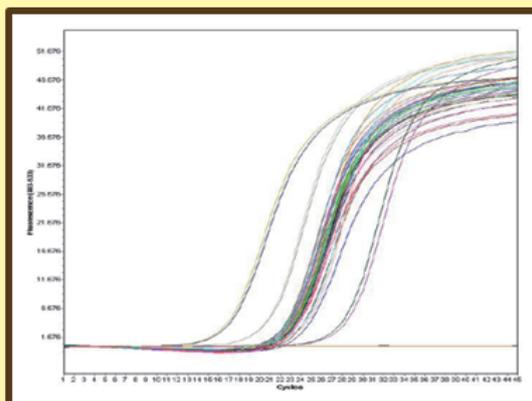




体細胞クローン家畜・胚における分子生物学的な 特性調査のためのマニュアル

—ミトコンドリア DNA・テロメア長・胚の遺伝子発現—



2012年3月

農研機構 畜産草地研究所

【表紙の説明】

左上：ドナー牛（左端）とこの牛に由来する5頭の体細胞クローン牛

右上：体細胞クローン牛に由来するブロック肉（うちもも）

左下：PCR装置

右下：リアルタイムPCRにおける増幅曲線の例

体細胞クローン雄牛の精子テロメア長の正常性

Normal telomere lengths of spermatozoa in somatic cell-cloned bulls

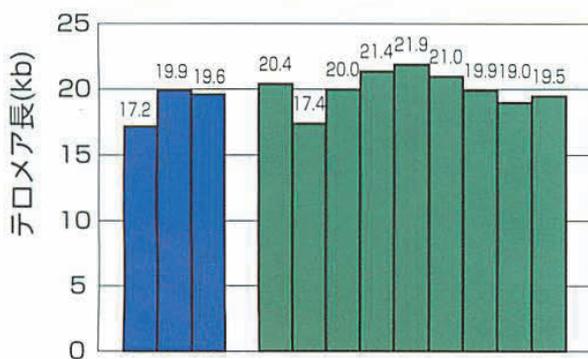
テロメアとは、染色体の末端にあるDNA配列で、加齢にともない短縮して細胞を老化へと導きます。高齢の種雄牛の筋肉組織の細胞から作出された体細胞クローン牛においては、精子と白血球のテロメア長は正常な長さであり、細胞提供牛の老化がリセットされていました。その精液を普通の雌牛に人工授精して得られた次世代子牛においても白血球テロメア長は正常でした。これにより、クローン雄牛が種雄牛として長期間安全に供用されることが期待されます。



左から、高齢の細胞提供牛とそのクローン牛2頭



白血球のテロメア長



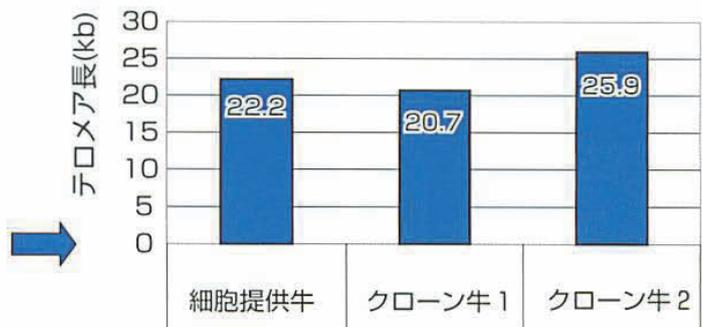
左から細胞提供牛(14歳時)、クローン牛2頭(0歳時) その次世代子牛9頭(0歳時)

白血球テロメア長は、細胞提供牛においては高齢のため短いですが、クローン牛とその次世代子牛では年齢相応の長さです。これらの牛はいずれも、外観・行動ともに現在まで異常は見つかっていません。

共同研究担当

(独) 農業生物資源研究所 大分県畜産試験場

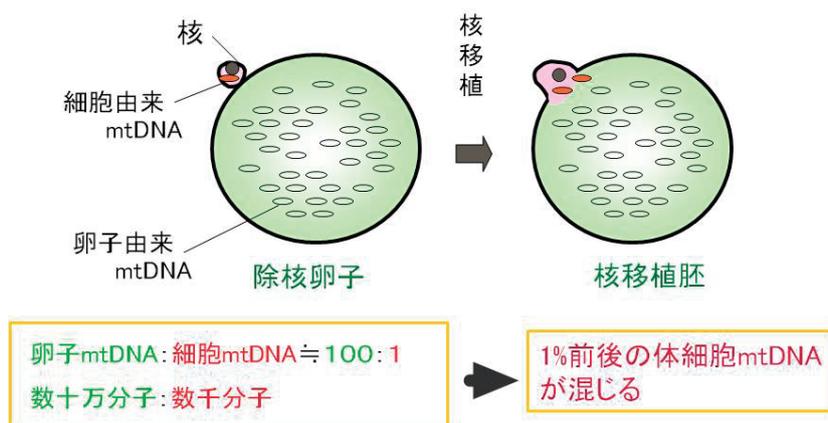
精子のテロメア長



通常の雄牛では、テロメラーゼという酵素により年齢に関わらず精子テロメア長は20.5kb以上に保たれています。クローン牛も正常な長さでした。

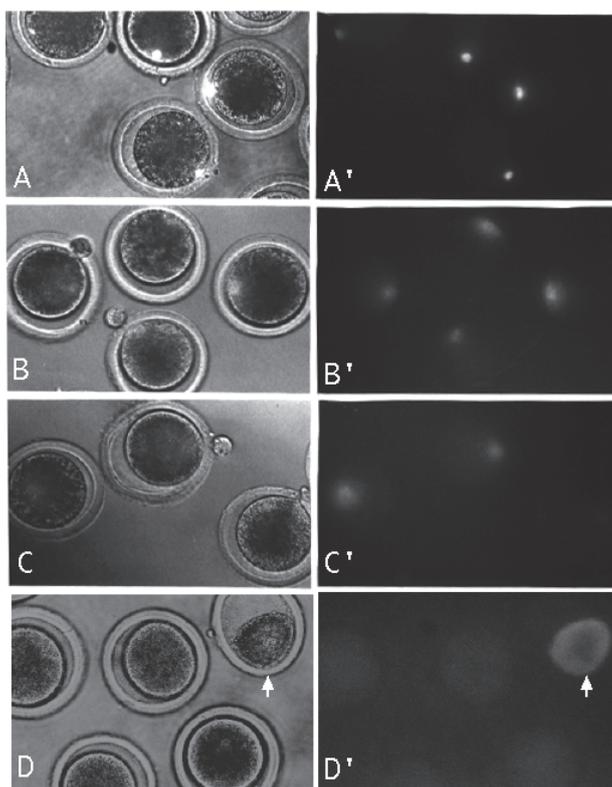


体細胞クローン牛の次世代子牛



核移植とミトコンドリア

核移植胚は核と共に体細胞の mtDNA が混入し、卵子由来の mtDNA とのヘテロプラズミーとなる。



体細胞核移植時におけるドナー細胞由来のミトコンドリアの動態

ドナー細胞を予め蛍光色素 MitoTracker™ Green FM にて染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。A および A' : 細胞融合前、B および B' : 細胞融合直後、C および C' : カルシウムイオノフォア処理後、D および D' : シクロヘキシミドを添加した活性化培地にて5時間培養後。A~D : 明視野+蛍光 (450-490 nm band-pass filter)、A' ~D' : 蛍光。矢印は壊れた胚を示す。倍率 200 X。

[Takeda *et al.* (2003)]

技術レポート 12 号
体細胞クローン家畜・胚における分子生物学的な特性調査のためのマニュアル
の刊行にあたって

本マニュアルは、先に刊行された「体細胞クローン牛生産のための周産期と新生子管理のマニュアル（技術レポート 8 号、平成 22 年 3 月）」および「牛における核移植胚作出と胚の品質評価のためのマニュアル（技術レポート 9 号、平成 23 年 3 月）」の姉妹編で、体細胞クローン家畜・胚の特性調査に使われてきた分子生物学的な研究手法を紹介している。

今回取り上げた手法のうちミトコンドリア DNA とテロメア長の解析法は、旧農水省畜産試験場／農研機構畜産草地研究所の求めに応じ、全国の畜産関係場所より提供された体細胞クローン牛に由来するサンプルに適用されたものである。平成 10～14 年度頃の核移植技術全国検討会（現 核移植・受精卵移植技術全国会議）において、その解析結果がしばしば紹介されていたことを記憶されている方も多いと思う。これらの解析によって、体細胞クローン牛の健全性に関する多くの知見が蓄積された。この場を借りて、サンプル提供にご協力いただいた関係各位にお礼申し上げたい。

マニュアルの執筆陣は、その当時からミトコンドリア DNA やテロメア長の研究に携わってきた研究者、そして、分子生物学を専門とする若手研究者である。したがって、ミトコンドリア DNA とテロメア長の実験マニュアルによって、その当時、提供していただいたサンプルがどのような手法で解析されていたのかを知ることができる。また、胚の遺伝子発現の実験マニュアルは、現在の畜産草地研究所において常用している研究手法の一端を垣間見ることができる。いずれも現役の研究者ならではの細かなポイントも、それぞれの文体で書き込まれており、優れた実験書になっている。

本マニュアルによって提供される情報が家畜クローン研究はもとより、家畜や胚を用いる分子生物学的な研究に関心を持つ研究者の参考になれば幸いである。

平成 24 年 3 月

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
畜産草地研究所 所長 松本 光人

目 次

マニュアル

1. 家畜ミトコンドリア DNA の解析方法	
(1) 組織サンプルからのミトコンドリア分画および DNA 抽出法	1
① 試料採取	
② 家畜の肝臓・腎臓からのミトコンドリア分画精製法	
③ 家畜の骨格筋・心筋からのミトコンドリア分画法	
④ 精製ミトコンドリアからの DNA 抽出	
⑤ 準備するもの	
(2) 組織サンプルからの mtDNA 変異検出法	6
① サンプル調整および DNA 抽出法	
② PCR 法による mtDNA 断片増幅法	
③ シークエンス解析法	
④ RFLP (制限酵素切断長多型) 検出法	
⑤ SSCP (一本鎖高次構造多型) 検出法	
(3) 卵子 1 個からの mtDNA 解析法	13
① 卵子からの DNA 抽出法	
② ウシ卵子 1 個の mtDNA コピー数の推定法	
(4) クローン家畜におけるミトコンドリアの解説	16
① クローン家畜の mtDNA	
② クローン牛のミトコンドリアタンパク質発現量差異の網羅的解析	
2. テロメア長の測定方法	22
① 実験手順	
② 準備するもの	
③ テロメア長の測定法の解説	
3. 胚盤胚のバイオプシー検体による遺伝子発現解析法	30
① 胚盤胞からのバイオプシー断片回収	
② PicoPure® RNA Isolation Kit を用いたバイオプシー細胞からの RNA 抽出法	
③ ReverTraAce® qPCR RT Kit を用いた cDNA 合成法	
④ リアルタイム PCR マシンを用いた遺伝子発現解析法	
⑤ データの解析・評価	
⑥ トラブルシューティング	
⑦ 準備するもの	
⑧ 終わりに	

参考資料

マニュアル

1. 家畜ミトコンドリア DNA の解析方法

(1) 組織サンプルからのミトコンドリア分画および DNA 抽出法

①試料採取

BSE 検査が必要な牛のサンプルは試料採取後ただちに液体窒素に投入し凍結、 -80°C で保存とする。

それ以外のサンプルは氷上に採取し、採取後ただちにミトコンドリア分画にまで精製することが望ましい。凍結保存した組織からミトコンドリア分画を採取することはできるがその収量は著しく少なくなる。

凍結する際は、放血した組織から試料として1 cm 角程度（次のステップで使用する量）に切って凍結する。

試料の量が多すぎると遠心分画がうまくいかないので注意する。

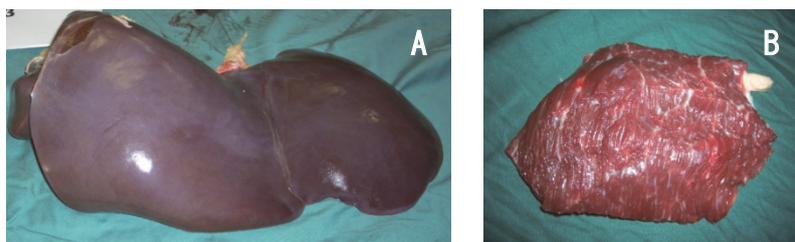


図1. A.牛の肝臓；B.牛の大腿筋

サンプリングする筋肉の部位は予め決めておく。

②家畜の肝臓・腎臓からのミトコンドリア分画精製法

1) 凍結サンプルは氷上のビーカー内に置き、冷 PBS (-) もしくは、冷 0.25 M ショ糖溶液で洗う。0.25 M ショ糖溶液を少し加え、ハサミで細断する（図2）。

一連の作業で一番手が疲れるところ。



図2. サンプルをハサミで細断

- 2) 細断後、溶液ごとビーカーからホモジナイザー (30 ml用) のガラス容器に移す (図3)。
溶液が汚れている場合は氷上に静置し、上清をピペットやスポイト等で静かに除いて新しい0.25 M ショ糖溶液を加える (~30 ml)。



図3. ホモジナイズ前の試料



図4. テフロンホモジナイザーでの作業

- 3) 氷中でホモジナイズする (図4)。テフロンホモジナイザーをゆっくり上下移動させる (700 rpm, 2~3回程度)。

ホモジナイズしすぎるとミトコンドリアの収量が悪くなるので注意。

- 4) ホモジナイズしたものをすべて15 ml遠心チューブに移し、200 x g (1,000 rpm) で5分間遠心する。(遠心している間に新しい15 mlチューブに冷0.35 M ショ糖溶液を5 mlずつ分注し、氷上に置いておく。)

- 5) 上清を5~10 mlピペットでとり、0.35 M ショ糖溶液の上に5 mlずつ重層する (図5)。
700 x g (2,000 rpm)、ブレーキなしで10分間遠心。

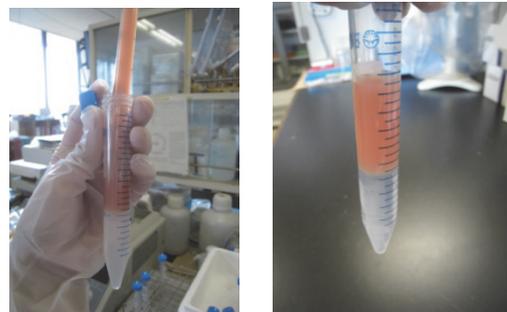


図5. 重層中 (左) と重層後 (右)

液面にピペットの先を付けゆっくり静かに重層する。一連の作業で一番気をつけるところ。

- 6) 上層を10,000 x g 対応の10 mlオークリッジ遠沈管に移す。

液面ぎりぎりまで取らない。

- 9,000 x g (8,200 rpm) で10分間遠心操作。



図6. ミトコンドリア画分の沈殿物

- 7) 沈殿 (ミトコンドリア画分:図6) に0.25 M ショ糖溶液8 mlを加え、スポイトなどで沈殿を再浮遊する。

9,000 x g (8,200 rpm) で 10 分間遠心操作。

- 8) 沈殿に 0.25 M ショ糖溶液を 1 ml 加え、再浮遊し、スポイト等で 1.5 ml 遠心チューブへ移す。微量高速遠心機で 10,000 rpm, 5 分間遠心操作し、上清を除く。分注して保存する場合は、このステップで何本かの 1.5 ml チューブに分注して遠心操作をするとよい。

③家畜の骨格筋・心筋からのミトコンドリア分画法

作業はほとんど上記の肝臓の場合と同じであるが、用いる溶液が異なるので注意する。また、収量は同じ量の肝臓と比較して格段に少ない。

- 1) 凍結サンプルは氷上のビーカー内に置き、冷 PBS (-) もしくは、冷 0.15 M 塩化カリウム溶液、もしくは Chappel-Perry 液で洗う。0.15 M 塩化カリウム溶液もしくは Chappel-Perry 液を少し加え、ハサミで細断する。

筋肉は肝臓より組織が固いので、ホモジナイザーで崩れにくい。このステップでよく細断しておくことがコツ。細断していくとねっとりしてくる。

- 2) 細断後、溶液ごとビーカーからホモジナイザーのガラス容器に移す。氷上に静置し、溶液が汚れている場合は上清をピペットやスポイト等で静かに除いて新しい 0.15 M 塩化カリウム溶液を加える (~20 ml)。

- 3) 氷中でホモジナイズする。テフロンホモジナイザーをゆっくり上下移動させる (700 rpm, 2~3 回程度)。

底にたまるサンプルもできるだけホモジナイザーにかける。組織が固い分、力がある。回転を高速にしすぎるとミトコンドリアが潰れて収量が悪くなる。

以降は肝臓の項の 4) に続く。

④精製ミトコンドリアからの DNA 抽出

- 1) 市販の DNA 抽出キットを用いて精製する。

ミトコンドリア DNA (mtDNA) を傷つけないように抽出する必要がある場合、ヴォルテックスはゆるめに。(抽出キットが高分子用であることが望ましいと思われるが、著者らは試したことがない。) また①において凍結しない組織を使用することが望ましい。抽出キットではなく従来法をもちいる場合、ミトコンドリアの溶解には SDS 溶液ではなく、サルコシル溶液を用いるとよい。その後、フェノール/クロロフォルム処理、エタノール沈澱にて回収することには変わりはない。

2) 必要な器具

- ・テフロンホモジナイザー (株)池本理化工業 812-771-06
(ポッター型) 30 ml用 アズワン 5-5721-05 等
→洗浄後オートクレーブ。

30 mlがない場合は 10 mlで代用可。その場合、
全体の量を 1/3 程度にする。

テフロンホモジナイザーがガラス管に入れて自然に
ゆるゆると降りていくくらいの堅さが OK。降りない
くらい堅い、あるいは、ストーンと降りるのは NG。

- ・ホモジナイザー用攪拌装置 (株)池本理化工業 343-061-01
- ・高速冷却遠心機 8～10 mlチューブを 10,000 x g で遠心できるもの
TOMY Suprema 等
- ・微量高速冷却遠心機 1.5 mlチューブを 10,000 x g で高速遠心できるもの
上記機種でも対応可
TOMY MX-105 等
- ・遠心チューブ
 - ・ 15 ml遠心チューブ (使い捨て)
 - ・ オークリッジ遠沈管 (10 ml、50,000 x g まで可、オートクレーブ可 ; Nalgene 3115-0010 等)→洗浄後オートクレーブし、繰り返し使用出来る。

(2) 組織サンプルからの mtDNA 変異検出法

①サンプル調整および DNA 抽出法

DNA 抽出にキットを用いる場合は、それぞれのマニュアルに従う。組織などから抽出操作を経ないで PCR できるキットはこの過程を省略できるであろう。

ア. 毛根

1) 引き抜く部分をせっけん、および水でよく洗う。

他の個体の毛が混入しないように注意する！

2) 毛抜きで引き抜き、70%エタノールの入った 15 ml チューブに入れる。運搬中の常温保存可。

3) ピンセットで毛をつまみ、ハサミで毛根をチューブの底に切り落とす。

少々毛が残っていても大丈夫

4) DNA 抽出キット (DNeasy Blood & Tissue Kit, キアゲン社等) により抽出する。

イ. 血液

1) EDTA 採血管を用いて採血する。ヘパリン採血管は用いない (DNA が採れない)。

2) 抽出にキット (DNeasy Blood & Tissue Kit, キアゲン社等) を用いる場合、全血を用いるので凍結保存可。

注意：キットによっては収量にムラのあるものがあるので使用方法に留意する。

ウ. 卵子 (後述、p13)

②PCR 法による mtDNA 断片増幅法

ア. ウシ及びブタの mtDNA の変異

哺乳動物の mtDNA は約 16 kb の環状二本鎖 DNA である。塩基置換が最も多い領域は Displacement (D-) ループ領域と呼ばれる非コード領域である。

ウシではほぼ母系ごとに塩基配列が異なっている [春海ら (1994), 武田ら (1995), 万年 (2002)]。改良の経緯から黒毛和種などの和牛とホルスタイン種など輸入種との明確な塩基変異の検出は難しい。一方、これら *Bos taurus* 系 (瘤なし; ヨーロッパ系) 品種と *Bos indicus* 系 (瘤あり; ゼブ牛、インド系) とは明確にグループ分けができる [Loftus *et al.* (1994), Takeda *et al.* (2004)]。

ブタの D-loop 内変異はウシほど多様ではないが、ヨーロッパ系品種（ランドレース）とアジア系品種（梅山豚）で mtDNA 型は明確に異なっている[三上ら(1988), Takeda *et al.* (1995)]。

イ. プライマーの設計

・目的に合った既報のプライマーを使用する。PCR 条件は使用酵素や機器によって異なる場合があるので条件設定を確認する必要がある。

・参考となるプライマーが既報にない場合は、自分で設計する。mtDNA の塩基配列についてはウシ、ブタを含め数多くのデータが DDBJ 等の DNA データバンクに登録されている。データベースから対象となる家畜のデータを検索し、ターゲットを決め、自分好みのプライマー配列を調節する。変異の多い部分にプライマーを設計してしまうと、モノによっては増えない、増えにくいといった弊害が出るため、なるべく変異のない部分にプライマーを設計する。WEB 上にプライマー検索用の無料ソフトが公開されている（Primer3、<http://primer3.sourceforge.net/>）。

表 1. 家畜の DNA 配列をターゲットとした PCR プライマー例

	プライマー名	プライマー塩基配列	増幅産物(bp)	参考文献	
ウシ	mtF1 mtR3	TAGCTTAACCCAAAGCAAGGCACTGAAAAT AGACGGCCTGGGATTGCGTCTGTTTTAGTCCT	7.5 k	Takeda <i>et al.</i> (2004)	
	mtF2 mtR2	TTATAGCCAATTCCACCACCACTACCCTGTCAT CCTAGAAGTGCGAAAAAATAATACGGGTGCTG	8.5 k	Takeda <i>et al.</i> (2004)	
	mtF3 mtR1	ACAGTTTCATACCCATTGTCCTTGAGTTA TGGGGGTTGATGGTGAGACTGCAGTTTCTT	7.8 k	Takeda <i>et al.</i> (2004)	
	DLL1 DLL2	GCATTTTCAGTGCCTTGCTTTGGGTTAAGC AGTCTCACCATCAACCCCAAAGCTGAAG	1.0 k	Harumi <i>et al.</i> (1994)	
	DLS1 DLS2	CCATACACAGACCACAGAATGA AGTCCAAGCATCCCCAAAATA	499	Takeda <i>et al.</i> (2007)	
	DLS3 DLS4	CCATGCATATAAGCAAGTACATGAC CTGATTAGCCATTAGTCCATCGAG	308	Takeda <i>et al.</i> (1997, 1999)	
	CYTB1 CYTB2	ACATCGGCACAAATTTAGTC CTATGGCAATTGCTATGATG	120	Takeda <i>et al.</i> (2010)	
	水牛	CYTB1 CYTB2	CTGAATGGTACTTCCTATTC TGAATGGCCGGAACATCATA	153	Srirattana <i>et al.</i> (2011)
	ブタ	DL1 DL2	GTACATAGCACATATCATGTC TAAGGGGAAAGAGTGGGCGAT	227	Takeda <i>et al.</i> (1995)
		CYTB1 CYTB2	ATCGTTGTCATTCAACTACA CTCCTTCTCTGTTTACAAG	1.1k	Watanobe <i>et al.</i> (1999)

ウ. PCR

・DNA ポリメラーゼは様々な種類があるが、多型解析用は収量重視ではなく、正確さを重視した酵素を選択する。(筆者はRoche社のFastStart™ Taq DNA ポリメラーゼ等を使用した。)

・10 kb以上の長いDNAをPCRで増幅する場合は、長鎖DNA増幅に適したTaqポリメラーゼを選択する。(筆者はTaKaRa社のLA Taq等を使用した。PCRの原理や酵素の選択方法などTaKaRa社のHPに解説あり。<http://catalog.takara-bio.co.jp/index.asp>)

③シーケンス解析法

ア. DNA 多型検出手法としての有効性

メリット	<ul style="list-style-type: none">・塩基配列の未知な検体について、塩基変異を明らかにすることができる。・2種類のDNAの混在についても確認ができる。
デメリット	<ul style="list-style-type: none">・高額な機械(シーケンサー)が必要である。検体が少数の場合はシーケンス解析を外注する方が安価。・2種類のDNAの混在比については算出できない。

④RFLP(制限酵素切断長多型)検出法

ア. DNA 多型検出手法としての有効性

メリット	<ul style="list-style-type: none">・制限酵素切断部位に塩基変異の箇所が予めわかっている場合は特に有効である。・多数検体を迅速に安価に解析できる。・塩基配列の異なる2種類のDNAの混在比を検出できる(但し、切れ残りバンドに留意する)。
デメリット	<ul style="list-style-type: none">・制限酵素切断部位に塩基変異がない場合や未知の場合は不向きである。・DNAバンド検出にエチジウムブロマイド(発がん物質)等を使用する。

混在比を解析する場合は、必ず個々のコントロールサンプルを一定の割合で混ぜたスタンダードを作成し、検量線を作成する(50%あたりで直線とはならない)。これにより、制限酵素による切れ残り(切断部位の異なる一本鎖DNA同士がアニーリングした二本鎖DNAは制限酵素で切断されない)等の補正を行う。

⑤SSCP（一本鎖高次構造多型）検出法

ア. DNA 多型検出手法としての有効性

メリット	<ul style="list-style-type: none"> ・未知の変異を検出できる。 ・制限酵素切断部位に変異がない場合でも塩基変異の検出ができる。 ・塩基配列の異なる2種類のDNAの混在比を検出できる。 ・解析するDNAは500 bp以下が望ましい。(長いDNAの場合、制限酵素で切断後に泳動すると、変異が検出されることがある。)
デメリット	<ul style="list-style-type: none"> ・塩基変異があるからといって必ずしも変異が検出されるとは限らない。(変異が検出されない場合もある。) ・予め泳動条件の検討が必要。泳動条件によって結果が不安定となりやすい。 ・劇物であるアクリルアミドおよび銀染色(有機溶媒)を使用する。

イ. ウシ mtDNA D-loop 領域内高変異部位をターゲットとした PCR-SSCP 法

- 1) ウシ DLS1, DLS2 (表 1 参照) を使用し、PCR 法にて DNA 断片を増幅する。
- 2) PCR 産物 6 μ l を用いて全量 20 μ l にて制限酵素 *Hpa*II 処理を行う。
- 3) 制限酵素処理を行った 1 μ l を 95%ホルムアミド溶液 5 μ l に加え、95°Cのブロック恒温槽で5分間熱する。(この操作により DNA を一本鎖に乖離する。)
- 4) 氷上で10分間十分冷却。(一本鎖に乖離した DNA はそれぞれ高次構造をとる。)
- 5) 4°Cの温度条件下、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)で0.5 X TBE バッファーにて165 V、3.5 時間、電気泳動を行う。
- 6) 泳動後のアクリルアミドゲルはガラス板から外し、銀染色法(Silver stain plus kit、Bio-Rad 社等)にてDNAバンドを検出する。

サンプルを入れる前にゲルのウェルをよく洗う。

銀染色はゲル板の傷や蛋白質などの汚れも染めてしまうので、扱いには特に注意を払う。ゲルには触らない。手袋を着用した手で触ると手袋の跡が出る。プラスチック製のヘラ等で扱う。また、ゲル板は素手で触らない。傷のないものを用い、泳動後はアクリルアミドゲルの破片をよく落とし、洗剤を用いてきれいに洗浄する。エタノールを噴霧し、ホコリを生じない紙(筆者らはケイドライ、クレシア社、製品番号 62701 を使用)などで水分を拭き取った後、汚れや傷がつかないようにプラスチック容器に保管する。ゲル作成時にも、エタノール噴霧し、ケイドライで拭き上げたガラス板を用いる。

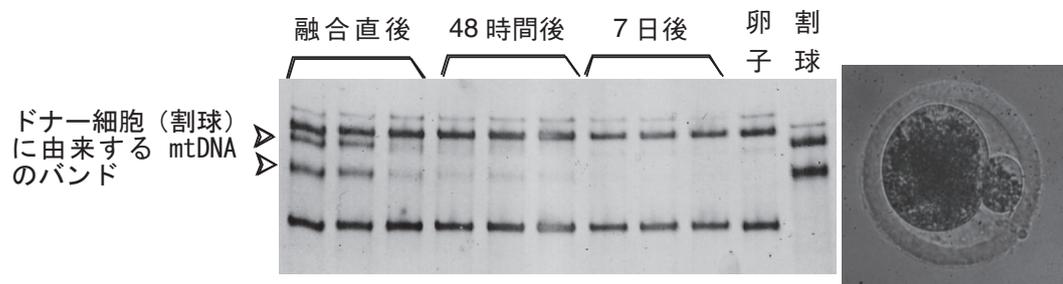


図7. PCR-SSCP法を用いて検出した牛受精卵核移植胚の割球および除核卵子由来 mtDNA の混在

融合直後、48 時間後、7 日後：各発生段階の受精卵クローン胚、卵子：レシピエント卵子、割球：ドナー細胞として用いた割球。胚の発育に伴って割球由来 mtDNA の割合が減少する様子がみられた。
[Takeda *et al.* (1999)]

ウ. ブタ mtDNA D-loop 領域内高変異部位をターゲットとした PCR-SSCP 法

1) ブタ DL1, DL2 (表 1 参照) を使用し、PCR 法にて DNA 断片を増幅する。

2) 増幅産物を適宜希釈する。

量が多すぎると電気泳動でうまくバンドが分けない。また、銀染色の許容範囲を超えた DNA バンドは透明に反転するため、濃淡による混在比の計測はできない。

3) 制限酵素処理を行った $1 \mu\text{l}$ を 95%ホルムアミド溶液 $5 \mu\text{l}$ に加え、 95°C のブロック恒温槽で 5 分間熱する。

4) 氷上で 10 分間十分冷却。

5) 4°C の温度条件下、5%グリセロールを含む 8%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) で 0.5 X TBE バッファーにて 165 V、4 時間、電気泳動を行う。

6) 泳動後のアクリルアミドゲルはガラス板から外し、銀染色法 (Silver stain plus kit, Bio-Rad 社等) にて DNA バンドを検出する。

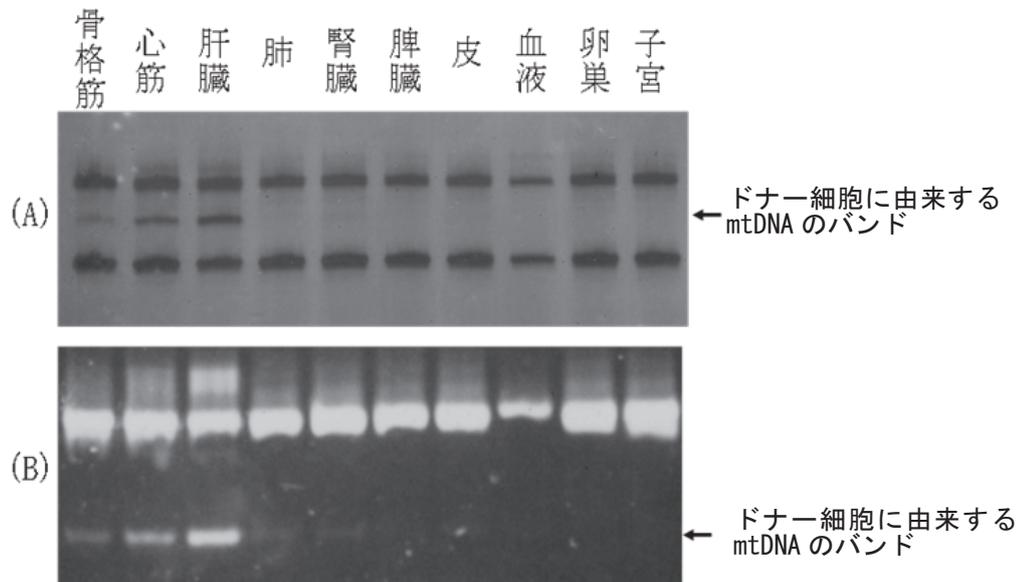


図8. PCR-SSCP 法(A)および PCR-RFLP 法(B)を用いて検出した体細胞クローン豚の mtDNA 型

レシピエント卵子（ランドレース）由来の mtDNA 型が主であるが、臓器によってはドナー細胞（梅山豚）由来の mtDNA（矢印）が検出された。(B)は PCR 増幅断片を制限酵素 *Tsp509I* で切断し、6%アクリルアミドゲル電気泳動後、SYBR Gold (Molecular Probes 社) にて検出した。

[Takeda *et al.* (2006)]

エ. バッファー組成

・95%ホルムアミド溶液	ホルムアミド	950 μl
	0.5 M EDTA	40 μl
	10 X 電気泳動用指示薬	10 μl
	→冷蔵保存	

- ・50%アクリルアミドストック溶液（劇物）
 - アクリルアミド（モノマー）
 - N, N'-メチレンビスアクリルアミド
 - スターラーにて攪拌（ただし静かに）溶解
 - （吸熱反応なので、溶けにくい場合は37°Cの温湯中で溶解させる。）
 - 0.45 μm フィルターを通す。（脱気効果もある。）
 - 遮光瓶にて冷蔵保存。（劇物管理）

冷蔵保存すると結晶ができる場合があるので、あらかじめスターラーパーを入れておくとよい。

・ 10%APS APS (過硫酸アンモニウム, Ammonium persulfate) 0.02 mg
 ミリ Q 水 2 ml
 →冷蔵保存 (～1 ヶ月使用可)

・ SSCP 用 6 % アクリルアミドゲル <ミニゲル 1 枚分 (全量 10 ml) >
 ミリ Q 水 7.23 ml
 50% グリセロール 1.0 ml
 10 × TBE 0.5 ml
 50% アクリルアミドストック溶液 1.2 ml

室温に戻してから使用する。結晶がある場合はスターラーで再融解する。室温が低い場合は、30℃くらいの温湯中で融解する。

→50 ml プラスティックチューブ (ない場合はきれいに洗浄したガラスビーカーを用いる) にとりわけ、揺すって混ぜる。

10% APS 60 μl
 TEMED (N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン) 10 μl

→TEMED を加えたらただちに混ぜ、ただちにゲル板に流し込む。気泡が入らないようコームを差し込む。

オ. 必要な器具

・ SSCP 用電気泳動装置 (ミニゲル用) レゾルマックス・二連ミニスラブ (ATTO, AE-6510)
 熱交換器が付いたスラブ型ポリアクリルアミドゲル電気泳動装置

・ 電気泳動装置 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO, AE6530M)

温度を制御する恒温システムがない場合は、クロマトチャンパー内でペリスタポンプにより上層と下層のバッファーを循環させながら、泳動するとよい。

(3) 卵子 1 個からの mtDNA 解析法

① 卵子からの DNA 抽出法

- 1) プロナーゼ処理およびピペッティング等により透明帯を除く。
- 2) 6 穴の PBS (－) に移し、6 回洗う。
- 3) 10 μ l の PCR グレード水を分注したシリコナイズチューブに移す。
- 4) -80°C 保存。
- 5) 微量 DNA 抽出キット (QIAamp DNA Micro Kit, キアゲン社等) を用いて DNA を精製する。精製した DNA を mtDNA コピー数の計測に用いる場合は、1 週間以内に下記の②を行う。

② ウシ卵子 1 個の mtDNA コピー数の推定法

家畜卵子 1 個あたりの mtDNA コピー数 (分子数) は、家畜種によっても異なるが、おおよそ $10^5 \sim 2 \times 10^6$ であり、発育ステージにより変動している [Smith *et al.* (2005)]。

mtDNA のコピー数 はリアルタイム PCR 法を用い、絶対値によって求める。

○解析対象サンプルの DNA 量が微量の場合は、サンプルを -80°C に保存しておき、微量 DNA 抽出から解析までを一気になるべく短期間で行うとよい。

ア. プライマーの設計および PCR 条件の設定

リアルタイム PCR の条件はそれぞれ使用する酵素や機器のマニュアルを元に条件設定を行う必要がある。筆者はエアーサーモ方式 LightCycler® (Roche Applied Science 社, 1.5 は販売終了。現在はマルチカラー対応の 2.0 のみ販売) および LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science 社) を使用した。ガラスキャピラリー使用のため 96 ウェルのようなウェル間の温度差がなく、信頼性が高い。1 回の最大サンプル数は 32 本と少ないが、30~40 サイクルを 20~30 分で完了する。

増幅効率がよく、PCR 産物が 1 種類 (1 ピーク) となるまで、条件を検索する。プライマーの設計については TaKaRa 社の HP にヒントが掲載されている (<http://www.takara-bio.co.jp/prt/guide.htm>)。

イ. スタンダードの作成

- 1) ウシ CYTB1, CYTB2 プライマー (表 1) で、目的 DNA 断片を PCR 増幅する。(筆者は 50 μ l 容量で行っている。)
- 2) 3% アガロース (低分子用、NuSieve™ GTG™ Agarose, Takara 社等) ゲル電気泳動により、DNA を分離し、エチジウムブロマイド (EtBr) で DNA バンドを検出する。
- 3) 目的の 120 bp の増幅バンドをメス刃等で 切り出し、DNA 回収キット (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE ヘルスケア社 ; QIAquick Gel Extraction Kit, キアゲン社等) で精製する。
- 4) DNA 濃度を正確に測定する。
 - PicoGreen® dsDNA 定量キット (Molecular Probes 社) による計測・・・微量二本鎖 DNA (dsDNA) の検出感度が高いため、信頼性が高い。ただし、計測に蛍光プレートリーダー等が必要。
 - △ 吸光度測定による計測・・・往々にして PCR 産物の回収量が少ないため、計測値が不正確となる。
- 5) 計測値の濃度 (ng/ μ l) をもとに、DNA 断片の 10^8 コピー数 / 3 μ l 濃度のスタンダードストックを作成する。筆者は 100 bp の DNA 断片が 9.1×10^9 コピーで 1 ng であることをベースに計算した [May-Panloup *et al.* (2005)]。
- 6) スタンダードストックを元に希釈し、 10^6 コピー、 10^5 コピー、 10^4 コピー、 10^3 コピー、 10^2 コピー / 3 μ l の濃度のスタンダードを作成する (図 9)。希釈液には、サーモン DNA 溶液 (10 μ g/ml, ssDNA from salmon testes, Sigma D7656) を用いる。希釈したスタンダードは 1 ~ 2 週間で更新する。
- 7) スタンダードを鋳型にリアルタイム PCR を行って検量線により信頼度を確認する。

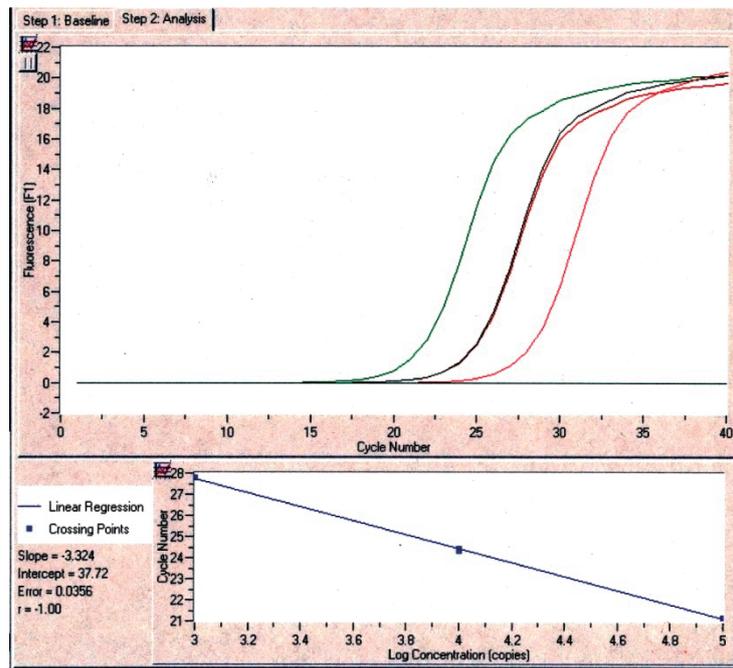


図9. ウシ CYTB1, CYTB2 プライマー-PCR 断片によって作成した希釈スタンダード (10^4 、 10^3 、 10^2 コピー) によって描いた検量線 (下) (LightCycler 1.5, Roche 社使用)。

ウ. リアルタイム PCR による DNA コピー数の推定

毎回の PCR に必ずスタンダードおよびネガコントロールを入れる。

○この実験の初心者は必ずクロスコンタミネーション (コンタミ) に直面する。サンプル解析時にこうなっては取り返しのつかない事態になるので、サンプルの解析を行う前に何度か練習をし、コンタミのない系を確立することが必要である。

○リアルタイム PCR でコンタミに悩むあなたへ

- ・できれば専用の場所・器具を確保する。卓上ブースなどで外からのゴミをシャットアウト。使用するピペット・チップなどもすべて専用とする。
- ・リアルタイム PCR を朝一番の仕事とする。
- ・ブース外のものに触った手袋はコンタミを疑う。怪しい手袋は即、替える。
- ・触るのは水、酵素入りバッファー、プライマー、サンプルの順。サンプルは最後に触り、サンプルに触った手で水やバッファーを触らない。スタンダードもコンタミのもとである。
- ・チューブの蓋をするときにコンタミする。

(4) クローン家畜におけるミトコンドリアの解説

①クローン家畜の mtDNA

mtDNA は細胞質のミトコンドリア内 (図 10) にある核外遺伝子で、エネルギー生産に必要な遺伝子をコードしている。mtDNA は細胞内に数千コピー含まれており、等倍したものが等しく分配される核の遺伝様式とは異なっている。

体細胞クローン家畜は、体細胞を除核した卵子に移植する核移植法により作成するため、mtDNA はほぼ卵子由来となる [(Smith *et al.* (2005), Takeda *et al.* (2008)]。また核移植の際に、卵子へ核と共に体細胞のミトコンドリアが混入する (図 11) ため、ウシの MII 期の卵子に含まれる mtDNA を 1×10^6 コピー、体細胞に含まれる mtDNA を 1×10^3 コピーとすると、核移植胚にはおおよそ 1% の割合で体細胞 mtDNA が混入する計算になる。クローン家畜の mtDNA 型を調べてみると、多くの場合、体細胞由来 mtDNA はほとんど検出限界以下になる。ところが、発生に伴う mtDNA 集団の分配の過程で、ある選抜が起こった場合に体細胞由来 mtDNA の割合が増え、ヘテロプラズミーを示す (図 12)。

一方、受精の場合は、精子と共に持ち込まれる mtDNA は 100 コピー未満とされ、0.1% の割合で精子由来 mtDNA が受精卵に含まれる計算になる。受精の際に、卵子に精子由来 mtDNA が持ち込まれるが、卵子内で消失するため、一般に父親の mtDNA は遺伝しない母性遺伝であることが知られている。

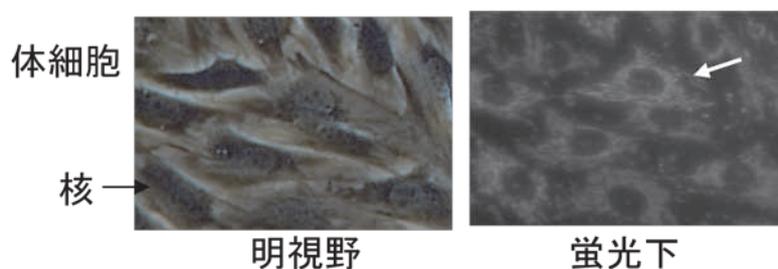


図 10. MitoTracker™ GreenFM (Molecular Probes 社) で蛍光標識した体細胞のミトコンドリア (右写真、白矢印)

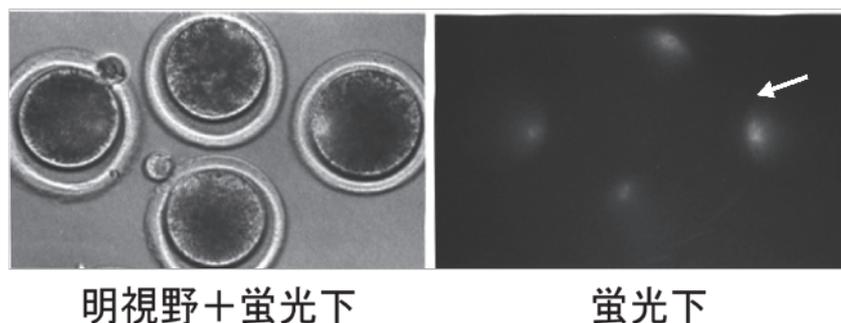


図 11. 核移植胚に混入した体細胞ミトコンドリア

予め MitoTracker™ GreenFM でミトコンドリアを染色した体細胞を核移植した。なお、移植直後は強い蛍光が観察されるが、徐々に蛍光は拡散していく。

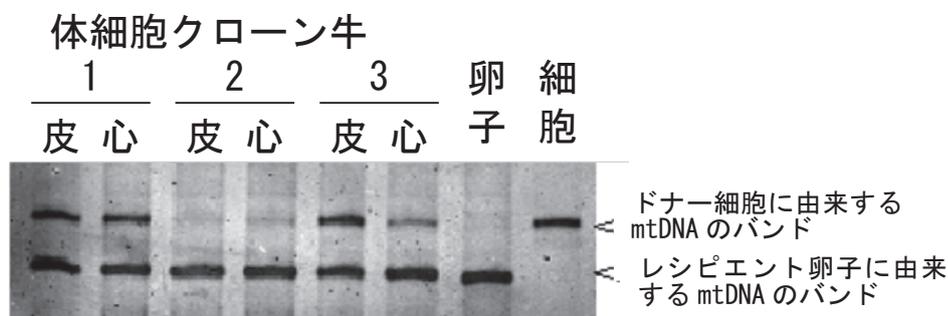


図 12. 体細胞クローンウシ由来の組織、ドナー細胞およびレシピエント卵子における mtDNA 多型の比較 (PCR-SSCP 法)

皮：皮膚、心：心臓、卵子：レシピエント卵子、細胞：ドナー細胞。体細胞クローンウシの mtDNA は、ほとんどの場合、99%以上レシピエント卵子由来となる。なお、個体によってはドナー細胞に由来する mtDNA の割合の高いもの (~59%) も存在した。

②クローン牛のミトコンドリアタンパク質発現量差異の網羅的解析

体細胞核と卵細胞質がうまく作用し合えないと、核移植は成功しない。*Bos taurus* 系品種と *Bos indicus* 系品種との間で行った核移植や mtDNA 型の異なる組合せの核移植では、その発育率に有意差がみられたとする報告がある[Yan *et al.* (2010)]。雑種が生まれないような異種間の組合せによる核移植では、現在のところ産子を得た成功例は報告されていない。mtDNA の塩基配列がもとの体細胞提供個体と異なると、そのクローン産子の生産性や同一性にどのような影響を与えるだろうか。核移植胚の発育率や産子の生産率のみならず、生時体重や強健性、産肉性、産乳性などといった指標による比較解析ではなかなか答えは得られなかった。そこで、ミトコンドリア蛋白質をターゲットとした蛋白質発現量差異の比較解析を行った（詳細については Takeda *et al.* (2011)を参照）。

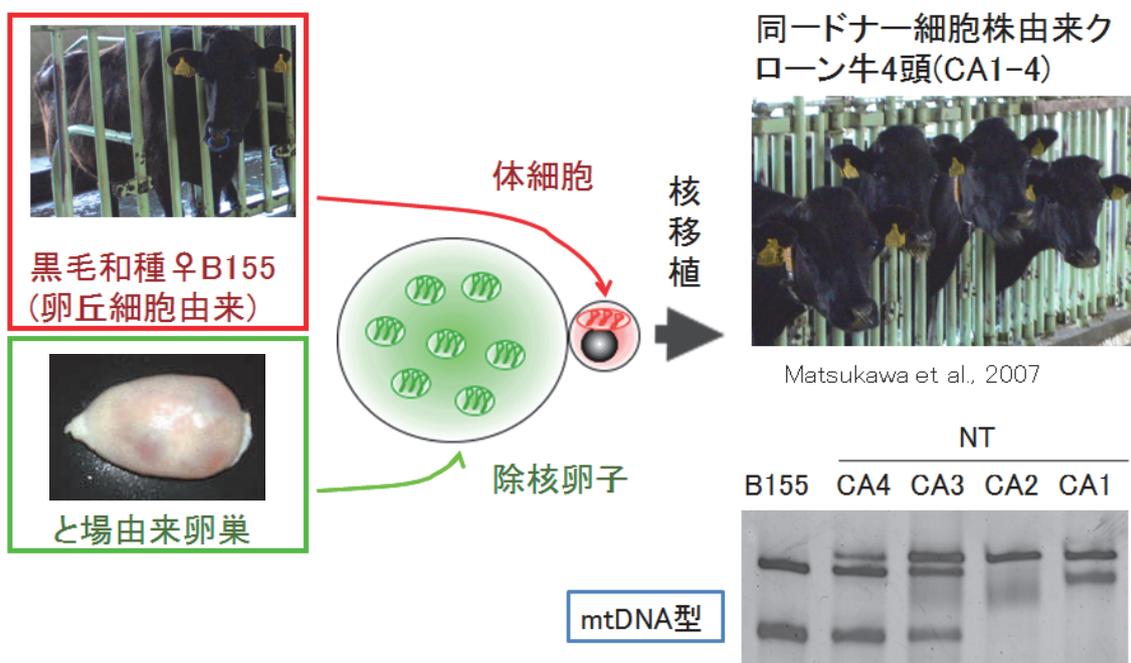


図 13. 黒毛和種 B155 の卵丘細胞由来核移植産子 (CA 1~4) の mtDNA 型

ア. 同一細胞株由来クローンウシ (成牛) における肝臓由来ミトコンドリア蛋白質発現パターンとの比較

解析材料: 黒毛和種同一卵丘細胞株由来 SCNT (体細胞核移植) 成牛 4 頭(CA1~4; 5~6 歳、[Matsukawa *et al.* (2007)]および対照黒毛和種成牛 4 頭(2~8 歳) (図 13)。

肝臓ミトコンドリア可溶化タンパク質について、Ettan DIGE システムによる発現差異解析を行った結果、SCNT 成牛群と対象牛群間で、蛋白質発現差異は 3 個検出された($P < 0.05$)。

また個体別では、mtDNA ヘテロプラズミーを示す2頭については差異が検出されず、ハプロタイプの異なる個体で多数の差異が検出された(図 14 A)。以上のことから、同一細胞株から生産した SCNT 成牛間でミトコンドリアタンパク質発現量に個体差が検出されること、また核移植で生じた mtDNA ヘテロプラズミーはミトコンドリアタンパク質発現量へ影響しないことが明らかとなった。

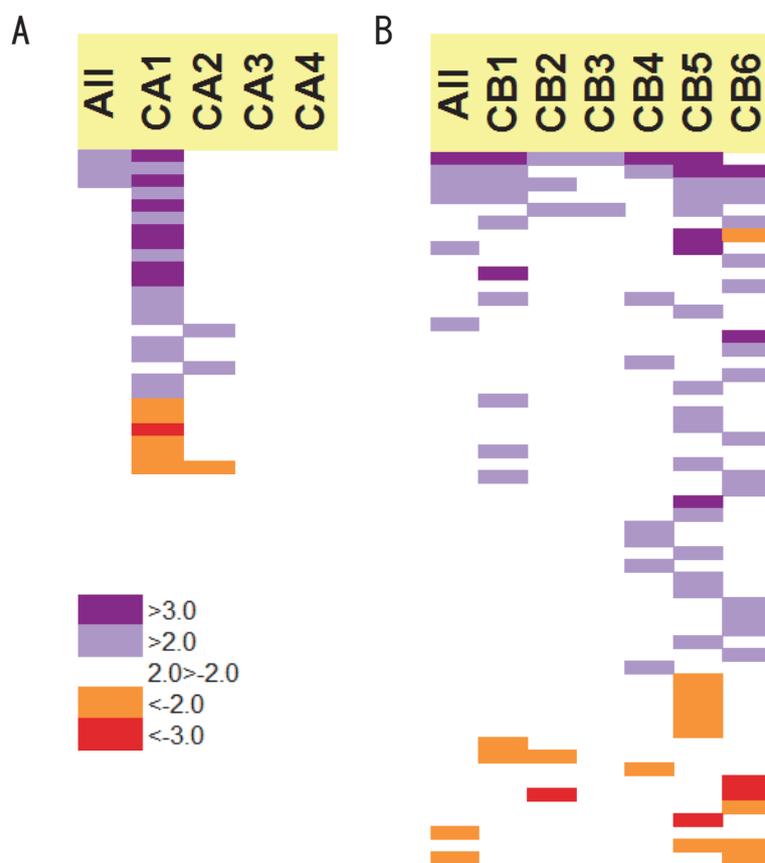


図 14. クローン牛に見られたミトコンドリア可溶化蛋白質発現量の差異

対照牛と比較して2倍以上の差異が検出されたスポットを示す。

A: 同一ドナー細胞から生産したクローン成牛4頭 (CA1~4)

B: 生後9日以内に死亡したクローン子牛6頭 (CB1~6)

イ. 斃死した SCNT 子牛におけるミトコンドリア蛋白質発現パターンの比較

解析材料: 生後9日以内に死亡した黒毛和種 SCNT 子牛6頭 (0~9日齢, [Akagi *et al.* (2003), Naruse *et al.* (unpublished)]および対照子牛9頭 (0~12日齢)。

各スポットの発現量差異を調べるため、(1) ②と同様にシヨ糖勾配遠心分画法により調整した肝臓ミトコンドリア可溶化タンパク質について、Ettan DIGE システムによる発現差異解析を行った。その結果、SCNT 子牛群と対象子牛群間で、蛋白質発現差異のあるスポッ

トは7個検出された($P<0.05$)。また個体間で、差異のあるスポットにばらつきがみられた(図14 B)。以上のことから、生後9日以内に死亡した SCNT 子牛は対照牛と比較して肝臓ミトコンドリアタンパク質に発現量差異のあるスポットが検出されることが明らかとなった。

参考文献

- 石田信繁, 犬丸茂樹, 武田久美子, 大西彰, 三上仁志, 小松正憲 (1992) ブタミトコンドリア DNA のクローニングとプローブとしての有効性の検討. 日畜会報 63(10): 1051-1058.
- 春海隆, 古川力, 粟田崇, 熊谷光洋, 安江博 (1994) PCR-SSCP 法によるウシミトコンドリア D ループ領域の多型解析. 日畜会報 65(2): 149-151.
- 万年英之 (2002) 黒毛和種の産肉形質に対するミトコンドリア DNA 効果. 日本胚移植学雑誌 24(1): 28-33.
- Matsukawa K., Akagi S., Adachi N., Kubo M., Hirako M., Watanabe S., Takahashi S. (2007) Effect of ovary storage on development of bovine oocytes after intracytoplasmic sperm injection, parthenogenetic activation, or somatic cell nuclear transfer. J. Mamm. Ova. Res. 24: 114-119.
- May-Panloup P., Vignon X., Chrétien M.F., Heyman Y., Tamassia M., Malthiery Y., Reynier P. (2005) Increase of mitochondrial DNA content and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. Reprod. Biol. Endocrinol. 3: 65.
- 三上仁志, 大西彰, 小松正憲, 大谷敏明, 関哲夫, 五十嵐尚哉 (1988) 中国豚のミトコンドリア DNA 制限酵素切断型. 日豚会誌 25(4): 181-185.
- Smith L.C., Thundathil J., Filion F. (2005) Role of the mitochondrial genome in preimplantation development and assisted reproductive technologies. Reprod. Fertil. Dev. 17: 15-22.
- Srirattana K., Matsukawa K., Akagi S., Tasai M., Tagami T., Nirasawa K., Nagai T., Kanai Y., Parnpai R., Takeda K. (2011) Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. J. Anim. Sci. 82: 236-243.
- 武田久美子, 大西彰, 三上仁志, 犬丸茂樹 (1994) ミトコンドリア DNA・RFLP の細胞質マーカーとしての有効性. 日畜会報 65(6): 556-562.
- Takeda K., Onishi A., Ishida N., Kawakami K., Komatsu M., Inumaru S. (1995) SSCP analysis of pig mitochondrial DNA D-loop region polymorphism. Anim. Genet. 26: 321-326.
- 武田久美子, 大西彰, 高橋清也, 小島敏之, 花田博文 (1997) 黒毛和種・褐毛和種・ホルスタイン種における, ウシミトコンドリア DNA・D-loop 領域内変異. 日畜会報 68(1):

- 1161-1165.
- Takeda, K., Takahashi S., Onishi A., Goto Y., Miyazawa A., Imai H. (1999) Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocyte in the bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *J. Reprod. Fertil.* 116: 253-259.
- 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.
- Takeda K., Satoh M., Neopane S.P., Kuwar B. S., Joshi H.D., Shrestha N. P., Fujise H., Tasai M., Tagami T., Hanada H. (2004) Mitochondrial DNA analysis of Nepalese domestic dwarf cattle 'Lulu'. *Anim. Sci. J.* 75: 103-110.
- Takeda K., Tasai M., Iwamoto M., Akita T., Tagami T., Nirasawa K., Hanada H., Onishi A. (2006) Transmission of mitochondrial DNA in pigs and progeny derived from nuclear transfer of Meishan pig fibroblast cells. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 306-312.
- Takeda K., Kaneyama K., Tasai M., Akagi S., Takahashi S., Yonai M., Kojima T., Onishi A., Tagami T., Nirasawa K., Hanada H. (2008) Characterization of a donor mitochondrial DNA transmission bottleneck in nuclear transfer derived cow lineages. *Mol. Reprod. Dev.* 75(5): 759-765.
- Takeda K., Tasai M., Akagi S., Matsukawa K., Takahashi S., Iwamoto M., Onishi A., Tagami T., Nirasawa K., Hanada H., Pinkert C.A. (2010) Microinjection of serum-starved mitochondria derived from somatic cells affects parthenogenetic development of bovine and murine oocytes. *Mitochondrion* 10: 137-142.
- Takeda K., Tasai M., Akagi S., Watanabe S., Oe M., Chikuni K., Ohnishi-Kameyama M., Hanada H., Nakamura Y., Tagami T., Nirasawa K. (2011) Comparison of liver mitochondrial proteins derived from newborn cloned calves and from cloned adult cattle by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Mol. Reprod. Dev.* 78: 225-304.
- Watanobe T., Okumura N., Ishiguro N., Nakano M., Matsui A., Sahara M., Komatsu M. (1999) Genetic relationship and distribution of the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) and Ryukyu wild boar (*Sus scrofa riukiuanus*) analysed by mitochondrial DNA. *Mol. Ecol.* 8: 1509-1512.
- Yan Z., Zhou Y., Fu J., Jiao F., Zhao L., Guan P., Huang S., Zeng Y., Zeng F. (2010) Donor-host mitochondrial compatibility improves efficiency of bovine somatic cell nuclear transfer *BMC Develop. Biol.* 10: 31.

【1. 家畜ミトコンドリア DNA の解析方法】

執筆者：武田久美子、太齊真理子（畜産草地研究所）