



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。



氏名・(本籍)	まん ねん ひて うき 万 年 英 之	(大阪府)
博士の専攻分野の名称	博 士 (農 学)	
学位記番号	博い第14号	
学位授与の用件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成6年3月31日	
学位論文題目	DNAフィンガープリント法の家畜育種への応用	

審 査 委 員	主査 教授 辻 莊 一		
	教授 岩 崎 照 雄	教授 水 上 雄 三	
	教授 上 島 脩 志		

論 文 内 容 の 要 旨

家畜・家禽の個体識別や親子鑑別等、卵性鑑定、フリーマーチンの鑑定の分析では、これまで血液型や多型蛋白質が用いられてきたが、これら遺伝的マーカーの多型性は必ずしも高いとは言えない。分析の精度を上げるには多数の遺伝子座の分析が必要となり、多型性に富む遺伝的マーカーの開発が望まれていた。近年、遺伝子工学の発展に従いDNAそのものの多型が検出できるようになった。

真核生物におけるゲノム中の機能していない領域の中には、ミニサテライトやマイクロサテライトと呼ばれる短い配列が高度に繰り返している領域が存在する。この様な領域は、繰り返し数の違いによる高度な多型性を有し、また類似の配列が数多くゲノム内に散在している。DNAフィンガープリント (DFP) 法は、この様な多数のミニサテライト遺伝子座を同時に検出する方法で、個体特有と言えるほどの複雑なバンディングパターンを示す。そこで本研究では、DFPが遺伝的マーカーの開発があまり進んでいない家畜・家禽に対して有効な遺伝的マーカーとして利用できると考え、家畜育種学的な見地からその応用法の検討を行った。また、量的形質に対するマーカーとしての有効性についても検討した。

1、6種類のプロープを用いたDNAフィンガープリント

DFPのプロープは20種ほどが報告されているが、研究ごとに対象とする生物種や制限酵素が異なり、統一されるまでには至っていない。また、DFP法ではプロープと相同性の低い複数の遺伝子座間で検出するために、分析可能な像を得るには洗浄条件の設定が必須である。そこで、本研究ではM13ファージ反復配列のプロープを用い、数種の家畜・家禽に対して良好なDFPの得られる条件を検討した。このM13ファージプロープに対するストリンジェンシーは哺乳類、鳥類で異なっていたが、哺乳類同士あるいは鳥類同士では同程度のストリンジェンシーを示した。そのメンブレンの最適洗浄条件は、哺乳類で $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, 55°Cであり、鳥類では $1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, 60°Cであった。良好なDFP像が得られる制限酵素の種類を調べたところ、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が適していた。また、ウシとニ

ワトリを対象とし、M13反復配列、Y N Z 22、 α -globin、33.15、mo-1、(G T)_nのうち、どのプローブが適しているかを検討した。ウシではM13反復配列とY N Z 22プローブ、ニワトリではM13反復配列、Y N Z 22、 α -globin、mo-1プローブが適していることが判明した。

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法がウシとニワトリの個体識別と親子鑑別にどの程度の精度を有しているのかを検討した。ウシは閉鎖集団で維持されている但馬牛と全国和牛能力共進会の出品牛（全共牛）、ニワトリは実用鶏の父系である52系と実験鶏のW L - B系に対して調べた。ウシでは前述の2種のプローブ、ニワトリでは4種のプローブを用いて調べたところ、個体識別の誤判別確率は全共牛で 6.24×10^{-8} 、但馬牛で 4.58×10^{-7} 、52系で 8.83×10^{-42} 、W L - B系で 4.83×10^{-41} となり、非常に高い精度を示した。母親が認知されている場合の父親の誤鑑別確率は、全共牛で 1.80×10^{-3} 、但馬牛で 6.17×10^{-3} 、52系で 2.86×10^{-3} 、W L - B系で 3.41×10^{-17} であった。また、判別すべき父親が兄弟であるときの誤判別確率は異なり、全共牛で 9.41×10^{-2} 、但馬牛で 1.20×10^{-1} 、52系で 1.87×10^{-6} 、W L - B系で 2.58×10^{-6} であった。この結果は、ウシ、ニワトリとも個体識別や血縁が関係しない親子鑑別は1、2種類のプローブを用いるだけで十分判別が可能であるが、判別すべき父親が兄弟である場合には、特にウシで複数のプローブの使用が必要であることを示していた。またウシ、ニワトリ共に閉鎖集団で維持されている但馬牛やW L - B系は、近交のため個体識別、親子鑑別共に判別率が低くなる傾向が示された。

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

実験動物は、実験の再現性を高めるために遺伝的特性を保つように維持されており、遺伝的な組成のチェック（遺伝的モニタリング）を行う必要がある。しかし、マウスを除く実験動物では遺伝的モニタリングを行うための標識遺伝子の開発が遅れており、またマウスにおいてもより精度の高い方法が望まれている。この遺伝的モニタリングに対し、D F P法が有効であるかどうかを検討した。まず、マウス12近交系に対して適用したところ、系統内では全く同一のパターンを示し近交系として確立していることが示された。また、12系統すべてが異なったパターンを示した。次に近縁関係の高いマウス亜系に対して適用し、C 57 B L / 6の亜系と C 3 H / Heの11亜系を調べたところ、ほとんどの系統で系統特異的なパターンを示し、亜系の識別においてもD F Pがモニタリングに有効であることが示された。さらに、標識遺伝子がほとんど開発されていない、ウサギ、ゴールデンハムスター、マストミスの遺伝的モニタリングに本法を適用した。ウサギでは2つの系統が近交系として確立していることが認められた。その他の3系統においても遺伝的にかなり固定されており、D F Pが系統の遺伝的固定度の指標となることが示された。本研究で用いたゴールデンハムスターの1系統とマストミスの2系統においても、本研究の結果初めて近交系として確立していることが示された。

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

集団や系統間の類縁関係の研究は、血液型や多型蛋白質を用いて行われてきたが、多くのマーカー遺伝子の分析を必要とする。D F Pは一度に多型性の高い多くのバンドを検出するので、この種の研究には特に適していると考えられる。そこで前述の近交系マウス、近交系マウス亜系、クローズドコロニーを含む実験動物と日本ウズラの大小選抜系を用いて分析を行った。

近交系マウス、近交系マウス亜系、実験用ウサギのそれぞれのD F Pからデンドログラムを作成し

たところ、すべてにおいてその遺伝的背景を良く反映している結果が得られた。ただし、非常に近縁関係にある垂系間では多型性が低くなるために遺伝的関係の矛盾も認められた。日本ウズラの選抜系でも体重大選抜系、体重小選抜系、対照系の3群を用いてデンドログラムを作成したところ、それらの個体は矛盾なく3群に分離された。また、マウス垂系を分析した結果からミニサテライト遺伝子座の突然変異率は0.001と推測された。以上から、DFP法では近交系やクローズドコロニー等の遺伝的構成に関わらず、一度の分析でその遺伝的背景をかなり正確に類推可能であることが示された。

5、DNAフィンガープリント法による血縁係数の予測

2個体間の遺伝的類似性が遺伝的マーカーにどの程度反映しているのかを研究した例はほとんどない。そこで、血縁関係の明らかな兵庫県美方群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調べた。DFPから遺伝的類似性を求める方法には、バンドシェアリング(BS)法とgenetic similarity(GS)法を用いた。BS法は2個体間の共通のバンドの割合で定義されている。GS法は本実験で考案した方法で、バンドの濃淡からホモ、ヘテロを判断し、その情報が類似性の判定に含まれるように考慮した。これら2種類の方法で求めた遺伝的類似性と血縁係数の単回帰分析を行った。BS法を用いた場合は相関係数 $r=0.631$ の高い相関が認められ、GS法を用いた場合は相関係数 $r=0.813$ とさらに高い相関が認められた。これは血縁が高まるに従い、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示している。DFP法を用いてこの集団の血縁係数を予測するためには、 $y=0.049+0.684x$ (BS法)、 $y=0.206+1.149x$ (GS法) (x はBS、GS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ッド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、量的形質に影響している遺伝子座(QTL)を検出し、選抜に役立てようとする試みがある。しかし、これまでマーカー数が少なく量的形質のマーカーはほとんど検出されていない。そこで、マウスのリコンビナントインブレッッド(RI)系を用いて、ミニサテライト遺伝子座のマッピングとマウス下顎骨に代表される量的形質とDNAマーカーとの関連の検出をDFP法を用いて試みた。

祖先系統のA/J系とSM/J系を含む30のSMXA RI系統群のDFPを得た。この多型を示すミニサテライト遺伝子座と染色体上の位置が分かっている30のマーカー遺伝子との連鎖分析を行ったところ、14のミニサテライト遺伝子座が第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。

マウスの量的形質には下顎骨の11測定値に主成分分析を施した値を用いた。その第1主成分の寄与率は0.664と高く、またその数値の傾向から下顎骨の大きさを反映していることが明らかとなった。この第1主成分値を量的形質として用いた。

SMXA RI系統群のDFPに基づくデンドログラムを作成したところ、そのクラスターは大きく3つに分れた。そのクラスターは下顎骨のサイズが大、中、小の個体からなっており、DFPと下顎骨の量的形質との関連が示唆された。

次に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。各ミニサテライト遺伝子座で、各RI系統が祖先系のどちらの遺伝子座を持つ系統なのかを区分し、その2群に対し

てそれぞれの第1主成分を計算し、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、有意差が認められ、下顎骨の大きさのQTLと連鎖していることが示された。この5つのミニサテライト遺伝子座のうち、2つは第11染色体上にマッピングされた遺伝子座である。第11染色体は成長ホルモンや矮性など成長に関わる遺伝子を含んでおり、これらの遺伝子が下顎骨の大きさに影響していることが示唆された。

以上のようにDFPのバンドが示すミニサテライト遺伝子座は染色体へのマッピングが可能であると共に、QTLを検出することが可能であり、この種の分析の遺伝的マーカーとして優れていることが認められた。

本研究から、DFPの個体識別、親子鑑別、実験動物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、染色体へのマッピング、QTLの検出に対する適用法が示され、いずれの結果もDFP法は家畜・家禽に対する遺伝的マーカーとして有効であることが示された。

論文審査の結果の要旨

家畜・家禽の育種では、血統登録、個体識別、親子鑑別、卵性鑑定、フリーマーチンの鑑定などが重要な作業である。旧来その目的のために血液型や多型蛋白質の分析が行われてきた。しかしながら、それらの遺伝的マーカーはその多型性は必ずしも高いとは言えず、精度の向上には多数の遺伝子座の分析が必要で、多大の努力を必要としている。

近年、遺伝子工学の発展に従いDNAそのものの多型を上記の目的に利用できるようになった。真核生物におけるゲノム中には、ミニサテライトやマイクロサテライトと呼ばれる短い塩基配列が高度に繰り返している領域が存在する。この様な領域は、繰り返し数の違いによる高度な多型性を有し、かつゲノム内に数多くある。DNAフィンガープリント(DFP)法は、複数のミニサテライト遺伝子座を同時に検出する方法で、個体特有と言えるほどの複雑なバンディングパターンを示す。

本研究では、遺伝的マーカーの開発があまり進んでいない家畜・家禽に対して有効な遺伝的マーカーとして、このDFP法が利用できるを考え、家畜育種学的な見地からその利用法を検討した。

第1章ではDFPの最適条件を検討した。DFPのプローブはこれまでに20種ほどが報告されているが、研究ごとに、また対象とする生物種ごとに最適なプローブや最適制限酵素が異なり、統一されるには至っていない。そこで、本研究では我が国で実用に供されている家畜・家禽に対して良好なDFPの得られる条件(プローブ、制限酵素、最適洗浄条件)を検討した。その結果、良好なDFP像が得られる制限酵素は、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で、プローブはウシではM13反復配列とYNZ22が、ニワトリではM13反復配列、YNZ22、 α -globin、mo-1が適していた。

第2章では、ウシとニワトリで最適のプローブであったM13反復配列とYNZ22を用い、個体識別と親子鑑別の精度を検討した。ウシは閉鎖集団として維持されている但馬牛と全国和牛能力共進会の出品牛(全共牛)、ニワトリは実験用集団のWL-B系と実用鶏の父系である52系を対象として調べた。ウシ、ニワトリ共に個体識別の誤判別確率は 10^{-8} 以下の非常に高い精度が得られた。母親が認知されている場合の父親の誤鑑別確率は、ウシで 10^{-3} レベル、ニワトリで 10^{-17} レベルであった。また、判別すべき父親が兄弟であるときの誤判別確率はウシで 10^{-1} レベル、ニワトリで 10^{-6} レベルであった。この結果から、ウシ、ニワトリとも個体識別や血縁が関係しない場合の親子鑑別は1、2種類のプローブを用いるだけで十分可能であるが、ウシでは判別すべき父親が兄弟である場合には複数

のプローブの使用が必要であることが示された。またウシ、ニワトリ共に閉鎖集団で維持されている但馬牛やWL-B系は、近交のため個体識別、親子鑑別共に判別率が低くなる傾向があった。

第3章では、DFP法を用いた実験動物の遺伝的モニタリングについて検討した。実験動物は、実験の再現性を高めるために遺伝的特性を保つように維持されており、遺伝的な組成のチェック（遺伝的モニタリング）を常に行う必要がある。しかし、マウスを除く実験動物では遺伝的モニタリングを行うための標識遺伝子の開発が遅れており、またマウスにおいてもより精度の高い方法が望まれている。この遺伝的モニタリングに対し、DFP法が有効であるかどうかを検討した。まず、マウス12近交系に対して適用したところ、12系統すべてが異なったパターンを示すと共に、系統内では全く同一のパターンを示した。次に近縁関係の高いマウス亜系に対して適用し、C57BL/6の8亜系とC3H/Heの11亜系を調べたところ、ほとんどの系統で系統特異的なパターンを示し、マウスの亜系の識別においてもDFP法が有効なことが示された。さらに、標識遺伝子がほとんど開発されていない、ウサギ、ゴールデンハムスター、マストミスの遺伝的モニタリング法としてDFP法は極めて有用である。

第4章は、DFP法による遺伝的類縁関係の解明について検討した。この研究では近交系マウス、近交系マウス亜系、クローズドコロニーを含む実験動物と日本ウズラの体重大小選抜系を用いてDFPによる類縁関係の分析を行った。近交系マウス、近交系マウス亜系、実験用ウサギのそれぞれについてDFPをもとにデンドログラムを作成したところ、いずれもその遺伝的背景を良く反映した結果が得られた。同じく、日本ウズラの体重大選抜系、体重小選抜系、対照系の3群を用いてデンドログラムを作成したところ、各々の個体は矛盾なく3群に分離された。以上から、DFPは近交系やクローズドコロニー等の遺伝的構成に関わらず、一度の分析でその遺伝的背景と類縁関係を正確に類推できることが示された。

第5章ではDFP法による血縁係数の予測について検討した。2個体間の遺伝的類似性が遺伝的マーカーの類似性にどの程度反映しているのかを研究した例はほとんどない。そこで、血縁関係の明らかな但馬牛を対象とし、2個体間の血縁係数とDFPの類似性との関係を調べた。DFPから遺伝的類似性を求める方法には、著者の開発したgenetic similarity (GS)法を用いた。GS値と血縁係数の単回帰相関は、 $r = 0.813$ と高い値が得られ、DFP法により血縁係数が、 $y = 1.149x - 0.206$ の式で予測できた。

第6章では、リコンビナントインブレッッド系マウスを用いてミニサテライト遺伝子座の染色体上のマッピングと量的形質との関連を検討した。遺伝的マーカーを用いて、量的形質に影響している遺伝子座(QTL)を検出し、選抜に役立てようとする試みがある。しかし、これまでマーカー数が少なく量的形質のマーカーはほとんど知られていない。そこで、マウスのリコンビナントインブレッッド(RI)系を用いて、下顎骨に代表される量的形質とDNAマーカーと(DFPのバンド)との関連を調べた。祖先系統のA/J系とSM/J系を含む30のSMXA RI系統群のDFPを得た。この多型を示すミニサテライト遺伝子座と染色体上の位置が明らかな30のマーカー遺伝子との連鎖分析を行ったところ、14のミニサテライト遺伝子座が第3、7、9、11、14、15番の常染色体上にマッピングされた。SMXA RI系統群でDFPに基づくデンドログラムを作成したところ、そのクラスターは大きく3つに分かれた。そのクラスターは下顎骨のサイズで大、中、小に相当し、DFPと下顎骨に代表される量的形質との関連が示唆された。分析の結果、この区分には5つのミニサテライト遺伝子座がかかわっており、そのうち2つは成長ホルモンや矮性など成長に関わる遺伝子を含む第11染色体上にマッピングされた。

以上のごとく、本研究は家畜育種学的の分野におけるDFP法の適用という今日的な課題に我が国で始めて取組み、個体識別、親子鑑別、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、染色体へのマッピング、QTLの検出など広範囲にわたる分野で多くの新知見を得たもので、畜産学ならびに実用上の貢献は極めて大である。したがって、学位申請者万年英之は、博士（農学）の学位を得る資格があるものと認める。