



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 [全文の要約]
Author(s)	加川, 真二郎
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15226号
Issue Date	2022-12-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87780
Type	doctoral thesis
File Information	Kagawa_Shinjiro_summary.pdf



学位論文内容の要約

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

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、受胎牛（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効率よく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に繋がる。また近年では、生体雌ウシの卵巣から未受精卵子を採取する経膈採卵（OPU）と、これに体外受精（IVF）による受精卵生産を組み合わせた体外受精卵生産方式が効率的な受精卵生産技術として普及が進み、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。繁殖技術は雌雄両面からの育種改良を推進する上で有効な手段であることから、本研究では雌雄両面からの育種改良効率化の可能性を広げるべく、3つの体外受精卵生産技術に関する研究を行った。

(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

【目的】

OPU 技術によって特定の雌ウシから繰り返し卵子を採取することが可能となる。採取した卵子の低温保存が可能になれば、雌ウシの遺伝資源を効率的に利用することができる。ガラス化保存法は特別な機材を使用せずに細胞の低温保存が可能であるため汎用性が高く、また加温後の生存性も高いため卵子の保存方法として適している。しかし、ガラス化保存卵子は新鮮卵子に比べると受精後の発生率が低いという問題がある。これは、卵子の周囲を覆う糖タンパク質からなる構造物である透明帯が、ガラス化処理の過程において変性し、精子侵入率が低下してしまうことが主な原因であると推測されている。そこで本研究では、精子を卵子細胞質内に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受精卵の作製を試みた。これまでに、ガラス化したウシ OPU 卵子に対して ICSI を行って作製した受精卵が個体まで発生するかどうかは検証されていない。このこと

から、本手法によって作製した受精卵の胚盤胞期における分化正常性を確認し、さらにレシピエント牛に移植することによって個体発生能力について確認を行った。

【材料と方法】

黒毛和種経産牛から OPU によって採取した卵子を成熟培養し、ガラス化保存に供した。卵子を加温後、ICSI を実施し、胚盤胞までの体外発生成績を調べた。また、定量 PCR 法による胚盤胞における細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現解析、およびレシピエント牛への移植による個体発生能力の確認を行った。

【結果と考察】

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 により受精させた受精卵に比べ、卵割率は低下するものの、卵割胚あたりの胚盤胞までの発生率が新鮮卵子と同等であることが明らかとなった。また、本手法により生産した胚盤胞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。これにより、胚盤胞における細胞分化は正常であると推察された。さらに、本手法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、本手法によって個体発生可能な受精卵を作製できることが証明された。本研究での受精卵作製条件では ICSI 後の卵割率が低かったことから、今後 ICSI の成功率を向上させる必要がある。ウシは他の動物種と比較して ICSI 後の発生率が低いといわれている。よって、ウシの受精機構の特性を明らかにした上でウシに適合した ICSI 技術を開発することにより、ガラス化 OPU 卵子を用いた個体生産効率を向上させていくことができると考えられた。

(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

【目的】

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。ウシを含む反芻動物では、受精卵の栄養膜細胞から産生されるインターフェロントウ (IFNT) が妊娠認識に重要であること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、栄養膜細胞からなる栄養膜小胞 (TVs) の共移植により IFNT 等の妊娠認識に関わる因子を補完することが効果的であると考えられてきた。TVs は、着床期の 14-17 日齢の伸長期胚から将来

胎子を形成するエピブラストを切除した後、胎盤を形成する栄養膜部分を分取することで作製する。この TVs を実際の胚移植に供する際には、凍結保存しておき用時調製することで利便性を飛躍的に高めることができると考えられる。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、受精卵移植による個体生産効率を向上させるべく TVs の効率的な生産手段を確立することを目的として、最適な伸長胚の回収日および凍結保存条件について調べた。さらに、凍結 TVs をレシピエント牛の子宮へ移植した後、移植された TVs の主要妊娠認識物質である IFNT の産生能について調べた。

【材料と方法】

黒毛和種経産牛に過剰排卵処理を行い、人工授精から 14、15 および 17 日に伸長胚を回収し、各回収日での TVs 作製効率について比較した。また、TVs の凍結保存を行うのに適した条件を検討した。凍結融解した TVs をレシピエント牛に移植し、その 7 日後に子宮灌流することで移植後の TVs を回収した。回収した TVs について、組織学的観察、細胞分化関連遺伝子の免疫染色による観察、および妊娠認識物質 IFNT の発現解析を実施し、対照として受精後日数が相当する 21 日齢の伸長胚を用いて比較解析を行った。

【結果と考察】

TVs 作製の材料となる伸長胚は、過剰排卵処理後の人工授精から 14 日目に回収することで、多くの TVs が作製できることが判明した。伸長胚栄養膜を細切して小胞の形成前後で凍結処理を行って比較したところ、従来の小胞形成後に凍結する方法に比べて小胞形成前に凍結した場合、融解後の小胞の生存率が高くなることが明らかとなった。これは、小胞が閉じていない状態で凍結処理を行ったことにより、内側の細胞を含む栄養膜全体に耐凍剤を平衡させることができたためであると推察された。さらに、子宮に移植し 7 日後に回収した凍結 TVs は、組織学および細胞免疫学的手法により 21 日齢の伸長胚栄養膜と比べたところ、差異は認められなかった。また、妊娠認識に重要な因子の一つである IFNT タンパク質も、対照の伸長胚と同等に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。以上より本研究では、TVs 生産のために適した胚の発生時期の決定および凍結保存法を確立することができた。

(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

【目的】

近年、ゲノム DNA の一塩基多型を網羅的に解析し遺伝的能力を推定するゲノム育種が普及し、遺伝的改良の効率が飛躍的に向上している。これにより、と畜後にのみ評価可能な「と体形質」についても、と畜前に評価することが可能となってきた。しかし、ゲノム評価による評価値の信頼度は形質によって差異があり、正確な評価が困難な形質もあることが問題となっている。そこで肉用牛の種雄牛造成において、ゲノム育種価に基づいた評価に加えて、一卵性双子を活用した産肉形質の計測値に基づいた評価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、ゲノム評価値の信頼度が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、その一方でゲノム評価値の信頼度が高い枝肉重量などの形質ではゲノム評価値に基づいて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を下すことが可能となる。この能力評価方法を実現するためには、種雄牛候補となる雄の一卵性双子を安定的に作出することが求められるが、性判別をした上で IVF 胚から双子を作出した事例はこれまで報告されていない。そこで本研究では、性判別を実施した上で一卵性双子胚を用意し、それらの個体までの発生能力を確かめることを目的とした。

【材料と方法】

OPU により採取した卵子を体外成熟および IVF に供することにより受精卵を生産した。その後、受精から 4 日および 5 日目の、ある程度卵割が進んだ胚盤胞期以前の胚の割球を分散させた後、2 つの割球を性判別用として採取し、残りの割球群を 2 つに分けて再凝集させることで一卵性双子となる受精卵を作製することを試みた。作製した再構成胚について、免疫染色法により分化の正常性を確認するとともに、レシピエント牛に移植することによって個体発生能力について確認を行った。

【結果と考察】

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分離、再構成した結果、それぞれ 40.0%、58.8% の割合で双子となる胚盤胞が得られた。また、採取した細胞サンプルを用いた性判別により雄胚を確実に判定することができた。免疫染色法による観察から、5 日目の分離で得られた再構成胚の細胞分化状態には、対照となる分離操作を行っていない胚と比べて差異は認められなかった。さらに、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 7 頭の子ウシを生産することに成功

した。培養 5 日目の受精卵の割球は割球同士が緊密に接着するコンパクションを起こしており、胚盤胞期における細胞分化に向けての準備が起こっている時期であると考えられる。本研究により再構成胚から正常な産子が得られたことから、この時期の割球は細胞分化が確立しておらず、再構成により正常な個体発生を遂行できる状態であると推察された。誕生した子ウシについては妊娠期間、生時体重は黒毛和種の正常な範囲内であり、性別も受精卵時点で判定した通りであったことから、IVF 技術を用いて性別まで行った一卵性双子を生産することが可能であることが初めて示された。

総合考察

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 により採取した未受精卵子をガラス化保存に供し、そのガラス化 OPU 卵子を ICSI により受精させることで受精卵を構築し個体生産が可能であることを示した。これにより、遺伝的能力に優れた雌ウシからの産子を増産可能であることが示された。また、妊娠認識を補助する TVs の生産および凍結保存方法を改善し、移植後には子宮内で妊娠認識物質の産生能を保持したまま、形態的にも体内発育胚と同様に発育することが確認された。さらに、IVF を利用して、性別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。これらの技術の融合によって、OPU により遺伝的能力の高い雌ウシから卵子を最大限に確保する一方で、割球分離によって雄一卵性双子の受精卵生産し、さらに凍結 TVs と共移植を行うことで、種雄牛候補となる雄双子を高効率に生産できる技術体系が構築される。したがって本研究の成果は、雌雄両面からの育種改良効率を向上させる体外受精卵生産技術として、肉用牛の遺伝的改良に寄与するものであると期待される。

結論

本研究では、雌側からの改良を促すという観点で、遺伝的能力に優れた雌ウシ卵子の低温保存による遺伝資源の有効活用を可能とさせた。また、雄側からの改良を効率化すべく、種雄牛造成のための双子胚生産法を確立した。したがって、本研究で開発した新方式の体外受精卵生産技術は、肉用牛の育種改良効率化に資するものであると結論付けることができる。