８）DNA による牛受精卵の遺伝病診断

（受精卵の遺伝子解析による牛の遺伝性疾患診断法の開発）

北海道立畜産試験場　畜産工学部　遺伝子工学科　受精卵移植科
家畜生産部　育種科

１．試験のねらい

近年、牛の遺伝性疾患においては原因遺伝子の解明が進み、血液から抽出した DNA を用いた遺伝子診断による疾患保因牛の特定および排除が進められているが、優良な種雄牛が遺伝性疾患を保因している場合も多く、それらを完全に排除することは困難である。遺伝性疾患保因牛を繁殖に供した場合でも、受精卵の段階で遺伝性疾患の保因の有無が診断できれば、遺伝性疾患をもたない受精卵を選別し移植することで正常な子牛のみを生産することが可能となる。その結果、遺伝性疾患保因種畜を効率的に育種改良に利用することができる。そこで本試験では、牛受精卵における遺伝性疾患の診断技術の開発を行った。

２．試験の方法

(1) 受精卵からの細胞採取法の検討

牛受精卵から細胞を採取する方法として、マイクロピペットを用いた吸引法と金属刃による切断法（口絵参照）を検討した。

(2) 細胞からの DNA 抽出法の検討

採取した細胞から DNA を抽出する方法として、蛋白分解酵素を用いる酵素法、熱処理による加熱法、凍結融解を繰り返す凍結融解法を検討した。

(3) PCR に用いる DNA サンプル量の検討

受精卵の損傷を最小限するため、PCR に用いることのできる最少 DNA 量の検討を血液から抽出した DNA とバンド３欠損症診断用プライマーを用いて行った。

(4) 牛受精卵における「バンド３欠損症」の診断

牛受精卵において遺伝性疾患を診断する方法を、「牛バンド３欠損症」をモデルに検討した。バンド３欠損症保因種雄牛の精液を用いて人工授精して得られた受精卵から細胞を採取し、抽出した DNA とバンド３診断用プライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物を制限酵素処理(PCR-RFLP 法；図１)し、バンド３欠損症型判定（正常受精卵、ヘテロ保因受精卵の判定）を行った。一部のサンプルでは同時に受精卵の性判別も試みた。

３．試験の結果

(1) 小型化桑実期以前の受精卵では吸引法によって数個の細胞を採取することができ、採取後の受精卵の細胞数も多かった（表１）。

(2) いずれの DNA 抽出法においても PCR 産物が得られたが、少数細胞からの DNA 抽出には酵素法が適していた。

(3) 細胞１個の DNA 量に相当する 3pg の DNA を用いた場合においても PCR 産物が得られ、最低でも細胞１個分の DNA を用いることで遺伝性疾患の診断が可能であると考えられた。

(4) バンド３欠損症の診断を行ったサンプルのうち、ほぼ全てのサンプルにおいて診断が可能であった（図２、表２）。バンド３欠損症の診断と性判別を同時に行った場合、１例を除いて、両方診断することができた（表３）。

本技術を用いて受精卵の遺伝子診断を行うことによって、遺伝性疾患保因種畜から正常子牛のみを生産することが可能となった。さらに本技術は、受精卵から採取するサンプル量を増やすことなしに性判別と遺伝性疾患の診断を行うことを可能とし、受精卵の付加価値をさらに高める技術と考えられる。また、本技術の他の遺伝性疾患(表 4)への応用はもとより、現在行われている家畜の生産形質の遺伝的解明が進めば、本技術を用いることによりそれらの形質についても受精卵における診断が可能と考えられ、新たな技術との融合、応用も期待される技術である。

表１　細胞採取後の受精卵の細胞数

	供試卵数	細胞採取後の受精卵の細胞数
吸引法	16	36.1±2.6
切断法	15	23.3±2.1

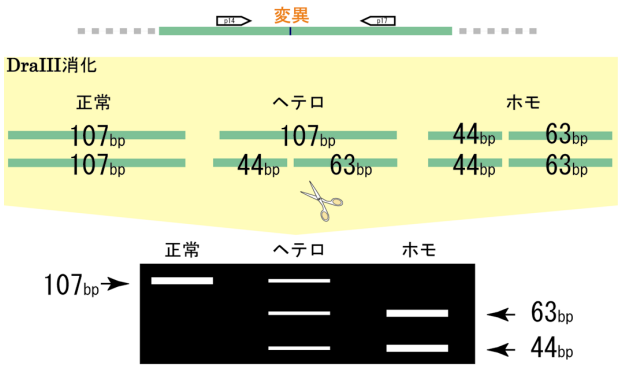
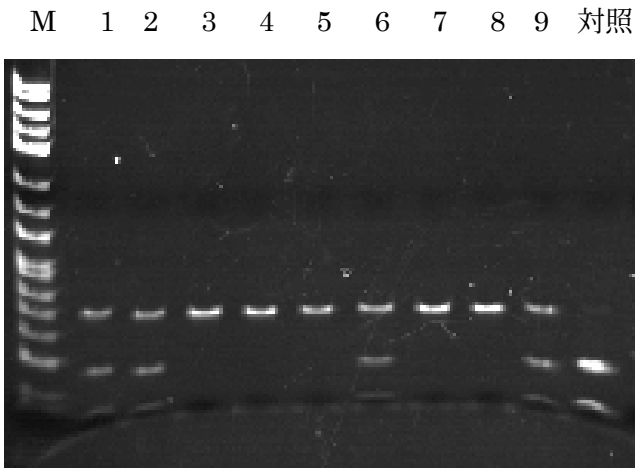


図１　バンド３欠損症の PCR-RFLP による診断



（N:正常受精卵、He:ヘテロ保因受精卵、
Ho:ホモ接合型血液由来 DNA）

図２　PCR 産物の制限酵素消化によるバンド３欠損症の診断

表２　受精卵におけるバンド３欠損症の診断

供試受精卵数	判別 ヘテロ 正常受精卵	保因受精卵	不明	判別率（%）
62	36	25	1	98.4

表３　受精卵におけるバンド３診断と性判別

供試受精卵数	バンド３診断数（%）	性判別数（%）
39	39 (100)	38 (97.4)

表４　遺伝子診断が可能である主な牛の遺伝性疾患

白血病粘着不全症（BLAD）
ウリジル酸合成補酵素欠損症
シトルリン血症
バンド３欠損症
第 XIII 因子欠乏症
クローディン 16 欠損症
モリブデン補酵素欠損症
チェディアックヒガシ症候群

【用語解説】

バンド３欠損症：黒毛和種牛にみられる１塩基置換型の遺伝性疾患。常染色体劣勢。赤血球の形態学的異常、極度の貧血を呈する。

制限酵素：　２本鎖 DNA の特定の塩基配列を認識し、DNA を切断する酵素