

#### 4 ウシ体外受精胚の性別及び赤血球膜蛋白異常症の同時診断

##### ねらいと成果

反復配列の多い雄特異的DNA領域に対してPCR法を利用することにより胚の性別判定が実用化されている。一方、遺伝性疾患は単一配列であるため、診断には性別判定より多くの不純物の少ないDNAを必要とする。ウシ赤血球膜蛋白異常症（バンド3）を診断するためには胚の1/2が必要であり、残りで性を診断すると移植できる胚は得られない。

そこで、性と疾病の両方を診断するために、ウシ体外受精7日目胚(胚盤胞)を切断後、胚サンプルにPrimer Extension Preamplification (PEP) - PCR法 (Tominaga and Hamada, 2003)の応用を検討した。また、実用的な利用を考えて、ゲル・ローディング・チップ (GL-Tip) ガラス化保存法 (Tominaga and Hamada, 2001) を用いて超低温保存した胚を移植して、受胎性と判定の正確さをみた。

胚盤胞の1/4~1/3を切断後、サンプルを熱処理して抽出したDNAをPEP-PCR後、性別判定及びバンド3診断に供することにより、2種類の遺伝情報を診断でき、GL-Tipガラス化法による超低温保存・移植により子牛の生産が可能になった。

##### 内容

バンド3をヘテロで保因する雄牛の精液と食肉センターで採取した卵巢由来卵子（フリー）とを体外受精し、高品質の7日目胚盤胞を試験に供した。切断刃で胚の1/4~1/3を切断したサンプルを洗浄後、

10 $\mu$  l 水に入れたサンプルを95 $^{\circ}$ C 5分間熱処理してDNAを抽出し、15 merランダムプライマー (OPERON) を用いたPEP-PCR法によりDNAを増幅した。XYセレクター (伊藤ハム) を用いて275 bpの雄バンドと102 bpの雌雄共通バンドから性別を判定し (図1)、並行して、バンド3を遺伝子型検査法 (Inaba et al. 1996) で診断した。バンド3診断では、染色体のバンド3-DNAの変異部に対応したプライマーを用いてPCRで増幅後、制限酵素Dra IIIでDNAを切断し、62 bpでの切断の有無で保因を調べた (図2)。

2種類の遺伝子判定は94.8% (73/77) の胚で可能であり、バンド3保因:フリーは36:37とほぼ1:1であり、♂:♀は46:27と雄が多くなる傾向があった (P=0.08) (表)。胚の受胎能と判定の正確さをみるために、経膈採卵で採取したバンド3フリー卵子を成熟培養後、ヘテロ保因雄牛精子と体外受精し、雄でバンド3フリーと判定した1個の7日目胚盤胞をGL-Tip法でガラス化し、18日間液体窒素で保存後移植した結果、判定どおりの雄でバンド3フリーの子牛 (体重22.6Kg、妊娠期間283日) を生産した (表紙)。

##### 今後の方針

種牛生産に応用すると共に、他の遺伝性疾患についても診断法を確立する。

富永敬一郎 (部長 (生工))

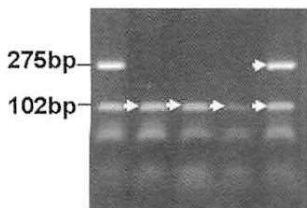


図1 性(XYセレクター)

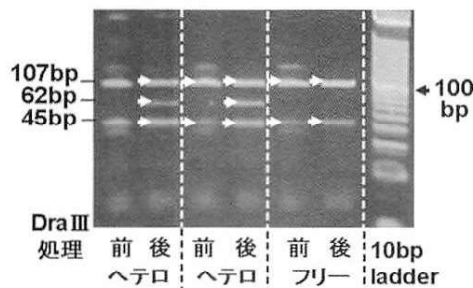


図2 バンド3 (遺伝子型検査法)

表 バンド3保因胚の頻度

保因/性	♂	♀	計
ヘテロ	21	15	36
フリー	25	12	37
計	46	27	73

2種類の遺伝情報判明率:94.8%