

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

小浜菜美子*・秋山敬孝*・岩木史之**・福島護之*

要 約

ウシ体外受精胚から採取したバイオプシー細胞を用いて Peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 (PPAR γ 2) 遺伝子の検出率から診断に必要な胚バイオプシー量, DNA抽出方法, 及び全ゲノム増幅法 (WGA法) を検討した。さらに, WGA産物を用いて性判別及び stearoyl-CoA desaturase (SCD) 遺伝子診断の複数項目DNA診断を実施した。

- 1 DNA抽出方法は加熱処理よりもNaOH処理が優れていた。
- 2 NaOH処理区では胚バイオプシー量、WGA法による変異型PPAR γ 2遺伝子の検出率に差はなかった。
- 3 1/5胚をNaOH処理でDNA抽出した場合の性判別はWGA法の種類にかかわらず100%可能であった。
- 4 1/5胚をNaOH処理でDNA抽出した場合のSCD遺伝子診断率はPEP-PCR産物に比較してMDA産物を用いた方が高い値であった。

以上のことから, NaOH処理で胚からDNAを抽出後, 全ゲノムDNAを増幅すると, バイオプシーサンプル量を1/5胚としても複数項目のDNA診断が可能であることが明らかとなった。

Multiple Genetic Diagnosis in Bovine In-Vitro Fertilized Embryos with Whole Genome Amplification

Namiko KOHAMA, Takayuki AKIYAMA, Humiyuki IWAKI and Moriyuki FUKUSHIMA

Summary

The purpose of this study was to examine multiple genetic diagnoses using whole genome amplification (WGA) in bovine in-vitro fertilized embryos. In experiment 1-1, heat or NAOH treatments, as the DNA extracting method, from different sized biopsied bovine embryos were compared using the detection rate of the Peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 (PPAR γ 2) gene after primer extension-PCR (PEP-PCR). In experiment 1-2, multiple displacement amplification (MDA) was compared with PEP-PCR using the same method of experiment 1-1. In experiment 2, both sexing and Stearoyl-CoA desaturase (SCD) genotyping of WGA (MDA or PEP-PCR) products from biopsied cells of 1/5 the size of the bovine embryo were performed to make multiple genetic diagnoses.

- (1) The NaOH treatment was more suitable for DNA extracting than the heat treatment.
- (2) There was no significant difference among biopsied embryo sizes for the PPAR γ 2 genotyping rate of WGA products using DNA extracted with the NaOH treatment.
- (3) The sexing efficiency of DNA extracted from biopsied cells of 1/5 the size of the bovine embryos with the NaOH treatment was 100% regardless of the WGA method.
- (4) The value of the SCD genotyping rate of MDA products was higher than that of PEP-PCR products using DNA

2011年8月31日受理

*兵庫県立農林水産技術総合センター北部農業技術センター

**姫路家畜保健衛生所

extracted with the NaOH treatment from biopsied cells of 1/5 the size of the bovine embryos.

From these results, we demonstrate that determination of sex and SCD genotype is successfully achieved using DNA products extracted with a NaOH treatment, and amplified the whole genome from biopsied cells of 1/5 the size of bovine in-vitro fertilized embryos.

キーワード：ウシ, 体外受精由来胚, WGA法, PPAR γ 2, 性判別, SCD, 着床前診断

緒 言

近年, ウシ胚による遺伝子診断技術が確立されたことから^{4,5,10,11)}, 経済形質や不良形質などの遺伝情報が判明した胚を利用することで, 遺伝性疾患を回避した高能力牛の生産が可能となってきた。

複数項目の遺伝子診断を実施し, 胚による選抜を可能にするためには, わずかな量の胚サンプルから大量のDNAを増幅させることが必要である。そのために開発された全ゲノム増幅法 (whole genome amplification, WGA法) は稀少なDNAサンプルからゲノムDNAを増幅する有効な方法であり, その増幅方法から主に2種類に大別される。その一つはPCRによるもので, ランダムな配列のプライマーを用いる primer extension preamplification (PEP)-PCR法¹³⁾ や改良型 PEP-PCR法³⁾ degenerate oligonucleotide primed (DOP)-PCR法⁹⁾ などが挙げられる。もう一つはバクテリオファージ由来の ϕ 29 DNAポリメラーゼを利用しゲノムを増幅する multiple displacement amplification (MDA) 法²⁾ である。

本試験では改良型 PEP-PCR法とMDA法を用いて Peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 (PPAR γ 2) 遺伝子の検出率を比較するとともに, 複数遺伝子診断に必要な胚バイオプシー細胞量, DNA抽出方法について検討を行った。

材料及び方法

1 胚の作出

(1) 卵子の体外成熟

食肉処理場で採取したウシ卵巣を100IU/mlペニシリンGカリウム (PC, Meiji Seika ファルマ株式会社), 100 μ g/ml 硫酸ストレプトマイシン (SM, Meiji Seika ファルマ株式会社), を添加した滅菌生理食塩水に入れ, 約25℃に保持して, 実験室に持ち帰った。卵巣表面の直径5mm以下の卵胞から卵丘卵子複合体 (COCs) を吸引採取し, 1%子ウシ血清 (CS) を添加した乳酸加リンゲル液でCOCsを数回洗浄し, 2層以上の卵丘細胞に含まれたCOCsのみを成熟培養に供試した。成熟培地はTCM-199 (GIBCO) に5%CSと1%の100IU/ml PC, 100 μ g/ml SM

を添加したものをを用いた。これらのCOCsを成熟培地で2回洗浄した後, 35 mmウエルディッシュ (Becton, Dickinson and Company) 内の滅菌流動パラフィン (ナカライテスク) で覆った600 μ lの成熟培地へ80~100個ずつ入れ, 5% CO₂, 95% airの気相下とした38.5℃加湿型炭酸ガス培養器内で約20時間培養した。

(2) 体外受精及び体外培養

家畜改良センター技術マニュアル⁷⁾ に準じて, 体外受精, 体外培養した。つまり, PPAR γ 2遺伝子に変異を持つ本県所有の種雄牛1頭から採取した同一ロットの凍結精液を37℃の温湯で融解し, 最終精子濃度を5 \times 10⁶/mlに調整した。あらかじめBO液で洗浄したCOCsを20個ずつ滅菌流動パラフィンで覆った100 μ lのBO液中へ入れ, 5% CO₂, 95% airの気相下で約6時間媒精を行った。

媒精後, 0.025% ヒアルロニダーゼ (SIGMA) を添加したCa、Mg無添加リン酸緩衝液 (PBS(-), SIGMA) 中で, ボルテックスミキサーを用いて卵丘細胞を除去し, 5% CO₂, 5% O₂及び90% N₂の気相下で5%CS添加CR1aa液⁷⁾ 中で体外培養を行った。媒精日を0日として5日目から0.1mM β -メルカプトエタノール (SIGMA) と20% CSを添加したTCM199液中で5% CO₂, 95% airの気相下で培養した。7日目または8日目に胚盤胞まで発生したエクセレントからグッド等級の胚を供試した。

2 胚のバイオプシー

体外受精により作出した胚盤胞を0.2Mスクロース (S) 添加PBS(-)で洗浄し, 90 mmシャーレ上の300 μ l同液の小滴中に1個ずつ移した。マイクロマニピュレータに取り付けた金属刀 (Micro Feather Blade, FEATHER) を用いて倒立顕微鏡下で1/5~1/2に胚を切断した。

3 DNAの抽出

バイオプシーした胚サンプルを滅菌蒸留水 (DW) で2回洗浄後, DNAを抽出した。

PEP-PCR法に供する胚サンプルは, 熱処理区の場合10 μ lのDWとともに0.2 ml PCRチューブへ移し, 95℃, 5分間の加熱処理を行った。NaOH処理区の場合は5 μ lのDWとともにPCRチューブへ移し, さらに5 μ lの50 mM NaOHを足して総量10 μ lとした。MDA法に供する胚サ

ンプルは50 mM NaOH で1回洗浄した後, REPLI-g mini kit (REPLI kit,QIAGEN) 付属のPBS 2 μ l をあらかじめ入れたPCRチューブに1 μ lの50 mM NaOHとともに移して総量3 μ lとした.

4 WGA法

PEP-PCR法では,改良型PEP-PCR法³⁾を一部修正した.つまり,10 μ lのDNA抽出液をPCRチューブへ移し,400 μ M 15 merランダムプライマー (OPERON),1 \times PCR buffer,25 mM MgCl₂,2 mM dNTPs,2U Taq DNA polymerase (TaKaRa) の組成15 μ lと合わせ,総量25 μ lとした.PCR条件については94 $^{\circ}$ C -2分の後に94 $^{\circ}$ C -1分,28 $^{\circ}$ C -2分,55 $^{\circ}$ C -4分 (28 $^{\circ}$ C -55 $^{\circ}$ C間は0.1 $^{\circ}$ C/秒で上昇),68 $^{\circ}$ C -30秒を50サイクル,最後に68 $^{\circ}$ C -8分とした.

MDA法では,REPLI kitを用い,プロトコール手順に従い調整した.すなわち3 μ lのDNA抽出液に3.5 μ lのbuffer D2を添加し,氷上で10分間インキュベートした後stop solutionを3.5 μ l添加し,DW 10 μ l,reaction buffer 29 μ l,DNA polymerase 1 μ lと合わせ,50 μ lとした.その後30 $^{\circ}$ Cで16時間インキュベートした後,65 $^{\circ}$ Cで3分間保持し酵素を不活化した.

5 PCR方法

PPAR γ 2遺伝子では相川らの方法¹⁾に準じてPPAR γ 2遺伝子増幅を行い,3%アガロースを用いて100Vで50分間の電気泳動を行った.性判別はLoopamp牛胚性判別試薬 (栄研化学)を用い,プロトコールに従って診断を行い,Stearoyl-CoA desaturase (SCD)遺伝子の診断はTaniguchiらの方法⁸⁾に準じて行い,3%アガロースを用いて100Vで20分間の電気泳動を行った.

6 実験の構成

実験1 PPAR γ 2遺伝子の検出

バイオプシー細胞量の大きさにより5区 (1/1胚,1/2胚,1/3胚,1/4胚,1/5胚) (図1)を設定した.バイオプシー細胞量,DNA抽出方法,WGA法毎にPPAR γ 2遺伝子の検出率を比較した.

1-1 DNA抽出方法

熱処理とNaOH処理により胚からDNAを抽出後,PEP-PCR法により全ゲノムを増幅し,PPAR γ 2遺伝子を検出した.

1-2 MDA法による全ゲノム増幅

NaOH処理により胚からDNAを抽出後,MDA法により全ゲノムを増幅し,PPAR γ 2遺伝子を検出した.

実験2 PEP-PCR法及びMDA法増幅産物による複数遺伝子診断

1/5胚をNaOH処理でDNA抽出を行ったWGA産物を用いて,性判別とSCD遺伝子診断を実施した.

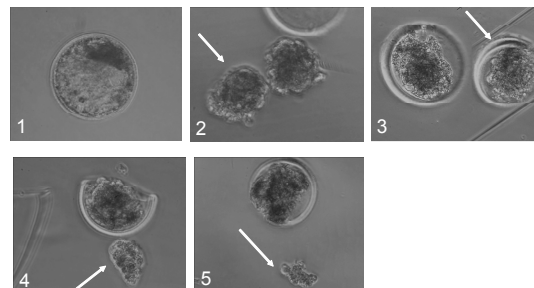


図1 バイオプシー細胞量

1は1/1,2は1/2,3は1/3,4は1/4,5は1/5の細胞量を示す.矢印:サンプル細胞

7 統計処理

計数データを χ^2 検定で解析し,P<0.05の差を有意とした.

結果

実験1 PPAR γ 2遺伝子の検出

成績を図2と表1に示した.

1-1 DNA抽出方法

NaOH処理によるDNA抽出で診断率が上昇した.また,NaOH処理区において胚バイオプシー量による検出率の有意差はなかった.

1-2 MDA法による全ゲノムを増幅

MDA法はPEP-PCR法と同等の変異型PPAR γ 2遺伝子の検出率が得られた.

また,MDA法でも胚バイオプシー量による検出率に有意差はなかった.

実験2 PEP-PCR法及びMDA法産物による複数遺伝子診断

PEP-PCR法及びMDA法産物を利用して,性判別とSCD遺伝子診断が84.6~100%の確率で可能であった(表2,3).性判別では差が出なかったものの,SCD遺伝子診断率はMDA産物を利用した場合に高い値であった.

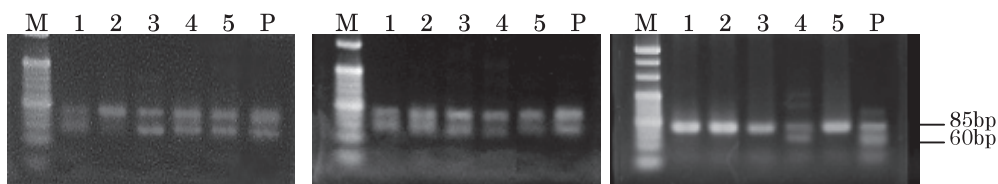


図2 全ゲノム増幅産物を鋳型としたPPAR γ 2遺伝子診断

左より順に熱処理PEP-PCR法,NaOH処理PEP-PCR法,NaOH処理MDA法によるWGAを示す.図上の数字はバイオプシー細胞量を示し,1は1/1,2は1/2,3は1/3,4は1/4,5は1/5の細胞量を示す.85bpのPCR産物を制限酵素（Hinc II）で切断すると60bpと25bpに切断される.85bpは正常バンドと60bpは変異特異的バンドを示す.60bpバンドの存在によりヘテロ変異個体を識別した.

M = 20bp ラダー ,P = ヘテロ遺伝子型をもつ種雄牛の血液抽出DNA

表1 PRAR γ 2遺伝子の診断率

DNA増幅方法	DNA抽出方法	バイオプシー細胞量					total
		1/1	1/2	1/3	1/4	1/5	
PEP-PCR法	熱処理法	4/17(23.5) ^a	32/40(80.0) ^b	2/3(66.7)	6/9(66.7) ^b	2/5(40.0)	46/74(62.2)
	NaOH区	4/4(100) ^b	5/6(83.3)	10/10(100)	6/6(100)	2/2(100)	27/28(96.4)
MDA法	NaOH区	4/4(100) ^b	7/7(100)	4/5(80.0)	2/2(100)	4/4(100)	21/22(95.5)

表内の数字は診断胚/供試胚数（診断成功率）を表す.

a,b = 異符号間に有意差あり (p<0.05)

表2 性判別の診断率

	雄	雌	判定/供試胚数 (%)	一致率
PEP-PCR法	2	4	6/6(100)	100
MDA法	1	5	6/6(100)	100

一致率：WGA法実施前のバイオプシー胚との診断一致率を示す

表3 SCD遺伝子の診断

	AA型	AV型	判定/供試胚数 (%)
PEP-PCR法	10	1	11/13(84.6)
MDA法	3	9	12/13(92.3)

考 察

近年,血液,脂肪,毛根,口内粘液,精液を用いて,バンドⅢ欠損症,クローディン16欠損症や赤血球凝集因子11欠損症等の遺伝的疾患,マーカーアシスト選抜のためのマイクロサテライトマーカー,SCD,FASNやPPAR γ 2等の脂肪構成に関わる経済的遺伝子の診断法が確立されている.また,移植前胚を用いて,性判定,DNA多型診断や経済形質が行われており,ウシの育種において,DNA診断は重要な技術に位置づけられる.しかし,胚を用いたDNA診断では,サンプル量が少なく,移植までの時間が限られているため,サンプリング胚の簡易的なDNA抽出及び迅速なDNA診断が要求される.また,性判定のように反復配列を用いたDNA診断であれば,少量のバイオプシーサンプルについてDNA抽出率が低い簡易な熱処理法を用いても,診断率及び

正確さを低下させない.しかし,反復配列がないその他の遺伝子診断や複数項目の診断では,DNAを効率よく抽出し,しかも蛋白の混入しない精製された,十分なDNA量を確保する必要がある.

実験1-1では50 mM NaOH処理は熱処理よりPPAR γ 2遺伝子の診断率が向上することを示した.DNA抽出方法として,塩類を除いた水中での熱処理,蛋白融解のためのproteinase Kによる酵素処理法,KOHやNaOHのアルカリ処理法があるが,本試験でDNA抽出方法が後に続く遺伝子診断に大きな影響をもたらすことが明らかとなった.

実験1-2において,改良型PEP-PCR法とMDA法の比較で,SCD遺伝子診断率はMDA産物を利用した場合に高い値であったが,PPAR γ 2遺伝子診断は差がなかった.これはSCD遺伝子診断において,MDA法はPEP-

PCR法より優れているとした報告⁵⁾を支持した。

WGA法では少量のヒト細胞を用いて、PEP-PCR法、改良型PEP-PCR法、DOP-PCR法及びMDA法等の種々の方法が開発され、ウシ胚由来細胞にPEP-PCR法¹⁰⁾、改良PEP-PCR¹¹⁾法及びMDA法⁵⁾が応用されている。PEP-PCR法のデメリットとしてDNAが均一に増幅されないことと、増幅されたDNAに1,500bp以上のサイズが確認できていないことが挙げられるが¹²⁾、対象遺伝子のサイズが240bpまでであればWGA法として用いることが可能としている³⁾。今回、PPAR γ 2遺伝子において対象としている変異特異的部位は170bpとサイズが短かったため増幅課程でバイアスが生じにくく、検出感度に差が生じなかったと思われる。しかし、WGA法をウシ胚の着床前遺伝子診断に用いる場合、対象遺伝子に左右されずに安定した診断が可能なMDA法が遺伝子増幅方法として望ましいと考えられた。

今回、WGA法に供する胚バイオプシーサンプル量について検討したが、50mM NaOH処理でDNA抽出をした場合において、WGA法及びバイオプシー細胞量に関わらず高いPPAR γ 2遺伝子診断率が得られた。特にMDA法では電気泳動像から、サンプル量に関わらず安定した増幅が行われていることが確認できた。これは、MDA法ではDNA量0.1ngから100ngの範囲においては同等のDNA収量が得られ、全ゲノム領域において増幅の偏りを最小限に抑えた均一な全ゲノム増幅ができる⁶⁾ことによると考えられる。

これらのことから、NaOH処理で胚からDNAを抽出後、全ゲノムDNAを増幅すると、バイオプシーサンプル量を1/5胚としても複数項目のDNA診断が可能であることが明らかとなった。胚バイオプシー量が小さい程、移植に供する胚へのダメージが小さいため、今後はサンプリング時のサンプルの散逸等のリスクを考慮しつつ、さらに小さなバイオプシー片の使用を検討したい。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、卵巣の採材にご協力賜りました兵庫県食肉衛生検査センターの方々には深謝いたします。

引用文献

- (1) 相川勝弘・太田進雄・谷本保幸・中西直人・柴田昌宏・松本和典(2005): 但馬系黒毛和種、高知系褐毛和種および見島牛におけるPPAR γ 2変異個体の家系調査：近中四農研報 5,85-90
- (2) Dean, F.B., S.Hosono, L.Fang, X.Wu, A.F.Faruqi

- , P.Bray-Ward, Z.Sun, Q.Zong, Y.Du, J.Du, M.Driscoll, W.Song, S.F.Kingsmore, M.Egholm, R.S.Lasken(2002): Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification: Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 5261-5266
- (3) Dietmaier W., A.Hartman, S.Wallinger, E.Heinmoller, T.Kerner, E.Endl, K.W.Jauch, F.Hofstadter, J.Ruschhoff(1999): Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification: Am J Pathol. 154,83-95
- (4) Hirayama H., S.Kageyama, S.Moriyasu, T.Hirano, Y.Sugimoto, N.Kobayashi, M.Inaba, K.Sawai, S.Onoe, A.Minamihashi(2004): Genetic diagnosis of claudin-16 deficiency and sex determination in bovine preimplantation embryos: J Reprod Dev. 50(6):613-618
- (5) Hirayama H., A.Fujikawa, S.Kageyama, S.Moriyasu, K.Saai, S.Onoe, A.Minamihashi (2008): Multiple genotyping in bovine pre-implantation embryos with whole genome amplification: Anim Sci J. 79,554-560
- (6) Hosono S., A.F.Faruqi, F.B.Dean, Y.Du, Z.Sun, X.Wu, J.Du, S.F.Kingsmore, M.Egholm, R.S.Lasken(2003): Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples: Genome Res. 13, 954-964
- (7) 小林修司 (2009) : 家畜改良センター技術マニュアル19 ウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアル：独立行政法人家畜改良センター
- (8) Taniguchi M., T.Utsugi, K.Oyama, H.Mannen, M.Kobayashi, Y.Tanabe, A.Ogino, S.Tsuji (2004): Genotype of stearoyl-coA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle: Mamm Genome. 15, 142-148
- (9) Telenius H., N.P.Carter, C.E.Bebb, M.Nordenskjold, B.A.Ponder, A.Tunnacliffe (1992): Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer: Genomics. 13,718-725
- (10) Tominaga K, Y.Hamada(2004): Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine in-vitro produced blastocysts: Theriogenology. 61(6):1181-91.
- (11) 山口浩・窪田力・林史弘・瀬戸口浩二・溝下和則 (2005) : 胚診断技術の確立 (第2報) : 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告 第10号, 20-22
- (12) Zheng YM., N.Wang, L.Li, F.Jin(2011): Whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis: J Zhejiang Univ Sci B. Jan. 12(1):1-11.
- (13) Zhang L., X.Cui, K.Schmitt, R.R.Hubert, W.Navidi,

N.Arnhelm(1992) Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis: PNAS.89(13):5847-5855.
