

哺乳動物初期胚の体外発生制御に関する研究

学位論文内容の要旨

家畜の育種改良のために、数多くの技術が日々開発されている。とくに生殖工学技術を利用した家畜改良が、現在盛んに行なわれている。それらの中でもブタの生殖工学技術は、医学や畜産の分野で注目されている。しかし、ブタ初期胚の体外発生率はウシなどと比べて低いことから、ブタの体外発生培養技術のいっそうの向上が期待されている。ブタ初期胚の体外発生培養技術の向上のためには、純系が数多く確立されているマウス初期胚の体外発生制御の解明を行い、基礎的知見を得ることが重要と考えられる。本研究は、第一章で、ブタ体外受精胚の体外発生に及ぼす細胞質内脂肪滴除去および酸素(O_2)濃度の影響について調べた。次に、第二章および第三章で、マウス 2-cell block の環境要因および遺伝要因の解析を行った。さらに、第四章および第五章では、マウスおよびブタ精子特異的ホスホリパーゼ $C\zeta$ (PLC ζ)の卵子活性化機構について検討した。

第一章では、ブタ初期胚の体外発生に及ぼす細胞質内脂肪滴除去と O_2 濃度の影響について検討した。その結果、細胞質内脂肪滴除去は、ブタ体外受精胚の体外発生率に影響を与えなかった。また、5% O_2 濃度条件下でブタ体外受精胚および細胞質内脂肪滴除去胚を体外培養した時、20% O_2 濃度条件下に比べて 2 細胞期および 4 細胞期への発生率が有意に高かったが、胚盤胞への発生率については有意な差は認められなかった。ブタ体内受精胚、体外受精胚および細胞質内脂肪滴除去胚を 5% O_2 濃度で体外培養した時の胚内過酸化水素(H_2O_2)量は、20% O_2 濃度で体外培養した時と比べて有意に低い値を示した。一方、20% O_2 濃度条件下における細胞質内脂肪滴除去は、体外受精胚の H_2O_2 量を減少させたが、5% O_2 濃度条件下における体外培養では、細胞質内脂肪滴除去による胚内 H_2O_2 量に変化は見られなかった。これらのことから、ブタ体外受精胚の細胞質内脂肪滴除去および低 O_2 濃度条件下での体外培養は、胚内 H_2O_2 量を減少させるが、胚盤胞への発生率には影響を及ぼさないと示唆された。

第二章では、培養環境の改善によるマウス 2-cell block の解除について検討した。最初に、リン酸を含む培養液でマウス初期胚を体外培養すると、C57BL/6 マウス胚はほとんどの胚が胚盤胞に発生したのに対して、AKR/N マウス胚はほぼ全ての胚が 2-cell block を起こした。しかし、リン酸無添加培養液で AKR/N 胚を体外培養した場合、2-cell block は解除され、卵割速度も早くなることが観察された。また、AKR/N 胚は Buffalo rat

liver (BRL)細胞との共培養や BRL 細胞の培養より調製した培養上清を用いた体外培養でも、2-cell block が解除されることが確認された。BRL 細胞の培養より調製した培養上清を分子量別に分画した結果、10～30 kDa の因子が AKR/N 胚の 2-cell block を解除することが明らかとなった。

第三章では、AKR/N と C57BL/6 マウスの系統間交配を利用して 2-cell block の遺伝的要因の解析を行った。その結果、2-cell block は雄系統に関係なく、雌マウス系統の形質に由来した。このことから、2-cell block には母親由来の因子が関与していることが示唆された。AKR/N と C57BL/6 マウスの交配により作出した F1 マウス由来胚は、雌雄どちらの系統間交配であっても 2-cell block を起こさず、胚盤胞まで高い発生率を示した。したがって、2-cell block を起こす形質が劣性形質であり、2-cell block には核の遺伝子により支配されていることが考えられた。F1 マウスの AKR/N への戻し交配により作出したバッククロス雌マウスの 2-cell block に関する表現型を調べた結果、2-cell block を起こす形質と起こさない形質が 3: 1 の割合で分離した。このことから、2-cell block には 2 つの遺伝子座が関与していることが示唆された。そこで、マウス全染色体上に位置しているマイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析を行ったところ、2-cell block に関与する遺伝子座は第 3 染色体および第 4 染色体上に位置していることが示唆された。

第四章では、マウス精子特異的 PLC ζ の卵子活性化能に関する制御機構について検討した。マウス PLC ζ cRNA をマウス未受精卵に注入すると、受精と同様に卵子内カルシウムオシレーションが引き起こされることが観察された。このカルシウムオシレーションは 5～6 時間継続し、前核が形成される時間帯には終了した。また、PLC ζ の細胞内局在を調べた結果、カルシウムオシレーションが継続している間は細胞質全体に存在していたが、前核が形成されると前核内に局在が移行することが観察された。さらに、受精卵および PLC ζ で活性化した胚の前核を未受精卵に移植したところ、未受精卵は活性化を引き起こした。一方、単為発生を誘起するストロンチウム処理により活性化した胚、不活性化型 PLC ζ を注入した胚、および核移行を阻害した PLC ζ で活性化した胚の前核を未受精卵に移植した場合は、卵子活性化は起こらなかった。これらの結果より、受精時に引き起こされるカルシウムオシレーションの開始と終了は、精子特異的 PLC ζ の細胞内局在により制御されていることが示唆された。

第五章では、ブタ精子特異的 PLC ζ の卵子活性化能について検討した。ブタ PLC ζ cRNA をブタ体外成熟卵子に注入すると、受精時と同様のカルシウムオシレーションが引き起こされることが確認された。さらに、ブタ PLC ζ で活性化したブタ体外成熟卵子を体外培養すると、体外受精胚と同程度の割合で胚盤胞へ発生した。このことから、ブタ精子特異的 PLC ζ に関しても、マウス PLC ζ 同様に卵子活性化能を持つことが明らかとなった。

本研究より得られたブタおよびマウス初期胚の発生制御に関する基礎的知見は、今後ブタ体外受精胚の発生率向上やブタでよく観察される多精子受精の防御に貢献するとともに、その応用が畜産分野のみに限らず不妊治療という医学の分野にも役立つことが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 智 行

副 査 教 授 中 村 富美男

副 査 助 教 授 山 田 豊

副 査 助 教 授 鈴 木 哲 太 (北方圏フィールド科学
センター)

学位論文題名

哺乳動物初期胚の体外発生制御に関する研究

本論文は5章からなり、図14、表17、引用文献122を含む、総頁数113の和文論文であり、別に3編の参考論文が添えられている。

家畜の改良技術の中でも、ブタの生殖工学技術は畜産のみならず医学分野においても注目されている。しかし、ブタ初期胚の体外発生率はウシに比べて低いことから、体外培養技術のいっそうの向上が求められている。そこで本研究は、1)ブタ初期胚において他の動物胚より多く含まれる細胞質内脂肪滴を除去して体外発生率が向上するか解析した。2)次に、純系が多く系統化されているマウスを用いて初期胚発生停止の原因遺伝子の解明を行なった。3)さらに、精子に存在する卵子活性化因子として有力候補の phospholipase C ζ (PLC ζ) について、卵子に顕微注入して体外発生率を検討した。

第一章では、ブタ初期胚の体外発生に及ぼす細胞質内脂肪滴除去と酸素濃度の影響について検討した。その結果、細胞質内脂肪滴除去は、ブタ体外受精胚の体外発生率に影響を与えなかった。また、5%酸素濃度条件下でブタ体外受精胚を体外培養した時、通常大気の20%酸素濃度条件下に比べて4細胞期までの発生率は有意に高かったが、胚盤胞への発生率については差は認められなかった。このことから、ブタ体外受精胚の細胞質内脂肪滴除去および低酸素濃度条件は、特に胚盤胞への体外発生率に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

第二章では、培養環境の改善によるマウス2-cell blockの解除について検討した。AKRマウス胚は通常の培養液で体外培養すると、ほぼ全ての胚が2細胞で発生停止する2-cell blockを起こす。しかし、AKR胚を各種サイトカインや成長因子を分泌する

ことで知られる BRL 細胞と共培養すると 2-cell block は解除された。また、BRL 細胞の培養により調製した上清を用いた体外培養した場合や、さらにその上清を分画した分子量 10～30 kDa の因子が 2-cell block を解除することが明らかとなった。

第三章では、AKR マウスと体外培養でも正常発生する他の系統と交配して 2-cell block の遺伝的要因の解析を行った。両者間の交配由来の F1 マウス胚は、胚盤胞まで高い発生率を示した。したがって、2-cell block を起こす因子は、劣性形質であると考えられた。さらに、F1 マウスの AKR への戻し交配により作出した雌マウス由来胚の表現型を調べた結果、2-cell block を起こすと起こさない形質が 3: 1 の割合で分離したことから、2 つの遺伝子座の関与が示唆された。そこで、全染色体上に位置しているマーカー遺伝子を用いて連鎖解析を行った結果、2-cell block を引き起こす原因遺伝子は、第 3 染色体および第 4 染色体上に位置していることが判明した。

第四章では、精子特異的 PLC ζ の卵子活性化能に関する制御機構について検討した。マウス PLC ζ cRNA をマウス未受精卵に顕微注入すると、受精と同様に卵子内カルシウム上昇が引き起こされた。また、カルシウム上昇が継続している間は、PLC ζ は細胞質内全体に存在していたが、カルシウム上昇終了時に前核内に移行することが観察された。さらに、受精および PLC ζ で活性化した胚の核を未受精卵に移植した時、未受精卵は活性化を引き起こした。これらの結果より、受精時のカルシウム上昇の開始と終了は、精子特異的 PLC ζ の細胞内局在により制御されていることが示唆された。

第五章では、ブタ精子特異的 PLC ζ の卵子活性化能について検討した。ブタ PLC ζ cRNA をブタ体外成熟卵子に注入すると、受精時と同様のカルシウム上昇が引き起こされることが確認された。さらに、ブタ PLC ζ で活性化したブタ体外成熟卵子を体外培養すると、受精胚と同程度の確率で胚盤胞へ発生した。このことから、ブタ精子特異的 PLC ζ に関しても、マウス PLC ζ と同様に卵子活性化能を持っていることが明らかとなった。

以上のように本研究は、1) ブタ初期胚の細胞質内脂肪滴除去および低酸素濃度条件での体外培養は胚盤胞への発生率を改善しないこと、2) マウス卵子発生停止に関する原因遺伝子は第 3 染色体および第 4 染色体上に位置すること、3) さらに卵子への顕微注入や核移植実験などにより精子特異的 PLC ζ が卵子活性化因子として有力であることを明らかにした。これらの初期胚の発生制御に関する基礎的知見は、今後ブタ体外受精胚の発生率向上に貢献するとともに、その応用が畜産分野のみに限らず不妊治療という医学の分野にも役立つことが期待される。

よって審査委員一同は、米田 明弘が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。