

水族館飼育下イルカにおける DNA マーカーによる親子鑑定法の開発

北 夕紀¹⁾・猪子英俊¹⁾・椎名 隆¹⁾・田中 彰²⁾

Development of Newly Paternity Test Method for Dolphins Using Microsatellite
and *MHC-DQB* Markers

Yuki F. Kita¹⁾, Hidetoshi Inoko¹⁾, Takashi Shiina¹⁾ and Sho Tanaka²⁾

Abstract

The father-offspring relationship of captive dolphins is sometimes difficult to assess: observation of females during pregnancy is limited and the biological fathers generally remain unknown. To prevent such dolphins from inbreeding, analyses on genetic information of captured dolphins are important to preserve their inherited genetic diversity. The genetic data management based on DNA analysis of familial relationships among aquariums is now becoming an important tool for determination of the inherited variety, relationships and the kinship states between the individuals in populations under inbreeding pressure.

In this paper, in order to develop a simple paternity test method using microsatellite and newly designed MHC class II DQ beta (*MHC-DQB*) marker, we performed polymorphism analysis, population genetic analyses and parentage test using 20 dolphins including four pedigrees. As a result, six to ten microsatellite alleles and 14 *MHC-DQB* alleles were identified from the polymorphism analysis. From the genetic and statistical evaluation, the *MHC-DQB* marker was found to be more informative for paternity test than the microsatellite markers. Namely, the likelihood of the paternity using only four microsatellite markers were 94.12% to 99.88% but when adding *MHC-DQB* polymorphic information the likelihood of the paternity was improved from 98.46% to 99.98%. Therefore, this method combined the microsatellite and *MHC-DQB* markers will be useful genetic tool for the paternity test.

1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 〒259-1143 神奈川県伊勢原市下糟屋143
Department of Molecular Life Science Tokai University School of Medicine, 143 Shimokasuya Isehara Kanagawa
259-1143, Japan

2) 東海大学海洋学部海洋生物学科 〒424-8610 静岡県静岡市清水区折戸3-20-1
Department of Marine Biology, School of Marine Science and Technology, Tokai University, 3-20-1 Orido Shimizu
Shizuoka 424-8610, Japan

(2009年10月22日受付 / 2009年10月31日受理)

緒 言

水族館では、複数のイルカ雌雄を限られた空間で飼育する機会が多い。この環境下にて繁殖がおこなわれたとき、母子関係は出産時の様子、育児行動の観察によって容易に確認することが可能であるが、父子関係は推測の域を出ない場合がある。一方、生物保全の場としての役割を期待されている水族館では、飼育個体の近親交配による近交弱勢を回避することは極めて重要である。したがって、個体に負担をかけずに簡便で信頼性の高い父子鑑定法を確立する必要がある。この場合、ゲノム DNA は健康診断時に採血された血液、皮膚の粘膜組織および糞便から抽出可能なことから、塩基配列に刻まれている個体間の差異を検出し、それを親子鑑定に用いる手法が好ましいと考えられる。

ゲノム DNA を用いた親子鑑定の手段の一つとして、マイクロサテライト法が挙げられる。マイクロサテライト配列とはゲノム配列に散在する GT や GCT のような 2~5塩基の短い塩基配列を 1 単位として、これが複数回繰り返される反復配列のことである。繰り返し回数の違いが個体間に観察されること、すなわち多型性に富み、かつメンデルの法則に従って遺伝するため、親子鑑定には極めて都合の良い DNA マーカーである(後藤・上田 2001)。鯨類では Scholoterer *et al.* (1991) が 11 種の鯨類からマイクロサテライトマーカーを設定した最初の報告から、これまでに 80 種類以上のマイクロサテライトマーカーが開発され、各鯨種にて多型解析が進められている (Amos *et al.*, 1993; Buchanan *et al.*, 1996; Palsboll *et al.*, 1997; Richard *et al.*, 1997; Shinohara *et al.*, 1997; Valsecchi *et al.*, 1997)。

一方、遺伝的多型性を有すると期待される DNA マーカーとして、主要組織適合遺伝子複合体 (Major Histocompatibility Complex; MHC) 遺伝子が挙げられる。MHC とは異物由来の外來性ペプチドを T 細胞受容体に抗原提示する白血球抗原を規定する遺伝子領域であり、この領域には MHC クラス I 分子と MHC クラス II 分子の 2 種類の分子を規定する MHC 遺伝子群が位置する。すなわち、ヒトの場合 3 個の MHC クラス I 分子を規定する MHC クラス I 遺伝子座 (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*)、MHC クラス II 分子を規定する MHC クラス II 遺伝子座 (*HLA-DR*, *HLA-DQ*, *HLA-DP*) が抗原提示に直接的関連を示し、MHC 領

域内の MHC クラス I 亜領域、MHC クラス II 亜領域にそれぞれ位置する (Shiina *et al.*, 2009)。オキゴンドウ MHC 領域の遺伝子構成は *HLA-DP* に相当する遺伝子座を除けば、ヒトとよく類似する (Kulski *et al.*, 2002; Shiina *et al.*, Unpublished data)。これら MHC 遺伝子はこれまでに調べられている脊椎動物にて高度な遺伝的多型性を示し、先に記したヒト MHC、6 遺伝子座において合計 3600 を超える対立遺伝子 (アレル)、鯨類と比較的近縁であるウシでは MHC、4 遺伝子座 (*class I*, *DRB3*, *DQA*, *DQB*) において合計 303 アレルがそれぞれ見出されている (猪子 2000; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/index.html>)。したがって、ハンドウイルカについても MHC 遺伝子の遺伝的多型性が備わっていることが期待される。この場合、各鯨種について比較的解析が進められており、かつ他 MHC 遺伝子のような遺伝子重複の認められない MHC クラス II DQ beta 遺伝子 (*MHC-DQB*) が多型解析や親子鑑定に最適であると考えられる (Hayashi *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2006)。

これまでに水族館にて飼育されているハンドウイルカ 1 家系、6 個体について 3 種類のマイクロサテライトマーカーを用いた親子鑑定法が報告されているが、その信頼性については触れられていない (Sumiyama *et al.*, 2008)。また、マイクロサテライトマーカーと MHC 遺伝子マーカーを組み合わせた手法による親子鑑定法はヒトでは一般的であるが (太田 2004)、他生物種での報告は認められない (Krutzen *et al.*, 2004; Sumiyama *et al.*, 2008)。そこで本研究では、父親候補を含む飼育環境下のハンドウイルカ 2 家系、ハンドウイルカとハナゴンドウを両親に持つ 2 家系の 17 頭ならびに非血縁個体 3 頭、合計 20 頭より抽出したゲノム DNA を供試材料として、4 種類の既知マイクロサテライトマーカー (MS-D08, MS-D14, MS-D18, MS-D22; Shinohara *et al.*, 1997) ならびに *MHC-DQB* マーカーを用いて多型解析を実行し、これら少数の DNA マーカーによる親子鑑定への有効性ならびに信頼性について明らかにしたので、これについて報告する。

材料および方法

供試材料

ゲノム DNA サンプルは、新江ノ島水族館、横浜・

八景島シーパラダイス, 南知多ビーチランドにて飼育管理されている父親候補を含むハンドウイルカ2家系(家系1と家系4), ハンドウイルカとハナゴンドウを両親に持つ2家系(家系2と家系3)の計17頭ならびに非血縁個体3頭から得た. その内訳は, ハナゴンドウ2頭, ハンドウイルカ16頭, ハナゴンドウとハンドウイルカのハイブリッド2頭である (Fig. 1). それらの血液より既知のフェノールクロロホルム法にて抽出したものを実験に用いた.

マイクロサテライトマーカーを用いた多型解析法

マイクロサテライトマーカーには, 4種類のハンドウイルカ用マイクロサテライトマーカー (MS-D08, MS-D14, MS-D18, MS-D22 : Shinohara *et al.*, 1997) を用いた. *Taq* ポリメラーゼには, Gold *Taq* (Applied Biosystems) を使用した. PCR 増幅には, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて, 既報の条件にしたがって PCR 増幅させた (Shinohara *et al.*, 1997 ; Sumiyama *et al.*, 2008). その後, 得られた PCR 産物を ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer

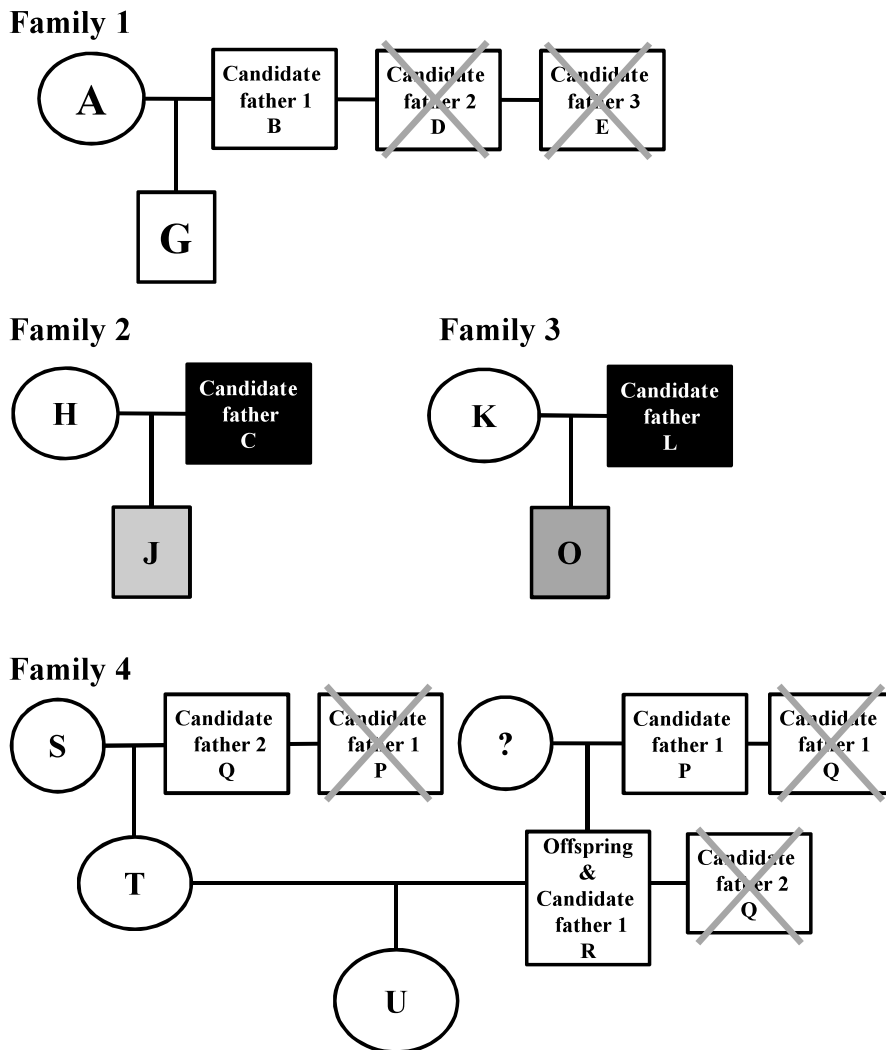


Fig. 1 Four pedigrees using in this study. White squares and circles indicate bottlenose dolphin male and females, black squares and circles indicate risso's dolphin male and females and gray squares and circles indicate hybrids between bottlenose dolphin and risso's dolphin.

(Applied Biosystems) により電気泳動し、Gene Mapper ソフトウェアを用いて PCR 産物の DNA 断片長を決定した。得られたアレルについては PCR 産物の DNA 断片長に基づいて、114塩基の DNA 断片長が決定された場合、“アレル114”のように表記した。

MHC-DQB マーカーにおける多型解析法

MHC 遺伝子のうち、よく解析されており、かつイルカと比較的近縁であるウシとヒツジの *MHC-DQB* 遺伝子の塩基配列 (accession numbers: AJ249717 and AJ249896) にならない、エクソン2を含む 357 塩基 (bp) を増幅させる PCR プライマー (DQB02P : 5'-TGTTACTTCACCAACGGGAC-3', (DQB08P : 5'-AAAGAAGCCAAAGGCACGAG-3')) を設計した。PCR 増幅には、*Taq* ポリメラーゼ *ExTaq* (TaKaRa) を使用し、96℃、3分間の熱変性の後、熱変性:96℃、30秒間; アニーリング:60℃、30秒間; 伸長反応:72℃、1分間の工程を 30 サイクル実行し、最終伸長反応として 72℃、4分間の反応をおこなった。PCR 産物のサブクロニングは pGEM-T Easy Vector (Promega) のプロトコールにしたがっておこない、得られたサブクローンならびに PCR 産物の塩基配

列決定には、ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。なお 1 個体あたり 16 個のサブクローンの塩基配列を決定した。また、ハンドウイルカより得られたアレルを “*Tutr-DQB**”, ハナゴンドウより得られたアレルを “*Grgr-DQB**” とそれぞれ表記した。

遺伝子解析法

塩基配列決定後の一般的な遺伝子解析には、Sequencher 4.1 (Gene Codes Co.) や GENETYX-MAC Ver. 11 (Software Development Co.), 公的データベースに公開されている塩基配列との類似性解析には、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) をそれぞれ用いた。アレル頻度、多型性の指標であるヘテロ接合度の計算には CERVUS Ver. 2.0 (<http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/cervus/details.html>), 親子鑑定に対する有用性の指標である多型情報含有値 (Polymorphic Information Contents: PIC), 父親でないオスが否定される確率である平均排除率 (Mean Exclusion Chance: MEC), 任意の 2 個体が異なる遺伝子型を有する確率である識別能 Power of Discrimination: PD) の計算には Parentage Test

Table 1 Allele frequency (AF) of four microsatellite (MS) markers and *MHC-DQB* gene for a 20 captive dolphins.

MS-D08		MS-D14		MS-D18		MS-D22		<i>MHC-DQB</i>	
allele	A.F.*	allele	A.F.	allele	A.F.	allele	A.F.	allele	A.F.
110	0.050	136	0.175	74	0.025	117	0.075	<i>Tutr-DQB*01</i>	0.075
112	0.150	138	0.200	76	0.075	119	0.025	<i>Tutr-DQB*02</i>	0.025
114	0.225	140	0.275	77	0.050	121	0.100	<i>Tutr-DQB*03</i>	0.025
116	0.100	142	0.200	85	0.250	125	0.150	<i>Tutr-DQB*04</i>	0.025
118	0.150	144	0.125	87	0.050	127	0.125	<i>Tutr-DQB*05</i>	0.100
120	0.100	148	0.025	89	0.150	129	0.250	<i>Tutr-DQB*06</i>	0.025
122	0.025			91	0.225	131	0.100	<i>Tutr-DQB*07</i>	0.025
126	0.125			93	0.150	133	0.100	<i>Tutr-DQB*08</i>	0.125
128	0.025			95	0.025	135	0.050	<i>Tutr-DQB*09</i>	0.150
132	0.050					140	0.025	<i>Tutr-DQB*10</i>	0.100
								<i>Tutr-DQB*11</i>	0.050
								<i>Tutr-DQB*12</i>	0.100
								<i>Tutr-DQB*13</i>	0.025
								<i>Grgr-DQB*01</i>	0.150
10 alleles		6 alleles		9 alleles		10 alleles		14 alleles	

http://www3.kmu.ac.jp/legalmed/DNA/ppl3.html)をそれぞれ用いた。なお供試材料とした 20 サンプルはハンドウイルカとハナゴンドウとのハイブリッド個体を含むことから、これらサンプルを同一集団として計算した。

父子鑑定法

父子鑑定には、Parentage Test (http://www3.kmu.ac.jp/legalmed/DNA/parent.html) を用い、Essen-Moller (1938) の父権肯定確率の判定基準に照らし合わせた。本研究では、Essen-Moller 値が 99.8% 以上を“父親と判定できる (Definite father)”, 99.0% ~ 99.7% を“極めて父親らしい” (Extremely father), 95.0% ~ 98.9% を“非常に父親らしい (Highly likely father)”, 90.0% ~ 94.9% を“父親らしい (Likely father)”, 90.0% 未満を“父親ではない” (Not father) として父親候補と定義付けた。

結 果

マイクロサテライトマーカーにおける多型情報

マイクロサテライトマーカー 4 種類 (MS-D08, MS-D14, MS-D18, MS-D22) における多型解析の結果、10, 6, 9, 10 種類のアリルがそれぞれ同定された (Table 1)。各マーカーにおける最も頻度の高いアリルは、MS-D08 がアリル 114, MS-D14 がアリル 140, MS-D18 がアリル 85, MS-D22 がアリル 129 であり、それぞれのアリル頻度は 0.225 (MS-D08) ~ 0.275 (MS-D14) であった (Table 1)。これらアリル数とアリル頻度から算出される、多型性の指標であるヘテロ接合度は 0.800 (MS-D14 および MS-D18) ~ 0.900 (MS-D08) と極めて高い値を示した。また親子鑑定の指標となる PIC 値

は 0.767 (MS-D14) ~ 0.848 (MS-D08), MEC 値は 0.597 (MS-D14) ~ 0.725 (MS-D08), PD 値は 0.928 (MS-D14) ~ 0.966 (MS-D08 および MS-D22) といずれのマーカーも高い値を示した (Table 2)。

MHC-DQB マーカーにおける多型情報

MHC-DQB 遺伝子のエクソン 2 を含む 357 bp における多型解析をおこなった結果、合計 13 種類のハンドウイルカ MHC-DQB (*Tutr-DQB*) アリル (*Tutr-DQB*01* ~ **13*: Accession numbers AB302044 ~ AB302056) ならびに 1 種類のハナゴンドウ MHC-DQB (*Grgr-DQB*01*) アリルが同定された。公的データベースに登録されている塩基配列との類似性解析の結果、*Tutr-DQB*10* は既知の塩基配列 (AB164221) と *Grgr-DQB*01* は (AB164222) と一致したが、その他の MHC-DQB アリルは新規に同定されたものであった。

同定された 14 種類のアリルのうち、最も頻度の高いアリルは、*Tutr-DQB*09* であり、それらのアリル頻度は 0.150 であった (Table 1)。ヘテロ接合度は 0.938, PIC 値は 0.889, MEC 値は 0.793, PD 値は 0.981 であり、いずれの値とも 4 種類のマイクロサテライトマーカーよりも高い値を示した (Table 2)。

マイクロサテライト多型と MHC-DQB 多型に基づく父子鑑定

マイクロサテライトマーカーならびに MHC-DQB マーカーにおける多型情報から、これら 5 マーカーはいずれとも多型性に富み、かつ親子鑑定に有効であると考えられた。そこで、これらのマーカーを用いて実際に父親候補を含む 4 家系における父子鑑定を実施した (Fig. 1, Table 3)。

Table 2 Statistical results for the genetic analyses of four MS markers and the MHC-DQB gene of 20 captive dolphins. R shows allele range. H (O) and H (E) show observed and expected heterozygosities, respectively. PIC, MEC and PD show polymorphic information contents, exclusion chance and power of discrimination, respectively.

Locus	Allele Num.	R	H (O)	H (E)	HWE	PIC	MEC	PD
D08	10	110-132	0.850	0.885	0.872	0.848	0.725	0.966
D14	6	136-148	0.800	0.818	0.778	0.767	0.597	0.928
D18	9	74-95	0.800	0.851	0.729	0.809	0.664	0.950
D22	10	117-140	0.850	0.882	0.702	0.845	0.722	0.966
<i>MHC-DQB</i>	14	-	0.938	0.921	0.351	0.889	0.793	0.981

Table 3 Four MS maker and *MHC-DQB* gene typing for 20 captive dolphins include four families. Bold letters indicate polymorphisms inherited from mothers and fathers. Black labels are individuals judged father each families.

Aquarium	Familial number	ID	Relationship	D08	D14	D18	D22	<i>MHC-DQB</i>	Percentage probability	Likelihood of paternity using 4 microsatellites	Percentage probability	Likelihood of paternity using 4 microsatellites and <i>Tutr-DQB</i> gene		
Minamichita Beachland Aquarium	A	Mother	112	114	136	142	85	93	129	133	<i>Tutr-DQB*09</i>	<i>Tutr-DQB*12</i>		
	B	Candidate Father1	112	116	140	140	85	93	127	129	<i>Tutr-DQB*09</i>	<i>Tutr-DQB*10</i>	99.39% Extremely father	99.88% Definite father
	D	Candidate Father2	114	128	140	148	93	95	121	129	<i>Tutr-DQB*09</i>	<i>Tutr-DQB*01</i>	<90.00% Not father	<90.00% Not father
	E	Candidate Father3	112	126	140	142	91	93	127	131	<i>Tutr-DQB*06</i>	<i>Tutr-DQB*07</i>	98.78% Highly likely father	<90.00% Not father
	G	Offspring	112	112	140	142	93	127	133	<i>Tutr-DQB*09</i>	<i>Tutr-DQB*10</i>			
	H	Mother	112	118	138	144	89	91	127	131	<i>Tutr-DQB*10</i>	<i>Tutr-DQB*12</i>		
	C	Candidate Father	126	126	144	144	76	89	121	121	<i>Grgr-DQB*01</i>	<i>Grgr-DQB*01</i>	99.88% Definite father	99.98% Definite father
	J	Offspring	118	126	138	144	89	121	131	<i>Tutr-DQB*10</i>	<i>Grgr-DQB*01</i>			
	F	non-related	110	116	136	140	85	91	125	129	<i>Tutr-DQB*01</i>	<i>Tutr-DQB*02</i>		
	K	Mother	118	120	136	140	85	87	129	129	<i>Tutr-DQB*09</i>	<i>Tutr-DQB*05</i>		
Sea Paradise Yokohama Hakkeijima	L	Candidate Father	126	132	140	142	74	76	135	140	<i>Grgr-DQB*01</i>	<i>Grgr-DQB*01</i>	99.87% Definite father	99.98% Definite father
	O	Offspring	120	132	136	140	76	87	129	135	<i>Grgr-DQB*01</i>	<i>Tutr-DQB*09</i>		
	M	non-related	116	122	138	138	91	91	119	131	<i>Tutr-DQB*08</i>	<i>Tutr-DQB*12</i>		
N	non-related	114	116	136	138	85	89	125	127	<i>Tutr-DQB*03</i>	<i>Tutr-DQB*04</i>			
Enoshima Aquarium	P	Candidate Father1	114	118	138	140	85	85	117	125	<i>Tutr-DQB*08</i>	<i>Tutr-DQB*13</i>	94.12% Likely father	98.46% Highly likely father
	Q	Candidate Father2	114	120	136	144	89	91	117	129	<i>Tutr-DQB*01</i>	<i>Tutr-DQB*05</i>	<90.00% Not father	<90.00% Not father
	R	Offspring	110	114	138	140	85	91	125	125	<i>Tutr-DQB*08</i>	<i>Tutr-DQB*08</i>		
	S	Mother	118	120	142	142	77	85	117	133	<i>Tutr-DQB*11</i>	<i>Tutr-DQB*12</i>		
	P	Candidate Father1	114	118	138	140	85	85	117	125	<i>Tutr-DQB*08</i>	<i>Tutr-DQB*13</i>	<90.00% Not father	<90.00% Not father
	Q	Candidate Father2	114	120	136	144	89	91	117	129	<i>Tutr-DQB*01</i>	<i>Tutr-DQB*05</i>	96.58% Highly likely father	99.30% Extremely father
	T	Offspring	114	118	136	142	77	91	129	133	<i>Tutr-DQB*05</i>	<i>Tutr-DQB*11</i>		
	T	Mother	114	118	136	142	77	91	129	133	<i>Tutr-DQB*05</i>	<i>Tutr-DQB*11</i>		
	Q	Candidate Father1	114	120	136	144	89	91	117	129	<i>Tutr-DQB*01</i>	<i>Tutr-DQB*05</i>	<90.00% Not father	<90.00% Not father
	R	Candidate Father2	110	114	138	140	85	91	125	125	<i>Tutr-DQB*08</i>	<i>Tutr-DQB*08</i>	98.67% Highly likely father	99.83% Definite father
U	Offspring	114	114	138	142	85	91	125	129	<i>Tutr-DQB*05</i>	<i>Tutr-DQB*08</i>			

まず、父親候補が1頭に限られている家系2と家系3において、マイクロサテライトマーカーのみの父子鑑定の場合、*MHC-DQB* マーカーを含めた父子鑑定の場合ともに、Essen-Moller (EM) 値が99.87%以上(父親と判定できる)の信頼度の高い判定が得られた(Table 3)。一方、3頭の父親候補を有する家系1において、父親候補“B”、“D”、および“E”のEM値はマイクロサテライトマーカーのみの場合、それぞれ99.39%、<90.00%および98.78%であったのに対して、*MHC-DQB* マーカーを含めた場合、それぞれ99.88%、<90.00%および<90.00%であった。したがって、“D”と“E”は父親候補から除外され、“B”を父親であると判定した。同様に家系1よりもさらに複雑な家族構成を示す家系4の場合においても、母子関係が“S”と“T”に対する父親は“Q”、母子関係が“T”と“U”に対する父親は“R”、母親不明、子が“R”に対する父親は“P”であるとそれぞれ判定することができた。

考 察

本論文では、まずMHCクラスII遺伝子の1つである*MHC-DQB* 遺伝子を特異的に増幅するPCR系を開発したとともに、飼育下20頭のイルカを用いて、*MHC-DQB* マーカーならびにマイクロサテライトマーカーを用いた多型解析を実施した。その結果、計14種類の*MHC-DQB* アリルが同定された。4種のマイクロサテライトマーカーにおけるアリル数は6~10種類であったのに対して、*MHC-DQB* 遺伝子はそれらの1.4~2.3倍の高い値を示したことから、高度な多型性を有することが明らかとなった(Table 2)。一般的に信頼性のある親子鑑定を行うには、親から子に対立遺伝子が遺伝すること、新生児でも検査可能であること、遺伝子頻度やハプロタイプ頻度のデータベースが整っていること、突然変異が起こらないこと、高度な多型性を示すことなどの要件を満たす遺伝形質を使用することが必要である。親子鑑定や個体識別に使用する遺伝形質は、ヘテロ接合度、PIC値(多型情報含有値)、MEC値(父子関係を否定できる確率)、PD値(二者が異なる遺伝子型になる確率)など対立遺伝子数や遺伝子頻度から算出される遺伝情報量が検査結果に大きな影響を及ぼし、いずれも高い値を示すことにより、より精度の高い父権肯定確率および否定確率が得られる(太田 2004)。本解析にて、*MHC-DQB* マーカーの示すヘテロ接合度、PIC値、MEC

値、PD値はいずれも既知のハンドウイルカ用マイクロサテライトマーカーよりも高い値を示した(Table 2)。また、マーカー数を4種類に揃えた場合の5通りの組み合わせ、すなわち組み合わせ1(MS-D08, MS-D14, MS-D18, MS-D22)、組み合わせ2(MS-D08, MS-D14, MS-D18, *MHC-DQB*)、組み合わせ3(MS-D08, MS-D14, MS-D22, *MHC-DQB*)、組み合わせ4(MS-D08, MS-D18, MS-D22, *MHC-DQB*)、組み合わせ5(MS-D14, MS-D18, MS-D22, *MHC-DQB*)の父権肯定確率を算出したところ、マイクロサテライトマーカーのみの組み合わせ1(94.12%:父親らしい~99.88%:父親と判定できる)よりも、*MHC*とマイクロサテライトマーカーを含む組み合わせ2、3,4および5(95.05%:非常に父親らしい~99.98%:父親と判定できる)の方が高い値を示した。さらに、組み合わせ1の父権肯定確率に対して、これに*MHC-DQB* マーカーを含めた場合、98.46%(極めて父親らしい)~99.98%(父親と判定できる)と極めて信頼度の高い判定が得られた(Table 3)。とりわけ、家系4の“P”は94.12%から98.46%と、大幅な信頼性の改善が見られた。したがって、*MHC-DQB* マーカーは父子鑑定のための優れたDNAマーカーであるとともに、既知の母子間および父子間に多型の矛盾は認められなかったこと、複数の父親候補から1頭の父親を選択しうることから、この少数のマイクロサテライトマーカーと*MHC-DQB* マーカーによる親子鑑定精度は極めて高く、飼育頭数の限られる環境下にて今後の有用な手法の一つになると考えられた。

鯨類の遺伝学的解析による個体識別や親子鑑定および血縁解析は、水族館における近交弱勢を回避するのみならず、野生下においても集団内の血縁関係を正しく理解する上で必須である。しかしながら、報告されているマイクロサテライトマーカーは、複数の鯨種に渡り80種程度存在するものの、それらの中には多型性に乏しいものや、種の枠を超えて使用できないものもあり、DNAマーカー選定が困難であると共に、DNAマーカー数の絶対数は少ないと考えられる。また、各研究機関がそれぞれ異なるDNAマーカーを使用することにより多型情報の共有が難しいという問題もある。これらの問題を解消するためにも、ヒトでは既に用いられているように脊椎動物で極めて高度な多型性を有するMHC遺伝子をDNAマーカーの1つとして含めることが必要である。今後、各MHC遺伝子

領域における DNA マーカーが複数開発され、国内の水族館で多型情報が共有されることにより、各鯨類の遺伝的多様性の比較はもとより、種の保全に役立てることが可能である。さらには、これらの多型情報から病気になるやすい個体、なりにくい個体の選別や、近交弱勢を回避するための交配個体の選別、および繁殖に有利な個体の選別が可能になることが期待される。

謝 辞

この研究を行うにあたり貴重なサンプルを提供してくださった新江ノ島水族館、横浜・八景島シーパラダイス、南知多ビーチランドの方々に心より感謝の意を表したい。

引用文献

- Amos, B., Scholttere, C. and D. Tautz (1993): Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science*, **260**, 670-672.
- Buchanan, F. C., Friensen, M. K., Littlejohn, R. P. and J. W. Clayton (1996): Microsatellites from the beluga whale *Delphinapterus leucas*. *Mol. Ecol.*, **5**, 571-575.
- Essen-Moller E. (1938): Die Beweiskraft der Ähnlichkeit im Vaterschaftsnachweises. *Theoretische Grundlagen. Mitt Anth Ges Wien*, **68**, 9-53.
- 後藤睦夫・上田真久 (2001): 鯨類における遺伝学的手法を用いた系群判別. *海洋と生物*, **134**, 281-287.
- Hayashi K., Nishida S., Yoshida H., Goto M., Pastene L. A. and H. Koike (2003): Sequence variation of the DQB allele in the cetacean MHC. *Mammal Study*, **28**, 89-96.
- Hayashi K., Yoshida H., Nishida S., Goto M., Pastene L. A., Kanda N., Baba Y. and H. Koike (2006): Genetic variation of the MHC DQB locus in the finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides*) *Zool. Sci.*, **23**, 147-153.
- 猪子英俊 (2000): ゲノム多様性と機能解析—MHC 多型と疾患感受性—HLA とポストゲノムシーケンシング. *Molecular Medicine*, **37**, 504-516.
- Krutzen M., Barre L. M., Connor R. C., Mann J. and W. B. Sherwin (2004): 'O father: where art thou?' -Paternity assessment in an open fission-fusion society of wild bottlenose dolphins (*Tursiops sp.*) in Shark Bay, Western Australia. *Mol. Ecol.*, **13**, 1975-1990.
- Kulski J. K., Shiina T., Anzai T., I, Kohara S. and H. Inoko (2002): Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. *Immunol. Rev.*, **190**, 95-122.
- 太田正穂 (2004): 法医学への応用. 猪子英俊・笹月健彦・十字猛夫 (監修), 輸血検査学. 講談社, 181-185.
- Palsboll, P. J., Berube, M., Larsen, A. H. and H. Jorgensen (1997): Primers for the amplification of tri- and tetramer microsatellite loci in baleen whales. *Mol. Ecol.*, **6**, 893-895.
- Richard, K. R., Whitehead, H. and J. M. Wright (1996): Polymorphic microsatellites from sperm whales and their use in the genetic identification of individuals from naturally sloughed pieces of skin. *Mol. Ecol.*, **5**, 313-315.
- Scholotterer, C., Amos, B. and D. Tautz (1991): Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, **354**, 63-65.
- Shiina T., Hosomichi K., Inoko H. and J. K. Kulski (2009): The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J. Hum. Genet.*, **54**, 15-39.
- Shinohara, M., Domingo-roura, X. and O. Takenaka (1997): Microsatellites in bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. *Mol. Ecol.*, **6**, 695-696.
- Sumiyama, D., Kitamura, S., Terasawa, F., Hori, Y., Murata, K., Kulski, J. K. and H. Inoko (2008): Paternity determination of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) using microsatellite DNA analysis. *J. Vet. Med. Sci.*, **14**, 711-713.
- Valsecchi, E., Palsboll, P., Glockner-Ferrari, D., Ferrari, M., Chapham, P., Larsen, F., Mattila, D., Sears, R., Sigurfonsson, J., Brown, M., Corkeron, P. and B. Amos (1997): Microsatellite genetic distances between oceanic populations of the humpback whale (*Megaptera noveangliae*). *Mol. Biol. Evol.*, **14**, 355-362.