

令和 4 年 6 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：2019～2021

課題番号：19K06362

研究課題名(和文) DNAメチル化可変部位を指標としたウシ精子・受精卵の受胎性評価システムの構築

研究課題名(英文) Evaluation of bull fertility for bovine spermatozoa and embryos using differentially methylated CpG sites as biomarkers

研究代表者

武田 久美子 (Takeda, Kumiko)

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・上級研究員

研究者番号：60414695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ人工授精において受胎性の低い精液の早期発見は喫緊の課題である。本研究では、雄牛の受胎性に関連して変動する精子DNAメチル化可変領域(DMR)を抽出し、新たな受胎性評価システムの構築を目指すことが目的である。人工授精後受胎率の明らかな黒毛和種雄牛の凍結精液から抽出した精子DNAを用いて、DNAメチル化網羅的解析データより受胎性に関連してメチル化率が変動するDMRを抽出した。さらに簡易検出系へ展開可能な10箇所のDMRを選定し、多数の凍結精液や体外受精胚レベルでのDNAメチル化動態を可能にした。これらDMRのメチル化率は雄牛の受胎性評価の指標として利用価値があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

凍結精液を用いた牛の人工授精後の受胎率低下が世界的に問題となっている。雄側の問題として遺伝的評価は高くても受胎性が低い雄牛の存在が問題となっており、通常の精液検査で発見できない受胎性の低い精液を発見する新たな精液評価技術の開発が求められている。本研究は精子DNAメチル化率が黒毛和種雄牛の人工授精後の受胎性に関連するメチル化可変領域を抽出し、それらが雄牛の受胎性評価のバイオマーカーの一つとして有効であることを示した。早期に受胎性の担保された雄牛を選定することが可能になれば、種雄牛造成において大きな経済的損失が削減される他、雄側からの受胎率低下への対処が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Early detection of bulls with low conception rate after artificial insemination is an urgent issue. The purpose of this study was to find new biomarkers that predict bull fertility by the detection of differentially methylated regions (DMRs) where the methylation levels were related to sire conception rate (SCR). Frozen-thawed semen samples were collected from Japanese Black bulls with recorded SCR, and the DMRs were detected using methylation comprehensive analysis data. Then, for 10 DMRs that could be deployed to a simple detection system fertility-related methylation changes were confirmed by COBRA. Using the system, the methylation levels of frozen-thawed semen samples and in vitro fertilized embryos were clarified. Furthermore, it was concluded that the methylation levels of these 10 DMRs were useful as new biomarkers for predicting SCR.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ウシ 精子 DNAメチル化 受胎性評価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウシ精液の品質は、精子活力や生存率、精子濃度など精液性状に基づいて評価されることが多いが、精液性状の評価が良好でも人工授精に使用してみると受胎性の低い精液が存在している。ヒトでは不妊症の要因として、精子 DNA の損傷や精子クロマチン構造の不安定な状態が認められており、検査手順も確立している。しかし、我々が人工授精後の受胎率と精子核 DNA ダメージ率との関連性を調べたところ、直接的な低受胎の要因ではなかった (Takeda et al., J Reprod Dev, 2015)。そこで次に要因として考えられたのは、遺伝子発現制御 (エピジェネティクス) の異常であった。ヒトでは男性不妊患者におけるインプリント遺伝子のメチル化異常 (Rajender et al., Mutat Res, 2011; Dada et al., J Assist Reprod Genet, 2012) 加齢に伴った精子核 DNA メチル化可変領域 (differentially methylated regions; DMRs) が多数判明し、老化による不妊症等への影響が示唆されていた (Jenkins et al., PLoS Genet, 2014)。ウシでも同様にメチル化異常が低受胎の要因や評価の指標となりうると考えられた。我々はこれまで受胎性に関連する精子核 DNA メチル化変化を探索していく過程において加齢変化を示す DMRs を多く発見してきた (Takeda et al., J Reprod Dev, 2019)。このことはウシ個体や個々の精子の成熟度がメチル化に反映されている可能性を示し、精子形成過程で起こりうる不完全さを DNA メチル化の相違として検出できる可能性を示していた。

2. 研究の目的

人工授精後の受胎率が 1 割に満たない凍結精液を早期発見できないか。我々は受胎性の低い精液を生産する雄牛を早期発見するため、ウシでの利用着手がまだあまり進んでいなかった精子 DNA メチル化の網羅的解析により、雄牛の人工受精後の受胎率 (sire conception rate, SCR) に関連した DNA メチル化部位を抽出し、それらをバイオマーカーとして利用した受胎性の低い精液を生産する雄牛を早期発見する手法の開発をすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 網羅的メチル化情報から SCR に関連する CpG 部位の抽出

協力機関で製造した黒毛和種雄牛 (14 頭) の凍結精液 (17 ロット) から DNA 抽出キット (キアゲン社) を用いて DTT 処理を施した手順により DNA を抽出し、ヒト用メチル化マイクロアレイ (入ルミナ社, Infinium MethylationEPIC BeadChip, EPIC) に搭載されている各 CpG 部位のメチル化率を評価した。受胎性に関連する CpG 部位抽出のため、受胎率が 50% 以上 (HF, n=7) と 40% 未満 (LF, n=6) に分けたグループ間での比較解析からメチル化率に有意に差のある部位、受胎率との回帰分析によりメチル化率が有意に相関のある部位を抽出した。メチル化率に有意な差のあった CpG 部位を用いて ward 法によるクラスター分析を行い、受胎率の高低のグループに分類が可能か検討した。さらに、全ゲノムバイサルファイトシークエンス (WGBS, n=3) 解析を行い、EPIC で抽出したターゲット CpG 部位を含む周辺領域 (4kb) について DMR かどうかを検討した。

(2) SCR に関連する DMRs のメチル化率簡易検出系の構築

簡易検出系構築のため、バイサルファイト処理した精子 DNA を鋳型とした PCR および制限酵素処理による検出法 (combined bisulfite restriction analysis, COBRA 法) でのメチル化率検出が可能な DMRs を選定した。まず、BLAST 検索によりウシゲノム情報 (ARS-UCD1.2) へ変換し、CpG 部位が制限酵素部位であるものを抽出、さらにウシゲノム配列を元にターゲット CpG 部位を含む PCR プライマーを設計した。SCR 情報を付帯した精子 DNA サンプル (雄牛 28 頭、50 ロット) について COBRA 解析を行い、SCR と有意に関連してメチル化率が変動する DMR を選定した。

(3) 体外受精前後における DNA メチル化の動態

(2) で構築した簡易検出系を用いて体外受精に用いる精子、成熟卵子、体外受精後の胚における DMR のメチル化動態を調査した。(2) で選定した 10 箇所のうち、6 箇所について精子、成熟卵子、体外受精後の胚における DMR のメチル化率を調べた。体外受精前の卵子については約 70 個のプールしたのから、胚盤胞期胚については 1 個づつからバイサルファイト処理した DNA を抽出し、解析に用いた。また、体外受精に用いた精子を SCR の高低グループに分け、それぞれの雄牛由来精子の体外受精により得られた胚盤胞期胚の DMR のメチル化率のグループ間比較を行った。1 箇所の DMR (F1) については体外受精後 2 細胞期、4 ~ 8 細胞期は複数個プールしたのものについても解析に用いた。

4. 研究成果

(1) 網羅的メチル化情報から SCR に関連する CpG 部位の抽出

EPIC の結果からグループ間で有意な差が認められ ($P < 0.01$) かつメチル化率に 0.1 以上差がある CpG 部位が 249 箇所検出された。

EPIC の結果を用いた受胎率に対する回帰分析の結果、CpG 部位のメチル化率と受胎率との有意な相関が認められ ($P < 0.01$) かつメチル化率に 0.3 以上の差のある CpG 部位が 143 箇所抽出された。クラスター分析を行ったところ、まず LF グループの一部が分岐し、さらに LF と HF グループが分岐する 3 つのクラスターが構成された (図 1)。例外として、LF グループのうち 1 頭は HF のクラスターに分けられた。WGBS の結果から抽出した CpG 部位の周辺領域が DMR であることを確認することができた (図 2 A)。

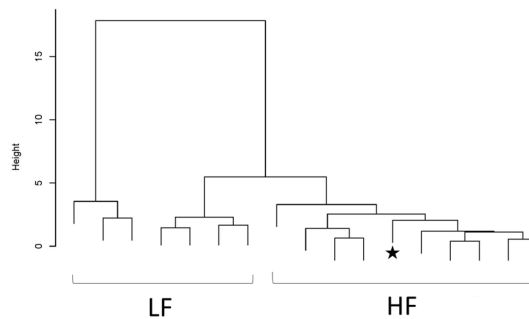


図 1 143 箇所の DNA メチル化率によるクラスター分析

(2) SCR に関連する DMR s のメチル化率簡易検出系の構築

(1) で選定した CpG 部位を含む領域のウシゲノム配列から設計した PCR プライマーにより増幅可能なもの、次に制限酵素処理可能なものを選定し (図 2 B)、COBORA 法により DNA メチル化率を簡易測定した。その後、LF グループと HF グループとでメチル化率に有意差があり (図 2 C)、SCR と有意に関連してメチル化率が変動する DMR (図 2 D) を 10 箇所特定した。

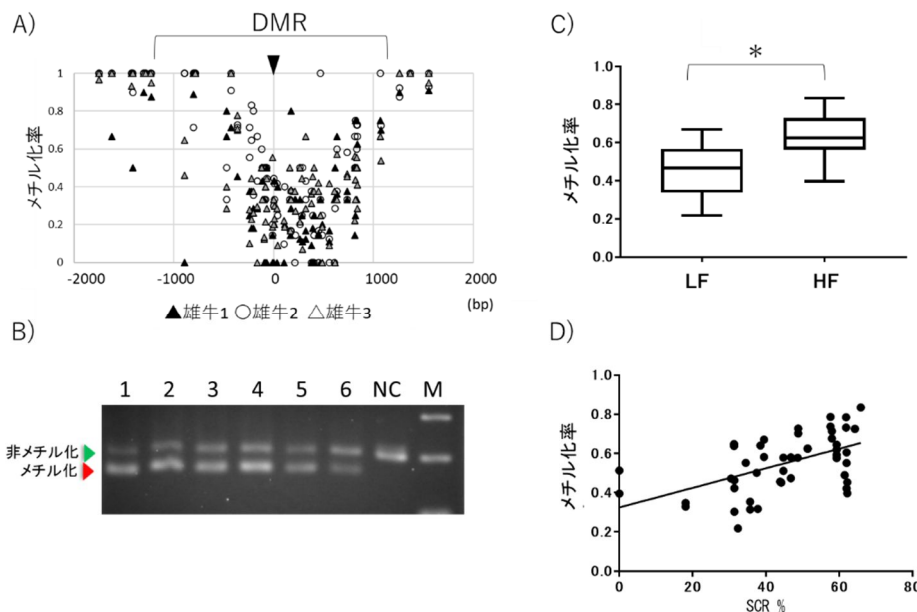


図 2 雄牛の人工授精後受胎率 (SCR) に関連してメチル化率が変動する DNA メチル化可変領域 (DMR) の一例 (F1)。A) メチル化アレイにより抽出された DNA メチル化部位 () 周辺 4kb についてバイサルファイトシーケンスデータによる DMR の検出。B) 精子 DNA (1-6) を COBORA 法による制限酵素処理した PCR 産物の電気泳動像。メチル化された部位は制限酵素により切断される。NC; 制限酵素処理前、M; サイズマーカー。C) メチル化率と SCR の相関 ($r=0.62$)。関連性が有意 ($P < 0.01$)。D) SCR の高い (50% 以上, HF) 低い (40% 未満, LF) グループ間でメチル化率に有意差あり ($P < 0.01$)。

10 箇所の DMR のメチル化率から回帰式により SCR の予測値を算出すると、実測値との相関係数は高かった ($r=0.71$)。また、寄与度の高い 3 箇所の DMR だけでも SCR の予測値と実測値との相関係数は比較的高かった ($r=0.67$)。これら DMR のメチル化率は雄牛の受胎性評価の指標として利用価値があると考えられた。一方で DMR のメチル化率は雄牛の加齢とともに変化しうるため、精液のロット (採精月齢) を考慮する必要がある。本研究は協力機関 (広島県、岐阜県、鳥取県、茨城県) で繋養している黒毛和種雄牛のデータを用いているため、他牧場での利用については当該地域の種雄牛のデータを用いた検証が今後も必要と考えられた。以上の結果については、論文にとりまとめた (Takeda et al., J Reprod Dev, 2021)。

(3) 体外受精前後における DNA メチル化の動態

精子、成熟卵子、体外受精後の胚における DMRs のメチル化動態を調べたところ、精子と体外

受精前の卵子では 6 箇所のうち 4 箇所ではメチル化率の相違がみられた ($P < 0.05$)。SCR の高低グループそれぞれの雄牛由来精子の体外受精により得られた胚盤胞期胚の DMR のメチル化率にグループ間で有意差は検出されなかった。また、F1 においては、2~8 細胞期胚で精子と卵子の間の値を示したが、桑実期以降メチル化率が低下する傾向がみられた (図 3、未発表)。DMR によって胚盤胞期胚の個々のメチル化率のばらつきが大きく、これらメチル化率の違いが胚の品質とどのように関連しているかは今後の課題である。

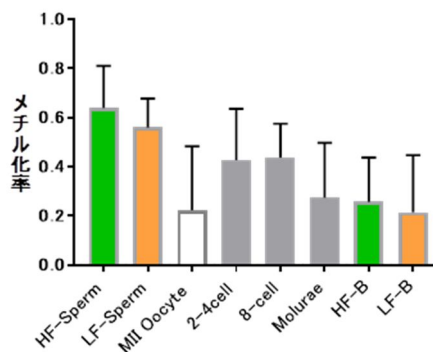


図 3 A) DMR における精子および胚盤胞期胚の DNA メチル化度の動態 (一例, F1)。SCR の高い (50%以上, HF-Sperm) 低い (40%未満, LF-Sperm) 雄牛由来精子の体外受精により得られた胚盤胞期胚のメチル化率にグループ間(HF-B, LF-B)で有意差なし。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 TAKEDA Kumiko, KOBAYASHI Eiji, OGATA Kazuko, IMAI Akira, SATO Shinya, ADACHI Hiromichi, HOSHINO Yoichiro, NISHINO Kagetomo, INOUE Masahiro, KANEDA Masahiro, WATANABE Shinya	4. 巻 67
2. 論文標題 Differentially methylated CpG sites related to fertility in Japanese Black bull spermatozoa: epigenetic biomarker candidates to predict sire conception rate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 99~107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2020-137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kumiko TAKEDA, Eiji KOBAYASHI, Kagetomo NISHINO, Akira IMAI, Hiromichi ADACHI, Yoichiro HOSHINO, Ken IWAO, Satoshi AKAGI, Masahiro KANEDA, Shinya WATANABE	4. 巻 65(4)
2. 論文標題 Age-related changes in DNA methylation levels at CpG sites in bull spermatozoa and in vitro fertilization-derived blastocyst-stage embryos revealed by combined bisulfite restriction analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 305-312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2018-146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田 久美子、緒方 和子、今井 昭、佐藤 伸哉、井上 真寛、木村 和輝、熊崎啓将、金田 正弘、小林栄治
2. 発表標題 精子核DNAメチル化可変領域を利用した黒毛和種凍結精液の人工授精後の受胎性予測の試み
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林栄治、緒方和子、武田久美子
2. 発表標題 ヒトメチル化アレイを用いたウシメチル化可変部位の網羅的解析
3. 学会等名 第22回動物遺伝育種学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田久美子、小林栄治、緒方和子、今井昭、佐藤伸哉、木村和輝、安達広通、井上真寛、金田正弘、渡邊伸也
2. 発表標題 黒毛和種雄牛の人工授精後の受胎性指標とする精子核DNAメチル化可変部位追加による評価精度の向上
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田 久美子、小林 栄治、西野 景知、星野 洋一郎、安達 広通、今井 昭、岩尾 健、緒方 和子、金田 正弘、渡邊 伸也
2. 発表標題 受胎性と関連しうる精子核DNAメチル化可変部位の体外受精胚におけるメチル化状態
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	小林 栄治 (Kobayashi Eiji) (00186727)	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 (82111)	

	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
研究 協力者	今井 昭 (Imai Akira)	広島県総合技術研究所・畜産技術センター・主任研究員	
研究 協力者	木村 和輝 (Kimura Kazuteru)	茨城県畜産センター・肉用牛研究所・技師	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	熊崎 啓将 (Kumazaki Hiromasa)	岐阜県畜産研究所・飛騨牛研究部・研究員	
研究協力者	井上 真寛 (Inoue Masahiro)	鳥取県畜産試験場・室長	
研究協力者	金田 正弘 (Kaneda Masahiro)	東京農工大学・大学院農学研究院・准教授	

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