

「霊長類学・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、必ずご提出ください)

平成 27 年 11 月 3 日	
所属部局・職	野生動物研究センター・博士課程学生 1 年
氏名	齋藤 美保

1. 派遣国・場所 (〇〇国、〇〇地域)
愛知県犬山市
2. 研究課題名 (〇〇の調査、および〇〇での実験)
ゲノム実習 (シカ班)
3. 派遣期間 (本邦出発から帰国まで)
平成 27 年 10 月 26 日 ~ 平成 27 年 10 月 30 日 (5 日間)
4. 主な受入機関及び受入研究者 (〇〇大学〇〇研究所、〇〇博士/〇〇動物園、キュレーター、〇〇氏)
早川先生、岸田先生、木下先生
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。
今回の実習では先週の屋久島実習で採取したシカのフンを用いて DNA 解析とホルモン分析を行った。両実験の目的は DNA とホルモンそれぞれからヤクジカの性別を判定することであった。
1. DNA 解析
<方法>
DNA 抽出・生成→PCR→電気泳動
<具体的内容と課題、および結果>
<ul style="list-style-type: none">- フィールドでは計 54 サンプルを採集したが、小分けにした袋にサンプル番号のみを記載し、採取した時間や誰が採取したかなどの詳細なデータを記載していなかった。そのため同じサンプル番号の小分けの袋が二つあった際に、そのサンプル番号に紐づけられる正しいフンを判別できなかった。今回の経験をもとに、今後このような調査をする際は袋にサンプル番号だけではなく、詳細な情報を記載したい。- サンプルとともにコントロールを PCR にかけることを忘れていた。サンプルよりもコントロールの方に注意が向きがちで、コントロールの存在を忘れてしまっていたが、電気泳動を流す際にノイズのレベルを知るためにもコントロールは重要であることを忘れずに次回に活かしたい。- 電気泳動はサンプルを二つのゲルに流したが、そのうちの一つはゲルを作成するときに試薬の量を測り間違えたのか、もう片方のゲルと同じ時間泳動したはずなのに、バンドが綺麗にかい離せず、流したサンプルの大きさを推測するのが難しくなった。サンプルの作成ばかりに注意を払っていたが、ゲル作成の際にもちょっとした不注意でこのようなことになるので次回から気を付けたい。(本当にゲルの試薬量が間違っていたかは定かではないが)- 結果としていくつかのサンプルはバンドが薄かったため雌雄の判別が困難であった。これはフンを綿棒でこする方法が不十分であったことが要因の一つとして考えられる。今後草食獣の乾いたフンにおける DNA サンプルの採集のやり方、もしくは今回とは異なるバッファーを用いればさらに効率よく DNA が抽出可能であるかなど、さらに検討する必要があると感じた。- バンドがしっかりと確認でき、雌雄の判別が可能であったサンプルに関してはほとんどの確率で直接観察と同じ結果を得ることができた。つまり、DNA での雌雄判別は幼獣などの性別が判別しにくい個体の雌雄を知るために有用な手法であるといえる。キリンはシカに比べ幼獣の雌雄は判別しやすいが、それでも時には性別を判別できないこともあり、そのような際にフンを回収し、今回の方法から雌雄を特定したい。- キリンの血縁関係の分析をする際に、
<平成 26 年 5 月 28 日制定版> 提出先: report@wildlife-science.org

「霊長類学・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、必ずご提出ください)

今回の実習で学んだフンサンプルから DNA を抽出する方法が基礎となるため、今回この技術を学ぶことができてよかった。今後の私自身の研究に活かしていきたい。



写真 1. フンサンプルの抽出作業風景



写真 2. 電気泳動用ゲルに試料を流し込む作業風景

2. ホルモン分析

<方法>

1. サンプルをエタノールに溶解→ボルテックス→上澄みを採取しバッファーと混合
2. S1-S10 の Standard を作成
3. HRP antigen/antibody を作成
4. 1. 2. 3 の手順で得られたサンプルと S1-S10 および HRP antigen/antibody をプレートに既定の値ずつ注入
5. 基質バッファーを注入しインキュベートする
6. 硫化水素を加え、マイクロプレートリーダーでそれぞれのウェルのそれぞれのサンプルのホルモン量を測定

<具体的内容と課題、および結果>

- ホルモン分析は過去の実習で行ったことがなかったので、新しい実験手法を学ぶことができてよかった。また今まで扱ったことのない機器も触らせていただき、いい経験になった。
- ピペットマンで何気なくサンプルやバッファーの注入を行っていたが、試料を吸い取る際には液面と平行にするなど実験を正確に行う上で重要である細かなテクニックが多々あった。それらは一人でテキストを見るだけでは学べないものであり、今回講師の方々に色々助言していただき非常に参考になった。
- 二枚のプレートを作成したが S1-S10 の Standard をウェルに注入するのを忘れていた。実験中はきちんと毎回メモを取り、都度確認を忘れないようにしたい。
- 私たちはプロジェステロン値の測定を行ったが、繁殖期のメスのプロジェステロン値は非繁殖期のメスよりもフンに多く含まれており、またフン中におけるメスのプロジェステロン値はオスのものよりも高いという結果が得られた。これにより、プロジェステロンはメスの繁殖期を判断するための、また雌雄を区別するうえでの有用な手段の一つといえる。

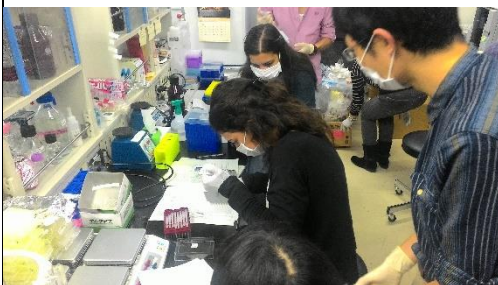


写真 3. 一度に 1 列全てのウェルに試料を注入することのできるピペットマンを使い、基質バッファーを注入する作業風景

6. その他 (特記事項など)

本実習は PWS リーディングプログラムの援助を受けて行いました。実習期間中、ご丁寧に指導して下さった先生方、およびプログラム関係者の皆様に感謝申し上げます。