ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるブタADA型の検出

坂上正行¹・市原裕子²・坂野庸子¹・田中一栄¹¹東京農業大学家畜種学研究室、東京都 156²現 石垣食品株式会社研究室、東京都 102

Detection of porcine ADA types by polyacrylamide gel electrophoresis

Masayuki Sakagami¹, Yuko Ichihara²,
Yoko Banno¹ and Kazue Tanaka¹¹Laboratory of Animal Breeding, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156.²Present; Ishigaki foods co., LTD laboratory, Tokyo 102.

ADA (Adenosine deaminase) はアデノシンをイノシンへと脱アミノ触媒作用を示す酵素で、アミノ酸還元酵素と呼ばれており、主に赤血球中に存在する。

大石ら (1979) は、澱粉ゲルおよびセルロゲルを支持体とした電気泳動法を用いて、ADA型の検出について検討しているが、澱粉ゲルでは泳動帯が不鮮明で判定ができないとし、セルロゲルによって良好な結果を得たとしている。また、A、B、AB、およびO型の4種類の表現型を確認し、その遺伝様式はヒトのABO式血液型と同様であり、共優性の関係にあるADA^A、ADA^B遺伝子およびこれらに対して劣性であるADA^O遺伝子の3つの対立遺伝子によることを示している。

しかし、セルロゲルは極めて高価であることから、多数の個体についての調査を必要とする研究分野では、安

価な支持体による検出方法の確率が望まれていた。幸い、ブタのADA型においては、Widarら (1974) がポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって遺伝的変異型を検出している。

そこで本研究では、Widarらの方法について再検討するとともに、ブタのADA型の表現型頻度および遺伝子頻度について調査したので報告する。

材料および方法

血液サンプルは、東京芝浦臓器(株)よりLWD42個体から採取したものについて提供を受け、遠心分離によって血球を分離し、-20℃に凍結保存したものを実験に供試した。

実験方法は、Table 1 に示す buffer system を用い

Table 1. The compositions of the various buffer systems examined in this study

Buffer system		Bridge buffer	Gel buffer
I	Tris aminomethane	0.223M	Tris aminomethane 0.008M
	citric acid	0.086M	
		pH6.3	pH6.7
II	Sodium dihydrogenphosphate dihydrate	0.1M	1:10 dilution of
	Disodium hydrogenphosphate 12 water	0.1M	
		pH6.5	bridge buffer } pH6.5
III	Tris aminomethane	0.008M	Tris aminomethane 0.223M
	citric acid	0.003M	
		pH6.3	pH6.7

Table 2. Comparisons between established and observed frequencies for each of the four porcine red cell ADA phenotypes

ADA phenotype	No. of animal	Observed phenotype frequency	Expected number calculated from established frequencies
A	30	30.55	0.7143
B	2	2.71	0.0476
AB	8	7.12	0.1905
O	2	1.62	0.0476
Total	42	42	1

て、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。この際、ゲル濃度 5 % の均一ゲルを支持体とし、通電条件は 400 V の定電圧とした。また、染色方法は定法に従い Adenosine, Nucleoside phosphorylase, Xanthine oxidase, MTT, PMS を用いて行った。

さらに、遺伝子頻度の推定は、Bernstein に従い算出した。すなわち、 ADA^A 、 ADA^B 、 ADA^O の遺伝子頻度をそれぞれ p 、 q 、 r とすると

$$p = 1 - \sqrt{PfB + PfO}$$

$$q = 1 - \sqrt{PfA + PfO}$$

$$r = \sqrt{PfO}$$

Pf =表現型頻度

で求めた。

しかし、遺伝子頻度の合計が 1 にならなかったため、

$$p' = p(1 + \frac{D}{2})$$

$$q' = q(1 + \frac{D}{2})$$

$$r' = (r + \frac{D}{2})(1 + \frac{D}{2})$$

ただし $D = 1 - (p + q + r)$

の補正を、 $D=0$ になるまで繰り返した。

結果および考察

1) ADA の遺伝的変異の検出

ポリアクリルアミドゲルを用いての、ブタの ADA 型の検出は Widar (1974) による報告がある。始めに我々は、この widar らが使用したものと同一 buffer system (Table 1, system I) で検出を試みたが、Fig.1 に示したように、ADA は Tailing を起こしたヘモグロビンに接近した位置に検出され、A 型と B 型の移動度に差

が認められなかった。また、widar らが使用した buffer system は、Show らが 1968 年にマウスの MDH を、1969 年にマウスの PGM を澱粉ゲル電気泳動法により検出した時の system を応用したものであることから、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による検出には不適当であると思われる。次いで、Spencer ら (1968) がヒトの ADA 型を澱粉ゲル電気泳動法で検出した system (Table 1, system II) を用いて検出を試みたところ、Fig. 1 と全く同様の結果となり、A、B、AB 型の分離は認められなかった。結局我々は、Table 1 に示した system III により、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で A、B、AB、O 型を分離・分類できることを確認した (Fig.2)。この system III は、system I の Electrode buffer と Gel buffer の組成を逆にしたものであり、Widar らの報告では、Show らの system を用いたとしているが、実際には system III と同じ条件で検出したものと考えられた。

2) ブタにおける ADA 型の表現型頻度および遺伝子頻度

今回調査した、LWD42 個体における ADA 型の表現型頻度を Table 2 に、また、遺伝子頻度を Table 3 に示した。表現型頻度は、A 型が 0.7143 と極めて高く、次いで AB 型が 0.1905 であり、B 型、O 型はそれぞれ 0.0476 と低い値となった。遺伝子頻度は、 ADA^A 遺伝子が 0.6789 で高く、 ADA^B は 0.1248、 ADA^O は 0.1963 と低い値であった。

また、今回調査された 42 個体がハーディー・ワインベ

Table 3. Gene frequencies of porcine red cell ADA

Allele	Gene frequency
ADA^A	0.6789
ADA^B	0.1248
ADA^O	0.1963
Total	1

Fig.1 Electrophoretic patterns of porcine red cell ADA using buffer system I or II.

Fig.2 Electrophoretic patterns of porcine red cell ADA using buffer system III.

ルグの法則が適応できる集団からの標本として、期待値に合致することを確認するために χ^2 検定を行った。この結果、Table 2 に示した観察値と期待値を用いた χ^2 の値は、 $\chi^2 = 0.3982$ であり、 $0.5 < p < 0.7$ となったため、観察値と期待値との差は有意ではなくハーディー・ワインベルグの法則の成り立つ集団からの標本であると見なされた。

以上 1)、2) の結果から、ADA の遺伝的変異型の検出は、system III の bufer system を用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動法により安価に検出することが可能であり、家畜の親子鑑定や系統分類において、ADA 型は有効な指標になると思われる。また、調査した 42 個体中 O 型、いわゆる欠損型が 2 例認められたが、ヒトにおける ADA の O 型は ADA 欠損症と呼ばれ、DNA 治療の対象に上げられている遺伝病であることから、O 型のブタがその疾患モデルとなり得る可能性がある。従っ

て、今後ブタにおける ADA の酵素活性について調査を行うことが重要であると考ええる。

要 約

ブタ赤血球 ADA 型の遺伝的変異の検出について、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の buffer system を検討したところ、system III により、4 つの表現型すなわち、A、B、AB および O 型が検出された。調査された LWD 豚の ADA 型における遺伝子頻度は、

$ADA^A = 0.6789$, $ADA^B = 0.1248$, $ADA^O = 0.1963$ であると推定された。

文 献

- Bernstein, F., 1930 Z. induct. ABSTAMM. u. Vererbungs Lehre, 56: 233-273.
大石孝雄・阿部恒夫, 1979 畜試研報, 35: 9-18.

- Show, T. B. & F. H. Ruddle, 1968 *Science*, 160: 1356-1357.
- Show, T. B. & F. H. Ruddle & T. H. Roderick, 1969 *Biochem. Genet.*, 3: 25-35.
- Spencer, N., D. A. Hopkinson & H. Harris, 1968 *Ann. Hum. Genet.*, 32: 9-14.
- Wider, J., M. Ansay & R. Hanset, 1974 *Anim. Blood Grps. biochim. Genet.*, 5: 115-124.

SUMMARY

In this study, we examined various buffer system to determine which was best suited for

detecting genetic variations of porcine red cell ADA on polyacrylamide gels. The results porcine ADA variations of the A, B, AB and O types were detected most accurately using buffer system III (Bridge buffer: 0.008M Tris aminomethane, 0.003M citric acid; Gel buffer: 0.223M Tris aminomethane, 0.086M citric acid). Using this system, the gene frequencies of ADA variants in 42 LWD pigs were found to be distributed in the following manner: $ADA^A=0.6789$, $ADA^B=0.1248$ and $ADA^O=0.1963$.