Application of DNA Fingerprinting to Investigation of Genetic Relationships between Laboratory Rabbit Strains

Toshiki SUDO***, Soichi TSUJI, Hideyuki MANNEN, Nobuo GOTO, Hidehiko UMEZAWA*, Makoto MIZUTANI*, Hajime YAZAWA*, and Masashi SHIOMI**

*Laboratory of Animal Breeding, Faculty of Agriculture, Kobe University, 1 Rokkodai, Kobe-shi, Hyogo 657, *Nippon Institute for Biological Science, Laboratory Animal Research Station, Kobuchizawa, Yamanashi 409-16, and **Institute for Experimental Animals, Kobe University School of Medicine, 7 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe-Shi, Hyogo 650, Japan*

(Received 2 October 1992/Accepted 20 January 1993)

It is well known that laboratory rabbits are not controlled genetically like laboratory mice and rats. In order to test the usefulness of DNA fingerprinting in investigation of genetic uniformity of the laboratory rabbits strains and their relationships, we applied DNA fingerprinting using bacteriophage M13 probe to five strains (2 inbreds (JWY-NIBS and DuY-NIBS) and 3 outbreds (JW-NIBS, Icl : JW and WHHL)). DNA fingerprints of 2 inbred strains showed the same banding patterns within each strain but the strain-specific patterns. Although there were no rabbits showing the same banding patterns in 3 outbred strains, average percent differences (APD) were 13.7 to 18.6. A dendrogram based on APD of DNA fingerprints was constructed by 2 large clusters, JW group and DuY. The dendrogram was essentially similar to that based on rabbit mandible measurements. These results suggest that DNA fingerprinting is available not only for the genetic monitoring of the laboratory rabbit strains but also for the investigation of their genetic relationships.—KEY WORDS : DNA fingerprint, genetic monitoring, genetic relationships, Japanese white rabbit

実験用ウサギ系統の類縁関係検討への DNA フィンガープリント法の適用

周 藤 俊 樹・辻 莊 一・万 年 英 之・後 藤 信 男・梅 沢 英 彦*
水 谷 誠*・矢 沢 肇*・塩 見 雅 志**

神戸大学農学部家畜育種学教室

*財団法人日本生物科学研究所附属実験動物研究所

**神戸大学医学部動物実験施設

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。これらのうち、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

***Present address : Toshiki SUDO, Dept. of Pharmacology & Experimental Therapeutics, Tokushima Res. Inst., Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd., 463-10 Kagasuno, Kawauchi-cho, Tokushima 771-01, Japan

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みられると言われている。

一般に、系統の遺伝的均一性や系統間の類縁関係を検討するために多くの方法が適用されているが、最も広く用いられている方法はタンパク質多型を支配している生化学的遺伝子を利用する方法であろう。野生、家畜の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検出されていないために、マウス、ラットにみられるほどこの方法は有効な手法になっていない。

Jeffreysら[8]によって開発されたDNAフィンガープリント (DFP) 法は、ゲノムDNA中のミニサテライトの多型を検出する方法で、ヒトをはじめ各種動物の個体識別、親子鑑別に利用されている[2,8,9,10,12]。また、集団の平均近交係数、個体間の血縁係数のDFPのバンディングパターンとの関係など集団の遺伝的構成や、集団間の遺伝的類縁関係の推定にも利用されている[4,5,11,14]。実験動物分野においては、万年ら[13]は、DFP法が近交系マウスの系統の同定と類縁関係の推定に有効であることを報告している。著者ら[17]は、プローブにM13ファージの反復配列を用いて、DFP法を実験用ウサギに適用したところ、個体識別、親子鑑別に有効であることを確認した。そこで、本実験では、このM13ファージ反復配列をプローブにしたDFP法が、実験用ウサギ系統の遺伝的均一性と遺伝的モニタリングおよび系統間の遺伝的類縁関係をみるのに有効であるかどうかを検討した。

材料および方法

供試動物には、日白種ウサギのクローズドコロニーとして(財)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個体と、近交系として(財)日生研で維持されている日白種のJWY-NIBS 4個体、グッチ種の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いる[18]。WHHLは、過去いろいろな繁殖維持方式がとられてきたが[16,19]、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、各群から冠狀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、長野県産の日白種由来で、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については文献[7,18,21]に詳述されている。

サンプルDNAは、これらの個体から採血した血液を、フェノール・クロロフォルム抽出法で精製したものをを用いた。この精製DNA10 μ gを制限酵素Pst Iで消化後、1.2%、40cmアガロースゲルを用い、2V/cm、90時間の条件で電気泳動を行った。電気泳動後、DNAを強化ニトロセルロース膜にサザンブロットした。プローブにはM13ファージDNA反復配列を[α -³²P] dCTPでプライマー伸長法により標識したものをを用いた。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション後の洗浄は、55℃、4 $\times$ SSC、0.1% SDS、30分、2回、55℃、2 $\times$ SSC、0.1% SDS、30分、1回の条件で行った。洗浄後、オートラジオグラフィーにより検出した[12,17]。

DFPの評価には、次式で表されるaverage percent difference (APD)を用いた[22]。

$$PD = [F_{ab} / (F_a + F_b)] \times 100$$

F_a 、 F_b はそれぞれ個体a、bのバンド数、 F_{ab} はa、b 2個体間で異なるバンド数を示している。APDは、集団内あるいは集団間で各個体についてpairwiseにPDを計算し、得られた全PDを平均したものである。集団内のAPD値は、その集団の遺伝的均一性の指標となり、値が低いほど均一性の高い集団であると推定できる。また、集団間で算出したAPD値はその集団間の遺伝的距離となる。系統間のデンドログラムはこのAPD値をもとにUPG (Unweighted Pair-Group Clustering)法で作成した。

成績

Fig. 1は上記5系統のDFP像である。1個体当たり20~28本のバンドが検出された。クローズドコロニーの日白種3系統は平均23.5本で、同一のバンディングパターンを示す個体はなかった。近交系のJWY-NIBS, DuY-NIBSはともに21本で、それぞれ系統内で変異がみられず、他の系統と異なる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確

Fig. 1. DNA fingerprints made with a bacteriophage M13 probe on *Pst* I-digested DNA of 5 strains of laboratory rabbits

Fig. 2. A dendrogram of 5 strains of laboratory rabbits based on DNA fingerprints. Scale refers to the APD values between strains

認された。また、5系統全てに共通なバンドは5本、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本見られた。このことにより、DFP法は実験用ウサギ系統の遺伝的モニタリングに有効であることが示された。Table 1はこれらのバンドをもとに算出した各系統内、系統間のAPD値である。2つの近交系は各系統内でバンディングパターンに変異がみられないため

に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, Icl:JW)の26.1から(DuY-NIBS, Icl:JW)の52.2となったが、クローズコロニーの日白種3系統間のAPD値は26.1から29.6とよく似た値を示した。Fig. 2はTable 1のAPD値をもとに作成したデンドログラムである。このデンドログラムは、大きくは日白種とダッチ種の2クラスターから形成されており、日白種の中でも近交系のJWY-NIBSとクローズコロニーの3系統の2クラスターに分類された。

考 察

本実験のDFPにおいて、近交系のバンド数21本にくらべ、クローズコロニーの日白種3系統は平均23.5本とやや多かった。この結果は、近交系のバンドがすべてホモ接合体になっているのに対し、クローズコロニーではホモとヘテロなバンドが混在しているためと考えられた。近交系とクローズコロニーの平均バンド数の差が2.5本と少ないのは、クローズコ

Table 1. APD matrix of 5 strains of laboratory rabbits

strain	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)

Data were expressed as APD±SD.

() : APD value within strain

ロニー 3 系統の維持過程におけるバンドのホモ化によるものと思われる。

DFP法で検出された各バンドがホモ、あるいはヘテロ接合体であるかを判断する手段として、同一サイズのバンドの濃淡を利用する方法がある[14]。すなわち、ホモなバンドはヘテロなバンドのほぼ 2 倍の濃さがあるはずなので、この点を比較することによってある程度判定できる。しかしながら、この方法はまだ一般化されておらず、通常バンドの評価は、ホモ、ヘテロを考慮せずに行われている。このため、本実験では、各バンドについてホモであるかヘテロであるかの判定は特に行わなかった。

APD値に関しては、脊椎動物の野生集団では 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[4,5]。しかし、APD値は同一の集団でも使用するミニサテライトプローブの種類によって多少異なる値を示す[5]。本研究では、プローブに大腸菌から哺乳動物まで広くミニサテライトの多型を検出することができる M13 ファージ反復配列[15]を用いた。このプローブによる日白種各 3 系統内の APD 値は 13.7~18.6 となり、プローブの種類が異なるものの上記各種野生動物集団の値に比べ低い値を示した。このことは、これら日白種 3 系統が上記の集団に比べると遺伝的変異が少ない、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が、今後他のミニサテライトプローブについても同様な検討を行う必要がある。クローズドコロニー 3 系統において、WHHL が他の 2 系統にくらべ若干低い APD 値を示したのは、冠状動脈の病変面積の選抜[16]による近交係数の上昇のためと思われる。また、日白種 3 系統全体で APD 値は 24.8 となったが、この値が品種として高いか低いかを判断するためには日白種他系統や他の品種について調べ、さらに検討する必要があると思われる。

後藤[6]は 15 のブリーダーで維持されている日本白

Fig. 3. A dendrogram of 5 strains of laboratory rabbits based on 12 mandible measurements

色種 18 系統について下顎骨分析、血漿蛋白質多型分析を行い、これらの系統内の遺伝的均一性、系統間の遺伝的類縁関係を検討した。Fig. 3 は、本報告で用いた 5 系統について、既報[6,7]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（各個体につき全部計測値の総和を求め、それで各部位計測値を除いた値）をもとにしている。この結果を Fig. 2 の DFP にもとづくデンドログラムと比較すると、両者とも日白種とグッチ種の 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[20]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 [3]は系統として複数の亜系と野生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みられたと報告しており、意見の相違がみられる。本実験において、DFP 法による分析結果 (Fig. 2) 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 (Fig. 3) 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、若干の相違がみられた。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るが、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の遺伝子型への固定のために、JW-NIBSを含むクローズドコロニーの3系統と遺伝的に離れている可能性がある。

Gilbertら[4]は、カリフォルニア諸島群に生息するキツネの集団間の類縁関係をDFPから算出したAPD値を用いて推定し、この方法が有効であることを報告している。DFPは任意の2個体間の血縁係数を推定するのに有効である[1,5,14]。これはDFPのバンディングパターンの類似性、すなわちバンドシェアリングBS(=100-PD)と血縁関係との間の正の相関を根拠にしている。しかし、血縁関係のない個体間の平均BS値が大きい集団では任意の2個体間の血縁関係の推定は困難となる[1,5]。このように、個体間あるいは集団間の類縁関係を推定する場合DFP法は若干の問題点があるものの、本実験の結果によれば下顎骨分析の結果ともほぼ一致しており、DFP法は実験用ウサギ系統の類縁関係の推定に有効であると思われる。

著者らは、マウス[13]、ゴールデンハムスター、マストミス[17]の近交系にDFP法を適用し、本法がこれらの系統の遺伝的モニタリングに有効であることを確認している。本実験では、同一近交系内の個体はすべて同じバンディングパターンを示し、また近交系間、クローズドコロニー3系統内の個体間で同じバンディングパターンを示す個体はみられなかった。このことは、DFP法が実験用ウサギ系統の遺伝的モニタリングに有効であることを示唆している。

要 約

実験用日本白色種(日白種)ウサギは、各種動物実験における結果の個体差や系統差が指摘されている。そこで本実験では、M13ファージ反復配列をプローブにしたDNAフィンガープリント法をダッチ種を含む実験用ウサギ5系統に適用し、日白種系統の遺伝的均一性をみるとともに、本法がこれらの系統の遺伝的モニタリングや遺伝的類縁関係の推定に有効であるかどうかを検討した。

近交系2系統のDNAフィンガープリントは、各系統内で変異がみられず、それぞれ特有のバンディングパターンを示した。またクローズドコロニーの日白種3系統では、同一のバンディングパターンを示す個体はなかったが、average percent difference (APD)値

は13.7~18.6となった。実験用ウサギ5系統のDNAフィンガープリントのAPDにもとづくデンドログラムは、大きく日白種とダッチ種の2つのクラスターから形成されていた。この結果は、これら5系統の下顎骨12部位計測値にもとづくデンドログラムとほぼ一致していた。これらのことから、DNAフィンガープリント法は実験用ウサギ系統の遺伝的モニタリングや類縁関係の推定に有効であることが示唆された。

文 献

- [1] Blanchetot, A. (1992). DNA fingerprinting analysis in the solitary bee *Megachile rotundata*: variability and nest mate genetic relationships. *GENOME*, **35**, 681-688.
- [2] Burke, T. and Bruford, M. W. (1987). DNA fingerprinting in birds. *Nature*, **327**, 149-152.
- [3] Festing, M. F. and Roderick, T. H. (1989). Correlation between genetic distances based on single loci and skeletal morphology in inbred mice. *Genet. Res.*, **53**, 45-55.
- [4] Gilbert, D. A., Lehman, N., O'Brien, S. J., and Wayne, R. K. (1990). Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California Channel Island fox. *Nature*, **344**, 764-767.
- [5] Gilbert, D. A., Packer, C., Pusey, A. E., Stephens, J. C., and O'Brien, S. J. (1991). Analytical DNA fingerprinting in lions: parentage, genetic diversity, and kinship. *J. Hered.*, **82**, 378-386.
- [6] 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.
- [7] Goto, N., Watanabe, K., Umezawa, H., Yazawa, H., and Kuramasu, S. (1987). Morphometrical observations on the mandible of five strains of rabbits and strain identification using mandible measurements. *Lab. Anim.*, **21**, 188-194.
- [8] Jeffreys, A. J., Wilson, V., and Thein, S. L. (1985). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, **314**, 67-73.
- [9] Jeffreys, A. J., Wilson, V., and Thein, S. L. (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, **316**, 76-79.
- [10] Jeffreys, A. J., Wilson, V., Thein, S. L., Weatherall, D. J., and Ponder, B. A. J. (1986). DNA 'fingerprints' and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. *Am. J. Genet.*, **39**, 11-24.
- [11] Kuhnlein, U., Zadworny, D., Dawe, Y., Fairfull, R. W., and Gavora, J. S. (1990). Assessment of inbreeding by DNA fingerprinting: development of a calibration curve using defined strains of chickens. *Genetics*, **125**, 161-165.
- [12] 万年英之・辻 莊一・向井文雄・後藤信男(1992). M13ファージ反復配列をプローブとしたウシのDNAフィンガープリント分析. 日畜会報, **63**, 928-934.
- [13] Mannen, H., Tsuji, S., Goto, N., and Fukuta, K. (1993). Identification of inbred strains of mice and genetic relationships between strains as assessed by DNA fingerprinting. *Exp. Anim.*, **42**, 169-173.
- [14] Mannen, H., Tsuji, S., Mukai, F., Goto, N., and Ohtagaki, S. (1993). Genetic similarity using DNA

- fingerprinting in cattle to determine relationship coefficient. *J. Hered.*, (in press)
- [15] Ryskov, A. P., Jincharadze, A. G., Prosnyal, M. I., Ivanov, P. L., and Limborslaya, S. A. (1988). M13 phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganism. *FEBS*, **233**, 388-392.
- [16] Shiomi, M., Ito, T., Shiraishi, M., and Watanabe, Y. (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.
- [17] 周藤俊樹・万年英之・辻 莊一・後藤信男(1992). DNAフィンガープリント法の実験動物への応用. 動物血液型蛋白質多型研究情報, **20**, 27-31
- [18] 上田 進 [編集] (1982). 小淵沢15年のあゆみ. pp23-44, 財団法人生物科学研究所, 東京.
- [19] Watanabe, Y. (1980). Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis*, **36**, 261-268.
- [20] Wayne, R. K. and O'Brien, S. J. (1986). Empirical demonstration that structural gene and morphometric variation of mandible traits are uncoupled between mouse strains. *J. Mamm.*, **67**, 441-449.
- [21] 矢沢 肇・梅沢英彦・倉益茂実・宮嶋正康(1986). ウサギの近交系の確立. 実験動物, **35**, 203-206.
- [22] Yuhki, N. and O'Brien, S. J. (1990). DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 836-840.