

ブタ体外成熟卵子の発生能を制御する要因に関する研究

学位論文内容の要旨

ブタ体外胚の作出効率を高めるためには、発生能の高い体外成熟卵子を作成する必要がある。体外成熟卵子の発生能は細胞質の成熟度と関係と考えられているが、細胞質成熟に伴って卵細胞質に起こる現象や、その後の初期発生に影響を及ぼす機構はほとんど明らかにされていない。本研究では、ブタ卵子の初期発生を制御する要因について明らかにすることを目的として、それらの要因が卵子成熟と関わりを持っているのかその機序を解析するとともに、卵丘細胞が卵子の細胞質成熟に果たす役割について検討した。

1. ブタ成熟卵子の初期発生を制御する要因

成熟卵子における細胞質内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇は、減数分裂の再開や表層顆粒の放出、前核の形成を促進することによって初期発生を誘起させることが報告されている。これらの報告は細胞外から人為的にカルシウムイオンを流入させる手法に基づいているが、受精時に観察される $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には細胞外だけでなく、細胞内に蓄積されているカルシウムイオンの動員が必要である。卵子における $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、イノシトールトリスリン酸 (IP3) を介した小胞体からのカルシウムイオン放出が重要な役割を果たしている。第一章では、より生理的な条件で誘起した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が卵子の活性化および胚発生に与える影響について知見を得ることを目的とし、濃度の異なる IP3 をブタの体外成熟卵子に注入した際に起きる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇、注入後の卵子活性化率、および胚発生率を観察した。本章の実験結果より、IP3 注入がブタ成熟卵子に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と活性化および胚発生を引き起こすことが実証された。また $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と発生率は注入した IP3 に対して濃度依存的に高まったために、IP3 に由来する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とブタ卵子発生能に密接な関連があることが示唆された。

2. 成熟中の卵丘細胞の存在がブタ卵子の IP3 への反応性に与える影響

卵子が IP3 注入に対してカルシウムイオンを放出する能力は、成熟中に高まり、受精時のカルシウムオシレーションの強さを制御し、初期発生を促進する重要な要因であると示唆されている。しかし、成熟中の卵子における IP3 への反応性がどのような要因によって促進されているのか、その機構は明らかにされていない。第二章では始めに卵丘細胞の存在がブタ成熟卵子の IP3 に対する反応性に影響を及ぼしているのか、次に IP3 に対する反応性は卵子の発生能と関係があるのか、を明らかにするために実験を行った。その結果として、IP3 への反応性は卵丘細胞の存在によって制御されていることが示唆された。さらに、成熟培養期間中に卵丘細胞

を経時的に除去した後成熟させた卵子の IP3 に対する反応性は、卵丘細胞の付着時間が長いほど高いことが示された。また IP3 を注入した後の活性化率および卵割率は、卵丘除去区から得られた成熟卵子の方が、卵丘細胞付着区や卵丘細胞共培養区に比べて低い傾向が観察された。従って、成熟中の卵丘細胞の存在が IP3 に対する反応性を介して初期発生を支持している可能性が示唆された。

3. 成熟中の卵丘細胞の存在がブタ卵子のグルタチオン蓄積に与える影響

受精後、正常な卵子発生のために必須の現象である雄性前核形成には、成熟中の卵丘細胞の存在が重要であることが、ブタを含めた様々な動物種で知られている。しかし卵丘細胞がどのようにして卵子の雄性前核形成能に関わっているのか、判っていない。第三章では、卵丘細胞-卵子間のギャップ結合を介した物質移送が雄性前核形成に果たす役割を知るために、成熟培養中にギャップ結合阻害剤であるヘプタノールを添加した卵子の雄性前核形成の様子を観察した。さらに、雄性前核の形成過程に重要な役割を果たしているとし唆されているグルタチオンが、成熟中の卵丘細胞-卵子間の物質移送と関わっているかを調べるために、卵子細胞質内グルタチオン量も測定した。また、細胞質内のグルタチオンが実際に雄性前核形成を促進するかを確認するために、成熟中の卵丘細胞の存在とは関係なくグルタチオンを蓄積させる作用のあるシステアミンを培養液に添加し、卵子の雄性前核形成率およびグルタチオン量の計測をした。これらの結果から、卵子成熟中における卵丘細胞-卵子間のギャップ結合を介した物質移動が受精後の雄性前核形成能に必要であることが示された。またギャップ結合を介して雄性前核の形成に関わる物質として、グルタチオンが重要であることも示唆された。

以上のことから、ブタ成熟卵子の IP3 由来の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、初期発生能に関与していることが明らかとなり、さらに成熟中の卵丘細胞の存在は、細胞質成熟の一要因である卵子の IP3 への反応性を増強させることも観察された。同様に卵子の雄性前核形成能も細胞質成熟に関わる一要因であり、卵丘細胞によって促進されることが知られているが、その機序には卵丘細胞-卵子間の物質移送が重要であることが示された。これらの一連の研究成果は、ブタ体外成熟卵子の初期発生を制御する機構について新たな知見を加え、今後発生能の優れたブタ体外成熟卵子を作出する上で、基礎的な情報を提供するものと示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 邊 智 正

副 査 教 授 近 藤 誠 司

副 査 助 教 授 上 田 純 治

副 査 助 教 授 堂 地 修 (酪農学園大学酪農学部)

学 位 論 文 題 名

ブタ体外成熟卵子の発生能を制御する要因に関する研究

本論文は図 9、表 11 を含む 61 ページからなる和文論文で、別に 2 編の参考論文が添えられている。

ブタ胚の体外作出効率を高めるためには、発生能の高い体外成熟卵子を作製する必要がある。ブタ体外成熟卵子の発生能は卵子細胞質の成熟度と関わっていると報告されているが、卵子発生能を制御する要因および卵子発生能と卵子成熟との関わりについてはほとんど知られていない。本研究の目的は、ブタ成熟卵子の発生能を制御する要因について検討すること、および卵子発生能と卵子成熟との関わりを解析するために、卵丘細胞が卵子の細胞質成熟に果たす役割を明らかにすることである。得られた研究結果は以下のように要約される。

1. ブタ成熟卵子の発生を制御する要因

成熟卵子における細胞質内カルシウムイオン濃度($[Ca^{2+}]_i$)の上昇は、減数分裂の再開や表層顆粒の放出、前核の形成を促進することによって発生を誘起させると報告されている。これらの報告は細胞外から人為的にカルシウムイオンを流入させる手法に基づいているが、受精時に観察される $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には細胞外だけでなく、細胞内に蓄積されているカルシウムイオンの動員が必要である。卵子における $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、イノシトールトリスリン酸(IP3)を介した小胞体からのカルシウムイオン放出が重要な役割を果たしている。第一章では、より生理的な条件で誘起した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が卵子の活性化および胚発生に与える影響について検討し、ブタ成熟卵子の発生を制御する要因を明らかにすることを目的とした。濃度の異なる IP3 をブタの体外成熟卵子に注入した際に起きる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇、注入後の卵子活性化率、および胚発生率を観察した結果、IP3 注入がブタ成熟卵子に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と活性化および胚

発生を引き起こすことが実証された。また $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と発生率は注入した IP3 に対して濃度依存的に高まったために、IP3 による細胞質内カルシウムイオンの動員によって引き起こされた $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、ブタ成熟卵子の発生能を制御する要因であることが示唆された。

2. 成熟中の卵丘細胞の存在がブタ卵子の IP3 への反応性に与える影響

卵子が IP3 注入に対してカルシウムイオンを放出する能力、すなわち IP3 への反応性は成熟中に高まり、受精時のカルシウムオシレーションの強さを制御し、発生を促進すると報告されている。しかし、IP3 への反応性が促進される機構は明らかにされていない。第二章では、はじめに卵丘細胞の存在とブタ成熟卵子の IP3 に対する反応性との関わり、次に IP3 に対する反応性と卵子の発生能との関係を明らかにするために実験を行った。その結果、成熟中に卵丘細胞が付着していた卵子では、卵丘細胞を除去した卵子に比べ、高い IP3 への反応性が観察された。従って IP3 に対する反応性は卵丘細胞の存在によって制御されていることが判明した。また IP3 を注入した後の活性化率および卵割率は、成熟中に卵丘細胞が付着していた成熟卵子の方が、除去したものより高い傾向が観察された。このことから、成熟中の卵丘細胞の存在は、IP3 に対する反応性を介して発生能を高めている可能性が示唆された。さらに成熟中に卵丘細胞を経時的に除去した場合、成熟培養開始から 12 時間以内における卵丘細胞の除去は、成熟卵子の IP3 への反応性および IP3 注入後の活性化率および卵割率を低下させるという傾向も観察された。この結果は、成熟培養初期における卵丘細胞の存在が、IP3 への反応性を獲得し、発生能を制御する上で重要であることを示唆すると考えられた。

3. 成熟中の卵丘細胞の存在がブタ卵子のグルタチオン蓄積に与える影響

受精後、正常な卵子発生のために必須の現象である雄性前核形成には、成熟中の卵丘細胞の存在が重要であることが、ブタを含めた様々な動物種で知られている。しかし卵丘細胞が卵子の雄性前核形成能に関わる機構については不明である。第三章では、卵丘細胞-卵子間のギャップ結合を介した物質移送が雄性前核形成に果たす役割を知るために、ギャップ結合阻害剤を用いて実験を行った。その結果、卵丘細胞-卵子間のギャップ結合を介した物質移送が雄性前核形成過程に必要であることが示された。またギャップ結合を介して雄性前核の形成に関わる物質として、グルタチオンが重要であることも示唆された。

以上のように、本研究はブタ体外成熟卵子の発生を制御する機構について新たな知見を加え、発生能の優れたブタ体外成熟卵子を作出する上での基礎的な情報を提供するものである。よって審査員一同は、天野朋子が博士（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。