

ウシ伸長胚を利用した遺伝子解析技術の検討

三木 遥子¹⁾・小浜菜美子²⁾・吉田裕一¹⁾・坂瀬充洋³⁾・岩本英治¹⁾

¹⁾兵庫県立農林水産技術総合センター北部農業技術センター, 兵庫県朝来市 669-5254

²⁾兵庫県立農業大学校, 兵庫県加西市 679-0104

³⁾兵庫県立農林水産技術総合センター畜産技術センター, 兵庫県加西市 679-0198

但馬牛繁殖雌牛から回収したウシ伸長胚にバイオプシーを実施し、切断片から遺伝子解析が可能か検討した。また遺伝子解析を行う期間、ウシ伸長胚の保存が可能かを合わせて検討したところ、以下に示す結果が得られた。

- 1 ウシ伸長胚のバイオプシーは従来の7日目胚に比べて、肉眼で簡便に実施できた。
 - 2 ウシ伸長胚の切断片から遺伝子解析は可能であった。
 - 3 バイオプシー後のウシ伸長胚の緩慢凍結法による凍結融解後生存率は、100%であった。
- 以上の結果により、ウシ伸長胚からのバイオプシーは、7日目胚より簡便に実施でき、バイオプシー後の胚は緩慢凍結法で保存することで、胚の生存性を維持しながら、遺伝子解析が出来る可能性が示唆された。

キーワード: 黒毛和種, ウシ伸長胚, 遺伝子解析

You can see the English abstract on the last page of this article

結 言

ウシゲノム情報は、急速に解明されつつあり、但馬牛においても、ゲノム情報を活用することで、産肉能力の向上や、遺伝的多様性を考慮しながら改良を進めることができると期待されている。一方、生産現場における改良の手法としては胚移植技術が用いられている。この技術で、受精後7日目の胚(以下7日目胚)を回収し移植することで、産子を一度に複数生産できる。加えて胚からバイオプシーした細胞を用いた遺伝子診断技術も活用され、移植前の段階で高能力牛の選抜が可能となっている。しかし、7日目胚は、長径が150~200 μm と小さく(浜名ら, 2006)、少量の細胞しか採取することができない。そのため、細胞採取には、マイクロマニピュレーターが必要であり、その操作には高度な技術が要求される。近年、受精後14日前後の伸長胚に関する研究が進みつつある。伸長胚は、受精後13日目では約2mm, 14日目では約6mmに達することから、伸長過程において肉眼で目視可能となる。そのため、ゲノム情報を解析するための必要な細胞を得られる可能性が示唆されている。またバイオプシーに精密機器や

高度な技術を必要としないことから(木村, 2018)、7日目胚より作業が簡便になることが期待される。

しかし、ゲノム解析には、バイオプシー後の伸長胚を保存しておく必要がある。伸長胚の保存には緩慢凍結法が最も適しているという報告がある(Fujii ら, 2017)ものの、但馬牛の伸長胚での報告はない。

そこで今回、但馬牛から受精後14日目の伸長胚を回収し、バイオプシー細胞での遺伝子解析を実施するとともに、但馬牛伸長胚での緩慢凍結法の有用性を確認するため、凍結融解後の伸長胚およびバイオプシー胚の生存性を調査した。

材料および方法

1 緩慢凍結後の生存性の確認

供試材料は、但馬牛繁殖雌牛3頭(月齢および産次:91か月齢・6産, 135か月齢・9産, 110か月齢・7産)に過剰排卵処理を行い作製した伸長胚18個を用いた。過剰排卵処理は、Sakase and Fukushima(2020)らの方法に準じて行い、スタンディングによる発情確認後にGnRH類似体(コンセラー[®]注射液)100 μg を筋肉内注射し、2回にわたり人

工授精を実施した。発情開始後 14 日目に 37.5 度に温めたハルゼン-V 注射液を用いて非外科的に子宮を還流洗浄することにより伸長胚を回収した(写真 1)。採胚には、既製のバルーンカテーテルの回収穴が約 1cm になるように加工したものを用いた(写真 1)。

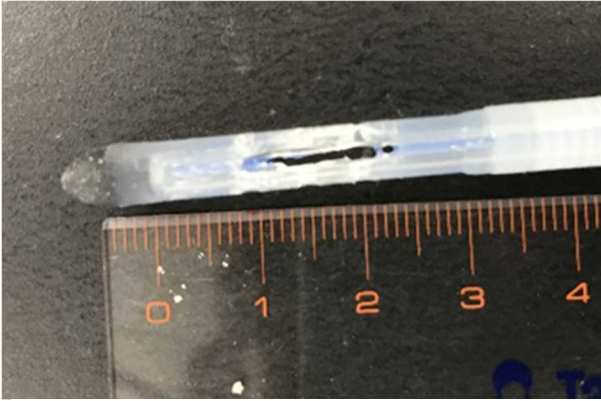


写真 1 加工したバルーンカテーテル

伸長胚は回収後、すぐに検卵を実施し、20%牛胎児血清加 Dulbeccos mPBS へ移した。採取した 18 個の伸長胚のうち 9 個は、実体顕微鏡下で伸長胚の片端を 18G の注射針により保持し、眼科用のメス刃により約 1mm 切断した(写真 2, 赤矢印)。バイオプシー胚およびバイオプシーしていない伸長胚(以下インタクト胚)を、1.5M エチレングリコール、0.2M シュークロースを含む保存液と共に 0.25ml ストローに封入し、10 分間平衡後、 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で冷却し、 -35°C で液体窒素内へ投入する緩慢凍結法で凍結し、その後 -196°C の液体窒素内にて保存した。その後、10 秒の風乾後に 37 度の湯温で融解し、顕微鏡で

確認しながら、シャーレに伸長胚を移して 20%胎児血清加 Dulbeccos mPBS で洗浄した。4 穴シャーレに、20%牛胎児血清加 TCM-199 を入れ、洗浄後の伸長胚を一個ずつ入れた。培養液をパラフィンオイルで浸し、5%CO₂、95%空気の気相条件、37.5°C のインキュベータで 7 日間培養後、胚の生存性を確認した。

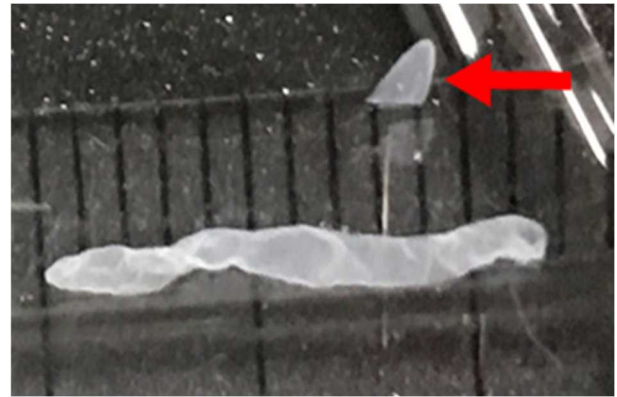


写真 2 切断片(赤矢印)と切断後の伸長胚

2 遺伝子解析の検討

供試材料には、但馬牛繁殖雌牛 2 頭(月齢および産次:65 か月齢・2 産, 154 か月齢・9 産)に、1 と同様の過剰排卵処理を行い作製した伸長胚を用いた。長径が 3mm 以上ある伸長胚を 1 と同様にバイオプシーを実施し、バイオプシーした細胞を $4\mu\text{l}$ の Dulbeccos mPBS に保存した。REPLI-g にて全ゲノム増幅法(WGA 法)を実施後、DNeasy Blood& Tissue Kit(QIAGEN)で DNA を抽出し、NanoDrop(Thermo Fisher Scientific)で濃度測定を行った。さらに抽出した DNA を用いて、バイオプシー細胞 1

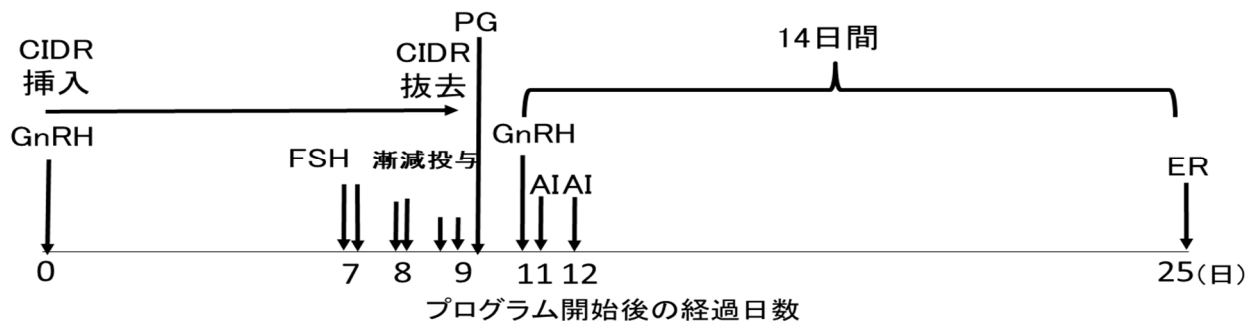


図 1 過剰排卵処理プログラム

CIDR：腔内留置型黄体ホルモン製剤、GnRH；性腺刺激放出ホルモン

FSH：前葉性卵胞刺激ホルモン、PG：プロスタグランジン F_{2α}

AI：人工授精、ER；採胚

検体につき 30K(30,000 か所)SNP チップである GGP BovineLD-24 (Illumina)を用いて SNP の型判別を行った(図 2)。

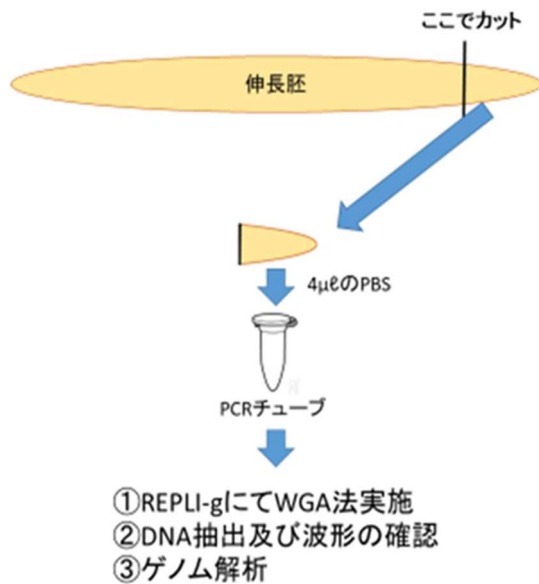


図 2 ゲノム解析の方法

結果および考察

1 緩慢凍結後の生存性の確認

バイオブシー胚およびインタクト胚について、凍結融解後 7 日目の生存率は両区とも 100%であり、バイオブシーによる影響は認められなかった。(図 3)。

7 日目胚の凍結保存方法は、緩慢凍結法およびガラス化法があり、畜産分野においては、ストロー内融解から直接牛の子宮内に移植できることから、7 日目胚の多くが緩慢凍結法で凍結保存されている(森

安,2017)。しかし、低品質で細胞数が少ない胚や性別判別等のためのバイオブシーにより損傷を受けた胚では、緩慢凍結法で凍結すると融解後の生存性や移植後の受胎性が低下する傾向にある(藤田,2003)。ガラス化法では、生存性低下を抑制できるとされているため(森安,2017)、バイオブシーした 7 日目胚の凍結保存には、ガラス化法が適しているとされている。一方、インタクト胚保存法については、緩慢凍結法とガラス化法であれば、緩慢凍結法が適している(Fujii ら,2017)との報告がある。本試験においては、緩慢凍結法で凍結融解後、バイオブシー胚およびインタクト胚どちらも生存性が 100%であったことから、バイオブシーの有無に関係なくウシ伸長胚においては、緩慢凍結法で保存が最適であると考えられた。7 日目胚は、桑実胚から胚盤胞期であり 150~200 μ m と長径が小さいため、ステージによっては、内細胞塊(ICM)を避けてバイオブシーするのが困難な場合もあると考えられる。本試験において、5 頭の但馬牛繁殖雌牛から回収された伸長胚の長径の平均値は、5.3mm であり、同一個体においても 1~12mm の範囲でばらつきはあるものの、すべての伸長胚が肉眼で確認できた。さらに、伸長胚の ICM はほぼ胚の中央に存在し、片端から約 1mm 程度の切断であれば、ICM に影響を与えることはないと考えられた。Fujii ら(2017)は、ウシ伸長胚の凍結保存について、受精後の胚における構造上の変化は、ガラス化法の耐凍剤の侵入を妨げるが、緩慢凍結法の耐凍剤の浸透性は、凍結融解後の死細胞数

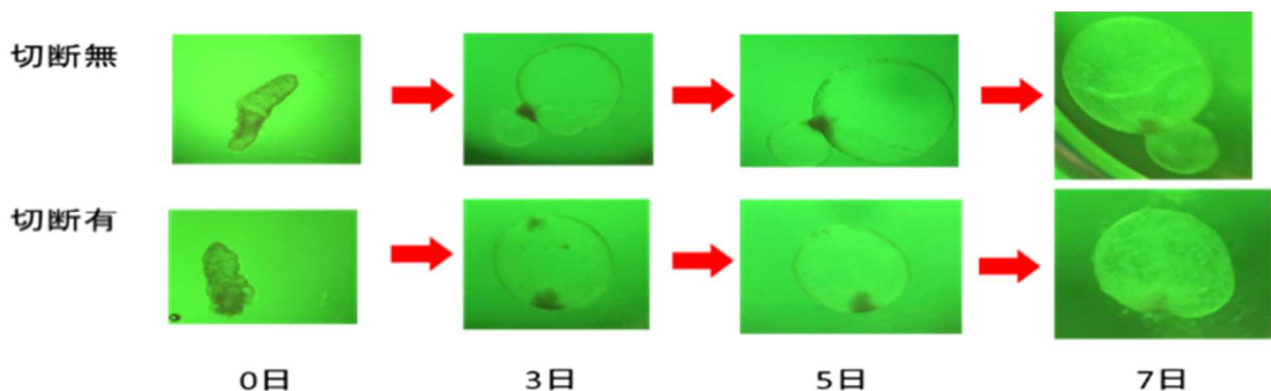


図 3 培養過程における胚の形態変化

と結びつかないと考察している。本試験においても、インタクト胚およびバイオプシー胚において、緩慢凍結法で凍結融解後の生存性が確認できたことから、透明帯からすでに脱出していることがガラス化法より緩慢凍結法が最適な理由だと考えられた。また、ウシ伸長胚回収時に起こる収縮や切断といった物理的損傷は移植後の受胎率に影響を及ぼさないことが報告されている(木村, 2018)。以上のことから、ウシ伸長胚においては、バイオプシーおよび緩慢凍結法による凍結融解は、胚の生存性に影響をあたえないと示唆される。さらにウシ伸長胚は眼科用メス刃および 18G の針を用いることで、肉眼で切断することができ、7 日目胚からの細胞採取と比較しても、簡便に実施することができた。これらのことから、着床前診断において、ウシ伸長胚の活用は有効であることが示唆された。

しかし、本技術を活用するためには、凍結保存後のバイオプシー胚を利用して、子牛が生産できなければならない。移植については、伸長胚を回収するバルーンカテーテルと同様に移植器を改良する必要がある。当センターでは、改良した移植器を用いてインタクト胚 2 個を新鮮卵移植した結果、ともに受胎、妊娠、分娩が確認されている。今後、凍結保存後のインタクト胚およびバイオプシー胚においても、移植を実施し受胎性および生産性を確認する必要がある。

2 遺伝子解析の可能性

2 頭から回収した伸長胚数は、それぞれ 12 個と 3 個の合計 15 個であった。回収した伸長胚のうち、長径が 3mm 以上の伸長胚は 8 個であり、それらから採取した約 1mm の切断片を用いて抽出した平均 DNA 濃度は、 $2,261 \pm 124 \text{ng}/\mu\text{l}$ であった。さらに、抽出した DNA を用いて、SNP タイピングを実施した結果、95%以上が必要とされる callrate (判明率) は、99%以上であり、精度の高い型判別ができることを確認した。さらに、同一個体から採取した伸長胚間で SNP 型の違いも確認できた。

遺伝子解析に必要なとされる DNA 量は、50～

100ng/ μl であることから、ウシ伸長胚のバイオプシー細胞から、十分な DNA 量を得ることができたと考えられる。また、同一個体から採取された胚の SNP 型に違いがあることは、全きょうだいであっても能力差があることを示唆しており、胚段階で高能力牛の選抜が期待される。

近年、ウシの遺伝子解析は、日々進歩しており、産肉能力のみならず、種牛性や繁殖性及び抗病性遺伝的な系統分類にも活用されている。本県においても SNP 情報を活用することも期待できる。今後、伸長胚を用いることで、簡便に遺伝子解析が実施できれば、但馬牛のさらなる改良に活用できると考えられる。

引用文献

- 浜名克己、中尾敏彦、津田茂久編(2016): 獣医繁殖学 文永堂出版, p225
- 木村康二(2018): ウシ伸長期胚の非外科的移植技術 岡山大学農学部学術報告 Vol.107,19-24
- Fujii T, Hirayama H, Naito A, Kashima M, Sakai H, Fukuda S, Yoshino H, Moriyasu S, Kageyama S, Sugimoto Y, Matsuyama S, Hayakawa H and Kimura K (2017): Production of calves by the transfer of cryopreserved bovine elongating conceptuses and possible application for preimplantation genomic selection Journal of Reproduction and Development, Vol.63, No5
- Sakase M and Fukushima M (2020): Necessity of exact examination of sperm characteristics to assess artificial insemination-subfertile bulls Journal of Reproduction and Development, Vol.66, No3, 2020
- 森安悟(2017): 牛生産の現場における精子および受精卵凍結保存技術の現状と方向性 低温生物工学会誌 Vol63, No.2, 89～93
- 藤田達(2003): 牛性判別胚のダイレクト法とガラス化保存法の比較ならびに性判別精度 畜産技術, 2, 26-29

Study of Gene analysis technology used Bovine Elongating Conceptuses

Yoko MIKI¹⁾, Namiko KOHAMA²⁾, Yuichi YOSHIDA¹⁾, Mitsuhiro SAKASE³⁾, Eiji IWAMOTO¹⁾

¹⁾Hokubu Agricultural Technology Institute, Hyogo Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries, Hyogo Prefecture, Asago 669-5254

²⁾Hyogo Prefectural Agricultural College, Hyogo Prefecture Hyogo Prefecture Kasai 679-0104

³⁾Hyogo Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries. Hyogo Prefecture, Kasai 679-0198

This paper examines possibility of gene analysis technology used fragment of bovine elongating conceptuses recovered from Japanese Black cattle. Furthermore, we examine possibility that Bovine elongating conceptuses can cryopreserve while gene analysis was in execution. The following results were obtained.

(1) Biopsy of Bovine elongating conceptuses was easy to implement by the naked eye compared to that of blastocyst.

(2) The gene analysis from fragment of bovine elongating conceptuses was possible.

(3) A survival rate after slow freezing and thawing biopsied cell of bovine elongating conceptuses was 100 percent.

These results suggested that we could biopsied from bovine elongating conceptuses and by slow freezing, gene analysis could done while maintaining viability of bovine embryo.

Key Words : Japanese Black breed, Bovine elongating conceptuses, genetic analysis