

牛の二卵性双子産子のキメラに関する分子遺伝的検索

安田康明、遠藤 治、森脇秀俊、板垣勝正

要 約 牛において追い移植により誕生した二卵性双子産子を含め 5 組の双子産子について動物遺伝研究所が開発選定した個体識別用マイクロサテライトマーカー (MSDNA マーカー) などを利用し分子生物学的検索を実施した。双子産子 4 例は白血球の MSDNA マーカー型は双子産子間で一致するが、体毛根部のそれは異なる血液キメラを示し、このうち異性双子 3 組の雌はフリーマーチンであった。キメラ体白血球の MSDNA マーカー型は雌または雄を示すものと一定では無く、残り 1 例の異性双子産子は血液キメラは認められずフリーマーチンも認められなかった。キメラを示した雌から得られた受精卵の MSDNA マーカー型は白血球の MSDNA マーカー型を 6 つの MSDNA マーカーで否定したが、頭部皮下組織のアリルを否定しなかった。個体識別マーカーによる個体識別は双子産子の判定にも極めて有効であり、正確な個体識別の観点から実施が必要であると思われた。

島根県立畜産試験場研究報告第 34 号 : 11-14,2001

はじめに

牛では雌雄異性双子を妊娠した場合、雌の 90% 以上が不妊牛となり、フリーマーチンとよばれる²⁾。フリーマーチンの原因は胎児体膜が接触し、絨毛膜血管の吻合による血液交流とされているが、この現象はキメラを生じる。キメラについては溶血反応など抗原抗体反応を応用した調査が行われてきたが、分子生物学的検索を実施した報告はほとんどない。今回、追い移植により誕生した、ホルスタイン種と黒毛和種の二卵性双子雌産子の黒毛和種雌産子や 2 卵移植や人工授精により誕生した黒毛和種異性双子産子など 5 組の双子産子の DNA 試料を得ることができ、動物遺伝研究所が開発選定した個体

識別用マイクロサテライトマーカー (以下、MSDNA マーカーとする) などを用いて分子遺伝的検索を行ったので報告する。

材料および方法

5 組の双子産子の概要と DNA 試料の由来を表 1 に示した。二卵性双子雌産子の黒毛和種雌産子より過排卵処理により得られた受精卵 2 個を凍結融解処理により細胞を破壊し DNA 試料とした。他に精液、白血球、体毛根部、角突起角質部そして頭部皮下織から DNA を調製し試料とした。

表 1 DNA 調製用材料の由来と概要

No.	個体	着床方法	材料の由来	父	母
1-1	同性双子産子 (雌 和牛)	受精卵移植	白血球、体毛根部など	凍結精液	白血球
1-2	" (雌 ホルスタイン)	自然交配	-	白血球	白血球
1-1-1	受 精 卵 (和牛)	-	細胞 (130 個程度)	凍結精液	白血球、組織
1-1-2	受 精 卵 (和牛)	-	細胞 (130 個程度)	凍結精液	白血球、組織
2-1	異性双子産子 (雄 F1)	人工授精	白血球、体毛根部	凍結精液	白血球
2-2	" (雌 和牛)	受精卵移植	"	"	"
3-1	" (雄 F1)	人工授精	"	"	"
3-2	" (雌 和牛)	受精卵移植	"	"	"
4-1	" (雄 和牛)	"	白血球	-	-
4-2	" (雌 和牛)	"	"	"	"
5-1	" (雄 和牛)	人工授精	白血球、体毛根部	凍結精液	白血球
5-2	" (雌 和牛)	"	"	"	"

1-2 については死亡していたため DNA 材料無し
和牛 : 黒毛和種 F1 黒毛和種雄とホルスタイン雌の交雑種

試料DNAの調整

凍結精液試料は約 0.5ml (ストロー 1 本) を PBS 緩衝液 1ml に懸濁後 800G の遠心分離による精子沈殿を 3 回繰り返す、500µl の 10mM Tris-HCl (PH8.5)、10mM EDTA、0.33% SDS、25mM DTT、30µg のプロテナーゼ K (Kodak) の溶液で 55 度 48 時間加熱溶解し、EASY-DNA Kit (Invitrogen™) により Genomic DNA を調整した。白血球についても EASY-DNA Kit (Invitrogen™) により Genomic DNA を調整した。体毛根部、角突起角質部、頭部皮下織は FastPrep™、FastDNA™ Kit を利用し Genomic DNA を調整した。

プライマーとポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

プライマーは (社) 畜産技術協会附属動物遺伝研究所が個体識別用に開発選定した常染色体上の 23 種類の蛍光色素でラベルされたマイクロサテライトマーカー (MSDNA マーカー) を主に利用した¹⁾。反応液は 15µl とし、その構成はテンプレート DNA 10ng、dNTP 200µM (each)、MgCl₂ 1.7mM、Primer 0.4µM each、Tris-HCl 10mM、KCl 50mM、Taq DNA Polymerase 0.375unit (タカラ) とした。反応液を 94 4 分間の加熱後、94 30 秒、55 (または 60) 30 秒、72 30 秒のサイクルを 30 回繰り返す、最後に 72 5 分加熱した。

GeneScan

PCR 終了後、PCR の温度条件により区別されている 2 つのグループ (12 種類、11 種類) について FAM および TET で蛍光色素ラベルされた反応液はそれぞれ 1µl、HEX の蛍光色素でラベルされた反応後溶液は 4µl を 1 マーカーずつ取り混合した。この混合溶液 1.2µl に、赤色の蛍光色素でラベルされたサイズマーカーなど 4.5µl を加え、94 度 10 分間の熱変性と濃度調整後に氷冷し、同一のレーンに 0.8µl を泳動した。電気泳動は DNA オートシーケンサー 377 用のプレミックスクリアミドゲル溶液 (株) パイオメイトを用い、DNA オートシーケンサー本体の蛍光検出器までの長さが 36cm のゲルを作成し、377 DNA Sequencer (Perkin Elmer) により 2 時間行った。泳動データは Genescan672、Genotyper (Perkin Elmer) で分析しアリルを判定した。

雄特異的 PCR 産物の確認

フリーマーチンを疑う 2 例 (4-2、5-2) についてウシ胚性判別キットである XY セクター (伊藤ハム) を利用し、プロトコールに準じて白血球由来の DNA より雄特異的 PCR 産物の有無を確認した。

受精卵の MSDNA マーカー型判定

限られた DNA 数からの MSDNA 型判定のために二

段階 PCR を行った。すなわち、10 個程度の鋳型 DNA で PCR を実施した PCR 産物 1µl を鋳型と同じ MSDNA マーカーをプライマーとして PCR を行い判定した。

結 果

Genotyper (Perkin Elmer) でエレクトロフェログラムとして出力したアリルの判定例を図 1 に示した。アリルは

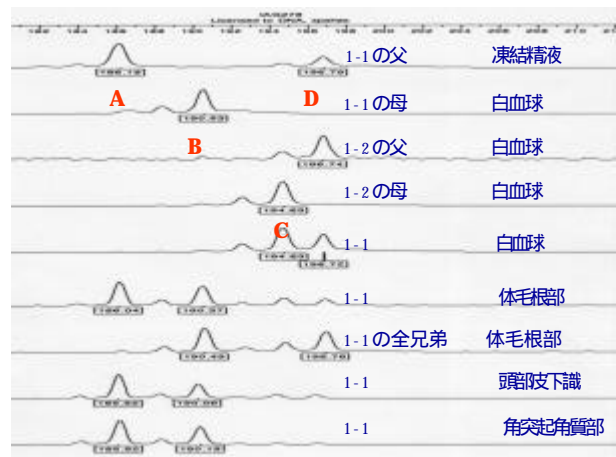


図 1 エレクトロフェログラムとアリルの型判定

小さいものから塩基数をアルファベット (A ~ Z) にカテゴリー化し 23 種類の MSDNA マーカーについて判定した。その 1 例 (1-1、1-2) を表 2 に示した。増幅しなかった 2 種のマーカーを除き、1-1 の白血球とそれ以外の組織の DNA 型は 1 種のマーカーでのみ一致した。不一致であったマーカーでは黒毛和種雌産子の白血球から調整した DNA 型はそのレシピエントであったホルスタイン雌と農場で飼育されていたホルスタイン雄の DNA 型からの遺伝を否定することなく、ドナーおよび黒毛和種雄牛の DNA 型からの遺伝には矛盾を認めた。逆に黒毛和種雌産子の体毛根部、角突起角質部そして頭部皮下織から調製した DNA 型はドナーおよび黒毛和種雄牛の DNA 型の遺伝を否定することなく、ホルスタイン雌および雄の DNA 型からの遺伝には矛盾を認めた。表 3 に 5 組の双子産子の MSDNA マーカーによる判定結果を示した。5 組の双子産子のうち 4 組で双子間で白血球由来の MSDNA マーカー型は同一でありキメラを認めた。キメラを認めた異性双子産子の 1 例である 3-2 は家畜改良事業団の検査によりフリーマーチンと診断された。残りの 2 例 (4-2、5-2) についても白血球由来 DNA から雄特異的 PCR 産物が確認されフリーマーチンと診断した (図 2)。1-1 を過排卵処理して得られた 2 個の受精卵について、23 種類の個体識別用 MSDNA マーカーから 8 種類のマーカーを選んで判定

表 2 個体識別用マーカーによるアリル型判定例

MSDNA マーカー	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DNA 調製材料											
1-1 の父 凍結精液	AE	EE	AD	BC	BE	AA	BD	BC	BE	AF	AC
1-1 の母 白血球	DE	?	BB	AB	BE	?	?	CC	?	AD	CC
1-2 の父 白血球	BE	CD	DD	DD	AD	AC	CD	AC	CF	CE	?
1-2 の母 白血球	CC	BC	CC	AB	AC	AA	BD	CD	AA	BE	BB
1-1 血液	CE	CC	CD	BD	AC	AB	CD	AD	AC	BC	BD
1-1 毛根	?	AE	AB	AB	EE	?	?	CC	BD	DF	AC
1-1 皮下織	AE	AE	AB	AB	EE	AA	AB	CC	BD	DF	AC
1-1 角質部	AE	AE	AB	AB	EE	AA	AB	CC	BD	DF	AC

表 3 双子産子の MSDNA マーカーによる判定結果

双子 No.	種類	個体識別用 MSDNA マーカー (23 種類) 型*	アリル型	キメラ	フリーマーチン (雌側)
1	同性双子産子	同一	ホルスタイン側	有り	-
2	異性双子産子	異なる	矛盾を認めず	無し	無し
3	"	同一	F1 (雄)側	有り	有り
4	"	同一	-	有り	有り
5	"	同一	雌側	有り	有り

* :白血球由来 DNA の個体識別用 MSDNA マーカー型

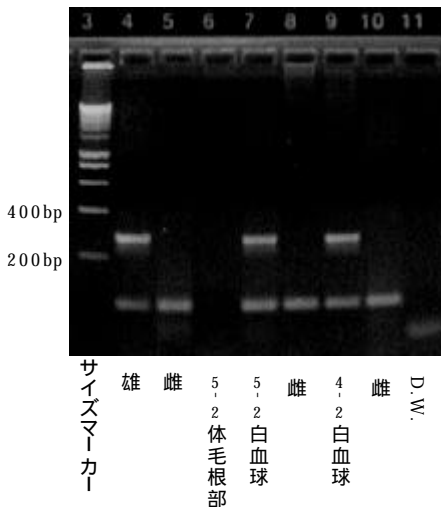


図 2 牛雄特異的 PCR 産物の確認

頭部皮下組織からの遺伝を否定することはなかったが、白血球由来のアリルの遺伝を 6 つのマーカーで否定した。

考 察

牛の双子産子の場合、胎子期の血管吻合によるキメラが高率 (90 ~ 95 %) 起こるとされている²⁾が、今回も 5 組中 4 組で認めている。また、その白血球の MSDNA マーカー型はどちらか一方の個体と同一となり判定する MSDNA マーカーによってはあたかも 1 卵生双子産子の MSDNA マーカー型を示すことが明らかとなった。さらに、これらの双子産子毛根細胞由来 DNA の MSDNA 型は異なっており個体識別が可能であることも判明した。

これらのことから異性双子の場合はそれらの白血球

表 4 受精卵の個体識別用マーカーによるアリル型判定

MSDNA マーカー	3	4	5	7	8	9	11	22
DNA 調製材料								
受精卵の父 凍結精液	AB	BC	BD	AC	BC	AB	AB	AB
1-1 の母 白血球	CD	BD	AC	CC	AC	CC	CD	AA
1-1 頭部皮下組織	AB	AB	EE	AB	BB	AD	BC	AB
受精卵 1	<u>AB</u>	<u>AB</u>	<u>BE</u>	AC	<u>BB</u>	<u>AD</u>	<u>AB</u>	AB
受精卵 2	<u>BB</u>	BB	<u>BE</u>	AC	BC	<u>BD</u>	<u>AB</u>	AB

*下線の MSDNA マーカー型が 1-1 の母の白血球由来 MSDNA マーカー型の遺伝を否定している

した結果を表 4 に示した。受精卵から得られたアリルは

由来 DNA の MSDNA マーカー型が同一であればキメラを生じていると考えられ、その雌側はフリーマーチンであると判定される。同性双子の場合は白血球由来 DNA の MSDNA マーカー型が同一であり、双子産子毛根細胞由来 DNA の MSDNA 型は異なっている場合はキメラを生じている二卵性双子と考えられ、白血球由来 DNA の MSDNA マーカー型が互いに異なる場合はキメラを生じていない二卵性双子と考えられる。そして、白血球由来 DNAMSDNA マーカー型が同一であり双子産子毛根細胞由来 DNA の MSDNA 型も同一の場合は一卵性双子であると考えられるが胎子期の血管吻合の有無を確認することはできない。

キメラ雌牛から得られた受精卵の DNA 型はマーカー数に不足はあるが、白血球由来 DNA 型を否定していることから、卵巣細胞へのキメラの影響はないと考えられる。また、二段階 PCR 報を利用することで少ない DNA コピー数の試料の MSDNA マーカー型判定が可能であると考えられる。

フリーマーチンの診断には血液型検査や白血球培養

による Y 染色体の確認が行われているが、異性双子産子の白血球由来 DNA を個体識別用マーカー型判定を実施し、キメラの有無を判定することでフリーマーチンを判定できることから効率的である。さらに組織由来の DNA を併せて判定することで、同性双子産子のキメラの存在と一卵生双子の判定も同時に行えることから、MSDNA マーカーによる個体識別は双子産子の判定にも極めて有効であり、正確な個体識別の観点から実施が必要であると思われた。

謝 辞

MSDNA マーカーの提供と御指導を賜りました、動物遺伝研究所杉本博士ほか研究所と研究所の諸先生方に深謝します。

参 考 文 献

- 1)日畜会報、68(5):443-449、1997
- 2)新編 畜産大辞典、584、1996