アガロース等電点電気泳動法による牛および 山羊 C 3 の遺伝的多型の検出

大西 彰・天野 卓*・阿部恒夫

農林水産省畜産試験場

*東京農業大学

近年、補体系蛋白における遺伝的多型が認められ、ヒトおよび実験動物についての報告がなされている。補体系蛋白の遺伝的多型の検出には多くの場合、両性担体 (carrier ampholyte) を用いてゲル中に pH 勾配を作成し、等電点分画を行なう等電点電気泳動法が用いられている。また、泳動後の補体蛋白バンドの同定法としては、特定補体成分に対する抗血清をゲルに反応させ、その沈降帯を観察する immunofixation 法と、溶血素で感作した血球に特定補体欠損血清を加えたものをゲルに反応させ、その溶血帯を観察する法の 2 つの方法が用いられている。

本実験では、アガロースを支持体とした等電点電気泳動法 (IEF) で分離したゲルに、自家作製した抗ウシ C 3 を反応させる immunofixation 法を行ない、ウシおよびヤギ補体第 3 成分 (C3) の遺伝的多型の検出を試みた。

材料および方法

供試動物は、ウシについては農林水産省畜産試験場のホルスタイン種 47 頭、黒毛和種 33 頭、褐毛和種 17 頭である。ヤギについては同場の日本ザーネン種 35 頭、日本在来種 (シバヤギ) 73 頭である。

血液試料は、EDTA-生理食塩水を加えて採血後、0℃の低温状態で血漿を分離し、-80℃にて凍結保存をした新鮮血漿を用いた。

抗ウシ C 3 の作製は、田村と中山 (1977) の方法により行ない、得られた抗体の特異性と交差反応性の検討は、免疫電気泳動法と Ouchterlony 法により行なった。

等電点電気泳動法は、Rosen ら (1979) の開発したアガロース等電点電気泳動法を基に、それに immunofixation 法を併用した坂井 (1980) の方法によった。

結果および考察

家兎免疫により作製した抗ウシ C 3 に $\frac{1}{20}$ 量のウシ血清を加え、非特異的抗体を吸着し除去した後、市販の抗ウシ C 3 との比較を Ouchterlony 法と免疫電気泳動法により行なった。その結果、作製した抗体はウシ C 3 に対して特異的であることがわかった。また、この抗体と各動物血清との交差反応性は、ヤギ、ヒツジとの反応が強く見られ、次いでウマ、イヌ、モルモットとの反応がわずかに見られた。この結果、作製した抗ウシ C 3 は、ヤギおよびヒツジの各 C 3 の検出に利用できることがわかった。

次に、作製した抗ウシC3を用いて、等電点電気泳動後のゲル板上に immunofixation を行ない、ウシC3の検出を行なったところ、図1に示すように、PI 7.0~7.3の位置に2本の色調の濃いバンドと1本の色調の薄いバンドとして検出されたが、多型は認められなかった。

同様に、ヤギC3の検出を抗ウシC3を用いて行なったところ、その immunofixation 像は不鮮明で判定が困難であった。そこで、通常の型の判定としては immunofixation を行わず、クマシーブリリアントブルーによる普通染色を行な

い、immunofixation 像との比較の結果、同位置により鮮明に見られた普通染色像をもって行なった。その結果、図1に示すように、PI 6.0~6.7の位置に色調が薄く易動度の早い3~4本のマイナーバンドと、色調が濃く易動度の遅い1~2本のメジャーバンドが検出された。また、メジャーバンドには3種類の表現型が見られ、それらをF型、FS型、S型とした。

さらに、これらのヤギC3多型の出現頻度について、ハーディ・ワインベルグの法則との適合度を調べたところ、表1に示すように、観察値と期待値とが良く一致したため、ヤギC3は常染色体性で共優性関係にある2つの対立遺伝子 $C3^F$ と $C3^S$ により、遺伝的に支配されていることが推察された。さらに、親子関係のデータとされている11例について検討した結果、1例を除き上記の遺伝様式が当てはまることがわかった。遺伝様式の当てはまらなかった1例については、親子関係そのものに疑いがあると思われる。これらの結果から、日本ザネン種C3の遺伝子頻度は $C3^F = 0.414$, $C3^S = 0.586$ であり、日本在来種C3については $C3^F = 0.274$, $C3^S = 0.726$ であると推定された。

今回得られたヤギC3多型を遺伝標識として利用するには、次の点に留意しなければならない。

まず、補体系は容易に活性化してしまうため、試料の取り扱いには十分に注意する。採血には、ヘパリンは補体系の活性を促すため使用せず、EDTAを用いるのが良い。また、試料の保存期間も-80℃で6ヶ月以内という報告がある。本実験でもC3の活性化による泳動像の変化の有無を調べるため、酵母菌の表皮である zymosan がC3の活性化を促す作用を利用して、zymosan を試料に加えて泳動したところ、今回とは異なった泳動像が得られた。

次に、今回得られたヤギC3の泳動像には、しばしば判定が困難なものがあり、特にFS型とS型の判定をまちがえる可能性がある。この理由として、泳動技術の巧拙も考えられるが、坂井(1980)

Fig. 1. C3 patterns of goat and cattle by agarose gel-IEF

Table 1. C3 phenotypes and gene frequency of Saanen and Japanese Native goat

Breed	No. of animals	Phenotype			gene frequency	
		FF	FS	SS	C3 ^F	C3 ^S
Saanen	35 ^a	7 (5.99)	15 (16.98)	13 (12.02)	0.414	0.586
Native	73 ^b	4 (5.98)	32 (29.04)	37 (38.98)	0.274	0.726

^a $\chi^2 = 0.391$ df = 1 0.7 > p > 0.5

^b $\chi^2 = 0.759$ df = 1 0.5 > p > 0.3

(): expected number

によると、泳動像の良し悪しは泳動中の冷却の正確度に依存するとして、温度精度 0.1℃の冷却装置を用いている。

また、ヤギC3の immunofixation 像が不鮮明であったため、マイナーバンドもC3としたが、これには疑問が残る。immunofixation 像が不鮮明な理由としては、抗原および抗体濃度の最適比が得られなかったことと、用いた抗血清が抗ウシC3であったため、ヤギC3に対しては強い特異的な反応を示さなかったことの2点が考えられる。これらは抗ヤギC3を作製し、それを使用することにより解決するものと思われる。

文 献

- Alper, C. A. and R. P. Propp, 1968 J. Clin. Invest., **47** : 2181-2191.
 Natsuume-Sakai, S., J. Hayakawa. and M. Takahashi, 1978 J. Immunol., **121** : 491-498.
 Rosen, A. EK. and P. Aman, 1979 J. Immunol. Method., **28** : 1.
 坂井俊之助, 1980 免疫実験操作法, 抗原Nの8: 2723-2734.
 田村 昇・中山秀英, 1977 免疫実験操作法, 補体Nの3: 1949-1952.

Detection of Genetic Polymorphism of C3 in Cattle and Goat by Agarose Isoelectric Focusing (IEF)

Akira Onishi, Takashi Amano*, Tsuneo Abe
National Institute of Animal Industry, Tsukuba
Norindanchi P. O. Box 5, Ibaraki 305

* Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156

Genetic polymorphism of C3 in cattle and goat was demonstrated by a combined use of agarose gel isoelectric focusing (IEF) and immunofixation. The anti-cattle C3 used here was produced in rabbits by the method of Tamura and Nakamura (1977). The specificity of anti-C3 was ascertained by immunoelectrophoresis and by Ouchterlony test with commercial anti-Cattle C3. The cross reactions among cattle, goat, and sheep-C3 were observed by Ouchterlony test. IEF was carried out by the method of Sakai (1980). C3 bands were visualized by overlaying anti-C3 on the gel at 37 °C for 60 min. Cattle sera (47 Horstein-Friesian, 33 Japanese Black, and 17 Japanese Brown) showed three C3 bands at PI 7.0-7.3, but no polymorphism of cattle C3 was observed. Goat sera (35 Saanen and 73 Japanese Native) showed 3 phenotypes of distinct C3 bands (F, FS, and S types) at PI 6.3-6.7 with

some vague bands at PI 6.0-6.3. Distribution of the observed C3 phenotypes in goat agreed with Hardy-Weinberg equilibrium. Therefore, it is presumed C3 phenotypes in goat are genetically controlled by a pair of alleles, C3^F and C3^S, at a single co-dominant locus. Family data also fits this presumption.