

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06370

研究課題名（和文）黒毛和種集団の人工授精受胎率向上を目指した遺伝子多型の解明

研究課題名（英文）Study of genetic polymorphisms to improve fertility by artificial insemination in Japanese Black cattle

研究代表者

石田 孝史（Ishida, Takafumi）

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：50253810

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）：本研究は、人工授精受胎率低下要因となる遺伝子多型を探索し、遺伝的要因の解析による人工授精受胎率向上を目指した知見を得ることを目的とした。ウシ受胎性に関与するとの報告がある遺伝子多型や受精システム、初期発生に関与する多型、さらに今回実施した網羅的SNP解析結果を踏まえ、より低コストで判定が可能であるPCR-RFLP法による解析プロトコルの確立を行い、計167遺伝子多型を解析した。各遺伝子型が各産次初回人工授精による受胎率について多変量ロジスティック回帰分析を行った結果、繁殖雌牛および人工授精に供した種雄牛において28および7遺伝子型で有意なオッズ比が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウシ人工授精受胎率に関して海外では主に乳用種集団を対象としたGWAS解析により確認されており、同じBos taurus種に属する黒毛和種においても同様の影響を及ぼしている可能性は高いと考えられるが、黒毛和種集団において再現性を確認する必要がある。

本研究では上記に加え、高密度SNPチップによる遺伝子多型情報を収集し、さらに多量の授精記録との遺伝的関連性を解析するにあたり、比較的低コストで実施可能であるPCR-RFLP法により遺伝子多型を解析することで、緊急を要する黒毛和種の受胎性向上のための情報提供を行う、非常に有意義なものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to search for genetic polymorphisms that affect lower fertility by artificial insemination and to obtain knowledge aimed at improving fertility by artificial insemination through analysis of genetic factors. We analyzed a total of 167 genetic polymorphisms, including polymorphisms reported to be involved in bovine fertility, fertilization system, early development, and based on the results of the comprehensive SNP analysis performed in this study, as well as establishing an analysis protocol using the PCR-RFLP method, which allows genetic analysis at a lower cost. The 28 and 7 genotypes showed significant odds ratios for conception rate of each genotype by the first insemination of each litter in breeding dams and sires used for artificial insemination, with multivariate logistic regression analysis.

研究分野：家畜遺伝育種学

キーワード：黒毛和種 受胎率 繁殖雌牛 人工授精種雄牛 遺伝子多型

### 1. 研究開始当初の背景

畜産経営の収益は生産物の評価に左右され、日本が誇る肉用牛である黒毛和種においては言うまでも無く、屠畜後の流通段階の評価に大きな影響を及ぼしている“枝肉格付”が大きなウェートをしめている。この生産物である枝肉となるのは肉量・肉質を高める飼養管理がなされた肥育牛であり、将来肥育牛となる子牛を生産しているのが繁殖雌牛である。そのため集団の産肉能力の向上に加えて、繁殖雌牛の生産性、すなわち子牛を産み育てる繁殖能力は肉用牛として非常に重要な能力である。

しかしながら肥育素牛となる子牛市場における取引頭数は近年減少している。この原因の1つとして2010年に宮崎県で発生した口蹄疫後の殺処分による繁殖雌牛頭数の減少といった要因などが考えられるものの、人工授精受胎率低下による子牛生産頭数の減少も考えられる。

黒毛和種を含め、我が国における家畜牛はほぼ100%凍結精液を用いた人工授精により種付が行われている。一つの重要な繁殖能力である人工授精による受胎率の推移は図1に示すとおり急激な低下傾向にある。計算上2014年には、当該産次の初回人工授精においておよそ半数の繁殖雌牛が受胎していないこととなる。受胎しなかった繁殖雌牛には当然、再度人工授精を行う必要が生じ、子牛の生産効率を低下させる。さらに次の発情を待つことによる空胎期間の延長、そしてこれに伴う分娩間隔の延長が考えられる。生物学的にウシの妊娠期間と空胎期間から分娩間隔を計算すると十分1年に1回子牛を分娩することが可能であるが、現状、肉用牛の分娩間隔は13.3ヶ月であり(農林水産省 家畜改良増殖目標) 受胎率の向上は分娩間隔改善の一助にもなる。

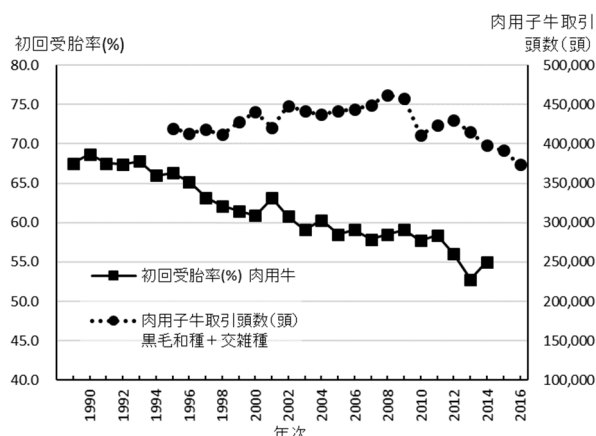


図1. 家畜改良事業団が全国に配布した肉用牛凍結精液による初回授精受胎率(含交雑種、引用: 家畜改良事業団) および全国子牛市場における黒毛和種と交雑種の取引頭数(引用: 農畜産業振興機構)の推移

以上のように家畜、特に肉用牛繁殖雌牛

の子牛生産性向上には、受胎率を向上させることが非常に重要なポイントと考えられる。受胎率の低い種雄牛や繁殖能力の低い繁殖雌牛はそれぞれ産肉能力検定時や飼養農家において遺伝的に淘汰される。そのためこれまで多様な検討が行われてきたが、根本的な解決策が示されず精子DNAのダメージやエピジェネティクスといった遺伝的な要因以外が関与しているとされている。一方、一部黒毛和種集団や海外の乳用牛ホルスタイン種集団において遺伝的要因を示唆する報告もあり、世界的にもその原因は明確になっていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

これまでウシの凍結精液による人工授精受胎率に関して幾つもの報告があるものの、特に黒毛和種において申請者が知る限りでは遺伝的要因としての遺伝子多型の影響を報告したものは少数にとどまる。

全国の人工授精用凍結精液供給者と同様に、申請者の研究フィールドである宮崎県における黒毛和種の人工授精用凍結精液製造および供給は、統一された品質管理により宮崎県家畜改良事業団が行っている。宮崎県下の一般農家における人工授精受胎成績をロジスティック回帰分析により解析したところ、血縁関係にある精液製造種雄牛間、特に同父異母半きょうだい間で受胎率オッズ比に有意な差異を見出した。生産現場における受胎率に違いが認められるということは、同父半きょうだいの母方から何らかの遺伝的要因を受け継ぎ、これが当該種雄牛による人工授精用精液に影響を及ぼしていると考えるのが妥当であり、人工授精受胎率低下に関して遺伝的要因の可能性が考えられる。

要因となる遺伝子多型の特定が行えれば宮崎県のみならず全国の黒毛和種集団における受胎率低下要因除去による生産効率向上など家畜育種上有用な情報となる。さらにその作用機序を解明することで黒毛和種以外の家畜全般にも応用が期待できると思われ、本研究の推進は我が国の家畜生産業にとって非常に意義深いものと考えられる。

以上の点を踏まえ、本研究ではこの人工授精受胎率低下要因となる遺伝子多型を探索し、遺伝的要因の解析による人工授精受胎率向上を目指した知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験材料

遺伝子解析に用いたゲノムDNAサンプルは宮崎大学附属住吉牧場で飼養管理されている繁殖雌牛、および宮崎県家畜改良事業団で管理されている種雄牛から採血し、白血球から常法により

抽出した。

また、宮崎大学附属住吉牧場において 2004 年 1 月～2020 年 12 月に実施した各産次初回人工授精記録および分娩情報を用いて統計解析を実施した。

## (2) 実験手法

以下の手法を用いて本研究を実施した。

PCR-RFLP (制限酵素断片長多型) 法

全ゲノム増幅 (TruePrime WGA Kit, Expedeon, Cambridge, England) および増幅サンプル精製 (NucleoSpin gDNA Clean-up, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Germany)

網羅的 SNP 解析 (Infinium BovineHD BeadChip, Illumina, Inc., CA, USA)

多変量ロジスティック回帰分析 (JMP Pro 16, SAS Institute Inc., NC, USA)

## 4. 研究成果

### (1) 海外既報の遺伝子多型同定

海外においてウシ受胎性に関与するとの報告がある遺伝子多型やウシの受精システム、初期発生に関与する遺伝子多型の同定を PCR-RFLP (制限酵素断片長多型) 法により行った。PCR-RFLP 法による解析プロトコルを確立し、宮崎県黒毛和種種雄牛集団および宮崎大学附属住吉牧場繁殖雌牛集団において、122 遺伝子多型が存在することを確認した。このうち 10 遺伝子多型は細胞の異化作用の要でほぼすべての種類の細胞成分の分解に関与し、受精から発生にも関与するとされるプロテアソームおよびオートファジー関連遺伝子であった。

### (2) 全ゲノム増幅プロトコルの確立

現存していない供試牛のゲノムサンプルについて、人工授精回数が多いものについては今後の高密度 SNP チップによる網羅的 SNP 解析や PCR-RFLP 法による遺伝子多型解析に備え、全ゲノム増幅 (TruePrime WGA Kit, Expedeon, Cambridge, England) および増幅サンプル精製 (NucleoSpin gDNA Clean-up, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Germany) によるゲノムサンプル量の確保の可能性について検討した。全ゲノム増幅プロトコルを確立し、供試牛 21 頭については既存の PCR-RFLP 法により全染色体上に存在する遺伝子多型の解析が確認できた。

### (3) 網羅的 SNP 解析

宮崎県黒毛和種集団における凍結精液供給を担っている宮崎県家畜改良事業団の協力を得て、県下の受胎成績に及ぼす人工授精に供した種雄牛の影響について予備検討を行った。その結果、半きょうだい関係にある種雄牛に加え全きょうだい関係にある種雄牛の 2 組を確認した。この 2 組のきょうだい間での初回人工授精受胎率に 5%水準で有意差が認められた。

この全きょうだいを含む 10 頭の種雄牛について、Infinium BovineHD BeadChip (Illumina, Inc., CA, USA) による網羅的 SNP 解析を行った。得られた解析結果は Ensembl データベース (<https://www.ensembl.org/index.html>) より取得した遺伝子情報 (Ensembl Genes 103, Cow genes ARS-UCD1.2) および SNP 情報 (Ensembl Variation 103, Cow Short Variants ARS-UCD1.2) とマッチングを行った。解析の結果、BeadChip に搭載されている 777,962 SNPs のうち Minor Allele Frequency が 5%以上の 504,956 SNPs が確認できた。このうち 1,794 SNPs がアミノ酸置換を伴う遺伝子多型であった。さらに多型により終止コドンとなるもの 9 SNPs、終止コドンがアミノ酸をコードとなるもの 4 SNPs、開始コドンが別のアミノ酸をコードとなるもの 10 SNPs、とコードするタンパク質に大きく影響を及ぼす遺伝子多型が確認された。

上記全きょうだい関係にある種雄牛 2 頭および別家系に属する人工授精受胎率が低い種雄牛 1 頭において、アミノ酸置換を伴う 160 SNPs が異なる遺伝子型であり、これらは受胎成績に影響を及ぼす可能性が高いと考えられる。さらに多型により終止コドンとなるもの 4 SNPs、終止コドンがアミノ酸をコードとなるもの 4 SNPs、開始コドンが別のアミノ酸をコードとなるもの 6 SNPs において異なる遺伝子型が確認された。

### (4) 網羅的 SNP 解析結果を踏まえた遺伝子多型同定

網羅的 SNP 解析により確認された全きょうだい関係にある種雄牛 2 頭および別家系に属する人工授精受胎率が低い種雄牛 1 頭で異なる遺伝子型を示した、コードするタンパク質に大きく影響を及ぼす遺伝子多型を主として、より低コストで多頭数の判定が可能である PCR-RFLP 法による解析プロトコルの確立を行った。その結果、アミノ酸置換を伴う 21 SNPs、多型により終止コドンとなるもの 6 SNPs、終止コドンがアミノ酸をコードとなるもの 3 SNPs、開始コドンが別のアミノ酸をコードとなるもの 5 SNPs、イントロン領域における 10 SNPs、合計 45 多型を判定する PCR-RFLP 法による解析プロトコルが確立できた。

このプロトコルを用いて、宮崎大学附属住吉牧場において 2004 年 1 月～2020 年 12 月に実施した各産次初回人工授精記録を持つ繁殖雌牛 22 頭 (授精記録 257 件、各雌牛 10～15 件、平均 11.7 件) およびこの人工授精に用いられた宮崎県家畜改良事業団で管理される種雄牛 18 頭 (授精記録 573 件、各種雄牛 12～127 件、平均 31.8 件) の遺伝子型判定を実施した。

### (5) 人工授精受胎率に及ぼす遺伝子多型の影響

宮崎大学附属住吉牧場の繁殖雌牛 22 頭およびこの人工授精に用いられた宮崎県家畜改良事業団の種雄牛 18 頭に対して、(1)による 122 遺伝子多型、および(4)による 45 多型、合計 167 遺伝子多型を解析し、各遺伝子型が初回人工授精により死産を含めた産子が誕生した(1)か否か(0)に及ぼす影響について多変量ロジスティック回帰 ( JMP Pro 16, SAS Institute Inc., NC, USA ) を用いて統計解析を行った。この際、繁殖雌牛および人工授精種雄牛それぞれにおいて全種付情報における遺伝子型頻度が 5%以下の遺伝子型を除外した。

その結果、繁殖雌牛において 11 多型、人工授精に供した種雄牛において 14 多型は遺伝子型が 1 つしか存在しないため統計解析から除外され、繁殖雌牛において 28 多型、人工授精に供した種雄牛において 7 多型で遺伝子型間で有意 ( $p < 0.05$ ) なオッズ比が認められた。この遺伝子多型の内訳は、繁殖雌牛ではアミノ酸置換を伴うもの 20 多型、終止コドンがアミノ酸をコードとなるもの 2 多型、アミノ酸置換を伴わないもの 1 多型、イントロン領域におけるもの 5 多型であった。また人工授精に供した種雄牛ではアミノ酸置換を伴うもの 6 多型、イントロン領域におけるもの 1 多型であった。

なお、繁殖雌牛、人工授精種雄牛に共通して有意性が認められたものが 1 多型あり、これは *CSPP1* 遺伝子の第 31 エキソンに存在するアミノ酸置換グリシン/アルギニンを伴う遺伝子多型であった。父と母の遺伝子は精子と卵子の形で受精卵に受け継がれ、その後母の胎内で胚、胎児へと発生していく。このことより胎児の分娩に及ぼす影響は父母で異なっており、父母共通して有意な影響が認められたということは、父母の遺伝子がそれぞれ受け継がれた受精卵の遺伝子型によって受精卵自身のその後の発生に影響を及ぼした可能性が 1 つの要因として考えられる。今後は、父母それぞれの遺伝子が受精から発生のどの段階で働いているのか、また父母の遺伝子型の組み合わせがどの様に影響しているか検証していく必要があると考えられる。さらに、今回の解析では宮崎大学附属住吉牧場において実施された人工授精および分娩記録を用いたが、今後別の黒毛和種集団における解析を行うことで、詳細な検討が可能となることが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------