

## 体細胞核移植技術によって作出された黒毛和種種雄牛の ミトコンドリアDNA D-loop領域多型による個体識別

安部亜津子 安田康明<sup>1)</sup> 志賀一穂<sup>2)</sup> 長谷川清寿  
山田彰司 佐々木恵美 安部茂樹

**要約** DNAレベルでのウシの個体識別には、マイクロサテライトDNAが利用されているが、全く同じ核内DNAを持つクローン個体相互やそのドナーとの個体識別には利用できない。そこで、核外DNAであるミトコンドリアDNA (mtDNA) に注目し、中でも多型性に富むD-loop領域の塩基配列の多型を利用した体細胞クローン牛の個体識別を試みた。

材料には、体細胞核移植により作出されたクローン種雄牛である夢福および第2夢福と、その体細胞ドナーである糸福を用い、mtDNA Displacement loop (D-loop) 領域多型による凍結精液段階での個体識別が可能であるかを検討した。多型の判定は、D-loop領域のうち、多型性に富む領域を含む496bpの断片 (15921bp-78bp) をPCRにより増幅し、ダイレクトシーケンスによる塩基配列決定およびPCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) によって行った。

夢福および第2夢福のD-loop領域の塩基配列は同一であった。また、夢福および第2夢福のD-loop領域の塩基配列について、2種類の塩基のピークが検出された部位が3箇所確認され、細胞質中に2種類のmtDNAが混在している、ヘテロプラズミーが示唆された。一方、ドナーである糸福のD-loop領域には、夢福および第2夢福で認められたヘテロプラズミーは検出されず、mtDNA型は異なるものであった。このことにより、夢福および第2夢福と糸福は、mtDNAの塩基配列の違いを利用すれば個体識別が可能であった。また、PCR-RFLPでもダイレクトシーケンスと同様の結果が得られ、より簡便なPCR-RFLPによっても識別が可能であった。

なお、糸福のD-loop領域の塩基配列は、ヘテロになっている部位以外は、夢福および第2夢福と同一であった。さらに、夢福および第2夢福でヘテロになっていた塩基について、糸福では3箇所とも、その片方の塩基と一致した。このことから、夢福および第2夢福で認められたmtDNA D-loop領域のヘテロプラズミーの原因として、核移植操作によってドナー体細胞のミトコンドリアが混入したことが考えられたが、レシピエント卵子のmtDNAがもともとヘテロプラズミックであった可能性も考えられた。

**キーワード** : 体細胞核移植 個体識別 ミトコンドリアDNA D-loop領域 ヘテロプラズミー

DNAを用いたウシの個体識別には、マイクロサテライトDNA (MS-DNA) の多型が利用されている<sup>5)</sup> が、MS-DNAは核ゲノムDNA上の多型領域であり、全く同じ核ゲノムDNAを持つ同一ドナー核由来の核移植産子相互や、そのドナーとの個体識別には利用することができない。

細胞質内の小器官であるミトコンドリアには、ミトコンドリアDNA (mtDNA) と呼ばれる独自のゲノムが存在する。mtDNAは約16.5kbpの環状DNAであり、核ゲノムと比較して変異が生じやすく、その変異が蓄積される<sup>3)</sup>。特に、Displacement loop (D-loop) と呼ばれる複製開始点を含む領域は変異に富み、ウシでは品種・系統ごとに、また、系統内では母系ごとに塩基配列の違いがあることが知られている<sup>7, 8)</sup>。核移植産子のドナー細胞とレシピエント卵

子では、細胞質内のmtDNA型が異なっている可能性があり、その場合、mtDNAの塩基配列の違いを利用した個体識別が可能であると考えられる。

そこで、mtDNA D-loop領域の塩基配列の多型を利用して、体細胞核移植によって作出されたクローン種雄牛とその体細胞ドナー種雄牛の個体識別を試みた。また、DNA材料には凍結精液を用い、凍結精液から調製したDNAを用いてmtDNAの解析が可能かどうかを検討した。

### 材料および方法

#### 供試材料およびDNA調製

材料には体細胞核移植により作出された種雄牛である夢福および第2夢福と、その体細胞ドナーである糸福を用い、夢福および第2夢福は凍結精液を、

現所属 : <sup>1)</sup> 松江農林振興センター安来地域

<sup>2)</sup> 大分県畜産試験場

糸福は血液をDNA材料とした。凍結精液からのDNA調製は既報<sup>11)</sup>により行った。また、血液からは自動DNA抽出機によりDNAを調製した。調製したDNAは、濃度を10ng/μlに調整し、以下の分析に用いた。

#### 塩基配列の決定

塩基配列の決定は、ウシmtDNAのD-loop領域のうち、15921bpから78bpの496bpの領域を対象として行った(図1)。ただし、これらの番号は、Andersonら<sup>1)</sup>によって決定されたウシmtDNAの塩基配列によった。対象領域の増幅はPCR法によって行った。プライマーの塩基配列はフォワードを5' GCCCATACACAGACCACAGA 3'、リバースを5' AAGGATCCCCCAAATAAAA 3'とした。PCR反応液の組成は、25ng DNA、1×PCR buffer、10mmol each dNTP (A, G, C, T)、12.5pmol each プライマー (フォワード、リバース) および1.25unit AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) であり、反応液量は50μLとした。PCR反応は、サーマルサイクラーGeneAmp9600 (Applied Biosystems) を用い、96

で9分間の熱変性を行った後、95 で30秒、53 で45秒、72 で45秒のサイクルを40サイクル実施し、72 で7分間の伸長反応を行った。反応産物はQuickStep 2™PCR purification kit (EdgeBiosystems) を用いて精製し、シークエンス反応のテンプレートDNAとした。シークエンス反応はダイターミネーター法により、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3.0 (Applied Biosystems) を用いて、プロトコールに従って行った。なお、シークエンス反応のプライマーは、D-loop領域の増幅で用いたフォワードプライマーを使用した。シークエンス反応後の産物は、Performa™ DTR Gel Filtration System (EdgeBiosystems) を用いて精製後、ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems)

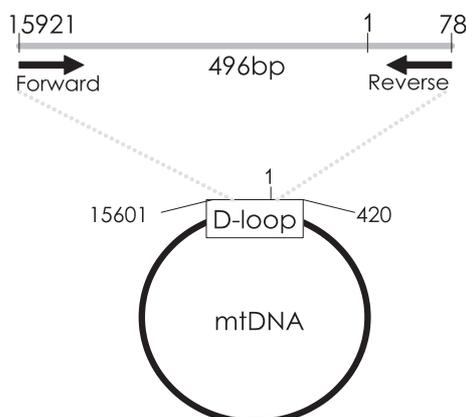


図1 多型解析に用いたD-loop内の領域

で電気泳動した。塩基配列はSequencing Analysis 3.4 (Applied Biosystems) により解析し、各個体間で比較を行った。

#### PCR-RFLP分析

個体間で塩基配列に違いが認められた部位のうち、16302bpのGからAへの塩基置換について、制限酵素AvaIIを用いたPCR-RFLPを行った(図2)。

分析に用いたDNA断片は、塩基配列決定に用いたものと同じであり、同一条件でPCR反応を行った。得られた反応産物はクロロホルム抽出およびエタノール沈殿後、20μlの滅菌水に溶解し、そのうちの10μlを制限酵素処理に用いた。反応液の組成は、20μl中でDNA溶液を10μl、1×M buffer (10mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 50mM NaCl) および10unit AvaII (TaKaRa) とし、37 で2時間の消化を行った。反応産物は、エチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルで電気泳動後、電気泳動像を観察し、制限酵素による切断の有無によってmtDNA型を判定した。

#### 結 果

夢福、第2夢福および糸福のD-loop領域の塩基配列を図3に、多型が認められた部位のエレクトロフェログラムを図4に示した。夢福および第2夢福のD-loop領域の塩基配列は同一であった。また、これらの塩基配列のうち、2種類の塩基のピークが検出され、ヘテロになっている部位が16042bp、16093bpおよび16302bpの3箇所に確認された。一方、糸福のD-loop領域の塩基配列には、夢福および第2夢福で検出された16042bp、16093bpおよび16302bpのヘテロは認められず、mtDNA型は夢福および第2夢福と異なっていたが、その3箇所以外の塩基配列は一致した。また、糸福において、16042bp、16093bpおよび16302bpの塩基は、夢福および第2夢福で認

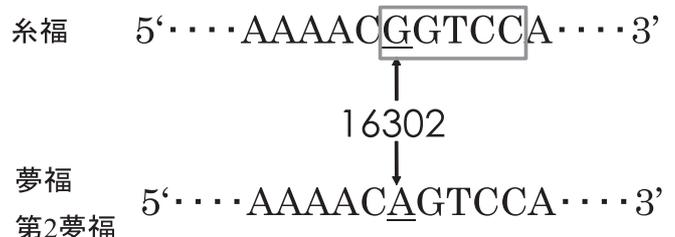


図2 PCR-RFLPに用いた領域

注)四角で囲った部分はAvaII認識配列を示す

められた2種類の塩基のうち、一方の塩基と一致した。

PCR-RFLPの電気泳動像を図5に示した。糸福では382bpおよび114bpの2本のバンドが検出され、制限酵素AvaIIによる切断が確認された。一方、夢福および第2夢福では、496bp、382bpおよび114bpの3本のバンドが検出されたことから、AvaIIによる切断を受けた断片と切断されなかった断片が混在しており、両者ともダイレクトシーケンスと同じ結果が得られた。

考 察

夢福および第2夢福とそれらの体細胞ドナーである糸福では、mtDNA D-loop領域の塩基配列が異なっており(図3)、両者の個体識別が可能であった。このことは、糸福のmtDNAと、核移植に用いたレシピエント卵子のmtDNAの型が異なっていたことに起因すると推察された。この結果から、体細胞核移植により作出された個体とその体細胞ドナーの間でmtDNA型が異なっている場合には、mtDNA D-loop領域の塩基配列を決定することで、個体識別が可能であることが明らかになった。また、受精卵クローンにおいても同様に個体識別が可能であると

		16042	16093	16302	
Standard*	5'	.....T.....	G.....	G.....	3'
夢福 **	5'	.....C.....	A.....	A.....	3'
第2夢福		T	G	G	
糸福 **	5'	.....T.....	G.....	G.....	3'

図3 夢福、第2夢福および糸福のD-loop領域の塩基配列

\*Andersonら<sup>1)</sup>による。

\*\*Standardと異なる塩基のみを示した。

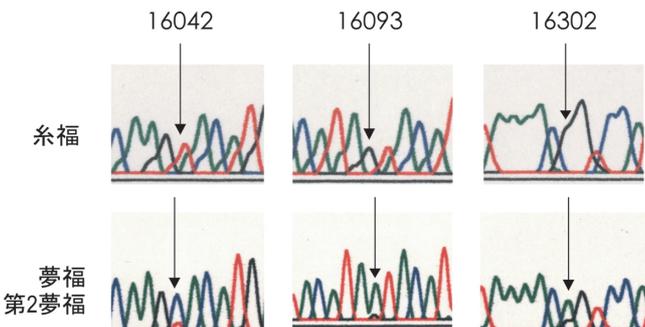


図4 多型が認められた部位のエレクトロフェログラム

考えられた。今回は体細胞核移植で作出された種雄牛間ではmtDNA型が同一であったため個体識別は不可能であったが、核移植の際にmtDNA型の異なるレシピエント卵子を用いた場合には個体識別が可能であると考えられた。また、塩基置換を利用したPCR-RFLPによっても同様な結果が得られ、より簡易な方法によって個体識別を行うことが可能であったが、塩基置換が認められた部位に制限酵素の認識配列が無い場合も考えられるため、その場合には、PCR-SSCPやダイレクトシーケンスのような方法を用いる必要がある。

今回はDNA調製の材料として凍結精液を用いたが、シーケンスおよびPCR-RFLPともに解析が可能であった。通常、哺乳類においては1個の体細胞内には約 $2 \times 10^3$ コピー、卵子には約 $2 \times 10^5$ コピーのmtDNAが存在するのに対し、精子には50~70コピーとごくわずかなmtDNAしか存在しない<sup>4, 9)</sup>。そのため、凍結精液から調製したDNA中には、白血球などの体細胞から調製したDNAと比較して、非常に少ないコピー数しかmtDNAは存在しないと考えられる。しかし、今回の結果から、凍結精液から通常のゲノムDNA調製の方法で調製したDNA中には、シーケンスやPCR-RFLP分析のために十分なコピー数のmtDNAが存在することが確認された。

なお、夢福および第2夢福のD-loop領域の塩基配列では、2種類の塩基のピークが検出された部位が16042bp、16093bpおよび16302bpの3箇所を確認され(図4)、細胞内に2種類のmtDNAが存在する、ヘテロプラズミーが検出された。一方、体細胞ドナーである糸福において、16042bp、16093bpおよび16302bpの塩基は、夢福および第2夢福で認められた2種類の塩基のうち、一方の塩基と一致した。また、夢福および第2夢福において、糸福と共通する塩基

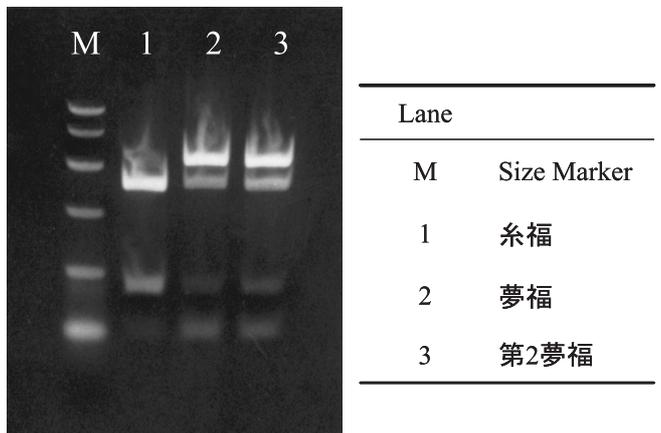


図5 PCR-RFLPの結果

のピークは、もう一方の塩基に比べ3箇所とも低かった(図4)。これらの結果から、夢福および第2夢福で認められたmtDNA D-loop領域のヘテロプラズミーの原因として、核移植操作によってドナー体細胞のミトコンドリアが混入したことが考えられたが、夢福および第2夢福のレシピエント卵子のmtDNAがもともとヘテロプラズミックであった可能性も考えられた。しかし、今回の場合、夢福および第2夢福のレシピエント卵子のmtDNA型が不明であったため、原因の特定はできなかった。

以上のことから、mtDNA D-loop領域の多型は核移植産子およびそのドナーの個体識別マーカーとして有用であると考えられる。しかしながら、mtDNAのD-loop多型あるいは遺伝子の多型が肉用牛の枝肉形質<sup>6)</sup>や繁殖性<sup>2)</sup>、乳牛の泌乳能力<sup>10)</sup>などに影響を及ぼすという報告もあり、mtDNA型の違いによって核移植産子とそのドナーとの間、あるいは、核移植産子間で、経済形質の表現型に違いが生じる可能性もある。そのため、mtDNAの多型を核移植産子および細胞ドナーの個体識別に活用するためには、mtDNAの多型が経済形質に及ぼす影響を評価することが重要であると考えられる。しかし、表現型に及ぼす効果としては核ゲノムの占める部分が非常に大きいため、核ゲノムのバリエーションが大きい集団から得られたフィールドデータを用いた解析によってmtDNAの影響を推定することは困難であることが予想される。経済形質に及ぼすmtDNAの影響を評価するためには、同一の核ゲノムを持つ個体を得

ることのできる核移植技術を活用し、核ゲノムは同一でmtDNA型の異なる核移植産子間で表現型を比較検討することが有効であると考えられる。

#### 引用文献

- 1) Anderson S. et al. J. Journal of Molecular Biology, 156:683-717. 1982
- 2) Boettcher, P. J. et. al. Journal of Dairy Science, 79:647-654. 1996
- 3) Brown, W. M. et. al. Journal of Molecular Evolution, 18:225-239. 1982
- 4) Hauswirth, W. W. and Laipis, P. J. Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research. vol.II, eds. Quagliariello, E. et. Al., elsevier Sci. Pub. pp. 49-59. 1985
- 5) Inoue-Murayama, M. et. al. Animal Science and Technology, 68:443-449. 1997
- 6) Mannen, H. et. al. Journal of Animal Science, 76:36-41. 1998
- 7) Mannen, H. et. al. Genetics. 150:1169-1175. 1998
- 8) 万年英之ら. 日本畜産学会報, 71:470-474. 2000
- 9) Michaels, G. S. et. al. Developmental Biology, 94:246-251. 1982
- 10) Sutarno, J. M. et. al. Theriogenology, 57:1603-1610. 2002
- 11) 安田康明ら. 島根畜試研報, 35:5-8. 2002