

学位論文題名

アクチビン A のウシ初期胚体外発生促進作用に関する研究

学位論文内容の要旨

哺乳動物の胚の発生や分化は、母体の卵管、子宮および胚自身から産生される様々なサイトカインにより制御されている。しかし、ウシ胚の発生過程におけるサイトカインの作用および役割に関する情報は少ない。アクチビン A はウシの卵管や子宮に存在するが、初期胚の発生に及ぼす影響や作用は検討されていない。本研究では、アクチビン A のウシ初期胚の発生に及ぼす影響とその作用機序を解明するため、化学的組成の明らかな修正合成卵管液（SOF）を用いて体外成熟・体外受精由来のウシ初期胚を培養して検討を加えた。

はじめに、アクチビン A がウシ初期胚の発生に及ぼす影響を明らかにするため、修正 SOF を用いてウシ 1 細胞期胚を培養して、体外発生成績を調べた。媒精後 20 時間目の 1 細胞期胚を 0.1~100 ng/ml のアクチビン A を含む修正 SOF 中で培養した結果、1 ng/ml 以上のアクチビン A の添加により胚盤胞への発生率が向上することが明らかになった。また、胚の体外発生率の向上は、媒精後 120 時間目まで 10 ng/ml のアクチビン A を添加した場合に認められた。さらに、異なる酸素濃度（5 および 20%）の気相中で胚を培養してもアクチビン A 濃度依存性に胚発生率が向上することも分かった。

つぎに、アクチビン A の胚発生促進作用がアクチビン特異的な作用であることを確認するとともに、内因性のアクチビンも胚発生に関与している可能性を明らかにするため、アクチビン A とアクチビン結合タンパク質であるホリスタチンの相互作用について検討した。その結果、修正 SOF に 1~100 ng/ml のホリスタチンを添加するとウシ 1 細胞期胚の発生率は低下することが判明した。また、アクチビン A（10 ng/ml）を添加した培地に同濃度のホリスタチンを添加するとアクチビン A の胚発生促進効果が中和され、10 倍量（100 ng/ml）のホリスタチンを添加すると胚の発生は抑制されることも分かった。このことから、アクチビンは胚自身によっても産生され、ホリスタチンは内因性のアクチビンを中和することが示唆された。さらに、アクチビン A（10 ng/ml）あるいはホリスタチン（10 ng/ml）は、1~8 細胞期の時期に培地に添加すると胚盤胞への発生率に影響するが、9~16 細胞期以降に添加しても発生率に影響のないことも明らかになった。

ついで、アクチビン A およびホリスタチンが作用する胚の発生ステージを特定するとともに作用機序を解明するため、微速度撮影法を用いてウシ胚の発生速度と卵割期におけ

る細胞周期について検討した。ウシ 1 細胞期胚は、修正 SOF (対照)、アクチビン A (10 ng/ml) あるいはホリスタチン (10 ng/ml) を添加した修正 SOF 中で 9 日間、微速度撮影下で培養した。まず、微速度撮影下における胚の発生率をインキュベーター内で培養した場合の発生率と比較して差異のないことを確認した。また、ホリスタチンの添加により 9 ~ 16 細胞期への発生に要する時間の延長が観察された。ウシ胚の体外発生では、9 ~ 16 細胞期以上に発生した培養胚の 95% で 4 ~ 8 細胞期の間に卵割が一時休止する “lag-phase” が認められ、“lag-phase” が短時間に終了する胚ほど、その後の発生能は高かった。アクチビン A を添加した培地で培養すると第 3 細胞周期は短くなり、“lag-phase” は短時間で終了した。一方、ホリスタチンを添加した培地では、ホリスタチンによる内因性アクチビン中和作用に起因すると考えられる “lag-phase” 持続時間の延長と第 4 細胞周期の延長が認められた。これらの結果から、アクチビン A は “lag-phase” を軽度抑え、第 3 ~ 4 細胞周期をスムーズに進行させて胚発生促進作用を示すものと考えられた。“lag-phase” の起こる時期は胚発生を制御する遺伝子が母性から胚性へ切り替わる時期にあたり、アクチビン A はこの発生を制御する遺伝子の切り替え機構を調節していることが示唆された。

最後に、未成熟卵子から孵化胚盤胞へ発生する過程での卵子および初期胚におけるアクチビンに関連する遺伝子の発現動態を明らかにするため、ウシ卵子および初期胚中のインヒピン/アクチビンサブユニット (α 、 βA および βB)、ホリスタチンおよびアクチビンレセプター (I 型 ; ActR-I および ActR-IB、 II 型 ; ActR-II および ActR-IIB) の mRNA を RT-PCR 法により調べた。インヒピン/アクチビンサブユニットの遺伝子発現を解析した結果、 βA サブユニット遺伝子は検査したすべての発生ステージの卵子と胚で発現していることが分かった。とくに、1 細胞期から桑実胚期にかけては βA サブユニット遺伝子のみが発現しており、この発生ステージのウシ胚はアクチビン A を生成していると推察された。また、ホリスタチン遺伝子は検査したすべての発生ステージの卵子と胚で発現していることも分かった。さらに、未成熟卵子から孵化胚盤胞までの発生ステージで I 型および II 型の両方のアクチビンレセプター遺伝子が発現していることが明らかになった。

以上の研究結果から、アクチビンはウシ胚の体外発生を促進する作用を有し、発生培地中に存在しないと第 3 ~ 4 細胞周期の卵割の遅延をまねき、胚発生率を低下させることが明らかになった。また、アクチビンは卵管や子宮だけでなくウシ初期胚からも分泌され、胚の有する機能的なアクチビンレセプターを介して 4 ~ 8 細胞期の間起こる胚発生を制御する遺伝子が母性から胚性へ切り替わる機構を調節していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 芳 幸
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 教 授 渡 邊 智 正
副 査 教 授 岩 永 敏 彦

学位論文題名

アクチビンAのウシ初期胚体外発生促進作用に関する研究

ウシ初期胚の発生過程におけるサイトカインの作用や役割については、ほとんど知られていない。申請者は、化学的組成の明らかな培地を用いてウシ体外受精由来胚を培養し、ウシの卵管に存在するアクチビン A が胚の体外発生に及ぼす影響を調べた。その結果、アクチビン A を培地に添加するとウシ1細胞期胚の胚盤胞への発生率が向上することを初めて見いだした。そこで、ウシ初期胚の体外発生に対するアクチビン A の作用時期について微速度撮影法を用いて詳細な検討を加えた結果、アクチビン A は4～8細胞期、すなわち第3および第4細胞周期にみられる割球の一時的な分裂停止、いわゆる“lag-phase”の期間を短縮して胚発生を促進する働きがあることを明らかにした。この時期は胚発生を制御する遺伝子が母性から胚性に切り替わる時期にあたり、この遺伝子切り替え機構にアクチビン A が関与していることを示唆した。また、ウシ初期胚におけるアクチン受容体の遺伝子発現についても調べた。その結果、アクチン受容体の機能に必要な2種類の受容体サブユニットの mRNA が1細胞期から孵化胚盤胞にかけて発現していることも確認し、ウシ初期胚が機能的アクチン受容体を有することを示唆した。さらに、アクチン結合タンパクであるホリスタチンを培地に添加すると胚発生が抑制されることと、アクチビン A の生産を意味するアクチンサブユニットの mRNA が1細胞期から桑実期のウシ胚に発現していることを明らかにし、胚自身が生産する内因性のアクチビン A も初期胚の発生を促進していることを示唆した。

これらの新知見はウシ胚の体外生産技術の開発と確立に貢献するとともに、ウシ初期胚の発生制御機構を解明するために有益な研究成果である。よって、審査員一同は申請者が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有すると認めた。