

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：81602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15652

研究課題名（和文）超早期ゲノミック評価を実現するためのウシ受精卵由来少数細胞からのSNP解析

研究課題名（英文）SNP analysis from very few cells derived from embryos to develop ultra-early genomic evaluation in cattle

研究代表者

的場 理子（的場理子）（Matoba, Satoko）

独立行政法人家畜改良センター・本所（企画調整部 技術グループ）・次長・課長

研究者番号：60592574

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：牛の育種改良は後代検定によって実施されているが、この手法は多数の後代牛と膨大な費用が必要となり、検定終了後の種雄牛選抜まで5年以上の長期間を要する。本研究では育種改良速度アップを目指した胚のゲノミック評価手法を開発するために、体外受精卵（胚）からの極少数細胞を用いたSNP解析法の開発を試みた。SNP解析に適する細胞採取ステージ、細胞数を明らかとし、そのステージの胚から採取した極少数細胞において、細胞増殖培養を経ずともDNAの増幅により、牛SNP型判定が可能であることを見出した。一方で、DNA濃度幅が大きいことから胚の状態とDNA品質の特定、濃度の安定性等の解明が引き続き必要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液等の体細胞は約1,000個以上存在するため、細胞増殖培養やゲノムDNAの増幅を必要とすることなくSNP解析が可能であるが、胚の総細胞数は約100個と少数であるだけでなく、一部をSNP解析用に採取し、残りを移植して子牛まで発育可能な状態へと両立させる技術の開発には困難を伴う。このことから胚を用いたSNP解析法を開発することは学術的意義が高いと考えられる。子牛の段階において胚生産し、それらの胚を利用したゲノミック評価の実現できれば、飼養頭数の減少が進む国内の現状および現行の後代検定手法による種雄牛選抜を超早期化し、育種改良の大幅な加速化に貢献できることとなり社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：A progeny test method is currently used to accelerate the breeding of cattle. However, this method requires a large number of progeny cattle and enormous costs, moreover requires at least period of 5 years until the end of the test. In this study, in order to develop a genomic evaluation method using embryos aiming at more acceleration breeding improvement, we attempted to develop an SNP analysis method using very few cells from in vitro fertilized embryos. It was clarified the appropriate cell collection stage and cell number for SNP analysis, and succeeded in determining the bovine SNP type by amplifying DNA in those collected extremely small number of cells without cell proliferation culture. However, it is still necessary to reveal the relationship between the quality of collected cells and DNA quality and the stability of DNA concentration. It is still remained elucidate the cell quality and the stability of DNA concentration that can be analyzed by SNP.

研究分野：農学

キーワード：ウシ 体外受精 受精卵 胚 SNP解析 ゲノミック評価 育種改良

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

牛の育種改良は、現行では後代への遺伝的改良能力が高いと判定された種雄牛を選抜する後代検定手法によって実施されている。しかし、この手法は後代の肥育成績や泌乳成績から種雄牛の能力が判定されるため、5年以上の長期間を要し、多数の後代と膨大な費用を必要とする。近年、育成牛段階での血液等の体細胞からの一塩基多型 (SNP) 解析によるゲノム情報を用いたゲノミック評価による改良の加速化が現行の後代検定と共に開始されているが、この手法においても4年以上を要する。牛を生産する前の受精卵 (胚) 段階でのゲノミック評価を実現できれば、低コストかつ育種改良の超高速化が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、胚という超早期にゲノミック評価を活用して優良後継牛を増産するための新育種改良システム構築の創出に貢献するため、体外受精した胚の段階において、SNP 解析用および移植可能な品質の胚 (生存胚) を両立させながら、割球分離した胚からの少数細胞を用いてゲノム DNA を解析可能なレベルまでへの細胞増殖培養法や、それらの細胞からのゲノム DNA 増殖法とその解析手法を確立する。さらに、育種改良の加速化を目指すため、若齢期の子牛から体外受精胚を生産する方法を検討する。

3. 研究の方法

体外受精直後の胚を均等に割球分離する適正な時期 (2~8 細胞期) を検討する。SNP 解析が可能となる細胞増殖法を検討する。SNP 解析法 (解析可能となる DNA 増幅法) を検討する。

4. 研究成果

ウシ胚由来細胞からの SNP 解析の可能性を検討するため、経膈採卵 (OPU) 技術により採取した卵子を用いて体外受精を実施し、第一卵割終了後に正常に卵割した胚を割球分離し、割球分離胚の生産を試みた。卵子には成牛である経産牛だけでなく、より改良速度の高速化を望める性成熟前後の時期の若齢子牛からも採取し、体外受精後の割球分離胚の生産性を比較検討した。子牛において、体外受精可能な卵子を内包する卵胞直径サイズは成牛と同等であったが、採取卵子数、そのうちの高品質卵子割合は成牛の半数以下であった。一方、体外受精後に正常卵割を示した胚を割球分離したのち胚盤胞 (体外受精後 8 日目) に発生したペアの割合は、子牛および成牛の間で差が認められなかった。このことから、子牛から高品質の卵子を採取することができれば、若齢時期の子牛においても、割球分離胚の片側を移植可能な胚として生産しながらもう一方を SNP 解析に供することができる可能性が示唆された。そのため、成牛において実施されている OPU 前の卵胞発育処理法を改変した新たな卵胞発育処理法を子牛に試み、卵子採取開始月齢に及ぼす影響を検討した。性成熟開始前後から一般的に繁殖を開始する月齢まで経時的にこの処理を比較検討したところ、体外受精可能な卵子を内包するサイズの卵胞数および採取卵子数においては卵胞発育処理の効果は認められなかった。一方、性成熟後以降の月齢において、卵胞発育処理を実施したことにより高品質な卵子率および生産胚盤胞数が向上することが明らかとなった。このことから、卵胞発育処理は、性成熟を境としたステロイドホルモン支配下になると効果が得られ、性成熟前には新たな処理による効果が得られず、さらなる処理法の改良が必要であることが示唆された。

食肉処理場由来ウシ卵巣および OPU 技術による生体牛の卵巣から採取した卵子を用い、体外受精直後の胚における割球分離が適する時期について検討した。第一卵割終了後において胚を均等に分離し、片側を SNP 解析用、残りを子牛生産の移植用として胚盤胞まで培養した場合と、第三卵割終了後において胚の極一部の割球を分離して SNP 解析用、残りを第一卵割終了後と同様に胚盤胞まで培養した場合、後者の胚盤胞発生率が有意に高く、割球分離する時期として適していることが明らかとなった。SNP 解析用に採取した細胞数の全ゲノム増幅を検討した結果、増幅後の DNA を Nano drop による純度と濃度判定およびアガロースゲルを用いた電気泳動による品質判定において、両者とも同様に DNA が抽出されていることが判明した。このことから、初期胚から採取した極少数の細胞を細胞増殖培養の過程を経ずとも全ゲノム増殖操作を実施することにより、SNP 解析を可能とするゲノム DNA が得られることが示唆された。全ゲノム増幅した極少数細胞において、牛の体細胞 (血液) を対照区として、TaqMan プローブ法を用いた 3 種の SNP 型判定 (脂肪酸合成酵素、脂肪酸不飽和化酵素、枝肉重量 QTL) を実施したところ、G/G、G/A、A/G 型を有する SNP 型判定が可能であるサンプルが認められた。このことから、極少数細胞においても、DNA を増幅することにより、細胞数の多い体細胞と同様に牛の SNP 型を判定可能であることが示された。一方、採取した極少数細胞の品質に問題がない場合において SNP 型を確定できなかったサンプルもあり、採取細胞の品質における SNP 解析可能な特徴

を見出すことが必要であると考えられた。

若齢時期の子牛から体外受精胚を生産するためには、卵胞発育処理に加え、子牛から物理的かつ安定的に卵子を採取可能とする OPU プローブが必要である。本研究において導入した市販の OPU プローブは、若齢時期の子牛の腔内には大きすぎることから子牛の腔内を傷つけ、子牛への負担が大きいことが明らかとなった。そのため、当初は計画していなかったが OPU プローブを小型化する改良を行い、若齢子牛からの卵子採取を可能とする子牛用 OPU プローブを開発した。

以上のことから、胚段階におけるゲノミック評価の実現に向けた SNP 解析への展望が拓かれ、牛育種改良の速度の加速化に貢献可能な基盤技術の開発ができたと考えられる。一方で、DNA 濃度幅が大きいことから胚の状態と DNA 品質の特定、濃度の安定性等の解明が必要であると考えられることから引き続き検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 的場理子
2. 発表標題 OPU-IVF技術を活用した肉用牛の胚移植の動向
3. 学会等名 令和3年度 畜産酪農生産力強化対策事業（繁殖性向上対策事業）にかかる肉用牛繁殖性向上検討会肉用牛繁殖技術シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------