

成績概要書 (2009年1月作成)

研究課題：牛体細胞クローン胚の遺伝子発現動態

(遺伝子情報を活用した正常に発育するクローン胚の評価・選別法の開発
—産業利用に向けた体細胞クローン牛に関する技術開発と調査—)

担当部署：道立畜試 基盤研究部 受精卵移植科 遺伝子工学科

協力分担：

予算区分：外部資金 (実用技術開発事業、旧高度化事業)

研究期間：2004～2008年度 (平成16～20年度)

1. 目的

体細胞クローン牛は、ドナー細胞の種類や細胞周期、活性化法などの違いによって核移植胚の遺伝子発現に差があると考えられる。また、同じ核移植法を用いても胚の遺伝子発現に差異がありその差が産子の正常性に影響を及ぼしている可能性がある。移植前の初期胚の遺伝子発現解析が可能であれば、遺伝子発現パターンの違いによる産子作出効率(受胎率、流産発生率、産子の正常性)を検討することができ、移植に用いるクローン胚の評価および選別が可能となる。本課題では、体細胞クローン胚の評価・選別法の開発を目的とし、初期胚における遺伝子発現解析法の確立および遺伝子発現パターンの解明を行う。

2. 方法

1)牛体細胞クローン胚の遺伝子発現量解析

RT-リアルタイムPCR法により、体細胞クローン(NT-SC)、受精卵クローン(NT-EM)、体外受精(IVF)、生体回収(Vivo)、単為発生(PA)由来の胚盤胞期(BC)胚の Oct-4、IFN- τ 、Glut-1、IL-6 遺伝子の mRNA 発現量解析を行った。

2) 牛体細胞クローン胚の IGF 関連遺伝子の発現動態

BC および伸長期(EL)胚の IGF 関連遺伝子(IGF-1r,IGF-2r,IGFBP-2,IGFBP-3)発現量解析を行った。

3) 牛体細胞クローン胚の発生に伴う遺伝子発現動態

BC および EL 胚胚盤の IFN- τ ,OCT-4, FGF-R2, FGF-4, FGF-2 各遺伝子発現を測定し、発生に伴う変化を検討した。

3. 成果の概要

1) 牛 BC 胚 1 胚に由来する RNA からリアルタイム PCR 法により複数の遺伝子発現解析が可能であることを示した。複数の手法で得られた BC 胚から、胚の初期発生に参与する Oct-4、IFN-tau、GLUT-1、IL-6 および GAPDH 遺伝子の発現量を解析した。

2) NT-SC 胚の IGF-1r、IGF-2r 遺伝子発現において個々の胚での発現量のバラツキが大きいことを示した(図1)。また、NT-SC および Vivo 胚の BC 期および EL 期において IGF-2r および IGFBP-3 遺伝子の発現頻度が胚発生に伴い高くなった(表1)。

IGFBP-2 遺伝子は NT-SC と Vivo 胚いずれも EL 期において発現量が急激に減少したが、両者の間に差はなかった。IGFBP-3 遺伝子は、Vivo 胚では EL 期に発現量が有意に増加したが、NT-SC 胚では発現量の増加が認められなかった(図2)。

3) 胚発生にともなう遺伝子発現動態を検討した結果、OCT-4 遺伝子発現量は、BC 期の NT-SC 胚で有意に高い値を示したが、EL 期胚では Vivo 胚と NT-SC 胚に差は認められなかった。また BC 胚の FGF-4 発現量は NT-SC 胚が有意に低い値を示したが、EL 胚では両区に差は認められなかった。

牛胚盤胞期1胚から複数の遺伝子発現量解析が可能であることを明らかにした。

牛体細クローン胚でいくつかの遺伝子において発現異常が認められた。また、それらのうち、発生に伴って体内受精胚と同等に発現するようになる遺伝子と、発現異常が継続する遺伝子の両方が存在することを明らかにした。

表 1. 胚発生にともなう IGF 関連遺伝子発現頻度の変化*

胚の 発生段階	胚の由来	遺伝子発現胚数/解析胚数(%)				
		IGF-2	IGF-1r	IGF-2r	IGFBP-2	IGFBP-3
BC	NT-SC	0/14 (0)	14/14 (100)	3/14 (21)	14/14 (100)	7/14 (50)
BC	Vivo	0/14 (0)	14/14 (100)	12/14 (86)	14/14(100)	13/14 (93)
EL	NT-SC	5/7 (71)	5/7 (71)	7/7 (100)	7/7 (100)	5/7 (71)
EL	Vivo	7/7 (100)	7/7 (100)	7/7 (100)	7/7 (100)	7/7 (100)

*GAPDH遺伝子発現はすべてのサンプルで確認された。

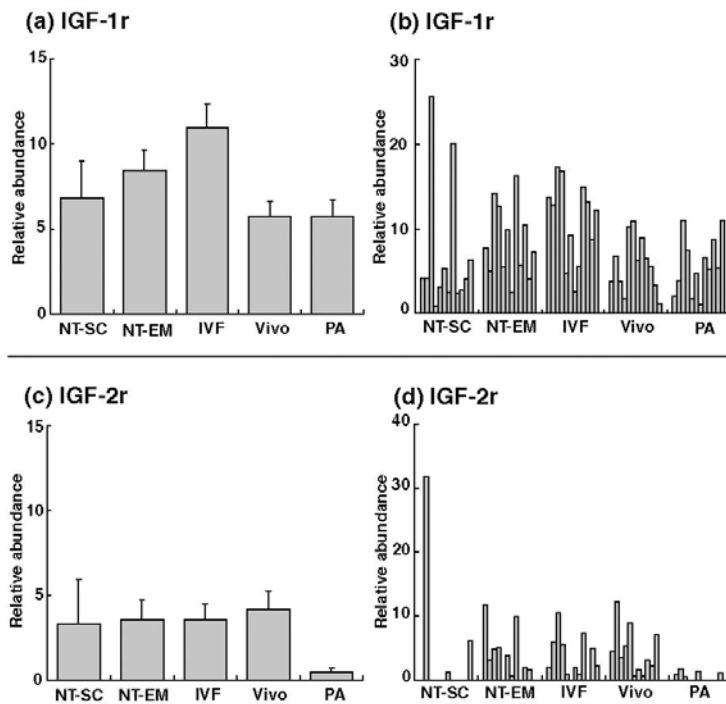


図 1. BCにおける IGF-1r および IGF-2r 遺伝子の発現量

(a),(c)は平均値、(b),(d)は個々の胚の発現量を示す。

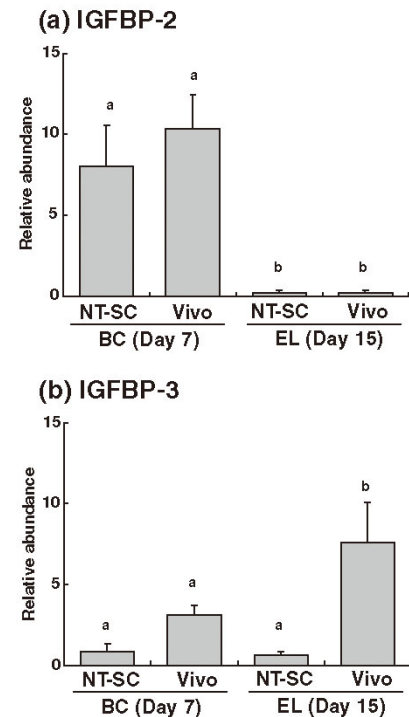


図 2. 胚発生にともなう IGFBP-2, IGFBP-3 遺伝子発現量の変化

4. 成果の活用面と留意点

1) 牛体細胞クローン胚で発現異常が認められる遺伝子があることを明らかにした。これは遺伝子診断による正常胚の選別法確立のための重要な知見として利用することができる。

5. 残された問題とその対応

- 1) 胚の一部から複数の遺伝子発現を解析する技術の開発。
- 2) 移植に供する体細胞クローン胚の遺伝子発現解析による選別法の確立。
- 3) 胚盤胞期の遺伝子発現と移植後の受胎率、正常産子作出効率の解明。