

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380151

研究課題名(和文) 高密度遺伝子解析と先端生殖技術を利用した優良遺伝子構成既知子牛の効率的生産

研究課題名(英文) Production of gene-designed calves using combination of highly accurate gene analysis and advanced reproductive technologies

研究代表者

吉澤 緑 (Yoshizawa, Midori)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：60114162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：望む経済形質の遺伝子型を有するホルスタインのデザイナーズ子牛の効率的生産を試みた。遺伝子解析には、栃木県畜産酪農研究センターのホルスタイン種の経産雌牛110頭の血液および10頭のホルスタイン種雄牛の購入凍結精液を用いた。遺伝子多型解析は、増体関連では成長ホルモン遺伝子、乳脂率、ホルモン感受性、乳房炎抵抗性の遺伝子などについて行い、望む形質の胚を得られるよう卵子と精子の遺伝子の組み合わせを考慮して、体外受精や人工授精で胚を得て受胎雌へ移植した。雌胚を得るために遺伝子多型を考慮した性別別精液を用い、又はバイオプシーにより性別別後修復培養して胚移植したが受胎には至らず、胚移植を再試行している。

研究成果の概要(英文)：It was aimed to produce genetically designed calves efficiently using in vitro fertilization techniques of gametes from the parents which were accurately analyzed for whole genomes. The blood samples of 110 females from the herd of the Tochigi Prefectural Livestock & Dairy Experimental Center were highly accurately analyzed for single nucleotide polymorphism (SNP) of genotypes on economically valuable genes. The genotypes of same genes were also determined for frozen semen samples purchased of ten bulls. Based on the genotyping results, combinations of ova and sperm were planned for yields of genetically superior calves. Ova were obtained from ovaries of the females of the center using OPU technics or ovaries from the slaughterhouse in Utsunomiya-city. The resulting blastocysts, which should have the desired genotypes, were obtained using the previously reported IVM-IVF-IVC system. The produced blastocysts were transferred to recipient females, but no calf was obtained until now.

研究分野：動物繁殖学

キーワード：ウシ 遺伝子多型 一塩基多型 ゲノム 体外受精 繁殖 生殖工学 経済形質

1. 研究開始当初の背景

日本には消費者の需要が高い黒毛和種に代表される和牛があり、この和牛の生産効率を上げるために種々の先端生殖技術が活用されている。しかし、消費者の購買動向としては、遺伝子導入や体細胞クローンといった技術によって作出された畜産物を拒絶する傾向が強い。これは特に日本の消費者は食品の安心・安全に敏感であることを示しており、この消費者心理を理解した上で畜産の技術開発を進める必要がある。消費者心理に合致するものとは、人体に対する影響や安全性が未解明である新技術を用いて作り出されるものを食物として摂取して健康上の影響が将来をも含めてないのかという不安を抱かせないものである。すなわち消費者が安心できる食料、食品とは、自然界に存在するこれまでに慣れ親しんだものの延長線上にあるものに他ならないと思われる。近年の哺乳動物における生殖工学の発展は目覚しく、対象は実験動物のマウス、ラットやウシ、ブタなどの家畜に止まらず、ヒトも範疇とされ、不妊症領域における治療手段としても汎用されるようになってきている。なかでも本邦におけるウシの先端生殖技術は、世界で初めて開発された非外科的胚移植技術を端緒として、屠場卵巣から採取された未成熟卵子を用いた体外受精による世界初の子牛の生産や世界初の体細胞クローン牛作出とまさに世界の先陣を切っている。最近の種々の動物におけるゲノム解析の成功は、長い年月と多額の費用、大きな労力を要するこれまでの後代検定による選抜・交配といった旧来の家畜育種法から、生産性に関与する重要な遺伝子をマーカーとして家畜の選抜を行う、マーカーアシスト選抜を利用した新たな育種を可能とした。マーカーアシスト選抜とは、予め表現形質への貢献およびその塩基配列が明らかにされた遺伝子情報を用いて、当該遺伝子を有する生物を選抜することであり、その遺伝子は既にその生物種に自然に存在するものである。我々は平成 20~23 年度、基盤研究(B)「マーカーアシスト選抜と先端生殖技術を利用したデザイナーズ家畜の生産」と題して研究を遂行、目的の子牛生産に成功し公表した。本研究では、さらに優良な雌牛の 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) の高密度遺伝子解析を行い、当該雌牛より経膈的に生体卵子を得て、体外受精により初期胚を作出してその割球 1 個を標本として分析を行い、ホスト胚を受胎雌牛に移植することで、優れた遺伝形質を有する個体の効率的な生産を行う計画である。本法により旧来の家畜育種の方法を画期的に改善できる。本研究テーマは、最終的には家畜全般に適用可能であるが、今回は牛(肉牛、乳牛)を対象とする。牛は性成熟に達する期間や妊娠期間が長

く単胎で 1 年に 1 頭の世代間隔の長さゆえに、旧来からの家畜育種の方法では劇的な改良を望むのは困難である。本研究では、遺伝子の高密度解析と先端生殖技術を組み合わせ、消費者に受け入れられる需要の高い優良な形質を有し、生産性の高い牛を迅速で的確・効率的に作出する技術の確立を目指した。

2. 研究の目的

我々は平成 20~23 年度の基盤研究(B)により「マーカーアシスト選抜と先端生殖技術を利用したデザイナーズ家畜の生産」と題して研究を遂行し、目的の子牛生産に成功した。本研究では、さらに発展させて、優れた形質を有する雌牛の高密度遺伝子解析を行い、遺伝子情報を得た上で、体外受精などの先端生殖技術を併用して望む遺伝子を有する卵子、精子を受精させ、胚の割球からの遺伝子プロファイリングを行い優れた遺伝子構成の個体を選別・作出する。さらに着床関連遺伝子検索や正常性診断、卵子や胚の凍結技術などを組み合わせて受胎率向上を図り、産子生産に繋げる。本研究により優れた遺伝形質の家畜を効率的に作出・生産する一連の技術を構築し、今後の家畜育種の新たな展開を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

平成 24 年度では、23 年度に誕生したデザイナーズ子牛の生育状況と遺伝子多型の関連を明らかにし、SNP 高密度遺伝子解析を用いた雌牛個体(10 頭)、凍結精子(5 検体)の遺伝子解析、当該牛からの OPU による生体卵子と解析精液による体外受精胚の作出と胚の評価を行う。平成 25 年度は 5 頭の雌の解析を行い、遺伝子情報既知の雌牛から生体内卵子吸引により採取した卵子と解析済の精子を用いた遺伝子構成既知胚の体外作出とバイオプシーによる評価、OPU で得られた卵子の成熟度と顕微授精法を検討する。平成 26 年度は遺伝子構成既知胚の作出の継続、作出胚の凍結保存と移植による子牛の生産と子牛の遺伝子解析による評価、さらに体外受精胚の評価と着床率向上のための遺伝子解析を行う。

1) これまでの成果の子牛の遺伝子解析と表現形質の検証(吉澤、福井、研究協力者:新楽)

2) 雌牛と凍結精液における高密度遺伝子解析(吉澤、福井、研究協力者:新楽、川野辺)

3) 雌牛の GH、SCD、FEZL および BoLA 遺伝子等の解析(吉澤、福井、研究協力者:川野辺、新楽)

4) 遺伝子情報既知雌牛からの生体内卵子と遺伝子情報解析済の精子を用いた胚の体外作出(吉澤、松本、福井、長尾、新楽、川野辺)

平成 25 年度研究計画

1) 雌牛の高密度遺伝子解析(吉澤、福井)

2) 遺伝子情報既知雌牛からの生体内卵子と解析済の精子を用いた胚の体外作出(吉澤他全員)

3) 体外作出された胚のバイオプシーによる評価と胚の凍結保存(吉澤、福井、松本、長尾)

4) OPU により得られた卵子の体外成熟条件および顕微授精法の検討(吉澤、松本、福井、研究協力者:新楽、川野辺)

5) 作出胚の受胎雌牛への移植(長尾、研究協力者:新楽、川野辺)

平成 26 年度研究計画

1) 遺伝子情報既知雌牛からの生体内卵子と解析済の精子を用いた胚の体外作出(吉澤他全員)

2) 体外作出された胚のバイオプシーによる評価と胚の凍結保存(吉澤、福井、松本、長尾)

3) OPU により得られた卵子の成熟条件と顕微授精法の検討(吉澤、松本、研究協力者:新楽、川野辺)

4) 作出胚の受胎雌牛への移植と誕生した子牛の評価(長尾、研究協力者:新楽、川野辺)

5) 雌牛の高密度遺伝子解析(平成 25 年度分の繰越部分、吉澤、福井)

6) 得られた研究成果の社会への報告(吉澤、福井、松本、長尾、新楽、川野辺)

4. 研究成果

雌牛の高密度遺伝子解析と体外受精などの先端生殖技術を併用して、優れた遺伝子構成の個体を選別・作出することを目的として、以下のような実験を遂行し成果を得た。

1) これまでの成果の子牛の遺伝子解析と表現形質の検証

栃木県畜産酪農研究センター、芳賀分場で飼養されているデザイナー子牛のサンプルから遺伝形質を検証した。経時的な成長、増体などの詳細なデータについてまとめて、専門誌へ発表した(印刷中)。

2) 雌牛と凍結精液における高密度遺伝子解析

体外受精に供する人工授精用精液を購入し、遺伝子型を分析した。栃木県畜産酪農研究センターで使用されているホルスタイン雌牛の個体ごとの全染色体について、SNP 解析を用いて欠損や重複を網羅的に調査し、ゲノムコピー数多型: Copy Number Variation の欠損を明らかにし、学会で報告した。ホルスタイン種雌ウシ 96 頭において、6,909SNP であるイルミナ社 BovineLD Genotype BeadChip (v1.1) を用いて、全染色体における網羅的 SNP 解析を行った。その結果、全染色体において欠損は認められなかった。また、解析ソフトウェア SNP & Variation Suite 2015 (Golden Helix 社) を用いて Genotype

Association Test および Haplotype Trend Regression を行うことで、高い乳量および乳脂率と相関のある SNP が位置する染色体を解析した。これらの解析には、栃木県畜産酪農研究センターのホルスタイン種 53 頭のデータを用い、平均乳量(305 日)は約 10,400kg、平均乳脂率は約 4%であり、いずれも家畜改良増殖目標値と比較して高い値を示した。その結果、乳量では 1、5、15 番染色体、乳脂率では、2、19、21 番染色体上において相関のある SNP が認められた。

3) 雌牛の GH、SCD、FEZL および BoLA 遺伝子等の解析

乳牛においては乳房炎関連の以下の遺伝子 FEZL : Forebrain embryonic zinc finger-like 遺伝子(乳房炎抵抗性と関連する 1 塩基置換)と BoLA-DQA 1 :Bovine leukocyte antigen 遺伝子(乳房炎抵抗性と関連する 1 塩基置換)について、これら遺伝子型を解析すると同時に従来の方法でも SNP 解析を行い、結果を学会で発表した。

4) 遺伝子情報既知雌牛からの生体内卵子と解析済精子を用いた胚の体外作出

栃木県畜産酪農研究センターの遺伝子情報既知の雌牛から採取した卵子と解析済精子を用いた遺伝子構成既知胚を体外受精により作出する実験を行って胚を作出でき移植をしているが、受胎には至っておらず、再度試行している。

5. 主な発表論文等

(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 2 件)

1) 福井 えみ子、湯澤 知子、松本 浩道、川野辺 章夫、桜井 由美、大島 藤太、北條 亨、新楽 和孝、桑波田 暁子、越知 正憲、吉澤 緑、遺伝子型をデザインした黒毛和種の効率的作出の試み、日本畜産学会報、査読有、2015(印刷中)

2) 阿久津 麗、福井 えみ子、松本 浩道、吉澤 緑、黒毛和種およびニホンジカの Breast cancer 1 遺伝子における比較解析、日本比較臨床医学会誌、査読有、21:15-21、2013

[学会発表](計 10 件)

1) 鈴木 なな子、福井 えみ子、松本 浩道、土屋 秀樹、宮村 元晴、濱野 晴三、桑波田 暁子、越知 正憲、吉澤 緑、定量 PCR を用いたウシ体外生産初期胚における BRCA1 遺伝子の発現解析、第 56 回日本卵子学会学術集会、2015 年 5 月 30-31 日、栃木県総合文化センター、栃木県総合文化センター、宇都宮市

2) 鈴木 なな子、福井 えみ子、土屋 秀樹、宮村 元晴、濱野 晴三、松本 浩道、吉澤 緑、ウシ胚盤胞における BRCA1 遺伝子の発現解析、第 31 回動物生殖工学研究会、2014 年 12 月 6 日、北里大学本館、東京都

3) 吉澤 緑、福井 えみ子、松本 浩道、松本 拓也、飯村 真衣、川野辺 章夫、大島 藤太、北條 亨、遺伝子型をデザインして作出されたウシ胚のバイオプシーによる診断、第 8 回宇都宮大学企業交流会、2014 年 9 月 8 日、栃木県マロニエプラザ、宇都宮市

4) 阿久津 麗、古川 悦子、福井 えみ子、土屋 秀樹、宮村 元晴、濱野 晴三、北條 亨、大島 藤太、松本 浩道、吉澤 緑、ウシ胚盤胞における BRCA1 の発現および多型解析、日本畜産学会第 118 回大会、2014 年 3 月 26-29 日、つくば国際会議場、つくば市

5) 福井 えみ子、阿久津 麗、川野辺 章夫、藤田 健太郎、松本 拓也、飯村 真衣、大島 藤太、北條 亨、松本 浩道、吉澤 緑、ホルスタイン種におけるデザイナーズ子牛の生産、日本畜産学会第 118 回大会 2014 年 3 月 26-29 日、つくば国際会議場、つくば市

6) 藤田 健太郎、吉澤 緑、福井 えみ子、松本 浩道、花田 博文、桑波田 暁子、越知 正憲、牛精子ゲノムの複製による当該精子の染色体分析および胚作出の試み、第 9 回日本生殖再生医学会、2014 年 3 月 16 日、大阪国際会議場、大阪市、

7) 吉澤 緑、優良家畜生産のための新たな戦略 遺伝子マーカーアシストと先端生殖技術の融合によるデザイナー家畜の生産、第 28 回東日本受精卵移植技術研究会特別講演、2013 年 2 月 7 日、東日本ホテル、宇都宮市

8) 福井 えみ子、松本 浩道、川野辺 章夫、星 一美、大島 藤太、櫻野 恒平、佐藤 尚人、吉澤 緑、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、2013 年 2 月 7-8 日、東日本ホテル、宇都宮市

9) 阿久津 麗、福井 えみ子、松本 浩道、川野辺 章夫、星 一美、大島 藤太、櫻野 恒平、佐藤 尚人、吉澤 緑、高泌乳のホルスタイン種雌ウシにおける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、関東畜産学会第 67 回大会、2012 年 11 月 10 日、茨城大学農学部、稲敷郡阿見町

10) 阿久津 麗、福井 えみ子、松本 浩道、吉澤 緑、ウシおよびシカの BRCA1 遺伝子における比較解析、第 43 回日本比較臨床医学会、2012 年 7 月 14 日、専修大学生田キャン

パス、川崎市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉澤 緑 (Yoshizawa, Midori)
宇都宮大学農学部・教授
研究者番号：60114162

(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

松本 浩道 (Matsumoto, Hiromichi)
宇都宮大学農学部・准教授
研究者番号：70241552

長尾 慶和 (Nagao, Yosikazu)
宇都宮大学農学部・教授
研究者番号：70291953

(3) 連携研究者

()

研究者番号：