

通し番号	4941
------	------

分類番号	30-57-21-12
------	-------------

未受精卵子に対する成熟培養液への分裂促進因子活性化蛋白質リン酸化酵素阻害剤およびジブチリル環状AMPの添加効果

[要約] 分裂促進因子活性化蛋白質リン酸化酵素阻害剤「U0126」およびジブチリル環状AMP（以下、dbcAMP）を添加した市販の成熟培養液「IVMD101」で2時間培養した後、通常の「IVMD101」に移して22時間成熟培養し、体外受精、体外培養を行い発生成績に与える影響を検討した。IVMD101にU0126（DMSOを溶媒として最終濃度5 μ M）を添加したU0126区と、U0126に1mMのdbcAMPを加えたU0126+dbcAMP区で培養し、その後の発生成績を比較したところ、U0126+dbcAMP区の桑実胚率（33.3%）、胚盤胞発生率（36.7%）は、U0126区（それぞれ27.4%、27.4%）と比較して数値は高いものの、有意な差は認められなかった。

畜産技術センター・企画指導部・企画研究課

連絡先 046-238-4056

[背景・ねらい]

卵子の減数分裂再開は、LHサーージ後に分裂促進因子活性化タンパク質リン酸化酵素(MAPK)を介してギャップ結合が崩壊し、卵子内のcAMP濃度が低下しておこる。しかし、体外成熟培養では、培養液に添加されている成長因子がMAPKを活性化し、ギャップ結合が体内より早く崩壊し、細胞質成熟が不十分のまま、減数分裂が再開される。そのため、体外成熟卵子は、体内成熟卵子と比較して胚盤胞発生率が低いと考えられる。昨年度は、体外成熟卵子にMAPK阻害剤を添加して胚発生率が向上した。今年度は、MAPK阻害剤単独またはcAMP製剤を併用し、培養初期の2時間に添加することで胚盤胞発生率向上に対する効果を検討する。

[成果の内容・特徴]

- 1 任意の発情時期にCIDRを挿入し、FSH 20AUを50mlの生理食塩水に溶解して皮下に1回投与し、72時間後にOPUで卵子を採取した（図1）。
- 2 U0126区は、MAPK阻害剤「U0126」を添加した市販の成熟培養液「IVMD101」（機能性ペプチド研究所）で2時間培養した後、通常の「IVMD101」に移して22時間成熟培養した。U0126+dbcAMP区は、「U0126」に更に1mMのdbcAMPを添加して、2時間培養した後、通常の「IVMD101」に移して22時間成熟培養した（図3）。
- 3 体外受精、体外培養（5日までIVMD101、6日から5%FCS、フォルスコリン、リファンピシン、システアミン加TCM199）を行い（図2）、分割率、桑実胚率、胚盤胞発生率を比較した。
- 4 U0126+dbcAMP区の桑実胚率（33.3%）、胚盤胞発生率（36.7%）は、U0126区（それぞれ27.4%、27.4%）と比較して有意な差は認められなかった（表1）。

[成果の活用面・留意点]

- 1 黒毛和種経産牛2頭を4～5週間で試験区を反復して実施した（図2）。

[具体的データ]

試験区	-3	0	1	3	4	8 (日)
U0126区	FSH20AU 50ml生食皮下	OPU	IVM <u>U0126</u>	IVF	分割 検査	胚盤胞 発生率
U0126+ dbcAMP	FSH 20AU	OPU	IVM <u>U0126</u> <u>+dbcAMP</u>	IVF	分割 検査	胚盤胞 発生率

図1 試験スケジュール

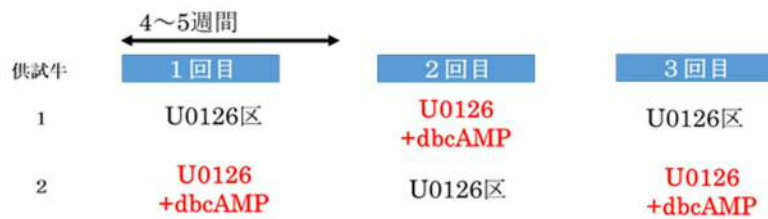


図2 試験計画

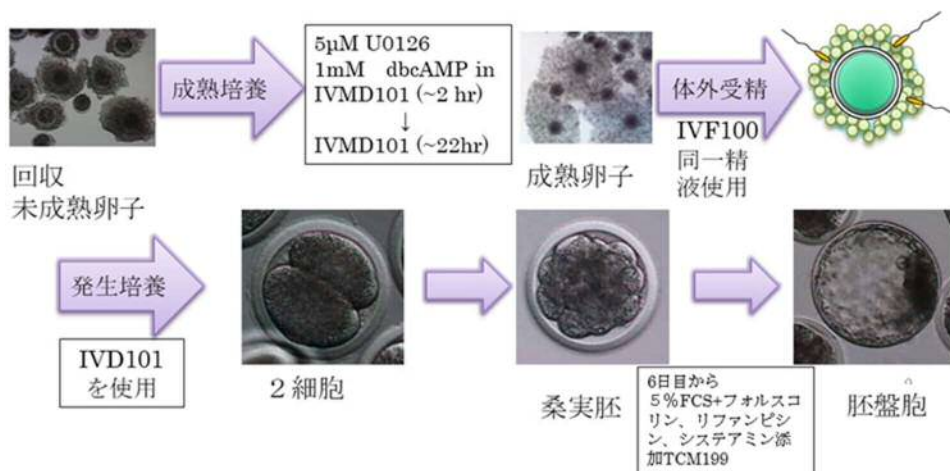


図3 試験方法

表1 U0126 を添加した成熟培地への dbcAMP 添加の有無が OPU 由来卵子の発生成績に与える影響

試験区	試験回数	供試 卵子数	分割 卵子数	分割率 (%)	桑実胚数	桑実胚率 (%)	胚盤胞数	胚盤胞発生率 (%)
U0126区	3	10.7	8	81.0	3.0	27.4	3.0	27.4
U0126+dbcAMP区	3	6.3	5.0	78.3	1.7	30.0	2.3	36.7

1 頭当たり平均

- [資料名] 平成 30 年度試験研究成績書
- [研究課題名] 経膈採卵を利用した効率的な肉用繁殖牛生産技術の開発
- [研究内容名] ア 未成熟卵子の体外成熟培養方法の検討
- [研究期間] 平成 28~令和 2 年度
- [研究者担当名] 坂上信忠、近田邦利、折原健太郎 (共同研究: 大阪府立大学)