



Title	育種効率化を目指したウシ体外受精卵生産技術に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	加川, 真二郎
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第15226号
Issue Date	2022-12-26
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/87778">http://hdl.handle.net/2115/87778</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Kagawa_shinjiro_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 加川 真二郎

## 学位論文題名

### 育種効率化を目指したウシ体外受精卵生産技術に関する研究

#### 背景と目的

ウシの受精卵移植技術は、遺伝的能力の高い雌ウシから複数の受精卵を生産し、レシピエント牛に移植して産ませることで複数の後代を短期間に得ることを可能にする。したがって、遺伝的能力が高い雌ウシの遺伝資源である卵子の利用性を高めることができることから、生産現場において普及が進んでいる技術となっている。現在では、経腔採卵 (OPU) と体外受精 (IVF) 技術を用いた受精卵生産方式が主流となり、優れた遺伝的能力を持つ種雄牛の造成の場面においても活用されている。このように、繁殖技術は育種改良を推進する上で有効な手段であり、繁殖技術の改良は効率的な育種改良法の構想に繋がる。本研究では、育種改良効率化の可能性を広げるべく、3つの体外受精関連技術について研究を行った。

#### (1) ガラス化保存した未受精卵子を利用した子ウシ生産系の開発

特別な機材を使用せずに細胞の低温保存が可能なガラス化により保存した卵子は、新鮮卵子に比べて受精後の発生率が低いという問題がある。これは、ガラス化過程において引き起こされる透明帯の変性による精子侵入率の低下が原因であると考えられている。そこで本研究では、精子を直接注入する顕微授精 (ICSI) をガラス化 OPU 卵子に適用することで、個体発生可能な受精卵の作製を目指した。その結果、ガラス化 OPU 卵子を ICSI によって受精させた受精卵は、新鮮卵子を IVF により受精させたものに比べて胚盤胞期までの発生率が低下するものの、卵割、すなわち発生を開始した受精卵が胚盤胞期に発育する割合は、新鮮卵子と同等の発生率を示すことが明らかとなった。また、ガラス化 OPU 卵子を用いて ICSI により生産した受精卵の胚盤胞期における細胞分化関連遺伝子の発現を調べたところ、新鮮 IVF 受精卵と同様の発現様式を示すことが確認された。さらに、ガラス化 OPU 卵子を用いて ICSI により生産した受精卵をレシピエント牛に移植することにより、2頭の子ウシを誕生させることに初めて成功した。このことから、ガラス化した OPU 卵子を ICSI によって受精させることにより、個体発生可能な受精卵を作製できることが証明された。

#### (2) 妊娠認識を補助する栄養膜小胞の凍結融解後の生存性改善および子宮への移植後の動態

受精卵の受胎には、母体による妊娠認識が必要不可欠である。ウシでは受精卵の栄養膜細胞から産生されるインターフェロンタウ (IFNT) を始めとした妊娠認識機構が明らかにされている。このことから、移植胚の受胎を補助するために、栄養膜細胞を含む栄養膜小胞 (TVs) の共移植が効果的であると考えられてきた。TVs は、着床期の 14-17 日齢の伸長期から、将来胎子を形成するエピブラストを切除して、胎盤を形成する栄養膜部分を切り出して作製することができる。実際の胚移植の際には、TVs を凍結保存し用時調製することができれば利便性が飛躍的に高まる。しかし、これまでに凍結 TVs の作製条件は十分に検討されていない。そこで本研究では、TVs が多く得られる生産手段を確立することを目的として伸長胚の回収日について検討を行い、次いで凍結保存条件を探った。その結果、過剰排卵処理後の人工授精から 14 日後に回収することで、多くの TVs が作製できることが判明した。TVs の凍結保存条件として、栄養膜細切直後の小胞形成前に凍結処理を行うことにより、小胞を形成した後に凍結する従来の方法に比べて融解後の生存率が高くなることがわかった。さらに、TVs を移植した場合の子宮内における動態についても調べた。移植した凍結 TVs について 21 日齢伸長胚の栄養膜と比較したところ、組織学および細胞免疫学的手法による観察では、凍結 TVs は 21 日齢の伸長胚の栄養膜と同様の特徴を示してい

た。また、妊娠認識に重要な因子の一つである *IFNT* 遺伝子の mRNA 相対発現値は低かったものの、タンパク質は同等レベルで発現していることが明らかとなった。このことから、移植後の凍結 TVs は少なくとも 7 日程度までは子宮内で栄養膜細胞としての性質を維持したまま発育することが明らかとなった。

### (3) 遺伝的能力の判定精度を高める一卵性双子生産技術の開発

近年、ゲノム育種が普及して遺伝的改良の効率が飛躍的に向上しており、個体をと畜しなければ評価できない「と体形質」についても利用が進んでいる。しかし、評価値の信頼度は形質によって高低があり、複数形質の効率的改良という観点からゲノム育種は万能とはいえない。そこで、肉用牛の種雄牛造成において、一卵性双子による候補牛自身としての計測値に基づいた評価と、ゲノム育種値に基づいた評価とを組み合わせることで、より信頼性の高い遺伝的評価ができる可能性がある。具体的には、現時点でゲノム評価値の信頼度の低い脂肪交雑などの形質では候補牛の一卵性双子の表型値に基づいて評価し、ゲノム評価値の信頼度が高い枝肉重量などの形質のゲノム評価値と組み合わせることで総合的に判断することによって、より正確な遺伝的能力評価が下せるかもしれない。そのためには種雄牛候補となる雄の一卵性双子を作出することが求められるが、体外受精技術を活用して性別を判別した上で安定的に双子を作出する方法は確立されていない。そこで本研究では、性別を判別した上で一卵性双子胚を用意し、個体までの発生能力を確かめることを目的とした。受精から 4 日および 5 日目の 16-32 細胞期の受精卵について、割球を一旦分散させた後に、性別判別に 2 割球を採取し、残りの割球を 2 つの受精卵に再構成するという手法で受精卵の生産を試みた。その結果、それぞれ 40.0%、58.8% の割合で双子となる胚盤胞が得られ、また雄胚を確実に判定することができた。さらに、5 日目の分離によって発生した胚盤胞期胚の免疫蛍光染色観察からは、将来胎盤を形成する TE 細胞においては *CDX2* が、将来胎子部分を形成する ICM 細胞においては *SOX2* がそれぞれ優先的に発現していることが確認され、これらは通常の受精卵と同様であったことから、再構成した後でも細胞分化が正常に起こっていると推察された。最後に、5 日目で分離した受精卵についてレシピエント牛に移植したところ、2 組の一卵性双子を含む 6 頭の子ウシ生産例が得られた。以上の結果から、性別を判別を行った一卵性双子胚から個体を生産することが可能であることが初めて示され、種雄牛造成を目的とした繁殖技術として利用できることが示された。

### 結論

これまで、家畜繁殖技術の発展は育種改良に貢献してきた。近年、ウシにおいて、OPU-IVF 技術が発展してきたことに伴い、遺伝的能力の高い雌ウシから卵子を採取し、種雄牛造成に活用することが可能となってきている。本研究では、OPU-IVF 技術を基盤として、より効率的な育種改良法の可能性を広げるべく、繁殖技術の改良について多角的に取り組んだ。その結果、OPU により採取しガラス化保存した未受精卵子を利用して ICSI を行うことで個体生産が可能であることを示した。また、妊娠認識を補助することが期待される TVs の凍結保存方法を改善し、移植後には子宮内で一定期間発育することも確認した。さらに、体外受精を利用して、性別を判別した上で一卵性双子を効率的に生産できる技術の開発にも成功した。これらの技術を駆使することによって、ウシの改良増殖に大きく貢献するものと期待される。