環境省・環境研究総合推進費（課題番号 S2-10）
クマ類の個体数推定法の開発に関する研究

ヘア・トラップ試料の DNA 分析マニュアル

-DNA 抽出、PCR、ジェノタイピング、精度検証の方法-

目次

１．はじめに
２．作業手順
2.1　体毛サンプルの保存
2.2　体毛からの DNA 抽出
2.3　遺伝子増幅反応
2.4　遺伝子型の判別（ジェノタイピング）
2.5　個体識別
2.6　精度の検証
2.7　アメロゲニン遺伝子による性判別
３．　参考

表紙写真：環境省自然環境局生物多様性センター. 2009. 平成 20 年度自然環境保全基礎調査種の多様性調査（山形県）報告書

１．はじめに

本マニュアルでは、ヘア・トラップ法で用いる遺伝的標識による個体識別を行うための標準的手法を記述した。ヘア・トラップ法における個体識別は、次の４段階の工程で行う。

①DNA 抽出：トラップで採取した体毛から DNA を抽出する。

②遺伝子増幅：体毛 DNA を鋳型として、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により**マイクロサテライト（用語解説）**の遺伝子増幅を行う。

③遺伝子型の判別：PCR 産物の**フラグメント解析（用語解説）**を行い、体毛の遺伝子型を決定する。

④個体識別：遺伝子型データを照合して、体毛をもたらした個体を識別する。

以下に各工程の基本的手順を述べ、分析効率と分析精度に大きな影響を与える各種条件及び注意事項等を解説する。

２．作業手順

2.1　体毛サンプルの保存

実験室に持ち帰った体毛サンプルは、紙封筒に入れて乾燥させた状態（図１）で、室温あるいは冷蔵・冷凍で保存する。ただし、DNA 分析を実施するまで長時間保存する場合は、冷凍保存が望ましい。

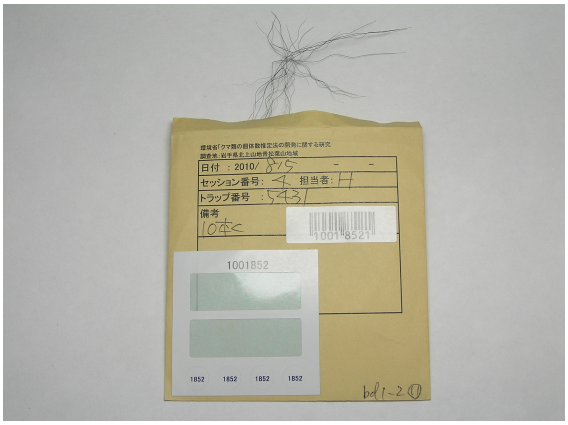


図１　紙封筒でのサンプル保存

2.2　体毛からの DNA 抽出

◆必要機材

実体顕微鏡、精密ピンセット、毛切り用ハサミ（眼科用剪刀や眼科用スプリング剪刀が適している：図２）、1.5ml マイクロテストチューブ、DNA 抽出用キット（市販）、恒温槽、微量高速遠心機、マイクロピペット類

図２　眼科用剪刀（上）と眼科用スプリング剪刀（下）

◆手順

①サンプルの選別

まず実体顕微鏡下で、毛根部分の有無を確認する。毛根が確認できないサンプルは、分析対象から除外する（図３）。ただし、サンプル数が不足する場合には、毛根が無いサンプルを分析対象に加える必要が生じるので、毛根部分が確認できないサンプルも捨てずに保存する。

［注意］DNA 抽出の成否は、抽出に用いる体毛の本数、太さ、毛根部分の状態などにより左右される。可能ならば、1 サンプルあたり 10 本以上の体毛を用い、guard hair のような太い体毛を使うほうが良い。（図４）

図３　毛根が無い毛（上）と毛根がある毛（中、下）

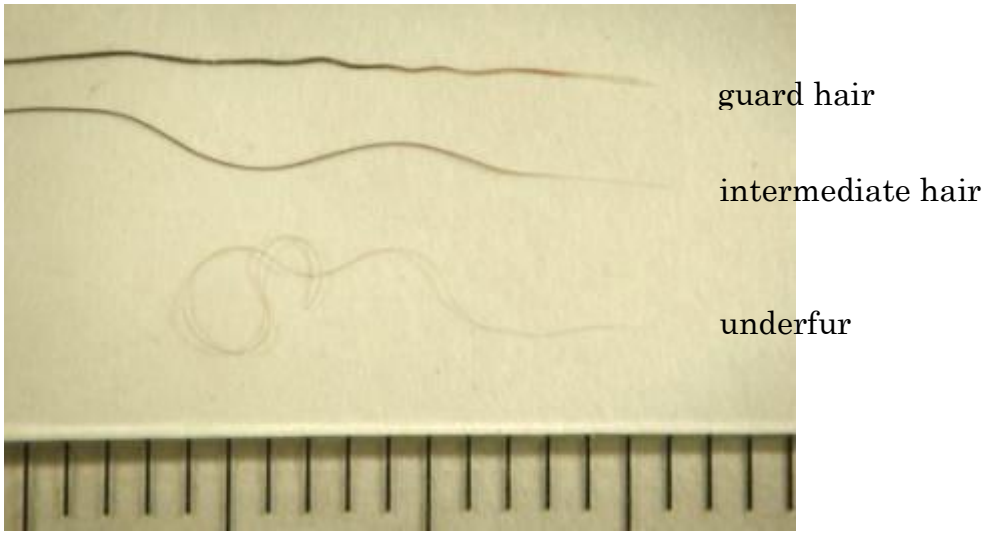


図４　クマ類の体毛の種類

②毛根部分の切断

毛根部分が確認できたサンプルは、実体顕微鏡下で毛根部分を数ミリほど、眼科用ハサミ等で切り分ける（図５）。切り分けた毛根部分は静電気などで飛散しやすく、サンプルの消失や混入などを引き起こす要因となるので、操作は慎重に行う。

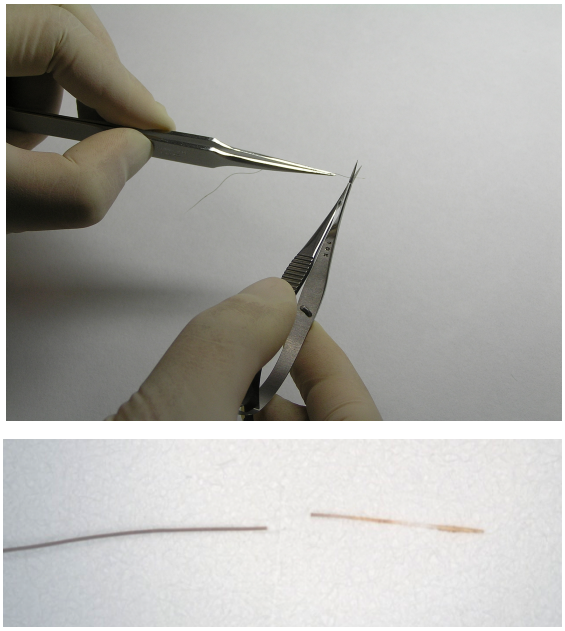


図５　毛根の切断（上）と切断された毛根部分（下：長さは約 3㎜）

③保存

切り取った毛根部分を 1.5ml マイクロテストチューブに入れる。ただちに DNA 抽出を行わない場合は、冷凍保存する。毛根部分を切り取った残りの体毛は、別の封筒に入れて保存する。

④DNA 抽出

市販されている微量試料からの DNA 抽出に適した抽出キットを用いると、短時間で効率よく DNA を得ることができる。市販のキットとしては、DNA Extractor FM kit （和光純薬）、ISOHAIR（ニッポンジーン）などがある。DNA 抽出の手順は、各キットに添付のマニュアル通りに行う。この工程では、体毛を酵素処理するための恒温槽と、DNA 抽出で遠心分離を行うための微量高速遠心機を使用する。

2.3　遺伝子増幅反応（PCR）

◆必要機材

機器類：遺伝子増幅装置（サーマルサイクラー）、微量高速遠心機、マイクロピペット、フラグメント解析ができる DNA シーケンサー（ABIPRISM ジェネティックアナライザ等）。

消耗品：PCR 用酵素（Prime STAR GXL, TaKaRa Ex Taq HS 等）、蛍光プライマーセット、DNA シーケンサー用消耗品類（Capillary, Electrode buffer, Gel polymer, Size standard 等）

◆手順

①遺伝マーカーの選定

サンプルの分析に先立って，個体識別に使用する遺伝マーカー（遺伝子座）を選定するために予備調査を行う。個体識別効率を上げるために、調査対象個体群において多型性が高いマーカーを選択する必要がある。そのため、まず調査対象地域において採取された捕獲個体試料（40～50 個体程度）を用いて，クマ類で報告されているマイクロサテライト遺伝子座（別表１）からできるだけ多くの遺伝子座について**シングル PCR（用語解説）**による増幅を行い、フラグメント解析を行う。調査対象地域の捕獲個体試料が利用できない場合は，同じ個体群に属する近隣地域の試料を利用しても良い。

なお，この際の PCR の反応条件（サーマルサイクラーの温度設定等）についてはプライマー配列の原記載論文に従う。

フラグメント解析の結果から，**PID（偶然に同一の遺伝子型が出現する確率：用語解説）**の低さ，増幅の良さおよび波形の判読のしやすさを基準に，分析対象とする遺伝子座を 10 座位ほど選定する。

選定した 10 座位程度の遺伝マーカーの中から、次節に述べるように 2～3 種類のマルチプレックス PCR の組み合わせを決める。使用する遺伝マーカーの数が増えれば、個体識別はより容易になるが、遺伝子型の誤判定も増える可能性がある。そのため、基本的には遺伝マーカーを 3～4 座位組み合わせたマルチプレックス PCR を 2 セット（基本セット）用いて、個体識別を行う。使用しなかった遺伝マーカーは、6～7 座位での個体識別が困難な場合などに補足的に使用する。

②マルチプレックスPCRの条件設定

選定した遺伝マーカーを3～4座位組み合わせた**マルチプレックスPCR(用語解説)**の条件設定を行う。すべての座位が良好に増幅される組み合わせを選択し，一定の数値（概ね 1×10^{-5}）よりも低いPIDが得られるように、マルチプレックスPCRで用いる遺伝マーカーのセットを設定する。

マルチプレックスPCRの標準的な反応溶液組成と反応条件を,以下に示した。本マニュアルでは、比較的に遺伝子増幅およびピークの判別が容易な遺伝マーカーの基本セットとして、ツキノワグマに対しては、G10C, MU05, MU23からなるmultiplex set AとD118, D2, D103からなるmultiplex set B, ヒグマに対しては, G10B, MU09, MU59からなるmultiplex set brA, G1A, G10P, MU51からなるmultiplex set brB, G10X, MU23, MU50からなるmultiplex brCおよびP2A03, D2, B5からなるmultiplex set brDの反応条件を示す。また, PCR反応の条件についても標準的なステップ数や温度を示したが， PCRの成功率が低い場合には、アニーリング温度や反応サイクル数等の条件を再検討することが望ましい。基本セットの遺伝マーカー組み合わせ例と、プライマー配列および蛍光標識の種類は別表２（a, b）で示す。

マルチプレックスPCRの反応溶液組成

サンプルDNA	1.0 μL	
10x PCR buffer	1.5 μL	
dNTP mix	1.2 μL	
1.5mM MgCl2	0.9 μL	
0.1% BSA	0.75 μL	
Primer A-forward	0.05 μL	（注1、2）
Primer A-reverse	0.05 μL	
Primer B-forward	0.05 μL	
Primer B-reverse	0.05 μL	
Primer C-forward	0.05 μL	
Primer C-reverse	0.05 μL	
Taq polymerase	0.15 μL	
滅菌水	9.2 μL	

以上を混合して、全量を 15 μLに調製する。

注 1. primer の原液濃度は 100μM

注 2. primer A,B,C の組合せを、予備調査の結果に基づき別表 1 から選択する。参考として、本推進費で使用されたツキノワグマとヒグマのプライマーセットを別表 2a, 2b に示す。プライマーの量は 0.05 μL を標準とするが、増幅産物のピークが高すぎる場合には減らすなど、適宜調整する。

マルチプレックス PCR の反応条件

１．変性 97℃，3 分

２．変性 97℃，30 秒

３．アニーリング 53～63℃，90 秒 （注 1）

４．伸長 72℃，30 秒

（２から４のステップを 35～40 サイクル繰り返す）

５．伸長 72℃，7 分

６．反応停止 4℃

注 1.使用するプライマーセットのアニーリング温度(別表 1 または別表 2a, 2b)を設定する

2.4 遺伝子型の判別（ジェノタイピング）

◆手順

①遺伝子型の基本波形との照合

遺伝子座ごとに，捕獲個体試料の分析結果から基本となる波形（リファレンス）を作成し，これと照合することで遺伝子型を判別する。基本的には、すべての遺伝子座について遺伝子型の決定ができた試料のみをデータとして用い，それ以外の試料はデータ化しない。ツキノワグマの遺伝マーカー基本セットに関するリファレンスの例を 3.5 参考図 1 に示す。

②遺伝子型の決定・記録および再分析

遺伝子型がホモ（同じ対立遺伝子の組み合わせ）の場合，基本波形に合致するもののみを対象に遺伝子型を決定・記録し，合致しない試料は再分析を行う。再分析でも基本形に合致する波形が得られない場合は，記録できるデータは得られないため試料を廃棄する。

遺伝子型がヘテロ（異なる対立遺伝子の組み合わせ）の場合，２つの対立遺伝子同士が隣り合っていない（2 塩基繰り返しの場合は 4 塩基以上，4 塩基繰り返しの場合は 8 塩基以上離れている）なら，ホモの場合と同じ手順で遺伝子型の決定・記録を行う。隣り合った対立遺伝子の組み合わせでは，以下の 2 つのケースが想定される

(1) サイズの小さい対立遺伝子のピークがサイズの大きい対立遺伝子のピークより低いケース（図６左）

この場合は，サイズの小さい対立遺伝子の高さがサイズの大きい対立遺伝子の 80%以上の場合のみヘテロとして遺伝子型を決定・記録し，80%未満の場合はホモとして記録する。

(2)　サイズの大きい対立遺伝子のピークが極端に小さいケース（図６右）

サイズの大きい対立遺伝子のピーク（B）が，サイズの小さい対立遺伝子のスタッターピーク（図６の s，繰り返し数の少ない偽ピーク）よりも大きく，サイズの小さい対立遺伝子のピーク（A）の 50%以上である場合には遺伝子型の決定・記録を行う。また，サイズの大きい対立遺伝子のピークがサイズの小さい対立遺伝子のスタッターピークよりも小さい場合には，このピークは記録せずホモとし遺伝子型の決定・記録を行う。これらの条件に合致しない場合は，再分析を実施し，それでも同じ結果であれば，記録できるデータは得られないため、その試料の分析は中止する。

図６　ピークの高さの違いによる対立遺伝子の判定

2.5　個体識別

①GeneCap による個体の同定

遺伝子型を決定したすべてのデータについて、遺伝子型の照合を行い、識別個体を同定する。試料数が少なければ手作業でも照合は可能であるが、データの取り扱いエラーを減らすため、GeneCap（Wilberg & Dreher, 2004）などの照合用のソフトウェアを利用することが推奨される。

②ミスマッチデータの再チェック

照合の結果、分析した全遺伝子座のうち 1 対立遺伝子のみ不一致（ミスマッチ）である組み合わせ（1 mismatch: 1MM）および 2 対立遺伝子のみ不一致である組み合わせ（2 mismatch: 2MM）についてデータの見直しを行う。データの見直し方法は以下の手順で行う。

(1)　1MM および 2MM のデータチェック

ミスマッチを生じているサンプルのうち、遺伝子型の判読に迷うサンプルは再分析する。再分析でも判読に迷う状況に変化が無ければ、そのサンプルデータは使用しない。ミスマッチを生じているどちらのサンプルについても、遺伝子型判読の信頼性が高いと考えられる場合（波形が明確、同一の遺伝子型が他に複数存在するなど）は、どちらのデータも破棄せずそれぞれ別個体とする。

(2)　再照合

上記で MM をチェックした後、再びすべてのデータについて遺伝子型の照合を行い、新しく 1MM, 2MM が生じた場合はさらにデータの見直しを実施する。以降、新しく 1MM, 2MM が生じなくなるまで同様の作業を続ける。

(3)　全ホモサンプルの除外

新しく MM が生じなくなったところで、同一の遺伝子型が存在しないサンプルデータの中で、全座位がホモ（同じ対立遺伝子の組み合わせ）のサンプルがあれば、そのデータを除外する。最後に、再度遺伝子型の照合を実施し、識別された個体にそれぞれ ID をつけて最終データセットとする。

以上の手順を図 7 にフローチャートで示す。

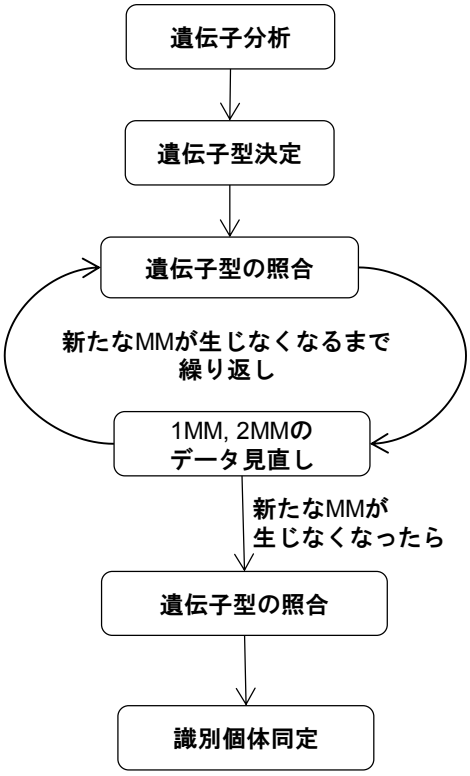


図７　識別個体の同定方法フローチャート

1MM, 2MM のデータ見直し後、同一遺伝子型の存在しないデータのうち、全座位がホモのものがあれば、そのデータを破棄する。データの取捨選択がすべて終了したところで、再度遺伝子型の照合を行い、識別個体を同定する。

遺伝子型照合の注意点

遺伝子増幅反応に用いるサーマルサイクラーは、例え同機種を用いていても、機器が異なれば対立遺伝子サイズに数塩基分のズレが生じる場合がある。したがって、遺伝子分析を複数の機関が分担して行う場合には、全機関分のデータを統合する際に注意が必要である。また、年度ごとに遺伝子分析機関が異なる場合、複数年度分のデータを比較する際にも同様の理由で注意が必要となる。

このように、異なる機関が出したデータを統合したり比較したりする場合には、まず各機関で標準サンプル※を用いて遺伝子分析を実施する。その結果から対立遺伝子サイズのズレを計算し、それを基に、実際の分析サンプルデータについて、分析機関間で対立遺伝子サイズのすり合わせを行う。データの統合や比較は、このすり合わせ後のデータを用いる。

※ツキノワグマの標準サンプルは山形大学理学部生物学科生態遺伝学研究室が必要に応じて配布を行っている。必要な場合は研究室まで問い合わせのこと（TEL: 023-628-4620）。

2.6　精度の検証

微量 DNA を用いてマイクロサテライトを増幅する場合には allelic dropout (ADO, 片側対立遺伝子の欠落)や false allele (FA, 偽対立遺伝子)などの遺伝子型の誤判定が生じる場合がある。誤判定の影響を調べて、分析精度を改善する手順を以下に示す。

① 誤判定率の推定

同一サンプルについて 2 回、独立した PCR を行って得た 2 組の遺伝子型データを比較することによって、遺伝子型の誤判定率（エラーレート）を推定することができる。ADO と FA それぞれの誤判定率を推定するプログラムとして、PEDANT（Johnson and Haydon, 2007）が用いられる。PEDANT のソフトウェアは次の URL からダウンロードできる。

http://www.stats.gla.ac.uk/~paulj/index.html

PEDANT で誤判定率を推定する場合は、PCR から遺伝子型の決定までの作業を２回行う。PEDANT は 1 回目と２回目のデータを比較して、遺伝子型が異なるサンプルをもとに、遺伝子座と各対立遺伝子の誤判定率を推定する。

PEDANT の結果で誤判定率が高いことが示された遺伝子座を、個体識別用データから除外することにより、個体識別の分析精度が向上することが期待される。

② 適合度検定による誤判定の検出

ヘア・トラップでは、ADO のためヘテロの遺伝子座を誤ってホモとして判定し、別個体としてしまうことから個体の数を過剰に見積もる場合がある。このような誤判定が生じている可能性を検証するための統計学的検定（適合度検定）について解説する。

適合度検定を行うためには、調査対象地域集団の対立遺伝子頻度のデータが必要となる。そのために、調査地域における有害駆除や狩猟で集められた組織サンプルから十分な量の DNA を得て、マイクロサテライト分析により 50 個体程度の遺伝子型を決定し、母集団の対立遺伝子頻度を推定する。適合度検定では、母集団の対立遺伝子頻度から求めたサンプル集団におけるホモ接合体の出現数の期待値に対して、サンプル集団におけるホモ接合体の出現数（観察値）を比較するカイ二乗検定を行う。帰無仮説（適合性）が棄却された場合には、ホモ接合となった個体の遺伝子データを再確認して、誤判定の有無を個別に検証する。

適合度検定に用いる Microsoft Office Excel のテンプレートは、URL の http://www.bear-project.org から入手できる。このテンプレートでは 6 遺伝子座を用いた適合度検定を行う事が出来る。

2.7　アメロゲニン遺伝子（用語解説）による性判別

遺伝マーカーを用いたクマ類の性判別では，SRY(Sex-determination region Y)遺伝子やZF(Zinc finger)遺伝子，アメロゲニン遺伝子をPCRによって増幅して判定する方法がある。ここではPCR産物サイズがマイクロサテライトマーカーとほぼ同じ範囲にあり，フラグメント長の相違で雌雄が判別可能であるアメロゲニン遺伝子を用いた性判別法を記す。

◆使用するプライマーの配列(Ennis S and Gallagher TF. Anim Genet 25:425-7)

SE47；CAGCCAAACCTCCCTCTGC

SE48；CCCGCTTGGTCTTGTCTGTTGC

GeneScanを用いてフラグメント解析を実施する場合は，SE47に蛍光色素を付加したプライマーを用いる。

◆手順

①PCR反応液の組成

TaKaRa Ex Taqを使用して、全体量を15μ l にした反応液組成を示す。

サンプルDNA	1.0 μL
10×PCR buffer	1.5 μL
dNTP mix	1.2 μL
1.5 mM $MgCl_2$	0.9 μL（最終濃度1.5 mM)
蛍光標識SE47	0.075 μL（最終濃度0.1 mM)
SE48	0.075 μL（最終濃度0.1 mM)
Taq polymerase	0.15 μL
滅菌水	4.65 μL

②PCR反応条件

１．変性	97℃	3分
２．変性	95℃	1分
３．アニーリング	63℃	1分
４．伸長	72℃	1分

（２から４のステップを45サイクル繰り返す)

５．伸長	60℃	30分
６．反応停止	4℃	

③ジェネティックアナライザを用いたアメロゲニン遺伝子の検出

マイクロサテライト分析と同様の方法で、ジェネテッィクアナライザを用いて PCR 産物のフラグメント解析を行う。オスの個体の場合には Y 染色体由来のアメロゲニン遺伝子のピーク Y（191bp）と X 染色体由来のピーク X（245bp）の 2 本が検出される。メスの場合は X のピーク 1 本のみが検出される（図８）。

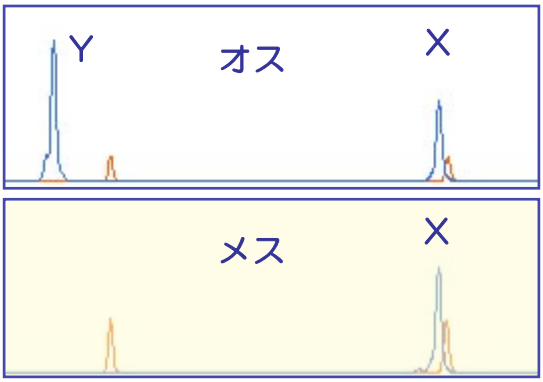


図８ ジェネティックアナライザによる性判別
オレンジ色のピークはサイズスタンダード

３　参考

3.1　分析費用および所要時間の見積もり

分析費用の見積もりは、使用する消耗品類（DNA 抽出用キット、PCR 用試薬、蛍光プライマーペア、ジェネテッィクアナライザ用消耗品、プラスチック器具類等）の単価から計算する。

6 遺伝子座程度を用いて個体識別を行う場合、1 サンプル当たり、マルチプレックス PCR を 2 セットとアメロゲニンによる性判別のための PCR で合計 3 回の PCR を行い、ジェネテッィクアナライザでは 3 回の分析（run）を行うことになる。ただし、データの確認のために、追加的に PCR やジェネティックアナライザによる分析を繰り返すことが多いので、PCR の反応回数とジェネティックアナライザを使用する回数は、いずれも余裕をもって（４～５回分）見積もることが必要である。

所要時間は、１サンプルを１回分析する場合で、毛切りから DNA 抽出まで１～２日、PCR 反応（複数回）で１日、ジェネティックアナライザで１日程度が必要である。また、前述のように、データの確認のために、PCR 以降の作業を繰り返し行う場合があるので、多くの時間を要することに留意すべきである。

3.2　受託合成および受託分析

蛍光プライマーは受託合成で入手する。使用する分析装置（DNA シーケンサーやジェネテッィクアナライザ）により使用できる蛍光が異なるので、プライマーを作製する場合にはどの種類の蛍光が使用できるか確認する必要がある。蛍光プライマーはアプライドバイオシステムズ、日本遺伝子研究所など数社で受託合成を行っている。

PCR 産物をジェネティックアナライザで泳動してデータを提供する受託分析を行う会社がある（株式会社ファスマック等）。ピークデータの解析については、追加費用が必要となる。

3.3　別表１　クマ類のマイクロサテライト遺伝子マーカー

別表1　クマ類のマイクロサテライト遺伝子マーカー

遺伝子座		ツキノワグマで観察された対立遺伝子サイズ(bp)	原著記載の対立遺伝子サイズ(bp)	アニーリング　温度(℃)	原著
G series	G1A	199-227	188-220	65	Paetkau et al. (1995) *U. americanus*
	G1D	192-196	174-190	58	
	G10B	147-165	142-160	65	
	G10C	112-124	101-115	50-55	
	G10J	81-97	-	50-55	
	G10L	134-150	121-141	58	
	G10M	199-209	200-218	54	
	G10P	168-188	-	-	
	G10X	186-202	129-149	54	
MSUT series	MSUT-1	175-179	166-174	58	Kitahara et al. (2000) *U. thibetanus*
	MSUT-2	86-98	75-91	50	
	MSUT-4	93-99	85-101	44	
	MSUT-5	126	167-171	50	
	MSUT-6	184-190	179-193	49	
	MSUT-7	110-121	110-118	43	
UarMU series	UarMu05	146-156	-	50-55	Taberlet et al. (1997) *U. arctos*
	UarMu09	118-126	-	50-55	
	UarMu10	137-141	-	50-55	
	UarMu15	128-138	-	50-55	
	UarMu23	118-134	-	50-55	
	UarMu26	186-188	-	50-55	
	UarMu50	216-232	-	50-55	
	UarMu51	117-125	-	50-55	
	UarMu59	249-257	-	50-55	
	UarMu61	208-212	-	50-55	
	UarMu64	185-191	-	50-55	
Uam series	UamA107	156-174	171-219	57, 55　2step	Meredith et al. (2009) *U. americanus*
	UamD2	212-228	223-239	57, 55　2step	
	UamD102	190-206	199-215	57, 55　2step	
	UamB2	173-197	185-197	57, 55　2step	
	UamB5	148-164	172-188	57, 55　2step	
	UamB103	115-123	134-146	57, 55　2step	
	UamC11	160-168	176-186	57, 55　2step	
	UamD1a	123-144	138-158	60-49.5 down	
	UamD3	229-237	242-258	57, 55　2step	
	UamD103	214-238	184-214	57, 55　2step	
	UamD112	141-160	142-210	57, 55　2step	
	UamD113	151-159	160-192	57, 55　2step	
	UamD118	190-202	197-213	57, 55　2step	
UA series	UA-BM3-P1B05U	224-250	235-262	60-49.5 down	Sanderlin et al. (2009) *U. americanus*
	UA-BM4-P1H10U	258-266	217-233	60-49.5 down	
	UA-BM4-P2E11U	236-256	256-280	60-49.5 down	
	UA-RM3-P2H03U	108-179	127-204	49	
Ut series	UT1	170	176-192	64	Shih et al.　(2009) *U. thibetanus*
	UT4	145-162	157-182	56	
	UT29	170-214	204-236	64	
	UT35	198-218	218-247	64	
	UT38	166-210	196-232	56	

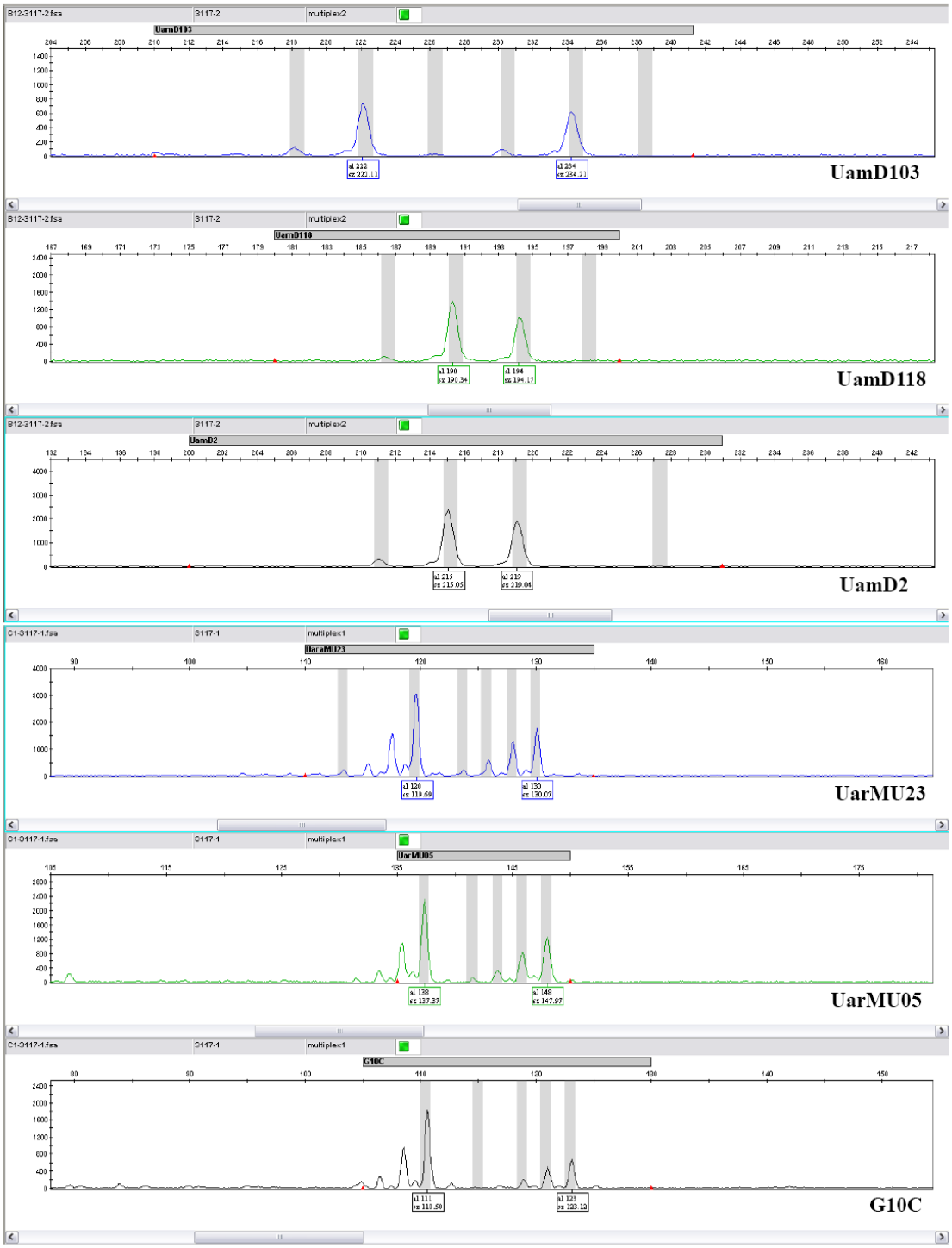
3.4　別表２a　Multiplex PCR の基本セット（ツキノワグマ用）

Multiplex set	遺伝子座	対立遺伝子サイズ	アニーリング温度	Forward / Reverse	配列	原著
set A	G10C	112-124		F	AAAgCAgAAggCCTTgATTTCCTg	Paetkau et al. (1995)
				R	ggggACATAAACACCgAgACAgC	
	UarMu05	146-156	55	F	AATCTTTTCACTTATgCCCA	Taberlet et al. (1997)
				R	gAAACTTgTTATgggAACCA	
	UarMu23	118-134		F	gCCTgTgTgCTATTTTATCC	Taberlet et al. (1997)
				R	AATgggTTTCTTgTTTAATTAC	
set B	UamD118	212-228		F	TgggTTTggCATTTTTATC	Meredith et al. (2009)
				R	CAgAgCACCACACTgATACTC	
	UamD2	214-238	55	F	ACACCTgTCTTCCCTTCCTAAC	Meredith et al. (2009)
				R	TTCCATCTgAgAggCTgAAC	
	UamD103	190-202		F	AgCCTTATCAgTTAgggTTTTC	Meredith et al. (2009)
				R	CTggCTTTCAgACTggAAC	

3.4 別表２b Multiplex PCR の基本セット（ヒグマ用）

Multiplex set	遺伝子座	対立遺伝子サイズ	アニーリング温度	Forward／Reverse	配列	原著
Set brA	G10B	138-165		F	gCCTTTTAATgTTCTgTTgAATTTg	Paetkau et al. (1995)
				R	gACAAATCACAgAAACCTCCATCC	
	UarMU09	122-138	55	F	TTgAAgTTCAgggTAAATgC	Taberlet et al. (1997)
				R	ATATAgCAgCATATTTTTggCT	
	UarMU59	99-117		F	gCTCCTTTgggACATTgTAA	Taberlet et al. (1997)
				R	gACTgTCACCAgCAggAg	
Set brB	G1A	175-187		F	gACCCTgCATACTCTCCTCTgATg	Paetkau et al. (1995)
				R	gCACTgTCCTTgCgTAgAAgTgAC	
	G10P	132-163	55	F	AggAggAAgAAAgATggAAAAC	Paetkau et al. (1995)
				R	TCATgTggggAAATACTCTgAA	
	UarMU51	104-112		F	gCCAgAATCCTAAgAgACCT	Taberlet et al. (1997)
				R	AAgAgAAgggACAggAggTA	
Set brC	G10X	173-181		F	CCACCTTCTTCCAATTCTC	Paetkau et al. (1998)
				R	TCAgTTATCTgTgAAATCAAAA	
	UarMU23	111-125	55	F	gCCTgTgTgCTATTTTATCC	Taberlet et al. (1997)
				R	AATgggTTTCTTgTTTAATTAC	
	UarMU50	191-217		F	TCTCTgTCATTTCCCCATC	Taberlet et al. (1997)
				R	AAAggCAATgCAgATATTgT	
Set brD	UA-BM4-P2A03	239-263		F	TTAAAAggTTgCTggTgTg	Sanderlin et al. (2009)
				R	ATggTgTgTTTCTACTAATCTC	
	UamD2	195-211	55	F	ACACCTgTCTTCCCTTCCTAAC	Meredith et al. (2009)
				R	TTCCATCTgAgAggCTgAAC	
	UamB5	152-160		F	CCggTggATCTATCTCAgAgT	Meredith et al. (2009)
				R	gggATCTTgTCTATCCTgCTC	

3.5　参考図１　遺伝子型のピークパターン例（レファレンス）



3.6　参考文献

◆マイクロサテライトマーカーのプライマー配列

Kitahara Y, Isagi Y, Ishibashi T and Saitoh T (2000) Polymorphic microsatellite DNA markers in the Asiatic black bear *Ursus thibetanus.* Molecular Ecology 9:1661–1662

Meredith EP, Rodzen JA, Banks JD and Jones KC (2009) Characterization of 20 tetranucleotide microsatellite loci in black bear (*Ursus americanus)* for used in forensic and population applications. Conservation Genetics 10: 693-696.

Paetkau D, Calvert W, Stirling I and Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. Molecular Ecology 4: 347-354.

Paetkau D, Shields G L and Strobeck C (1998) Gene flow between insular, costal and interior populations of brown bears in Alaska. Molecular Ecology 7: 1283-1292

Sanderlin JS, Faircloth BC, Shamblin B and Conroy MJ (2009) Tetranucleotide microsatelliteloci from the black bear (*Ursus americanus*) Molecular Ecology Resources 9:288-291.

Shih CC, Huang CC, Li SH, Hwang MH and Lee LL (2009) Ten novel tetranucleotide microsatellite DNA markers from Asiatic black bear, Ursus thibetanus. Conservation Genetics

Taberlet P, Camarra JJ, Griffin S, Uhres E, Hanotte O, Waits LP, Dubois-Paganon C, Burke T and Bouvet J (1997) Noninvasive genetic tracking of endangered Pyrenean brown bear population. Molecular Ecology, 6: 869-876.

◆ヘア・トラップにおけるマイクロサテライト分析の精度等に関する考察

Paetkau D and Strobeck C (1994) Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. Molecular Ecology, 3: 489-495.

Waits LP and Paetkau D (2005) Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. J. Wildlife Management, 69: 1419-1433.

佐藤喜和・湯浅卓　2008.　ヘア・トラップを用いたクマ類の個体数推定法：概

要と注意点　哺乳類科学　48：101-107
McKelvey KS and Schwartz MK (2004) Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. Journal of Wildlife Management 68: 439-448.

3.7　マイクロサテライト解析のためのソフトウェア

◆GENECAP: http://wilberglab.cbl.umces.edu/downloads.html

機能：DNA サンプルの遺伝子型を相互に照合して、同一遺伝子型のサンプルをソートし、ミスマッチの組み合わせをリスト化するプログラム。

文献：Wilberg MJ and Dreher BP (2004) GENECAP: a program for analysis of nuclear data for capture-recapture population estimation. Molecular Ecology Notes 4:783-785.

◆MICROCHECKER: http://www.microchecker.hull.ac.uk/

機能：マイクロサテライトデータの遺伝子頻度を計算して、ヌルアリル等を検出するプログラム。

文献：Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM and Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4:535–538.

◆DROPOUT: http://www.rmrs.nau.edu/wildlife/genetics/software.php

機能：対立遺伝子が選択的に増幅・非増幅されるエラー（ドロップアウト）を検出するプログラム。

文献：McKelvey K and Schwartz MK (2005) DROPOUT: a program to identify problem loci and samples for noninvasive genetic samples in a capture-mark-recapture framework. Molecular Ecology Notes 5:716-718.

◆GENEPOP: http://genepop.curtin.edu.au/

機能：ヘテロ接合度や対立遺伝子頻度の計算、ハーディワインベルグ平衡からの逸脱の検定等を行うプログラム。

文献：Raymond M and Rousset F (1995) GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Hered. 86:248-249.

◆FSTAT: http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm
機能：ヘテロ接合度や対立遺伝子頻度の計算等を行うプログラム。
文献：Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate Fstatistics. J. Hered. 86:485-486.

◆MICROSATELLITE TOOL KIT:
http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/
機能：マイクロサテライトデータの遺伝子頻度を計算して、ヌルアリル等を検出する表計算ソフトのアドイン
文献：www.fs.fed.us/rm/wildlife/genetics/3.3

◆ PEDANT: http://www.stats.gla.ac.uk/~paulj/pedant.html
機能：PCR 等によって生じた遺伝子型の誤判定率の最尤推定を行うプログラム。
文献：Johnson PCD and Haydon DT (2007) Maximum likelihood estimation of allelic dropout and false allele error rates from microsatellite genotypes in the absence of reference data. Genetics 175:827-842.

3.8　用語解説

マイクロサテライト：　DNA の配列中で、２～４塩基程度の短い DNA 配列が連続して反復する領域をマイクロサテライト（microsatellite）とよぶ。例えば、クマ類のヘアトラップ調査で用いられる UamD118 は４塩基（TAGA）の反復配列を持つ。反復（繰り返し）の数は個体により異なることが多い。この性質を利用して、体毛サンプルの DNA のマイクロサテライト領域の塩基配列の長さの違いを調べることにより、サンプルをもたらした個体の識別をおこなうことができる。

フラグメント解析：　PCR や制限酵素による切断などによって得られた短い DNA 断片を、電気泳動法により分離して、断片長（塩基配列の長さ）を調べる分析手法。DNA シーケンサーのような自動分析装置を用いるが、DNA 断片の大きさによっては、アガロースゲル電気泳動でも調べることができる。

シングル PCR：　１種類のマイクロサテライト遺伝子だけを増幅する PCR

マルチプレックス PCR　：複数のマイクロサテライト遺伝子を一本のチューブで

同時に増幅するPCRで、数種類の異なる遺伝子に対するプライマーを混合して用いる方法。

PID： 同一ではない２個体の遺伝子型が，偶然に一致する確率。言い換えれば、異なる２個体を捕獲したときに、偶然に同じ遺伝子型になる確率。PIDが高いと、同じ遺伝子型をもつ個体が集団内に多く存在することになる。そのため、ヘアトラップ法では、できるだけ低いPIDを持つ遺伝マーカーを選択することが重要となる。PIDは対象集団ごとに異なると予想されるので、あらかじめ有害捕獲などで得られた集団サンプルの遺伝子分析を行って測定することが望ましい。

アメロゲニン遺伝子： アメロゲニンは、歯のエナメル質を構成するタンパク質。アメロゲニン遺伝子は、性染色体上に存在し、Ｘ染色体とＹ染色体では長さが異なる。そのため、この遺伝子領域をPCRで増幅してフラグメント解析を行うことにより、性判別ができる。