

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06370

研究課題名(和文) 不凍タンパク質を利用した低温牛胚保存法による牛胚移植の高度化

研究課題名(英文) Advancement of cryopreserved bovine embryo transfer using anti-freeze protein

研究代表者

阪谷 美樹 (Sakatani, Miki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・グループ長

研究者番号：00355687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では低温保存においても受胎率が低下せず、過大子などの問題が生じにくい無血清の培養及び凍結培地を用いた牛体外受精胚保存法を検討した。耐凍性を高めるIII型不凍タンパク質(AFP III) 1.0 ug/mLで1時間前処理し、AFP III 1.0 ug/mLの凍結液で緩慢凍結を行った牛体外受精胚は融解後の生存性に優れ、ストレスタンパク質の発現が有意に抑制されたことから、AFP IIIの添加が体外受精胚の耐凍性を高めることが示唆された。また移植試験結果でも対照区より高い受胎率が得られ、無血清凍結液でのAFP III 1.0 ug/mLの添加は耐凍性を高め受胎率を担保できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの胚を安価に生産できる体外受精凍結保存胚を利用することが増加する牛胚移植の需要を満たす。一方で凍結保存胚は受胎率が低くその改善が長く望まれている。本研究成果は一般の食品にも使われる不凍タンパク質を活用し、血清を含まない培養・凍結液を用いて融解後の生存性や移植成績もよい胚保存法を提示したことで、生産コストを抑えた効率的な牛生産に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study investigated a method for cryopreservation of bovine in vitro produced (IVP) embryo using serum-free culture and freezing medium that does not reduce fertility and does not cause problem such as large offspring syndrome. To improve the cryodamage, we used Type III anti-freeze protein (AFP III). IVP blastocysts were cultured for 1 h with AFP III 1.0 ug/mL, and then cryopreserved with cryopreservation medium including 1.0 ug/mL AFP III. After thawing, the blastocysts frozen with AFP III showed the higher viability and their stress gene (HSPA1) expression was suppressed. It was suggested that the supplementation of AFP III enhanced the cryotolerance of IVP embryos. The results of embryo transfer also showed a higher conception rate than the control, indicating that the AFP III supplementation in serum-free freezing solution may increase cryotolerance and guarantee conception rate.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：牛 体外受精 凍結保存 耐凍性 受胎率 不凍タンパク質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

育種の加速化のためにゲノム育種の手法が家畜でも使われるようになってきている。農家レベルでも保有牛のゲノム解析を行い、優良形質を持つ個体から生体由来胚や生体内卵子吸引 (OPU) ~ 体外受精 (IVF) 胚を作成し移植する農家内のゲノム育種・後継牛生産も乳用牛を中心に積極的に行われている。日本で好まれる新鮮胚移植では発情同期化を行った受胎牛を用意する必要がある。また、乳用牛では夏季の卵子品質、採胚成績が低下することが報告されており夏季に新鮮胚移植を実施することは困難である場合が多く、凍結保存胚の利用が推奨される。

これまで応募者らは、緩慢凍結胚は新鮮胚と比較し、胚のストレス遺伝子の発現が増加すること、凍結融解後の胚を高温に 6 時間曝すことで胚の生存性が低下することを示している。すなわち、胚移植による後継牛増産を効率的に行うためには、夏季にも受胎性の高い凍結保存胚の作製技術が必要となってくる。一般的な保存法はいずれも液体窒素を用いた超低温保存であり、輸送には液体窒素タンク内での保管が必須となる。しかしながら、最近宅配業者において安全面の観点から液体窒素タンクの輸送が中止される事例が多くなってきており、胚流通の点から問題が生じている。

北極海や南極海など寒冷地に生息する魚類では AFP の存在が知られている。AFP には複数の型が存在するが、いずれも水分子に接着することで氷晶形成を抑制し、氷晶形成による細胞ダメージを抑制することが知られている。AFP を添加して凍結した細胞では保存後の細胞障害が抑制されることも明らかとなっている。加えて、AFP は従来凍結に使われてきたエチレングリコール (EG) などの耐凍剤と比較し毒性が低く、食品等の冷凍技術にも応用されている。つまり AFP は胚の耐凍性の点からも毒性の点からも利用価値が高いと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では効率的な後継牛生産を実現するため、生存性が高く受胎が期待される凍結保存法を開発することを目的とする。凍結時の氷晶形成を抑制し、耐凍性を高める効果が知られている魚類由来 III 型不凍タンパク質 (antifreeze protein: AFP) を用いて従来の液体窒素保存 (-196) と -20 ~ -30 の低温で保存する方法を比較し、低温で保存が可能か検討する。その手法として AFP を利用し細胞毒性の存在する従来の耐凍剤の使用量を減らすことで胚の生存性を高め、さらに液体窒素を用いない簡易な保存で受胎・分娩個体が得られるかを検討する。受胎率の低下により後継牛確保に問題となっている乳用種や夏季の交配への適応可能性を明らかにし、畜産・酪農現場における効率的な後継牛生産技術の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 1) AFP III 濃度と凍結融解後生存性の評価

食肉処理場由来黒毛和種卵巣から卵子を採取し、常法による成熟培養、体外受精後、血清不含の SOF-BE1 培養液にて 38.5 5% O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub> にて発生培養を行った。培養 7 日目の胚盤胞を III 型 AFP (AFP III) 0 (対照: control), 0.1 0.5, 1.0, 5.0 µg/mL を添加した SOF-BE1 にて 38.5 5% O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub> の条件で 1 h 前培養し、AFP III を胚内に取り込ませた。さらに血清不含の凍結液 (修正 PBS に 5% エチレングリコール, 6% プロピレングリコール, 0.1 M スクロース, 4 mg/mL BSA を添加) に AFP III を 0, 0.1 0.5, 1.0, 5.0 µg/mL 添加し、緩慢凍結法で凍結を行った。凍結後の胚は -196 (液体窒素) で約 1 週間保存した。-30 保存検討区では、LN2 保存と同じ濃度での生存胚が認められなかったため、AFP III 濃度を高く 0 (対称: control), 10, 50, 100 µg/mL に設定し、同様の前処理及び緩慢凍結処理を行い、1~3 日間 -30 にて保存した。

凍結保存後の胚を空气中で 10 sec、30 の温湯で 10 sec 融解、洗浄後、20% FBS, 20 µM bME 加 m199 38.5 5% O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub> 回復培養を行った。培養後 24 時間の生存率、拡張胚盤胞率、脱出胚盤胞率を評価し、ANOVA によって統計比較を行った。

#### 2) AFP III 添加凍結保存胚品質の評価

1) の試験で、最も効果が高かった AFP III 1.0 µg/mL 添加、-196 保存区を対象に凍結融解後の胚品質を評価する目的で、遺伝子発現評価を行った。1) の方法で凍結、融解した 24 時間後の生存胚盤胞を 1 区 6~7 個採取し、mRNA を抽出、cDNA 合成後、qRT-PCR 法にてストレス遺伝子 (*HSPA1*), 胚特異的因子 (*POU5F1*, *NANOG*, *CDX2*, *IFNT*), アポトーシス関連遺伝子 (*CASPASE3*) の発現を検討した。解析は ΔΔCT 法で行い、Student t-test にて統計比較を行った。

#### 3) AFP III 添加凍結保存胚の移植成績の検討

AFP III 1.0 µg/mL にて -196 保存した胚 (AFP 区) 通常の凍結を行った対照区の胚を移植試験に供した。受胎牛は黒毛和種経産牛を用い、発情同期化処理を行った。発情周期が正常である受胎牛に 2 mg のエストラジオール製剤投与とプロジェステロン製剤 (CIDR) 挿入を同時に行い、11 日間留置後に CIDR を抜去し、プロスタグランジン製剤を投与した。その翌日に 2 mg のエ

ストラジオール製剤投与し発情を誘起し、発情発現後の 7 日目に開花期黄体の確認を行って移植実施した。

凍結保存胚は空气中に 10sec 35 の温湯にて 15 sec 融解後、速やかに深部移植器（モ 5 号）に移し、黄体測に移植を行った。発情後 30 日に超音波診断装置にて受胎の確認（黄体の存在、胎子の心拍）を行った。受胎個体は、プロスタグランジン製剤を投与し人口流産処置を行った。子の流産と卵巣、子宮機能の回復を確認した 2 か月後を目途に再度移植を実施した。

対照区、AFP 区の各胚の移植を 2x2 のラテン方格法で行い、受胎率を Fisher の正確性テストにて比較した。

#### 4. 研究成果

##### 1) AFP III 濃度と凍結融解後生存性の評価

R2-R3 年度は食肉処理場由来卵巣から血清不含体外培養（IVP）した牛胚盤胞を AFP III 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  にて 1 h 前処理後、同様の濃度の AFP III を含有する血清不含の凍結液にて緩慢凍結を行った。凍結後、-30 もしくは -196 にて 1 週間以上保管後に融解し 24 時間後の胚盤胞の生存率、拡張率、脱出率を判定した。-196 保存では AFP III 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加区で融解後の生存率が対照区より高い傾向を示し、拡張率、脱出率も安定した結果が得られた（表 1、図 1）。一方、30 保存では融解 24 時間後の生存率が AFP III 10, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加区で高くなる傾向が認められたもののその生存率は低く、拡張胚盤胞、脱出胚盤胞が全く観察されなかったことから（表 2）-30 保存における AFP III の添加効果は限定的であった。そのため、以後の試験は AFP III 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加、-196 保存の胚を用いて実施した。

表 1 -196°C 保存胚、融解後 24 時間の生存率

	The percentage of blastocysts				Replicates (n)
	Survival	Expand	Hatching Hatched		
control	63.3 $\pm$ 12.0	16.0 $\pm$ 6.3	27.2 $\pm$ 8.6		7 (43)
AFP III 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	78.9 $\pm$ 10.8	33.6 $\pm$ 9.9	26.9 $\pm$ 10.4		5 (28)
AFP III 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	79.1 $\pm$ 6.0	18.0 $\pm$ 9.1	33.7 $\pm$ 9.7		5 (29)
<b>AFP III 1.0 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>80.4 <math>\pm</math> 7.3 †</b>	<b>28.6 <math>\pm</math> 8.1</b>	<b>30.1 <math>\pm</math> 13.7</b>		7 (46)
AFP III 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	86.9 $\pm$ 7.2	24.3 $\pm$ 13.0	27.8 $\pm$ 14.7		3 (24)

Is mean  $\pm$  SE. †  $P < 0.1$  vs control

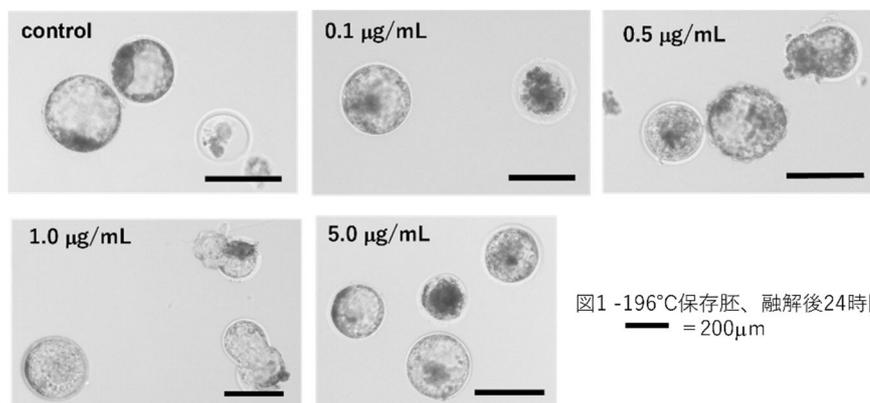


図 1 -196°C 保存胚、融解後 24 時間  
= 200  $\mu\text{m}$

表 2 -30°C 保存胚、融解後 24 時間の生存率

	The percentage of blastocysts				Replicates (n)
	Survival	Expand	Hatching Hatched		
control	16.1 $\pm$ 5.5	0	0		8 (63)
AFP III 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	33.4 $\pm$ 8.2 †	0	0		6 (43)
AFP III 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	41.3 $\pm$ 20.8 †	0	0		3 (20)
AFP III 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9.5 $\pm$ 9.5	0	0		3 (34)

Is mean  $\pm$  SE. †  $P < 0.1$  vs control

## 2) AFP III 添加凍結保存胚の移植成績の検討

AFP III 添加 (AFP 区) で凍結保存し、融解 24 時間後の生存胚における遺伝子発現 (*HSPA1A*, *POU5F1*, *NANOG*, *CDX2*, *IFNT*, *CASPASE3*) を AFP 未添加の対照区と qRT-PCR にて比較した。ストレスマーカー *HSPA1A* の発現は AFP 区で対照区と比較し有意に低く、栄養外胚葉マーカー *CDX2* の発現は AFP 区で有意に高かったが、内部細胞塊マーカーやアポトーシスマーカーに差は認められなかった (図 2)。 *HSPA1A* の結果から AFP 添加区で凍結による障害が軽減される可能性が示唆された。また、*CDX2* の発現差は胚の外側に位置する栄養外胚葉が対照区では凍結によって障害されているものが、AFP の添加によって軽減されている可能性を示唆している。

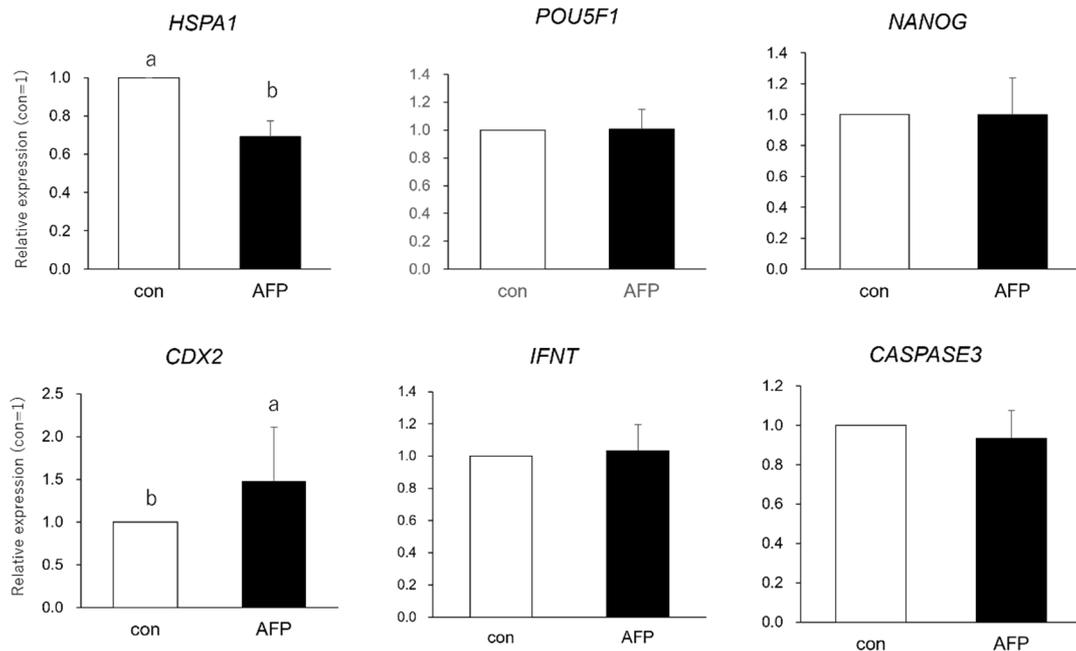


図 2 -196 保存胚、融解後 24 時間後の遺伝子発現

qRT-PCR による相対発現量 (con: 対称区 = 1.0) にて表示 (LS mean  $\pm$  SE), AFP = AFP III 1.0  $\mu$ g/mL 添加区。反復数は 5、対照区 (n=39)、AFP (n=38)、異符号間 (a-b) に有意差あり (P < 0.05)。

## 3) AFP III 添加凍結保存胚の移植成績の検討

AFP III 1.0  $\mu$ g/mL 区と対照区の凍結胚を融解後各 7 頭の黒毛和種に移植した。両区とも受胎個体が得られたが、有意差はないものの AFP 区で対照区より高い受胎率 (28. % (2/7) vs 14.3% (1/7)) が得られた。この結果は、AFP 添加は凍結保存した胚の受胎性への悪影響がないことを示唆している。さらに対称区よりも高い受胎率を示したことから、AFP 区を用いた胚の凍結保存は融解度の生存性及び受胎性改善に寄与する可能性が示唆された。

以上の結果より、不凍タンパク質 AFP III の牛体外受精胚凍結保存液への添加によって胚の凍結障害が軽減されること、受胎性に添加による悪影響は認められず、対称区と比較し受胎性を改善する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 阪谷 美樹	4. 巻 3(3)
2. 論文標題 暑熱環境での胚移植による受胎性改善の可能性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本胚移植学雑誌	6. 最初と最後の頁 127-131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阪谷 美樹
2. 発表標題 胚移植による暑熱ストレス下の受胎率改善の可能性
3. 学会等名 第5回日本胚移植技術研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Miki Sakatani, Masafumi Miwa, Kaiyu Kubota
2. 発表標題 The effect of the supplementation of type III anti-freeze protein on cryotolerance of bovine in vitro-produced blastocysts
3. 学会等名 50th International Embryo Technology Society Annual Conference（国際学会）
4. 発表年 2023年～2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------