Tsuda Y., Nishida-Umehara C., Ishijima J, Yamada K., Matsuda Y. (2007). Comparison of the Z and W sex chromosomal architectures in elegant crested tinamou (*Eudromia elegans*) and ostrich (*Struthio camelus*) and the process of sex chromosome differentiation in palaeognathous birds. *Chromosoma*. 116:159-173.
5. Pinkel D., Straume T., Gray J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity

- fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:2934-2938.
6. Ogawa A., Solovei I., Hutchison N., Saitoh Y., Ikeda J.E., Macgregor H., Mizuno S. (1997) Molecular characterization and cytological mapping of a non-repetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing Carinatae birds. *Chromosome Res.* 5:93-101.
 7. Ogawa A., Murata K., Mizuno S. (1998) The location of Z- and W- linked marker genes and sequence on the homomorphic sex chromosomes of the ostrich and the emu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:4415-4418.
 8. Nakamura D., Tiersch T.R., Douglass M., Chandler RW. (1990) Rapid identification of sex in birds by flow cytometry. *Cytogenet. Cell Genet.* 53:201-205.
 9. Canon N.R., Tell L.A., Needham M.L., Gardner I.A. (2000) Flow cytometric analysis of nuclear DNA for sex identification in three psittacine species. *Am. J. Vet. Res.* 61:847-850.
 10. 佐伯和弘. (2001) PCR 法による胚の性判別とその実用化. *畜産技術.* 558:5-8.
 11. Sinclair AH., Berta P., Palmer MS., Hawkins JR., Griffiths BL., Smith MJ., Foster JW., Frischauf AM., Lovell-Badge R., Goodfellow P. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 346:216-217.
 12. Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Muensterberg A., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. (1990) A gene mapping to the sex-determining region of mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature.* 346:245-250.
 13. Fu Q., Zhang M., Qin WS., Lu YQ., Zheng HY., Meng B., Lu SS., Lu KH. (2007) Cloning the swamp buffalo SRY gene for embryo sexing with multiples-nested PCR. *Theriogenology.* 68:1211-1218.
 14. McClive PJ., Sinclair AH. (2001) Rapid RNA extraction and PCR-sexing of mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 60:225-226.
 15. Xu X., Lin L., Zhang Z., Shen F., Zhang L., Yue B. (2008) A reliable, non-invasive PCR method for giant panda. *Progress in ex-situ giant panda res. Chapter 4, Genetic research.* 285-287.
 16. Smith CA., Roeszler KN., Ohnesorg T., Cummins DM., Farlie PG., Doran TJ., Sinclair AH. (2009) The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature.* 461:267-271.
 17. Ellegren H. (1996) First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 263:1635-1641.
 18. Griffiths R., Double MC., Orr K., Dawson RJG. (1998) A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecology.* 7:1071-1075.
 19. Ito H., Sudo-Yamaji A., Abe M., Murase T., Tsubota T. (2003) Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes. *Zoological Sci.* 20:339-344.
 20. Chang HW., Chou TC., Gu DL., Cheng CA., Chang CC., Yao CT., Chuang LY., Wen CH., Chou YC., Tan KY., Cheng CC. (2008) An improved PCR method for gender identification of eagles. *Mol. Cell. Probes.* 22:184-188.
 21. Costantini V., Guaricci AC., Laricchiuta P., Rausa F., Lacalandra GM. (2008) DNA sexing in Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples. *Anim. Reprod. Sci.* 106:162-167.
 22. Romas PS., Bastos E., Mannan R.W., Guedes-Pinto H. (2009) Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism applied to sex identification of *Accipiter cooperii*. *Mol. Cell. Probes.* 23:115-118.

23. Huynen L., Millar CD., Lambert DM. (2002) A DNA test to sex ratite birds. *Mol. Ecology*. 11:851-856.

英文要旨

Gender identification of birds

Hiromi Kato, Mimoru Miyashita and Akira Iritani

Abstract

Birds have a different sex chromosome system compared to mammals. Female birds have heterogametic ZW sex chromosomes and male birds have homogametic ZZ sex chromosomes. The gender identification of each bird has huge effect on the industrial utilization of birds and the reproduction program of wild or rare species in captivity. In this text, gender identification methods developed so far were reviewed.