水平式 Polyacrylamide Gradient Gel 電気泳動法による牛 Transferrin 型判定の精度について

大石孝雄・島田和宏

農林水産省中国農業試験場畜産部，大田市 694

Accuracy of Determination of Cattle Serum Transferrin Type by using Horizontal Polyacrylamide Gradient Gel Electrophoresis

Takao Oishi and Kazuhiro Shimada

Livestock Division, Chugoku National Agricultural Experiment Station, Ohda-shi 694

牛血清中の蛋白質の1つであるトランスフェリン (transferrin-Tf) の遺伝的変異 (Tf型) の研究は, Ashton (1958) が報告したのが最初で長い歴史を有している。その後の研究で主要な対立遺伝子として Tf^A , Tf^{D_1} , Tf^{D_2} , Tf^E の4つが明らかとなり, わが国の牛集団でもこれら4遺伝子が見出されている。牛Tf型の判定は, 当初でん粉ゲル電気泳動法を用いて検出することにより行われ, Tf^{D_1} と Tf^{D_2} 遺伝子を区別するためその後いくつかの改良法が試みられてきた。泳動方法の改良によりTf型の分離判定を明瞭にするための主眼点は, 不連続緩衝液系の buffer system において, でん粉ゲル作成用のでん粉を溶解させる緩衝液を変えてみることにおかれた。ゲル用緩衝液は, トリスアミノメタンとクエン酸またはカコジル酸の組み合わせが試験され, D_1 と D_2 の分離に良好な方法がいくつか提案されている (印牧ら, 1973)。しかし, 現時点におけるTfの D_1 と D_2 バンドの分離に最も適した方法は, アミラーゼ (Am) 型の同時判定を考慮しなければ, 阿部と小松 (1977) の用いたゲル用緩衝液であると思われる。この緩衝液系は, 電極槽には従来と同じホウ酸・カセイソーダ緩衝液 (pH8.7) を用いているが, ゲル用にはトリスアミノメタン・塩酸緩衝液 (pH7.4) を用い, さらに少量の塩化カルシウムを添加するという特徴を有している。

一方最近Gahneら (1977) が, ポリアクリルアミドのグラジエントゲルを用いて, 牛の血清中のいくつかの蛋白質の遺伝的変異を検出する方法を報告している。この電気泳動法は, 従来でん粉ゲルでは分離検出が十分でなかったポストアルブミン (Pa) 域とポストトランスフェリン (Pt f) 域蛋白質の遺伝的な個体変異を明らかにした。また同時にTf型の判定も可能であることが示された。そこで現在この水平式ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動法を用いて, 牛のTf, Pa, Pt f型を同時に検出判定することが広く試みられるようになってきた。わが国では, 阿部と小松 (1978) がGahneの方法に若干の改良を加え詳細な技術の解説をして以来, 広く用いられるよう

になった。しかし本方法は、Tf型のD₁とD₂バンドの分離については最良の方法とはいえないと思われる。そこでポリアクリルアミドのグラジエントゲル泳動法を用いて行ったTf型の判定を、でん粉ゲルの最良の方法による判定と比較し、その精度を検討してみた。

材料および方法

電気泳動用の血清材料は、黒毛和種64頭、無角和種74頭から採取したものをを用い、その内でTfのAA型と判定された黒毛和種15頭、無角和種23頭を除いた残りの100頭を、本報告の分析用として供試した。

水平式ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動法は、阿部と小松（1978）の解説した方法に準じて行った。泳動装置は三紳工業社製で、泳動中のゲルの冷却は、氷冷水を入れた水槽に小型ポンプ（日立ハンデイポンCP-30B）を連結し、冷却槽に循環冷却する方法によって行った。泳動条件は定電流で、10cm×20cm×0.1cmのゲルに対して10mA通電し、約5時間泳動した。Pa型とPt f型の分離判定は良好で、でん粉ゲルに先立って泳動することにより、各個体のTf型についても同時に判定した。

一方Tf型の一層確実な判定のために実施したでん粉ゲル電気泳動法は、電極槽にホウ酸・カセイソーダ緩衝液（pH8.7）、ゲル用として0.021Mトリスアミノメタンと0.018M塩酸緩衝液（pH7.4）に0.005Mの塩化カルシウムを添加したものをを用いて行った。その他詳細な方法については、従来のでん粉ゲル電気泳動とほとんど同じで、泳動条件などは阿部と小松（1977）が提案した方法に準じて行った。すなわち12cm×26cm×0.6cmのゲルに対して150～300Vの定電圧条件で行い、約5時間泳動した。ゲル濃度は13.5%で、試料を塗布しゲルに挿入した濾紙片は通電開始後45分を取り除いた。この方法により、TfのD₁とD₂のバンドは明瞭に区別でき、AD₁とAD₂型、D₁D₁とD₂D₂とD₁D₂型、D₁EとD₂E型の分離判定が確実に行えた。

結果および考察

ポリアクリルアミドグラジエントゲルとでん粉ゲルによって電気泳動して得られた牛血清トランスフェリン型の泳動像を図1に示した。図1から明らかなように、ポリアクリルアミドゲルは鮮明な泳動像を示すが、AD₁とAD₂型、D₁D₁とD₂D₂とD₁D₂型、D₁EとD₂E型の区別に少し難がある。一方でん粉ゲルでは、D₁とD₂バンドが明瞭に分離することから、Tf^{D₁}とTf^{D₂}遺伝子を含むTf型の区別は確実に行えることが図1からも明らかである。どちらのゲルにも塩化カルシウムが添加されているが、Tf型の判定の精度には少し差があると思われる。ただしポリアクリルアミドグラジエントゲル泳動法をTf型の分離判定に焦点をしばって、少し改良を加えれば、D₁とD₂バンドの分離がもう少し改善される可能性もある。

次にTf^{D₁}とTf^{D₂}遺伝子を含むTf型を有する牛個体100頭の血清を、ポリアクリルアミドゲルとでん粉ゲルで泳動比較し、ポリアクリルアミドグラジエントゲルによるTf型判定の精度を検討してみた。泳動の順序として、まずポリアクリルアミドゲル泳動を行ってTf型を判定した後、でん粉ゲル泳動により再度一層確実なTf型の判定を行った。得られた結果は表1に示したとおり、両者の泳動法の間に幾分異なる判定結果がみられた。ポリアクリルアミドゲルでTf型を判定する場合、

A D₁ A A D₁ A A A A D₁ A A A
D₁ D₂ D₁ D₁ D₂ D₁ D₂ D₁ D₂ D₂ D₂ D₂ D₁

でん粉ゲル電気泳動像

D₁ A D₁ D₂ D₁ D₂ A A A A D₁ D₁ D₂
D₂ A D₂ E D₂ D₂ D₁ A D₁ D₂ D₂ E

ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動像

図1. 牛トランスフェリン型泳動像の比較

判定技術と関連して主観的なものと思われる個人差を考慮しておく必要があると考えられる。その点とはともかくとして、著者らの判定結果では、表1に示すとおりポリアクリルアミドゲルでAD₂を2例AD₁と、D₁D₂を5例D₁D₁と、D₂D₂を1例D₁D₁と、D₂D₂を1例D₁D₂と、その逆にD₁D₂を1例D₂D₂と誤って判定しているのがわかった。その10例、すなわち10%判定の誤りが表1のような100頭のTf型の分布の違いを引き起している。

表1 ポリアクリルアミドゲルとでん粉ゲル電気泳動による牛Tf型の判定

泳動法	AD ₁	AD ₂	D ₁ D ₂	D ₁ D ₁	D ₂ D ₂	D ₂ E
ポリアクリルアミドゲル電気泳動法	34	26	20	8	6	6
でん粉ゲル電気泳動法	32	28	25	2	7	6

注) 上記は同一の100頭(AA型を除く)の血清を泳動比較したものである。

以上のここで得られた成績は、水平式ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動法でTf型を判定する際に、十分注意しなければならない問題点を提供していると思われる。とくに牛の親子鑑別

を，ポリアクリルアミドグラジエントゲル泳動法を用いて，Pa型，Ptf型，Tf型の同時判定によって行う場合，細心の注意が必要と思われる。泳動結果は時として安定せず，また判定技術の巧拙も考えられ，その他泳動条件の改善などももっと検討する必要があるだろう。しかしポリアクリルアミドゲルで3つの蛋白質型を同時にうまく判定しようとした場合，Tf型のD₁とD₂のバンドの良好な分離を安定して得ることは，かなり困難を伴うものとする。そのようなことから，この報告で示したような10%ぐらいの判定の誤りの生ずる危険があるものと懸念される。そこで現時点で牛Tf型のもっとも確実な判定方法として，ここで述べたでん粉ゲル泳動法が用いられることが望ましいと推察された。

文 献

阿部恒夫・小松正憲，1977，私信．

阿部恒夫・小松正憲，1978 免疫実験操作法Ⅶ，2013-2020．

Ashton, G. C., 1958 Nature, **182**:370.

Gahne, B., R.K. Juneja and J. Grolmus, 1977 Anim. Blood Grps
Biochem. Genet., **8**:127-137.

印牧美佐生・山田道男・阿部恒夫・景山 晟，1973 ABRI, **2**:12-13.