

体細胞クローン技術の高度化および遺伝子組換えブタの維持・保存に関する研究開発

埜和靖俊・津田和之¹⁾・藤木美佐子・中村妙・三浦成見²⁾・相馬由和・大石仁

Research and development about the advancement of the somatic cell
cloning technique and the preservation of transgenic Pig

Yasutoshi HAGA, Kazuyuki TUDA, Misako FUJIKI, Tae NAKAMURA,
Narumi MIURA, Yoshikazu SOMA and Hitoshi OHISHI

要 約

近年、ブタは医学分野への利用が進められ、体細胞クローン技術を利用し、医療用モデルブタとしての遺伝子組換えブタの作出が可能となった。しかし、ブタは極めて近交退化が生じやすく、ブタの維持・保存が課題となっている。

(独)農業生物資源研究所で作出された補体反応を抑制するhDAF(human decay accelerating factor)を高発現するブタ¹⁾(以下hDAFブタ)、異種抗原である α Gal抗原を特異的に切断する酵素Endo Gal C(endo- β -galactosidase)を発現するブタ¹⁾(以下Endo Gal Cブタ)の2種類の遺伝子組換えブタを導入し、遺伝子のホモ化を行うとともに、遺伝子組換えブタの維持・保存法を検討した。

hDAF遺伝子は、種雌豚の遺伝子ホモ化により、分娩頭数、ほ乳開始頭数が低下し、種雌豚の繁殖性へ影響を与えると考えられる。また、子豚の体重にも影響を与え、遺伝子保有による子豚の体重の低下が子豚の事故の発生を起していると考えられる。

Endo Gal C遺伝子は、繁殖性や子豚の育成に影響を与えない。

医療用モデルブタとして利用するためには体型の小型化が求められるため、医療用モデルブタとして安定して供給するためには、有用遺伝子をホモで持つ低体重子豚の育成率向上が今後の課題となる。

キーワード：遺伝子組換えブタ、医療用モデルブタ、維持・保存

緒 言

ブタは、解剖学的、生理学的にヒトに類似していることから、疾患モデルを初めとする移植医療用のモデルブタとして有利な点を有している²⁾。

また、近年体細胞クローン技術による遺伝子組換えブタの作出が可能となったことから、医療用モデルブタとしての利用が期待されている。

しかし、ブタは近交退化が極めて生じやすく、遺伝子のホモ化のためにはF2世代へわたる交配が必要となり、作出した遺伝子組換えブタの維持・保存が課題となっている。

(独)農業生物資源研究所で作出された2種類の

遺伝子組換えブタを維持・保存し、遺伝子のホモ化を行うとともに、小規模集団での遺伝子組換えブタの系統維持法の開発を目指す。

材料および方法

1 実験安全管理規定の設置

1) 「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、およびその関連法規に基づき設置した。

2) 畜舎整備

豚舎1棟を遺伝子組換えブタ専用豚舎とした。逃亡防止用の柵および窓(網戸)を設置し、拡散防止措置P1Aレベルに畜舎整備を行った。混同防止のため豚舎出入り口には看板を設置した。

1)現所属：茨城県県南農林事務所

2)現所属：茨城県県南家畜保健衛生所

2 供試豚

(独) 農業生物資源研究所で作出された遺伝子組換えブタの後代種豚を導入した。供試豚の概要は表 1 のとおりである。

hDAF ブタは、平成 19 年度に雄 1 頭、雌 2 頭を導入した。導入豚 3 頭とも父方半兄弟である。

Endo Gal C ブタは、平成 20 年度に雄 1 頭、雌 3 頭を導入した。導入雌豚 2 頭(19532, 19533)は、全兄弟である。また、雌 1 頭は、hDAF 遺伝子を併せて保有していた。

3 交配

導入した遺伝子組換えブタは、遺伝子のホモ化のため、hDAF ブタ同士、Endo Gal C ブタ同士を交配し後代を作成後、2 種類の遺伝子を持つ遺伝子組換えブタ作出のため hDAF ブタと Endo Gal C ブタの交配を行った。

なお、種付けは自然交配で行った。

4 遺伝子判定

生産された子豚の耳から試料を採材し、当該遺伝子保有の有無を判定した。検査は(独) 農業生物資源研究所に依頼した。

5 飼養管理

繁殖豚および子豚の飼養管理は、当所の慣行法により行った。

6 調査項目

妊娠期間、分娩頭数、子豚体重(生時、1 週齢、3 週齢、5 週齢)を調査した。

7 統計処理

近交係数および血縁係数の算出は「CoeFR」^{3,4)}を、調査項目の分散分析には最小二乗法プログラム「LSMLMW」⁵⁾を用いた。

表 1 導入豚の概要

名号	性	品種	生年月日	hDAF	Endo Gal C	導入年度
17312	雄	L・LW	H17.9.2	ヘテロ		19 年度
17277	雌	M・LW	H17.8.13	ヘテロ		
17307	雌	M・LW	H17.8.28	ヘテロ		
19549	雄	2(M・LW)	H19.10.19		ヘテロ	20 年度
18044	雌	M・LW	H18.1.10		ヘテロ	
19532	雌	2(M・LW)	H19.9.28		ヘテロ	
19533	雌	2(M・LW)	H19.9.28	ヘテロ	ヘテロ	

※品種の M は、ミニブタである。

品種の 2(M・LW) は、M・LW×M・LW である。

結 果

近交係数・血縁係数

近交係数は、遺伝子のホモ化のため、hDAF ブタ同士、Endo Gal C ブタ同士を交配したため平成 21 年度までは上昇した。2 種類の遺伝子を持つ遺伝子組換えブタ作出のため hDAF ブタと Endo Gal C ブタの交配を行ったため平成 22 年度から低くなった。

血縁係数は、平成 19 年度に導入した hDAF ブタが父方半兄弟であったため 25% と高かったが、平成 20 年度に Endo Gal C ブタを導入したため低下した。その後の交配により、平成 23 年度には 27% まで上昇した。

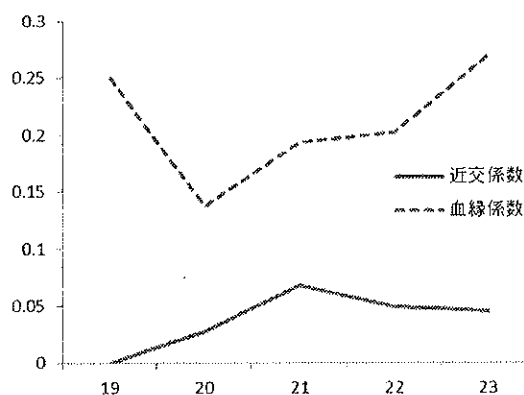


図 1 近交係数と血縁係数の推移

繁殖成績

表 2 に種豚の遺伝子型ごとの繁殖成績の最小自乗平均値を示した。

妊娠期間は、遺伝子型の違いによる差はみられなかった。

ほ乳開始頭数では、種雌豚の hDAF 遺伝子ホモ型が有意に少なかった。分娩頭数でも、種雌豚の hDAF 遺

伝子ホモ型が有意に少なかった。

死産頭数は遺伝子型の違いによる差はみられなかった。

表 2 遺伝子型ごとの繁殖成績

種豚	遺伝子	遺伝子型	妊娠期間 (日)	生産頭数 (頭)	死産頭数 (頭)	分娩頭数 (頭)
種雌豚	hDAF	-	115.8	10.1 a	2.8	12.9 a
		ヘテロ	115.9	7.7 a	1.2	8.9 a
		ホモ	117.0	4.1 b	0.7	4.9 b
	Endo Gal C	-	116.5	7.1	2.1	9.2
		ヘテロ	116.7	6.2	1.7	7.9
		ホモ	115.4	8.6	0.9	9.5
種雄豚	hDAF	-	115.4	7.0	2.1	9.1
		ヘテロ	116.5	8.8	1.6	10.3
		ホモ	116.7	6.2	1.0	7.2
	Endo Gal C	-	115.8	8.5	1.4	9.9
		ヘテロ	117.5	7.5	1.1	8.6
		ホモ	115.3	5.9	2.2	8.1

※異符号間に有意差あり (p<0.05)

子豚体重

表 3 に子豚の遺伝子型ごとの体重の最小自乗平均値を示した。解析にとりあげた要因は、腹、性、hDAF 遺伝子型、Endo Gal C 遺伝子型、遺伝子間の交互作用である。

hDAF 遺伝子では、各測定時ともにホモ<ヘテロ<-の順で有意に体重が小さかった。

Endo Gal C 遺伝子では、ホモ型の子豚が 1 週齢時に有意に小さかった。生時、3 週齢時、5 週齢時にも小さい傾向がみられたが、有意な差ではなかった。

なお、各測定時において、遺伝子間の交互作用は見られなかった。

表 3 遺伝子型ごとの体重の推移

遺伝子	遺伝子型	(kg)					
		生時	1 週齢	3 週齢	5 週齢		
hDAF	-	1.19 Aa	2.29 Aa	5.54 A	8.79 A		
	ヘテロ	1.07 Ab	2.05 Ab	4.54 B	7.18 B		
	ホモ	0.86 B	1.54 B	3.56 C	5.46 C		
Endo Gal C	-	1.07	2.01	4.40	7.51		
	ヘテロ	1.09	2.17 A	4.97	7.59		
	ホモ	0.97	1.69 B	4.26	6.33		

※異符号間に有意差あり 大文字 (P<0.01), 小文字 (p<0.05)

子豚事故率

表 4 に遺伝子型ごとの事故率 (5 週齢まで) を、表 5 に事故子豚の生時体重を示した。

子豚の事故率では、hDAF 遺伝子をホモで持つ子豚の事故率が高くなる傾向がみられた。Endo Gal C 遺

伝子型の違いによる事故率の差はみられなかった。事故子豚の生時体重は、各遺伝子型ともに、生産子豚の平均体重よりも小さい傾向がみられた。

表 4 子豚事故率

(%) (事故頭数/生産頭数)

		Endo Gal C			計
		-	ヘテロ	ホモ	
	-	5.0 (2/40)	19.4 (6/31)	22.2 (2/9)	12.5 (10/80)
hDAF	ヘテロ	13.7 (7/51)	1.8 (1/57)	0 (0/8)	6.9 (8/116)
	ホモ	37.5 (6/16)	38.5 (5/13)	25.0 (1/4)	36.4 (12/33)
計		14.0 (15/107)	11.9 (12/101)	14.3 (3/21)	13.1 (30/229)

表 5 事故子豚の生時体重

左:事故豚ほ乳開始時体重(kg), 右:ほ乳開始子豚平均体重(kg)

		Endo Gal C						計	
		-		ヘテロ		ホモ			
	-	0.86	1.17	0.55	1.05	0.57	0.99	0.61	1.10
hDAF	ヘテロ	0.83	1.16	1.28	1.09	-	0.97	0.89	1.11
	ホモ	0.81	0.95	0.79	0.83	0.63	0.75	0.78	0.88
計		0.83	1.13	0.71	1.05	0.59	0.93	0.76	1.07

考 察

(独) 農業生物資源研究所で作出された hDAF (ヒト補体制御因子高発現) ブタ, Endo Gal C (α Gal 抗原を特異的に切断する能力を有する) ブタの 2 種類の遺伝子組換えブタを導入し、遺伝子のホモ化をおこなうとともに、遺伝子組換えブタの維持・保存法を検討した。

hDAF 遺伝子では、種雌豚の遺伝子ホモ化により、分娩頭数、ほ乳開始頭数が低下し、繁殖成績への影響がみられた。死産頭数や死産子豚の割合には、遺伝子型による違いはみられないことから、ホモ化により受胎頭数の減少が起こると考えられる。また、ヘテロの種雌豚においても有意な差ではないが、hDAF 遺伝子を持たないものよりも、分娩頭数、ほ乳開始頭数が少ない傾向がみられ、hDAF 遺伝子は種雌豚の繁殖性へ影響を与えると考えられる。子豚の体重では、ホモ<ヘテロ<-の順に有意に小さく、hDAF 遺伝子は子豚の体重にも影響を与えると見える。また、hDAF 遺伝子ホモの子豚の事故率が高いが、子豚

の事故は生後 1 週以内の発生が約 8 割を占め、その発生は低体重の子豚に多くみられたことから、hDAF 遺伝子保有による子豚の体重の低下が子豚の事故の発生を起こしていると考えられる。

Endo Gal C 遺伝子では、子豚の体重で、ホモ型が低い傾向にあるが、hDAF 遺伝子のように繁殖性や子豚の育成に影響を与えないと考えられる。

導入した遺伝子組換えブタは、医療用モデルブタとして利用するためには、造成の過程でミニブタと交配しているように、体型の小型化が求められる。医療用モデルブタとして安定して供給するためには、有用遺伝子をホモで持つ低体重子豚の育成率向上が今後の課題となる。

参考文献

- 1) 大西彰 体細胞クローン技術を用いた遺伝子組換えブタの開発と利用 2010 日生研たより 第 56 巻 第 2 号
- 2) 大西彰 医療への利用を目指した新たなブタの開

- 発 2008 農林水産技術研究ジャーナル 31 巻 1 号
- 3) 佐藤正寛 大規模血統情報から近交係数を算出するプログラムの開発 2000 日本養豚学会誌 37 巻 3 号 122-126 頁
- 4) 佐藤正寛 近交係数および血縁係数を算出するプログラム “CoeFR” マニュアル 2007
- 5) Harvey, W.R. 1987. User's Guide of LSMLMW PC-1 Version. Ohio State University. Columbus.