日本家禽学会誌，*59*：*J1-J5*，*2022*
Copyright © 2022, Japan Poultry Science Association

≪技術報告≫

PCR 法によるホロホロチョウ（*Numida meleagris*）の性判別

南村昌孝・石田和真・黒澤　亮・高橋幸水・白砂孔明・岩田尚孝・小川　博・桑山岳人

東京農業大学農学部，神奈川県厚木市船子 240-0034

近年，鳥類の性判別に有用な方法として遺伝子解析による方法が用いられている。本実験はホロホロチョウの血液や羽軸根から抽出した DNA を用いて PCR 法で性特異的遺伝子を増幅させることにより性判別できるかを検討した。DNA は血液から抽出し，標的遺伝子として spindlin 遺伝子を用いた結果，性判別が可能であった。キジ科のニワトリ，ニホンキジ，ニホンウズラにおいても同様の条件で判別が可能であった。

また，ホロホロチョウの羽軸根を用いて性判別を行ったところ，血液と同様に判別が可能であった。

キーワード：ホロホロチョウ，性判別，PCR

緒　　言

家禽の品種の多くは体格や羽相などから雌雄の区別が可能なものが多い。しかし，世界の半数以上の鳥類種では成鳥において雌雄で外観から判断することは困難であり，幼鳥時の外観にも性差が表れることはほとんどないことから，その性判別は困難である（Griffiths *et al*., 1998）。産業用家禽において，産卵用の雌と産肉用の雄の区別は極めて重要であり，性鑑別技術は欠かせない。養鶏の現場では肛門鑑別法や羽毛鑑別法が用いられているが，精度の高い鑑別には多くの経験・訓練が必要である。特にホロホロチョウ（*Numida meleagris*）では外観に性差がなくその判断が難しい。近年では鳥類の雌雄を確認する方法として，簡便で判別が容易に行える Polymerase Chain Reaction（PCR）法が多く用いられている（Miyaki *et al*., 1998；Jensen *et al*., 2003）。PCR 法による性判別は 1990 年にマウスとヒトで Sex-determining Region Y（*SRY*）遺伝子が発見されて以降（Gubbay *et al*., 1990；Sinclair *et al*., 1990），哺乳類において盛んにおこなわれてきた。雄は XY，雌は XX の性染色体を有する哺乳類において，*SRY* 遺伝子は雄の Y 染色体上に存在する性決定因子である。この遺伝子領域を対象としたプライマーを用いることで多くの哺乳類の性判別が可能であり，Pomp ら（1995）をはじめとしてさまざまな種において性判別が可能であることが報告されている。一方，哺乳類とは異なり雄で ZZ，雌で ZW の性染色体を有する鳥類では，W 染色体上にのみ存在し種間で広く保存されている任意の DNA 配列は，PCR に基づく性決定の目標にすることができる（Itoh *et al*., 2001）。しかし，哺乳類とは性決定様式が異なる鳥類では，性を明確に判別できる遺伝子がいまだ発見されていない。

2021 年 5 月 19 日受付，2021 年 12 月 25 日受理
連絡者：桑山岳人
〒243-0034 神奈川県厚木市船子 1737
Tel : 046-270-6589
Fax : 046-247-4338
E-mail : takehito@nodai.ac.jp

ホロホロチョウの性判別の標的遺伝子として，一般に鳥類の性判別に広く用いられてきた Chromodomain-helicase-DNA-binding protein（CHD）遺伝子（市川ら，2006）とニワトリ（*Gallus gallus domesticus*）の W 染色体上に特異的にみられる繰り返し配列の Xho 領域（Clinton *et al*., 2001）を対象とした実験を行ったが，性判別は不可能であった（未発表データ）。ホロホロチョウでの性判別が報告されている 2550/2718 のプライマーセット（Abdul-Rahman II *et al*., 2015）を用いた実験では，ホロホロチョウ及びニワトリの性判別が可能であることを確認した（未発表データ）。本実験では，先に報告されている 2550/2718 以外にシギダチョウ目で W 染色体と Z 染色体上で異なる領域に存在する spindlin 遺伝子を対象とした SPIN12/SPIN13 のプライマーセット（Itoh *et al*., 2001；De Kloet, 2002）が，ホロホロチョウの性判別に有効か検討した。

材料および方法

1.　供試鶏

東京農業大学農学部厚木キャンパスで飼育している個体のうち，性成熟に達し雌雄が分かっているホロホロチョウ：GF（雌雄各 5 羽），キジ科鳥類（岐阜地鶏：G（雌雄各 1 羽），比内鶏：H（雌雄各 1 羽），桂矮鶏：B（雌雄各 1 羽），烏骨鶏：S（雌雄各 1 羽），ニホンウズラ：Q（雌雄各 1 羽），ニホンキジ：K（雌雄各 1 羽）），ダチョウ（アフリカンブラック）：AB（雌 2 羽）および野生の王国 群馬サファリパークで飼育しているダチョウ（アフリカンブラック）：AB（雄 3 羽，雌 1 羽）を供試した。

本研究は東京農業大学生命科学研究倫理規定に則り行った（2020109）。

2.　血液および羽軸根の採取

血液採取はヘパリンナトリウムで処理した 25 5/8 ゲージの注射針（テルモ株式会社）と 2.5 m*l* シリンジ（テルモ株式会社）を用い，翼下静脈から 1 m*l* 採取し，2.0 m*l* チューブに分注した。

羽軸根の採取は脊椎骨付近から 1 羽につき羽を 2 枚採取後，羽軸根のみを採取するため解剖はさみで切断し，羽軸根 1 cm を

表 1.　使用したプライマーの配列および増幅断片の大きさ

プライマー	配列	断片の大きさ	引用
SPIN12	5′-GCAGAATACAGCATGGATGGAA-3′	Z : 1.0 kb	De Kloet, 2002
SPIN13	5′-AGGTGGGCATCACTAATTCGAG-3′	W : 1.2 kb	

1.5 m*l* チューブに採取した。

3.　DNA 抽出

採血した 1.0 m*l* の血液を PBS で 3 倍に希釈し 5, 6 回転倒混和した。15 m*l* ファルコン管に Lymphoprep（コスモバイオ株式会社）を 3 m*l* 入れ，希釈した血液を Lymphoprep に混ざらないよう注入し 800×g で 20 分間の設定で遠心分離を行った。遠心分離後，パスツールピペットで単核球層を吸い取り 1.5 m*l* チューブに分注した。分注した単核球層と PBS の総量を 1.5 m*l* になるように PBS をいれ 5 分間遠心分離を行った。遠心分離後，チューブの底のペレットを流さないように溶液を捨て（ペレットが確認されない場合は溶液を捨て PBS を 1.5 m*l* になるように追加し再度 5 分間遠心分離を行った），Cica Geneus DNA Prep Kit（for Blood&Tissue）（関東化学株式会社）の Buffer TL200 μ*l* をペレット状のものに当てながら入れペレット状のものが溶けるまでピペッティングを繰り返した。その後 Cica Geneus DNA Prep Kit のプロトコール 2 から行い DNA を抽出した。

羽軸根は Buffer TL200 μ*l* を入れ，Tissue Grinder（COYOTE）で均一化し，その後 Cica Geneus DNA Prep Kit のプロトコール 2 から行い DNA を抽出した。

抽出した DNA は微量分光光度計（DeNovix 社）を用いて DNA 純度と濃度を測定した。

4.　PCR 条件

抽出した DNA は De Kloet（2002）を参考に SPIN12/SPIN13 のプライマーを用いて PCR を行った。PCR 反応液は超純水 8.6 μ*l*，SPIN12/SPIN13（100 μM）各 0.2 μ*l*，Go Taq Green Master Mix 2×（Promega）10 μ*l*，DNA サンプル 3 μ*l* の計 22 μ*l* とした。PCR 条件は 94℃ 2 分の後，94℃ 30 秒，55℃ 20 秒，72℃ 1 分 20 秒を 35 サイクル，72℃ 10 分で増幅を行った。プライマー配列は表 1 に示した。

5.　電気泳動条件

増幅した PCR 産物は 3% アガロースゲルの厚さを 0.5 cm になるように作成し 1×TAE（NIPPON GENE），6×Loading Buffer（WAKO NIPPON GENE）を 2 μ*l* と PCR 産物 10 μ*l* と混合し，100V で 30 分間泳動した。泳動後のゲルは，0.5 μ*l*/m*l* に希釈した Ethidium bromide（Q BIO gene）で 60 分間染色した後，紫外線照射下でターゲット領域の増幅を確認した。

結果および考察

ホロホロチョウとキジ科のニワトリ，ニホンキジおよびニホンウズラにおいて De Kloet（2002）の報告と同様に雄で約 1.2 kb の 1 本のバンドが，雌で約 1.2 kb と約 1.0 kb の 2 本のバンドが検出され，性判別が可能であった（図 1-4）。また，羽軸根由来の DNA においても，血液由来の DNA と同様の結果が得られた（図 5）。

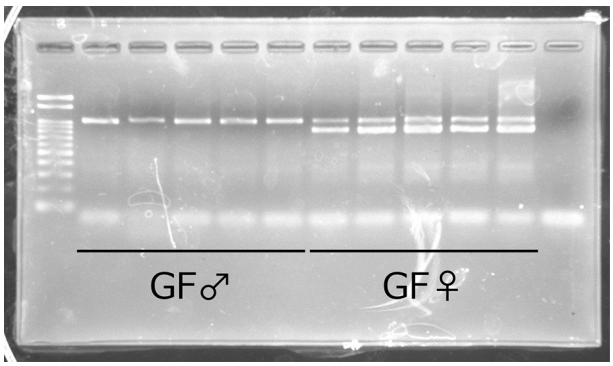

図 1.　ホロホロチョウ血液由来 DNA から得られた泳動像
ホロホロチョウ（GF）。オスで 1 本，メスで 2 本のバンドが確認された。

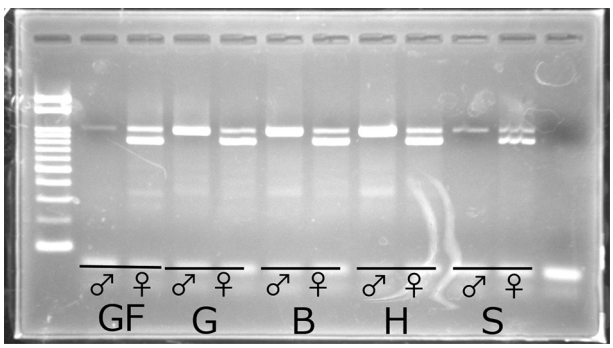

図 2.　ニワトリ血液由来 DNA から得られた泳動像
左からホロホロチョウ（GF），岐阜地鶏（G），桂矮鶏（B），比内鶏（H），烏骨鶏（S）。すべての品種においてオスで 1 本，メスで 2 本のバンドが確認された。

キジ科のニワトリ，ニホンウズラ及びニホンキジとホロホロチョウにおいて共に性判別が可能であったことから spindlin 遺伝子はキジ科とホロホロチョウにおいて Z 染色体と W 染色体の異なる領域に共通して存在することが示唆された。

ダチョウでは雌雄ともに約 1.2 kb 付近でバンドが 1 本のみしか確認できず，spindlin 遺伝子を用いた性判別は不可能であった（図 6）。今回実験に供試し，性判別が可能だった品種は全てキジ目に属する種である。Spindlin 遺伝子はキジ科，ホロホロチョウ科以外のキジ目の性判別においても有用である可能性があり，汎用性の高さが期待される。ダチョウ目に属するアフリカンブラックでは同じ古顎下綱に属するシギダチョウ目で性判別が可能であった（De Kloet 2002）ため，同様に性判別が可能であると予想していたが雌雄ともにバンドは 1 本のみしか確認できず，性判別は不可能であった。一方で SS1/SS2（sexing primer）と

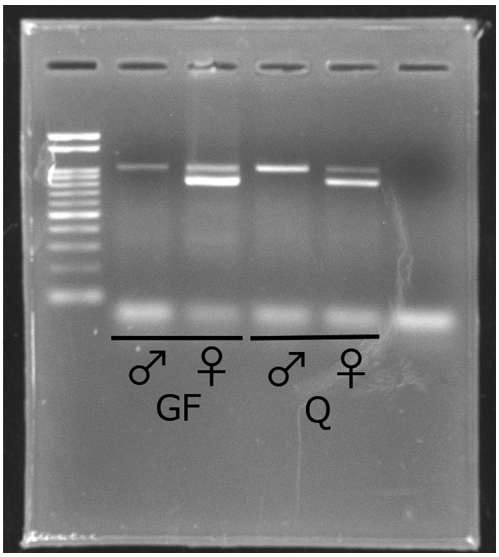

図 3.　ニホンウズラ血液由来 DNA から得られた泳動像
左からホロホロチョウ（GF），ニホンウズラ（Q）。
オスで 1 本，メスで 2 本のバンドが確認された。

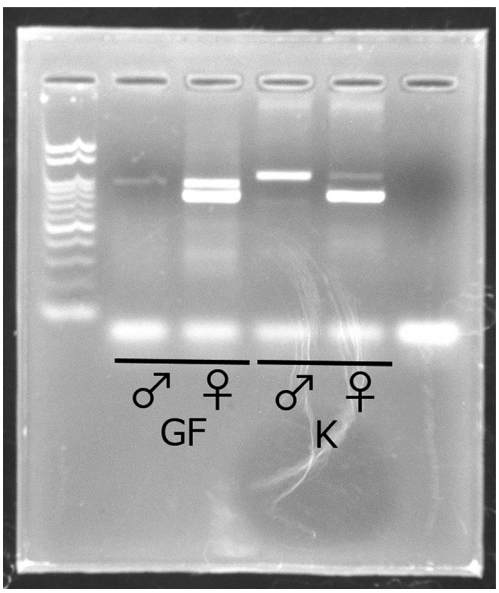

図 4.　ニホンキジ血液由来 DNA から得られた泳動像
左からホロホロチョウ（GF），ニホンキジ（K）。
オスで 1 本，メスで 2 本のバンドが確認された。

L014a/L014b（control primer）のプライマーセットを用いたダチョウの性判別が可能であるとの報告がなされている（Bello and Sanchez 1999）。ダチョウにおいては spindlin 遺伝子の W 染色体と Z 染色体の遺伝子断片の長さに差が少ない，もしくは相当する領域が存在していない可能性が示された。

本研究によりホロホロチョウの性判別には spindlin 遺伝子を対象としたプライマー SPIN12/13 が有用であることが示され，spindlin 遺伝子はキジ目の性判別において有用である可能性が示された。

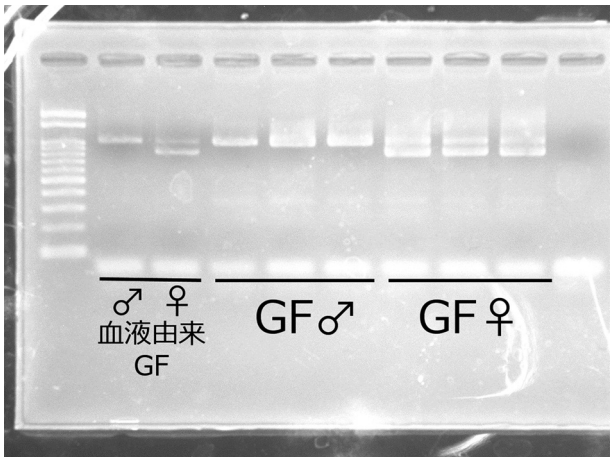

図 5.　ホロホロチョウ羽軸根由来 DNA から得られた泳動像
ホロホロチョウ（GF）。血液由来 DNA と同様羽軸根由来 DNA でもオスで 1 本，メスで 2 本のバンドが確認された。

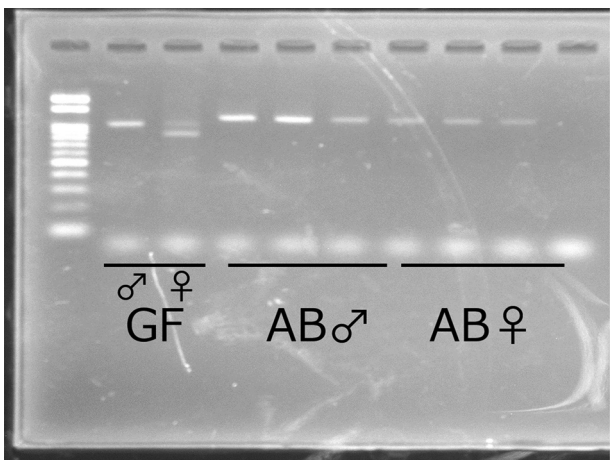

図 6.　ダチョウ羽軸根由来 DNA から得られた泳動像
左からホロホロチョウ（GF），ダチョウ（アフリカンブラック：AB）。ダチョウでは雌雄共にバンドが 1 本しか確認できなかった。

謝　　辞

ダチョウのサンプルの一部をご提供頂いた，野生の王国 群馬サファリパーク様に感謝致します。

引 用 文 献

Abdul-Rahmann II, Awumbia B, Jeffcoate IA, Robinson JE and Obese FY. Sexing in guinea fowl (*Numida meleagris*). Poultry Science, 94 : 311–318. 2015.

Bello N and Sanchez A. The identification of a sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. Molecular Ecology, 8 : 667–669. 1999.

Clinton M, Haines L, Belloir B and McBride D. Sexing chick embryos: a rapid and simple protocol. British Poultry Science, 42 : 134–138. 2001.

De Kloet SR. Molecular sex identification of tinamous with PCR using primers derived from the spindlin gene. Molecular Ecology Notes, 2 : 465–466. 2002.

Griffiths R, Doble MC, Orr K and Dawson RJG. A DNA test to sex most birds. Molecular Ecology, 7 : 1071–1075. 1998.

Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, Goodfellow P and Lovell-Badge R. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature, 346 : 245–250. 1990.

市川あゆみ，市村卓也，中村明弘，野田賢治，加藤泰之．遺伝子診断による性判別技術．愛知県農業総合試験場研究報告，38 : 175–180．2006.

Itoh Y, Hori T, Saitoh H and Mizuno S. Chicken *spindling* genes on W and Z chromosomes: transcriptional expression of both genes and dynamic behavior of spindling in interphase and miotic cells. Chromosome Research, 9 : 283–299. 2001.

Itoh Y, Suzuki M, Ogawa I, Munechika I, Murata K and Mizuno S. Identification of sex of a wide range of carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences. The American Genetic Association, 92 : 315–321. 2001.

Jensen T, Pernasetti F and Durrant B. Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessel, and feathers. Zoo Biology, 22 : 561–571. 2003.

Miyaki C, Griffiths R, Orr K, Nahum L, Pereira S and Wajntal A. Sex identification parrots, toucans and curassows by PCR: Perspectives for wild and captive population studies. Zoo Biology, 17 : 415–423. 1998.

Pomp D, Good BA, Geisert RD, Corbin CJ and Conley AJ. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos Journal of Animal Science, 73 : 1408–14151. 1995.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R and Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature, 346 : 240–244. 1990.

Sex Identification of Guinea Fowl (*Numida meleagris*) by PCR

Masataka Minamimura, Kazuma Ishida, Ryo Kurosawa, Yukimizu Takahashi,
Koumei Shirasuna, Hisataka Iwata, Hiroshi Ogawa and Takehito Kuwayama

Tokyo university of agriculture, Faculty of Agriculture, Atsugi-shi Kanagawa-ken, 240−0034

Recently, polymerase chain reaction (PCR) is an efficient method for sex identification in avian. This study made to verify efficient gene region for sex identification in guinea fowl (*Numida meleagris*). DNA was extracted from blood. Target genes used for sex identification were spindling gene (SPIN). As a result, primer SPIN12/SPIN13 (spindlin) were able to identify their sex. Also, Phasianidae including domestic fowl, Japanese quail and pheasant could determine their sex by the same method.

In addition, sex identification using guinea fowl's rachis was as possible as using the blood method.

(*Japanese Journal of Poultry Science,* ***59*** *: J1−J5, 2022*)

Key words : guinea fowl, sex identification, PCR