〔原 著〕

各種動物の長期保存および事故死体臓器からの ミトコンドリア DNA の精製

横濱道成・山崎泰助・亀山祐一・石島芳郎

SUMMARY

Physical effects of sampling conditions and preservation time on the nature of mitochondrial DNA (mtDNA) were studied by analyzing electrophoretic patterns and measuring volume and purity of mtDNA which was fractionated and extracted from organs preserved for a maximum 1.4 years in eight animal species. The analysis showed that the volume and purity of the prepared samples did not differ significantly between long-term preserved and fresh organs. Also, no physical effect of the long-term freezing preservation on the cleavage patterns was detected in the results using eight restriction endonucleases. Non-degenerate mtDNA was extracted from the livers of Japanese Sika deer which died in accidents, and the organs preserved at less than -80°C for one year. Almost no physical effect on volume or purity of the prepared mtDNA was observed. When mitochondria was fractionated from organs of animals without bleeding and with fatty livers, the non-degenerate mtDNA was obtained more by repeated washings with the homo buffer and careful cutting with scissors. From the above results, even if organs are obtained under inferior sampling conditions, as in the case of wild animals which died by traffic accidents, mtDNA obtained by fractionation can be used to study cytoplasmic inheritance. It is suggested that accident carcasses of wild animals, which are also important as gene resources can be efficiently used for academic researches.

Key words: mitochondrial DNA, preserved organs, accident carcass, Japanese Sika deer.

緒 言

ミトコンドリア DNA (mtDNA) は核 DNA とは独立した遺伝系にあり、母性遺伝に従う約 16, 500 塩基対の環状分子である。mtDNA は組織から比較的容易にかつ多量に分離でき、進化速度 (塩基置換) が核 DNA の 5~10 倍の速さであることなどから、系統進化や先天性異常疾病との関連性に関する情報を得るため系統進化学、家畜育種学、分子遺伝学および医学の分野において多くの動物種を対象にその制限酵素断片長多型 (RFLP)

の分析が行われてきた¹⁻⁷⁾。

野生動物を対象とした mtDNA についての研究では、生体からの材料採取が困難で、大半は事故死体やある程度保存しておいた古い材料を利用せざるをえない場合がある。また家畜の先天性異常を研究する場合には、死体や屠体からの臓器を材料にする場合も多いと考える。しかし、いままでの mtDNA に関する報告は、材料の入手が比較的容易な動物で、しかも RFLP 分析への物理的切断や mtDNA 変性などの影響を避けるため、新鮮材料から抽出した DNA について検討されたものであ

Preparation of mitochondrial DNA from long-term preserved and accident carcass organs in animals. Michinari Yokohama, Taisuke Yamazaki, Yuichi Kameyama, Yoshirou Ishijima; 東京農業大学生物産業学部動物資源学研究室

Correspondence address: Michinari Yokohama, Laboratory of Animal Resources, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, 196, Aza-Yasaka, Abashiri 099-24, Japan.

(受付 1993年5月17日, 受理 1993年9月8日)

る。短期間 (21 日) の冷凍保存についてはブタ肝臓で検討されているものの⁸⁾, 長期間冷凍保存した臓器, 放血が不完全な屠体臓器から抽出した mtDNA の分析についてはあまり検討されていない。

そこで, 本研究では試料採取の条件が劣悪な場合でも RFLP 分析が可能な mtDNA の抽出が可能であるか調べるため, 偶発的に生じた動物の事故死体や生産目的に屠殺した死体などを用い, 採取した臓器の保存期間や採取材料の状態による mtDNA 抽出量の差異および放血が不完全な屠体臓器からの mtDNA 精製について検討した。

材料および方法

1. 供試動物

肝臓を採取した動物種は, ブタ 1 頭 (品種不明), 北極キツネ *Alopex lagopus* 2 頭 (青キツネと白キツネ), 赤キツネ *Vulpes fulva* 4 頭 (ギンギツネ), ミンク *Mustela vison* 16 頭 (白色系 13 例, 淡褐色系 3 例), ウサギ 7 頭 (雑種), ラット 4 頭 (SD 系), ニホンジカ *Cervus nippon* 4 頭 (エゾシカ, *Cervus n. yezoensis* 3 例, ヤクシカ, *Cervus n. yakushimae* 1 例) および重挽馬 7 頭であった。

2. 採取材料および保存法

ブタ (屠場屠体) とウサギは完全に放血後に肝臓を摘

出した。ミンクとラットは放血群と未放血群 (頸椎脱臼による屠殺後室温に 1 時間放置) を設け肝臓を摘出した。キツネは飼育農家にてパコマ液を心臓に注入し屠殺後, 剥皮処理したものから肝臓を摘出した。シカは事故死 (交通事故や窒息死) 後数十時間が経過した屠体から肝臓を摘出した。ウマの精巣は去勢摘出した後 -20°C でいったん冷凍したもの入手した。採材した肝臓および精巣はホモバッファーで洗浄後, ビニール袋に入れ密閉し -80°C にて最長 1 年 4 カ月間保存した。

3. mtDNA の精製および検出法

mtDNA の精製とサブマリン泳動法による DNA 分析は Powell および Zuniga²⁾, ならびに三上ら⁴⁾の方法に準じて行った。

4. 制限酵素処理

使用した制限酵素は, *Apa*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Sca*I および *Stu*I の 7 種類であった。

5. mtDNA 量の測定

mtDNA の抽出量および純度は, 自記分光光度計 (BECKMAN DU-65) を用い, 230~330 nm の連続波長で測定し, 280 nm/260 nm の吸光度比で求めた。

結果および考察

Fig. 1 には, 長期保存した各種動物の肝臓および精巣から分画したミトコンドリア DNA (mtDNA) の吸光

Fig. 1. UV absorbance of mtDNA obtained from preserved organs (liver and testis) less than -80°C .

度曲線パターンを示した。実線で示したのは、ブタ肝臓を摘出した直後に mtDNA を抽出した試料で理想的な吸収極大 (260 nm) を示していた。このブタ肝臓を -80°C で 1 年間保存した後に精製した場合の mtDNA の吸収極大は 270 nm 付近で、その回収量は $47\text{ }\mu\text{g}/10\text{ g}$ と少なく、純度が 1.5 で蛋白質含量が多い試料であったが、RFLP 分析は可能であった。

ウサギでは、 -80°C で 1 年間保存した試料から精製した mtDNA 量は $240\text{ }\mu\text{g}/10\text{ g}$ で、その純度が 1.5 と低く蛋白質含量の多い試料であったが、DNA の泳動パターンおよび制限酵素切断パターンは臓器摘出後 2 日間冷凍保存したものと差異はなかった。またウサギの材料はシカとミンクの場合と同様に 230 nm の吸光度値が高い値を示した。これは保存日数が多くなるにつれて増える傾向にあった。

ラット肝臓では、1 年間の保存 (-80°C) でも 260 nm 付近に吸収極大が得られ、純度は 1.9 でやや RNA 成分含量が高かったが、回収量は $332\text{ }\mu\text{g}/8\text{ g}$ で多かった。またラットでは事故動物屠体からの試料採取を想定し、未放血試験群を作り、死後 1 時間後に肝臓を採取したものと、放血後直ちに採取したものとの間には、DNA 回収量および純度にほとんど差異は認められなかった。これは後述するミンク肝臓を用いた試験でも同じであった。未放血材料を用いる場合は、臓器の破碎と洗浄操作を血液成分 (ヘモグロビン色素) などが確認できなくなるまで十分繰り返すことが重要であった。

キツネ肝臓はいずれも 4 カ月以上冷凍保存した。Fig. 1 に示した試料の回収量は $238\text{ }\mu\text{g}/10\text{ g}$ であったが、分析に必要な mtDNA 量はいずれの保存試料からも得られた。キツネの場合は、パコマ液を心臓注入し死亡させ、毛皮用のために剥皮後採取しているので、放血が不十分な屠体を用いた。採取は屋外で実施したため、野生動物などの事故死体から採取する状況に近似していた。

ミンクは毛皮用家畜として飼育されているため、臓器を採取できる時期は高エネルギー飼料が給与されている 11~12 月の剥皮期であった。この時期に採取した肝臓はいずれも多くの脂肪沈着が認められ、通常の抽出操作で回収した mtDNA 量は Fig. 1 の例では $250\text{ }\mu\text{g}/10\text{ g}$ 、純度が 1.89 で RNA の多い試料であった。また 7 例 (1 カ月 -80°C で保存) のミンク肝臓から分離した mtDNA の純度は 1.81~1.97 でいずれも RNA の多い試料で、その泳動像 (cccDNA および ocDNA パターン) は不鮮明であった。なお、ミンクの肝臓は脂肪が多かったので脂肪などの不純物の除去操作を 2 回繰り返した

結果、泳動パターンは鮮明になったがその回収量が約 7 割減少した。

ウマの去勢手術によって得た精巣は肝臓の場合とは異なり、実質組織が少ないためホモナジズ操作がやや困難であった。精巣は肝臓に比べ mtDNA の回収量が少ないと報告されているが⁹⁾、ハサミによる組織破碎を丁寧に実施することにより 3 カ月間保存した精巣からでも $675\text{ }\mu\text{g}/10\text{ g}$ の DNA 量を回収することができたので、ウマの mtDNA 分析には肥育目的に去勢した精巣でも有効に利用できることがわかった。

また、シカ肝臓からの mtDNA 抽出には、事故死後少なくとも数十時間経過後に摘出した材料をさらに 1 年間冷凍保存して用いた。その吸光度極大は 260~270 nm に得られたが (Fig. 1), mtDNA 量は $119\text{ }\mu\text{g}/10\text{ g}$ で、その純度が 1.7 であった。シカの場合は、いずれも事故死体を用いて DNA を精製したもので、8 日、12 日および 4 カ月間保存した後で抽出したが、その純度はいずれも 1.7 付近であった。

Fig. 1 に示した試料は、保存日数や動物種も異なるがその平均 mtDNA 回収量は $318\pm 153\text{ }\mu\text{g}/10\text{ g}$ で、純度は 1.68~1.93 であった。吸収極大は大部分 260 nm 付近に集中しており動物種の差はほとんど認められなかった。回収 mtDNA 量の標準誤差が大きかった点はおもに実験者による技術上の差異によるものと考えられた。

シカなどのような野生動物の場合は、研究遂行のため一時的に捕獲し採材することは一般的に不可能である。また北海道におけるエゾシカなどの野生動物は車などによる事故死例が多いが、これらの大半は学術的材料として活用されことなくそのまま廃棄されている。今回の調査では、事故死体からの材料をさらに長期間保存した場合でも十分 mtDNA 分析が可能であることを示した。

Fig. 2 は、各種動物臓器から回収した mtDNA の泳動像である。ここに示した 5 種の動物では、いずれも開環状の ocDNA (open circular DNA) と閉環状の cccDNA (covalently closed circular DNA) 域を示す明瞭な 2 本の DNA バンドが得られた。動物種間で DNA 分子量が若干異なり、また cccDNA と ocDNA バンドの濃度間にも差異があった。No. 4 個体は ocDNA が No. 1 と No. 3 は cccDNA バンドが濃く検出され、No. 2 個体では両 DNA バンドがほぼ同じ濃度を示していた。なお、ミンクおよびウマの場合は不純物の混入が多かったため、Fig. 2 に示したような明瞭な 2 本バンドのパターンは得られなかった。

これらの mtDNA 試料を 7 種類の制限酵素で切断し、

Fig. 2. Agarose gel electrophoretic patterns of mtDNA prepared from preserved livers.

Remarks: 1 (pig), 2 (Yezo Sika deer), 3 (rabbit), 4 (rat), 5 (Arctic fox) and marker (λ DNA-*Hind* III)

Fig. 3. *Hind* III cleavage patterns of mt-DNA prepared from preserved livers stored for various lengths of time.

Remarks: 1 (0 day), 2 (3 months), 3 (6 months), 4 (12 months) and marker (λ DNA-*Hind* III)

その泳動パターンから保存期間や採材条件の影響による物理的切断があるか否か調べた。Fig. 3 はブタ肝臓から回収した mtDNA を *Hind* III で切断したパターンで、新鮮材料および 1 年間保存した材料との間には差異がなく、長期間保存による影響は認められなかった。これと同じ成績が今回供試した全材料を 7 種類の酵素で処理した RFLP パターンでも得られた。また ocDNA および cccDNA パターンが不鮮明であったミンクおよびウマの mtDNA 試料でも、酵素処理することによって薄いバンドではあったが鮮明な切断片パターンが観察できた。

以上のように、通常では研究材料として利用されることのない動物屠体などを用いその臓器を摘出し mtDNA

を分離精製した結果、RFLP 分析に十分な純度の mtDNA が精製できた。これは、野生動物などの事故死体臓器を細胞遺伝学的研究の材料として十分活用し得ることを示唆した成績であった。今後は、貴重な野生動物の事故死体材料の保存が組織的に実施され、各研究分野への協力が容易になるような体制が確立されることを望む。

本研究実施に当たり、mtDNA の精製および RFLP の検出について指導を賜りました、農林水産省畜産試験場の小松正憲および大西彰技官に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 宝来 聰. ミトコンドリア DNA から見た日本人. 遺伝 1981; 40: 202-9.
- 2) Powell JR, Zúñiga MC. A simplified procedure for studying mtDNA polymorphism. Biochem Genet 1983; 21: 1051-5.
- 3) Buzzo K, Fouts DL, Wolstenholme DR. *Eco*-RI cleavage site variants of mitochondrial DNA molecules from rats. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75: 909-13.
- 4) 三上仁志, 大西 彰, 小松正憲, 大谷敏明, 関哲夫, 五十嵐真哉. 中国豚のミトコンドリア DNA 制限酵素切断型. 日豚会誌 1988; 25: 181-5.
- 5) Bell BR, McDaniel BT, Robison OW. Effects of cytoplasmic inheritance on production traits of dairy cattle. J Dairy Sci 1988; 68: 2038-51.
- 6) Bibb MJ, Van Etten RA, Wright CT, Walberg MW, Clayton PA. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. Cell 1981; 26: 167-80.
- 7) 林 純一. ミトコンドリア遺伝子疾患の体細胞遺伝学. 細胞工学 1992; 11: 31-9.
- 8) 坂上正行, 田中一栄, 鈴木伸一, 坂井浩子, 向山明孝. ブタ保存臓器からのミトコンドリア DNA の精製とその RFLP 分析. 日畜会報 1991; 62: 125-34.

要 旨

8 種類の動物種から採材し、最長 1 年 4 カ月間保存した臓器からの mtDNA 抽出量と抽出された DNA の純度の検定および泳動パターンの分析を実施し、保存期間や採材条件が mtDNA の性状に及ぼす物理的影響を調べた。その結果、長期間保存した動物臓器と新鮮材料間の mtDNA 回収量および純度には有意な差異は認められなかった。また制限酵素によって切断した DNA 断片の泳動パターンにも長期間の冷凍保存による物理的影響は認められなかった。

交通事故などによって死亡したニホンジカの肝臓からも変性のない mtDNA が回収でき、その臓器を長期保存した場合でも、mtDNA の回収量や純度に大きな影響は認められなかった。

ミトコンドリア分画に当たって未放血や脂肪の多い材料を用いるときは、不純物（蛋白質や脂肪）を除去するためフェノールやクロロホルムの処理操作を繰り返すよりも、ハサミによる破碎操作とホモバッファーによる洗浄を丁寧に繰り返すことによって DNA 分析

に使える mtDNA 量がより多く回収できた。

野生動物などの事故死体および屠体は採取材料の条件として劣悪であるが、その材料は mtDNA を用いた細胞遺伝学的研究にも活用できることが示された。また事故死体から摘出した臓器を長期間冷凍保存した場合でも、RFLP 分析が可能な mtDNA 量を十分に回収できたことから、遺伝子資源としても貴重な野生動物の事故死屠体が細胞遺伝学的研究へ有効に活用できることが示唆できた。