

琉球在来豚（アグー）の近交退化を緩和するための 育種技術の確立

(1) 23個のマイクロサテライトマーカーを用いたアグーのDNA多型解析

大城まどか 稲嶺修 仲村敏 佐藤正寛*
石井和雄** 蝦名真澄

I 要 約

アグーの遺伝的多様性を明らかにすることを目的とし、沖縄県内アグー254頭および対照豚として他品種8頭について、23個のマイクロサテライトマーカーを用い、アグーのDNA多型解析を行った結果、以下のとおりであった。

1. 1遺伝子座当たりの平均対立遺伝子数は、沖縄県内アグーで4.35個、対照豚で4.87個であった。
 2. 1遺伝子座当たりのヘテロ接合度の観察値(Ho)は、沖縄県内アグーで0.343、対照豚で0.484であり、1遺伝子座当たりのヘテロ接合度の期待値(He)は、沖縄県内アグーで0.417、対照豚で0.654であった。
- 以上のことより、アグーは対照豚に比べ遺伝的多様性が低いと考えられた。

II 結 言

琉球在来豚アグーは、小集団で維持されてきたため、近交退化によると思われる繁殖能力の低下や異常形質の出現等がおこっており¹⁾、現状のままでは集団の維持が困難となっている。今後は、アグーの遺伝的多様性を解明し、その情報を基に計画的な交配を行うことで、アグーの近交退化を緩和し、増殖を図る必要がある。

近年、分子生物学の飛躍的な進歩により、DNAマーカー情報による遺伝解析が可能となっている。中でも、マイクロサテライトマーカー²⁾は、多型性に富み、検出される対立遺伝子数も多いことから、集団の遺伝的多様性を解析するマーカーとして有効であり、豚^{3~5)}や鶏⁶⁾においても使用されている。

そこで、本研究では、アグーの遺伝的多様性を明らかにすることを目的とし、23個のマイクロサテライトマーカーを用いたアグーのDNA多型解析を行い、各染色体毎の多型情報を得たので報告する。

III 材料および方法

1. 供試動物

供試動物は、沖縄県内でアグーであると申請のあった豚254頭（沖縄県畜産研究センター所有のアグー35頭含む）および対照豚として他品種8頭（ランドレース3頭、大ヨークシャー2頭、パークシャー1頭、梅山豚1頭、日本イノシシ1頭）を用いた。対照豚8頭のうち、ランドレース2頭は沖縄県内農家所有の豚で、それ以外の6頭については、(独)農業生物資源研究所から提供されたDNAを用いた。また、沖縄県畜産研究センター所有のアグー（畜研アグー）は、小集団での維持により遺伝的多様性が低い可能性があるため、あわせて調査を行った。

2. DNAの抽出

DNAを抽出するため耳の組織を採材した。採材した組織は、プロテイナーゼK (10mg/ml:和光純薬工業株式会社)を含んだDNA抽出バッファー (1.2%SDS, 12.0mM EDTA, 100mM Tris-HCl [pH8.5], 0.5%NP-40)にて溶解後、フェノールクロロホルム法にて精製し、エタノール沈殿によりゲノムDNAを抽出した。

3. マイクロサテライトマーカーDNA多型の検出

実験には、23個のマイクロサテライトマーカーを用い、各染色体ごとに1~3個程度マーカーを配置した。PCRの反応液は、AmpliAq Gold & 10×PCR Gold Buffer with dNTP (Applied Biosystems)、ゲノムDNA16.0ng、フォワードおよびリバースプライマー各5.0pmolを使用した。

PCRは、サーマルサイクラー (GeneAmp™ PCR System9700:Applied Biosystems)を用い、94℃9分の熱変成後、94℃30秒、55℃30秒、72℃30秒のサイクルを40回行った。

PCR産物を希釈し、3130x1DNAアナライザー (Applied Biosystems)を用いて電気泳動した。

4. 調査項目

1) 各遺伝子座ごとの対立遺伝子数

GeneMapperソフトウェア (Applied Biosystems)を用いて、PCR産物の断片長の解析を行った。検出された各マーカーのピークを1つの対立遺伝子と見なし、そのサイズを明らかにした。ピークが1本ならホモ型、2本ならヘテロ型と判断して、対立遺伝子数を算出した。

2) ヘテロ接合度

1遺伝子座当たりのヘテロ接合度の期待値 (H_e)と観察値 (H_o)を下記の式⁷⁾によって算出した。

$$H_e = 1 - \sum x_{ijk}^2$$

$$H_o = 1 - \sum X_{ijk}$$

s個ある部分集団のうちk番目 ($k=1, 2, 3, \dots, s$) の部分集団で、j番目 ($j=1, 2, 3, \dots, r$) の遺伝子座におけるi番目 ($i=1, 2, 3, \dots, m$) の対立遺伝子頻度、ホモ接合体の遺伝子頻度をそれぞれ x_{ijk} と X_{ijk} とする。

IV 結 果

1. 対立遺伝子数およびヘテロ接合度

表1に各遺伝子座ごとの対立遺伝子数およびヘテロ接合度を示した。沖縄県内のアグー (県内アグー) では、22マーカーで多型性を示し、1マーカーで単型性であった。畜研アグーでは、17マーカーで多型性を示し、6マーカーで単型性であった。対照豚では、23マーカー全てで多型性を示した。23マーカーで検出された対立遺伝子数の合計は、県内アグーで100個、畜研アグーで41個、対照豚で112個であり、1遺伝子座当たりの平均対立遺伝子数は、県内アグーで4.35個、畜研アグーで1.78個、対照豚で4.87個であった。マーカーの中で、sw853およびsw1030は、アグー、対照豚ともに対立遺伝子数が少なかった。

1遺伝子座当たりの H_o は、県内アグーで0.343、畜研アグーで0.278、対照豚で0.484であり、1遺伝子座当たりの H_e は、県内アグーで0.417、畜研アグーで0.251、対照豚で0.654であった。1番染色体の3つの遺伝子座において、sw552およびswr1061の H_o の値は、アグーで0.496および0.591、対照豚で0.500および0.625であったが、sw745ではアグーで0.220、対照豚で0.625となっており、アグーでは低い値であった。対照豚では、 H_e と H_o の開きが大きいマーカーが多かった。県内アグーでは、sw827の H_e および H_o は、0.357および0.085、sw813の H_e および H_o は、0.581および0.028となっており、 H_e と H_o の開きが大きかった。畜研アグーでは、 H_e と H_o の開きは小さかった。sw1067およびsw1125は、県内アグーで対立遺伝子数が多く、 H_o の値も高かった。

表1 各遺伝子座ごとの対立遺伝子数およびヘテロ接合度

マーカー名	染色体番号	対立遺伝子数			ヘテロ接合度の期待値(He)			ヘテロ接合度の観察値(Ho)		
		県内アグー (254頭)	畜研アグー (35頭)	対照豚 (8頭)	県内アグー (254頭)	畜研アグー (35頭)	対照豚 (8頭)	県内アグー (254頭)	畜研アグー (35頭)	対照豚 (8頭)
sw552	1	4	2	5	0.535	0.500	0.625	0.496	0.600	0.500
swr1061	1	4	2	8	0.630	0.500	0.750	0.591	0.543	0.625
sw745	1	3	1	6	0.215	0.000	0.734	0.220	0.000	0.625
sw1443	3	6	2	5	0.595	0.496	0.695	0.504	0.571	0.875
sw969	4	4	1	6	0.318	0.000	0.789	0.303	0.000	0.875
sw839	4	5	2	5	0.330	0.265	0.719	0.299	0.257	0.625
swr153	4	4	2	5	0.639	0.431	0.625	0.528	0.343	0.625
sw1353	6	4	1	3	0.076	0.000	0.648	0.075	0.000	0.125
sw1067	6	9	2	6	0.679	0.180	0.756	0.634	0.200	0.375
sw933	8	2	2	4	0.377	0.408	0.711	0.378	0.514	0.375
sw853	8	2	2	2	0.422	0.302	0.375	0.315	0.371	0.250
sw827	9	6	2	4	0.357	0.320	0.633	0.085	0.400	0.375
swr250	9	4	2	3	0.387	0.157	0.357	0.366	0.171	0.250
sw915	9	6	2	7	0.411	0.284	0.773	0.421	0.286	0.500
sw1041	10	4	2	4	0.487	0.420	0.633	0.535	0.543	0.250
sw957	12	6	3	5	0.541	0.534	0.750	0.429	0.629	0.375
sw1307	12	4	2	5	0.349	0.257	0.766	0.278	0.303	0.500
sw1030	13	1	1	3	0.000	0.000	0.227	0.000	0.000	0.250
sw769	13	3	1	5	0.087	0.000	0.680	0.071	0.000	0.500
sw1125	14	7	2	8	0.706	0.408	0.820	0.606	0.400	0.750
sw1119	15	3	1	6	0.333	0.000	0.742	0.248	0.000	0.750
sw813	16	5	2	3	0.581	0.056	0.633	0.028	0.000	0.250
swr1133	17	4	2	4	0.538	0.265	0.602	0.472	0.257	0.500
合 計		100	41	112						
平 均		4.35	1.78	4.87	0.417	0.251	0.654	0.343	0.278	0.484

V 考 察

本研究では、沖縄県内でアグーであると申請のあった豚254頭（沖縄県畜産研究センター所有のアグー35頭含む）および対照豚8頭について、遺伝的多様性を明らかにすることを目的とし、23個のマイクロサテライトマーカーを用いた多型解析を行った。

1遺伝子座当たりの対立遺伝子数は、県内アグーで4.35個、畜研アグーで1.78個、対照豚で4.87個であった。1遺伝子座当たりのHoは、県内アグーで0.343、畜研アグーで0.278、対照豚で0.484であり、1遺伝子座当たりのHeは、県内アグーで0.417、畜研アグーで0.251、対照豚で0.654であった。1遺伝子座当たりの対立遺伝子数、HeおよびHoは、遺伝的多様性の重要な尺度で、値が大きいほど遺伝的多様性が高い。遺伝的多様性は、対照豚が最も高く、次いで県内アグー、畜研アグーの順であると考えられた。畜研アグーは、小集団での近親交配により維持されてきたため、染色体の様々な領域でホモ化が進んでおり、遺伝的多様性が低くなったと考えられた。Heとは、ある集団の1つの遺伝子座に関してハーディ・ワインベルグの法則¹⁰⁾から期待されるヘテロ接合体の割合であり、対立遺伝子頻度の値をもとに算出される。Hoとは、ある集団の1つの遺伝子座で実際に観察されたヘテロ接合体の割合である。HeとHoの開きが大きい場合は、ハーディ・ワインベルグの法則からずれている。この原因として調査した集団のサイズが小さいか、何らかの選抜による場合が考えられ、今後集団内での交配により、対立遺伝子頻度の変化がみられる可能性がある。対照豚では、HeとHoの開きが大きい遺伝子座が多かったが、これはいくつかの異なる集団を単一集団とみなして算出したためである。県内アグーでは、sw827およびsw813の遺伝子座でHeとHoの開きが大きかったことから、今後その遺伝子座の領域で対立遺伝子頻度の変化がみられる可能性がある。畜研アグーでは、HeとHoの開きは小さかったことから、今後集団内の交配を続けても対立遺伝子頻度の変化は小さいと考えられた。

梅山豚等の中国の18品種1001頭について、26個のマイクロサテライトマーカーを用いた多型解析をした場合、品種ごとの1遺伝子座当たりの対立遺伝子数は、10.54~14.46個、1遺伝子座当たりのHoは、0.700~0.876であった⁵⁾。ランドレース等のヨーロッパの11品種483頭について、18個のマイクロサテライトマ

ーカーを用いた多型解析をした場合、品種ごとの1遺伝子座当たりの対立遺伝子数は、3.22~5.72個、1遺伝子座当たりのHoは、0.35~0.60であった¹⁾。閉鎖群で系統造成中のデュロック80頭について、60個のマイクロサテライトマーカーを用いた多型解析をした場合、1遺伝子座当たりのHoは、0.510であった³⁾。これらの結果からも、アグーは他品種に比べ、遺伝的多様性が低いと考えられた。

分子系統解析を行うには、解析する遺伝子が研究対象の生物種で高い変異性を示す必要がある¹⁾。このことから、系統解析には、対立遺伝子数が多く、ヘテロ接合度が高いマーカーを選択する必要がある。今回使用したマーカーの中で、対照豚でヘテロ接合度の低い3マーカー (sw853, swr250, sw1030) および県内アグーでヘテロ接合度の低い4マーカー (sw745, sw1353, sw1030, sw769) は、詳細な系統解析には利用しない方がよいことが明らかとなった。さらに、県内アグーでHoとHeの差の大きく、小集団に分化していることを示す2マーカー (sw827, sw813) についても、県内アグー集団内の詳細な系統解析には利用しない方がよいことが明らかとなった。今後は、マーカー数を増やして多型解析を行い、アグー集団内で対立遺伝子数が多いマーカーを選抜し、その情報を基に系統解析を行うことで、正確なアグーのグループ分けができると考えられた。さらに、体型等の表現型質とDNA多型情報との関係についても調査する必要があると考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、豚のDNAの提供およびDNA多型解析のご指導をいただいた(独)農業生物資源研究所 美川智主任研究員に深く感謝いたします。

VI 引用文献

- 1)大城まどか・仲村敏・鈴木直人・太田克之・渡久地政康(2003)琉球在来豚(アグー)を活用した銘柄豚の確立(2)アグーの繁殖性および哺育・育成成績への近親交配による影響, 沖縄畜試研報, 41, 67-70
- 2)緒方宣邦(2000)遺伝子工学キーワードブック改訂第2版, 384, 葛西文明
- 3)峰澤満・高橋秀彰・佐藤正寛・武田尚人・柴田知也・門脇宏・鈴木啓一・小林栄治(2001)系統造成中豚集団のマイクロサテライトDNAマーカーを用いた遺伝的多様性の解析, 第99回日本畜産学会大会講演要旨, 75
- 4)Laval G, Iannuccelli N, Legault C, Milan D, Groenen MA., Giuffra E, Andersson L, Nissen PH, Jorgensen CB, Beeckmann P, Geldermann H, Foulley JL, Chevalet C, Ollivier L(2000)Genetic diversity of eleven European pig breeds, *Genet Sel Evol*, 32, 187-203
- 5)Shu-Lin Yang, Zhi-Gang Wang, Bang Liu, Gui-Xiang Zhang, Shu-Hong Zhao, Mei Yu, Bin Fan, Meng-hua Li, Tong-An Xiong, Kui Li(2003)Genetic variation and relationships of eighteen Chinese indigenous pig breeds, *Genet Sel Evol*, 35, 657-671
- 6)力丸宗弘・石塚条次・高橋秀彰(2006)比内地鶏の遺伝的多様性の調査, 秋田畜試研報, 21, 57-64
- 7)Nei M(1978)Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, *Genetics*, 89(3), 583-590
- 8)Sneath P. H. A, Sokal R. R(1994)数理分類学, 153, 内田老鶴圃
- 9)Sneath P. H. A, Sokal R. R(1994)数理分類学, 265, 内田老鶴圃
- 10)Hardy G. H. (1908)Mendelian proportions in a mixed population, *science*, 28, 49-50
- 11)Brown T. A. (2000)ゲノム, 449, メディカル・サイエンス・インターナショナル