

吉井千真 和田優希 村上賢（分子生物学）松井久実（動物生理学）

研究の背景と目的

動物生態調査や犯罪捜査などの動物種の特정에DNA鑑定が利用されている。魚類、鳥類、哺乳類などの動物種を判別するDNA領域(DNAバーコード領域)としてミトコンドリアDNAのCOI遺伝子領域が一般に利用されている。しかし、解析配列領域がやや大きく、サンプルの状態によっては適当な配列情報が得られないこともある。そこで、新たに、汎用性が高くより小さな領域であるCytochromB(CytB)領域を用いることにした。CytBを増幅することができる共通プライマー(図1: cons primer)は既に存在するが、その精度はあまり高くない。そこで、より精度の高いプライマーを設定し、その有効性を確認することを目的とした。

研究・調査方法

日本に生息すると思われる哺乳類72種類を候補に挙げ、BLASTでそのCytB配列を調べたところ50種類のデータを得た。これらのデータをもとに、コンセンサスプライマーを改変し、2種類のフォワードプライマーを新規に設定した(図1)。設定した2種類のプライマーを用いて、50種類のうち21種類の哺乳類動物のDNAについてPCR増幅を行い、電気泳動と塩基配列解析を行った。なお、リバースプライマーは共通の塩基配列のものを用いた。

```

Yoshii primer FR.seq 1-----TGAGGACAAATATCMTTGTGAGG-----
cons Cytb FR.seq      1 GTCCTACCA.....C.....
Wada primer FR.seq    1 GTCCTACCA.....C.....
Mustela nivalis.seq   1 GTTTACCA.....A..T.....AGCA
Mustela sibirica.seq  1 GTTTACCA.....A..T..G..TGCA
Mustela erminea.seq   1 GTTTACCA.....A..T.....CGCA
Mustela itatsi.seq    1 GTTTACCA.....A..T.....TGCA
Martes melampus.seq   1 GTTCGCA.....C..T.....TGCA

```

図1: Yoshii primer と Wada primer

G T A G A C A A A G C C A C C C T A A C A C G A T T C T T C G C A T T C C A C T T C A T T C T A C C A T T T
V D K A T L T R F F A F H F I L P F

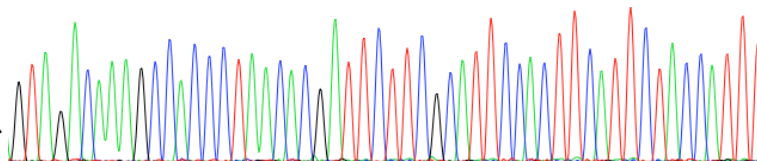
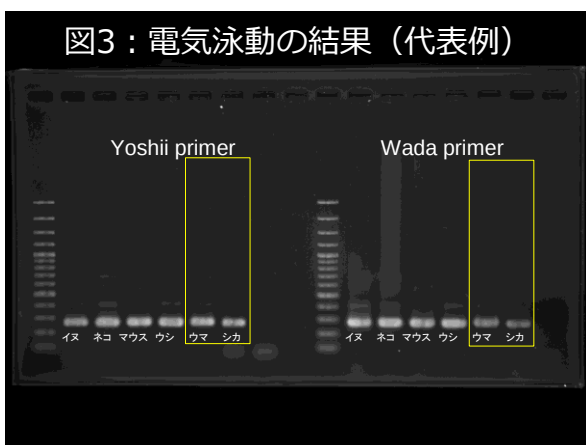


図2: バンドの塩基配列解析 (代表的なフェログラム)

結果と考察

図3: 電気泳動の結果 (代表例)



[結果]

Yoshii primer(Y) と Wada primer(W)のどちらでも、用いた21種類の動物DNAを増幅することができ、配列解析と相同性検索の結果、いずれも目的の動物種であることを確認した。YとWでの増幅産物の電気泳動像から、ウマとシカにおいて、YはWに比べて増幅効率が良いと考えられた。(図3)

[考察]

YとWの塩基配列を比較すると、重複している配列に関しては塩基配列に違いはない。しかし、非重複部分(図1黒破線)の3'末端の配列異なる。この違いが、今回の結果に大きく影響していると考えられる。

これから

今回の研究では、想定した72種類の哺乳類のうち21種類についてPCR増幅と配列の検証を実施した。今後は残りの51種類の動物種のDNAサンプルを入手し、増幅とその配列を調べることでYoshii primerの有効性を確認したい。