

研究開発部門

北海道立畜産試験場 遺伝子診断応用研究グループ

陰山聡一（代表）・平山博樹・森安 悟・澤井 健
繪野澤真樹・尾上貞雄・南橋 昭・山本裕介・森 清一
高野 弘・納富継宣・渡辺恵子・副島隆浩・森 安義
平野剛史・藤田奈由・高橋芳幸・片桐成二・堂地 修
山科秀也・松崎重範

新規遺伝子増幅法(LAMP法)による 牛受精卵性判別キットの研究開発



遺伝子診断応用研究グループのみなさん

子牛を生産する場合、乳用牛では乳生産のための雌、肉用牛では発育のよい雄の子牛が望まれる場合が多い。現在、子牛の雌雄産み分けは、PCR法と呼ばれる遺伝子増幅法を用いて、あらかじめ性判別した受精卵を受胎牛に移植することで行われている。

道立畜試では、独自に牛雄特異的DNA配列(S4;1997年特許取得)を同定し、S4から設計したプライマーを用いたPCR法による性判別技術を確立している。しかしながら、煩雑で時間がかかること、高価な設備が必要なことから、性判別受精卵の利用は十分に普及していない現状にある。

一方、栄研化学(株)は1999年に新たな遺伝子増幅法であるLoop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)法を開発した。LAMP法は、短時間に特異的かつ大量に目的のDNA配列を増幅することができ、また、一定温度で反応が進行し、反応液の白濁により増幅産物を検出できるため電気泳動が必要ないなど、迅速かつ現場での遺伝子診断に適した技術である。

そこで当研究グループは2001年度から北海道の研究課題として、道立畜試が同定した牛雄特異的DNA配列(S4)と栄研化学(株)が開発したLAMP法を組み合わせることで迅速かつ簡易な牛受精卵の性判別技術の開発およびそのキット化に取り組んだ。

LAMP用のプライマーは、S4および既知の雌雄共通DNA配列を用いて設計し、反応温度、反応時間およびDNA抽出方法の検討を行った。その結果、DNA抽出から検出まで約1時間と、PCR

法の2~3時間程度に比較して所要時間を大幅に短縮するキットを開発した(商品名:Loopamp牛胚性判別試薬キット)。また、必要な機器は、同時に開発された簡易な専用装置(ヒートブロック付き濁度測定装置)のみである。キットを用いて行った実証試験では、性判別を行った61個の受精卵を移植したところ、35頭が受胎し、出生した33頭の子牛の性はすべて判定結果と一致していた。

本キットは2002年3月より試験販売を開始し、2003年9月末現在、国内55施設で利用されている。これまで性判別に興味があっても導入に躊躇していた現場の獣医師などへも広がっている。国内だけでなく、2002年10月より新疆および北京において評価試験等が開始され、実験用試薬としての販売が予定されている。さらに2003年1月にニュージーランドで開催された国際胚移植学会での発表を契機に、欧米への展開も検討されている。また、本キットはLAMP法のコンセプトを具現化した第1号製品でもあり、LAMP法を様々な分野へ広げる上でも大きな役割を果たしている。

以上のように、当研究グループが開発した牛受精卵性判別キットは、国産の遺伝子増幅技術を用いたものとしてはわが国最初の試みであり、日本をはじめ海外においても、畜産現場ですでに一般技術となった受精卵移植に大きな付加価値を与えるものである。今後は性判別受精卵の凍結技術の改善を図り、性判別受精卵の一層の有効活用を目指している。

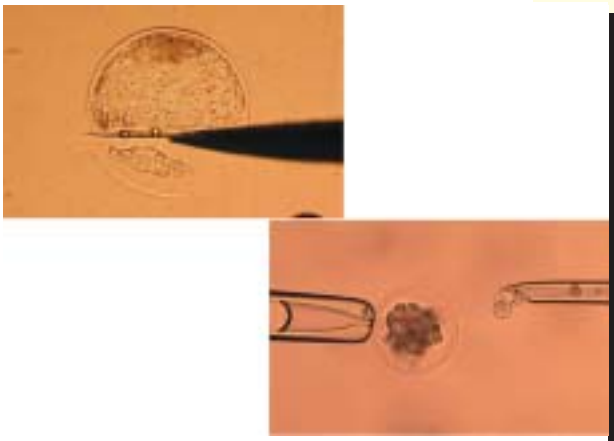
現所属：陰山聡一・平山博樹・森安 悟・澤井 健・繪野澤真樹・尾上貞雄・南橋 昭・山本裕介・森 清一(北海道立畜産試験場)、高野 弘・納富継宣・渡辺恵子・副島隆浩・森 安義・平野剛史・藤田奈由(栄研化学株式会社)、高橋芳幸・片桐成二(北海道大学)、堂地 修(酪農学園大学)、山科秀也(財)北海道農業開発公社十勝育成牧場)、松崎重範(社)ジェネティクス北海道試験研究室)

活動のすかた



▲受精卵からの細胞採取

倒立顕微鏡とマイクロマニピュレーターを用いて判別用の細胞を採取する。



▲胚盤胞は切断、桑実胚は吸引

受精卵をできるだけ傷つけないように発育ステージに適した採取法を用いる。



▲専用装置による LAMP 反応

性判別キット（右下）を用いて、採取した細胞から DNA を抽出し、LAMP 反応を行う。

▼増幅結果と判定

DNAが増えると白濁する。濁度判定結果は+、-でプリントアウトされる。



▼性判別受精卵の移植により誕生した産子

LAMP 性判別キットにより雌と判定した受精卵を移植して誕生したホルスタイン種の雌子牛。

