

「靈長類学・ワイルドライフサイエンス・リーディング大学院」による派遣研究者報告書  
(当経費の支援を受けての出張後、2週間以内に必ずご提出ください)

2025年 11月 19日	
所属部局・学年	野生動物研究センター
氏名	金 紗羅

1. 派遣国・場所 (○○国、○○地域) 京都大学 野生動物研究センター
2. 研究課題名 (○○の調査、および○○での実験) 野外生物学分析実習
3. 派遣期間 (本邦出発から帰国まで) 2025年 11月 4日 ~ 2025年 11月 7日 ( 4日間)
4. 主な受入機関及び受入研究者 (○○大学○○研究所、○○博士／○○動物園、キュレーター、○○氏) 野生動物研究センター 村山美穂教授、佐藤悠先生
5. 所期の目的の遂行状況及び成果 (研究内容、調査等実施の状況とその成果：長さ自由) 写真（必ず1枚以上挿入すること。広報資料のため公開可のもの）の説明は、個々の写真の直下に入れること。 別途、英語の報告書を作成すること。これは簡約版で短くてけっこうです。
●実習の目的 羽根サンプルからDNAを抽出し、PCRおよびDNAシークエンサーによる塩基配列決定によって、その羽根の種同定と性判別を行う。本実習では、羽根サンプルから種同定と性判別を行い、DNA抽出やPCRなどの分析手法を学ぶことを目的としている。
●方法 ・サンプリング 11月4日に、京都大学吉田南キャンパス内で羽根の採取を行った。採取した14サンプルの羽根に加え、11月3日に京都御所内で採取された2サンプルと石垣島の2サンプルを加え、計16サンプルを分析に用いた(図1-2)。 本実習で抽出するDNAは、羽軸から採取するため、その部分がなるべく欠損・汚染していないものを選んだ。
 
図1 サンプル採取の様子 図2 各サンプルと採取場所の地図
・DNA抽出 羽根の付け根を5mm程度切り取り、1.5mlチューブに入れた。細胞膜・核膜を分解する試薬でインキュベート後、エタノール沈殿を用いてDNAとそのほかの成分にわけ、エタノールを除去して、DNAを抽出した。

「笠長類学・ワイルドライフサイエンス・リーディング大学院」による派遣研究者報告書  
(当経費の支援を受けての出張後、2週間以内に必ずご提出ください)

- ・DNA濃度測定  
NanoDrop を用いてDNA濃度と純度を測定した。

- ・PCR  
種判別で使用したプライマーはmtDNAのCOIという領域を用いた。

BirdF1: 5'-TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'

BirdR1: 5'-ACGTGGGAGATAATTCAAATCCTG-3'

PCRで使用した試薬は以下の通りである。

2x GCI Buffer	7.5 (×17)
H2O	2.7 (×17)
dNTP	2.4 (×17)
Primer1 (20 μM)	0.38 (×17)
Primer2 (20 μM)	0.38 (×17)
LA Taq	0.15 (×17)
Mix Total	13.5 μL
Template DNA	1.5 μL

PCRは、95°C 2分→(95°C 30秒・55°C 30秒・74°C 1分)×40サイクル→74°C 10分→10°C保持で行った。

性判別にはCHDという領域を用いる。

(本実習のサンプルでは性判別は行わず、シマフクロウの結果から手法を学んだ)

CHD 2550 F: 5'-GTTACTGATT CGTCTACGAGA-3'

CHD 2718 R: 5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'

鳥類の性染色体はZWがメス、ZZがオスであるため、性判別に関わるCHD領域を増幅した後に電気泳動してバンドの本数が2本になるものがメス、1本がオスになることで性別を判断することが可能である。

- ・電気泳動

1.5%TBEアガロースゲルを用い、100Vで20分間泳動した。電気泳動後は、UVライト下で観察した。

- ・PCR産物の精製

不要なプライマーやdNTPを除去するため、フィルタカラムを用いた精製を行った。DNAをフィルターに結合させるために、Binding bufferを加えて遠心し、その後Washing bufferを加えて遠心することで2回洗い流した後に、DNAを水に溶かして4°Cで保存した。

- ・シークエンシング

サンガー法によるシーケンスを行った。使用した試薬の分量は以下の通りである。

BigDye Terminator	2 (×17)
B. D. Buffer	2 (×17)
F-primer	1 (×17)
Mix Total	5 μL
PCR products	5 μL

アニーリング温度50°Cで25サイクルPCRを行った。

エタノール精製で上澄みを除去し、Hdfaを加え、95度で2分置き、その後アイスブロック上に5分放置した。

- ・データ解析

得られた結果をFinchTV(<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>)で確認し、読み取り可能なシーケンスをBOLD SYSTEMS(<https://v3.boldsystems.org>)などのデータベースに入力して種判別を行った。

## ●結果

- ・DNA抽出

羽根は環境に晒される時間が長く、DNA分解が進んでいることが多いため、得られるDNA濃度は低い傾向があった。

「靈長類学・ワイルドライフサイエンス・リーディング大学院」による派遣研究者報告書  
 (当経費の支援を受けての出張後、2週間以内に必ずご提出ください)

UV ライト下で観察した結果、明瞭な単一バンドが得られたサンプルもあれば、バンドが複数・不明瞭なもの、あるいはバンドが全く見られないサンプルも存在した(図 3)。

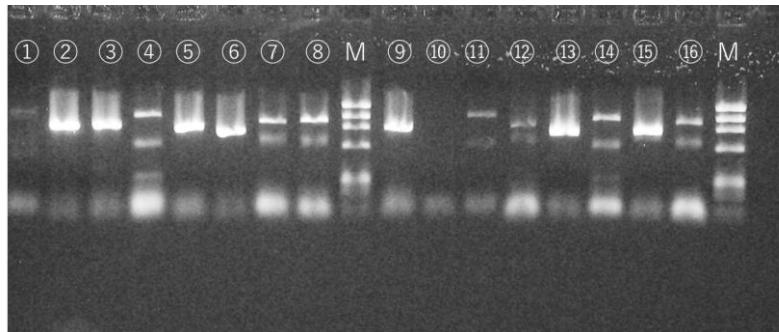


図 3 PCR の結果

・データ解析

読み取り可能であったサンプルは 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 16 の 12 つであった。種同定の結果は以下の通りである(表 1)。

ID	Location	Estimated Species	Confirmed Species	PCR result
1	Yoshida South	Dove	Rock dove	✗
2	Yoshida South	Dove	Oriental turtle dove	✓
3	Yoshida South	Dove		✓
4	Yoshida South	Dove	Sooty tern	
5	Yoshida South	Dove	Rock dove	✓
6	Yoshida South	Dove	Rock dove	✓
7	Yoshida South	unclear_small	Carriion crow	
8	Yoshida South	Dove?_white		
9	Yoshida South	Dove	Rock dove	✓
10	Yoshida South	Crow		✗
11	Yoshida South	Crow	Carriion crow	
12	Palace	Crow	Rock dove	
13	Palace	Kite	Rock dove	✓
14	Yoshida South	unclear_small	Sooty tern	
15_Con	Ishigaki	Crow		✓
16_Con	Ishigaki	Dove	Sooty tern	
: At least two bands				

表 1 種同定の結果

表 1 より、本実習で採取したサンプルから判明した種は Rock dove(カワラバト), Oriental turtle dove(キジバト), Sooty tern(セグロアジサシ), Carrion crow(ハシボソガラス)の 4 種であった。セグロアジサシは亜熱帯の島々に生息しており、日本では先島諸島や小笠原諸島に生息している種である。

●考察

・電気泳動結果について

複数バンドが生じた理由としては、サンプリング時のコンタミネーション、目的の DNA 領域以外にプライマーがついて増幅してしまった可能性が考えられる。

・予想外の種について

本結果ではサンプル 4, 14, 16 から、本来亜熱帯の島に生息するセグロアジサシが検出された。サンプル 16 は石垣島で採取したものであり、十分に考えられるが、サンプル 4 と 14 は京大キャンパス内で採取したものであった。考えられることとして、風に運ばれた可能性、DNA コンタミの可能性があげられる。また、サンプル 4 は、羽の形状もかなりセグロアジサシに似ているようであり、コンタミの可能性は低い。

・サンプル 10 について

このサンプルは、PCR の結果より、DNA 抽出ができていなかった。私がキャンパスで採取したものであるが、人通りの多い場所に落ちてあり、発見時の段階で羽軸が踏まれ、中に砂が入っていた。したがって、他のサンプルと比較して、砂などの他の成分によって、抽出がうまくいかなかつたのではないかと考える。

「靈長類学・ワイルドライフサイエンス・リーディング大学院」による派遣研究者報告書  
(当経費の支援を受けての出張後、2週間以内に必ずご提出ください)

●感想

採取時に状態が良い羽だと思っても、各手法の作業内でうまくいかなかつたのか、種同定できなかつたサンプルもあり、時間や手際の良さが大切だと感じた。状態もよくしっかりと結果が出たサンプルもあり、とてもうれしかつた(図4)。

外見の特徴だけでは種判別が難しかつた比較的小さい羽や特徴が他の鳥と似ている種であつても、遺伝分析によって、正確な種、性別まで調べられることがとても興味深かつた。

セグロアジサシについて、私はこの種を詳しく知らなかつたが、本来京都には生息していないと知り、コンタミなどの人為的な結果も考えられるが、今後もこういった例が見つかったり、長期的に同じ事例があつたりするとその種の生息地利用の変化などがわかつて、面白いと思つた。

鳥類だけでなく、他の野生動物でも状態の良いサンプル、DNAの採取が可能であれば、見た目だけではわからないことを調べられるこの分析は、今後の野生動物調査において、非常に重要な手がかりを得ることができると思った。



図4 結果がしっかり確認できたサンプル

6. その他 (特記事項など)

本実習はPWSよりご支援いただきました。また、実習のご指導いただきました村山教授と佐藤先生、サポートしていただきましたFadel氏、中村氏、Xorlali氏に深く感謝申し上げます。