

白山で発見されたライチョウの遺伝子分析

中谷内 修 石川県立大学附属生物資源工学研究所
上馬 康生 石川県白山自然保護センター

GENETIC ANALYSIS OF ROCK PTARMIGAN (*LAGOPUS MUTUS JAPONICUS*) FOUND IN MT. HAKUSAN

Osamu NAKAYACHI, *Research Institute for Bioresource and Biotechnology, Ishikawa
Prefectural University*

Yasuo UEUMA, *Hakusan Nature Conservation Center, Ishikawa*

はじめに

2009年5月26日に白山で発見されたライチョウについては、その後の調査で明らかとなった行動等について報告した(上馬ほか, 2010)。日本のライチョウの遺伝子分析についてはBaba et al. (2001)が初めて行い、その後、信州大学の中村浩志を中心とするグループと九州大学の馬場芳之との共同研究で各山岳に生息する個体の分析が進められ(中村, 2007ab)、今では240個体の遺伝子分析で6つのハプロタイプが報告されている(中村ほか, 2009)。そこで白山で発見された個体のハプロタイプを明らかにすることで、この個体がどの山域から来たのかを推定する手掛かりを得る目的で遺伝子分析を行った。また、白山産とされる唯一の剥製についても遺伝子分析を行ったので併せて報告する。

材料と方法

遺伝子分析に用いたのは、2009年10月10日に白山で調査した時にライチョウが羽繕いで落としたり確認した羽毛およびその個体の行動圏内から見つかった複数の羽毛の、それぞれの羽軸の先端部分、および石川県立自然史資料館所蔵の1936年9月に白山で拾得したとされる(花井・徳本, 1976)剥製の腹部の皮膚である。DNAの抽出には、DNA Extractor FM Kit (株式会社ニッポンジーン)を用い、添付のマニュアルにしたがって、採集した試料から抽出を行った。

ミトコンドリアDNAコントロール領域の増幅

ミトコンドリアDNAコントロール領域の増幅には、既に報告されている6種類の特異的プライマー(Baba et al., 2001, 図1)を組み合わせて用いた。8通りの組み合わせのプライマーセット(表1)を用い、以下の条件でPCRを行った後、電気泳動法により、DNA断片の増幅と増幅された断片の長さを確認した。耐熱性DNAポリメラーゼにはGO Taq Green Master Mix (プロメガ株式会社)を用いた。サーマルサイクラーにはTakara Dice (タカラバイオ株式会社)を用いた。

PCR反応液		
Go Taq Green Master Mix		10 uL
Forward Primer (10 uM)		1 uL
Reverse Primer (10 uM)		1 uL
Template DNA (10 ng uL ⁻¹)		1 uL
滅菌蒸留水		7 uL
<hr/>		
計		20 uL

PCR条件		
94°C	2分	1サイクル
94°C	30秒	} 40サイクル
60 or 65°C	20秒	
72°C	1分30秒	
72°C	3分30秒	1サイクル

表1の3のプライマーセットを用い、58°Cから68°Cの範囲でアニーリング温度を変えてPCR反応を

行った。以下の条件でPCRを行ってから、電気泳動法により、DNA断片の増幅と増幅された断片の長さを確認した。耐熱性DNAポリメラーゼにはKOD FX (タカラバイオ株式会社) を用いた。サーマルサイクラーにはTakara Diceを用いた。

PCR反応液

KOD FX DNA Polymerase	1 uL
10 mM dNTPs	4 uL
AVEL16760.raii (10uM)	1 uL
H00683.raii (10uM)	1 uL
Template DNA (10 ng uL ⁻¹)	1 uL
2×反応バッファー	10 uL
滅菌蒸留水	2 uL

計 20 uL

PCR条件

94℃	2分	1サイクル
98℃	10秒	} 40サイクル
58~68℃※	30秒	
68℃	1分30秒	
68℃	3分30秒	1サイクル

※この範囲でアニーリング温度を12段階に分けて実験を行った。

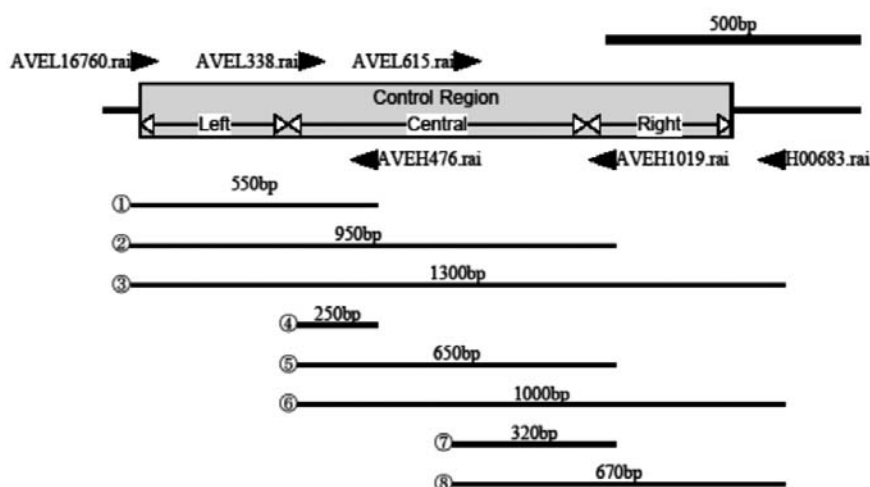


図1 供試したプライマーのアニーリング位置

塗りつぶした三角は供試プライマーのアニーリング位置と方向を示す。下部のバーの左横につけた番号は表1の番号と対応する。

表1 供試したプライマーの組み合わせ

	Forward Primer	Reverse Primer	増幅サイズ
1	AVEL16760.raii (60.5℃) 5'-GACTACGGCTTGAAAAGCCATTGTTGT-3'	AVEH476.raii (57.5℃) 5'-GTGAAAAGTGAGAAAGTTCAGGAGTTA-3'	550bp
2	AVEL16760.raii (60.5℃) 5'-GACTACGGCTTGAAAAGCCATTGTTGT-3'	AVEH1019.raii (57.8℃) 5'-TATGATTTGTGGGTTTTTATGCGGTAGTTT-3'	950bp
3	AVEL16760.raii (60.5℃) 5'-GACTACGGCTTGAAAAGCCATTGTTGT-3'	H00683.raii (63.4℃) 5'-GTTTTCCCAGCTGCGGATACTTGCATGT-3'	1300bp
4	AVEL338.raii (63.3℃) 5'-GCTCGTCGTACCAGATGGATTATTGATCG-3'	AVEH476.raii (57.5℃) 5'-GTGAAAAGTGAGAAAGTTCAGGAGTTA-3'	250bp
5	AVEL338.raii (63.3℃) 5'-GCTCGTCGTACCAGATGGATTATTGATCG-3'	AVEH1019.raii (57.8℃) 5'-TATGATTTGTGGGTTTTTATGCGGTAGTTT-3'	650bp
6	AVEL338.raii (63.3℃) 5'-GCTCGTCGTACCAGATGGATTATTGATCG-3'	H00683.raii (63.4℃) 5'-GTTTTCCCAGCTGCGGATACTTGCATGT-3'	1000bp
7	AVEL615.raii (65.1℃) 5'-GGCTTCTTCACAGGTGCCCTTCACAG-3'	AVEH1019.raii (57.8℃) 5'-TATGATTTGTGGGTTTTTATGCGGTAGTTT-3'	320bp
8	AVEL615.raii (65.1℃) 5'-GGCTTCTTCACAGGTGCCCTTCACAG-3'	H00683.raii (63.4℃) 5'-GTTTTCCCAGCTGCGGATACTTGCATGT-3'	670bp

増幅サイズは、既知の配列を元にした場合に増幅が期待されるおおよその断片のサイズ。

() 内は推定アニーリング温度。

以下の条件でPCR反応を行い、ミトコンドリアDNAコントロール領域の増幅を行った。プライマーには、表1の3のプライマーセットを用いた。

PCR反応液	
KOD FX DNA Polymerase	1 uL
10 mM dNTPs	4 uL
AVEL16760.rai (10uM)	1 uL
H00683.rai (10uM)	1 uL
Template DNA (10 ng uL ⁻¹)	1 uL
2×反応バッファー	10 uL
滅菌蒸留水	2 uL
<hr/>	
計	20 uL

PCR条件		
94℃	2分	1サイクル
98℃	10秒	} 40サイクル
68℃	1分30秒	
68℃	3分30秒	1サイクル

クローニングベクターpUC19のマルチクローニングサイト内部にある制限酵素Hinc II 認識部位をHinc II (東洋紡績株式会社)で消化し、アルカリフォスファターゼ (タカラバイオ株式会社)により末端を脱リン酸化した。T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (タカラバイオ株式会社)を用い、PCR反応で増幅されたDNA断片の末端をリン酸化した。それぞれの処理後、ベクターと増幅断片を混合し、TA-Blunt Ligation Kit (株式会社ニッポンジーン)を用いてライゲーション反応を行った。ライゲーション反応終了後、反応液を用い、大腸菌 (東洋紡績株式会社, Competent high DH5α)を形質転換した。全ての反応は、製品に添付の使用説明書にしたがって行った。

コロニーPCR

形質転換された大腸菌が保有するプラスミド内に目的のDNA断片が挿入されている事を確認するため、コロニーPCRを行った。プライマーには、表1の3のプライマーセットを用いた。以下の条件でPCRを行った後、電気泳動法により、DNA断片の増幅と増幅された断片の長さを確認した。耐熱性DNAポリメラーゼにはGO Taq Green Master Mix (プロメガ株式会社)を用いた。サーマルサイクラーにはTakara Diceを用いた。

PCR反応液	
Go Taq Green Master Mix	10 uL
Forward Primer (10 uM)	1 uL
Reverse Primer (10 uM)	1 uL
Template DNA (10 ng uL ⁻¹)	1 uL
滅菌蒸留水	7 uL
<hr/>	
計	20 uL

PCR条件		
94℃	2分	1サイクル
94℃	30秒	} 40サイクル
68℃	20秒	
72℃	1分30秒	
72℃	3分30秒	1サイクル

大腸菌からのDNA抽出

コロニーPCRによって目的のDNA断片がクローニングされている事が確認された大腸菌を培養し、保持するプラスミドを回収した。アンピシリンナトリウム (ナカライテスク株式会社, 100 ug mL⁻¹)を含むLB培地に大腸菌を接種し、37℃で16時間振盪培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (株式会社キアゲン)を用いてプラスミドDNAを回収した。操作は、製品に添付の使用説明書にしたがって行った。

LB培地組成

Bcto Tryptone (Becton, Dickinson and Company)	10 g
Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company)	5 g
塩化ナトリウム (ナカライテスク株式会社)	10 g
蒸留水	1 L
pH7.5	

塩基配列の決定

塩基配列の決定は、ダイターミネーター法により行った。プライマーには①M13 Forward primer (5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3'), ②M13 Reverse primer (5'-GGTCATAGCTGTTTCCTG-3'), ③AVEL338.rai, ④AVEL615.rai, ⑤AVEH1019.rai, ⑥AVEH476.raiの6種類を用いた。サイクルシーケンスはBigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ株式会社)を用い、製品に添付の使用説明書にしたがって行った。反応後のサンプルを、アルコール沈殿によって精製した後、Hi-Di Formamide (アプライドバイオシステムズ株式会社)に溶解させ、ABI Prism 3130ジェネテック

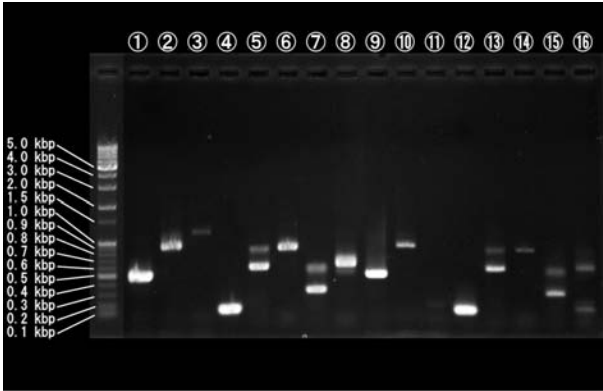


図2 羽毛由来全DNAを鋳型にしたミトコンドリアDNAコントロール領域の増幅

レーン①～⑧はアニーリング温度60℃で、レーン⑨～⑬はアニーリング温度65℃でPCR反応を行った。レーン①および⑨はプライマーセット1、レーン②および⑩はプライマーセット2、レーン③および⑪はプライマーセット3、レーン④および⑫はプライマーセット4、レーン⑤および⑬はプライマーセット5、レーン⑥および⑭はプライマーセット6、レーン⑦および⑮はプライマーセット7、レーン⑧および⑯はプライマーセット8を用いてPCR反応を行った(表1)。

クアナライザ(アプライドバイオシステムズ株式会社)を用いて塩基配列を分析した。

結果および考察

まず、既知のプライマーセットを用いて羽毛由来の全DNAからのミトコンドリアDNAコントロール領域の増幅が可能であることを確認した(図2)。フォワードプライマー3種類とリバースプライマー3種類を用い(図1および表1)、計8通りの組み合わせでPCR反応を行ったところ、いずれの組み合わせでも、想定されるサイズのDNA断片が増幅されることが確認された。

次に、最も広い領域を増幅できるAVEL16760.raiおよびH00683.raiを用いたPCR反応の条件を検討した。アニーリング温度が60℃の時はわずかな増幅が認められたものの、65℃の時には断片の増幅はほとんど見られなかった。そこで、耐熱性DNAポリメラーゼをにKOD FXを用いて、アニーリング温度の検討を行った。58℃から68℃の範囲でアニーリング温度を変えてPCR反応を行ったところ、全ての温度で良好な増幅が認められた(図3)。

検討した条件にしたがって、AVEL16760.raiおよびH00683.raiの間の領域をクローニングし、塩基配列を決定した。PCR反応で増幅した領域をプラスミドベクターpUC19にクローニングし、生じたアンピ

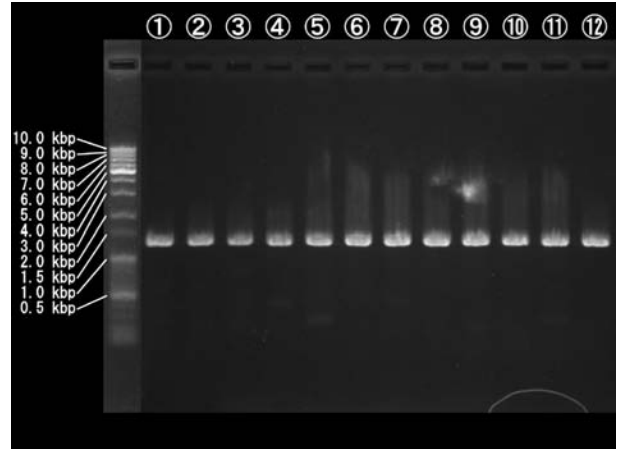


図3 AVEL16760.rai およびH00683.raiを用いたPCR反応におけるアニーリング温度の検討

アニーリング温度:レーン①58.0℃, レーン②58.5℃, レーン③59.0℃, レーン④60.0℃, レーン⑤61.2℃, レーン⑥62.4℃, レーン⑦63.6℃, レーン⑧64.8℃, レーン⑨66.0℃, レーン⑩67.0℃, レーン⑪67.5℃, レーン⑫68.0℃

シリン耐性コロニーからコロニーPCRによって目的DNA断片がクローニングされた大腸菌コロニーを選抜し、プラスミドを回収してから塩基配列の決定を行った(図4)。既に報告されている他のライチョウのミトコンドリアDNAコントロール領域の配列との比較を行ったところ、高い相同性が認められ、クローニングされたDNA断片がライチョウのものであることがわかった。今までに明らかにされた日本のライチョウの塩基配列は5種類あり(中村, 私信), その一部分を白山のものと合わせて示すと図5のようになる。現時点での知見によれば2009年に白山で発見された個体はハプロタイプLm Hilと同じであることが明らかとなった。

これをすでに発表されている中村ほか(2009)の240個体とともに示すと表2のようになった。少なくとも南アルプスとは別のタイプで、火打山, 北アルプス, 乗鞍岳, 御嶽山に広く見つかっているハプロタイプであった。白山からそれぞれの山岳への距離や位置関係および個体数の多さから考えると、北アルプス, 乗鞍岳, 御嶽山あたりから飛来したと考えるのが妥当であると考えられた。

次に白山で拾得したとされる剥製については、羽毛由来のDNAからのクローニングと同じ手法で、腹部の皮膚(約5mm×5mm)からのミトコンドリアDNAコントロール領域のクローニングと塩基

中谷内・上馬：白山で発見されたライチョウの遺伝子分析

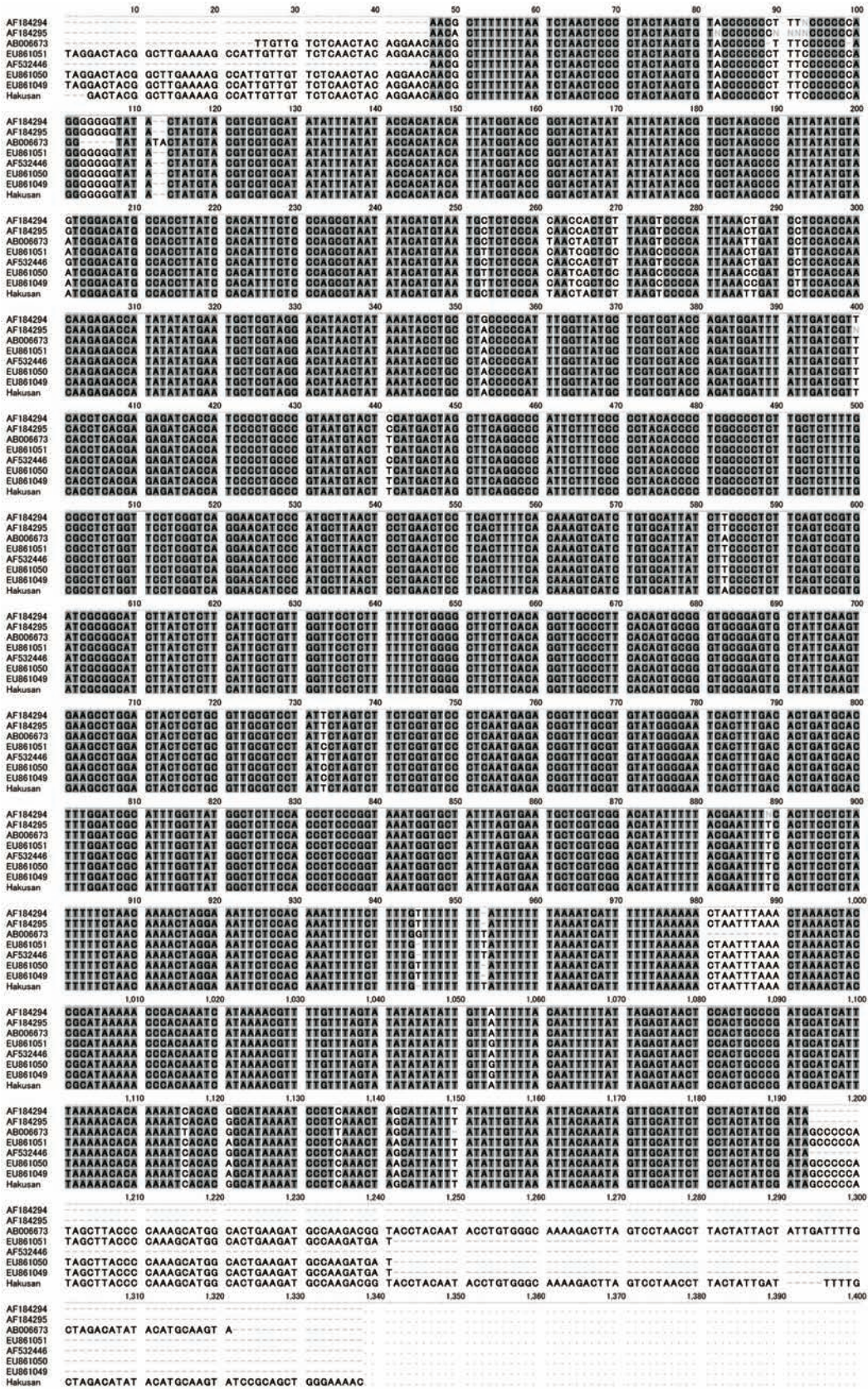


図4 クローニングされたミトコンドリアDNAコントロール領域の配列と既知の配列との比較

Hakusanと表記されたデータが今回クローニングしたDNAの配列で、以下は既知の様々な報告から得たデータ。番号は、GenBankのデータ登録番号を示す。AF184294およびAF184295、(Holderら、2000)、AF532446 (Drovetskiら、2002)、AB006673 (direct submission)、EU861049、EU861051 (Bechら、2009)、EU861050 (direct submission) 黒色に塗られている塩基は比較した全ての配列で一致している塩基であることを示す。

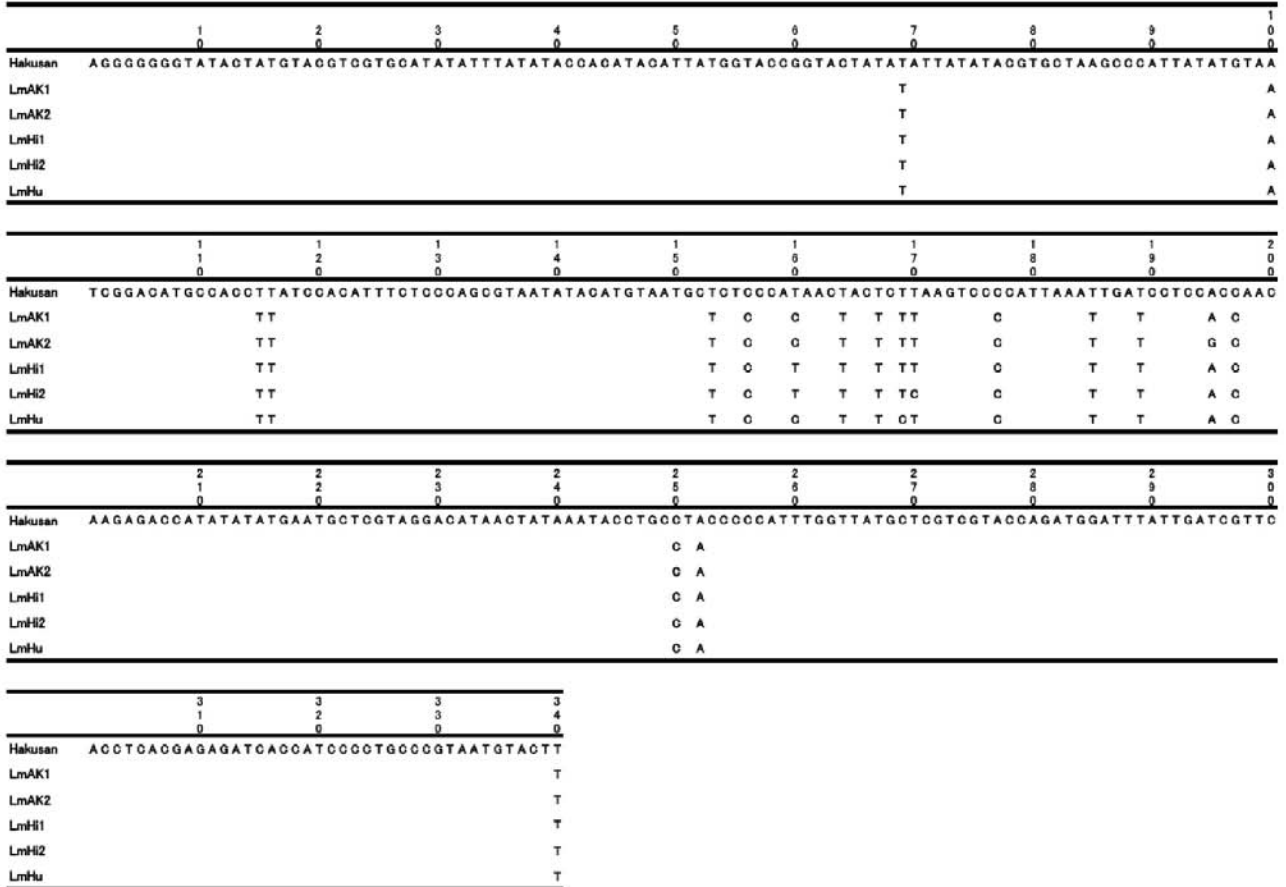


図5 既知のハプロタイプの塩基配列との比較

LmAk1, LmAk2, LmHi1, LmHi2, LmHuは既知の国内ライチョウハプロタイプ (中村, 私信)。Hakusanは今回得られたデータ。今回得られたデータ以外は、ハプロタイプの識別に用いられる部位の塩基のみ示した。今回得られたデータはハプロタイプLmHi1の配列と一致していた。

表2 白山のライチョウのハプロタイプと各山岳のハプロタイプ分布

ハプロタイプ	白 山	火打山	飛騨山脈(北アルプス)			乗鞍岳	御嶽山	赤石山脈(南アルプス)	
			白馬周辺	立山周辺	常念周辺			北 部	南 部
LmAk1		3	6	0	3	11	0	55	14
LmAk2		0	0	0	0	0	0	1	0
LmHu		2	0	0	0	0	0	0	0
LmHi1	1	15	30	14	20	46	18	0	0
LmHi2		0	1	0	0	0	0	0	0
LmHi3		0	1	0	0	0	0	0	0

* 中村ほか (2009) を改変

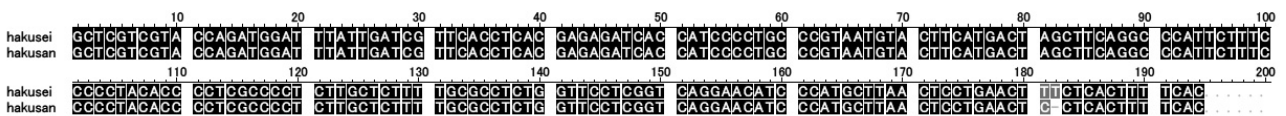


図6 剥製の皮膚からクローニングされたミトコンドリアDNAコントロール領域の配列と羽毛からクローニングされた配列との比較

上段は剥製の皮膚から回収されたDNA断片の配列であり、下は羽毛からクローニングされたDNA断片の配列。黒色に塗られている塩基は両者の間で一致している塩基であることを示す。

配列の決定を行った（図6）。剥製の皮膚からは、AVEL338.raiとVEH476.raiに挟まれた領域のクロニングのみが可能であった（データ未掲載）。そこで、この領域のみ塩基配列を決定した。羽毛由来のDNAと高い相同性を示したが、一部に配列が異なる箇所があった。資料としては古い剥製であり、一部の領域の塩基配列しか明らかにできなかったが、明らかになった部分は、今回白山で発見されたライチョウから得られたデータとほぼ完全に一致しており、このライチョウと同様に、北アルプス、乗鞍岳、御嶽山近辺に生息する集団と遺伝的に同一の集団に属していた可能性が高いと考えられた。

謝 辞

2009年10月9～11日の調査に参加していただき、塩基配列の提供を受けるなどライチョウ研究について多くのことを教示いただいた信州大学の中村浩志氏、同調査に参加いただきライチョウの生態について教示いただいた市立大町山岳博物館の宮野典夫氏、ライチョウの剥製を遺伝分析に供していただいた石川県立自然史資料館に感謝の意を表します。

文 献

Baba, Y., Fujimaki, Y., Yoshii, R., and Koike, H. (2001) Genetic variability in the mitochondrial region of the Japanese Rock

- Ptarmigan *Lagopus mutus japonicus*. Jpn. J. Ornithol. **50**, 53–64.
- Bech, N., Boissier, J., Drovetski, S., and Novoa, C. (2009) Population genetic structure of rock ptarmigan in the 'sky islands' of French Pyrenees: implications for conservation. *Anim. Conserv.* **12** (2), 138–146.
- Drovetski, S. V. (2002) Molecular phylogeny of grouse: individual and combined performance of W-linked, autosomal, and mitochondrial loci. *Syst. Biol.* **51** (6), 930–945.
- 花井正光・徳本 洋 (1976) 白山におけるニホンライチョウ *Lagopus mutus japonicus* の絶滅について. 石川県白山自然保護センター研究報告, **3**, 95–105.
- Holder, K., Montgomerie, R., and Friesen, V. L. (2000) Glacial vicariance and historical biogeography of rock ptarmigan (*Lagopus mutus*) in the Bering region. *Mol. Ecol.* **9** (9), 1265–1278.
- 中村浩志 (2007a) ライチョウの現況と保全に関する展望. 保全鳥類学, 105–125. 京都大学学術出版会.
- 中村浩志 (2007b) 総説(モノグラフ) – ライチョウ *Lagopus mutus japonicus*. 日本鳥学会誌 **56** (2), 93–114.
- 中村浩志・所 洋一・森口千英子・熊野 彩 (2009) 日本のライチョウの遺伝的構造と系統分化 – 火打山個体群の遺伝的特性 –. 第9回ライチョウ会議新潟大会報告書, 116–118.
- 上馬康生・佐川貴久・白井伸和・中村浩志・宮野典夫 (2010) 2009・2010年に白山で観察された雌ライチョウの行動, 食性および営巣場所. 石川県白山自然保護センター研究報告, **37**, 41–47.