

学 位 論 文 題 名

EMBRYO SEXING BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF TRACE TARGET DNA SEQUENCES IN CATTLE AND WATER BUFFALOES

(微量 DNA 配列の等温 DNA 増幅法による牛と水牛の胚の性別判定)

学位論文内容の要旨

本研究では、牛と水牛の胚の性別判定技術の簡易化を目的として、等温 DNA 増幅法である loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いた胚の性別判定技術について検討した。また、LAMP 法を用いた胚の性別判定技術を牛の異性双子におけるフリーマーチンの診断法として応用した。

第 1 章では、LAMP 法を用いた牛 (*Bos taurus*) の胚の性別判定技術について検討した。まず、牛雄特異的 DNA 配列である S4 と雌雄共通配列である 1.715 satellite を増幅するための LAMP 用プライマーセットを設計した。雄特異的プライマーを用いた反応は雄胚中の Y 染色体の検出に、また、雌雄共通プライマーは試料回収チューブに胚由来の細胞が正しく採取されたことを確認するために使用した。次いで、試料となる胚由来の細胞の DNA 抽出法を検討した結果、加熱、NaOH および Proteinase K-Tween20 処理による DNA 抽出効率 (89~94%) が同等であることが分かった。また、胚から採取した細胞を試料として LAMP 法により性別を判別した結果、4 個以上の細胞を試料とした場合にすべての検体を正しく判定できた。さらに、LAMP 法により性別を判別した胚をレシピエント牛に移植して得られた子牛 33 頭の性別は、LAMP 法により判定された性別とすべて一致した。LAMP 法 (63.5~65℃の定温下で実施) による DNA の増幅は反応液の濁度の上昇により検出され、胚の性別判定に要した時間は 1 時間以内であった。これらの結果から、LAMP 法を用いた牛胚の性別判定は精度が高く、従来の PCR 法に比較して迅速かつ簡易であり、胚移植における性別の特定された子牛の生産に利用できることが示された。

第 2 章では、第 1 章で開発した LAMP 法を用いた牛胚の性別判定キットを利用して、異性双子由来の産子における性染色体キメラ検査を行った。

検査試料となる DNA は、子牛から採取した血液を蒸留水で希釈した後、NaOH を用いて抽出した。反応液中で血液を 1,000 倍に希釈すると LAMP 法により増幅された DNA の検出（濁度測定）に血液色素などの影響がみられず、雌牛の血液中に添加した 0.01% の雄由来白血球の存在を検出することができた。また、染色体検査および PCR 法による検査で性染色体キメラと判定された異性双子由来の雌子牛（10 頭）のすべてから、LAMP 法により血中から雄特異的 DNA が検出された。これらの結果から、LAMP 法による牛胚の性別判定キットが性染色体キメラを高感度に検出し、フリーマーチンの判定法として利用できることが示された。

第 3 章では、水牛 (*Bubalus bubalis*) の雄特異的 DNA 配列を同定し、LAMP 法を用いた水牛胚の性別判定技術について検討した。まず、牛の雄特異的 DNA 配列である BRY に対する相同配列をサブクローニングして沼沢型水牛 (sBuRY.2) と河川型水牛 (rBuRY.2) の雄特異的配列を得た。雄胚の検出には sBuRY.2 を増幅する LAMP 反応を、また、試料回収チューブに胚由来の細胞（試料）が存在することを確認するためには 12S rRNA を増幅する LAMP 反応を用いた。線維芽細胞を試料として性別判定を行った場合、NaOH 処理法が加熱処理法より安定した DNA 抽出効率を示した。さらに、水牛の線維芽細胞と牛の除核卵子を用いて作出した異種間核移植胚の性別判定を行った結果、4 個以上の胚細胞を試料とした場合に正確に胚の性別を判定できた。LAMP 反応は 61℃ の定温下で行われ、DNA の増幅は反応液の濁度の上昇により検出された。胚の性別判定に要した時間は約 1 時間であった。これらの結果から、LAMP 法を用いた水牛胚の性別判定技術は、迅速かつ精度が高く雌雄の産み分けに利用できることが考えられた。

以上の研究から、LAMP 法を用いて迅速かつ正確な牛と水牛の胚の性別判定技術が開発された。また、この技術が異性双子由来の雌子牛におけるフリーマーチンの迅速診断に利用できることが示された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	高橋	芳幸
副査	教授	昆	泰寛
副査	教授	木村	和弘
副査	准教授	片桐	成二

学位論文題名

EMBRYO SEXING BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF TRACE TARGET DNA SEQUENCES IN CATTLE AND WATER BUFFALOES

(微量 DNA 配列の等温 DNA 増幅法による牛と水牛の胚の性別判定)

学位論文提出者は、牛と水牛の胚の性別判定技術の簡易化を目的として、等温 DNA 増幅法 (loop-mediated isothermal amplification: LAMP 法) を用いた胚の性別判定技術について検討した。

牛胚の性別判定に関しては、牛の雄特異的および雌雄共通の DNA 配列を増幅するためのプライマーセットを設計し、一定温度下での DNA 増幅を反応液の濁度により判定する条件 (増幅時間と判定基準濁度) を確認したのち、試料となる胚細胞からの適切な DNA 抽出法と性別判定精度 (確実な判定に必要な最少細胞数: 4 個) を明らかにした。ついで、その技術を用いて性別判定した牛胚をレシピエント牛に移植し、得られた子牛の性別が事前に判定された性別とすべて一致することを実証した。また、この牛胚の性別判定技術を牛の異性双子由来の産子における性染色体キメラの検出に応用し、フリーマーチンの判定法として利用できることを示した。

水牛胚の性別判定に関しては、沼沢型と河川型の水牛の雄特異的および雌雄共通 DNA 配列を増幅するためのプライマーセットについて、一定温度下での DNA 増幅時間、判定基準となる濁度、試料からの DNA 抽出法を検討した。ついで、その最適条件を用いて水牛胚 (沼沢型水牛の線維芽細胞と牛の除核卵子を用いて作出した異種間核移植胚) の性別判定を行い、4 個以上の胚細胞を試料とした場合、正確に性別を判定できることを示した。

本研究により、LAMP 法を用い牛と水牛の胚から採取した少数の細胞の雄特異的および雌雄共通 DNA 配列を等温（61～65℃）で短時間（30～45 分間）のうちに増幅し、反応液の濁度測定によって胚の性別を判定する簡便で正確な技術が開発された。よって、審査員一同は上記学位論文提出者 平山博樹 氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。