

遺伝子マーカーを利用した計画的交配技術の開発

新楽和孝、野澤久夫、櫻井由美、川野辺章夫
福井えみ子¹⁾、松本浩道¹⁾、吉澤緑¹⁾

1) 宇都宮大学農学部

要 約

成長ホルモン (GH)、脂肪酸不飽和化酵素 (SCD) 遺伝子が、望む遺伝子型となる子牛を、人工授精や生体卵子吸引-体外授精 (OPU-IVF) を用いて効率的に生産することを目的に、血統と遺伝子型出現頻度の関係や、遺伝子解析結果に基づいて計画的に交配した場合の産子の遺伝子型出現頻度を調査した。また、遺伝子解析済みの老齢牛や長期不受胎牛と凍結精液を用いた OPU-IVF において、OPU 前の卵胞刺激処置や卵胞発育同調処理が OPU-IVF 成績に及ぼす影響を調査した。

- 1) 増体系種雄牛との血縁が強いほど、GH 遺伝子は L 対立遺伝子、SCD 遺伝子は V 対立遺伝子の頻度が高かった。
- 2) 子牛の GH 遺伝子が LV 型、SCD 遺伝子が AA または AV 型となるよう、母牛と凍結精液の遺伝子解析結果に基づいて交配したところ、子牛の LV 型の出現頻度が母牛よりやや低かったが、子牛の AA、AV 型の出現頻度は母牛より高かった。
- 3) OPU 実施前に CIDR と EB 製剤による卵胞発育同調処置と FSH 製剤による卵胞刺激処置を施したところ、OPU 実施時の卵胞数が増加し、IVF により胚盤胞が作出された。

目 的

種雄牛を保有しない本県において、県産牛肉の市場競争力を向上させるためには、繁殖雌牛牛群の改良の効率化が求められる。近年、牛の発育や枝肉成績に影響する成長ホルモン (GH) 遺伝子^{1)、2)}や、脂肪組織中の脂肪酸組成に影響する脂肪酸不飽和化酵素 (SCD) 遺伝子³⁾等、経済形質を左右する遺伝子マーカーが報告されている。交配する種雄牛を選定する際に、これらの遺伝子の遺伝子型を考慮して計画的に交配を行うことで、これまで育種価によって進められてきた枝肉形質の改良を更に効率的に進められるだけでなく、牛肉中の脂肪酸組成等の育種価評価されていない形質にも遺伝的な改良を加えることができると期待される。

一方、繁殖雌牛が生涯に利用できる生殖細胞の数は、種雄牛と比較して圧倒的に少ない。また、高い能力を持ちながらも長期不受胎となり、後継牛を十分に残せないまま淘汰対象となる繁殖雌牛も存在する。生体卵子吸引と体外授精 (OPU-IVF) は、生体から採取した卵子を用いて体外授精を行う技術であり、そのような長期不受胎牛に対しても実施できる。OPU-IVF と遺伝子解析を併用することで、繁殖雌牛側の遺伝資源を有効活用できるとともに、望む遺伝子を有する牛をより多く生産することができると考えられる。

そこで、本試験においては、血統と遺伝子型出現頻度の関係や、遺伝子解析結果に基づいて交配した場合

の産子の遺伝子型出現頻度を調査し、望む遺伝子型を有する子牛を効率的に生産するための交配方法を検討した。また、遺伝子解析済みの老齢牛や長期不受胎牛と凍結精液を用いた OPU-IVF によって、優良な遺伝子を持つ子牛を効率的に生産することを目的に、OPU 実施前のホルモン処置が OPU-IVF 成績に及ぼす影響を調査した。

材料及び方法

試験 1

千国ら⁴⁾の報告に基づいて GH 遺伝子の遺伝子型を、また、Taniguchi ら³⁾の報告に基づいて SCD 遺伝子の遺伝子型を解析した黒毛和種繁殖雌牛各 98 頭を調査対象とした。気高系、藤良系及び栄光系の種雄牛を増体系、田尻系、茂金系及び菊美系の種雄牛を資質系に分類し、調査対象牛の父及び母の父 (祖父) にあたる種雄牛の組み合わせと遺伝子型の出現頻度の関係を調査した。

試験 2

GH、SCD 遺伝子の遺伝子型が明らかな當場飼養の黒毛和種繁殖雌牛 (母牛) 20 頭と 2 種類の凍結精液を用いて、産子の GH 遺伝子が LV 型、SCD 遺伝子が AA または AV 型となるよう計画的に人工授精を実施し、受胎、分娩した母牛 17 頭と生産された子牛 17 頭を調査対象とした (表 1、2)。生産された子牛の遺伝子型を解析し、

母牛における遺伝子型出現頻度と比較した。

表 1 交配種雄牛の GH、SCD 遺伝子の遺伝子型

交配種雄牛	GH 遺伝子	SCD 遺伝子
種雄牛①	LV	AA
種雄牛②	VV	AV

表 2 調査対象とした母牛の遺伝子型と交配種雄牛

母牛の遺伝子型			産子数 (頭)
GH 遺伝子	SCD 遺伝子	交配種雄牛	
LL	AV	②	2
LV	AA	①	2
		②	1
LV	AV	①	5
LV	VV	①	5
VV	AV	①	2

試験 3

当場で飼養する長期不受胎の繁殖雌牛を OPU 供卵牛とし、OPU 前の卵胞刺激ホルモン (FSH) の投与や卵胞発育同調処理が OPU-IVF 成績に及ぼす影響を調査した。OPU には超音波診断装置 (本多電子株式会社 HS-1500)、採卵針ガイド付きコンベックス型プローブ、採卵針はミサワ医科工業のディスプレイブル採卵針を用いた。超音波画像上で直径 2mm 以上の卵胞に採卵針を刺入し、吸引圧 120mmHg で卵胞内の卵丘卵子複合体 (COC) を吸引した。採取した COC は 21~22 時間の成熟培養、5 時間の媒精後、5%CO₂、90%N₂、39°C 下で発生培養に供した。そして、媒精から 7~9 日目における胚盤胞への発生を観察した。

(1) 低単位 FSH 製剤単回投与の影響

供卵牛として長期不受胎の経産牛 4 頭 (平均年齢 13.1 ± 0.3 歳) を用い、各々 2 回の OPU-IVF を実施した。1 回目は任意の時期に無処置のまま、2 回目は発情から 3 日目に FSH 製剤 5AU を筋肉内に投与し、その 2 日後に OPU-IVF を実施した。卵胞は大卵胞 (直径 8mm 以上)、中卵胞 (直径 5mm 以上 8mm 未満)、小卵胞 (直径 5mm 未満) に分類し、1 回目と 2 回目における OPU 実施時の卵胞数、採取 COC 数及び胚発生成績を比較した。

表 3 父と祖父の系統の組み合わせと GH 遺伝子の遺伝子型出現頻度の関係

血統	遺伝子型出現頻度 (%)			対立遺伝子頻度	
	LL 型	LV 型	VV 型	L	V
父と祖父が共に増体系種雄牛 (n=20)	20.0	70.0	10.0	0.550	0.450
父と祖父のいずれかが増体系種雄牛 (n=67)	1.5	74.6	23.9	0.388	0.612
父と祖父が共に資質系種雄牛 (n=11)	0.0	18.2	81.8	0.091	0.909

(2) 卵胞発育同調処置の影響

供卵牛として長期不受胎の未経産牛 1 頭 (年齢 3.9 歳) を用いた。試験開始前に超音波画像上で卵胞数を確認し、その後 2 回の OPU-IVF を実施した。OPU-IVF 実施前には、各回異なる方法で卵胞発育同調処理を行った。1 回目は、徐放性プロジェステロン製剤 (CIDR) を膈内に挿入し、その 3 日後に酢酸フェルチレリン (GnRH) 製剤 100 μg を筋肉内に投与した。更にその 2 日後から FSH 製剤 20AU を 3 日間漸減投与して、FSH 製剤投与終了から 2 日後に CIDR を除去して OPU-IVF を実施した。2 回目は、CIDR 挿入時に安息香酸エストラジオール (EB) 製剤 0.5mg を筋肉内に投与した。更にその 5 日後から FSH 製剤 20AU を 3 日間漸減投与して、FSH 製剤投与終了から 2 日後に CIDR を除去して OPU-IVF を実施し、1 回目と 2 回目における OPU 実施時の卵胞数、採取 COC 数及び胚発生成績を比較した。

結果及び考察

試験 1

血統と遺伝子型出現頻度の関係を調査したところ、GH 遺伝子の遺伝子型出現頻度は、父と祖父が共に資質系種雄牛である牛では、VV 型の出現頻度が 81.8% と高かった。それに比べ、父と祖父の少なくとも一方が増体系種雄牛である牛では、LV 型や LL 型の出現頻度が高かった (表 3)。

SCD 遺伝子の遺伝子型出現頻度は、父と祖父が共に資質系種雄牛である牛では AA 型の出現頻度が高く、父及び祖父の少なくとも一方が増体系種雄牛である牛では、AV 型や VV 型の出現頻度が高かった (表 4)。

対立遺伝子頻度を比較すると、増体系種雄牛との血縁が強いほど GH 遺伝子は L 型、SCD 遺伝子は V 型の頻度が高く、逆に資質系種雄牛との血縁が強いほど GH 遺伝子は V 型、SCD 遺伝子は A 型の頻度が高い傾向があった。以上のことから、血統に配慮しながら交配することで、目的とする遺伝子型を有する子牛を多く生産できる可能性が示された。

表4 父と祖父の系統の組み合わせと SCD 遺伝子の遺伝子型出現頻度の関係

血統	遺伝子型出現頻度 (%)			対立遺伝子頻度	
	AA 型	AV 型	VV 型	A	V
父と祖父が共に増体系種雄牛 (n=20)	15.0	50.0	35.0	0.400	0.600
父と祖父のいずれかが増体系種雄牛 (n=66)	27.3	59.1	13.6	0.569	0.431
父と祖父が共に資質系種雄牛 (n=12)	50.0	33.3	16.7	0.667	0.333

試験2

産子の GH、SCD 遺伝子が望む遺伝子型 (GH 遺伝子: LV 型、SCD 遺伝子: AA または AV 型) となるよう、母牛と凍結精液の遺伝子解析結果に基づいて計画的に人工授精を実施した。その結果、GH 遺伝子の各遺伝子型の頭数は、母牛では LL 型 2 頭 (11.8%)、LV 型 13 頭 (76.4%)、VV 型 2 頭 (11.8%)、子牛では LL 型 4 頭 (23.5%)、LV 型 9 頭 (53.0%)、VV 型 4 頭 (23.5%) であり、子牛における LV 型の出現頻度はやや減少した (表 5)。本試験では、発育や枝肉重量等に好ましい影響を及ぼすとされる L 対立遺伝子^{1), 2)}と、肉質に好ましい影響を及ぼすとされる V 対立遺伝子⁵⁾を併せ持つヘテロ (LV 型) の子牛生産を目的として交配計画を立てた。しかし、LV 型の母牛に対しては、どの遺伝子型の凍結精液を用いても産子が LV 型となる確率は 50% であるため、複数世代にわたって LV 型の出現頻度を高く維持することは難しい。本試験においても、母牛における LV 型の出現頻度が高かったため、その子牛の世代において LV 型の出現頻度を維持できなかったと考えられる。一方、試験 1 において、父と祖父の少なくとも一方が増体系種雄牛である牛の 79.3% が LV 型であり、GH 遺伝子の遺伝子型出現頻度には血統による偏りが認められた。このことから、LV 型の子牛生産を目的とする場合、母牛や凍結精液の遺伝子型

を確認する意義は大きく無いものと考えられた。

SCD 遺伝子の各遺伝子型の頭数は、母牛では AA 型 3 頭 (17.6%)、AV 型 9 頭 (52.9%)、VV 型 5 頭 (29.5%)、子牛では AA 型 7 頭 (41.2%)、AV 型 10 頭 (58.8%)、VV 型 0 頭 (0.0%) であり、子牛の世代で AA、AV 型の出現頻度は増加した (表 5)。本試験においては、牛肉中の不飽和脂肪酸割合を増加させる効果が期待できる A 対立遺伝子³⁾を有する子牛生産を目的とした交配計画を立てた。この場合、AV、VV 型の母牛には AA 型の凍結精液を用いることで、また、AA 型の母牛にはいずれの遺伝子型の凍結精液を用いても確実に目的の遺伝子型の子牛を生産することができる。本試験においても、母牛と凍結精液の遺伝子解析結果に基づき計画的に交配を行った結果、全ての子牛が AA または AV 型となった。試験 1 においても、父と祖父が共に資質系種雄牛である場合に AA 及び AV 型の出現頻度が 83.3% と最も高いことから、血統に配慮した交配によっても高い確率で目的とする遺伝子型の子牛を生産できると考えられた。しかし、ヘテロの子牛生産を目的とした場合と異なり、一方の対立遺伝子頻度の増加を図る場合には、血統に配慮して交配するよりも、遺伝子解析結果に基づいて交配する方がより効率的に望む遺伝子型の子牛を生産できると考えられた。

表5 GH、SCD 遺伝子の解析結果に基づき計画的に交配した母牛とその産子の遺伝子型出現頻度

項目	GH 遺伝子 (%)			SCD 遺伝子 (%)		
	LL 型	LV 型	VV 型	AA 型	AV 型	VV 型
母牛 (n=17)	11.8	76.4	11.8	17.6	52.9	29.5
子牛 (n=17)	23.5	53.0	23.5	41.2	58.8	0.0

試験3

(1) 低単位 FSH 製剤単回投与の影響

OPU-IVF における低単位 FSH 製剤単回投与の影響を調査するため、黒毛和種 4 頭を用いて各 2 回の OPU-IVF を実施した (1 回目: 無処置、2 回目: OPU 実施前に FSH 製剤 5AU を投与)。OPU 実施時の卵胞数は、1 回目は大卵胞数 1.0 ± 0.7 個、中卵胞数 5.8 ± 2.0 個、小卵胞数 18.5 ±

4.6 個、総卵胞数 25.3 ± 3.1 個、2 回目は大卵胞数 1.8 ± 1.4 個、中卵胞数 20.0 ± 1.8 個、小卵胞数 15.5 ± 3.4 個、総卵胞数 37.3 ± 4.4 個であり、2 回目の中卵胞数、総卵胞数が有意に多かった。また、採取した COC の数も 1 回目が 10.0 ± 3.2 個、2 回目が 14.5 ± 6.6 個で、2 回目の方が多い傾向が認められた。しかし、卵割率には有意な差は認められず、1 回目、2 回目ともに移植可能な胚盤胞を作

出することはできなかった(表6)。

OPU実施前の低単位FSH製剤投与については、繁殖障害のホルスタイン種においても報告されており、10AUのFSU製剤を単回投与することで、OPU実施時の卵胞数や採取卵子数が増加する傾向が認められている⁶⁾。今回、長期不受胎の黒毛和種においてもOPU実施前に5AUのFSH製剤を1回投与することで、OPU実施時の総卵胞数と中卵胞数が増加することが確認され、より多くのCOCを採取できると考えられた。しかし、胚盤胞の生産には至らなかったことから、FSH製剤の投与量や投与時期について更なる検討が必要と考えられた。

表6 OPU-IVF成績(試験3の(1))

項目	1回目	2回目
大卵胞数(個)	1.0±0.7	1.8±1.4
中卵胞数(個)	5.8±2.0a	20.0±1.8b
小卵胞数(個)	18.5±4.6	15.5±3.4
総卵胞数(個)	25.3±3.1a	37.3b±4.4b
採取COC数(個)	10.0±3.2	14.5±6.6
卵割数(個)	5.8±1.6	4.0±2.7
胚盤胞数(個)	0.0	0.0

同行異符号間で有意差(p<0.05)

(2) 卵胞発育同調処置の影響

黒毛和種1頭を用い、異なる卵胞発育同調処置法で2回のOPU-IVFを実施した(1回目:GnRH投与、2回目:CIDR挿入とEB製剤投与)。供試牛の試験開始前の卵胞数は大卵胞数2個、中卵胞数9個、小卵胞数9個、総卵胞数20個であった。1回目のOPU実施時の卵胞数は、大卵胞数5個、中卵胞数9個、小卵胞数6個、総卵胞数20個と、試験開始前に比べ大卵胞の増加傾向は見られたものの、総卵胞数は変わらなかった。2回目のOPU実施時の卵胞数は、大卵胞数15個、中卵胞数16個、小卵胞数7個、総卵胞数38個で、16個のCOCを採取し、IVFにより1個の胚盤胞を作出した(表7)。

体内胚生産においては、過剰排卵処置開始時に主席卵胞が存在すると、他の卵胞の発育が阻害されて採胚成績が低下すると言われている^{7)、8)、9)、10)}。そこで、過剰排卵処置前にGnRH製剤を投与して主席卵胞を排卵させる方法や、プロジェステロン製剤とEB製剤を併用して発育中の卵胞を退行させる方法等により、新たな卵胞波を誘起(卵胞発育同調処置)してから過剰排卵処置を開始することで、採胚成績の向上が図られている¹¹⁾。しかし、卵胞波の発育初期の卵胞顆粒層細胞からは黄体形成ホルモン(LH)受容体のmRNAが検出されず^{12)、13)}、LH製剤を投与しても排卵が誘起されない場合があることが報告されている¹⁴⁾。従って、GnRH製剤の投与によってLHサージが誘起されたとしても、それが卵胞波の発育初期であった場合には排卵が起こらないことがあると考えられる。本試験では、GnRH投与時の卵胞の発育状況は確認しなかったが、1回目のOPU-IVFにおけるGnRH投与が卵胞波の発育初期であった可能性がある。そのために排卵が誘起されず、FSH製剤投与時には主席卵胞が選抜されてしまい、卵胞刺激処置の効果が十分得られなかったと推測された。

以上の結果から、CIDRとEB製剤による卵胞発育同調処置とFSH製剤による卵胞刺激処置を施すことで、OPU時の卵胞数、採取卵子数が増加し、体外胚をより効率的に生産できると考えられた。

表7 OPU-IVF成績(試験3の(2))

項目	1回目	2回目
大卵胞数(個)	5	15
中卵胞数(個)	9	16
小卵胞数(個)	6	7
総卵胞数(個)	20	38
採取COC数(個)	10	16
卵割数(個)	4	4
胚盤胞数(個)	0	1

参考文献

- 1) 片岡博行, 馬場誠, 石川和人, 塚本章夫(2000). 岡山県の黒毛和種におけるウシ成長ホルモン遺伝子の多型と産肉性. 岡山県総合畜産センター. 11:1-4.
- 2) 安田康明, 遠藤治, 森脇秀俊, 板垣勝正(2000). 島根県における牛成長ホルモン遺伝子の多型について. 島根県畜産試験場研究報告. 33:17-19.
- 3) Taniguchi M, Utsugi T, Oyama K, Mannen H, Kobayashi M, Tanabe Y, Ogino A, Tsuji S (2004). Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black

cattle. *Mammalian Genome*. 14:142-148.

- 4) 千国幸一, 寺田文典, 陰山聡一, 小石川常吉, 加藤貞雄, 小堤恭平(1991). PCR法を用いた牛成長ホルモン遺伝子127番アミノ酸部位塩基配列の多型検出. *日本畜産学会報*. 62:660-666.
- 5) Schlee P, Graml R, Rottmann O, Pirchner F (1994). Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 111: 253-256.
- 6) 川野辺章夫, 星一美, 大島藤太, 稲葉浩子, 新楽和孝, 玉野慎也, 横尾圭一(2012). 繁殖障害牛の卵胞刺激ホルモン(FSH)投与によるOPU-IVF胚生産. 第27回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会要旨. 62-63. OPU技術による体外受精卵の生産効率向上
- 7) Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ(1992). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*. 94:177-88.
- 8) Guilbault LA, Grasso F, Lussier JG, Rouillier P, Matton P(1991). Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *Journal of Reproduction and Fertility*. 91:81-89.
- 9) Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP(1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*. 87:223-30.
- 10) 小林修一, 生水誠一, 阿部恭一, 高岸実, 加藤武市, 福井幸昌, 内海恭三. 1997. ウシ発情周期における卵胞動態の超音波画像診断装置による解析と過剰排卵反応. *日本畜産学会報*. 6: 45-53.
- 11) 小西一之, 堂地修, 岡田真人, 宮沢彰, 橋谷田豊, 後藤裕司, 小林修司, 今井敬. 1997. 黒毛和種未経産牛におけるCIDRとFSHを用いた過剰排卵処理成績に及ぼすEstradiol-17 β の効果. *日本畜産学会報*. 68:1075-1084.
- 12) Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS(1995). Expression of follicle-stimulating hormone and Luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction*. 53:951-957.
- 13) Ireland JJ, Roche JF(1982). Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology*. 111:2077-2086.
- 14) Sartori S, Frick PM, Ferria JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC(2001). Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*. 65:1403-1409.

Development of planned Breeding Technique That Genetic Markers Were Used for

To develop the technique to produce efficiently calves that have expected genotypes of growth hormone (GH) and stearoyl-CoA desaturase (SCD) genes by artificial insemination and ovum pick up - in vitro fertilization (OPU-IVF), we researched for relationship between lineage and genotypic frequencies, and examined genotypic frequencies of calves produced by breeding plan based on genotypes of sires and dams. In addition, we examined effects of follicular growth treatment and synchronization of follicular growth on OPU-IVF using old dams and infertile dams and frozen sperm the genotypes of which identified.

- 1) As for GH and SCD genotypes, the L allele and the V allele are respectively so frequent that a blood relative with the so called gain-line sires was strong.
- 2) The dams and the frozen sperm were deliberately crossbred based on genotypes of them, in the expectation

that the GH genotype of calves became LV and the SCD genotype of them became AA or AV. As a result, the LV frequency of GH genotypes was slightly lower in the calves than in the dams, but AA or AV frequency of SCD genotypes was higher in the calves than in the dams.

- 3) After the synchronization of follicular growth with controlled internal drug release (CIDR) and estradiol benzoate EB preparation and follicular growth treatment with FSH preparation before OPU enforcement, the number of the follicles at the time of the OPU enforcement increased, and a blastocyst was produced.