

豚人工授精の利用技術高度化に関する試験 混合精液により得られた子豚の父子鑑定

仲沢慶紀・青木稔・矢後啓司・岸井誠男

Studies for Improvement in Swine Artificial Insemination Technology
Judgement from Father-Child Relationship (artificial inseminated for mixed sperm in 2 boar semen)

Yoshinori NAKAZAWA, Minoru AOKI, Keiji YAGO and Yoshio KISHII

系統豚の半兄弟どうしについて、父子鑑定が可能かどうか検討するため、大ヨークシャー種2頭（A、B）由来の混合精液を用いて、雌豚9頭に人工授精（A I）を行い、妊娠51～64日でと畜した。得られた95頭の胎子を用い、DNAマーカーによる父子鑑定を実施した。

DNAマーカーとしてマイクロサテライトマーカーを用い、父親間で多型を示す父子鑑定に使用可能なマーカーを検索したところ、54マーカー中32マーカーに多型が検出された。このうち3マーカーを用いて、胎子の多型と父、母の多型と比較したところ、胎子95頭すべての父親を特定することができた。

キーワード：豚、精液、混合精液、DNA、マイクロサテライトマーカー、PCR、父子鑑定

近年、養豚農家においては、受胎率と産子数の向上を目的として、数頭分の精液を混合して人工授精（A I）に利用する形態が増えてきている。

しかし、混合精液によるA Iでは、産子から父親の特定ができないため、後代からの種雄豚の評価が困難である。

このため、湊らはマイクロサテライトマーカーを用いて、混合精液で生産された子豚の父親判定が可能であることを報告した。¹⁾

マイクロサテライトマーカーにより得られる多型は、血統や個体ごとに異なるが知られている。²⁾そこで、当所で飼養する系統豚について、使用可能なマイクロサテライトマーカーを検索し、混合精液のA Iで得られる子豚の父子判定を試みた。

材料及び方法

当所で飼養する系統豚、大ヨークシャー種の成雄2頭から採取した濃厚部精液を用いて、精子濃度を測定した後、最終精子濃度が1億/mlになるようにモデナ液で希釈調製した。

混合精液の作成は、供試豚2頭の希釈精液をそれぞれ等量ずつ同一容器に静かに注入し混和し、18℃のインキュベーター内に保存しておき、随時

A Iに供した。

同系統の大ヨークシャー種の未経産豚6頭及び系統造成中のランドレース種の初産豚1頭、未経産豚2頭の合計9頭にA Iを行った。混合精液の注入量は80mlとし、雌豚の自然発情期間中、1日1回A Iを実施した。妊娠51～64日目に雌豚をと畜して胎子を摘出し、その皮膚及び皮下織をサンプルとした。

胎子の父親鑑定を行うため、父親2頭の精子からフェノール法によりDNAを抽出し、54個のマイクロサテライトマーカーを用いて、父親について多型解析を実施した。

抽出したDNAを蒸留水で3ng/ μ lに調製したものを8.5 μ l、蛍光プライマー（F:30ng/ μ l、R:30ng/ μ l）2 μ l、Mix（10×Buffer1.5 μ l、2mM dNTP1.5 μ l、蒸留水1.425 μ l、Taq Polymerase0.075 μ l）4.5 μ lを混和し、94℃9分、（94℃30秒－55℃30秒－72℃30秒）を40サイクル、72℃5分、20℃5分の条件でPCRを行い、蛍光プライマーで挟んだマイクロサテライトを含むDNA領域を増幅した。

PCR産物2.5～10 μ lに総量180 μ lとなるように蒸留水を加え、このうち2 μ lとstandard液（ホ

ルムアルデヒド $2\mu\text{l}$ 、GeneScan500TAMURA $0.5\mu\text{l}$ 、色素 $0.5\mu\text{l}$ 、 $3\mu\text{l}$ とを混和した後、 94°C 2分間でディメンジョンを行い、DNA2本鎖を1本にし、ただちに氷水につけた。このうち $3.7\mu\text{l}$ をアクリルアミドゲル(SQC6P)にアプライし、DNAシーケンサー(a b i 3 7 3 A)を用いて電気泳動によるジーンスキャンを実施した。

ジーンスキャンによる電気泳動像について各マーカーごとにジェノタイパーを用いて2頭の父親の多型を検出し、父親鑑定に使用可能なマーカーを選択した。

2頭の父親間に明確な多型を認めた12マーカーを用いて雌豚(母豚)及び胎子(子豚)の多型を検出し、父子鑑定を実施した。母親については筋肉組織から、子豚は表皮及び皮下組織からフェノール法によりDNAを抽出した。母親及び子豚のDNAについて12個の蛍光プライマーを用いてPCRを行い、シーケンサーでジーンスキャンを実施し、ジェノタイパーで多型を解析した。

子豚のアリル多型を父親2頭及び母親の多型と比較し、子豚の父親を特定した。

結果及び考察

表1に用いたマイクロサテライトマーカーと検出された多型性について示した。雄豚A及びBについて合計54個のマーカーを無作為に用い、マイクロサテライト多型を検出した結果、32マーカーについて多型が検出された。その内訳は、2カ所に多型が検出されたものが16個、1カ所に検出されたものが16個であった。

同じ系統豚間で同品種かつ比較的血縁関係の近い父親間であっても、多型を示すマイクロサテライトマーカーを数多くスクリーニングすることができた。

これら32マーカーをいくつか組み合わせることによって親子鑑定が可能になるものと思われた。

表1 雄豚A、Bのマーカー多型状況

No.	マーカー	多型の有無
		○: 2カ所 △: 1カ所 ×: なしor検出不能
1	S 0 2 2 7	×
2	A L O X 1 2	×
3	A P O B	×
4	O P N	○
5	S 0 0 0 5 N	○
6	S 0 0 8 6	○
7	S 0 0 9 7	△
8	S 3 2 0	△
9	2 4 4 3	△
1 0	S 0 0 0 7	×
1 1	2 4 8 0	×
1 2	S 0 0 7 3	×
1 3	7 4 5	○
1 4	7 8 1 N	×
1 5	1 0 5 7 F e x	○
1 6	9 7 4	○
1 7	1 4 2	×
1 8	3 4 4	○
1 9	9 6 3	△
2 0	4 8 0	○
2 1	8 5 9	△
2 2	6 0 7	○
2 3	4 4 6	×
2 4	4 8 5 N	○
2 5	9 0 2	△
2 6	1 0 9 2 N	×
2 7	1 7 0 8	△
2 8	S 0 3 0 1	×
2 9	1 6 0 8	○
3 0	1 6 6 7	×
3 1	8 2 7 N	△
3 2	1 5 5 7 N	×
3 3	2 0 9 3	△
3 4	2 1 2 6	×
3 5	1 8 4 1	○
3 6	1 8 1 6	×
3 7	7 7	△
3 8	6 0	×
3 9	7	×
4 0	5 1 1	△
4 1	2 3 0 0	△
4 2	2 5 2 5	○
4 3	S 0 0 1 9	○
4 4	S 0 3 8 5	×
4 5	G P I 1	×
4 6	1 3 3 9	×
4 7	1 3 7 8	△
4 8	1 8 0 2	△
4 9	4 4 3 N	○
5 0	I G F 1	△
5 1	9 7 0	△
5 2	2 5 9	○
5 3	3 1 4	×
5 4	8 5 6	×

表2には、マイクロサテライトマーカーを用いて父親、母親及びその子豚のアリルサイズを比較し、父親を特定した1例を示した。





マーカーOPNの場合、父親Aのアリルサイズは165bp及び169bpであった。父親Bのアリルサイズは145bp及び163bpであった。一方、母親1は145bpと169bpであった。

同一マーカーについて、父親と母親からその子はそれぞれ一本ずつ遺伝子を引き継ぐことから、母親1の子であるNo.1-2についてマーカーO

PNで増幅したときは、165bp及び169bpのアリルサイズを示しており、子No.1-2が示した165bpのアリルは父親Aしか有していないことから、これが父親A由来のものであることが分かる。マーカーS0005及び1802を用いたときも同様に父親A由来のアリルが検出され、結果に矛盾がないことから、子No.1-2の父親はAであると判定した。

表2 父子鑑定例の1例

サンプル	マーカー										父親判定総合結果	
	OPN(FAM)			父親判定	S0005(FAM)			父親判定	1802(TET)			父親判定
	アリルサイズ		アリルサイズ		アリルサイズ		アリルサイズ					
父親A	165	169		244	248		89	115				
父親B	145	163		236	250		115	121				
×												
母親1	145	169		236	248		115	121				
//												
母親1の子	1-1	145	169	?	236	248	?	89	115	A	A	
	1-2	165	169	A	244	248	A	89	115	A	A	
	1-3	145	169	?	236	248	?	89	121	A	A	
	1-4	163	169	B	236	236	B	115	121	?	B	
	1-5	145	145	B	236	250	B	115	115	?	B	
	1-6	169	169	A	236	244	A	89	121	A	A	
	1-7	145	145	B	236	250	B	121	121	B	B	
	1-8	145	169	?	248	248	A	89	115	A	A	
	1-9	163	169	B	236	236	B	115	121	?	B	
	1-10	145	163	B	236	236	B	121	121	B	B	
	1-11	145	145	B	236	250	B	115	115	?	B	
	1-12	145	169	?	236	244	A	89	121	A	A	
	1-13	165	169	A	248	248	A	115	121	?	A	
	1-14	145	163	B	236	250	B	115	115	?	B	

注:  :父親A由来のアリル  :父親B由来のアリル  :母親1由来のアリル  :由来不明
? :父親判定不能

一方、子No.1-1のアリルサイズはマーカーOPNでは、145bp及び169bpであったが、145bpのアリルは父親Bと母親1が持っており、169bpのアリルは父親Aと母親1が持っている。したがって、子No.1-1は父親B×母親1由来の可能性と母親1×父親A由来の可能性があり、父親を特定することができなかった。マーカーS0005を用いても同様の結果であった。マーカー1802を用いたところ、子No.1-1のアリルサイズ89bpは父親Aしか持っていないサイズであり、父親A由来のアリルであることが分かり、父親Aの子であると判定した。このようにマーカーOPN、S0005、1802を用いた結果、系統豚間においても、複数の父-母-子の関係について多型を示したため、父親A、Bの子豚95頭についてすべての父親を特定することができた。

本試験では、父親2頭を判定するのに3マーカーを要したが、判定に矛盾がないかどうかを確認する上で、複数のマーカーを同時に用いることは有効であると考えられる。

引用文献

- 1) 湊和之・渋谷立人・鈴木保・杉山千秋・小林栄治・美川智・峰沢満. 混合精液による産子のDNAマーカーを用いた父子判定. 日豚会誌, 34(4): 210. 1997
- 2) 動物遺伝育種シンポジウム組織委員会. 家畜ゲノム解析と新たな家畜育種戦略. 第1版. 20. 社団法人畜産技術協会. 2000