

< 資料 >

一本鎖高次構造多型法による牛ミトコンドリアDNAの解析

水木 剛・有安則夫

Bovine mitochondrial DNA analysis using Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism(PCR-SSCP)

Takeshi MIZUKI and Norio ARIYASU

要 約

核移植を伴うクローン胚は、多量のレシピエント卵子由来のミトコンドリアDNA(以下、mtDNA)に少量のドナー細胞由来のmtDNAが混在しており、このことがクローン胚の受胎能あるいは出生後の発育に及ぼす影響が懸念されている。そこで、当センターの黒毛和種受精卵クローン牛2頭とそのドナー胚提供牛及び受胎牛のmtDNAを一本鎖高次構造多型法(以下、PCR-SSCP)により解析した。

その結果、いずれのクローン牛についても、ドナー胚提供牛と同じバンドパターンは検出されなかったことから、核移植直後のドナー胚由来mtDNAとレシピエント卵子由来mtDNAの混在がクローン胚の発生等に影響を与える可能性は少ないことが示唆された。

キーワード：牛、クローン、mtDNA、PCR-SSCP

緒 言

細胞内でエネルギーの生産に携わっているミトコンドリアは、核DNAとは別の遺伝情報を有しており、哺乳動物ではほぼ完全に母親由来のものだけが遺伝することが知られている。

牛のmtDNAは、約16kbpのコンパクトな環状二本鎖構造で、13個のタンパク質、2個のrRNA及び22個のtRNAをコードする遺伝子を含んでいる。また、これらとは別にDisplacement Loop(以下、D-Loop)と呼ばれる機能性遺伝子をコードしないが故に変異に富む領域も含んでいる¹⁾。

哺乳動物の細胞では、1個の体細胞内に約 2×10^3 のmtDNA分子が存在しているが、卵子には約 2×10^5 のmtDNA分子が存在している。一方で、精子に存在する約50~75分子のmtDNAは、受精の際に卵子に持ち込まれるものの、発生の初期までしか検出されず、その後消滅して後代へは遺伝しないことが報告されている²⁾。

核移植を行うクローン牛については、除核したレシピエント卵子に侵入するドナー細胞由来のmtDNAが通常の受精時における精子のそれに比べて明らかに多いことから、レシピエント卵子とドナー細胞の双方に由来するmtDNAが混在していることが考えられる。実際、クローン牛については、ドナー細胞由来のmtDNAの割合が発育とともに減少してレシピエント卵子由来のmtDNAのみが残る^{3), 4)}、もしくは双方のmtDNAが混在する^{5), 6)}2つのケースが報告されており、混在する2種類のmtDNAの相互作用や由来の異なる核とミトコンドリアの相性が、クローン胚の発生能、受胎能及び出生後の発育に与える影響が懸念されている。

そこで、当センター繋養の黒毛和種受精卵クローン牛2頭についてmtDNAの解析を試みた。

材料及び方法

1 血液サンプルからのDNAの抽出

解析用のサンプルは、当センターの黒毛和種受精卵クローン牛2頭とそのドナー胚提供牛及び受胎牛の血液をEDTAで抗凝血処理した後、-80℃で凍結保存したものを使用した。DNAの抽出は、凍結血液を室温で融解後、DNA抽出キット「Genとるくん™(血液用)」(宝酒造)を用いて行った。

2 PCR手法

PCR用のプライマーは、武田ら^{3), 7)}の報告に従い、D-Loop内のほぼ全体を増幅の対象としたLF&LR及びD-Loop内の高変異部位(308bp)を対象としたSF&SRの2種類を用いた。

両プライマーのデザイン及び反応条件については、表1のとおりである。また、PCR反応は、サーマ

ルサイクラー (Gene Amp PCR system 9600、PE biosystem社) の温度制御下で、FastStart Taq Polymerase (Roche Diagnostics社) を添加した25ulの反応液中で行った。

なお、LF&LRで得られたPCR産物は、PCR-SSCPに供する前に、制限酵素 *Hpa* で2カ所切断した。

表1. プライマーのデザイン及び反応条件

LF&LR			SF&SR		
(デザイン)			(デザイン)		
3' -AGTCTCACCATCAACCCCAAGCTGAAG-5'			3' -CCATGCATATAAGCAAGTACATGAC-5'		
3' -GCTTAACCCAAAGCAAGGCACTGAAAATGC-5'			3' -CTCGATGGACTAATGGCTAATTCAG-5'		
(反応条件)			(反応条件)		
1st	95	4分	1st	95	4分
2nd; 35cycles	95	30秒	2nd; 10cycles	95	30秒
	62	30秒		65	30秒
	72	2分		72	30秒
Final	72	7分	3rd; 25cycles	95	30秒
	15			63	30秒
				72	30秒
			Final	72	2分
				15	

3 PCR-SSCPによる解析

PCR-SSCP は、武田ら^{3), 7)}の報告を参考に、1ulのPCR産物を5ulのホルムアミド溶液 (95%脱イオン化ホルムアミド、20mM EDTA) 中に加え、95℃、5分間の熱処理後、氷中で10分間急冷、直ちにその0.5~1ulを電気泳動に用いた。電気泳動は、5%グリセロールを含む6%アクリルアミドゲル (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=49:1、8×10cm、1mm厚) を用い、4℃の0.5×TBE溶液中で、135V、3.5時間行った。

電気泳動後のバンドの検出には、銀染色法 (Silver Stain Plus Kit, BIO-RAD社) を用いた。

結果及び考察

PCR-SSCPによる解析の結果、図のようにいずれのクローン牛についてもドナー胚提供牛及び受胎牛と異なるバンドパターンを示した。このことから、核移植直後に混在していたドナー胚及びレシピエント卵子由来mtDNAのうち、ドナー胚由来のmtDNAのみが発生の過程で消滅、あるいはPCR-SSCPでは検出可能なレベルまで減少した可能性が考えられた。なお、今回供試したクローン牛については、食肉処理場由来の卵子をレシピエント卵子として利用したため、レシピエント卵子側のmtDNA型が不明である。このため、クローン牛のmtDNAがレシピエント卵子のmtDNAをそのまま受け継いでいるのかどうかは確認できなかった。

今回供試した2頭のクローン牛については、それぞれ平成14年5月と7月に試験屠殺し、枝肉成績は表2のとおりであった。なお、703号牛については、育成期の事故で足を痛めたため、枝肉成績に悪影響があったものと考えられた。

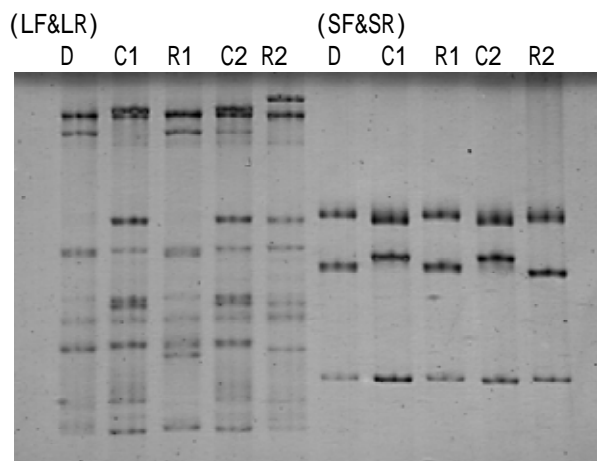
また、試験屠殺にあわせて、食肉検査員による食肉検査、並びに心、肺、肝、腎、脾及び腸の組織切片による病理検査を行ったが、特に異常は認められなかった。このことから、仮にPCR-SSCPの検出限界以下の微量のドナー胚由来mtDNAが存在していたとしても、クローン牛の発育に影響を及ぼさないと考えられた。

なお、クローン技術によらずに生産される一般の牛でも、突然変異によると考えられる複数の型のmtDNAの混在が確認されている^{3), 8)}が、このような牛についてもmtDNAの混在に起因すると考えられるような異常は報告されていない。

一方、mtDNAの変異が乳牛⁹⁾あるいは肉用牛¹⁰⁾の経済形質に影響を及ぼすという報告があるものの、mtDNAの変異や混在が個体としての牛に与える影響については今なお不明な点が多い。今後こうした点が明らかになれば、mtDNAの変異を利用したレシピエント卵子の選別を行うことで、クローン牛の受胎率・出生率を高められるだけでなく、より斉一性の高いクローン牛の作出に寄与することが期待される。

表2. 黒毛和種受精卵クローン牛の枝肉成績

個体番号	生年月日	出荷月齢	体重	体高	枝肉重量	枝肉規格	BMS-No
703号	H12.3.28	26ヶ月齢	712kg	154.0cm	407kg	B-2	3
702号	H12.3.28	28ヶ月齢	828kg	152.8cm	496kg	A-3	4
(参考)	-	26ヶ月齢	786kg	153.1cm	-	-	-



- ・ 図中のD、C、Rはそれぞれドナー、クローン、受胎牛を示す。
- ・ R1はC1の、R2はC2の受胎牛。

図. 黒毛和種受精卵クローン牛のPCR-SSCP解析結果

謝 辞

本試験の実施にあたり、mtDNAの抽出及び解析手法について御指導いただきました(独)農業技術研究機構 畜産草地研究所 家畜育種繁殖部 育種素材開発研究室 武田久美子博士、また、病理鑑定に御協力いただいた岡山県家畜病性鑑定所に深謝いたします。

引用文献

- 1)動物遺伝育種シンポジウム組織委員会編、家畜ゲノム解析と新たな家畜育種戦略(2000)：「1.6.1 ミトコンドリア DNA 変異と細胞質遺伝効果(執筆担当：万年英之)」, 196-199
- 2)Kaneda H, Hayashi J, Takahama S, Taya C, Lindahl KF and Yonekawa H(1995): Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4542-4546
- 3)K. Takeda, S. Takahashi, A. Onishi, Y. Goto, A. Miyazawa and H. Imai(1999): Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *J. Reprod. Fertil*, 116, 253-259
- 4)Flavio V. Meirelles, Vilceu Bordignon, Yeda Watanabe, Michelle Watanabe, Andre Dayan, Raysildo B.Lobo, Joaquim M. Garcia and Lawrence C. Smith(2001): Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by transfer to a *Bos taurus* oocyte. *Genetics*, 158, 351-356
- 5)Hiendleder, S., S. M. Schmutz, G. Erhardt, R. D. Green and Y. Plante(1999): Transmitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle. *Mol. Reprod. Dev*, 54, 24-31
- 6)武田久美子、長谷川清寿、市野清博、今井 昭、金山佳奈子、高橋清也、赤木悟史、今井 裕、山中真理子、大西 彰、花田博文(2002)：ウシ核移植産子のミトコンドリア DNA 型・ヘテロプラズミーの要因、*日本胚移植学雑誌*, 24, 1, 13-18
- 7)武田久美子、佐藤正寛、Shreeram P. NEOPANE、Bahadur S. KUWAR,Hari D JOSHI(2001):ネパールにおける希少家畜：Lulu 牛の共同調査。動物遺伝資源探索調査報告, 12
- 8)William W. Hauswirth and Philip J. Laipis(1982): Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of holstein cows. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4686-4690
- 9)P. J. Boettcher, A. E. Freeman, S.D. Jonston, R. K. Smith, D. C. Beitz and B. T. McDaniel(1996): Relationships between polymorphism for mitochondrial deoxyribonucleic acid and yield traits of holstein cows. *J. Dairy. Sci*, 79, 647-654
- 10)H. Mannen, T. Kojima, K. Oyama, F. Mukai, T. Ishida and S. Tsuji(1998)： Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of japanise black cattle. *J. Anim. Sci*, 76, 36-41

