

(様式 2)

成績概要書 (2010 年 1 月作成)

研究課題：牛受精卵の多項目遺伝形質分析技術 (114681)

担当部署：畜試 基盤研究部 受精卵移植科・遺伝子工学科 家畜研究部 肉牛育種科

協力分担：なし

予算区分：道費 (一般)

研究期間：2006～2009 年度 (平成 18～21 年度)

1. 目的

遺伝情報を活用した受精卵の選抜を可能にするためには、わずかな DNA 試料から多数の量的形質座位 (Quantitative trait locus; QTL) 解析を行う必要がある。本試験では、全ゲノム増幅法を用いて DNA 試料を予備増幅した後に受精卵の QTL 解析を行う技術の検討を行った。

2. 方法

1) 全ゲノム増幅法として Primer extension preamplification-PCR (PEP-PCR) および Multiple displacement amplification (MDA) 法の増幅効率を比較した。培養線維芽細胞から DNA を抽出後に全ゲノム増幅を行い、その増幅産物から PCR 法で Sex-determining region Y (SRY) 遺伝子を検出して全ゲノム増幅効率を評価した。DNA 抽出は、PEP-PCR 法は Proteinase K-Tween 20 を用いる従来法あるいは水酸化ナトリウムを用いて、MDA 法は加熱処理による従来法あるいは水酸化ナトリウムを用いて行った。

2) MDA 法を利用した受精卵における性別判定、クローディン-16 (CL16)、バンド-3 (BND3)、ステアリン酸 CoA 脱飽和酵素 (SCD) および血液凝固第 XI 因子 (F11) の多型解析ならびに 16 種類のマイクロサテライト (MS) マーカー解析の精度を評価した。

3) 性別判定、CL16、BND3、SCD および F11 の多型解析ならびに MS マーカー (Carcass weight 1; CW1) 解析を実施した受精卵を移植して子牛を生産し、受精卵における QTL 解析精度を検証した。なお、本成績中では性別および遺伝病原因遺伝子型等の診断も含めて QTL 解析として表記した。

3. 成果の概要

1) Proteinase K-Tween 20 あるいは水酸化ナトリウムを用いる方法で細胞から DNA を抽出し、PEP-PCR 法で全ゲノム増幅を行った場合は、安定した SRY の検出感度は得られなかった (図 1)。MDA 法では、加熱処理に比較して水酸化ナトリウムを用いて細胞から DNA を抽出し全ゲノム増幅を行った場合に SRY の検出感度が高く、PEP-PCR 法に比較しても効率よくゲノム DNA が増幅された。

2) MDA 法を利用して、単一の受精卵 (胚盤胞) から性別判定ならびに CL16、BND3、SCD および F11 の遺伝子型を 95～100% の精度で判定できた (表 1)。種雄牛および供卵牛とそれらから得た受精卵の 16 種類の MS マーカー解析を行った結果、8 種類の MS マーカーでは両親と受精卵の間に矛盾がなかったが、別の 8 種類の MS マーカーでは 17～83% の矛盾が認められ、MS マーカーはその種類によって解析精度が異なることが明らかとなった。本法を使用し、単一の胚盤胞の 10～20% に相当する細胞を用いることにより、多数の QTL 解析が可能であった。

3) 子牛 3 頭における QTL 解析結果は、F11 の誤判定が 1 例あったことを除き、性別判定、多型解析および CW1 タイプのすべてで受精卵における判定結果と一致した (表 2 および 3)。

本試験では、受精卵 (胚盤胞) の 10～20% に相当する細胞から抽出した微量な DNA を全ゲノム増幅法によって予備増幅することで多数の QTL 解析が可能となり、遺伝形質によっては受精卵段階で選抜できることを明らかにした。

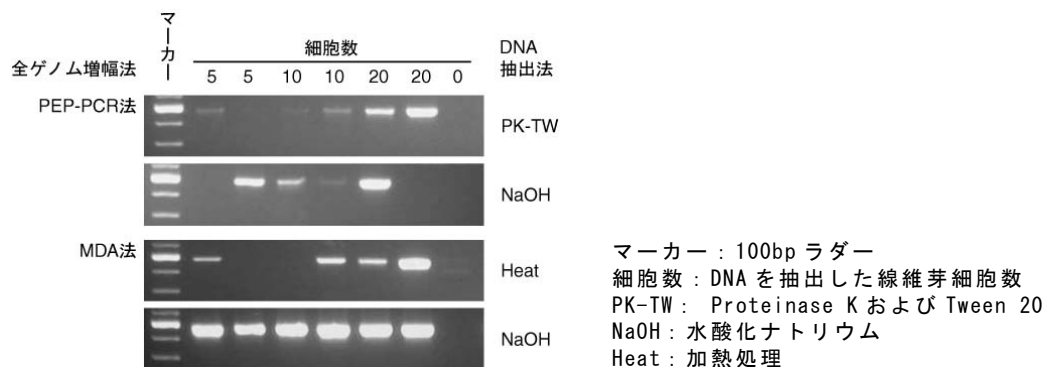


図1 全ゲノム増幅産物からの SRY 遺伝子の検出感度

表1 受精卵における複数の QTL 解析

座位	多型	正	誤	一致率
性別	雄	26	0	100%
	雌	13	0	
CL16	正常	31	0	97%
	ヘテロ	7	1	
BND3	正常	28	0	97%
	ヘテロ	10	1	
SCD	A/A	18	2	95%
	A/V	12	0	
	V/V	7	0	
F11	正常	3	1	95% #
	ヘテロ	14	0	
	ホモ	19	1	

受精卵において DNA が増幅されなかった 1 検体は除外した。

正常：野生型ホモ、ヘテロ：正常/変異型ヘテロ、ホモ：変異型ホモ、A/A：アラニン残基型ホモ、A/V：アラニン残基型とバリン残基型ヘテロ、V/V：バリン残基型ホモ

表2 受精卵移植による DNA 診断精度の検証

子牛	判定結果 (受精卵における結果/子牛における結果)				
	性別	CL16	BND3	SCD	F11
406T	雄/雄	正常/正常	正常/正常	AV/AV	正常/ヘテロ
401U	雄/雄	正常/正常	正常/正常	AV/AV	ホモ/ホモ
404U	雄/雄	正常/正常	正常/正常	AV/AV	ホモ/ホモ

正常：野生型ホモ、ヘテロ：正常/変異型ヘテロ、ホモ：変異型ホモ、A/A：アラニン残基型ホモ、A/V：アラニン残基型とバリン残基型ヘテロ、V/V：バリン残基型ホモ

表3 受精卵移植による CW1 判定精度の検証

子牛 DNA 試料	MS マーカー (bp)				CW1 タイプ
	DIK7013	DIK7015	DIK7018	NRKM-040	
406T 受精卵	239/241	292/296	270/274	122/124	Q/q
	血液 239/241	292/296	270/274	122/124	Q/q
401U 受精卵	239/239	296/296	270/270	124/124	Q/Q
	血液 239/239	296/296	270/270	124/124	Q/Q
404U 受精卵	237/239	290/296	266/270	112/112	Q/q
	血液 237/239	290/296	266/270	112/112	Q/q

太字は Q アリルを示す。NRKM-040 は種雄牛によっては 122bp 以外も Q である可能性があるため、今回は DIK7013、DIK7015 および DIK7018 を基準に CW1 タイプを判定した。

4. 成果の活用面と留意点

- 1) 全ゲノム増幅法を利用した遺伝子型や MS マーカー解析は、受精卵移植によって牛を改良する際の受精卵の選抜に活用する。
- 2) MDA 法による全ゲノム増幅は 18 時間を要するため、翌日まで受精卵を体外培養する必要がある。
- 3) 牛の遺伝病あるいは生産性に関連する遺伝子の型判定技術は、特許が取得あるいは出願されている場合があり、営利目的の利用には権利者からの特許実施の許諾を得る必要がある。

5. 残された問題とその対応

- 1) 全ゲノム増幅には 18 時間を要し、受精卵を保存せずに移植するためには全ゲノム増幅とその後の QTL 解析の迅速化が必要である。
- 2) 一般に細胞採取した受精卵を凍結保存すると受胎率が低下するため、本技術を有効に活用するためには凍結技術の向上が必要である。