

## クローン胚および産子におけるミトコンドリア DNA の動態

武田久美子（畜産草地研究所 家畜育種繁殖部 育種素材開発研究室）

kumiko@affrc.go.jp

通常の受精を介しないクローン家畜において、細胞質遺伝のミトコンドリア DNA (mtDNA) が、クローン産子へ伝達される機序を解明する研究を行った。受精卵由来核移植胚における mtDNA の分解・消失の様相を明らかにするとともに、同一の体細胞に由来する複数のクローン産子の mtDNA はほぼレシピエント卵子由来となるため、産子間で異なっていることを明らかにした。

### 1. はじめに

ウシのクローンを作成する核移植操作において用いるドナー細胞とレシピエント卵子は、由来個体が異なる場合が多く、核移植胚ではドナー細胞およびレシピエント卵子双方に由来する 2 種類の mtDNA が混在する状態（ヘテロプラズミー）となることが考えられる。しかし、mtDNA は核 DNA とは異なる複製・伝達様式を示すため、核移植操作で混在した mtDNA がその後の発生過程でどのように伝達されるか、また、産子の発育などの経済形質に与える影響は不明である。mtDNA は細胞内のエネルギー生産に深く関わっており、ヒトでは mtDNA の特定部位の塩基置換や欠失・挿入などの変異が病気を引き起こす原因となっていることが示されている。マウスでは、核と細胞質の由来の違いが胚の発育や産子の能力に影響を与えることが示唆されている。また、家畜では、mtDNA 型と泌乳形質や産肉形質との関連性が統計的に示唆されている。

こうした背景から、本研究は、核移植操作により生じた mtDNA ヘテロプラズミーの胚発生および産子への伝達の機序を解析することにより、クローン家畜の生産形質への mtDNA の寄与の有無を明らかにすることを目的としたものである。

### 2. mtDNA 型の解析

mtDNA で最も塩基置換が多いと考えられている調節領域(D-loop 領域)の塩基配列および変異をマウス 2 系統<sup>5)</sup>、ブタ 4 品種<sup>8)</sup>、ウシ 3 品種<sup>7)</sup>について明らかにした。塩基配列の違いを見分けるには制限酵素切断型多型法やシーケンス解析で行うのが常法であるが、PCR 断片の一本鎖高次構造多型 (SSCP) 法を併用することにより、より簡便に塩基置換や DNA の混在を検出することが可能となった。その結果、D-loop 領域の変異はマウスおよびブタでは系統間または品種間の区別に有効であり、ウシでは母系系統の解析や遺伝的起源追求に有効であることが明らかとなった。

### 3. 初期胚に人為的に混在させた mtDNA の伝達

人為的操作により初期胚に混在した mtDNA が、その後の発生過程でどのように伝達するかを検討するため、mtDNA 塩基配列の異なる 2 系統のマウスから採取した 2 細胞期胚の割球と除核割球をそれぞれ相互に細胞融合した再構築胚を作成した。再構築胚からそれぞれの系統由来の mtDNA を持つ（ヘテロプラズミー）産子を得て mtDNA の解析を行った。その結果、産子の組織では、核側の細胞種がいずれの系統であっても、特定系統由来の mtDNA の割合が非常に高く、mtDNA には独自に複製・伝達に有利な要因のあることが明らかとなった。また、発育にともなって mtDNA の均一化が進むこと、均一化の進行には組織特異性が認められることが明らかとなった<sup>5)</sup>。

#### 4. ウシ核移植胚および産子における mtDNA の伝達

##### 1) 初期胚割球由来核移植

あらかじめ mtDNA 型が同定されているウシ初期胚割球由来ドナー細胞およびレシピエント卵子によって核移植胚を作成し、mtDNA 型について検討した。その結果、融合直後にはドナー細胞由来の mtDNA が検出されたが、4-8 細胞期には順次消失し、胚盤胞期にはほとんど検出されなかった (図 1A)。このことから、初期発生の段階でドナー細胞由来の mtDNA はレシピエント細胞質内で徐々に分解・消失し、レシピエント卵子由来の mtDNA に均一化されることが示唆された。また、核移植胚由来産子からは、ドナー細胞由来の mtDNA 型は検出されない例が多かったが、これは再構築胚の初期発生時に起こる mtDNA 均一化の結果であると考えられた<sup>6)</sup>。

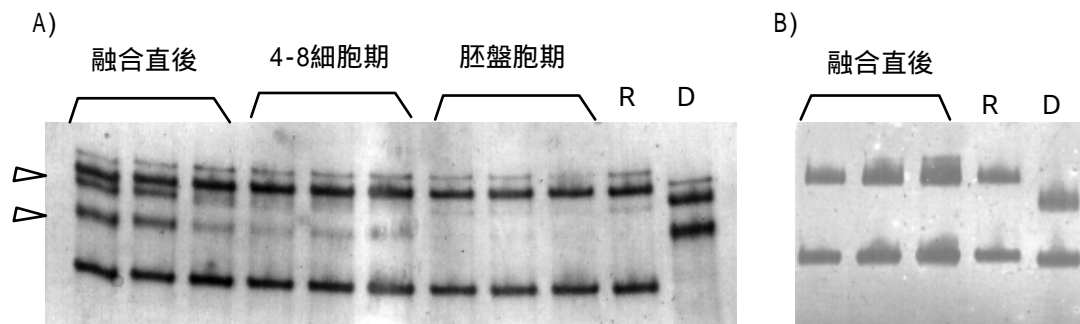


図 1 核移植後の胚発育に伴うドナー細胞 mtDNA の動態。SSCP 解析には、D-loop 領域内の高変異部位 (308bp) を PCR で増幅した断片を用いた。A) 初期胚割球由来核移植胚。B) 体細胞由来核移植胚。D; ドナー細胞として用いた桑実期胚割球。R; レシピエント卵子。

##### 2) 体細胞由来核移植

体細胞由来核移植の場合、レシピエント卵子に持ち込まれるドナー細胞由来の mtDNA 数は受精卵割球由来核移植と比較して非常に少なくなると考えられる。ひとつのドナー細胞内に存在する mtDNA は約 2,000 分子に対し、レシピエント卵子には約 200,000 分子存在していることから、体細胞核移植後の胚細胞質内にはドナー細胞由来する mtDNA はおおよそ 1% であると考えられる。実際、卵子内に導入された体細胞の mtDNA を検出することはほとんど不可能 (3-4% 未満) であり (図 1B)、産子でも多くの場合、検出されなかった (表)。

表. 体細胞クローン産子の mtDNA 解析結果

卵子	ドナー細胞 品種	細胞の由来	試験数 (死亡数)	牝 (ドナ型)	ヘコ (ドナ型含)
	ホルスタイン	卵管	11 (4)	11 (0)	0 (0)
		皮膚	9 (3)	9 (0)	0 (0)
		子宮	1 (0)	0 (0)	1 (0)
不特定	黒毛和種	卵丘	13 (9)	10 (1)	3 (2)
		皮膚	11 (8)	11 (2)	0 (0)
		胎仔	2 (1)	2 (0)	0 (0)
	ジャージー	卵管	5 (1)	3 (0)	2 (1)
合計			52 (26)	46 (3)	6 (3)
特定	ホルスタイン	卵丘	11 (8)	5 (3)	6 (3)

ところが、ある卵丘細胞 (D1) 由来核移植産子 (胎児含む) 11 頭について mtDNA の解析を行ったところ、

その内3頭の産子でドナー細胞とレシピエント卵子の双方の mtDNA 型が明瞭に検出された(図 2A)。これらの産子では、核移植により導入されたドナー細胞 mtDNA の全 mtDNA に対する割合がそのままの割合で維持されるだけでなく、増加したと考えられた<sup>1)</sup>。その他の産子においては、産子の mtDNA 型は、レシピエント卵子由来となることが明らかとなった(図 2B)。例外として mtDNA 型のヘテロプラズミーがみられる場合、その発生要因としては、1.ドナー細胞由来の mtDNA が残存する(図 2A)、2.レシピエント細胞質の mtDNA 型が元来ヘテロプラズミーである(図 2B, C5~C6)、あるいは3.同一受胎牛に mtDNA 型の異なる複数胚の移植で生産された産子である、の3点があると考えられた<sup>3)</sup>。また、ドナー細胞と同一の mtDNA 型となった場合、ドナー細胞と同一の mtDNA 型をもつレシピエント卵子を用いたと示唆された(図 2B, C7~C8)。

mtDNA の伝達は選択的なものとランダム的なもの双方に支配されており、このような、核移植産子におけるドナー細胞 mtDNA の伝達の違いは、血清飢餓などのドナー細胞の培養条件<sup>2)</sup>や導入した mtDNA の量に因ると考えられているが、例外も多く、いまだ不明な点が多い。

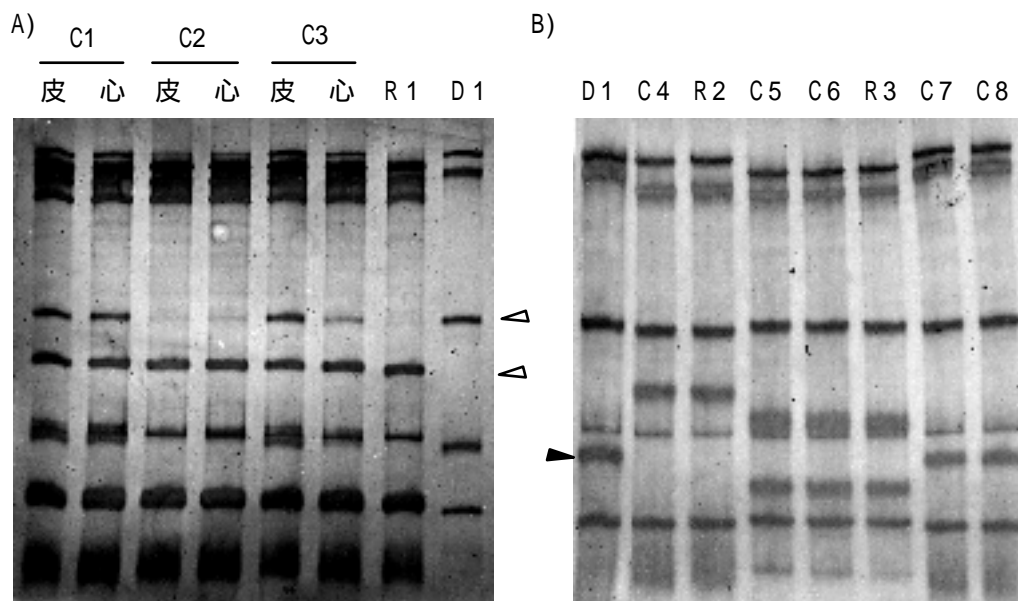


図2 同一ウシ個体細胞由来(D1)のクローン産子にみられた様々な mtDNA 型。SSCP 解析には D-loop 全領域を増幅した PCR 産物を制限酵素 *Hpa*I で 2 箇所切断した断片を用いた。

- A) ドナー細胞 (D1) とレシピエント卵子 (R1) から作出された C1~3 の核移植産子では、双方に由来する mtDNA 型が検出された (白矢印)。ドナー細胞 mtDNA の全 mtDNA に対する割合は、 $39 \pm 8\%$  (C1)、 $6 \pm 6\%$  (C2)、 $40 \pm 18\%$  (C3) と高い値を示した。皮：皮膚、心：心筋。
- B) レシピエント卵子と同一のパターンを示した例。R2 卵子を用いた C4 産子および R3 卵子を用いた C5~6 産子では、ドナー細胞(D1)に由来する mtDNA が検出されなかった (黒矢印)。C7~C8 産子は卵子にドナー細胞と同一の D1 由来のものを用いた。

## 5. おわりに

核移植産子の mtDNA 型は、ほぼレシピエント卵子由来となり、ドナー細胞とクローン産子の mtDNA 型が必ずしも一致しないことが明らかとなった。mtDNA 型の違いは流産産子と生存産子間において相違はみられなかったことから、通常の核移植において、産子の mtDNA 型や伝達の違いが直ちにクローン産子の早死産などの異常の原因とはならないと考えられた。

## 6. 謝辞

本研究の一連の遂行にあたり、京都大学大学院農学研究科の今井裕教授に終始多大なご指導をいただきました。また、元家畜改良センターの小島敏之博士、現東京農業大学の花田博文教授、農業生物資源研究所の大西彰博士には、暖かいご指導とご援助をいただきました。さらに、共同研究者である畜産草地研究所の高橋清也氏、赤木悟史氏、太齊真理子氏をはじめ、ウシ核移植産子の作成およびサンプルをご提供下さった家畜改良センターの金山佳奈子氏（現農業生物資源研究所）ならびに技術第一課の皆様、島根県立畜産試験場、山口県畜産試験場、広島県畜産技術センター、宮城県畜産試験場、群馬県畜産試験場、神奈川県畜産研究所、山梨県酪農試験場、富山県畜産試験場、北海道立畜産試験場、宮崎県畜産試験場、鹿児島県肉用牛改良研究所、石川県畜産総合研究センター、茨城県畜産センター、兵庫県畜産技術センター、静岡県畜産試験場、岐阜県畜産研究所、岡山県総合畜産センター、畜産草地研究所の関係諸氏に多大なご支援をいただきました。皆様に心より感謝し厚くお礼申し上げます。本農学進歩賞にご推薦下さいました日本畜産学会金井幸雄会長、農業・生物系特定産業技術研究機構横内園生理事ならびに諸先生方に深く感謝いたします。

## 7. 引用文献

- 1) K. Takeda, S. Akagi, K. Kanayama, K. Kojima, S. Takahashi, H. Imai, M. Yamanaka, A. Onishi, and H. Hanada. (2003) Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves (*Bos taurus*) derived from cumulus cells. *Molecular Reproduction and Development* Vol. 64, 429-437.
- 2) K. Takeda, S. Akagi, S. Takahashi, A. Onishi, H. Hanada, and C. A. Pinkert (2002) Mitochondrial activity in response to serum starvation in bovine (*Bos taurus*) cell culture. *Cloning and Stem Cells* Vol. 4, 223-229.
- 3) 武田久美子・長谷川清寿・市野清博・今井昭・金山佳奈子・高橋清也・赤木悟史・今井裕・山中真理子・大西彰・花田博文、2002年1月、ウシ核移植産子のミトコンドリアDNA型・ヘテロプラスミーの要因、日本胚移植学雑誌、24巻、13-18頁
- 4) K. Takeda, S. Takahashi, S. Akagi, Y. Goto, K. Kanayama, T. Kojima, A. Onishi, H. Hanada, H. Imai. (2001) Segregation of mitochondrial DNA in the heteroplasmic state in reconstructed embryos and offspring. In: *Reproductive Biotechnology and Relating Physiology*. (H. Miyamoto and N. Manabe eds.) 265-270. Hokuto Printing Co., Ltd., Kyoto.
- 5) K. Takeda, S. Takahashi, A. Onishi, H. Hanada, H. Imai (2000) Replicative advantage and tissue-specific segregation of RR mitochondrial DNA between C57BL/6 and RR heteroplasmic mice. *Genetics* Vol. 155, 777-783.
- 6) K. Takeda, S. Takahashi, A. Onishi, Y. Goto, A. Miyazawa, H. Imai (1999) Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocyte in the bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *Journal of Reproduction and Fertility* Vol. 116, 253-259
- 7) K. Takeda, A. Onishi, S. Takahashi, T. Kojima, H. Hanada (1997) Genetic variants of bovine mitochondrial DNA D-loop region in Japanese Black, Japanese Brown and Holstein Breeds. *Animal Science and Technology (Jpn.)* Vol. 68, 1161-1165.
- 8) K. Takeda, A. Onishi, N. Ishida, K. Kawakami, M. Komatsu, S. Inumaru (1995) SSCP analysis of pig mitochondrial DNA D-loop region polymorphism. *Animal Genetics* Vol. 26, 321-326

Mitochondrial DNA study of cloned cattle.

Kumiko Takeda (National Institute of Livestock and Grassland Science)

kumiko@affrc.go.jp