

ウシ初期胚内における複数の遺伝子発現に関する検討 (アンチセンス RNA-RT-PCR 法)

角川 博哉¹・浜野 晴三²・伊藤 隆司³・
高橋ひとみ⁴・山田 豊¹・仮屋 堯由⁴

¹北海道農業試験場畜産部 札幌市 〒062, ²家畜改良事業団家畜バイテクセンター 東京都品川区 〒140
³家畜衛生試験場北海道支場 札幌市 〒062, ⁴畜産試験場繁殖部 茨城県稻敷郡茎崎町 〒305

要旨: 1個のウシ初期胚から作成したアンチセンス (aRNA) RNA 溶液を RT-PCR 法の材料として用いる方法 (aRNA-RT-PCR 法) により、1 胚内の複数の遺伝子発現を調べることが可能かどうか検討した。凍結保存した 2 細胞期～胚盤胞期までの体外成熟・体外受精卵を材料として用いた。T7-RNA 合成酵素の認識結合配列が連結した oligo(dT) 逆転写用プライマーによる逆転写と 2 本鎖 cDNA 合成の後に、T7-RNA 合成酵素を用いた転写反応によって 100 μl の aRNA 溶液を作成した。aRNA の逆転写には、増幅録型として 5 μl の aRNA 溶液 (1/20) と、ウシの β-アクチン (bActin) の塩基配列を基に合成したセンス側 (aRNA に対する第 1cDNA 鎖合成に必要) またはアンチセンス側 (mRNA に対する第 1cDNA 鎖の合成に必要) のプライマーを用いた。続いて両プライマーを用いた PCR を行い、アガロースゲル電気泳動により増幅産物を確認した。その結果、aRNA の逆転写でセンス側プライマーを用いた場合に増幅産物が確認され、アンチセンス側プライマーのみを用いた場合には確認されなかった。以上のことから、aRNA-RT-PCR 法によりウシ初期胚の複数の遺伝子発現を検討できる可能性が示唆された。キーワード: ウシ、1 初期胚、アンチセンス RNA、RT-PCR、遺伝子発現。

近年、哺乳動物の初期胚を用いて各種の遺伝子発現を、RT-PCR 法により mRNA を増幅しその有無を確認する方法 (以下、mRNA-RT-PCR 法) により検討する研究が行われている [1]。しかし、mRNA-RT-PCR 法を用いた場合は、ウシ初期胚における 1 種類の mRNA の有無を検討するために、1 反応あたり数個 [1] から数十個 [2] の初期胚が必要であり、多数の初期胚を材料として用意しなければならない。そのためこの方法には実施する上で大きな制約がある。また複数の胚をまとめて材料とするために、同じ発育段階の胚間の比較や 1 胚内の遺伝子発現相互の関連などを調べることも困難であった。

Gelder ら [3] は、極微量の多種 mRNA の混合溶液を基にして、大量の多種アンチセンス RNA (以下、aRNA) 混在溶液を作成する方法 (以下、aRNA 合成法) を開発した。さ

らに Eberwine ら [4] は、aRNA 合成法を用いて、1 個の神経細胞から複数の mRNA が合成される様子を報告した。RT-PCR 法では 1 種類の mRNA から cDNA が合成され増幅されるため、その 1 種類の mRNA の有無のみを知ることが可能である。一方、aRNA 合成法では (Fig. 1)，複数の mRNA に対して約 2,000 倍の aRNA が合成される [3, 4]。この方法の原理は、mRNA から cDNA を合成する際に T7-RNA 合成酵素の認識結合配列が連結した oligo(dT) 逆転写用プライマー (以下、T7-(dT) プライマー) を用いることで、T7-RNA 合成酵素の認識結合配列を組み込ませた 2 本鎖 cDNA を合成し、これに T7-RNA 合成酵素を作用させ転写により RNA を合成することによるものである。

mRNA-RT-PCR 法では、アンチセンス側プライマーを用いて逆転写により第 1cDNA (アンチセンス鎖) を合成し、続いて PCR 法によりセンス鎖とアンチセンス鎖からなる 2 本鎖 cDNA の増幅産物が得られる。aRNA は mRNA に対して相補的な塩基配列を持ち mRNA の配列とは同一ではない。しかし RT-PCR 法で、センス側プライマーを用いた逆転写により第 1cDNA (センス鎖) を合成し PCR 法を行うこと (以下、aRNA-RT-PCR 法) により、アンチセンス鎖とセンス鎖からなり mRNA-RT-PCR 法の増幅産物と同一の 2 本鎖 cDNA の増幅産物が得られ、これが同様の情報源となる。

これまでの mRNA-RT-PCR 法を用いた報告から、初期胚の数にして約 100 個分の mRNA を材料として用いれば広範囲な遺伝子の発現を明らかにすることができます [5]。1 個の初期胚を材料として aRNA 合成法を行うことにより、初期胚の数にして約 2,000 個分の mRNA と同様な情報源が得られ、約 20 の遺伝子発現を明らかにすることが可能になると考えられる。

著者らは、1 個のウシ初期胚から aRNA 合成法で作成した aRNA 溶液の 1/20 を用いた aRNA-RT-PCR 法を行い、これについて検討した。

材料および方法

2 細胞期～胚盤胞期まで発生段階ごとに 8 個ずつの初期胚を作成し、個別に aRNA を合成した。体外成熟・体外受精卵

(受付 1996 年 7 月 10 日／受理 1996 年 8 月 28 日)

別刷請求先: 〒062 札幌市豊平区羊ヶ丘 1

北海道農業試験場畜産部 角川博哉

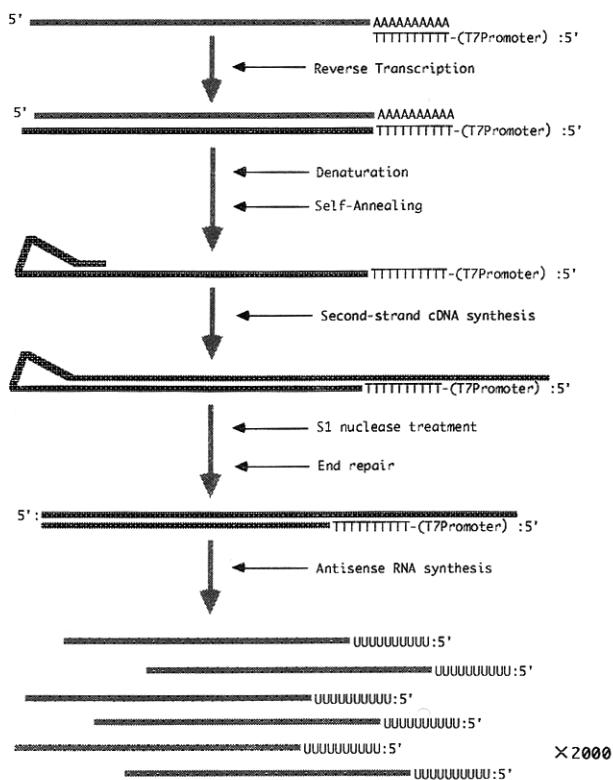


Fig. 1. Paradigm for production of aRNA. Whole RNA is reverse-transcribed by using the AMV transcriptase and a synthetic primer containing the T7 RNA polymerase binding site. Second-stranded cDNA is performed with Klenow and T4 DNA polymerase. After removing hairpin-loop structure by S1 nuclease treatment and end repair, the cDNA is purified and transcribed with T7 RNA polymerase, yielding antisense RNA.

の作出および凍結保存は次のように行った。屠場にて黒毛和種牛の卵巣を採取後、37°Cの0.1 mg/ml カナマイシン添加生理食塩水中に浸漬した状態で1時間以内に試験室に持ち返った。卵巣表層で直径2~5 mmの卵胞から注射器を用いて卵子を吸引採取し、5層以上の卵丘細胞が付着した卵子のみ選別して試験に用いた。卵子の体外成熟および体外受精後の発生培養には、5%非動化ウシ胎子血清(FBS, Filtron, PTY Ltd., Victoria, Australia) 添加TCM-199溶液(Earle's salts, 25 mM HEPES, 380-2340, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)を基礎培地として用い、培養用シャーレ(35 × 15 mm, Nunclon 153066, Inter-med, Roskilde, Denmark)に1 mlの基礎培地の液滴を作成し、周囲をミネラルオイル(Squibb, 和光純薬工業, 大阪)で覆い用いた。採取後の卵子の体外成熟培養は、2%CO₂, 98%air, 38.5°Cの条件下で21~22時間行った。精子の処理はParrishら[6]の方法に順じた。すなわち0.5 mlストロー内に凍結保存した黒毛和種の人工授精用精液を、融解後に10 mlの10 mM

カフェイン(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)添加BO液[7]に懸濁し、2回の800×g・5分間の遠心処理による洗浄後、精子濃度を2×10⁷/mlに調整した。この精子浮遊液に10 mg/ml BSA(Fraction-V, 和光化学, 大阪)および10 µg/mlヘパリン(ノボヘパリン, 小玉製薬, 東京)を添加したBO液により等量希釈した。成熟培養終了後、成熟培地中で2~3回ピッティングすることで卵子から放射冠に至らない膨化した卵丘細胞を除去し、この卵子を精子懸濁液中に移し媒精を行った。成熟培養に入れた卵丘細胞をCO₂インキュベーター内で継続して培養した。媒精5時間後に卵子を発生培地に移し、2%CO₂, 98%air, 38.5°Cの条件下で培養を行った。媒精48時間後に卵丘細胞を除去し2細胞期以上に分割している胚の割合を検査した後に、4細胞期以上に発生した胚のみを卵丘細胞と共に培養しそれを継続した。媒精後24, 36, 48, 72, 96, 120および144時間に、それぞれ2, 4, 8, 16, 32細胞期胚、桑実期胚および胚盤胞期胚を凍結保存した。凍結保存は、完全に卵丘細胞を除去した各ステージの胚を3 mg/mlポリビニルアルコール添加PBS(-)中で5回洗浄し、1個ずつ0.25 ml人工授精用ストロー内へ吸引しプログラムフリーザーを用いて冷却した後、液体窒素中に投入することにより行った。

aRNA合成の錆型となる2本鎖cDNAの合成を行った。融解後の初期胚を0.9%生理的食塩水中で2~3回洗浄し、11.5 µlの逆転写反応溶液[1.0 µlのエタ沈メイト(312-01791, 和光純薬工業, 大阪), 5.0 µlのH₂O, 2.0 µlの10 mM dNTP(各2.5 mM, 27-2035-01, ファルマシア社, 東京), 0.5 µlの0.5 mg/ml T7-(dT)プライマー(AAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGC= (T)₂₄)溶液, 0.5 µlの0.25 MDTT溶液(2620 A)および2.5 µlの5×AMV逆転写酵素用緩衝液(2620 A)]の入った0.5 mlマイクロチューブ(Safe lock 0.5 ml, Eppendorf, Hamburg, Germany)に入れ、95°C 5分間と0°C 3分間の処理を3回繰り返しmRNAにプライマーを結合させた。この処理後に0.5 µlのRNasin(70 unit, 2310 A)と0.5 µlのAMV逆転写酵素(25 unit, 2620 A)を加え、41°C 60分間の処理により1本鎖cDNAを合成した。次にフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール混合液(用量比25:24:1)を用いた除タンパク、エタノール沈殿および乾燥処理を行った後、48.0 µlのcDNA合成用緩衝液[5.0 µlの10×クレノウ断片酵素用緩衝液(2140 A), 4.0 µlの10 mM dNTP, 39.0 µlのH₂O]に融解し、95°C 5分間, 0°C 3分間, 22°C 10分間の処理によりヘアピン構造化させた。ヘアピン構造化後に1.0 µlのクレノウ断片酵素(4 unit, 2140 A)と1.0 µlのT4-DNA合成酵素(4 unit, 2040 A)を加え、22°C 120分間の処理により2本鎖cDNAを合成した。

aRNA合成を次のように行った。除タンパク、エタノール沈殿および乾燥処理後、50.0 µlのS1分解酵素液[44.0 µlのH₂O, 5.0 µlの10×S1分解酵素用緩衝液(2410 A)および1.0 µlのS1分解酵素(150 unit, 2410 A)]に希釈し37°C

30分間の処理によりヘアピン構造を除去した。除タンパク、エタノール沈殿および乾燥処理後、50.0 μ lの末端平滑化用酵素液 [5.0 μ lの10×クレノウ断片酵素用緩衝液、4.0 μ lの10 mM dNTP, 39.0 μ lのH₂O, 1.0 μ lのクレノウ断片酵素(4 unit)と1.0 μ lのT4-DNA合成酵素(4 unit)]に融解し37°C 5分間の処理により末端を平滑化させた。さらに除タンパク、エタノール沈殿および乾燥処理し、50.0 μ lのT7-RNA酵素液 [6.4 μ lの10 mM NTP (各2.5 mM, 27-2025-01, ファルマシア社、東京), 35.6 μ lのH₂O, 1.0 μ lのRNasin (70 unit), 5.0 μ lの10×T7-RNA酵素用緩衝液および2.0 μ lのT7-RNA酵素 (100 unit, I2540 A)]に融解し37°C 60分間の処理によりaRNAを合成した。

aRNA合成液のDNaseI処置(2210 LA)後、H₂Oを添加し希釈した溶液100.0 μ lのうち、5.0 μ lを1回のRT-PCR法の材料として以下の検討に用いた。ウシの β -アクチンの配列[8]を基にセンス側プライマー(ACGTCGCC-TTGGAACTTCGAGCAGG)とアンチセンス側プライマー(GCTGGAAGGTGGACAGGGAGGCCAGGA)をそれぞれ合成した。5.0 μ lのaRNA合成液に、0.5 μ lまたは1.0 μ lのH₂O, 2.0 μ lの10 mM dNTP, 0.5 μ lの0.25 M DTT溶液, 2.5 μ lの5×AMV逆転写用緩衝液を加えた。さらに0.5 μ lのセンス側プライマー溶液のみ、アンチセンス側プライマー溶液のみ、または両方を加え、95°C 5分間と0°C 3分間の処理後に0.5 μ lのRNasin (70 unit)と0.5 μ lのAMV逆転写酵素(25 unit)を加え41°C 60分間処理し逆転写反応を行った。続いて66.0 μ lのH₂O, 8.0 μ lの10 mM dNTP, 9.0 μ lの10×Taq酵素用緩衝液(R001A), 0.5 μ lのTaq酵素(2.5 unit, R001A), 2.0 μ lのセンス側またはアンチセンス側プライマー、2.5 μ lのアンチセンス側またはセンス側プライマー溶液を加えた。これを92°C 2分-(92°C 1分-60°C 1.5分-72°C 1.5分)×30サイクル-72°C 10分の温度設定でPCR装置(Temptronic thermal cycler, Barnstead-Thermolyne, IA, USA)を用いてPCRを行った。aRNA-RT-PCR法によるbActinの增幅産物(405 bp)は、ItohとKodama[9]が、ウシ単核細胞から同じbActinのプライマーを用いてmRNA-RT-PCR法により作成した増幅産物を比較に用いて1.5%アガロース電気泳動(TAE緩衝液)により確認した。

なお、用いた全ての酵素および酵素用緩衝液は宝酒造社製(東京)のものである。また、実験においてはPCR法を実施するまでの注意事項に従った[10, 11]。

結果および考察

2細胞期～胚盤胞期までの全ての発生段階の胚由來のaRNAの逆転写で、センス側プライマーのみ用いた区とセンス側とアンチセンス側プライマーの両方を用いた区でbActinの増幅産物が得られ、アンチセンス側プライマーのみ用いた区では得られなかった(Fig. 2)。同じ発生段階内

の胚間の比較では、bActinの増幅産物量に差が観察されたが顕著ではなく、また増幅産物が得られない胚は無かった。発生段階別の増幅産物量の比較では、発生初期に減少し続いて増加するという傾向が観察されたもののこの差も顕著ではなかった(Fig. 3)。aRNA合成において、T7-RNA酵素処理前のエタノール沈殿に比べ処理後では沈殿物量が増加することが観察され、2本鎖cDNAおよびaRNA合成が正しく行われたことの目安になった。

本報告では体外成熟・体外受精胚のみを用い正常胚を用いていない。そのため、正常胚を材料とした場合にも複数のmRNAを検出できるかどうかについては言及できないが、著者らは体外成熟・体外受精胚と同様に複数のmRNAを検出可能であると考える。

aRNA合成法の原法に従って反応用酵素を多種類用いたため、操作時間が長かった。しかし、1種類のバッファーを逆転写反応にもDNA合成反応にも利用可能なTth酵素(Tet-Z, Amersham, England, UK)等を用いることでより簡便な方法に改良できる可能性も考えられる。

aRNA合成反応液の1/20を用いて検討を行った結果、全発育ステージの胚由來のbActinの増幅産物が得られた。そのためbActinと同程度以上の発現量のmRNAであれば、1個の初期胚で20種類のmRNAの発現について調べられるこ

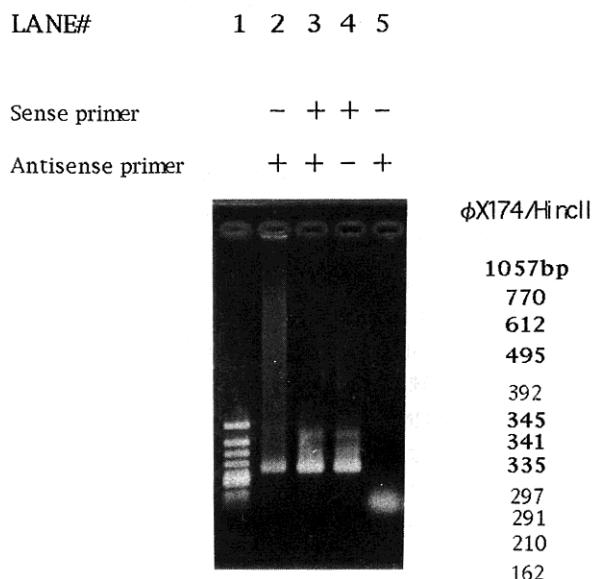


Fig. 2. RT-PCR products from aRNA of a bovine blastocyst using bActin primer(s). Before PCR, each 1/20 of total aRNA was reverse-transcribed by using both the bActin sense primer (for the synthesis of single strand cDNA of aRNA) and the bActin antisense primer (for the synthesis of single strand cDNA of mRNA) in lane 3, using the sense primer in lane 4, and using the antisense primer in lane 5. Lane 1 showed the ϕ X174-HincII marker. Lane 2 showed the RT-PCR product from the mRNA of bovine peripheral blood mononuclear cells.

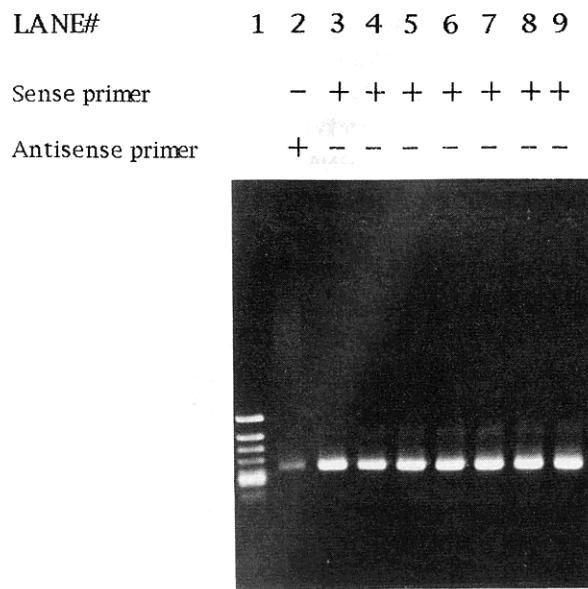


Fig. 3. Products from 1/20 of total antisense RNA (aRNA) followed reverse transcription with bActin sense primer and polymerase chain reaction (RT-PCR). Lanes 3–9 showed the products from aRNA of a 2-cells in lane 3, of a 4-cells in lane 4, of an 8-cells in lane 5, of a 16-cells in lane 6, of a 32-cells in lane 7, of a morulae in lane 8 and of a blastocyst in lane 9. Lane 1 shows the ϕ X174-HincII marker. Lane 2 shows the amplified product from mRNA of bovine peripheral blood mononuclear cells.

とが示唆された。ここでは aRNA-RT に用いた aRNA 量は 1/20 のみであるため明らかではないが、より多種類の mRNA を調べられる可能性も考えられる。

Collins ら [12] は、顕微操作により 32 ~ 64 細胞期胚より採取した割球に対して増幅サイクル数の多い RT-PCR 法を行い bActin の mRNA を検出した。同様に顕微操作により採取した 1 個の割球に対して aRNA-RT-PCR 法を行うことにより、複数の mRNA を検出できる可能性も考えられる。

移植胚の品質によって移植後の受胎率に大きな違いがあることが知られているが [13]、胚の品質がどのようなメカニズムにより移植後の受胎率に影響するかはあまり明らかではない。本報告では増幅産物量の比較を電気泳動像の観察だけにより行ったため、胚間の比較や発育段階別の精密な比較は困難であった。しかし mRNA-RT-PCR 法においても定量が可能になったように [14]、材料中に適切な比較用の poly(A)-RNA を添加することで本法においても定量が可能になり [15]、1 個の初期胚内の遺伝子発現量を調べることも可能と考えられる。そのため本法を定量的分析法に改良するための今後の研究が必要である。

1 個のウシ初期胚から合成した aRNA 液の 1/20 を用いて aRNA-RT-PCR 法を行った結果、全発育ステージの胚由

来の bActin の増幅産物が得られた。このことから、本法によって 1 個のウシ初期胚内の bActin と同程度以上の発現量であれば、少なくとも 20 種類の遺伝子発現を調べられることが明らかになった。この方法は、今後基礎研究や応用の場面において有用であると考えられる。

文 献

- Gaudette, M.F. and Crain, W.R. (1991): A simple method for quantifying specific mRNAs in a small numbers of early mouse embryos. *Nucl. Acids Res.*, 19, 1879–1884.
- Watson, A.J., Hpgan, A., Hahnel, A., Weimer, K.E. and Schultz, G.A. (1992): Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 31, 87–95.
- Gelder, R.N.V., Zastrow, M.E.V., Yool, A., Dement, W.C., Barchas, J.D. and Eberwine, J.H. (1990): Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1663–1667.
- Eberwine, J., Yeh, H., Miyashiro, K., Cao, Y., Nair, S., Finnell, R., Zettel, M. and Coleman, P. (1992): Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3010–3014.
- Rappolee, D.A., Brenner, C.A., Schultz, R., Mark, D. and Werb, Z. (1988): Developmental expression of PDGF, TGF-alpha, and TGF-beta genes in preimplantation mouse embryos. *Science*, 241, 1823–1825.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E., Eyestone, W.H. and First, N.L. (1986): Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology*, 25, 591–600.
- Brackett, B.G. and Oliphant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12, 260–274.
- Degen, J.L., Neubauer, M.G., Degen, S.J.F., Seyfried, C.E. and Morris, D.R. (1983): Regulation of protein synthesis in mitogen-activated bovine lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 258, 12153–12162.
- Itoh, T. and Kodama, M. (1996): Demonstration by reverse transcription-polymerase chain reaction of multiple cytokine mRNA expression in bovine alveolar macrophages and peripheral blood mononuclear cells. *Research in Veterinary Science*, 60, 94–96.
- Kwok, S. and Higuchi, R. (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339, 237–238.
- Sarkar, G. and Sommer, S.S. (1990): Shedding light on PCR contamination. *Nature*, 343, 27.
- Collins, M.E., Stevens, D.A., Jenner, L.J. and Brownlie, J. (1995): A rapid method for mRNA detection in single-cell biopsies from preimplantation-stage bovine embryos. *Theriogenology*, 43, 1227–1238.
- Christie, W.B. (1996): Embryo transfer in large domestic animals. In: *Veterinary reproduction and obstetrics* (Arthur, G.H., Noakes, D.E., Pearson, H. and Parkinson, T.J., eds.), pp.677–693, W. B. Saunders

- company Ltd., London.
- 14) Robinson, M.O. and Simon, M.I. (1991): Determining transcript number using the polymerase chain reaction: PgI-2, mP2, and PGK-2 transgene mRNA levels during spermatogenesis. *Nucl. Acids Res.*, 19, 1557–1562.
- 15) Vandenheuvel, J.P., Tyson, F.L. and Bell, D.A. (1993): Construction of recombinant RNA templates for use as internal standards in quantitative RT-PCR. *Biotechniques*, 14, 395–398.

Detection Method for Multiple Gene Expression in Single Early Bovine Embryo (Antisense RNA-RT-PCR)

Hiroya Kadokawa¹, Seizo Hamano², Ryuji Itoh³, Hitomi Takahashi⁴, Yutaka Yamada¹ and Takayoshi Kariya⁴

¹Hokkaido National Agricultural Experiment Station, Sapporo 062, ²Animal Bio-Technology Center, Livestock Improvement Association of Japan, Shinagawa-ku, Tokyo 140, ³Hokkaido-branch, National Institute of Animal Health, Sapporo 062 and

⁴National Institute of Animal Industry, Kukizaki-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 305, Japan

We examined whether we can detect multiple gene expression in single early bovine embryos by using antisense RNA (aRNA) and RT-PCR (aRNA-RT-PCR). Embryos, from the 2-cell stage to the blastocyst stage, were produced by the IVM-IVF method, cryopreserved and used as material for aRNA synthesis. Antisense RNA solution was yielded after reverse-transcription (RT) with a synthetic primer containing the T7 RNA polymerase binding site, double strand cDNA synthesis and transcription by the T7 RNA polymerase. For the reverse transcription of aRNA (aRNA-RT), we used a 5 µl of total

100 µl aRNA solution (1/20) and either sense primer or an antisense one encoding bovine beta-actin (bActin). After the aRNA-RT and PCR, the presence of the expected products was confirmed by electrophoresis. We confirmed the bActin products when the sense primer was used in aRNA-RT, but we did not confirm the products with the antisense one. These results indicate that we could detect multiple gene expression in a single early bovine embryo by means of aRNA-RT-PCR.

Key words: Bovine, Single early embryo, Antisense RNA, RT-PCR, Gene expression.