

# Studies on improvement of the bovine blastocysts derived in vitro production and enhancement of the ATP-binding cassette sub-family B member 1 expression

平嶋, 美幸

<https://hdl.handle.net/2324/1456012>

---

出版情報：九州大学, 2014, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

氏 名 : 平嶋 美幸 (森 美幸)

論文題目 : Studies on improvement of the bovine blastocysts derived in vitro  
production and enhancement of the ATP-binding cassette sub-family B  
member 1 expression  
(牛体外受精由来胚の作出における胚の品質向上と ABCB1 発現に関する研究)

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

牛の胚移植は、着床前の胚をレシピエント牛の子宮に移して着床・妊娠・分娩させる技術であり、育種改良の加速だけでなく、現場の農家においてもホルスタイン種に市場価値の高い黒毛和種の胚を移植して収益の高い子牛を得る技術として活用されている。胚生産では、ドナー牛にホルモン処置を行って回収する体内胚の他、屠畜卵巣から取り出した卵子を体外受精し、培養器で大量生産できる体外胚生産技術の発展が目覚ましい。胚移植はレシピエント牛の発情周期に合わせる必要があるため、体外胚を活用するためには胚の凍結保存技術が必要であるが、凍結保存後の生存率や受胎率が低いという問題がある。

本研究では、まず体外胚生産において、体外培養由来の栄養膜小胞を用いて移植可能なステージに相当する胚盤胞への発生率向上を試みた。また、細胞の代謝機能や生体防御機能を有する膜タンパク質である ABC 輸送porter の一種 ABCB1 に着目し、これまで明らかにされていなかった牛卵子・胚における ABCB1 の発現について解析するとともに、胚の ABCB1 発現を増幅させる体外培養法について検討した。さらに、ABCB1 を増加させた胚の凍結後の生存性や、移植後の受胎性について検証した。

まず、特に作出効率が低いとされる体外胚の少数胚培養において、胚培養液にビタミン B 複合体を添加して栄養膜小胞と共培養することにより、栄養膜小胞の発育が増進するとともに胚盤胞発生率が有意に向上した。このことから、栄養膜小胞が胚の発生促進に関与している可能性があることが明らかとなった。

さらに、卵子・胚における ABCB1 の発現状況について解析したところ、未成熟卵子、成熟卵子、受精後 2 日目から胚盤胞までの発育ステージにおいて、ABCB1 が存在していることが確認された。ABCB1 遺伝子の転写開始点上流域には、フォルスコリン (FSK) 等に応答する cAMP 応答配列 (CRE-like 配列)、リファンピン (RIF) に応答する DR4-like 配列、インターフェロン (IFNA) 等のサイトカインに応答する JAK/STAT-like 配列が存在する。体外受精後の胚の発生培養において、FSK, RIF, IFNA を培養液へ添加すると、胚盤胞の ABCB1 発現が増加した。

次に、FSK, RIF および IFNA を培養液へ添加して作出した胚盤胞の凍結後の生存性について調査した。凍結融解後の胚の生存率および透明帯脱出率について、FSK および RIF 添加の有無で比較したところ、FSK あるいは RIF 単独でも向上する傾向が認められたが、FSK と RIF の添加 (FSK+RIF) により生存率および脱出率が有意に向上した。また、凍結前後の胚細胞数を比較したところ、凍結前では FSK, RIF および IFNA 添加の有無による違いは認められなかったのに対し、凍結後の胚細胞数は、FSK+RIF により有意に増加し、IFNA の単独添加あるいは 3 種添加 (FSK+RIF+IFNA) により有意に増加した。また、FSK+RIF+IFNA による 24 時間の処理で胚盤胞の ABCB1 増加と凍結後の胚細胞数増加が認められた。以上のことから、FSK, RIF および IFNA の処理で胚の ABCB1 を増加させることにより、胚の凍結後の生存性を向上させる効果があることが示唆された。

最後に、FSK+RIF を用いて ABCB1 を増加させる培養方法で作出した胚を、酪農家飼養のドナー牛に移植を行なって受胎率を調査したところ、無処理の胚に比べ、ABCB1 を増加させた胚の受胎率が高い傾向が認められた。さらに、興味深いことに、分娩後 3 回以上授精して受胎できなかったいわゆるリピートブリーダー牛への移植において、ABCB1 を増加させた胚の受胎率が有意に向上した。

本研究により、牛卵子と胚における ABCB1 の存在が初めて明らかとなったとともに、体外培養系において ABCB1 の発現増幅が胚の凍結後の生存性および移植後の受胎性向上に寄与する可能性を示唆されたことから、牛胚培養技術における胚の品質向上に関して本研究は新たな概念を提供している。