

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-33200

(P2003-33200A)

(43) 公開日 平成15年2月4日 (2003.2.4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)		
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 Q	1/68	Z	4 B 0 2 4
C 1 2 M	1/00	C 1 2 M	1/00	A	4 B 0 2 9
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00	A	4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2001-222636 (P2001-222636)
 (22) 出願日 平成13年7月24日 (2001.7.24)

(71) 出願人 591190955
 北海道
 北海道札幌市中央区北3条西6丁目1番地
 (72) 発明者 尾上 貞雄
 北海道上川郡新得町字新得西5線39番地
 北海道立畜産試験場内
 (72) 発明者 南橋 昭
 北海道上川郡新得町字新得西5線39番地
 北海道立畜産試験場内
 (74) 代理人 100096699
 弁理士 鹿嶋 英實

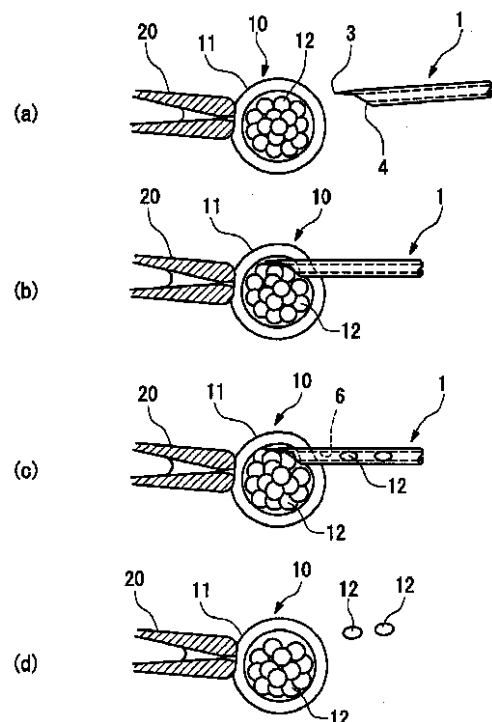
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 初期胚における遺伝情報の判定法とこれに使用される器具および初期胚から細胞を取り出す方法

(57) 【要約】

【課題】 移植前の胚の段階での遺伝的選抜を確実に実施し、最小限の細胞個数で確実に遺伝情報を判定して、移植作業性を向上させるとともに、初期胚から細胞を損傷なく最小限数で採取することを可能にし、細胞採取後の初期胚の移植性を高めて、優良な遺伝形質を持つウシなどの動物を確実に生産する技術を提供する。

【解決手段】 初期胚における遺伝情報の判定法とこれに使用される器具および初期胚から細胞を取り出す方法を包含しており、移植前初期胚から細胞を取り出し、該細胞から抽出した核酸をテンプレートとして核酸増幅を行い、所望の遺伝情報を調べる技術が採用され、必要に応じて、パイプ材の先端に設けられた鋭利な突き刺し部と、該突き刺し部からパイプ材の表面に至る傾斜部とを備えた器具が使用される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 初期胚から 1 個ないし数個の細胞を無処理状態で取り出し、核酸をテンプレートとしてアニーリング温度およびサイクル数などの組み合わせにより遺伝情報の判定を行うことを特徴とする初期胚における遺伝情報の判定法。

【請求項 2】 使用されるゲノム DNA 量が、少なくとも 1 細胞の配列の検出感度であることを特徴とする請求項 1 記載の初期胚における遺伝情報の判定法。

【請求項 3】 4 細胞期ないし 64 細胞期範囲の初期胚に適用されることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の初期胚における遺伝情報の判定法。

【請求項 4】 1 個ないし数個の細胞からの DNA 抽出法として、Tween20 と Proteinase K とを使うことを特徴とする請求項 1、2 または 3 記載の初期胚における遺伝情報の判定法。

【請求項 5】 DNA 増幅が、1 回の増幅操作によりなされることを特徴とする請求項 1、2、3 または 4 記載の初期胚における遺伝情報の判定法。

【請求項 6】 初期胚 (10) から少数の細胞 (12) を取り出すための器具 (1) であって、パイプ材 (2) と、該パイプ材の先端に配される鋭利状態の突き刺し部 (3) と、該突き刺し部の後方に連続して配され細胞の突き刺し部分を広げる傾斜部 (4) とを有する初期胚から細胞を取り出す器具。

【請求項 7】 傾斜部 (4) に、パイプ材 (2) の中心穴 (6) と連通状態の開口部 (5) が配されることを特徴とする請求項 6 記載の初期胚から細胞を取り出す器具。

【請求項 8】 初期胚 (10) の透明帯 (11) に非円形状の貫通傷を形成する工程と、該貫通傷を徐々に押し広げる工程と、貫通傷を經由して挿入した器具 (1) により初期胚における細胞の 1 個または数個を吸引して透明帯の外部に抜き取り採取する工程とを有する初期胚から細胞を取り出す方法。

【請求項 9】 器具 (1) の先端部に配した傾斜状態の開口部 (5) より、細胞 (12) を 1 個吸着させたものを吸引して透明帯 (11) の外部に抜き取り採取することを特徴とする請求項 8 記載の初期胚から細胞を取り出す方法。

【請求項 10】 初期胚 (10) の透明帯 (11) に非円形状の貫通傷を形成する工程と、該貫通傷を徐々に押し広げる工程と、初期胚を挟んで貫通傷の近傍に位置させた細胞 (12) を透明帯の外部に押し出す工程とを有する初期胚から細胞を取り出す方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は初期胚における遺伝情報の判定法とこれに使用される器具および初期胚から細胞を取り出す方法に関するもので、特に、ウシの枝肉

重量、脂肪交雑、ロース芯面積等の枝肉形質や乳量・乳質、抗病性及び遺伝病の有無に関する遺伝形質を判定し、繁殖に適した胚を子宮に着床させて目的とする遺伝形質を持つウシを生産する技術等に好適である。

【0002】

【従来の技術】特開平 10 - 57058 号公報には、ウシの遺伝性血液疾患、特にウシのバンド 3 欠損症の検出方法及びキットに関する技術が開示されている。この従来技術においては、ウシ (母ウシ) の赤血球、骨髄細胞及び腎細胞などから核酸試料を採取し、遺伝子レベルでバンド 3 欠損症を診断することが提案されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、母ウシの選別を行って優良ウシを識別し得たとしても、優良ウシ由来の胚全てが優良な遺伝形質を持つとは限らず、また、遺伝的形質の解析には、通常の場合、胚移植から約 9 ヶ月後の分娩を待たなければならないこともあって、優良な遺伝形質を持つウシなどの動物を、確実に生産する方法を確立する技術の開発が要望されていた。

【0004】本発明は、上記の事情に鑑みてなされたもので、以下の目的を達成するものである。

(1) 移植前の胚の段階で遺伝的選抜を確実に実施すること。

(2) 最小限の細胞個数で確実に遺伝情報を判定して、移植作業性を向上させること。

(3) 初期胚から細胞を損傷なく最小限数で採取すること。

(4) 細胞数 1 個の場合などであっても、遺伝情報の判定誤差発生を低減し、信頼性の向上を図ること。

(5) 細胞採取後の初期胚の移植性を高めること。

(6) 初期胚からの細胞採取時の作業を簡略化すること。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記目的を達成するために、初期胚における遺伝情報の判定法とこれに使用される器具および初期胚から細胞を取り出す方法を包含するものであり、遺伝情報の判定技術の一部に、前述した特開平 10 - 57058 号や、その他の判定技術を適宜踏襲するものであるが、新たに知見を得た以下の技術を付加して構成されている。

【0006】《初期胚における遺伝情報の判定法》主として、移植前初期胚を対象とし、初期胚から 1 個ないし数個の細胞を無処理状態で取り出し、核酸をテンプレートとして増幅酵素、アニーリング温度およびサイクル数などの組み合わせにより遺伝情報の判定を行う技術が適用される。核酸の概念には、ゲノム DNA、ミトコンドリア DNA や RNA などが含まれる。上記技術にあって、判定を行う対象となる核酸自体を増幅せずに、検出方法の感度を上げることにより遺伝情報の判定を行う技術も包含される。上記 DNA 増幅 (ポリメラーゼ連鎖反

応増幅)は、1回の増幅操作により行われる。移植前初期胚からは、少なくとも1つの細胞が取り出され、該細胞から抽出したゲノムDNAをテンプレートとしてポリメラーゼ連鎖反応増幅を行うことにより、所望の遺伝情報を調べる技術や、移植前初期胚がウシから得られる場合には、所望の遺伝情報が霜降り、高泌乳、抗病性及び遺伝病の有無に関する遺伝形質の中から選択される技術も包含している。

使用されるゲノムDNA量が、少なくとも1細胞の配列の検出感度である技術も付加される。

移植前初期胚から細胞を取り出す時期にあつては、4細胞期ないし64細胞期範囲の初期胚に適用可能であるが、初期胚における遺伝情報の判定目的と、診断した残りの胚の部分が移植できるための細胞数を考えると8細胞期ないし32細胞期への適用が望ましく、さらに、移植可能な最終時期としては、脱出胚盤胞まで適用される。

増幅酵素は、HotStarTaq (QIAGEN)が適用され、アニーリング温度およびサイクル数は、95 15分1回の後、94

30秒 - 64 30秒 - 72 30秒の条件を45回、次いで72

5分1回とする方法や、98 5秒 - 60~68 1~10秒の

条件を30-50回とする2段階の温度変化による方法(シ

ャトルPCR)などが適用される。供試胚は、雌牛に過剰

排卵処置を行い凍結精液を人工授精して得たもの、核移

植のために培養されたもの、体外受精によって得たもの、

過剰排卵処置を行わずに得たもの、その他これらに類するもの

に対して適用される。DNA抽出は、由元ら(1997)の方法に準じて実施され、0.5% 界面活性剤(Tween20)と0.1 mg/mlのプロテイナーゼ(ProteinaseK)とを加えて(反応液10 μ l)37

、10分間のインキュベーションを行って抽出する技術が適用される。抽出DNAについて、バンド3型判定および性別判別それぞれのPCR用反応液と混合しPCRを行うことが好ましい。バンド3型判定については、増幅断片を制限酵素Dra IIIで37

、数時間消化することにより行われる。バンド3型判定PCRは、ホットスタートTaqが適用される。ゲノムDNAをテンプレートとして用いた場合、3 pg以上でバンド3標的配列が検出可能である。移植前初期胚は、1個ないし数個の細胞による遺伝子診断終了後、繁殖条件を具備しているもの、つまり、異常のない場合や、所望の遺伝子情報を備えている場合、つまり、ウシの場合であると、霜降り・高泌乳・抗病性などの優良な遺伝形質とともに、遺伝病モデル家畜を作出したりする、いわゆる「悪い遺伝子」を選抜することも含まれ、移植処理される。(子宮への着床処理がなされる。)

【0007】《初期胚から細胞を取り出す器具》初期胚に突き刺して少数細胞を取り出すための器具として、ピペットに類似するパイプ材と、該パイプ材の先端に配される鋭利状態の突き刺し部と、該突き刺し部の後方に連続して配され細胞の突き刺し部分を広げる傾斜部とを有する技術が適用される。パイプ材は、例えば石英ガラス

管とされる。上記傾斜部には、パイプ材の中心穴と連続状態の開口部が配される。

パイプ材の中心穴の内径は、吸引細胞の大きさに合わせて設定されるが、概略30 μ mに設定される。突き刺し部を除く、傾斜部および開口部の縁部やパイプ材の中心穴には、加熱処理による鈍化処理や研磨加工などにより、表面の滑面加工や曲面加工を施しておくことが望ましい。傾斜部におけるパイプ材の長手方向とのなす角度は、突き刺し部からパイプ材の円筒状表面までを緩やかに導くものとされ、開口部の近傍においてほぼ45度前後に設定される。この器具が適用される初期胚は、4細胞期ないし胞胚腔形成以前の胚までのものが含まれるが、8細胞期ないし32細胞期のものへの適用が望ましい。

【0008】《初期胚から少数細胞を取り出す方法》初期胚の透明帯に非円形状の貫通傷を形成する工程と、該貫通傷を徐々に押し広げる工程と、貫通傷を経由して挿入した器具により初期胚における細胞の1個または数個を吸引して透明帯の外部に抜き取り採取する工程とを有する技術が採用される。

この際に、器具の先端部に配した傾斜状態の開口部を胚細胞に密着させ、1個または数個の細胞を吸引して透明帯の外部に抜き取り採取する技術が採用される。

初期胚の透明帯における貫通傷は、透明帯自体の弾性などに基づいて閉鎖状態に導かれ、残りの細胞を透明帯の内部に保持したまま、以下、子宮への着床処理が実施される。初期胚から、少数細胞を取り出す方法として、透明帯に非円形状の貫通傷を形成する工程と、該貫通傷を徐々に押し広げる工程と、初期胚を挟んで圧力を加えて貫通傷の近傍に位置させた細胞を透明帯の外部に押し出す工程とを有する初期胚から少数細胞を取り出す技術も適用される。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明の初期胚における遺伝情報の判定法とこれに使用される器具および初期胚から細胞を取り出す方法をさらに詳細に説明する。

【0010】《初期胚における遺伝情報の判定法》本発明に係る初期胚における遺伝情報の判定法は、移植前初期胚から少なくとも1つの細胞を取り出し、該細胞から抽出したゲノムDNAをテンプレートとしてポリメラーゼ連鎖反応増幅を行い、所望の遺伝情報を調べる技術が採用される。

【0011】この判定法において、対象となる初期胚は、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギなどの家畜動物、マウス、ラット、モルモット、サルなどの実験用の動物、イヌ、ネコなどの愛玩用動物などの種々の動物から得ることができるが、一般にはウシの初期胚を対象とする。さらに、ウシの初期胚は、過剰排卵処理した雌ウシに人工授精を行って得られる胚、卵巣から採取した卵子と精子とを体外で人工授精して得られる胚や、核移植の

10

20

30

40

50

ために培養されたものなどが対象となる。この場合の精子は、新鮮あるいは凍結保存してある精子が含まれる。

【0012】所望の遺伝情報は、対象となる動物によって適宜選択することができる。ウシにおいて本発明を実施する場合、所望の遺伝情報は、霜降り、高泌乳、抗病性などの優良ウシに必要とされる遺伝形質、および遺伝病、例えばバンド3、パラセリン1、第13遺伝子、CHSなどの遺伝子に関連した、いわゆる遺伝子病の有無に関する遺伝形質からなる群から選択される少なくとも1つの項目とすることができる。

【0013】この判定法では、上記ゲノムDNAの使用量が3pg~20ngの範囲であることが好ましい。また、上記移植前初期胚から細胞を取り出す時期は、8細胞期~32細胞期であることが望ましい。

【0014】初期胚から取り出した細胞からゲノムDNAを抽出するための方法として、本発明においては界面活性剤とプロテイナーゼを用いた方法が好ましい。界面活性剤は種々の市販のタイプの界面活性剤を使用することができる。好適な実施態様において、ゲノムDNAを抽出するために用いられる界面活性剤とプロテイナーゼの組み合わせは、例えばTween20（登録商標）とプロテイナーゼK（Proteinase K：（登録商標））を用いることが好ましい。さらに好適な実施例においては、0.2~0.8重量%のTween20と0.01~0.5mg/mlのプロテイナーゼKの水溶液を用いて、5分以上、好ましくは6~20分間、37℃でインキュベートすることによってゲノムDNAを抽出することが好ましい。なお、DNAの抽出法の詳細については、由元ら（1997）：第38回日本哺乳動物卵子学会大会（平成9年）講演要旨にも記載されている。

【0015】抽出したゲノムDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応（以下、PCRと記す）により増幅される（必要に応じて、PCR以外の核酸増幅法も適用される）。PCR条件は、特に限定されないが、1回のPCR増幅操作で行うことが望ましい。好ましい実施態様において、このPCR増幅は、抽出したゲノムDNAをテンプレート（テンプレート）として増幅酵素、アニーリング温度及びサイクル数などの組み合わせにより遺伝情報の判定を行う。

【0016】アニーリング温度及びサイクル数は、特に限定されないが、好ましいアニーリング条件及びサイクル数を例示すれば、94℃30秒-64℃30秒-72℃30秒の条件を45回、次いで72℃5分1回とする方法などを採用し得る。好ましい実施態様において、ウシの初期胚から得られ、抽出したDNAを用いて、バンド3型の判定を行う場合、増幅断片を制限酵素DraIで37℃、数時間消化する。また、バンド3型判定PCRは、ホットスタートTaqが適用される。ゲノムDNAをテンプレートとして用いた場合、3pg以上でバンド3標的配列が検出された。

【0017】移植前初期胚は、1つ以上の細胞による遺伝子診断終了後、繁殖条件を具備しているもの、すなわち、遺伝病に係る遺伝子が検出されなかったもの（意図的に遺伝病モデルウシなどを作出する場合にあっては、所望の遺伝子が検出されたもの）や、霜降り、高泌乳、抗病性などの所望の遺伝形質を有することが明らかとなったものは、子宮への着床処理がなされる。この着床処理は、当該分野で周知の手法を用いて実行可能である。

10 【0018】《初期胚から細胞を取り出す器具》本発明は、上述した移植前初期胚から、少なくとも1つの細胞を取り出すために好適な器具を提供する。図7は、本発明に係る初期胚から細胞を取り出す器具の第1実施形態を示している。この器具1は、ピペットに類似するパイプ材2の先端に設けられた鋭利な突き刺し部3と、該突き刺し部3からパイプ材2の円筒状表面まで緩やかに連続している傾斜部4と、その位置に開けられた開口部5とを備えており、傾斜部4がほぼ45度前後に設定されるとともに、開口部5が、パイプ材2の中心穴6と連続した状態となっている。

20 【0019】パイプ材2は、細いガラス管、好ましくは石英ガラス管を用いることができ、その他端側には、当該分野で周知のマクロマンピュレーター用の微量吸引/排出が可能な操作器具に接続される。そして、該操作器具の微量吸引/排出操作によって、パイプ材2の先端から細胞を中心穴6内に吸引しまたは排出することができるようになっている。

30 【0020】パイプ材2の中心穴6の内径は、吸引細胞の大きさに合わせて設定されるが、概略20~40μm、好ましくは25~35μm、さらに好ましくは30μm前後に設定される。突き刺し部3を除く、傾斜部4及び開口部5の縁部やパイプ材2の中心穴6には加熱処理による鈍化処理や研磨加工により表面の滑面加工や局面加工を施しておくことが望ましい。パイプ材2の長手方向に対して傾斜部4のなす角度は、突き刺し部3からパイプ材2の円筒状表面までを緩やかに導くものとされ、開口部4の近傍において好ましくは40~50度程度に設定される。

40 【0021】《初期胚から細胞を取り出す方法》本発明に係る初期胚から細胞を取り出す方法は、上述した器具を用いて好適に実施し得る。図8は、本発明に係る初期胚から細胞を取り出す方法の第1実施形態を示している。この方法では、まず、初期胚10を顕微鏡観察下、生理食塩水やリン酸緩衝化食塩水、あるいは組織培養用液体培地などの液中加入し、先端を平坦化もしくは丸めた固定用吸引管20で吸引することにより固定するようにしている。

50 【0022】図8(a)に示すように、固定用吸引管20の先端で初期胚10を吸引して固定しておき、初期胚10の透明帯11で覆われた細胞12を取り出すもので

ある

。この初期胚 10 は、8 細胞期ないし 32 細胞期のものが適用され、各細胞 12 が比較的強固にくっ付いた塊状（桑実状）になったものを想定している。

【0023】次いで、図 8（b）に示すように、固定用吸引管 20 で吸引固定された初期胚 10 に、器具 1 の先端（突き刺し部 3）を突き刺す。初期胚 10 の透明帯 11 は、突き刺し部 3 が貫通した後、傾斜部 4 によって徐々に押し広げられ、突き刺し部 3、傾斜部 4 及び開口部 5 などのパイプ材 2 の先端部が、透明帯 11 内部に挿入される。

【0024】図 8（c）に示すように、器具 1 の開口部 5 を細胞 12 の一つに密着させ、器具 1 に接続された操作器具の微量吸引操作などによって、細胞 12 を開口部 5 から中心穴 6 の中に取り込み吸引する。

【0025】さらに、図 8（d）に示すように、器具 1 を初期胚 10 から抜き去った後、所望数（少なくとも 1 個）の細胞 12 を取り出す。器具 1 が挿入された部分は、透明帯 11 の弾力性により塞がれ、子宮への着床までの間、細胞 12 を保護した状態を維持する。

【0026】図 9 は、本発明に係る初期胚から細胞を取り出す方法の第 2 実施形態を示している。固定用吸引管 20 で吸引固定した初期胚 10 に器具 1 の先端を挿入して透明帯 11 に貫通傷を形成した後、開口部 5 に吸着させた細胞 12 を、貫通傷の近傍まで位置させておくか、あるいは各細胞 12 がばらばらの状態に近づいている場合に、器具 1 を初期胚 10 から抜き出し、器具 1 と固定用吸引管 20 とで初期胚 10 を挟んで押圧力を加え、貫通傷を経由させて少なくとも 1 つの細胞 12 を初期胚 10 から外部に取り出すものである。

【0027】このように取り出した細胞 12 は、上述した通り、本発明に係る初期胚における遺伝情報の判定法に従って、ゲノム DNA を抽出し、その遺伝形質を調べる。そして、この初期胚が好ましい遺伝形質を有することが明らかになったならば、初期胚を動物の子宮に着床するなどの処理が行われる。

【0028】

【実施例】〔実施例 1：DNA マーカーによるウシ初期胚解析のための研究〕

1. 目的

近年、畜産を取り巻く情勢はますます厳しくなり、生産物の更なる高品質化が強く望まれている。そのような状況の中、北海道では DNA マーカーによる霜降り遺伝子の解析や、胚移植技術を活用した黒毛和種雄牛造成に取り組んでいる。一方、核移植技術の発達により、同一胚に由来する数頭のクローン産子生産も現実のものとなりつつある。しかしながら、優良ウシ由来の胚全てが優良な遺伝形質を持つわけではなく、さらに、遺伝的形質の解析には胚移植から約 9 ヶ月後の分娩を待たなければならぬのが現状である。そこで本試験では、移植前の

胚の段階で遺伝的選抜を行う技術の開発を目指す。

【0029】2. 研究方法

2 - 1) 胚細胞を試料とした DNA マーカー検出条件の検討

(1) 雄ウシの皮膚由来培養細胞（1～10 細胞）を材料として、加熱（沸騰水中に 1 分間浸漬）、凍結融解（液体窒素および恒温槽を用いて 3 回繰り返す）、および酵素消化（プロテイナーゼ K（登録商標）および Tween 20（登録商標）を加えて 37℃ 10 分処理）による DNA 抽出を行った。その後、それぞれの方法により抽出した DNA をテンプレートとして、性判別用プライマーを用いた PCR を行い、目的の DNA が検出できるかどうかによって DNA 抽出法を比較検討した。

【0030】(2) 雄ウシの培養細胞（50 細胞）を材料として、酵素消化により抽出した DNA をテンプレートとして、マーカー検出条件（テンプレート量、サイクル数、エタノール沈殿時の PCR 産物量）について検討した。マーカーについては 3 組を 1 セットとしたものを 3 セット設定した。

20 【0031】2 - 2) DNA マーカーによるクローン胚の遺伝的斉一性の検証

体細胞由来クローン胚を用いて、動物遺伝研より提供された個体識別用 DNA マーカーが検出できる条件について検討し、同一ドナー細胞由来胚の遺伝的斉一性を検証した。

【0032】2 - 3) 移植前の胚の段階で遺伝的選抜を行うための条件の検討

胚の一部をサンプルとして性別と黒毛和種の遺伝病バンド 3 欠損型の遺伝子型の 2 つの形質を判定するための条件について検討した。

【0033】3. 結果と考察

3 - 1) 胚細胞を試料とした DNA マーカー検出条件の検討

(1) DNA 抽出法については、5 細胞以上の場合は、どの方法によっても目的の DNA が安定して検出できた。3 細胞以下の場合、加熱や凍結融解では、目的のバンドが増幅されなかったり、プライマーダイマーなど目的外のバンドの出現が見られ、不安定であったが、酵素消化で安定した結果が得られた（図 1）。

40 【0034】(2) 培養細胞 50 個から抽出した DNA をテンプレートとした場合は PCR サイクル数 40 回、解析に用いる PCR 産物量を通常の 1.2～2.5 倍とすることにより、マーカーの検出が可能であった。しかしながら、プライマーの配列や標識色素の種類により増幅効率や蛍光強度に違いが見られ、検出率への影響が大きいことが同われた（図 2）。

【0035】3 - 2) 体細胞由来クローン胚を作成し、体細胞、クローン胚および移植により得られたクローン産子それぞれについて、遺伝的斉一性を検証した。

50 【0036】3 - 3) Inaba ら（1996）（Inaba, M., e

t. al.(1996):Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band3 in cattle due to a nonsense mutation. J. Clin. Invest. 97, 1804-1817)の方法に準じて少量のDNAをテンプレートとした場合におけるバンド3欠損症の遺伝子型判定についてPCR条件の検討を行ったところ、細胞1個程度に相当するゲノムDNA 3 pgでのバンド3遺伝子型判定が可能であった。同条件を胚に適用することにより、1つのサンプルから性別とバンド3遺伝子型の両形質を判定することができた(図3, 4)。

【0037】このことは、移植前の胚の段階で性別に加えて他の遺伝的形質についても選抜が可能であることを初めて実証したものである。これにより、脂肪交雑などの肉質、乳量あるいは抗病性などの優良形質を判別して効率的な胚移植を行うことが可能と考えられ、育種改良への貢献が期待できる。また、遺伝病についてはキャリアの判定だけでなく、実験的に劣性ホモと判定した胚を移植して遺伝病発症家畜を作出することも可能である。黒毛和種では肉質などの偏った選抜により多くの遺伝病が顕在化し問題となっている。農家にとっては避けなければならない問題であるが、一方では、肉質に関連して選抜されてきた形質という面も考慮する必要があると思われる。また、遺伝病の中にはヒトを含め哺乳類に共通して見られるものもある。特に今回標的としたバンド3欠損症はこれまでホモ接合型は致死性であり、バンド3は生命維持に不可欠の膜蛋白質とされてきたが、ヒトも含めバンド3を全く持たずに生存している哺乳動物の自然界での最初の例として、定説を覆し、代償機構の解明に役立つ実験家畜としても注目されている。従って、医学領域への貢献も考えると、黒毛和種は霜降りのような我々にとって好ましい形質だけでなく、遺伝病も含めて非常に貴重な日本の財産であるとの認識を持つことが21世紀の畜産には必要ではないかと思われる。

【0038】4. 結果の要約

移植前の胚の段階で遺伝的選抜を行う技術の開発を目指し、DNA抽出法、DNAマーカー検出条件などについて検討し、実証例として遺伝病の遺伝子型判定に応用した。その結果、酵素消化によるDNA抽出法が優れており、培養細胞50個から抽出したDNAをテンプレートとした場合はPCR条件などを変更することにより、マーカーの検出が可能であった。しかしながら、プライマーの配列や標識色素の種類により増幅効率や蛍光強度に違いが見られ、検出率への影響が大きいことが窺われた。

【0039】また、実証例として胚の一部をサンプルとして性別と黒毛和種の遺伝病バンド3欠損症の両形質の遺伝子型判定を行うための条件について検討したところ、細胞1個程度に相当するゲノムDNA 3 pgでのバンド3遺伝子型判定が可能であった。同条件を胚に適用

することにより、1つのサンプルから性別とバンド3遺伝子型の両形質を判定することができた。

【0040】〔実施例2：性別別した胚をドナーとしたクローンウシの生産〕

(目的)胚由来のクローン胚を生産する際、通常再構築したクローン胚またはドナー胚の一部を用いて性別をしている。しかしクローン胚を利用する場合は核移植前に性別を知ることはできず、性別を特定した胚の生産効率は低下する。一方ドナー胚を利用する場合は、分離した割球の一部を用いればドナー細胞の損耗は最小限に抑えられるが、性別が判明するまで割球を単離したまま培養することによる変性の危険が避けられない。こういった現状を踏まえ、本試験では、核移植を実施する前にドナー胚の性別を判定するために、ドナー胚から細胞を採取する方法として、細胞の損耗を少なくできると考えられるマイクロピペット(図7~図9に示す器具1などを参照)を用いた吸引採取法を試みた。

【0041】(方法)核移植のドナーには、過剰排卵処理したドナーウシから発情後5.5日目に回収した16細胞期胚~小型桑実期胚を用いた。性別別用の細胞は、先端を斜めに研磨し、穿刺用の顎を付けた内径約30μmのマイクロピペットで割球を直接吸引して採取した。この時破壊された細胞数を推計し、採取した細胞の細胞数も数えた。また、細胞の結合が強固で吸引操作により細胞採取できなかった幾つかの胚はマイクロピペットを刺した透明帯の切れ目から一部を押し出して細胞を採取した。

【0042】採取した細胞は洗浄後0.5%Tween 20と0.1mg/mlプロテイナーゼK(proteinase K)内で37.10分間酵素処理し、沸騰水中で10分間加熱して以後の処理を行った。由元らの文献(由元美砂、堀内俊孝 マイクロキャピラリーPCR法によるウシ胚の単一割球の性別別、第38回日本哺乳動物卵子学会講演要旨(1997):27)参照。PCRによる性別別のプライマーにはS4-Bを用いた。陰山らの文献(陰山聡一、森安悟、南橋昭、芦野正城、北野則泰、山本裕介 雌雄多型を示すゲノムDNA断片によるウシ胚の性別別、第90回日本畜産学会講演要旨(1995):111)参照。細胞採取の終わったドナー胚は、割球の単離まで10%CS加TCM199で39 または10%CS加PBSで室温にて約8~9時間培養した。以後の核移植操作は、常法(森安悟、澤井健、陰山聡一、南橋昭、芦野正城、北野則泰、山本裕介 BSA加CR1aaへのグルコース添加がウシ核移植胚の発生率に及ぼす影響、第90回日本繁殖生物学会講演要旨(1997):99を参照)に従って行い、発生したクローン胚を6~8日目にレシビアントウシに移植した。

【0043】(結果と考察)本法により得られた性別別用の細胞は多くが3個以下であった。また、細胞採取時に破壊される細胞もほとんどの場合1個以下であった。

それぞれの区における性判定率は 5, 6 ~ 10 細胞区では 100%、3, 4 細胞区で 85.3%、80%と若干の低下が見られるものの、1 および 2 細胞区ではそれぞれ 95%、100%と高く、細胞数の減少による判定率の低下は見られなかった(図 5)。すなわち、吸引法により採取した 1, 2 個の細胞があれば十分ドナー胚の性判別が可能であることが示された。

【0044】性判別した胚のうちドナー胚として核移植に用いた 23 個の胚の平均細胞数は 39.1 個であり、9 回の試験すべてにおいて十分な数の細胞が確保できた。これらの細胞から得られたクローン胚の発生率は 33.5%であった。また発生したクローン胚 63 個を移植した結果、24 頭(38.1%)が受胎した。その結果を図 6 にまとめた。現在までに得られたクローンウシの性別はすべて性判別の結果と一致している。また 2000 年 5 月には胚由来クローンとしては国内最高記録となる 7 頭の正常なクローン産子を得ており、マイクロピペットによる細胞採取が効率的なクローンウシ生産に寄与することを実証した。

【0045】

【発明の効果】(1) 初期胚から損傷の少ない細胞を採取して、遺伝情報の判定を行うことにより、移植前の胚の段階で遺伝的選抜を確実に実施することができる。

(2) 細胞から抽出したゲノム DNA をテンプレートとしてポリメラーゼ連鎖反応増幅を行い、所望の遺伝情報を調べる技術の採用により、最小限の細胞個数で確実に遺伝情報を判定して、移植作業性を向上させることができる。

(3) ピペット状の器具における突き刺し部と開口部を有する傾斜部とで、細胞を吸引する技術により、初期胚から細胞を損傷なく最小限数で採取することができる。

(4) 損傷の少ない細胞の採取と複合技術の併用とにより、細胞数 1 個の場合などであっても、遺伝情報の判定誤差発生を低減し、信頼性の向上を図ることができる。

(5) 初期胚に対して、負担を及ぼさない細胞採取により、細胞採取後の初期胚の移植性を高めることができる。

(6) 効率良く、所望数の細胞採取技術により、細胞採

* 取時の作業を簡略化することができる。

(7) これら技術により、優良な遺伝形質を持つウシなどの動物を確実に生産することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の実施例の結果を示し、異なる抽出法により得られた DNA をテンプレートとして行った PCR の電気泳動像を示す図である。

【図 2】 本発明の実施例の結果を示し、雄ウシの培養細胞(50 細胞)を材料とした DNA マーカー解析結果を示す図である。

【図 3】 本発明の実施例の結果を示し、20 個の胚の一部をサンプルとしたバンド 3 変異領域の PCR 増幅結果を示す図である。

【図 4】 本発明の実施例の結果を示し、DraIII 消化によるバンド 3 型判定結果を示す図である。

【図 5】 本発明の実施例の結果を示し、採取細胞数が性判定率に及ぼす影響を示す図である。

【図 6】 本発明の実施例の結果を示し、性判別胚をドナーに用いたクローン胚の発生成績を示す図である。

【図 7】 本発明に係る器具の第 1 実施形態を示し、(a) は一部を破断した正面図、(b) は底面図である。

【図 8】 本発明に係る初期胚から細胞を取り出す方法の第 1 実施形態を示す工程の概略図である。

【図 9】 本発明に係る初期胚から細胞を取り出す方法の第 2 実施形態を示す模式図である。

【符号の説明】

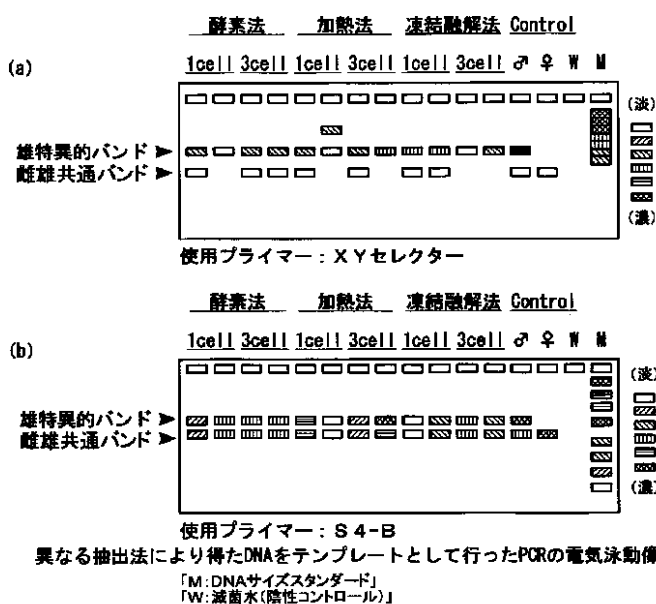
- 1 器具
- 2 パイプ材
- 3 突き刺し部
- 4 傾斜部
- 5 開口部
- 6 中心穴
- 10 初期胚
- 11 透明帯
- 12 細胞
- 20 固定用吸引管

【図 6】

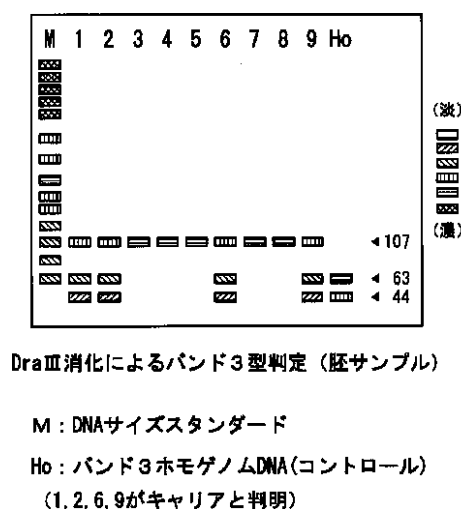
性判別胚をドナーに用いたクローン胚の発生成績

供試ドナー胚数	平均細胞数	供試卵子数	融合胚数 (%)	分割胚数 (%)	発生胚数 (%)
23	39.1 ± 3.3	691	606(87.7)	568(93.7)	203(33.5)

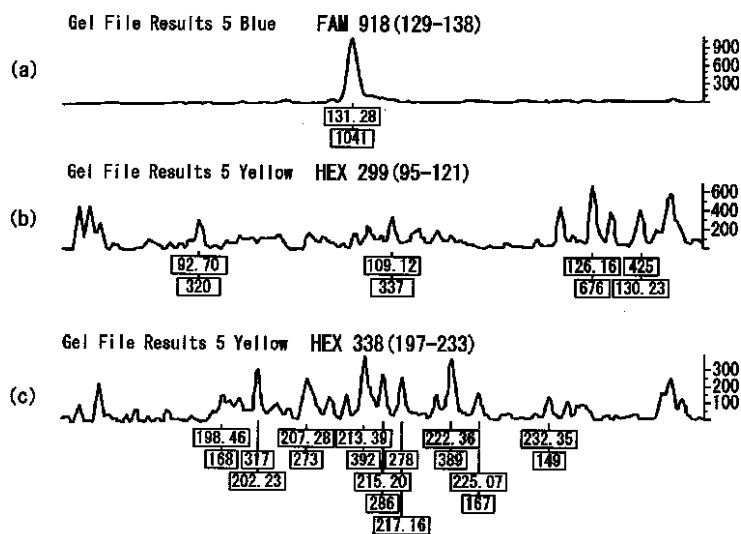
【図1】



【図4】



【図2】



雄ウシの培養細胞(50細胞)を材料としたDNAマーカー解析結果例

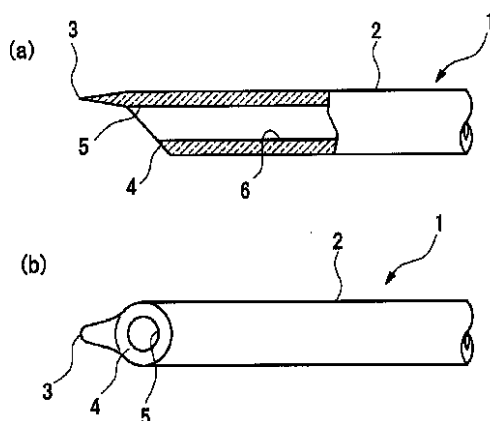
【図5】

採取細胞数が性別定率に及ぼす影響

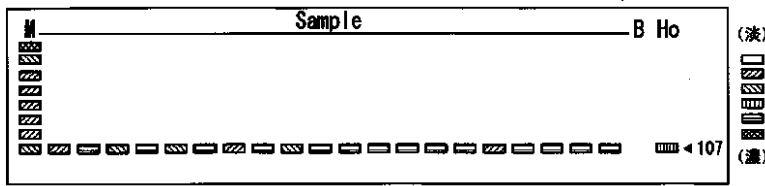
採取細胞数	供給胚	判定不能胚		性別定率 (%)
		×*1	?*2	
1	20	1	0	95.0
2	33	0	0	100.0
3	34	1	4	85.3
4	10	2	0	80.0
5	9	0	0	100.0
6~10	9	0	0	100.0
計	115	4	4	93.0

*1×: 雌雄のバンドともに検出できなかった胚
*2?: バンドが薄く雌雄を断定できなかった胚

【図7】



【図3】



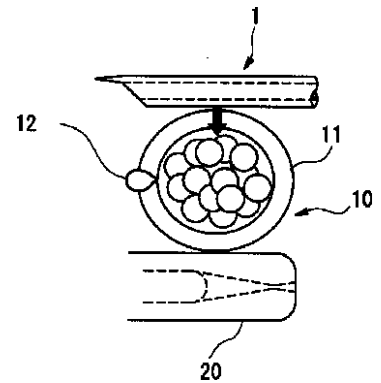
20個の胚の一部をサンプルとしたバンド3変位領域のPCR増幅結果

M: DNAサイズスタンダード

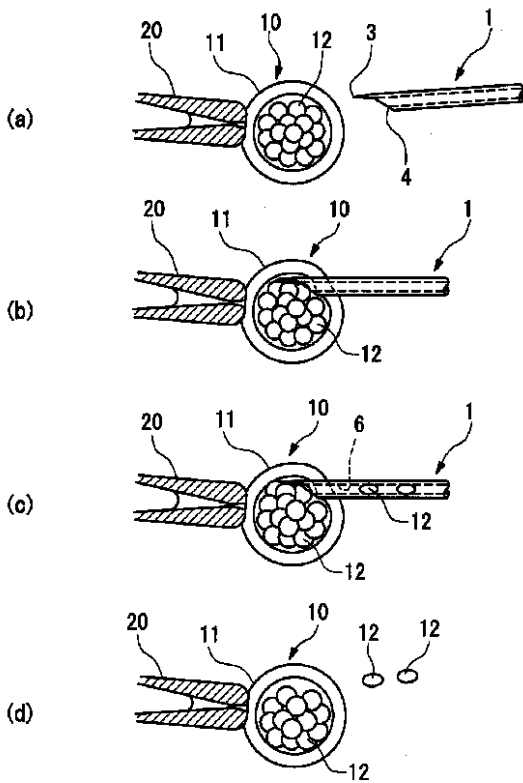
B: 滅菌水(陰性コントロール)

Ho: バンド3ホモゲノムDNA(陽性コントロール)

【図9】



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 陰山 聡一
 北海道上川郡新得町字新得西2条南3丁目
 3-3地共済アパート204号

(72)発明者 森安 悟
 北海道上川郡新得町字新得西5線39番地
 北海道立畜産試験場内

(72)発明者 澤井 健
 北海道上川郡新得町字新得西5線39番地
 北海道立畜産試験場内

(72)発明者 平山 博樹
 北海道上川郡新得町字新得西5線39番地
 北海道立畜産試験場内

(72)発明者 繪野澤 真樹
北海道上川郡新得町字新得西5線39番地
北海道立畜産試験場内

Fターム(参考) 4B024 AA10 AA11 AA19 AA20 CA01
CA20 HA11 HA20
4B029 AA09 AA23 AA25 BB11 HA07
HA10
4B063 QA01 QA05 QA20 QQ02 QQ42
QR08 QR32 QR35 QR40 QR42
QR62 QS16 QS25 QS36 QX01