

## PCR 法によるペンギン類の性判別

加藤 博己<sup>1</sup>

### 要 旨

ペンギン類は、同種内で雌雄個体間に外見の差が少ないため、外見からは個体の雌雄を正確に判別することが困難である。その一方で、日本国内で飼育され、動物園・水族館で展示されているペンギン類を維持し、展示を継続するためには、国内での効率の良いペンギン類の繁殖が必要であり、その第一段階として、ペンギン類の各個体の性別を知ることは必須である。本稿では、当研究室で実施している PCR 法によるペンギン類の雌雄判別について紹介する。

キーワード：ペンギン、性判別、PCR 法

### 1. 緒 論

ペンギンは、鳥綱ペンギン目ペンギン科に属する種の総称であり、6 属 18 種が存在する<sup>(1)</sup>。これら 18 種のうち、国際自然保護連合(International Union for Conservation of Nature, IUCN)レッドリストのカテゴリーで、5 種が絶滅危惧種、4 種が危急種とされている(表 1)<sup>(2)</sup>。

また、「絶滅のおそれのある野生動植物の種の国際取引に関する条約 (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES またはワシントン条約)」では、フンボルトペンギンが附属書 I に、ケープペンギンが附属書 II に掲載されており<sup>(3)</sup>、それぞれの種は国際間取引が制限される対象となっている。ペンギン類は、日本において、14 種が飼育されており<sup>(1)</sup>、日本は世界最大のペンギン飼育大国である。しかしその一方で、ワシントン条約で国際間取引が制限されていなくても、野生個体を捕獲して飼育することは種の保全の観点から世界的に困難になってきており、日本国内で従来と同様なペンギン類の展示を動物園・水族館で継続しようとするれば、現在日本国内で飼育されているペンギン類を国内で繁殖させ、遺伝的多様性を維持しながら個体数を維持する必要がある。

ペンギン類は、経験を積んだ飼育員であれば嘴の太さ等で個体の性別をある程度予測できるが、同種内で雌雄個体間に外見の差が少ないため、外見から個体の雌雄を正確に判別することが困難である。そのため、当研究室では、簡便かつ正確にペンギン類個体の雌雄を判別する方法として、Constantini らによる方法<sup>(4)</sup>をもとに、羽軸または血液のサンプルから回収した DNA をテンプレートとして使用した PCR 法による雌雄判別を実施してきた。本稿では、現在当研究室で実施している羽軸から回収された DNA を用いた PCR 法によるペンギン類の雌雄判別について紹介する。

表 1. ペンギン類の種と IUCN\* による絶滅危惧度 (2)

科名	属名	種名	絶滅危惧度*
ペンギン	オウサマペンギン	オウサマペンギン	低懸念
		コウテイペンギン	準絶滅危惧
	アデリーペンギン	アデリーペンギン	低懸念
		ジェンツーペンギン	低懸念
		ヒゲペンギン	低懸念
	コガタペンギン	コガタペンギン	低懸念
	フンボルトペンギン	フンボルトペンギン	危急
		ガラパゴスペンギン	危機
		マゼランペンギン	低懸念
		ケープペンギン	危機
	キンメペンギン	キンメペンギン	危機
	マカロニペンギン	シュレーターペンギン	危機
		ロイヤルペンギン	準絶滅危惧
		マカロニペンギン	危急
		キタイワトビペンギン	危機
		ミナミイワトビペンギン**	危急
		スネアーズペンギン	危急
		フィヨルドランドペンギン	準絶滅危惧

\* : IUCN による絶滅危惧度の指標

未評価	データ不足	低懸念	準絶滅危惧	危急	危機	深刻な危機	野生絶滅	絶滅
-----	-------	-----	-------	----	----	-------	------	----

\*\* : ペンギンの種を 19 種としている例もあるが、この分類では、ヒガシイワトビペンギンはミナミイワトビペンギンの亜種であるとし、ミナミイワトビペンギンに含めて 18 種とする。

## 2. 材料と方法

### (1) DNA の採集

DNA を採集するためのペンギンのサンプルは、採集時に各個体への侵襲性をなるべく下げるために、胸部または腰部の羽毛を、鉗子を用いて採集する。当研究室では、通常、1 回の DNA 採集処理に 3 本の羽毛を用いている。

羽毛からの DNA 採集には、キアゲン社の DNeasy® Blood & Tissue Kit を用いる。利用するプロトコルは、通常の DNeasy® Blood & Tissue Kit のものとは異なり、キアゲン社の Web サイトに示されている User-Developed Protocol のうち、爪・被毛・羽毛用に最適化されたものに従う<sup>(5)</sup>。その方法は、以下のとおりである。

1. ペンギンの羽毛3本のうち、羽軸根先端の下臍から約1cmまでの部分を切断し（以下、羽軸）、2mLのチューブへ入れる。
2. 300 $\mu$ LのATLバッファー、20 $\mu$ LのプロテイナーゼKと20 $\mu$ Lの1Mジチオスレイトール(DTT)をチューブへ加え、ボルテックスしてよく混合した後、56°Cで一晩培養して羽軸を溶解する。培養中に数回ボルテックスを行ってサンプルをよく攪拌する。
3. 羽軸が溶解した後、15秒間ボルテックスをかけ、サンプルを再度よく攪拌する。300 $\mu$ LのALバッファーを加え、ボルテックスでよく攪拌する。その後300 $\mu$ Lのエタノール(96-100%)を加えて、再度ボルテックスでよく攪拌する。
4. サンプル混合物(沈殿物がある場合は沈殿物ごと)を2mLのコレクションチューブ上へセットしたDNeasy Mini spin カラムへ入れ、 $\geq 6,000 \times g$ で1分間遠心し、コレクションチューブをカラムを通過した液体ごと廃棄する。
5. DNeasy Mini spin カラムを新しい2mL コレクションチューブ上へセットし、500 $\mu$ LのAW1バッファーを加え、 $\geq 6,000 \times g$ で1分間遠心し、コレクションチューブをカラムを通過した液体ごと廃棄する。
6. DNeasy Mini spin カラムを新しい2mL コレクションチューブ上へセットし、500 $\mu$ LのAW2バッファーを加え、20,000 $\times g$ で3分間遠心し、コレクションチューブをカラムを通過した液体ごと廃棄する。
7. DNeasy Mini spin カラムを新しい清浄な1.5mLチューブ上へセットし、100 $\mu$ LのAEバッファーをカラムのメンブレン上へ直接加え、室温で1分間静置した後、 $\geq 6,000 \times g$ で1分間遠心する。
8. DNeasy Mini spin カラムを新しい清浄な1.5mLチューブ上へセットし、100 $\mu$ LのAEバッファーをカラムのメンブレン上へ直接加え、室温で1分間静置した後、 $\geq 6,000 \times g$ で1分間遠心する。
9. 7と8で回収したDNA溶液を合わせて、ペンギンの羽軸由来のDNA溶液とする。

通常、このDNA採集方法によって、6 ng/ $\mu$ L程度の濃度の高純度(A260/A280値2.0程度)DNA溶液が約200 $\mu$ L回収され、PCR法のテンプレートとして直接使用可能である。

## (2)PCR法

(1)で採集されたペンギンのDNA溶液をテンプレートとして用いたPCR法は、Constantiniらによる方法<sup>(4)</sup>を用いる。この方法では、鳥類の性染色体であるZおよびW染色体上に存在する *Chromodomain helicase DNA binding protein* (CHD)遺伝子を増幅する。鳥類の性染色体は、哺乳類の性染色体のように分化が進んでおらず、CHD遺伝子はZおよびW染色体のどちらにも存在しているが、ZおよびW染色体上のCHD遺伝子は塩基配列に違いがあるため、その違いを利用する。ペンギン類のZ染色体上のCHD遺伝子(CHD-Z)遺伝子とW染色体上のCHD遺伝子(CHD-W)は、Griffithsら<sup>(6)</sup>によって記載されたプライマーP8とP2を用いたPCRで増幅すると、それぞれCHD-ZとCHD-Wから増幅されたDNA断片長は、これまでに当研究室で研究に用いた、オウサマペンギンでは50bp程度の違いがあるが、コウテイペンギン、ヒゲペンギン、アデリーペンギン、ジェンツーペンギン、マゼランペンギン、ケープペンギンおよびキタイワトビペンギンでは、増幅されたDNA断片長の差はCHD-ZとCHD-Wの間で20bp程度と非常に小さく、2%アガロースを用いたDNA断片の電気泳動では判別が困難である。しかし、CHD-Z

と CHD-W の DNA は塩基配列が異なり、CHD-Z から増幅された DNA 断片は、制限酵素 *Hae*III で切断することができるため、PCR 産物を制限酵素 *Hae*III で処理したものを電気泳動する制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) を行うと、Z および W 染色体の存在を確認することができる。

PCR 法にはキアゲン社の TaqDNA ポリメラーゼおよび dNTP 混合溶液を用いる。反応系は総量 25  $\mu$ L で行い、テンプレート DNA 溶液として (1) からのゲノム DNA 溶液 10  $\mu$ L を用いる。PCR 法の反応液組成、プライマー設定、反応温度およびサイクルは表 2、表 3 および図 1 のとおりである。

表 2. PCR 法反応液組成

薬品名等	液量( $\mu$ L)
Distilled water	9.375
10 $\times$ Corel Load PCR buffer	2.5
dNTP mix	0.5
Primer P8 (5 $\mu$ M)	1.25
Primer P2 (5 $\mu$ M)	1.25
Taq DNA Polymerase	0.125
DNA template solution	10
total	25

表 3. プライマー(P8、P2)の塩基配列<sup>(6)</sup>

名称	塩基配列
P8	5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'
P2	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'

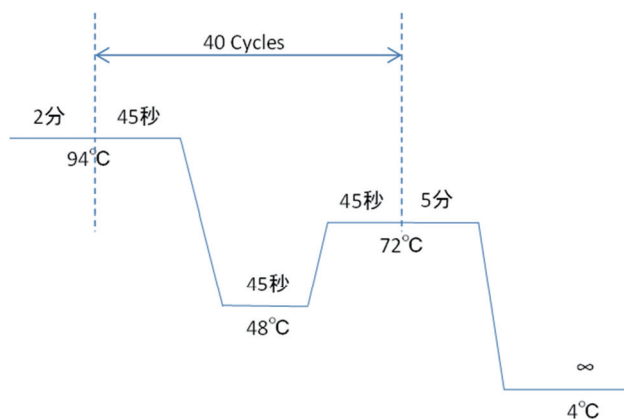


図 1. PCR の反応温度およびサイクル

### (3) RFLP

PCR 反応の終了後、RFLP を実施するために、各個体サンプルの反応後溶液から 8  $\mu$ L を用いて制限酵素 *Hae*III による処理を行う。表 4 に示した反応液を、37°C の培養器中で一晩培養して反応させた後に、2% アガロースゲルプレートを用いて電気泳動を行う。

表 4. RFLP の反応液組成

薬品名等	液量( $\mu$ L)
反応後の PCR 反応液	8
10 $\times$ buffer M	1
<i>Hae</i> III	1
total	10

### 3. 結果と考察

鳥類は、雄では ZZ 型、雌では ZW 型の雌ヘテロ型の性染色体構成を持つ。前述したように、ペンギン科に属する多くの種では、Z 染色体上に存在する CHD-Z と W 染色体上に存在する CHD-W は、PCR 法に使用する P8 および P2 のプライマーを用いると、CHD-Z および CHD-W からそれぞれ約 400 および 380bp の長さの DNA 断片が増幅されるが、2%アガロースゲルを用いた電気泳動では CHD-Z と CHD-W の区別がつきにくい。マゼランペンギンの場合は、12%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動すれば、この CHD-Z と CHD-W の約 400 および 380bp の長さの増幅された DNA 断片を確認することが可能であることが報告されている<sup>(7)</sup>。さらに、3%アガロースゲルを用いた電気泳動では、CHD-Z および CHD-W から増幅された約 400 および 380bp の長さの DNA 断片の判別が可能であるとする報告もある<sup>(8)</sup>。しかし、CHD-Z と CHD-W は塩基配列が異なり、CHD-Z から増幅された DNA 断片は、制限酵素 *Hae*III で切断することができることを利用して、PCR 産物を *Hae*III で処理したものを電気泳動する RFLP を行うと、CHD-Z は *Hae*III によって約 300bp と約 80bp の長さの DNA 断片に分かれるが、CHD-W は *Hae*III で切断されず、約 400bp の長さの DNA 断片がそのまま確認されるため、RFLP 後にアガロースゲルを用いた電気泳動によって、Z および W 染色体の存在をより確実に確認することができる。図 2 は、アドベンチャーワールドより提供されたケーブペンギンの羽軸から回収されたゲノム DNA をテンプレートとし、P8 および P2 のプライマーを用いて PCR 法によって増幅された DNA 断片を制限酵素 *Hae*III で RFLP を行ったものを 2%アガロースゲルを用いて電気泳動した結果である。レーン②と③および④と⑤はそれぞれ同一個体であり、レーン②と④は PCR によって増幅された DNA 断片をそのまま泳動したもので、レーン③と⑤は、レーン②と④のものを *Hae*III を用いて RFLP を行った後に泳動したものである。レーン②と④では現れているバンドの長さに差は認められないが、RFLP の結果、レーン⑤はバンドが 1 本であるのに対し、レーン③にはバンドが 2 本現れており、レーン②と③の個体は CHD-Z と CHD-W の両方を持つ個体であり、すなわち雌、レーン④と⑤の個体は CHD-Z のみを持つ個体であり、すなわち雄であると判定される。

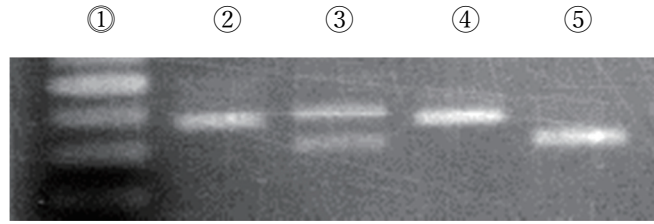


図2. 羽軸由来ケーペンギンゲノム DNA をプライマーP8 および P2 を用いて増幅した、PCR とその後の制限酵素 *Hae*III を用いた RFLP の 2%アガロースゲルの電気泳動像

Lane①：100bp Ladder DNA marker, 上の濃いバンドは 500bp を示す。

②：プライマーP8 および P2 を用いて増幅された DNA のバンド。

③：②を *Hae*III で RFLP を行ったもの。RFLP の結果、2 本のバンドが観察された。

④：プライマーP8 および P2 を用いて増幅された DNA のバンド。

⑤：④を *Hae*III で RFLP を行ったもの。RFLP の結果、1 本のバンドが観察された。

図3は、アドベンチャーワールドより提供されたオウサマペンギンの羽軸から回収されたゲノム DNA をテンプレートとし、P8 および P2 のプライマーを用いて PCR 法によって増幅された DNA 断片を制限酵素 *Hae*III で RFLP を行ったものを 2%アガロースゲルを用いて電気泳動した結果である。レーン②と③および④と⑤はそれぞれ同一個体であり、レーン②と④は PCR によって増幅された DNA 断片をそのまま泳動したもの、レーン③と⑤は、レーン②と④のものを *Hae*III を用いて RFLP を行った後に泳動したものである。レーン②では現れているバンドは 1 本であるが、レーン④では RFLP を行わなくても、2 本のバンドが現れている。さらに、RFLP の結果、レーン③はバンドが 1 本であるのに対し、レーン⑤にはレーン④よりも長さの差が大きいバンドが 2 本表れており、レーン②と③の個体は CHD-Z のみを持つ個体であり、すなわち雄、レーン④と⑤の個体は CHD-Z と CHD-W を持つ個体であり、すなわち雌であると判定される。このように、オウサマペンギンの場合は、P8 および P2 のプライマーを用いると、CHD-Z および CHD-W からそれぞれ約 400 および 350bp の長さの DNA 断片が増幅され、2%アガロースゲルを用いた電気泳動でも CHD-W と CHD-Z を区別することができるが、より確実に個体の性を判定するためには、P8 および P2 のプライマーを用いて PCR 法によって増幅された DNA 断片を制限酵素 *Hae*III で RFLP を行った方が良いと考えられる。また、オウサマペンギンにおけるこのような P8 および P2 のプライマーを用いた場合の、CHD-Z および CHD-W からの増幅 DNA 断片長の約 50bp の長さの違いは、図4に示すように、同じオウサマペンギン属であるコウテイペンギンの雌個体由来 DNA をテンプレートとして用いた PCR の結果には現れない。

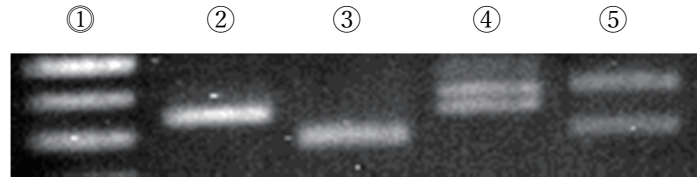


図3. 羽軸由来オウサマペンギンゲノム DNA をプライマーP8 および P2 を用いて増幅した、PCR とその後の制限酵素 *Hae*III を用いた RFLP の 2% アガロースゲルの電気泳動像

Lane①：100bp Ladder DNA marker, 上の濃いバンドは 500bp を示す。

②：プライマーP8 および P2 を用いて増幅された DNA のバンド。

③：②を *Hae*III で RFLP を行ったもの。RFLP の結果、1 本のバンドが観察された。

④：プライマーP8 および P2 を用いて増幅された DNA のバンド。

2 本のバンドが観察された。

⑤：④を *Hae*III で RFLP を行ったもの。RFLP の結果、2 本のバンドが観察された。

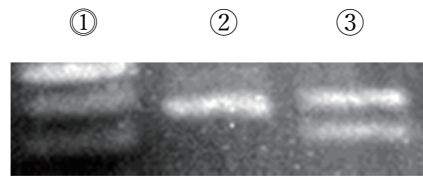


図4. 羽軸由来コウテイペンギンゲノム DNA をプライマーP8 および P2 を用いて増幅した、PCR とその後の制限酵素 *Hae*III を用いた RFLP の 2% アガロースゲルの電気泳動像

試料提供：アドベンチャーワールド

Lane①：100bp Ladder DNA marker, 上の濃いバンドは 500bp を示す。

②：プライマーP8 および P2 を用いて増幅された DNA のバンド。

③：②を *Hae*III で RFLP を行ったもの。RFLP の結果、2 本のバンドが観察された。

#### 4. 結 論

ペンギン類は、外見上雌雄の差が少なく、また、雄同士でペアリングを行う事例もあり、雌雄の判別が困難である。その一方で、各ペンギン類の種の保全のためには、本来の生息域に住む野生個体の捕獲とその飼育は避けるべきであり、また、現在飼育下繁殖により展示されている様々なペンギン類の個体は、将来的な本来の生息域への放鳥の可能性を考えて、近交係数の上昇を避け、かつそれぞれの個体の持つ遺伝子の組成から本来の生息域を考慮した計画的な繁殖を行う必要がある。ペンギン類の計画的な繁殖のためには各個体の性別の確認は必須であることから、簡便かつ確実なペンギン個体の性判別法の開発は重要な意味を持つ。現在、ペンギン類の分子生物学的な手法による性判別には主に性染色体である Z および W 染色体上に存在する *Chromodomain helicase DNA binding protein* (CHD) 遺伝子が利用されているが、他の遺伝子の利用も含めて、さらに簡便かつ確実な方法の開発が必要であると考えられる。

## 5. 謝 辞

貴重な各ペンギン類の羽毛サンプルを提供していただいた、アドベンチャーワールド 安達那央子先生へ、感謝を申し上げます

## 6. 参 考 文 献

- (1) 上田一生. “ペンギンレッドリスト 2019 抄録” 生物の科学遺産 いきものライブラリ 1 ペンギンの生物学. 東京都千代田区. 株式会社エヌ・ティー・エス. 2020. p.153-203.
- (2) The IUCN Red List of Threatened Species. 2021. 3. <https://www.iucnredlist.org/ja> (参照 2021.12.31).
- (3) 経済産業省 ワシントン条約規制対象種の調べ方. 2021.6.22. [https://www.meti.go.jp/policy/external\\_economy/trade\\_control/02\\_exandium/06\\_washington/cites\\_search.html](https://www.meti.go.jp/policy/external_economy/trade_control/02_exandium/06_washington/cites_search.html) (参照 2021.12.31).
- (4) Constantini 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.
- (5) QIAGEN 社 DNeasy® Blood & Tissue Kit Resources Use-Developed Protocols Purification of total DNA from nails, hair, or feathers using the DNeasy® Blood & Tissue Kit (EN). 2006. <https://www.qiagen.com/jp/resources/resoucedetail?id=a5a065dc-e287-4a61-b917-9792e25ab42&lang=en> (参照 2014.11.24).
- (6) Griffiths R., Double MC., Orr K., Dawson RJD. (1998) A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.* 7:1071-1075.
- (7) Reis E.C., Aires R.M., Moura J.F., Matias C.A.R., Tavares M., Ott P.H., Siciliano S., Lobo-Hajdu G. (2011) Molecular sexing of unusually large numbers of *Spheniscus magellanicus* (Spheniscidae) washed ashore along Brazilian coast in 2008. *Genet. Mol. Res.* 10:3731-3737.
- (8) Bertellotti M., Tella JL., Godoy JA., Blanco G., Forero MG., Donázar JA., Ceballos O. (2002) Determining sex of Magellanic Penguins using molecular procedures and discriminant functions. *Waterbirds* 25:479-484.



英文抄録

## Sexing of Penguins (*Spheniscidae*) by PCR method

Hiromi Kato<sup>1</sup>

Since there is little difference in appearance between males and females, it is difficult to accurately distinguish the sex of each individual penguins from the appearance. On the other hand, in order to maintain and continue the exhibition of penguins bred at zoos and/or aquariums in Japan, efficient breeding of penguins is necessary. As a step of efficient breeding, it is essential to know the sex of each individual penguins. In this article, I will introduce the sexing of penguins by the PCR method carried out in my laboratory.

**Key words:** Penguin, sexing, PCR

---

1. Institute of Advanced Technology, Kindai University, Wakayama, 642-0017, Japan