ブタにおける DNAフィンガープリント法の有用性

万年 英之・福田 智一・辻 莊一・後藤 信男

神戸大学農学部家畜育種学研究室, 神戸市 657

Usefulness of DNA Fingerprinting for Swine

Hideyuki Mannen, Tomokazu Fukuda, Soichi Tsuji,
and Nobuo Goto

Laboratory of Animal Breeding, Faculty of Agriculture, Kobe University, Kobe 657, Japan

染色体上に散在するミニサテライト遺伝子座は、反復単位の繰り返し回数の違いによる多大な多型性を持っている。1985年に Jeffreys *et al.* (1985a) によって開発された DNAフィンガープリント法は、この超可変ミニサテライト遺伝子座を検出する DNA多型分析法といえる。検出されるバンド数は非常に多く、そのバンディングパターンは個体に特有である (Jeffreys *et al.*, 1985b)。また子供のバンドは必ず両親のどちらかから受け継ぐ (Jeffreys *et al.*, 1985c, 1986)。この様な特徴から、DNAフィンガープリント法は個体識別や親子鑑別に有力な方法となることが知られている。最近ではこの他に、系統間の遺伝的距離を推定できること (Kuhnlein *et al.*, 1989)、生物集団の遺伝的構成の解明に役立つことがわかってきた (Wetton *et al.*, 1987; Reeve *et al.*, 1990; Gilbert *et al.*, 1990)。家畜、家禽に対しても本法は、個体識別や親子鑑別は勿論のこと、将来的には選抜のマーカーとして利用できる可能性を秘めている。そこで、我々は M13ファージ DNAの反復配列をプローブとして用いる場合、本法が豚でも上述のような核 DNAの分析に適しているか否かを調べるため、制限酵素の種類、ハイブリダイゼーションなど最適条件を模索した。また、こうして得られたフィンガープリント像について、親子鑑別と豚品種間の類似性など分析した結果を報告する。

材料と方法

豚は梅山豚、金華豚、ランドレース種の3品種、梅山豚と金華豚の F1、日本コツワルド K. K. 産のコツワルド PS (ランドレース種と大ヨークシャー種との合成豚)

とコツワルド28 (大ヨークシャー種、ハンプシャー種、デュロック種、ビエトレン種の合成豚) の F1 を用いた。

DNAの精製: DNAは血液か精子のいずれかから抽出、精製して用いた。血液からの DNAの精製は白血球から行った。1 mg/ml EDTA 存在下で血液を採血し、3000rpm, 10分間の条件で遠心分離した後、白血球層を分取した。10倍量以上の0.2% NaCl に良く混合し、3000rpm, 5分間の遠心分離で核を集めた。少量の生理食塩水に核を良く混合し、ザルコシル溶液 [0.5% N-lauroylsarcosine sodium salt, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA] を加えて DNAを抽出した。次いで、100 µg/ml の Proteinase Kを加え、37℃で1晩インキュベートした。この溶液に TE-phenolを加え、ゆっくりと10分間混和した後、3000rpm 10分間遠心分離し、水層を分取した。同様の操作を phenol・chloroform, chloroform で行った。Ethyl ether を加えて phenol を除き、10分間の1量の sodium acetate (pH 5.2), 2倍量の ethanol を加えて DNAを沈殿させた。70% ethanol で DNAを洗浄後、ethanol を完全に除き、TE に溶かし、サンプルとした。

精子からの DNA精製は次の操作に従った。採取した精液に対し10倍量以上の生理食塩水を加え、良く混合し、3000rpm 10分間遠心分離した。この操作を計3回行った。集めた精子と当量の生理食塩水を加え、良く混合した後、4M guanidine thiocyanate, 25mM sodium acetate, 0.84 β-mercapto ethanol を加え、37℃で1晩インキュベートした。0.6倍量の 2-propanol を加えて DNAを沈殿させ、70% ethanol で良く洗浄した後、ザルコシル溶液に溶かした。以下の操作は血液から

の DNA 精製と同様に行った。

DNA の制限酵素消化と電気泳動：用いた制限酵素は、*Hae* III, *Msp* I, *Eco* RI, *Bam* HI, *Hind* III, および *Pst* I の 6 種類である。制限酵素で消化した DNA 10 μ g を 1.2% アガロースゲルで 2 V/cm の条件で電気泳動した。以下の操作は基本的に Vassart *et al.* (1987) の方法に従った。すなわち、電気泳動が終了し

たゲルは 0.5M NaOH, 1.5M NaCl に 1 時間, 1M ammonium acetate, 0.03M NaOH に 1 時間浸した後、サザントランスファーにより、ニトロセルロース膜 (Schieicher & Schuell) に移行した。

プローブの作成とハイブリダイゼーション：プローブは M13 ファージの反復配列を用いた。5 μ g の ssM13mp 18DNA を 2 MBq の [α - 32 P] dCTP でオリゴ・

Fig.1. Parentage test using DNA fingerprints digested with respective restriction enzymes (*Eco* RI, *Hae* III, *Msp* I, *Bam* HI, *Hind* III, *Pst* I). M:Meshan Pig; J:Jinhua Pig; F1:F1 hybrid (M♀ × J♂).

プライマー法を用いて標識し、プローブとした。ハイブリダイゼーションは、40% formamide, 6×SSC (1×SSC 0.15M NaCl, 15mM sodium citrate), 5mM EDTA, 0.25% skim milk の溶液中で1晩行った。メンブランは4×SSC, 0.1% SDS, 55℃の溶液中で30分間、2回洗浄し、2×SSC, 0.1% SDS, 55℃の溶液中で30分間洗浄した後に、オートラジオグラムを得た。DNAフィンガープリントの評価: 2個体間におけるバンドパターンの比較は、次式によった (Wetton *et al.*, 1987)。

$$D = 2 N_{AB} / (N_A + N_B)$$

N_{AB} は個体AとBに共通のバンド数, N_A , N_B は個体A, Bそれぞれのバンド数, Dは遺伝的類似性の指数を示す。

結 果

図1は梅山豚の雌, 金華豚の雄, およびその子供の親子鑑別を行ったものである。Mは梅山豚, Jは金華豚, F1はその子供を示す。各豚の核DNAは6種の制限酵素 (*Eco* RI, *Hae* III, *Msp* I, *Bam* HI, *Hind* III, *Pst* I) でそれぞれ消化し、フィンガープリント像を得た。いずれの制限酵素を用いても子供のバンドは必ず両親のどちらかから由来しており、親子鑑別が可能であることがわかる。DNA断片の大きさが1kbから20kbの範囲でのバンド数は制限酵素によって異なり, *Eco* RI: 24.7 ± 1.3 , *Hae* III: 13.7 ± 3.1 , *Msp* I: 21.7 ± 2.1 , *Bam* HI: 18.3 ± 2.1 , *Hind* III: 19.7 ± 0.5 , *Pst* I: 15.7 ± 0.5 (Mean±SD) であった。全体像のパターンは、用いる制限酵素によって特徴的であった。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散在しているもの (*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領域に存在しているもの (*Hae* III) であった。

図2は、制限酵素 *Msp* Iを用いた豚3品種、合成豚のF1のDNAフィンガープリントである。どの個体も1kbから20kbの範囲で、20~25本のバンドが観察された。品種内、品種間のどの個体においても個体特有のバンディングパターンが観察された。

品種内、品種間で遺伝的類似性を調べた結果が、表1に示してある。品種内ではどの品種もD値が高い。それに対し、品種間のD値は品種内の約半分である。組み合わせのうち、ランドレース種と合成豚のF1が他の組み合わせ ($D=0.28$) と比較して高い値を示した ($D=0.38$)。

考 察

本報告では、M13ファージDNAの反復配列をプローブとして用い、豚核DNAのフィンガープリント分析を行った。M13プローブは大腸菌から高等生物にいたるまで、多種にわたるミニサテライトDNAとハイブリダイズし、フィンガープリントが得られることが報告されている (Vassart *et al.*, 1987; Rogstad *et al.*, 1988; Ryskov *et al.*, 1988; Nybom & Schaal, 1990; 万年ら, 1990)。

6種の制限酵素を用いたそれぞれのフィンガープリント像の全体のパターンは、それぞれの制限酵素によって特徴的であった (図1)。制限酵素の認識部位が、検出されるミニサテライト領域に存在せず、その他の領域にランダムに存在するのであれば、4塩基認識の制限酵素間では同じような全体像が得られるはずである。6塩基認識の制限酵素間でも同じである。6塩基認識の制限酵素は、*Pst* I, *Eco* RI, *Bam* HI, *Hind* III である。*Eco* RIと*Bam* HIでは全体像がよく似ているのに対し、*Hind* IIIではそれよりも高分子領域にバンドが集中しており、*Pst* Iでは全域にバンドが分散している。4塩基認識の制限酵素は、*Hae* IIIと*Msp* Iである。*Msp* Iでは全域にバンドが分散しているが、*Hae* IIIでは高分子領域にはバンドはほとんど存在していない。これらの理由は明確ではないが、1) *Hind* IIIでは、その認識配列がミニサテライト領域の前後に存在している頻度が低いいため、1つのバンドが複数のミニサテライト領域を含んでいる、2) *Pst* Iや*Hae* IIIでは、プローブに対するいくつかのミニサテライト領域の反復単位中に、これらの制限酵素の認識配列が存在するために検出される領域数が減っている、などの理由が考えられる。

いずれの制限酵素を用いても親子鑑別が可能であったが (図1)、豚の分析に適した制限酵素は 1) バンド数が多い、2) バンドやバックグラウンドがスミアになっていない、3) バンドが散在しているため分析が容易という点から、*Msp* Iが適していると思われる。

豚の3品種と合成豚のF1に対する分析では、個体に特有のバンディングパターンが観察され、個体識別が可能であることが示唆された (図2)。また、品種内と品種間で遺伝的類似性を、前述の式に従って求めたところ (表1)、品種内では高いD値が観察された (0.45~0.61)。これはどの品種および合成豚のF1も少集団から得られているので、個体間の血縁が高まっているものと思われる。特に梅山豚、金華豚のコロニー (神戸大) は、数頭の種畜から構成されたので特にD値が高くなっているものと思われる。品種間のD値は、品種内の値と比較して

Fig.2. DNA fingerprints of three breeds and synthetic swine
M:Meishan Pig; J:Jinhua Pig; L:Landrace; Syn: F1 hybrid
(Cotswold PS $\text{\textregistered}$ $\times$ Cotswold 28 $\text{\textregistered}$).

Table 1 Similarity* matrix among 3 breeds and synthetic swine (Mean $\pm$ SD)

	M	J	L	Syn
M	0.57 $\pm$ 0.16	0.29 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.09	0.30 $\pm$ 0.05
J		0.61 $\pm$ 0.22	0.28 $\pm$ 0.06	0.28 $\pm$ 0.04
L			0.45 $\pm$ 0.09	0.38 $\pm$ 0.08
Syn				0.53 $\pm$ 0.18

Values on the diagonal are within breed and off diagonal between breeds.

*: See text

M: Meishan Pig J: Jinhua Pig L: Landrace

Syn: F1 hybrid (Cotswold PS ♀ $\times$ Cotswold 28 ♂)

約半分であった (0.24~0.38)。合成豚のF1とランドレース種のフィンガープリント像の組み合わせでは、他の組み合わせのものと比較して高いD値を示した (表1)。これは合成豚にランドレース種を用いているために、他の組み合わせより遺伝的に近縁になっているためであろう。これらの結果から DNA フィンガープリント法による分析は、遺伝的類似性を直接反映しているものと言える。

要 約

M13 フェージの反復配列をプローブとして用い、豚核 DNA のフィンガープリントを得る場合、制限酵素としては *Msp* I が最も適していた。梅山豚、金華豚、そのF1の親子鑑別では、F1のバンドは必ず親のどちらかに由来しており親子鑑別が可能であった。豚3品種、合成豚を用いて検討したところ、各個体毎に特有のバンディングパターンが得られ、個体識別が可能であることが示唆された。これらから遺伝的類似性を比較した結果、品種間よりも品種内で遺伝的に近く、フィンガープリント像は遺伝的背景を反映していることが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、貴重な試料を提供してくださった丸紅飼料株式会社技術センターの菱山和洋氏に深く感謝します。

文 献

- Gilbert, D. A., N. Lehman, S. J. O'Brien & R. K. Wayne, 1990. Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California Channel Island fox. *Nature*, 344: 764-766.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson & S. L. Thein, 1985a. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314: 67-73.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson & S. L. Thein, 1985b. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316: 76-79.
- Jeffreys, A. J., J. F. Y. Brookfield & R. Semmeonoff, 1985c. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprinting. *Nature*, 317: 818-819.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson, S. L. Thein, D. J. Weatherall & B. A. J. Ponder, 1986. DNA "fingerprints" and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. *Am. J. Genet.*, 39: 11-24.
- Kuhnlein, U. Y., Y. Dawe, D. Zadworny & J. S. Gavora, 1989. DNA fingerprinting: a tool for determining genetic distances between strains of poultry. *Theor. Appl. Genet.*, 77: 669-672.
- 万年英之, 辻 莊一, 後藤信男, 1990. M13 フェージを用いたニワトリ核 DNA のフィンガープリント. *日畜会報*, 61: 1057-1062.

- Nybom, H. & B. A. Schaal, 1990. DNA "fingerprints" applied to paternity analysis on apples (*malus X domestica*). Theor. Appl. Genet., 79: 763-768.
- Reeve, H. K., D. F. Westneat, W. A. Noon, P. W. Sherman & C. F. Aquadro, 1990. DNA fingerprinting reveals high level of inbreeding in colonies of the eusocial naked mole-rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2496-2500.
- Rogstad, S. H., J. C. Patton II & B. A. Schaal, 1988. M13 repeat probe detects DNA minisatellites-like sequence in gymnosperms and angiosperms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 9176-9178.
- Ryskov, A. P., A. G. Jincharadze, M. I. Prosnyal, P. L. Ivanov & S. A. Limborslaya, 1988. M13 Phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganisms. FEBS, 233: 388-392.
- Vassart, G., M. Georges, R. Monsieur, H. Brocas, A. S. Lequarre & D. Christophe, 1987. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. Science, 235: 683-684.
- Wetton, J. H., R. E. Caeter, D. T. Parkin & D. Walters, 1987. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. Nature, 327: 147-149.

Usefulness of DNA Fingerprinting for Swine

Hideyuki Mannen, Tomokazu Fukuda, Soichi Tsuji,
and Nobuo Goto

Laboratory of Animal Breeding, Faculty of Agriculture, Kobe University, Kobe 657, Japan

For obtaining clear DNA fingerprint and detecting variation with the bacteriophage M13 probe in swine, *Msp* I was suitable enzyme in the several restriction enzymes examined. Parentage test was carried out with fingerprints of Meishan Pig, Jinhua Pig and their F1 offspring. All bands of F1 were always originated from either parent. DNA fingerprinting analysis of their breeds (Meishan Pig, Junhua Pig and Landrace) and synthetic swine showed that their banding pattern is specific to each individual. Comparison with these banding patterns suggested the pattern is more similar within breeds than between breeds. Thus, DNA fingerprinting is useful not only for identifying the individual and parent-offspring but also for classifying the breeds of swine.