

ウシの経済形質に関連する遺伝子多型および初期胚の遺伝子  
発現プロファイル解析

2019.3

東京農工大学大学院  
連合農学研究科  
生物生産科学専攻

張 傳強

## 学 位 論 文 要 旨

### ウシの経済形質に関連する遺伝子多型および初期胚の遺伝子発現プロファイル解析 Analyses of genetic variations and gene expression profiles in the early embryo for bovine economic traits

生物生産科学専攻 動物生産学大講座  
張 傳強

日本における家畜改良は、家畜改良増殖目標に従い進められており、これまでにホルスタイン種では乳質および乳量に関する形質について目覚ましい成果を挙げてきた。しかしながら、ここ数年の受胎率の全国平均は低下傾向にあり、特に乳用牛であるホルスタイン種では深刻な問題となっている。また、飼養頭数の減少および経産牛の供用期間も短縮傾向にある。2025年までのホルスタイン種の経済形質における目標は、乳脂肪率などの乳成分においては現在の値を維持し、乳量を9,500~10,000kgに改良していくというものである。この改良増殖目標を目指して、農林水産省は、SNPを利用した遺伝子解析技術の導入および体外生産された受精卵を用いた優良後継牛の効率的生産技術の推進を図っている。

本研究では、高い経済形質を維持するためにゲノムワイド関連解析により、栃木県内の高い乳量および乳脂肪率のホルスタイン種雌集団(T集団)におけるマーカー遺伝子の探索を行い、また、受胎率低下の対策に寄与できる新規のマーカー遺伝子を探索するために、ヒトやマウスにおいて着床に関わることが報告されている遺伝子について、体外生産されたウシの初期胚における遺伝子発現プロファイルを作成し、受胎しやすい胚の品質評価においてマーカーとなる遺伝子の探索を試みた。

第1章では、ウシの育種改良現状を整理し、本研究で解析する遺伝子の研究経緯を論じた。

第2章では、乳量、乳脂肪率および産歴において優れた能力を持つT集団においてゲノムワイド関連解析(genome-wide association study: GWAS)を行った。その結果、乳脂肪率と相関があるSNP(single nucleotide polymorphism)マーカーがウシ第14番染色体上の

*DGAT1*(*Diacylglycerol acyl transferase 1*)遺伝子の領域に検出された。そこで T 集団における *DGAT1* 遺伝子の遺伝子型構成および乳脂肪率との関連性を解析した。*DGAT1* 遺伝子の AA 型、AK 型および KK 型を有するホルスタイン種の平均乳脂肪率(±標準誤差)はそれぞれ 3.82 (± 0.41)%、3.91 (± 0.39)%、4.52 (± 0.47)%であり、KK 型を有するウシの平均乳脂肪率は AA 型および AK 型を有するウシより有意に高かった。

以上の結果より、*DGAT1* 遺伝子の KK 型は、乳脂肪率の遺伝子マーカーとして有効であり、T 集団における乳脂肪率の維持および向上に貢献できると考えられた。

第 3 章では、T 集団の経産牛および不妊牛において、*BRCA1*(*Breast cancer 1*)遺伝子の *BRCA1* cDNA の塩基配列および SNP1257 と不妊との関連性を解析し、また、体外生産された黒毛和種の初期胚における *BRCA1* 発現プロファイルを作成した。*BRCA1* cDNA は 5,550bp であり、1,257bp で 1 つの SNP(SNP1257)のみが同定された。SNP1257 の対立遺伝子頻度は、経産牛と不妊牛との間に有意差はなかった。*BRCA1* 遺伝子の発現量は、黒毛和種の 2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚、胚盤胞および脱出胚盤胞において有意な差はなかった。また、*BRCA1* タンパク質は、黒毛和種の 2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚の割球の接着部分ではなく、割球表面全体に発現していた。胚盤胞および脱出胚盤胞において、*BRCA1* タンパク質は内細胞塊では発現していなかったが、栄養外胚葉に発現していた。

以上のことから、ウシ *BRCA1* は初期胚において細胞分化および胚発生の制御において働いていることが示唆された。

第 4 章では、ホルスタイン種および黒毛和種における、経産牛および不妊牛の *CXCR1*(*Chemokine (C-X-C motif) receptor 1*)遺伝子の 5 つの SNP と不妊の関連性を解析した。また、黒毛和種の初期胚において *CXCR1* 遺伝子発現プロファイルを作成した。

本研究のホルスタイン種および黒毛和種において、それぞれの経産牛と不妊牛との間に、5 つの SNP の対立遺伝子の出現率では有意差は認められず、共通のハプロタイプは存在しなかった。この結果より、本研究の *CXCR1* の 5 つの SNP の対立遺伝子は、ウシの不妊に関わっていないことが明らかとなった。黒毛和種の初期胚において、*CXCR1* 遺伝子の発現量は、2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚では発現は認められず、胚盤胞で発現していた。

以上のことから、*CXCR1* は 2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚では働いていないことが示唆された。

本研究により、栃木県の T 集団において、*DGAT1* 遺伝子が乳脂肪率のマーカー遺伝子となることが明らかとなった。また、体外生産されたウシの初期胚において、*BRCA1* および *CXCR1* 遺伝子の発現プロファイルが作成され、*BRCA1* はウシ初期胚の細胞周期や栄養外胚葉の分化において働いていることが示唆された。

これらの結果は、ホルスタイン種雌集団における高い乳脂肪率の維持と体外生産されたウシ胚の受胎率低下への対策の一助となると考えられた。

# 目 次

第 1 章 緒論.....	1
第 2 章 ホルスタイン種の経済形質に関わる遺伝子多型を用いた選抜指標の探索.....	7
第 1 項 T 集団におけるゲノムワイド関連解析.....	8
目的.....	8
材料および方法.....	8
結果.....	11
考察.....	12
第 2 項 T 集団における <i>DGATI</i> 遺伝子の乳脂肪率におけるマーカーとしての検討.....	17
目的.....	17
材料および方法.....	18
結果.....	21
考察.....	22
第 3 章 ウシの初期胚における <i>BRCA1</i> 発現プロファイル解析.....	32
第 1 項 T 集団における <i>BRCA1</i> 遺伝子および SNP の解析.....	34
目的.....	34
材料および方法.....	34
結果.....	37
考察.....	38

第2項 初期胚における <i>BRCA1</i> の発現解析.....	43
目的.....	43
材料および方法.....	43
結果.....	49
考察.....	50
第4章 ウシの初期胚における <i>CXCR1</i> 遺伝子の発現プロファイル解析 .....	61
第1項 ウシにおける <i>CXCR1</i> 遺伝子の多型解析.....	64
目的.....	64
材料および方法.....	64
結果.....	67
考察.....	69
第2項 初期胚における <i>CXCR1</i> 遺伝子の発現解析 .....	76
目的.....	76
材料および方法.....	76
結果.....	78
考察.....	79
第5章 総合考察.....	82
参考文献.....	86
謝辞.....	101

## 第1章 緒論

日本における、これまでの乳用牛の改良は、乳用牛の能力向上を目的として、登録事業により収集された血縁情報を基礎に、雌牛の能力測定を行う牛群検定と優良な種雄牛を選抜するための後代検定により推進されてきた(農林水産省, 2017)。以上の方法により、これまでの25年間、ホルスタイン種の1頭当りの乳脂肪率および乳量などの形質は目覚ましい成果を挙げてきた(図 1-1)。例えば、1989年では、1頭あたりの305日検定成績(日2回搾乳)は、日本全国の平均乳脂肪率が3.69%、平均乳量が7,705kgであり、2014年では、日本全国の平均乳脂肪率が3.92%、平均乳量が9,382kgであり、それぞれ、乳脂肪率は0.23%増加し、平均乳量は1,677kg増加した(家畜改良事業団, 2018)。

しかしながら、現在、飼養頭数は減少傾向にあるため日本全体的な生乳生産量の回復は難しく、また人工授精による受胎率は低下を続けている。また、良質な生乳生産は、牛乳、乳製品の多様な用途に安定的に消費者ニーズに対応するうえで重要である。したがって、2015年(平成27年)農林水産省は、2025年までにホルスタイン種の乳脂肪率は3.9%を維持しながら、乳量は9,500~10,000kgという目標を示している。さらに、受胎率の改善を図るために、ウシの受胎や胚着床に関わる調査研究が課題となっている。

近年、農林水産省は、ゲノミック評価のためのSNP(single nucleotide polymorphism)解析技術を活用することによりリファレンス集団の解析充実のための取り組みを推進しており、優良後継牛の効率的な生産を促進するとともに受精卵を用いた和牛子牛の生産拡大における計画的な取り組みを推進している。

SNP は点突然変異による一塩基置換によって生じる多型である。遺伝子の質的・量的異常を引き起こす SNP は、家畜の経済形質に役立つ情報となり、経済形質関連遺伝子を探索するためのマーカーとして重要である。SNP 解析は、従来、特定のゲノム配列中の SNP を検出するために PCR 後の DNA を制限酵素処理する RFLP 法(restriction fragment length polymorphism)、ゲル電気泳動による SSCP 法(single strand conformation polymorphism)が用いられてきた(Kan *et al.*, 1978; Orita *et al.*, 1989)。しかし、操作が煩雑で工程が多く正確な結果が得られない場合があり、2000 年代には簡便で汎用性がある解析方法が求められるようになった。そこで、高速かつ大量に SNP タイピングが可能な TaqManPCR 法、SNaP Shot 法および DNA マイクロアレイなどのさまざまな分析法が開発された(Ohnishi *et al.*, 2001)。家畜においても高密度 SNP アレイが開発され、経済形質に関するゲノムワイド関連解析が行われるようになってきた (Karim *et al.*, 2011)。ウシのゲノム上には数百万の SNP があるといわれており、以上の SNP 解析方法を用いたゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS)が行われている。ゲノムワイド関連解析は、遺伝子を特定せずに SNP などの多型解析を全ゲノム上に適応し網羅的に解析する手法である(Balding *et al.*, 2006)。また、乳用牛においては、Illumina 社(2009)により 6,000 SNP のチップが開発され、ウシの経済形質における遺伝子マーカーを探索することができるようになった。

ウシ受胎率の改善を図るためには、受胎に関わる遺伝子の探索および胚発生に関連遺伝子を探索することが必要である。また、栃木県は安定的に生乳を供給するとともに、遺伝的能力の高い育成雌牛の受精卵活用を推進している (栃木県酪農・肉用牛生産近代化計画の概要, 2016)。本研究では、ヒトの生殖およびマウスの繁殖において報告された *Breast*

*cancer 1(BRCA1)* および *Chemokine (C-X-C motif) receptor 1(CXCR1)* 遺伝子に着目し、2つの遺伝子の受胎との関連性や胚発生における働きに着目した。

*BRCA1* 遺伝子は、ヒトの乳がんおよび卵巣がんに関連する遺伝子としてクローニングされ(Miki *et al.*, 1994)、細胞周期(Scully *et al.*, 1997<sup>a</sup>; Scully *et al.*, 1997<sup>b</sup>; Huber *et al.*, 2001; Well *et al.*, 2005)、細胞分化の制御 (Lane *et al.*, 1995)、および DNA の修復(Scully *et al.*, 1997<sup>b</sup>; Huber *et al.*, 2001)に役割を果たすことが報告されている。*BRCA1* 遺伝子変異は、ヒトに FSH の処理への反応が低くさせ、排卵数が少なくなることが報告されている(Oktay *et al.*, 2010)。これらのことから、BRCA1 は哺乳動物の繁殖に影響する可能性があると考えられている。ウシにおいて、*BRCA1* 遺伝子のエキソン 11 に SNP が同定されている(Snelling *et al.*, 2005)。しかしながら、*BRCA1* の SNP が不妊との関連性は不明である。

そのほか、ヒトにおいて、*BRCA1* 遺伝子は胚ゲノム活性化に関わる(Wells *et al.*, 2005)。マウスにおいて、Hamatani ら(2004)は *BRCA1* の遺伝子およびタンパク質が着床誘起胚で発現することを明らかにした。Saito ら(2014)は、*BRCA1* のタンパク質は栄養外胚葉 (Trophectoderm: TE)で発現することを報告した。また、*Brcal* を欠損させたマウスにおいて、胚性致死となることが報告されている(Hakem *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998)。以上のことより、*BRCA1* は哺乳動物の胚発生において重要な働きをしていることが示されている。ウシにおける、*BRCA1* 遺伝子塩基配列は Krum(2003)らが最初に解析し、DNA 修復を制御することが明らかになった。また、*BRCA1* の遺伝子およびタンパク質は、ウシの乳腺などの組織および培養細胞で発現していることが報告されている(Yongji *et al.*, 2002)。しかしながら、ウシの胚発生における *BRCA1* 遺伝子の発現動態およびタンパク質の分布は明らかにされていない。

ヒトの *CXCR1* 遺伝子は、Holmes ら(1991)によりクローニングされ、7つの TM(transmembrane)を有する G タンパク質受容体(G protein- coupled receptor: GPCR)に属することが明らかになった。TM3~TM6 および細胞質側のループは、GPCR の立体構造に影響を及ぼし、その活性化のスイッチと考えられ、重要な役割を果している(Vauquelin *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011)。また、炎症(Sturm *et al.*, 2005)、癌(Bates *et al.*, 2004)、HIV(Caccuri *et al.*, 2012)、喘息(Al-Alwan *et al.*, 2013)などの多くの疾患との関連が報告された。

ウシの *CXCR1* 遺伝子は、1つのイントロンと2つのエクソンから構成され、全塩基配列に36個の SNP が同定された(Pighetti *et al.*, 2012)。第2エクソンの翻訳開始コドンから5つの SNP が同定され、SNP612、684、858 および 861 の塩基の置換はアミノ酸の同義置換を起こすが、SNP777 において、塩基置換(G→C)によりアミノ酸非同義置換(Q245H)を起こす(Youngerman *et al.*, 2004<sup>a</sup>)。また、SNP 777 の CC 型を有するウシは潜在性乳房炎発生率が高い(Youngerman *et al.*, 2004<sup>b</sup>)。しかしながら、5つの SNP と受胎との関連性は明らかにされていない。

また、ヒトの子宮内膜(Dominguez *et al.*, 2003)、卵管などの組織(Balasubramaniam *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2006)、栄養膜細胞層(Jovanović *et al.*, 2010)においても *CXCR1* が発現していることが報告された。ラットにおいては、子宮内膜(Gao *et al.*, 2014)に発現していることが示された。ウシにおいては、*CXCR1* は Lahouassa ら(2008)により同定され、卵胞膜細胞(Murayama *et al.*, 2010)、顆粒細胞および黄体(Shimizu *et al.*, 2012)に発現している。以上の研究は、*CXCR1* は哺乳動物、すなわちウシの繁殖に関与していることを示唆されている。しかしながら、ウシの胚発生において、*CXCR1* の発現動態はまだ明らかにされていない。

以上のことに基づいて、本研究は、第2章では、栃木県内のT牧場で繋養されているホルスタイン種雌ウシ集団(T集団)において、ゲノムワイド関連解析により、T集団の乳脂肪率、乳量および産歴のデータおよびSNPマーカー解析を行い、新規のSNPマーカー遺伝子の探索を行った。また、探索した遺伝子について、T集団において改良の遺伝子マーカーとして利用できる可能性を検討した。第3章では、栃木県内のT集団における、*BRCA1* cDNA塩基配列を解析し、その結果見いだされたSNPと不妊との関連性を解析した。また、ウシの胚発生における*BRCA1*遺伝子の発現動態およびタンパク質の分布を解析した。第4章では、栃木県のホルスタイン種および黒毛和種集団における、*CXCR1*遺伝子のSNPと不妊との関連性を解析した。また、胚発生における*CXCR1*遺伝子の発現動態を解析した。第5章では、第2、3および4章の結果をまとめ、総合考察を行った。

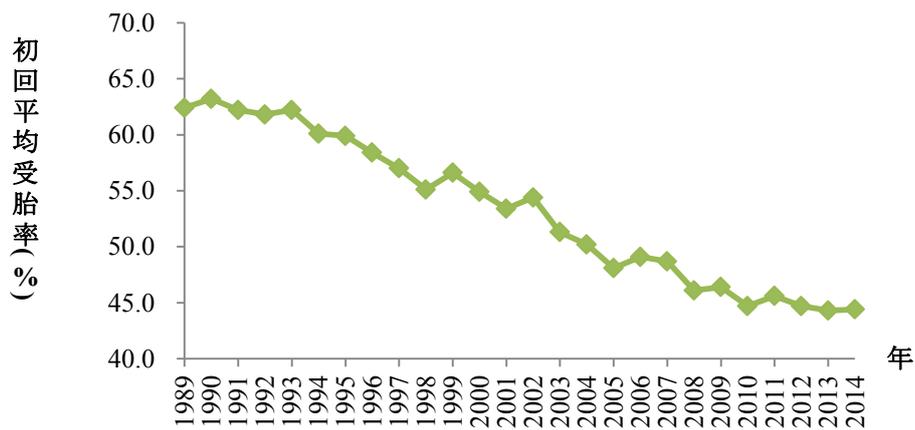
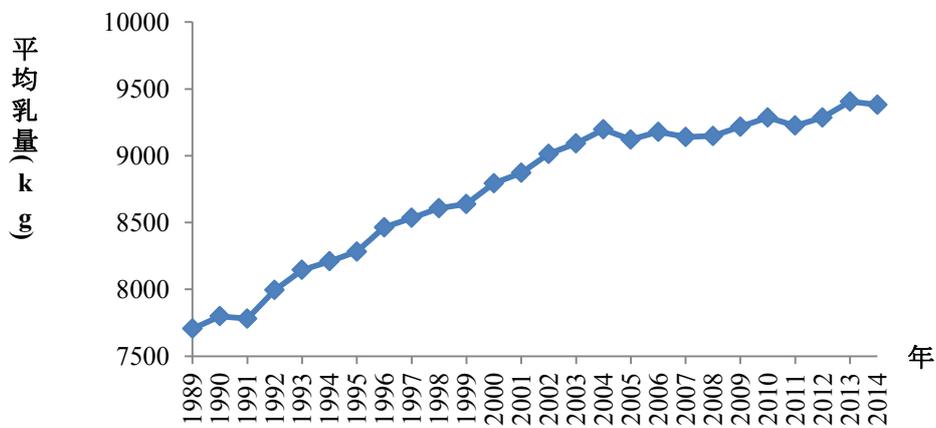
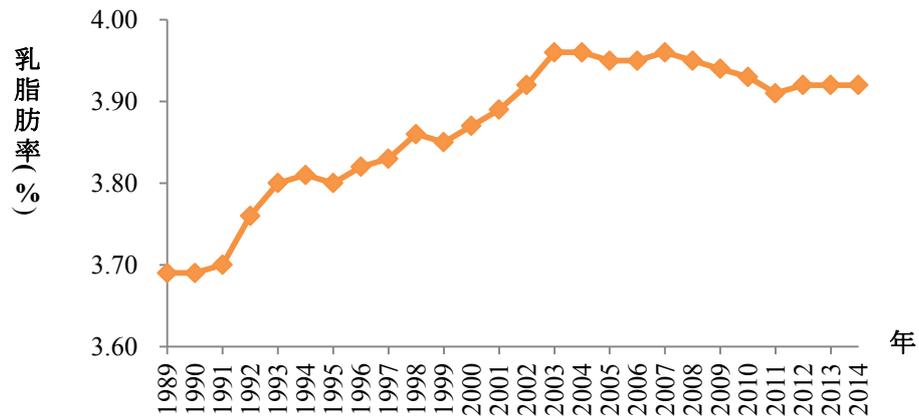


図 1-1. ホルスタイン種における日本全国の平均乳脂肪率および初回平均受胎率の年次推移  
(1989 年~2014 年)

家畜改良事業団の受胎調査および 2017 年度乳用牛群能力検定成績速報より

## 第2章 ホルスタイン種の経済形質に関わる遺伝子多型を用いた選抜指標の探索

### 緒言

2015年(平成27年)農林水産省において策定された家畜改良増殖目標では、リファレンス集団を充実させるために SNP 解析を推進している。ゲノムワイド関連解析は、遺伝子を特定せずに SNP などの多型を全ゲノム上において適応し網羅的に解析する手法である (Balding *et al.*, 2006)。ウシにおいては、Illumina 社(2009)により 6,909 SNP のチップが開発され、ウシの経済形質における遺伝子マーカーを探索することができるようになった。栃木県においても、乳用牛における各種経済形質に影響する遺伝子を活用した育種改良を推進している (星ら, 2012)。

そこで、本章の第1項では、栃木県内の T 牧場で繋養されているホルスタイン種雌ウシ集団(T 集団)における、ゲノムワイド関連解析により、乳脂肪率、乳量および産歴における高い相関がある SNP マーカーの探索を行った。第2項では、第1項で相関が認められた遺伝子について、T 集団において改良の遺伝子マーカーとしての利用可能性を検討した。

## 第1項 T 集団におけるゲノムワイド関連解析

### 目的

栃木県の T 牧場のホルスタイン種雌ウシ集団(T 集団)において、経済形質である乳脂率、乳量および産歴と高い相関がある SNP マーカーを探索することを目的として、ゲノムワイド関連解析を行った。

### 材料および方法

ゲノムワイド関連解析は、栃木県内の T 牧場のホルスタイン種雌ウシの DNA およびそれらのウシの乳脂率、乳量および産歴のデータ(2014 年から 2018 年まで)を用いた(表 2-1)。本研究は、栃木県内の T 牧場における、2014 年から 2018 年までの 65 頭の乳量、乳脂率および 32 頭の産歴のデータを用いた。

#### 1. 血液からの DNA 抽出

ホルスタイン種雌ウシ 65 頭の血液サンプルを使用した。真空採血管で採取されたホルスタイン種の血液 10 ml を 18,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上澄みを捨て、buffy coat 部分 0.5 ml を別のチューブに移し、冷凍保存した。

DNA 抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit(QAGEN, Cat. No. 69504)を使用した。ProteinaseK 20  $\mu$ l に冷凍保存していたバフィーコート部分 0.5 ml を溶解して、100  $\mu$ l 添加し、PBS で容量を 220  $\mu$ l に調整した。200  $\mu$ l の Buffer AL を加え、ボルテックス操作で混和し、56°Cで一晩インキュベートした。その後、200  $\mu$ l のエタノールをサンプルに添加し、十分に混和した。これらの混合液を新しい 2 ml コレクションチューブ中の DNeasy Mini スピンカラムに移し、8,000 rpm 以上で一分間遠心分離をし、DNA をメンブレンに結合させた。ろ液を捨てて 500  $\mu$ l の Buffer AW1 を添加し、8,000 rpm 以上で 1 分間遠心分離し、洗浄した。ろ液を捨てて 500  $\mu$ l の Buffer AW2 を添加し、14,000 rpm で 3 分間遠心して DNeasy メンブレンを洗浄し、乾燥させた。DNeasy Mini スピンカラムを新しい 2 ml マイクロチューブに移し、30  $\mu$ l の超純水を DNeasy メンブレン上に直接ピペットで添加した。室温で 1 分間インキュベートした後、8,000 rpm 以上で 1 分間遠心分離し、DNeasy メンブレンから DNA を溶出した。

## 2. ジェノタイピングアッセイ

解析には Bovine LDv1.1 Genotyping BeadChip (Illumina)を使用した。この Beadchip はウシ全ゲノムをカバーする 6,909 個の SNP マーカーが搭載されており、平均値で 383 kb のマーカー間隔を有しているものである(Illumina, 2009)。

抽出した DNA を使用し、一晩のインキュベーションで全ゲノム増幅を行った。均一でバイアスのほとんどない DNA が、1000~1500 倍に増幅される。その後、酵素反応により、増幅した DNA を 300 bp~600 bp の大きさに断片化する。イソプロパノール沈殿により DNA を沈殿させた。沈殿させた DNA はハイブリダイゼーションバッファーで再懸濁した。一

晩ハイブリダイゼーションを行う。増幅後、断片された DNA サンプルは、Bovine LD Genotype BeadChip(Illumina)の 50mer の特異的なプローブにハイブリダイズする。ハイブリダイズしなかった、もしくは非特異にハイブリダイズした DNA を洗浄した。その後、ハイブリダイズした DNA をテンプレートとし、BeadChip 上で特異的な一塩基伸長を行う。その際、Biotin または DNP が標識された ddNTP を取り込む。一塩基伸長産物の蛍光をレーザーで励起させスキャンする。スキャナーは蛍光から放出された光のイメージを高解像度で記録した。

### 3. ゲノムワイド関連解析

Infinium genotyping assay により記録した各の SNP マーカーの ID、Design strand での SNP、Beads のアドレス、プローブの配列、NCBI データベースのビルドナンバ、染色体番号、染色体上の番号および乳脂肪率データを利用して、遺伝統計解析ソフトウェア SNP & Variation Suite(Golden Helix)により、解析には線形混合モデル( $y=Xb+Zu+e$ ,  $b$ : 母数効果(環境効果);  $u$ : 変量効果(ポリジーン効果))を使用し、Bonferroni 補正を行い、ゲノムワイド関連解析した。リファレンス集団(日本国内のホルスタイン種 200 頭)のデータを考慮して、 $P$ -value 値が  $7.24 \times 10^{-6}$  未満のときを有意差ありとした(危険率 5%以下 ( $P < 0.05$ )の場合を有意差ありとしたが、本研究では  $0.05/6,909=7.24 \times 10^{-6}$ 、 $-\log_{10} P\text{-value} = -\log_{10}(7.24 \times 10^{-6})=5.14$ )。結果はわかりやすくするために図(マンハッタンプロット解析)で示した。

## 結果

本研究では、T集団65頭ウシの乳量(305日平均総乳量10,137 kg)および平均乳脂率(3.97%)、32頭ウシの産歴(そのうち、7年4産以上のウシ11頭)のデータを用いた。

以上のウシにおいて、6,909個のSNPマーカーが搭載されているBovine LDv1.1 Genotyping BeadChipにより、乳量、乳脂率および産歴と高い相関があるSNPマーカーの検出を試みた。その結果、乳脂肪率と高い相関があるSNPマーカーとして、第14番染色体、物理位置1,802,265 bpに位置することが示した(図2-1)。この位置は、*DGATI* 遺伝子の領域内(物理位置1,795,425 bp-1,804,838 bpに存在する)に位置していた(図2-2)。

また、乳量および産歴と高い相関があるSNPマーカーは検出できなかった。

## 考察

本研究では、乳脂肪率において、ゲノムワイド関連解析により最も高い相関がある SNP マーカーを検出した。この SNP マーカーは、ウシの第 14 番染色体の物理位置 1,802,265 bp に存在し、*DGATI* 遺伝子の領域内に位置していた(図 2-2)。同じ方法により、オランダ (Bouwman *et al.*, 2011)、イタリア (Fontanesi *et al.*, 2014)、カナダ (Nayeri *et al.*, 2016) のホルスタイン種においても同じ結果が検出された。

さらに、本研究で検出した乳脂肪率と相関がある SNP マーカーは、*DGATI* 遺伝子のエキソン 8 の領域内に位置していた(図 2-2 および 2-3)。この SNP は、*DGATI* の塩基 GC→AA の置換によって、アミノ酸アラニン(A)→リシン(K) (A232K)への非同義置換することが報告されているものであった(Grisart *et al.*, 2002)。

一方、乳量、産歴と関連している SNP は検出できなかった。

表 2-1. T 集団における乳量、乳脂肪率および産歴について

	T 集団	家畜改良増殖目標(2015-2025 年)
乳量	10,137 ± 1,802.37 kg/305 日 (n=65)	9,500~10,000kg/305 日
乳脂肪率	3.97 ± 0.50 % (n=65)	3.9%維持
産歴	解析に用いた頭数 (n=32) うち 4 産以上/7 年 (n=11)	

(平均値 ± 標準誤差)

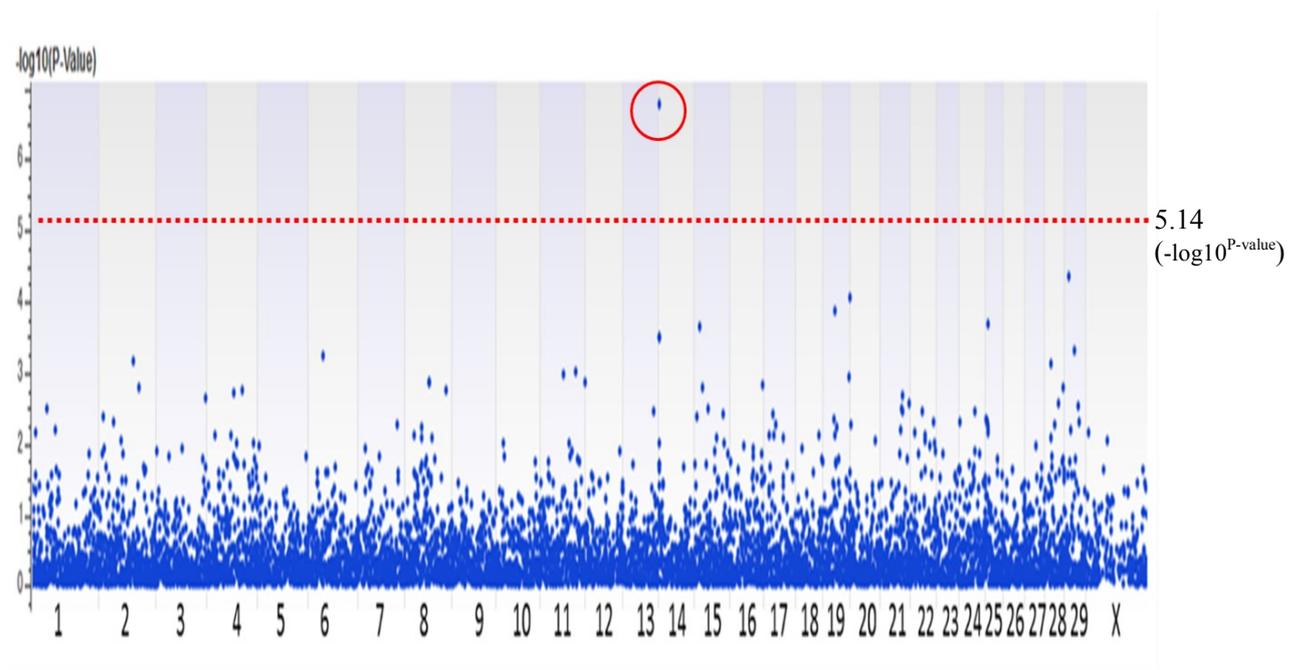


図 2-1. T 集団ウシの全染色体における乳脂肪率と SNP マーカーとの相関関係

縦軸は $-\log_{10}P\text{-value}$ 、横軸はウシの染色体番号; 乳脂肪率と高い相関が SNP マーカー(赤い丸)は第 14 番染色体に位置

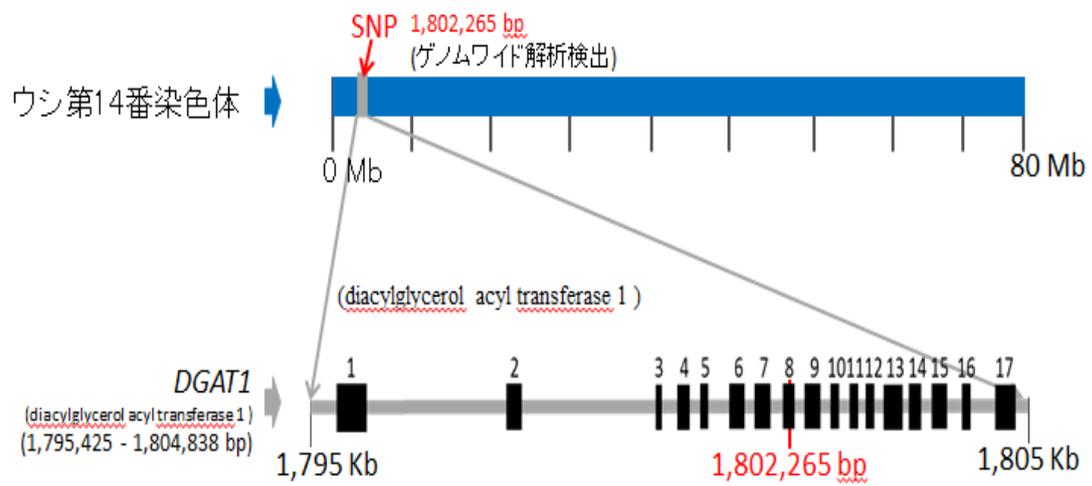


図 2-2. ウシ第 14 番染色体および *DGAT1* 遺伝子模式図

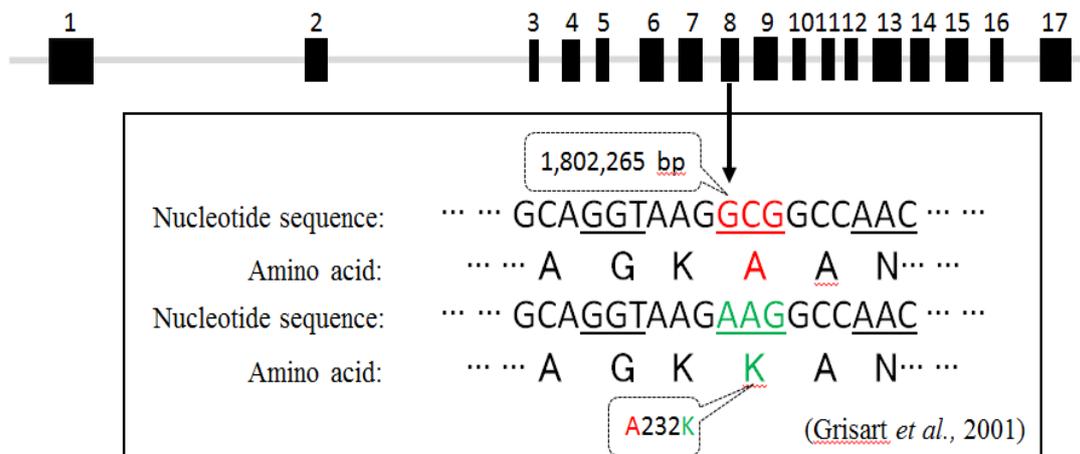


図 2-3. ウシの *DGATI* 遺伝子における塩基置換およびアミノ酸置換

## 第2項 T集団における *DGATI* 遺伝子の乳脂肪率におけるマーカーとしての検討

### 目的

第1項で、ゲノムワイド関連解析により、乳脂肪率と高い相関がある SNP マーカーが *DGATI* 遺伝子の領域に位置することが明らかとなった。

*DGATI* はアシルグリセロールと脂肪酸の反応の触媒を行うと共に、中性脂肪の合成を行う役割を有する酵素である (Bell *et al.*, 1980; Brindley 1991; Lehner *et al.*, 1996)。 *DGATI* 遺伝子は乳腺を含む多くのヒトの組織で発現していることが報告されている (Farese *et al.*, 2000)。マウスの乳腺の発生においては、間質および上皮組織での *DGATI* 発現を必要とする (Cases *et al.*, 2004)。 *Dgat1* 遺伝子を欠損させると、マウスの乳汁分泌ができないことを含めていくつかの組織におけるトリグリセリド代謝が変化していた (Smith *et al.*, 2000)。ウシにおいて、 *DGATI* 遺伝子は、第14番染色体に位置し、17個のエキソンから構成され、エキソン8における232番目のリシン (K: AAG) / アラニン (A: GCG) のアミノ酸置換を伴う2塩基置換により、乳用牛の乳成分に関連することが報告されている (Grisart *et al.*, 2002)。Shorten ら(2004)は、脂肪酸合成とトリグリセリド構築の数学的モデルを用いて、ウシ *DGATI* 遺伝子の塩基置換が乳脂肪収量の増加と関連することを推定した。オランダ (Schennink *et al.*, 2007)、スウェーデン (Näslund *et al.*, 2008)、ポーランド (Nowacka-Woszuk *et al.*, 2008) のホルスタイン種において、K対立遺伝子を有するウシは、A対立遺伝子を有するウシと比較して乳量およびタンパク質量は少ないが、乳脂肪率およびタンパク質率は高

い値を示すことが報告されている。以上より、*DGATI* はウシの乳成分に影響することが示唆されており、乳脂肪率に関連するマーカーとなる可能性の高い遺伝子である。

本項では、*DGATI* 遺伝子 SNP が、T 集団において乳脂肪率の改良の遺伝子マーカーとして利用の可能性について検討した。

## 材料および方法

*DGATI* 遺伝子の SNP 解析は、T 集団のホルスタイン 101 頭を用いた。乳脂肪率の解析には、乳脂肪率データを入手できた 65 頭を用いた(第 1 項のゲノムワイド関連解析したウシと同じ)。

### 1. 血液から DNA の抽出

第 2 章第 1 項と同様の方法を使用した。

### 2. 抽出した DNA について、濃度の測定

分光光度計 Nano Drop (SCRUM)を用いて DNA 濃度を測定した。

### 3. PCR(polymerase chain reaction) による DNA 抽出物の増幅

TaKaRa Ex Taq (TaKaRa, Code No. RP001A)を用いて PCR を行った。プライマーの塩基配列は表 2-2 に示した。

*DGATI* 遺伝子では、SNP を含む塩基配列の増幅には Grisart ら(2002)の報告によって設計されたプライマーをもとに設計し直した *DGAT1F* および *DGAT1R* を用い、反応条件は、熱変性(denaturation)98°C 30 秒、アニーリング(annealing)55°C 30 秒、伸長反応(extension)72°C 30 秒の処理を 30 サイクル繰り返した。反応液は表 2-3 に示した。

#### 4. 電気泳動による PCR 産物の確認

アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の確認を行った。マーカーは 100bp DNA Ladder Dye Plus (TaKaRa, Code No.3426A)、ゲルは 1.0%のアガロース(表 2-4, TAKARA, Cat# 5014)、電気泳動バッファーは 1×TAE(表 2-5 および表 2-6)を用いた。5  $\mu$ l の PCR 産物を 1  $\mu$ l の 6×Loading buffer (TaKaRa)とパラフィルム上で混合後、ウェルへ注入し、100 V で 35 分間泳動した。その後、ゲルを 100 $\mu$ l の泳動後の電気泳動バッファーとともに、遮光する容器に転移し、20  $\mu$ l のエチジウムブロミドを添加し、均一混合後 35 分間染色する(表 2-7)。紫外線照射下で撮影し、マーカーとの比較により PCR 産物の大きさを確認した。

#### 5. PCR 産物の精製

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Cat. No. 28104)を用いて PCR 産物の精製を行った。45 $\mu$ l の PCR 産物に、225  $\mu$ l の Buffer PB を添加して、よく混合後、2 ml コレクションチューブ中の QIAquick スピнкаラムに入れ、13,000 rpm で 1 分間遠心分離した。ろ液を捨て、コレクションチューブ中に Buffer PE を 750  $\mu$ l 加え、13,000 rpm で 1 分間遠心分離をし、洗浄した。ろ液を捨て、Buffer PE を完全に取り除くため、再び 13,000 rpm で 1 分間遠心分離

した。スピнкаラムを清潔な 1.5 ml チューブに移し、MilliQ water を 30  $\mu$ l 加えて、13,000 rpm で 1 分間遠心分離し、PCR 産物を溶出した。

## 6. シークエンス前処理

BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI PRISM, Part No.4336917)および前述のプライマー(表 2-2)を用いて行った。プライマーは 5pmol/ $\mu$ l に希釈して使用した。

シークエンス反応条件は 96°C で 1 分間処理後、熱変性(denaturation)96°C で 10 秒、アニーリング(annealing)50°C で 5 秒、伸長(extension)60°C で 4 分の処理を 25 サイクル繰り返した。反応液組成を表 2-8 に示した。

## 7. 得られたシークエンスについて、塩基配列の決定

ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)によりシークエンス解析を行った。

## 8. 塩基配列の解析

遺伝子解析ソフト GENETYX(株式会社ゼネティックス)を用いた。

## 9. 統計解析

乳脂肪率は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。*DGATI* の各遺伝子型における、平均乳脂肪率の結果は、一元配置の分散分析を用い、Tukey-Kramer 法によって多重比較検定を行った。危険率 5%以下 ( $P < 0.05$ )の場合を有意差ありとした。

## 結果

T 集団の 101 頭のウシにおける、*DGATI* 遺伝子型の AA 型を有するウシは 57 頭(56.4%)、AK 型は 31 頭(30.7%)、KK 型は 13 頭(12.9%)であり、対立遺伝子出現頻度は A:0.718 および K:0.282 であった(表 2-9)。

65 頭のウシにおける、*DGATI* 遺伝子型の AA 型を有するウシは 38 頭(58.5%)、AK 型は 15 頭(23.1%)、KK 型は 12 頭(18.5%)であった。平均乳脂肪率は、それぞれ  $3.82 \pm 0.41\%$ 、 $3.91 \pm 0.39\%$ 、 $4.52 \pm 0.47\%$  であった。KK 型の平均乳脂肪率は AA 型および AK 型より有意に高かった( $P < 0.05$ ) (図 2-4)。

## 考察

*DGATI* 遺伝子のエキソン 8 における、塩基 GC→AA の置換によって、アミノ酸アラニン(A)→リシン(K) (A232K)への非同義置換を引き起こし、乳脂肪の生産効率に関連していることが報告されている(Grisart *et al.*, 2002)。具体的には、*DGATI* 遺伝子 SNP の AA 型は乳量やタンパク質量などに正の影響を与える一方で、KK 型は乳脂肪率に正の影響を与える(Molee *et al.*, 2012)。また、*DGATI* 遺伝子 KK 型は乳量とタンパク質量を減少させ、乳脂肪量や乳脂肪率を増加させる(Sun *et al.*, 2009)。さらに、ウシの生乳には平均 4.0%の脂肪が含まれており、その脂肪の 98%以上はトリアシルグリセロール(Triglyceride: TAG または TG)である(Walstra *et al.*, 2006)。脂肪酸合成と TAG 構築の数学的モデルを用いて、K 対立遺伝子は長鎖脂肪酸を増加させ、A 対立遺伝子は中鎖および短鎖脂肪酸を増加させることが明らかにされている(Lu *et al.*, 2015)。

本研究で、*DGATI* の KK 型を有するウシの平均乳脂肪率は AA 型および AK 型より有意に高かった。オランダ (Schennink *et al.*, 2007)、スウェーデン (Näslund *et al.*, 2008)およびポーランド (Nowacka-Woszek *et al.*, 2008)のホルスタイン種において、A より K 対立遺伝子を有するウシの乳脂肪率は高いことが報告され、本研究の結果と一致していた。このことから、*DGATI* 遺伝子は T 集団において乳脂肪率に関与する遺伝子マーカーとして利用できると考えた。

表 2-2. *DGAT1* プライマーの塩基配列および PCR 産物の大きさ

遺伝子	プライマー名	プライマーの配列	PCR 産物の 大きさ(bp)
<i>DGAT1</i>	DGAT1F	5'-AGCCTCCCTACCAGCTCTCT-3'	348
	DGAT1R	5'-CGTTGTTGCCAGCCTCAC-3'	

表 2-3. *DGAT1* 遺伝子を増幅する PCR 反応液組成

反応液組成	添加量
10×EX Taq <sup>TM</sup> Buffer	5 μl
dNTP (2.5 mM each)	4 μl
Primer DGAT1F (100 pmol / μl)	0.5 μl
Primer DGAT1R (100 pmol / μl)	0.5 μl
EX Taq <sup>TM</sup> (5 units / μl)	0.5 μl
DNA template	100 ng
MQ	Up to 50 μl
Total	50μl

表 2-4. 1%アガロースゲルの組成

試薬	使用量
H14 (TaKaRa)	1 g
1×TAE	100 ml
Total	100 ml

表 2-5. 50×TAE の組成

試薬	使用量
Tris (tris (hydroxymethyl)aminomethane)	242 g
酢酸	57.1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml
超純水	700 ml + $\alpha$
Total	1 L

表 2-6. 1×TAE の組成

試薬	使用量
50×TAE	10 ml
超純水	490 ml
Total	500 ml

表 2-7. エチジウムブロミド (EB)溶液の組成

試薬	使用量
Ethidium Bromide	0.1 g
超純水	5 ml
Total	5ml

表 2-8. シーケンス前処理反応液組成

反応液組成	添加量 (最終濃度)
5×Sequencing Buffer	1 $\mu$ l
Primer F ( 5 pmol / $\mu$ l )	2 $\mu$ l (10 pmol)
Primer R ( 5 pmol / $\mu$ l )	2 $\mu$ l (10 pmol)
サンプル (DNA template)	5 $\mu$ l
BigDye Terminator Mixture	2 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

表 2-9. T 集団における *DGATI* 遺伝子型および対立遺伝子頻度

遺伝子名	遺伝子型(%)			対立遺伝子出現頻度	
	AA	AK	KK	A	K
<i>DGATI</i> (n = 101)	57(56.4%)	31(30.7%)	13(12.9%)	0.718	0.282
(n = 65)	38(58.5%)	15(23.1%)	12(18.5%)	0.700	0.300

n はサンプル数

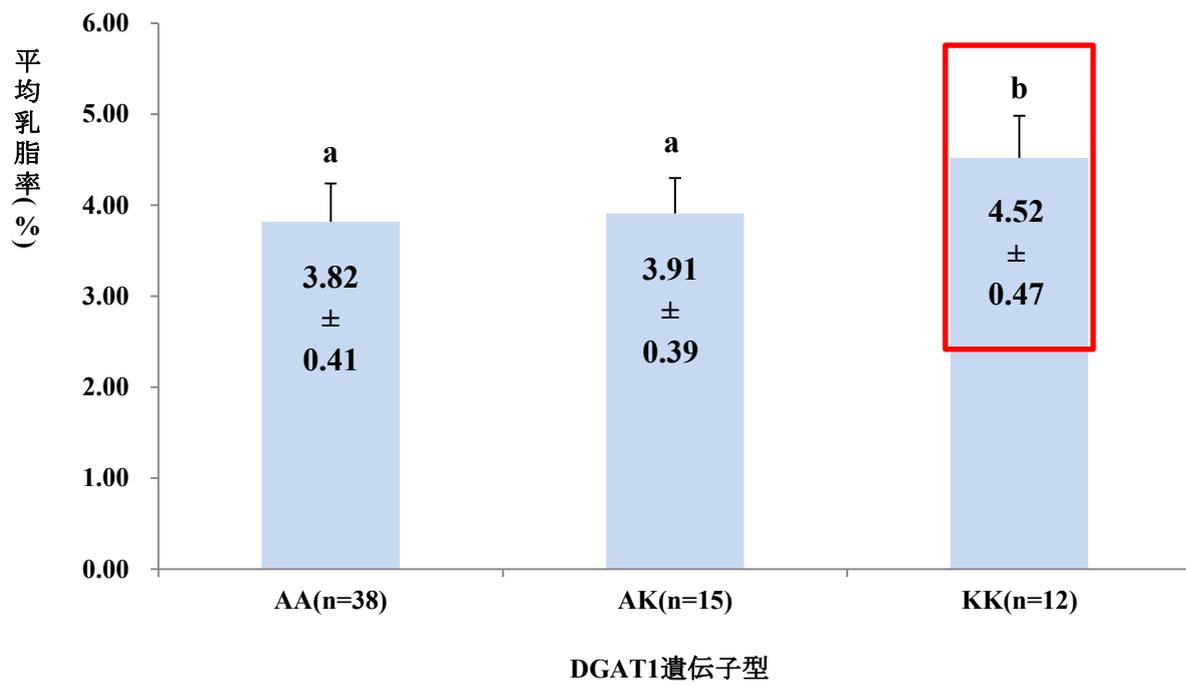


図 2-4. T 集団における *DGAT1* の各遺伝子型における乳脂肪率の比較

a, b 異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ )

### 第3章 ウシの初期胚における BRCA1 発現プロファイル解析

#### 緒言

*BRCA1* 遺伝子は、ヒトの遺伝性の乳がんおよび卵巣がんに関連する遺伝子としてクローニングされ(Miki *et al.*, 1994)、細胞周期(Scully *et al.*, 1997<sup>a</sup>; Scully *et al.*, 1997<sup>b</sup>; Huber *et al.*, 2001; Well *et al.*, 2005)、細胞分化の制御 (Lane *et al.*, 1995)、DNA の修復(Scully *et al.*, 1997<sup>b</sup>; Huber *et al.*, 2001)、転写調節(Scully *et al.*, 1997<sup>c</sup>; Cui *et al.*, 1998)などで働いていることが報告されている。*BRCA1* のエキソン 11 は全塩基の約 60%を占めるもっとも大きなエキソンであり、核内移行シグナルが存在している。*BRCA1* タンパク質は核内移行シグナルに運搬タンパク質である Importin と GTP 結合タンパク質の1種である Ras related nuclear protein (Ran) が結合し、核孔複合体が認識して核内へと移送され、核内において機能している(Thakur *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998)。ヒトにおいて、*BRCA1* 遺伝子変異の個体は、FSH の処理への反応が低いので排卵数が少ないことが報告されている(Oktay *et al.*, 2010)。

ウシ *BRCA1* 遺伝子は第 19 番染色体に位置し、エキソン 1 から 24 までの 5,550bp のドメインからなる。ヒトおよびマウスと同様に、2 つの核局在化シグナルがエキソン 11 に存在することはヘレフォード種において明らかにされている(Krum *et al.*, 2003)(図 3-1)。また、ウシ *BRCA1* 遺伝子のエキソン 11 において、4 つの SNP が同定(Snelling *et al.*, 2005)されている。しかしながら、*BRCA1* の SNP が不妊との関連性はあるか否かは不明である。

ヒトにおいて、*BRCA1* 遺伝子は胚ゲノム活性化に関わることが報告され(Wells *et al.*, 2005)。マウスにおいて、Hamatani ら(2004)は着床遅延モデルを用いて、マイクロアレイに

より、*Brcal* 遺伝子およびタンパク質は、着床誘起胚において高い発現を示すことを明らかにした。BRCA1 タンパク質はマウスの栄養外胚葉で発現していたことが示されている (Saito *et al.*, 2014)。また、*Brcal* を欠損したマウス胚は、胚性致死となることが報告されている (Hakem *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998)。これらのことより、BRCA1 は胚発生において、重要な働きをしていることが示されている。

ウシにおいて、Krum(2003)らが最初に *BRCA1* 遺伝子塩基配列を明らかにし、*BRCA1* 欠損した血管内皮細胞を用い、*BRCA1* 遺伝子は細胞周期などを制御していることを示した。また、*BRCA1* 遺伝子およびタンパク質は、ウシの乳腺、腎臓、脾臓および肝臓などの組織およびそれらの培養細胞で発現していることが報告されている (Yongji *et al.*, 2002)。しかしながら、ウシの胚発生において、*BRCA1* 遺伝子の発現動態およびタンパク質の分布は明らかにされていない。

そこで、第1項では、T集団における *BRCA1* cDNA の塩基配列を解析し、その中の SNP を不妊との関連性を解析する。第2項では、黒毛和種の初期胚におけるリアルタイム PCR により *BRCA1* 遺伝子の発現動態を解析し、免疫蛍光染色法により BRCA1 タンパク質の分布を解析した。

## 第1項 T集団における *BRCAl* 遺伝子および SNP の解析

### 目的

T集団のウシにおける、*BRCAl* cDNA の塩基配列を解析し、SNP と不妊との関連性を解析した。

### 材料および方法

T集団における、36頭の経産牛および18頭の不妊牛の血液を採取した。不妊牛とは3回の人工授精により受胎が認められなかったリピートブリーダーである。以上のサンプルは2014年から2018年まで収集した。

#### 1. RNA の抽出

採取されたウシの血液 10 ml を 18,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、 Buffy Coat 部分 0.5ml を Total RNA の抽出に用いた。Total RNA 抽出は、QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Cat. No. 52304) を用いて、プロトコールに従って行った。

Buffy Coat 部分 0.5ml と Buffer EL 2.5 ml を 10 ml チューブ中で混和して氷上で 10～15 分間インキュベート後、4℃、500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を完全に除去した。上清を除去した細胞ペレットに Buffer EL 1 ml を添加後、軽くボルテックスして細胞を懸濁し、再び 4℃、150 rpm で 10 分間遠心分離後、上清を完全に除去した。赤血球が除去され

た白血球ペレットに  $\beta$ メルカプトエタノール : Buffer RLT=1:100 の割合で混合した混合液 350 $\mu$ l を添加し、ボルテックスでよく混和後、2 ml コレクションチューブにセットした QIAshredder スピンカラムにライセートをピペットで移し、ホモジナイズするために 25 $^{\circ}$ C、14,000 rpm で 2 分間遠心分離した。ホモジナイズしたライセートに 70%エタノールを 350  $\mu$ l 添加し、ピペッティングで混和した後、沈澱物も含めた全てのサンプルを 2 ml コレクションチューブ中の QIAamp スピンカラムにピペットで注入し、25 $^{\circ}$ C、10,000 rpm で 15 秒間遠心分離し、ろ液を捨てた。QIAamp スピンカラムを新しい 2 ml コレクションチューブにセットして 700  $\mu$ l の Buffer RW1 を加え、洗浄のために 25 $^{\circ}$ C、10,000 rpm で 15 秒間遠心分離し、ろ液を捨てた。500  $\mu$ l の Buffer RPE を加え、25 $^{\circ}$ C、10,000 rpm で 15 秒間遠心分離し、ろ液を捨てた。再び、500  $\mu$ l の Buffer RPE を加え、25 $^{\circ}$ C、14,000 rpm で 3 分間遠心分離し、ろ液を捨てた。さらに Buffer RPE のキャリーオーバーの可能性を排除するために、25 $^{\circ}$ C、14,000 rpm で 1 分間遠心分離を行い、ろ液を捨てた。QIAamp スピンカラムを新しい 1.5 ml コレクションチューブにセットし、QIAamp メンブレンに RNase free water 30  $\mu$ l を直接ピペットで添加後、25 $^{\circ}$ C、10,000 rpm で 1 分間遠心分離し、Total RNA を溶出した。抽出後、Total RNA 抽出液を -80 $^{\circ}$ C のフリーザーにて保存、もしくはただちに次の手順に用いた。

## 2. 濃度の測定

分光光度計 Nano Vue (GE Healthcare)を用いて Total RNA 濃度の測定を行った。

## 3. RT-PCR および PCR による *BRCA1* 遺伝子増幅

Prime STAR GXL (TaKaRa)を用いて PCR を行った。

プライマーの塩基配列を表 3-1 に示した。また、反応液組成をそれぞれ表 3-2 に示した。

#### 4. 電気泳動による PCR 産物の確認

第 2 章第 2 項方法と同様に行った。

#### 5. PCR 産物の精製

第 2 章第 2 項方法と同様に行った。

#### 6. シークエンス前処理

第 2 章第 2 項方法と同様に行った。

#### 7. 塩基配列の決定

第 2 章第 2 項方法と同様に行った。

#### 8. 塩基配列の解析

第 2 章第 2 項方法と同様に行った。

#### 9. 統計解析

統計解析はカイ二乗検定で行い、危険率 5%以下( $P < 0.05$ )の場合に有意差ありとした。

## 結果

T 集団の 54 頭のホルスタイン種において、*BRCAl* cDNA の塩基配列は 5,550bp の長さであった。cDNA は、エキソン 1 からエキソン 24 までのドメインからなっていた。1,257bp で 1 つの SNP1257 (A → T) のみ同定された。SNP1257 は、*BRCAl* 遺伝子のエキソン 11 上の 2 つの核局在シグナルの近くに位置し、塩基置換に対するアミノ酸は同義置換(GTA: Val → GTT: Val)であった(図 3-1)。

36 頭の経産牛の AA、AT および TT 遺伝子型の分布はそれぞれ 23 頭(63.9%)、3 頭(8.3%) および 10 頭(27.8%)であり、対立遺伝子頻度は A0.681 および T0.319 であった。18 頭の不妊牛の AA、AT および TT 遺伝子型の分布はそれぞれ 8 頭(44.4%)、7 頭(38.9%)および 3 頭(16.7%)であり、対立遺伝子頻度は A0.639 および T0.361 であった(表 3-3)。経産牛と不妊牛との間における、対立遺伝子頻度は有意差がなかった。

## 考察

T 集団の 54 頭のホルスタイン種において、cDNA はエキソン 1 からエキソン 24 までのドメインからなって、*BRCA1* cDNA の塩基配列は 5,550bp の長さであった。しかし、ヘレフォード雌ウシおよび黒毛和種と同じ 3,411 bp であった(阿久津ら, 2013)。

本研究で見出された SNP1257 は、*BRCA1* のエキソン 11 上に位置し、*BRCA1* 転写調節のための 2 つの核局在シグナルの近くに位置していた。これは、黒毛和種で観察された SNP と同じ塩基置換であり(阿久津ら, 2013)、*Bos taurus* と *Bos indicus* 交雑由来のハイブリッドに見られる 4 つの SNP の 1 つであった(Snelling *et al.*, 2005)。以前にヒト、マウス(Bachelier *et al.*, 2000; Mixon *et al.*, 2000)およびウシ(Krum *et al.*, 2003)で検出されたスプライス認識部位の変異型は、本研究では検出されなかった。この領域は、BRCA1 エキソン 11 の転写調節を調節する核局在シグナルと関連し、39 種の胎盤哺乳動物で保存されていることが報告されている(Madsen *et al.*, 2001)。本研究で T 集団において検出した SNP1257 は、アミノ酸の非同義置換であることから、SNP1257 は核局在シグナルと関連していないと考えられた。*BRCA1* 遺伝子の変異はヒトの排卵数を影響する(Oktay *et al.*, 2010)が、本研究の SNP1257 はウシの不妊と関連していないと考えられた。

表 3-1. ウシ *BRCAl* 遺伝子解析に用いたプライマーの塩基配列および PCR 産物の大きさ

<i>BRCAl</i> プライマーの位置	Forward プライマー (5'→3')	Reverse プライマー (5'→3')	PCR 産物の大きさ(bp)
exon2-exon8	ctgcggatcatggtgaagaagtac	gagagttcgacagtaagactgg	460
exon8-exon11 <sup>a)</sup>	cttctccttagcaaccact	ggggtctttgtactattcgac	1,903
intron10-exon11	ccagtcttactgtcgaactctc	tgctatccttacatgtgcccttac	564
exon11-11 <sup>a)</sup>	gcagagccaaaacctcaactc	ggaaggacgctcaaacatc	1,974
exon11-exon24 <sup>a)</sup>	gttctgagacacctgacaac-	cacatggtcggatactgcttca	1,053

a) 阿久津ら 2013

表 3-2. Prime STAR GXL を用いた PCR 反応組成液

反応液組成		添加量
5 × Buffer for Prime STAR GXL		10 μl
2.5 mM dNTPs		4 μl
Primer F	10 pmol/μl	1 μl
Primer R	10 pmol/μl	1 μl
DNA Template	200ng/50μl	5 μl
Prime STAR GXL polymerase		1 μl
MilliQ water		up to 50μl
Total		50 μl

表 3-3. T 集団におけるウシ *BRCAl* の SNP1257 遺伝子型および対立遺伝子頻度

	n	遺伝子型(%)			対立遺伝子出現頻度	
		AA	AT	TT	A	T
経産牛	36	23(63.9%)	3(8.3%)	10 (27.8%)	0.681	0.319
不妊牛 <sup>a</sup>	18	8(44.4%)	7(38.9%)	3(16.7%)	0.639	0.361

a:不妊牛は、3回の人工授精で受胎しなかったリピートブリーダー

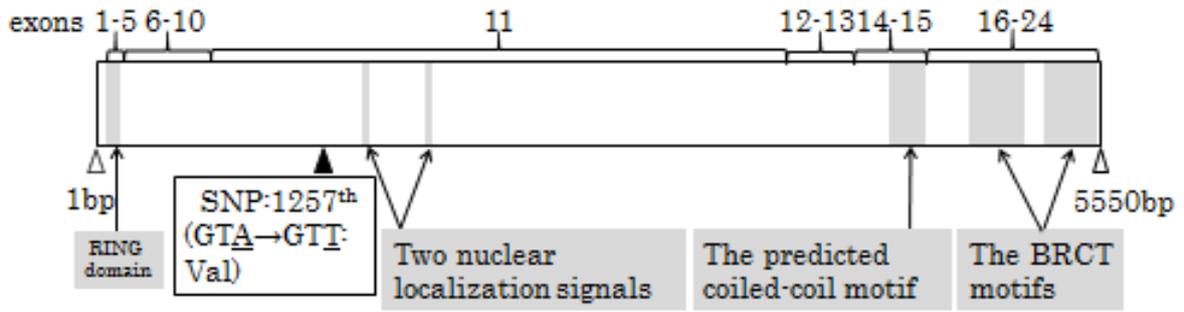


図 3-1. ウシ *BRCA1* 遺伝子模式図および SNP の位置

## 第2項 初期胚における BRCA1 の発現解析

### 目的

体外生産された黒毛和種の2細胞期胚、8細胞期胚、桑実胚、胚盤胞および脱出胚盤胞において、リアルタイム PCR により *BRCA1* 遺伝子の発現動態および免疫蛍光染色によりタンパク質の分布を明らかにすることを目的とした。

### 材料および方法

材料は東京食肉市場(芝浦屠場)より黒毛和種の卵巣を提供して頂いた。

#### 1. 体外生産胚の作出

胚の作出には Hamano & Kuwayama(1993)の方法に準じて行った。

##### a. 卵子成熟発生培地

結晶ペニシリン G カリウム (明治製菓)20 万 I.U.及び硫酸ストレプトマイシン(明治製菓)0.1 g を 2 ml の超純水に溶解し、抗生物質混合液(ペニシリン 10 万 I.U./ml、ストレプトマイシン 50 mg / ml)を作製し、-20℃で凍結保存した。

卵子の成熟及び発生用培地は、TCM-199(Gibco)28.5ml にウシ胎児血清(SIGMA)1.5 ml と抗生物質混合液 30 µl を添加したものを濾過滅菌し、使用した。この培地で 35 mm シャー

レ(Nunc)に 100  $\mu$ l のドロップを 3 つ作製し、ミネラルオイルで被覆したものを成熟培養用培地とした。

#### b. 卵子の採取および体外成熟

東京食肉市場(芝浦屠場)において、と殺直後の黒毛和種の雌牛から卵巣を採取し、0.85% 生理食塩水の入った水筒内に入れ、室温で実験室へ輸送した。18G 注射針付き 10 ml 注射筒(テルモ)を用いて、卵巣表面の直径 2~6 mm の小卵胞から、卵胞液とともに卵胞内卵子を吸引採取した。吸引後の卵胞液を 15 ml 遠沈管内に入れ、静置した。沈下させたものを、パスツールピペットを用いて直径 60 mm シャーレ(FALCON, 3002)に移して、顕微鏡下で卵子を回収した。卵丘細胞が密に付着し 3 層以上確認できたものを Excellent、卵丘細胞が 1~2 層確認できたものを Good、卵丘細胞の付着が不完全なものや形態的に異常なものを Poor として分類した。分類した Excellent、Good の卵子を TCM-199 内で洗浄し、100 $\mu$ l の成熟培地ドロップ中に 12 個を移し、インキュベーター(38.5 $^{\circ}$ C, 2% CO<sub>2</sub>, 98% air)で 22 時間の体外成熟培養を行った。

#### c. 体外受精

体外受精には黒毛和種の凍結精液を使用した。Brackett & Oliphant(BO)液(表 3-4 および 3-5) 3.884mg/ml のカフェイン(Sigma, Lot#MKBQ2780V)溶液を濾過滅菌し、インキュベーター内で加温して、精子洗浄液を作製した。BO 液 10 ml にヘパリンナトリウム注射液(富士製薬)5 万単位/50 ml を 34  $\mu$ l、さらに BSA(Sigma)0.05 mg を添加し、その溶液を濾過滅菌後、インキュベーター内で加温して、精子稀釈液を作製した。

液体窒素中に凍結保存しておいた精液ストロー1本を取り出し、直ちに、38.5℃の温水中に入れ、完全に精液が融解したことを確認してから、温水中から取り出した。融解した精液0.5mlを直ちに遠心管に移し、38.5℃に温めた精子洗浄液7.5mlを良く攪拌しながら希釈ショックを与えないよう徐々に加えて(等温希釈)全量を8mlにした後、1,800rpmで5分間遠心分離した。遠心分離後、直ちに上澄みを除去し、沈渣の精子ペレットに精子洗浄液を同様に加え、再び同様に洗浄した。精子活力検査板を用いて精子の運動性と生存率を検査し、トーマ氏血球計算盤を用いて精子濃度を測定し、精子洗浄液の希釈量を決定した。その後、精子洗浄液を適量添加して精子濃度を $10\sim 14 \times 10^7$  sperm/mlに調節し、さらに、精子希釈液で希釈し、最終濃度 $2 \times 10^7$  sperm/mlの精子浮遊液を作製した。

シャーレ内に精子浮遊液200 $\mu$ lのドロップを作製し、媒精用培地とした。成熟培養後、卵丘細胞が膨化している卵子を軽くピペッティングし、卵丘細胞層を除去してから、ドロップ内に移した後、インキュベーター内に5時間静置し、体外受精を行った。

#### d. 発生培養

媒精5時間後に卵子の周囲に付着している精子や卵丘細胞などを取り除き、発生用培地に移した。発生用培養液は成熟用培養液と同じものを用い、卵丘細胞の単層が形成されている成熟用培地のシャーレをそのまま使用して、培養液だけ新鮮なものと50 $\mu$ l交換して用いた。シャーレをインキュベーター内(38.5℃, 2% CO<sub>2</sub>, 98% air)に静置し、胚の発生培養を行った。媒精をはじめた日をDay0とし、2細胞期胚(Day1~)、8細胞期胚(Day2~)、桑実胚(Day6~)、胚盤胞または脱出胚盤胞(Day7~)をその後の実験に使用した。

## 2. 胚の評価

胚の評価は国際胚移植学会(IETS)により推奨されている様式(IETS マニュアル第3版、第9章)の分類に従い、胚の品質はコード1(Excellent または Good)のものを使用した(図3-2)(Stringfellow et al., 2001、(公社)畜産技術協会(訳)(2001))。一部はリアルタイム PCR 解析のために RNA を抽出し、もう一部分はタンパク質の局在解析のために免疫蛍光染色に用いた。

## 3. リアルタイム PCR

胚を室温の 0.1% PVA-PBS で3回洗浄後、RNA 抽出に供した。RNA 抽出には Cell-to-cDNA TM<sup>II</sup> Kit (Ambion, 製品番号: A35379)を用い、マニュアルに準じて行った。

氷上においた 0.2 ml の PCR チューブに 5  $\mu$ l ずつ Cell Lysis II Buffer を分注し、各々のチューブに 12 個の胚を加えた。なお、加えた液量は 0.1% PVA-PBS と胚を含めて約 0.5  $\mu$ l とした。チューブをすばやく 75°C で 10 分間処理し細胞を溶解させると共に各種の RNase を不活性化した。その後チューブを氷上におき、最終濃度が 0.04 U/ $\mu$ l になるように 0.44 U/ $\mu$ l DNase I を 0.5  $\mu$ l 加え、穏やかに混合し遠心した。なお、DNase I は予め 2 U/ $\mu$ l DNase I を Cell Lysis II Buffer にて希釈し 0.44 U/ $\mu$ l とした。DNase I の反応は 37°C で 15 分間行い、完全にゲノム DNA を分解した。その後、75°C で 5 分間処理し、DNase を不活性化した。得られた RNA を含む細胞溶解物は直ちに逆転写反応に用いた。RNA を含む細胞溶解物の入ったチューブに 2.2  $\mu$ l の dNTP Mix、1.1  $\mu$ l の Oligo (dT)18 Primers を加え、穏やかに混合し遠心した。その後、RNA の二次構造を変性させるため 70°C で 3 分間処理した。氷上に 1 分間静置した後、1.1  $\mu$ l の 10 $\times$ RT buffer、0.55  $\mu$ l の M-MLV Reverse Transcriptase、0.55  $\mu$ l の RNase inhibitor を加え、穏やかに混合し遠心した。その後 42°C で 60 分間逆転写反応を行い、95°C

で 10 分間処理し、逆転写酵素を不活性化させた。得られた cDNA は-30℃で保存した。本研究では、2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚、胚盤胞、脱出胚盤胞それぞれ 41、83、26、46、42 合計 238 個を用いた。

リアルタイム PCR は Igarashi(2009)らの方法を若干修正し、*BRCA1* 遺伝子の発現動態の解析を行った。内在性コントロールとして 18S rRNA を用い、プライマーは Goossens ら (2005)が報告したプライマーセットを使用した(表 3-6)。ウシ *BRCA1* cDNA の塩基配列の増幅には、表 3-6 に示したプライマーを設計して用いた。解析には、FastStart Essential DNA Green Master kit (Roche) (表 3-7)を用い、リアルタイム PCR は、各ステージで 5 個分の胚を添加し、95℃で 10 分間処理後、熱変性(denaturation)95℃で 10 秒、アニーリング (annealing)60℃で 10 秒、伸長反応(extension)72℃で 30 秒の処理を 45 サイクル繰り返した。実験は 3 回以上の繰り返しを行った。発現量の解析には相対定量法を使用した。2 細胞期胚の発現量を 1.0 とし、それぞれの発生ステージにおける相対的な発現量を求めた。

発現量は平均値 ± 標準誤差で示している。統計解析は、一元配置の分散分析を用い、Tukey-Kramer 法によって多重比較検定を行った。危険率 5%以下 ( $P < 0.05$ )の場合に有意差ありとした。

#### 4. 免疫蛍光染色

*BRCA1* タンパク質の局在は、免疫蛍光染色により、Saito(2014)および Takeuchi(2017)らの方法に従って行った。初期胚を 3.7% Formaldehyde-PBS (-)に室温で 30 分間固定した。0.25% Tween 20-PBS (-)で 5 分間浸漬して透過処理を行い、次いで、一次抗体としてウサギ抗 *BRCA1* ポリクローナル抗体(1:50, Santa Cruz, sc-646)を用いて 4℃で一晩反応させた。FITC

標識ヤギ抗ウサギ抗体 (1:25, Cappel, #55664)と室温で 1 時間反応させた後、核染色のため 5 µg/ml Hoechst33342(SIGMA)を室温で 1 時間反応させ、洗浄後 Glass Bottom Dish へマウントした。観察には、共焦点レーザー走査型顕微鏡(Lica, TCS SP8)を用いた。BRCA1 タンパク質の発現は Negative control と比較して判定した。本研究では、2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚、胚盤胞および脱出胚盤胞それぞれ 21、18、23、17、12 個、全部で 91 個の胚を用いた。

## 結果

*BRCA1* 遺伝子発現量は 2 細胞期胚を 1.0 として、8 細胞期胚 :  $1.17 \pm 0.37$ 、桑実胚 :  $0.87 \pm 0.16$ 、胚盤胞 :  $0.88 \pm 0.18$ 、脱出胚盤胞 :  $0.20 \pm 0.02$  であった(図 3-3)。*BRCA1* 遺伝子の発現レベルは、脱出胚盤胞において低い傾向があったが、各ステージで有意差はなかった。

*BRCA1* タンパク質の強度は、免疫蛍光染色により Negative control(図 3-4)と比較して判定した。2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚、胚盤胞および脱出胚盤胞の各ステージにおける *BRCA1* タンパク質の発現を観察したところ、全てのステージにおいて、弱く発現していた(図 3-5 および 3-6)。2 細胞期胚、8 細胞期胚および桑実胚において、*BRCA1* タンパク質は、割球同士の接着部分以外の割球表面全体に発現していた(図 3-5: A、C、E)。また、*BRCA1* タンパク質は一部分の細胞の核に発現していた(図 3-5: B、D、F; 黄色矢印)。核に *BRCA1* タンパク質が発現している胚のパーセンテージは、2 細胞期胚から桑実胚まで発生が進むにつれて増加する傾向があり、2 細胞期胚は 28.6%(6/21)、8 細胞期胚は 44.4%(8/18)、桑実胚は 52.2%(12/23)であった。全ての胚盤胞および脱出胚盤胞において、内部細胞塊に発現は認められず、栄養外胚葉の細胞の核に *BRCA1* タンパク質が発現していた(図 3-6; 黄色矢印)。

## 考察

本研究では、*BRCA1* 遺伝子はウシの 2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚、胚盤胞および脱出胚盤胞で発現が検出されたが、各ステージにおいて有意差がなかった。ヒトの 4~5 細胞胚における *BRCA1* 遺伝子の発現量が変わることから、この遺伝子は胚ゲノム活性化に関与している(Wells *et al.*, 2005)。しかし、ウシの胚ゲノム活性化はで起こる 8 細胞期胚(Vigneault *et al.*, 2004)における、*BRCA1* 遺伝子の発現量は有意な変化がないことから、*BRCA1* 遺伝子は、ウシの胚ゲノム活性化に関与していないことが明らかとなった。

*BRCA1* タンパク質は、2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚において割球の接着部分ではなく割球表面全体に発現し、胚盤胞および脱出胚盤胞において内部細胞塊に認められず、栄養外胚葉の細胞に発現していた。Shen ら(1998)の研究では、*Brcal* 欠損したマウスの栄養外胚葉細胞は 300 ラドのガンマ照射を受けたら劇的に減少した(20~30 細胞から 5~10 細胞へ)が、対照の栄養外胚葉細胞は 300 ラドのガンマ照射を受けたら僅かに減少した(20~35 細胞から 20~25 細胞へ)。加えて本研究で用いた胚は国際胚移植学会(IETS)により推奨されている様式の分類に従い、胚の品質はコード 1(Excellent または Good)のものを使用した。以上のことから、*BRCA1* は栄養外胚葉への分化に関与する可能性が高いと考えられている。しかし、今後、*BRCA1* と初期胚の細胞分化に関与する因子とともに解析する必要があると考えられている。

2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚において割球表面全体だけではなく、一部分の細胞の核に *BRCA1* タンパク質が発現していた。また、*BRCA1* タンパク質が核に局在する胚のパーセンテージは、2 細胞期胚から桑実胚まで胚の発生が進むとともに増加した。胚盤胞およ

び脱出胚盤胞において栄養外胚葉の細胞の核にも発現していた。BRCA1 は細胞周期を制御として S 期の細胞の核に特異的に発現している (Scully *et al.*, 1997<sup>a</sup>; Huber *et al.*, 2001; Krum *et al.*, 2003)。このことより、BRCA1 はウシの初期胚において細胞周期を制御することが示唆された。

以上のことより、BRCA1 はウシの初期胚において細胞周期を制御し、栄養外胚葉への分化に関与することが示唆された。

表 3-4. BO stock 組成表 (×10)

BO Stock 液組成液	g / 100 ml	モル濃度 mM
NaCl	6.55	$1.12 \times 10^3$
KCl	0.300	40.27
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.128	10.67
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.330	22.45
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.106	5.21

表 3-5. BO 液組成表

BO 液組成液	g / 10 ml	モル濃度 mM
BO Stock	10 ml	--
Glucose	0.25g	$6.56 \times 10^{-5}$
NaHCO <sub>3</sub>	0.3105g	$3.69 \times 10^{-4}$
Sodium pyruvate	0.0110g	$9.99 \times 10^{-6}$
抗生物質混合液	100 $\mu$ l	--

表 3-6. リアルタイム PCR に使用した *BRCA1* および *18S rRNA* 遺伝子のプライマー

プライマー名	塩基配列	PCR 産物の大きさ (bp)
BRCA1 RTF	5'-CAGCAGTTTATTGCTCACTG-3'	135
BRCA1 RTR	5'-TGCCTATCCTTACATGTGCCCTTAC-3'	
Bov18S rRNAF	5'-AGAAACGGCTACCACATCCA-3'	169
Bov18S rRNAR	5'-CACCAGACTTGCCCTCCA-3'	

表 3-7. リアルタイム PCR に用いた反応液の組成

反応液組成	添加量	最終濃度
Master Mix 2× conc.	10 $\mu$ l	
PrimerF (10 pmol / $\mu$ l)	1 $\mu$ l	500 nM
PrimerR (10 pmol / $\mu$ l)	1 $\mu$ l	500 nM
PCR Grade water	3 $\mu$ l	
Total RNA	5 $\mu$ l	
Total	20 $\mu$ l	

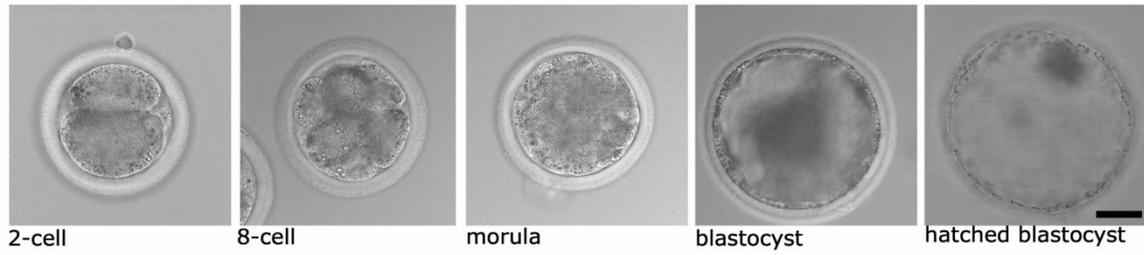


図 3-2. 本研究で用いた体外生産由来黒毛和種初期胚

morula: 桑実胚; blastocyst: 胚盤胞; hatched blastocyst: 脱出胚盤胞; Bar=50 $\mu$ m

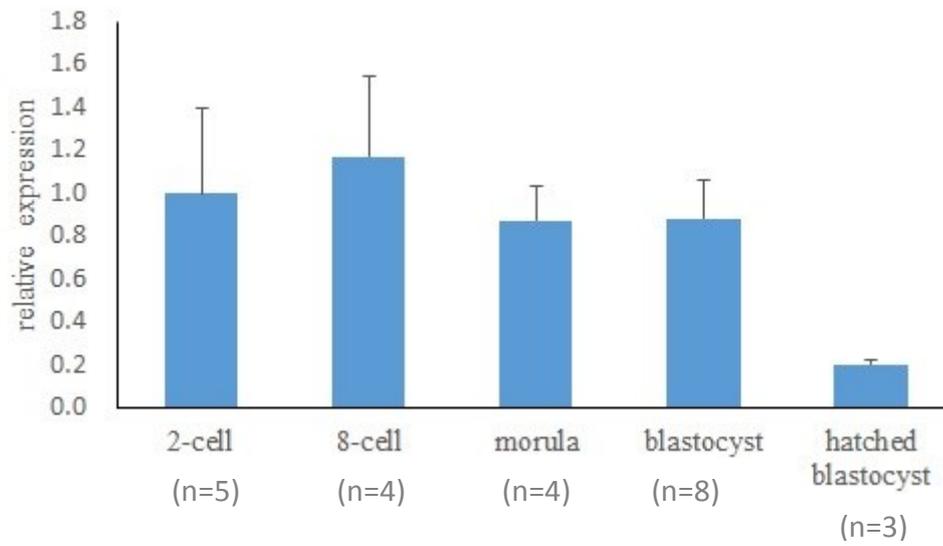


図 3-3. 体外生産された黒毛和種初期胚における *BRCA1* 遺伝子の相対発現量

morula: 桑実胚; blastocyst: 胚盤胞; hatched blastocyst: 脱出胚盤胞; n は実験回数

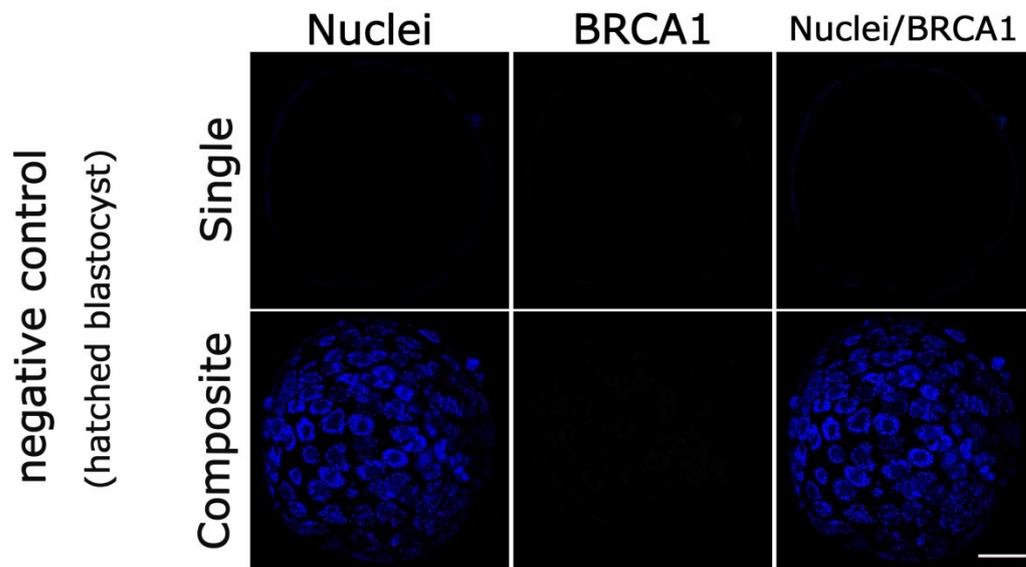


図3-4. 体外生産された黒毛和種の脱出胚盤胞におけるBRCA1の一次抗体無処理の免疫蛍光染色像

hatched blastocyst: 脱出胚盤胞; 青: 細胞の核; Bar=50 $\mu$ m

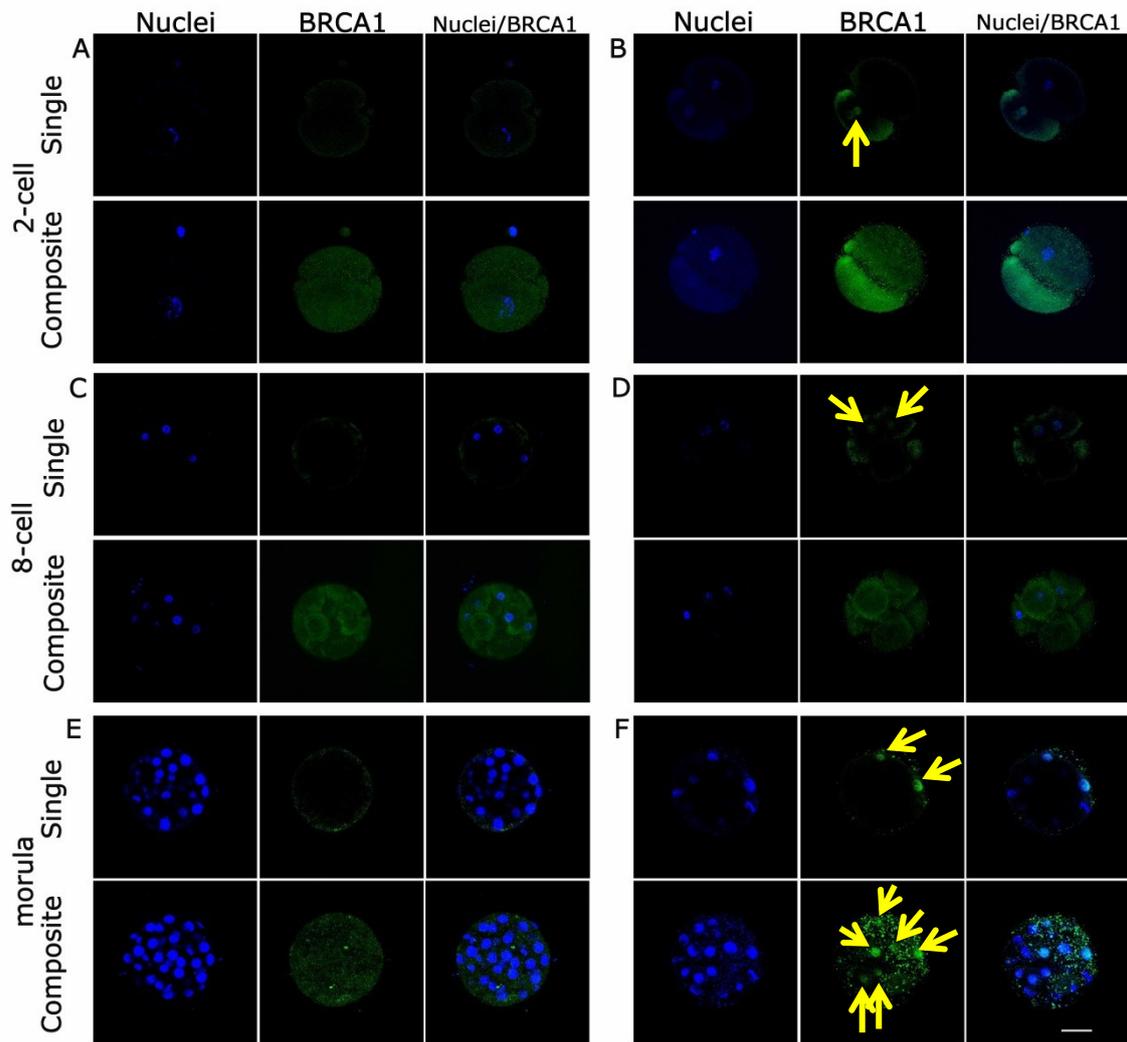


図 3-5. 体外生産された黒毛和種の 2 細胞期胚から桑実胚における BRCA1 タンパク質発現

A、C および E : BRCA1 タンパク質は、割球同士の接着部分以外の割球表面全体に発現していた。 B、D および F の矢印: BRCA1 タンパク質は、割球の一部分の細胞の核に発現していた。 morula: 桑実胚; 緑: BRCA1(黄色矢印); 青: 細胞の核; Bar=50 $\mu$ m

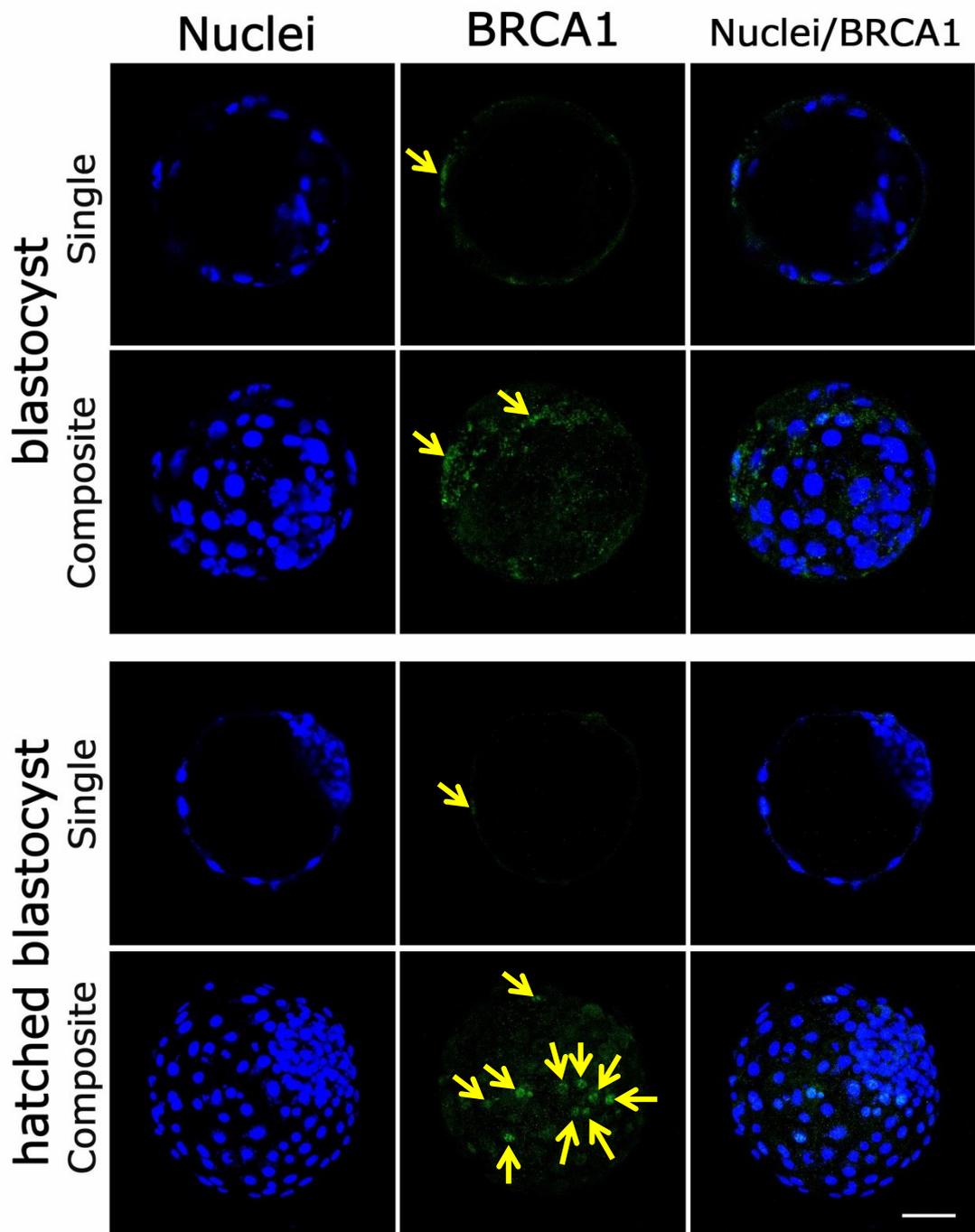


図 3-6. 体外生産された黒毛和種の胚盤胞および脱出胚盤胞における BRCA1 タンパク質発現

blastocyst: 胚盤胞; hatched blastocyst: 脱出胚盤胞; 緑: BRCA1(黄色矢印); 青: 細胞の核; Bar=50 $\mu$ m

## 第4章 ウシの初期胚における *CXCR1* 遺伝子の発現プロファイル解析

### 緒言

ヒトの *CXCR1* 遺伝子は、Interleukin-8(IL-8)の高親和性受容体 (Lahouassa *et al.*, 2008)として Holmes ら(1991)によりクローニングされ、G タンパク質受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR)に属することが明らかにされた。

GPCR における、TM3~TM6 および細胞質側のループは、GPCR の立体構造を影響し、GPCR の活性化のスイッチとして重要な役割を果たす (Vauquelin *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011)。ヒトにおいて、*CXCR1* のアミノ酸 247 残基が TM6 に位置し、このアミノ酸の残基置換は、IL-8 に応答して走化性が変わる(Han *et al.*, 2012)。ヒト *CXCR1* 遺伝子は、炎症性疾患(Sturm *et al.*, 2005)、癌(Bates *et al.*, 2004)、HIV(Caccuri *et al.*, 2012)および喘息(Al-Alwan *et al.*, 2013)などにも関与していることが報告されている。

ウシの *CXCR1* 遺伝子は、第2番染色体上に位置し、1つのイントロン(長さ 2,219bp)と 87bp の塩基配列から成るエクソン1 および 1,713bp の塩基配列から成るエクソン2 で構成され、全塩基配列に 36 の SNP が同定されている(Pighetti *et al.*, 2012)。第2エクソンでは、5つの SNP が同定され、SNP612、684、858、861 は同義置換であり、SNP777 の塩基置換はアミノ酸残基 245 番目でグルタミン (Gln) からヒスチジン (His) への非同義置換を起こす(Youngerman *et al.*, 2004<sup>a</sup>)。245 番目アミノ酸は TM5、TM6 およびその間の第三細胞内ループに位置する。第三細胞内ループのアミノ酸残基は、GPCR 結合および細胞内 Ca<sup>2+</sup>にお

いて重要な役割を果たす(Damaj *et al.*, 1996)ことから、SNP777ではGタンパク質媒介シグナルを妨げる可能性があることが示されている。また、SNP777のCC型を有するウシは乳房炎発生率が高い(Youngerman *et al.*, 2004<sup>b</sup>)。しかしながら、こちらのSNPはウシの不妊との関連性が不明である。

Youngermanら(2004<sup>a</sup>および2004<sup>b</sup>)はIL-8受容体遺伝子(GenBank Accession No.U19947)*CXCR2*の5つのSNPと乳房炎の関連性について報告しており、また、Lahouassaら(2008)は、RNA ligase-mediated-RACE (RLM-RACE)方法によりウシの新しいIL-8受容体(nIL-8R)をクローニングし、さらにアミノ酸のホモロジー解析により、ウシのnIL-8Rがヒトやウサギなどの*CXCR2*と類似していることを明らかにした。Pighettiら(2006)は、IL-8受容体の特定の領域のRT-PCR産物を配列決定し、ClustalWを用いてヒト配列と比較することによって、以前にYoungermanら(2004<sup>a</sup>および2004<sup>b</sup>)により報告されたウシ*CXCR2*が*CXCR1*と同じ遺伝子であることが確認された。

また、ヒトの子宮内膜(Dominguez *et al.*, 2003)、卵管(Balasubramaniam *et al.*, 2012)および栄養膜細胞層(Jovanović *et al.*, 2010)において*CXCR1*の発現が明らかにされている。ラットにおいては、子宮内膜(Gao *et al.*, 2014)に発現された。体外培養のヒト胚盤胞では、*CXCR1*は発現されなかったが、子宮内膜上皮細胞とともに体外共培養すると、子宮内膜上皮細胞の*CXCR1*発現が増加された(Dominguez *et al.*, 2003)。ウシにおいては、*CXCR1*はLahouassaら(2008)により同定され、卵胞膜細胞(Murayama *et al.*, 2010)、顆粒細胞および黄体(Shimizu *et al.*, 2012)に発現された。以上の研究は、*CXCR1*が多くの哺乳動物の繁殖に関与していることを示している。しかし、ウシの胚発生において、*CXCR1*が発現しているのかは明らかにされていない。

そこで、第1項では、ホルスタイン種および黒毛和種における、*CXCR1* 遺伝子の SNP およびハプロタイプと不妊との関連性を探索した。第2項では、体外生産された黒毛和種の初期胚の2細胞期胚、8細胞期胚、桑実胚および胚盤胞において、リアルタイム PCR により *CXCR1* 遺伝子の発現動態を明らかにすることを目的として解析した。

## 第1項 ウシにおける *CXCR1* 遺伝子の多型解析

### 目的

本研究は、ホルスタイン種および黒毛和種の *CXCR1* 遺伝子における、SNP およびハプロタイプと不妊との関連性を解析した。

### 材料および方法

材料は、宇都宮大学附属農場で飼養されている 12 頭の経産ホルスタイン種の血液、2015 年から 2017 年に栃木県内の T 牧場で飼養されていた 14 頭の不妊ホルスタイン種の血液、栃木県食肉処理場由来の 38 頭の経産した黒毛和種の卵巣、2015 年から 2017 年に栃木県内の T 牧場で飼養されていた 12 頭の不妊黒毛和種の血液を利用した。経産牛は AI または ET により受胎、分娩したウシであり、不妊牛は人工授精 3 回以上受胎ができなかったウシである。

#### 1. DNA の抽出

##### a. 血液からの DNA の抽出

第 2 章第 2 項方法と同様に行った。

## b. 卵巣からの DNA の抽出

DNeasy Blood & Tissue Kit(QAGEN, Cat. No. 69504)を用いて DNA 抽出を行った。卵巣 30mg をメスにより切り出して細かくカットし、1.5 ml のマイクロ遠心チューブに入れて 180  $\mu$ l の ATL を添加した。ProteinaseK 20  $\mu$ l を添加後、ボルテックス操作して混和し、56°C で一晩インキュベートした。サンプルをボルテックス操作し、200  $\mu$ l の Buffer AL を添加して十分に混和した。その後、第 2 章第 2 項の血液のサンプルと同じ処理方法を行った。

## 2. DNA 濃度の測定

第 2 章第 2 項方法と同様に行った。

## 3. PCR(Polymerase chain reaction) による DNA 抽出物の増幅

PCR は KOD-FX(TOYOBO)を用いて行った。*CXCR1* 遺伝子の模式図は図 4-1 に示し、プライマーの塩基配列は表 4-1 に示した。KOD-FX の反応液は表 4-2 に示し、DNA Template を 200 ng/50 $\mu$ l 添加した。KOD-FX の PCR 反応条件は、94°C で 2 分間処理後、熱変性 (denaturation)98°C で 10 秒、アニーリング (annealing)57°C で 30 秒、伸長反応 (extension)68°C で 60 秒を 30 サイクルを繰り返した。

## 4. 電気泳動による PCR 産物の確認

第 2 章第 2 項方法と同様に行った。

## 5. PCR 産物の精製

第 2 章第 2 項方法と同様に行った。

#### 6. シーケンス前処理

第 2 章第 2 項方法と同様に行った。

#### 7. 塩基配列の決定

第 2 章第 2 項方法と同様に行った。

#### 8. 塩基配列の解析

第 2 章第 2 項方法と同様に行った。

#### 9. 統計解析

統計解析はカイ二乗検定で行い、危険率 5%以下( $P < 0.05$ )の場合に有意差ありとした。

## 結果

ホルスタイン種の経産牛および不妊牛において、SNP 570 の G と A 対立遺伝子頻度はそれぞれ G0.500、A0.500 および G0.500、A0.500 であり、対立遺伝子頻度において有意差が認められなかった。SNP 642 の G と A 対立遺伝子頻度はそれぞれ G0.542、A0.458 および G0.607、A0.393 であり、対立遺伝子頻度において有意差が認められなかった。SNP 735 の G と C 対立遺伝子頻度はそれぞれ G0.500、C0.500 および G0.500、C0.500 であり、対立遺伝子頻度において有意差が認められなかった。SNP 816 の C と A 対立遺伝子頻度はそれぞれ C0.750、A0.250 および C0.714、A0.286 であり、対立遺伝子頻度において有意差が認められなかった。SNP 819 の A と G 対立遺伝子頻度はそれぞれ A0.500、G0.500 および A0.500、G0.500 であり、対立遺伝子頻度において有意差が認められなかった(表 4-3)。

黒毛和種の経産牛および不妊牛において、SNP 570 の G と A 対立遺伝子頻度はそれぞれ G0.145、A0.855 および G0.125、A0.875 であり、対立遺伝子頻度において有意差が認められなかった。SNP 642 の G と A 対立遺伝子頻度はそれぞれ G0.750、A0.250 および G0.750、A0.250 であり、対立遺伝子頻度において有意差が認められなかった。SNP 735 の G と C 対立遺伝子頻度はそれぞれ G0.750、A0.250 および G0.875、C0.125 であり、対立遺伝子頻度において有意差が認められなかった。SNP 816 の C と A 対立遺伝子頻度はそれぞれ C0.961、A0.039 および C1.000、A0.000 であり、対立遺伝子頻度において有意差が認められなかった。SNP 819 の A と G 対立遺伝子頻度はそれぞれ A0.750、G0.250 および A0.875、G0.125 であり、対立遺伝子頻度において有意差が認められなかった(表 4-4)。

ハプロタイプ解析結果から、ホルスタイン種および黒毛和種において、16種類のハプロタイプが同定された。ホルスタイン種において、10種類が同定された。一方、黒毛和種において、11種類が検出された。また、経産牛において、ハプロタイプDはホルスタイン種のみ存在するが、ハプロタイプB、F、N、P、Qは黒毛和種の経産牛のみ存在していた。不妊牛において、ハプロタイプE、F、G、H、I、Jはホルスタイン種のみ存在するが、ハプロタイプMは黒毛和種のみ存在していた。品種間で差異があることが明らかとなった(図4-2)。

## 考察

本研究では、Human Genome Variation Society(HGVS) のガイドラインに基づき、Youngerman ら(2004<sup>a</sup> および 2004<sup>b</sup>)が報告した *CXCR2* の SNP612、684、777、858 および 861 は本研究では *CXCR1* の SNP570、642、735、816 および 819 である。5つの SNP の対立遺伝子の出現率において、ホルスタイン種および黒毛和種の品種内の経産牛と不妊牛を比較したところ、有意差が認められなかった。この結果より、本研究の *CXCR1* の5つの SNP の対立遺伝子の出現率は、ウシの不妊に関わらないことが明らかとなった。

また、ウシにおいて16のハプロタイプが同定され、ホルスタイン種および黒毛和種では、それぞれ10および11が存在することが明らかになった。経産牛において、ハプロタイプ D はホルスタイン種のみ存在するが、ハプロタイプ B、N、O、F は黒毛和種のみ存在していた。不妊牛において、ハプロタイプ E、F、G、H、I、J はホルスタイン種のみ存在するが、ハプロタイプ M は黒毛和種のみ存在していた。これらのことから、経産牛および不妊牛において共通のハプロタイプが存在しないことが分かった。

以上の結果より、本研究の *CXCR1* の5つの SNP の対立遺伝子の出現率およびハプロタイプの分布は、ウシの不妊に関わらないことが明らかとなった。

表 4-1. ウシ *CXCR1* 遺伝子多型を解析するプライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列	PCR 産物の大きさ(bp)
CXCR1F588	CTCCGTGAGGCCTATCAAC	311
CXCR1R898	AGGTCTCAGCAATCACATGG	

表 4-2. KOD-FX を用いた PCR 反応組成液

反応液組成		添加量
2×Buffer for KOD FX		25 $\mu$ l
2mM dNTPs		10 $\mu$ l
Primer F (CXCR1-F588)	10 pmol/ $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
Primer R (CXCR1-R898)	10 pmol/ $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
DNA Template	200ng/50 $\mu$ l	—
KOD-FX		1 $\mu$ l
MilliQ water		up to 50 $\mu$ l
Total		50 $\mu$ l

表 4-3. ホルスタイン種における *CXCR1* 遺伝子の 5 つの SNP の遺伝子型および対立遺伝子頻度

SNP		遺伝子型(%)			対立遺伝子頻度	
		GG	GA	AA	G	A
570	経産牛(n=12)	2(17.67%)	8(66.66%)	2(17.67%)	0.500	0.500
	不妊牛(n=14)	3(21.43%)	8(57.14%)	3(21.43%)	0.500	0.500
642	経産牛(n=12)	3(25.00%)	7(58.33%)	2(16.67%)	0.542	0.458
	不妊牛(n=14)	5(35.71%)	7(50.00%)	2(14.29%)	0.607	0.393
735	経産牛(n=12)	2(16.67%)	8(66.67%)	2(16.67%)	0.500	0.500
	不妊牛(n=14)	3(21.43%)	8(57.14%)	3(21.43%)	0.500	0.500
816	経産牛(n=12)	6(50.00%)	6(50.00%)	0(00.00%)	0.750	0.250
	不妊牛(n=14)	7(50.00%)	6(42.86%)	1(7.14%)	0.714	0.286
819	経産牛(n=12)	2(16.67%)	8(66.67%)	2(16.67%)	0.500	0.500
	不妊牛(n=14)	3(21.43%)	8(57.14%)	3(21.43%)	0.500	0.500

表 4-4. 黒毛和種における *CXCR1* 遺伝子の 5 つの SNP の遺伝子型および対立遺伝子頻度

SNP		遺伝子型(%)			対立遺伝子頻度	
		GG	GA	AA	G	A
570	経産牛(n=38)	0(00.00%)	11(28.95%)	27(71.05%)	0.145	0.855
	不妊牛(n=12)	0(00.00%)	3(25.00%)	9(75.00%)	0.125	0.875
642	経産牛(n=38)	19(50.00%)	19(50.00%)	0(00.00%)	0.750	0.250
	不妊牛(n=12)	6(50.00%)	6(50.00%)	0(00.00%)	0.750	0.250
735	経産牛(n=38)	22(57.89%)	13(34.21%)	3(7.89%)	0.750	0.250
	不妊牛(n=12)	9(75.00%)	3(25.00%)	0(00.00%)	0.875	0.125
816	経産牛(n=38)	35(92.11%)	3(7.89%)	0(00.00%)	0.961	0.039
	不妊牛(n=12)	12(100.00%)	0(00.00%)	0(00.00%)	1.000	0.000
819	経産牛(n=38)	22(57.89%)	13(34.21%)	3(7.89%)	0.750	0.250
	不妊牛(n=12)	9(75.00%)	3(25.00%)	0(00.00%)	0.875	0.125

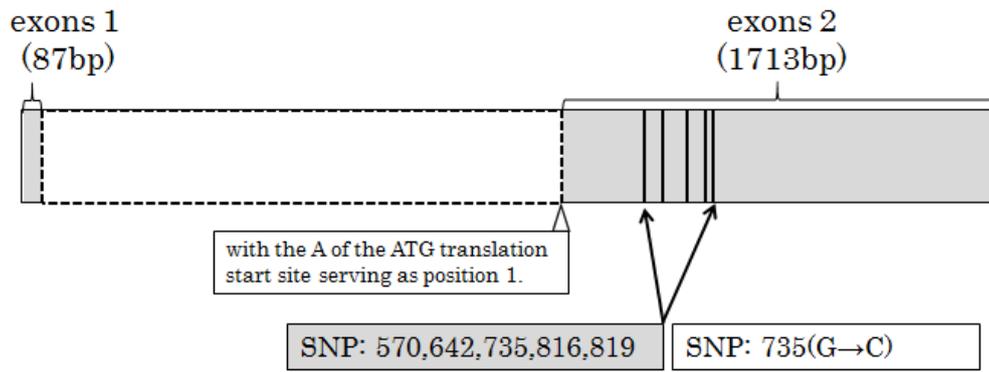
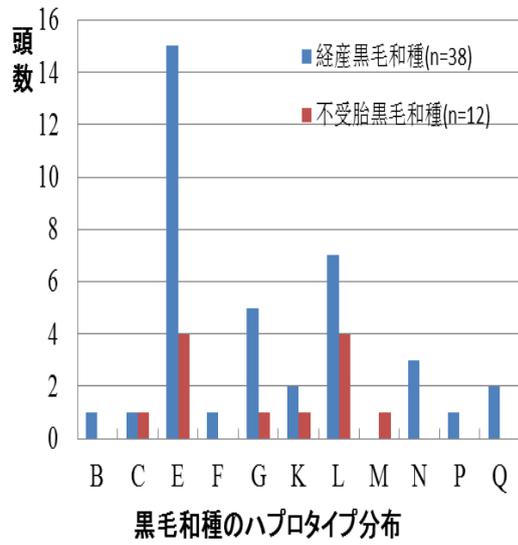
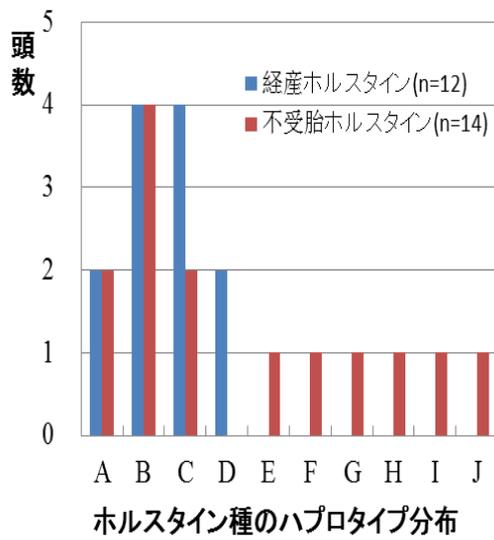


図 4-1. ウシの *CXCR1* 遺伝子の模式図と 5 つの SNP の位置



A	AA/AA/GG/CC/AA	G	GA/GG/GC/CC/AG	M	GA/GG/GG/CC/AA
B	GA/GA/GC/CA/AG	H	GG/GG/CC/AA/GG	N	AA/GG/GC/CC/AG
C	GA/GA/GC/CC/AG	I	GG/GG/CC/CA/GG	P	GA/GG/CC/AC/GG
D	GG/GG/CC/CA/CG	J	GG/GG/CC/CC/GG	Q	GA/GG/CC/CC/GG
E	AA/GA/GG/CC/AA	K	AA/GA/GC/CC/AG		
F	GA/GG/GC/CA/AG	L	AA/GG/GG/CC/AA		

図 4-2. ウシにおける *CXCR1* 遺伝子のハプロタイプ分布

## 第 2 項 初期胚における *CXCR1* 遺伝子の発現解析

### 目的

体外生産された黒毛和種の初期胚の 2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚および胚盤胞における *CXCR1* 遺伝子の発現動態を解析した。

### 材料および方法

#### 1. 体外生産胚の作出

第 3 章第 2 項と同様の方法を使用した。

#### 2. 初期胚からの Total RNA の抽出および cDNA の合成

第 3 章第 2 項と同様の方法を使用した。

本研究では、2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚、胚盤胞それぞれ 96、63、48、48 合計 256 個を用いた。

#### 3. リアルタイム PCR

本研究は、Igarashi(2009)らを若干の修正したリアルタイム PCR の方法に従い、*CXCR1* 遺伝子の発現動態の解析を行った。内在性コントロールとして 18S rRNA を用い、プライマーは Goossens ら(2005)が報告したプライマーセットを使用した(表 4-7)。ウシ *CXCR1* 遺伝

子を増幅するため、GenBank: HM367082.1 に基づいて 220F および 330R のプライマーセットを用いた(表 4-7)。解析には、FastStart Essential DNA Green Master kit (Roche) を用い、リアルタイム PCR は、各ステージで 5 個分の胚を添加し、95℃で 10 分間処理後、熱変性 (denaturation)95℃で 10 秒、アニーリング(annealing)60℃で 10 秒、伸長反応(extension)72℃で 30 秒の処理を 45 サイクル繰り返した。リアルタイム PCR の反応液は表 3-7 と同じものを利用した。各ステージにおいて実験は 3 回以上繰り返しを行った。胚盤胞における発現量を 1.0 として、 $\Delta\Delta\text{Ct}$  法(Ashley *et al.*, 2011)によりそれぞれの発生ステージにおける相対的な発現量を求めた。結果は平均値  $\pm$  標準偏差で示している。

## 結果

本研究で使った各ステージの胚は第3章第1項の図3-2と同様であった。

*18S rRNA* は、黒毛和種の胚発生の各ステージに発現した。

黒毛和種の初期胚において、2細胞期胚、8細胞期胚、桑実胚の *CXCR1* 遺伝子発現量は検出限界以下であり、胚盤胞のみ、*CXCR1* 遺伝子の発現が認められた(図4-3)。

## 考察

*18S rRNA* は、低 M 値（遺伝子解析基準のマーカー）であり、ウシの初期胚において内在性コントロール遺伝子として用いた (Goossens *et al.*, 2005)。本研究では、18S rRNA の発現量は黒毛和種の初期胚の各ステージに発現し、効率も *CXCR1* とほぼ同じであり、本研究の内在性コントロールに適する値を示した。

本研究で、*CXCR1* 遺伝子は 2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚で発現しなかったが、胚盤胞のみ発現していた。妊娠 3 ヶ月のヒト栄養膜細胞層では *CXCR1* 発現が認められたことが示されていることから (Jovanović *et al.*, 2010)、ウシにおいても *CXCR1* が栄養外胚葉で発現する可能性が高いと考えられる。今後は、免疫蛍光染色により、ウシの胚盤胞における *CXCR1* の局在、さらに胚盤胞と子宮内膜細胞において解析する必要があると考えられた。

表 4-7. リアルタイム PCR に使用した *CXCR1* および *18S rRNA* 遺伝子のプライマー

プライマー名	塩基配列	増幅部位の 大きさ (bp)
CXCR1-220F	5'-CTGTGAGATAAGCACTGAGA-3'	121
CXCR1-330R	5'-GAGCGACCAATCCGGCTGTA-3'	
Bov18S rRNAF	5'-AGAAACGGCTACCACATCCA-3'	169
Bov18S rRNAR	5'-CACCAGACTTGCCCTCCA-3'	

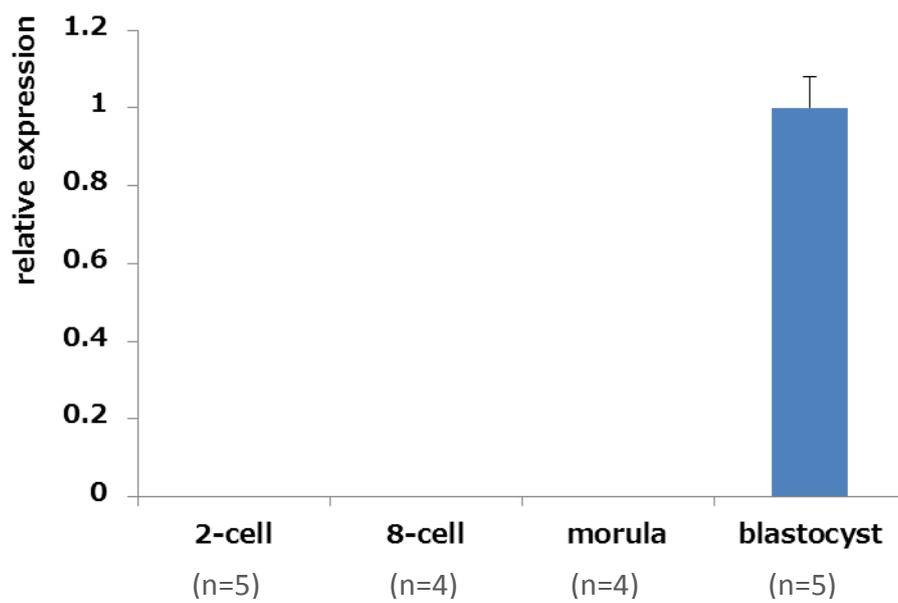


図 4-3. 黒毛和種の初期胚における *CXCR1* 遺伝子の発現動態

morula: 桑実胚; blastocyst: 胚盤胞; n は実験回数

## 第5章 総合考察

日本における家畜改良は家畜改良増殖目標に従い進められており、これまでにホルスタイン種では乳脂肪率などの乳質および乳量に関する形質について、目覚ましい成果を挙げてきた。しかしながら、ここ数年の受胎率の全国平均は低下傾向にあり、特に乳用牛であるホルスタイン種では深刻な問題となっている。また、飼養頭数の減少、経産牛の供用期間が短縮傾向にある。2025年までに、ホルスタイン種の乳量が9,500~10,000kgに増加、現在の乳脂肪率などの乳成分を現在の値を維持しながら改良を推進することを目標としている。この新しい改良増殖目標を目指して、農林水産省は、SNP解析技術を用いたゲノミック育種価の利用および優良な受精卵により子牛を効率よく生産する技術開発を推進している。

そこで、本研究では、栃木県内のT牧場で繋養されている高い経済形質を持つホルスタイン集団を用いて、第2章ではウシ全染色体上のSNPによるゲノムワイド関連解析を行い、またこの解析法により乳脂肪率と関連が示された*DGATI*遺伝子について、多型解析を行い、本集団においてマーカー遺伝子として利用可能か否かを検討した。

*DGATI*の各遺伝子型における、平均乳脂肪率はAA型 $3.82 \pm 0.41\%$ 、AK型 $3.91 \pm 0.39\%$ およびKK型 $4.52 \pm 0.47\%$ であり、KK型を有するウシの平均乳脂肪率はAA型およびAK型を有するウシより有意に高かった。この結果は、オランダおよびスウェーデンのホルスタイン種におけるの研究と一致した(Schennink *et al.*, 2007; Näslund *et al.*, 2008)。これにより、*DGATI*遺伝子は、栃木県内のT集団において、乳脂肪率の遺伝子マーカーとして有効であることが明らかとなった。

第3、4章では、ヒトの生殖やマウスの繁殖における報告された *BRCA1* および *CXCR1* 遺伝子に着目し、ウシの不妊や胚発生において *BRCA1* および *CXCR1* 遺伝子を解析した。

ウシの *BRCA1* の SNP は、ホルスタイン種における 36 頭の経産牛の *BRCA1* 遺伝子の AA、AT および TT 遺伝子型の分布は、それぞれ 23 頭、3 頭および 10 頭であり、対立遺伝子頻度は A0.681 および T0.319 であった。18 頭の不妊牛の AA、AT および TT 遺伝子型の分布は、それぞれ 8 頭、7 頭および 3 頭であり、対立遺伝子頻度は A0.639 および T0.361 であった。経産牛と不妊牛との間の SNP1257 の遺伝子型および対立遺伝子頻度の分布に有意差はなかった。ヒトでは、*BRCA1* 遺伝子変異の個体は FSH の処理への反応が低いので排卵数が少ないことが報告されている(Oktay *et al.*, 2010)。本研究検出した SNP1257 は *BRCA1* のエキソン 11 の 2 つの核局在シグナルに近い位置するが、それに対するアミノ酸は非同義置換である。以上のことから、*BRCA1* の SNP1257 はウシの不妊との関連性がないことが明らかとなった。

*BRCA1* 遺伝子の発現量は、2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚および胚盤胞と同程度の発現が認められた。ウシの胚ゲノム活性化時期である 8 細胞期胚で有意な変化は認められなかったことから、ウシの *BRCA1* 遺伝子はウシの胚ゲノム活性化において働いていないことが明らかになった。

*BRCA1* タンパク質は、2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚において割球の接着部分ではなく割球表面全体に発現し、胚盤胞および脱出胚盤胞において内部細胞塊に認められず、栄養外胚葉の細胞に発現していた。

また、2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚において割球表面全体だけではなく、一部分の細胞の核に *BRCA1* タンパク質が発現していた。また、*BRCA1* タンパク質が核に局在する胚

のパーセンテージは、2細胞期胚から桑実胚まで胚の発生が進むとともに増加した。胚盤胞および脱出胚盤胞において栄養外胚葉の細胞の核にも発現していた。BRCA1は細胞周期を制御しており、S期の細胞の核に特異的に発現していることが報告されている (Scully *et al.*, 1997<sup>a</sup>; Huber *et al.*, 2001; Krum *et al.*, 2003)。このことより、BRCA1はウシの初期胚において細胞周期を制御することが示唆された。以上のことより、BRCA1はウシの初期胚において細胞周期を制御し、栄養外胚葉への分化に関与する可能性があると考えられている。

CXCR1の5つのSNPの対立遺伝子の出現率において、ホルスタイン種および黒毛和種の品種内の経産牛と不妊牛を比較したところ、有意差が認められなかった。この結果より、本研究のCXCR1の5つのSNPの対立遺伝子の出現率は、ウシの不妊に関わらないことが明らかとなった。

また、ウシにおいて16のハプロタイプが同定され、ホルスタイン種および黒毛和種では、それぞれ10および11が存在することが明らかになった。経産牛において、ハプロタイプDはホルスタイン種のみ存在するが、ハプロタイプB、N、O、Fは黒毛和種のみ存在していた。不妊牛において、ハプロタイプE、F、G、H、I、Jはホルスタイン種のみ存在するが、ハプロタイプMは黒毛和種のみ存在していた。このことから、ハプロタイプの出現率は品種間で異なることが明らかとなった。

ウシ初期胚におけるCXCR1遺伝子の発現動態を解析より、2細胞期胚、8細胞期胚、桑実胚においてCXCR1遺伝子の発現は認められなかったが、胚盤胞のみ発現していた。ヒトにおいて妊娠3ヶ月の栄養膜細胞層にCXCR1遺伝子が発現していた (Jovanović *et al.*, 2010) ことから、ウシCXCR1遺伝子は栄養外胚葉で発現する可能性が高いと推測された。

本研究では、*DGATI* 遺伝子は T 集団の乳脂肪率マーカーとして選抜に用いることができることを明らかにし、*BRCA1* はウシの初期胚の細胞周期および栄養外胚葉への分化において働いて、今後詳細な働きを明らかにすることでマーカー遺伝子となり得る可能性を示した。

## 参考文献

阿久津麗, 福井えみ子, 松本浩道, 吉澤緑. (2013). 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*. 21(2): 15-21.

Al-Alwan LA, Chang Y, Mogas A, Halayko AJ, Baglole CJ, Martin JG, Rousseau S, Eidelman DH, Hamid Q. (2013). Differential Roles of CXCL2 and CXCL3 and Their Receptors in Regulating Normal and Asthmatic Airway Smooth Muscle Cell Migration. *Journal of Immunology*. 191(5): 2731-41.

Ashley RL1, Antoniazzi AQ, Anthony RV, Hansen TR. (2011). The chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12 are activated during implantation and placentation in sheep. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2011 Nov 3; 9:148. doi: 10.1186/1477-7827-9-148.

Bachelier R, Venezia ND, Mazoyer S, Frappart L, Lenoir GM, Vincent A. (2000). Differential expression and subcellular localization of murine BRCA1 and BRCA1 -  $\delta$ 11 isoforms in murine and human cell lines. *International Journal of Cancer*. 88: 519-524.

Balasubramaniam ES, Van Noorden S, El-Bahrawy M. (2012). The expression of interleukin (IL)-6, IL-8, and their receptors in fallopian tubes with ectopic tubal gestation. *Fertil Steril*. 98(4): 898-904.

Balding DJ. (2006). A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nature Reviews Genetics*. 7(10): 781-91.

Bates RC, DeLeo MJ, Mercurio AM. (2004). The epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR-1-mediated chemotaxis. *Experimental Cell Research*. 299(2): 315–24.

Bell RM, Coleman RA. (1980). Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Annual Review Biochemistry*. 49: 459-487.

Bouwman AC, Bovenhuis H, Visker MH, van Arendonk JA. (2011). Genome-wide association of milk fatty acids in Dutch dairy cattle. *British Medical Council Genetics*. 11: 12:43.

Brindley DN. (1991). *Metabolism of triacylglycerols*. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 20: 171-203.

Caccuri F, Giagulli C, Bugatti A, Benetti A, Alessandri G, Ribatti D, Marsico S, Apostoli P, Slevin MA, Rusnati M, Guzman CA, Fiorentini S, Caruso A. (2012). HIV-1 matrix protein p17 promotes angiogenesis via chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(36): 14580-14585.

Cases S, Zhou P, Shillingford JM, Wiseman BS, Fish JD, Angle CS, Hennighausen L, Werb Z, Farese RV Jr. (2004). Development of the mammary gland requires DGAT1 expression in stromal and epithelial tissues. *Development*. 131(13): 3047-3055.

Chen CF, Li S, Chen Y, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH. (1998). The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 271(51): 32863-32868.

Cui JQ, Shao N, Chai Y, Wang H, Reddy ES, Rao VN. (1998). BRCA1 splice variants BRCA1a and BRCA1b associate with CBP co-activator. *Oncology Reports*. 5(3): 591-595.

Damaj BB, McColl SR, Neote K, Na SQ, Ogborn KT, Hebert CA, Naccache PA . (1996). Identification of g-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops. *FASEB Journal*. 10(12):1426-1434.

Dominguez F, Galan A, Martin JJ, Remohi J, Pellicer A, Simón C. (2003). Hormonal and embryonic regulation of chemokine receptors CXCR1, CXCR4, CCR5 and CCR2B in the human endometrium and the human blastocyst. *Molecular Human Reproduction*. 9(4): 189-198.

Farese RV, Cases S, Smith SJ. (2000). Triglyceride synthesis: insights from the cloning of diacylglycerol acyltransferase. *Current Opinion in Lipidology*. 11(3): 229-234.

Fontanesi L, Calò DG, Galimberti G, Negrini R, Marino R, Nardone A, Ajmone-Marsan P, Russo V. (2014). A candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle. *Animal Genetics*. 45(4): 576-580.

Gao WN, Yang W, Liu YF, Tang X1, Guo Y, Wang LJ, Zhang MM, Huang GY. (2014). Effect of acupuncture on CXCL8 receptors in rats suffering from embryo implantation failure. *Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Sciences)*. 34(1): 91-98.

Goossens K, Poucke MV, Soom AV, Vandesompele J, Zeveren AV, Peelman LJ. (2005). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Developmental Biology*. 5: 27 doi:10.1186/1471-213X-5-27.

Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, Cambisano N, Mni M, Reid S, Simon P, Spelman R, Georges M, Snell R. (2002). Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense Mutation in the Bovine DGAT1 Gene with Major Effect on Milk Yield and composition. *Genome Research*. 12(2): 222-231.

Hakem R, de la Pompa JL, Sirard C, Mo R, Woo M, Hakem A, Wakeham A, Potter J, Reitmair A, Billia F, Firpo E, Hui CC, Roberts J, Rossant J, Mak TW. (1996). The tumor suppressor gene *Brcal* is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell*. 85(7): 1009-1023.

Hamano S, Kuwayama M. (1993). In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*. 39(3): 703-712.

Hamatani T, Daitoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MSH, Dey SK. (2004). Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(28): 10326-10331.

Han Xinbing, Souvenir D, Tachado, Henry Koziel, William A. Boisvert. (2012). Leu128(3.43) (I128) and Val247(6.40) (V247) of CXCR1 are critical amino acid residues for gprotein coupling and receptor activation. *PLoS One*. 7(8): e42765.

Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. (1991). Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*. 253(5025): 1278-80.

星一美, 稲葉浩子, 大島藤太, 川野辺章夫, 菊池草一. (2012). 乳用牛の遺伝子解析による生産性向上技術の開発. 栃木県平成24年度報告試験研究成果. pp. 20-21.

Huber LJ, Yang T W, Sarkisian CJ, Master SR, Deng CX, Chodosh LA. (2001). Impaired DNA damage response in cells expressing an exon 11-deleted murine Brca1 variant that localizes to nuclear foci. *Molecular and Cellular Biology*. 21(12): 4005-4015.

Igarashi T, Tajiri Y, Sakurai M, Sato E, Li D, Mukai K, Suematsu M, Fukui E, Yoshizawa M, Matsumoto H. (2009). Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 is expressed in extraembryonic tissues and interacts with laminin 1 in the Reichert membrane at postimplantation in the mouse. *Biology of Reproduction*. 81(5): 948-955.

Illumina. (2009). BovineSNP50 Genotyping BeadChip.

Jovanović M, Stefanoska I, Radojčić L, Vićovac L. (2010). Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1. *Reproduction*. 139(4):789-98.

家畜改良事業団 (一般社会法人). (2018). 2017年度乳用牛群能力検定成績速報.

Karim L, Takeda H, Lin L, Druet T, Arias JA, Baurain D, Cambisano N, Davis SR, Farnir F, Grisart B, Harris BL, Keehan MD, Littlejohn MD, Spelman RJ, Georges M, Coppieters W. (2011). Variants modulating the expression of a chromosome domain encompassing PLAG1 influence bovine stature. *Nature Genetics*. 43(5): 405-413.

Kan YW, Dozy AM. (1978). Antenatal diagnosis of sickle-cell anaemia by D.N.A. analysis of amniotic-fluid cells. *Lancet*. 34(5): 364-365.

Krum SA, Womack JE, Lane TF. (2003). Bovine BRCA1 shows classic responses to genotoxic stress but low in vitro transcriptional activation activity. *Oncogene*. 22(38): 6032-6044.

Lahouassa H, Rainard P, Caraty A, Riollot C. (2008). Identification and characterization of a new interleukin-8 receptor in bovine species. *Molecular Immunology*. 45(4): 1153-1164.

Lane T F, Deng CX, Elson A, Lyu MS, Kozak CA, Leder P. (1995). Expression of BRCA1 is associated with terminal differentiation of ectodermally and mesodermally derived tissues in mice. *Genes & Development*. 9(21): 2712-2722.

Lehner R, Kuksis A. (1996). Biosynthesis of triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*. 35(2): 169-201.

Lu J, Boeren S, van Hooijdonk T, Vervoort J, Hettinga K. (2015). Effect of the DGAT1 K232A genotype of dairy cows on the milk metabolome and proteome. *Journal of Dairy Science*. 98(5): 3460-3469.

Madsen O, Scally M, Douady CJ, Kao DJ, Debry RW, Adkins R, Amrine H M, Stanhope M J, Jong W, Springer M S. (2001). Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals. *Nature*. 409(6820): 610-614.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 266(5182): 66-71.

Mixon M , Kittrell F, Medina D. (2000). Expression of Brca1 and splice variant Brca1D11 RNA levels in mouse mammary gland during normal development and tumorigenesis. *Oncogene*. 19(46): 5237-5243.

Molee A, Duanghaklang N, Na-Lampang P. (2012). Effects of Acyl-CoA : diacylglycerol acyl transferase 1 (DGAT1) gene on milk production traits in crossbred holstein dairy cattle. *Tropical Animal Health and Production*. 44(4): 751-755.

Murayama C, Kaji A, Miyauchi K, Matsui M, Miyamoto A, Shimizu T. (2010). Effect of VEGF (vascular endothelial growth factor) on expression of IL-8 (interleukin-8), IL-1beta and their receptors in bovine theca cells. *Cell Biology International*. 34(5): 531-536.

Nayeri S, Sargolzaei M, Abo-Ismael MK, May N, Miller SP, Schenkel F, Moore SS, Stothard P. (2016). Genome-wide association for milk production and female fertility traits in Canadian dairy Holstein cattle. *British Medical Council Genetics*. 17(1): 75.

Näslund J, Fikse WF, Pielberg GR, Lunde'n A. (2008). Frequency and Effect of the Bovine Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 1 (DGAT1) K232A Polymorphism in Swedish Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*. 91(5): 2127-2134.

農林水産省. (2015). 家畜改良増殖目標. 平成 27 年 3 月.

農林水産省. (2015). 畜産部ホームページ・酪農及び肉用牛生産の近代化を図るための基本方針・家畜改良増殖目標等.

[http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/rakuniku\\_kihon\\_houshin.html#title/](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/rakuniku_kihon_houshin.html#title/)

農林水産省生産局畜産振興. (2017). 家畜改良増殖をめぐる情勢. 平成 29 年 2 月.

Nowacka-Woszuk J, Noskowiak A, Strabel T, Jankowski T, Świtoński M. (2008). An effect of the DGAT1 gene polymorphism on breeding value of Polish holstein-friesian sires. *Animal Science Papers and Reports*. 26(1): 17-23.

Ohnishi Y, Tanaka T, Ozaki K, Yamada R, Suzuki H, Nakamura Y. (2001). A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *Journal of Human Genetics*. 46(8): 471-477.

Oktay K, Kim JY, Barad D, Babayev SN. (2010). Association of BRCA1 Mutations With Occult Primary Ovarian Insufficiency: A Possible Explanation for the Link Between Infertility and Breast/Ovarian Cancer Risks. *Journal of Clinical Oncology*. 28(2): 240-244.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(8): 2766-2770.

Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe HW, Ernst OP. (2008). Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*. 454 (7201): 183–187.

Pighetti GM, Rambeaud M. (2006). Genome conservation between the bovine and human interleukin-8 receptor complex: improper annotation of bovine interleukin-8 receptor b identified. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 114(3-4): 335-340.

Pighetti GM, Kojima CJ, Wojakiewicz L, Rambeaud M. (2012). The bovine CXCR1 gene is highly polymorphic. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 145(1-2): 464-470.

Saito K, Furukawa E, Kobayashi M, Fukui E, Yoshizawa M, Matsumoto H. (2014). Degradation of estrogen receptor  $\alpha$  in activated blastocysts is associated with implantation in the delayed implantation mouse model. *Molecular Human Reproduction*. 20(5): 384-391.

Schennink A, Stoop WM, Visker MH, Heck JM, Bovenhuis H, van der Poel JJ, van Valenberg HJ, van Arendonk JA. (2007). DGAT1 underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. *Animal Genetics*. 38 (5): 467-473.

Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM. (1997<sup>a</sup>). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell*. 88(2): 265-275.

Scully R, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, Livingston DM. (1997<sup>b</sup>). Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell*. 90(3): 425-435.

Scully R, Anderson SF, Chao DM, Wei W, Ye L, Young RA, Livingston DM, Parvin JD. (1997<sup>c</sup>).

BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(11): 5605-5610.

Shen SX, Weaver Z, Xu X, Li C, Weinstein M, Chen L, Guan XY, Ried T, Deng CX. (1998). A targeted disruption of the murine *Brcal* gene causes gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability. *Oncogene*. 17(24): 3115-3124.

Shimizu T, Kaji A, Murayama C, Magata F, Shirasuna K, Wakamiya K, Okuda K, Miyamoto A.. (2012). Effects of interleukin-8 on estradiol and progesterone production by bovine granulosa cells from large follicles and progesterone production by luteinizing granulosa cells in culture. *Cytokine*. 57(1): 175-181.

Shi YL, Luo XZ, Zhu XY, Hua KQ, Zhu Y, Li DJ. (2006). Effects of combined 17beta-estradiol with TCDD on secretion of chemokine IL-8 and expression of its receptor CXCR1 in endometriotic focus-associated cells in co-culture. *Human Reproduction*. 21(4): 870-879.

Shorten PR, Pleasants TB, Upreti GC. (2004). A mathematical model for mammary fatty acid synthesis and triglyceride assembly: the role of stearoyl CoA desaturase (SCD). *Journal of Dairy Research*. 71(4): 385-397.

Smith SJ, Cases S, Jensen DR, Chen HC, Sande E, Tow B, Sanan DA, Raber J, Eckel RH, Farese RV Jr. (2000). Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nature Genetics*. 25(1): 87-90.

Snelling WM, Casas E, Stone RT, Keele JW, Harhay GP, Bennett GL, Smith, TPL. (2005). Linkage mapping bovine EST-based SNP. *BMC Genomics*. 6: 74.

Stringfellow DA, Seidel SM, IETS. (2001). Manual of the International Embryo Transfer Society. ((公社)畜産技術協会(訳)(2001) 胚の衛生的取り扱いマニュアル (国際胚移植学会 IETS マニュアル) 第3版). pp. 104-116.

Sturm A, Baumgart DC, d'Heureuse JH, Hotz A, Wiedenmann B, Dignass AU. (2005). CXCL8 modulates human intestinal epithelial cells through a CXCR1 dependent pathway. *Cytokine*. 29(1): 42-48.

Sun D, Jia J, Ma Y, Zhang Y, Wang Y, Yu Y, Zhang Y. (2009). Effects of DGAT1 and GHR on milk yield and milk composition in the Chinese dairy population. *Animal Genetics*. 40(6): 997-1000.

Takeuchi M, Seki M, Furukawa, E, Takahashi A, Saito K., Kobayash M, Ezoe K, Fukui E, Yoshizawa M, Matsumoto H. (2017). Improvement of implantation potential in mouse blastocysts derived from IVF by combined treatment with prolactin, epidermal growth factor and 4-hydroxyestradiol. *Molecular Human Reproduction*. 23(8): 557-570.

Thakur S, Zhang HB, Peng Y, Le H, Carroll B, Ward T, Yao J, Farid LM, Couch FJ, Wilson RB. (1997). Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Molecular and Cellular Biology*. 17(1): 444-452.

栃木県. (2016). 栃木県酪農・肉用牛生産近代化計画の概要. 平成 28 年度.

Vauquelin G, Van Liefde I. (2005). G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 19(1): 45–56.

Vigneault C, McGraw S, Massicotte L, Sirard, MA. (2004). Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biology of Reproduction*. 70(6): 1701-1709.

Walstra P, JTM. Wouters, TJ Geurts. (2006). *Dairy Science and Technology*. 2nd ed. CRC Press.

Wells D, Bermudez MG, Steuerwald N, Thornhill AR, Walker DL, Malter H, Delhanty JDA, Cohen J. (2005). Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Human Reproduction*. 20(5): 1339-1348.

Xu F, Wu H, Katritch V, Han GW, Jacobson KA, Gao ZG, Cherezov V, Stevens RC. (2011). Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science*. 332(6027): 322–327.

Yongji C, Gorewit RC. (2002). Cloning and Expression of Bovine BRCA1. *Pakistan Journal of Nutrition*. 1(1): 56-63.

Youngerman SM, Saxton AM, Pighetti GM. (2004<sup>a</sup>). Novel single nucleotide polymorphisms and haplotypes within the bovine CXCR2 gene. *Immunogenetics*. 56(5): 355-359.

Youngerman SM, Saxton AM, Oliver SP, Pighetti GM. (2004<sup>b</sup>). Association of CXCR2 polymorphisms with subclinical and clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 87(8): 2442-2448.

## 謝辞

本研究の実験および本論文を作成するために、丁寧なご指導を賜りました指導教員である宇都宮大学 福井えみ子教授に深く感謝し、心からお礼申し上げます。また、研究室のことばかりではなく、日頃から体調や家庭生活にも配慮していただいた上、常に温かく見守ってくださったこと、本当に感謝しております。

本研究を進めるにあたり、ご指導いただきました宇都宮大学 松本浩道准教授に心より感謝いたします。免疫蛍光染色結果を解析することについて、大変お世話になりました。投稿論文を書き直してくださる時、夜遅くまで長時間お付き合いくださって本当にありがとうございました。小さな疑問にも分かりやすく、丁寧に対応いただき、理解を深めることができました。

本論文の審査、ご指導ならびに細部にわたる丁寧なご校閲を賜りました茨城大学 大久保武教授に深く感謝し、心からお礼申し上げます。中間発表会に、遺伝子の知識を丁寧に説明して下さって、本当にありがとうございました。

本論文の審査、ご指導ならびに細部にわたる丁寧なご校閲を賜りました宇都宮大学 長尾慶和教授に深く感謝し、心からお礼申し上げます。また、血液や精巣などのサンプルを採取するにあたり、いつもご協力くださったこと、本当に感謝しております。

本論文の審査、ご指導ならびに細部にわたる丁寧なご校閲を賜りました東京農工大学 杉村智史特任准教授に深く感謝し、心からお礼申し上げます。

終始適切な助言を賜りました宇都宮大学 吉澤 緑名誉教授に心より感謝いたします。論文を投稿する際には、ご多忙の中、貴重な時間を割いて私の面倒を見てくださったことに

は感謝の念が絶えません。入学時、緑教授は「これから本番だよ」の言葉を時々思い出します。

ウシの体外受精胚を提供していただきました家畜改良事業団の濱野晴三様、土屋秀樹様、宮村元晴様をはじめとした家畜改良事業団の皆様にご心より感謝申し上げます。お仕事にも関わらず、親切に対応していただき、実験をスムーズに行うことができました。

ゲノムワイド関連解析を提供していただきました東京大学大学院新領域創成科学研究科中山一大様にご心より感謝申し上げます。

実験の遂行にあたり、血液などのサンプル、供試したウシのデータや様々なご教示をいただきました栃木県内の T 牧場の皆様にご心より感謝いたします。皆様のお力によりこの論文は成り立っているといっても過言ではありません。

卵巣の採取にあたり、ご協力して頂きました栃木県畜産公社、宇都宮市食肉衛生検査所の皆様にご心より感謝いたします。よく声をかけてくださったり、優しく対応していただき、本当にありがとうございました。

血液や精巣サンプルを採取するにあたり、ご協力いただきました宇都宮大学家畜繁殖生理学研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。サラントラガ博士、佐藤あかね博士、アチラト博士および研究室の皆様には、自身の研究室の仕事でお忙しい中、ウシの保定やサンプルを採取して下さって大変感謝しております。

ニホンジカのサンプルをご提供くださいました野生鳥獣管理学研究室の小金澤正昭名誉教授にご心から御礼申し上げます。ありがとうございました。

実験の遂行にあたり、ご協力、ご指導いただきました宇都宮大学 バイオサイエンス教育研究センターの先生たちと皆様にご心より深く感謝申し上げます。ゲノミクス棟に行った際には、研究のことばかりではなく、温かいお言葉をかけてくださったことは、とても大きな励みとなりました。

宇都宮大学まなびの森保育園の金崎芙美子園長に心より深く感謝申し上げます。家内は博士研究期間および訪問学者として勤める期間、うちの子を保育くださって、ほんとに助かりました。また、子供の体を鍛え、自立心や人と関わる力、豊かな人間性を育てくださっていた保育園の先生たちに、に心から御礼申し上げます。

技術習得の際にご指導いただきました動物育種繁殖学研究室の藤田健太郎様、阿久津麗様、鈴木なな子様、鈴木なな子様に心より感謝いたします。研究室に配属されてまだ間もなく、研究について何も分からない私に試薬の位置から器具の使い方、実験計画の立て方まで厳しく、懇切丁寧に基礎をしっかりと教えてくださったからこそ、この研究を遂行できたと思っております。

交換留学の一年間、研究を遂行するにあたり、お忙しい中、時間を割いてご協力してくださった磯部圭祐様、古川悦子様、中里千帆様、松本拓也様、高橋明仁様、飯村真衣様、樫野恒平様、赤城祐様、星野瑞貴様、大舘仁志様、上嶋優子様、に深く感謝いたします。

また、実験室で共に実験をしていることが多く、様々なことを手伝ってくださった西萌香様、竹内美紀様、町田琴音様、野間絵里様、佐々木亜美様、山崎理央様、浅川美幸様、関美沙都様、利田明日香様、門前有華様、後藤洋祐様、西山智穂様、八板理様、吉田桃菜様、田代渚様、赤岩将門様、名嘉修治様、半田育未様、水口恵様、鈴木沙織様、山崎茜様、矢部麻由子様、宮本玲湖様、小林蒼様、服部菜穂様、竹内栄作様、中島大貴様、石田友子様、関口陽様、中村佳穂様、加藤えみ様、岡井大樹様、松崎夢々果様、領塚美南様、大谷暁洋様、小崎晴菜様、三沼千夏様には大変感謝しております。

最後となりましたが、動物育種繁殖学研究室の皆様、に御礼申し上げます。

本研究は家族の皆さん、多くの友達に支えられて成り立っているということを非常に痛感しております。皆様、本当にありがとうございました。