

13. ブタおよびイノシシのミトコンドリア DNA 型解析のための LA-PCR 法の確立

〔要約〕 ブタおよびイノシシのミトコンドリア DNA (mtDNA) 15.2kb を PCR 増幅する LA-PCR 法を初めて確立し, mtDNA の RFLP 解析を極めて容易に行えるようにした。フィリピン在来豚およびイノシシのゲノム DNA を材料に, 本方法の有効性を確認した。

国際農林水産業研究センター 畜産草地部
畜産試験場 育種部 形質発現研究室, フィリピン大学農学部

連絡先 0298 (38) 6038

部会名	国際農業・畜産	専門	バイテク	対象	豚	分類	研究
-----	---------	----	------	----	---	----	----

〔背景・ねらい〕

動物ゲノムには, 核ゲノムと細胞質ゲノムに大別できるが, 動物品等の遺伝子特性を大局的に把握するには, 膨大な遺伝子数 (約10万) 及び塩基数 (約30億) をもつ核ゲノムを解析するより, 塩基数が約16キロベースと小型でかつ突然変異率が核ゲノムより数倍高い細胞質ゲノムすなわちミトコンドリア DNA (mtDNA) を解析する方が適当である。従来, 豚や牛など家畜・家禽の mtDNA の解析は, 1) 新鮮な肝臓から mtDNA を分離精製し, RFLP 解析を行う方法, 2) 各家畜の mtDNA をクローニングした後, これを標識してプローブとし, ゲノム DNA を制限酵素処理してサザン解析を行う方法が採られてきた。しかし, これらの方法は, 極めて煩雑なステップを必要とするだけでなく, 解析に多くの mtDNA やゲノム DNA を必要とする欠点があった。そこで, 最近, 開発された LA-PCR (L: Long; 長い, A: accurate; 正確の略) をブタ及びイノシシの系に応用し, 微量のゲノム DNA を鋳型にした mtDNA の LA-PCR 増幅系を開発し, 簡便な mtDNA の RFLP 解析系を確立することをねらいとした。

〔成果の内容・特徴〕

- ① 微量のゲノム DNA (約500ng) を鋳型にした PCR 法により, ブタおよびイノシシのミトコンドリア DNA (mtDNA) 約15.2kb を増幅し, RFLP 解析を可能にする LA-PCR 法を初めて確立した。
- ② 本方法は, ホットスタートによる LA-PCR 法である。
- ③ 本 LA-PCR 法を用いて, フィリピン在来のブタであるイフガオブタ及びルソンイボイノシシおよびパラワンヒゲイノシシのミトコンドリア DNA を増幅して RFLP 解析を行い, これら動物 mtDNA 型を初めて明らかにするとともに, 本法の有効性を確認した。

〔成果の活用面・留意点〕

- ① この LA-PCR 法はあらゆるブタ品種及びイノシシ mtDNA の増幅に使用できる。
- ② 長鎖の mtDNA を増幅するため, ゲノム DNA の抽出の際, ゲノム DNA の物理的切断等の非特異的切断が起こらないよう注意が必要である。

〔具体的データ〕

Lower Mix を分注	1 サンプル 当 たり
10 × LA-PCR buffer	2 μl
dNTP mixture (2.5mM)	8 μl
Forward Primer (20pm/μl)	0.5μl
Reverse Primer (20pm/μl)	0.5μl
オートクレーブ済み蒸留水	9 μl
↓	
ミネラルオイル 1滴 添加	
↓	
94℃加温	
↓	
Upper Mix 添加	1 サンプル 当 たり
10 × LA-PCR buffer	3 μl
Takara Ex Taq (2.5U/ml)	0.5μl
ゲノムDNA (500ng)	26.5μl
オートクレーブ済み蒸留水	
↓	
PCR	
94℃ 1分 1 サイクル	
98℃ 20秒 30 サイクル	
68℃ 20分	
72℃ 10分 1 サイクル	
↓	
・ 0.8%アガロースゲル電気泳動で増幅の確認	
・ 制限酵素による RFLP 解析 (1%アガロースゲル電気泳動)	

図1 LA-PCRの操作手順

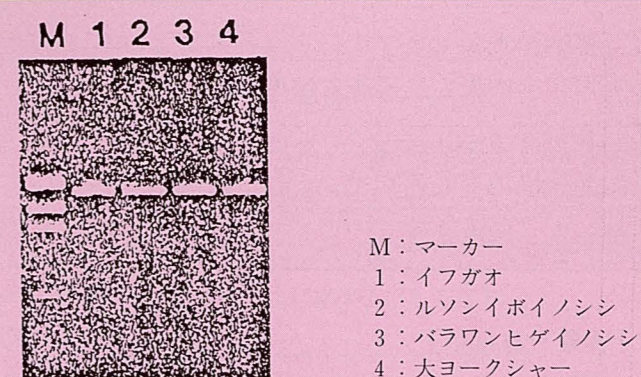


図2 LA-PCR法による mtDNA 約15.2kb の増幅

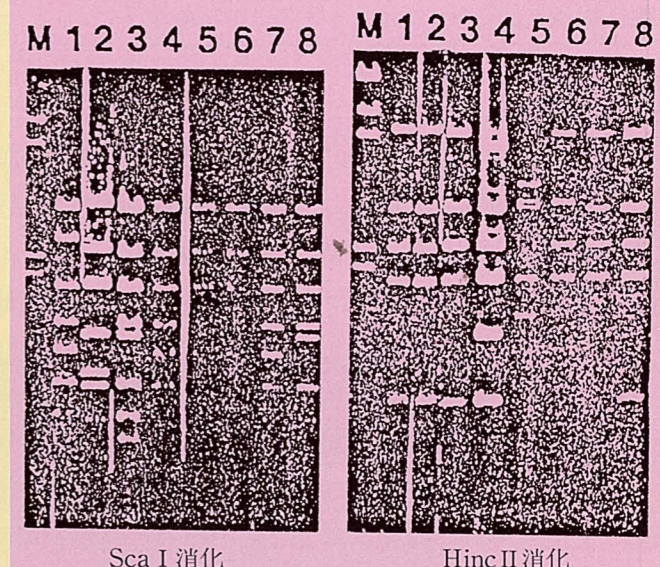


図3 フィリピン在来ブタ及びイノシシの mtDNA 型

M: マーカー
1: 大ヨークシャー
2: 梅山豚
3: ニホンイノシシ
4: リュウキュウイノシシ
5: ルソンイボイノシシ
6: パラワンヒゲイノシシ
7: イフガオブタ (IAS)
8: イフガオブタ (バナウェイ)

〔その他〕

研究課題名: フィリピン在来ブタの遺伝子特性の解明

予算区分: 経常

研究期間: 平成7年度 (平成7年)

研究担当者: 小松正憲・Job M. Matias (フィリピン大農学部)・武田久美子・大西 彰

発表論文等: LA-PCR-RFLP 法によるフィリピン在来ブタおよびイノシシのミトコンドリア DNA 型分析, 第91回日本畜産学会発表 (H8年3月).