

生殖器奇形原因遺伝子保因牛検査法開発事業

応募事業テーマ：（５）多様な形質の家畜改良と効率的な飼養管理技術の普及

重点対応事項：（３）収益性の高い経営の育成のための対策

応募区分：研究開発事業

事業実施主体：国立大学法人東京大学

事業期間：令和4～6年度

実施体制：東京大学 松田二子（総括責任者）、角田茂、真方文絵

宮城大学 須田義人

千葉県農業共済組合 石山大



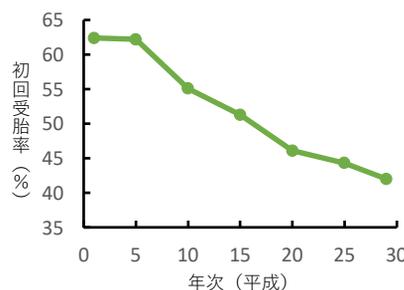
事業の目標

受胎率を正常牛の半分以下にまで低下させるホルスタイン種雌の**先天性生殖器奇形（ミューラー管融合不全）の原因遺伝子（SNPとその近傍遺伝子）を特定し、この原因遺伝子の遺伝子型検査による保因牛の鑑別と淘汰技術を開発**する。この技術を用いて生殖器奇形原因遺伝子を保因する種雄牛や繁殖雌牛を特定し、繁殖利用を避けることで、**乳用牛における受胎率低下の一因を取り除き、畜産農家の経済的負担の低減を図る**。

事業の背景

《乳用牛における受胎率の低下》

- 日本の乳用牛の受胎率は2017年（平成29年）に42%まで低下（図1）。
- 畜産物の生産効率向上のため、受胎率低下に関与する要因を確実に排除する必要がある。



家畜改良事業団 受胎調査成績より

図1. 乳用牛の受胎率の推移

《ミューラー管融合不全（生殖器奇形）》

- 子宮・子宮頸管の形態異常を呈する先天性の生殖器奇形（図2）。
- ホルスタイン種雌の2.1%（1,054頭中22頭）で発生（千葉県・茨城県での調査、Ishiyama et al., *Theriogenology* 123: 209–215, 2018）。
- 重度のミューラー管融合不全を持つ牛の受胎率（17%）は正常牛（35%）の半分未満。
- 畜産現場ではミューラー管融合不全の問題は認識されておらず、罹患牛も繁殖に利用されるなど、放置されている。



原因遺伝子を特定し、保因牛の検査法を開発することが急務

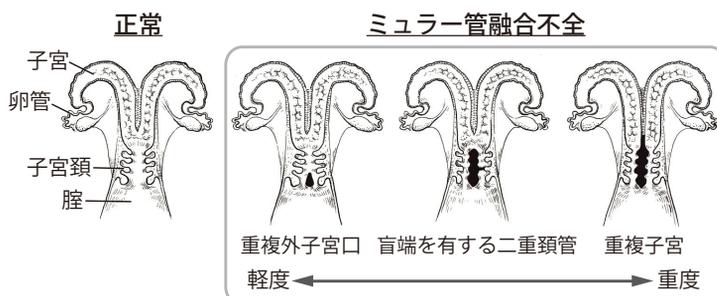
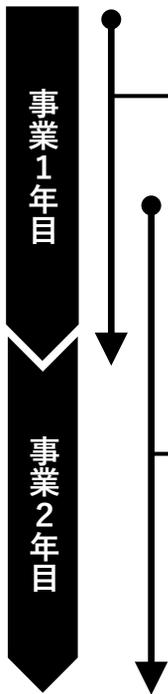
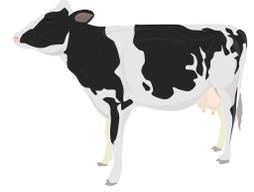


図2. 牛のミューラー管融合不全の形態

事業の概要



1. 生殖器奇形原因遺伝子候補の探索

正常牛及び罹患牛ゲノムの網羅的SNP（一塩基多型）解析を行い、疾患に相関するSNPとその近傍の原因遺伝子候補を同定する。

2. 生殖器奇形原因遺伝子の特定

(1) 種雄牛のSNP解析

罹患雌牛の父親について原因遺伝子候補のSNP多型配列を解析する。

(2) 原因遺伝子候補の発現解析

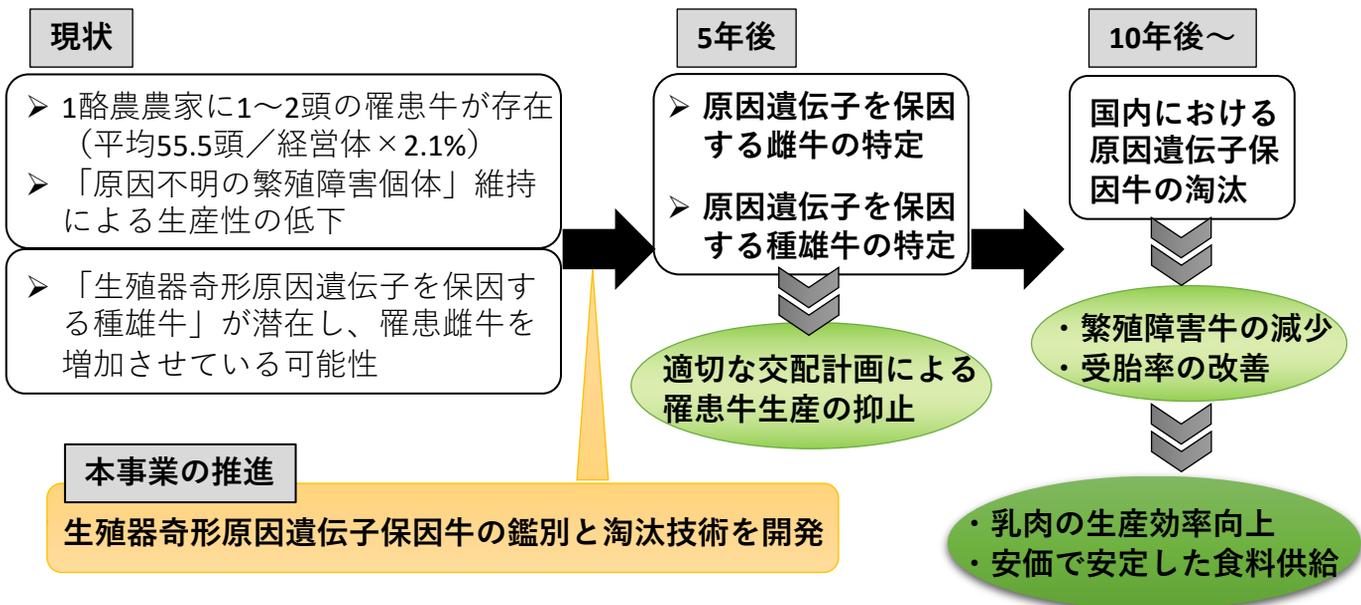
反芻家畜の胎子生殖器における原因遺伝子候補の発現を解析し、生殖器形成における機能を確認する。

(3) 原因遺伝子候補の機能解析

原因遺伝子候補の遺伝子欠損マウスを作製し、生殖器の形態への影響を解析する。



事業の波及効果



事業の成果

1. 生殖器奇形原因遺伝子候補の探索

ミューラー管融合不全罹患牛33個体と正常牛154個体の網羅的SNP解析を行い、疾患に高度に有意に関連するSNPを複数特定した（図1）。これらのSNP近傍に存在する遺伝子をミューラー管融合不全原因遺伝子候補とした。

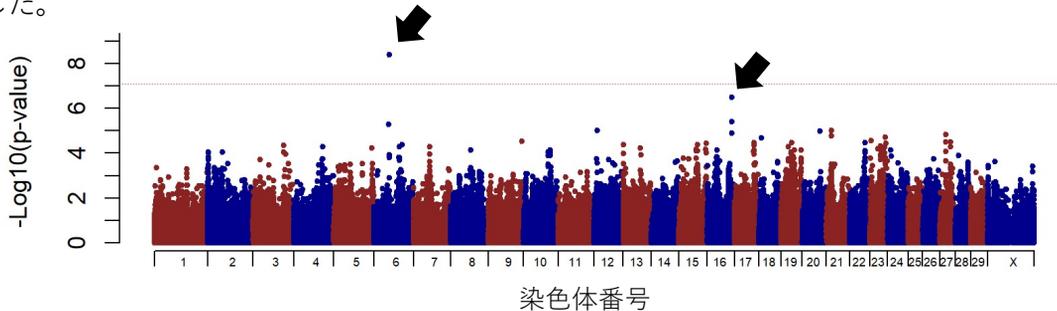


図1. ミューラー管融合不全罹患牛33個体と正常牛154個体の網羅的SNP解析結果。高度に有意なSNP（矢印）が同定された。

2. 生殖器奇形原因遺伝子の特定

(1) 種雄牛のSNP解析

罹患牛と血縁関係にある種雄牛7頭の精液の網羅的SNP解析を行った。

(2) 原因遺伝子候補の発現解析

ヤギおよび牛の胎子サンプルを採取した。ヤギ胎子の組織切片を作製し、ミューラー管が融合する前後の時期のミューラー管やウォルフ管等の構造を確認した。また雌ヤギ胎子（妊娠39日）組織切片の免疫染色を行い、上記の網羅的SNP解析で特定した原因遺伝子候補のタンパク質の局在を調べた。その結果、ミューラー管、ウォルフ管および周辺組織（尿細管等）に候補タンパク質が局在することが示唆された（図2）。

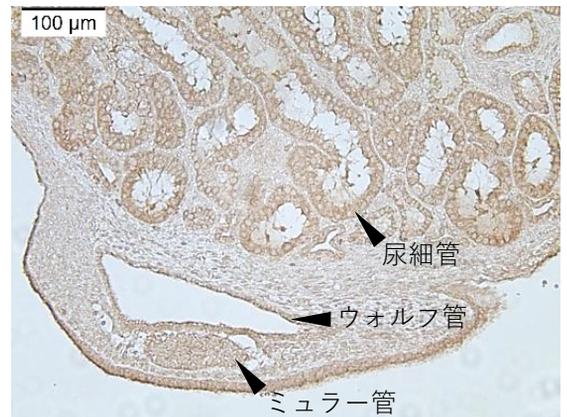


図2. 妊娠39日雌ヤギ胎子のミューラー管周辺組織における原因遺伝子候補タンパク質の局在。

(3) 原因遺伝子候補の機能解析

マウスが牛の生殖器奇形形成のモデル動物となり得ることを確認するため、牛に生殖器奇形（単角子宮）を起こすと報告されている遺伝子（*Kitlg*）の改変マウスを作製した。牛（Belgian Blue種）で*KITLG*のA218D変異が単角子宮の原因遺伝子であると報告されている（*Mammalian Genome* 10: 710-12, 1999）。この変異をマウス*Kitlg*で再現する遺伝子改変マウスをCRISPR/Cas9システムで作製した（図3, 4）。同個体の生殖器形成に異常が起きているか、解析を進めている。

マウス*Kitlg* 遺伝子座

野生型

TGG ACA GCC ATG GCA TTG CCG GCT CTC ATT
W T A M A L P A L I

変異導入

A217D変異 + silent mutation for PCR

TGG ACA GAT ATG GCT CTC CCA GCT CTC ATT
W T D M A L P A L I



図3. *Kitlg*遺伝子改変マウスの変異導入部位の配列。

図4. 作製した*Kitlg*遺伝子改変マウス。