〔原著論文〕

受精卵クローン作出技術を活用した種雄牛造成効率化のための 胚 DNA 型判定方法の検討

今井佳積¹、尾形康弘²、松井茉由³、日高健雅³、平野 貴⁴、松重忠美⁵

¹ 広島県立総合技術研究所保健環境センター 〒734-0007 広島市南区皆実町1-6-29

² 広島県立総合技術研究所西部工業技術センター生産技術アカデミー 〒739-0046 東広島市鏡山3丁目13-26
広島テクノプラザ

³ 広島県立総合技術研究所畜産技術センター 〒727-0023 広島県庄原市七塚町584

⁴ 東京農業大学農学部 〒243-0034 神奈川県厚木市船子1737

⁵ 広島県西部畜産事務所 〒739-0013 東広島市西条御条町1-15

Development of an embryo-based genotyping system for efficient sire bleeding.

Kazumi IMAI¹, Yasuhiro OGATA², Mayu MATSUI³, Takemasa HIDAKA³,
Takashi HIRANO⁴, Tadami MATSUSHIGE⁵.

¹Health and Environment Center, Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Hiroshima, 734-0007, Japan

²Western Region Industrial Research Center, Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Hiroshima, 739-0046, Japan

³Livestock Technology Research Center, Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Hiroshima, 727-0023, Japan

⁴Faculty of agriculture, Tokyo University of Agriculture, Kanagawa, 243-0034, Japan

⁵Hiroshima Prefectural Western Office of Livestock Industry, Hiroshima, 739-0013, Japan

ABSTRACT

An embryo-based genotyping enables prenatal diagnosis of genes or markers for economically important traits or genetic disorders, and establishment of an embryo-based genotyping system is hoped to contribute efficiently selecting bulls as sires. We performed the embryo-based genotyping for *CL-16* and *SREBP-1* that are causative gene for *CL-16* deficiency and fatty acid composition-related gene, respectively. In-vitro embryos were produced from Ovum Pick Up (OPU). Cells detachment was performed on 5 days after an in-vitro fertilization. To create nuclear transplant embryos for progeny(clone)test, these detached cells were used as a donor. We carried out genetic screening using developmental arrest embryos on 5-6 days after the nuclear transplant. The genotypes for *CL-16* and *SREBP-1* were successfully determined with the nuclear transplant embryo, and the genotypes determined by postnatal test were same as one by prenatal test. It was suggested that we will be able to get prenatally genotypic information of the candidate sire, and select effectively the sires harboring genotypes associated with the traits of interest.

Key words: embryo, genotyping, cell-datchment

要約

現在、広島県の種雄牛造成では受精卵クローン作出技術を活用した「クローン検定」を導入している。本試験では、優良形質を導く DNA 型を数多く保有する候補種雄牛の出生前選抜を可能にし、効率的な候補牛生産と精度の高い

連絡先: 今井 佳積 広島県立総合技術研究所保健環境センター
〒734-0007 広島市南区皆実町1丁目6-29
(email: k-imai86259@pref.hiroshima.lg.jp)

検定を行うために、検定牛用に生産されるクローン胚を用いた出生前胚 DNA 診断技術の確立を試みた。診断対象の遺伝子には、*CL-16* (タイプ 1 欠損) と脂肪酸組成関連遺伝子 3 種 (*SCD*, *FASN*, *SREBP-1*) のうちの親牛の DNA 型がヘテロである *SREBP-1* を用いた。候補種雄牛となる体外受精胚は、広島県立総合技術研究所畜産技術センター繁殖の供卵牛から経膈採卵して得た卵子と広島県供用種雄牛精液を用いて作出した。5 日齢の桑実胚で細胞剥離を行い、得られた細胞をドナーとして核移植胚を作出し、核移植後 5 から 6 日目で 32 細胞期に達していない発育不良胚を DNA 型判定用サンプルとして用いた。そこで得られた *SREBP-1* と *CL-16* の DNA 型は、細胞剥離後正常に発育し、受胎および出生に至った元の胚の出生後診断による DNA 型と一致した。このことから、DNA 型の出生前診断が可能であることが示され、核移植技術と胚 DNA 診断技術を用いることにより、候補種雄牛の遺伝情報を出生前に獲得し、目的形質の優良 DNA 型を保有する種雄牛の効率的な選抜が可能であると考えた。

緒言

広島県における和牛の育種は、次世代種雄牛候補の産子を肥育し、その肥育検定結果 (産肉成績) と血統情報から算出した統計遺伝学的な能力評価である「育種価」が高い候補牛を選抜することで行っている。しかし、この手法による「種雄牛造成」は、次世代候補牛生産のための種付け開始から最終的な種雄牛選抜までに約 7 年を要し、その間の多大な労力と経費が問題となっている。そこで、種雄牛造成の効率化と高精度化を目的として、平成 19 年度から受精卵クローン作出技術を活用した「クローン検定」を導入した。クローン検定は、初めに育種価上位の種雄牛と繁殖雌牛を選定し、雌牛からの経膈採卵 (Ovum Pick Up: OPU) によって得られた卵子と雄牛の精液によって体外受精 (In Vitro Fertilization: IVF) を実施する。2 細胞期に達した受精胚を 2 つに分離し、一方はそのまま 7 日齢まで培養し、候補種雄牛となるための体外受精胚とする。もう一方は、5 日齢まで培養し、32 細胞期と推定できる正常発育胚 (桑実胚) をドナーとして核移植 (Nuclear Transfer: NT) を行い、検定用のクローン牛を現場後代検定 20 頭と統計上同等の信頼度が得られる頭数である 3 頭生産する (古川、2000)。これらの検定牛を 27 ヶ月齢まで肥育し、得られた産肉成績から、候補種雄牛の能力を検定するものである。

近年、黒毛和種のゲノム解析が全国的に進められ、産肉形質に関わる遺伝子や遺伝性疾患原因遺伝子の情報を利用することが可能になってきている (Takasuga ら 2007, Setoguchi ら 2009, Hirano ら 2000, Yamakuchi ら 2000, Hirano ら 2012)。*Stearoyl-CoA Desaturase (SCD)*、*Fatty Acid Synthase (FASN)* および *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (SREBP-1)* で検出された塩基置換 (DNA 型) は、不飽和脂肪酸割合と関連することが示され (Taniguchi ら 2004, Abe ら 2009, Hoashi ら 2007)、これらの DNA 型が牛肉の美味しさを高める

ための DNA マーカーとして期待されている。また、クローデイン 16 (*CL-16*) 欠損症 (腎尿細管形成不全症、慢性間質性腎炎) は、黒毛和種の特定種雄牛の産子で頻発した腎機能障害を伴う発育不良として特徴づけられる疾患で、連鎖解析によって原因遺伝子領域が 1 番染色体に特定され、その領域から原因遺伝子変異として、*CL-16* のエクソン 1 から 4 を含む欠損 (タイプ 1 欠損) が同定された (Hirano ら 2000, Kobayashi ら 2000, Ohba ら 2000)。遺伝子診断法も確立、実用化され、広島県内にも保因牛が存在することが確認されている。

クローン検定で作出される核移植胚は、将来候補種雄牛となる体外受精胚と遺伝的に全く同一である。また、検定される候補種雄牛は母牛、父牛が明確な通常の体外受精卵由来であるため、種雄牛としての登録が可能である。この核移植胚を用いた、候補種雄牛の着床前遺伝子診断 (Preimplantation Genetic Diagnosis: PGD) が可能であれば、受卵牛に移植する前に候補種雄牛の遺伝情報を獲得できることになり、また、診断用の核移植胚を数多く作出することで、目的の形質に対応した優良 DNA 型を数多く保有する胚を選択して受卵牛に移植することが可能となる。

そこで、本試験では、候補種雄牛の PGD を取り入れた効率的で精度の高いクローン検定システム確立を目的として、*SREBP-1* と *CL-16* タイプ 1 欠損を対象とし、それぞれ優良型ホモ、正常型ホモ産子の作出を試みた。体外受精を行い、2 分割せずそのまま培養した桑実胚から採取した表層の細胞を用いて作出した核移植胚で、元胚の DNA 診断を試み、新たなクローン検定技術の確立の可能性を検討した。

材料および方法

体外受精供用個体

SREBP-1 試験では、予め 3 種の脂肪酸組成関連遺伝

子 (*SCD*, *FASN*, *SREBP-1*) について、広島県立総合技術研究所畜産技術センターで体外受精卵供給事業用に繋養している県内産供卵牛と、広島県供用種雄牛の DNA 型を判定し、優良アレルの保有状況を調査した。結果に基づき、*SCD* および *FASN* 遺伝子で優良アレルホモ型で、*SREBP-1* がヘテロ (*SCD*; AA, *FASN*; TW/TW, *SREBP-1*; LS) である雌牛 (Dam1) と、3 遺伝子とも優良ホモ型 (*SCD*; AA, *FASN*; TW/TW, *SREBP-1*; SS) である種雄牛 (Sire1) を体外受精に供した。

CL-16 試験では、センターの供用雌牛で *CL-16* タイプ 1 欠損保因の繁殖雌牛 (Dam2) と、*CL-16* 正常の広島県産供用種雄牛 (Sire2) を体外受精に供した。

体外受精胚とクローン胚の作出

体外受精胚とクローン胚の作出は、*SREBP-1* 試験と *CL-16* 試験で同様に実施し、これらの作出における経腔採卵、発生培養、細胞剥離、核移植などの方法はすべて尾形ら (2005, 2007) に従った。

OPU は、超音波画像診断装置 (アロカ社 SSD-1200) に経腔穿刺用コンベックス探触子 (アロカ社 UHT-9106-7.5) を装着し、ディスプレイザブル採卵針 (ミサワ医科工業株式会社) と卵子吸引システム (クック社 K-MAR-5115) を用いて行った。回収液には 3% ウシ胎児血清 (FCS; Hyclone, Standard Fetal Bovine Serum) および 1.8U/ml ヘパリン添加乳酸加リンゲル液 (ハルゼン V 注射液; 日本全薬工業) を用い、吸引圧 100 mm Hg で卵胞液を吸引した。吸引液中の卵丘卵子複合体を 10% 牛胎児血清添加リン酸緩衝液に移し、3 回以上洗浄した後、成熟用培地 (TCM-199; SIGMA, Medium199) に 10% FCS、0.12 mg/ml 卵胞刺激ホルモン (FSH; 川崎製薬) と 50ng/ml 上皮性成長ホルモン (EGF; Sigma, E9644) を加え、38.5 °C、5% CO₂、95% air の気相条件下で 22~24 時間成熟培養を行った。

体外受精 (IVF) は岩水ら (1998) に従い、凍結精液を用いて精子濃度を $6 \sim 12 \times 10^6$ /ml に調整し、媒精を約 6 時間行った。媒精後 72 時間目まで mSOF 培地に 3 mg/ml 牛血清アルブミン (BSA; Sigma, A-4378) と 0.25 mg/ml リノール酸アルブミン (Sigma, L-8384) を加え、38.5 °C、5% CO₂、5% O₂、90% N₂ の低酸素条件下で培養し、以降は mSOF 培地に 10% FCS と 10 µg/ml インスリン (Sigma, I-6634) を加え、Vero 細胞との共培養を 38.5 °C、5% CO₂、95% air の気相条件下で行った。

細胞剥離は、体外受精後 5 日目に桑実胚に達した胚

Fig. 1. Cell detachment.

Cells detachment was performed on day 5. ▲; detached cell.

で実施した (図 1)。桑実胚を 0.25% アクチナーゼ E (科研製薬) に 60 秒ほど静置し、透明帯を溶解した後、20% FCS 添加 M2 (SIGMA, M-5910) 液に移して酵素作用を停止させた。次に、この胚を 0.125% トリプシン (GIBCO 27250-042) 添加 PBS- に移し、ガラス製毛細管 (Drummond 057910) をガスバーナーで炙って細く伸ばしピペットに加工したものをういて数回ピペッティングし、胚表層の 5~6 個の細胞が剥離した時点で胚を 20% FCS 添加 M2 液中に戻し、洗浄して酵素作用を停止させた。この胚は発生培地 (20% FCS 添加 mSOF 培地) で Vero 細胞との共培養を継続し、剥離した細胞は核移植のドナー細胞とした。

核移植におけるレシピエント卵子は、体外受精後 4 日目 (細胞剥離および核移植日の前日) に、Dam1, Dam2 以外のウシで経腔採卵を実施し、準備した。A, B, C ランクの卵丘卵子複合体を成熟培養後、0.125% トリプシン入り 0.1% ヒアルロニターゼ溶液 (SIGMA, H3506) 中でピペッティングして顆粒層細胞を除去し、第一極体の放出が見られたものを除核してレシピエントに用いた。

核移植は、レシピエント卵子について成熟培養 24 時間目に 10 µM カルシウムイオノフォア (SIGMA, C-7522) と 25 µg/ml イノシトール 3 リン酸 (Ins (1, 4, 5) P3 (synthetic)、(株)同仁化学研究所) で 5 分間処理した後、100 µg/ml ピューロマイシン (SIGMA, C-7255) で 6 時間複合活性化処理をおこなって準備し、マイクロマニピュレーターを用いてドナー細胞を挿入し、電気刺激を与えて 2 つの細胞を融合させた。細胞融合は、チンマーマン氏液で、1 mm 幅ステンレスチャンバーを用い、交流パルス 8.5V/mm 5sec、直流パルス 75V/mm 50 µsec で 2 回印加した。その後の体外培養は、

72 時間目まで 3 mg / ml BSA 添加 CR1aa 培地、それ以降は 10% FCS および 10 μ g / ml インスリン添加 CR1aa 培地で Vero 細胞との共培養を行った。

SREBP-1 試験では 11 個、*CL-16* 試験では 8 個の桑実胚で、それぞれ細胞を剥離し核移植のドナーに用いた。作出した核移植胚は、核移植後 5 から 6 日目の時点で、*SREBP-1* 試験ではすべて、*CL-16* 試験では 1 ないし 2 個の発育不良胚を DNA 型判定用サンプルとして用いた。

核移植胚の DNA 抽出と DNA 型判定

胚からの DNA 抽出は、平山ら (2004, 2008) の報告に基づくアルカリ処理法で行った。胚サンプルは、1 mg / ml PVP (SIGMA, P-0930) 含有 PBS-液 (30 μ l) で 6 回洗浄後、滅菌水に移し、サンプル細胞を含む 2 μ l を採取し、0.05N-NaOH 液 2 μ l が入ったサンプルチューブに移して混和後、室温で 15 分放置した。その後 95℃ で 15 分加熱し、1M-Tris-Hcl (pH8.0) を 1 μ l 加えて中和したものを胚 DNA 抽出液とした。

今回用いた DNA 型判定用の核移植胚は推定細胞数が 6 ~ 16 個であり、抽出 DNA 量も微量であると考えたため、*SREBP-1* 試験では、ヘテロ (LS)、ホモ (SS) 両方のアレルの出現が考えられる *SREBP-1* の DNA 型判定のみ実施した。*SREBP-1* 試験、*CL-16* 試験とも、PCR 反応の酵素には増幅効率が高いとされる KOD-FX (TOYOBO) を用いた。PCR 反応液の組成は、DNA 抽

出液 1 ~ 4 μ l、KOD-FX (1.0U/ μ l) 0.2 μ l、2 $\times$ PCR Buffer for KOD-FX 7.5 μ l、2mM dNTPs 3 μ l、Primer (10pmol/ μ l) 0.5 μ l とし、滅菌水で 15 μ l に調製した。*SREBP-1* 遺伝子型検出用プライマーは、Forward ; 5'-CCACAACGCCATCGAGAAACGCTAC-3' と Reverse ; 5'-GGCCTTCCCTGACCACCCAACTTAG-3' を用いた (Hoashi ら 2007)。*CL-16* タイプ 1 欠損遺伝子型検出用プライマーは、Forward ; 5'-ATTGTATTTTTAGGAGTGACTC-3' と Reverse ; 5'-CCCCCCCCCACTCTATAC-3'、正常アレル検出用は、Forward ; 5'-TATGCTGTTGATGTTTATGTAG-3' と Reverse ; 5'-CCCCCCCCCGCCTTTTTC-3' を用いた (平野ら 2000)。

PCR サイクルは、94℃ で 2 分加熱後、*SREBP-1* では 98℃ 10 秒、60℃ 30 秒、68℃ 30 秒を 35 サイクル、*CL-16* タイプ 1 では 98℃ 10 秒、55℃ 30 秒、68℃ 1 分を 40 サイクルとした。PCR 反応液を、3% アガロースゲル (Agarose S, ニッポンジーン) で電気泳動し、出現バンドから DNA 型を判定した。

結果

体外受精と核移植について

両試験区における経膈採卵成績を表 1、体外受精成績を表 2 に示した。採取した卵子は、尾形ら (2005) に従いランク分けし、A、B および C ランクに分類さ

Table 1. Result of OPU

Lank of ovum*	<i>SREBP-1</i> test			<i>CL-16</i> test		
	Dam1	Recipient1	Recipient2	Dam2	Recipient3	Recipient4
A	0	5	6	10	8	10
B	16	6	19	11	11	28
C	13	8	11	7	10	24
other	8	1	0	3	0	0
total	37	20	36	31	29	62

*A ~ C; levels of granule cell layer
A; More than triple layer
B; More than two layer
C; Less than single layer

Table 2. Results of IVF

	Number of IVF	Embryonic stage			Rate of morula (%)
		2cell	8cell	Morula	
Sire 1 (<i>SREBP-1</i> test)	28	24	24	21	75.0
Sire 2 (<i>CL-16</i> test)	26	19	16	16	61.5

Fig. 2. *SREBP-1* genotype by the prenatal test.

Genotypes of six embryos were able to be determined. Es3, Es7 and Es11 embryo(▼) were proceeded to embryo transfer. M; 50bp ladder marker, Es1-11; embryo sample, N; negative control.

Fig. 3. *SREBP-1* genotype by the postnatal test.

Genotypes of Es3 and Es7 were able to be determined by the prenatal test. These genotypes detected on the postnatal test were same as the genotype determined by the prenatal test.

M; 50bp ladder marker, Es3, Es7 and Es11; new born clonal cattle from each embryo, N; negative control.

れたものを約 24 時間成熟培養後、体外受精に供した。レシピエント卵子は各試験区につき 2 頭で、Dam1, 2 以外のセンター繫養雌牛 (Recipient1, 2, 3, 4) で経膣採卵を実施した。24 時間の成熟培養後、第一極体の放出を確認したものを除核し、*SREBP-1* 試験では 38 個、*CL-16* 試験では 21 個を核移植のレシピエントに用いた。

核移植と DNA 型判定—*SREBP-1* 試験区

核移植の結果を表 3 にまとめ、剥離細胞数 (Peeling cell)、核移植実施個数 (NT)、診断用の NT 胚個数 (NT embryo for DNA test) および推定細胞総数 (Total cell) と、PGD 成功胚 (Successful PGD)、正常発育胚 (Normal-growth embryos)、移植胚 (ET)、受胎 (Conception) および出生 (Birth) を示した。体外受精後 5 日目に桑実胚に発育したもののうち、11 個 (胚番号 Es1 ~ Es11) で細胞剥離を行った。各胚の剥離細胞個数は 1 ~ 12 個、核移植実施数は 1 ~ 6 個であった。それぞれについて、すべての核移植胚を、DNA 抽出用に 1 チューブにまとめてサンプルとした。細胞剥離した元の胚は再度培養したが、Es6 由来の核移植胚が全て死滅したため、残

り 10 個の由来の核移植胚で DNA 型判定を実施した。そのうちの 4 サンプル (Es2, 4, 10, 11) では判定不能であったが残りの 6 サンプル (Es1, 3, 5, 7, 8, 9) では判定が可能であり、優良型の S アレル (342bp バンド) を検出し、L アレル (432bp バンド) が検出できない 3 サンプル (Es1, 3, 9) を SS 型と判定した (図 2)。アレルが判定できなかった胚を含め、正常に発育した元の胚 10 個を全て受卵牛に移植した結果、7 頭が受胎し、4 頭 (Es3, 7, 10, 11) が出生した (Es10 は受胎後民間農場に移動)。Es3, Es7 は胚診断で DNA 型が確認された個体であり、場内で生まれた Es3, 7, 11 産子について出生後採血し、*SREBP-1* の DNA 型判定を行った結果、胚診断による型と一致した (図 3)。

核移植と DNA 型判定—*CL-16* 試験区

表 3 に示すように、体外受精後 5 日目の桑実胚のうちの 8 個 (胚番号 Ec1 ~ 8) を細胞剥離に供した。*CL-16* 試験区では、DNA 型判定に作出された核移植胚のうち、発育不良であった各 1 ないし 2 個の核移植胚を用い、発育良好な 5 個 (Ec1, 3, 4, 6, 7 由来核移植胚) は凍結保存した。

Table 3. Results of NT

	Embryo no.	Peeling cell	NT	NT embryo for DNA test	Total cell	Successful PGD	Cryopreserved embryo	Normal-growth embryos	ET	Conception	Birth
<i>SREBP-1</i> test	Es1	3	3	1	8	○		○	○		
	Es2	4	4	1	6			○	○		
	Es3	3	3	2	8<	○		○	○	○	○
	Es4	6	6	3	8<			○	○	○	
	Es5	6	4	4	8<	○		○	○	○	
	Es6	1	1	-	-	-		-	-	-	-
	Es7	3	3	3	8<	○		○	○	○	○
	Es8	12	5	3	8<	○		○	○	○	
	Es9	4	3	1	8	○		○	○		
	Es10	4	3	1	6			○	○	○*	○*
	Es11	4	3	1	6			○	○	○	○
<i>CL-16</i> test	Ec1	3	3	1	8>	○	○	○	○	○	○
	Ec2	3	1	1	8>	○		○	○		
	Ec3	2	2	1	8>		○				
	Ec4	3	3	1	8>	○	○	○			
	Ec5	3	3	1	8>	○		○			
	Ec6	3	3	1	8>		○				
	Ec7	3	3	1	8>	○	○	○	○		
	Ec8	3	3	2	8>	○		○			

* ; After ET,recipient cow transported other farm.

Fig. 4. Genotype of *CL-16* deficiency by prenatal test.

Ec1, Ec2 and Ec7 were determined as normal. Ec4, Ec6 and Ec8 were determined as carrier. Ec1, Ec2 and Ec7 embryo (▼)were proceeded to embryo transfer.

M;50bp ladder marker, Ec1-8;embryo sample, Mutant;type-1 deletion allele (722bp),Wild-type;normal allele (375bp), andN;negative control.

Fig. 5. Genotype of *CL-16* deficiency by postnatal test.

Only Ec1 of three embryos was normally born.

M;50bp ladder marker, w;wild-type allele, m;type-1 deletion allele, N;negative control.

細胞剥離後の胚は6個 (Ec1, 2, 4, 6, 7, 8) が正常に発育した。それぞれの核移植胚をサンプルに用いてDNA型判定を実施し、判定結果を図4に示した (Ec1, 2, 4, 6, 7, 8)。DNA型判定に用いた核移植胚はいずれも推定8細胞未満であったが、全て判定が可能であった。正常ホモ型と判定されたもの (Ec1, 2, 7) のみ、元の胚を受卵牛に移植し、1頭 (Ec1) が受胎し出生した。出生後の型判定結果は着床前の胚診断結果と一致した (図5)。

考察

本試験の結果、核移植胚を用いたDNA型判定が可能であったことから、種雄牛造成のクローン検定でこの技術を活用することで、候補種雄牛の産肉形質や遺伝性疾患などの遺伝子型情報をPGDにより出生前に獲得することが可能となると考えられた。

今回の試験で、*SREBP-1* 試験区では、候補種雄牛となる胚からの剥離細胞をドナーとして作出した核移植胚を、すべてDNA型判定に用い、細胞剥離した元の胚は判定結果に関わらず全て受卵牛に移植した。*CL-16* 試験区では、発育不良な核移植胚1ないし2個をDNA型判定に用い、発育良好な核移植胚は凍結保存したが、全てのサンプルで診断可能であり、*CL-16* フリーであることが判明した元の胚のみを移植した。今回の試験では、剥離した細胞を核移植に用いたが、実際のクローン検定では、体外受精後2日目の2細胞期に胚を2つに分離し、体外受精後5日目に、一方を候補種雄牛となる胚として凍結保存し、もう一方の32細胞期から桑実期に達した胚をドナーとして核移植を行い、そして、移植後5日目で推定32細胞に達した核移植胚をクローン検定牛胚作出用ドナー胚として凍結保存し、発育不良な核移植胚を用いて候補種雄牛のPGDのためのDNA型判定を行うことが可能になると考えた。凍結保存しておいた、候補種雄牛となる胚について、目的の優良DNA型が判明した場合に、その胚を移植し、受胎を確認後、凍結保存のドナー用核移植胚を用いて検定牛用クローン胚の作出に取り掛かることが出来るため、効率的なクローン検定が可能となると考えられる。

黒毛和種の全国的なゲノム解析研究で、遺伝性疾患については、*CL-16* タイプ1欠損症の他、ウシバンド3欠損症 (band3)、第XIII因子欠損症 (F13)、チェディアック-ヒガシ症候群 (CHS)、XI因子欠損症 (*F11*)、眼球形成異常 (MOD)、マルファン症候群などが原因遺伝子の同定と診断方法の確立に至っている (Inaba ら

1996、小川 1996、Yamakuchi ら 2000、Kunieda ら 1999、Kunieda ら 2005、Abbasi ら 2005、Hirano ら 2012)。産肉性などの生産形質については、広島県産牛の父方半きょうだい家系を用いたQTL解析で、枝肉重量や脂肪交雑形質に関連するQTLを検出し、県内の優良牛選抜への活用が可能であることが示唆されている (Imai ら 2007、今井ら 2012)。また、全国の研究による複数の黒毛和種父方半きょうだい家系を用いた解析では、産肉形質に関わるQTLが73箇所検出されており (Takasuga ら 2007)、脂肪交雑形質や枝肉重量では、複数の家系で同じ位置に検出され、特に信頼性の高いQTLも報告されている (Mizoguchi ら 2006、Mizoshita ら 2004、Setoguchi ら 2009)。これらのうち、枝肉重量の責任遺伝子と考えられる *NCAPG* の SNP (Ile-442-Met ; CW-2) (Eberlein ら 2009、Setoguchi ら 2009) については、広島県産の種雄牛、繁殖雌牛約80頭および県内肥育牛約400頭で、DNA型と産肉成績やそれらに対する育種価との関連性を調査し、顕著なDNA型効果を確認した (今井ら 未発表)。

このように、和牛ゲノム研究の進展とともに、遺伝性疾患の原因遺伝子や、産肉形質関連遺伝子など、診断可能な遺伝子が増加していく中で、広島県の種雄牛造成においても、効率的な候補牛選抜に向けて、PGDを行うことが望ましいとされるDNA型判定対象形質が増加していくことが予想される。従来のPGDでは、胚の細胞を一部採取して診断用DNAサンプルに用いており、元の胚の生存性や受胎性の維持のために、採取できる細胞は微量で、多項目のPGDは困難であった。このため近年では、ヒト医学の分野で開発された少数細胞からの全ゲノム増幅方法 (Whole Genome Amplification : WGA) をウシ胚で応用することで、多項目PGDを実現させるための研究も進んでいる (平山ら 2008、小浜ら 2012) が、この中で平山ら (2008) は、診断用サンプルとしての細胞採取量が栄養外胚葉の10%未満では、全胚の診断結果との不一致が増加する傾向や、マイクロサテライトマーカーでアレルの喪失が認められたこと、また2004年のHellaniらの報告でも、細胞1個からの全ゲノム増幅サンプルでは、短い繰り返し配列 (Short Tandem Repeats : STRs) の部分で5%の確率でアレルの喪失が起こっていた事を取り上げ、こういった危険を避けるため、全ゲノム増幅には最低10から15細胞が必要であることを示唆している。

今回、我々が実施した試験では、核移植胚によるDNA型判定が可能であり、生後診断結果との一致も確認できた。核移植における除核の際、レシピエント卵

子のDNAが残存し、核移植胚のDNA診断結果に影響する可能性がある。しかし、本来の移植核のDNA型と異なる判定となる場合、出生後診断結果と異なると考えられる。今回得られた核移植胚を用いて決定されたDNA型は、すべて出生後診断結果と一致したため、移植核のDNA型を表していると考えられたが、この点については今後より詳細に検討していく必要があると考えられた。

本県で実施するクローン検定では、候補種雄牛と遺伝的に全く同一な核移植胚を作出して検定牛を生産するが、この核移植胚をPGDに用いれば、将来候補種雄牛となる胚を傷つけず、必要とする判定項目数に応じて核移植胚を増産することも出来るため、多項目のPGDを実施できる、新たな種雄牛造成システムが実現する。

以上の結果、種雄牛造成の初期段階における、核移植胚を用いたPGDは、確実な遺伝的・不良形質の回避と優良牛の選抜を可能とし、目的に応じて優良DNA型を多く保有した種雄牛を、クローン検定を経て効率的に造成するための、有効な手段となりうると考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、試験全般でご協力いただきました、広島県立総合技術研究所畜産技術センター育種繁殖研究部佐々木美佳補助員と、採卵、受精卵移植等でご協力いただきました、同センター総務部管理課牛管理部門職員の皆様、論文作成にあたりご助言をいただきました、広島大学大学院生物圏科学研究科家畜育種学研究室准教授、西堀正英先生に深謝いたします。

参考文献

Abbasi AR, Ihara N, Watanabe T, Khalaj M, Tsuji T, Sugimoto Y, Kunieda T. 2005. Linkage mapping of the locus responsible for congenital multiple ocular defects in cattle on bovine chromosome 18. *Mammalian Genome*, 16: 731-737.

Abe T, Saburi J, Hasebe H, Nakagawa T, Misumi S, Nade T, Nakajima H, Shoji N, Kobayashi M, and Kobayashi E. 2009. Novel mutations of the *FASN* gene and their effect on fatty acid composition in Japanese Black beef. *Biochemical genetics*, 47: 397-411.

Eberlein A, Takasuga A, Setoguchi K, Pfuhl R, Flisikowski K, Fries R, Klopp N, Fürbass R, Weikard R, Kühn C.

2009. Dissection of genetic factors modulating fetal growth in cattle indicates a substantial role of the non-SMC condensin I complex, subunit G (*NCAPG*) gene. *Genetics*, 183: 951-964.

古川 力. 2010. クローン技術を用いた肉用牛育種法の検討. *日畜会報*, 81: 53-64.

Hoashi S, Ashida N, Ohsaki H, Utsugi T, Sasazaki S, Taniguchi M, Oyama K, Mukai F, Mannen H. 2007. Genotype of bovine sterol regulatory element binding protein-1 (*SREBP-1*) is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian genome*, 18: 880-886.

Hirano T, Kobayashi N, Itoh T, Takasuga A, Nakamaru T, Hirosune S, and Sugimoto Y. 2000. Null Mutation of *PCLN-1/Claudin-16* Results in Bovine Chronic Interstitial Nephritis. *Genome Research*, 10: 659-663.

Hirano T, Matsuhashi T, Kobayashi N, Watanabe T, Sugimoto Y. 2012. Identification of an *FBN1* mutation in bovine Marfan syndrome-like disease. *Animal Genetics*, 43: 11-17.

Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Hirano T, Sugimoto Y, Kobayashi N, Inaba M, Sawai K, Onoe S, Minamihashi A. 2004. Genetic Diagnosis of Claudin-16 Deficiency and Sex Determination in Bovine Preimplantation Embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 50: 613-618.

Hirayama H, Fujiwara A, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Minamihashi A. 2008. Multiple genotyping in bovine pre-implantation embryos with whole genome amplification. *Animal Science Journal*, 79: 554-560.

Imai K, Matsushige T, Watanabe T, Sugimoto Y, Ihara N. 2007. Mapping of a quantitative trait locus for beef marbling on bovine chromosome 9 in purebred Japanese black cattle. *Animal Biotechnology*, 18: 75-80.

今井佳積, 井原紗弥香, 松重忠美, 平野貴, 渡邊敏夫, 杉本喜憲. 2012. 遺伝子型を活用した「広島牛」育種手法の確立に関する研究. 広島県立総合技術研究所畜産技術センター研究報告, 16: 37-44.

Inaba M, Yawata A, Koshino I, Sato K, Takeuchi M, Takakuwa Y, Manno S, Yawata Y, Kanzai A, Sakai J, Ban A, Ono K, Maede Y. 1996. Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation. *The Journal of Clinical Investigation*, 97: 1804-1817.

- 岩水正, 尾形康弘, 田澤直子, 原田佳積, 白須洋, 堀内俊孝. 1998. ウシ体外受精胚の凍結保存. 広島県獣医学会雑誌, 13: 59-62.
- Kobayashi N, Hirano T, Maruyama S, Matsuno H, K Mukoujima, Morimoto H, Noike H, Tomimatsu H, Hara K, Itoh T, Imakawa K, Nakayama H, Nakamaru T, Sugimoto Y. 2000. Genetic mapping of a locus associated with bovine chronic interstitial nephritis to chromosome 1. *Animal Genetics*, 31: 91-95.
- Kunieda T, Nakagiri M, Takami M, Ide H, Ogawa H. 1999. Cloning of bovine *LYST* gene and identification of a missense mutation associated with Chediak-Higashi syndrome of cattle. *Mamm Genome*. 10: 1146-1149.
- Kunieda M, Tsuji T, Abbasi A.R, Khalaj M, Ikeda M, Miyadera K, Ogawa H, Kunieda T. 2005. An insertion of the bovine *F11* gene is responsible for factor XI deficiency in Japanese black cattle. *Mammalian genome*, 16: 383-389.
- 小浜菜美子, 秋山敬孝, 岩木史之, 福島護之. 2012. ウシ体外受精胚における複数遺伝子診断のための DNA 抽出法と遺伝子増幅法. 兵庫県立農林水産技術総合センター研究報告〔畜産編〕. 48: 5-10.
- Mizoguchi Y, Watanabe T, Fujikawa K, Iwamoto E, Sugimoto Y. 2006. Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in a Japanese Black (Wagyu) cattle population. *Animal Genetics*, 37: 51-54.
- Mizoshita K, Watanabe T, Hayashi H, Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Sugimoto Y. 2004. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle. *Journal of Animal Science*, 82: 3415-3420.
- Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh K, Asahina S, Nishimori K, Yoneda K, Kunieda T & Sasaki Y. 2000. Homozygosity mapping of the locus responsible for renal tubular dysplasia of cattle on bovine Chromosome 1. *Mammalian Genome* 11: 316-319.
- 尾形康弘, 谷本陽子, 松重忠美, 栗原順三, 今井昭, 堀内俊孝. 2005. クローン技術を活用した種雄牛造成の効率化. 広島県獣医学会雑誌, 20: 11-15.
- 尾形康弘, 日高健雅, 松重忠美, 堀内俊孝. 2007. ウシ胚からの性判別用細胞採取法の開発. 広島県獣医学会雑誌, 22: 16-19.
- 小川博之. 1996. 和牛の第 XIII 因子欠乏症. *JVM 獣医畜産新報*, 49: 411-412.
- Setoguchi K, Furuta M, Hirano T, Nagao T, Watanabe T, Sugimoto Y, Takasuga A. 2009. Cross-breed comparisons identified a critical 591-kb region for bovine carcass weight QTL (CW-2) on chromosome 6 and the Ile-442-Met substitution in *NCAPG* as a positional candidate. *BMC Genetics*, 10: 43-49.
- Takasuga A, Watanabe T, Mizoguchi Y, Hirano T, Ihara N, Takano A, Yokouchi K, Fujikawa A, Chiba K, Kobayashi N, Tatsuda K, Oe T, Furukawa-Kuroiwa M, Nishimura-Abe A, Fujita T, Inoue K, Mizoshita K, Ogino A, Sugimoto Y. 2007. Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping. *Mammalian Genome*, 18: 125-136.
- Taniguchi M, Utsugi T, Oyama K, Mannen H, Kobayashi M, Tanabe Y, Ogino A, Tsuji S. 2004. Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome*, 15: 142-148.
- Yamakuchi H, Agaba M, Hirano T, Hara K, Todoroki J, Mizoshita K, Kubota C, Tabara N, Sugimoto Y. 2000. Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese black cattle (Wagyu). *Animal Genetics*, 31: 13-19.