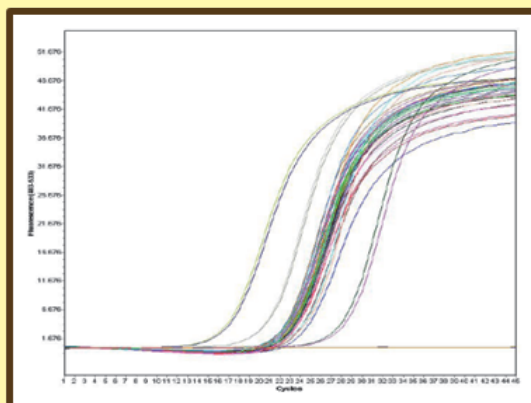




体細胞クローン家畜・胚における分子生物学的な 特性調査のためのマニュアル

—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

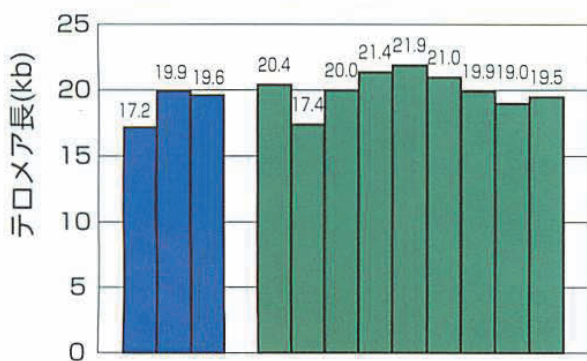
テロメアとは、染色体の末端にあるDNA配列で、加齢にともない短縮して細胞を老化へと導きます。高齢の種雄牛の筋肉組織の細胞から作出された体細胞クローン牛においては、精子と白血球のテロメア長は正常な長さであり、細胞提供牛の老化がリセットされていました。その精液を普通の雌牛に人工授精して得られた次世代子牛においても白血球テロメア長は正常でした。これにより、クローン雄牛が種雄牛として長期間安全に供用されることが期待されます。



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



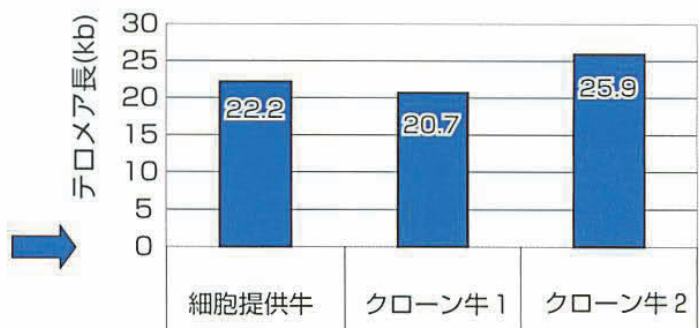
左から細胞提供牛(14歳時)、クローン牛2頭(0歳時)
その次世代子牛9頭(0歳時)

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

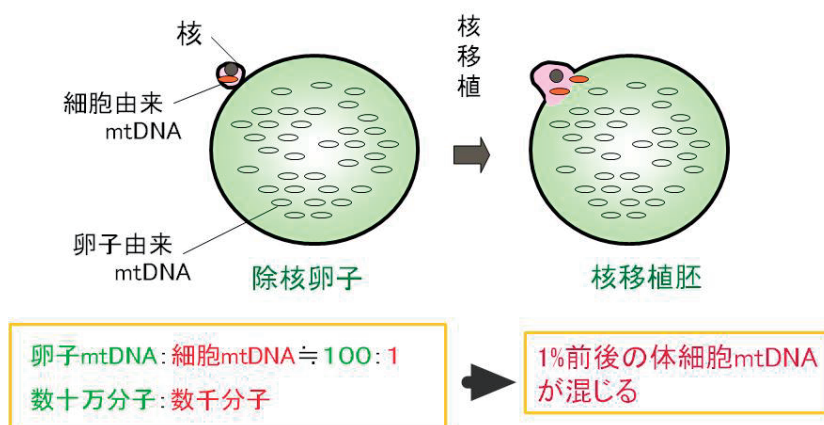
精子のテロメア長



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。

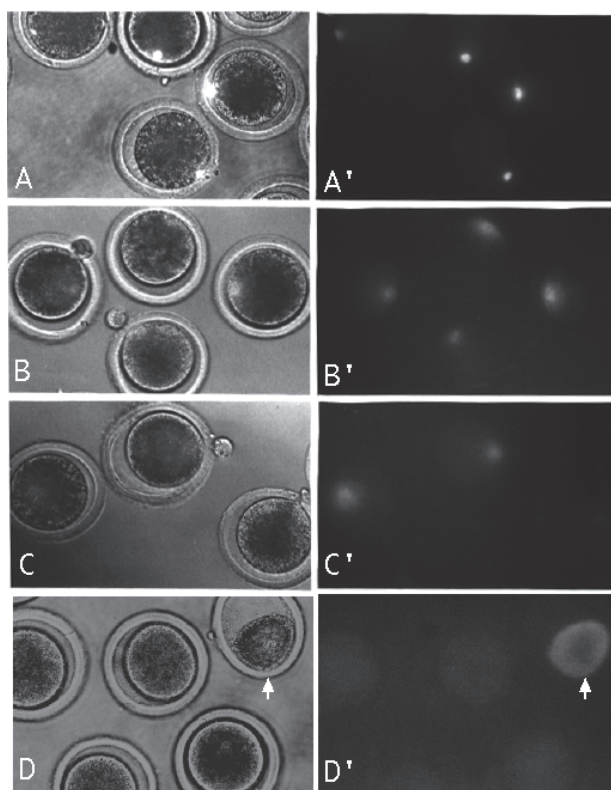


体細胞クローン牛の次世代子牛



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。

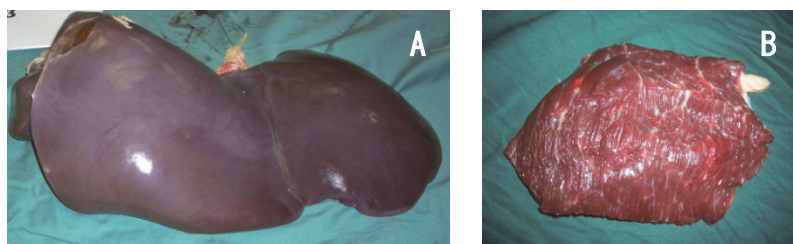


図1. A.牛の肝臓；B.牛の大腿筋

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。

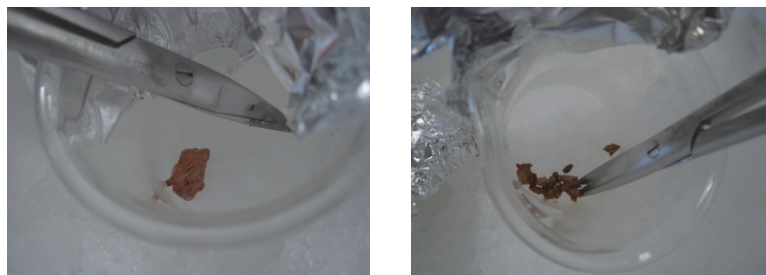


図2. サンプルをハサミで細断

- 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)。

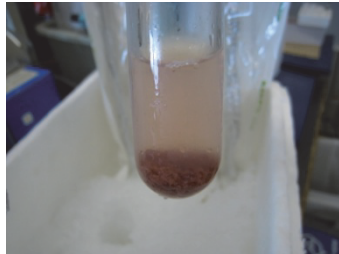


図3. ホモジナイズ前の試料

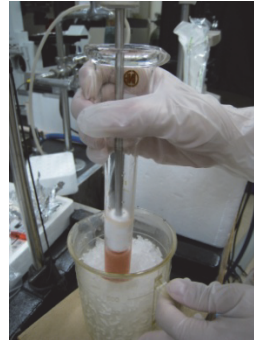


図4. テフロンホモジナイザーでの作業

- 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。

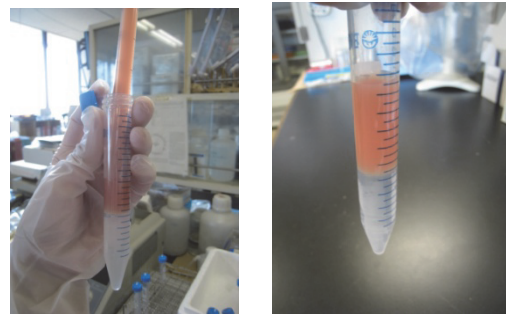


図5. 重層中 (左) と重層後 (右)

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。

- 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。

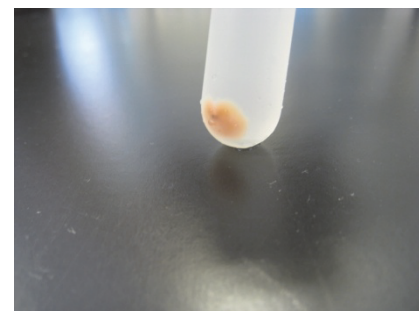


図6. ミトコンドリア画分の沈殿物

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) 抽出した mtDNA の品質を確かめるには 16 kb をカバーする DNA サイズマーカー (λ DNA/*Hind*III 等) と共に 0.8% アガロースゲル電気泳動を行う。約 16 kb のサイズに mtDNA のバンドが検出される。核 DNA が多く混入している場合、全体がスメアとなる。

⑤準備するもの

1) バッファー組成

- 0.25 M ショ糖溶液 0.25 M Sucrose (85.575 g/1L)
 3 mM Tris-HCl pH7.4
 1 mM EDTA
 →0.45 μm フィルターを通す。冷蔵保存。

- 0.35 M ショ糖溶液 0.35 M Sucrose (35.9415 g/300 ml)
 3 mM Tris-HCl pH7.4
 1 mM EDTA
 →0.45 μm フィルターを通す。冷蔵保存。

- 0.15 M 塩化カリウム溶液 0.15 M KCl (5.59 g/500 ml)
 10 mM NaHPO₄
 →pH 7.0
 →0.45 μm フィルターを通す。冷蔵保存。

- Chappel-Perry 液 0.1 M KCl
 50 mM Tris-Cl pH7.4
 1 mM Na-ATP
 5 mM MgSO₄
 1 mM EDTA pH 8.0
 →0.45 μm フィルターを通す。冷蔵保存。

- サルコシル溶液 0.5% Sarcosyl (0.5 g/100 ml)
 (N-Lauroyl Sarcosine)
 0.5 M 酢酸ナトリウム (3 水飽和物)
 10 mM Tris-Cl
 5 mM EDTA
 →pH8.0 室温保存。オートクレーブしない。

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	GCATTTTCAGTGCCTTGCTTTGGGTAAAGC 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 μl を用いて全量 20 μl 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 μl を 95%ホルムアミド溶液 5 μl 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。

サンプルを入れる前にゲルのウェルをよく洗う。
- 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。

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。

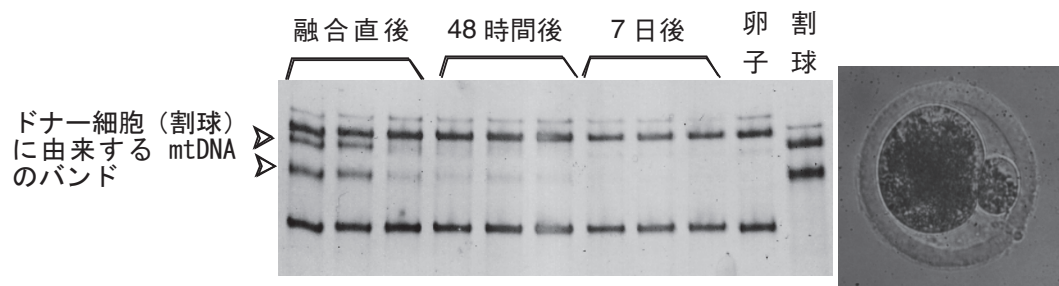


図7. PCR-SSCP法を用いて検出した牛受精卵核移植胚の割球および除核卵子由来 mtDNA の混在

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。

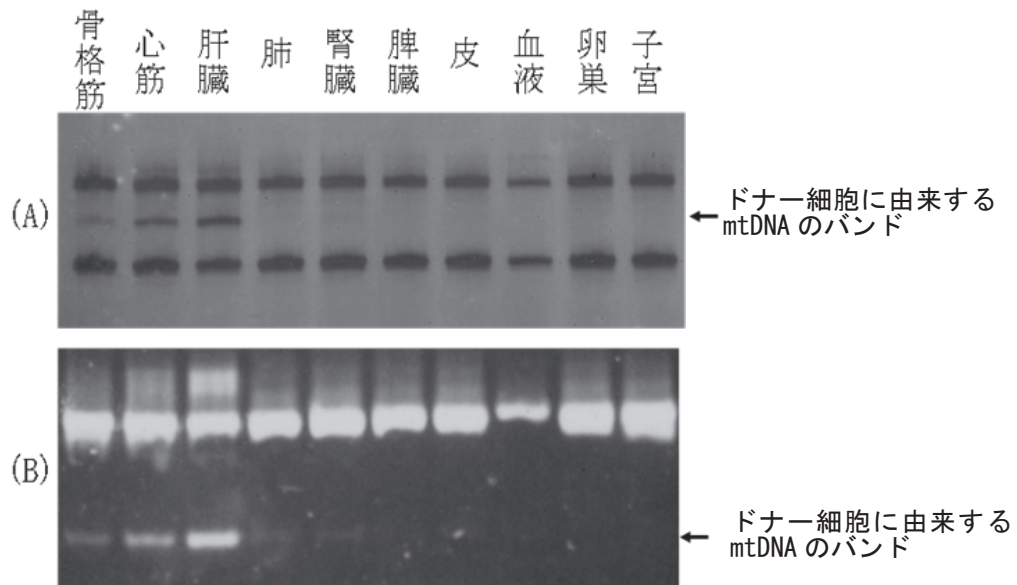


図8. PCR-SSCP 法(A)および PCR-RFLP 法(B)を用いて検出した体細胞クローン豚の mtDNA 型

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。

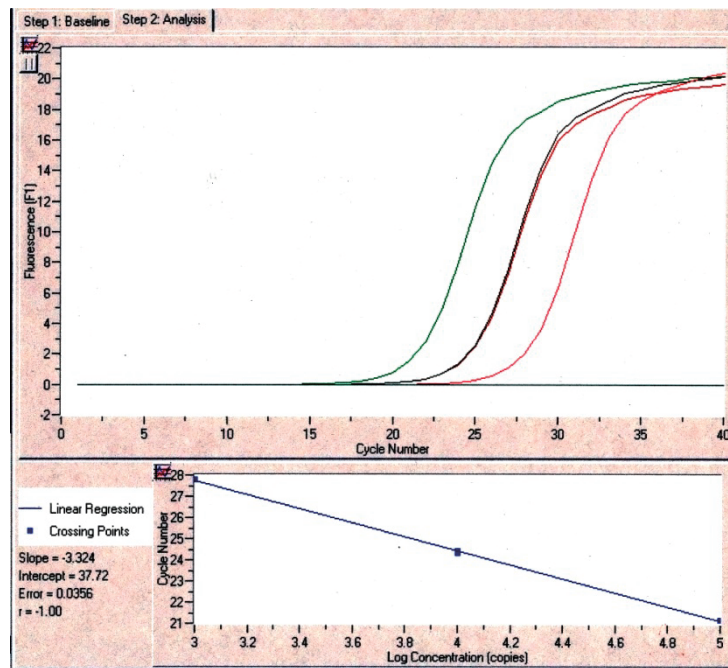


図9. ウシ CYTB1, CYTB2 プライマー-PCR 断片によって作成した希釈スタンダード (10^4 、 10^3 、 10^2 コピー) によって描いた検量線 (下) (LightCycler 1.5, Roche 社使用)。

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ると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。

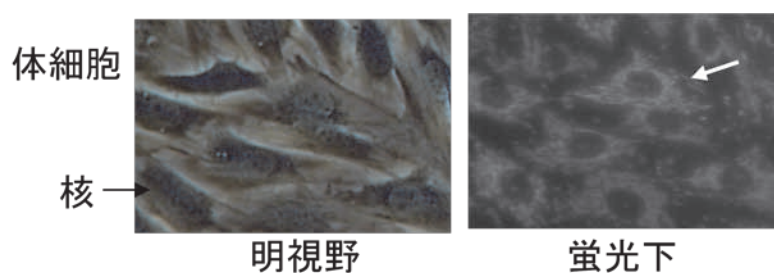


図 10. MitoTracker™ GreenFM (Molecular Probes 社) で蛍光標識した体細胞のミトコンドリア (右写真、白矢印)

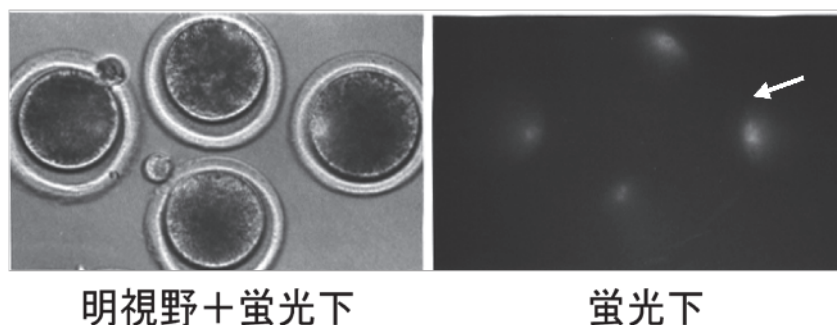


図 11. 核移植胚に混入した体細胞ミトコンドリア

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。

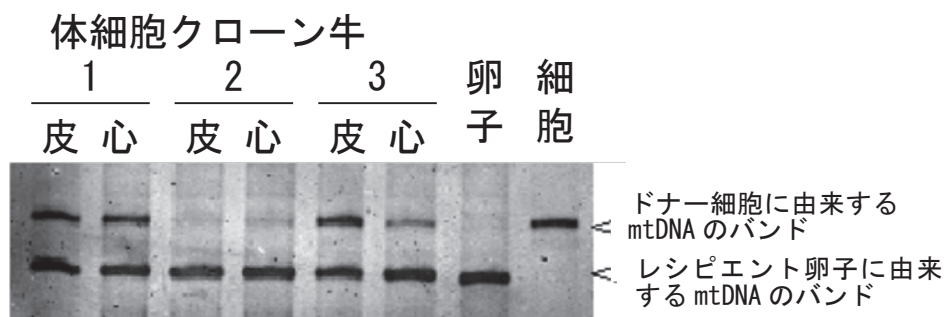


図 12. 体細胞クローンウシ由来の組織、ドナー細胞およびレシピエント卵子における mtDNA 多型の比較 (PCR-SSCP 法)

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）。

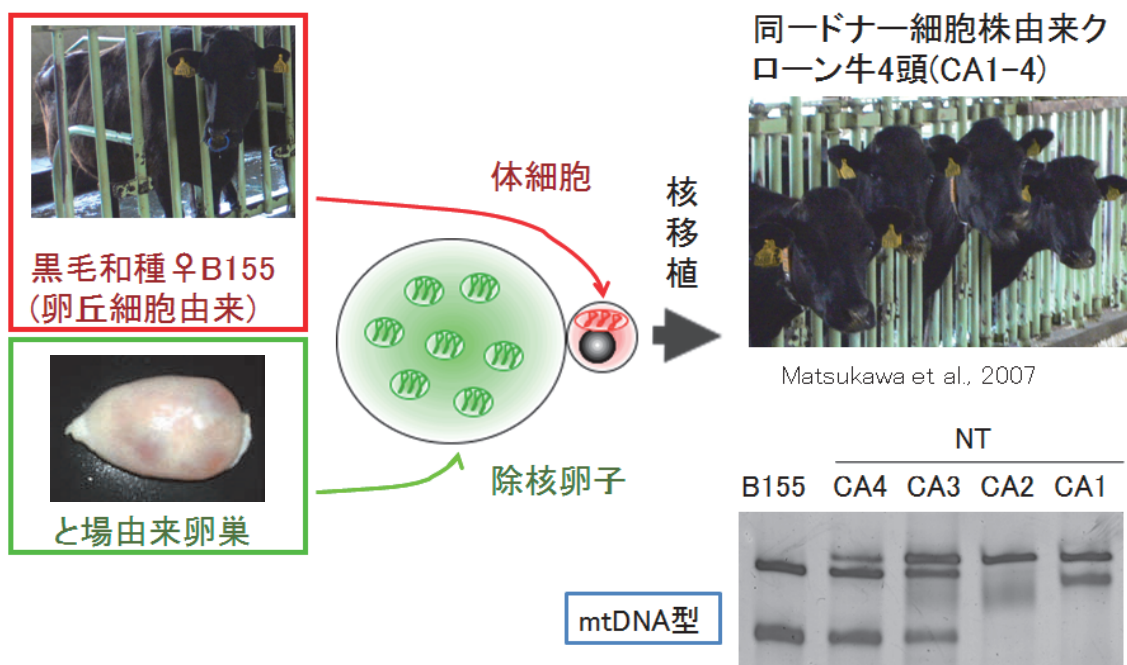


図 13. 黒毛和種 B155 の卵丘細胞由来核移植産子 (CA 1~4) の mtDNA 型

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。

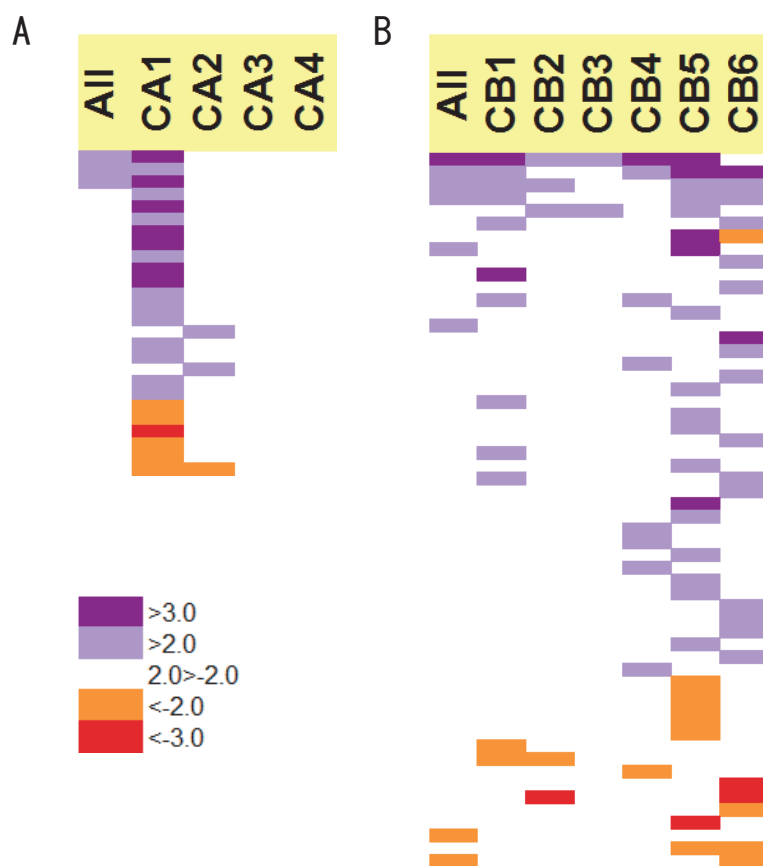


図 14. クローン牛に見られたミトコンドリア可溶化蛋白質発現量の差異

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）

2. テロメア長の測定方法

テロメアとは、染色体末端に存在する DNA (TTAGGG の直列反復配列) とテロメア結合タンパク質の複合体である。テロメアは染色体末端と核膜をつないでおり、染色体を保護する役割を担っている。ただし、テロメア DNA は染色体の複製の際にその構造上完全には複製されない(末端複製問題:DNA の複製時に娘鎖の 5'側最末端の RNA プライマーは DNA に置き換われない)ため、テロメアは細胞分裂を繰り返すたびに短小化してしまう(図 15)。その結果、細胞は徐々に老化の様相を現し、テロメア DNA がヒトでは約 5 kb、ウシでは約 10kb まで短くなると細胞増殖能を喪失する(ヘイフリック限界に達する)ことが分かっている。ちなみに、このようなテロメアにもとづく細胞老化現象を解明した研究グループは 2009 年にノーベル医学・生理学賞を受賞している。

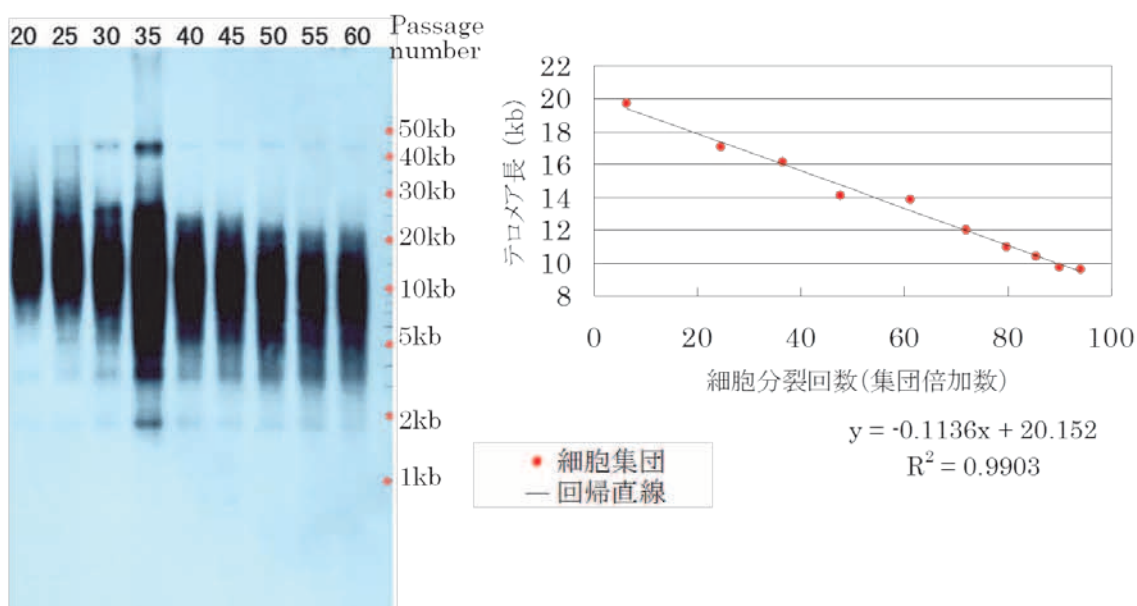


図 15. ウシ培養細胞の経代にもなうテロメア短小化

そして、体細胞核移植に用いられるドナー細胞は、体内および培養下での細胞分裂回数にもとづきテロメアが短小化している。そのため、体細胞クローン動物はテロメアが生まれながらに短いのか？ 動物の月齢が若くても細胞レベルおよび個体レベルで老化しているのか？ その寿命はどうなのか？が問われてきた。これまでの知見では、クローン牛のテロメア長はドナー細胞の種類によって異なっていることが判明している。具体的には、線維芽細胞や卵丘細胞に由来するクローン牛のテロメアは同月齢のコントロール牛と同等の長さであるが、上皮細胞に由来するクローン牛のテロメアは同月齢のコントロール牛より短くなっていた(図 16)。このようなテロメアの短いクローン動物の寿命や生産性について

は、長期間にわたる実験と観察が必要であろう。

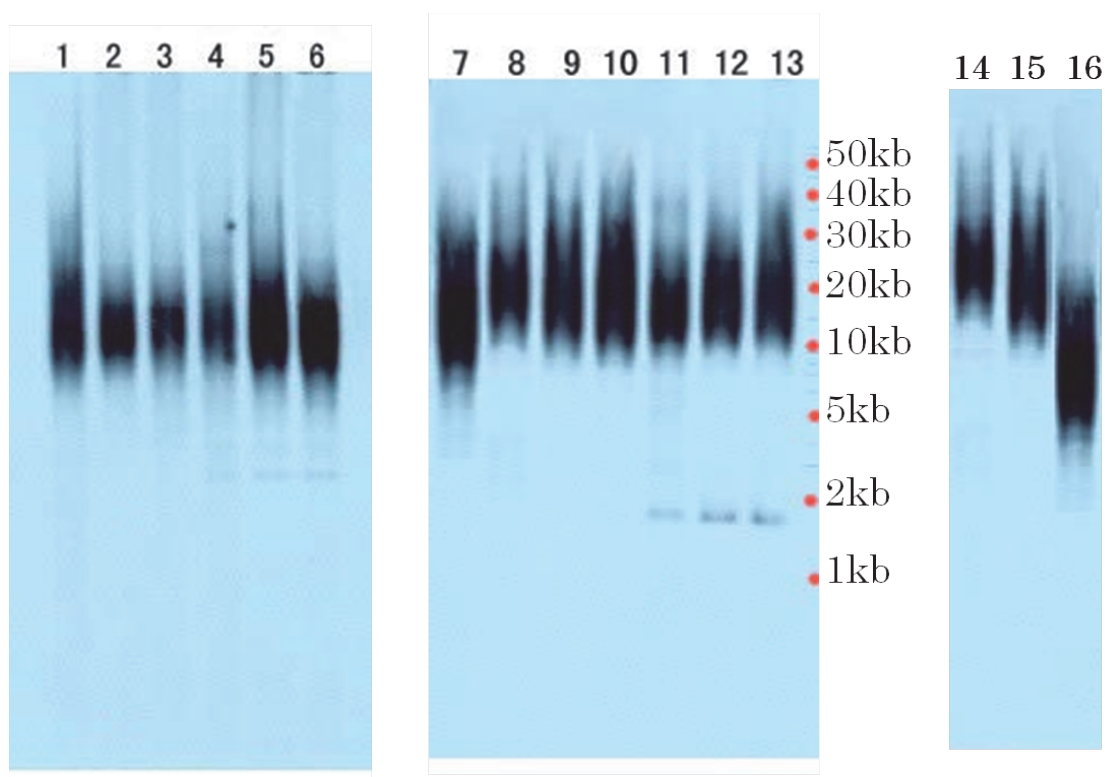


図 16. クローン牛のテロメア解析

- Lane 1 : 卵管上皮細胞(6 歳のジャージー) → 2, 3 : クローン子牛
Lane 4 : 卵管上皮細胞(13 歳のホルスタイン) → 5, 6 : クローン子牛
Lane 7 : 糸福(14 歳時) → 8 : 筋肉細胞(12 歳時) → 9, 10 : クローン子牛
Lane 11 : 皮膚線維芽細胞(2 歳の黒毛) → 12, 13 : クローン子牛
Lane 14 : 精子 Lane 15 : 子牛 Lane 16 : 老化細胞

①実験手順

ア. 血液からの高分子 DNA 抽出

- 1) 静脈血を 10%EDTA で溶血し、50 ml の遠心チューブに血液 10 ml を移す。
- 2) T₁₀E₁₀ Buffer (10 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA) を等量加え、ローテーターで 10 分攪拌する。
- 3) 遠心分離する。アスピレーターを用いて上清を捨てる。
- 4) 沈殿した白血球を TE Buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA) で洗う。ローテーターで 10 分攪拌する。

- 5) 遠心分離する。アスピレーターを用いて上清を捨てる。
- 6) 白血球のペレットに DNA 抽出 Buffer (8 mM 尿素, 0.3 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, 2% SDS, 1 mM EDTA) 10 ml と Proteinase K (最終濃度 100 µg/ml) を加えて懸濁し、37°Cで一晩ウォーターバスを用いて振とうする。
- 7) 等量の中性フェノール (TE buffer で飽和したもの) を加え、室温で 20 分間ローテーターを用いて穏やかに混合する。
遠心分離して、2層に分離した上層 (水層) を新しい遠心チューブに移す。
- 8) 等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールを加え、室温で 20 分間ローテーターを用いて穏やかに混合する。
遠心分離して、2層に分離した上層 (水層) を新しい遠心チューブに移す。
- 9) 等量のクロロホルム・イソアミルアルコールを加え、室温で 20 分間ローテーターを用いて穏やかに混合する。
遠心分離して、2層に分離した上層 (水層) を新しい遠心チューブに移す。
- 10) 上層 (水層) に 1/10 量の酢酸ナトリウムと 2 倍量の 100%エタノールを加えてゆっくり攪拌する。この時、白い糸状の高分子 DNA を見ることができる。
遠心分離し、アスピレーターを用いて上清を捨てる。
- 11) 70%エタノールを加えて、沈殿している高分子 DNA を洗浄する。
遠心分離し、アスピレーターを用いて上清を捨てる。これを 2 回繰り返す。
- 12) TE Buffer を加え、4°Cで 24 時間かけて高分子 DNA を溶解させる。
- 13) 分光光度計を用いて高分子 DNA の濃度を測定する。

イ. 制限酵素反応

- 1) 太口チップを用いて、マイクロチューブに高分子 DNA と制限酵素、反応 Buffer を混合する。
- 2) 37°Cで一晩インキュベートする。
- 3) 等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールを加え、軽く混和する。

遠心分離して上層（水層）を新しいマイクロチューブに移す。

4) 上層（水層）に 1/10 量の Quik-Precip TM Plus と 2 倍量の 100%エタノールを加えてよく攪拌する。

遠心分離し、上清を捨てる。

5) 70%エタノールを加えて、消化された DNA を洗浄する。

遠心分離し、上清を捨てる。

6) 沈殿した DNA をミリ Q 水に溶解させる。

1 μ g 分の DNA を分取し、色素マーカールを加える。

ウ. FIGE 電気泳動

1) 電子レンジを用いて、Pulsed Field Certified Agarose (バイオラッド) 0.8 g を 80 ml の 0.5 \times TBE Buffer (89 mM Tris, 89 mM ホウ酸, 2 mM EDTA) に溶解させる。

2) 溶解したゲルを専用のトレイに流し込み、15cm \times 15cm のゲルを作る。

3) 20 $^{\circ}$ C の部屋にて、専用の電気泳動層にゲルをセットし、1.6 l の 0.5 \times TBE Buffer を注ぐ。

4) ゲルのスロットに、制限酵素切断を行った DNA と分子量マーカールを静かに加える。

5) FIGE Mapper Electrophoresis System (バイオラッド) のパワーサプライを電気泳動槽につないで電気泳動を 14 時間行う。

6) 電気泳動の終了後に分子量マーカールをチェックし、写真撮影を行う。

エ. サザンブロッティング

1) 電気泳動が終わったゲルをタッパーに入れ、0.25 M の HCl を加えて振とう機でゆるやかに回転させて 10 分間処理する。

2) ミリ Q 水でゲルを洗浄した後、変性溶液 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) を加えてゲルを 30 分間処理する。

3) ミリ Q 水でゲルを洗浄した後、中和溶液 (0.5 M Tris/HCl, 1.5 M NaCl) を加えてゲルを 15 分間処理し、一旦中和溶液を捨てて新たな中和溶液でもう 1 回 15 分間処理する。

4) バキュームブロッター (バイオラッド) に、下からろ紙、メンブレン、ひっくり返したゲルを乗せる。

5) 展開液として 10×SSC (20×SSC は、333 mM NaCl, 333 mM クエン酸ナトリウム) を注ぎ、真空ポンプを使用して2時間ブロッティングを行う。

6) メンブレンを 2×SSC で洗浄後、ブロットされた DNA を UV クロスリンカーで固定する。

7) ハイブリダイゼーションバッグにメンブレンを入れてシールし、2×SSC で洗浄する。

オ. プローブのラベリング

1) 精製後のオリゴヌクレオチド(TTAGGG)₃をミリ Q 水に溶かす。

2) DIG オリゴヌクレオチド 3'-エンドラベリングキット (ロシュ) に従いラベリングを行う。

3) LiCl を加えてからエタノール沈殿を行う。適切な濃度で再溶解する。

カ. ハイブリダイゼーション

1) メンブレンの入ったハイブリダイゼーションバッグに DIG Easy Hyb (ロシュ) を 40 ml 加えて、ウォーターバスで 37°C、2 時間振とうインキュベートする。DIG Easy Hyb を捨てる。

2) 10 ml の DIG Easy Hyb に対してオリゴヌクレオチドプローブを 10 pmo/ml の濃度で混合して、ハイブリダイゼーションバッグに注入する。37°C で一晩振とうインキュベートする。

3) プローブ溶液を除いた後、0.5×SSC を注いで 37°C で 15 分間洗浄を行う。これを 3 回繰り返す。

キ. 発光検出

1) DIG Wash and Block Buffer Set (ロシュ) のマニュアルに従い、抗ジゴキシゲニン Fab フラグメント (ロシュ) と CSPD (ロシュ) を用いて発光検出を行う。

ク. X線フィルムでの撮影

- 1) メンブランからの発光を5～20分間X線フィルムに曝す。
- 2) X線フィルムを、現像液、反応停止液、定着液の順に浸して、ミリQ水で洗浄する。

ケ. デンシトメーター解析

- 1) デンシトメーターのソフトに従い、X線フィルムの像をデジタル画像化する。
- 2) デンシトメーター解析ソフト Molecular Analyst (バイオラッド) によって、各移動度における化学発光量を測定する。
- 3) それらの数値を表計算ソフトにコピーして、 $\Sigma(OD_i \cdot Li) / \Sigma(OD_i)$ を算出する (OD_i は移動度*i*における化学発光量、 Li は移動度*i*におけるテロメア長)。

②準備するもの

- 1) 必要な機器、器具
 - ・ピペット 10 ml用
 - ・遠心チューブ 50 ml用
 - ・遠心機 50 ml用
 - ・アスピレーター
 - ・ウォーターバス
 - ・ローテーター
 - ・分光光度計
 - ・マイクロピペット
 - ・マイクロピペット用チップ
 - ・マイクロピペット用太口チップ (あるいは普通のチップの先端を太口に切ったもの)
 - ・マイクロチューブ 1.5 ml用
 - ・マイクロ遠心機 1.5 ml用
 - ・ドライバス
 - ・電子レンジ
 - ・電気泳動装置 FIGE Mapper Electrophoresis System (バイオラッド、生産中止)
 - ・ゲル撮影装置
 - ・プラスチックタッパー (15 cm×15 cm のゲルが入る物)
 - ・振とう機
 - ・ガラスビーカー500 ml用
 - ・プラスチックビーカー500 ml用、1 l用

- ・バキュームブロッター (バイオラッド)
- ・ろ紙
- ・サランラップ
- ・UV クロスリンカー
- ・ハイブリダイゼーションバッグ
- ・メスシリンダー 200 ml用
- ・シーラー
- ・X 線フィルム
- ・現像液、定着液
- ・デンシトメーター
- ・デンシトメーター解析ソフト Molecular Analyst (バイオラッド、生産中止)
- ・表計算ソフト

2) 必要な試薬

- ・ Tris
- ・ 塩酸
- ・ EDTA
- ・ Proteinase K
- ・ 尿素
- ・ SDS
- ・ NaCl
- ・ フェノール
- ・ クロロホルム
- ・ イソアミルアルコール
- ・ エタノール
- ・ 酢酸ナトリウム
- ・ 制限酵素 *Hinf*I と *Alu* I とそれぞれの反応バッファー
- ・ Quik-Precip TM Plus (MS テクノシステムズ)
- ・ Pulsed Field Certified Agarose (バイオラッド)
- ・ ホウ酸
- ・ Bromophenol Blue
- ・ Xylene Cyanol
- ・ Orange G
- ・ 1 kb ラダーマーカー
- ・ 5 kb ラダーマーカー
- ・ NaOH

- ・ Nylon Membranes, positively charged (ロシュ)
- ・ クエン酸ナトリウム
- ・ オリゴヌクレオチド (TTAGGG)₃
- ・ DIG オリゴヌクレオチド 3'-エンドラベリングキット (ロシュ)
- ・ LiCl
- ・ DIG Easy Hyb (ロシュ)
- ・ 抗ジゴキシゲニン、Fab フラグメント (ロシュ)
- ・ CSPD (ロシュ)
- ・ DIG Wash and Block Buffer Set (ロシュ)

③テロメア長の測定法の解説

ここまで筆者が実際に行っている実験手順を示したが、原理としては通常のサザンハイブリダイゼーション法に他ならない。したがって、上記の実験手順を四角四面に墨守せずとも、各研究室で確立しているサザンハイブリダイゼーション法のまま実験すればテロメア長の測定が可能である。また、ロシュ社から TeloTAGGG テロメアレンジスアッセイというキットも発売されているので、それを用いればより簡便かもしれない。

しかしながら、以下の留意点がある。

- 1) ウシのテロメア DNA フラグメントは長いもので 50 kb ほどもあるため、実験サンプルから高分子 DNA を抽出する必要がある。したがって、市販のゲノム DNA 抽出キット、特に抽出の過程でボルテックスを用いるものはテロメア測定実験に適さない。また、制限酵素反応が終わるまでは、高分子 DNA を物理的に切断しないようにするべく太口チップ（普通のチップの先端をはさみ等でカットしたもので可）で実験サンプルを扱わなければならない。
- 2) 通常のアガロースゲル電気泳動は 20 kb 以下の DNA の分離に適しており、ウシのテロメア DNA フラグメントの分離には適していない（ただし、ヒトのテロメア DNA フラグメントは比較的短いので通常のアガロースゲル電気泳動でも分離ができる）。この問題を解決するため、筆者は FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis) 電気泳動を行った。これは、電場を短時間のうちに交互に転換することで、100 bp~200 kb の DNA 断片を分離するものである。ただし、この装置は生産中止になっており、これからは入手ができなくなってしまった。

【2. テロメア長の測定方法】

執筆：宮下範和（農業生物資源研究所）

3. 胚盤胞のバイオプシー検体による遺伝子発現解析法

ここでは、少数細胞、具体的には胚盤胞をバイオプシーした 10 個程度の細胞からの遺伝子発現を安定的に解析する手法について解説する。リアルタイム PCR 技術や様々な特化された試薬を用いることにより、個々の胚レベルで遺伝子発現を解析することで胚の品質評価に資するデータを取得することができる。本稿で述べる実験の流れとおおよその所要時間は図 17 の通りである。

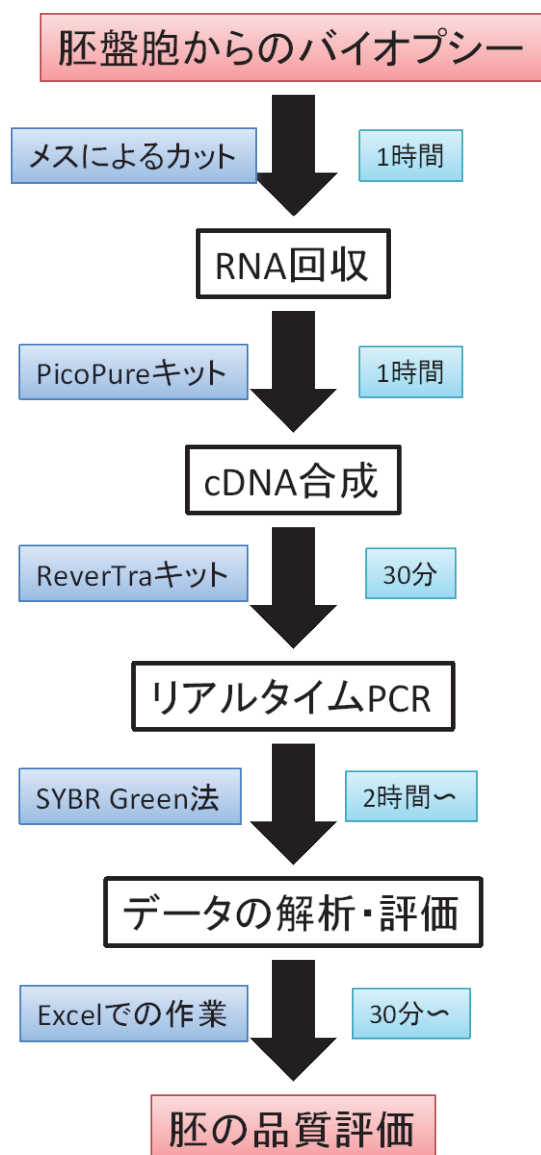


図 17. 実験の流れとおおよその所要時間

左は用いるツール、右は 10 サンプル程度を一度に取り扱う場合の標準所要時間。当然ながら、熟練度や扱うサンプル数、解析する遺伝子数により所要時間は大きく異なる。

①胚盤胞からのバイオプシー断片回収

- ・ バイオプシーの手法は、PCR 法や LAMP 法で性判別を行う場合に準じる。より多くの細胞を解析に回せばより多くの遺伝子の発現量を知ることができるが、同時に胚のダメージも大きくなるため、切断できる細胞量で解析できうる範囲にターゲット遺伝子を絞り込む必要がある。
- ・ バイオプシー断片は PBS/BSA (0.2 mg/ml) 中で洗浄し、マウスピペットを用いて RNase free の 1.5 ml チューブに少量の PBS/BSA と共にはき出す。泡を立てないように、チューブの底に近い側面にはき出せば、顕微鏡下で断片が視認できる。すぐに氷上に置く。次の断片を吸う前に、必ず一回はき出して断片がピペット内に残っていないか確認すること。サンプルごとに異なるピペットを使えばベストであるが、同じピペットでも何度か洗浄して次のサンプルに用いても良い。全ての断片が回収できたら、次のステップに進む。

②PicoPure® RNA Isolation Kit (アクトラス社) を用いたバイオプシー細胞からの RNA 抽出法

- ・ Extraction Buffer 100 μ l をチューブに入れ、泡を立てないようにゆっくりかつ十分に 10 回以上ピペッティングすることによりバイオプシー断片が確実にバッファーにより溶解されるようにする。その後、42°C のヒートブロックで 30 分処理する。すぐに RNA 回収を行わない場合、この状態で -80°C で数ヶ月程度ならば保存可能である。
- ・ 以後、キットの手順を日本語で解説する。このキットの特徴として、a) 洗浄後の廃液を捨てる手間が無いように容量が計算されているため、コンタミネーションを最小限に抑えることができる、b) 低回転速度で遠心することで、サンプルをカラムのフィルターメンブレン上に行き渡らせ、また最後の RNA 溶出の際も回収量を最大限にすることができる、c) カラム上で DNase 処理を行うので、DNase 処理によるサンプルのロスが無い、といった点が上げられる。もともとこのキットはレーザーマイクロダイセクションで回収した切片上の細胞片など、極微量のサンプルから RNA を抽出することに特化しており、例えばキアゲン社から出されている微量細胞からの RNA 抽出キット RNeasy Micro Kit (カタログ番号: 74004) に比べて、最大で 10 倍程度の回収量の増大が見込まれる (単一胚盤胞から両キットを用いて RNA を回収し、リアルタイム PCR を行った際の同一遺伝子の発現量から推定した)。

- 1) カラムの前処理 : 250 μl の Conditioning Buffer をカラムのフィルターメンブレン上に加え、室温で5分間インキュベートする。その後、16,000 x g で1分間遠心する。
- 2) サンプルが Extraction Buffer 100 μl に入ったチューブに、70%エタノールを 100 μl 加え、ピペッティングにより混和する。それを全量 (200 μl) カラムに加える。
- 3) まず 100 x g で2分間遠心し、その後直ちに 16,000 x g で 30 秒間遠心する。この過程で RNA がメンブレンに吸着する。
- 4) 100 μl の Wash Buffer 1 (W1)をカラムに加え 8,000 x g で1分間遠心する。
- 5) DNase 処理 : この処理は必須では無いとマニュアルには書かれているが、特に発現量の低い遺伝子の場合、DNA のコンタミが問題となる場合がある (イントロンをまたがないプライマーを使用した場合)。そのため、このステップをルーチンにした方が良い。キアゲン社の RNase-Free DNase Set (カタログ番号 : 79254) を用いる。1 サンプルあたり、5 μl の DNase I ストック溶液に 35 μl の RDD バッファーを加え静かに混和したものをカラムのメンブレン上に加え、室温で 15 分間放置する。
- 6) カラムに W1 を 40 μl 加え 8,000 x g で 15 秒間遠心する。
- 7) カラムに Wash Buffer 2 (W2)を 100 μl 加え 8,000 x g で 1 分間遠心する。
- 8) 再びカラムに W2 を 100 μl 加え、16,000 x g で 2 分間遠心する。遠心後、カラムに余分なバッファーが付着していないか、必ず確認すること。次の抽出ステップは極微量で抽出するため、この段階で少しでもカラムにコンタミネーションがあった場合、確実に次のステップ以降に影響を及ぼす。
- 9) カラムを付属の 0.5 ml チューブに移し、Elution Buffer (EB)を 16 μl 加える。確実にフィルターメンブレン全体に EB を行き渡らせるため、チップの先端を軽くメンブレンに付けた状態で EB を排出する。こうすることで、EB がメンブレンに最大限吸収され、最終的な RNA の回収量が上がる。

- 10) 1分間室温で放置後、まず 1,000 x g で1分間遠心することでEBをカラム全体に行き渡らせ、次いで 16,000 x g で1分間遠心してRNAを抽出する。この時、遠心機の回転方向とチューブのキャップの位置に注意すること(キットのマニュアル p.13に図解あり)。
- 11) 約 14 μl の RNA が回収される。この時、もし他のサンプルより明らかに回収された溶液の量が多かった場合は8) で注意したカラムへの Wash Buffer のコンタミネーションが疑われる。そのままでは次のステップへ進めないため、どうしてもそのサンプルを回収したければ、もう一度、1) から精製をやり直すことで、トータルの回収量は減るものの RNA を抽出することはできる。
- 12) 凍結融解による RNA の損傷を最小限にするために、すぐに次の cDNA 合成ステップへと進む。どうしても時間が取れない場合は-80°Cで保存する。

③ReverTraAce® qPCR RT Kit (東洋紡ライフサイエンス社) を用いた cDNA 合成法

- 1) ②-11) で回収した RNA を 0.5 ml チューブのまま、65°Cで5分間インキュベートし、氷上で急冷する。この処理により高次構造を取りやすい RNA に対する逆転写効率が向上する。
- 2) その間に、反応液を調製する。

5 x RT Buffer	4 μl
Primer Mix	1 μl
RT Enzyme Mix	1 μl

これらをサンプル数+1本分あらかじめ 1.5 ml チューブで混和し、マスターミックスを作る。そのマスターミックスを 0.2 ml PCR チューブに 6 μl ずつ分注しておく。
- 3) 2) で分注した反応液に1) の RNA を全量 (14 μl) 添加し、ピペッティングにより穏やかに混和する。
- 4) 逆転写反応 : 37°Cで15分間インキュベートする。
- 5) 酵素失活反応 : 98°Cで5分間インキュベートする (4) ~ 5) は PCR マシンでプログラムを組んでおくと良い)。

6) 反応終了後の cDNA 溶液は-20°Cで保存可能であるが、1 ヶ月以上保存する場合は-80°Cで保存する (蒸発を防ぐため)。

④リアルタイム PCR マシンを用いた遺伝子発現解析法

本稿では、ロシュ社のライトサイクラー480 を用いた解析手法について解説するが、他社の機種においても原理はほとんど同じである。

ア. プライマーの設計

リアルタイム PCR 実験に於いて、最も重要なファクターがプライマーの設計である。というのも、出版された論文のプライマー配列をそのまま用いても上手くいかない場合が往々にしてあるからである。また、時にはそのプライマー配列自体が間違っているという場合もある (筆者らは何度も遭遇している)。幸いなことに現在では多くの動物種でゲノムデータベースが充実しているため、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) などのデータベース上で遺伝子配列を取得することは容易である。その配列をもとに、筆者らは Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) というウェブ上の無料サービスを使ってプライマーの設計をしている。使い方は非常に簡単で、遺伝子配列を貼り付けた後に”General Settings”タブから Product Size Ranges を”80-160”にして、緑の”Pick Primers”ボタンを押すだけである (動かせるパラメーターは多数あるが、たいいてい場合はデフォルトで問題ない)。場合によっては 200 bp や 300 bp の長さでも良好な PCR 増幅を得ることはできるが、できるだけ短い方が効率の良い場合が多い。また、②の RNA 回収で DNase 処理をしているため、イントロンをまたぐプライマーを選ぶ必要も無い。それよりも、1 つの遺伝子について最低 2 ペアのプライマーを作製して、より効率の良いプライマーを選ぶべきである。なお、Primer3 の使い方については、ライフサイエンス統合データベースセンターが発信する統合 TV でも解説されているので、参考にされたい (<http://togotv.dbcls.jp/20110111.html#p01>)。このサイトには他にもライフサイエンスに有用なデータベースやウェブツールの活用法が動画で紹介されている (<http://togotv.dbcls.jp/>)。

ここでは一例として、ウシの H2AFZ 遺伝子 (ハウスキーピング遺伝子の一種) のプライマーを設計した時の画面を図 18 に示す。この例では、塩基配列の 54 番目から 156 番目までの 103 bp を増幅するプライマーペアを第 1 候補、476 番目から 600 番目までの 125 bp を増幅するプライマーペアを第 2 候補としてプライマーを注文した。また、Gómez *et al.* (2009) によるプライマーペア (塩基配列の 162 番目から 370 番目までの 209 bp を増幅する) も用いて、次項のようなプライマーのテストを行った。

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

[Primer3Manager](#) [Help](#)
[About](#) [Source Code](#)

< Back

Pair 1:

Left Primer 1: H2AFZ_F

Sequence: GGTAAGGCTGGGAAGGACTC

Start: 54 Length: 20 bp Tm: 60.1 °C GC: 60.0% ANY: 3.0 SELF: 3.0

Right Primer 1: H2AFZ_R

Sequence: TCAGGTGTCGATGAATACGG

Start: 156 Length: 20 bp Tm: 59.5 °C GC: 50.0% ANY: 4.0 SELF: 1.0

Product Size: 103 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 1.0

1	GCCTTTTCTC	TGCCTTGCTT	GCTTGAGCTT	CAGCGGAATF	CGAAATGGCT
51	GGCGGTAAGG	CTGGGAAGGA	CTCCGAAAG	GCCAAGACAA	AGGCGGTTTC
101	CCGCTCGCAG	AGAGCCGGTT	TGCAGTTCCC	GGTGGG CCGT	ATTCAATCGAC
151	ACCTGA AATC	TAGGACGACT	AGCCATGGAC	GTGTGGGCGC	GACTGCCGCT
201	GTGTACAGCG	CAGCCATCCT	GGAGTACCTC	ACCGCAGAGG	TACTTGAATT
251	GGCAGGAAAT	GCATCGAAAG	ACTTGAAGGT	AAAGCGTATF	ACCCCTCGTC
301	ACTTGCAACT	TGCTATTCGT	GGAGATGAAG	AATTTGGACTC	TCATCAAG
351	GCTACAATTG	CTGGTGGTGG	TGTCATTTCCA	CACATCCACA	AACTCTGAT
401	TGGAAGAAA	GGACAACAGA	AGACTGTCTA	AAGGATGCCT	GGATTTCTTA
451	TTATCTCAGG	ACTCTAAATA	CTCTAACAGC	TGTCCAGTGT	TGGTATTC
501	AGTTGGACTGT	ATCTCTGTGA	AAAACACAAT	TTTGCCTTTF	TGTAATCTA
551	TTTAAGCAAG	TTGGAAGTTT	AATTAGCTTT	CCAACCAACC	AAATTTCTGC
601	ATTTGAGTCT	TAACCATATT	TAAGTGTTC	TGTGGCTTCA	AAGAAGTAT
651	TGATGCTGAA	GTAGTGGGTT	TTGATTGAGT	TGACTGTTTT	TAAAAACTG
701	TTTGGATTTT	AAATGTGATG	CAGAAGTTAT	AGTAACAAAC	ATTTGGTTTT
751	GTACAGACAT	TATTTCCACT	CTGGTGGATA	AGCTCAATAA	AGGTCATATC
801	CCAAACTGTT	GTGTATAAAA	TTTGCTTGAT	TATAGTAGGA	ACAGCTTTGT
851	TGAATAGGTA	TCTTACCTAG	CAATAACTTA	AGCACATTTT	TTCCCTTTAA
901	ATTACTGTTA	ATTCTGTCTG	TAGATCACAA	AGTTAAAAGG	CCCAAGTG

Select all Primers

Pair 2:

Left Primer 2: H2AFZ_1_F

Sequence: ACAGCTGTCCAGTGTGGTG

Start: 476 Length: 20 bp Tm: 59.8 °C GC: 55.0% ANY: 8.0 SELF: 0.0

Right Primer 2: H2AFZ_1_R

Sequence: GCAGAAATTTGGTTGGTTGG

Start: 600 Length: 20 bp Tm: 60.3 °C GC: 45.0% ANY: 6.0 SELF: 0.0

Product Size: 125 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 0.0

Pair 3:

Left Primer 3: H2AFZ_2_F

Sequence: CCTTTTCTCTGCCTTGCTTG

Start: 2 Length: 20 bp Tm: 60.1 °C GC: 50.0% ANY: 2.0 SELF: 0.0

Right Primer 3: H2AFZ_2_R

Sequence: TCAGGTGTCGATGAATACGG

Start: 156 Length: 20 bp Tm: 59.5 °C GC: 50.0% ANY: 4.0 SELF: 1.0

図 18. Primer3Plus ウェブサイトを用いて、ウシ H2AFZ 遺伝子を増幅するプライマーを設計した

イ. プライマーのテスト

本マニュアルでは、SYBR Green I という蛍光物質を用いたインターカレーション法による DNA 定量法について解説する。その他にも、ハイブリダイゼーション法、LUX 法といった DNA 定量法があるが、本稿では割愛する。また、定量方法についても、検量線を用いた定量方法と用いない方法 ($\Delta\Delta C_t$ 法と呼ばれる) があるが、本稿では検量線を用いた定量方法について解説する。これらの原理については北條 (2007) の実験ガイドを参照されたい。

検量線は、スタンダードサンプルを希釈した系列を使って作成するが、スタンダードに PCR 産物そのものや PCR 産物をクローニングしたプラスミド DNA など、DNA 濃度から遺伝子のコピー数があらかじめ分かっているサンプルを用いる場合 (絶対定量) と、調べようとする細胞・組織から RNA を抽出し、合成した cDNA をスタンダードに用いる場合 (相対定量) がある。絶対定量は、主に細菌・ウイルスの定量や遺伝子組換え食品の定量など、サンプルに存在する遺伝子の絶対量を知りたい場合に用いられる。本マニュアルで扱うような遺伝子発現解析には相対定量が最もよく使われているため、以下の実験では cDNA を希釈してスタンダードとして用いている。希釈濃度は目的とするサンプルの発現量の変動範囲をカバーできるようにすることが最も望ましいが、通常は 10 倍、100 倍希釈系列を作れば充分である。ただし、極端に濃度が薄くなると安定した PCR ができなくなるため、Yeast tRNA などのキャリア (担体) を用いた希釈を行う。

1 ウェルあたり、以下の組成で反応液を調製する。

2 x SYBR Green I Master	10 μl
10 μM プライマー (forward/reverse)	0.5+0.5 μl
水	7 μl
テンプレート cDNA	2 μl (※)
合計	20 μl

※ここでテンプレート cDNA の量を 1 μl ではなく 2 μl にしたのは、ピペッティング等による誤差をなるべく少なくするためである。

PCR 反応条件は、個々の機器および試薬によって異なるが、上記の Primer3 ではアニーリング温度が 60°C になるようなプライマーを作成するため、アニーリング温度が 60°C になるように PCR 反応条件を設定する。ほとんどの場合はデフォルトの設定で上手く増幅するはずであり、もし上手く増幅しなかった場合は、PCR 条件を色々といじるよりは、プライマーを変えてしまった方が劇的に改善することが多い。逆に言えば、「誰がやっても上手く

PCR がかかる良いプライマー」を見つけることが重要である。

図 19 は実際に上記の H2AFZ 遺伝子に対する 3 種類のプライマーを用いてリアルタイム PCR を行った結果である。まずは、melting curves（融解曲線）を見ることで、非特異的産物が増幅されていないかを知ることができる。

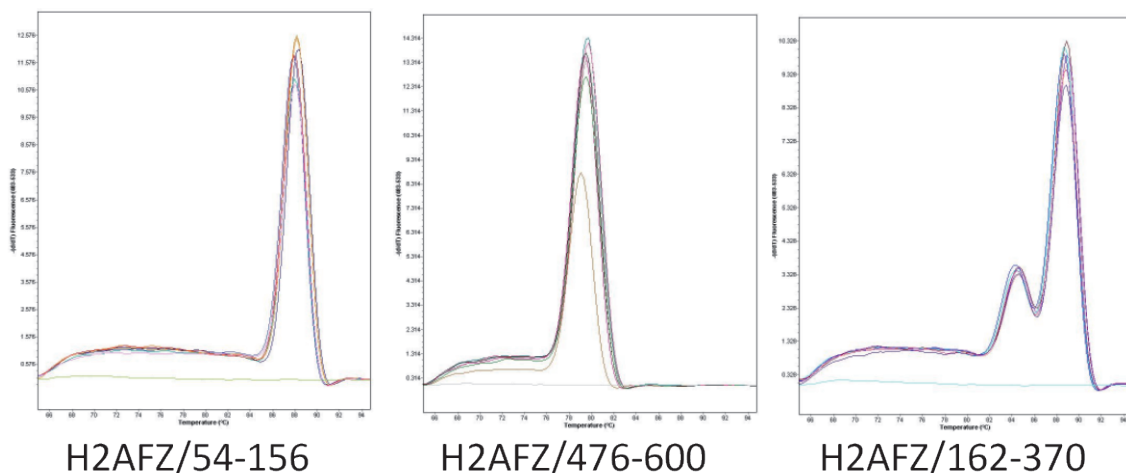


図 19. 3 種類のプライマーペアを用いた場合の融解曲線

図 19 を見て分かるように、54-156 と 476-600 では 1 本の鋭いピークのみが観察されるが、162-370 では 2 本のピークが見られる。このことは、162-370 のプライマーペアでは非特異的産物が増幅されていることを示している。実際に PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動した写真が図 20 になるが、確かに 162-370 では目的の 200 bp 程度のバンドの上に非特異的なバンドが見られるのに対し、54-156 および 476-600 では目的のサイズのバンドのみが増幅されている。SYBR Green I を用いたインターカレーション法では、増幅された全ての DNA の量がサイズに関わりなく定量されてしまうため、このような非特異的産物が存在することは誤った実験結果を招くことになる。162-370 のプライマーペアは論文に掲載された配列であるが、いざ自分の手持ちの機器・試薬で同じ実験を行おうとするときにはこのような落とし穴があることも知っておかなければならない。というのも、往々にして論文に記されたものと全く同じ機器・試薬類を用意することは困難であるからである。

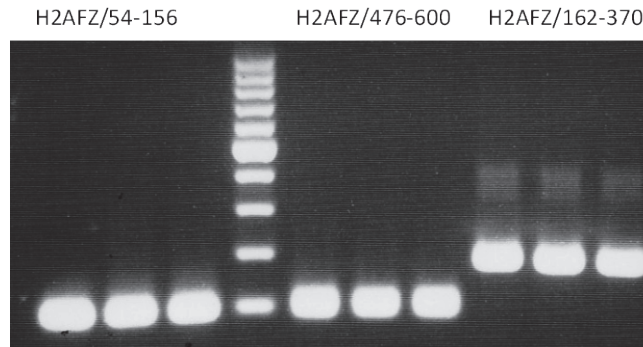


図 20. 3種類のプライマーのリアルタイム PCR 後のアガロースゲル電気泳動写真

このように、初めて使うプライマーを用いて実験を行う場合は、融解曲線のチェックおよび PCR 産物の電気泳動を行い、確実に目的の PCR 産物のみが増幅されていることを確認する必要がある。もっと厳密に言えば PCR 産物をシーケンシングして塩基配列まで調べれば文句は無いが、通常そこまで行う必要は無い。心配であれば、PCR 産物を制限酵素で切断し、予想されるサイズのバンドが見られることが確認できれば問題は無い。

また、図 21 に見られるように、多数のピークが存在したり、ピークが一致しないものも良くないプライマーであるため、これらのプライマーペアを実験に用いることは避ける。

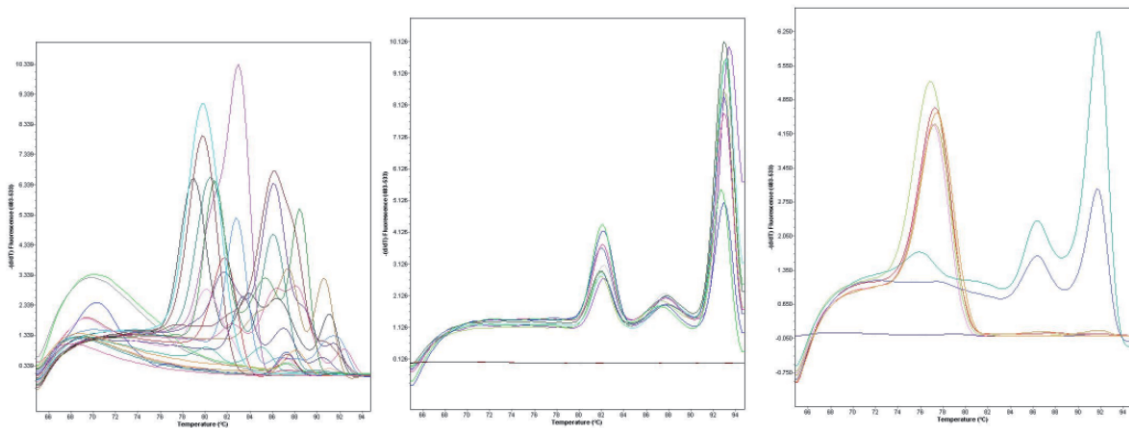


図 21. 良くないプライマーの融解曲線の例

図 22 は融解曲線が良好であった 2 種類のプライマーペアを用いて、4 つの希釈系列 (10 倍希釈) をスタンダードにリアルタイム PCR を行った後の増幅曲線およびスタンダードカーブを示している。どちらのプライマーペアを用いた場合でも、4 つの希釈系列がきれいに等間隔に並んでおり、また一番下の立ち上がっていない直線はネガティブコントロールであるため、コンタミネーションやプライマーペアの生成なども起こっていないことが分

かる。スタンダードカーブもきれいに描けており、Efficiency もほとんど 2.0 に近いことから、PCR 増幅効率が非常に高いことが分かる。理論的には Efficiency は 2.0（1 回の PCR サイクルで PCR 産物が 2 倍に増幅する）であるが、1.8 以下のプライマーペアは増幅効率が悪いので用いるべきでは無い。また、Error が 0.2 以上の場合も、プライマーあるいは実験系に問題がある場合があるので、避ける。

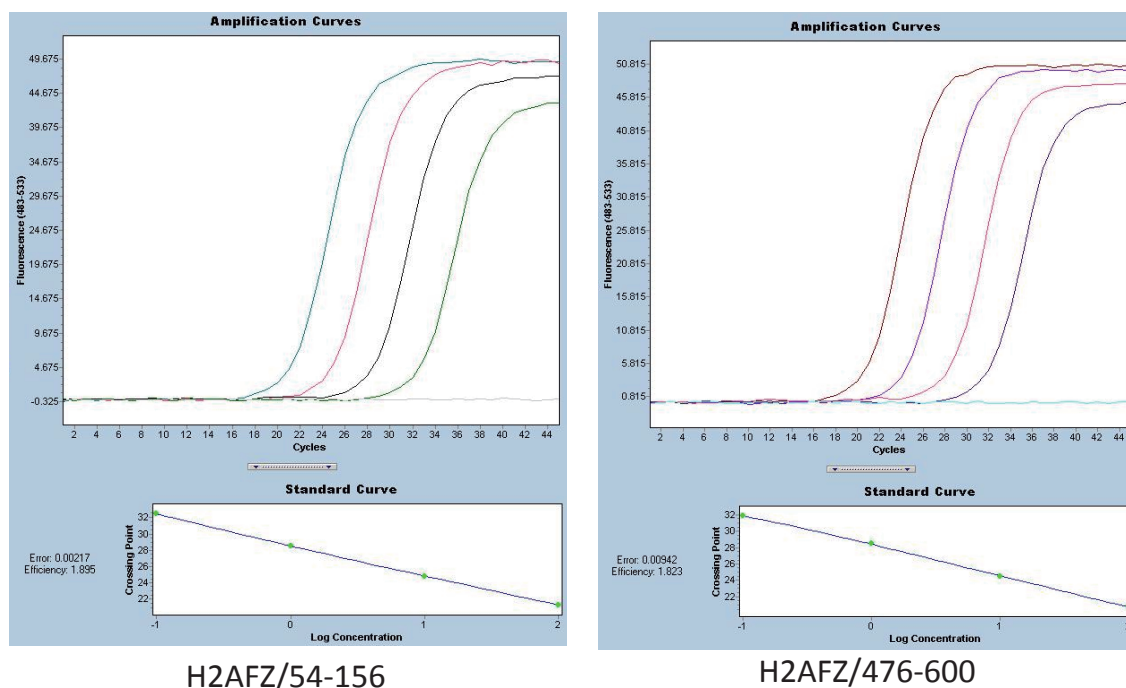


図 22. 2 種類のプライマーペアを用いた場合の増幅曲線およびスタンダードカーブ

以上、リアルタイム PCR 実験に於いて最も重要なファクターであるプライマーの設計およびテストについて述べてきた。まとめると、

- 1) NCBI などのデータベースを利用して、解析したい遺伝子の配列情報を得る。
- 2) Primer3Plus ウェブサービスを用いて、1 遺伝子について最低でも 2 組のプライマーペアを設計する。
- 3) 論文に掲載されているプライマー配列を用いる場合でも、必ず自分の機器・試薬を用いてテストを行う。
- 4) 以下のテストをパスしたプライマーペアのみ、今後の実験に用いる。
 - ・融解曲線がきれいに 1 つのピークを示しているか。

- ・ PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した時に、単一のバンドになっているか。また、ネガティブコントロールのレーンにプライマーダイマーの形成が無いか。
- ・ 増幅曲線およびスタンダードカーブがきれいに描けており、Error が 0.2 以下、Efficiency が 1.8 以上であるか。

5) これらのテストをパスしたプライマーが複数ある場合は、同濃度のサンプルで最も早くシグナルが検出できているプライマー (=感度が高いプライマー) を用いれば良い。

ウ. 内在性コントロールについて

RNA が大量に抽出できる組織であれば、cDNA 合成の前に RNA 量を分光光度計などを用いて定量し、すべてのサンプル間で RNA 量を揃えることができるが、本プロトコルで扱うような極微量の RNA 量を定量することはできない。そのため、発現量がサンプル間で一定していると考えられるハウスキーピング遺伝子を内在性コントロールとして mRNA 量の補正に用いるのが一般的である。しかし、適切なハウスキーピング遺伝子を選択しないと、誤った実験結果をもたらす可能性がある[Vandesompele *et al.* (2002)]。

ウシの受精卵および体細胞クローン胚のハウスキーピング遺伝子発現量を調べた論文では、一般的にハウスキーピング遺伝子として使われる GAPDH や beta-ACTIN の発現量自体に IVF 胚とクローン胚の間で違いがある事が報告されている[Ross *et al.* (2010)]。それに対してヒストン H2A.2 および PPIA(Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A))という遺伝子では IVF 胚とクローン胚の間で大きな違いは無かった。胚盤胞においては、H2A よりも PPIA の発現量の方が高いため、本マニュアルで扱うような微量サンプルの場合は、PPIA を内在性コントロールとして用いることを推奨する。

エ. レプリケートは必要か？

本マニュアルにおけるプロトコルでは、リアルタイム PCR は最も誤差が少ないステップである。そのため、レプリケートを取るのであればその分サンプル数を増やすべきとされている[北條 (2007)]。

オ. 実際のサンプルを用いた実験結果

ここからは、実際のサンプルを用いて行った実験結果について紹介する。用いたプライマーは以下の通りである。

・内在性コントロール遺伝子：PPIA

forward: 5'-GCATACAGGTCCTGGCATCT-3'

reverse: 5'-GCCATCCAACCACTCAGTCT-3'

・母体の妊娠認識に必要な因子として知られている遺伝子:インターフェロン・タウ (IFN-tau)

forward: 5'-TCCATGAGATGCTCCAGCAGT-3'

reverse: 5'-TGTTGGAGCCCAGTGCAGA-3'

・細胞の多分化能に関与する遺伝子：OCT4

forward: 5'-CCACCCTGCAGCAAATTAGC-3'

reverse: 5'-CCACACTCGGACCACGTCTT-3'

・グルコーストランスポーター1：GLUT1

forward: 5'-TCCGGCAGGGAGGAGCAAGT-3'

reverse: 5'-TGCTGAGATCTATCAGTTTGAG-3'

サンプルはウシの day 8 胚盤胞 (IVF 胚) の一部をバイオプシー (10 細胞程度) したものであり、細胞数はサンプル間でかなりばらつきがある。合計 20 個の胚盤胞から RNA を抽出、cDNA を合成してリアルタイム PCR を行った。反応液の組成はプライマーテストと同様である。なるべく検出感度を上げるため、最大 4 μ l のテンプレート cDNA を 20 μ l の系で PCR にかけても良い。

サンプル数が多い場合は 8 連ピペッターを用いても良い。また、マスターミックスを分注するために電動ピペッターを利用すると簡便であるが、サンプル数が 20 程度であれば 1 つ 1 つ通常のピペットマンでピペッティングしても問題ない。

⑤データの解析・評価

表 2 はリアルタイム PCR の結果 (生データ) をそのまま Excel に取り込んだものである。まず、blast (胚盤胞) #12 と #19 における PPIA の発現量が他のサンプルより著しく低いことが分かる。これは、サンプリングの過程でバイオプシー断片がうまく取れなかった、あるいは RNA 抽出の過程などで何らかの理由によりサンプルの大部分が失われてしまったことを意味する。通常、このようなサンプルは解析から除く方が良い。そうしないと、他に比べて著しく大きい/小さい値が出てきてしまうので、その後の解析に問題が生じる。も

もちろん、実際に遺伝子発現量が極めて少ないために検出できなかった、という事も考えられるが、少なくとも PPIA の発現が著しく低い場合はサンプル自体に問題があると考えて良い。

表 2. 20 個の胚盤胞からのバイオプシーサンプルを用いたリアルタイム PCR の結果

	PPIA	IFN-tau	OCT4	GLUT1
blast #1	8.12	2.9	208	3.26
blast #2	12.5	6.2	3.33	5.27
blast #3	14.2	2.34	4.85	8.89
blast #4	12.6	1.03	2.39	3.77
blast #5	8.18	0.825	2.52	4.82
blast #6	8.33	6.04	2.73	4.16
blast #7	13.5	14.1	3.68	4.41
blast #8	4.34	4.17	1.22	1.07
blast #9	3.67	0.645	1.15	1.58
blast #10	12.2	3.46	1.9	3.66
blast #11	3.34	1.66	0.564	1.84
blast #12	0.0729	0.145	0	0.661
blast #13	0.737	0.554	0.0968	0.333
blast #14	7.04	1.15	1.61	3.3
blast #15	2.47	5.47	0.679	0.529
blast #16	4.78	0.849	1.04	2.67
blast #17	1.35	0.871	0.484	0.689
blast #18	3.14	4.47	0.173	1.12
blast #19	0.0289	0	0	0
blast #20	0.653	0.626	0.176	0.332

基本的には、解析したい遺伝子の発現量を内在性コントロール遺伝子の発現量で割り算することで、各サンプル間の発現量を標準化し、相対的な遺伝子発現量を解析する(表 3)。この例では発現量をいったん Excel にコピーして作業しているが、リアルタイム PCR マシンによっては、標準化の過程を自動的に行うソフトウェアも付属している。図 23 では、得られた相対発現量を散布図にプロットしている。このような形でグラフ化すると、個々の

胚ごとの発現量が一目で分かるが、そこからどう解釈していくかは難しい問題であり、例えば体細胞クローン胚では IVF 胚に比べて IFN-tau を含む多くの発現に重要な遺伝子の発現が乱れているという報告は多数ある [Daniels *et al.* (2000, 2001), Fujii *et al.*(2010), Kato *et al.* (2007), Li *et al.* (2006), Sawai *et al.* (2005), Wrenzycki *et al.* (2001)]。

表 3. blast #12, #19 を除き、それぞれの発現量を内在性コントロール PPIA で割った値

	IFN-tau/PPIA	OCT4/PPIA	GLUT1/PPIA
blast #1	0.357	0.256	0.401
blast #2	0.496	0.266	0.422
blast #3	0.165	0.342	0.626
blast #4	0.082	0.190	0.299
blast #5	0.101	0.308	0.589
blast #6	0.725	0.328	0.499
blast #7	1.044	0.273	0.327
blast #8	0.961	0.281	0.247
blast #9	0.176	0.313	0.431
blast #10	0.284	0.156	0.300
blast #11	0.497	0.169	0.551
blast #13	0.752	0.131	0.452
blast #14	0.163	0.229	0.469
blast #15	2.215	0.275	0.214
blast #16	0.178	0.218	0.559
blast #17	0.645	0.359	0.510
blast #18	1.424	0.055	0.357
blast #20	0.959	0.270	0.508

しかしながら、個々の胚における遺伝子発現のバリエーションは非常に大きい。図 23 では OCT4, GLUT1 は比較的サンプル間のばらつきが小さいが、IFN-tau では 10 倍以上の発現量の差がある。そのため、コントロールとする胚 (IVF 胚や *vivo* 胚など) は最低でも 20 サンプル以上準備し、そのコントロールの範囲と実際に処理したサンプルの発現状態を比べることで、胚の品質評価を行うべきである。

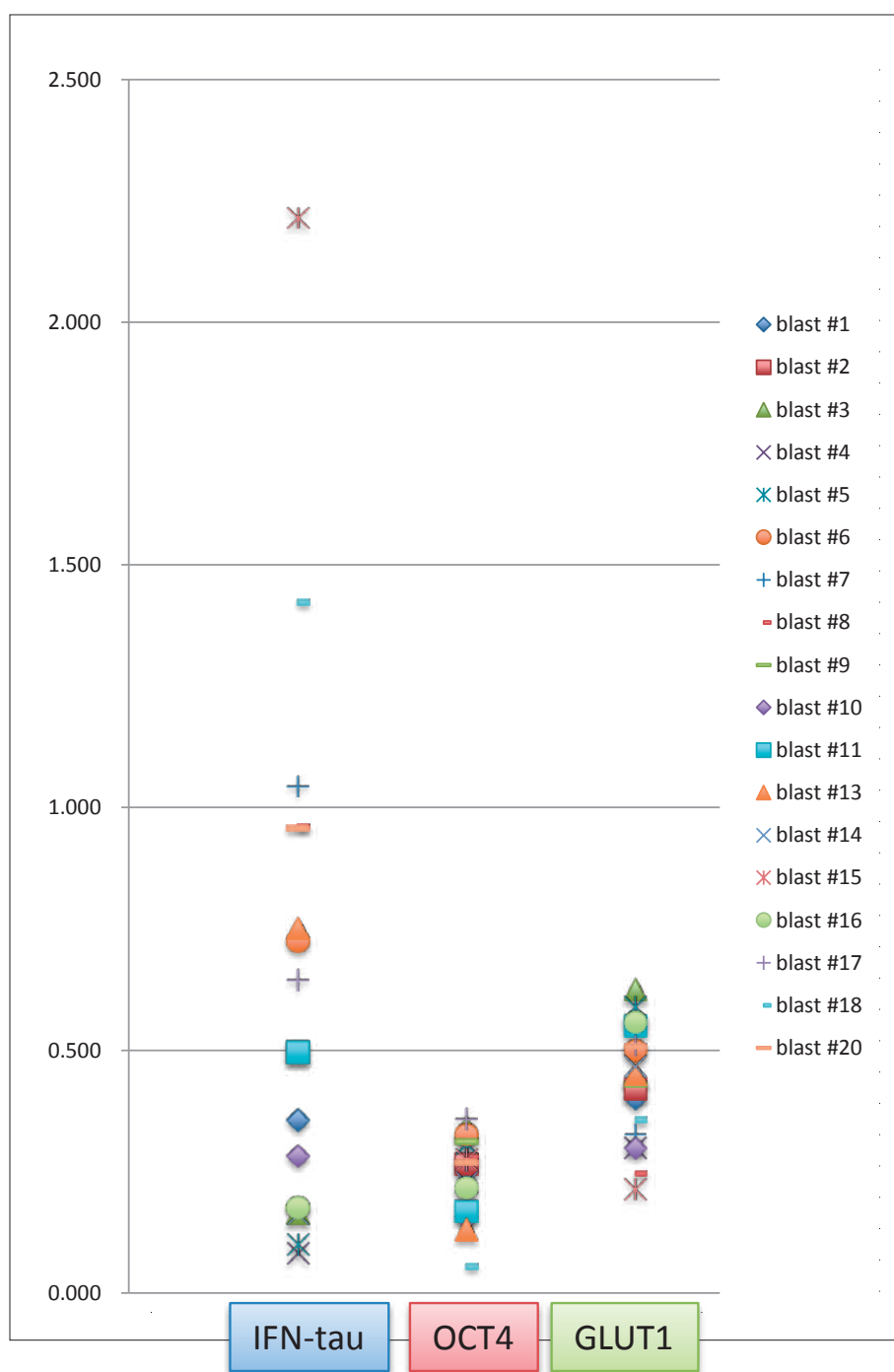


図 23. 各遺伝子の発現量をサンプルごとにプロットした散布図

もともと、現状ではこの遺伝子の発現が高い＝高品質の胚である、という遺伝子は見つかっておらず、むしろ IFN-tau や初期化因子である OCT4、SOX2 などの発現が低い胚＝低品質の胚、と考えた方が良い。ウシの場合は、1頭の受胎牛には通常1～2個の受精卵しか移植できないため、品質の低い胚を移植前に除くことで、受胎率を上げる効果が期待できる。なお、同じスタンダード cDNA を用いる限り、別の日に処理したサンプルでも比較す

ることは可能である。そのため、スタンダード cDNA は大量に用意しておいた方が良い（胚盤胞を 10〜20 個程度プールするなど）。ただし、凍結融解を繰り返すことによってサンプルはダメージを受けるし、また操作する人間や試薬のロット、操作時間などにより実験結果が影響を受けることも考えられるので、必要な数だけサンプルが揃ったところで、一気に実験を始めた方が良い。②にも書いたように、Extraction Buffer に溶解したサンプルは -80°C で数ヶ月間保存しても問題ないので、例えば 1 週間ごとに 10 個程度のサンプリングを行い、凍結保存しておき、数週間分を一気に RNA 抽出→cDNA 合成→リアルタイム PCR 解析まで実験を行う、といった実験計画を立てるべきである。

⑥トラブルシューティング

ア. 全体の流れに対して

- ・ 実験を途中で止めたい場合→実験を止められるポイントは限られている。a) バイオプシー断片をサンプリングし、Extraction Buffer で処理後 -80°C で保存、b) RNA 抽出後 -80°C で保存、c) cDNA 合成後 -20°C（長期間の場合は -80°C）で保存。
- ・ 何サンプルまで同時に処理できるか？→バイオプシーする胚の数が多い場合は、10 個程度を 1 グループとして Extraction Buffer で処理して -80°C に保存する。RNA 抽出時は、用いる遠心機に一度に装着できるサンプル数（多くの場合 24 サンプル程度）が律速となる。cDNA 合成は例えば 96 ウェルプレートを用いれば 96 サンプルまで一度に処理できる。リアルタイム PCR も、ライトサイクラー 480 では 96 ウェルプレートを用いるため、最大で 92 サンプル（3 ウェルはスタンダード、1 ウェルはネガティブコントロール）を同時に解析することができる。

イ. 機器や器具の準備について

- ・ 必要な機器がない→他の研究室のものが借りられれば貸してもらおう。ただし、離れた場所にある場合は、移動時にサンプルを氷上で保持するなど、サンプルの保護に気をつける。
- ・ RNA 専用のピペットやチューブが用意できない→実験台やピペット、器具などを 70% エタノールで消毒し、RNase Zap などの RNase 阻害剤入りスプレー（ワイプタイプのもも発売されている）を用いてできるだけ RNase フリーの環境を整えるようにする。

- ・ 試薬類が高価なので節約できないか？→試薬類はいずれも保存できるので、メーカーのキャンペーン時などにまとめて購入すると良い。リアルタイム PCR は本稿では1 サンプルあたり 20 μl の系で解説しているが、10 μl でもほぼ同じ結果が得られている。ただし、容量が少なくなると誤差も多くなるので、必ず自らの手で確認すること。

ウ. バイオプシーについて

- ・ うまくサンプリングできない→性判別に用いるのと同じプロトコルで良いので、そのような技術を持っている研究室に技術習得に行くのも一つのやり方である。
- ・ バイオプシー断片がうまく拾えない→場合によってはカットした際に断片がシャーレに埋没してしまうことがある。そのような場合は細いガラスキャピラリーなどを用いて、一部分でも良いので回収する。

エ. RNA 抽出について

- ・ RNA が回収できない→どこかのステップでミスした可能性がある。特にバッファーの種類を間違ったり、最後の RNA 回収の際に Elution Buffer ではなく水を使ったりすると RNA がほとんど回収できないので注意する。

オ. cDNA 合成について

- ・ サーマルサイクラー (PCR マシン) が無い→ブロックインキュベーターでも代用可能。

カ. リアルタイム PCR について

- ・ 良いプライマーが設計できない→標的とする遺伝子のサイズが小さかったりするとプライマー候補が見つからない場合がある。その際は、パラメーターを変更してプライマー設計を繰り返す。
- ・ スタンダードカーブが上手く作成できない→あまりにも薄すぎるスタンダードは不安定な PCR 増幅をもたらすので、希釈系列の変更を検討する。
- ・ 著しく値の外れた結果が出る→PPIA などの内在性コントロール遺伝子の発現が他のサンプルに比べて 10 倍以上低い場合は、サンプル収集あるいはその後の過程においてサンプルの大部分が失われた可能性があるため、解析から除く。

⑦準備するもの

1) 必要な機器、器具

- オートピペッター：RNA 操作に用いるものと通常の PCR 操作に用いるものを分けることができた方がよい。1000、200、20、2 μ l 用が必要。
- 遠心機：1.5 ml のチューブを 100 x g で遠心できるもの。サンプル数が多い場合は、遠心できる本数が多いタイプが好ましい。
- 1.5 ml チューブ：RNA を扱うため、RNase free のチューブを用いる。エッペンドルフ社のバイオピュア（100 本入り、カタログ番号：95192）のように個別包装されているものがあれば RNase のコンタミを最小限に抑えることができる。
- 0.2 ml PCR 反応チューブ：通常の PCR 用に市販されているもので良い。多数サンプルを扱う場合は、8 連キャップ付きのものが使いやすい。
- リアルタイム PCR 装置：本稿ではロシュ社のライトサイクラー480 を用いているが、各社から様々な機種が発売されている。96 ウェルタイプのものであれば、同時に複数の遺伝子を定量することができる。高額な機器であり、新規導入することは簡単ではないため、近くの研究室で使わせてくれる機種を使用した方がよい。本稿ではどのように実験系を最適化するかについても述べているので、機種が違っても手法は応用できる。
- PCR マシン：cDNA 合成に用いる。オイルフリーの機種が望ましい。PCR マシンが無い場合、ヒートブロックで代用する。
- ヒートブロック：42°C および 65°C で使用できるもの。

2) 用いるキット・試薬

- RNA 回収キット：アクトラス社 PicoPure® RNA Isolation Kit（日本では BM 機器株式会社が輸入・販売している。カタログ番号：KIT0204）40 回分で定価 60,000 円。
- DNase 試薬：キアゲン社 RNase-Free DNase Set（カタログ番号：79254）50 回分（本マニュアルで用いる場合は 100 回分）で定価 13,000 円。

- cDNA 合成キット：東洋紡ライフサイエンス社の ReverTraAce® qPCR RT Kit（カタログ番号：FSQ-101）200 回分（本マニュアルで用いる場合は 100 回分）で定価 38,000 円。
- リアルタイム PCR 用試薬：ロシュ社 LightCycler® 480 SYBR Green I Master（カタログ番号：4707516）500 回分で定価 54,000 円。ただし、他の機種を使う場合は推奨されている試薬を用いること。
- プライマー：グライナーやシグマなど、多くのメーカーでプライマーの外注を受けている。

3) RNA を扱うときの注意点

- RNA は非常に壊れやすい(RNA 分解酵素である RNase は我々の皮膚や唾液、汗など様々な部分に存在し、かつ熱に対する安定性も非常に高い) ため、RNase の混入をいかに防ぐか、という点が重要になる。
- そのため、a) 実験時には必ず手袋を着用する、b) 実験台は 70%エタノール消毒後、市販の RNase 阻害剤入りスプレー（RNaseZap など）を用いて RNase フリーの環境を整える、c) 溶液類は DEPC 処理して RNase free にする必要があるが、DEPC は発がん作用があり、また本実験で用いる量は少量であるため、溶液類は RNase free のものを購入したり、あるいは水などはキット類に含まれているのでそれらを用いる。
- 器具類は RNA 専用として用意し、ほこりの付かないように RNA 専用引き出しに保存することが望ましい。器具類に触れる際は必ず手袋を着用する。

⑧おわりに

以上、ウシ胚盤胞のバイオプシーサンプルを材料に用いたリアルタイム PCR 法について解説してきた。極微量のサンプルを扱うため、全てのステップにおいて細心の注意が必要である。特に、RNA 抽出過程までは必ず手袋を着用し、RNase のコンタミを防ぐことが実験成功への大きなファクターとなる。

しばしば分子生物学の実験は料理に例えられることがある。なるほど、確かに、材料の種類、大きさ（重さ）、調味料、鍋やフライパンなどの器具、それらをもとに、レシピに基づいて作れば美味しい料理ができるはずであるのと同様、適切なサンプルを用意してプロ

トコルに従って実験を行えば、きれいな結果が出る・・・はずなのだが、なぜか上手くいかないことも多い。慣れた人の手さばき見ると簡単そうなのに、実際にやってみるとなかなか難しい。その理由は、もちろん慣れ、ということもあろうが、上手い人というのは、料理でも実験でもその「キモ」の部分をしっかり理解している、という点にあるのではないだろうか。全ての過程をきっちり容量通り、時間通りに集中してやる事が理想ではあるが、なかなかそうはいかない。けれども、ここだけは外せない、というポイントは必ずある。そのコツを知っているかどうか、その場面で集中できるかどうか、という違いが上手い人と下手な人を分けているのではないだろうか。本マニュアルでは、そういったコツの部分でもできる限り記載したつもりではあるが、実際に試行錯誤しながら自らの手でつかんでいって欲しい。そうすることで、ただのプロトコルが「自分のプロトコル」となるのである。

引用文献

- Daniels, R., Hall, V., Trounson, A.O. (2000) Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol. Reprod.* 63: 1034-1040.
- Daniels, R., Hall, V.J., French, A.J., Korfiatis, N.A., Trounson, A.O. (2001) Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques. *Mol. Reprod. Dev.* 60: 281-288.
- Fujii, T., Moriyasu, S., Hirayama, H., Hashizume, T., Sawai, K. (2010) Aberrant expression patterns of genes involved in segregation of inner cell mass and trophectoderm lineages in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Cell. Reprogram.* 12: 617-625.
- Gómez, E., Gutiérrez-Adán, A., Díez, C., Bermejo-Alvarez, P., Muñoz, M., Rodríguez, A., Otero, J., Alvarez-Viejo, M., Martín, D., Carrocera, S., Caamaño, J.N. (2009) Biological differences between in vitro produced bovine embryos and parthenotes. *Reproduction* 137: 285-295.
- 北條浩彦編 (2007) 原理からよくわかるリアルタイム PCR 実験ガイド, 実験医学別冊, 羊土社, 東京.
- Kato, Y., Li, X., Amarnath, D., Ushizawa, K., Hashizume, K., Tokunaga, T., Taniguchi, M., Tsunoda, Y. (2007) Comparative gene expression analysis of bovine nuclear-transferred embryos with different developmental potential by cDNA microarray and real-time PCR to determine genes that might reflect calf normality. *Cloning. Stem. Cells.* 9: 495-511.
- Li, X., Amarnath, D., Kato, Y., Tsunoda, Y. (2006) Analysis of development-related gene expression in cloned bovine blastocysts with different developmental potential. *Cloning. Stem. Cells.* 8: 41-50.

- Ross, P.J., Wang, K., Kocabas, A., Cibelli, J.B. (2010) Housekeeping gene transcript abundance in bovine fertilized and cloned embryos. *Cell. Reprogram.* 12: 709-717.
- Sawai, K., Kageyama, S., Moriyasu, S., Hirayama, H., Minamihashi, A., Onoe, S. (2005) Analysis of mRNA transcripts for insulin-like growth factor receptors and binding proteins in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Cloning. Stem. Cells.* 7: 189-198.10
- Sawai, K., Kageyama, S., Moriyasu, S., Hirayama, H., Minamihashi, A., Onoe, S. (2007) Changes in the mRNA transcripts of insulin-like growth factor ligand, receptors and binding proteins in bovine blastocysts and elongated embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *J. Reprod. Dev.* 53: 77-86.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome. Biol.* 3: RESEARCH0034.
- Wrenzycki, C., Wells, D., Herrmann, D., Miller, A., Oliver, J., Tervit, R., Niemann, H. (2001) Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* 65: 309-317.

【3. 胚盤胞のバイオプシー検体による遺伝子発現解析法】

執筆者：金田正弘（畜産草地研究所）、橋谷田豊（家畜改良センター）、赤木悟史（畜産草地研究所）

参 考 资 料

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

武田久美子¹⁾・長谷川清寿²⁾・市野清博³⁾・今井 昭⁴⁾・金山佳奈子⁵⁾・高橋清也¹⁾
赤木悟史¹⁾・今井 裕⁶⁾・山中真理子¹⁾・大西 彰⁷⁾・花田博文¹⁾

¹⁾畜産草地研究所・²⁾島根県立畜産試験場・³⁾山口県畜産試験場・⁴⁾広島県畜産技術センター
⁵⁾家畜改良センター・⁶⁾京都大学大学院農学研究科・⁷⁾農業生物資源研究所

はじめに

哺乳類の細胞質には、エネルギー生産を担う小器官ミトコンドリアが存在する。ミトコンドリア内には、エネルギー生産に必要な蛋白質をコードする核外遺伝子であるミトコンドリア遺伝子(mtDNA)が数コピーずつ存在している。mtDNAはDNAの保護蛋白であるヒストンと結合しておらず、核DNAと比較して変異を受けやすい¹⁾。その中でも蛋白質をコードしない調節領域(D-loop領域)は特に塩基置換が多く、ウシではほぼ母系ごとに異なっていることが知られている^{2,3)}。

クローン動物を生産するために用いる核移植では、核を提供する細胞(ドナー細胞)を除核した卵子(レシピエント卵子)に融合させ、ドナー核

の初期化(リプログラミング)を促した後に個体への発生を誘導する^{4,5)}。従来、ウシの核移植においては、ドナー細胞とレシピエント卵子は、由来個体が異なる場合が多く、核移植胚においてはドナー細胞およびレシピエント卵子双方に由来する2種類のmtDNAが混じり合う状態(ヘテロプラズミー)となっていると考えられる(図1)。例えば、体細胞核移植においては、ひとつの細胞内に存在するmtDNAはドナー細胞の約2,000分子に対して、レシピエント卵子には約200,000分子存在していることから⁶⁾、核移植後の胚細胞質内にはそれぞれmtDNAがおおよそ1:100の割合で混在していると考えられる。しかし、mtDNAは核DNAとは異なる複製・伝達様式を持っており、細胞周期と同調せずに複製を行い、細胞分裂

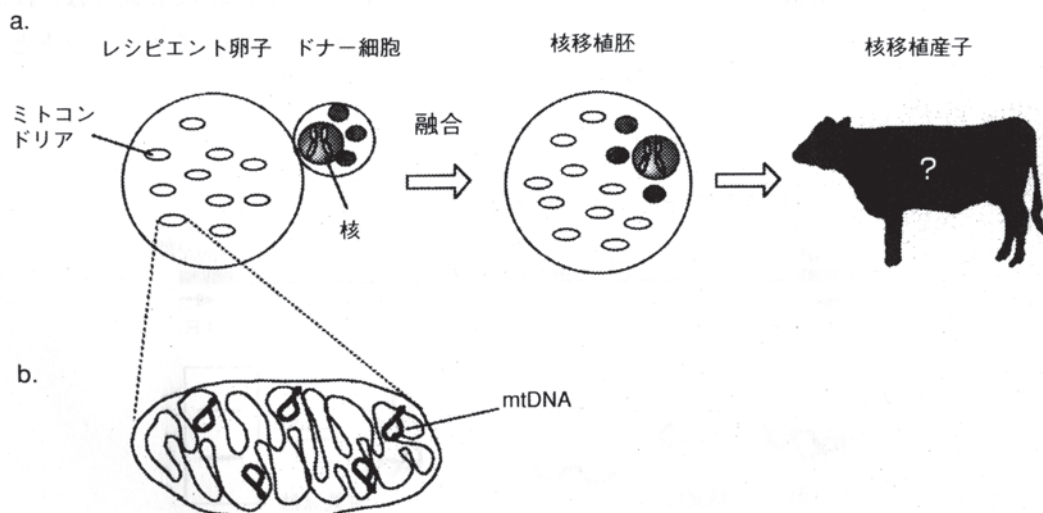


図1 核移植によって生じる mtDNA ヘテロプラズミー。a. 核移植胚はレシピエント卵子、ドナー細胞双方のミトコンドリアが存在する。b. 一つのミトコンドリア内には数分子の mtDNA が存在する。mtDNA は約 16kbp の環状二本鎖 DNA である。

時に mtDNA 集団はランダムに娘細胞へ分配されるので⁷⁾、核移植操作で混在した mtDNA がその後の発生過程でどのように変化するかは明らかでない。

我々は、これまでドナー細胞由来の mtDNA の分配様式について解析する目的で、ウシ核移植胚の発生過程および産子について調査してきた。その結果、初期胚の割球をドナー細胞とした核移植では、ドナー細胞とレシピエント卵子を電気融合した直後の胚では双方由来の mtDNA の存在が確認されたが、胚の発生に伴ってドナー細胞由来の mtDNA が次第に消失し、ほとんどの産子がドナー細胞とは異なる mtDNA 型であった⁸⁾。しかし、この現象はすべての核移植胚で起こるわけではなく、ドナー細胞として体細胞を用いた場合でもドナー細胞由来 mtDNA が核移植産子で検出される例が多数報告されている⁹⁻¹²⁾。我々の解析においても、mtDNA 型がヘテロプラズミーとなる核移植産子が複数検出されたが、これらはレシピエント卵子側の mtDNA 型が同定されていない例であったため、ヘテロプラズミーの原因を詳細に検討することが不可能であった。

そこで我々は、あらかじめ mtDNA 型が同定されているドナー細胞およびレシピエント卵子によって作出された核移植産子を用いて mtDNA 型のヘテロプラズミーの発生要因について検討した。

材料と方法

解析には、mtDNA 型のヘテロプラズミーが検出されたウシ体細胞および初期胚由来核移植産子 12 頭を用いた。体細胞由来の核移植産子はクローン 3 組 (7 頭) で、ドナー細胞の種類は卵丘細胞 (cumulus cell) であった。その内訳は、レシピエント卵子の mtDNA 型が同定されている単子 3 頭 (C1、C2 と C3)、レシピエント卵子の mtDNA 型が同定されている同腹双子 2 頭 (C4 と C5)、ならびにレシピエント卵子の mtDNA 型が不明な単子 2 頭 (C6 と C7) であった。また、初期胚 (embryo) 由来の核移植産子はクローン 2 組 (5 頭) であった。その内訳は、レシピエント卵子の mtDNA 型が不明な単子 3 頭 (E1、E2 と E3)、レシピエント卵子の mtDNA 型が不明な同腹双子 (E4 と E5) であった。

解析対象とした産子の血液サンプルは 100 μ l を血液用 DNA 抽出キット (Gen とる君、宝酒造社)、組織サンプルはおおよそ 2 mm³ の断片を組織用 DNA 抽出キット (DneasyTM Tissue Kit、キアゲン社) を用いて、それぞれのサンプルから DNA を抽出、精製した。

産子の mtDNA 型解析は、mtDNA の高変異部位である D-loop 領域の塩基配列の違いを PCR-SSCP (一本鎖高次構造多型) 法によって行った (図 2)。SSCP に用いる PCR 断片は、D-loop 領域内の高変異部位 (308bp) をターゲットとしたプラ

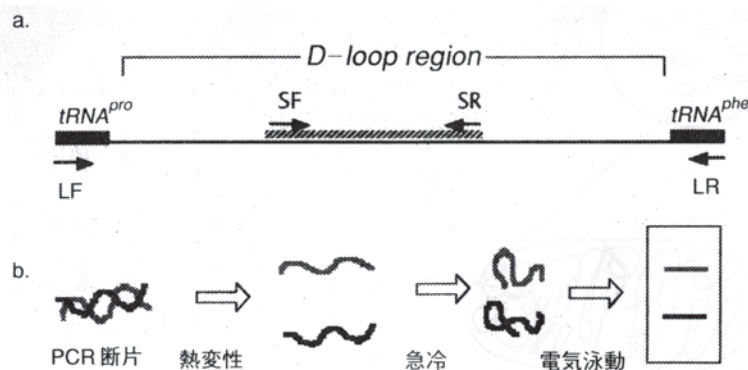


図 2 ウシの mtDNA ・ D-loop 領域の PCR-SSCP 解析法。a. D-loop 領域の高変異部位を増幅する PCR プライマー (SF, SR, LF, LR) の位置。b. PCR-SSCP 法の概略図。PCR 断片 (二本鎖) は熱変性により一本鎖に乖離し、急冷するとそれぞれの鎖が異なる立体構造をとることから電気泳動では 2 本のバンドが検出される。

イマーで増幅した断片 (SF&SR 断片)¹³⁾、および D-loop 全領域をターゲットとしたプライマーで増幅したものを制限酵素 HpaII で 2 箇所切断した断片 (LF&LR 断片)¹⁴⁾ の 2 種類とした。PCR 反応は、サーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 9700、PE biosystems 社) の温度制御下で、FastStart Taq ポリメラーゼ (Roche Diagnostics 社) を添加した 25 μ l の反応液中 (1 \times PCR + Mg buffer、プライマー各 12.5 pmol、0.2 mM dNTP) で行った。SSCP 解析は、それぞれの PCR 増幅断片を一本鎖に乖離後、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 4 $^{\circ}$ C の温度条件下、135 V、4 時間で電気泳動を行い、銀染色法 (Silver stain plus kit、Bio-Rad 社) にて DNA バンドを検出した⁸⁾。

結果と考察

単子で生産された核移植産子 8 頭 (C1~3、C6~7、E1~3) の mtDNA 型を解析した。その結果、レシピエント卵子の mtDNA 型が同定されている C1~3 産子では、ドナー細胞とレシピエント卵子の双方の mtDNA 型が検出された (図 3)。また、レシピエント卵子の mtDNA 型が不明な C6 産子でもドナー細胞と同一の mtDNA 型を含むヘテロプラズミーが検出された。これらの産子では、核移植により細胞内に mtDNA が混じり合った後ドナー細胞の mtDNA が消失しなかったため、産子においてヘテロプラズミー型が検出されたと示唆された。一方、レシピエント卵子の mtDNA 型が不明な C7 産子において、ドナー細胞と同一の mtDNA 型を含まないヘテロプラズミーが検出された (図 4)。この原因として、レシピエント細胞質内に DNA 型の異なる mtDNA が元来混在していたことが考えられた。また、レシピエント卵子の mtDNA 型が不明の E1~3 産子では、ドナー細胞と同一の mtDNA 型を含むヘテロプラズミーが検出された。これらの産子においては、レシピエント卵子側の mtDNA 型が不明であるため、核移植に因るヘテロプラズミーか、ある

いはレシピエント細胞質に元来 DNA 型の異なる mtDNA が混在していたかを特定することはできなかった。

次に、双子で生産された核移植クローン産子 2 組 4 頭 (C4~5 および E4~5) の mtDNA 型を解析した。その結果、レシピエント卵子の mtDNA 型が同定されている C4~5 産子では、mtDNA 型は血液では明らかに C4 と C5 のレシピエント卵子の mtDNA が混在していたが、毛根ではそれぞれの由来レシピエント卵子の mtDNA 型のみを有していた (図 5)。C4~5 はそれぞれレシピエント卵子の mtDNA 型が異なる胚を 1 頭の受胎牛に移植して生産された双子であり、胎子期の血管吻合で血液キメラが生じたと考えられた。すなわち、両方の産子で血液および組織中に mtDNA 型の異なる 2 種類の細胞が存在し、結果としてヘテロプラズミーとして検出されたと推察された。また、

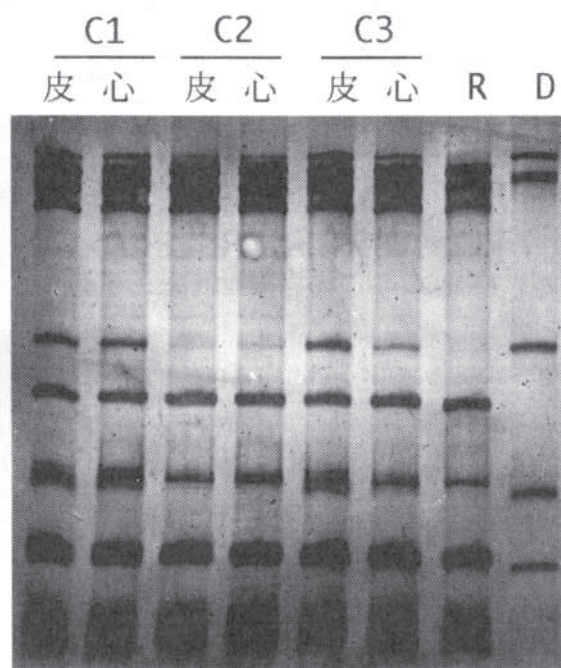


図 3 ドナー細胞に由来する mtDNA を含むヘテロプラズミーの例。レシピエント卵子の mtDNA 型が明らかな C1~3 の産子では、ドナー細胞 (D) とレシピエント卵子 (R) の双方の mtDNA 型が検出された。PCR-SSCP 法による LF&LR 断片の解析結果。皮: 皮膚、心: 心筋。

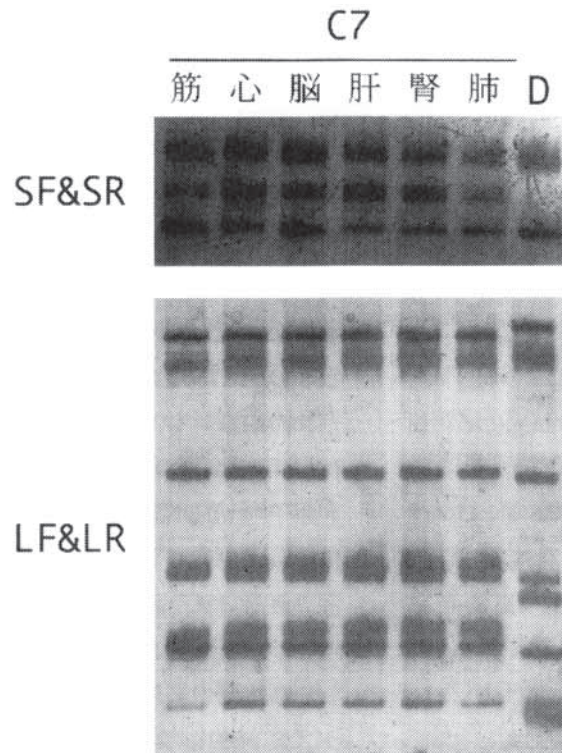


図4 ドナー細胞に由来しないmtDNAを含むヘテロプラズミーの例。レシピエント卵子のmtDNA型が不明なC7産子ではドナー細胞(D)のmtDNA型を含まないヘテロプラズミー型を示した。PCR-SSCP法によるSF&SR断片およびLF&LR断片の解析結果。筋：骨格筋、心：心筋、肝：肝臓、腎：腎臓。

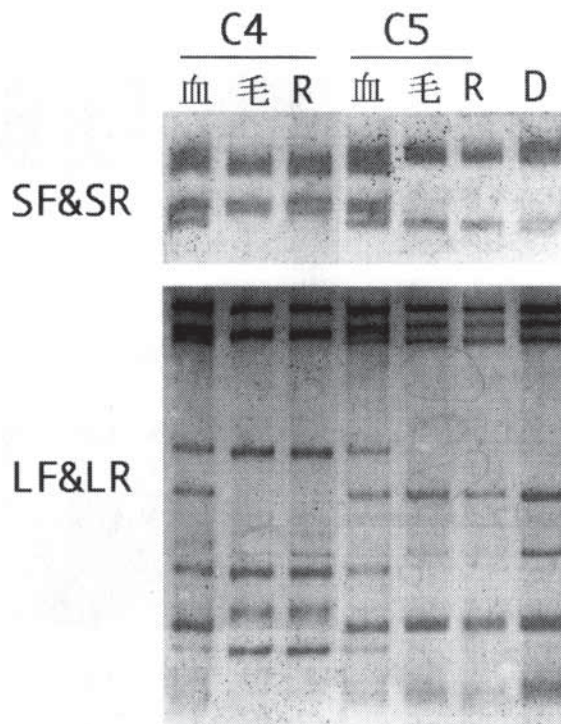


図5 血液と毛根でそれぞれ異なったmtDNA型が生じた例。同腹双子であるC4～5産子(ドナー細胞(D)およびレシピエント卵子(R)のmtDNA型が同定されている)では、血液ではC4とC5のレシピエント卵子のmtDNAが混在しているが、毛根ではそれぞれ一方のレシピエント卵子のmtDNA型のみが検出された。PCR-SSCP法によるSF&SR断片およびLF&LR断片の解析結果。血：血液、毛：毛根。

レシピエント卵子の mtDNA 型が不明の E4～5 産子についても、血液や脾臓、肺では mtDNA が混在するといった類似の現象が見られたことから、C4～5 産子と同様に血液キメラが生じた可能性が高いと考えられた。

以上のことから、核移植産子における mtDNA 型のヘテロプラズミーの発生要因としては、1. ドナー細胞由来の mtDNA が残存する、2. レシピエント細胞質の mtDNA 型が元来ヘテロプラズミーである、あるいは 3. 同一受胎牛に mtDNA 型の異なる複数胚の移植で生産された産子である、の 3 点が考えられた。

おわりに

mtDNA の塩基配列の違いやヘテロプラズミーが核移植クローン産子の表現形質に及ぼす影響については知られていない。ここで利用した D-loop 領域の変異は、mtDNA の由来を調べるマーカーとして有効であるが、機能を持つ蛋白質をコードする領域ではないため、その塩基配列の違いや直接個体の表現形質の相違に結びつくものではないと考えられる。また、異なる mtDNA 型の混在するヘテロプラズミーを直接表現形質の相違と関連付けることは難しい。さらに、細胞内に数千分子存在する mtDNA はエネルギー生産に深く関わっており、核移植等の細胞操作によって mtDNA に変異が生じる可能性や変異が胚の発育¹⁵⁾ や産子の能力¹⁶⁾ に影響を与える可能性は否めない。ヒトではミトコンドリア病を引き起こすある特定の塩基置換や欠失変異がみつかっているが¹⁷⁾、家畜では確認されていない。これらの未確認の問題点は今後の検討課題になると考えられる。そしてまた、核移植のレシピエントとして用いる卵子の mtDNA の違いがクローン家畜の相似性にどのように影響するかを調べることは核移植技術の進展にとって極めて重要であり、その調査は国内では家畜改良センターを中心に進められている。そのような取り組みの中で、由来の明らかなドナー細胞およびレシピエント卵子で作出した核が同一である核移植クローン産子は、表現形質に及ぼす

mtDNA の影響を検討する上で有用な知見をもたらすだろう。

核移植産子の mtDNA 型解析の積み重ねによって、mtDNA の伝達様式は徐々に明らかになってきている。最後に貴重な核移植産子のサンプルの提供にご協力下さった元家畜改良センター小島敏之博士をはじめ、宮城県畜産試験場、群馬県畜産試験場、神奈川県畜産研究所、山梨県酪農試験場、富山県畜産試験場、北海道立畜産試験場、宮崎県畜産試験場の関係諸氏に感謝の意を表す。

本研究は農林水産省グリーンフロンティア研究プロジェクト「体細胞クローン動物における個体発生機構に関する研究」の一部として実施された。

参考文献

- 1) Brown, W. M., E. M. Prager, A. Wang and A. C. Wilson (1982), Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.*, 18: 225-239.
- 2) Loftus, R. T., D. E. MacHugh, D. G. Bradley, P. M. Sharp and P. Cunningham (1994), Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 2757-2761.
- 3) Mannen, H., S. Tsuji, R. T. Loftus and D. G. Bradley (1998b), Mitochondrial DNA variation and evolution of Japanese Black cattle (*Bos taurus*). *Genetics*, 150: 1169-1175.
- 4) Kato, Y., T. Tani, Y. Sotomaru, K. Kurokawa, J. Kato, H. Doguchi, H. Yasue and Y. Tsunoda (1998), Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282: 2095-2098.
- 5) Prather, R. S., F. L. Barnes, M. M. Sims, J. M. Robl, W. H. Eyestone and N. L. First (1987), Nuclear transplantation in bovine embryos: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37: 859-866.
- 6) Michaels, G. S., W. W. Hauswirth and P. J. Laipis (1982), Mitochondrial DNA copy

- number in bovine oocytes and somatic cells. *Develop. Biol.*, 94: 246-251.
- 7) 林 純一 (1992), ミトコンドリア遺伝子疾患の体細胞遺伝学. *細胞工学*, 11 (1): 19-27.
- 8) Takeda, K., S. Takahashi, A. Onishi, Y. Goto, A. Miyazawa and H. Imai (1999), Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *J. Reprod. Fertil.*, 116: 253-259.
- 9) Steinborn, R., V. Zakhartchenko, J. D. Jelyazkov, Klein, E. Wolf, M. Muller and G. Brem (1998a), Composition of parental mitochondrial DNA in cloned bovine embryos. *FEBS Letters*, 426: 352-356.
- 10) Steinborn, R., V. Zakhartchenko, E. Wolf, M. Muller and G. Brem (1998b), Non-balanced mix of mitochondrial DNA in cloned cattle produced by cytoplasm-blastomere fusion. *FEBS Letters*, 426: 357-361.
- 11) Hiendleder, S., S. M. Schmutz, G. Erhardt, R. D. Green and Y. Plante (1999), Transmitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle. *Mol. Reprod. Dev.*, 54: 24-31.
- 12) Steinborn, R., P. Schinogl, V. Zakhartchenko, R. Achmann, W. Scherthaner, M. Stojkovic, E. Wolf, M. Muller and G. Brem (2000), Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nature Genet.*, 25: 255-257.
- 13) 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: 1161-1165.
- 14) 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: 149-151.
- 15) Nagao, Y., Y. Totsuka, Y. Atomi, H. Kaneda, H. Yonekawa, S. Takahashi and H. Imai (1997), Heterogeneous mitochondria DNA introduced by nuclear transfer influences the developmental ability of mouse embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 47 (Abstr): 233.
- 16) Nagao, Y., Y. Totsuka, Y. Atomi, H. Kaneda, K. F. Lindahl, H. Imai and H. Yonekawa (1998), Decreased physical performance of congenic mice with mismatch between the nuclear and the mitochondrial genome. *Genes. Genet. Syst.*, 73: 13-19.
- 17) Wallace, D. C. (1999), Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283: 1482-1488.

[成果情報名]体細胞由来ミトコンドリアDNAはクローンブタ雌産子の後代に伝達しうる

[要約]除核した卵子に体細胞核を移植することにより得られたクローンブタのミトコンドリアDNAはそのほとんどが卵子由来のミトコンドリアDNAであるが、体細胞に由来するミトコンドリアDNAは残存し、後代へ伝達しうる。

[キーワード]ブタ、クローン、ミトコンドリアDNA、家畜育種繁殖

[担当]畜産草地研・家畜育種繁殖部・育種素材開発研究室

[連絡先]電話 029-838-8624

[区分]畜産草地

[分類]科学・参考

[背景・ねらい]

体細胞クローン家畜の場合、核DNAはドナー細胞と同一となるが、核外DNAであるミトコンドリアDNA (mtDNA) はほぼ卵子由来となる。核移植時に少量の体細胞由来mtDNAが卵子内へ持ち込まれると考えられるが、その後の動態については明らかでない。そこで、体細胞クローンブタおよびその後代産子について、体細胞由来mtDNAの伝達性を調べる。

[成果の内容・特徴]

1. 一塩基置換多型 (SNP) プライマーによるPCR法により、ランドレース mtDNA に混在する梅山豚 mtDNA の検出ができる。この手法により 0.1%の梅山豚 mtDNA の混入を検出することが可能である。
2. 梅山豚の胎子線維芽細胞をランドレースまたは交雑豚 LWD の卵子に核移植して作成したクローンブタ 4 頭の血液および毛根DNAには、0.1%-1.0%の割合で体細胞由来の梅山豚 mtDNA が残存している (図1、図2)。
3. ランドレースの雌に梅山豚の雄を交配した交雑豚 LM の血液DNAからは梅山豚 mtDNA は検出されない (図1)。
4. クローンブタの後代産子(P1)25 頭中、1 頭についてのみ細胞由来の梅山豚 mtDNA が混入している。さらに、その 1 頭の後代産子(P2)18 頭では、89%にあたる 16 頭に 1%以上の割合で梅山豚 mtDNA が伝達しており、ドナー細胞の mtDNA は子孫へ伝達しうる (図2)。
5. P1 のヘテロプラズミー産子の臓器から 0-44%の梅山豚 mtDNA が検出され、肝臓で最も高い割合である (図3)。P2 のヘテロプラズミー産子でも肝臓で有意に梅山豚 mtDNA を含む割合が高い (図4)。

[成果の活用面・留意点]

1. クローン研究において、卵子の品種 (mtDNA) の違いの影響を解析する場合の有用な知見となる。
2. 梅山豚 mtDNA 検出用の SNP プライマーはデュロック・バークシャーの mtDNA も検出可能である。

[具体的データ]

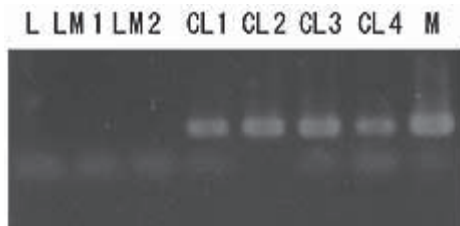


図1 クローンブタ(CL1~4)における体細胞由来梅山豚mtDNAの検出。
L:ランドレース、LM1-2:F1雑種豚、M:梅山豚

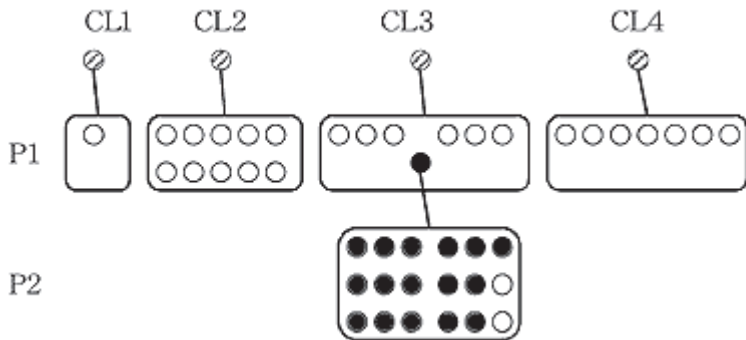


図2 クローンブタ(CL1-4)および後代産子(P1およびP2)における体細胞由来の梅山豚mtDNAの伝達の模式図。梅山豚mtDNAの検出が0.1%未満(白), 0.1%-1.0%(斜線), 1.0%以上(黒)。

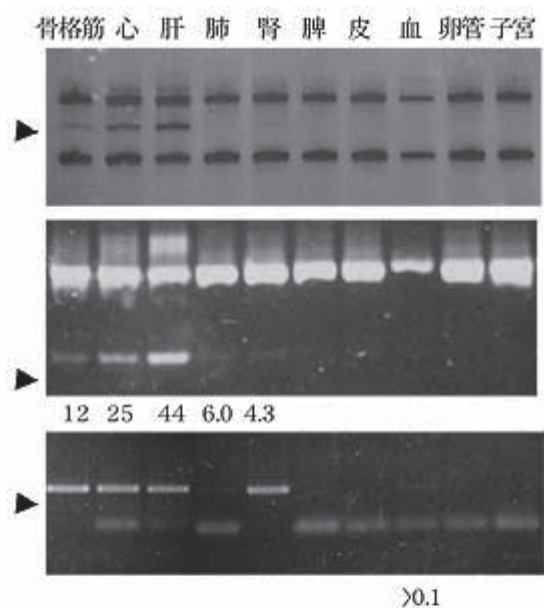


図3 ヘテロプラスミーの検出されたP1産子のmtDNA解析(上:PCR-SSCP, 中:PCR-RFLP, 下:SNP-PCR)。矢印;体細胞由来の梅山豚mtDNA。数値は体細胞由来梅山豚mtDNAの割合(%)。

[その他]

研究課題名:キメラ豚およびクローン豚の mtDNA 型の解析
 予算区分: 交付金
 研究期間: 2001~2004 年度
 研究担当者: 武田久美子、田上貴寛、菫澤圭二郎、大西 彰
 発表論文等: Takeda et al. (2006) Mol. Reprod. Dev. 73: 306-312.

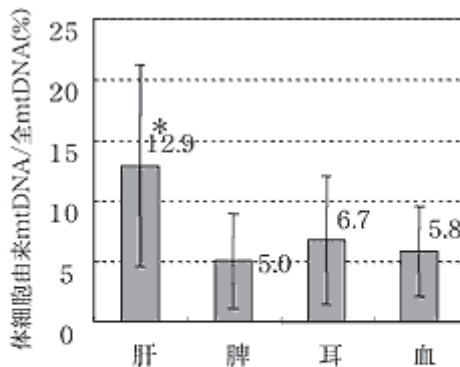


図4 クローンブタの後代P2産子(16頭)中に検出された体細胞由来梅山豚mtDNAの割合(%)。*P<0.05

[成果情報名]体細胞クローン雌牛の後代産子における体細胞由来ミトコンドリア DNA の混在割合

[要約]除核卵子に体細胞を移植して得られたクローン牛のミトコンドリア DNA(mtDNA)はそのほとんどが卵子由来の mtDNA であるが、数%未満の体細胞に由来する mtDNA の割合は、後代産子への伝達後 0?50%と大幅に変化する。

[キーワード]ウシ、体細胞クローン、後代産子、ミトコンドリア DNA

[担当]畜産草地研・高度繁殖技術研究チーム

[連絡先]電話、029-838-8624

[区分]畜産草地

[分類]研究・参考

[背景・ねらい]

体細胞クローン家畜は核移植によって生産されるため、核 DNA はドナー細胞と同一となるが、核外 DNA であるミトコンドリア DNA (mtDNA) は多量の卵子由来 mtDNA と微量の体細胞由来 mtDNA (D-mtDNA) が混じり合ったヘテロプラズミーとなる。ミトコンドリア は生命活動に必要不可欠な働きをしており、mtDNA の相違やヘテロプラズミーが生産個体へ及ぼす影響が懸念されている。卵子に持ち込まれる体細胞 mtDNA は卵子のおおよそ 1%程度であると考えられる。体細胞クローン技術は生殖を経た後代の利用が期待されているが、mtDNA の動態については明らかでない。そこで、核移植による体細胞クローン (NT) 牛の後代 (G1) 産子について、mtDNA ヘテロプラズミーの伝達性を明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. 4種類の体細胞より得られた NT 雌牛 (表) の組織中には微量の D-mtDNA が含まれる (~7.6%) 。
2. D-mtDNA を微量に含む NT 牛の G 1 産子各々 1 頭は、高い割合で D-mtDNA を有するヘテロプラズミーである (17%, 36%, 46%, 51%) 一方、残りの G1 産子については 5%未満であり、NT 牛の G 1 産子は卵細胞形成時もしくは胚発生時に起こるボトルネック効果によって様々な割合の mtDNA ヘテロプラズミーが生じうる (表、図) 。
3. D-mtDNA が微量検出された 6 頭の NT 牛は通常牛と同様に出産・産乳を行っており (Yonai et al., 2005)、D-mtDNA の混入による影響はみられない。D-mtDNA の割合が 46% の G 1 産子は胎子期に死亡したが、その他 D-mtDNA の割合が高い 3 頭については正常に出生しており、D-mtDNA ヘテロプラズミー率の高いことが産子の 出生へ影響するとはいえない。

[成果の活用面・留意点]

1. 調査対象牛の血液もしくは毛根のみを調べた場合、D-mtDNA は検出されない場合がある (<5%)。mtDNA 型を調べる折には、組織についても網羅的に調査する必要がある。

[具体的データ]

表 NT 雌牛および G₁ 産子における D-mtDNA 含有率

ドナー体細胞由来	NT雌牛		G ₁ 産子		
	ID	D-mt (%)	ID	No.	D-mt (%)
ジャージー (J) 卵管上皮細胞	JC2	-*	J21	1	-*
	JC3	+ (7.6)	J31-J34	4	+* (51), + (<5), +*, +*
	JC4	+ (<5)	J41	1	+* (36)
ホルスタイン (H1) 卵管上皮細胞	HC1	-	H11-H13	3	+*, +*, -
	HC4	+ (<5)	H41	1	+* (17)
	HC6	+ (<5)	H61-H63	3	+ (46), +*, -
ホルスタイン (H2) 卵丘細胞	HC7	+ (<5)	H71-H72	2	+*, -
	HC8	+ (<5)	H81	1	-
黒毛和種 (B) 卵丘細胞	BC1	-*	B11	1	-
	BC2	-*	B21	1	-*
	BC3	-*	B31	1	-
合計				19	

ID; 個体番号。No.; NT 牛の G₁ 産子数。 D-mt (%); 総 mtDNA 量に対する D-mtDNA 量の割合。
 +; D-mtDNA が検出された。 -; 検査した組織 (下図参照) 中に D-mtDNA は検出されなかった。
 *; 血液・毛根のみ解析した結果。

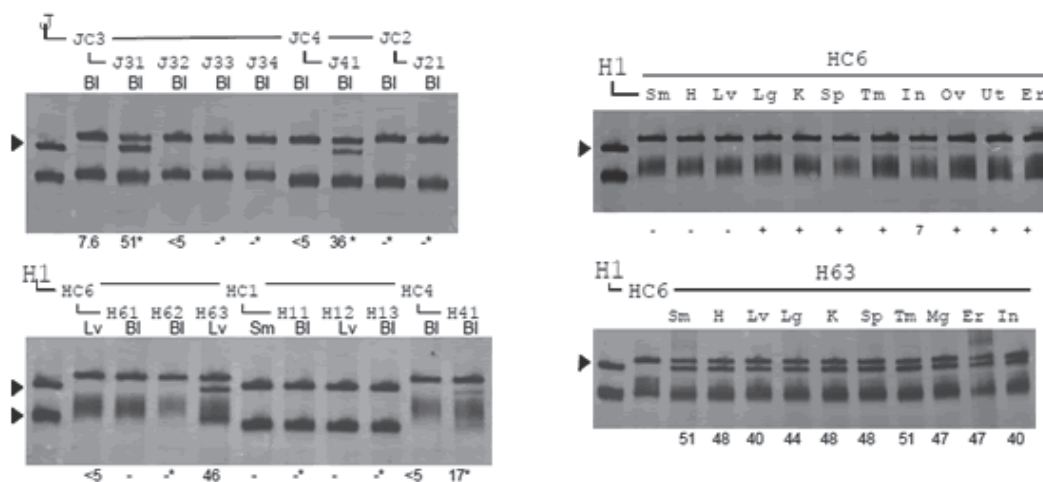


図 NT 雌牛とその後代の PCR-SSCP 電気泳動像。左図は体細胞 J および H1 より作出した NT 雌牛およびその後代、右図は NT 雌牛 (HC6) とその後代 (H63) の組織中に検出された D-mtDNA。矢印は D-mtDNA を示す。検査した組織 (Bl, 血液; Sm, 骨格筋; H, 心筋; Lv, 肝臓; Lg, 肺; K, 腎臓; Sp, 脾臓; Tm, 甲状腺; Mg, 乳腺; In, 小腸; Ov, 卵巣; Ut, 子宮; Er, 耳)。個体 ID、数値、その他の記号は表を参照。

[その他]

研究課題名：高品質畜産物生産のためのクローン牛等の安定生産技術の開発

課題 ID：221-n

予算区分：交付金プロ (クローン牛)

研究期間：2006～2010 年度

研究担当者：武田久美子、金山佳奈子 (改良センター)、赤木悟史、米内美晴、田上貴寛、葦沢圭二郎、花田博文 (東京農大)

[成果情報名]血清飢餓培養した体細胞ミトコンドリアの注入はウシ卵子の発生率を低下させる

[要約] 7日間血清飢餓培養を行ったウシ線維芽細胞より精製したミトコンドリアは、MII期のウシ卵子へ顕微注入することにより、単為発生能を低下させる。同様に、マウス線維芽細胞より精製したミトコンドリアの顕微注入は、マウス卵子の単為発生能を低下させる。

[キーワード]核移植、肉用牛・乳用牛、マウス、ミトコンドリア、家畜育種繁殖

[担当]畜産草地研・高度繁殖技術研究チーム

[連絡先]電話 029-838-8624

[区分]畜産草地

[分類]研究・参考

[背景・ねらい]

家畜のクローン胚作成には核移植技術が用いられているが、ウシの場合、体細胞を除核した卵子に融合するため、体細胞核とともにミトコンドリアも卵子内に持ち込まれる。しかし、卵子内のミトコンドリアは体細胞のミトコンドリアとは異なる形状であることが知られており、体細胞のミトコンドリアが核移植胚の発生に影響を与える可能性がある。また、核移植に用いるドナー細胞の処理として血清飢餓培養を通常行うが、血清飢餓培養によって体細胞のミトコンドリアの形状が変化すると考えられる。本研究は、ウシおよびマウスの単為発生系を用い、血清飢餓処理もしくは無処理の体細胞のミトコンドリアが卵子の発生に与える影響を明らかにし、核移植胚の発生率の向上に寄与することを目的とする。

[成果の内容・特徴]

1. 体外培養における細胞内ミトコンドリア膜の活性は、細胞種、培養状態、血清飢餓培養によって異なっている。7日間以上0.5%の血清を含むD-MEM培地で血清飢餓処理を行うことによって、その活性は有意に上昇する(図1)。
2. 7日間の血清飢餓処理を行った黒毛和種雄耳由来線維芽細胞から精製したミトコンドリアをMII期のウシ体外成熟卵子内へ微量注入する(図2)。ついで、その卵子に単為発生を促し、IVD101培養液中で培養すると、胚盤胞期胚への発生率について有意な差とはならないが、分割率および桑実胚への発生率は、バッファーのみを注入した対照区と比較して有意に低くなる($P<0.05$) (表1)。この時、注入したミトコンドリアDNA量は、核移植で持ち込まれる量と同程度である。以上のことより、ウシの核移植時に体細胞の血清飢餓培養を7日間以上行うと発生率の低下が懸念される。
3. 血清飢餓処理もしくは無処理のM. spretus系統マウス耳由来線維芽細胞から精製したミトコンドリアをF1マウス(B6D2F1)の未受精卵子に顕微注入し単為発生を促すと、バッファーのみを注入した区と比較して桑実期および胚盤胞期への発生率は有意($P<0.01$)に低くなる(表2)。体細胞ミトコンドリアを注入した受精卵についても同様の傾向を示す。以上のことより、マウス核移植時に体細胞ミトコンドリアを持ち込むと発生率の低下が懸念される。
4. 3の細胞について血清飢餓培養を1~2週間行い、ついで、精製したミトコンドリアをマウス卵子へ顕微注入すると、血清飢餓を行わなかった場合と比較して桑実胚への発生率は有意に低くなる($P<0.01$) (表2)。
5. 卵母細胞質(ミトコンドリア含む)の卵子への注入はウシおよびマウス卵子の単為発生を阻害しない(Takeda et al., 2005, 2009)。

[成果の活用面・留意点]

1. ウシ及びマウスの核移植胚の作出効率改善の検討に利用できる。

[具体的データ]

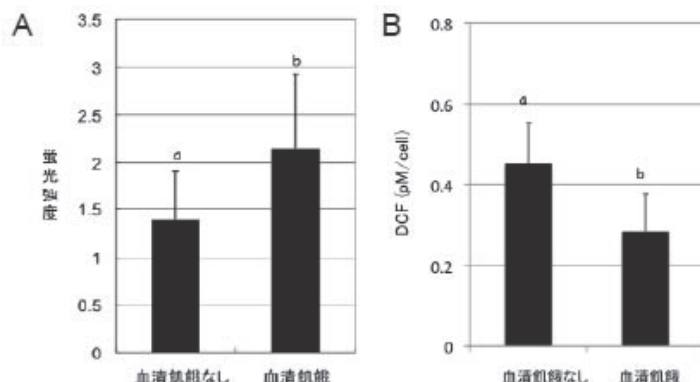


図1 血清飢餓培養処理7日間が、ウシ耳由来線維芽細胞のミトコンドリア膜活性(A)および活性酸素産生量(B)に及ぼす影響。異符号間で有意差有り; $P < 0.05$ (t検定)。

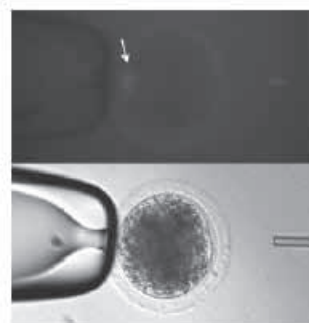


図2 ウシ卵子内に顕微注入したミトコンドリア (蛍光染色; 矢印). 上: 蛍光視野. 下: 明視野. (X200)

表1. 血清飢餓処理・無処理の体細胞ミトコンドリア(mt)の注入がウシ単為発生卵子の発生能に与える影響.

注入	卵子数 (実験回数)	活性化処理後 生存卵子数 ^a	発育卵子数 ^b (b/a%)		
			分割	桑実期	胚盤胞期
血清飢餓なし mt	248 (10)	182	141 (78) ^{cd}	91 (50) ^{cd}	35 (19) ^{cd}
血清飢餓 mt	323 (11)	180	122 (68) ^c	69 (38) ^c	26 (14) ^c
バッファー	437 (17)	350	284 (81) ^d	200 (57) ^d	78 (22) ^{cd}
無操作	206 (13)	198	158 (80) ^d	104 (53) ^d	49 (25) ^d

^{cd} 列内で異符号間に有意差あり; $P < 0.05$ (χ^2 検定)

表2. 血清飢餓処理・無処理の体細胞ミトコンドリア(mt)の注入がマウス単為発生卵子の発生能に与える影響.

注入	卵子数 (実験回数)	活性化処理後 生存卵子数 ^a	発育卵子数 ^b (b/a%)		
			分割	桑実期	胚盤胞期
血清飢餓なし mt	228 (11)	119	99 (83) ^{cd}	79 (66) ^c	52 (44) ^c
血清飢餓 1w mt	446 (10)	209	179 (86) ^{ode}	101 (48) ^d	78 (37) ^c
血清飢餓 2ws mt	211 (6)	110	81 (74) ^c	48 (44) ^d	37 (34) ^c
バッファー	188 (15)	84	81 (96) ^{de}	76 (91) ^e	59 (70) ^e
無操作	82 (6)	66	63 (96) ^{de}	61 (92) ^e	59 (89) ^e

^{ce} 列内で異符号間に有意差あり; $P < 0.01$ (χ^2 検定)

1w; 1週間、2ws; 2週間

[その他]

研究課題名：高品質畜産物生産のためのクローン牛等の安定生産技術の開発

中課題整理番号：221n

予算区分：交付金プロ (クローン牛)、委託プロ (体細胞クローン)

研究期間：2002～2009年度

研究担当者：武田久美子、太齊真理子、赤木悟史、松川和嗣 (現高知大)、高橋清也、田上貴寛、蕨澤圭二郎、Carl A. Pinkert (アーバン大)

発表論文等：

- 1) Takeda K. et al. (2010) Mitochondrion. 10:137-142
- 2) Takeda K. et al. (2005) Biol. Reprod. 72:1397-1404
- 3) Takeda K. et al. (2002) Cloning Stem Cells. 4:223-229

本技術レポートから転載・複製を行う場合は、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の許可を得て下さい。

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**

－ミトコンドリア DNA・テロメア長・胚の遺伝子発現－

発行日 2012 年 3 月 31 日

発 行 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

〒305-0901 茨城県つくば市池の台 2

Tel 029-838-8600 (代表)

編 者 渡邊伸也

