

マイクロサテライト DNA マーカーを用いた スunks系統間の遺伝的多型解析

小松 亮・目加田 和之

岡山理科大学理学部動物学科

(2020年10月29日受付、2020年12月11日受理)

1. 緒言

スunks (ジャコウネズミ) (*Suncus murinus*) は、トガリネズミ形目トガリネズミ科に属し、南アジアや東南アジアの熱帯・亜熱帯地域を中心に広く分布する小型哺乳類である。地域集団ごとに毛色や体サイズ、染色体数が異なるなど、種内変異に富んだ特徴をもつ¹⁻³⁾。スunksは、1973年に実験動物化され、これまでに捕獲地域ごとに樹立された系統(純系統)や異なる系統を交配させて確立させた毛色変異などの特徴をもつ交雑由来系統が育成されている⁴⁾。これらの系統は、現在、岡山理科大学理学部動物学科のみで維持されており、数少ない食虫類の実験動物として、貴重な遺伝資源となっている。

地域集団間や個体間などの遺伝的な相違を評価する上で、DNA多型を利用した解析が有用である⁵⁾。とりわけ、マイクロサテライト DNA はゲノム中に広く分布する反復配列であり、PCRによる多型のタイプ分けが容易であることから、マウスやラットなどの実験動物においては、系統の遺伝背景の推定や新規変異遺伝子のマッピング、マーカー選抜によるコンジェニック系統育成などに利用されている⁶⁾。スunksにおいても、マイクロサテライト DNA を用いた多型マーカーの開発が行われたが^{7,8)}、すでに途絶えたスunks系統である TKU 系統、BAN 系統および WZ 系統のみを対象としていたため、現存するスunks系統の情報は含まれていない。

そこで本研究では、現存するスunks系統の遺伝的多様性の評価や今後の系統育成に有用となる遺伝的基盤の情報を整備することを目的として、先行研究で開発されたマイクロサテライト DNA マーカーを用いて、本学で系統維持されている各種スunks系統の区別が可能となる多型マーカーを選定するとともに、系統間での多型性について評価した。

2. 材料および方法

2-1. 動物

対象動物は岡山理科大学理学部動物学科で系統維持されている、捕獲地域の異なるスunks純系統である KAT (ネパール・カトマンズ産野生由来系統)、EDS (バングラデシュ野生由来系統 BAN より分離育成した糖尿病発症系統) および NAG (長崎県長崎市茂木産野生由来系統) の 3 系統と、交雑由来系統である BK-*Slc45a2*^{ocao} (バングラデシュ産野生個体と KAT 系統の交雑系統を由来とする毛色変異系統; ホモ接合型においてアルビノ様毛色変異を呈し、ヘテロ接合型において野生色を呈する) (以下、BK-c と称す) および TESS (複数系統の交雑により育成された、巻毛、赤眼淡毛色およびスクラーゼ活性の欠損をもつ多重変異系統) の 2 系統とし、それぞれ雌雄 2 個体ずつ (EDS 系統は個体の確保が困難であったため、雌雄 1 匹ずつ) 計 18 個体を用いた。飼育環境の条件は、室温 25°C、明暗周期 12L12D 設定とし、餌は鱒育成用飼料 (5P、25 mm) (フィードワン) を使用し、餌・水ともに自由摂取させた。本研究で行った動物実験は、岡山理科大学全学動物実験管理委員会によって審査・承認され (承認番号 第実 2018-10 号)、かつ実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 25 年環境省告示) およびその他の動物実験などに関する法令などの規程に踏まえ策定された学内取扱規程などに準じて行った。

2-2. ゲノム DNA の精製

ゲノム DNA の精製には、DNeasy Blood & Tissue Kit (キアゲン) を用いた。対象動物の耳片または尾の先端から約 3 mm の組織片を採取し 2 ml のエッペンドルフ型チューブに入れ、DNA 抽出まで -80°C で保管した。組織片に 180 μ l の Buffer ATL を加えて、20 μ l の Proteinase K を加え、ボルテックス操作をして混合し、組織が完全に溶解するまで 55°C でインキュベートした。15 秒間ボルテックス操作をし、200 μ l の Buffer AL と 200 μ l のエタノール (96~100%) をサンプルに添加し、DNeasy Mini スピンカラムに移し 8,000 rpm で 1 分間遠心分離を行い不純物を取り除いた。混合液を新し

いコレクションチューブ中の DNeasy Mini スピんカラムに移し、500 μ l の Buffer AW1 を添加し 8,000 rpm で 1 分間遠心分離を行い、ろ液を捨てた。DNeasy Mini スピんカラムを新しいコレクションチューブに移し、500 μ l の Buffer AW2 を添加し 14,000 rpm で 3 分間遠心分離を行い、メンブレンを乾燥させた。DNeasy Mini スピんカラムを新しい 2 ml のチューブに移し、100 μ l の Buffer AE を添加し 5 分間室温でインキュベートした後、8,000 rpm で 1 分間の遠心分離を行い DNA を溶出した。

2-2. PCR 反応

PCR には、Type-it Microsatellite PCR Kit (キアゲン) を用いた。PCR 反応液およびサイクリング条件は以下の通りとした。

PCR 反応液組成

Components	Volume
2x Type-it Multiplex PCR Master Mix	5 μ l
10x primer mix, 2 μ M each primer	1 μ l
RNase-free water	3 μ l
Template DNA	1 μ l
Total volume	10 μ l

PCR サイクリング条件

Initial activation step:	5 min	95°C
3-step cycling:		
Denaturation	30 s	95°C
Annealing	90 s	60°C
Extension	30 s	72°C
Number of cycles	32~35	
Final extension:	10 min	68°C

2-3. アガロースゲル電気泳動

電気泳動には、4%アガロースゲル [NuSieveTM3:1 アガロース (ロンザジャパン) を 0.5x TBE Buffer または 1x TAE Buffer で溶解したもの] を用いた。サブマリン型アガロースゲル電気泳動装置 (i-MyRun II) (コスモバイオ) を使用し、泳動条件は 100V で 50~60 分間とした。電気泳動の直前に、PCR 反応液 10 μ l に対して 0.8 μ l の核酸染色蛍光試薬 Midori Green Direct (日本ジェネティクス) を添加し、電気泳動を行った。電気泳動後、LED ゲル撮影装置 (オプトコード) を用いてゲル撮影を行った。

2-4. マイクロサテライトマーカーの選定

先行研究⁸⁾によって選別されたマイクロサテライト DNA マーカー (179 種類) のうち、系統の由来となった野生個体の捕獲地域が地理的に離れたスunks 系統

である TKU 系統 (鹿児島県徳之島産野生個体由来) vs BAN 系統 (バングラデシュ産野生個体由来) の電気泳動パターンが文献の写真上で視覚的に区別可能なもの (およそ 10 bp 以上のバンド差があるもの) を抽出し、さらに、リンケージグループ全体をカバーできるように 14 種類を選択し、解析対象とした。

まず、KAT、NAG および EDS のスunks 純系統のゲノム DNA を用いて各種マイクロサテライト DNA マーカーに対するプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動によりバンドパターンを確認した。バンドサイズに違いが認められたマーカーを用いて残りの交雑由来系統 BK-c および TESS の遺伝背景を調査した。本研究で選定したマイクロサテライト DNA マーカーを Table 1 に示した。

Table 1. Microsatellite DNA markers used in this study

Linkage Group	Locus Name (Acc No.)	Product Size (bp)*	Primer sequence Forward / Reverse
I	<i>NGA155</i> (AB277522)	212	F: cctaactggcttcaggctgac R: atgggagtgtagaggccggcag
II	<i>NGA102</i> (AB277467)	193	F: tgcctgaaatctgggagcagg R: tgcagcagcatcagcaagatgc
II	<i>NGA76</i> (AB277441)	239	F: gagggggaggtacaattcc R: ccctgcaaataggagcaaga
III	<i>NGA97</i> (AB277462)	308	F: ccagtggtcccgagccacc R: aaacgacacagtgccaggcggctc
III	<i>NGA179</i> (AB277546)	251	F: agtgatagcacaacaggtcttgc R: tggttctgcttcagggatcagg
III	<i>NGA31</i> (AB277397)	160	F: aggtgcaactggtgaagtggagg R: tgagggagcagtgctggaagag
IV	<i>NGA118</i> (AB277482)	416	F: tgcaagagcagctagcagcctgg R: acacttggagcagcagcctctc
IV	<i>NGA24</i> (AB277390)	99	F: tcaaccagatctcaccatggggt R: agacttgagtcaccccagcgt
V	<i>NGA20</i> (AB277386)	117	F: aggtcattcaggatctgacc R: acttgctgctgacagctgtggaca
VI	<i>NGA67</i> (AB277433)	135	F: tcatcgacatgaagcttgacacc R: tgcctcttgacagcattctgg
VII	<i>NGA39</i> (AB277405)	146	F: tgggtgcaatcccgaatgcccagg R: tgggtctgtaggaccagacag
VIII	<i>NGA56</i> (AB277422)	266	F: acacatcagagatcctggggtc R: agcatcctctggaaggtcagcagg
IX	<i>NGA161</i> (AB277528)	303	F: acatgtgacctgctgcagaagc R: agaggctgtgctagtcaggggct
X	<i>NGA12</i> (AB277378)	331	F: acatggtgcttcacagacac R: tgcgtgcccagaaggtcagcagg

*The size of the PCR product, including the primer sequences, obtained from the clone used to develop the loci⁸⁾.

3. 結果

3-1. 純系スunks 3 系統間の多型性

対象としたマイクロサテライト DNA マーカー 14 種類すべてにおいて電気泳動によりバンドが確認できた。

しかしながら、NGA155、NGA97、NGA118、NGA39 および NGA56 のマーカーでは、系統間に目視による区別可能なバンドサイズの差が認められなかった。また、NGA20 は数回の電気泳動を通してバンドサイズが定まらなかった。結果として、残りのマイクロサテライト DNA マーカー8 種類においてスルクス純系統間で多型性が認められた (Fig. 1)。KAT 系統と NAG 系統の間には共通のバンドサイズ示すマーカーはなく、すべてのマーカーにおいてそれぞれ固有のバンドパターンとなった。EDS 系統では、EDS 固有のバンドパターンを示したマーカーは NGA76、NGA179 および NGA24 であり、残りのほとんどは KAT 系統と同じパターンであった、一方、NGA24 のバンドパターンには個体差が観察され、EDS 型と NAG 型の2 種類が観察された。

Locus name	Band size	Strain name / animal ID									
		KAT				EDS				NAG	
		m1	m2	f1	f2	m1	f1	m1	m2	f1	f2
NGA102	c<a	a	a	a	a	a	a	c	c	c	c
NGA76	a<c<b	a	a	a	a	b	b	c	c	c	c
NGA179	c<a<b	a	a	a	a	b	b	c	c	c	c
NGA31	a<c	a	a	a	a	a	a	c	c	c	c
NGA24	a<c<b	a	a	a	a	b	c	c	c	c	c
NGA67	c<a	a	a	a	a	a	a	c	c	c	c
NGA161	a<c	a	a	a	a	a	a	c	c	c	c
NGA12	c<a	a	a	a	a	a	a	c	c	c	c

Fig. 1. Microsatellite DNA marker polymorphisms in the pure KAT, NAG, and EDS suncus strains. a, KAT; b, EDS; and c, NAG types; m, male; f, female.

3-2. 交雑由来スルクス2系統のバンドパターン

スルクス純系統間で多型がみられたマイクロサテライト DNA マーカーを用いて、交雑由来系統 BK-c および TESS のバンドパターンを解析した。2 系統とも、KAT 型もしくは EDS 型、NAG 型のいずれかのバンドパターンを示した (Fig. 2)。BK-c 系統では、NGA31、NGA24 および NGA12 以外のマーカーで、個体によってバンドパターンに違いがあった。一方 TESS 系統の個体間では全てのマーカーにおいてバンドパターンは同一であった。KAT 型、EDS 型および NAG 型の各遺伝子型が占める割合 (平均) を求めたところ、BK-c 系統のアルビノ様毛色 (ocao/ocao) 個体 (m1 と f1) では、KAT 型が 43.75%、EDS 型が 12.50%、NAG 型が 43.75% であり、野生色 (ocao/+) 個体 (m2 と f2) では、KAT 型が 53.13%、EDS 型が 12.50%、NAG 型が

34.38% であった。TESS 系統では、KAT 型が 12.50%、EDS 型が 0%、NAG 型が 87.50% であった。

Locus name	KAT	EDS	NAG	Strain name / animal ID							
				BK-c				TESS			
				m1	f1	m2	f2	m1	f1	m2	f2
NGA102	a	a	c	a	c	c	a/c	c	c	c	c
NGA76	a	b	c	c	a	c	a	c	c	c	c
NGA179	a	b	c	b	b	b	b	c	c	c	c
NGA31	a	a	c	a	a	a	a	c	c	c	c
NGA24	a	b/c	c	c	c	c	c	a	a	a	a
NGA67	a	a	c	c	c	a/c	a/c	c	c	c	c
NGA161	a	a	c	c	a	a	a	c	c	c	c
NGA12	a	a	c	a	a	a	a	c	c	c	c

Fig. 2. Microsatellite band patterns in the hybrid-derived BK-c and TESS suncus strains. a, KAT; b, EDS; and c, NAG types; m, male; f, female. BK-c m1 and f1 animals were ocao/ocao homozygotes (albino-like coat color), BK-c m2 and f2 animals were ocao/+ heterozygotes (wild coat color).

4. 考察

EDS 系統では、多型性がみられた8種類のマイクロサテライト DNA マーカーの過半数が KAT 型であった。KAT 系統はネパール・カトマンズ産野生個体を由来とする系統であり、EDS 系統はバングラデシュ産野生個体を由来とする系統である。もう一つのスルクス純系統である長崎県産野生個体を由来とする NAG 系統と比べ、KAT 系統と EDS 系統は産地となった地域が地理的に近く、遺伝的距離の近さがバンドパターンの類似性を反映しているものと考えられる。

BK-c 系統はバングラデシュ産野生個体に KAT 系統を戻し交雑することによって育成された BK 系統に、沖縄県具志川市で捕獲した野生ジャコウネズミがもっていたアルビノ様変異を導入した毛色変異系統であり、ホモ接合型でアルビノ様毛色を呈す⁹⁻¹¹⁾。したがって、BK-c 系統のアルビノ様毛色個体 (m1 と f1) の遺伝背景において、NAG 系統の高い割合が示されたことは、長崎産野生由来の NAG 系統とアルビノ様毛色変異の起源となる沖縄が地理的に近く、遺伝的距離が近いことによるものと考えられる。同様に、TESS 系統の遺伝背景において、NAG 型の高い割合が示されている。TESS 系統は、長崎、沖縄本島、多良間島とジャカルタおよびボゴールで捕獲した野生スルクスを掛け合わせた系統育成背景をもち、保有する変異の多くが日本産

スunksに由来することによって考えられる¹²⁻¹⁴⁾。

以上より、これら8種類のマイクロサテライト DNA マーカーは、交雑由来系統の育成背景と整合性が認められ、現存するスunks系統の遺伝背景をよく反映したマーカーであることが示された。今後、これらのマーカーを用いることにより、系統の識別といった遺伝的モニタリングへの利用やコンジュニックなどの新規系統育成などへの応用が可能となる。しかし、より詳細で精度の高い遺伝背景の把握を行うためには、今後、本研究で使用できなかった残りのマーカーを用いての検証を行うとともに、系統内での多型性(個体差の程度)を検証するために解析のサンプル数の追加が必要であろう。

参考文献

- 1) 織田銃一. 1985. III-1 入手 採集と輸送, スunks 実験動物としての食虫目トガリネズミ科動物の生態学(近藤恭司 監修)(織田銃一, 鬼頭純三, 太田克明, 磯村源蔵 編), pp. 97-101, 学会出版センター, 東京.
- 2) 並河鷹夫. 1987. ジャコウネズミ-実験動物化の過程と研究. 遺伝, 41: 13-18.
- 3) Yoshida TH. 1982. Cytogenetical studies on Insectivora.II. Geographical variation of chromosomes in the house shrew, *Suncus murinus* (Soricidae), in East, Southeast and Southwest Asia, with a note on the karyotype evolution and distribution. *Jpn J Genet*, 57: 101-111.
- 4) 織田銃一. 2011. I-1 野生動物の実験動物化とスunks. スunksの生態学(磯村源蔵 監修)(織田銃一, 東屋一雄, 宮本孝昌 編), pp. 3-9, 学会出版センター, 東京.
- 5) 石川明. 2011. IV-2 スunksにおける遺伝的マーカーの開発. スunksの生態学(磯村源蔵 監修)(織田銃一, 東屋一雄, 宮本孝昌 編), pp. 78-83, 学会出版センター, 東京.
- 6) Rhodes M, Straw R, Franando S, Evans A, Lacey T, Dearlove A, Greystrom J, Walker J, Watson P, Weston P, Kelly M, Taylor D, Gibson K, Mundy C, Bourgade F, Poirir C, Simon D, Brunialti AL, Montagutelli X, Gu'enet JL, Haynes A, Brown SD. 1998. A high-resolution microsatellite map of the mouse genome. *Genome Res*, 8: 531-42.
- 7) Adjei S, Sato A, Nagase T, Matsubara K, Matsuda Y, Namikawa T, Ishikawa A. 2008. A genetic linkage map of the house musk shrew, *Suncus murinus*, constructed with PCR-based and RFLP markers. *Exp Anim*, 57: 129-134.
- 8) Adjei S, Ishikawa A. 2007. A novel set of microsatellite marker loci linkage-mapped in the house musk shrew, *Suncus murinus*. *Exp Anim*, 56: 51-56.
- 9) Jogahara T, Ogura G, Higa G, Ishibashi O, Oda S. 2008. Survey and capture of albino-like house musk shrews (*Suncus murinus*) in Okinawa, Japan, and a preliminary report regarding inheritance of the albino-like mutation. *Mamm Stud*, 33: 121-124.
- 10) 織田銃一, 城ヶ原貴通. 2011. III-3 スunksの地域集団由来系統とミュータント. スunksの生態学(磯村源蔵 監修)(織田銃一, 東屋一雄, 宮本孝昌 編), pp. 78-83, 学会出版センター, 東京.
- 11) Tuboi K, Hayashi Y, Jogahara T, Ogura G, Murata Y, Oda S. 2009. Oculocutaneous albinism in *Suncus murinus*: establishment of a strain and identification of its responsible gene. *Exp Anim*, 58: 31-40.
- 12) Iseki R, Namikawa T, Kondo K. 1984. Cream, a new coat-color mutant in the musk shrew. *J Hered*, 75: 144-145.
- 13) Ohno T, Ishikawa A, Namikawa T. 1992. Red-eyed dilution (*rd*), a novel coat-mutant gene in the musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora). *Exp Anim*, 41: 13-1793.
- 14) Ohno T, Oda S, Namikawa T. 1994. TESS Line: A laboratory line of the musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora), triple-homozygous for the curly hair (*ch*), cream coat-color (*cr*) and red-eyed dilution (*rd*) genes and segregating the sucrase deficient (*suc/suc*). *Exp Anim*, 43: 111-113.

Genetic polymorphism analysis of suncus strains using microsatellite DNA markers

Ryo Komatsu and Kazuyuki Mekada

Department of Zoology, Faculty of Science

Okayama University of Science

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received October 29, 2020; accepted December 11, 2020)

Genetic polymorphism in the five extant suncus strains, including pure and hybrid-derived origins, was assessed using eight microsatellite DNA markers, which allowed us to distinguish the pure KAT, EDS, and NAG suncus strains. Their genetic similarity was consistent with the geographic localities from which they were derived. Furthermore, the genetic background of hybrid-derived BK-c and TESS suncus strains, as indicated by the microsatellite DNA markers, was consistent with their developmental process. These markers could be used for genetic monitoring, such as identifying strains, and for establishing new suncus strains.

Keywords: *Suncus murinus*, strain difference, microsatellite marker polymorphism