

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：82617

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22770088

研究課題名（和文）性別不明の動物標本における性判定法の確立

研究課題名（英文） Establishment of sex identification method for unisexed specimens.

研究代表者

栗原 望 (KURIHARA NOZOMI)

国立科学博物館・動物研究部・支援研究員

研究者番号：40456611

研究成果の概要（和文）：

本研究は、分子生物学的手法を用いて、性別不明標本の性判定を行う技術を確立することを目的とする。まず、剥製標本や骨格標本に残存する DNA の状態を確認したところ、本剥製・仮剥製・鞣し皮の毛および骨格標本の中で、仮剥製の DNA が最も良い状態にあることが分かった。そこで、仮剥製について、X と Y 染色体上に存在する ZF 遺伝子約 240 bp と Y 染色体にのみ存在する SRY 遺伝子約 220 bp を PCR 法によって増幅、電気泳動により各遺伝子の有無を確認することで性判定を試みた。その結果、正答率は 86.7%、実験の失敗は 13.3%、誤判定は 0%であった。DNA の状態により実験に失敗する可能性もあるが、誤判定がないという点で、ここで試行した性判定法は十分に実用化できるものである。

研究成果の概要（英文）：

In this study, a molecular method for sex determination of museum specimens was established. Firstly, the condition of the DNA held in museum specimens was ascertained. We found that DNA from hairs plucked from study skin was in the best condition, as compared to hairs obtained from mounted skin, study skin, and tanned skin, and DNA from skeletal preparations. Therefore, sex determination was carried out on study skins by PCR amplification and gel electrophoresis of a 240 bp fragment of the ZF gene, which is present on both the X and Y chromosomes, as well as amplification of a 220 bp fragment of the SRY gene, which is Y chromosome-specific. We determined the correct sex for 86.7% of samples, and failed to obtain any results for 13.3% samples (n = 15). Despite the fact that we failed to determine sex when the DNA was degraded, our results for this sex determination method are robust, with a 0% error rate, and would be useful for future determination of sex of museum samples.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：動物、遺伝子、性判定、博物館

### 1. 研究開始当初の背景

自然史研究において全ての研究の原点となる標本には、個体情報を付記するのが常であり、この付属情報が科学調査の基礎を成している。しかし、博物館等の研究機関に保存されている標本の中にも、この情報が欠けているものが多く含まれる。特に性別の不明な標本は数が多く、それらの標本は調査から除外されることが多い。すなわち、性別が不明であると、貴重な標本でさえ十分に活用できない。これが現在の自然史研究の問題点である。

標本の性判定に関する研究は、これまでも行われている (Griffith and Tiwari, 1993; Murata and Masuda, 1996)。しかし、多くの場合は、状態の良い DNA を十分量得られる新鮮な試料を用いており、断片化した DNA を少量しか含まない骨格標本や剥製標本について性判定を試みた報告はない。

### 2. 研究の目的

本研究は、性別不明の博物館標本を十分に利用可能なものとするため、分子生物学的手法による標本の性判定法を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

法医学分野で用いられている性判定法、すなわち、X と Y 染色体上の遺伝子の有無を電気泳動により確認する方法を用いた。この方法では、状態の良くない DNA を用いた場合に困難となる塩基配列データの抽出を必要としないため、DNA の断片化や混濁物の存在が予想される博物館標本の性別を判定するのに適している。

(1) 博物館標本に残されている微量な鋳型 DNA を電気泳動で確認できる程度に増幅するには、増幅効率のよいプライマーが必要である。本研究では、X と Y 染色体の両者に存在する ZF 遺伝子および Y 染色体のみに存在する SRY 遺伝子をターゲットとする。そこで、国立科学博物館が保管する DNA サンプルを用い、可能な限り多くの種について、プライマー設計に必要な両遺伝子の塩基配列を決定した。

(2) 博物館標本に残存する DNA の状態を明らかにするため、国立科学博物館に保存されている本剥製・仮剥製・鞣し皮の毛および骨格標本から DNA を抽出、total DNA の量と DNA 断片の長さを調べた。また、剥製を製作する際にほぼ必ず使用されるミョウバンの DNA への影響を調べるため、同一個体から薬品処理していない毛と皮ごとミョウバン液に浸けた毛のそれぞれから DNA を抽

出し、total DNA の量と DNA 断片の長さを比較した。

(3) 以上の基礎的研究の結果を踏まえ、鋳型 DNA が微量であっても、PCR (polymerase chain reaction) 法によりターゲット遺伝子を増幅できるプライマーを設計、性別の既知の博物館標本について、性判定を試行した。正しい判定がなされた標本数、誤った判定がなされた標本数、実験自体が失敗した標本数を数え、正答率が上がるよう試行錯誤を繰り返した。

### 4. 研究成果

(1) ZF 遺伝子について、哺乳綱全 29 目のうち 12 目 52 種、SRY 遺伝子について 13 目 33 種の塩基配列を決定した。

(2) 本剥製・仮剥製・鞣し皮のそれぞれから引き抜いた毛 100 本、および骨格標本から得た骨粉約 200 mg あたりの total DNA 量を比較したところ、仮剥製で 1000 ~ 7500 ng と最も収量が多かった。DNA 断片の長さも仮剥製で 280 ~ 880 bp と最も長かった。そこで、DNA が良好な状態に保たれている仮剥製に焦点を絞り、調査を進めた。1924 ~ 2011 年に捕獲されたハクビシンの仮剥製を用いて、DNA の状態の経年変化を調べたところ、total DNA の量は、時間経過とともに指数関数的に減少し、標本製作後 25 年以上経過した標本では DNA 量が 1500 ng/100 本とほぼ一定になった (図 1)。1500 ng の DNA は、DNA の解析に十分な量である。断片長と経過時間の間に相関関係はなかった。

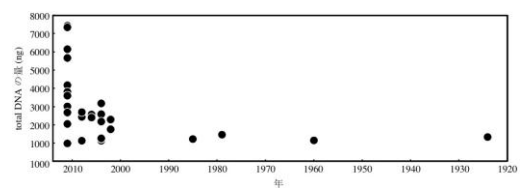


図 1 仮剥製の毛に含まれる DNA 量の経年変化

一方、ミョウバンの DNA への影響を調べたところ、統計的な支持は得られなかったものの、ミョウバン処理済みの毛で未処理の毛よりも、PCR 阻害物質である水溶性メラニンの量が少ない傾向にあった (Wilcoxon signed-rank test,  $Z = -0.183$ ,  $P = 0.855$ )。Prota (1998) は、元来毛に含まれる不溶性メラニンはアルカリ環境下で水溶性メラニンに変化することを報告している。従って、標本の保存期間中あるいは DNA 抽出時に、酸性のミョウバンがアルカリ環境に傾くことを防ぎ、結果として、脂溶性メラニンの水溶性メラニン (PCR 阻害物質) への変化を抑制しているものと考えられた。

以上のことから、処理にミョウバンのみを

使用することの多い仮剥製は、優れた DNA 解析試料であると結論づけるに至った。

(3) 成果 (1)を踏まえ、ZF および SRY 遺伝子を増幅するプライマーの設計を試みた。ZF 遺伝子について、哺乳綱動物全般に使用できるユニバーサル・プライマーの設計を試みたが、それは不可能であった。そこで、目レベルで適合するプライマー設計を目指し、試験的に食肉目動物全般に適合する ZF 遺伝子約 240 bp を増幅するプライマーを設計した。SRY 遺伝子については、Griffiths and Tiwari (1993) による約 220 bp を増幅するユニバーサル・プライマーが多種に適合し、効率よく DNA を増幅した。

これらのプライマーを用いて、性別の既知の仮剥製 (アナグマ、ハクビシン、タヌキ、テン) について性判定を試行した。DNA の状態が良いと考えられる仮剥製では、性別が正しく判定されたが (図 2)、DNA の状態が良くないと考えられる標本では、ZF 遺伝子と SRY 遺伝子の両者を電気泳動で確認できなかった。15 個体の仮剥製について PCR と電気泳動を試行した結果、正答率は 86.7%、実験の失敗は 13.3%、誤判定は 0%であった。

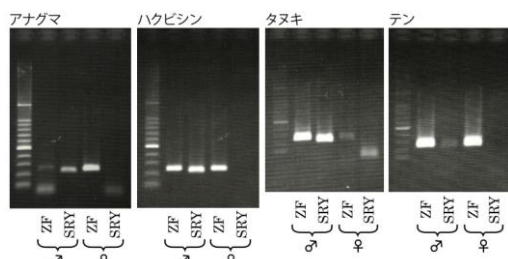


図 2 電気泳動による性別の確認

DNA の状態により実験に失敗する可能性もあるが、誤判定がないという点で、ここで試行した性判定法は、十分に実用化できる方法であると言える。また、PCR 法による鋳型 DNA の増幅と電気泳動のみを行う本方法は、安価で容易に行えるため、汎用性の高い方法である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Nozomi Kurihara, Utility of hair shafts from study skins for mitochondrial DNA analysis, *Genetics and Molecular Research*, 査読有 (accepted), 2013, 巻号未定.
- ② 栗原望、標本と二次資料、合わせて見るとおもしろい -Part 2-、*哺乳類科学*、査読有、2012、52 巻、1 号、124-126
- ③ 栗原望、川田伸一郎、安田雅俊、小林秀司、有田寛之、標本と二次資料、合わせ

て見るとおもしろい、*哺乳類科学*、査読有、2011、51 巻、1 号、172-173

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 望 (KURIHARA NOZOMI)

研究者番号：40456611

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：