

医療用ミニブタの育種繁殖に関する最近の話題

鈴木 隆 春（静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター）

Takaharu, S. (2010). Recent topics about breeding and reproduction in miniature pigs for medicine

ALL about SWINE 36, 24-29

はじめに

静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センターでは、本県の戦略プロジェクト研究の一貫として、また新産業創造に向けての研究として、平成20年度から3年計画で「医療用実験に適した極小ミニブタの開発」と題したプロジェクト研究に取り組んでいます。

研究の背景としては、ブタは生理や解剖学的な特性がヒトと類似しており、前臨床実験への活用が期待されています。また動物愛護意識の高まりから、これまで大学等で実験動物として用いられてきた犬等が利用できなくなってきましたが、ブタは産業動物として食用に利用されているため、他の動物に比べて倫理的障壁が低く、繁殖能力も高いため、今後実験動物としての利用が望まれています。このように条件的には実験動物としての条件は備えているものの、現状の実験ブタにはまだ以下のような問題点がありその利用は少数にとどまっています。

問題点1：既存の実験用ミニブタは、体重が40～50kgと大学等の研究施設で飼育するには大きすぎる。

2：遺伝学的な均一性や微生物コントロールが不十分である。

3：産子数が3～5頭と、ブタとしては繁殖力が低い。

当研究センターでは、県内で突然変異により誕生したと思われる極小ミニブタと、当研究センターで体細胞クローン技術により作出したGFP（緑色蛍光タンパク質）遺伝子導入金華豚などを素材とし、体細胞クローン技術や遺伝子解析技術を活用し、SLA（白血球抗原型）遺伝子の明確化、SPF化を図るなど実験動物として優れた特性を付加し、医療用実験に適した新しい極小の実験ブタを開発しています。

本稿では、当研究センタープロジェクトスタッフが取り組んでいるミニブタの開発について紹介するとともに、スタッフの資料原稿¹⁾に基づくミニブタの育種繁殖に関する最近の話題を紹介します。

1 医療用実験に適した極小ミニブタの開発

当研究センターでは、図1に示すとおり、静岡県内で誕生した体格の非常に小さなミニブタや体細胞クローン技術で作製したGFP遺伝子導入金華豚などを素材にし、医療用の実験ブタとして優れた特徴をもつ極小ミニブタの開発に取り組んで



図1 研究の概要

います。本研究では、体細胞クローン技術、遺伝子解析技術、SPF化技術を活用し、開発の効率化を図るとともに、需要に応じたコンパクトな生産体制を構築することを目指しています。また、開発したブタを識別するための体の大きさに関与するゲノム領域の探索や体細胞クローン技術を活用したSPFブタの維持・増殖方法についても検討しています。

2 ブタの遺伝子情報

ブタのゲノム解析のための国際ブタゲノムコンソーシアムが立ち上げられ、2003年9月にフランスのToursで初めての会合が開かれました。日本の機関も一部を分担してゲノム解析が進められてきましたが、ドラフト解読が概ね終了し、2009年11月にイギリスのHinxtonで解析終了の祝賀会合が開かれました。

解読されたシーケンスデータは、Pig genome assembly in Ensemblで公開されています。またブタの量的形質遺伝子座(Pig Quantitative Trait Locus: QTL)についても、QTL database (Pig QTLdb)が公開されており、現在、499形質に関

して、4928のQTLが報告されています。なお、これらの遺伝子情報は、ミニブタの育種繁殖を進める上で強力なツールとなるものと考えられます。

3 体の大きさに関連する遺伝子

体格の小さいミニブタは、大学等の研究機関での飼育が容易になる、薬効試験において用いる薬品が少量ですむなど実験動物としてより利用しやすいものになります。

ブタの矮性に関与する遺伝子は十分に明らかになっていません。イヌでは、品種により体格差が非常に大きく、Insulin-like growth factor 1 (IGF1) 遺伝子の変異が体の大きさに影響していることが確認されています²⁾。IGF1は成長ホルモンの刺激により産生され、骨や筋肉に作用し、成長を促進します。IGF1の影響を確認するために、開発中のミニブタの血中のIGF1濃度を測定しましたが、いずれも正常値でありました。またIGF1遺伝子の構造においても、アミノ酸の置換を伴う変異は見られませんでした³⁾。

ブタの増体や体重に関するQTLは多数報告さ

れていますが、多くの染色体上に分散して存在し、体の大きさに関与する遺伝子は特定されていません。そこで我々は現在、開発中のミニブタの矮性に関する遺伝子を探索するために、ミニブタと金華豚との交雑家系を作成し、ミニブタの体格に関する連鎖解析を行う準備を進めています。

4 毛色に関連する遺伝子

実験ブタの毛（皮膚）色は、実験の用途により異なったものが要求されるため、実験ブタの育種における毛色のコントロールは重要であります。レーザー光放射に関する皮膚モデルにおいては、メラニン色素分布がヒトと似ている有色の系統が適しているとされています⁴⁾。外用薬の反応を観察したり、血管を確保したりするためには、白色が適しています。適用頻度は後者の方が多く、白い毛色のミニブタの方がより汎用性が高いものと考えられます。

これまでに、ブタの毛色関連遺伝子で表現形質の違いと遺伝子の変異で説明がついているのは、*MC1R* と *KIT* の2遺伝子であり、これらの遺伝子の変異は、品種鑑別に利用されています⁵⁾。*MC1R* 遺伝子は6番染色体短腕末端に位置し、その変異は毛色の黒、茶、黒スポットの原因となります。*KIT* 遺伝子は、8番染色体上にあり、その変異は優性白色の原因となっています。優性白色では、*KIT* 遺伝子が重複しており、重複した遺伝子のイントロン17の最初の塩基がGからAに変化することでスプライシングを認識できなくなり、エキソン17を欠失します。そのため、毛根にメラノサイトが存在できなくなり、白色になります。*KIT* 遺伝子の優性白色変異を利用することにより実験用ミニブタを汎用性の高い白色にコ

ントロールすることが可能となります。例えば、*KIT* 遺伝子の変異をホモ接合型で持つ雄の子供は全て白色になります。

我々の開発しているミニブタの毛色関連遺伝子の多型をPCR-RFLP法で調べたところ、*MC1R* 遺伝子は、すべて優性黒色対立遺伝子 *E* のホモ接合型 (*E/E*) でした⁶⁾。*KIT* 遺伝子は、毛色が黒・灰色の個体では、劣性対立遺伝子 *i* のホモ接合型 (*i/i*) でした。毛色が白色の個体では、優性白色対立遺伝子 *I* のホモ接合型 (*I/I*) もしくはヘテロ接合型 (*I/i*) でしたが、ホモ接合型とヘテロ接合型の区別はつきませんでした。そこで、自身の毛色が白色であり、その子供の全てが白の毛色を持ち、優性白色対立遺伝子 *I* のホモ接合型 (*I/I*) であると推察されるミニブタ、自身の毛色は白色であるが、その子供に黒・灰・白色があり、優性白色対立遺伝子 *I* のヘテロ接合型 (*I/i*) であると推察されるミニブタ、劣性対立遺伝子 *i* のホモ接合型 (*i/i*) である毛色が黒・灰色のミニブタについて塩基配列を解析し、イントロン17の最初の塩基のシーケンスデータを比較しました。その結果、G:Aの比率がホモ接合型 (*I/I*) では1:1、ヘテロ接合型 (*I/i*) では2:1、および *i* のホモ接合型 (*i/i*) ではGのみとなり、優性白色遺伝子 *I* のホモ接合型、ヘテロ接合型の識別が可能であると考えられました⁶⁾。

5 Swine leucocyte antigen (SLA) 型

SLAは、外来抗原や移植片を認識し、免疫応答を規定する細胞膜タンパク質です。SLA領域は複雑な配列が多数存在するために遺伝子解析が困難でしたが、最近になりマーカー遺伝子によるハプロタイプの識別が可能になりました⁷⁾。

SLA型の違いによりワクチンに対する抗体産生能に違いがあることが確認されています⁸⁾。また再生医療実験においては、SLA型が同一なものでは移植組織の拒否反応が起こりにくくなります。このように、SLA型を明らかにし、コントロールすることは、ミニブタの利用性をより高めることとなります。

これまでの調査で、開発中のミニブタには9種類、GFP金華豚には8種類のSLA型が存在することが確認されました。それぞれの系統ともに、高い頻度のSLA型が存在するため、それらを活用することにより、SLA型の明確な系統にすることが可能と思われます。

6 体細胞クローン技術の活用

体細胞クローン技術は、あらかじめ能力の分かった個体を再現できる技術であり、種ブタの維持や増殖に有用です。ブタはクローンの作出が難しい動物のひとつと考えられていましたが、2000年に成功例が報告されました^{9,10)}。我々も2002年に体細胞クローンブタの作出に成功し^{11,12)}、発育や繁殖能力などが一般ブタと変わらないことを確認しています^{13,14)}。

2009年6月25日、内閣府食品安全委員会から厚生労働省に、新開発食品「体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品」に係る食品健康影響評価についての答申が出されました。答申では、「体細胞クローン技術によって生産された牛及び豚並びに体細胞クローン家畜から人工授精等の従来の繁殖技術を用いて産出される牛及び豚に由来する食品については、従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する食品と比較して、同等の安全性を有する。」

との結論が示されました。しかし平行して行われたパブリックコメントでは、クローン家畜を食肉として利用することに対して消費者等から十分な理解が得られませんでした。そのため体細胞クローン家畜に由来する食品は流通していません。

体細胞クローン技術は、食を目的としていない実験ブタでは、種ブタの維持や増殖手段として非常に有効であります。医療用実験に用いるミニブタでは、安定した実験結果が求められることから、近交系が求められますが、近交の上昇は繁殖性の消失の危険をはらんでいます。しかし、体細胞で基礎ブタを保存しておくことにより、安全に系統を造成することができます。また実験動物としての活用では、実験の種類により多様な種類の実験ブタが求められます。それらを全て生体で維持するには、多大なコストがかかりますが、体細胞で保存しておき、需要に応じて再生し、増殖することによりコンパクトな生産が可能となります。

一方、体細胞クローン技術は、遺伝子組み換え動物を誕生させる有用な手法でもあります。体外培養した体細胞に、遺伝子を導入し、目的の遺伝子が導入された細胞のみを選別し、さらに増殖する。確実に遺伝子が導入された体細胞核を、本来の核を取り除いた未受精卵子に注入し、クローンを作成すれば、従来の方法よりも効率的に遺伝子導入動物を誕生させることができます。体細胞クローン技術の応用により、異種臓器移植時の超急性拒絶反応の原因とされる細胞表面抗原を産生する alpha1, 3-Galactosyl transferase gene をノックアウトした α -Gal ノックアウトブタが作出されました¹⁵⁾。 α -Gal ノックアウトブタの心臓や腎臓などの臓器を、ヒヒに移植する異種移植研究

が進められています。異種移植の研究において、GFP 標識を有するブタは、これらのノックアウトブタと組み合わせることにより、移植後の臓器の予後を追跡、評価するのに活用できます。

我々は、体細胞クローン技術を用いて GFP 遺伝子を導入した GFP 金華豚を作出しました。GFP 金華豚は成体となり、繁殖能力も正常であることが確認されました。GFP 遺伝子導入ブタの後代ブタ 85 頭中 42 頭 (45.9%) が GFP を発現しており、GFP 遺伝子は後代に確実に伝達されることが確認されました。また、GFP は殆どの組織において発現しており、再生医療などの実験に活用可能であることが示唆されました¹⁶⁾。新しいミニブタの開発では、この GFP 金華豚に極小ミニブタの系統の雄を戻し交配し、再生医療に活用できる GFP シグナルを持ったミニブタの開発を行っています。選抜には、毛色の遺伝子、SLA 型の判別、繁殖性に関与すると推察される QTL などの情報を活用し、利用性の高い特性を持った系統に改良する計画です。

引用文献

- 1) 河原崎達雄・塩谷聡子・大津雪子, 2009, ミニブタの育種繁殖に関する最近の話題, 東海畜産学会報, 第 20 巻 (印刷中).
- 2) Sutter NB, Bustamante CD, Chase K, Gray MM, Zhao K, Zhu L, Padhukasahasram B, Karlins E, Davis S, Jones PG, Quignon P, Johnson GS, Parker HG, Fretwell N, Mosher DS, Lawler DF, Satyaraj E, Nordborg M, Lark KG, Wayne RK, Ostrander EA. 2007. A single IGF1 allele is a major determinant of small size in dogs. *Science*. 316 (5821) :112-115.
- 3) 塩谷聡子・美川 智・大津雪子・堀内 篤・桑原 康・河原崎達雄, 2009, アジア系ミニブタの体尺測定値と特徴について, 第 91 回日本養豚学会講演要旨, 藤沢市, p16.
- 4) Eggleston TA, Roach WP, Mitchell MA, Smith K, Oler D, Johnson TE. 2000. Comparison of two porcine (*Sus scrofa domestica*) skin models for in vivo near-infrared laser exposure. *Comparative Medicine*. 50, 391-397.
- 5) 奥村直彦. 日本食品科学工学会・食品分析研究会共同編纂. 2006. 新・食品分析法 [II]. 第 1 版. 342-355. 光琳. 東京.
- 6) 塩谷聡子・河原崎達雄・大津雪子・桑原 康・金子直樹・美川 智. 2009, ミニブタの毛色コントロール. 静岡県畜技研中小せ研報, 3 (印刷中).
- 7) Tanaka M, Ando A, Renard C, Chardon P, Domukai M, Okumura N, Awata T, Uenishi H. 2005. Development of dense microsatellite markers in the entire SLA region and evaluation of their polymorphisms in porcine breeds. *Immunogenetics* 57, 690-696.
- 8) 田中麻衣子・新開浩樹・寺田 圭・井手華子・河原崎達雄・安藤麻子・粟田 崇・上西博英. 2007. 日本畜産学会. 相模原市.
- 9) Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry ACF, 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei, *Science*, 289, 1188-1190.
- 10) Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS, 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer

- from adult somatic cells, *Nature*, 407, 86-90.
- 11) 河原崎達雄・大竹正剛・土屋聖子・柴田昌利. 2003, 細胞核の顕微注入による体細胞クローンブタの作製. 静岡県中小試研究報告, 14:7-12.
 - 12) 河原崎達雄, 2004. ブタ体細胞クローン技術の現状. 日豚会誌, 41, 49-58.
 - 13) Shibata M, Otake M, Tsuchiya S, Chikyu M, Horiuchi A, Kawarasaki T, 2006. Reproductive and growth performance in Jin Hua pigs cloned from somatic cell nuclei and the meat quality of their offspring. *J Reprod Dev*, 52, 583-590.
 - 14) 河原崎達雄・大竹正剛・柴田昌利・寺田圭・大津雪子. 2007, 体細胞クローン雄ブタおよび後代雄ブタの繁殖能力. 静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター研究報告, 1, 23-30.
 - 15) Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.W., Cheong, H.T., Greenstein, J.L., Im, G.S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B.N., Murphy, C.N., Carter, D.B., Hawley, R.J., Prather, R.S., 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295, 1089-1092.
 - 16) Kawarasaki T, Uchiyama K, Hirao A, Azuma S, Otake M, Shibata M, Tsuchiya S, Enosawa S, Takeuchi K, Konno K, Yoshino H, Hakamata Y, Wakai T, Ookawara S, Tanaka H, Kobayashi E and Murakami T, 2009 b. Profile of new green fluorescent protein (GFP)-transgenic Jinhua pigs as an imaging source. *Bio Medical Optics* (In press).