



# DNAフィンガープリント法の家畜育種への応用

万年, 英之

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1994-03-31

(Date of Publication)

2007-10-03

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1285

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3078413>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001285>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

DNAフィンガープリント法の  
家畜育種への応用

平成6年1月

神戸大学大学院自然科学研究科

万年 英之

## 目次

緒論	1
第1章 6種類のプロープを用いたDNAフィンガープリント	
第1節 緒言	5
第2節 材料および方法	7
第3節 結果および考察	18
第2章 DNAフィンガープリント法による個体識別と親子鑑別	
第1節 緒言	47
第2節 材料および方法	49
第3節 結果および考察	50
第3章 DNAフィンガープリント法を用いた実験動物の遺伝的モニタリング	
第1節 緒言	64
第2節 DNAフィンガープリント法を用いた近交系マウスおよび 近交系亜系マウスの同定	67
第3節 DNAフィンガープリント法を用いた実験用ウサギ、近交系マ トミス、近交系ゴールデンハムスターの遺伝的モニタリング	77
第4章 DNAフィンガープリント法による遺伝的類縁関係の解明	
第1節 緒言	87
第2節 材料および方法	89
第3節 結果および考察	91

第5章	DNAフィンガープリント法による血縁係数の予測	
第1節	緒言	105
第2節	材料および方法	107
第3節	結果および考察	111
第6章	リコンビナントインブレット系マウスにおけるミニサテライト遺伝子座のマッピングと量的形質の検出	
第1節	緒言	117
第2節	材料および方法	119
第3節	結果および考察	124
総括		146
謝辞		156
引用文献		157

## 緒論

家畜において、血液型を始めとする遺伝的マーカーは、家畜の血統登録、親子鑑定、卵性鑑定、新生児黄疸症、フリーマーチンの鑑定などに広く利用されてきた。これらの遺伝的マーカーとしては、血液型、トランスフェリンやセルロプラスミンといった血清中の蛋白質型、ミクルカゼインの型、あるいは血球中のカルボニック・アンヒドラーゼ、血清中のアミラーゼなどの酵素型がよく知られている。ところが、蛋白質では多型性に富むものが少なく、集団の近交度が上昇したり、両親が遺伝的に似通ってくると、この方法を用いた個体識別や親子鑑別の精度が低くなるため、多数の多型蛋白質を分析する必要が生じてくる。

近年、遺伝子工学と呼ばれる新技術の発達に伴って、従来の血液型や多型蛋白質に代る方法として、遺伝物質であるDNAそのものの多型を分析する方法が注目されるようになった。それらのうちでも代表的なものが、RFLP法（restriction fragment length polymorphisms: 制限酵素切断断片長多型）、DNAフィンガープリント法、PCR法（polymerase chain reaction）で検出できる多型である。

哺乳動物の染色体DNAは、1倍体当たり約 $3 \times 10^9$ 塩基対（bp）からなり、それを直線状に伸ばすとその全長は1mにも達するといわれている。このDNA全体をゲノムと呼ぶ。しかしこれだけの塩基対の中で実際に遺伝子として蛋白質に翻訳される領域やそれに係わる領域は1%以下で、ゲノムの大部分はスペーサーやイントロンと呼ばれる非遺伝子であると考えられている。これらの非遺伝子領域で起こる突然変異は、生命維持には直接影響しないために、排除されることなく受け継がれ、蓄積される。その結果として、これらの領域は高度な多型性を持つこととなる。例えば、ゲノムの10%を占めるサテライトDNA（縦列型反復配列）は、その反復性に起因して高頻度の組み替えを起こし、結果として多型性に富むことが知られている（Chaig and Shaw, 1971; John and Miklos, 1979）。

また、非遺伝子中にはミニサテライトと呼ばれる領域が存在する。ミニサテラ

イントロ領域とは、一般的にコア配列と呼ばれる 9~40塩基を基本単位とする塩基配列が数十回から、多いところでは数千回も反復する領域をいう。この様な領域は、ヒトの  $\alpha$ -globin 遺伝子 (Higgsら, 1981; Proudffotら, 1982; Goodburnら, 1983)、insulin 遺伝子 (Bellら, 1982)、c-Ha-*ras*-1 oncogene (Caponら, 1983) などのイントロン中に存在していることが報告されている。また、これと似たミニサテライト配列は、ゲノム中にかなりのコピー数が存在していることが示唆されており、またその種類も多く、全染色体上に散在していることが示されている (Hillelら, 1989; Jeffreysら, 1987; Royleら, 1988; Zischlerら, 1989)。これらミニサテライトは、反復回数の違いによる多大な多型性を持つ。これらの多型を生ずる原因としては、有糸分裂時の不等交差や減数分裂時の相同組換えによるものと考えられているが (Wahlsら, 1990)、詳しいことは明らかではない。

1985年、Jeffreysら (1985a)は、ヒトのミオグロビン遺伝子のイントロン中に存在する33塩基の繰り返し配列に注目し、この配列の23塩基の基本単位を化学合成したものをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。そして、プローブの非特異的な結合を除く洗浄を穏やかな条件で行った。その結果、ゲノムに存在する類似した複数のミニサテライト遺伝子座を同時に検出することに成功した。この時に得られたバンドパターンは個体に特異的とも言える複雑な様相を示し、それはあたかも個人に特有な指紋のようなので、DNAフィンガープリント (DFP) と名付けられた。

RFLPとDFPは、ほとんど同じ操作によって得られる。両者間の違いは、プローブにある。RFLPでは通常、cDNAをプローブとして用いている。その結果生まれる多型は、その遺伝子領域内の塩基の置換による制限酵素認識部位が変化し、長さの違う断片が産み出されるためである。一方DFPでは、もちろん上述のような多型も含まれるが、その多型の多くは制限酵素で切断された断片内におけるミニサテライト反復単位の反復回数が個体ごとに異なるためであり、その結果、その反復回数の違いによる断片の長さが多型として検出される。そして、RFLPが一つの遺伝子座のみを検出するのに対し、DFPでは全染色体上に散在している類似した複数のミニサテライト領域を検出する点が異なっている。

D F Pの研究はヒトで特に進み、個人識別 (Burk and bruford,1987; Gillら, 1985; Jerffreysら, 1985a,b,c,1986; Nichols and Balding, 1991)や親子鑑別 (Dallasら, 1988; Fowlerら, 1988; Jeffreysら, 1985b,c,1986)で良く研究されてきた。その他の動物においても、個体識別 (Mengら, 1990; Nybom, 1990; Vassartら, 1987)、親子鑑別 (Brock and White, 1991; Burkら, 1989; Kashiら, 1990; Nybom and Schaal, 1990)、連鎖分析 (Jeffreysら, 1987)、集団の分類 (Dunningtonら, 1991; Kuhnleinら, 1989)、動物集団の遺伝的評価 (Amosら, 1991; Blanchetot, 1991; Ellegrenら, 1992; Wettonら, 1987)、集団の近交との関連 (Kuhnleinら, 1990)など幅広く適用されてきた。

しかしながら、開発されてまだ十年もたたないこの方法は、その適用法や応用法が十分に検討し尽くされたとはいえない。特に、D F Pの家畜や家禽種に対する適用についてはまだ十分に検討されておらず、本法が畜産の分野で広く用いられるためにはその基礎的な研究が必要と考えられる。

そこで本研究では、D F P法が将来、有効な家畜育種の手法の一つになり得ると考え、数種の家畜、家禽に対するD F P法実施のための基本的な条件を設定すること、D F Pの家畜育種学的な見地からの応用法や量的形質に対するマーカーとしての有効性を明らかにすることなどを目的として、以下の諸点について検討した。

1 適切なD F P像を得るために、各生物種に対して制限酵素やプローブ、また洗浄条件等の検討を行った。対象とした生物種は、ウシ、ウマ、ブタ、ニワトリ、マウス、ウサギ等である。

2 ウシとニワトリを対象としてD F Pの個体識別と親子鑑別に対する有効性を検討した。

3 D F Pが実験動物の遺伝的モニタリング法として有効か否か、近交系マウス、近交系マウス亜系、クローズドコロニーを含む実験用ウサギ及び遺伝的マーカーがほとんど開発されていないハムスターやマストミスに対して検討した。

4 系統や集団の分類にDFP法が有効であるかどうかを検討した。またそれらの遺伝的類縁関係の解明に役立つかどうかについても検討した。

5 2個体間の遺伝的類似性を示す血縁係数とDFPから計算される類似性との関連を調べた。次に、その結果からDFP法を用いて2個体間の血縁係数が予測できるかどうかを検討した。

6 DFP法が量的形質のマーカーとして有効かどうかを検討した。対象動物には、マウスのリコンビナント・インブレット系統を用い、量的形質には下顎骨の測定値を用い、その量的形質の変異と関連するDFPのバンドを検索した。



## 第1章 6種類のプロープを用いた各家畜種に対する

### DNAフィンガープリント

#### 第1節 緒言

Jeffreysら (1985a)がヒトミオグロビン遺伝子のミニサテライトDNAを用いてDFPを開発して以来、DFPに関する数多くの報告がなされている。最初に開発されたのがヒトの遺伝子についてのDFPであったため、これら初期の報告の大部分はヒトについてのものである (Flowlerら, 1988; Gillら, 1985, 1987; Hill and Jeffreys, 1985; Jarmanら, 1986; Jeffreysら, 1985a, b, c, 1986)。家畜、家禽に関してはウシ (Kashiら, 1990; Vassartら, 1987)、ウマ (Ellegrenら, 1992)、ブタ (Coppetersら, 1990)、ニワトリ (Dunningtonら, 1990, 1991; Hillelら, 1989; Kunleinら, 1989, 1990)でいくつかの報告が見られるが、その報告例は少ない。また、DFPに用いるプロープは今日までに20種類を超えるが (Dover, 1989; Fowlerら, 1988; Higgら, 1986; Jeffreysら, 1985a; Mitaniら, 1990; Nakamuraら, 1987; Schaferら, 1988; Vassartら, 1987)、各研究者によって用いるプロープや制限酵素の種類は異なっており、各家畜種に対してどのプロープと制限酵素が適しているのかは明らかではない。さらに、DFP法では、プロープと相同性の低い複数のミニサテライト領域まで検出するため、良いDFP像を得るにはハイブリダイゼーション後のメンブランの洗浄条件の設定が必須になる。これらの条件は、プロープの種類や家畜、家禽種によっても異なる。

M13ファージDNAの反復配列は、1987年 VassartらによってDFPのプロープとして利用出来ることが示されたものである。また翌年、Ryskovら(1988)はこのプロープを用いて、1個体ずつながら哺乳類から大腸菌に至るまで多種にわたるDNAフィンガープリント像を得ている。そこで著者はまず、M13ファージDNAの反

復配列を用いて、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ラット、マウス、ニワトリ、ホロホロ鳥などの家畜家禽で良好なDFPが得られるか否か、洗浄条件や制限酵素を変えて検討を加えた。

また、使用するプローブ数が増加すれば、個体識別や親子鑑別、量的形質と関連しているDFPバンドの検出等において分析の精度が上昇し、M13ファージDNAの反復配列以外のプローブが必要になると考えられる。そこでウシとニワトリを対象とし、報告されている他のミニサテライト反復配列、YNZ22 (Nakamuraら, 1987)、33.15 (Jeffreysら, 1985)、 $\alpha$ -globin (Higgsら, 1986)、mo-1 (Mitaniら, 1990) の4種類のプローブと(GT) $n$  マイクロサテライト反復配列 (Schaferら, 1988) の1種類のプローブについても、有効なDFPが得られるか否かを検討した。

## 第2節 材料および方法

### 1) 供試動物

#### 1)-1 M13ファージプローブによるDFPの検出

数種類の家畜、家禽においてM13ファージ反復配列プローブを用いたDFPの洗浄条件を決定するために、ウシではホルスタイン種と黒毛和種をそれぞれ1頭ずつ、ブタでは金華豚と梅山豚、日本白色種ウサギ、Wister rat、DDD/Jahマウス各1頭と、ニワトリは横班プリマスロックと白色レグホーン種およびホロホロ鳥をそれぞれ1羽ずつ供試した。

さらに、M13ファージ反復配列プローブを用いた場合、制限酵素を変えたDFPをウシ、ブタ、ウマ、マウスで検討するため、ウシでは黒毛和種を2頭、ブタでは金華豚、梅山豚およびその子供を1頭ずつ、ウマではサラブレッド種とペルシュロン種をそれぞれ3頭ずつ、マウスは異なった近交系(RR/Jah, SS/Jah, C3H/HeJah, CF#1/Jah, CFW, SMXA-5,6,7)から、3頭ずつ用いた。

#### 1)-2 複数プローブによるDFPの検出

数種類のプローブを用いて有用なDFPが得られるかどうか検討するために、ウシとニワトリを実験材料とした。ウシではホルスタイン種と黒毛和種をそれぞれ10頭ずつ、ニワトリでは農林水産省家畜改良センター兵庫牧場においてブロイラー作成の父系として維持されている系統(以後52系)と、我々の研究室で小さな閉鎖集団として維持している白色レグホーン種のB系(以後WL-B系)を用いた。52系はブロイラー作成の父系として、増体性を改良目標に昭和57年に造成が開始され、系統維持されている白色コーニッシュ由来の系統である。またWL-B系は我々の研究室で20年以上にわたって雄10羽、雌20羽程度の小さな閉鎖集団として維持してきた白色レグホーン種である。各系統とも雌雄5羽ずつ、合計20羽を供試した。

## 2) DNAの精製

ウシのゲノムDNAは雌牛では全血から、雄牛では精液から、また枝肉ではリンパ節、ウマでは全血、ブタ、ウサギでは全血および肝臓、マウス、ラットでは肝臓、ニワトリ、ホロホロ鳥では赤血球より抽出、精製した。

### 2) - 1 哺乳類における全血からのDNAの精製

血液はヘパリン添加の真空採血管を用いて、頸動脈より採取した。約10mlの全血を 3,000rpm 10分間遠心分離し、パスツールピペットを用いて白血球層を50mlのファルコンチューブ (Falcon #2070) に分取した。40mlの0.2% NaCl溶液を加えてよく混合して血球を溶血させ、3,000rpm 10分間遠心分離した後、上清を除いた。0.5mlの0.16M NaCl, 1mM EDTA溶液を加えて良く懸濁した後、20mlのザルコシル溶液 (0.5% N-lauroylsarcosine sodium salt, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA) を加え、DNAを切断しないようにゆっくりと振とうし、DNAを溶出させた。200  $\mu$ lのProteinase K溶液 (10mg/ml in water) を加え、37°Cで一晩インキュベートした。当量のTE-フェノール (フェノールを60°Cで溶かし、TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) で水飽和し、0.1% になるように8-hydroxyquinolineを加えたもの) を加え、10分間以上ゆっくりと混和した。3,000rpm 10分間遠心分離し、中間の白い蛋白層を取らないように水層を分取した。この水層にフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール (25:24:1、0.1% の 8-hydroxyquinolineを含む) を加え、10分間以上ゆっくりと混和した。3,000rpm 10分間遠心分離し、水層を分取した。この水層に当量のクロロフォルム・イソアミルアルコール (24:1) を加え 10分間以上混和した後、3,000rpm 5分間遠心分離した。水層を分取し、当量以上のジエチルエーテルを加え、白色になった水層が透明に成るまでやや強めに振とうした。3,000rpm 1分間遠心分離し、エーテル層を除いた。この操作をもう一度繰り返した後、エーテルを通風除去し、10分の1量の3M 酢酸ナトリウム溶液 (酢酸でpH 5.2に調整) を加え、冷却した2倍量の100% エタノールを混合し、DNAを沈殿させた。その沈殿を冷却した70% エタノールで洗浄した。通風によりエタノールを除去した後、2ml のTEに溶解し、4°Cで保存した。

## 2) - 2 精子からのDNAの精製

精液ストローから取り出した精液を生理食塩水 (0.16M NaCl in water) に良く懸濁した後、3,000rpm 10分間遠心分離し精子を沈殿させた。この操作を数回繰り返し、精子を洗浄した。精子のペレットを0.5mlの生理食塩水/EDTA (0.16M NaCl, 1mM EDTA) に良く懸濁した後、30mlのグアニジン溶液 (4M guanidine thiocyanate, 25mM sodium acetate, 0.84%  $\beta$ -mercaptoethanol) を加え、50°C で2時間インキュベートし、DNAを溶出させた。37°Cで1晩インキュベートした後、0.6倍量のイソプロパノールを加え、DNAを析出させた。70% エタノールで析出したDNAが半透明になるまで数回洗浄した。洗浄後、通風によりエタノールを除いて約20mlのTEに溶解させた。1/100量のProteinase K (10mg/ml)を加え、37°Cで一晩インキュベートした。以下の操作は、哺乳類における全血からのDNAの精製の場合と同様に行った。

## 2) - 3 リンパ節からのDNAの精製

リンパ節約0.5gをテフロン・ペッスルとステンレスメッシュを用いて、生理食塩水/EDTA中ですり潰し、ガーゼで濾過した後 3,000rpm 10分間遠心分離した。上清を除去し、20mlの生理食塩水/EDTAを加え良く混和し、再び3,000rpm 10分間遠心分離した。上清を除き、ペレットを約1mlの生理食塩水/EDTAに良く混和し、20mlのザルコシル溶液を加えて、DNAを溶出させた。以下の操作は、哺乳類における全血からのDNAの精製と同様に行った。

## 2) - 4 肝臓臓器からのDNAの精製

肝臓約0.5gを冷却したTNE溶液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 0.1M NaCl, 1mM EDTA) 中で、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ガーゼを用いて濾過した後、3,000rpm 10分間遠心分離し、上清を除いた。20mlのTNE溶液を加え、良く混和し、再び3,000rpm 10分間遠心分離し、上清を除いた。ペレットを約1mlの生理食塩水/EDTAに良く混和し、20mlのザルコシル溶液を加えて、DNAを溶出

させた。以下の操作は、哺乳類における全血からのDNAの精製と同様に行った。

## 2) - 5 鳥類における全血からのDNAの精製

1mg/ml EDTA存在下で1~3mlの血液を採取した。10倍量の生理食塩水/EDTAを加え混合した後、1,000rpm 10分間遠心分離し、上清を捨てた。この操作をもう一度繰り返し、沈殿した血球を1.5mlのエッペンドルフ型チューブに100 $\mu$ l取り、900 $\mu$ lの1% Triton X-100溶液 (0.32M sucrose, 10mM Tris-HCl pH8.0, 5mM MgCl<sub>2</sub>) を加え、良く混和した後、1,000rpm 10分間遠心分離し、上清を除いた。この白い沈殿を50mlのファルコンチューブに移し、20mlのザルコシル溶液を加えDNAを溶出した。以下の操作は、哺乳類における全血からのDNAの精製と同様に行った。

## 3) DNAの定量

DNAの定量は260nmの吸光度の測定で行った。OD<sub>260</sub> = 1.00は2本鎖のDNAが50 $\mu$ g/mlの濃度に相当する。同時に280nmの吸光度も測定しておき、OD<sub>260</sub>:OD<sub>280</sub>比が1.8 $\pm$ 0.1であれば、蛋白質、界面活性剤、フェノールなどの不純物が混入していない純粋なDNAが回収されたとみなした。

## 4) 制限酵素によるDNAの切断

精製してTEに溶解したDNA 50 $\mu$ g相当に1/10容の酢酸ナトリウムを加え、2倍量の100% エタノールを加えてDNAを析出させ、3,000rpm 1分間遠心分離した。この沈殿を70% エタノールで洗浄し、通風によりエタノールを除いた。440 $\mu$ lのH<sub>2</sub>O、50 $\mu$ lの10倍制限酵素バッファーを加えDNAを良く溶解した後、100単位の制限酵素を加え良く混和し制限酵素の至適温度で一晩インキュベートした。制限酵素は、*Eco*R I、*Bam*HI、*Hind*III、*Pst*I、*Hinf*I、*Hae*IIIおよび*Hsp*Iの内から、数種類を用いて検討した。反応終了後、当量のフェノール・クロロフォルム

を加えよく混合し、10,000rpm 5分間遠心分離した後、上層を分取し新しいチューブに移した。当量のジエチルエーテルを加えて良く混合し、10,000rpm 10分間遠心分離した。ジエチルエーテルを完全に除いた後、50  $\mu$ lの酢酸アンモニウム、2.5倍量の100% エタノールを加えた。-80°Cに15分以上放置して室温に戻した後、10,000rpm 10分間遠心分離してエタノールを除き、70% エタノールを用いてDNAを洗浄した。減圧乾燥下で水分を完全に除去した後、30  $\mu$ lのTE、10  $\mu$ lの試料重層用色素液 (0.25% bromophenol blue、0.25% xylene cyanol FF、30% glycerol) を加え、4°Cで保存した。

#### 5) アガロース・ゲル電気泳動

実験には、20×20cmおよび20×40cmの1.2% アガロース・ゲル (ゲル厚は4mm) を用いた。アガロース・ゲルはTakara L03 (Takara, Japan) を使い、TAEバッファ (40mM Tris-acetate pH7.7, 1mM EDTA) 中で、オートクレーブを用いて完全に溶解した。水平な面でアガロース・ゲルを完全に固めた後、10  $\mu$ gの制限酵素消化DNAを添加した。同時に $\lambda$ -phageのHind III消化DNAをサイズマーカーとして添加した。泳動中はバッファの緩衝能を保つために、ペリスタポンプでバッファを循環させた。電圧や泳動時間は検出したいバンドの範囲によって設定した。基準としては、2V/cmの電圧で泳動し、0.5~20kbの範囲のDNAが検出できるようにした。泳動終了後、ゲルを0.5  $\mu$ g/mlのethidium bromide溶液中に浸し、約20分間染色した。UVトランスイルミネーター上でゲルを観察し、泳動状態がよければポラロイド写真を取り、後のDNA断片の大きさの決定のために用いた。

#### 6) サザン・トランスファー

ゲルを十分な量のアルカリ変性液 (0.5M NaOH、1.5M NaCl) に浸し、室温で1時間ゆっくりと浸透した。この操作により2本鎖DNAは1本鎖になる。蒸留水でゲルを軽くすすいだ後、トランスファー溶液 (1M ammonium acetate、0.03M NaOH) 中で1時間、室温で振とうしゲルを中和した。強化ニトロセルロース膜

(BA-85、Schleicher & Schull) をゲルと同じ大きさに切り蒸留水に浸した後、トランスファー溶液に30分間以上浸した。キャピラリー法により (Southern, 1975)、DNAをニトロセルロース膜に1晩かけて移行させ、トランスファーが終了した膜は新しいトランスファー溶液に浸し付着したゲルを落とした。次いで、ペーパータオルの上で10分間以上風乾した後、ペーパータオルにはさんでベイクング装置(Bacubaker AB-1890, ATTO)を用いて80°C、2時間ベイクングを行い、DNAを完全にニトロセルロース膜に固定した。

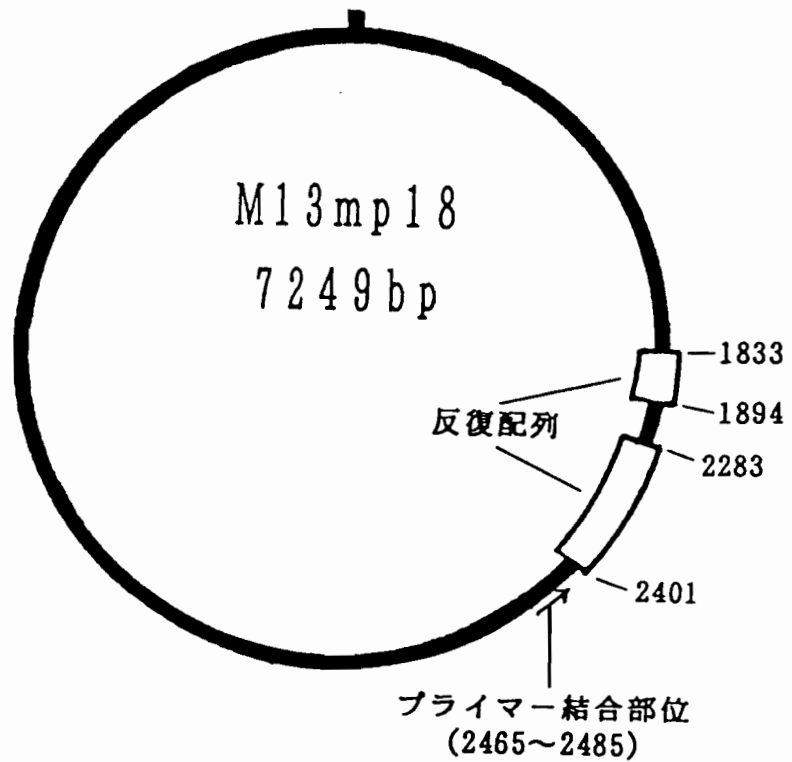
#### 7) プロブの作成

プロブにはM13ファージDNAの繰り返し配列 (Vassartら, 1987)、M13ファージの基本単位反復配列、YNZ22 (Nakamuraら, 1987)、33.15 (Jeffreysら, 1985)、 $\alpha$ -globin (Higgsら, 1986)、mo-1 (Mitaniら, 1990)、および(GT) $n$  (Schaferら, 1988) の7種類のプロブを用いた。

#### 7) - 1 M13ファージDNAプロブの作成

M13mp18ファージの反復配列は、図1-1に示すように15塩基を単位とする繰り返し配列が1833bpから1894bp領域で4回繰り返し、2283bpから2401bp領域で9回繰り返している。この領域はM13ファージのprotein III遺伝子に相当する。この領域をプロブとするために、M13ファージDNAの2465bpから2482bp領域の相補鎖に相当する19塩基のオリゴプライマーを化学合成した。その塩基配列は、5'CGTCAGACTGTAGCGCGTT3'である。標識方法は、プライマー伸長法を用いた。すなわち、5 $\mu$ gのM13mp18ファージ一本鎖DNA (200ng/ $\mu$ l) を1.5mlのエッペンドルフ・チューブに取り、100°C、3分間熱処理した後、氷水中で急冷した。0.25pmol/ $\mu$ lのオリゴプライマー溶液を10 $\mu$ l、Klenow buffer (0.5M Tris-HCl pH7.5、0.1M MgCl<sub>2</sub>) を5 $\mu$ l、H<sub>2</sub>Oを40 $\mu$ l加えた。60°C、1時間インキュベートした後、ゆっくりと室温になるまで温度を下げ、M13ファージDNAとオリゴプライマー間のア





1833	2283
1 GAGGGTGGTGGCTCT	1 GGCGGCGGCTCT
2 GAGGGTGGCGGTTCT	2 GGTGGTGGTTCT
3 GAGGGTGGCGGTTCT	3 GGTGGCGGCTCT
4 GAGGGTGGCGGTACT	4 GAGGGTGGTGGCTCT
1894	5 GAGGGTGGCGGTTCT
	6 GAGGGTGGCGGCTCT
	7 GAGGGAGGCGGTTCC
	8 GGTGGTGGCTCT
	9 GGTCCGGT
	2401

基本配列  
5'- GAGGGTGGXGGXTCT -3'

図 1-1 M13mp18ファージの反復配列部位とプライマー結合部位

プライマーの配列は 5'-CGTCAGACTGTAGCGGTT-3' である。

ニーリングを行った。さらに、Klenow bufferを5  $\mu$ l、3dNTP溶液 (dATP、dGTP、dTTPがそれぞれ500pmol/ $\mu$ lの濃度で含まれる)を5  $\mu$ l、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTPを5  $\mu$ l (1.85MBq)、Klenow fragmentを5単位加え、42°C、30分間インキュベートした。100°C、10分間加熱した後、氷水中で冷却した。この操作でプローブは一本鎖になる。この溶液をスパンカラムを用いて、取り込まれなかった $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPを除去した。スパンカラムのゲルはTEで膨張させたBio Gel P-60を用いた。0.5mlのエッペンドルフ・チューブの底に23Gの注射針を用いて穴をあけて1.5mlのエッペンドルフ・チューブに差し込み、Bio Gel P-60を300  $\mu$ l入れて1,000rpm 1分間遠心し、ゲルを詰めた。新しい1.5mlのエッペンドルフ・チューブに代え、標識した溶液を添加した。850rpm 1分間遠心分離し、1.5mlのエッペンドルフ・チューブの液体をプローブとして用いた。実験にはプローブの比活性が、 $1 \times 10^9$ cpm/ $\mu$ g DNA以上のものを用いた。プローブは使用直前まで-20°Cで保存した。

#### 7) - 2 合成オリゴヌクレオチドを用いた反復配列プローブの作成

M13ファージの基本単位反復配列、YNZ22、33.15、mo-1、および $\alpha$ -globinプローブは合成オリゴヌクレオチドを用いて作成した。その作成法は基本的に Collick and Jeffreys (1990)に従った。これらのプローブの基本配列とその相補配列を表1-1に示した。これらオリゴヌクレオチドはDNA合成装置で合成した。TEに溶解したこれら1組の合成オリゴヌクレオチド各2  $\mu$ g (18  $\mu$ l)、2  $\mu$ lの10 $\times$ T4 polynucleotide kinase buffer、および10単位のT4 polynucleotide kinaseを加えて、37°C 2時間反応させて5'末端をリン酸化した。次いで、90°C 2分間、65°C 10分間、37°C 10分間の順にインキュベートしてアニーリングを行った。この溶液をTakara ligation kit (Takara, Japan)を用い、その使用説明書に従い16°C 45分間反応させ、各オリゴマー間のライゲーションを行った。この産物をPolymerase Chain Reaction (PCR) (Saikiら, 1985)の鋳型とした。PCR反応は、10ngの鋳型DNA、各50pmolの反復単位の2種のオリゴヌクレオチド、50mM KCl、10mM Tris-HCl pH8.8、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% Triton X-100、各200  $\mu$ Mの4dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、4.5単位のTaq polymeraseを含む100  $\mu$ lの

表 1-1 実験に用いたミニサテライトおよびマイクロサテライトプローブの塩基配列とその相補鎖

プローブ	反復単位	相補鎖
M13反復配列	5'GAGGGTGGXGGXTCT3' <sup>1)</sup>	
YNZ22	CTCTGGGTGTCGTGC	5'CCCAGAGGCACGACA3'
$\alpha$ -globin	GAGCGACACGGGGG	GTCGCTCCCCC
mo-1	TGCCCAGTCCTCCC	CCACCTCTCCACCTG
33.15	AGAGGTGGGCAGTGG	TGCCCAGTCCTCCC
(GT) <sub>n</sub>	(GT) <sub>n</sub>	(CA) <sub>n</sub>

1) Xは、CもしくはT

溶液中で行った。94°C 2分間、55°C 2分間、72°C 4分間を30サイクル行い、最終ステップに72°C 10分間反応を行った。反応終了後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ってTEに溶解する。この産物50ngをBca BEST ligation kit (Takara, Japan) を用い、使用説明書に従い $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 存在下で標識した。標識したプローブはM13ファージDNAの場合と同様に、スパンカラムを用いて精製した。

(GT)<sub>n</sub>マイクロサテライトDNAは市販のものを用い (Pharmacia Fine Chem., Sweden)、上述の方法に従い Bca BEST ligation kit を用いて標識した。

#### 8) ハイブリダイゼーション

十分量のハイブリダイゼーション溶液 (40% formamide、6×SSC (1×SSC: 0.15M NaCl, 15mM sodium citrate)、15mM EDTA、0.25% skim milk) をタッパーウェアに注ぎ、DNA固定済のニトロセルロース膜をその中に37°C 2時間浸した。再び新しいハイブリダイゼーション溶液でニトロセルロース膜を軽く洗浄した後、シールバックにニトロセルロース膜と約15mlのハイブリダイゼーション溶液を入れてシールした。このバックのなかに標識したプローブを $3\sim 6 \times 10^6$ cpm/mlになるように注射器を用いて注入した。プローブが均一になるようにハイブリダイゼーション溶液を良く混合し、37°C 一晩、シーソーシェーカーでゆっくりと振とうしつつハイブリダイゼーションを行った。ニトロセルロース膜をシールバックから取り出し、4×SSC、0.1% SDS溶液中で、55°C 30分間を2回洗浄し、さらに2×SSC、0.1% SDS溶液中で、55°C 30分間を1回洗浄した。この時のSSC濃度、洗浄温度、洗浄回数は動物種やプローブの種類により変化させた。このニトロセルロース膜を、水分を軽く除いた後、両面をサランラップで覆い、X線感光用のカセットと増感紙 (Grenex HR-12, Fuji, Japan) を用いて X線フィルム (Super HR-X, Fuji, Japan) に-80°C 数日間感光させ、その後現像を行った。

#### 9) リハイブリダイゼーション

DNAを固定したニトロセルロース膜は必要があれば数回使用した。X線フィ

ルムに感光させた後のニトロセルロース膜は、90°Cに加熱した0.1×SSC、0.1% SDS溶液中で振とうした。その後、サーベイメーターを用いて、プローブが完全に除去されたかどうか確認した。サーベイメーターのカウントが100cpm/min以下のメンブランは2週間以上X線フィルムに感光させても像が認められず、完全にプローブが除去できたと見なした。除去した後は風乾し、常温で保存した。再度ハイブリダイゼーションを行う場合は、プレハイブリダイゼーションから行った。

#### 10) 統計分析

個体間の遺伝的類似性の指標には、バンドシェアリング (BS) を用いた。BSは2個体間の共通のバンドの割合であり、次の式で示される。

$$BS = 2 N_{ab} / (N_a + N_b)$$

ここで  $N_{ab}$  は個体 a と個体 b に共通なバンド数、 $N_a$  と  $N_b$  は個体 a と b のそれぞれのバンド数である。

### 第3節 結果および考察

#### 1) M13ファージDNA反復配列をプローブとして用いたDNAフィンガープリントの条件

まずウシ（ホルスタイン種、黒毛和種）、ブタ（金華豚、梅山豚）、ウサギ（日本白色種）、ラット（Wister rat）、マウス（DDD/Jah）、ニワトリ（横班プリマスロック、白色レグホーン種）、ホロホロ鳥のゲノムDNAを *Hae* III で切断して電気泳動して得た1枚のメンブランを用い、そのメンブランの洗浄条件を変えてDFPを検出した。プローブにはM13ファージの反復配列を用いた。図1-2がその結果である。ハイブリダイゼーションの温度は37°Cとし、最終洗浄条件は55°C、2×SSC、0.1% SDS溶液中（図1-2a）と60°C、1×SSC、0.1% SDS溶液中（図1-2b）で試した。家畜、家禽種によって異なったバンドのパターンが観察された。55°Cの洗浄条件では（図1-2a）、哺乳類のウシ、ブタ、ウサギ、ラット、マウスでは鮮明なDFPパターンが観察されるが、鳥類のニワトリとホロホロ鳥ではプローブと強く反応しており、バンドの識別は困難であった。同じメンブランを60°Cで洗浄した場合（図1-2b）では、鳥類では鮮明なDFPパターンが得られたが、哺乳類では検出できるバンドの本数が減少した。これらのことは検出されるミニサテライト領域とプローブ配列の間における相同性が哺乳類より鳥類の方が高いためと考えられる。また、プローブに対する相同性が哺乳類間や鳥類間では良く似ていることを示している。これらの結果から、メンブランの洗浄条件は、哺乳類では55°C、2×SSC、0.1% SDS、鳥類では60°C、1×SSC、0.1% SDSとした。

さらにウシでは、*Eco* RI、*Hae* III、*Hinf* I、*Pst* I の4種類の制限酵素を用いて、DFPの比較を行った。図1-3は、そのDFP像である。レーン1、2は *Hae* III、レーン3、4は *Hinf* I、レーン5、6は *Eco* RI、レーン7、8は *Pst* I を用いたDFPである。図1-3に示されるように、DFP像は用いる制限酵素によってそれぞれ特徴的であった。そのバンドのパターンは、高分子領域にバンドが多く観察されるもの（*Eco* RI）、全体的にバンドが散在しているもの（*Hae* III、*Pst*

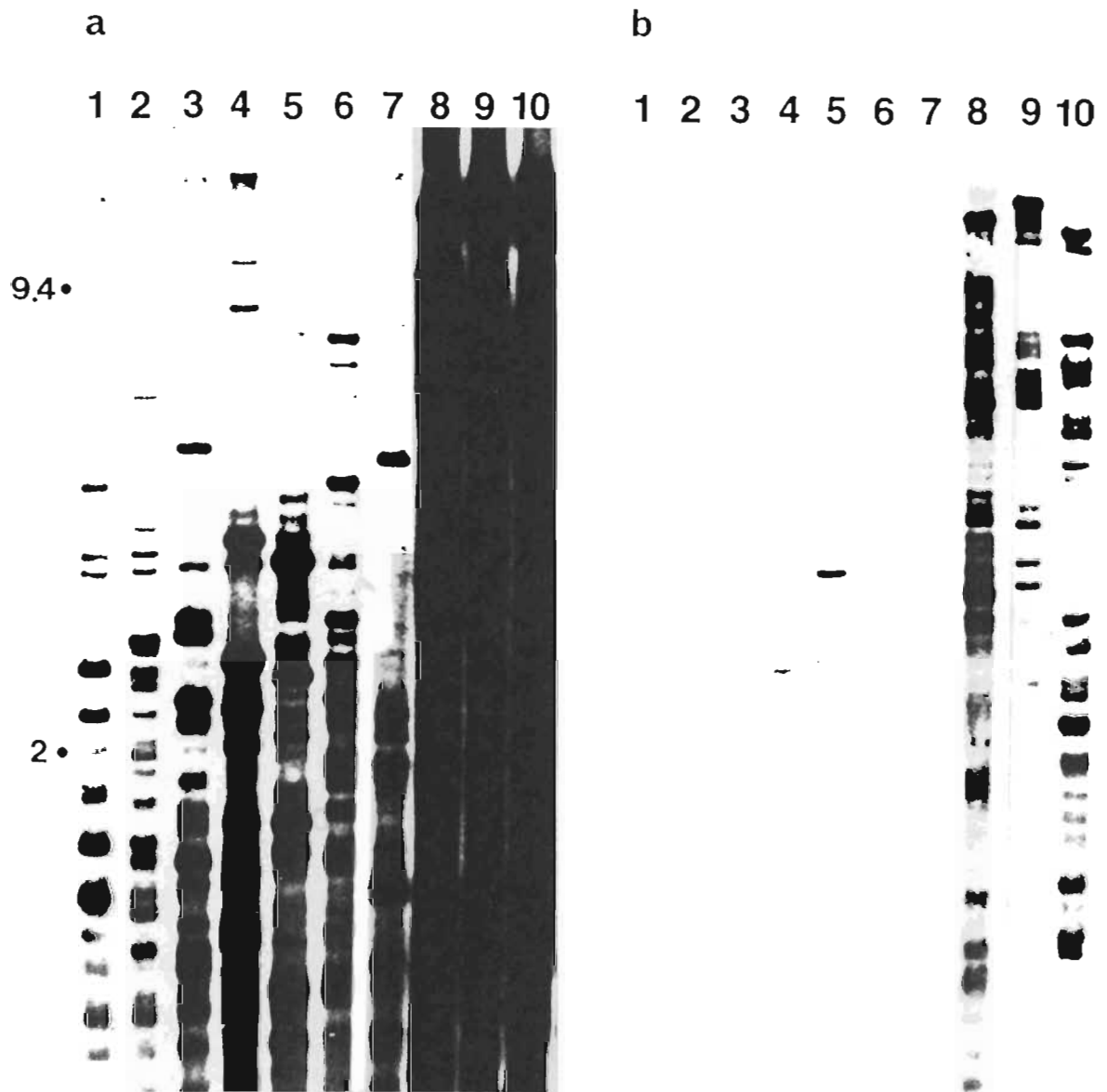


図1-2 M13ファージ反復配列プローブを用いた、家畜家禽のDFP

a: 最終洗浄条件は2×SSC, 0.1% SDS、55℃ b: 最終洗浄条件は1×SSC, 0.1%SDS、60℃。 1: ウシ(ホルスタイン種) 2: ウシ(黒毛和種) 3: ブタ(金華豚) 4: ブタ(梅山豚) 5: ウサギ(日本白色種) 6: ラット(Wisterrat) 7: マウス(DDD/Jah) 8: ニワトリ(横斑プリマスロック種) 9: ニワトリ(白色レグホーン種) 10: ホロホロ鳥

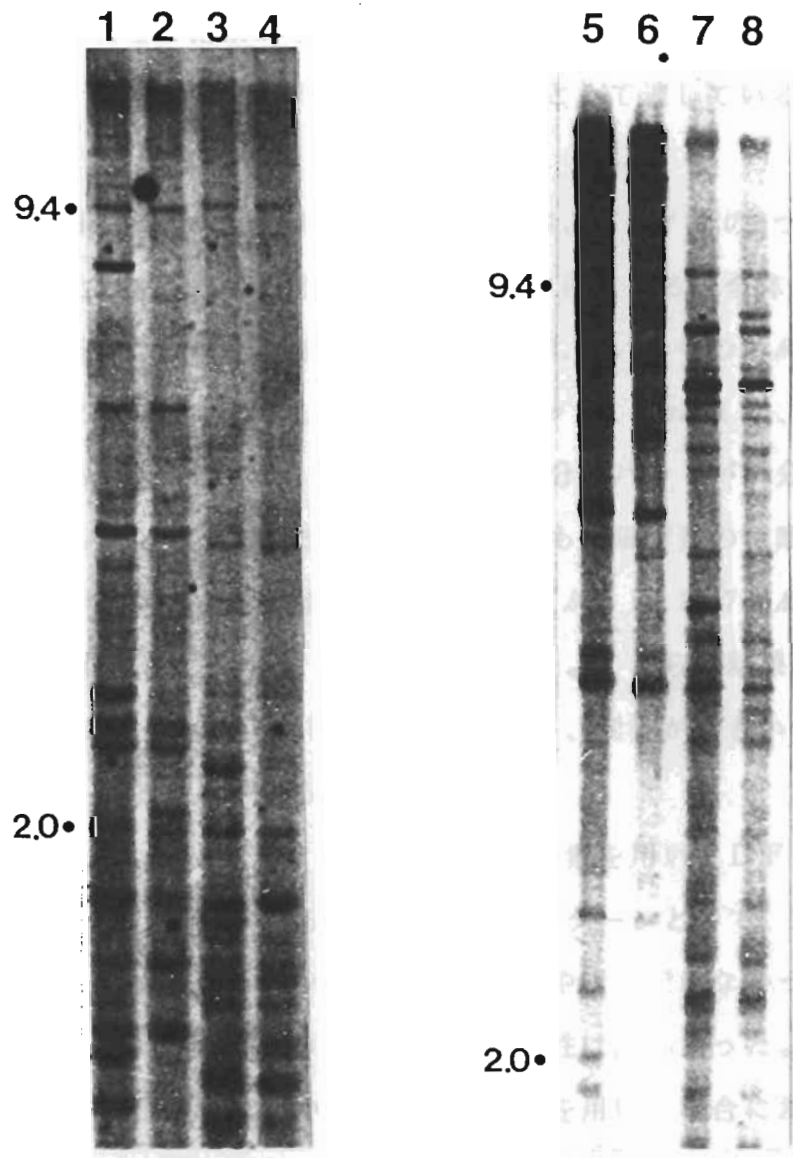


図 1-3 各種制限酵素を用いたウシのDFP

1,2: *Hae*III、3,4: *Hinf* I、5,6: *Eco*RI、7,8: *Pst* I  
 DNA材料は、1,3,5,7と2,4,6,8は別個の黒毛和種の  
 個体由来のものである。



I)、低分子領域に大部分のバンドが観察されるもの (*Hinf* I) に大別された。*Eco* RI、*Pst* I の2つの制限酵素については、共にバンドの数が20数本観察されるものの全体的に多型性に乏しかった。一方、*Hae* III、*Hinf* I の2つの制限酵素については、前2者と同様に20数本のバンドが観察され、しかもその変異は大きく多型性を示した。これらの結果から、M13プローブを用いたDFPでは、全体的にバンドが散在し、変異が大きい*Hae* IIIが制限酵素として適していることが明らかとなった。

ブタでは*Eco* RI、*Hae* III、*Msp* I、*Bam*HI、*Hind* III、および*Pst* I の6つの制限酵素を用いてDFPの比較を行った。図1-4はそのDFP像である。全体像のパターンは、大別して、極端に高分子領域にバンドが集中しているもの (*Hind* III)、比較的高分子領域にバンドが集中しているもの (*Eco* RI、*Bam*HI)、全体的にバンドが散在しているもの (*Pst* I、*Msp* I)、大部分のバンドが低分子量域に存在しているもの (*Hae* III)であった。バンドの本数も制限酵素の種類によって異なり、一個体当たりの平均の本数では、*Eco* RI:24.7、*Hae* III:13.7、*Msp* I:21.7、*Bam*HI:18.3、*Hind* III:19.7、*Pst* I:15.7であった。これらの結果から、M13プローブを用いたDFPでは、全体的にバンドが散在し、変異が大きい*Msp* Iが制限酵素として適していることが明らかとなった。

ウマでは、*Hae* III、*Msp* I、および*Pst* I の3つの制限酵素を用いてDFPの比較を行った。図1-5はそのDFP像である。全体像のパターンとして、*Hae* IIIでは数多くのバンドが観察されたがバンド間の分離がやや明確ではなかった。*Msp* Iでは分離したバンドが数本観察できるが、その多型性は乏しかった。*Pst* Iでは明確なバンドはほとんど得られなかった。どの酵素を用いた場合においても、サラブレッド種とペルシュロン種との差異は認められなかった。この3種類の制限酵素を用いた場合では、*Hae* IIIがまだ分析に耐える酵素と思われたが、ウマでは本実験に用いたM13プローブは余り適しておらず、他のプローブを開発する必要があると思われる。

マウスでは、*Msp* I、*Hinf* I、および*Pst* I の3種類の制限酵素を用いてDFPの比較を行った。図1-6はそのDFP像である。その全体のパターンとしては、3種類のどの酵素を用いても、数多くの多型性のあるバンドが観察された。た

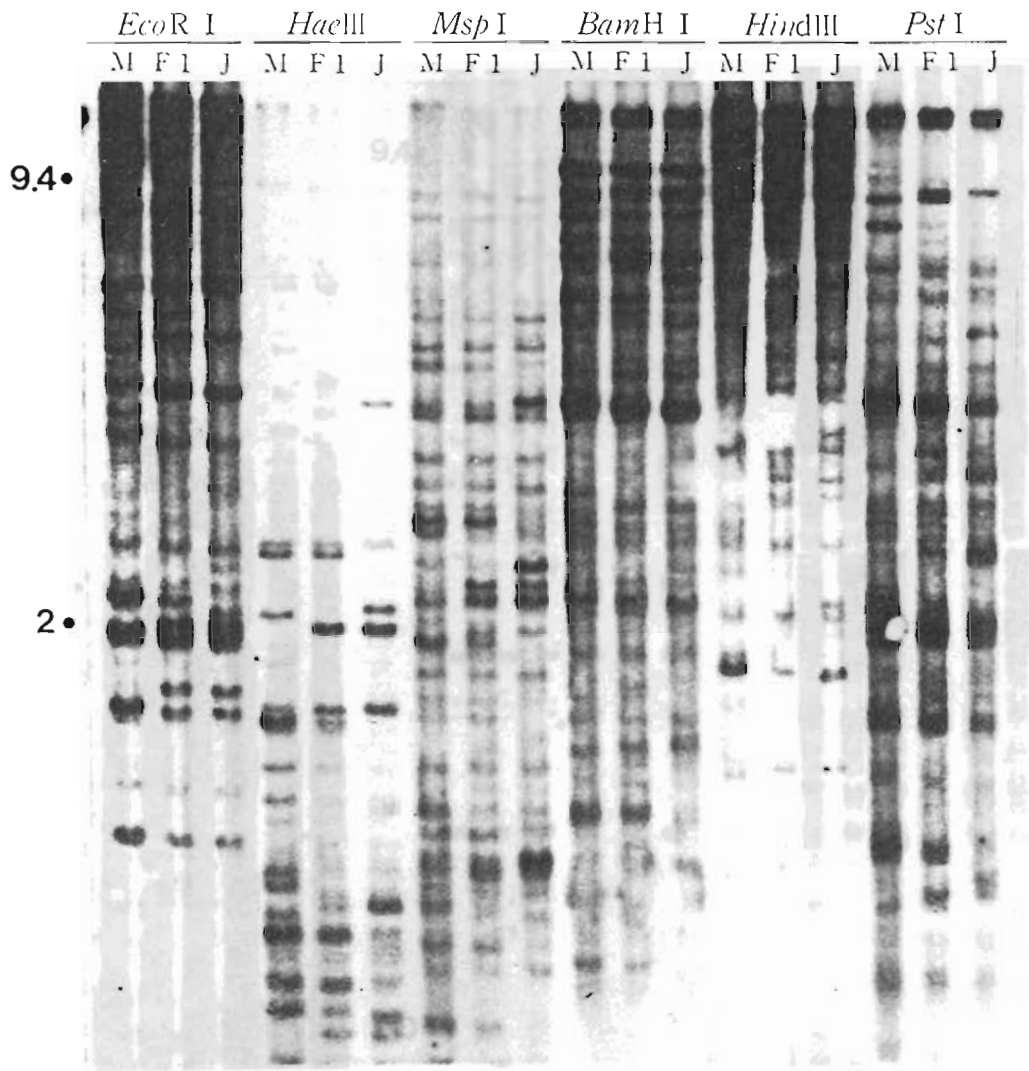


図 1-4 各種制限酵素を用いたブタの D F P

M: 梅山豚、J: 金華豚、F1: 梅山豚と金華豚の子

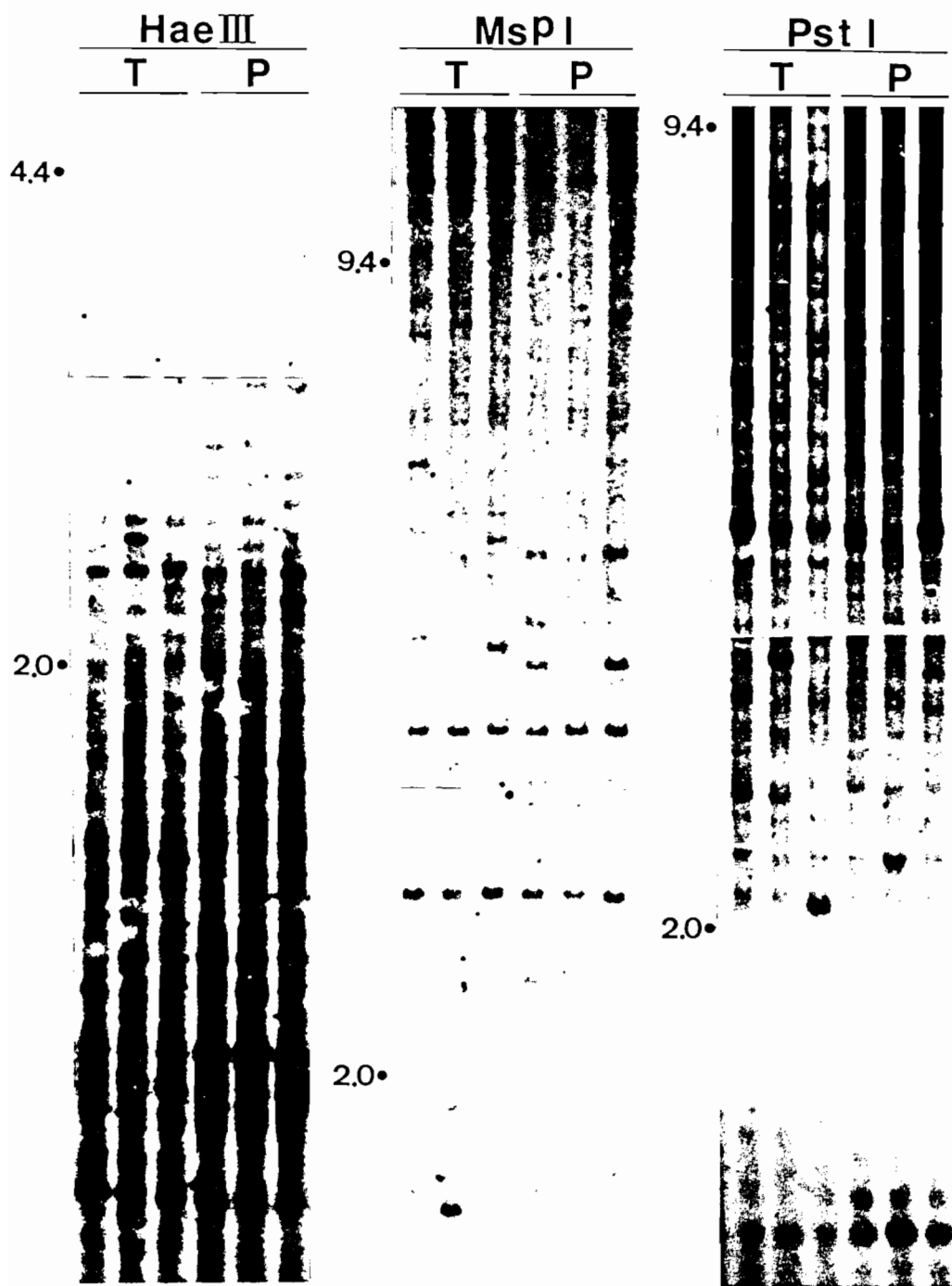


図 1-5 各種制限酵素を用いたウマの D F P

T:、サラブレッド種、P:ペルシュロン種、  
各3頭よりのDNAを分析材料とした。

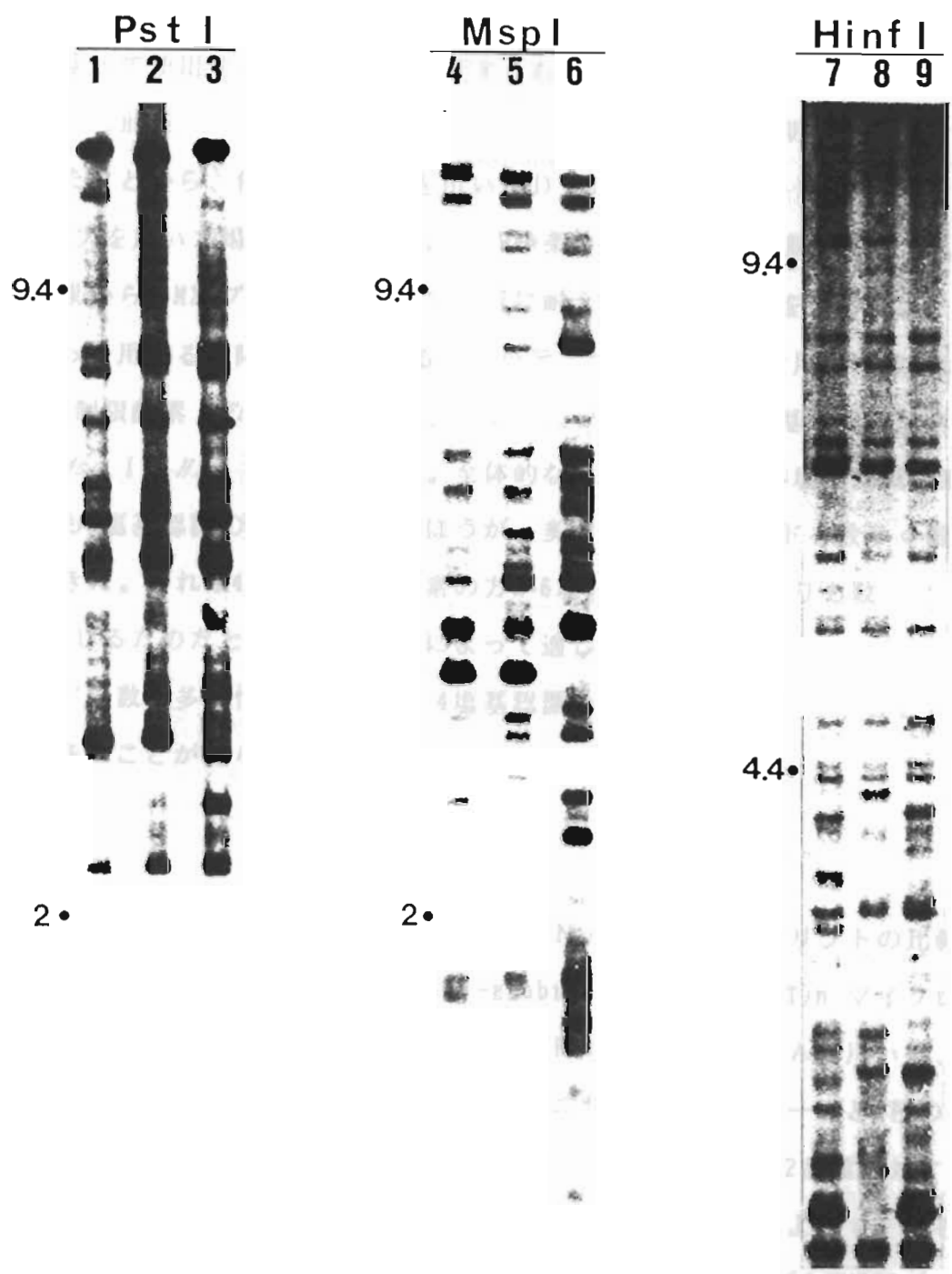


図 1-6 各種制限酵素を用いたマウスの D F P

1:RR/Jah、2:SS/Jah、3:C3H/HeJah、4:CFW/Jah、5:CF#1/Jah、  
6:C3H/HeJah、7:SMXA-5、8:SMXA-6、9:SMXA-7

だし、*Hinf* Iでは数多くのバンドが観察されるものの、全体的に弱いシグナルのバンドが多かった。いずれにせよ、マウスでは*Msp* I、*Hinf* I、*Pst* Iの3種類の酵素はすべて使用することが可能と考えられる。

鳥類では前述の図1-2に示されるように、*Hae* IIIが数多くの明確なバンドが観察できたことから、他の制限酵素を用いたDFPは行わなかった。

M13プローブを用いた場合のDFPの最適洗浄条件と制限酵素を表1-2に示す。これらの結果から、M13プローブを用いて分析に耐えうるDFP像を得るためには、種によって用いる制限酵素が異なることが示された。本実験で用いた酵素は6塩基認識の制限酵素(*Eco* RI、*Bam*HI、*Hind* III、*Pst* I)と4塩基認識の酵素(*Hae* III、*Msp* I、*Hinf* I)に分れる。全体的な傾向としては、6塩基認識の制限酵素よりも4塩基認識の酵素を用いたほうが、多型性の高いバンドを数多く得ることができた。これは4塩基認識の酵素の方が6塩基認識の酵素よりも数多くのDNA断片を生じるためだと思われる。種によって適している酵素の違いはあるものの、バンドの数や多型性から考えて、4塩基認識の酵素を用いるほうがDFPには有効であることが明らかとなった。

2) 異なった6種類のプローブによるウシのDNAフィンガープリントの比較  
ウシではM13反復配列、YNZ22、33.15、 $\alpha$ -globin、mo-1および(GT)<sub>n</sub> マイクロサテライト反復配列の6種類をプローブとし、*Hae* IIIで切断したDNAを用いて、DFPの比較を行った。図1-7~1-12は5種類のミニサテライトプローブと1種のマイクロサテライトプローブを用いた黒毛和種とホルスタイン種の2品種に対するDFPである。ここで示されているように、用いるプローブによってそれぞれのDFP像は特徴的であった。図1-7、1-8に示されるM13プローブとYNZ22プローブでは、多型性を示す明瞭なバンドが数多く検出できた。1kbから9.4kbの範囲で多型性を示す明瞭なバンドは、M13プローブでは27本、YNZ22プローブでは29本であった。図1-9に示されるように $\alpha$ -globinプローブでは多型性を示す明瞭なバンドを検出できたが、その本数は少なく16本であった。また、1個体当りのバンド数はM13プローブが5.7本、YNZ22プローブが6.7本に対し、 $\alpha$ -globinプローブ

表1-2 M13ファージDNA反復配列をプローブとした  
場合の各家畜、家禽種に対する最適条件

生物種	制限酵素	最終洗浄条件
ウシ	<i>Hae</i> III	55°C、2×SSC、0.1% SDS
ウマ	<i>Hae</i> III	55°C、2×SSC、0.1% SDS
ブタ	<i>Msp</i> I	55°C、2×SSC、0.1% SDS
ウサギ	<i>Pst</i> I	55°C、2×SSC、0.1% SDS
マウス	<i>Pst</i> I	55°C、2×SSC、0.1% SDS
	<i>Msp</i> I	55°C、2×SSC、0.1% SDS
	<i>Hinf</i> I	55°C、2×SSC、0.1% SDS
ニワトリ	<i>Hae</i> III	60°C、1×SSC、0.1% SDS

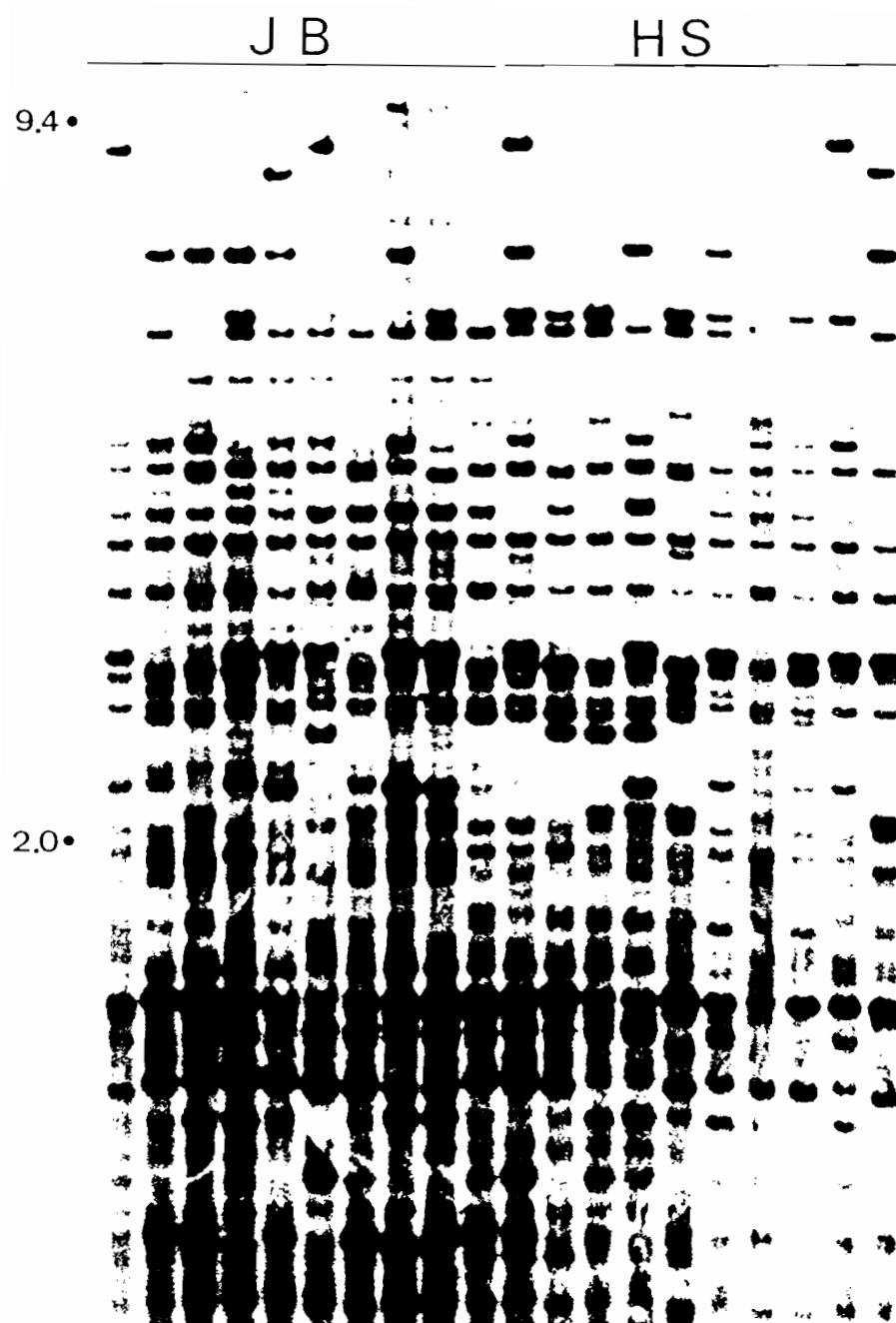


図 1-7 M13ファージプローブを用いたウシのDFP

JB: 黒毛和種、HS: ホルスタイン種

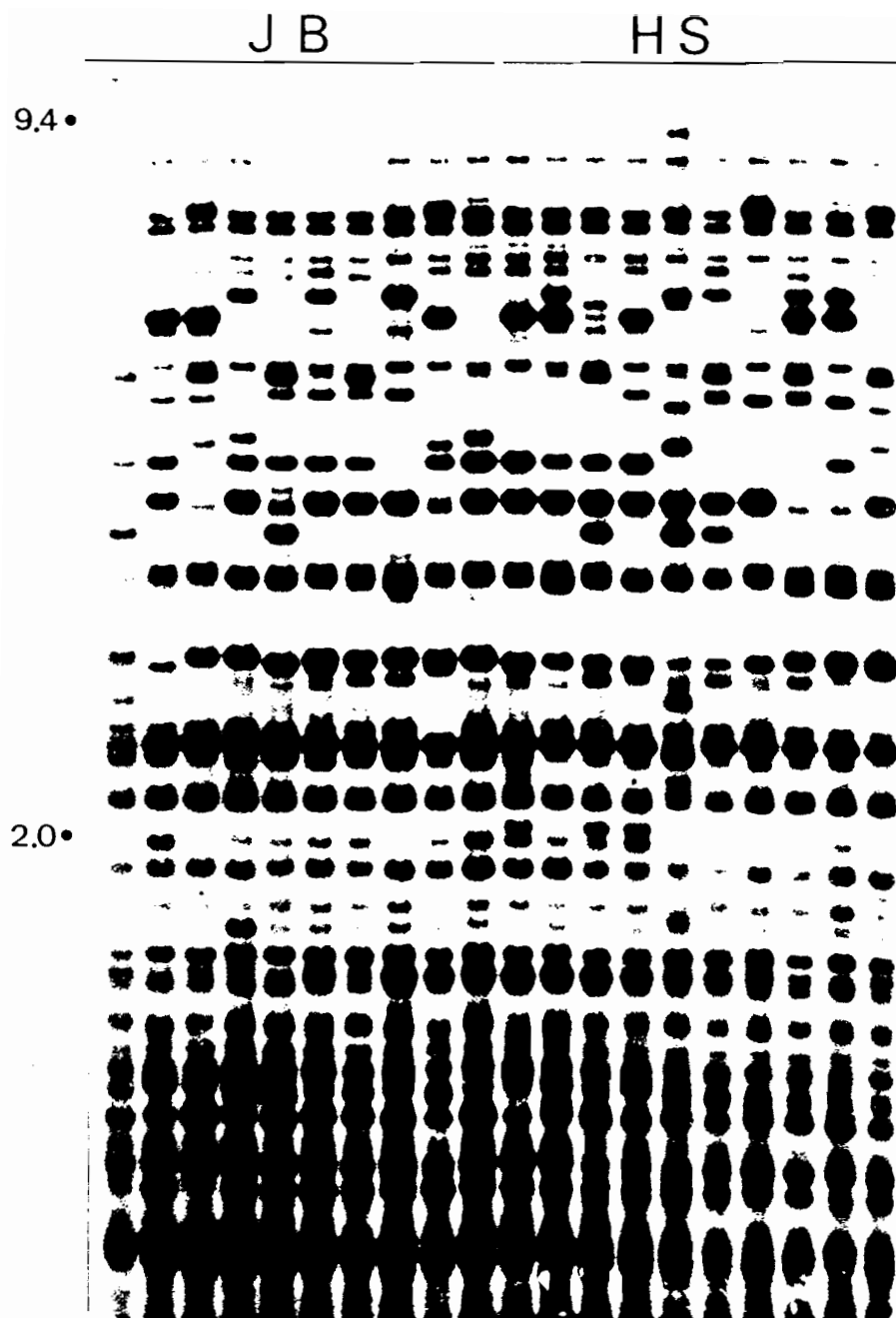


図 1-8 YNZ22プローブを用いたウシのDFP

JB: 黒毛和種、HS: ホルスタイン種



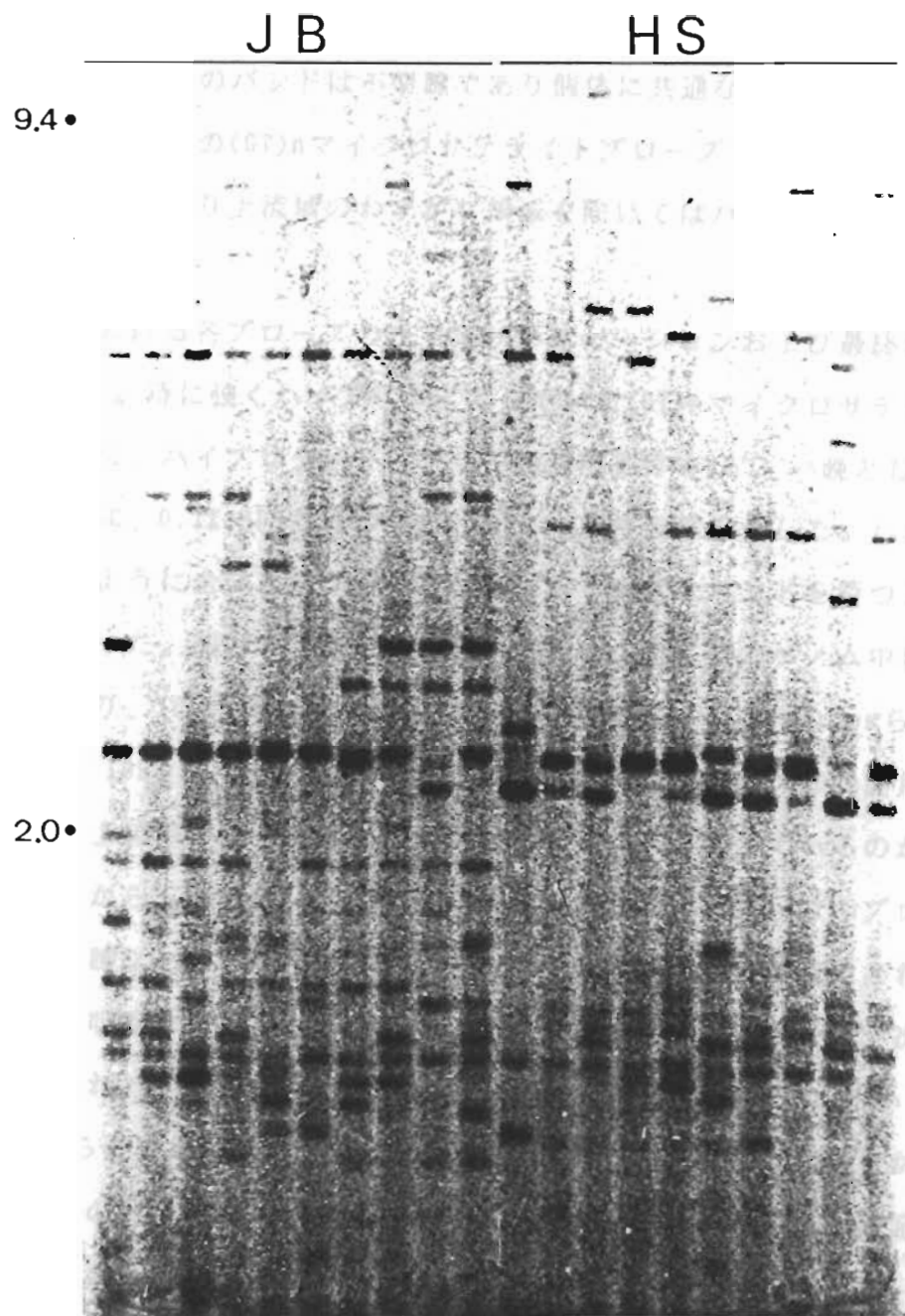


図 1-9  $\alpha$ -globinプローブを用いたウシのDFP

JB: 黒毛和種、HS: ホルスタイン種

ブは3.5本と少なかった。図1-10のmo-1プローブでは、9.4kb付近に黒毛和種に類度の高いバンドと約4kbまでの範囲で数本バンドが観察されたが、それよりも下流域では明確なバンドは存在しない。図1-11の33.15プローブでは全体的にバンドが検出できたが、そのバンドは不明瞭であり個体に共通なバンドが多く、多型性は低かった。図1-12の(GT)nマイクロサテライトプローブでは、レーン全体にプローブが反応しており上流域のわずかな領域を除いてはバンドはほとんど観察できなかった。

上記の実験における各プローブのハイブリダイゼーションおよび最終洗浄条件は表1-3に示した。特に強くハイブリダイズしていた(GT)nマイクロサテライトプローブに関しては、ハイブリダイゼーションの温度条件を42℃ 一晚とし、最終洗浄条件を1×SSC、0.1% SDS溶液中で、65℃まで条件を厳しくした。しかしながら図1-12に示すように全体に像が薄くなるだけで、明確なバンドを持つDFP像は検出できなかった。(GT)n マイクロサテライトは、哺乳類のゲノム中に非常に多く含まれており、10,000コピー以上存在すると云われている(Friesら, 1990; Lagercrantzら, 1993)。そのため今回の実験では非常に数多くのDNA断片と反応しており、上流域から下流域まで全体にハイブリダイズしているのかも知れない。しかしながら、Haberfeldら (1993)は33.15プローブと(GT)nプローブを用いて多くの明瞭なバンドを持つDFP像を得ている。今回の実験でこれらのプローブを用いて明瞭なバンドを持つDFP像が得られなかったのには、次の2つの理由が考えられる。1) 今回の実験では*Hae* III 以外の制限酵素を用いておらず、Haberfeldらの用いた制限酵素(*Hinf* I)を含む他の酵素との比較ができなかった。2) この実験では、厳密なハイブリダイゼーション等の条件設定を行っておらず、最適条件からかなりずれが生じた可能性がある

表1-4に、比較的良好なDFP像が得られた3種類(M13、YNZ22、 $\alpha$ -globin)のプローブを用いた黒毛和種とホルスタイン種の品種内、品種間のバンドシェアリング(BS)の値を示した。この値は2個体間の共通のバンドの割合を示すもので、低い値ほど多型性が高いDFP像と言える。この結果、どのプローブを用いた場合も品種内の値は品種間の値よりも高く、品種の分岐が起こっていることを示している。また品種間の比較では、黒毛和種とホルスタイン種の違いは認め

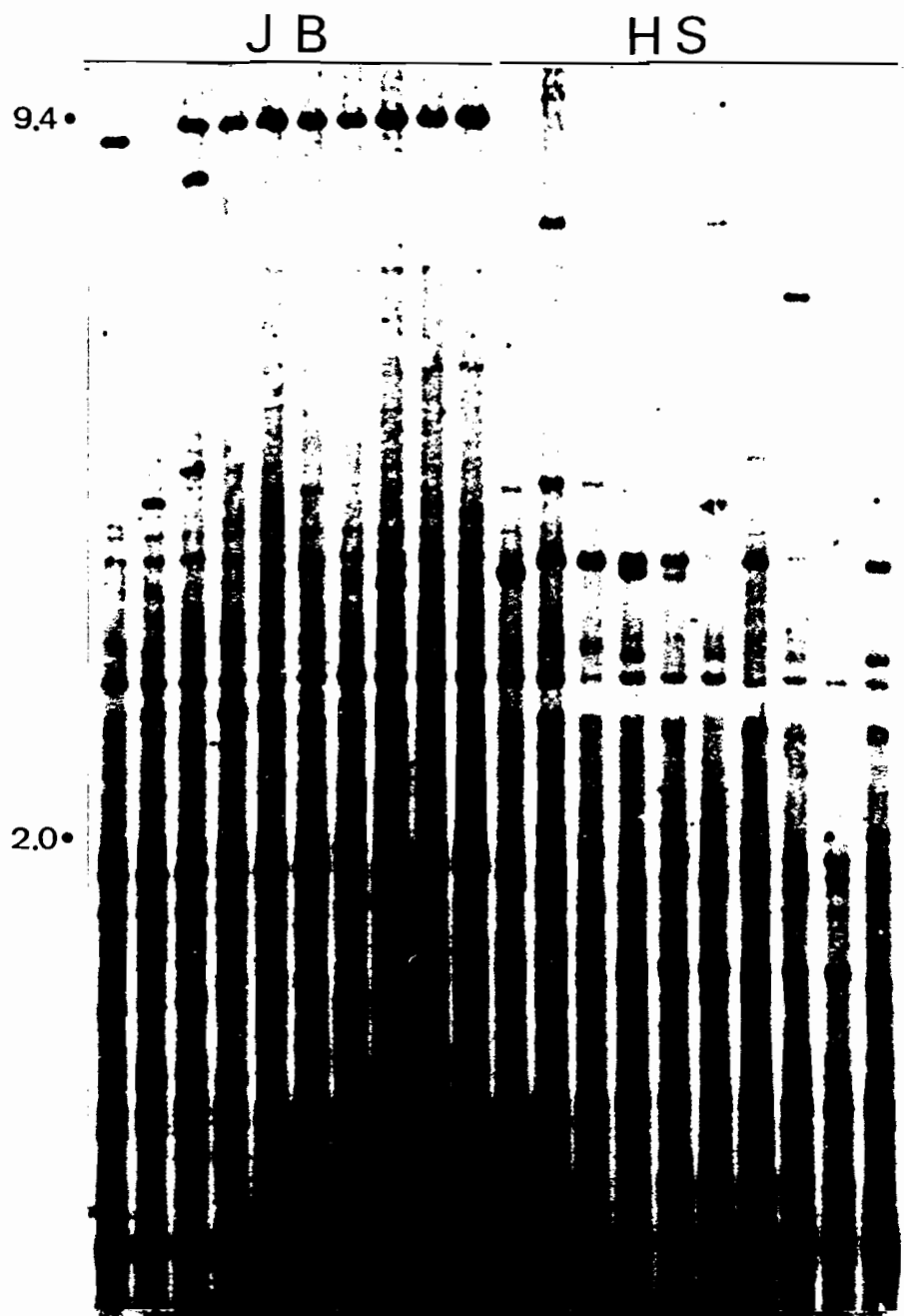


図 1-10 mo-1プローブを用いたウシのDFP

JB: 黒毛和種、HS: ホルスタイン種

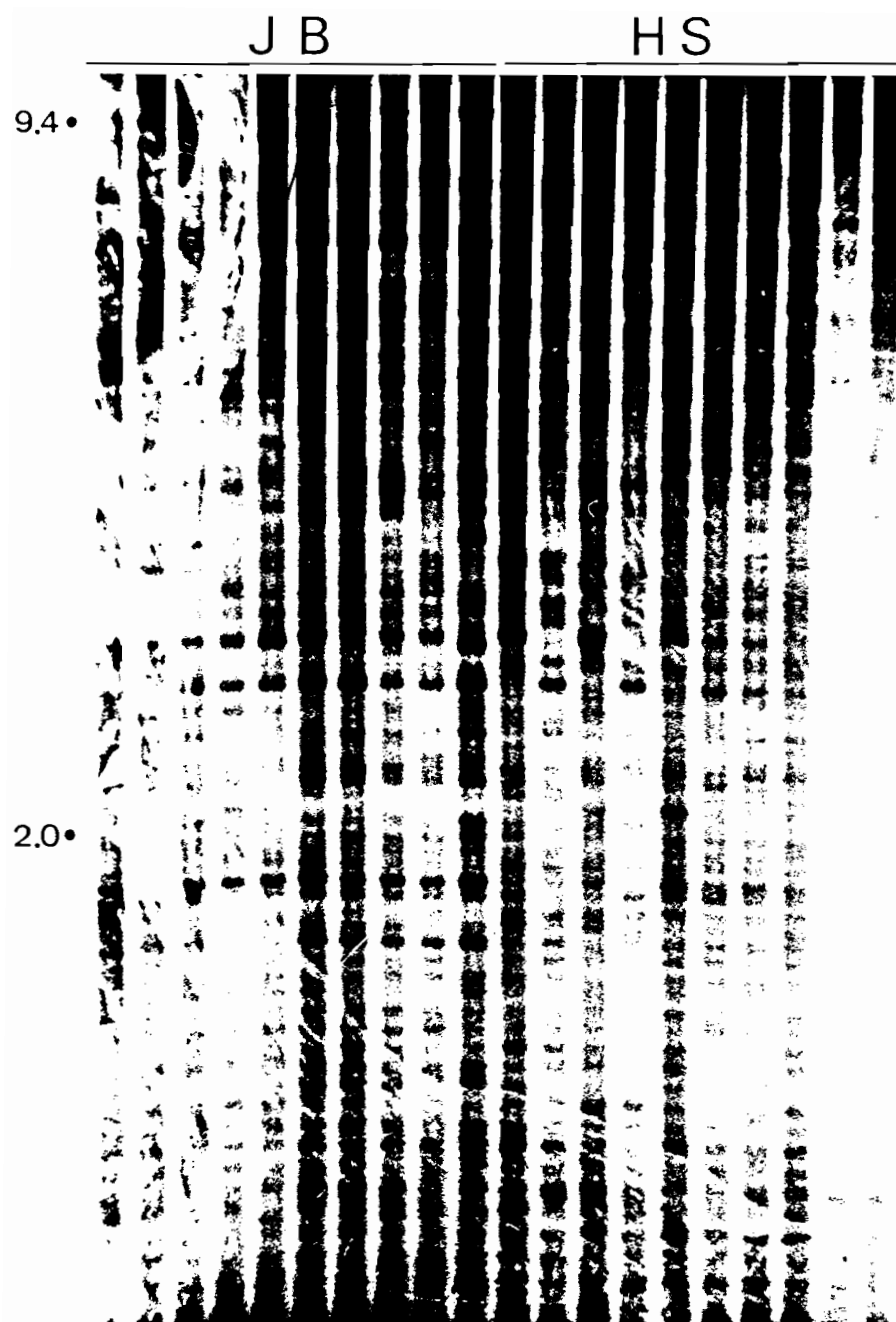


図 1-1 1 33.15プローブを用いたウシの D F P

JB: 黒毛和種、HS: ホルスタイン種

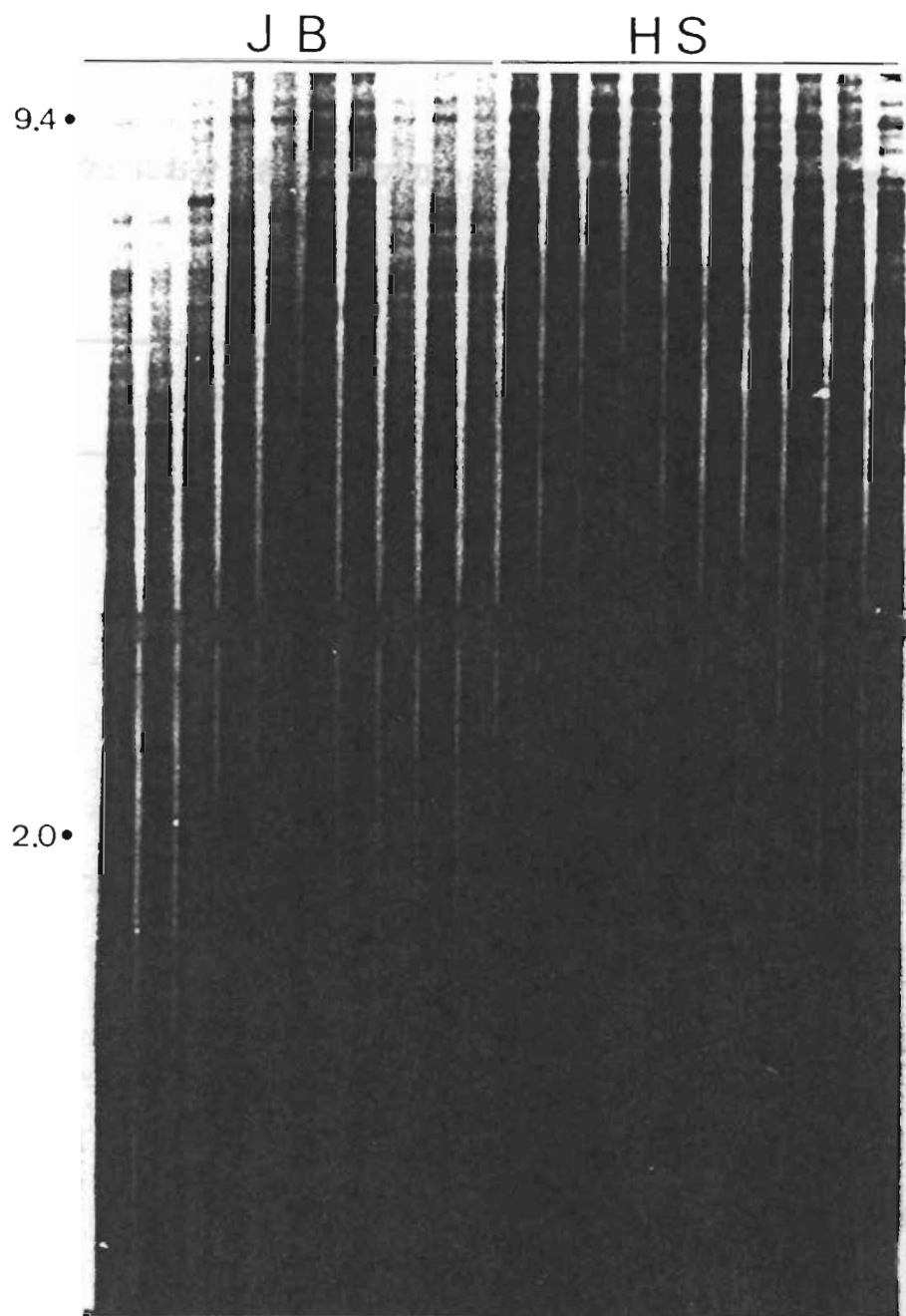


図 1-12 (GT)nプローブを用いたウシのDFP

JB: 黒毛和種、HS: ホルスタイン種

表1-3 ウシにおける各プローブのハイブリダイゼーションおよび最終条件

プローブ	ハイブリダイゼーションの条件	最終洗浄条件
M13反復配列	40% Formamide, 6×SSC, 5mM EDTA, 0.25% Skim milk, 37°C	2×SSC, 0.1% SDS 55°C
YNZ22	40% Formamide, 6×SSC, 5mM EDTA, 0.25% Skim milk, 37°C	2×SSC, 0.1% SDS 50°C
α-globin	40% Formamide, 6×SSC, 5mM EDTA, 0.25% Skim milk, 37°C	4×SSC, 0.1% SDS 50°C
no-1	40% Formamide, 6×SSC, 5mM EDTA, 0.25% Skim milk, 37°C	4×SSC, 0.1% SDS 50°C
33.15	40% Formamide, 6×SSC, 5mM EDTA, 0.25% Skim milk, 42°C	4×SSC, 0.1% SDS 55°C
(GT) <sub>n</sub>	40% Formamide, 6×SSC, 5mM EDTA, 0.25% Skim milk, 42°C	1~4×SSC, 0.1% SDS 55~65°C

表1-4 3種類のプローブにおける黒毛和種とホルスタイン種の品種内、  
品種間のバンドシェアリング値

プローブ	品種内		品種間
	黒毛和種	ホルスタイン種	
M13	0.443	0.372	0.154
YNZ22	0.465	0.502	0.280
$\alpha$ -globin	0.545	0.457	0.243

られなかった。

これらの結果から、少なくとも本研究で示した実験条件においては、検出できるバンドの明確さ、多型性、分析可能な本数の点から考えて、M13プローブとYNZ22プローブがウシに対する分析に関して有効であると考えられる。従って、以降の研究にはM13プローブとYNZ22プローブの2種類、もしくはどちらか一方を用いることとした。

また本研究において6種類のプローブのうち4種類は試験管内での合成によって得たものである。この研究で示されたプローブ合成の方法は、ミニサテライト繰り返し配列の情報さえあれば簡単に新しいプローブを作ることができることを示しており、必要なプローブを数多く入手するための方法として優れていることが明らかとなった。

### 3) 異なった6種類のプローブによるニワトリのDNAフィンガープリントの比較

52系統とWL-B系統のニワトリに対し、M13反復配列、M13ファージの基本単位反復配列、YNZ22、33.15、 $\alpha$ -globin、mo-1の6種類のプローブを用いて、DFPの比較を行った。それぞれのプローブに対する洗浄条件は、表1-5に示した。図1-13~1-18は、それぞれのDFP像である。分析にあたっては、約2kbから20kbまでの範囲のバンドを対象とした。この範囲外ではバンドが不明瞭なため、評価には加えなかった。

図1-13はM13ファージの反復配列をプローブとして用いたDFPである。この図に示されるように、各々のバンドが十分に分離した鮮明な像が得られ、このプローブがニワトリに対して有効であることが示された。図1-14はM13ファージの反復配列の基本単位を反復させた、合成プローブによるDFPである。検出できたバンド数は非常に多いが、各バンドが十分に分離せず、特定することが困難なバンドが多い。このプローブは、M13ファージと基本的に同じである。洗浄条件が異なるものの、これら2つのプローブが異なるパターンを示す理由については不明である。図1-15は、YNZ22を基本単位としたプローブを用いて得られた



表1-5 ニワトリにおける各プローブのハイブリダイゼーションおよび最終条件

プローブ	ハイブリダイゼーションの条件	最終洗浄条件
M13反復配列	40% Formamide, 6×SSC, 5mM EDTA, 0.25% Skim milk, 37°C	1×SSC, 0.1% SDS 60°C
合成 M13 配列	40% Formamide, 6×SSC, 5mM EDTA, 0.25% Skim milk, 37°C	2×SSC, 0.1% SDS 50°C
YNZ22	40% Formamide, 6×SSC, 5mM EDTA, 0.25% Skim milk, 37°C	2×SSC, 0.1% SDS 45°C
α-globin	40% Formamide, 6×SSC, 5mM EDTA, 0.25% Skim milk, 37°C	2×SSC, 0.1% SDS 45°C
no-1	40% Formamide, 6×SSC, 5mM EDTA, 0.25% Skim milk, 37°C	4×SSC, 0.1% SDS 45°C
33.15	40% Formamide, 6×SSC, 5mM EDTA, 0.25% Skim milk, 37°C	4×SSC, 0.1% SDS 45°C

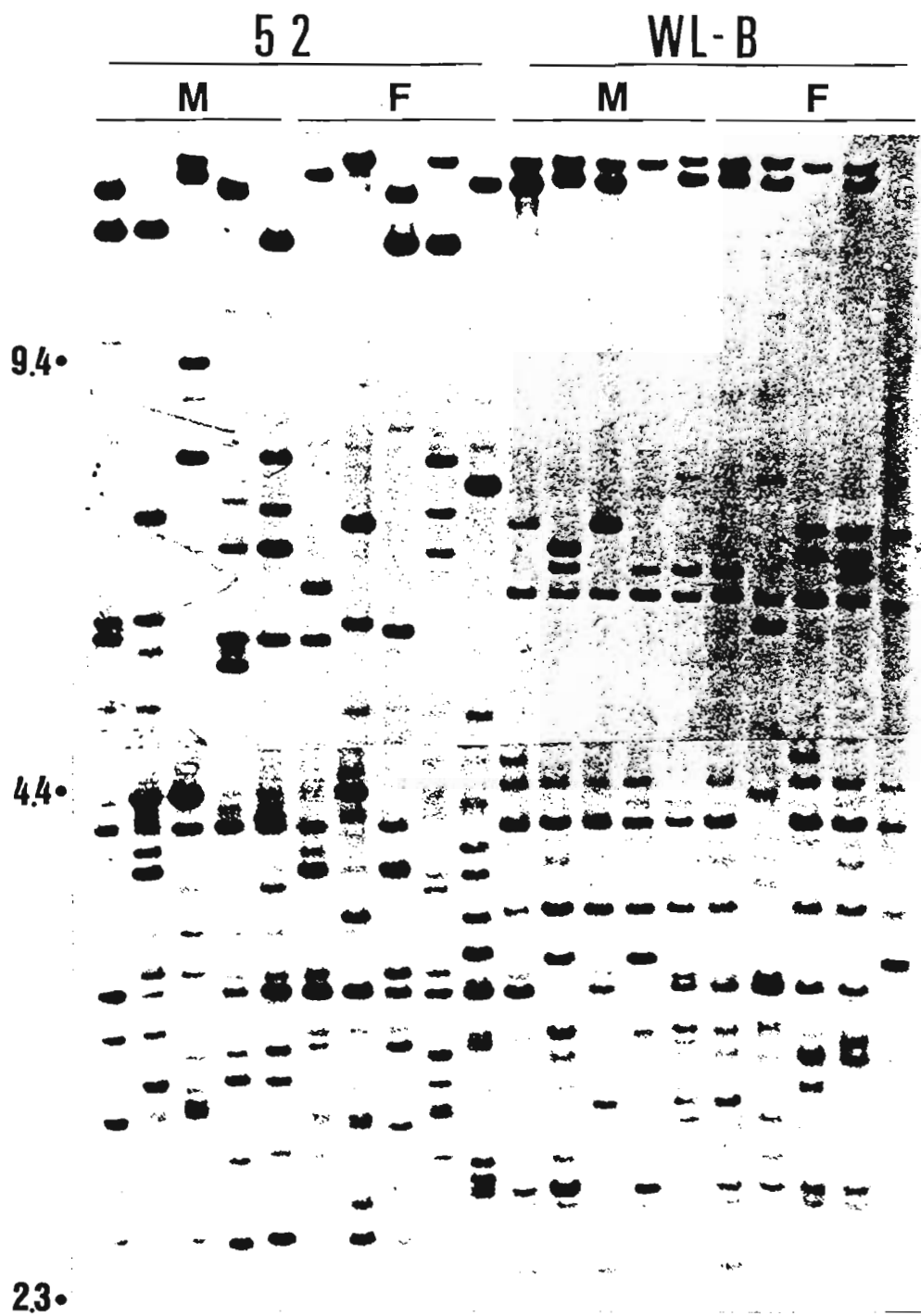


図 1-13 M13ファージプローブを用いたニワトリのDFP

M: 雄、F: 雌

52

WL-B

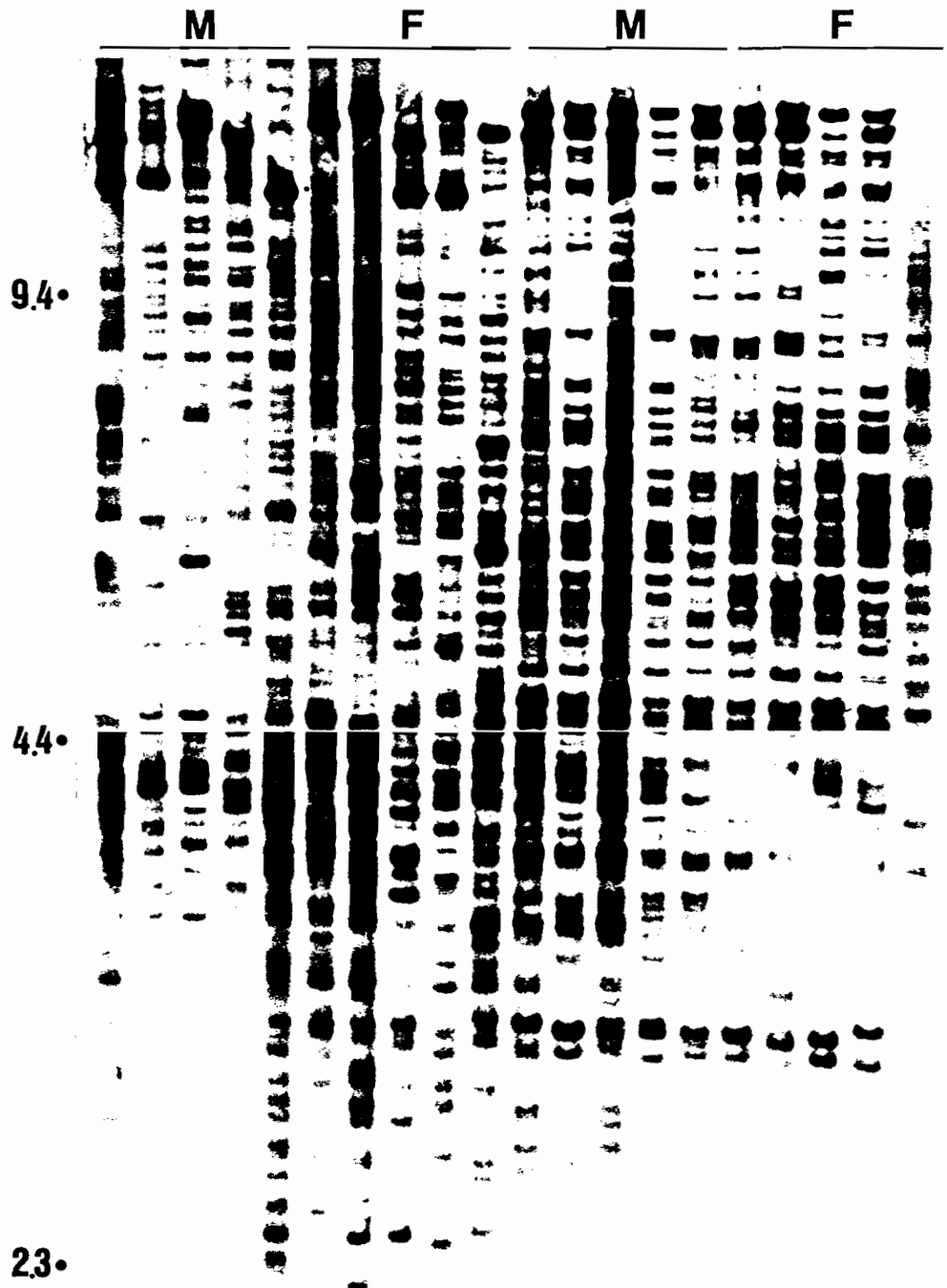


図1-14 合成M13プローブを用いたニワトリのDFP

M:雄、F:雌

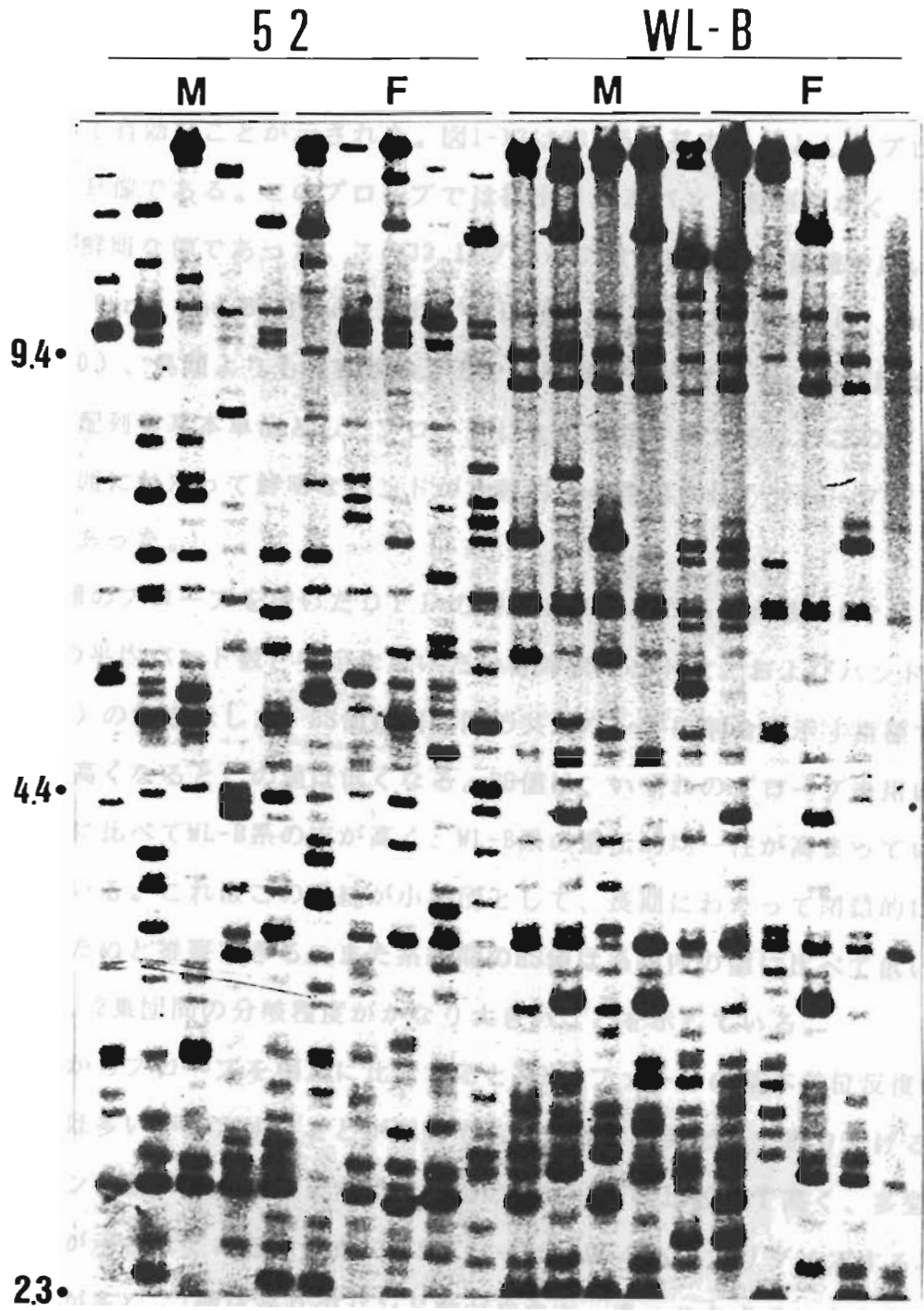


図 1-15 YNZ22プローブを用いたニワトリのDFP

M: 雄、F: 雌

D F P 像である。このプローブでは約2kbから20kbの広い範囲にわたって多数の鮮明なバンドが検出された。図1-16はmo-1プローブによるD F P 像である。このプローブを用いた場合も、広い範囲にわたって多数の鮮明なバンドが検出され、プローブとして有効なことが示された。図1-17は33.15を基本単位としたプローブによるD F P 像である。このプローブでは検出されるバンド数が少なく、また全体として不鮮明な像であった。この33.15プローブは、多くの家畜種で用いられているが (Burke and Burford, 1987; Hillelら, 1989; Jeffreysら, 1987; Reeveら, 1990)、鳥類よりも哺乳類のD F P に有効なようである。図1-18は $\alpha$ -globinの反復配列を基本単位としたプローブによるD F P 像である。このプローブでは広い範囲にわたって鮮明なバンドが比較的多く検出され、プローブとして優れたものであった。

これら6種類のプローブを用いたD F P の特徴をまとめたものが表1-6であり、1個体あたりの平均バンド数、判定に用いた分析対象バンド数、およびバンドシェアリング (BS) の値を示した。BS値は個体間の共通バンドの割合を示す指標であり、多型性が高くなるとこの値は低くなる。BS値は、いずれのプローブを用いた場合でも52系に比べてWL-B系の方が高く、WL-B系の遺伝的均一性が高まっていることを示している。これはこの系統が小集団として、長期にわたって閉鎖的に維持されてきたためと推察できる。また系統間のBS値は系統内の値に比べて低い値を示しており、2集団間の分岐程度がかなり大きいことを示している。

以上の結果からプローブを相互に比較すると、M13ファージの基本単位反復配列はバンド数は多いが特定することが困難であり、分析対象として取り上げることのできるバンド数が少ない。またBS値は他のプローブと比較して高く、多型性が少ないことが示されている。また33.15プローブは弱くハイブリダイズする不鮮明なバンドが多く、1個体当りのバンド数が少なかった。これらのことから、これら2つのプローブはニワトリに対するD F P のプローブとしてはあまり有効でなく、M13ファージの反復配列、YNZ22、mo-1、 $\alpha$ -globinプローブの4種類がニワトリを対象としたD F P のプローブとして特に有効であると考えられる。これら6種類のプローブを用いたD F P の有効なバンド数は、合計393本にもなる。これらを用いればD F P を用いた個体識別、親子鑑別、連鎖分析、量的形質との関

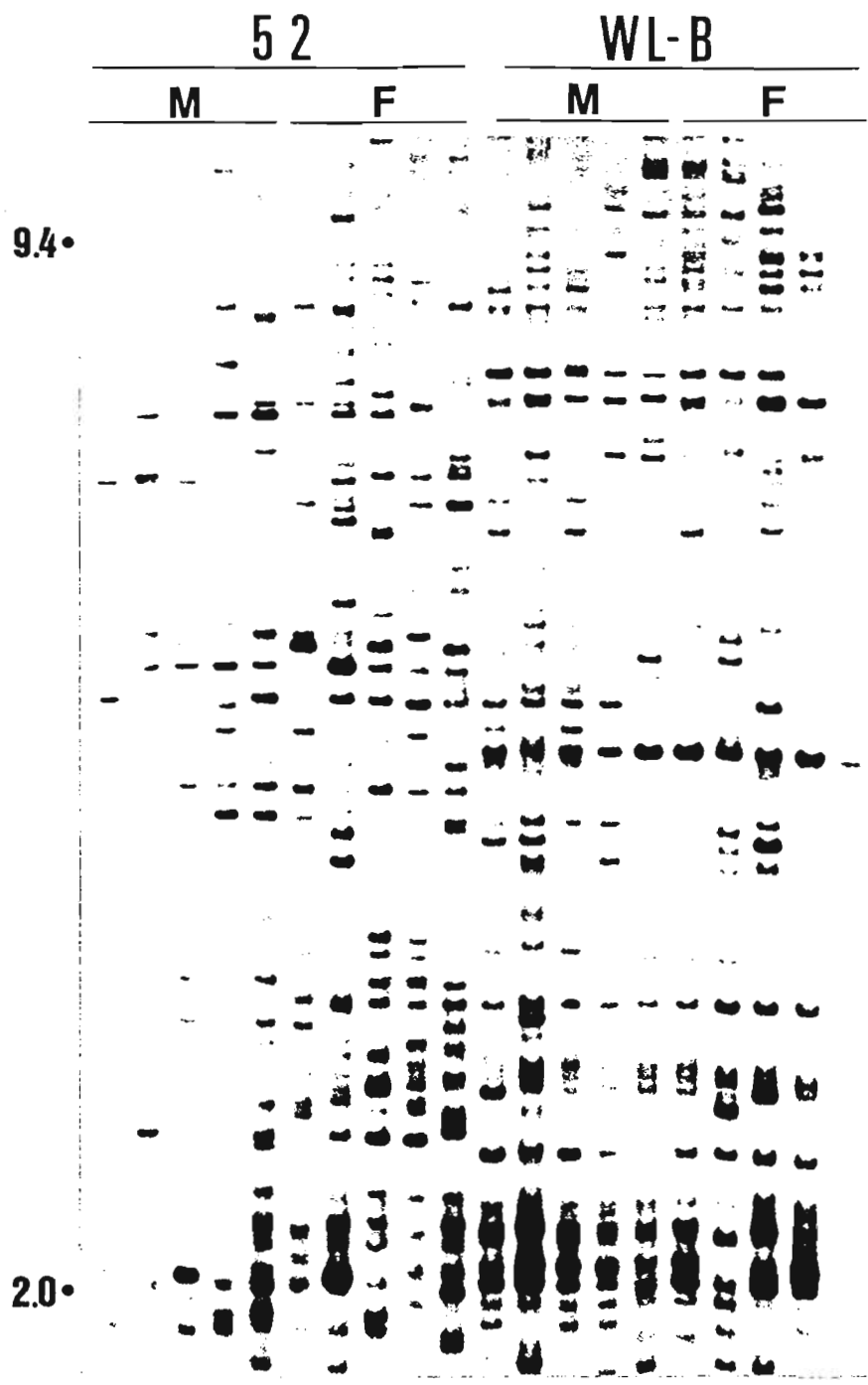


図 1-16 mo-1プローブを用いたニワトリのDFP

M: 雄、F: 雌

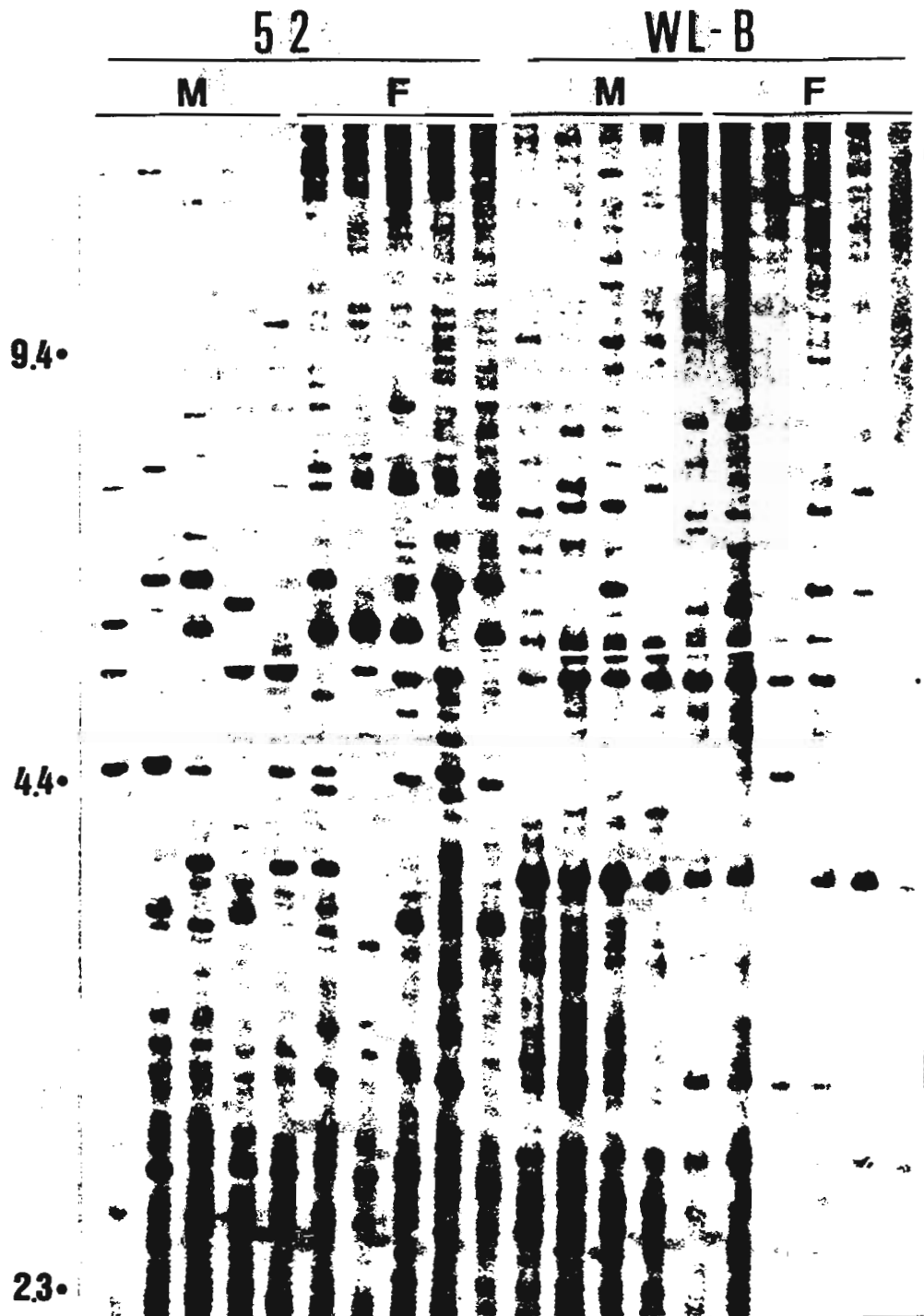


図 1-17 33.15プローブを用いたニワトリのDFP

M: 雄、F: 雌

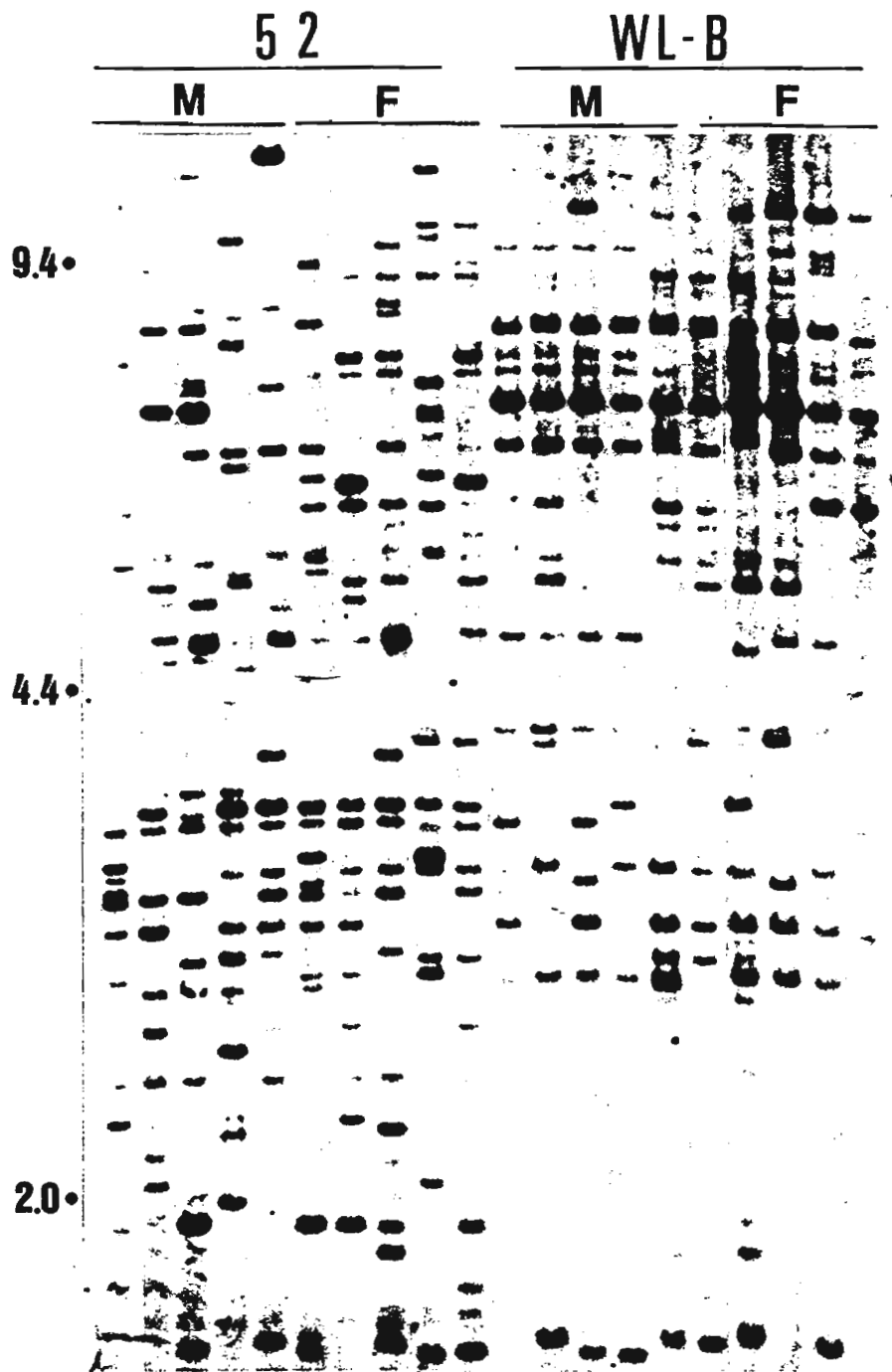


図 1-18  $\alpha$ -globinプローブを用いたニワトリのDFP

M: 雄、F: 雌



表 1-6 ニワトリにおける6種類のプロローブを用いた場合の平均バンド数、分析対象バンド数、およびバンドシェアリング値

プロローブ	平均バンド数 <sup>1)</sup>	分析対象バンド数	バンドシェアリング値 <sup>2)</sup>		
			52系	WL-B系	系統間
M13反復配列	8.3 ± 1.5	39	0.33 ± 0.15	0.54 ± 0.20	0.26 ± 0.12
合成 M13配列	30.4 ± 6.0	78	0.46 ± 0.10	0.66 ± 0.12	0.42 ± 0.10
YNZ22	19.7 ± 3.9	91	0.29 ± 0.11	0.50 ± 0.12	0.21 ± 0.08
α-globin	11.2 ± 2.9	47	0.42 ± 0.12	0.53 ± 0.15	0.17 ± 0.10
m0-1	24.0 ± 6.2	102	0.38 ± 0.10	0.50 ± 0.14	0.19 ± 0.09
33.15	5.8 ± 1.8	36	0.31 ± 0.19	0.44 ± 0.16	0.11 ± 0.12

1) 平均値 ± 標準偏差

2) バンドシェアリング値 =  $2 N_{AB} / (N_A + N_B)$ 、 $N_{AB}$ は個体A、Bに共通なバンド数、 $N_A$ 、 $N_B$ はそれぞれ個体A、Bのバンド数

連等、種々の分析の精度も一段と増すであろう。

またウシの場合と同様に、オリゴヌクレオチドを用いた化学合成によるプローブの合成法は非常に有効であることが示された。今回用いたプローブのほかにも使用できるミニサテライト配列は多数報告されており、これらの配列の情報からプローブを合成することによりDFPの情報を飛躍的に増加させることが可能であることが示された。

## 第2章 ウシとニワトリにおけるDNAフィンガープリントの 個体識別と親子鑑別に対する有効性

### 第1節 緒言

D F P法はこれまでに、ヒトの個体識別と親子鑑別を中心に利用されてきた (Gillら, 1986; Jeffreysら, 1985a, b, c)。それはD F Pが多型性の高い数多くのバンドからなり、個体に特有とも言えるバンドのパターンを示すこと、各バンドは両親のどちらかから受け継がれると言った性質を持つためである。家畜や家禽は経済的価値を高めるために、選抜による育種改良が行われてきている。優れた個体を産み出すためにその血統を維持し、またより優れた方向に家畜や家禽を改良していくためには正確な血統情報が必要になる。最近では受精卵移植技術の進歩により、仮腹で優良牛の子を生ませることも可能となっており、血統確認の必要性も高まってきている。また、黒毛和種では、人工授精により種付けが行われているが、ごく最近、優良牛の偽りの精液ストローが出回るなど、D F Pによる鑑定の出る役割は大きい。

家畜や家禽の個体識別や親子鑑別では、これまで血液型や蛋白質の多型が用いられてきた。しかし集団の血縁関係や近交度の高まりなどにより、さらに精度の高い鑑別法が望まれるに至っている。D F P法は多型性の高いバンドを数多く検出でき、1つのプローブが色々な種にわたって使用できる可能性があるため、ヒトばかりでなく家畜や家禽においてもこれらの目的に有効であると思われる。家畜や家禽に対するD F P法の適用はいくつか報告されているが (Hillelら, 1989; Kunleinら, 1989, 1990; Mengら, 1990; Vassartら, 1987)、個体識別や親子鑑別に対してどの程度有効であり、また種によってどの程度の精度があるのかを報告した例は少ない。さらにヒトにおいても、その精度は人種や国、地域によって異なると言った報告もされている (Cohen, 1990; Lander, 1989)。そこ

でDFP法を用いた個体識別と親子鑑別が、我国のウシとニワトリに対してどの程度有効であるかを検討した。ウシに関しては閉鎖集団で飼育、維持されている兵庫県美方郡の但馬牛と34都道府県から出品された第6回全国和牛能力共進会第12区出品牛の2つの集団を分析し、特定の小集団と日本全体を代表するサンプル指標となることを目的として、DFP法の個体識別と親子鑑別の精度の検討を行った。ニワトリでは、ブロイラー作成の父系である52系と我々の研究室で非常に小さな小集団で系統維持しているWL-B系の2つの系統を分析し、一般に維持されている実用系統と実験用小集団においてDFPによる個体識別と親子鑑別が有効か否かを検討した。またプローブはウシでは第1章で有効であった2種類、ニワトリでは4種類を用いて分析と検討を行った。

## 第2節 材料および方法

### 1) 供試動物

ウシ：ウシは黒毛和種の2グループ、すなわち兵庫県美方郡に飼育されている但馬牛の繁殖雌牛群に属する121頭（以後但馬牛）と34都道府県から出品された第6回全国和牛能力共進会第12区出品牛119頭（以後全共牛）を用いた。

ニワトリ：第1章で用いた、農林水産省家畜改良センター兵庫牧場においてブロイラー作成の父系として維持されている系統（以後52系）と、我々の研究室で小さな閉鎖集団として維持している白色レグホーン種のB系（以後WL-B系）を用いた。各系統とも雌雄5羽ずつ、合計20羽を供試した。

### 2) DNAフィンガープリント

DNAは、但馬牛では血液および精液から、ニワトリでは全血から第1章の方法に従って精製した。制限酵素はウシ、ニワトリ共に*Hae*IIIを用いた。プローブは第1章で有効であることが示されたものを用い、ウシではM13ファージの反復配列とYNZ22プローブの2種類、ニワトリではM13ファージの反復配列、YNZ22、 $\alpha$ -globin、mo-1の4種類のプローブを用いた。電気泳動、ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件等は第1章の方法に従った。

### 第3節 結果および考察

#### 1) ウシの黒毛和種に対する個体識別と親子鑑別

M13プローブとYNZ22プローブの2つを用いて、但馬牛121頭と全共牛119頭のD F Pを得た。その代表的なD F Pが図2-1である。バンドの評価は第1章の場合と同じく、2kbから20kbの範囲で行った。但馬牛と全共牛のすべての個体において、同一のバンドのパターンを持つ個体はなく、それぞれの個体が個体特有のバンドのパターンを示した。この結果から、D F P法は個体識別に対して有効であることを示唆していた。これら2グループにおけるD F Pの結果をまとめたものが表2-1である。fはそれぞれのプローブとそれぞれのグループごとの、1個体あたりの平均バンド数を示している。M13プローブを用いた場合では但馬牛で8.66本、全共牛で7.42本、YNZ22プローブを用いた場合では、但馬牛で7.04本、全共牛で6.15本であった。各プローブを用いたそれぞれのグループに対するヘテロ接合度とD F P法の個体識別と親子鑑別に対する精度を数値化するために、Jeffreysら(1985c)の方法に従って、次の計算を行った。まず、但馬牛と全共牛の2グループに対し、それぞれのバンドの頻度を計算した。これはある個体が持っているバンドが、無作為に選んだ個体に存在している確率を示している。その平均のバンド頻度を"x"とする。各グループが、Hardy-Weinbergの法則に合致しているとすると、これらバンドの平均対立遺伝子頻度"q"は $x = 2q - q^2$ の式を用いて求められる。ヘテロ接合度は、 $h = 2(1-q) / (2-q)$ の式で求められる(Georgesら, 1988)。この値が高いほど多型性に富んでいることを示している。これらの値は、表2-1に示した。この結果、2グループのどちらの場合もM13プローブよりもYNZ22プローブの方がやや多型性が高い結果となっており、また全共牛の方が但馬牛と比べて高い多型性を示した。この結果は、但馬牛と全共牛の遺伝的背景の違いを示している。全共牛は全国から出品されたウシであり、その個体間の血縁は低いが、但馬牛は過去80年間にわたって閉鎖集団で飼育、維持されており、その血縁係数や近交係数が高まっている(Mukaiら, 1989)。これら2つのグループにおける平均血縁係数を調べたところ、全共牛では0.071であり、但馬牛では0.375であっ

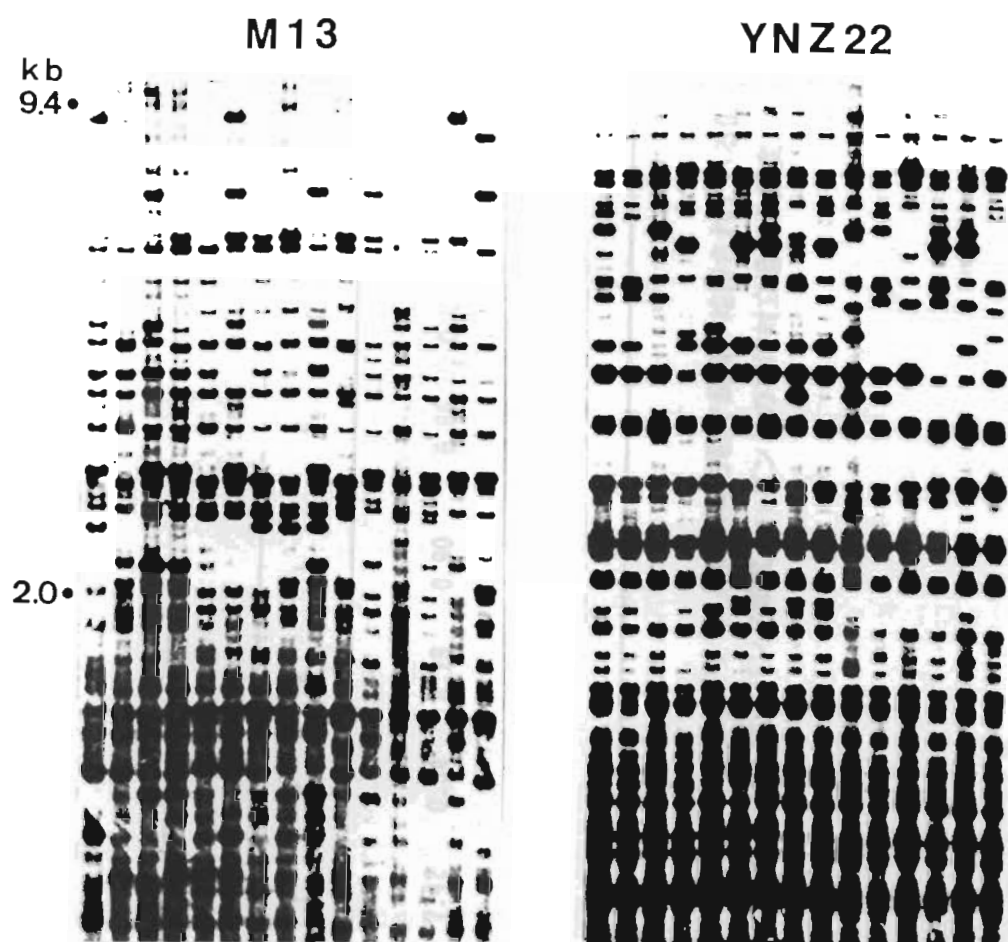


図 2-1 M13ファージプローブとYNZ22プローブを用いた但馬牛のDFP

表2-1-1 2種のブローブを用いたウシ2集団におけるDFPの特色

ブローブ	全共牛 <sup>1)</sup>				但馬牛 <sup>2)</sup>			
	f	x	q	h	f	x	q	h
M13反復配列	7.42	0.34	0.19	0.90	8.66	0.45	0.26	0.85
YNZ22	6.15	0.25	0.14	0.93	7.04	0.34	0.19	0.90

1) 第6回全国和牛能力共進会第12区出品牛、2) 兵庫県美方郡で飼育、維持されている但馬牛  
 f:1個体当りの平均バンド数、x:平均のバンド頻度、q:バンドの平均対立遺伝子頻度、  
 h:ヘテロ接合度



た。この血縁の程度の違いがDFPの多型性の差異に反映していると考えられる。

DFPを用いた個体識別の確率は、ある個体が示すDFPと無作為に選出された個体のDFPが同じになる確率で示した。その確率“i”は、 $i = x^f$ で求めた。この結果は表2-2に示した。2つのプローブを用いて全共牛では $6.24 \times 10^{-6}$ 、但馬牛では $4.58 \times 10^{-7}$ であった。この確率は、全共牛では1600万頭で1組、但馬牛では200万頭中で1組同じDFPになる確率である。現在全国で黒毛和種は、200万頭飼育されており、また但馬牛は2000頭である。これらのことから考えてDFP法は黒毛和種の個体識別に対して十分な効力を有しているものと考えられた。

次にDFP法の親子鑑別に対する有効性を検討した。図2-2は、但馬牛の4家系のDFPである。Sは雄親、Dは雌親、Oはその子を示している。子牛のバンドは両親のどちらかから由来していることが示めされている。DFPを用いた親子鑑別はこのバンドが必ず両親のどちらかから由来していることで親子の肯定を行い、子が両親に由来していないバンドを持つ場合に親や子の否定を行う。この親子関係のDFPのバンドの種類を雄親、雌親、子の3個体に共通するバンド(SOD)、雄親と子(SO)、雌親と子(DO)、雄親のみ(S)、雌親のみ(D)、子にはなく雄親と雌親に存在するバンド(SD)に分類した結果を表2-3に示した。ここで親子の肯定を行うことのできるバンドはSOとDOである。また、それぞれの家系における両親間の血縁係数は、36.7% (家系1)、43.3% (家系2)、28.2% (家系3)、49.2% (家系4)であった。両親間の血縁係数が最も高かった家系4では雄親と子に存在するバンド(SO)は認められず、積極的に父親を肯定することはできなかった。これまでにDFP法を用いた親子鑑別は様々な生物種において報告されているが、これらは両親間に血縁が低いか、無い場合がほとんどである。高い血縁集団における親子鑑別では、親子関係のない個体はその条件を満たす場合も考えられる。実際に親子鑑別を行うにあたっては、個体識別の場合と同様、適用する集団における確率を求めておく必要がある。そこで次に、全共牛と但馬牛の2グループに対してこの確率を求めることとした。

ここでは、ある子の母親が確実にわかっている場合、父親を間違える確率がどの程度であるかをGeorgesら(1988)の方法に従って計算した。この確率は、本当の

表2-2 黒毛和種における血縁のない個体間で  
フィンガープリントが同一になる確率

プローブ	全共牛	但馬牛
M13	$3.09 \times 10^{-4}$	$9.33 \times 10^{-4}$
YNZ22	$2.20 \times 10^{-4}$	$4.86 \times 10^{-4}$
M13 and YNZ22	$6.24 \times 10^{-8}$	$4.58 \times 10^{-7}$

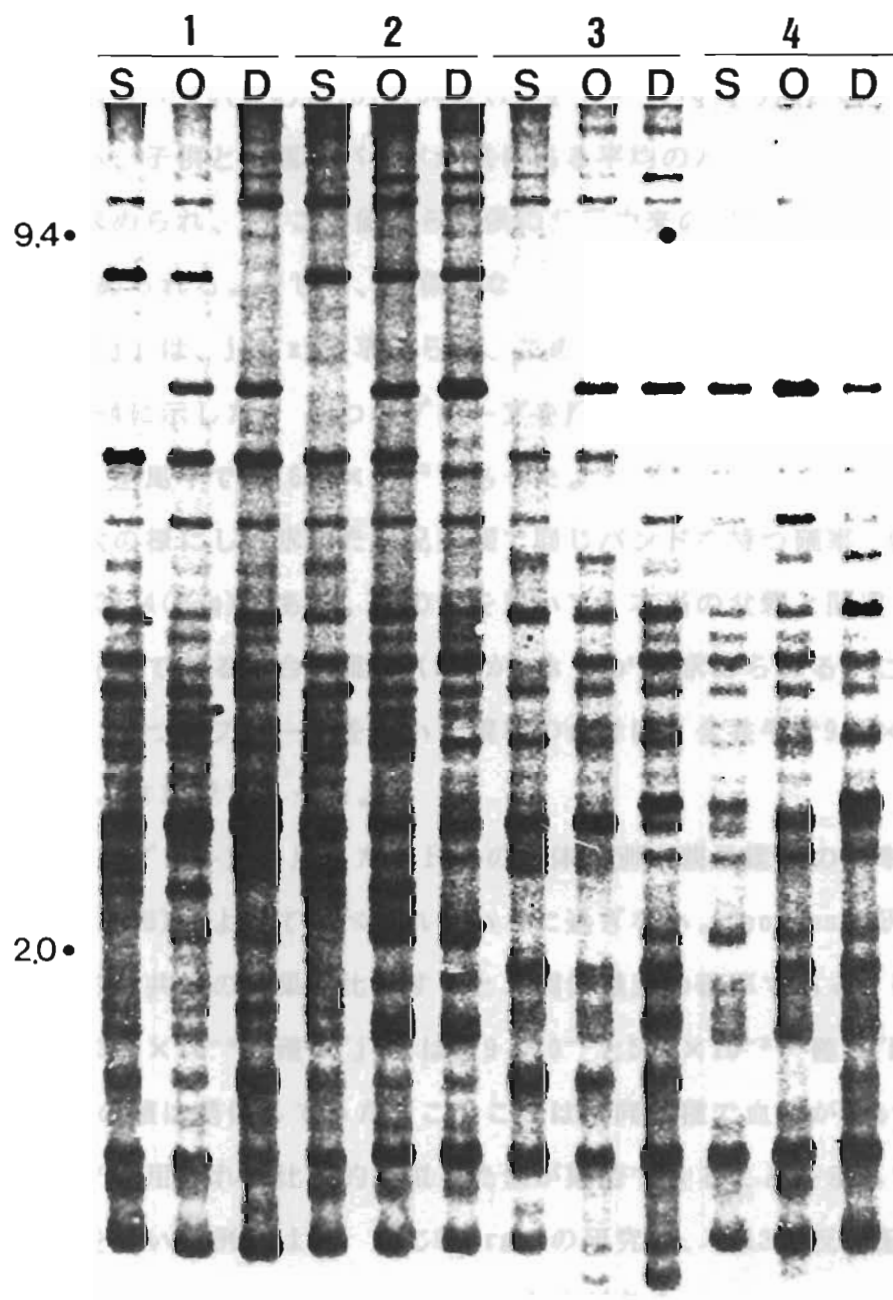


図 2-2 M13ファージプローブを用いた但馬牛4家系のDFP

S: 雄牛、D: 雌牛、O: 子牛

父親と間違える可能性のある個体間に血縁が全くない場合（確率 "j"）と、この2個体が兄弟である場合（確率 "k"）の2つに分けて計算した。この計算方法を次に示す。DFPにおける常染色体の由来のバンドが母親にも存在する確率（l）は、 $l = q^2/(2q-q^2) + 2q(1-q)(0.5+0.5q)/(2q-q^2) = (1+q-q^2)/(2-q)$ で示される。この値を用い、子供と母親にバンドが共にある平均のバンドの本数（m）は、 $m = l \times f$ で求められ、この値から子供の父親由来のバンドの本数（n）は、 $n = f - m$ で求められる。そして、関係のない個体とその父親由来のバンドをすべて持つ確率（j）は、 $j = x^n$ で求められ、この値が父親を誤る確率となる。この結果は、表2-4に示した。2つのプローブを用いた確率の合計は、全共牛では  $1.8 \times 10^{-3}$ 、但馬牛では  $6.2 \times 10^{-3}$ であった。

確率 "k"は、次の様にして求めた。兄弟間で同じバンドを持つ確率（o）は、 $o = (4+5q-6q^2+q^3)/4(2-q)$ である。この値を用いて、本当の父親と間違える可能性のある個体間が兄弟である場合の確率（k）が、 $k = o^n$ で求められる。この結果は表2-5に示した。2つのプローブを用いた確率の合計は、全共牛で  $9.4 \times 10^{-2}$ であり、但馬牛で  $1.2 \times 10^{-1}$ であった。

ウシにおけるM13プローブを用いたDFPの個体識別や親子鑑別の確率は、わずかGeorgesら（1988）によって述べられているに過ぎない。Georgesの研究と今回の研究における全共牛の結果を比較すると、個体識別の確率である、確率 "i"では  $3.8 \times 10^{-4}$ と  $3.1 \times 10^{-4}$ 、確率 "j"では  $5.9 \times 10^{-2}$ と  $5.2 \times 10^{-2}$ 、確率 "k"では共に  $3.1 \times 10^{-1}$ とその値は酷似していた。このことは、同じ種で血縁が無い場合では、同じプローブを用いれば比較的類似した値が期待できることを示している。複数のプローブを用いた例では、同じGeorgesの研究で、M13の反復配列、 $\alpha$ -globin、Jeffreysのcore配列の3種類を用いたものがある。この結果、確率 "i"、"j"、"k"はそれぞれ、 $1.4 \times 10^{-11}$ 、 $1.2 \times 10^{-4}$ 、 $2.7 \times 10^{-2}$ であった。その他には、Ikedaら（1993）がマウス由来のミニサテライトプローブ、I-84とI-3-2を用いて確率 "i"、"j"、"k"をそれぞれ、 $3.7 \times 10^{-5}$ 、 $3.4 \times 10^{-2}$ 、 $2.4 \times 10^{-1}$ と計算している。これらの結果から、DFPの個体識別に対する精度は1つのプローブを用いただけでかなりの正確さが期待できるようである。しかし親子鑑別において、特に本当の父親と間違える可能性のある個体との間に兄弟関係のある場合（確率 "k"）

表2-3 黒毛和種4家系におけるバンドの分布状態

	バンドパターン				家系		
	父牛	子牛	母牛	1 (36.7%) <sup>1)</sup>		2 (43.3%)	3 (28.2%)
S	-	-	-	2	3	3	3
SO	-	-	-	5	2	6	0
SOD	-	-	-	14	15	9	15
DO	-	-	-	5	7	5	5
D	-	-	-	3	0	3	2
SD	-	-	-	1	0	1	1
				30	27	27	26

1) 両親間の血縁係数 (%)

S:父牛のみに検出できるバンド、SO:父牛と子牛に検出できるバンド、SOD:両親と子牛に検出できるバンド、  
 DO:母牛と子牛に検出できるバンド、D:母牛のみに検出できるバンド、SD:両親に検出できるバンド

表2-4 判別すべき父親間に血縁がない場合の  
黒毛和種における父親の誤判別率

プローブ	全共牛	但馬牛
M13	$5.22 \times 10^{-2}$	$1.09 \times 10^{-1}$
YNZ22	$3.45 \times 10^{-2}$	$5.66 \times 10^{-2}$
M13 and YNZ22	$1.80 \times 10^{-3}$	$6.17 \times 10^{-3}$

表2-5 判別すべき父親間が兄弟である場合の  
黒毛和種における父親の誤判別率

プローブ	全共牛	但馬牛
M13	$3.13 \times 10^{-1}$	$3.80 \times 10^{-1}$
YNZ22	$3.01 \times 10^{-1}$	$3.22 \times 10^{-1}$
M13 and YNZ22	$9.41 \times 10^{-2}$	$1.20 \times 10^{-1}$

では、どのプローブを用いた場合でもかなり高い値となっており、さらに多くのプローブを用いることが必要であることが示された。この場合に、今回の研究で示されたオリゴヌクレオチドからプローブを合成する方法は簡便であり、ミニサテライト配列の情報さえ明らかであれば、プローブ数を増加させるのに有効である方法であることが示された。

## 2) ニワトリに対する個体識別と親子鑑別

D F Pは第1章で得たオートラジオグラフを用いた。52系およびWL-B系のどちらとも、同じバンドのパターンを示す個体は見付からなかった。ウシの場合と同様、得たD F Pから、1個体当りのバンドの平均本数 "f"、平均のバンドの頻度 "x"、そのバンドの平均対立遺伝子頻度 "q" および平均ヘテロ接合度 "h" をそれぞれのプローブに対して求めた。これらの結果は、表2-6に示した。ヘテロ接合度 "h" はどちらの系統、4種類のどのプローブにおいても高い値となり、個体識別や親子鑑別に対してこれら4種類のプローブが有効であることを示唆している。表2-6の結果からそれぞれのプローブに対して、個体識別に対する確率を求めた(表2-7)。どのプローブを用いた場合でも、ウシよりも低い確率となりニワトリの場合ではより精度が高いことを意味している。特にYNZ22とmo-1プローブでは非常に低い確率となった。これはこれらのプローブが、M13や $\alpha$ -globinプローブを用いた場合よりも、1個体あたりのバンドの本数が多く検出できていることに起因している(表2-6)。これら4つのプローブを用いた場合の個体識別の確率は52系で  $8.8 \times 10^{-42}$ 、WL-B系で  $4.8 \times 10^{-42}$  となる。ニワトリの場合の個体識別においても、複数のプローブを用いる必要はなく、これら4つのプローブのうち1つを用いるだけで個体識別が十分可能であることが示された。その中でも特に、YNZ22とmo-1プローブが有効であることが明らかとなった。

次にD F Pのニワトリに対する親子鑑別の確率計算を行った。計算方法は前述のウシの場合に従い、母子の関係が明らかなきとき、本当の父親と間違える可能性のある個体間に血縁が全くない場合(確率 "j")と、この2個体が兄弟である場合(確率 "k")に父親を間違えて鑑定する確率の2つに分けて計算した。確率 "j"

表 2-6 4種のプローブを用いたニワトリ2集団におけるDFPの特色

プローブ	52系				WL-B系			
	f	x	q	h	f	x	q	h
M13反復配列	8.3	0.21	0.11	0.94	8.3	0.21	0.11	0.94
YNZ22	19.7	0.22	0.11	0.94	19.7	0.22	0.11	0.94
mo-1	25.4	0.25	0.13	0.93	22.5	0.22	0.11	0.94
$\alpha$ -globin	11.6	0.25	0.13	0.93	10.7	0.23	0.12	0.94

f:1個体当りの平均バンド数、x:平均のバンド頻度、q:バンドの平均対立遺伝子頻度、  
h:ヘテロ接合度



表2-7 ニワトリにおける血縁のない個体間で  
フィンガープリントが同一になる確率

プローブ	52系	WL-B系
M13	$2.65 \times 10^{-6}$	$2.65 \times 10^{-6}$
YNZ22	$8.09 \times 10^{-14}$	$8.09 \times 10^{-14}$
no-1	$4.62 \times 10^{-16}$	$1.70 \times 10^{-15}$
$\alpha$ -globin	$8.94 \times 10^{-8}$	$1.33 \times 10^{-7}$
Total	$8.83 \times 10^{-42}$	$4.83 \times 10^{-41}$

表2-8 判別すべき父親間に血縁がない場合の  
ニワトリにおける父親の誤判別率

プローブ	52系	WL-B系
M13	$4.73 \times 10^{-3}$	$4.73 \times 10^{-3}$
YNZ22	$6.26 \times 10^{-6}$	$6.26 \times 10^{-6}$
no-1	$6.75 \times 10^{-7}$	$7.74 \times 10^{-7}$
$\alpha$ -globin	$1.43 \times 10^{-3}$	$1.49 \times 10^{-3}$
Total	$2.86 \times 10^{-17}$	$3.41 \times 10^{-17}$

の結果を表2-8に示した。4つのプローブを用いた場合では52系で $2.9 \times 10^{-17}$ 、WL-B系で $3.4 \times 10^{-17}$ となり、父親に血縁関係がない場合は親子鑑別は十分有効であり、特に個体識別の場合と同じくYNZ2やmo-1プローブを用いればこれらプローブ1つだけでも親子鑑別が十分であることが示されている。一方、父親が兄弟関係にある場合の確率“k”については、表2-9に示した。4種類のプローブを用いて52系では $1.9 \times 10^{-6}$ 、WL-B系では $2.6 \times 10^{-6}$ であった。1つのプローブだけでは不十分ではあるが、これら4種類のプローブを用いれば父親と兄弟関係のある個体を含んでいても、親子鑑別に対し十分有効であることが示された。

D F Pを用いたニワトリに対する個体識別や親子鑑別の確率についての報告は少なく、Hillelら(1989)が33.6プローブを用いて個体識別の確率を求めている。その確率は産卵鶏で $8.2 \times 10^{-15}$ 、ブロイラーで $8.7 \times 10^{-17}$ と非常に低い値となっている。本研究においてもプローブによって違いがあるものの、プローブ1種類あたりの確率は、ウシにおいて計算された値よりもかなり低い確率となっている(表2-2、2-7)。この理由は、ニワトリではウシと比べてD F Pの像が明確であり、分析対象になるバンドの本数がウシ(平均6~8本)よりも平均で10本程度多いためである。これらのことから、D F P法を用いた個体識別や親子鑑別はニワトリに対して特に有効であることが示された。

表 2-9 判別すべき父親間が兄弟である場合の  
ニワトリにおける父親の誤判別率

プローブ	52系	WL-B系
M13	$1.66 \times 10^{-1}$	$1.66 \times 10^{-1}$
YNZ22	$1.75 \times 10^{-2}$	$1.75 \times 10^{-2}$
no-1	$6.52 \times 10^{-3}$	$8.36 \times 10^{-3}$
$\alpha$ -globin	$9.90 \times 10^{-2}$	$1.07 \times 10^{-1}$
Total	$1.87 \times 10^{-6}$	$2.58 \times 10^{-6}$

### 第3章 DNAフィンガープリント法を用いた実験動物の 遺伝的モニタリング

#### 第1節 緒言

医学や生物学の分野で用いられる実験動物は哺乳類ばかりではなく、鳥類、魚類と多数の種におよんでいる。これらの中でもげっし類のマウス、ラット、ハムスター、モルモットなど実験動物用に開発、改良された種は、実験動物の中核をなしている。

実験動物が研究に使用されるためには遺伝的制御、微生物制御、環境制御を行った条件下で維持、生産されなければならない。これら3つの条件が十分に行われていなければ、研究において最も重要である実験結果の再現性を期待することは難しい。

実験動物学の分野では「計画的な交配方法によって維持（遺伝的制御）されており、由来が明らかで一般に何らかの特徴を備えている動物群」を系統と呼ぶ。これに対し、品種とは産業上の分類で、一般に「同じ種に属する家畜が異なる地域、目的、用途で長年月にわたって飼育、育種されたために形態、生理、能力などの点で明らかに区別できるようになった動物集団」とされている。マウス、ラットでは品種に相当する分類はなく、分類単位としては系統が用いられる。家畜から転用されたイヌ、ネコ、ブタ、ヤギなどは遺伝的制御が遅れており品種名が用いられている。ウサギやニワトリでは品種名と系統名を区別して用いられている。野性動物や一部の家畜など遺伝的制御を全く受けていない動物は雑動物やモングレル (mongrel) と呼ばれ、実験用の動物としては適さない。

実験動物分野では、系統はさらに遺伝的制御の違いによって、近交系、ミュータント系、クローズドコロニー、交雑群に大きく分類されている。

近交系は、20世代以上の兄妹交配によって確立された系統である。近交系は同一系統内の個体であれば遺伝的に均一であるため、各実験に対する誤差が少なく

なると期待できる。

ミュータント系は、遺伝子記号で表すことのできる突然変異を持つ系統である。このうち、突然変異遺伝子を既知の近交系に導入して育成された系統をコンジュニック系統と呼び、既知の近交系に突然変異が起きてそのまま近交系として育成された系をコアイソジュニック系と呼んでいる。

クローズドコロニーは、5年以上外部から種動物を導入することなく一定の集団内で維持、繁殖されている群で、閉鎖集団とも呼ばれる。わが国では近交系、ミュータント系を除く大部分の系統がクローズドコロニーとして維持されている。

これらの実験動物は、それぞれの系統に対して遺伝的特性を保つように維持、育成されている。しかしながら、系統間の交雑ミスなどによる遺伝的汚染、長期間にわたって維持している場合などでは突然変異の積み重ねにより、系統の遺伝的特性が変化していく可能性がある。さらに近交系では、交配方法が的確でなかったり、兄妹交配が20世代に満たない場合ではヘテロの遺伝子座が存在することもある。従って、再現性の高い実験結果を得るためには、これら実験動物の各系統の遺伝的特性、遺伝的均一性が変化、消失しないように系統を維持、生産していくことが重要となる。

このような各系統の遺伝的組成の変化を早期に発見するためには、系統の遺伝子組成や遺伝的均一性のチェックを行う必要がある。これらチェックを科学的方法によって行い、その動物の遺伝的品質を客観的に保証することを遺伝的モニタリングという。

現在、マウスにおいては生化学的標識遺伝子、免疫遺伝学的標識遺伝子、毛色などの形態学的標識遺伝子を利用して遺伝的モニタリングが行われている。しかしながら、その他の動物種では遺伝的解析や標識遺伝子の開発がマウスほど行われておらず、ラットは近年かなり改善されているものの、遺伝的モニタリングに利用できる標識遺伝子は極めて少ない。

D F P法はこれら実験動物の遺伝的モニタリングに有効であると思われる。その理由として、(1)これまでの実験動物の遺伝的モニタリングには血液型など数多くの単一遺伝子座における多型を利用して行われているが、D F P法は一度に数

多くの遺伝子座を検出できる。(2)検出されるミニサテライト領域は多型性に富むため、特に近交系の亜系など遺伝的に近縁関係にある系統の同定に有利である。(3)プローブとして用いるミニサテライト領域は、動物種に関係なく使用できる可能性があるため、種ごとにプローブを開発する必要がない、と言った点が挙げられる。

本章では以上の観点から、(1)DFP法をコンジェニック系統、コアイソジェニック系統、亜系を含む近交系マウスの遺伝的モニタリングに有効かどうか、(2)C3H/HeとC57BL/6系の近交系亜系マウスを取り上げ、遺伝的類縁関係が非常に近い亜系マウス間の遺伝的モニタリングに有効かどうか、(3)またマウスに比べて有効な標識遺伝子が検出されていない実験用ウサギ、ゴールデンハムスター、マストミスなどの近交系動物のモニタリングに本法を適用し、その有効性を検討した。

## 第2節 DNAフィンガープリント法を用いた近交系マウスおよび近交系亜系マウスの同定

近交系マウスは、系統内の遺伝的均一性や系統特異的な遺伝的、生理学的、形態学的特性を持つため、医学、生物学分野で広く利用されている。現在のところ、近交系マウスの遺伝的品質を検査する遺伝的モニタリングは、生化学的標識遺伝子、免疫学的標識遺伝子、毛色などの形態学的標識遺伝子を利用して行われている。しかしながら、モニタリングに有効な遺伝子の数は50程度であり、より正確に系統の遺伝的均一性を保証するには多数の新しい標識遺伝子の開発が必要である。

また近交系マウスは、その特性から広く利用されているため、各研究機関に分与され、それぞれ亜系として維持されている。たとえば、有名なC57BL/6系やC3H/He系はわが国だけでも多数の大学、研究所、製薬企業などで長年にわたって維持され、実験に使用されている。この様な場合では、不可視的な突然変異などによる遺伝子組成の変化が各研究機関のマウスに生じ、同じ系統名を有しているにもかかわらず、相互にその特性に差異が生じる可能性があり、また現実にもそうになっている。従って、近交系マウス亜系に関する遺伝的モニタリングは近交系の場合と同様に定期的に行う必要がある。また、亜系間ではなんらかの標識遺伝子を用いて区別できることが望ましい。しかしながら、近交系マウスの遺伝的モニタリングに一般的に用いられている生化学的標識遺伝子では、亜系の同定ができないのが現状である。

そこで本節では、M13ファージプローブを用いるDFP法が、12系統の近交系マウスとC57BL/6とC3H/Heの近交系マウス亜系のモニタリングに有効であるかどうかを検討した。

## 1 材料および方法

### 1) 供試動物

近交系マウスとしては、DDD/Jah (雌 9、雄 9)、DSD/Jah (雌4、雄4)、RR/Jah (雌2、雄1)、SS/Jah (雌4、雄4)、C3H/HeJah (雌4、雄4)、C57BL/6Jah (雌4、雄4)、C57BL/6JSlc (雌4、雄4)、NC/Jah (雌1、雄4)、CF#1/Jah (雌1、雄1)、CFW/Jah (雌0、雄1)、NC/Jah系のコアイソジェニック系であるNC-*brp* (雌0、雄3)、およびC57/6系の*bg*コンジェニック系統であるC57BL/6-*bg* (雌4、雄4)の計12系統を用いた。C57BL/6CrSlc系は日本エス・エル・シー(浜松)から購入した。それ以外の系統は、農林水産省家畜衛生試験場(以下、家衛試)で系統維持されていたものである。DDD/Jahは家衛試で系統維持されていた個体(雌5、雄5)と、家衛試から神戸大学農学部へ系統分与されてから10世代を経た個体(雌4、雄4)を合わせて用いた。

C57BL/6系の亜系には、C57BL/6JJcl(日本クレア)、C57BL/6JYok(国立予防衛生研究所、以下予研)、C57BL/6JJms(東京大学医科学研究所、以下東大医科研)、C57BL/6JNrs(国立放射線医学総合研究所、以下放医研)、C57BL/6JSlc(日本エスエルシー)、C57BL/6Jah(家衛試)、C57BL/6NJcl(日本クレア)、およびC57BL/6NCrj(チャールスリバー・ジャパン)の8亜系、C3H/He系の亜系には、C3H/HeJ(ジャクソン研究所)、C3H/HeJJcl(日本クレア)、C3H/HeJYo(予研)、C3H/HeJJms(東大医科研)、C3H/HeJNrs(放医研)、C3H/HeN(アメリカ・NIH)、C3H/HeJah(家衛試)、C3H/HeNJcl(日本クレア)、C3H/HeNCrj(チャールスリバー・ジャパン)、C3H/HeSlc(日本エスエルシー)、およびC3H/HeNrs(放医研)の11亜系を用いた。用いた頭数、維持されている研究所は表3-1に示した。これら亜系マウスでJ、JYok、JJms、JNrs、JSlc、JJclの記号で示される系統の起源はアメリカのジャクソン研究所に由来する。また、N、NJcl、NCrj、の記号で示される系統の起源はアメリカのNIH研究所に由来する。



表 3-1 実験に用いた近交系マウス亜系の頭数と維持機関

亜系名	頭数	維持機関
C57BL/6JJcl	雌1、雄1	日本クレア株式会社、東京
C57BL/6JYok	雌1、雄1	国立予防衛生研究所、東京
C57BL/6JJms	雌1、雄2	東京大学医科学研究所、東京
C57BL/6JNrs	雌2、雄2	国立放射線医学総合研究所、千葉
C57BL/6JSlc	雌1、雄1	日本エス エル シー株式会社、浜松
C57BL/6Jah	雌4、雄4	農水省家畜衛生試験場、つくば
C57BL/6NJcl	雌1、雄1	日本クレア株式会社、東京
C57BL/6NCrj	雌1、雄1	日本チャールスリバー株式会社、横浜
C3H/HeJ	雌0、雄3	Jackson Laboratory、USA
C3H/HeJJcl	雌1、雄1	日本クレア株式会社、東京
C3H/HeJYok	雌1、雄2	国立予防衛生研究所、東京
C3H/HeJJms	雌2、雄2	東京大学医科学研究所、東京
C3H/HeJNrs	雌2、雄2	国立放射線医学総合研究所、千葉
C3H/HeN	雌0、雄3	National Institute of Health、USA
C3H/HeJah	雌4、雄4	農水省家畜衛生試験場、つくば
C3H/HeNJcl	雌1、雄1	日本クレア株式会社、東京
C3H/HeNCrj	雌1、雄1	日本チャールスリバー株式会社、横浜
C3H/HeSlc	雌1、雄1	日本エス エル シー株式会社、浜松
C3H/HeNrs	雌2、雄2	国立放射線医学総合研究所、千葉

## 2) DNAフィンガープリント

DNAは第1章の方法に従い、マウス肝臓より抽出、精製した。制限酵素は、*Pst*I、*Hinf*I、*Msp*Iを用いた。その他の操作は、第1章の方法に従った。

## 2 結果および考察

### 1) 12近交系マウスの同定

まず、12系統のすべての個体において、制限酵素*Pst*Iを用いたDFPを得た。図3-1は、その例でDDD/JahのDFP像である。左から10頭は家衛試で維持されているマウス(NIAH)、右から8頭は家衛試より神戸大学に分与されて10世代経過したマウス(KOBE)である。図が示すように、系統内のすべての個体において同じDFP像が得られ、雌雄の差も認められなかった。ここで調査したDDD系以外の11系統でも、系統内では同一のバンディングパターンを示し、異なったDFP像は認められなかった。このことからこれらマウスは遺伝的に均一で、近交系として確立されていることを示している。また、雌雄における差は検出されなかったことから、Y染色体由来のバンドは検出されなかったことも示された。DDD/Jahに関しては、制限酵素*Msp*I、*Hae*IIIについても調べたが、*Pst*Iの場合と同様に系統内で同じDFP像を示し、NIAHとKOBEの間でも変異は認められなかった。Jeffreysら(1988)の研究に示されるように、33.15由来のミニサテライト遺伝子座の突然変異は最も不安定な遺伝子座で、一世代、一配偶子あたり最高5.2%の突然変異を示し、平均でも0.4%の割合で突然変異が検出される。しかしながらDDD/Jahでは分与10世代後も、突然変異が検出できなかったことから、M13プローブによって検出されるミニサテライト領域はそれほど突然変異率が高くないものと推測できた。

図3-2は、近交系マウス12系統のDFP像である。各系統とも2kbから20kbの範囲で24~29本のバンドが検出された。全く同一のDFPを示す系統はなく、それぞれ系統特異的なバンドのパターンを示した。C57BL/6JahとC57BL/6JS1c系は共

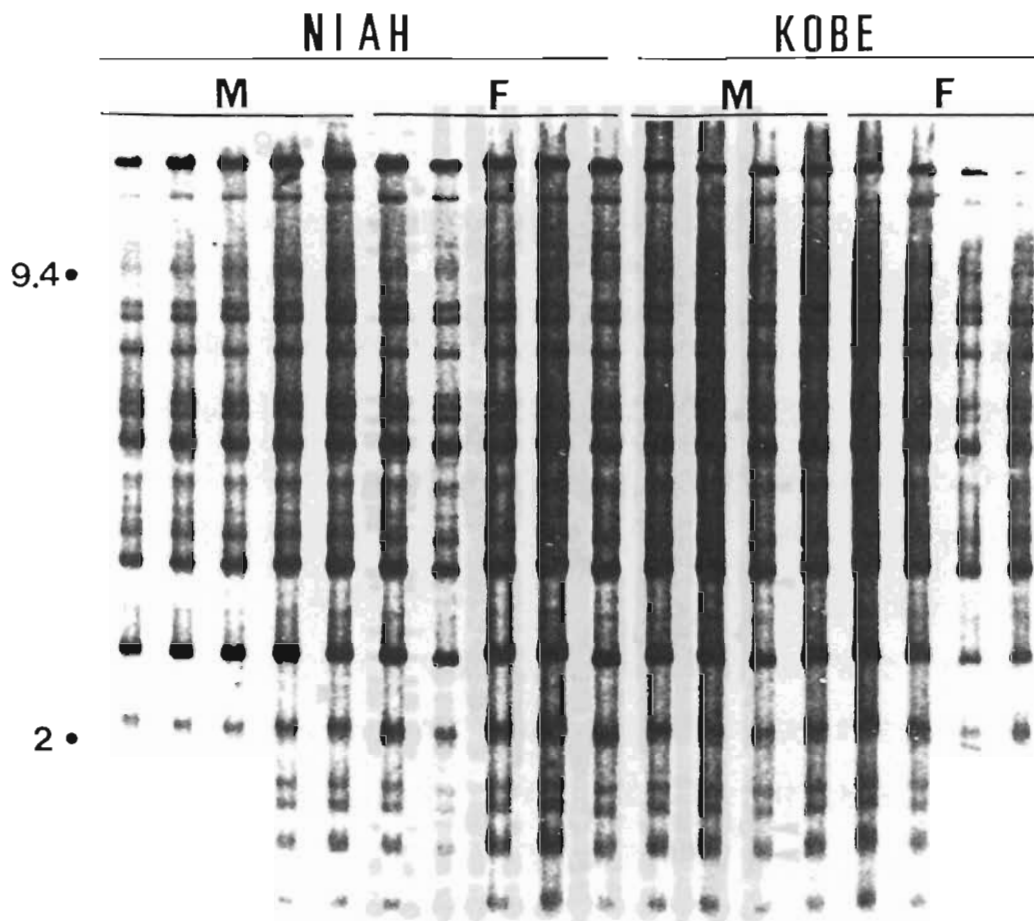


図3-1 DFP法によるDDD系マウスの遺伝的モニタリング

NIAH: 家衛試で系統維持されているDDD/Jahマウス.

KOBE: 家衛試から神戸大学に導入されたDDD/Jahマウス

M: 雄、F: 雌

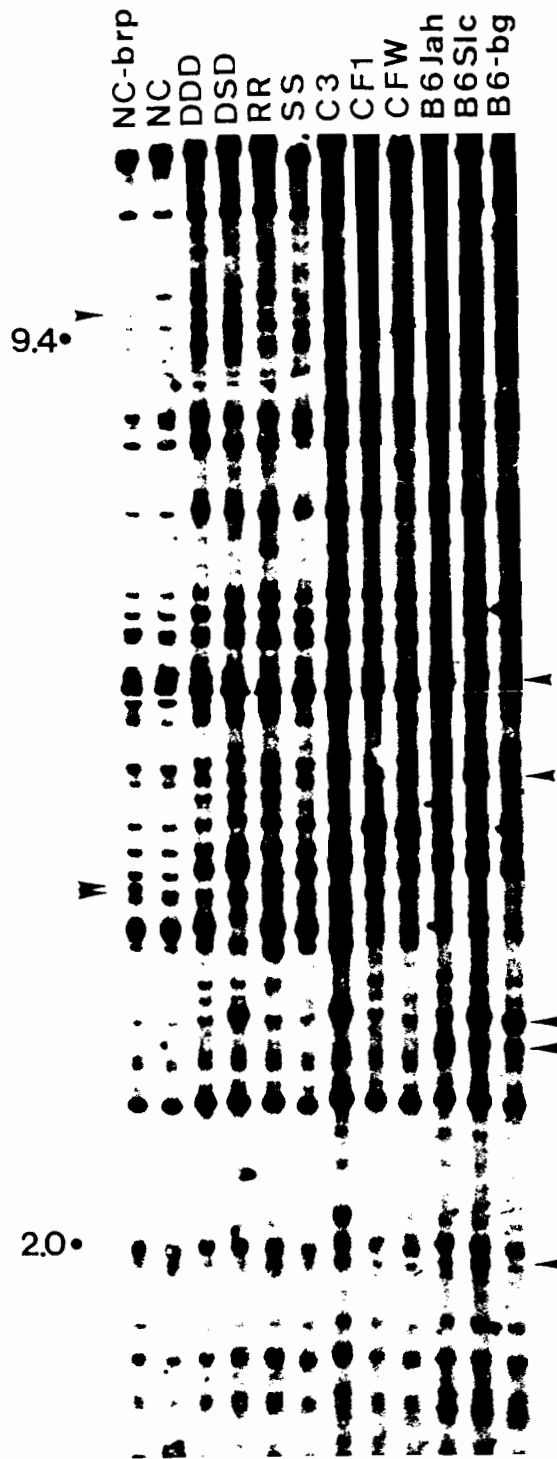


図 3-2 近交系マウス12系統のDFP像

NC:NC/Jah, DDD:DDD/Jah, DSD:DSD/Jah, RR:RR/Jah,  
 SS:SS/Jah, C3:C3H/HeJah, CF1:CF#1/Jah, CFW:CFW/Jah,  
 B6 Jah:C57BL/6NJah, B6 Slc:C57BL/6JSlc, B6-bg:C57BL/6J-*bg*.  
 図左の矢印はNC/JahとNC-*brp*で多型を示したバンドの位置を示す。  
 図右の矢印はC57BL/6系の3系統で多型を示したバンドの位置を示す。

にC57BL/6系由来である。遺伝的モニタリングに使用されている12の生化学的遺伝子座において、この2系統の遺伝子型を比較した場合、両者はすべての遺伝子座で同じ遺伝子型を示し、識別は不可能である。それにもかかわらず、DFP法ではこの2系統のバンドパターンは、図3-2の右側の矢印のバンドで多型を示し、明らかに両者の間で区別が可能であった。さらに、C57BL/6系のコンジェニック系統であるC57BL/6-*bg*、NC/Jah系のコアイソジェニック系統であるNC-*brp*は、それぞれDFP法を用いることにより分岐した系統であるC57BL/6JahとNC/Jahと区別することが可能であった。本章の実験では、C57BL/6系とC57BL/6-*bg*系間で2本、NC/Jah系とNC-*brp*系間で3本の異なるバンドを検出した（図3-2）。これらの系統間で差が検出できたバンドは、おそらく*bg*や*brp*遺伝子と関連のある突然変異というよりもむしろその他の領域のミニサテライト遺伝子座での突然変異によるものであろう。しかしながら、C57BL/6-*bg*系は他の系統からバッククロスによって*bg*遺伝子を導入されたコンジェニック系統であるため、これらのバンドはC57BL/6系に導入された*bg*遺伝子の近傍にあったミニサテライト遺伝子座のバンドである可能性も残っている。以上に示したように、DFP法により遺伝的に近縁関係にあるコンジェニック系やコアイソジェニック系統の同定や区分も可能であった。これは、ミニサテライト遺伝子座がほぼ全染色体に散在し、またその多型性が一般に用いられている生化学的標識遺伝子よりもかなり高いためと思われる。

## 2) C57BL/6系とC3H/He系近交系マウス亜系の同定

図3-3は、制限酵素 *Hinf* I を用いた亜系のDFPである。1kbから20kbの範囲で、C57BL/6系では21本から26本（平均23.8本）、C3H/He系では20本から22本（平均20.7本）のバンドが検出された。C57BL/6系の亜系では13本のバンドで多型を示し、系統特有のDFP像を示した。C57BL/6系亜系について、ジャクソン研究所由来の5系統中（JYok, JJms, JNrs, JJcl, JSlc）4系統にジャクソン研究所系統に特異的なバンドを1本検出できたが、NIH系統に特異的なバンドは検出されなかった。C3H/He系の亜系ではC57BL/6系よりも変異はかなり小さく、全体で8本のバンドが多型を示した。SlcとNCrjの2系統間とJ、JNrs、JYokの3系統間では同一

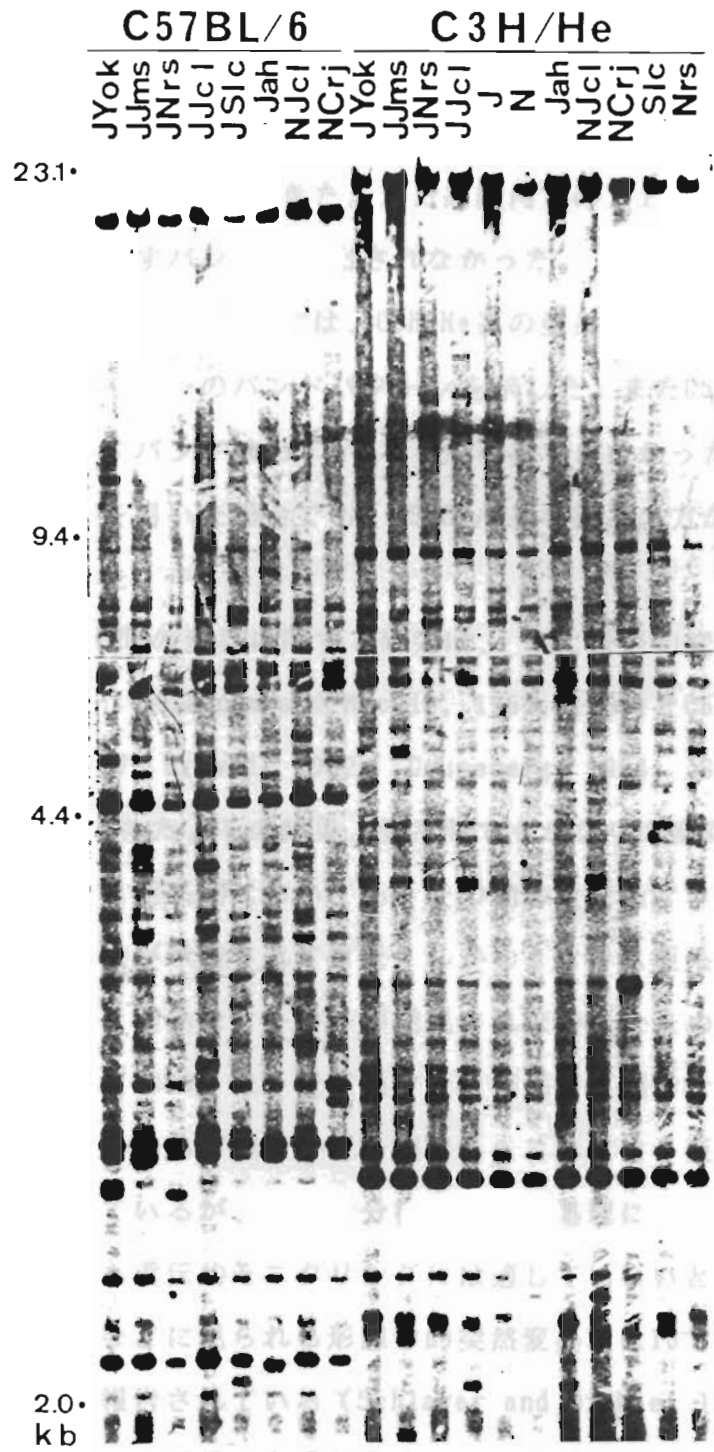


図 3-3 C57BL/6系マウスとC3H/He系マウスの亜系のDFP像

J, JYok, JJms, JNrs, JJcl, JSlcはジャクソン研究所由来の系統。  
N, NJcl, NCrjはNIH由来の系統。

のDFPパターンを示したが、その他の系統では系統特異的なDFPパターンが得られた。また、ジャクソン研究所由来のマウスでは、5系統中(JYok, JJms, JNrs, JJcl, J)5系統に見られるジャクソン特異的バンドが1本と5系統中4系統に見られるバンドが1本検出できた。また系統内でのDFPを検討したところ、系統内で多型性を示すバンドは検出されなかった。

制限酵素*Pst*Iを用いた場合では、C3H/He系の亜系では全く多型を示すバンドはなく、どの系統も同一のバンドパターンを示した。またC57BL/6系の亜系においても、多型を示すバンドはわずか5本しか検出できなかった。*Pst*Iと*Hinf*Iのどちらの制限酵素を用いた場合でも、C57BL/6系の亜系の方が系統間の多型性が高い結果が得られた。

これまで、亜系間の変異に関する研究は、主に骨格の変異に関するもので、C3H (Green, 1953; McLaren and Mickie, 1954, 1955)とC57BL (Carpenterら, 1957; Deolら, 1957; Greval, 1962; Gruneberg, 1954; Searl, 1954; Yong, 1972)で調べられてきた。その結果、亜系間でもかなりの変異が認められることが報告され、マウス亜系間においても、その他の近交系マウスと同様、遺伝的モニタリングの必要性が示唆されてきた。しかし、マウス亜系の同定やモニタリングに関する研究は、有効なマーカーが発見されなかったためにほとんど報告されていない。後藤ら(1980)は、近交系マウス亜系に下顎骨計測値をもとにした系統の判別分析、いわゆる下顎骨分析を適用し、これにより亜系間の同定が可能であることを報告しているが、下顎骨分析は、統計処理によるところが大きく、その手間から考えても遺伝的モニタリングには適していないと思われる。また、マウスなどでは骨格などに見られる形態学的突然変異率は $10^{-5}$ から $10^{-6}$ /1世代/1配偶子/1遺伝子座と報告されている (Schlager and Dickie, 1967)。一方、DFPで検出されるミニサテライト遺伝子座の突然変異率は、 $10^{-2}$ から $10^{-3}$ /1世代/1配偶子/1遺伝子座と報告されており (Jeffreysら, 1988)、骨格の突然変異率と比較して高くなっている。このことから、多くのミニサテライト遺伝子座を検出するDFP法は、遺伝的に近い関係にあるマウス亜系などの遺伝的モニタリングに有利であると考えられる。

本節の制限酵素*Hinf*Iを用いたDFPによって、遺伝的に極めて近い関係にあ

る亜系間で多数の変異が検出された。しかしながら、制限酵素 *Pst*I を用いて同様に分析した結果では、C57BL/6系の一部に多型が検出できるだけで、C3H/He系ではすべてが同一のバンドパターンを示した。これは *Pst*I は6塩基認識の酵素であるが、*Hinf*I は4塩基認識の酵素のためにより多くのDNA断片が生じたためではないかと推測できる。*Hinf*I を用いた結果でも、同一のDFPを示す系統が見られたが、このうち、JNrsは1980年代にジャクソン研究所から分与されたもので、他の亜系に比べ分岐してから日が浅くDFP法で検出できる突然変異がおこっていないため区別できなかつたものと思われる。

以上の結果から、DFP法は近交系マウスや遺伝的に極めて近い近縁関係にある近交系亜系マウスにおいても遺伝的モニタリングの有効な手段となり得ることが明らかとなった。亜系マウスの一部では、系統間に差異を検出できないものもあったが、これらについては、第1章で示したような新しいプローブを用いて検討することが有効であると考えられる。



### 第3節 DNAフィンガープリント法を用いた実験用ウサギと

#### 近交系マストミスおよび近交系ゴールデンハムスターの遺伝的モニタリング

動物実験で用いられる動物は、すでに造成されている数多くの種あるいは系統のなかから研究目的に適したものを選択するか、もしくはその研究目的に応じた動物の種、系統を既知の実験動物、家畜あるいは野性動物から新たに開発、造成するかのどちらかである。現在、実験動物に使用されている主な動物種としてはマウス、ラット、モルモットなどがあげられる。動物実験の意義はこれら動物種で得られたデータをヒトにあてはめ、人間生活をより安全かつ豊かにすることにある。当然これらの動物種の形質はヒトのそれとの共通点も多いが、それぞれの動物種によって異なる特性を持っている。よってヒトへの影響を推定するためには特定の動物種のみを用いるのではなく、様々な動物種を使用すべきである。しかしながら、現在用いられている種は少なく、また開発されつつある動物種においては遺伝的均一性などの検討はほとんど行われていないのが現状である。

我が国で使用されている実験用ウサギとしては、日本白色種（日白種、JW）、ニュージーランドホワイト種、ダッチ種などがあげられる。このうち、日白種が最も多く使用されており、国内約20のブリーダーによって、主としてクローズドコロニーとして維持、生産され、系統として供給されている。しかし、この日白種は各種動物実験の諸反応に関して系統間のみならず、個体間でもかなりの差異が見られる。一般に、系統の遺伝的均一性を検討するために用いられている方法としては、蛋白質多型を支配している遺伝子を利用する方法がある。野性ウサギや家畜ウサギではこれらに関する多型がかなり多く検出されているものの、実験用日白種ウサギ系統ではほとんど多型が検出されておらず、マウス、ラットで行われているほどこの方法は有効な手法になっていない。

また新しい実験動物としては、ハムスター、スナネズミ、マストミス、ハタネズミ、スunksなどがあげられる。マストミスは、南アフリカ・ヨハネスブルグで捕獲され、実験動物化されたマウスとラットの中間の大きさの動物である。現在ではカルチノイドや白内障のモデル動物として注目を集めている。このマスト

ミスは、アメリカのNIHから新潟大学に導入され、東京大学医科学研究所で近交系の育成が試みられた。また、長毛ゴールデンハムスターは東京のペット屋で偶然発見されて以来、家畜試で系統維持されていたアルビノ色のゴールデンハムスターとの交雑種から、長毛を選抜指標として近交を開始し育成された系統である。この2系統、特にマストミスは歴史の浅い実験動物であるために、遺伝的解析はマウス、ラットに比べてはるかに遅れており、遺伝的モニタリングに利用できる有効なマーカーがほとんど開発されていない。その結果として、これら2系統は近交系として確立しているのかどうかは確かめられてこなかった。

そこで本節では、前節でマウス近交系の有効なマーカーとなることが示されたDFP法が日白色ウサギの近交系とクローズドコロニー、近交系マストミス、近交系長毛ハムスターにおける有効な遺伝的マーカーとなるかどうか検討し、これらの系統が近交系として確立されているか、また遺伝的均一性がどの程度であるのかを調査した。

## 1 材料および方法

### 1) 供試動物

日白種ウサギは、日本生物科学研究所（日生研）で維持されているJW-NIBS 10個体、神戸大学医学部で維持されているWHHL 10個体、(有)市川屋のIcl:JW 10個体、近交系として日生研で維持されている日白種のJWY-NIBS 4個体、ダッチ種のDuY-NIBS 10個体を用いた。クローズドコロニー3系統の繁殖維持方法については、JW-NIBSは、雌230個体、雄28個体からなる6群間のローテーションシステムで維持されてきている（上田，1982）。WHHLは過去に色々な繁殖維持方式が取られてきたが（Watanabeら，1980；Shiomiら，1992）、現在は1群雌15～20個体、雄2～5個体からなる6群で構成され、各群から冠状動脈狭窄を指標に選抜された雌、雄間でローテーションシステムで維持されている。Icl:JWは、長野産の日白種由来

で、雌50個体、雄15個体を種動物としてローテーションシステムで維持されているものである。JW-NIBS、Icl:JWは、兄弟、従兄弟などの血縁関係にある個体を含めないように、WHHLは各群からもれなく1~3個体計10個体をサンプリングした。JWY-NIBS、DuY-NIBSの造成については文献に詳述されている（上田，1982；矢沢ら，1986；Gotoら，1987）。

マストミスは東大医科研で系統維持されている近交系マストミスのMRJ系とMWC系の雌2個体、雄2個体を用いた。マストミスMRJ系はオランダで1967年から近交を開始し、1988年にF48で東大医科研に導入された系統、MWCは東大医科研で同じ1967年から近交を開始した系統である。長毛ハムスターは家畜試で系統維持されている雌6個体、雄6個体を用いた。この長毛の遺伝子は交配実験から常染色体性の劣性遺伝子であることがわかっている。

## 2) DNAフィンガープリント

DNAはウサギでは全血から、マストミスと長毛ハムスターは肝臓から抽出、精製した。制限酵素は*Pst*Iを用い、プローブにはM13ファージ反復配列を用いた。その他の操作は第1章に従いDFPを得た。

## 3) 統計計算

系統内、系統間の遺伝的類似性の評価には、DFPのバンドパターンから次式により得られる percent difference (PD) (Yuhki and O'Brien, 1990)を用いた。

$$PD = [ Fab / ( Fa + Fb ) ] \times 100$$

Fa、Fbはそれぞれ個体a、bのバンド数、Fabは個体a、bの間で異なるバンド数を示している。

ウサギのクローズドコロニーの遺伝的均一性の評価には、上記PDを系統内で各個体についてpairwiseに計算し、得られた全PD値を平均し算出されるAPDを用いた。系統内のAPD値はその系統の遺伝的均一性の指標となり、値が低いほど遺伝的に均一性の高い系統であると推定できる。

## 2 結果および考察

### 1) DNAフィンガープリント法を用いた実験用ウサギの同定

図3-4は、実験用ウサギ5系統のDFPである。2kbから20kbの範囲で、1個体あたり20~28本のバンドが検出された。JWY-NIBSとDuY-NIBSは共に21本のバンドが検出され、それぞれ系統内で変異が見られず、また他の系統とは異なるパターンを示し、近交系として確立されていることが確認された。クローズドコロニーの日白種、JW-NIBS、JW、WHHLは平均23.5本のバンドが検出され、同一のパターンを示す個体はなかった。近交系として確立されている2系統よりも、クローズドコロニーの3系統の平均バンド数が多いのは、クローズドコロニーではヘテロのバンドが存在しているのに対し、近交系ではバンドがホモ化しているためにバンド数が少なくなると推測できた。

5系統すべてに共通なバンドは5本検出された。各系統に特異的なバンドは、JWY-NIBSで1本、DuY-NIBSで4本、Icl:JWで1本、WHHLで1本検出された。これらのバンドを指標にすることにより、近交系はもちろん、クローズドコロニー系統の同定が可能である。よって、DFP法は実験用ウサギの遺伝的モニタリングに有効であることが示された。

表3-2はこれらDFPをもとにして算出した各系統内、系統間のAPD値である。2つの近交系は各系統内で変異が検出されないため、そのAPD値は0になっている。日白種3系統のAPD値はWHHLの13.7からJW-NIBSの18.6とほぼ同じ値を示した。近交系を含めた5系統間のAPD値は、JW-NIBSとIcl:JW間の26.1から、DuY-NIBSとIcl:JWの52.2となったが、クローズドコロニーの日白種3系統間のAPD値は26.1から29.6と良く似た値を示した。APD値に関しては、脊椎動物の野性集団では70~90、ヒトでは76.9、アフリカライオンの閉鎖集団では44.5~51.5、カリフォルニア諸島群に生息するキツネにおける各島の平均では12.0(0~23.5)などの報告がある(Gilbertら, 1990, 1991)。APD値は用いるプローブによっても異なる値を示すものの(Gilbertら, 1991)、本節のAPD値と比較すると日白種のクローズドコロニー各系統内のAPD値は13.7~18.6となり、上記の野性動物集団よりも

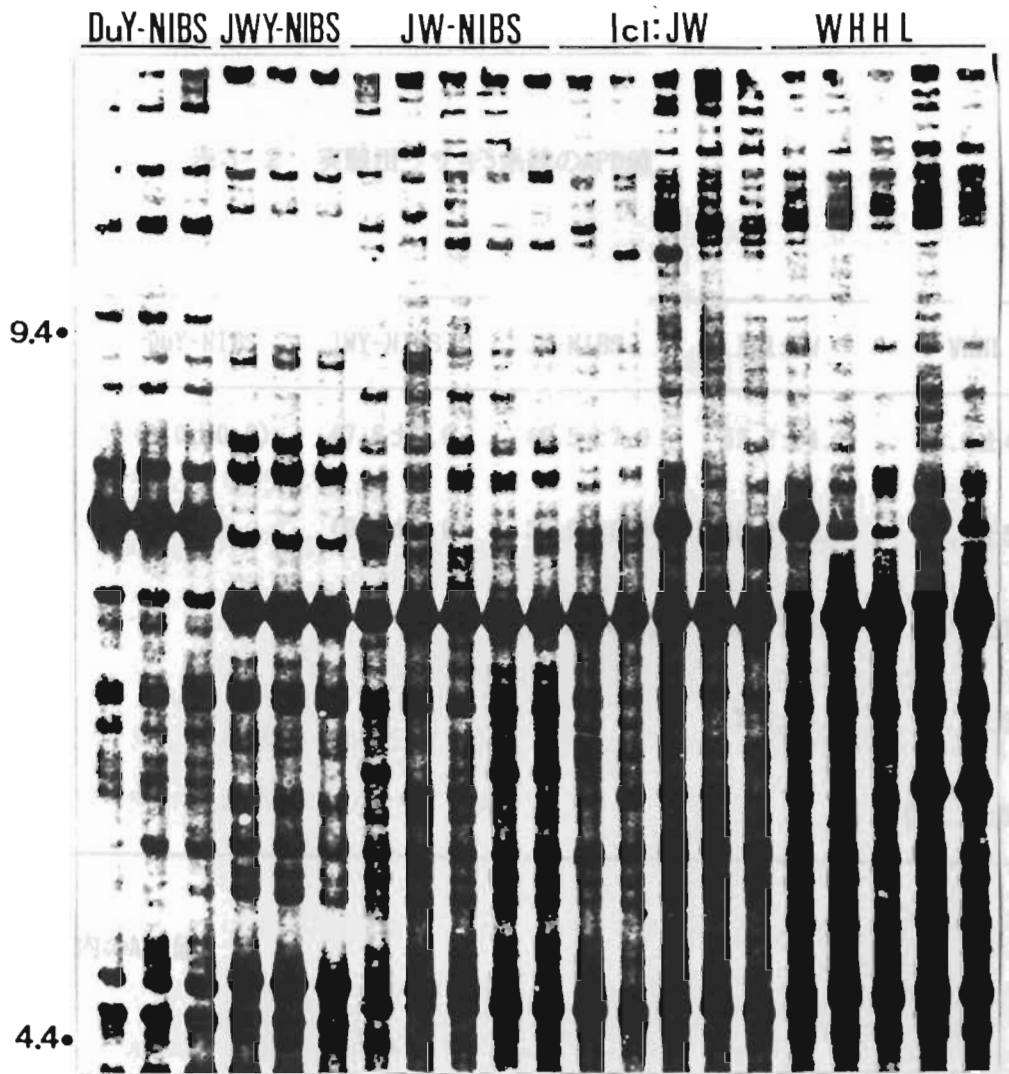


図 3-4 実験用ウサギ5系統のDFP

表3-2 実験用ウサギ5系統のAPD値

	DuY-NIBS	JWY-NIBS	JW-NIBS	Icl:JW	WHHL
DuY-NIBS	(0.0±0.0)	47.6±0.0	46.5±7.0	52.2±4.2	43.9±4.2
JWY-NIBS		(0.0±0.0)	33.0±6.0	40.2±3.1	30.0±5.1
JW-NIBS			(18.6±6.5)	26.1±4.3	28.6±7.0
Icl:JW				(17.6±4.4)	29.6±5.4
WHHL					(13.7±5.2)

( ) : 系統内のAPD値

かなり低い値を示した。これはこれら日白種3系統がかなり遺伝的変異の少ない集団、すなわち遺伝的均一性が高いことを示していると思われる。

## 2) DNAフィンガープリント法によるマストミスおよび長毛ゴールデンハムスターの遺伝的モニタリング

図3-5は近交系マストミスMRJ系とMWC系のDFP像である。1kbから20kbの範囲で、MRJ系では37本、MWC系では41本のバンドが検出された。2系統とも同一系統内の4個体は雌雄の区別なくすべて同一のパターンを示した。このことからこの2系統は、近交系として確立していることが示された。また、雌雄間で同一のバンドパターンを示したことから、Y染色体由来のバンドは検出されていないことが示された。この2系統間ではかなり多くの共通のバンドが見られたが、その内10本はこの系統間で多型を示した。

図3-6は長毛ハムスターのDFP像である。2kbから9.6kbの範囲で25本のバンドが検出された。この長毛ゴールデンハムスター12個体のすべてが同一のバンドパターンを示した。このことは、上記のマストミスと同様、この系統が近交系として確立していることを示している。また、雌雄差がないことからY染色体由来のバンドは検出されていないことが示された。

これまで実験動物の代表格であるマウス、ラットの遺伝的モニタリングは、様々な標識遺伝子を用いて行われてきている。しかしながら、これら以外の実験動物では肉眼で観察できる毛色以外は有効な標識遺伝子は開発されていない。従って、これらの実験動物では厳密な遺伝的モニタリングは行われていないのが現状であり、理論上では近交系として確立しているはずの動物も科学的な検証が行われていない。結果として、飼育操作の誤りによる遺伝的汚染も見過ごされがちである。本節では、供試動物にこの様な余り遺伝的解析が行われていない実験用ウサギ、マストミス、ゴールデンハムスターに対してDFP法を適用した。その結果、3種の実験動物とも、多数の分離したバンドが検出された。また近交系と考えられた系統ではすべて、DFPは同一のバンドパターンを示し、これらの系統

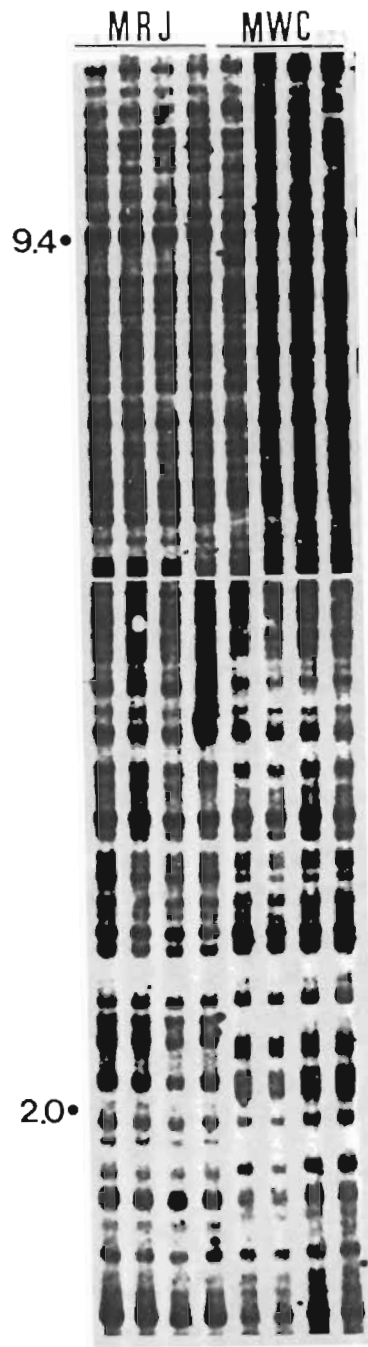


図3-5 DFP法による近交系マストミスMRJ系とMWC系の遺伝的モニタリング



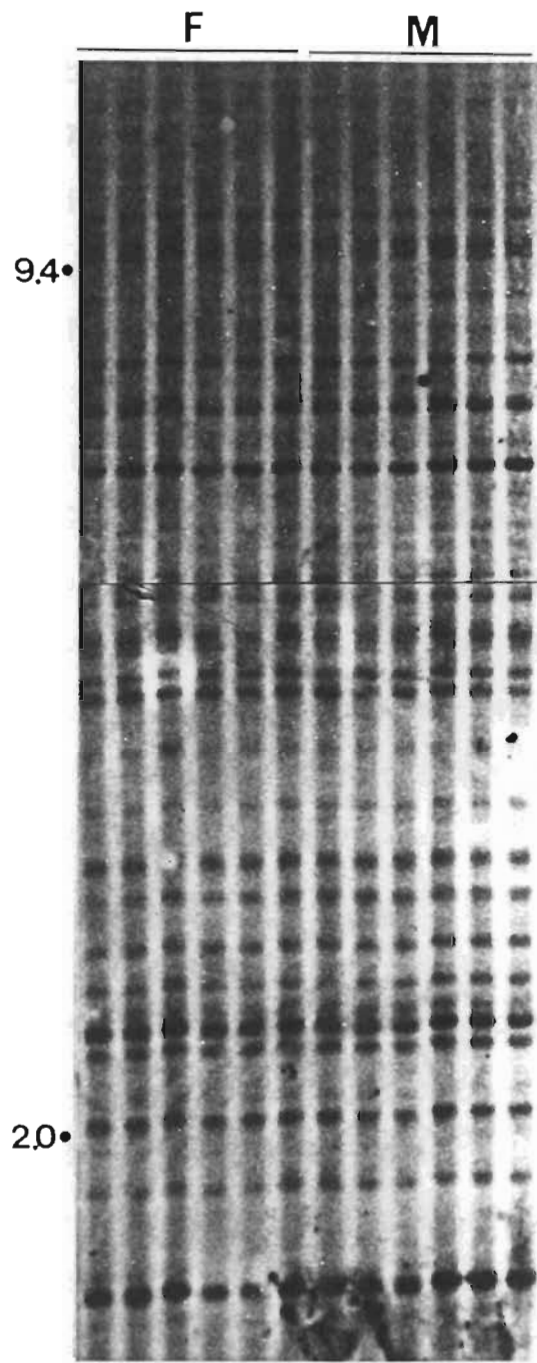


図3-6 DFPによる近交系ゴールデンハムスターの遺伝的モニタリング

F: 雌、M: 雄

が遺伝的に均一で近交系として確立されていることが示された。これらのことから、DFP法は有効な標識遺伝子が開発されていない実験動物種に対して極めて有効な手段となり得ることが明らかになった。特に、これから新たな近交系を実験動物として育成しようとする場合、近交系として確立されているかどうかをチェックする方法として有効な手法になると思われる。

## 第4章 DNAフィンガープリントを用いた遺伝的類縁関係の解明

### 第1節 緒言

野性動物では、その動物が持つ遺伝様式の解明のために集団間の遺伝的類縁関係の研究や分類の研究がよく行われてきている。家畜や家禽、あるいは最近では実験動物など、ヒトが改良や交配、選抜などを行っている動物種においても、品種や系統の分岐点が明確でなかったり、新しい品種や系統の導入、また不正確な記録などのために、はっきりした遺伝的類縁関係や背景がわかっているものは少ない。これら遺伝的類縁関係を知ることは、系統間や品種間の遺伝的特性を理解するうえでも重要であるし、またそのことによって家畜の育種計画では遺伝的変異を保ち、近親交配を避けて交配計画を立てることが可能となると思われる。

これまで、集団や系統、あるいは個体間の遺伝的構成や遺伝的類縁関係を調べるためには、個体識別や親子鑑別と同様、血液型や蛋白質多型などが用いられてきた。しかしながら、それらの形質は遺伝的変異が比較的少ないことや一度の分析では1遺伝子座の情報しか得られず、多くの分析が必要であった。DFP法は、操作の点では血液型や蛋白多型と比較してやや複雑なものの、一度の分析で多くのミニサテライト遺伝子座を検出するため、非常に情報量が高くなる。またミニサテライト領域は遺伝子としての情報を担わないため、この領域に突然変異が起こったとしても基本的に生物の生死には関係がない。そのためその突然変異はゲノム中に蓄積され、非常に多型性の高い領域となる。このことは、第3章において遺伝的に非常に近い近縁関係にあるマウス亜系間においても変異が検出されたことから明らかである。

これまでに、DFP法を用いて集団や系統の遺伝的類縁関係を調べた報告は少ない。Kuhnleinら(1989)は、同じ祖先集団に由来しているニワトリ4系統を用いてDFPを適用したところ、そのデンドログラムはそのニワトリ系統が分岐してきた歴史と一致していることを認めた。また、Gilbertら(1990)は、野性動物のキツネの集団についてDFPを適用している。これらの結果は、DFP分析

が遺伝的類縁関係を調べるのに有効であることを示していた。そこで本章では、第3章で実験動物の遺伝的モニタリングのDFPを用いて、12の近交系マウス、C3H/HeとC57BL/6の近交系亜系マウス、クローズドコロニーを含む実験用ウサギの5系統の遺伝的類縁関係を調べ、これらの遺伝的類縁関係を明らかにすると共に、DFPの有効性を検討した。また、日本ウズラ大小選抜系を用いて、その系統の分類が可能であるかどうか、系統内、系統間での遺伝的特性などについての検討を行った。

## 第2節 材料および方法

### 1) 供試動物

12系統の近交系マウス、近交系亜系マウス、実験用ウサギのDFPは、第3章で得たものを用いた。

日本ウズラは、佐賀大学農学部で維持されている3系統を用いた。これは、6週令の体重が大(LL系)、小(SS系)で選抜された2系統と、体重による選抜を行っていない対照閉鎖集団の1系統(RR系)である。この3系統は現在までにLL系で60世代、SS系で59世代、RR系で50世代経過している。3系統とも雌雄関係なくランダムに6個体を選び、本実験に供した。

### 2) ウズラのDNAフィンガープリント

日本ウズラのDNAは、第1章の方法に従って、全血より抽出、精製した。制限酵素は、*Hae*IIIを用いた。電気泳動、サザントランスファー、およびハイブリダイゼーションは第1章の方法に従って行った。プローブにはM13ファージの反復配列を用いた。洗浄条件は、2×SSC、0.1% SDS溶液中、60°Cで1時間、その後、1×SSC、0.1% SDS溶液中、60°Cで30分間行った。

### 3) デンドログラムの作成

マウス近交系、マウス亜系間の遺伝的類縁関係の推定に用いる遺伝的距離には、第3章で示した、DFPから得られるPDを用いた(Yuhki and O'Brien, 1990)。遺伝的距離をPDにすることにより、デンドログラムの分岐枝の長さはPD値を示し、系統の分岐年数との比較が容易になる。また、近交系は系統内の個体間に変異がないため、系統内のデータには分散が生じない。したがって、系統間のデンドログラムは、PDに最長距離法を適用して作成した(Lance and Williams, 1967)。

実験用ウサギの遺伝的距離には全個体のPD値を平均して算出されるAPDを用いた。この系統間、系統内のAPD値は表3-2に示した。系統間のデンドログラムの作成には、このAPD値をもとにしてUPG(Unweighted Pair-Group Clustering)法で

作成した。デンドログラム作成法がマウスの場合と異なるのは、クローズドコロニーを含むため系統内に分散が生じるためである。

日本ウズラの場合は遺伝的距離と分岐年数との比較を行わないため、その遺伝的距離は比較的容易に計算できる方法、つまりDFPバンドの有無をデータにしてユークリッド距離を算出する方法を用いた。デンドログラムは、この値をもとにしてウォード法 (Ward, 1963) で作成した。

### 第3節 結果および考察

#### 1) マウス近交系12系統の遺伝的類縁関係の解明

第3章のマウス12系統のDFPから作成したデンドログラムを図4-1に示した。まず、そのクラスターは大きくC57BL/6グループとその他の系統が構成しているクラスターに分れた。マウスの遺伝的類縁関係を調べた報告では、Taylor (1972)による生化学的標識遺伝子を用いて調べた研究と、後藤ら (1981、1982)によるマウス下顎骨を用いて調べた研究がある。これらの報告によれば、C57BL/6系統は遺伝的にその他の系統と分岐している傾向にあり、本論文の結果と同一の傾向を示した (図4-1)。

NC/JahとNC-*brp*が非常に近縁関係にある1つのクラスターを形成しているのは、NC-*brp*はNC/Jahから派生したコアイソジェニック系統であり (後藤ら, 1977)、当然の結果と言える。この2つの系統は分岐してから50世代が経過している。ここからM13ファージプローブによって検出されるミニサテライト遺伝子座のおおよその突然変異率が計算できる。この2つの系統では、合計65本のバンドのうち3本が多型を示した。よって、 $3/65 \div 50$  (世代)  $\approx 0.001$ である。しかし、その突然変異がその近交系に固定しないことも考えられるので、実際にはその2~3倍の突然変異率であると考えられる。この値は、Jeffreysら (1988)が報告しているミニサテライト遺伝子座の平均突然変異率0.004と良く似た値と言える。

また、DDD/JahとDSD/Jahは同じクラスターを形成したが、これら2つの系統は共通祖先のクローズドコロニーdd系から由来しており、そのために遺伝的に似ているためだと思われる。NC系とRR系も比較的近い類縁関係にあるが、これはこの2つの系統だけが日本マウスに由来しているためだと考えられる。

この様に、DFP法は一度の分析結果でも正確な遺伝的背景を反映しており、未知の系統や集団間の遺伝的類縁関係の推測に有効であると考えられる。

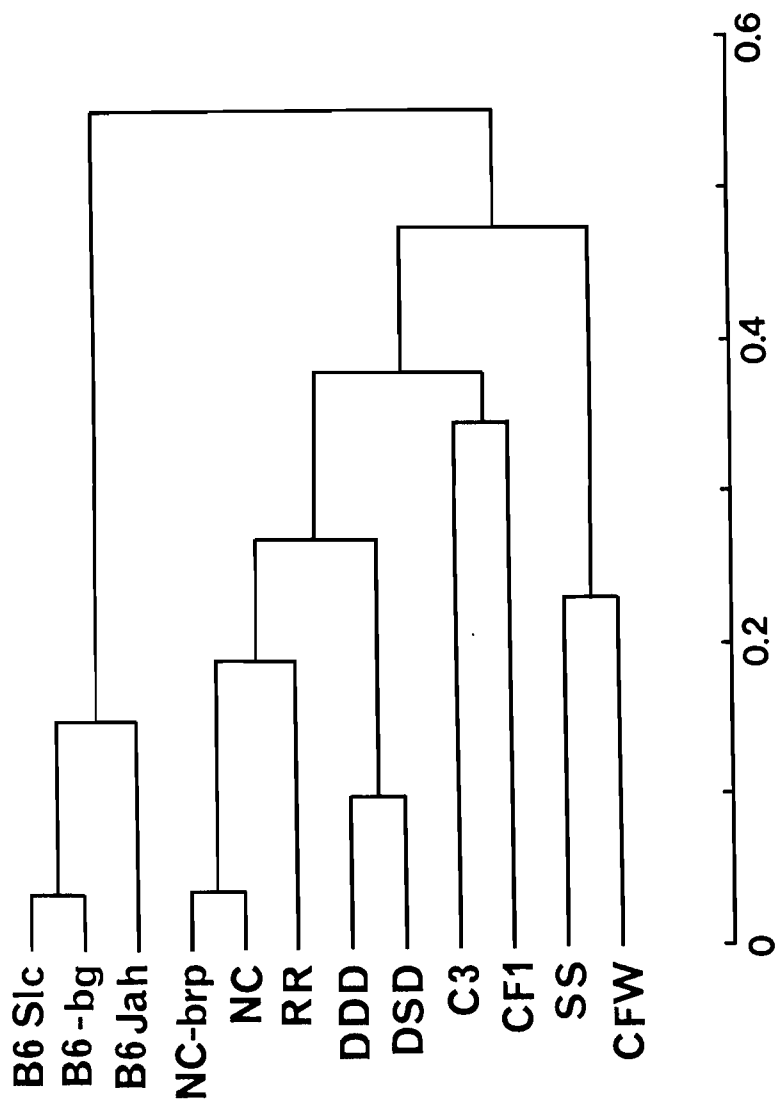


図 4-1 D F P に基づくマウス12系統の遺伝的類縁関係

NC:NC/Jah, DDD:DDD/Jah, DSD:DSD/Jah, RR:RR/Jah,  
 SS:SS/Jah, C3:C3H/HeJah, CF1:CF#1/Jah, CFW:CFW/Jah,  
 B6 Jah:C57BL/6NJah, B6 Slc:C57BL/6JSlc, B6-bg:C57BL/6J-bg



## 2) 近交系マウス亜系C57BL/6とC3H/Heの遺伝的類縁関係の解明

マウスにおいて遺伝的類縁関係を研究する場合、一般的には生化学的標識遺伝子を用いる。しかし、遺伝的に非常に近縁関係にある亜系では、これらは多型を示さない。したがって亜系マウスの類縁関係の研究は、下顎骨を用いる方法（後藤ら, 1980）以外はほとんど試されてこなかった。前述したマウス12系統の結果では、亜系の系統間においてもD F Pが多型を示し、亜系に対する遺伝的類縁関係を研究するのにD F P法は、有効な方法となることが期待される。第3章の実験結果から、C57BL/6系の8系統とC3H/Heの11亜系統のD F PはC3H/He系の一部を除いて多型を示した（図3-4）。このD F Pをもとに作成されたデンドログラムが、図4-2である。その結果、そのデンドログラムはC3H/He系とC57BL/6系の2つの大きなクラスターに分れた。C3H/He系では、J、JYok、JNrsの3系統間とSlcとNCrjの2系統間では多型が認められなかったため、区別はできなかった。

図4-3、4-4はそれぞれ、C57BL/6系とC3H/He系の亜系の遺伝的な系図である。C3H/He系もC57BL/6系のどちらとも、大きくジャクソン研究所由来のマウスとNIH由来のマウスとに分れるが、C3H/He系ではC3H/HeJahやC3H/HeSlcのようにヘストン研究所由来のマウスやC3H/HeNrsのように由来がはっきりとわかっていない系統もある。

D F Pから得られたデンドログラムからC3H/He系では、ジャクソン研究所由来の系統とNIH由来の系統は大きく分れた。この実験で用いられたC3H/HeJ系は、最も早く分岐したもので11年しか経っておらずそのため同じD F P像が得られた系統が多いのであろう。逆に、JとJJc1の間では、わずか4~5年しか経っていないものでも多型の見られる系統もある。その反面、C3H/HeN系では最も分岐の遅いもので13~14年が経過しており、そのデンドログラムは系図の遺伝的背景と良く一致していると言える。

C57BL/6系では、ジャクソン研究所由来のJJms、JJc1、JSlcが形成しているクラスターとJYokとJNrsが形成しているクラスターは別々になり、この2つのクラスターの間にはNIH系がクラスターを構成した。この理由はよく解らないが、考えられる理由として、1) 図4-3に見られるように実験に用いたC57BL/6亜系の遺伝的歴史はよく解っていない、2) C57BL/6N系はC57BL/6J系に由来している、

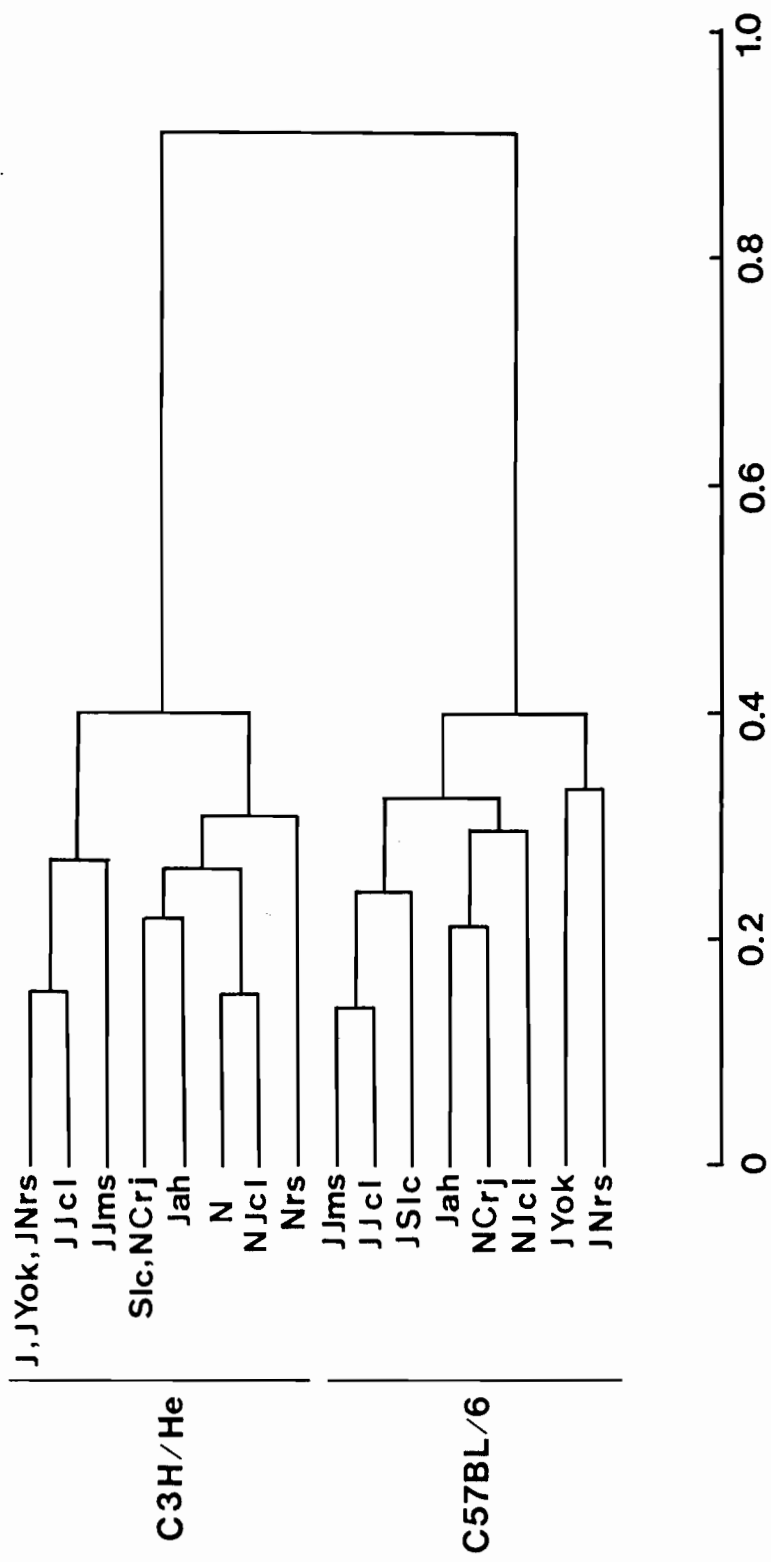


図 4-2 DFP に基づく近交マウス垂系の遺伝的類縁関係

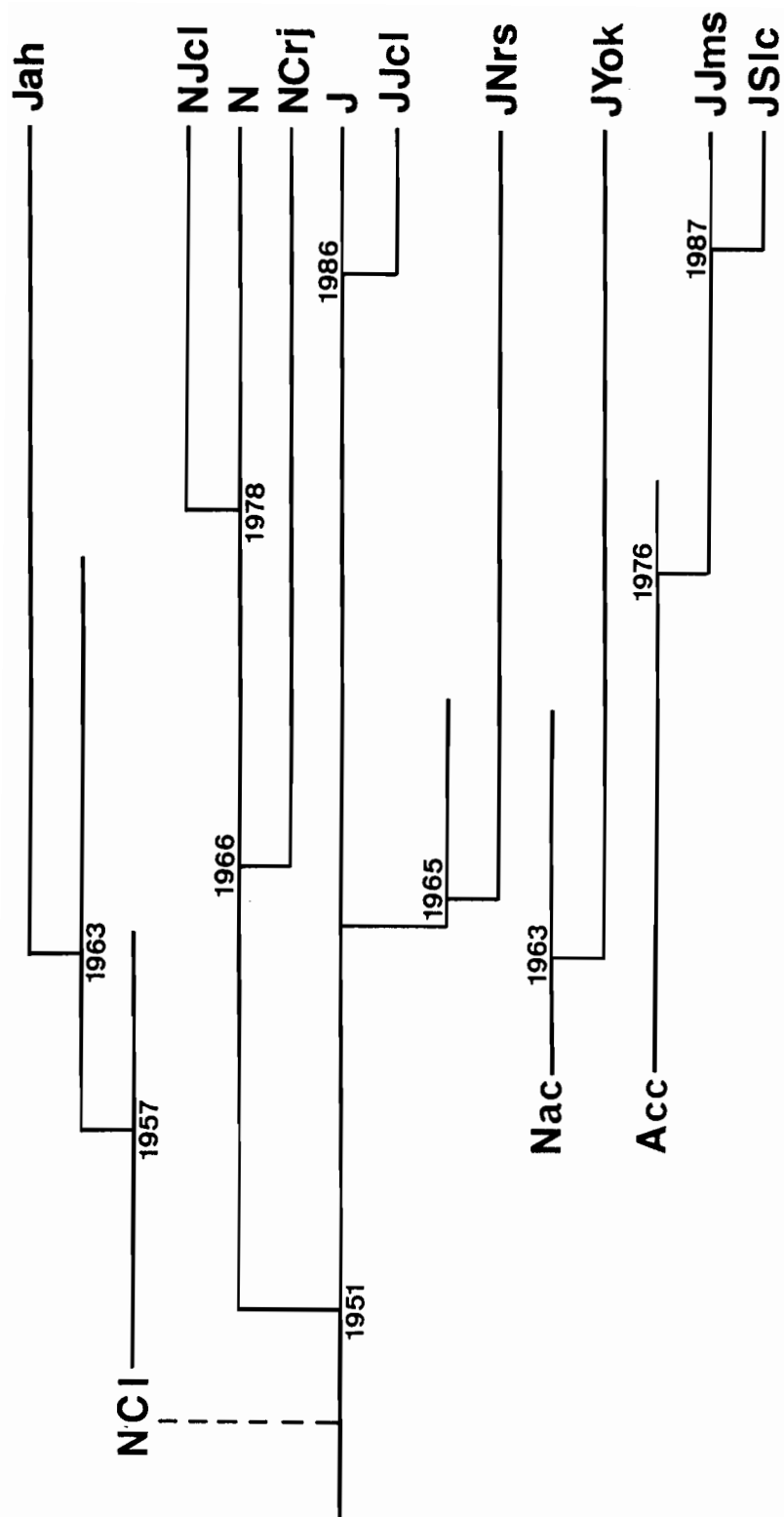


図 4-3 実験に用いたC57BL/6亜系マウスの系図

Nac:国立ガン研究所、Acc:愛知ガン研究所、  
 NCI:National Cancer Inst. (U.S.A)

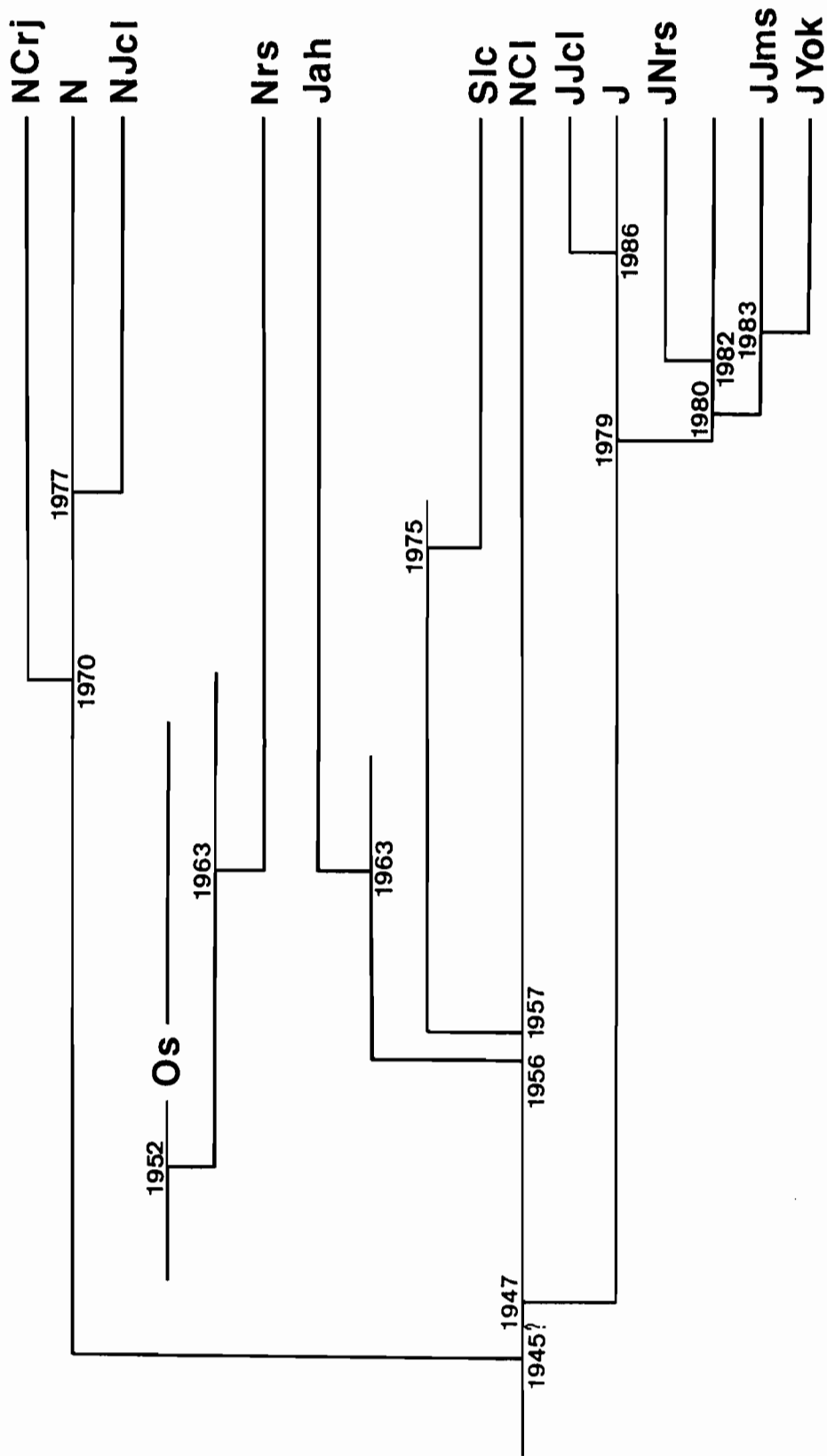


図 4-4 実験に用いたC3H/He垂系マウスの系図

NCI:National Cancer Inst. (U.S.A)、Os:大阪大学医学部

3) C57BL/6J系とC57BL/6N系は1951年に分岐しているが、JYok、JJms、JS1c、Jah系がC57BL/6J系から分岐したのが1951年前後、あるいはそれ以前に分岐したためであると考えられる。遺伝的背景が良く反映されている例としては、JS1cとJJmsであり、JS1cは1987年にJJmsから系統分与されたものであり、かつ同じクラスターを構成している。

このように遺伝的な歴史に基づく系図とDFPから得られたデンドログラムではやや矛盾するところもあるが、おおよそその歴史的背景を反映していた。系図と大きく異なっている系統があった理由としては、亜系は分岐してからまだ長く40年程度であるので、M13ファージ反復配列をプローブとするだけでは多型性のあるバンドが十分でないことがあげられる。C57BL/6とC3H/Heはどちらの系統とも、1950年頃にジャクソン研究所とNIHの系統は分岐しており、J系とN系が分岐してからわずか40年しか経ていない。これは世代に換算して、分岐してわずか120~160世代にあたりと考えられ、1つのプローブを用いて多くのミニサテライト遺伝子座の突然変異を検出できるには限界があると考えられる。さらにプローブを増やして研究を行うことが、今後重要であると考えられる。

しかしながら、これまでは生化学的遺伝標識を用いても亜系間で変異が見られた例はこれまでほとんどない。このことは、DFP法で検出されるミニサテライト領域は非常に高い突然変異率を有していることを示している。よって、亜系間のような非常に近縁関係にある類縁関係の解明には、DFPは非常に有効な手法となることが示唆された。

### 3) 実験用ウサギの遺伝的類縁関係

第3章の実験用ウサギのDFPから作成したデンドログラムを図4-5aに示す。このデンドログラムは、大きくは日白種とダッチ種の2つのクラスターから構成されており、日白種の中でも近交系のJWY-NIBSとクローズドコロニーの3系統の2クラスターに分類された。

後藤(1991)は15のブリーダーで維持されている日本白色種18系統について下顎骨分析、血漿蛋白多型分析を行い、これらの系統間の遺伝的均一性、系統間

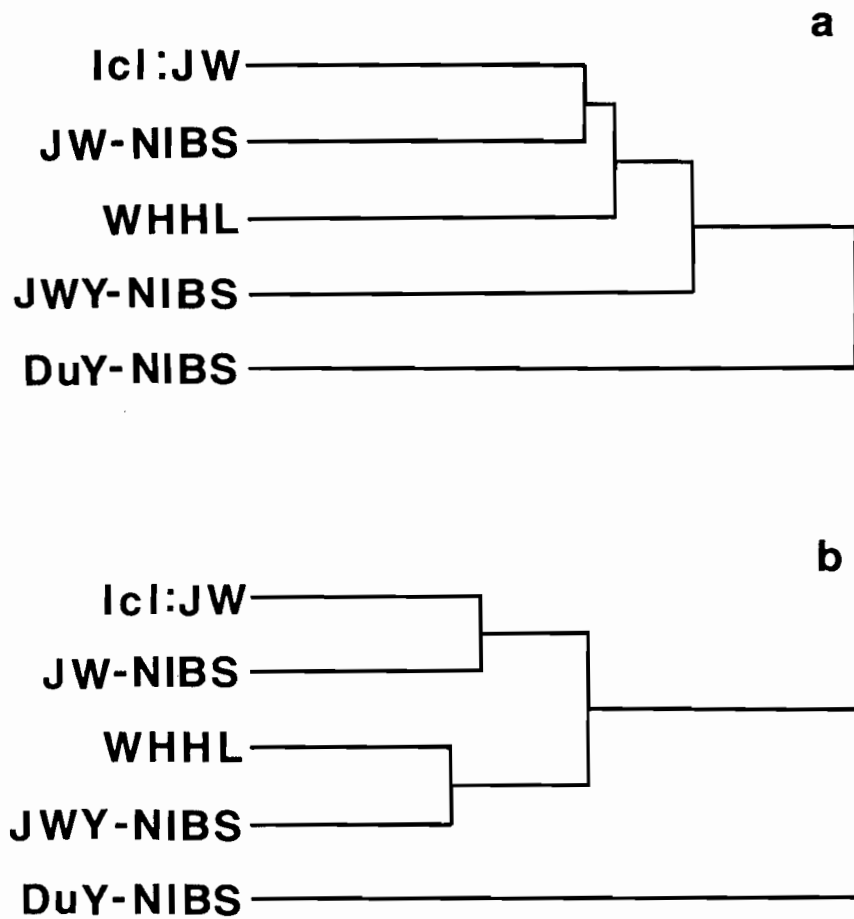


図4-5 DFPに基づく5系統の実験用ウサギの遺伝的類縁関係

a: DFP、b: 下顎骨

の遺伝的類縁関係を検討した。図4-5bは、本章で用いた5系統について、既報（Gotoら, 1987; 後藤, 1991）の下顎骨12部位計測値を用いてデンドログラムを作成したものである。ただし、この図は下顎骨の大きさを補正したデータ（各個体につき全部位計測値の総和を求め、そこから各部計測値を除いた値）をもとにしている。この結果を図4-5aのDFPにもとづくデンドログラムと比較すると、両者とも日白種とダッチ種の2クラスターに分類されており、この点ではほぼ一致した結果が得られている。Wayne and O'Brien (1986) は近交系マウスを用い下顎骨の形態にもとづく系統間の形態的距離（マハラノビスの距離）と生化学的遺伝子座にもとづく遺伝的距離（Neiの距離）とを比較したところ、両者間には関連がないと報告している。しかし、Festing and Roderick (1989) は系統として複数の亜系と野性由来の近交系を加えて同様に分析したところ、両者の間には高い正の相関が見られたと報告しており、意見の相違が見られる。本実験において、DFP法による分析結果ではクローズドコロニー3系統と近交系のJWY-NIBSとは別のクラスターを形成しているが、下顎骨分析の結果ではIcl:JWとJW-NIBS、WHHLとJWY-NIBSがそれぞれ別のクラスターを形成しており、若干の相違が見られた。Wayne and O'Brienが用いた供試動物は遺伝的に近い近交系マウスであるために相関が得られなかったが、Festing and Roderick は野性由来の近交系を加えているために正の相関が検出されやすい結果になったと思われる。本実験においても、遺伝的にかげ離れたダッチ種と日白種の間相関は見られたが、日白種内ではDFPと下顎骨では異なった結果が得られている。また、JWY-NIBSは、JW-NIBSと同じ東京都府中市の農家由来の近交系であったが、この系統間がやや遠い遺伝距離にあるのは、基礎個体群の後者系統との遺伝的構成の相違、あるいは近交系確立過程における特定遺伝子型への固定のために、JW-NIBS含むクローズドコロニーの3系統と遺伝的にかげ離れていると思われる。

これらの結果はDFPがクローズドコロニーを含む系統間の遺伝的類縁関係の解明にも有効であることを示している。

#### 4) 体重選抜ウズラ系統の遺伝的構造の分析

図4-6aはウズラ3系統のD F P像である。一世代、約50個体で維持されている系統から6個体を用いて比較した。40cmの寒天ゲル上で各バンドはよく分離し、1kbから20kbの大きさの間に少なくとも45本のバンドが検出された。そのすべてのバンドは多型を示し、ウズラ間で固定されているバンドは1本もなかった。各系統6個体のうち5個体以上共通なバンドをその系統に共通なバンドと仮定すると、図4-6aに示すようにL L系とS S系では6本の共通バンドがあり、R R系では3本の共通バンドが認められた。Dunningtonら(1990, 1991)は白色プリマスロックの体重大小選抜系の30世代の近交系を用いて同様の研究を行っているが、54本のバンドのうち28本が共通のもので、その割合は52%にのぼるとしている。これに対し本研究ではL L系とS S系が11%、R R系が7%で、彼らの研究に比べて著しく低い値となっている。Dunningtonら(1990, 1991)の研究と本研究では用いた材料が白色プリマスロックとウズラ、選抜世代が30世代と60世代、用いたプローブがJeffreysら(1985a)の33.6とM13ファージの反復配列であるといった大きな違いがある。特にプローブの違いは結果に大きく影響すると思えるので、この結果はM13ファージ反復配列がウズラの系統の遺伝的特性の分析に特に有効であることを示すものと考えられる。

今、2個体が同一バンドを共有する割合を示すBS値を各系統内で比較すると、L L系では $0.62 \pm 0.12$ 、S S系で $0.79 \pm 0.10$ 、R R系で $0.57 \pm 0.16$ であった。S S系でBS値が高い傾向があつて、この系統がより遺伝的に固定が進んでいると言える。現にS S系ではもはや体重の選抜に反応しなくなっている。一方、多型蛋白質の分析から、Ardiningsasiら(1992)は、この集団の平均ヘテロ接合度がL L系で0.36、S S系で0.37、R R系で0.43とL L系とS S系間で大きな差異はないとしている。ここで示した結果は、特にS S系での結果とは異なっている。

また、Kuhnleinら(1990)は、BS値(x)から集団の近交係数(y)を推定できることを示している。今、3集団、L L系、S S系、R R系の全平均のBS値0.317を選抜開始前の値と考えると、近交係数は $y = -0.463 + 1.463x$ 、で与えられる。それをもとに計算するとL L系の近交係数は44%、S S系は69%、R R系は37%であった。一方、選抜世代数より計算した値( $\Delta F = 1/2Ne$ 、Neは集団の大きさ)



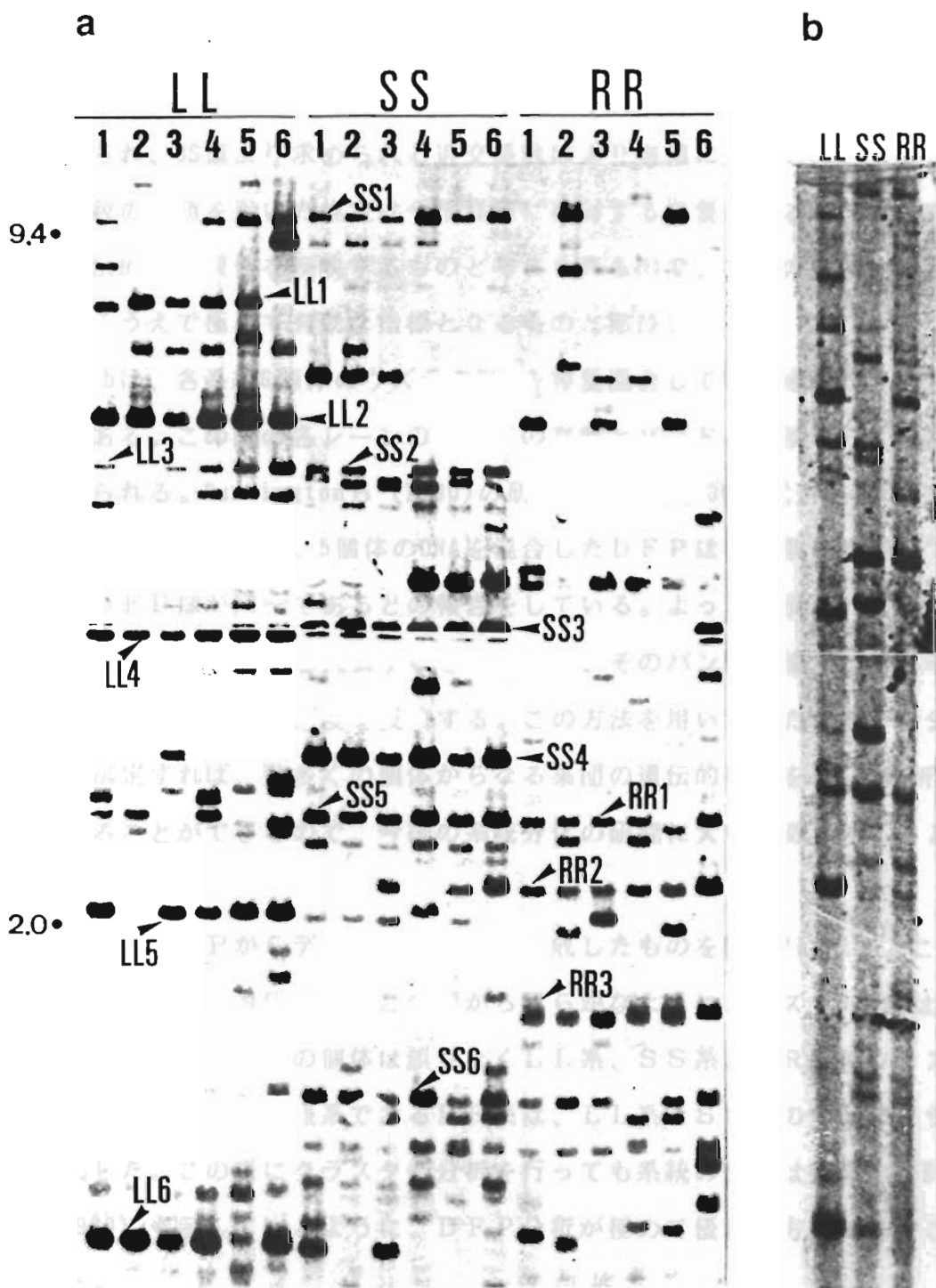


図 4-6 体重大小選抜系ウズラの D F P 像

a: 系統内個体間の比較、番号は個体番号、LLは体重代選抜系、SSは体重小選抜系、RRはランダム集団、b: 混合DNAサンプルによる系統間の比較

は、LL系で73%、SS系で72%、RR系で52%であった。本試験で用いたウズラの系統では各世代とも、ペア毎に後代を残し、かつ、4世代遡って近交を回避した交配方法が取られているので、近交係数は後者の値と比べてより低い値が妥当と考えられ、BS値より求められる近交係数はより真値に近いものと推定される。近交係数のBS値を用いた推定は今後詳細に検討する必要があるが、このBS値は実際の遺伝的な均質性を反映するものと考えられるので、集団の遺伝的構造を明らかにするうえで極めて有効な指標となるものと期待された。

図4-6bは、各系統6個体のウズラのDNAを等量混合して電気泳動して得られたDFPである。この図の各レーンのバンドの有無とバンドの濃淡から3系統の違いが認められる。Dunningtonら(1990)の研究によると、30世代選抜後の白色プリマスロックの系統では、5個体のDNAを混合したDFPはどの個体を用いても系統内ではDFP像が同一であるとの報告をしている。よって、混合DNAによるバンドパターンはその系統を代表するものとなり、そのバンドの濃淡はそれぞれのバンドの各集団の遺伝子頻度を反映する。この方法を用い、得た像をデンストメーターで測定すれば、数多くの個体からなる集団の遺伝的構造を1度の分析で明らかにすることができるので、今後の系統分化の研究に大いに寄与することになると思われる。

図4-6aのDFPからデンドログラムを作成したものを図4-7に示す。この図内の番号は図4-6aに対応する。この図から明らかなように、ウズラ3系統は3グループに区分された。各々の個体は誤りなくLL系、SS系、RR系のクラスター内に区分された。また対照系であるRR系は、LL系とSS系の中間にクラスターを形成した。この様にクラスター分析を行っても系統の分類は容易で、Kuhnleinら(1989)も示しているように、DFP分析が極めて優れた方法であることが示された。

本章では、遺伝的類縁関係の解明や集団の遺伝的構造の分析にDFP法が有効かどうかを検討した。その結果、マウス12系統を用いた分析では、それらマウスの遺伝的歴史背景を良く反映していた。さらにそれらよりも非常に近い類縁関係

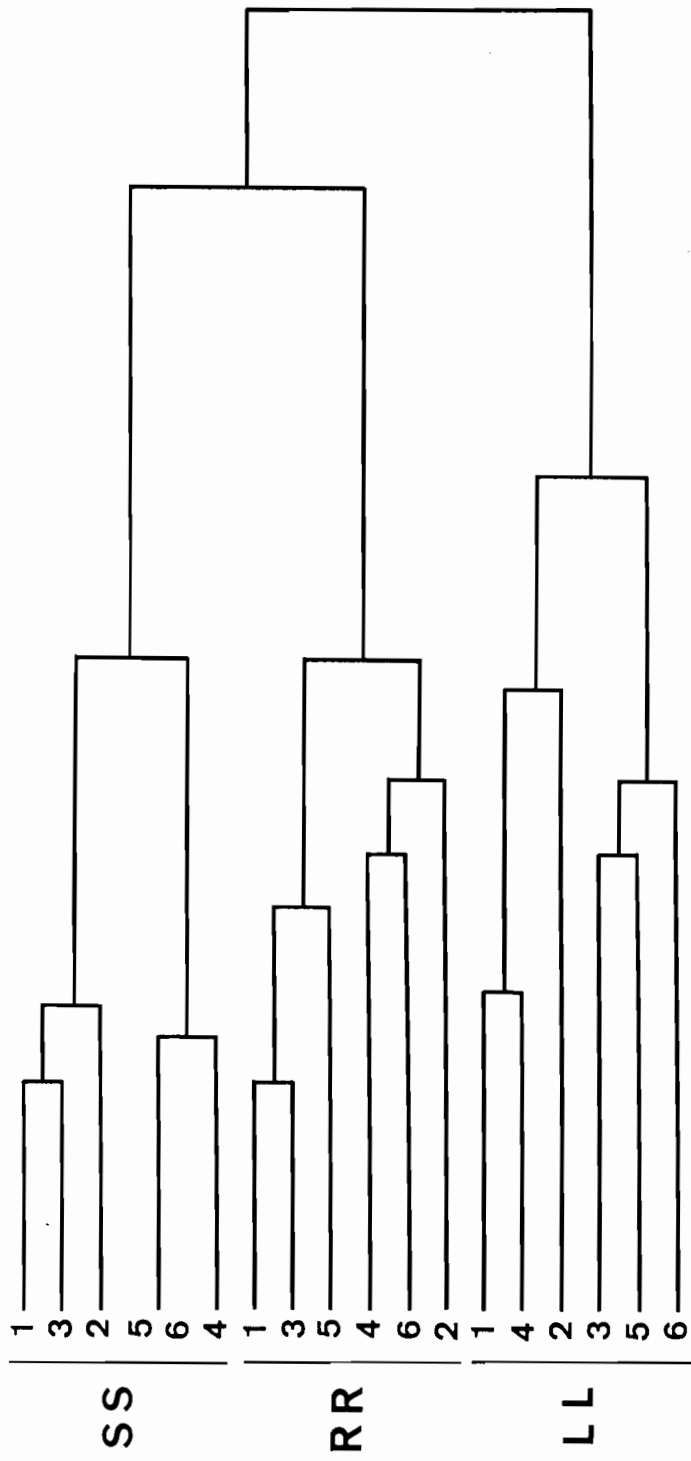


図 4-7 DFP に基づく体重大小選抜系ウズラの遺伝的類縁関係

番号は図4-6aの個体番号と一致

にあるマウス亜系の分析でも良く多型が検出されることは興味深いことであり、これまで分析がほとんど不可能であった亜系に関する遺伝分析をDFPを用いることによって可能になることが示された。閉鎖集団である実験用ウサギや選抜系ウズラに関するその遺伝的背景、遺伝的構造を良く反映しており、近交系のみならず遺伝的変異を持つ集団における分析においてもDFP法は極めて有効な手法となることが示された。

## 第5章 DNAフィンガープリント法を用いた血縁係数の予測

### 第1節 緒言

自然集団や家畜集団の遺伝的構造の研究には、これまでに血液型や多型蛋白質、DNAプローブを用いたRFLPなどによる数多くの研究がなされてきた (Hoelzel and Amos, 1988; Lewontin, 1974; Nevoら, 1984; Quinnら, 1987)。また近年では、DFP法の適用もなされるようになった (Burke, 1989; Burkeら, 1989; Gilbertら, 1990; Jeffreys and Morton; 1987; Reeveら, 1990; Wettonら, 1987)。集団遺伝学の研究にDFP法が有効であるのは、1) 一度の分析で数多くの遺伝子座を検出できる、2) 検出される遺伝子座は多型性が高い、3) 適用する種に対する特異的なプローブを開発する必要がないため、すぐに分析が可能、等である。これら報告の多くは、集団内での遺伝的変異性を調べたり、集団間での比較を行う調査などであった。その他の適用として、Kuhnleinら (1989)は、祖先を同じにするニワトリの7系統の分析を行って、DFPによる系統樹がそれら系統の歴史を反映していることを示した。DFPが遺伝的類縁関係の研究に役立つことは、本論文第4章のマウス、ウサギ、ウズラなどを用いた研究からも明らかである。また、Kuhnleinら (1990)はDFPを適用してニワトリ系統内の近交係数とバンドの頻度間には高い正の相関があることを認め、DFPの類似性を用いて集団の近交係数の予測が可能であることを示唆している。

しかし、個体間の遺伝的類似性がDNAマーカーにどの程度反映しているのか研究した例はほとんどない。未知の個体間の遺伝的な類似性が推定できれば、絶滅に瀕している野性動物の適切な交配に貢献するだろうし、家畜の育種でも血縁関係の明らかでない集団において、近交や高い血縁関係を避けた交配が可能となるであろう。個体間の遺伝的類似性の高まりとDFPの類似性の増加との関係は、Lynch (1988, 1990)によって、理論的な計算として研究されたのが最初である。実際の集団への適用としては、Gilbertら (1991)のアフリカライオンに対しての適

用が見られるに過ぎない。しかし、基礎集団がどの程度の血縁や近交を持っているのかが明らかでないため、その結果は集団によって異なり、誤差の大きい結果となっている。

兵庫県美方郡で維持、飼育されている黒毛和種の集団はその記録から少なくとも10世代以上さかのぼって親子の関係が明らかであり、個体間の血縁係数を計算することが可能であり、また閉鎖集団のためかなり高い血縁係数の個体を得ることも可能である。そこでこの黒毛和種集団を用い、2個体間の血縁係数とDFPの類似性との関係について検討した。

## 第2節 材料および方法

### 1) 供試動物

家畜種としてはウシで、兵庫県美方郡で飼育されている黒毛和種を対象とした。この集団は、前述したように80年間にわたって完全な閉鎖集団として維持、飼育されており、各個体が10世代以上にわたって家系の記録を持つ (Mukaiら 1989)。この集団の繁殖雌牛群とその種雄牛から、DNAを得ることが可能な155個体を選び出し、Wright (1992) の式に従って、155個体すべての個体間の血縁係数を求めた。その血縁係数の範囲は、0.192から0.765であった。その中でできるだけ種々の血縁係数が得られるように48個体を選びだし、その個体をDFPの分析の対象とした。

### 2) DNAフィンガープリント

DNAの抽出は雌牛では全血液、雄牛は精液から行った。精製法は第1章の方法に従った。制限酵素はHaeIIIを用い、プローブにはM13ファージの反復配列を第1章の方法に従ってラベルし、ハイブリダイゼーションに用いた。その他の操作も、第1章の方法に従った。ただし、オートラジオグラフは、1倍濃度のオートラジオグラフと2倍濃度のオートラジオグラフの2種類を用意した。これは、単に感光時間を2倍にしてあるのではなく、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ の半減期を考慮し、その時間を計算してX線フィルムに感光させて得た。

### 3) DFPバンドの評価法

得られたDFPで、同じ分子量を持つバンドは同じミニサテライト遺伝子座に由来すると仮定した。これは多くの家系分析を行わない場合、正確な対立遺伝子の関係を明らかにすることは難しいことと、1つのメンブタンに検出される対立遺伝子はあまり多くはないためである (Hillelら, 1989)。まず、Kuhnleinら

(1989)の方法に従って、最も濃く、鮮明で良く分離した評価しやすいバンドを1個体あたり8本選んだ。この操作をすべての個体、メンブタンで行った結果、3

枚のメンブランで最終的に評価したミニサテライト領域は、18、20、22遺伝子座であった。2個体間のDFPの評価は、隣り合ったレーンのみで行った。この理由は、離れているレーン間の比較や違ったメンブランの間での比較は正確ではなく、誤差を生じる可能性を排除するためである。この2個体間のDFPの比較により、48個体から52のデータを得た。いくつかの個体では、複数回違うレーンでDFPを得た。

### 3) DFPによる2個体間の遺伝的類似性の評価

DFPを用いた2個体間の類似性は、2つの方法を用いて評価し、それらの比較を行った。

1つは、一般的に良く用いられているバンドシェアリング(BS)と呼ばれる方法である。この式の詳細は第1章で述べた。BSは2個体間のDFPバンドの合計数に対する、共通バンドの割合と定義されている。

BS法は集団に対する評価としては適しているが、DFPバンドのホモ、ヘテロを直接には評価していないので、2個体間の評価には大きな誤差が生じると考えられる。そこでさらに正確度の高い評価法として、ホモやヘテロを考慮して遺伝的類似性を評価する、GS法を考案した。次にその計算法の概念を示す。

DFPのバンドはホモ、ヘテロ、nullの3種類に分類される(Hillelら, 1989)。他の対立遺伝子がなければ同じ遺伝子座由来のバンドは、ヘテロに対してホモがオートラジオグラム上で2倍の濃さを示すはずである。ある個体のあるバンドがホモかヘテロを決定するために、1倍濃と2倍濃のオートラジオグラムを用い、同じ分子量でヘテロと考えられるバンドが2倍濃のオートラジオグラム上で示す濃さと、ホモと考えられるバンドが1倍濃のオートラジオグラム上で示す濃さが同じであれば、前者をヘテロ、後者をホモと決定した。それ以外の関係を示すバンドは他の対立遺伝子によるバンドと考えたが、このようなバンドはほとんど検出されなかった。また、同じ分子量の位置にバンドが存在しない場合はnullとした。ここでバンド間の類似性を定義する。ホモとホモ、ヘテロとヘテロ、nullとnullの間の類似性は1、ホモとヘテロ、ヘテロとnullでは0.5、ホモとnullは0と定義した。また、他の対立遺伝子によるバンドとその他のバンドの間の類似性は、比



較が難しいためすべて0とした。これらのバンドの類似性の分類をもとにして、DFPによる2個体間の遺伝的類似性を求めた。この方法をgenetic similarity (GS)法と名付ける。これは次式によって計算される。

$$GS = (2p + q) / 2N$$

ここで、pはバンド間の類似性が1であったバンドの本数、qは0.5であったバンドの本数である。Nは用いたメンブランで評価された全遺伝子座数である。

BS法とGS法を用いて遺伝的類似性を計算した例を、表5-1に示す。この表で+は、バンドがホモを示すミニサテライト遺伝子座、±はバンドがヘテロを示すミニサテライト遺伝子座、-はnullのミニサテライト遺伝子座を示す。その他のミニサテライト対立遺伝子を示すバンドは\*で表した。

これら2種類の方法で求められた遺伝的類似性と2個体間の血縁係数の単回帰分析を行った。

表 5-1 BS と GS を求めるために用いたバンド評価の例

遺伝子座	個体					
	1	2	3	4	5	6
1	+ <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+ <sup>a</sup>	-	-
3	-	+ <sup>a</sup>	-	+ <sup>a</sup>	-	+ <sup>a</sup>
4	±	*	+ <sup>a</sup>	±	±	±
5	± <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	± <sup>a</sup>
6	±	±	±	±	±	±
7	±	±	+	-	+	-
8	-	±	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	±	±
9	± <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
10	+ <sup>a</sup>	±	+ <sup>a</sup>	± <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
11	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
12	±	-	-	-	-	-
13	± <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	± <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
14	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	-	-	+ <sup>a</sup>
15	± <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+	±	±	±
16	+ <sup>a</sup>	+	+	± <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	±
17	-	+	+	±	-	-
18	-	-	-	-	*	-
19	-	+ <sup>a</sup>	-	±	+ <sup>a</sup>	-
20	-	-	±	-	± <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
BS レベル <sup>b</sup>	0.741	0.897	0.741	0.741	0.815	
GS レベル <sup>c</sup>	0.525	0.750	0.550	0.575	0.675	

a: 各個体において最も強いシグナルを持つ8本のバンド

b:  $BS = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$ 、 $N_{AB}$ は個体A、Bに共通なバンドの本数、 $N_A$ 、 $N_B$ は個体A、Bにおけるそれぞれのバンドの総数をあらわす。

c:  $GS = (2p + q) / 2N$ 、 $p$ は $s=1$ 、 $q$ は $s=0.5$ であるバンドの本数、

$s$ はバンドの類似性であり、 $Ho$  (ホモ) と $Ho$ 、 $He$  (ヘテロ) と $He$ 、 $null$ と $null$ の間のバンドの類似性は $s=1$ 、 $Ho$ と $He$ 、 $He$ と $null$ の間は $s=0.5$ 、 $Ho$ と $null$ 、 $Ma$ とその他のバンドの間は $s=0$ とした。

+ : ホモのミニサテライト遺伝子座 ( $Ho$ )

± : ヘテロのミニサテライト遺伝子座 ( $He$ )

- :  $null$ のミニサテライト遺伝子座

\* : その他のミニサテライト対立遺伝子からなる遺伝子座 ( $Ma$ )

### 第3節 結果および考察

図5-1は、本実験で用いたメンブロン3枚のうちの1枚のDFP像である。バンドは2kbから20kbの範囲で評価した。2kb以下のバンドは不鮮明なため評価には加えなかった。図内の黒丸で示したバンドは、その個体で選ばれた最も強いシグナルを持ち、鮮明に観察される8つのミニサテライト遺伝子座を示している。このメンブロンにおいては、20のミニサテライト遺伝子座が評価の対象になり、その遺伝子座は図の右側の矢印で示してある。

BS法を用いた場合、そのBS値の範囲は0.308から0.923であった。図5-2は、その値と血縁係数の単回帰分析を行った結果である。その相関係数は、0.631 ( $p < 0.001$ ) と高い相関を示した。このことは、血縁係数が高まるとDFPから求められたBS値は比例的に増加することを示している。

GS法を用いた場合、その値の範囲は0.295から0.861であった。図5-3は、GS値と血縁係数の単回帰分析を行った結果である。その相関係数は、0.813と、BS法を用いた場合よりも高い相関を示した。これはGS法がホモやヘテロの情報が含まれているために、個体間の類似性がより正確に評価されたためだと考えられる。これらの結果から、BS法は一般的に幅広く用いられているが、DFP法を用いて個体間の遺伝的類似性を評価する場合には、GS法の方が真値との誤差が少なく優れていることが示唆された。

本章では、DFPの1倍濃度のバンドをヘテロ、2倍濃度のバンドをホモと定義した。Dunningtonら (1990)は、ニワトリを用いて同じ系統内の個体のDFPバンドの中で、雄では2倍の濃さを示し、雌では1倍の濃さを示すバンドをZ染色体に由来するバンドであることを示唆している。また、我々はマウス近交系C3H/HeとC57BL/6のF1を作成し、そのDFPを得た結果、両親に共通でないバンドでは子供のバンド（ヘテロ）と片親のバンド（ホモ）は、1倍濃度と2倍濃度の関係にあることを確かめている。これらの結果からも本章におけるホモ、ヘテロの定義は妥当であると思われる。

本実験で用いた美方郡の黒毛和種の閉鎖集団においては、個体間の血縁係数は

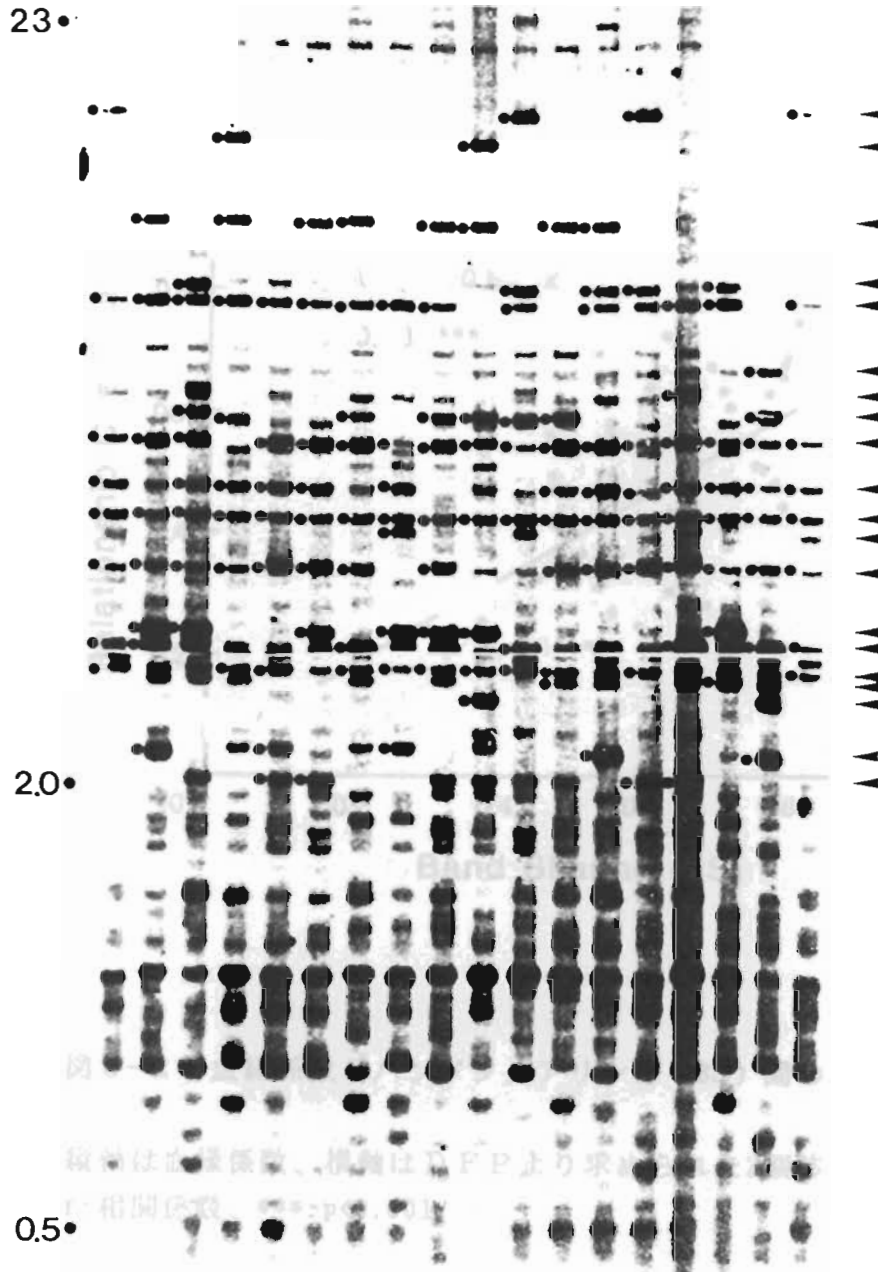


図5-1 BSとGSの分析に用いたD F Pの例

各個体（レーン）の左側の黒丸は、その個体における最も強い8本のバンドを示す。矢印は、これらのバンドにより評価された20のミニサテライト遺伝子座の位置を示す。

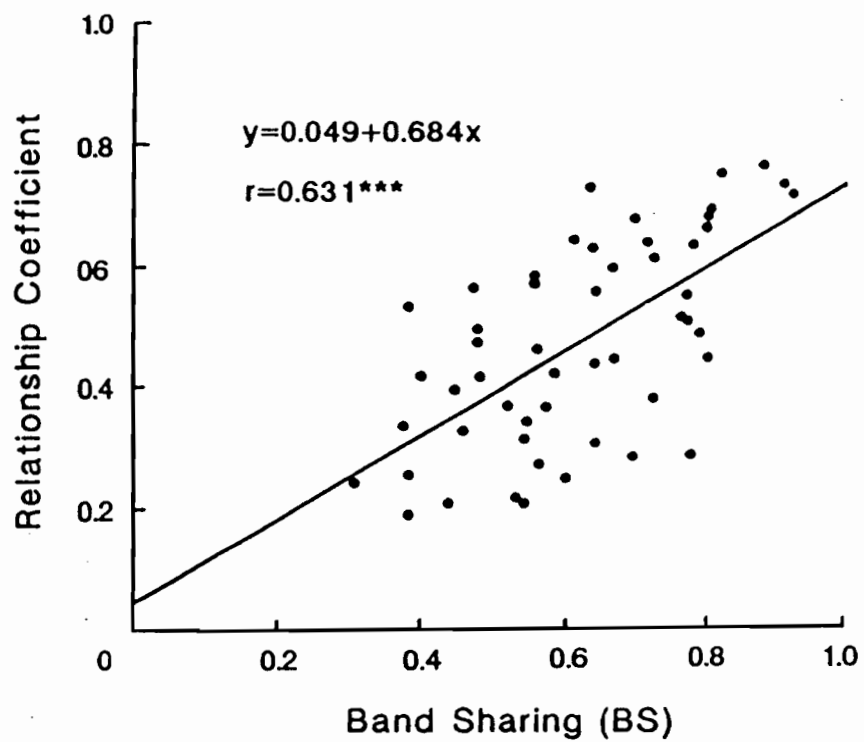


図5-2 血縁係数とバンドシェアリング (BS) 間の単回帰分析

縦軸は血縁係数、横軸はDFPより求められた2個体間のBS値、  
r: 相関係数、\*\*\*:  $p < 0.001$

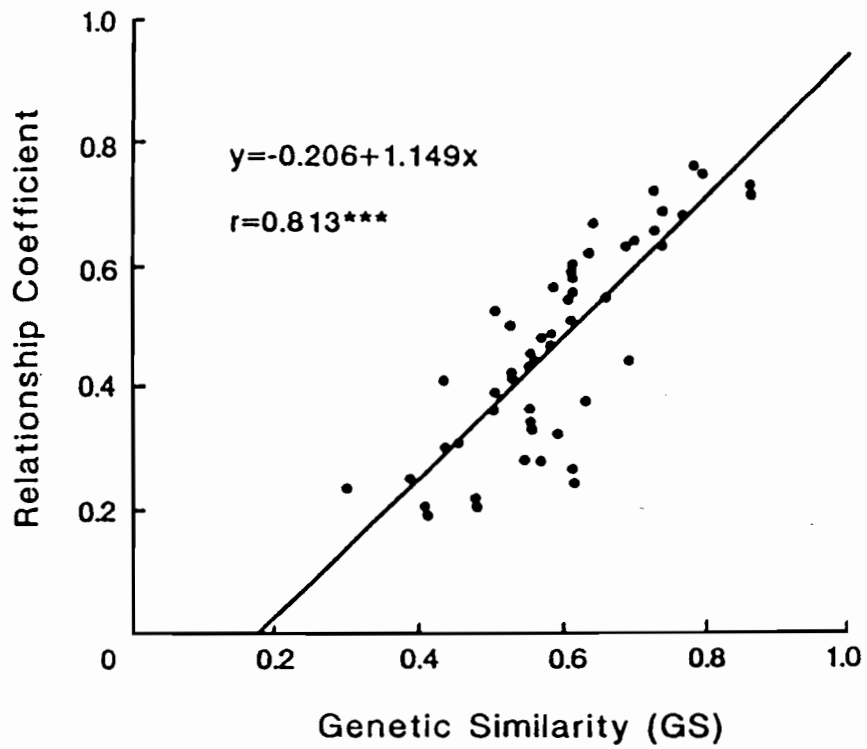


図 5-3 血縁係数とGS間の単回帰分析

縦軸は血縁係数、横軸はD F Pより求められた2個体間のGS値、  
r: 相関係数、\*\*\*:  $p < 0.001$

次式で推定される。

$$y = 0.049 + 0.684x_1$$

$$y = -0.206 + 1.149x_2$$

ここで、 $x_1$ 、 $x_2$ はそれぞれ、BS法とGS法によってDFPから求められた2個体間の遺伝的類似性指数である。 $y$ は予測される2個体間の血縁係数である。この式を用いることにより、少なくとも美方郡の黒毛和種閉鎖集団に属する牛ではある程度未知の2個体間の血縁係数を予測することが可能であると考えられる。より正確な血縁係数の予測は、プローブを増やし、DFPの情報量を高めることによって、可能となるだろう。

上述の式の逆関数は、次式で与えられる。

$$y_1 = 0.344 + 0.581x$$

$$y_2 = 0.319 + 0.575x$$

$x$ は血縁係数、 $y_1$ 、 $y_2$ はそれぞれDFPから求められるBS、GS値である。この式における、切片はこの集団における血縁係数0の場合における平均のBS値、GS値を示していると考えられる。この式における切片や傾きは、用いる種や集団、プローブによって異なると思われる。しかしながら、Reeveら(1990)は、同じM13ファージの反復配列をプローブとして用いて、血縁関係のないウシのBS値を得ており、その値は0.34で本章の実験から得られた値、0.344とほぼ同じである。同じプローブを用いた場合には、種が同一であれば同じ切片を持つ可能性がある。もしそうであれば、プローブや種ごとに切片を一度設定すれば、集団ごとに予測式を求めなくとも、任意の集団に適用することが可能となるだろう。

血縁係数とDFPから求められる遺伝的類似性との関係は、Lynch(1988, 1990)により理論的なアプローチから研究された。これは、DFPから求められるバンドシェアリングを用いて個体間の類似性が血縁に従いどのように増加するか、あるいは集団間のホモ化がどのように増加するのかをシミュレーションによって調べたものであった。実際の集団に対する適用としては、Gilbertら(1991)の研究がある。これは、アフリカのライオンの2集団に対して適用したもので、バンドシェアリングと血縁係数の関係を調べている。その血縁係数は親子間なら

0.5、親と孫間なら0.25と定義しており、その分類された血縁間で求められたバンドシェアリングの平均値との関係を調べている。その結果、1集団では正の直線関係が、もう一方の集団では曲線的な関係が求められている。曲線関係の結果が得られた集団では本研究と異なった結果が得られているが、その血縁関係が観察によって決定されたものであることと、その集団の大きさが小さく過去においてすでに血縁が高まっていた可能性があるなど血縁係数が正確でないことが考えられる。事実、Gilbertらの実験でも、直線関係が得られた集団では、集団のサイズは大きく、集団の平均バンドシェアリングの値は小さい。一方、曲線関係が得られた集団ではサイズが小さく、バンドシェアリングの値は大きい傾向にある。もし、この曲線関係が得られた集団の近交が高まっていなければ、本章で得られたと同じ直線関係が得られると考えられる。本章で用いられた黒毛和種の集団は、少なくとも5世代以上の血統が各個体で明らかで、その血縁係数は信頼できる。従って本研究で得られた結果から、個体間の血縁が高まることによりDFPの類似性は直線的に高まると考えるのが妥当であろう。しかしながら、本研究においても用いた個体間の血縁係数は集団の性格上、0.2から0.75までの範囲でしか得ることができなかった。更に詳しい研究は、マウスなどの実験動物を用いてより広い血縁関係の個体を作成して行うべきであろう。

本研究では、DFPから求められる遺伝的類似性と血縁係数の間には高い正の相関があることが確認された。このことから、DFPを用いて未知の2個体間の類似性の予測が可能になることが示唆された。これら遺伝的マーカーを用いた類似性と2個体間と血縁係数、あるいは集団の近交係数が明らかになれば、絶滅に瀕している野性動物における近交を回避した適切な交配に役立つであろうし、また家畜育種の現場においても個体間の血縁の高い交配を避けるための指標になると考えられる。



## 第6章 DNAフィンガープリント法を用いたリコンビナントインブレット系マウスにおけるミニサテライト遺伝子座のマッピングと量的形質の検出

### 第1節 緒言

経済的に重要な量的形質に影響している遺伝子座 (quantitative trait loci、QTL) を遺伝的マーカーを用いて連鎖により検出し、そのマーカーを指標として選抜に役立てようとする概念は、Sax (1923) によって述べられた。この概念は現在、Marker assisted selection (MAS) として理解されている。しかし1960年代までには、利用できるマーカーの数から実験はショウジョウバエの量的形質の分析に限られていた。その後、家畜と家禽においても血液型、血液の多型蛋白質、酵素やミルク、および卵の多型が研究され、比較的多くのマーカーを用いてQTLの連鎖に関する研究が行われるようになった。しかし、ウシを始めとする家畜では個体が持つ遺伝子座の多くはヘテロであり、また1対の両親から数多くの子孫を得ることができないため、ほとんどQTLは検出されなかった。ウシでは近年になって人工授精が急速に広まり、1頭の種雄牛から多くの子を得ることが可能になったが、種雄牛一頭当りの娘牛には限りがあるために、人工授精が行われていてもその分析の効力は低くなる。それにもかかわらず蛋白多型を用いて、Geldermannら (1985) により乳牛のGerman Friesian種で、Beeverら (1990) によりAngus種でQTLと連鎖しているマーカーが見つけられている。しかし、経済的に優れたすべての量的形質を検出するためには、どの種においてもさらに多くのマーカーが必要となる。ヒトや実験動物のマウスでは、遺伝子工学の発展に伴い、多くのDNAマーカーが開発されている。しかし、家畜、家禽においては、近年マーカーの開発が急速に進められてきているものの、まだ十分な量であるとはいえない。本論文で取り上げているDFP法は、一度に数多くの多型性のある遺伝子座を検出できること、マーカーとするプローブは様々な種に用いることができるため、マーカーの開発に時間がかからないなどの利点が考えられる。そこ

でまず、DFP法が量的形質の検出に適しているかどうかを検討するために、マウスのリコンビナントインブリード系統群（RI系統群）に対して適用することを試みた。

RI系統群は、特定の二つの近交系（祖先系統）間の交配から得られたF<sub>2</sub>交雑群から、兄妹交配を繰り返して育成された複数の近交系のセットである。RI系統群は、1971年にBaileyによって発案された系統で、マウスを中心に作出されている。この近交系群では、その遺伝子はどれも祖先系統の二つの近交系に由来した遺伝子で、他からの遺伝子が全くないことが特徴である。RI系統群は、祖先系統に由来する様々な遺伝子型の組み合わせを持った近交系であるので、既知のマーカー遺伝子との連関より、再び交配実験を行うことなく調べたい遺伝子の染色体へのマッピングが可能となる。このため、RI系統群の祖先系統の遺伝子座はなるべく相互に異なっていることが好ましく、適切な系統を祖先系に選ぶことで量的形質に対する研究にも有効である（Bailey, 1971; Oliverio, 1979）。

RI系統群は、古くから近交化されている代表的な系統をもとにして、BXD（C57BL/6とJDBA/2J）、AKXL（AKR/JとC57L/J）、CXB（BALB/cByとC57BL/6By）などアメリカを中心に作出されている。我が国では1990年に西村らによって、体重小を指標に選抜され、自然発生腫瘍の少ないSM/J系と正常体重で肺腫瘍に高感受性のA/J系を祖先系にしてSMXA RI系マウスが作出された。このRI系統群は28系統の近交系群からなるわが国初の本格的なRIマウスである。このRI系は、体重小に選抜された系統が祖先系統であるので、身体の大小に関する量的形質を研究するのに有効であると思われる。そこで、本研究ではこのRI系統群を用いて、DFPのバンドを各染色体へマッピングし、DFP法と下顎骨分析によるSMXA系統間の遺伝的類縁関係を比較し、さらにDFPバンドと下顎骨の大きさに代表される量的形質との関連を調べ、考察を加えた。

## 第2節 材料および方法

### 1) 供試動物

マウスは浜松医科大で育成されている A/J系、SM/J系、およびこれらの2近交系を祖先系統にして開発されたRI系マウスSMXA系統群を用いた。このSMXA系統群はSMXA-1からSMXA-30を用いた。ただし、SMXA-2、13および28の各系統は、育成途中で肥満、不妊、食殺、離乳仔の性比アンバランス等が重なり途絶した。また、SMXA-21には10代で毛色の薄いミュータントが現われたため、これを次世代からSMXA-21dとして分岐させた。従って、合計28のRI系統群であり、本実験では親系統の2系統と合わせた30系統を用いた。DFPを用いた分析にはこれらの系統および祖先系統A/J、SM/Jを雄3個体、雌3個体、計180個体を用いた。下顎骨分析に用いた雄マウスの個体数は1系統につき10個体以上、計308個体で、すべて90日齢以上の個体である。これらすべてのマウスは温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度50~60%の条件下で飼育され、繁殖用飼料(F-1、船橋農場製)を自由摂取させると共に水道水を与えた。

### 2) DNAフィンガープリント

DNAの抽出は肝臓から行い、精製は第1章に従って行った。制限酵素には *Hinf* I と *Pst* I を用いた。プローブには、M13ファージの反復配列を用いた。その他の方法も第1章に従って行った。

### 3) 染色体へのミニサテライト遺伝子座のマッピング

DFPバンドの染色体への連鎖の推定には、系統間分布パターン、SDP(strain distribution pattern) を利用し、基本的にSilver (1985)の方法に従って行った。この連鎖分析法は、すでに染色体にマッピングされている遺伝子座について各SMXA RI系統の遺伝子型、すなわち2つの祖先系統のどちらかの遺伝子を受け継いでいるか調べてSDPを作成し、同様に目的としている遺伝子座のSDPを作成して両者を比較することによって行うものである。この両者の遺伝子のSDPが一致、

もしくは有意に似ていれば連鎖の関係にあると推定できる。連鎖している遺伝子座間の組み換え頻度 ( $r$ : recombinant value) は、調べたRI系統数( $n$ )の組み換え型の系統の割合( $R$ )から次式で求めた。

$$r = R / ( 4 - 6R )$$

この組み換え頻度 $r$ は遺伝子座間の染色体上の距離(cM)になるので、この連鎖分析法から遺伝子座の染色体上の位置を推定することができる。

#### 4) 下顎骨標本の作成と測定

それぞれのマウスはジエチルエーテルにより麻酔し、斬頭した。頭部は $-20^{\circ}\text{C}$ で保管した後、 $121^{\circ}\text{C}$  10分間、オートクレーブにかけた。表皮と筋肉をできるだけ除き、それからこれを0.3% papain 溶液に $37^{\circ}\text{C}$  20時間浸した。次いで、この標本を軽く洗浄した後、注意深く下顎骨を分離し、ピンセットで骨に付着している余分な筋肉と腱を取り除き、濾紙の上のせ室温で乾燥させた。以上のようにして得た下顎骨を測定用の標本とした。

下顎骨は、Universal projector V-20A (Nikon) を用いて、10倍に拡大した後測定した。図6-1は測定した11部位を示している。

#### 5) 主成分分析

本研究における下顎骨測定値のように多くの変量からなる場合には、個々の変量別に系統間の比較をするのは変量相互間に相関関係が存在するために適切ではない。本研究では11変量からなっているので、各変量の平均値と標準偏差が11ずつ、変量間の相関係数が ${}_{11}C_2 = 55$ 個となり、合計77個のパラメータが得られる。これら多数のパラメータの持つ意味を生物学的にすべて解釈することは不可能に近い。個々に55個の持つ情報を要約する必要を生ずるが、主成分分析はそのために最適な手法と言える。すなわち、この分析では、観測の対象となった多変量間の相関関係は、各変量に潜在的に共通して含まれている少数の因子によって生ずるという観点から、その因子(主成分)を抽出するものである。そして、その因子の有する意味を形態学的に解釈することによって、各系統の下顎骨の特徴を明らかにすることができる。11変量を分析する本研究では、第1(PC1)～第11主成

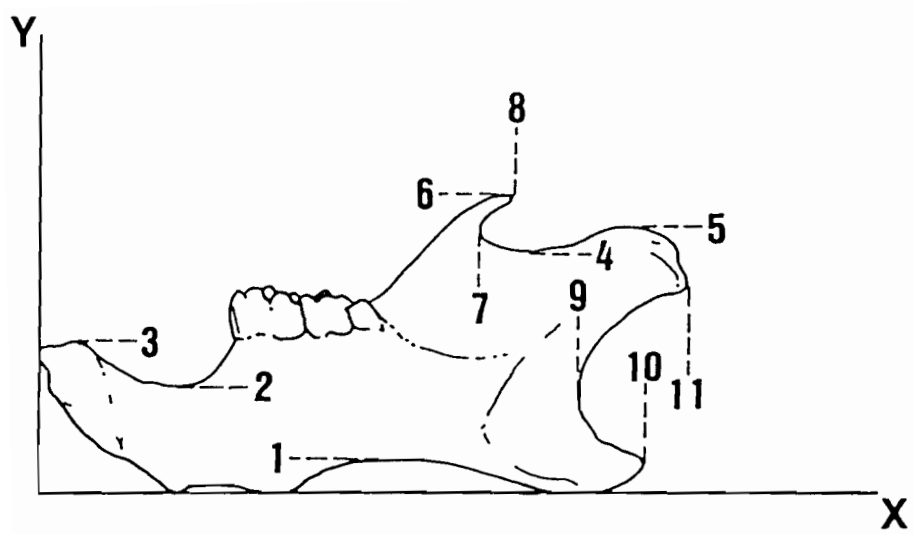


図 6-1 マウス下顎骨11測定部位

1~6: X軸より破線までの高さ、7~11: Y軸より破線までの長さ

分 (PC11) まで求められるが、それらは次の式によって定められる。

$$\begin{aligned}
 PC1 &= l_{1.1}X_1 + l_{1.2}X_2 + \dots + l_{1.11}X_{11} \\
 PC2 &= l_{2.1}X_1 + l_{2.2}X_2 + \dots + l_{2.11}X_{11} \\
 & \quad \vdots \\
 & \quad \vdots \\
 PC11 &= l_{11.1}X_1 + l_{11.2}X_2 + \dots + l_{11.11}X_{11}
 \end{aligned}$$

ただし、

$$\begin{aligned}
 l_{1.1}^2 + l_{1.2}^2 + \dots + l_{1.11}^2 &= 1 \\
 l_{2.1}^2 + l_{2.2}^2 + \dots + l_{2.11}^2 &= 1 \\
 & \quad \vdots \\
 & \quad \vdots \\
 l_{11.1}^2 + l_{11.2}^2 + \dots + l_{11.11}^2 &= 1
 \end{aligned}$$

$l_{1.1}$ 、 $l_{1.2}$ 、 $\dots$ 、 $l_{1.11}$ はPC1の係数で、 $l_{1.1}^2 + l_{1.2}^2 + \dots + l_{1.11}^2 = 1$  の条件の下でPC1の分散が最大になるように定める。PC2の係数、 $l_{2.1}$ 、 $l_{2.2}$ 、 $\dots$ 、 $l_{2.11}$ は、 $l_{2.1}^2 + l_{2.2}^2 + \dots + l_{2.11}^2 = 1$  で、さらにPC2がPC1と無相関になるという条件下でPC2の分散が最大になるように定めるものである。同様にして、いずれも無相関のPC1からPC11まで定められる。

本研究ではこのうち第1～第3主成分の情報にとどめ、それ以外の主成分は、生物学的な解釈が難しいにもかかわらず、要約された情報量が少ないため用いなかった。

## 6) クラスタ分析

RI系統群のDFPからのデンドログラムの作成には、日本電気(株)のLANSTAT3に含まれているクラスタ分析のプログラムを用いた。その遺伝的距離には第4章で述べた、Percent Difference (PD)を用い、ウォード法(Ward, 1963)

で行った。

下顎骨からのデンドログラムの作成は、各個体について測定された下顎骨 11 変量の値をもとにマハラノビスの距離を計算し、ウォード法 (Ward, 1963) で行った。

### 第3節 結果および考察

#### 1) SMXA系統群に対するDNAフィンガープリント

このRI系統群マウスSMXAは、最近育成された新しい系統群である。マッピングや量的形質との関連を調べる前に、この系統群が近交系として確立しているかどうか検討した。これには、制限酵素*Pst*Iを用い、すべてのSMXA系統群に対して、雌3頭、雄3頭の合計6頭ずつを用いてDFPを得た。図6-2はSMXA-8とSMXA-9のDFP像である。同一系統内では雌雄の区別なくすべての個体が同じバンディングパターンを示した。このことは、同一系統内ではどの個体も遺伝的に全く同一であることを示唆しており、これらRI系統は近交系として確立していると思なされた。同様に他のSMXA系統を調べたところ、どの系統も系統内で同一のバンドパターンを示し、このRI系統群はすべて近交系として確立していることが示された。また雌雄差が見られなかったことからY染色体由来のバンドは検出されなかった。従って、以下の分析には、各系統1頭ずつをサンプルとして供し、DFPを得た。

次にすべての系統で、制限酵素*Hinf*Iと*Pst*Iを用いたDFPを得た。制限酵素*Hinf*Iを用いた2つの親系統とSMXA1~16までのDFPは図6-3、*Pst*Iを用いた例は図6-4に示した。SMXA全系統のバンドパターンを調べたところ、ほとんどすべてのバンドは祖先系統のA/J系とSM/J系から由来していた。このことは、これらのバンドが20世代以上安定して親から子へ遺伝していたことを示している。制限酵素*Hinf*Iを用いたDFPでは(図6-3)、祖先系に存在しているのにどのSMXA系統にも存在しないバンドと祖先系統には存在しないのにSMXA系で存在するバンドが数本見られた。これら数本のバンドは祖先系統内で変異を起こしたバンドもしくはSMXAの近交の過程で突然変異により生じたバンドであると思われる。図中矢印で示したバンドは突然変異により生じたと思われるバンドを示している。SMXA-21d系は、SMXA-21系の近交の過程10世代目に毛色の突然変異を起こし、11世代目以降、分離、育成された系統である。この2系統間でも、1本のバンドで変異を示した。突然変異のバンドを除き、系統間で明確に多型が認められたバンドは*Hinf*Iで23本、*Pst*Iで17本、計40本のバンドが認められた。本研究では、こ



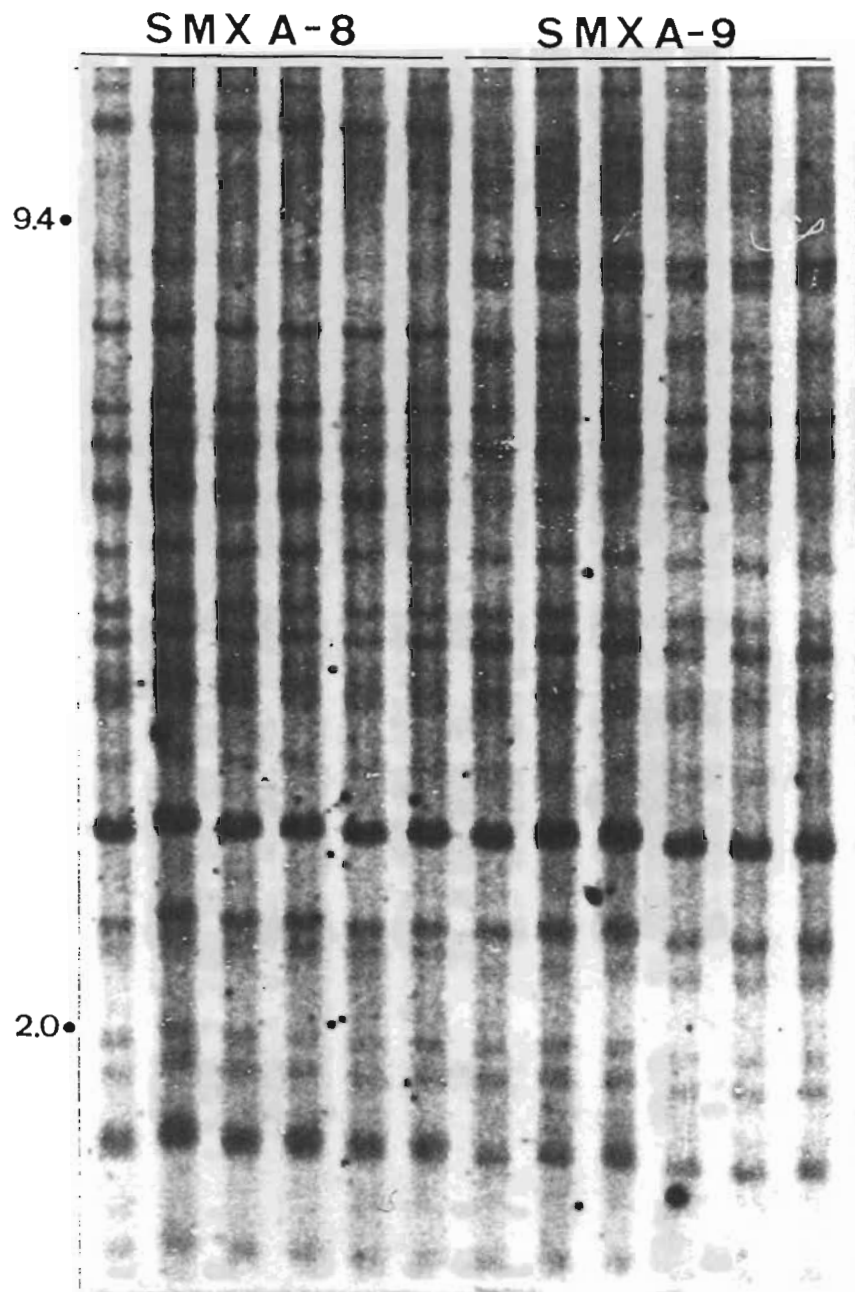


図6-2 RI系統内におけるDFPの例

用いた制限酵素は*Pst*I

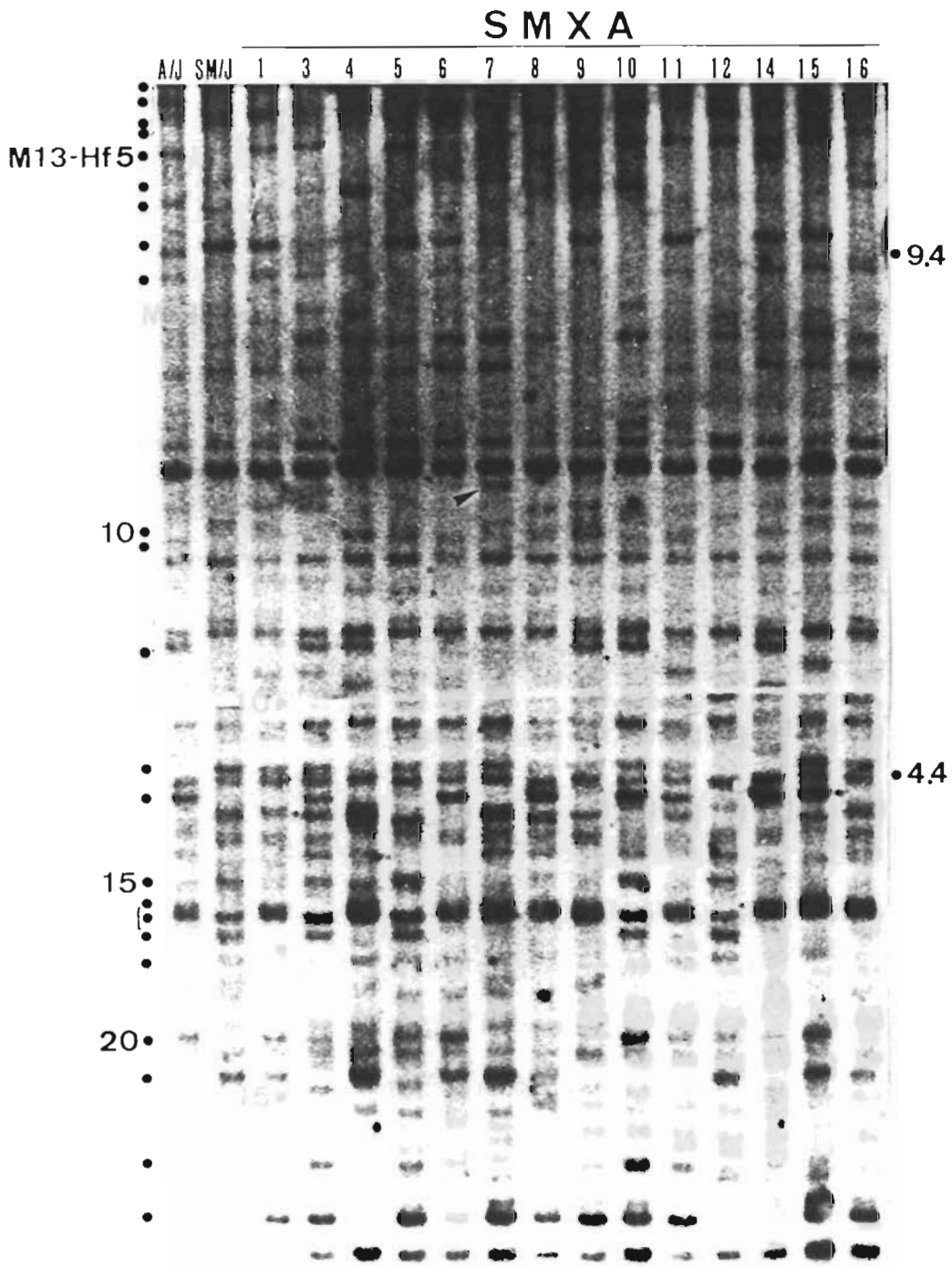


図6-3 制限酵素 *Hinf* I を用いたA/J系、SM/J系、SMXA-1~16のD F P

対立遺伝子関係にあるバンドはカッコで括った。矢印は突然変異のバンドを示している。

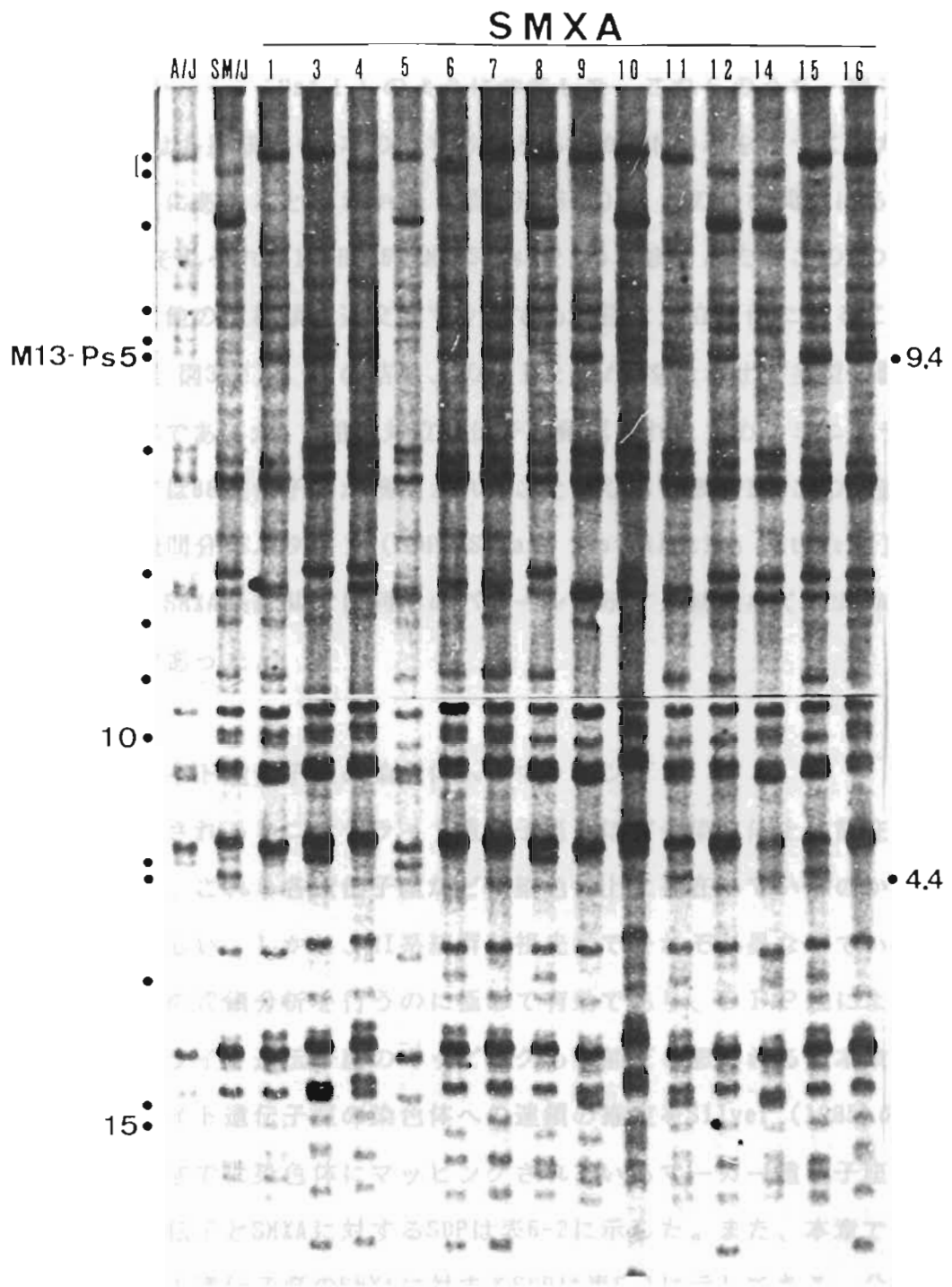


図6-4 制限酵素 *Pst*I を用いたA/J系、SM/J系、SMXA-1~16のD F P

対立遺伝子関係にあるバンドはカッコで括った。

これらのバンドについて分子量が大きいバンドから、Ms13-Hf1、Ms13-Hf2……  
(minisatellite, M13 phage probe, restriction endonuclease *Hinf* I)、Ms13-Ps1、Ms13-Ps2……(*Pst* I)のように命名した。これらのうち、線で結ばれた2本のバンドは各系統とも2本のうち必ずどちらか1本のみを持つことから、対立遺伝子の関係にあることがわかる(図6-3、6-4)。この様な関係にある断片は2組認められ、それぞれMs13-Hf16とMs13-Ps1と1つにまとめた。この2つの遺伝子座のバンドは、他の数種類の近交系マウスでも同様に対立関係にあることが確認された(第3章、図3-2)。この結果、*Hinf* Iと*Pst* Iを合わせて多型が認められたバンドは40本であるが、2組の対立遺伝子が確認されたため、ミニサテライト遺伝子座としては38遺伝子座が検出されたことになる。表6-1はこの38遺伝子座についての系統間分布パターン(SDP, Strain Distribution Patterns)を示したものである。SMXA系統間では同一のパターンを示す系統はなく、SMXA系統群内で同定が可能であった。

## 2) ミニサテライト遺伝子座の染色体へのマッピング

D F Pで検出されるミニサテライト遺伝子座はほぼ全染色体上に散在していると考えられるが、これら各遺伝子座がどの染色体上に存在しているのかを明らかにすることは難しい。しかし、RI系統群は祖先系でそれぞれ異なっている形質を支配する遺伝子の連鎖分析を行うのに極めて有効であり、D F P法によって検出されるミニサテライト遺伝子座のマッピングも可能だと思われる。本章では上記の38ミニサテライト遺伝子座の染色体への連鎖の推定をSilver (1985)の方法によって試みた。すでに染色体にマッピングされているマーカー遺伝子座は30であり、それらの遺伝子とSMXAに対するSDPは表6-2に示した。また、本章で得られた38ミニサテライト遺伝子座のSMXAに対するSDPは表6-1に示してある。分析の結果、合計14ミニサテライト遺伝子座が各染色体と連鎖していることが推定された(表6-3)。これら14のミニサテライト遺伝子座は、第3、7、9、11、14、15番の6つの常染色体上にマッピングされた。特に第14番染色体には、5つのミニサテライト遺伝子座がマッピングされた。マウスの染色体数は  $2n = 40$  である。用いたマーカーはすべての染色体を網羅しているわけではなく、また染色体ごとにマ-

表6-1 SMXA RI系統群におけるミニサテライト遺伝子座の系統分布パターン

		SMXA																																
ミニサテライト遺伝子座 <sup>1)</sup>		1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17	18	19	20	21	21d	22	23	24	25	26	27	29	30					
Ms13-Ps1 (AS)		A	A	S	A	S	A	A	A	A	A	S	S	A	A	A	A	S	S	A	A	S	S	S	A	A	S	S	A					
2 (S)		A	A	A	S	A	A	S	A	S	A	S	S	A	A	A	A	S	A	S	S	S	S	A	S	S	S	A	A	S				
3 (S)		S	A	A	S	A	S	S	S	A	S	S	S	S	A	A	S	A	S	S	S	S	S	S	A	A	S	S	A	S				
4 (A)		S	A	A	A	S	S	S	S	A	A	S	S	S	A	A	A	A	A	A	A	A	S	A	S	S	S	A	A	S				
5 (A)		A	A	A	S	A	A	S	A	S	S	A	S	A	A	A	A	S	A	S	S	S	A	A	S	S	S	S	A	S				
6 (A)		S	A	A	A	S	S	S	A	A	A	S	A	S	S	A	A	S	S	S	S	S	S	A	A	S	A	S	S	S				
7 (S)		A	S	S	A	A	A	S	A	S	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A	A	S				
8 (S)		S	S	S	S	S	S	A	S	S	A	S	A	A	S	A	A	A	S	A	A	S	S	S	A	S	A	S	A	S				
9 (S)		S	A	A	S	S	S	S	A	A	S	S	A	S	S	A	A	S	S	S	S	S	S	A	A	A	S	A	S	S				
10 (S)		S	S	S	A	S	S	A	A	S	A	A	S	A	S	A	S	A	S	S	A	S	S	S	A	A	S	A	A	S	A			
11 (A)		S	A	S	A	S	S	A	S	A	S	S	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	A	S	A	A	S	A	A	A	S			
12 (S)		A	A	A	S	A	A	A	A	A	S	A	S	S	A	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S	A	S	S	S	S				
13 (A)		S	S	S	S	A	S	A	S	A	A	S	A	A	S	S	S	A	S	A	A	S	S	S	A	S	A	A	A	S				
14 (A)		S	A	A	S	S	S	S	A	A	A	S	A	S	S	A	A	S	S	S	S	S	S	A	A	A	S	S	S	S				
15 (S)		S	S	S	A	A	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A	A	A	A	A	A	A				
16 (A)		S	S	A	S	S	S	S	A	S	S	S	A	S	A	S	S	A	S	S	S	S	S	S	S	S	A	S	S	S				
Ms13-Hf1 (S)		S	S	A	S	A	S	A	A	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A	A	S	S	S	A	A	S	A	A		
2 (A)		S	S	A	S	A	S	A	A	A	A	S	S	S	S	A	S	A	S	A	A	A	A	S	S	A	S	A	A	A	S			
3 (S)		S	A	S	A	S	A	A	A	S	S	S	S	A	S	S	A	A	A	S	S	A	A	A	S	S	A	A	A	S				
4 (S)		A	A	A	S	A	A	S	S	A	A	S	A	A	A	A	A	A	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	S	A		
5 (A)		A	A	S	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	S	S	S	A	A	S	S	S	A	S	S	S	S				
6 (S)		A	A	A	A	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	S	A	A	A	A	A	S	S	A	A	A	A	S	S	S	A			
7 (A)		S	S	S	S	S	S	A	A	A	S	S	S	S	A	S	S	S	A	S	S	S	A	S	S	S	S	A	S	S	A			
8 (S)		S	A	A	S	S	S	A	S	A	S	A	S	S	A	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A	S	S	A			
9 (A)		A	A	S	S	A	S	S	S	S	A	S	A	A	A	S	S	S	S	S	A	A	A	S	A	A	A	S	A	A	A			
10 (A)		A	A	S	S	S	S	A	A	S	S	S	A	A	A	S	A	S	S	S	A	A	S	A	S	A	S	A	A	A	A			
11 (S)		A	A	A	A	A	S	A	S	S	A	S	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A	A	S	S	S	S	A	S	S	A		
12 (A)		S	A	A	S	S	S	S	A	A	S	S	A	S	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S	A	A	A	S	S	S	S			
13 (S)		S	S	A	S	S	S	A	S	S	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S			
14 (A)		S	A	S	S	A	S	A	S	A	A	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S	A	A	S	S	S	A	S	A	A	A		
15 (S)		A	S	S	S	A	A	A	A	S	A	S	A	A	A	A	S	A	A	S	S	S	A	A	S	S	A	A	S	S	S	S		
16 (AS)		A	S	A	S	A	A	A	A	S	A	S	A	A	A	A	S	A	A	S	S	S	A	A	S	A	S	A	S	A	S			
17 (S)		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A	A	A	S	S	S	S	S	S		
18 (S)		A	A	S	S	S	A	A	A	A	S	S	A	S	A	A	A	S	A	A	A	S	A	A	A	S	A	A	A	A	A	A		
19 (A)		A	A	S	A	A	S	S	S	A	A	A	A	A	A	S	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	S	S	A	A	S	S	S
20 (S)		S	A	S	A	S	S	A	A	A	A	S	A	S	S	A	A	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S	A	S	S	A			
21 (A)		S	A	S	A	S	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	S	S	S	S	A	S	S	S	A	S	S	A	
22 (A)		A	A	S	A	S	A	A	A	A	A	S	S	A	A	A	A	A	S	S	A	A	S	S	S	A	A	S	S	A	S	S	A	

1) A/J系とSM/J系間で多型のあるバンド、( )内はバンドを持つ祖先系を示す。

ASはその遺伝子座で複対立遺伝子を持つ

A: A/J由来の遺伝子座、S: SM/J由来の遺伝子座

表6-2 SMXA RI系統群における29の遺伝子マーカーの系統分布パターン

Locus <sup>1)</sup>	Chr. <sup>2)</sup>	SMXA																												
		1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17	18	19	20	21	21d	22	23	24	25	26	27	29	30	
Idh-1	1	S	S	S	S	A	S	A	S	A	S	S	A	S	A	S	A	A	S	A	A	S	S	A	S	S	A	A	S	
Akp-1	1	S	S	S	S	A	A	A	A	S	S	A	A	A	S	A	S	A	A	A	A	S	S	A	S	A	S	S	A	
Hc	2	S	A	S	A	A	A	S	S	A	A	S	S	S	A	S	S	A	S	S	S	S	A	S	S	A	S	A		
Car-1	3	A	A	S	S	S	S	A	A	S	S	S	A	A	A	S	A	S	S	A	A	S	A	A	S	A	A	S		
cdm	3	A	S	A	S		A	A	A	S	A	S	A	S	A	A	S	A	A	S		S	S	S	A	A	A	S		
Msp-3	4	S	A	S	S	A	S	S	A	S	A		S	S	S	A		A	A	S	S	A	A	A	S	S	S	A		
Mup-1	4	S	A	S	S	A	S	S	A	S	A	S	S	S	S	A	S	A	A	A	S	S	A	A	A	S	S	S		
b	4	S	A	S	A	A	S	S	A	S	S	S	S	A	S	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	S	S	A		
Pgm-2	4	A	S	A	S	A	A	S	A	S	A	S	S	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	S	S	S	A		
Laf	5	S	S	A	S	A	S	S	A	S	A	A	S	A	S	S	S	A	A	A	A	S	A	S	A	S	S	A		
Prp	6	A	S	S	S		A	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A	A	A	S	S	S		A	A		
Msp-1s	7	A	S	A	A	A	S	S	S	S	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A	S	A		
Mtp-1	7	A	S	A	A	S	S	S	S	S	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A	S	A		
c	7	S	A	S	S	S	A	S	A	S	A	S	S	H	H	S	A	S	S	S	S	S	S	A	S	A	S	S		
Mod-2	7	S	A	S	S	H	H	S	A	S	A	S	S	S	A	S	A	S	S	S	S	S	S	A	A	A	S	S		
Hbb	7	S	A	S	S	S	A	S	S	S	A	S	S	A	A	S	A	A	S	S	S	S	S	H	A	A	S	A		
Int-2	7	S	A	S	S		S	A	A	A	A	S	A	A	S	S	A	S	S	S	S		A	S	A		S	S		
Msp-1r	7	S	A	S	S	S	A	S	A	A	A	A	S	A	A	S	A	A	S	A	A	S	A	S	S	S	A	A		
Hba	11	S	A	S	A	S	A	A	A	S	S	S	A	S	A	H	S	A	S	A	A	A	S	S	S	A	A	S		
Hox-2	11	S	S	S	S		S	A	A	A	A	S	A	A	S	S	A	S	S	S	S		A	S	S		A	A		
Gfap	11	S	S	A	S		S	A	A	A	A	S	A	S	S	S	S	A	S	S		A	S	S		S	A	S		
Igh-C	12	A	S	S	S		S	S	A	A	A	A	A	A	S	A	S	A	S	A		A	A		A		S	S		
Igh	12	A	S	S	S		S	A	A	A	A	A	S	A	S	A	S	S	A	S	S	A		A	S	S		A		
Tcra	14	A	S	S	A		S	S	S	A	S	A	S	S	S	A	A	S	S	S		A	S	S		A	S	S		
ES-10	14	S	S	S	S	A	S	A	A	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S	A	S	A	A	S	A	S	A	A		
Hox-3	15	S	S	A	S		A	A	A	S	A	A	A	S	A	S	A	S	A	S	A		S	S	S		A	A		
Msp-2	15	S	S	A	S	S	S	A	A	S	S	A	A	A	S	S	S	A	S	A	A	S	S	S	S	S	S	A		
H-2K	17	A	A	S	A	S	S	S	S	A	A	S	A	S	A	A	S	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	S		
H-2D	17	A	A	S	A	S	S	S	S	A	A	A	A	S	A	S	S	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	S		

表6-3 SMXA RI系統群によるミニサテライト遺伝子座と標識遺伝子との連鎖分析

ミニサテライト 遺伝子座	染色体 番号	標識遺伝子	組換え率 <sup>1)</sup>	遺伝的距離 (cM、95% 信頼限界)
Ms13-Hf10	3	Car-1	1/28	0.9 (0.0~6.3)
Ms13-Hf16	3	Cdm	5/26	6.7 (1.8~24.0)
Ms13-Hf3	7	C	7/28	10.0 (3.1~34.3)
Ms13-Hf21	7	Msp-1r	8/28	12.5 (4.1~45.0)
Ms13-Ps12	9	M10	5/28	6.1 (1.6~20.6)
Ms13-Hf8	9	M10	0/28	0.0 (0.0~3.7)
Ms13-Ps1	11	Hba	7/27	10.6 (3.3~37.8)
Ms13-Hf22	11	Hba	7/27	10.6 (3.3~37.8)
Ms13-Ps8	14	Es-10	8/28	12.5 (4.1~45.0)
Ms13-Ps13	14	Es-10	4/28	4.5 (1.0~16.0)
Ms13-Hf1	14	Es-10	6/28	7.8 (2.3~26.5)
Ms13-Hf2	14	Es-10	4/28	4.5 (1.0~16.0)
Ms13-Hf14	14	Es-10	7/28	10.0 (3.1~34.3)
Ms13-Hf13	15	Msp-2	5/28	6.1 (1.6~20.6)

1) (組換えを起こしたRI系統数) / (調べたRI系統数)

カーの数は異なっている。しかし、マッピングされたミニサテライト遺伝子座の数が染色体ごとに差がある原因は明らかではない。また、2つのマーカー間のSMXA系における組み換え率から、マーカー間の距離も求めた。その距離は、0～12.5cMの範囲であった。

この様に、38ミニサテライト遺伝子座のうち14が染色体上にマッピングされ(36.8%)、RI系統群を用いたミニサテライト遺伝子座のマッピングはかなり有効であることが示された。今後、SMXA系統群に対する遺伝子マーカーが増加するに連れて、その他のミニサテライト遺伝子座もマッピングされ、染色体へのさらに正確なマッピングが可能になることが期待される。

また、これらのミニサテライト遺伝子座の中で、Ms13-Ps1とMs13-Hf22は第11染色体にマッピングされたが、この染色体上には成長ホルモン (*gh*) や矮性 (*df*) などの成長に関わる遺伝子が存在している。これらの遺伝子とマーカー遺伝子、ミニサテライト遺伝子座の位置を図6-5に示す。この染色体上に位置しているミニサテライト遺伝子と成長に関する量的形質は深い関係があることが推測される。そこで、量的形質である下顎骨の大きさとDFPの関係を調べることにした。

### 3) DFPと下顎骨を用いたRI系統間の遺伝的類縁関係の比較

RI系統群は2つの近交系から作出された系統群である。そのため、RI系統間の遺伝的距離は、あまり近縁関係にない標準的な近交系間のそれよりもかなり小さくなる。しかし、第3章で示されたようにDFP法も下顎骨分析もマウス亜系統間の同定が可能なほど精度が高い。そこで、下顎骨のような量的形質から求められる遺伝的類縁関係とDFP法によって求められる遺伝的類縁関係との間に関係があるかどうかの比較を行った。図6-6は、A/J系とSM/J系の2つの祖先系と、SMXA系統の下顎骨標本の例である。SM/J系と比較してA/J系では下顎骨の大きさが大きいことがわかる。SMXA系では、SM/J系に近く下顎骨が小さいものからA/J系に近く大きいものまで、下顎骨の大きさが系統によって様々であることが示されている。これら標本からの測定値を表6-4に示す。

この下顎骨計測値からクラスター分析を行ったところ、A/J系統などの下顎骨



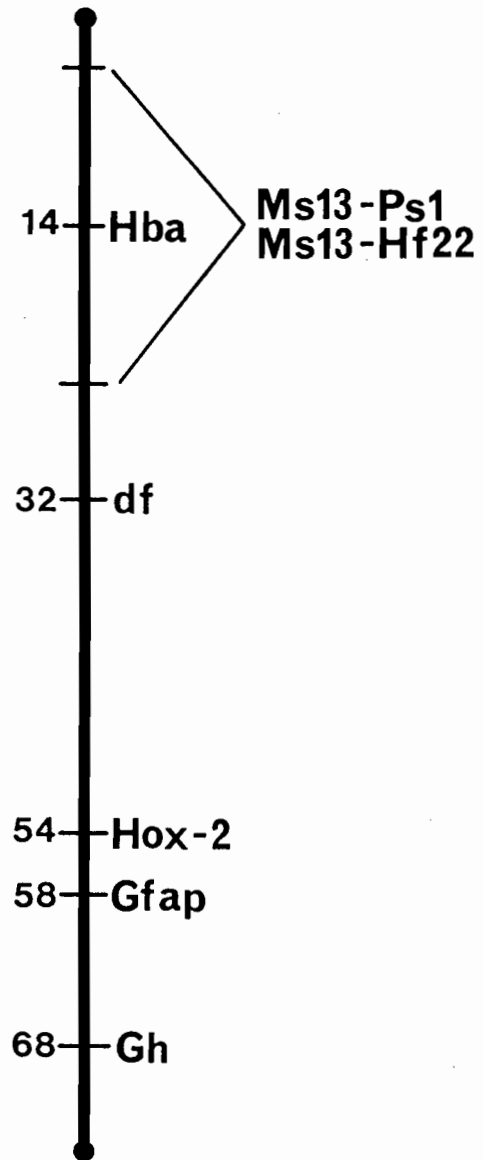


図 6-5 マウス第11染色体における遺伝子地図

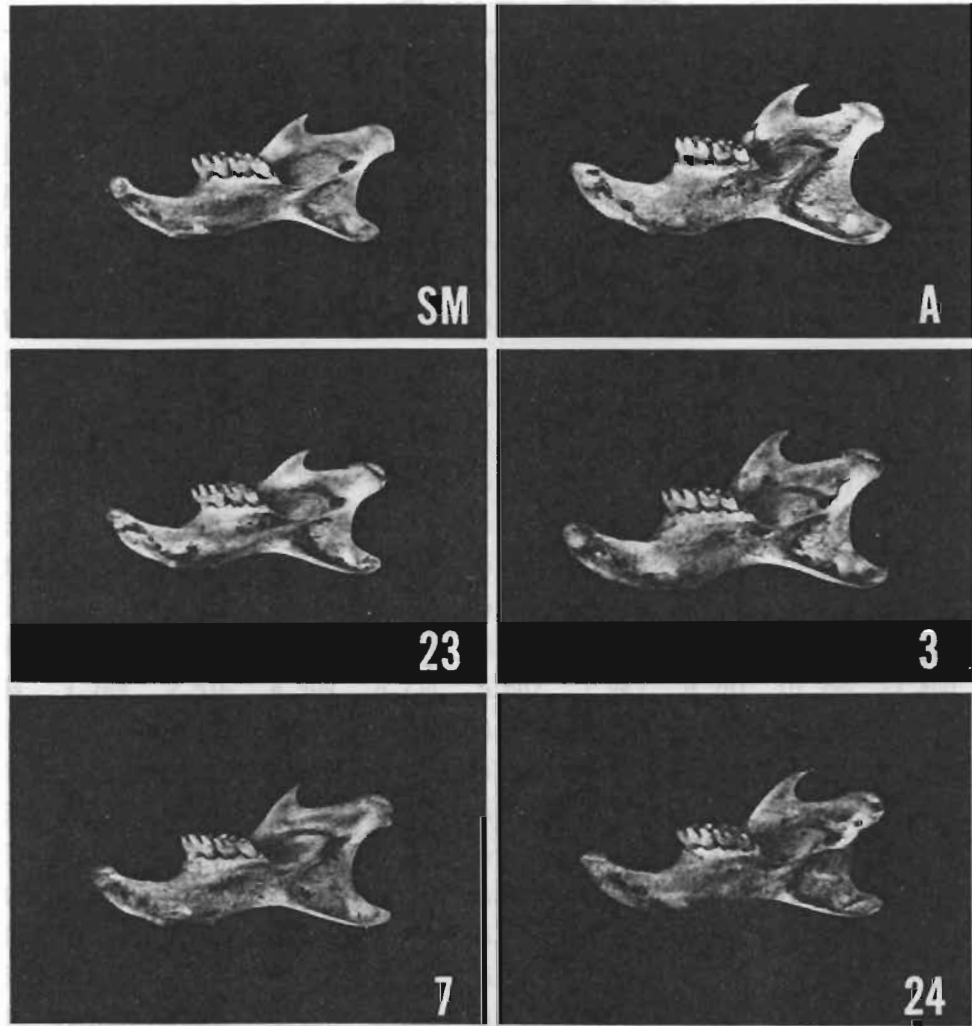


図 6-6 A/J系、SM/J系およびSMXA系統群の下顎骨標本の例  
 各標本の右下の数字はSMXAの各系統を示す。

表6-4 A/J、SM/J、およびSMXA各系統における下顎骨測定部位の平均値

系統	変 量 (mm)										
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>
A/J	0.856	1.929	2.713	4.691	5.451	5.958	8.329	8.790	10.568	12.203	11.822
SM/J	0.827	1.678	2.440	4.216	4.649	5.114	7.460	7.745	9.517	10.572	10.942
SMXA-1	0.855	1.701	2.428	4.344	5.041	5.286	7.684	7.801	9.756	11.162	11.189
3	0.986	1.990	2.731	4.742	5.294	6.075	8.230	8.612	10.800	12.240	12.171
4	0.845	1.785	2.486	4.405	4.922	5.200	7.588	7.653	9.843	11.038	11.133
5	0.876	1.785	2.536	4.383	5.020	5.351	7.824	8.135	10.097	11.406	11.365
6	0.845	1.783	2.592	4.680	5.464	5.874	8.036	8.476	10.196	11.511	11.655
7	0.826	1.830	2.584	4.545	5.122	5.527	7.991	8.149	10.193	11.625	11.860
8	0.830	1.866	2.586	4.668	5.181	5.642	8.195	8.545	10.277	11.719	11.812
9	0.863	1.949	2.661	4.457	5.117	5.520	7.885	8.184	9.999	11.323	11.535
10	0.840	1.842	2.706	4.549	5.116	5.690	8.025	8.272	10.470	11.704	11.637
11	0.827	1.890	2.652	4.504	4.995	5.576	8.244	8.817	10.505	11.799	11.793
12	0.822	1.856	2.693	4.491	4.961	5.482	8.109	8.383	10.229	11.550	11.462
14	0.794	1.769	2.516	4.509	5.234	5.602	7.943	8,281	10.350	11.400	11.576
15	0.837	1.776	2.459	4.536	5.188	8.636	7.790	8.208	9.894	11.310	11.287
16	0.850	1.810	2.519	4.489	4.984	5.364	7.809	7.964	10.132	11.348	11.518
17	0.966	1.879	2.659	4.659	5.291	5.714	8.060	8.543	10.246	11.627	11.720
18	0.861	1.807	2.570	4.538	5.155	5.591	8.041	8.267	10.315	11.777	11.744
19	0.911	1.868	2.586	4.655	5.220	5.813	8.183	8.653	10.453	11.765	11.653
20	0.814	1.798	2.501	4.306	4.725	5.342	8.152	8.550	10.087	11.448	11.407
21	0.857	1.882	2.578	4.582	5.360	5.660	8.092	8.351	10.690	12.168	11.715
21d	0.874	1.909	2.632	4.427	5.259	5.601	7.942	8.238	10.340	11.737	11.593
22	0.849	1.771	2.513	4.320	5.035	5.482	7.646	8.025	9,984	11.412	11.339
23	0.750	1.748	2.475	4.183	4.607	5.170	7.763	8.124	9.776	11.058	11.233
24	0.707	1.867	2.608	4.378	4.841	5.519	8.078	8.627	10.042	11.343	11.434
25	0.896	1.901	2.764	4.583	5.152	5.688	8.432	8.734	10.730	12.143	11.998
26	0.915	1.827	2.568	4.677	5.037	5.708	8.173	8.539	10.195	11.620	11.628
27	0.842	1.759	2.500	4.127	4.871	5.144	7.674	7.992	9.785	11.142	11.160
29	0.841	1.894	2.713	4.490	5.173	5.586	7.837	8.083	9.938	11.420	11.507
30	0.836	1.868	2.686	4.633	5.167	5.830	8.293	8.645	10.581	11.910	11.840

が大きい系統からなるクラスターとSM/J系統などの下顎骨が小さい系統からなるクラスターの大きく2つに分れた(図6-7)。

RI系統群のDFPでは、祖先系であるA/J由来の遺伝子型とSM/J由来の遺伝子型は各SMXA系統共に同数ずつ分布しているとは限らず、むしろ不均等に遺伝していた(表6-1)。例えば、SMXA-3はA/J由来の遺伝子型が多く、SMXA-22はSM/J由来の遺伝子型が多い。これは、SMXA系統群の中でもA/Jに近い系統やSM/Jに近い系統があることを示している。そこで、SMXA系統群で多型が認められた38ミニサテライト遺伝子座(表6-1)をもとにクラスター分析を行い、SMXA間の遺伝的類縁関係を調べた。その結果、図6-8が示すように、そのデンドログラムは大きく3つのクラスター(I、II、III)に分れた。このデンドログラムと下顎骨分析によるデンドログラムを比較すると、そのどちらのデンドログラムも下顎骨の大きさによってクラスターが分れるという傾向が認められた。しかし、ミニサテライト遺伝子座に基づく遺伝的距離であるPDと、下顎骨に基づく形態学距離であるマハラノビスの距離をすべての系統間で算出し、両者の相関を見たところ、有意ではあるが( $p < 0.01$ )、低い相関( $r = 0.20$ )しか認められなかった。

Wayne and O'Brien (1986) の報告によると、近交系マウス15系統を用い、生化学的遺伝子座に基づくNeiの距離と下顎骨に基づくマハラノビスの距離との相関は、 $r = 0.24$ で、両者の間には関連がないとされている。しかし、Festing and Roderick (1989) は、彼らを用いたサンプルには1組の亜系しか含まれておらず、また40年以内に分岐した系統が含まれていないこと、遺伝的距離と形態学的距離の関係が非線形であることにより相関係数が低くなったとしている。これらを修正して再分析すると、 $r = 0.63$ まで増加し、また同氏らが新たに複数の亜系と野生由来の系統を含む近交系マウス12系統を用い、両者の関係を見たところ、高い正の相関( $r = 0.72$ )があったと報告している。本研究においては、DFPに基づくPDと下顎骨に基づく形態的距離を示すマハラノビスの距離との相関を見たところ、有意ではあったが( $p < 0.01$ )、低い相関しか認められず( $r = 0.20$ )、Wayne and O'Brien (1986) と良く似た結果となった。この様にDFPにおけるバンドの有無と下顎骨の大きさによるデンドログラムが比較的類似していたにもかかわらず、PDに基づく遺伝的距離と下顎骨計測値に基づく形態学的距離との相関が低かった

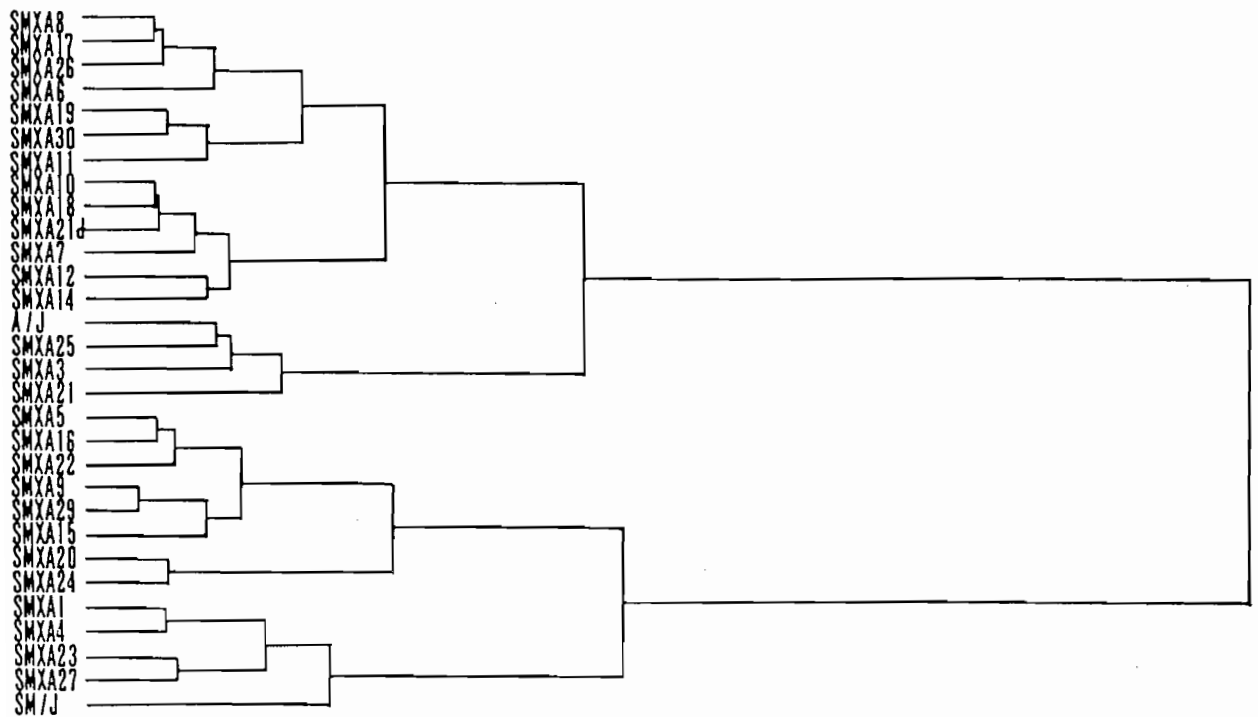


図6-7 下顎骨11部位計測値に基づくSMXA RI系統間のデンドログラム

のは、1) RI系統群は、2つの近交系から作出した系統から作出されているので、遺伝的に非常に近縁関係にあるため、2) Festing and Roderick (1989)やWayne and O'Brien (1986)の研究では、下顎骨の大きさのみを対象としているのに対し、本研究ではその大きさばかりではなく、形をも対象としているためと考えられる。これらのことから、骨の大きさに関与する遺伝子(群)は必ずしも形に関与するそれ(ら)と同じではないことが示唆された。従って次に、下顎骨の大きさとDFPのバンドとの関連を調べることにした。

#### 4) 下顎骨の大きさとミニサテライト遺伝子座との関係

量的形質として下顎骨を選んだ理由は、体重が食前食後、排泄の前後で変動が大きいのに比して下顎骨は環境要因の影響を受けにくいためである。表6-4の測定値から下顎骨の大きさの因子を抽出するため、主成分分析を行った。その結果、第1主成分の寄与率は66.4%、第2主成分の寄与率は13.2%、第3主成分の寄与率は7.5%となり、第3主成分までの累積寄与率は87.1%にのぼった(表6-5)。これらの寄与率から3つの主成分によって、下顎骨の形態的特徴の大半を把握することができることが示された。

表6-6は第1~3主成分における、各変量に対する固有ベクトルを示している。その係数から、PC1はすべて正であってどの変量が大きになってもPC1は大になることがわかる。すなわち、この主成分は下顎骨の大きさの因子を抽出していると解釈される。また、下顎骨が大きい個体は体重も大きくなると考えられるので、PC1は体重の指標とも考えられる。事実、PC1と体重の相関を調べると、相関係数0.656 ( $p < 0.01$ )の高い相関があり、下顎骨の大きさと体重はかなり関連があると言える。PC2、PC3では正負の符号が混同しており、このような場合、これらの主成分はプロポーションに関する因子を抽出していると解釈される。PC2では下顎骨後部(下顎枝)の高さを示す $X_4 \sim X_6$ の3変量の係数が負で大きな絶対値を示しており、このことから、PC2が大きな系統は下顎枝が低く、逆にPC2が小さい系統は下顎枝が高いことを示している。なお、 $X_1$ は下顎骨下縁の湾曲程度を示す測定部位であるが、どの系統も非常に変異が大きく、形態の特徴に関して大きな意義

表 6 - 5 下顎骨測定値に対する主成分分析の固有値とその寄与率

主成分(P C)	固有値	寄与率	累積寄与率
P C 1	7.3006	0.6637	
P C 2	1.4545	0.1322	0.7959
P C 3	0.8242	0.0749	0.8708

表 6-6 PC1~PC3 における固有ベクトル

変量	主成分		
	PC1	PC2	PC3
X <sub>1</sub>	0.1746	-0.5347	-0.3026
X <sub>2</sub>	0.2812	0.2053	-0.5709
X <sub>3</sub>	0.2610	0.3226	-0.5561
X <sub>4</sub>	0.3052	-0.3633	0.0963
X <sub>5</sub>	0.2763	-0.4194	0.0731
X <sub>6</sub>	0.3244	-0.2525	0.1106
X <sub>7</sub>	0.3232	0.3014	0.2294
X <sub>8</sub>	0.3003	0.2964	0.2865
X <sub>9</sub>	0.3422	0.0874	0.1526
X <sub>10</sub>	0.3465	0.0342	0.1342
X <sub>11</sub>	0.3405	0.0937	0.0882



を有していないと思われる。PC3では、下顎骨全部の高さを示す $X_2$ 、 $X_3$ の係数が共に負で絶対値が大きくなっている。このことから、PC3が大きな系統は前部が低く、小さな系統は高いことを示している。

この主成分分析の結果から、下顎骨の大きさはPC1によって説明され、また寄与率も高い(0.664)ので、このPC1とDFPとの関連を調べることにした。表6-7は各SMXA系統群のPC1を示している。SMXA系統のDFPから求められたデンドログラムは、3つのクラスターにわかれた(図6-8)。その各クラスターに含まれている系統を観察すると、クラスターIには、おおむね下顎骨の大きいA/J、SMXA-3、SMXA-25系統を含んでおり、クラスターIIには下顎骨の大きさが中程度の系統からなっており、クラスターIIIは下顎骨の小さい系統SM/J、SMXA-23、SMXA-27系統からなっていた。DFPによる3つのクラスターI、II、IIIにおける各系統のPC1の平均値は、クラスターIで2.07、クラスターIIで0.09、クラスターIIIで-1.64であった。このことは、DFPで検出されたいくつかのミニサテライト遺伝子座が下顎骨の形態、特に大きさに関わる遺伝子座と連鎖していることを示唆している。

次に、DFPの示すどのミニサテライト遺伝子座が下顎骨の大きさと関連しているのかを調べた。各系統の下顎骨の大小(PC1)と表6-3におけるミニサテライト遺伝子座のSDPとを詳細に比較、検討した。すなわち、各ミニサテライト遺伝子座についてA/J系あるいはSM/J系統由来の遺伝子座を有するRI系統の2つに分け、その2群に対してそれぞれのPC1を算出し、両群の平均値に対して差の検定を行った。その結果、Ms13-Ps1、Ms13-Hf1、Ms13-Hf14、Ms13-Hf20、およびMs13-Hf22において、表6-3のA型の遺伝子座を有する系統のPC1とSM型の遺伝子座を有する系統のPC1との間に有意差( $p < 0.05$ )が認められた(表6-8)。これら有意差が検出されたミニサテライト遺伝子座すべてにおいて、A/J型を示す系統群の第一主成分平均値がSM/J型のそれよりも大きい、すなわちこれらA/J型のミニサテライト遺伝子座を有する系統は下顎骨が大きいことを示している。Ms13-Ps1とMs13-Hf22は第11染色体に、Ms13-Hf1とMs13-Hf14は第14染色体にマッピングされたミニサテライト遺伝子座である。前述したように第11染色体は成長ホルモン(*Gh*)や矮性(*df*)などの成長に関わる遺伝子が関与しており、この染色体にマッピン

表6-7 SMXA RI系統の第1主成分平均値(PC1)

系統	PC1	系統	PC1
A/J	3.660	SMXA16	-1.430
SM/J	-5.584	SMXA17	1.731
SMXA1	-3.346	SMXA18	0.515
SMXA3	4.600	SMXA19	1.910
SMXA4	-3.423	SMXA20	-1.398
SMXA5	-1.537	SMXA21	1.926
SMXA6	1.157	SMXA21d	0.664
SMXA7	0.157	SMXA22	-2.048
SMXA8	1.362	SMXA23	-3.903
SMXA9	-0.217	SMXA24	-0.868
SMXA10	0.928	SMXA25	3.295
SMXA11	1.679	SMXA26	0.955
SMXA12	0.039	SMXA27	-3.620
SMXA14	-0.369	SMXA29	-0.287
SMXA15	-1.377	SMXA30	2.419

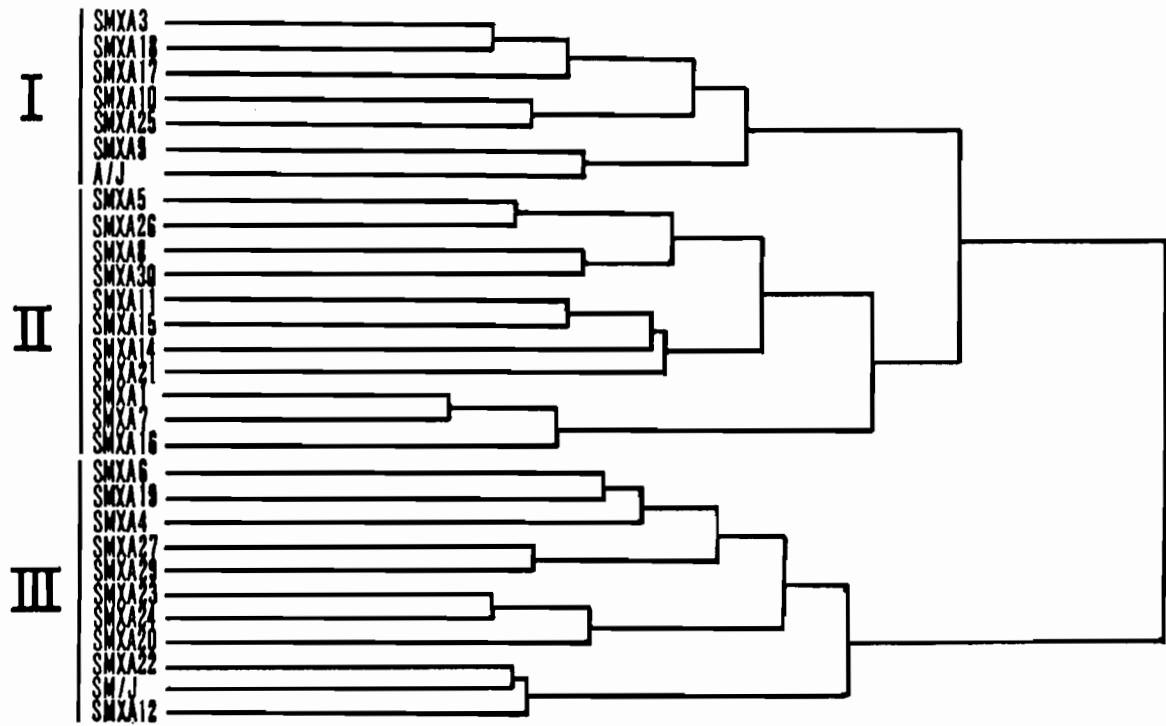


図6-8 DFPに基づくSMXA RI系統のデンドログラム

表6-8 SM系由来、A系由来のミニサテライト遺伝子座によって分類された  
SMXA RI系統のPC1平均値と標準偏差

遺伝子座	SM系由来	A系由来
Ms13-Ps1	-1.168 ± 1.925 (11)	0.725 ± 1.942 (17)*
Ms13-Hf1	-0.684 ± 2.213 (16)	0.868 ± 1.688 (12)*
Ms13-Hf14	-0.858 ± 1.819 (15)	0.949 ± 2.088 (13)*
Ms13-Hf20	-0.700 ± 2.196 (16)	0.889 ± 1.699 (12)*
Ms13-Hf22	-1.168 ± 1.925 (11)	0.725 ± 1.942 (17)*

\*: p<0.05

グされたミニサテライト遺伝子座が下顎骨の大きさと関係しているのは興味を持たれるところである。SH/J系とA/J系とでは、成長ホルモンやそれにかかわる因子などで異なっているのかも知れない。また、その他3つのミニサテライト遺伝子座で有意差が認められたが、このことは下顎骨の大きさのような量的形質に関与している遺伝子が複数であり、その内でも効果が大きいいくつかの遺伝子座が本研究で抽出されたと考えられる。

以上のように、DFP法をマウスのリコンビナントインブリード系統に適用したところ、約1/3のミニサテライト遺伝子座は各染色体上にマッピングできた。その結果、このDFPを染色体番号のわかった遺伝的マーカーとして利用することが可能となることが示された。また、このDFP法を用いて下顎骨の大きさに対する量的形質に関係する遺伝子と連鎖しているミニサテライト遺伝子座が検出できたことから、DFP法はQTLを検出するための有効な手法であることも示された。しかしながら、このミニサテライト遺伝子座と量的形質との関係に関しては、今回検出された数個のミニサテライト遺伝子座を指標にして戻し交雑実験を行い、さらにHaley (1991) の提唱した方法などを参考にしてさらに詳細な実験を行って、再検討する必要があると思われる。

## 総括

家畜において血液型を始めとする蛋白質多型は、個体識別や親子鑑別の血統検査、卵性鑑定、フリーマーチンの鑑定などに広く利用されてきた。ところが家畜集団の近交が上昇したり、両親が遺伝的に似通ってくると、これらの方法を用いての個体識別や親子鑑別などの精度が低くなり、多数の多型蛋白質分析が必要になってくる。

近年、遺伝子工学と呼ばれる新技術が発達するに従って、従来の血液型や多型蛋白質に代る方法として、遺伝物質であるDNAそのものの多型が注目されるようになった。ゲノムDNAの中には、ミニサテライトやマイクロサテライトと呼ばれる超可変領域が存在する。1985年、Jeffreysらはミニサテライト配列を反復したものをプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、そのバンドニングパターンは個体に特有とも言える複雑な様相を示し、それはあたかも個人に特有な指紋のようであったことから、これをDNAフィンガープリントと呼んだ。DFPは情報量が高く、さらに一つのプローブは任意の生物種にまたがって使用することが可能であるため、遺伝的マーカーがあまり開発されていない家畜・家禽では非常に有効な方法となり得ることが考えられる。

そこで本研究では、DFP法が家畜育種の有効な手法の一つになると考え、家畜育種学的な見地からの応用法や量的形質に対するマーカーとしての有効性を検討した。

### 1、6種類のプローブを用いたDNAフィンガープリント

DFPのプローブはこれまでに20種類ほど報告されているが、各研究者によって用いるプローブや制限酵素は異なり、各家畜種に対してどの組み合わせが有効であるのか明らかでない。更に、DFP法ではプローブと相同性の低い複数のミニサテライト領域まで検出するために、ハイブリダイゼーション後のメンブランの洗浄条件の設定が必須である。そこでまず、M13ファージの反復配列をプローブとして、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ラット、マウス、ニワトリ、ホロホロ鳥

などの家畜・家禽に対して良好なDFPが得られるか検討した。

その結果、メンブランの洗浄条件は哺乳類と鳥類では異なっていたが、哺乳類内(2×SSC, 0.1% SDS、55°C)や鳥類内(1×SSC, 0.1% SDS、60°C)では同一であった。次に良好なDFP像が得られる制限酵素を検討した。用いた制限酵素はウシでは*Hae*III、*Hinf* I、*Eco*R I、*Pst* I、ブタでは*Eco*R I、*Hae*III、*Msp* I、*Bam*HI I、*Hind*III、*Pst* I、ウマでは*Hae*III、*Msp* I、*Pst* I、マウスでは*Pst* I、*Msp* I、*Hinf* Iである。ニワトリでは洗浄条件決定の実験で*Hae*IIIが適していることが示されているので新しい制限酵素を用いての検討は行わなかった。その結果、ウシ、ウマ、ニワトリでは*Hae*III、ウサギでは*Pst* I、マウスでは*Pst* I、*Msp* I、*Hinf* Iが適していることが明らかとなった。

また、用いるプローブ数を増加すれば、個体識別や親子鑑別を始めとする種々の分析の精度を増すことになると考えられる。しかし、複数のプローブを同時に検討した報告はほとんどない。そこで、ウシとニワトリを実験の対象に選び、M13ファージ反復配列を始め、その他4種類のミニサテライト反復配列、YNZ22、33.15、 $\alpha$ -globin、mo-1と(GT)*n*マイクロサテライト反復配列をプローブとして用い、有効なDFP像が得られるかどうか検討した。

ウシは黒毛和種10個体とホルスタイン種10個体を用いて調べた。M13ファージ反復配列で27本、YNZ22プローブで29本の多型性の高いバンドが数多く検出され、プローブとして適していた。 $\alpha$ -globinプローブは明確なDFP像が得られたもののそのバンド数は16本と少なかった。mo-1、33.15、(GT)*n*プローブでは、明確なDFP像は得られず、この3種類はウシに対するプローブとしては適していなかった。

ニワトリは農林水産省家畜改良センター兵庫牧場でブロイラー作成の父系として系統維持されている白色コーニッシュ由来の52系統と我々の研究室で小さな閉鎖集団として系統維持しているWL-B系をそれぞれ10羽ずつ用いて調べた。6種類のプローブの中でM13ファージの反復配列、YNZ22、 $\alpha$ -globin、mo-1はそれぞれ8.3、19.7、11.2、24.0本の多型性の高い明確なバンドが得られ、ニワトリに対する有効なプローブであることが示された。しかし、M13ファージの反復配列の基本単位を合成して得たプローブと33.15プローブでは、不鮮明なDFP像が検

出され、プローブとしては適していなかった。

本実験で用いたいくつかのプローブは、反復単位のオリゴヌクレオチドから簡単な操作によって合成したものであるが、プローブとして十分に機能した。本法はミニサテライトの配列がわかれば簡単にプローブを得ることができるので、プローブ数を増加するのに有効な方法となることが示された。

## 2、DNAフィンガープリント法による個体識別と親子鑑別

D F P法はこれまでに、ヒトの個体識別と親子鑑別を中心に利用されてきた。D F P法の家畜・家禽に対する適用もいくつかされているが、種の違いや集団構成の違いによりどの程度、D F Pの精度があるのかを報告した例は少ない。そこでD F P法を用いた個体識別と親子鑑別が、我国のウシとニワトリに対してどの程度有効であるかを検討した。

ウシは閉鎖集団で飼育、維持されている兵庫県美方郡の但馬牛と34都道府県から出品された第6回全国和牛能力共進会第12区出品牛（全共牛）の2つの集団を分析した。プローブにはM13ファージの反復配列とYNZ22の2つを用いた。個体識別の精度はランダムに選んだ2個体が同一のD F Pを持つ確率で求めた。2つのプローブを用いた確率の合計は全共牛で $6.24 \times 10^{-6}$ 、但馬牛で $4.58 \times 10^{-7}$ と非常に低い値となり、1つだけのプローブを用いるだけでも個体識別は十分可能であることが示唆された。親子鑑別の精度は、ある子供の母親が確実に認知されている条件下で父親を判別し、その父親間には血縁がない場合に父親を誤って判定してしまう確率で求めた。2つのプローブを用いた確率の合計は全共牛で $1.80 \times 10^{-3}$ 、但馬牛で $6.17 \times 10^{-3}$ であった。また親子鑑別において父親間が兄弟である場合の確率も求めた。2つのプローブの合計は全共牛で $9.41 \times 10^{-2}$ 、但馬牛で $1.20 \times 10^{-1}$ であった。これらの結果から、親子鑑別において判別すべき種雄牛間に血縁がない場合はこの2つのプローブを用いて親子鑑別が十分可能であることが示されたが、種雄牛が兄弟である場合ではプローブ数を増やして判別するのが望ましいことが明らかとなった。全共牛と但馬牛では、何れの場合も全共牛の方がD F Pの多型性が高く、判別の精度が高い結果となったが、これは但馬牛では閉鎖集団で



飼育、維持されているために集団の近交が高まっており、その結果としてDFPの多型性が低くなっているためと考えられた。

ニワトリは前述の52系とWL-B系について調べた。用いたプローブはM13反復配列、YNZ22、mo-1、 $\alpha$ -globinである。個体識別の精度は、それぞれのプローブに対して $2.65 \times 10^{-6}$ 、 $8.09 \times 10^{-14}$ 、 $4.62 \times 10^{-16}$ 、 $8.94 \times 10^{-8}$  (52系)、 $2.65 \times 10^{-6}$ 、 $8.09 \times 10^{-14}$ 、 $1.70 \times 10^{-16}$ 、 $1.33 \times 10^{-8}$  (WL-B系)であった。4種類のプローブを用いた確率の合計は52系で $8.83 \times 10^{-42}$ 、WL-B系で $4.83 \times 10^{-41}$ と非常に低い値を示した。この結果から、個体識別にはこの4種類のプローブのうち1つを用いるだけで十分可能であることが示された。親子鑑別の精度は、ウシの場合と同様にある子供の母親が确实認知されている条件下で父親を判別し、その父親間には血縁がない場合父親を誤って判定してしまう確率で求めた。M13反復配列、YNZ22、mo-1、 $\alpha$ -globinプローブに対するそれぞれの確率は、 $4.73 \times 10^{-3}$ 、 $6.26 \times 10^{-6}$ 、 $6.75 \times 10^{-7}$ 、 $1.43 \times 10^{-3}$  (52系)、 $4.73 \times 10^{-3}$ 、 $6.26 \times 10^{-6}$ 、 $7.74 \times 10^{-7}$ 、 $1.49 \times 10^{-3}$  (WL-B系)であり、4つのプローブを用いた確率の合計は52系で $2.86 \times 10^{-17}$ 、WL-B系で $3.41 \times 10^{-17}$ であった。また親子鑑別において父親間が兄弟である場合の確率も求めた。M13反復配列、YNZ22、mo-1、 $\alpha$ -globinプローブに対するそれぞれの確率は、 $1.66 \times 10^{-1}$ 、 $1.75 \times 10^{-2}$ 、 $6.52 \times 10^{-3}$ 、 $9.90 \times 10^{-2}$  (52系)、 $1.66 \times 10^{-1}$ 、 $1.75 \times 10^{-2}$ 、 $8.36 \times 10^{-3}$ 、 $1.07 \times 10^{-1}$  (WL-B系)であり、4つのプローブの合計は52系で $1.87 \times 10^{-6}$ 、WL-B系で $2.58 \times 10^{-6}$ であった。これらの結果より、判別すべき種鶏間に血縁がない場合は4種類のプローブのうち1つか2つ用いれば十分判定可能であり、また種鶏が兄弟である場合もこの4つのプローブのうち多くとも3つを用いることで十分精度の高い判定が可能であることが示された。またこの4種類のプローブのうち特にYNZ22とmo-1は精度が高く有効なプローブであることが示されたが、これはこの2つのプローブがM13や $\alpha$ -globinと比較して倍以上のバンド数が検出できるためである。

以上の結果から、ウシ、ニワトリ共にいくつかのプローブを組み合わせることにより、DFP法は個体識別と親子鑑別に十分利用できることが示された。

### 3、DNAフィンガープリント法を用いた実験動物の遺伝的モニタリング

マウス、ラットを始めとする実験動物は、実験の再現性を重視するためにそれぞれの系統に対して遺伝的特性を保つように維持、育成されている。したがって、周期的に系統ごとの遺伝的な組成のチェックを行う必要がある。そのチェックを科学的な方法により検査し、その動物の遺伝的品質を客観的に保証することを遺伝的モニタリングという。現在、マウスにおいては生化学的標識遺伝子、免疫遺伝学的標識遺伝子、毛色などの形態学的標識遺伝子を利用して遺伝的モニタリングが行われている。しかし、マウスを除く実験動物では標識遺伝子の開発が進んでおらず、遺伝的モニタリングに利用できる標識遺伝子は極めて少ない。DFP法は一度に数多くの多型性に富む遺伝子座を検出でき、しかも各動物種特有のプロンプを開発する必要がないことから、特にこの様な実験動物で有効であると考えられる。また、マーカー数の多いマウスにおいても新しい遺伝的マーカーの開発が望まれている。そこで、DFP法が遺伝的モニタリングに有効であるかどうかを調べるために、近交系マウス、近交系マウス亜系、クローズドコロニーを含む実験用ウサギ、ほとんど遺伝的標識が開発されていないゴールデンハムスター、マストミスなどの近交系に本法を適用した。

調べた近交系マウス12系統は、DDD/Jah、DSD/Jah、RR/Jah、SS/Jah、C3H/He Jah、C57BL/6Jah、C57BL/6Slc、C57BL/6-*bg*、NC/Jah、NC-*brp*、CF#1/Jah、およびCFW/Jahである。M13ファージプロンプを用いたDFP像では、これらすべての近交系において、それぞれの系統内では全く同一のバンディングパターンを示し近交系として確立していることが認められた。系統間のDFP像では数多くの多型を示すバンドを検出でき、すべての系統で異なったバンディングパターンを示した。これらから、本法を用いた遺伝的モニタリングは有効であることが明らかとなった。

次に一つの近交系から分岐して生じたマウス亜系について調べた。用いた亜系はC57BL/6の亜系8系統(JJcl, JYok, JJms, JNrs, JSlc, Jah, NJcl, NCrj)とC3H/Heの亜系11系統(J, JJcl, JYok, JJms, JNrs, N, Jah, NJcl, NCrj, Slc, Nrs)である。C3H/He系のSlcとNCrjの2系統間とJ、JNrs、JYokの3系統間では同一のDFPパターンが得られたが、その他の系統間では系統特異的なバンディン

グパターンを示した。これまで垂系間で多型を示す生化学的遺伝標識はほとんどないと言っていいほど見付かっていないことから、DFPは垂系の遺伝的モニタリングの方法として非常に有効な手法となることが示された。

クローズドコロニーを含む実験用ウサギに対してもDFPを適用した。用いた系統は、クローズドコロニーの日本白色種、JW-NIBS、WHHL、Icl:JW、近交系のJWY-NIBS、ダッチ種の近交系であるDuY-NIBSである。JWY-NIBSは4個体、その他の系統は10個体を供試した。系統内、系統間の遺伝的類似性の評価には、percent difference (PD)を用いた。この値が大きいほど、遺伝的な距離は遠いことを示す。その結果、DuY-NIBSとJWY-NIBSの系統内では、全く同一のバンディングパターンを示し、近交系として確立していることが認められた。またその他3系統の系統内の平均PD値は、18.6 (JW-NIBS)、17.6 (Icl:JW)、13.7 (WHHL)であった。野性動物におけるPD値が、40~90であることから、これら3系統はかなり変異の少ない集団で、遺伝的均一性が高いことが示された。

同様に、近交系ゴールデンハムスターとマストミスにDFPを適用した。ゴールデンハムスターは、劣性遺伝子によって起こる長毛を固定した系統であり、またマストミスはMRJ系とMWC系の2系統である。これらの系統は最近になって20世代を超す近交が行われた系統であり、生化学的遺伝標識が開発されていないことから近交系確立の検査は行われていない。これらの系統のDFPを得たところ、系統内では全く同一のバンディングパターンを示し、近交系として確立されていることが示された。

以上の様に、DFP法はマウス近交系を始めとし、これまで他の生化学的遺伝標識では検出できなかった垂系間ですら多型が検出可能であった。また、有効な生化学的遺伝標識が開発されていない実験動物に対しても、簡単に適用できることが示された。このことから、DFP法は実験動物の遺伝的モニタリングに非常に有効であることが明らかとなった。

#### 4、DNAフィンガープリント法による遺伝的類縁関係の解明

集団や系統間の遺伝的類縁関係の研究は、これまで個体識別や親子鑑別と同様

血液型や多型蛋白質を用いて行われてきた。DFPは多型性の高いバンドを数多く検出できるので、遺伝的類縁関係を研究するには適していると考えられる。そこで、前述した12系統の近交系マウス、近交系マウス亜系、クローズドコロニーを含む実験用ウサギを用いて、これらの遺伝的類縁関係を明らかにすると共に、DFPの有効性を検討した。また日本ウズラ大小選抜系を用いて、その系統の分類が可能であるかどうか、系統内、系統間での遺伝的特性などについての検討を行った。

マウス12近交系のDFPからデンドログラムを作成したところ、そのクラスターはC57BL/6由来の3系統とその他の系統に大きく分れた。この結果は、生化学的遺伝標識や下顎骨から分析された結果と一致していた。NC-*brp*はNC/Jahと同じクラスターを形成したが、NC-*brp*はNC/Jahのコアイソジェニック系統であるためである。また、DDD/JahとDSD/Jahも同じクラスターを形成したが、これはこの2系統は同じddグループから派生したためだと考えられた。

C57BL/6系とC3H/He系亜系のDFPから作成したデンドログラムは、大きくC57BL/6系とC3H/He系のクラスターに分れた。各系統内では、これらの亜系間の遺伝的距離は、一般的に分岐した年数を経ているものほど遠い傾向を示したが、遺伝的関係の矛盾も認められた。一つのミニサテライト遺伝子座が突然変異を生じる確率は、系統が分岐した年数から計算して約0.001であり、これまで報告された突然変異率と良く似た値を示した。

実験用ウサギ5系統のDFPからデンドログラムを作成したところ、ダッチ種であるDuY-NIBSが最も遺伝的に離れており、Icl:JWとJW-NIBSは同じクラスターを形成した。これはウサギの下顎骨分析から得られた結果と同じであり、全体のクラスター構成も下顎骨分析の結果と同じ傾向を示した。

日本ウズラの3系統は、大方向に選抜されたLL系、小方向に選抜されたSS系、およびランダム集団のRR系に関して検討した。これらの系統は選抜開始時より60世代を経た系統である。この3系統のDFPを得たところ、系統特異的なバンドはLL系で6本、SS系で6本、RR系で3本検出された。また、2個体間の共通バンドの割合を示す、バンドシェアリングの値を調べたところ、0.62 (LL)、0.79 (SS)、0.57 (RR)とSS系で最も固定が進んでいることが明らかとなった。

このDFPからデンドログラムを作成したところ、すべての個体はそれぞれの系統のクラスターを構成し、この3系統は明らかに分岐が進んでいることが示された。

以上のように、DFPは近交系やクローズドコロニーなどの遺伝的構成に関わらず、一度の分析だけでその遺伝的背景をかなり正確に反映しており遺伝的類縁関係の解明には有効な手法となることが明らかとなった。

#### 5、DNAフィンガープリント法による血縁係数の予測

前研究のように系統や集団の構造を遺伝的マーカーを用いて分析する研究はいくつか報告があるが、個体間の遺伝的類似性がDNAマーカーにどの程度反映しているのか研究した例はほとんどない。そこで、血縁関係の良く分っている兵庫県美方郡の黒毛和種の閉鎖集団を用い、2個体間の血縁係数とDFPの類似性との関係を検討した。

得られたDFPから、2個体間の類似性の評価をするにあたって、DFPの比較は隣り合ったレーンのみとした。DFPから得られる遺伝的類似性の指標には、バンドシェアリング(BS)法とgenetic similarity(GS)法の2種類を用いた。BS法は集団に対する評価としては適しているが、DFPバンドのホモ、ヘテロを直接には評価していないので、2個体間の評価には誤差が生ずると考えられる。そこで、オートラジオグラム上のバンドの濃淡により、バンドのホモ、ヘテロを判定し、それから1つ1つのバンドにおける遺伝子座の類似性から2個体間の遺伝的類似性を計算する方法を考案した。これがGS法である。これら2種類の方法で求められた遺伝的類似性と血縁係数の単回帰分析を行った。

BS法を用いた場合、相関係数  $r=0.631$  の高い相関が認められた。また、GS法を用いた場合では、相関係数  $r=0.813$  のより高い相関が認められた。この結果は、血縁係数が高まるにつれて、DFPから求められる2個体間の遺伝的類似性は比例的に増加することを意味している。また、GS法によって求められる遺伝的類似性は、BS法を用いた場合よりも遺伝的背景をより良く反映しており、実際の個体間が持つ遺伝的類似性の真値に近いと考えられる。これらから、少なく

とも本実験で用いた美方郡の閉鎖集団における個体間の血縁係数は、 $y = 0.049 + 0.684x$  (BS法)、 $y = -0.206 + 1.149x$  (GS法) ( $x$ はBS法、GS法で求められる遺伝的類似性指数、 $y$ は予測される血縁係数)の式で予測が可能であることが示された。

## 6、リコンビナントインブレット系マウスにおけるミニサテライト遺伝子座のマッピングと量的形質の検出

遺伝的マーカーを用いて量的形質を連鎖により検出し、そのマーカーを指標として選抜に役立てようとする概念は、Marker assisted selection (MAS)として知られている。しかし、家畜においては有効な遺伝的マーカーが少ないために、量的形質に影響している遺伝子座 (QTL) はほとんど検出されていない。家畜種ごとにマーカーを開発する必要のないDFP法は、これらの目的に適していると言える。そこで、DFP法が量的形質の検出に適しているかどうかを検討するために、マウスのリコンビナントインブレット (RI) 系を用いて、DFPのバンドを各染色体へマッピングし、DFPバンドと量的形質との関連を調べ、考察を加えた。

マウスは浜松医科大で、A/J系とSM/J系から造成された28系統のRI系マウスSMXA系統群を用いた。DFPは制限酵素 *Pst*I と *Hinf*I を用いた。SM/J系は体重小方向に選抜された系統であるので、身体のサイズに関する量的形質に興味を持たれる。そのためマウスの量的形質には、下顎骨を選びその測定値に主成分分析を施した値を用いた。

得たDFPで多型を示すバンドに注目し、30のマーカー遺伝子との連鎖分析を行い、DFPバンドを染色体にマッピングしたところ、14本のバンドがマウス第3、7、9、11、14、15番の6つの常染色体上にマッピングされた。これら14のミニサテライト遺伝子座のうち、2つは第11染色体にマッピングされた。この染色体上には成長ホルモンや矮性の遺伝子など成長に係わる遺伝子が位置しており、身体の大きさに係わる量的形質との関連が期待される。

次に、SMXA系統群のDFPからデンドログラムを作成し、遺伝的類縁関係につ

いて調べることにした。そのデンドログラムは大きく3つのクラスターに分れた。このクラスターは、おおむね下顎骨が大、中、小の個体からなるクラスターであった。従って、DFPのバンドパターンと下顎骨の大きさは何らかの関係があることが考えられる。そこで、DFPが示すどのミニサテライト遺伝子座が下顎骨の大きさに影響しているのかを調べた。

下顎骨測定値に施した主成分分析から抽出される因子の内、第1主成分は下顎骨の大きさを反映しており、またその寄与率は0.664と高い。従って、この第1主成分を下顎骨が示す量的形質として用いた。次に、各ミニサテライト遺伝子座についてSM/J系あるいはA/J系由来の遺伝子座を有するRI系統の2つに分け、その2群に対してそれぞれの第1主成分を算出し、両群の平均値に対して差の検定を行った。その結果、5つのミニサテライト遺伝子座において、A/J系の遺伝子座を有する系統の第1主成分とSM/J系の遺伝子座を有する系統の第1主成分の間に差が認められた。これら有意差が検出されたミニサテライト遺伝子座すべてにおいて、A/J系の遺伝子型を持つ系統が第1主成分が大きいことが示された。この5つのミニサテライト遺伝子座のうち、2つは前述した第11染色体にマッピングされたものであった。このことは、SM/J系とA/J系では成長に関わるQTLで多型を有していることを示唆している。いずれにせよ、下顎骨のような量的形質に影響している遺伝子が、DFPのミニサテライト遺伝子と連鎖していることが示され、DFPは量的形質の検出にも有効であることが明らかとなった。

以上のことから、DFPはヒトばかりでなく家畜・家禽の遺伝的マーカーとして有効な方法となることが示された。また、家畜育種学的な見地からの応用法をいくつか検討したところ、個体識別、親子鑑別、実験動物等の遺伝的モニタリング、遺伝的類縁関係の解明、血縁係数の予測など、新しい適用が可能であることも示された。特に、マウス下顎骨の量的形質との関連が認められたことから、DFPを選抜の遺伝的マーカーとして用いることが可能であることが示唆された。

## 謝辞

本研究の実行並びに本論文の作成に際し、御懇切な御指導と御助言を賜りました神戸大学農学部、辻 荘一教授、後藤信男元教授、向井文雄助教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の作成に際し、御助言を頂きました神戸大学農学部、岩崎照雄教授、氷上雄三教授、上島脩志教授に深く感謝の意を表します。

本研究に際し、研究材料の提供を頂いた兵庫県立北部農業技術センター、太田垣 進氏、農林水産省家畜衛生試験場、福田勝洋博士、神戸大学医学部、塩見雅志教授、浜松医科大学動物実験施設、西村正彦教授、佐賀大学農学部、岡本 悟教授、鹿児島大学農学部、前田芳實助教授、東京大学医科学研究所、田中 慎助教授、国立予防衛生研究所、浅野敏彦博士、国立放射線医学総合研究所、岡本正則博士、財団法人日本生物科学研究所附属実験動物研究所、梅沢英彦氏、水谷 誠氏、矢沢 肇氏、農林水産省家畜改良センター兵庫牧場、狩野 昇氏、山本次人氏、佐藤忠昭氏に謹んで感謝の意を表します。

最後に、この研究の遂行に協力を得た神戸大学農学部応用動物遺伝学講座の大学院生並びに専攻生各位に感謝致します。



## 引用文献

- Ardiningsaki, S.M., Y. Maeda, S. Okamoto and T. Hashiguchi (1992). Protein polymorphism in the quail lines selected for large and small body size. Jpn. Poult. Sci., in press.
- Amos, B., J. Barrett and G.A. Dover (1991). Breeding behaviour of pilot whales revealed by DNA fingerprinting. *Heredity*, 67: 49-55.
- Bailey, D.W. (1971). Recombinant inbred strains, an aid to finding identity, linkage, and function of histocompatibility and other genes. *Transplantation*, 11: 325-327.
- Beever, J.E., P.D. George, R.L. Fernando, C.J. Stormont and H.A. Lewin (1990). Associations between genetic markers and growth and carcass trait in a paternal half-sib family of Angus cattle. *J. Anim. Sci.*, 68: 337
- Bell, G.I., M.J. Selby and W.J. Rutter, (1982). The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature*, 295: 31-35.
- Blanchetot, A. (1991). Genetic relatedness in honeybees as estimated by DNA fingerprinting. *J. Hered.*, 82: 391-396.
- Burke, T. and M.W. Bruford, (1987). DNA fingerprinting in birds. *Nature*, 327: 149-152.
- Burke, T., N.B. Davies, M.W. Bruford and B.J. Hatchwell (1989). Parental care and mating behaviour of polyandrous dunnocks *Prunella modularis* related to paternity by DNA fingerprinting. *Nature*, 338: 249-251.
- Capon, D.J., E.Y. Chen, A.D. Levinson, P.H. Seeburg and D.V. Goeddel, (1983). Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature*, 302: 33-37.

Carpenter, J. R. (1957). Genetical differentiation involving morphological characters in an inbred strains of mice. II. American branches of the C57BL and C57BR strains. *J. Morphol.*, 100: 377-388.

Chaig-Holmes, A.P. and M.W. Shaw, (1971). Polymorphism of human constitutive heterochromatin. *Science*, 174: 702-704.

Cohen, J.E. (1990). DNA fingerprinting for forensic identification: potential effects on data interpretation of subpopulation heterogeneity and band number volatility. *Am. J. Hum. Genet.*, 46: 358-368.

Coppieters, W., A. Van de Weghe, A. Depicker, Y. Brouquet and A. Van Zeveren, (1990). A hypervariable pig DNA fragment. *Anim. Genet.*, 21: 29-38.

Collick, A. and A. J. Jeffreys, (1990). Detection of a novel minisatellite-specific DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.*, 18: 625-629.

Dallas, J.F. (1988). Detection of DNA "fingerprinting" of cultivated rice by hybridization with human minisatellite DNA probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6831-6835.

Deol, M.S. (1962). Genetical differentiation involving morphological characters in an inbred strains of mice. I. A British branch of the C57BL strain. *J. Morphol.*, 100: 345-376.

Dover, G.A. (1989). Victim or perpetration of DNA turnover? *Nature*, 342: 347-348.

Dunnington, E. A., O. Gal, Y. Plotsky, A. Haberfeld, T. Kirk, A. Goldberg, U. Lavi, A. Cahaner, P.B. Siegel and J. Hillel (1990). DNA fingerprints of chickens selected for high and low body-weight for 31 generations. *Anim. Genet.*, 21: 247-257.

Dunnington, E.A., O. Gal, P.B. Siegel, A. Haberfeld, A. Cahaner, U. Lavi, Y. Plotsky and J. Hillel (1991). Deoxyribonucleic acid fingerprint comparisons between selected populations of chickens. *Poult. Sci.*, 70: 463-467.

- Ellegren, H., M. Johansson, K. Sandberg and L. Anderson (1992). Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Anim. Genet.* 23: 133-142.
- Festing, M.F. and T.H. Roderick, (1989). Correlation between genetic distances based on single loci and skeletal morphology in inbred mice. *Genet. Res.*, 53: 45-55.
- Fowler, S.J., P. Gill, D.J. Werrett and D.R. Higgs (1988). Individual specific DNA fingerprints from a hypervariable region probe: alpha-globin 3'HVR. *Hum. Genet.*, 79: 142-146.
- Fries, R., Aeggen and G. Stranzinger, (1990). The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics*, 8: 403-406.
- Geldermann, H., U. Pieper and B. Roth (1985). Effects of marked chromosome sections on milk performance in cattle. *Theor. Appl. Genet.*, 70: 138
- Geroges, M., A.S., Lequarre, M. Castelli, R. Hanset and G. Vassart, (1988). DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 47: 127-131.
- Gilbert, D.A., N. Lehman, S.J. O'Brien and R.K. Wayne, (1990). Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California Channel Island fox. *Nature*, 344: 764-767.
- Gilbert, D.A., C. Packer, A.E. Pusey, J.C. Stephens and S.J. O'Brien, (1991). Analytical DNA fingerprinting in lions: parentage, genetic diversity and kinship. *J. Hered.*, 82: 378-386.
- Gill, P., A.J. Jeffreys and D.J. Werrett (1985). Forensic applications of DNA 'fingerprints'. *Nature*, 318: 577-579.
- Goodbourn, S.E.Y., D.R. Higgs, J.B. Clegg and D.J. Weatherall, (1983). Molecular basis of length polymorphism in the human  $\zeta$ -globin gene complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 5022-5026.

後藤信男 (1991). 平成2年度科学研究費補助金試験研究(B)研究成果報告書.

後藤信男・今村憲吉・坂本賢一郎 (1977). 短指マウス(brp)の遺伝と成長. 実験動物, 26: 231-238.

後藤信男・三浦克洋・金子精一・米田嘉重郎 (1980). 下顎骨の形状による近交系マウス亜系の同定. 獣医学と統計利用, 5: 20-25.

Goto, N., K. Miura, K. Imamura and K. Komeda, (1981). Genetic relationships between substrains of inbred strains of mice as assessed by mandible analysis. Natl. Inst. Anim. Hlth Q (JPN), 21: 32-41.

Goto, N., K. Miura, K. Imamura and K. Komeda, (1982). Genetic relationships among 5 inbred strains established from common ancestor, dd mouse, as assessed by mandible analysis. Natl. Inst. Anim. Hlth Q (JPN), 22: 70-75.

Goto, N., K. Watanabe, H. Umezawa, H. Yazawa and S. Kuramasu (1987). Morphometrical observations on the mandible of five strains of rabbits and strain identification using mandible measurements. Lab. Anim., 21: 188-194.

Green, E.L. (1953). A skeletal difference between sublimes of the C3H strains of mice. Science, 117: 81-82.

Greval, M.S. (1962). The rate of genetic divergence of sublimes in the C57BL strains of mice. Genet. Res. (Camb.), 3: 226-237.

Gruneberg, H. (1954). Variation within inbred strains of mice. Nature, 173: 674-676.

Haberheld, A., D. Kalay, P. Weisberger, O. Gal and J. Hillel, (1993). Application of multilocus molecular markers in cattle breeding. 1. Minisatellites and microsatellites. J. Dairy Sci., 76: 645-652.

Haley, C.S. (1991). Use of DNA fingerprints for the detection of major genes for quantitative traits in domestic species. Anim. Genet., 22: 259-277.

- Higgs, D.R., S.E.Y. Goodbourn, J.S. Wainscoat, J.B. Clegg and D.J. Weatherall, (1981). Highly variable regions of DNA flank the human  $\alpha$ -globin genes. *Nucleic Acids Res.*, 9: 4213-4224.
- Higgs, D.R., J.S. Wainscoat, J. Flint, A.V.S. Hill, S.L. Thein, R.D. Nicholls, H. Teal, H. Ayyub, T.E.A. Peto, A.G. Falusi, A.P. Jarman, J.B. Clegg and D.J. Weatherall (1986). Analysis of the human alpha-globin gene cluster reveals a highly informative locus. *Proc. Natl. Sci. USA*, 83: 5165-5169.
- Hill, A.V.S. and A.J. Jeffreys (1985). Use of minisatellite DNA probes for determination of twin zygosity at birth. *Lancet II*, 1394-1395.
- Hillel, J., Y. Plotzy, A. Haberfeld, U. Lavi, A. Cahander and A.J. Jeffreys (1989). DNA fingerprint of poultry. *Anim. Genet.*, 20: 145-155.
- Hoelzel, A.R. and W. Amos (1988). DNA fingerprinting and "scientific" whaling. *Nature*, 333: 305
- Ikeda, K., K. Tsutsumi, S. Ejiri and Y. Yasuda (1993). DNA fingerprints applied to individual identification and paternity testing in bovines. *Anim. Sci. Technol.*, 64: 129-132.
- Jarman, A.P., R.D. Nicholls, D.J. Weatherall, J.B. Clegg and D.R. Higgs, (1986). Molecular characterisation of a hypervariable region downstream of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. *EMBO J.*, 5: 1857-1863.
- Jeffreys, A.J. and D.B. Morton (1987). DNA fingerprints of dogs and cats. *Anim. Genet.*, 18: 1-15.
- Jeffreys, A.J., V. Wilson and S.L. Thein, (1985a). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314: 67-73.
- Jeffreys, A.J., V. Wilson and S.L. Thein, (1985b). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316: 76-79.
- Jeffreys, A.J., J.F.K. Brookfield and R. Semeonoff, (1985c). Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*, 317: 818-819.

Jeffreys, A.J., V. Wilson, S.L. Thein, D.J. Weatherall and B.A. Ponder, (1986). DNA "fingerprints" and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. *Am. J. Hum. Genet.*, 39: 11-24.

Jeffreys, A.J., V. Wilson, R. Kelly, B.A. Taylor and G. Bulfield (1987). Mouse DNA 'fingerprints': analysis of chromosome localization and germ-line stability of hypervariable loci in recombinant inbred strains. *Nucleic Acid Res.*, 15: 2823-2836.

Jeffreys A.J., N.J. Royle, V. Wilson and Z. Wong, (1988). Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature*, 332: 278-281.

John, B. and G.L.G. Miklos, (1979). Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *Int. Rev. Cytol.*, 58: 1-114.

Kashi, Y., Y. Tikochisky, E. Genislaw, F. Iragi, A. Nave, J.S. Berckman, Y. Gruenbaum and M. Soller (1990). Large restriction fragments containing poly-TG are highly polymorphic in a variety of vertebrates. *Nucleic Acid Res.*, 18: 1129-1132.

Kuhnlein, U., Y. Dawe, D. Zadworny and J.S. Gavora, (1989). DNA fingerprinting: a tool for determining genetic distances between strains of poultry. *Theor. Appl. Genet.*, 77: 669-672.

Kuhnlein, U., D. Zadworny, Y. Dawe, R.W. Fairfull and J.S. Gavora, (1990). Assessment of inbreeding by DNA fingerprinting: Development of a calibration curve using defined strains of chickens. *Genetics*, 125: 161-165.

Lagercrantz, U.L.F., H. Ellegren and L. Andersson (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.*, 21: 1111-1115.

Lance, G.N. and W.T. Williams, (1967). A general theory of classificatory sorting strategies 1. Hierarchical system. *Computer Journal*, 9: 373-380.

Lander, E.S. (1989). DNA fingerprinting on trial. *Nature*, 339: 501-505.

- Lewontin, R.C. (1974). The genetic basis of evolutionary change. New York: Columbia University Press.
- Lynch, M. (1988). Estimating relatedness by DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.*, 5: 584-599.
- Lynch, M. (1990). The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.*, 7: 478-484.
- Meng, A., R.E. Cater and D.T. Parkin (1990). The variability of DNA fingerprinting in three species of swan. *Heredity*, 64: 73-80.
- Mclaren, A. and D. Michie (1954). Factors affecting vertebral variation in mice. 1. Variation within an inbred strain. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 2: 140-160.
- Mclaren, A. and D. Michie (1955). Factors affecting vertebral variation in mice. 2. Further evidence of intrastain variation. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 3: 366-375.
- Mitani, K., Y. Takahashi and R. Kominami, (1990). A GGCAGG motif in minisatellites affecting their germline instability. *J. Biol. Chem.*, 265: 15203-15210.
- Mukai, F., S. Tsuji, Y. Fukazawa, Y. Ohtagaki and Y. Nambu, (1989). history and population structure of a closed herd of Japanese Black cattle. *J. Anim. Breed. Genet.*, 106: 254-264.
- Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin and R. White, (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 25: 1616-1622.
- Nevo, E., A. Belies and R. Ben-Shlomo (1984). The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates. In: *Evolutionary dynamics of genetic diversity*, 53: (Mani GS, ed), New York: Springer-Verlag; 13-213.

Nybom, H. and B.A. Schaal (1990). DNA "fingerprintings" applied to paternity analysis in apples (*malus × domestica*). *Theor. Appl. Genet.*, 79: 763-768.

Oliverio, A. (1979). Uses of recombinant inbred lines. In *Quantitative Genetic Variation* (eds. Thompson, J.N. and J.M. Thoday), pp.197-218, Academic Press, Inc., New York, San Francisco, London.

Proudfoot, N.J. and A. Gill, (1982). The structure of the human zeta-globin gene and a closely linked, nearly identical pseudogene. *Cell*, 31: 553-563.

Quinn, T.W., J.S. Quinn, F. Cooke and B.N. White (1987). DNA marker analysis detects multiple maternity and paternity in single broods of the lesser snow goose. *Nature*, 326: 392-394.

Reeve, H.K., D.F. Westneat, W.A. Noon, P.W. Sherman and C.F. Aquadro, (1990). DNA "fingerprinting" reveals high levels of inbreeding in colonies of the eusocial naked mole-rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2496-2500.

Royle, N.J., R.E. Clarkson, Z. Wong and A.J. Jeffreys (1988). Clustering of hypervariable minisatellites in proterminal regions of human autosomes. *Genomics*, 3: 352-360.

Ryskov, A.P., A.G. Jincharadze, M.I. Prosnyal, P.L. Ivanov and S.A. Limborslaya, (1988). M13 phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganism. *FEBS*, 233: 388-392.

Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharff, R. Higuchi, G.T. Horn, K. Mullis and H.A. Erlich (1988). *Science*, 239: 487-494.

Sax, K. (1923). The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, 8: 552

Schafer, R., H. Zischler, U. Birsner, A. Becker and J.T. Epplen, (1988). Optimised oligonucleotide probes for DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 9: 369-374.



Schlager, G. and M.M. Dickie, (1967). Spontaneous mutations and mutation rates in the house mouse. *Genetics*, 57: 319-330.

Searl, A.G. (1954). Genetic studies on the skeletal of the mouse. IX. Cause of skeletal variation with pure lines. *J. Genet.*, 52: 68-102.

Shiomi, M., T. Ito, M. Shiraishi and Y. Watanabe, (1992). Inheritability of atherosclerosis and the role of lipoproteins as risk factors in the development of atherosclerosis in WHHL rabbits: Risk factors related to coronary atherosclerosis are different from those related to aortic atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 96: 43-52.

Silver, J. (1985). Confidence limits for estimates of gene linkage based in analysis of recombinant inbred strains. *J. Hered.*, 76: 436-440.

Silvers, W.K. and D.L. Grasser, (1973). The genetic divergence of sublines as assessed by histocompatibility testing. *Genetics*, 75: 671-677.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517.

Taylor, B.A., (1972). Genetic relationships between inbred strains of mice. *J. Hered.*, 63: 83-86.

上田 進 [編集] (1982). 小淵沢15年のあゆみ. pp23-24, 財団法人日本生物科学研究所, 東京

Vassart, G., M. Georges, R. Monsieur, H. Brocas, A.S. Lequarre and D. Christophe, (1987). A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellite in human and animal DNA. *Science*, 235: 683-684.

Ward, J.H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Amer. Stat. Assoc.*, 58: 236-244.

Watanabe, Y. (1980). Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis*, 36: 261-268.

Wahls, W.P., L.J. Wallace and P.D. Moore (1990). Hypervariable minisatellite DNA is a hotspot for homologous recombination in human cells. *Cell*, 60: 95-103.

Wayne, R.K. and S.J. O'Brien, (1986). Empirical demonstration that structural gene and morphometric variable of mandible traits are uncoupled between mouse strains. *J. Mamm.*, 67: 441-449.

Wetton, J.H., R.E. Carter, D.T. Parkin and D. Walters, (1987). Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, 327: 147-149.

Wright, S. (1922). Coefficients of inbreeding and relationship. *Am. Nat.*, 56: 330-338.

矢沢 肇・梅沢英彦・倉益茂実・宮嶋正廉 (1986). ウサギの近交系の確立. *実験動物*, 35: 203-206.

Yong, H.S. (1972). Subline differentiation a continuing process in inbred strains of mice?. *Genet. Res. (Camb.)*, 19: 53-59.

Yuhki, N. and S.J. O'Brien, (1990). DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 836-840.

Zischler, H., I. Nanda, R. Schafer, M. Schmid and J. Epplen (1989). Digoxigenated oligonucleotide probes specific for simple repeats in DNA fingerprinting and hybridization in situ. *Hum. Genet.*, 82: 227-233.