

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580316

研究課題名（和文）遺伝子多型選抜と生殖細胞機能賦活化を併用する優良家畜生産手法の構築

研究課題名（英文）Development of in vitro culture system for oocytes and embryos using marker assist selection together with pharmaceutical activation

研究代表者

松本 浩道（MATSUMOTO HIROMICHI）

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：70241552

研究成果の概要（和文）：200字

生産性に関わる遺伝子として、ウシBRCA1遺伝子について解析したところ、BRCA1遺伝子エクソン11の塩基配列およびアミノ酸配列はウシの品種間で保存性が高いことが明らかになった。Brcalタンパク質はマウス着床能力獲得胚の栄養外胚葉で発現していた。一方、体外受精で得られた胚盤胞におけるBrcalタンパク質は低い発現レベルを示した。この低発現は、4-ヒドロキシエストラジオールとプロラクチンによって改善することが可能であった。

研究成果の概要（英文）：

Nucleotide sequence of Bovine BRCA1 gene was highly conserved between Holstein cows and Japanese Black cows. Expression of Brcal was strongly upregulated in implantation-competent blastocysts in the mouse, whereas the Brcal expression of was low in blastocysts derived from in vitro fertilization. In contrast, 4-hydroxyestradiol and prolactin upregulated Brcal levels in blastocysts derived from in vitro fertilization. Our results suggest that Brcal most likely plays a physiological role in directing implantation-competent blastocysts in the mouse.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成23年度	900,000	270,000	1,170,000
平成24年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：繁殖、受胎率、着床率、遺伝子多型、胚発生、妊娠

## 1. 研究開始当初の背景

ウシの体外受精と胚移植は、優良形質個体の効率的な増産法として実用化されている。しかしながら、体外受精によって作出した胚の産子生産率は極めて低い。ウシの体外受精卵移植において、受胎率は約40%（受胎数/移植数）、産子生産率は約22%（産子数/移植数）である。この値は移植数を分母にしているの、子宮への胚移植に用いるステージである胚盤胞への発生率が50%程度であることを考えると、実際の受胎率や産子生産率は非常な低率である。ウシの受精卵移植が始まって以来約20年が経過しているが、この値は低率のままで改善できていない。すなわち、体外作出胚における低受胎率の原因究明と対応技術の開発は、優良家畜の安定増産において、重要かつ必要不可欠な課題である。

## 2. 研究の目的

体細胞クローンウシが多数作出されている今日ではあるが、前述のように体外受精によって作出した胚の産子生産率が低いことは意外に知られていない。ウシの受精卵移植開始からこの間、発生工学が大きく前進し、胚盤胞への発生率が改善されているのに何故受胎率は低いのか？我々は、発生の速いウシ体外受精胚では染色体異常が多いことを明らかにしている。染色体異常胚は流産率が高いことから、このことが低受胎率に関わっているものと考えられる。つまり「発生の速い胚は良好と評価する従来法」には問題があり、新たな胚質評価法を作出し、それを活用した改善法の樹立が必要である。

胚発生や着床の分子機構に関する研究は、これまでにも国内外で多くの研究が行われてきた。家畜においては、反芻動物特有の

受胎に関わる分子機構の解明が進んでおり、この分野では我が国の成果はトップレベルである。母体側の生理機構などから受胎率改善への試みもなされている。しかしながら、ウシの受精卵移植における受胎率は一向に改善されていない。このことは、分子機構などの基礎研究の更なる推進に加え、それらの知見を基に、標的とする分子機構を賦活させる体外培養系を作出し、受胎率を改善するアプローチの必要性を示唆している。

本研究では、遺伝子多型選抜と生殖細胞機能賦活化の併用による優良家畜生産手法の構築を目指す。生産性と抗病性に関わる遺伝子を新規に探索し、ウシの塩基配列を決定する。また、品種間の相違について遺伝子多型解析を行う。さらに、胚発生過程における標的遺伝子の発現動態を解析し、着床能力の低い体外受精胚の原因を探る。この過程に必須である体外成熟培養や体外受精といった従来の生殖工学技術に加え、生殖細胞機能を賦活化する技術を開発し、着床能力の高い胚培養法を作出する。

我々はこれまでも、着床に関する分子メカニズムの研究を展開してきた。そこで、これまでに明らかにしてきた着床関連因子の中で、現在細胞学的に注目が高い因子を候補とすることを考えた。すなわち、ガン細胞などの培養実験から得られた最新の知見を速やかに応用させていく。また、培養細胞を用いた実験では、細胞機能の増加作用や抑制作用を示す化学物質の開発と検討が広く展開されている。それらの中に、胚の着床能力を賦活化する因子が含まれていることが期待出来る。一方で、新規の着床関連因子の同定も行ってきた。その知見の更なる解析も進め、着床能力向上への応用を展開する。

### 3. 研究の方法

#### 生産性に関わる遺伝子の解析

マウスにおけるBrcalの遺伝子多型については多くの報告があるが、ウシでは不明な部分が多い。そこで、ウシBRCA1の遺伝子配列を決定し、多型の解析を行う。これまで、マウスBrcalの遺伝子多型でガンと関連性が示されている配列を中心にウシのBRCA1を解析し、乳用牛や肉用牛の特性にBRCA1遺伝子多型が関与しているかを検証する。さらに他の動物種との相同性について比較解析を行う。

#### 発生と着床能力獲得に関する分子機構

ウシの卵子を用いる実験系では、利用できる数と実験回数に制約があり、様々な項目を詳細に検討することは困難である。そこで、まずマウスで行う。胚の各発生ステージにおけるBrcalの発現と機能の解析を行う。体外発生過程における胚のBrcalの発現を免疫染色で解析する。Brcalはエストロゲン感受性のガンに関わる遺伝子である。そこで、胚の培養系におけるエストロゲンによるBrcal発現誘導や栄養外胚葉の増殖への関与などについて解析を行う。また細胞培養系でBrcalの発現を誘導する因子についても検討する。

### 4. 研究成果

#### 生産性に関わる遺伝子の解析

ヒトBRCA1は、家族性乳ガンに関与していることが知られている。そこで我々は、BRCA1がウシの乳房性疾患に関与している、と仮説をたてた。ウシBRCA1遺伝子については、肉用牛であるヘレフォード種のクローニングが報告されているのみである。ヘレフォード種では、エクソン11において111塩基の挿入の有無が、BRCA1遺伝子の転写

を制御するリン酸化に関わっていることが報告されている。乳房性疾患は乳用牛の生産において重要な問題であることから、代表的な乳用牛であるホルスタイン種におけるBRCA1遺伝子の塩基配列解析を行った。また肉用牛としては黒毛和種を解析した。

黒毛和種およびホルスタイン種において得られたBRCA1遺伝子エクソン11の塩基配列およびアミノ酸配列を既報のヘレフォード種と比較したところ、総塩基数および総アミノ酸数は一致していた。また、ホルスタイン種BRCA1遺伝子のエクソン11は、ヘレフォード種と同一の配列であった。一方で、111bp挿入は認められなかった。これらの結果、ウシBRCA1エクソン11のアミノ酸配列は、3品種間で高く保存されており、重要な機能を有していることが示唆された。一方で、ウシにおけるBRCA1遺伝子の塩基配列は保存性が高い一方で、乳用牛特異的な配列をもつ可能性が示唆された。今回解析した乳用牛については、乳房炎の記録と遺伝子型に明らかな相関は認められなかった。

ホルスタイン種リピートブリーダーにおけるBRCA1遺伝子エクソン11の塩基置換は、経産雌ウシと比較して遺伝子型に特徴は見られなかった。さらに、エクソン11における核局在化シグナルおよび疾患関連性変異の部位での塩基置換は認められなかった。

BRCA1遺伝子のエクソン9～11前半部位について、黒毛和種とホルスタイン種の塩基配列の比較解析を行った。その結果、黒毛和種とホルスタイン種の塩基配列はすべて一致し、既報のヘレフォード種の配列とも同一であった。ニホンジカのBRCA1遺伝子についてウシと比較したところ、相同性は96.9%であり、そのうち12bpにおいて塩基置換が認められた。得られた塩基配列をアミノ酸配列に翻訳した結果では、129個のアミノ酸の

うち8個のアミノ酸において非同義置換が認められた。また、アミノ酸置換をエクソンごとにみると、エクソン10で3個、エクソン11前半部位で5個存在していた。さらに、ヒト(U14680.1)、マウス(NM\_009764.3)、ブタ(XM\_003358029.1)の配列と比較したところ、ニホンジカとウシとの間で最も相同性が高く、反芻亜目において共通する塩基配列が認められ、作成した系統樹ではニホンジカおよびウシは同じクラスター内に存在していた。

#### 発生と着床能力獲得に関する分子機構

マウス胚における *Brcal* タンパク質は、胚盤胞の子宮内膜に着床する部位である栄養外胚葉に発現していた。*Brcal* はエストロゲンの作用後に発現が上方制御され、胚盤胞が着床能力を獲得するのに伴い高い発現を示す。培養細胞を用いた研究では、*Brcal* は *Bard1* とヘテロ二量体を形成することでタンパク質分解作用を示されている。しかしながら、着床期の胚盤胞における *Brcal* は、*Bard1* とは独立して着床期胚および2倍体栄養外胚葉の細胞増殖および分化抑制に機能するとともに、着床後の栄養膜巨細胞への分化に間接的に関与していることが示唆された。

一方で胚盤胞においてもタンパク質分解が胚の着床能力に関与していた。すなわち、着床周辺期胚における *ERα* は、着床能力の獲得において発現が上昇するが、その後ユビキチン化によるタンパク質分解によって速やかに分解されることで、過剰なエストロゲンの作用を回避していることが示唆された。

体外受精で得られた胚における *Brcal* タンパク質は栄養外胚葉に発現しており、局在性は体内で発生した胚盤胞と差が認め

られないものの、低い発現レベルを示した。このことから、体外受精胚の低い着床率に、*Brcal* タンパク質の発現動態が関与している可能性が示唆された。そこで、4-ヒドロキシエストラジオールとプロラクチンを胚盤胞の培養系に添加したところ、*Brcal* の発現を賦活化することが可能であった。培養細胞において、*Brcal* は細胞周期チェックポイント、DNA修復、ユビキチン化によるタンパク質分解など多岐にわたって機能する。胚盤胞における *Brcal* の役割は、ユビキチン化に関するものではなく、細胞周期チェックポイントやDNA修復などに機能することで、着床前後における胚発生を支持している可能性が示唆された。

着床期の胚において *Brcal* タンパク質が発現しているのに対し、着床直前に *ERα* 発現は消失する。ユビキチン化によるタンパク質分解であるプロテアソームの阻害剤により *ERα* を発現している胚を子宮に移植したところ、無処理区よりも低い着床率を示した。プロテアソーム阻害剤と *ERα* 拮抗剤で処理した胚の *ERα* 発現は、プロテアソーム阻害剤単独処理区に比べ低下する傾向がみられた。プロテアソーム阻害剤と *ERα* 拮抗剤で処理した胚を移植した結果、プロテアソーム阻害剤単独処理区よりも高い着床率を示した。これらの結果から、マウス胚において UPP を介した *ERα* 分解が着床の成立に必要であることが示唆された。またこの経路は *Brcal* 非依存的であると考えられた。

#### 5. 主な発表論文

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Sakurai M, Sato Y, Mukai K, Suematsu M, Fukui E, Yoshizawa M, Tanemura K, Hoshino Y, Matsumoto H, Sato E. Distribution of tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 and structural matrix proteins

- in mouse embryos during preimplantation development in vivo and in vitro. *Zygote*. 査読有. 2013. 印刷中. DOI: 10.1017/S0967199412000469.
- ② Matsumoto H, Fukui E, Yoshizawa M, Sato E, Daikoku T. Differential expression of motin family in the peri-implantation mouse uterus and their hormonal regulation. *J Reprod Dev*. 査読有. **58**: 649-653, 2012. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2012-075>.
- ③ Matsumoto H, Ezoe K, Mitsui A, Fukui E, Ochi M, Yoshizawa M. Extended uterine receptivity for blastocyst implantation and full-term development in mice with vitrified-warmed ovarian tissue autotransplantation. *Reprod Med Biol*. 査読有. **11**: 123-128, 2012. DOI: 10.1007/s12522-012-0119-8.
- ④ 福井 えみ子, 星 一美, 川野辺 章夫, 新楽 和孝, 稲葉 浩子, 長尾 慶和, 松本 浩道, 吉澤 緑. 栃木県で飼養されているホルスタイン種および黒毛和種雌ウシにおける FEZL 遺伝子の多型解析. *関東畜産学会報*. 査読有. **62**: 7-11, 2011.
- ⑤ Matsumoto H, Ezoe K, Mitsui A, Fukui E, Ochi M, Yoshizawa M. Vitrified-warmed ovarian tissue autotransplantation into ovariectomized mice restores sufficient ovarian function to support full-term pregnancy. *Reprod Med Biol*. 査読有. **10**: 185-191, 2011. DOI: 10.1007/s12522-011-0090-9.
- ⑥ Yuzawa T, Fukui E, Matsumoto H, Kawada T, Kawanobe A, Niira K, Ochi M, Yoshizawa M. Tumor protein p53 gene polymorphism and developmental competence of embryos derived from in vitro fertilization in old-aged and long-term infertile Japanese Black cows. *J Mamm Ova Res*. 査読有. **28**: 75-78, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1274/jmor.28.75>.
- ⑦ Takahashi K, Matsui H, Takahashi I, Matsumoto H, Fukui E, Motoyama M, Yoshizawa M. Effects of in vitro aging of mouse oocytes on metaphase II spindle morphology, in vitro fertilization and subsequent embryonic development. *J Mamm Ova Res*. 査読有. **27**: 42-50, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1274/jmor.27.42>.
- ⑧ Tajiri Y, Igarashi T, Li D, Mukai K, Suematsu M, Fukui E, Yoshizawa M, Matsumoto H. Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 is expressed in the uterus and binds with integrins in decidualized endometrium during postimplantation in mice. *Biol Reprod*. 査読有. **82**: 263-270, 2010. DOI: 10.1095/biolreprod.109.080028.
- [学会発表] (計 25 件)
- ① 松本 浩道ら. マウス胚の着床成立機構におけるユビキチン-プロテアソーム経路を介した ER $\alpha$  分解の必要性. 日本畜産学会 116 回大会. 2013 年 3 月 28-30 日. 広島県広島市. 安田女子大学.
- ② 福井 えみ子ら. 一塩基多型を利用したホルスタイン雌ウシ選抜の試み. 第 28 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会. 2013 年 2 月 7-8 日. 栃木県宇都宮市. 東日本ホテル.
- ③ 松本 浩道. 着床期マウスにおける子宮内膜の分化と血管新生の制御機構. 第 27 回日本生殖免疫学会総会・学術集会 シンポジウム 生殖免疫の立場から不妊症、不育症を議論する. 2012 年 12 月 8-9 日. 大阪高槻市. 大阪医科大学.
- ④ 福井 えみ子ら. 乳形質および繁殖性の遺伝子マーカーによる同時選抜の試み. 第 67 回関東畜産学会大会. 2012 年 11 月 10 日. 茨城県稲敷郡阿見町. 茨城大学.
- ⑤ 松本 浩道ら. 体外培養系で Brca1 の発現を誘起した胚盤胞における Egfr, Erbb4, Tinag11 の発現動態. 日本繁殖生物学会 105 回大会. 2012 年 9 月 6-8 日. 茨城県つくば市. 筑波大学.
- ⑥ Midori Yoshizawa ら. Oocytes of night monkeys. 4<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE 2012). August 31-September 2, 2012. Osaka, Japan. 大阪国際会議場.
- ⑦ Midori Yoshizawa ら. Chromosomal analysis of mouse 4- and 8-cell stage embryos derived from poly-pronuclear eggs fertilized in vitro. 4<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE 2012). August 31-September 2, 2012. Osaka, Japan. 大阪国際会議場.
- ⑧ Midori Yoshizawa ら. Spermatozoa of night monkeys. 4<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE 2012). August 31-September 2, 2012. Osaka, Japan. 大阪国際会議場.
- ⑨ 吉澤 緑ら. 高齢マウス卵核胞期卵子の体外発生能と卵核胞置換による胚作出の試み. 第 11 回生殖バイオテクノロジーシンポジウム. 2012 年 7 月 22 日. 東京都千代田区. 都市センターホテル.
- ⑩ 福井 えみ子ら. ウシおよびシカの BRCA1 遺伝子における比較解析. 日本比較臨床医学会 43 回大会. 2012 年 7 月 14 日. 神奈川県川崎市. 専修大学生田キャンパス.
- ⑪ 吉澤 緑ら. 体外受精により作出されたマウス多前核胚の 8 細胞期における染色体

- 分析. 第 53 回日本哺乳動物卵子学会. 2012 年 5 月 26-27 日. 大阪府豊中市. 千里ライフサイエンスセンター.
- ⑫ 松本 浩道ら. プロテアソーム阻害処理によるマウス着床期胚特異的発現因子の解析. 日本畜産学会 115 回大会. 2012 年 3 月 28-30 日. 愛知県名古屋市. 名古屋大学.
- ⑬ 吉澤 緑ら. マーカアシスト選抜と体外受精・胚移植を用いたデザイナー子牛の誕生. 第 66 回関東畜産学大会. 2011 年 11 月 4 日. 茨城県つくば市. 文部科学省研究交流センター.
- ⑭ 松本 浩道ら. マウス胚盤胞における *Brcal* の発現誘起. 日本繁殖生物学会 104 回大会. 2011 年 9 月 15-17 日. 岩手県盛岡市. いわて県民情報交流センター・アイーナ.
- ⑮ 福井 えみ子ら. ホルスタイン種雌ウシにおける *BoLA-DQA1* 遺伝子型と乳房炎罹患との関係. 日本畜産学会 113 回大会. 2011 年 8 月 26-27 日. 青森県十和田市. 北里大学.
- ⑯ 福井 えみ子ら. ウシ *TINAGLI* 遺伝子の多型解析. 日本畜産学会 114 回大会. 2011 年 8 月 26-27 日. 青森県十和田市. 北里大学.
- ⑰ 吉澤 緑ら. 黒毛和種長期不受胎高齢雌ウシの有する遺伝子多型と体外受精における胚発生能の関連性. 第 52 回日本哺乳動物卵子学会. 2011 年 5 月 21-22 日. 栃木県大田原市. 国際医療福祉大学.
- ⑱ 松本 浩道ら. 着床能力を獲得したマウス胚盤胞における *Brcal*、*Bard1* および *ERα* タンパク質の発現動態. 第 52 回日本哺乳動物卵子学会. 2011 年 5 月 21-22 日. 栃木県大田原市. 国際医療福祉大学.
- ⑲ 松本 浩道. 着床の分子生物学的メカニズム. 日本生殖再生医学会第 6 回学術集会 シンポジウム Reproductive loss—着床不全と流産—. 2011 年 3 月 13 日. 東京都千代田区. シェーンバツハ・サボー.
- ⑳ 吉澤 緑ら. 長期不受胎高齢雌ウシにおける体外受精由来胚盤胞の作出. 第 65 回関東畜産学大会. 2010 年 11 月 5 日. 神奈川県海老名市. 海老名市文化会館.
- Hiromichi Matsumoto ら. Breast cancer 1 (*Brcal*) is a potential marker of implantation-competent blastocysts in mouse. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction. July 30-August 3, 2010. Milwaukee, Wisconsin, USA.
  - 湯澤知子, 福井えみ子, 松本浩道, 越知正憲, 吉澤緑. 長期不受胎高齢牛の体外受精を含めた繁殖成績と Tumor

protein p53 (*TP53*)遺伝子の関連性について. 第 142 回日本生殖医学会関東地方部会. 2010 年 6 月 12 日. 栃木県下野市. 自治医科大学.

- 福井 えみ子ら. 選別 Y 精子を用いた体外受精由来ウシ胚盤胞における染色体分析. 第 51 回日本哺乳動物卵子学会. 2010 年 5 月 29-30 日. 新潟県新潟市. 朱鷺メッセ.
- 吉澤 緑ら. 黒毛和種雄牛における Tumor protein p53 (*TP53*) 遺伝子の塩基配列解析. 第 51 回日本哺乳動物卵子学会. 2010 年 5 月 29-30 日. 新潟県新潟市. 朱鷺メッセ.
- Hiromichi Matsumoto ら. Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 Is expressed in extraembryonic tissues and interacts with laminin 1 in the Reichert's membrane at postimplantation in the mouse. The First SKLRB Symposia on Frontiers in Periimplantation Biology. May 8-12, 2010. Beijing, China.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 浩道 (MATSUMOTO HIROMICHI)  
 宇都宮大学・農学部・准教授  
 研究者番号：70241552

### (2) 研究分担者

福井 えみ子 (FUKUI EMIKO)  
 宇都宮大学・農学部・准教授  
 研究者番号：20208341

吉澤 緑 (YOSHIKAWA MIDORI)  
 宇都宮大学・農学部・教授  
 研究者番号：60114162

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：