



ブタ着床前胚におけるグルコース代謝特性に関する研究

澁谷, 海大

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2015-03-25

(Date of Publication)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6342号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006342>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

ブタ着床前胚における
グルコース代謝特性に関する研究

平成 27 年 1 月

神戸大学大学院農学研究科

澁谷 海大

目次

第一章：序論	1
第二章：培地へのグルコースおよびフルクトース添加がブタ単為発生2倍体の着床前発生に及ぼす影響	
第一節 緒言	14
第二節 材料および方法	17
第三節 結果	22
第四節 考察	37
第五節 引用文献	41
第三章：ブタ着床前胚の糖新生能	
第一節 緒言	43
第二節 材料および方法	45
第三節 結果	47
第四節 考察	51
第五節 引用文献	53
第四章：ブタ着床前胚におけるO-結合型N-アセチルグルコサミン修飾	
第一節 緒言	55
第二節 材料および方法	57
第三節 結果	62
第四節 考察	77
第五節 引用文献	80
第五章：総括・謝辞	85

第一章

序論

哺乳類着床前胚の生理学的特性を知ることは、着床前発生機構に関わる生物学上の新たな知見を得るのみならず、体外胚培養技術の向上に貢献することによって、優良胚の生産や発生工学的な技術を加えた胚の生産、家畜繁殖およびヒト不妊治療などへの応用が期待できる。これまで胚の発生能力は、主に培養期間を通しての形態学的観察に基づく評価によって判断されてきた。しかし、形態学的観察の有効性は、生理学的特性の解析を導入し、評価基準を確立することによって、さらに改善できると考えられる。例えば、近年の技術革新により、胚単独の酸素消費量が計測できるようになり、個別の胚の呼吸能力から、高い発生能力を持つ胚の選別が可能になることが期待されている (Yamanaka et al., 2011; Sakagami et al., 2015)。しかし、これはまだ一面的な生理活性を測っているにすぎず、胚の発生能力のより正確な評価には、さらに多様な指標を用いた特性解析、あるいは微小環境下での測定法の開発が必要である。特に培地に含まれる物質の代謝は、胚の発生能力と相関があると考えられる。そこで本研究では、ブタ着床前胚におけるグルコースに代表される糖の代謝特性を、電気刺激によって活性化した単為発生 2 倍体を用いて解析した。

組成の明らかな化学的合成培地を用いた哺乳類着床前胚の胚盤胞までの体外培養は、1950 年代にマウス胚を用いて初めて報告されており、その中で、8 細胞期にあるマウス胚が、グルコースおよびウシ血清アルブミンを添加した Krebs-Ringer 重炭酸溶液中で胚盤胞期へと発生することが示されている (Whitten, 1956)。1958 年には、体外培養法によって作出された胚盤胞を外科的に子宮に移植することにより、産仔を得ることに成功している (McLaren and Biggers, 1958)。その後、マイクロドロップ培養法の発達 (Brinster, 1963) やそれを用いた系統だった研究により、培地の浸透圧、pH、アミノ酸組成、そしてエネルギー源等の違いが、着床前のマウス胚発生に与える影響が調べられ、哺乳類の着床前発生に関わる基本的、体系的な情報が集積された。例えば、マウス胚ではピルビン酸が受精卵から 2 細胞期への発生を支持し (Biggers et al., 1967),

乳酸が 2 細胞期以降の発生に必要である (Brinster, 1965 a, b)。また, 2 細胞期のマウス胚によってピルビン酸はグルコース以上に主要なエネルギー源として利用されるが (Brinster, 1965 a, b), 4~8 細胞期胚の発生を支持するためにはグルコースが必要である (Brinster and Thomson, 1966)。ブタ着床前胚においては, エネルギー源としてピルビン酸, 乳酸, およびグルコースを含む Whitten's medium (Menino and Wright, 1982), グルコースのみを含む North Carolina State University series (NCSU-23, -37; Petters and Wells, 1993), ピルビン酸と乳酸を含む Pig zygote medium 3 (PZM3; Yoshioka et al., 2002) などによって受精卵から胚盤胞までの発生が支持されることが明らかにされている。中でも, 卵管液の成分を参照して作製された PZM3 は, 最も効率的に胚盤胞への発生を支持することが報告されている (Im et al., 2004)。また, NCSU-37 を用いた研究においてブタ着床前胚は, 培養開始 48~53 時間後までは乳酸とピルビン酸によって, その後の培養ではグルコースによって効率的に胚盤胞へ発生することが示されている (Kikuchi et al., 2002; Karja et al., 2004)。これらの報告は, 着床前発生胚の生理学的特性が, 発生段階によって異なることを示唆している。しかし, ブタ着床前胚における代謝に関する報告はマウスほど多くはなく, いずれの発生段階で, いずれの基質が最も良く発生を支持するかは明らかでない。

初期卵割期における胚の生理学的特性の変化は, 一般的に胚性遺伝子の活性化 (zygotic gene activation, ZGA) と結びつけて説明される。すなわち, ZGA によって, これまで卵母細胞に蓄積されていた母由来の RNA やタンパク質から, 新規に胚のゲノムから発現される遺伝子産物に置き換わることによって, 胚の代謝特性の変化, タンパク質合成能力, 細胞の分化等が引き起こされると考えられている。また, ZGA の起こる時期は動物種によって異なっており, マウスでは 2 細胞期 (Telford et al., 1990), ウシでは 8~16 細胞期 (Camous et al., 1984), ブタでは 4 細胞期 (Jarrell et al., 1991) に起こると考えられている。このことから, ブタ着床前胚の生理学的特性の解析は 4 細胞期以前と 4 細胞期以降に分けて行う必要がある。

着床前胚におけるグルコース代謝は, 一般的に初期卵割期には低調であり, 桑実胚期以降に増大する (Brinster, 1967; Brinster and Wales, 1968; Leese and Barton, 1984; Flood and Wiebold, 1988)。これは桑実胚から胚盤胞にかけて, 急速な細胞の増殖と胚盤胞腔の形成のために多くのエネルギーが必要であるためと考えられており (Flood and Wiebold, 1988), ブタ胚盤胞はグルコースを含む培地

で培養することにより、胚の生存率が高くなることが報告されている (Mito et al., 2012)。一方、培地中の桑実胚期以前のグルコースの存在は、多くの種では発生に抑制的に働くことが報告されている。例えば、ハムスターでは着床前の全ての発生段階を通してグルコースが抑制的に働き (Schini and Bavister, 1988)、マウスではグルコースは最初の 48 時間、すなわち 4 細胞期までは抑制的に働くのに対して、その後は主要なエネルギー基質として利用される (Leese and Barton, 1984)。しかし、グルコースのマウス胚発生における抑制的な働きは絶対ではなく、マウスの系統や培地によって異なると考えられている (Behringer et al., 2014)。ウシもマウスと同様に、初期卵割期にはグルコースは抑制的な影響を与えることが報告されている (Kim et al., 1993)。ブタ着床前胚の培養においては、初期卵割期からグルコースを添加した培地で培養しても比較的高い胚盤胞形成率を示すことが報告されており (Petters and Wells, 1993)、抑制的な影響は少ないと考えられてきたが、グルコースを含まない PZM3 でより高い胚盤胞形成率を示したことから (Im et al., 2004)、同一培地を用いた検討が必要である。また、興味深いことに、マウス胚では胚盤胞期への発生にグルコースを必要とすることが報告されており (Chatot et al., 1989, 1990; Amarnath et al., 2011)、一方、ブタ着床前胚の体外培養においてグルコースは必須ではないとされている (Yoshioka et al., 2002)。この違いの原因としては、ブタ着床前胚ではピルビン酸や乳酸からグルコースを作り出す糖新生が行われている可能性が考えられる (Fig. 1-1 および Fig. 1-3)。しかし、哺乳類着床前胚における糖新生について検討した報告はない。

これまで、哺乳類胚の培養におけるグルコースの役割は、胚のエネルギー源として考えられてきた (Fig. 1-1 および Fig. 1-2)。しかし、グルコースはエネルギー生産にのみ利用されているのではなく、生体内の多くの代謝経路で利用され、核酸合成やタンパク質の糖鎖修飾に利用されることが知られている。例えば、核酸合成に関与するペントースリン酸経路 (PPP)、タンパク質の糖鎖修飾に用いられるヘキソサミン生合成経路 (HBP) などである (Fig. 1-1)。最近、マウス胚では、コンパクション前に一時的にでもグルコースを、HBP を介して代謝することが、胚盤胞への発生に必要であることが示された (Pantaleon et al., 2008)。一方、ブタ着床前胚の体外培養においてグルコースの必要性は報告されていない。しかし、ブタ卵管液および子宮液にグルコースは含まれており (Iritani et al., 1974; Nichol et al., 1992; La Bonnardiere et al., 1991)、体内由来の胚は、体外生産胚に比較してグルコースを代謝する能力が高い (Swain et al., 2002)。また、ブタ胚

は着床前の全ての時期を通してグルコースを代謝していることが報告されている (Flood and Wiebold, 1988)。これらの報告は、ブタ着床前胚の発生においてグルコースが重要な役割を担っている可能性を示唆している。しかし、ブタ着床前胚においてエネルギー生産以外の観点からグルコースの役割について調べた報告は少なく、PPP を介して一部のグルコースが代謝されていることが報告されているにすぎず (Flood and Wiebold, 1988)、HBP については全く知られていない (Fig. 1-1)。

O-結合型 N-アセチルグルコサミン修飾 (O-GlcNAc 修飾) はタンパク質の翻訳後修飾の一種であり (Torres and Hart, 1984)、HBP の最終代謝産物であるウリジン 2 リン酸 N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) を基質として、タンパク質のセリンあるいはトレオニン残基 (Ser/Thr) に対して起こる (Holt et al., 1987; Hanover et al., 1987)、可逆的な修飾である (Fig. 1-4)。HBP は解糖系から枝分かれしており、細胞に取り込まれたグルコースの 2~5% が HBP を介して代謝されると考えられている (Marshall et al., 1991)。そのため、O-GlcNAc 修飾レベルは外部のグルコース濃度を反映する (Han et al., 2000)。O-GlcNAc 修飾を受けるタンパク質はこれまでに千種類以上報告されており、その中には初期発生においても重要と考えられる、RNA ポリメラーゼ II (Comer and Hart, 2001; Ranuncolo et al., 2012)、転写因子 (Jang et al., 2012)、ヒストン (Sakabe et al., 2010; Fujiki et al., 2011; Fong et al., 2012) などが含まれる。O-GlcNAc 修飾を受けるタンパク質は被リン酸化タンパク質であり、リン酸化との競合的な作用により、タンパク質の機能を制御していると考えられている。着床前発生においても O-GlcNAc 修飾タンパク質が正常な発生に必要な可能性が高い。

以上のように、ブタ着床前胚における基質の代謝はおそらく発生段階によって異なっており、また、マウスをはじめとした哺乳類種間でも異なると考えられる。さらに着床前胚において、これまでグルコースはエネルギー生産以外の面からはほとんど研究されていない。本研究ではブタ着床前胚における、グルコースに代表される糖の代謝特性および解糖系や TCA 回路以外の代謝経路について詳細に調べ、さらに HBP とその代謝産物を利用して行われる O-GlcNAc 修飾について調べた。単為発生 2 倍体は高い同期性と発生率を示し (Kure-Bayashi et al., 1996)、受精胚と同等の発生速度と細胞増殖能力を有している (Kim et al., 1997) ため、ブタ着床前発生のモデル実験系として利用できることが報告されている (Kure-Bayashi et al., 2000; Nguyen et al., 2003)。そこで本研究では、ブタ受精

卵の代わりに単為発生 2 倍体を用いて実験を行った。本論文において 2 倍体と表記した場合は，単為発生 2 倍体を指す。

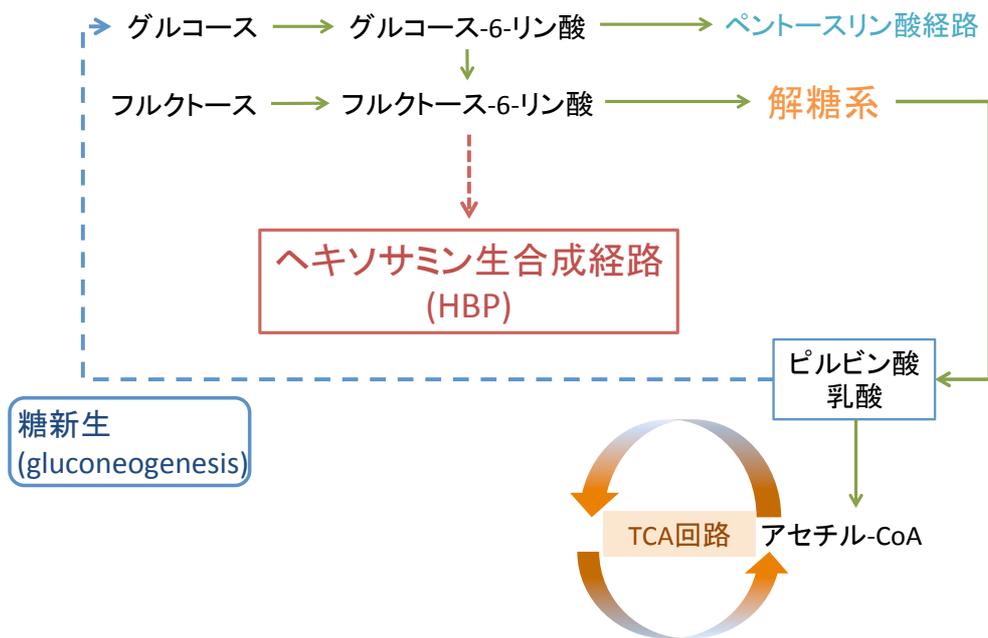


Fig. 1-1. グルコースおよびフルクトースの主要代謝経路。哺乳類着床前胚における糖代謝は、これまでは主に解糖系および TCA 回路によるエネルギー生産に注目されてきた。しかし、解糖系から派生したヘキソサミン生合成経路 (HBP) やピルビン酸・乳酸からの糖新生によるグルコースの供給は、ブタ着床前胚においては調べられていない。

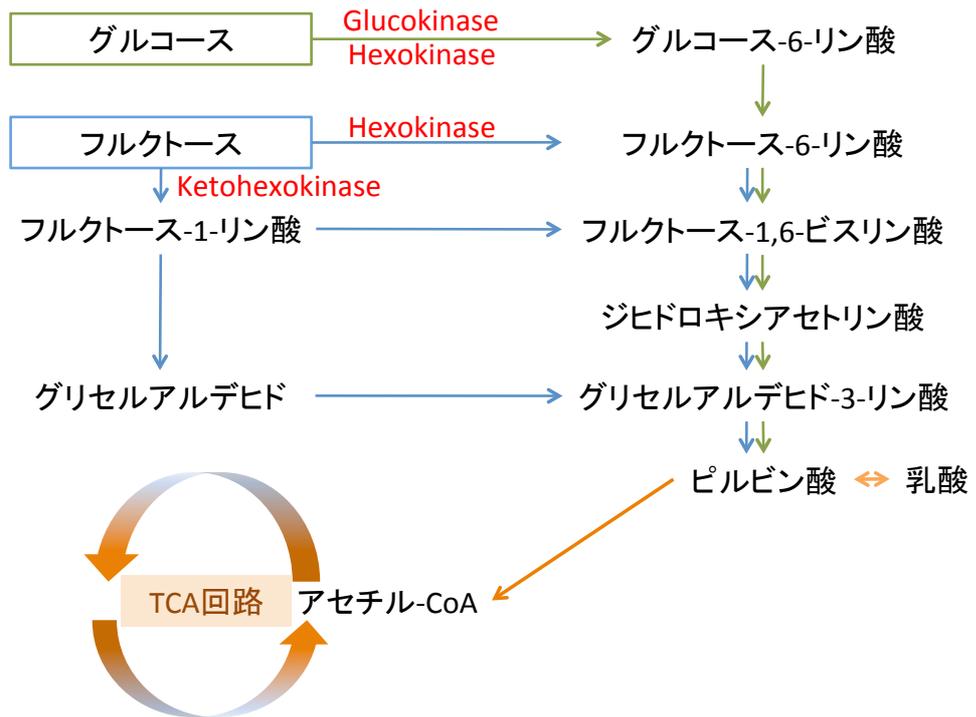


Fig. 1-2. 解糖系によるグルコースおよびフルクトースの主要代謝経路。

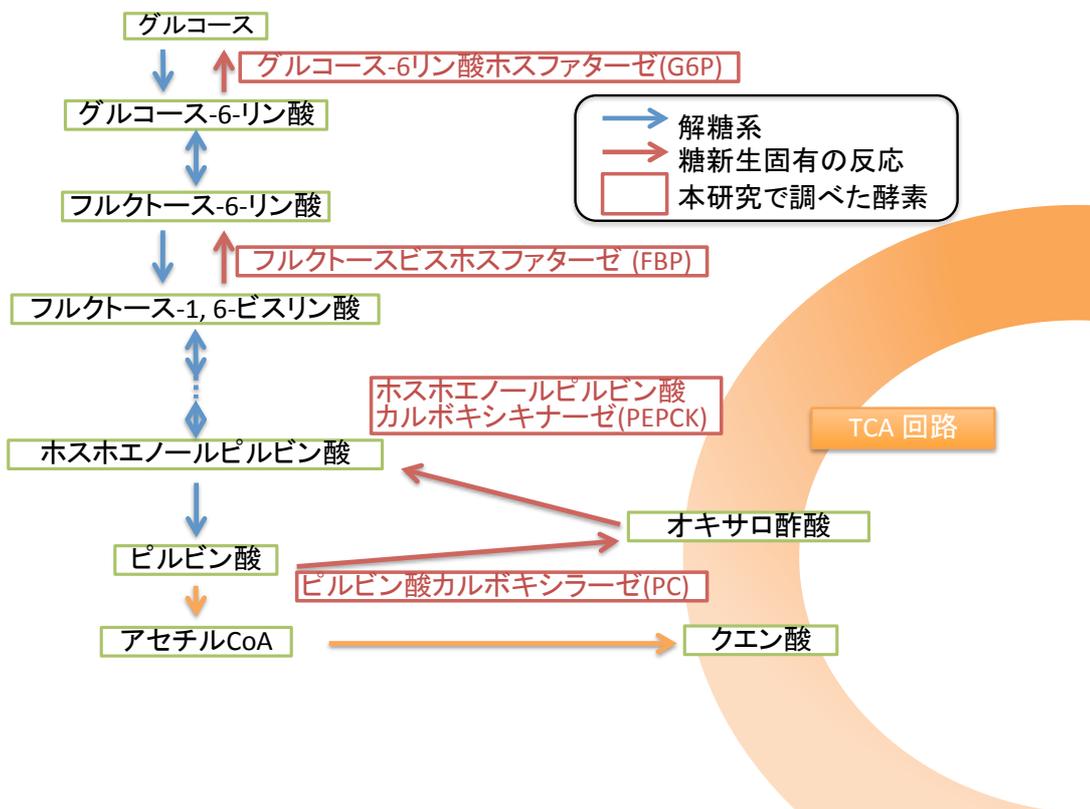


Fig. 1-3. 糖新生および解糖系の代謝経路。解糖系と糖新生はほぼ逆の経路であるが、4カ所だけ別の酵素によって糖新生は進められる。糖新生に必要な酵素は、図中に赤字で示した。

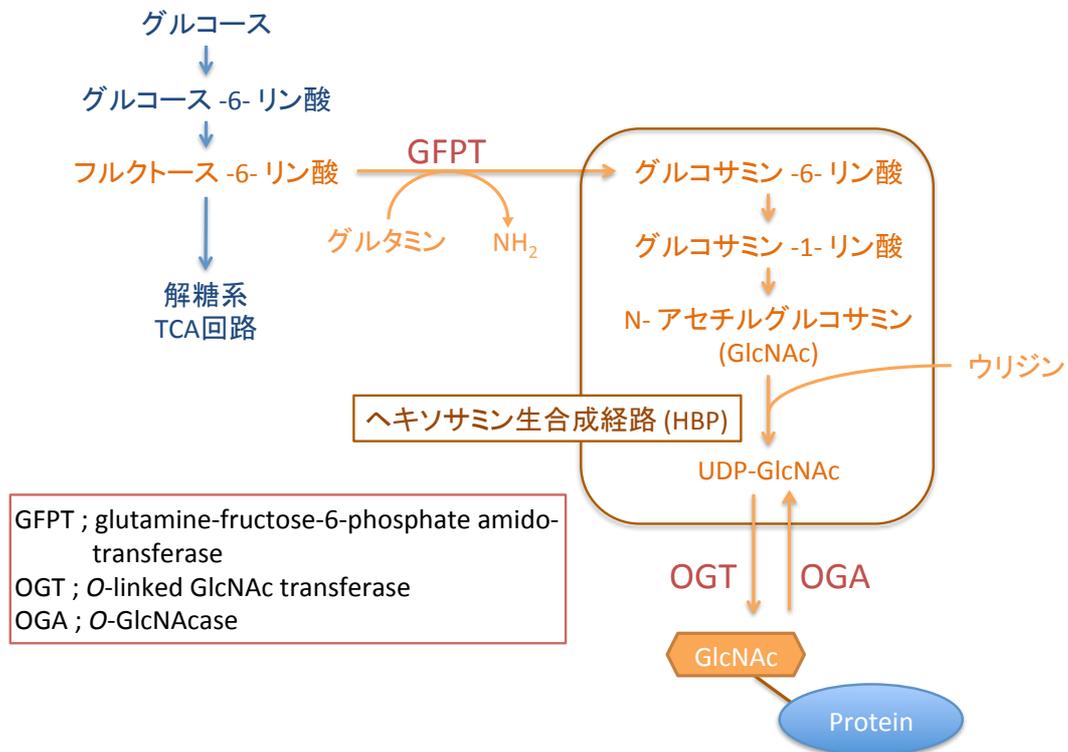


Fig. 1-4. 解糖系から派生するへキソサミン生合成経路 (HBP) およびその最終産物、ウリジン二リン酸 N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) によるタンパク質の O-GlcNAc 修飾に至る主要代謝経路。

引用文献

- Amarnath D, Wakayama S, Zhu J, Moawad AR, Wakayama T, Campbell KH.** The novel use of modified pig zygotic medium for the efficient culture of the preimplantation mouse embryos. *Theriogenology*. 2011; 76:1639-1646.
- Behringer R, Gertsenstein M, Nagy KV, Nagy A.** Critical components of preimplantation embryo culture in 'Manipulating the mouse embryo', 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014; pp113-114.
- Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP.** The pattern of energy metabolism in the mouse oöcyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967; 58:560-567.
- Brinster RL.** A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp Cell Res*. 1963; 32:205-208.
- Brinster RL.** Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source. *J Exp Zool*. 1965a; 158:59-68.
- Brinster RL.** Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interaction of energy sources. *J Reprod Fertil*. 1965b; 10:227-240.
- Brinster RL.** Carbon dioxide production from glucose by the preimplantation mouse embryo. *Exp Cell Res*. 1967; 47:271-277.
- Brinster RL, Thomson JL.** Development of eight-cell mouse embryos in vitro. *Exp Cell Res*. 1966; 42:308-315.
- Brinster RL, Wales RG.** The uptake of hexoses by pre-implantation mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil*. 1968; 15:415-422.
- Camous S, Heyman Y, Méziou W, Ménézo Y.** Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J Reprod Fertil*. 1984; 72:479-485.
- Chatot CL, Lewis JL, Torres I, Ziomek CA.** Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol Reprod*. 1990; 42:432-440.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I.** An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil*. 1989; 86: 679-688.
- Comer FI, Hart GW.** Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry*. 2001; 40:7845-752.
- Flood MR, Wiebold JL.** Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *J*

Reprod Fertil. 1988; 84:7-12.

Fong JJ, Nguyen BL, Bridger R, Medrano EE, Wells L, Pan S, Sifers RN. β -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a novel regulator of mitosis-specific phosphorylations on histone H3. *J Biol Chem.* 2012; 287:12195-12203.

Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder RG, Brown M, Kato S. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature.* 2011; 480:557-560.

Han I, Oh ES, Kudlow JE. Responsiveness of the state of O-linked N-acetylglucosamine modification of nuclear pore protein p62 to the extracellular glucose concentration. *Biochem J.* 2000; 350:109-114.

Hanover JA, Cohen CK, Willingham MC, Park MK. O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J Biol Chem.* 1987; 262:9887-9894.

Holt GD, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L, Hart GW. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J Cell Biol.* 1987; 104:1157-1164.

Im GS, Lai L, Liu Z, Hao Y, Wax D, Bonk A, Prather RS. In vitro development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology.* 2004; 61:1125-1135.

Iritani A, Sato E, Nishikawa Y. Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine and uterine fluids in sows. *J Anim Sci.* 1974; 39:582-588.

Jang H, Kim TW, Yoon S, Choi SY, Kang TW, Kim SY, Kwon YW, Cho EJ, Youn HD. O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell.* 2012; 11:62-74.

Jarrell VL, Day BN, Prather RS. The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *Sus scrofa*: quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Biol Reprod.* 1991; 44:62-68.

Karja NW, Medvedev S, Onishi A, Fuchimoto D, Iwamoto M, Otoi T, Nagai T. Effect of replacement of pyruvate/lactate in culture medium with glucose on preimplantation development of porcine embryos in vitro. *J Reprod Dev.* 2004; 50:587-592.

Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T,

Nagai T. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system. *Biol Reprod.* 2002; 66: 1033-1041.

Kim JH, Funahashi H, Niwa K, Okuda K. Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology.* 1993; 39:875-886.

Kim NH, Uhm SJ, Ju JY, Lee HT, Chung KS. Blastocoele formation and cell allocation to the inner cell mass and trophectoderm in haploid and diploid pig parthenotes developing in vitro. *Zygote.* 1997; 5:365-370.

Kure-Bayashi S, Miyake M, Katayama M, Miyano T, Kato S. Development of porcine blastocysts from in vitro-matured and activated haploid and diploid oocytes. *Theriogenology.* 1996; 46:1027-1036.

Kure-Bayashi S, Miyake M, Okada K, Kato S. Successful implantation of in vitro-matured, electro-activated oocytes in the pig. *Theriogenology.* 2000; 53:1105-1119.

La Bonnardiere C, Martinat-Botte F, Terqui M, Lefevre F, Zouari K, Martal J, Bazer FW. Production of two species of interferon by Large White and Meishan pig conceptuses during the peri-attachment period. *Reprod Fertil Dev.* 1991; 91:469-478.

Leese HJ, Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil.* 1984; 72:9-13.

Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem.* 1991; 266:4706-4712.

McLaren A, Biggers JD. Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early as early embryos. *Nature.* 1958; 182:877-878.

Menino AR Jr, Wright RW Jr. Development of one-cell porcine embryos in two culture systems. *J Anim Sci.* 1982; 54:583-588.

Mito T, Yoshioka K, Yamashita S, Suzuki C, Noguchi M, Hoshi H. Glucose and glycine synergistically enhance the in vitro development of porcine blastocysts in a chemically defined medium. *Reprod Fertil Dev.* 2012; 24:443-450.

Nguyen VT, Kure-bayashi S, Harayama H, Nagai T, Miyake M. Stage-specific effects of the osmolarity of a culture medium on the development of parthenogenetic diploids in the pig. *Theriogenology.* 2003; 59:719-734.

Nichol R, Hunter RHF, Gardner DK, Leese HJ, Cooke GM. Concentrations of

energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J Reprod Fertil.* 1992; 96: 699-707.

Pantaleon M, Scott J, Kaye PL. Nutrient sensing by the early mouse embryo: hexosamine biosynthesis and glucose signaling during preimplantation development. *Biol Reprod.* 2008; 78:595-600.

Petters RM, Wells KD. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil.* 1993; Suppl 48: 61–73.

Ranuncolo SM, Ghosh S, Hanover JA, Hart GW, Lewis BA. Evidence of the involvement of O-GlcNAc-modified human RNA polymerase II CTD in transcription in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2012; 287:23549-23561.

Sakabe K, Wang Z, Hart GW. Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:19915-19920.

Sakagami N, Nishida K, Akiyama K, Abe H, Hoshi H, Suzuki C, Yoshioka K. Relationships between oxygen consumption rate, viability, and subsequent development of in vivo-derived porcine embryos. *Theriogenology.* 2015; 83:14-20.

Schini SA, Bavister BD. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod.* 1988; 39:1183-1192.

Swain JE, Bormann CL, Clark SG, Walters EM, Wheeler MB, Krisher RL. Use of energy substrates by various stage preimplantation pig embryos produced in vivo and in vitro. *Reproduction.* 2002; 123:253-260.

Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev.* 1990; 26:90-100.

Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem.* 1984; 259:3308-3317.

Whitten WK. Culture of tubal mouse ova. *Nature.* 1956; 177:96.

Yamanaka M, Hashimoto S, Amo A, Ito-Sasaki T, Abe H, Morimoto Y. Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. *Hum Reprod.* 2011; 26:3366-3371.

Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod.* 2002; 66:112-119.

第二章

培地へのグルコースおよびフルクトース添加が ブタ単為発生 2 倍体の着床前発生に及ぼす影響

第一節 緒言

哺乳動物着床前胚の培養では、グルコース (Glu) は胚盤胞形成を支持することから、哺乳類胚の着床前発生において主要なエネルギー基質の一つであると考えられている。しかし、ハムスター (Schini and Bavister, 1988; Ludwig et al., 2001) やウシ (Kim et al., 1993) では、培地中の Glu は胚発生に抑制的に働くこと、マウス胚の初期卵割を Glu が抑制することが示されている (Chatot et al., 1989)。

ブタ着床前胚の培養では、培地への Glu 添加は、着床前の胚発生に対して促進的に働く、あるいは抑制的に働くという、矛盾する報告が存在している。ブタ着床前胚は、一般的に修正 Whitten's medium (mWM) や North Carolina State University medium 23 (NCSU23) のような Glu を含む培地で培養されてきた (Wright, 1977; Beckmann and Day, 1993; Petters and Wells, 1993; Miyano et al., 1994)。これらの培地は Glu のみ、あるいは Glu と共にピルビン酸と乳酸 (Pyr·Lac) を同時に含んでおり、ブタ胚の胚盤胞への発生を支持する。ブタ胚は Glu を、着床前発生期間を通して代謝することが可能で、その消費量は、8 細胞期以前の胚よりもコンパクション後の桑実胚や胚盤胞の方が高い (Flood and Wiebold, 1988)。また、培養開始から媒精 58 時間後まで Glu を Pyr·Lac に置き換えた NCSU-37 で培養することによって、ブタ胚の胚盤胞への発生率が改善される (Karja et al., 2004)。さらに、Glu を含まずに、Pyr·Lac を主要エネルギー基質とした培地が最も高い胚盤胞形成率を示すことが、ブタの体内受精卵を用いて明らかにされている (Yoshioka et al., 2002; Im et al., 2004)。これらの報告は、初期卵割期にあるブタ胚は、エネルギー基質として Glu よりもその他の炭水化物 (Pyr·Lac) を優先的に利用することを示唆している。一方、コンパクションを起こしたブタ胚、あるいは胚盤胞の生存性は、培地への Glu 添加によって高めら

れる (Mito et al., 2012)。以上の結果を総合すると、ブタ着床前期胚では、初期卵割期と胚盤胞期において、Glu の利用性に関する生理的特性が異なることが示唆される。

着床前胚の培養において、培養液の Glu をフルクトース (Fru) に置換することが可能で、Fru への置換によってウシ胚盤胞の細胞数は増加する (Kwun et al., 2003; Bhuiyan et al., 2007)。着床前期のハムスター胚を Fru にさらすことによって、その後レシピエントに移植された胚の着床率が向上し、胚盤胞の細胞数も増加する (Ludwig et al., 2001)。ブタ胚においても、Glu の代わりに Fru を day 3 に培地へ添加することによって、胚盤胞形成率の改善、胚盤胞の総細胞数の増加、ならびに胚盤胞中のアポトーシスをおこす細胞の割合の低下が明らかにされている (Wongsrikeao et al., 2006)。これに対して、ブタ体外受精胚を、体外培養の初期から Fru のみを主要エネルギー基質として含む培地で培養すると卵割率が著しく下がり、胚盤胞は得られなかったことが報告されている (Park et al., 2005)。したがって、Fru の培地への添加は、常にブタ胚の発生を支持するわけではない。これらの結果は、ブタ胚の Fru 代謝特性も、初期卵割期とコンパクション後では異なることを示唆している。このように、ブタを含む多くの哺乳動物では、胚盤胞形成にとって Fru が Glu よりも優れていることを示唆する報告が見られるが (Kwun et al., 2003; Wongsrikeao et al., 2006; Bhuiyan et al., 2007)、着床前胚による Fru 利用性の詳細は、十分に理解されていない。

以上のように、ブタにおける研究報告にはいくつかの矛盾が存在するが、Glu や Fru の利用性に関するこれらの違いは、胚性遺伝子の活性化 (ZGA) によって一般的に説明されている。ブタでは後期 4 細胞期付近で ZGA が起こると考えられており (Jarrell et al., 1991)、コンパクションの前後に Glu を添加することによって、得られた胚盤胞の状態が改善されることが報告されている (Mito et al., 2012)。これらの結果から、ブタ着床前胚の解糖系酵素が ZGA 後に活性化することが推察される。

第二章では、主要エネルギー源として、Glu, Fru ならびに Pyr・Lac に着目し、これら主要エネルギー源として利用される炭水化物がブタ胚の胚盤胞への発生に及ぼす影響について、発生時期特異的な作用を明らかにすることを目的として、これらの主要エネルギー基質を、単独あるいは組み合わせて含む培地を、異なる発生時期から胚の培養に使用した。また、得られた培養結果を裏付けるために、Glu と Fru 代謝の第一段階を触媒する II 型ヘキソキナーゼ (*hexokinase II*,

HKII), ケトヘキソキナーゼ (*ketohexokinase, KHK*) およびグルコキナーゼ (*glucokinase, GCK*) mRNA の, それぞれの発生段階の胚における発現を調べた。

第二節 材料および方法

卵母細胞の採取および成熟培養，電気刺激による活性化

食肉衛生処理場で採取したブタの卵巣を 2 時間以内に実験室まで運んだ。卵巣を 0.2% (w/v) の cetyltrimethylammonium bromide (CETAB; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) で一度洗浄後，0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (PVA; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を添加した， Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない Dulbecco's リン酸緩衝液 (PBS) で二度洗浄した。メスを用いて卵巣から直径 4~6 mm の卵胞を PBS-PVA 中で切り出した。Tissue Culture Medium 199 (TCM-199; Nissui Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) buffered with 25 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES; Dojindo Molecular Technologies Inc., Kumamoto, Japan) (HEPES-199) 中で卵丘細胞-卵母細胞-顆粒膜細胞複合体 (COGCs) を卵胞から採取した。その後 HEPES-199 で洗浄し，ヒト閉経期性腺刺激ホルモン (hMG; ASKA Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を含まない成熟培養培地で 2 度洗浄した。いくつかの正常な卵胞から卵胞殻を採取し，顆粒膜細胞を除去した。30~90 個の COGCs を 2, 3 個の卵胞殻と共に 2.0 ml の，10% (v/v) 不活化ウシ胎仔血清，0.1 mg/ml のピルビン酸ナトリウム，0.08 mg/ml の硫酸カナマイシン，2.2 mg/ml 炭酸水素ナトリウム，および 0.1 IU/ml の hMG を含む，重炭酸緩衝 TCM-199 中で 5% CO_2 ，95% 空気，38.5°C の CO_2 インキュベータ内で 44~48 時間，成熟培養を行った。成熟培養後，200 μl の，0.1% (w/v) ヒアルロニダーゼ (Sigma-Aldrich) を含む PBS-PVA を，成熟培養後の培地に添加し，卵母細胞に結合した卵丘細胞を，PZM3 (Yoshioka et al., 2002) 中でピペッティングによって除去した。裸化卵母細胞を，0.30 mM マンニトール，0.05 mM CaCl_2 ，0.10 mM MgSO_4 ，および 0.01 % (w/v) PVA からなる電気刺激用電解液中で 3 度洗浄した。次に，平行電極 (FTC-03; Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan) 間に満たされた 100 μl の電解液中に卵母細胞を静置し，1,500 V/cm，直流，100 μ 秒の単矩形波の電気刺激を 1 回負荷して卵母細胞を活性化した。電気刺激後，第二極体の放出を阻害するために 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のサイトカラシン B (Sigma-Aldrich) を含む PZM3 中で卵母細胞を 4 時間培養した。

発生用培地の準備

この章では，胚の培養のために 6 種類の培地を用いた。すべての培地は PZM3

あるいは Pyr·Lac を除いた PZM3 (PZM) を基本とし、PZM3 または PZM に 5.56 mM の Glu または Fru を添加した。今後、それぞれを PZM3+G, PZM+F, PZM+G, PZM+F と表記する。PZM には 2.0 mM の CaCl_2 を添加し、PZM3 から乳酸カルシウムを除去したことによる Ca^{2+} の欠乏を補った。また、それぞれの培地の浸透圧は、NaCl 濃度を調整することにより補正した (Table 2-1)。

胚の培養

サイトカラシン B 処理後、2 倍体を PZM3 で 3 度、それぞれの培地で 2 度洗浄した。ミネラルオイルを重層した、それぞれの培地 10 μl 中に 8~12 個の 2 倍体を入れ、5% CO_2 , 95% 空気, 38.5°C の CO_2 インキュベータ内で培養した。培養した 2 倍体を 24 時間ごとに観察し、発生段階を形態学的に分類した。すべての実験に使用する培地は、気相と温度を平衡するために 2 時間以上 CO_2 インキュベータ内に静置した。予備実験において、電気刺激後 216 時間まで、3 日ごとの培地交換の有無について比較したところ、着床前発生率において差がなかったことから、本実験では、使用培地を変更する場合を除いて、培地交換は行わなかった。

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 法によるアポトーシス細胞の検出

胚盤胞内でアポトーシスを起こした細胞を DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega Co., Madison, WI, USA) によって検出した。電気刺激の 144 時間後に胚盤胞を回収し、4% (w/v) パラフォルムアルデヒドと 0.2% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) を含む PBS-PVA を用いて、25 分間室温で固定した。次に、胚盤胞を PBS-PVA で 3 度洗浄後、室温で 10 分間、50 μl の付属の平衡バッファに浸漬した。平衡化処理後、胚盤胞を 45 μl の平衡バッファ、5 μl の nucleotide mix, 1 μl の rTdT 酵素からなる 50 μl の reaction cocktail に移した。37.0°C の暗所で 1 時間 TUNEL 反応を行い、50 μl の 2x SSC を加えて停止した。PBS-PVA で 3 度洗浄後、胚盤胞の核を 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Hoechst 33342 を含む PBS-PVA 中で、室温で 20 分反応させることによって対比染色した。染色後、蛍光顕微鏡 (BX53-FL; Olympus Co., Tokyo, Japan) 下で胚盤胞中の総細胞数と TUNEL 陽性細胞数を計測した。

ヘキソキナーゼ (*Hexokinase II, HKII*), グルコキナーゼ (*Glucokinase, GCK*), ケトヘキソキナーゼ (*Ketohexokinase, KHK*) mRNA 発現の検出

正常に発生した各発生段階にある胚を -80°C で保存した。48~50 個の各発生段階にある胚から, GenEluteTM Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) を用いて, メーカーの説明書にしたがって総 RNA を抽出した。その後, SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて mRNA を単離後, 逆転写反応によって 20 μl の cDNA 溶液を作成した。1 μl の oligo (dT), 8 μl の RNA, 1 μl の 10 mM dNTP mix を混合し, 65°C で 5 分間反応後, それぞれのチューブに 2 μl の 10x RT buffer, 4 μl の 25 mM MgCl_2 , 2 μl の 0.1 M DTT, 0.75 μl の DEPC 水に 0.25 μl SuperScript II RT (reverse transcriptase) を加えたもの, ならびに 1 μl RNase OUT recombinant RNase inhibitor を添加した。 42°C で 50 分間逆転写反応 (RT) を行い, その後 70°C で 15 分間処理して反応を停止した。合成されたそれぞれの cDNA の濃度を計測し, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に濃度調整した。すべての RT 産物は使用するまで -20°C で保存した。

着床前発生中の単為発生 2 倍体に Glu および Fru 代謝の能力があるかどうかを知るために, *HKII*, *GCK*, *KHK* mRNA の発現を逆転写 PCR (RT-PCR) を用いて分析した。PCR は C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA, USA) 中で, 最初に 94°C で 2 分間処理した後, 94°C で変性, 56°C でアニーリング, 72°C で伸長を各 30 秒ずつ 45 サイクル行った。最後に 72°C で 3 分間処理し, シングルストランドの DNA を完全に伸長した。用いたプライマーは, すべて各遺伝子のエクソンを認識するようにデザインした (Table 2-2)。反応のポジティブコントロールには, ブタのユビキチン mRNA (*UBC*) を用いた (Kuijk et al., 2007)。

実験計画

実験 1: ピルビン酸と乳酸 (Pyr·Lac) を含む合成培地 (PZM3) へのグルコースあるいはフルクトース添加がブタ胚の着床前発生に及ぼす影響 (Fig. 2-1A 参照)

第二極体の放出を抑制するために, すべての活性化卵母細胞を活性化後 4 時間サイトカラシン B 処理した。Glu および Fru の発生段階特異的な影響を知るために, 活性化 4 時間後すなわちサイトカラシン B 処理直後, 電気刺激の 48, ならびに 72 時間後まで 2 倍体を PZM3 で培養し, その後, PZM3 (control), 5.56 mM Glu あるいは Fru を含む培地に 2 倍体を移した (Fig. 2-1A)。サイトカラシン B 処

理の直後に培地を交換する場合には、2倍体を直接 PZM3, PZM3+G, あるいは PZM3+F に移して培養した。各観察時間に、退行している2倍体、および48時間以上の発生遅延を示した2倍体を、異常発生胚に分類した (Kure-Bayashi et al., 1996; Nguyen et al., 2003)。電気刺激48および72時間後に培地を交換する場合には、それぞれ、正常に発生した2~4細胞、および4細胞を越えた2倍体を使用した。どの実験においても、活性化後216時間2倍体を培養し、24時間ごとに発生段階を観察した。

実験2: ピルビン酸と乳酸 (Pyr·Lac) を含まない合成培地 (PZM) へのグルコースあるいはフルクトース添加がブタ胚の着床前発生に及ぼす影響 (Fig. 2-1B 参照)

実験1ではPyr·Lacを含むPZM3にヘキソースを添加したが、実験2ではブタ着床前発生におけるGluおよびFru単独の影響を調べた。したがって、活性化2倍体の培養にPZM3 (positive control), PZM3+G, PZM+G, PZM+F および PZM (negative control) を用いた。電気刺激後、4あるいは72時間後にGluあるいはFruを添加した培地に2倍体を移して培養した。実験2ではブタ着床前発生において、活性化72時間後に4細胞期にある2倍体の割合が高かったため、活性化72時間後に培地を代える場合には、4細胞の2倍体のみを選択し、その後の培養に供した。いずれの実験においても、2倍体を電気刺激216時間後まで培養し、24時間ごとに発生段階を観察した。それぞれの培地で培養した胚盤胞の一部を電気刺激の144時間後に回収し、TUNEL反応に用いた。これらの胚盤胞中のアポトーシスを起こした細胞および総細胞数を計測し、総細胞数に対するアポトーシス細胞の割合をapoptotic indexとし、アポトーシスを起こした割合の指標として各実験区間で比較した。

実験3: ブタ着床前胚におけるII型ヘキソキナーゼ (*Hexokinase II, HKII*), グルコキナーゼ (*Glucokinase, GCK*) およびケトヘキソキナーゼ (*Ketohexokinase, KHK*) mRNA 発現解析

実験2の結果より、ブタ着床前胚ではFruとGluの代謝能力が異なることが示された。したがって、PZM3で培養された着床前の各発生段階にある単為発生2倍体における、Glu代謝の第一段階を触媒する*HKII*および*GCK*のmRNA発現とFru代謝の第一段階を触媒する*KHK*のmRNA発現を、RT-PCR法によっ

て調べた。

統計解析

胚の発生率および apoptotic index の値を arcsine 変換後, one-way ANOVA を用いて解析した。ANOVA において有意な差があると認められた場合には, Tukey-Kramer の方法を用いて, 各実験区間の有意性を比較した。胚盤胞における総細胞数は, 対数変換後に, 同様に one-way ANOVA および Tukey-Kramer 法によって解析した。

第三節 結果

実験 1：ピルビン酸と乳酸を含む合成培地 (PZM3) へのグルコースあるいはフルクトース添加がブタ胚の着床前発生に及ぼす影響

電気刺激 144 時間後まで 2 倍体を培養した場合の代表的な発生の様子を Fig. 2-2 に示す。実験 1 の結果は Fig. 2-3 から 2-5 に示した。

電気刺激 4 時間後から, Glu あるいは Fru を含む PZM3 中で 2 倍体を培養すると, PZM3, PZM3+G, ならびに PZM3+F の各実験区における 2 細胞期 (24 時間), 早期 4 細胞期 (48 時間), 後期 4 細胞期 (72 時間) の割合には有意差がなかった (Fig. 2-3)。また, 120 時間以前では, 正常に発生した 2 倍体の割合にも, 実験区間における有意差は見られなかった。一方で, 96 時間後における桑実胚の割合, および 120 時間から 192 時間の PZM3 および PZM3+F における胚盤胞の割合は, PZM3+G よりも有意に高かった ($P < 0.05$)。168 時間以降に, 正常に発生した 2 倍体とは, 胚盤胞以降に発生しているものを指している。

電気刺激 48 時間後から, PZM3+G あるいは PZM3+F で培養した 2 倍体では, いずれの観察時間においても PZM3, PZM3+G, PZM3+F の実験区間において, 正常発生胚の割合に有意差は見られなかった (Fig. 2-4)。72 時間後から PZM3+G あるいは PZM3+F で 2 倍体を培養した場合 (Fig. 2-5), 電気刺激 144 時間以降, PZM3+F における全胚盤胞 (拡張および孵化胚盤胞) の割合が, その他の実験区に比較して高くなる傾向にあった ($P > 0.05$)。また, 216 時間における PZM3+F の孵化胚盤胞の割合は, PZM3+G よりも有意に高く ($P < 0.05$), その割合は PZM3+F, PZM3, および PZM3+G においてそれぞれ 39%, 26% および 5% であった。

実験 2：ピルビン酸と乳酸 (Pyr·Lac) を含まない合成培地 (PZM) へのグルコースあるいはフルクトース添加がブタ胚の着床前発生に及ぼす影響

実験 1 の結果より, 電気刺激 216 時間後における孵化胚盤胞の割合は, 72 時間から Fru を添加した実験区において有意に高くなった。一方で 48 時間から添加してもこの効果は見られなかった (Fig. 2-4 および Fig. 2-5)。したがって, 実験 2 では, 電気刺激 4 時間後, あるいは 72 時間後からヘキソースを添加した。

4 時間後から Glu (PZM+G)あるいは Fru (PZM+F)を添加した場合 (Fig. 2-6), 24 時間後の 2 細胞期の割合に有意差は認められなかったが, 48 時間後における 4 細胞期の割合は, PZM (negative control) において, その他のすべての区よりも有意に低かった ($P < 0.05$, Fig. 2-6)。また, 96 時間後の桑実胚の割合は, PZM+F (3%)および PZM (0%) において, PZM3 (positive control, 60%) および PZM+G (47%) より有意に低く, PZM+F ならびに PZM で培養された 2 倍体は, 活性化 144 時間後までに細胞膜が不鮮明になる等の特徴を示し, 退行した。Glu を含む実験区 (PZM3+G および PZM+G) では, PZM3 と比較して, 144 時間以前の観察時間において正常に発生した 2 倍体の割合に有意差は見られなかった。しかし, 120 および 144 時間における胚盤胞の割合は, PZM3+G および PZM+G において, PZM3 よりも有意に低かった ($P < 0.05$)。このような差は, 168 および 192 時間の正常に発生した 2 倍体の割合においても, PZM3 と PZM3+G 間に観察された。しかし, PZM3 と PZM+G との間に有意差はなかった ($P > 0.05$)。

電気刺激 72 時間後からヘキソースを添加する実験では, PZM3 中で 4 細胞期まで発生した 2 倍体のみを, その後の培養に用いた。168 時間までは, 各実験区間における正常発生胚の割合に有意差は見られなかった (Fig. 2-7)。192 時間後の生存胚盤胞率は, PZM+F の方が, PZM3 に比較して有意に高く, 216 時間後の生存胚盤胞率は, PZM+F および PZM+G において, PZM3 および PZM より有意に高かった ($P < 0.05$, Fig. 2-7)。なお生存胚盤胞とは活性化 144 時間以降において, 胚盤胞を形成しており, かつ細胞膜が明瞭で, 退行の兆候が見られない物を指す。

電気刺激 72 時間後からヘキソースを添加する実験において, 電気刺激 144 時間後の胚盤胞における総細胞数は, PZM+F で培養した場合に, その他の培地で培養したものよりも多い傾向にあった ($P > 0.05$, Fig. 2-8)。また, 144 時間後の胚盤胞における apoptotic index に有意差は見られなかった (Fig. 2-8)。TUNEL 染色アッセイの結果を Fig. 2-9 に示す。

実験 3 : ブタ着床前胚における *Hexokinase II (HKII)*, *Glucokinase (GCK)* および *Ketohexokinase (KHK)* mRNA 発現解析

RT-PCR の結果を Fig. 2-10 に示す。すべての発生段階の 2 倍体において, *HKII* および *GCK* の mRNA 発現が検出された。一方, *KHK* の mRNA は MII 期の卵母

細胞, および活性化 72 時間以降の正常に発生した 2 倍体では検出されたが, 2 細胞, および早期 4 細胞期胚には検出されなかった。

Table 2-1. 本章の実験に用いられた各培地の組成

Components		PZM3	PZM3+G	PZM3+F	PZM+G	PZM+F	PZM
NaCl	mM	108.00	105.22	105.22	105.42	105.42	108.20
KCl	mM	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
KH ₂ PO ₄	mM	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
MgSO ₄ ·7H ₂ O	mM	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
NaHCO ₃	mM	25.07	25.07	25.07	25.07	25.07	25.07
Na-pyruvate	mM	0.20	0.20	0.20	-	-	-
Ca-lactate·5H ₂ O	mM	2.00	2.00	2.00	-	-	-
Glucose	mM	-	5.56	-	5.56	-	-
Fructose	mM	-	-	5.56	-	5.56	-
CaCl ₂	mM	-	-	-	2.00	2.00	2.00
L-glutamine	mM	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Hypotaurine	mM	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
EAA	ml/l	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
NEAA	ml/l	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Kanamycin	mg/ml	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
BSA	mg/ml	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Osmolality	mOs	300.04	300.04	300.04	300.04	300.04	300.04

PZM3; Yoshioka et al., 2002

EAA; MEM essential amino acids solution (50x)

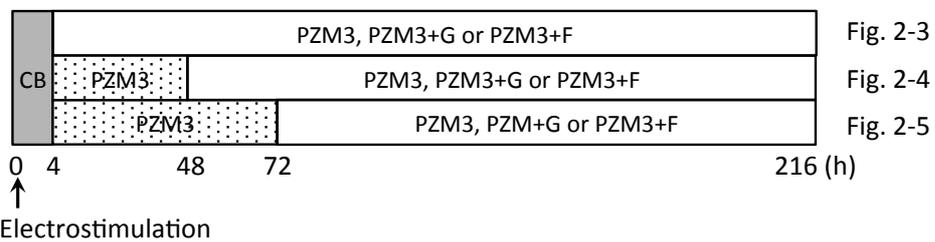
NEAA; MEM nonessential amino acids solution (100x)

Table 2-2. 実験3でもちいたプライマーの配列

Genes		Sequence	GenBank accession number
<i>HKII</i>	Forward	TGAAACCAAGTTCCTGTCTCA	DQ432056.1
	Reverse	TTGGCAAAGTGAGGATGTAGC	
<i>GCK</i>	Forward	TTTGTTCATGTCTGCACTG	XM_003484067.1
	Reverse	TAGGTGATCAGCAGCTTCCC	
<i>KHK</i>	Forward	TACGGGGATGTGGTGTGTTGT	XM_003125302.2
	Reverse	ATGCTCTTCCCCTGGGAGA	
<i>UBC</i>	Forward	TTCGTGAAGACCTTGACTG	M18159
	Reverse	GGACTCCTTCTGGATGTTG	

UBC を PCR 反応のポジティブコントロールとして用いた。プライマー配列は Kuijk et al. (2007) を参考にした。

(A) 実験1



(B) 実験2

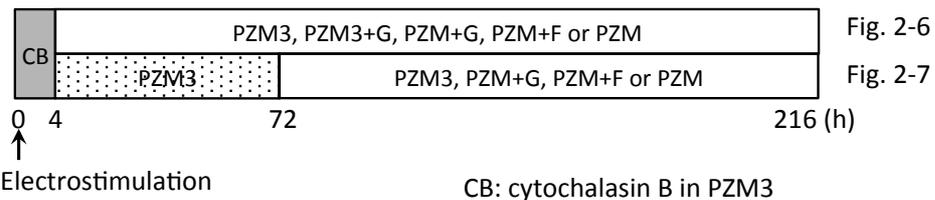


Fig. 2-1. 本章で行った培養実験の方法。電気刺激を与えたすべての卵母細胞をサイトカラシン B (CB) を含む PZM3 中で 4 時間培養することで第二極体の放出を抑制した。詳細は材料および方法の実験計画を参照。

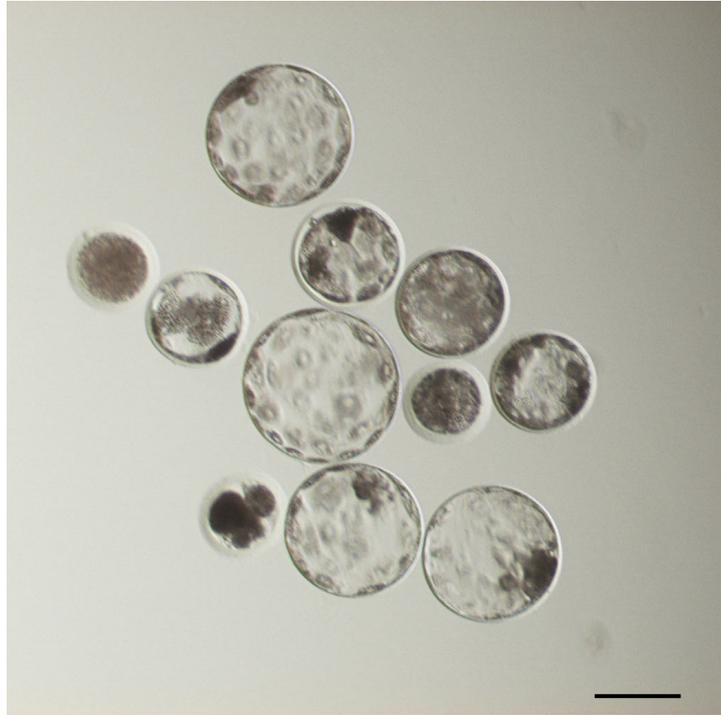


Fig. 2-2. PZM3 中で 144 時間培養し，胚盤胞期へと発生したブタ単為発生 2 倍体。11 個中 8 個 (73%) の 2 倍体が胚盤胞あるいは拡張胚盤胞へと発生している。Scale Bar = 100 μm 。

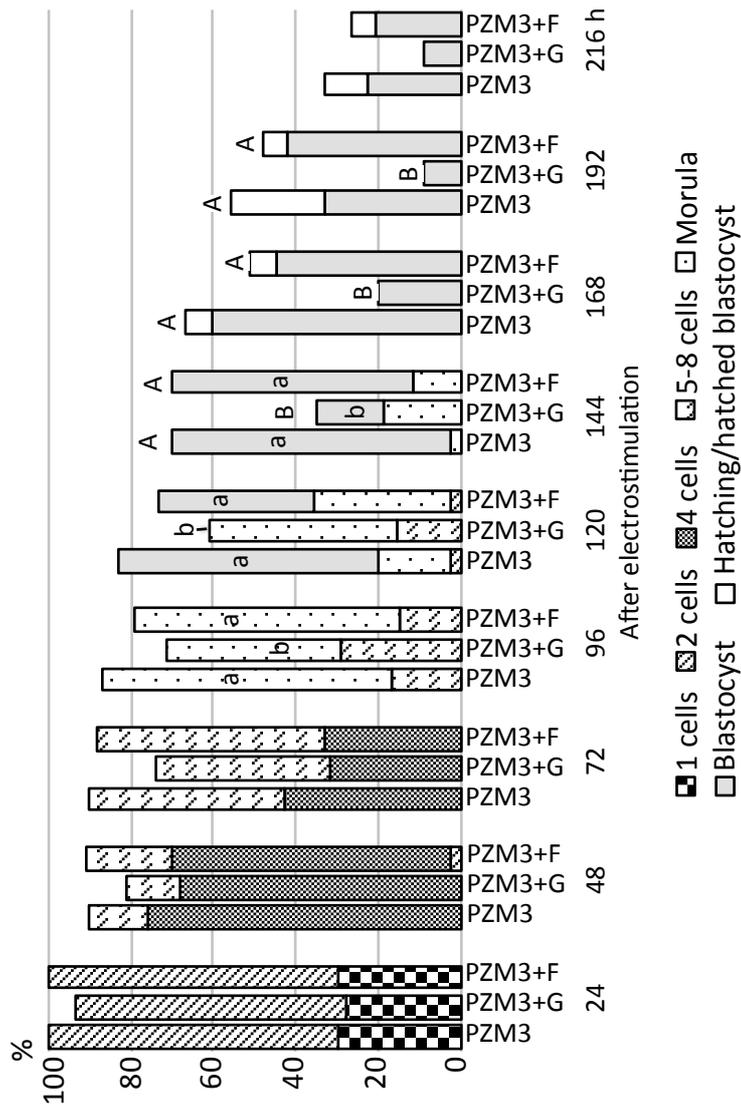


Fig. 2-3. Pyr·Lac を含む PZM3 培地への、電気刺激 4 時間後から Glu または Fru の添加がブタ単為発生 2 倍体の着床前発生に及ぼす影響。サイトカラシン B 処理直後から単為発生 2 倍体を、PZM3, Glu 添加 (PZM3+G) あるいは Fru 添加 PZM3 (PZM3+F) で電気刺激 216 時間後まで培養した。各実験区において、少なくとも 3 回実験を行い、それぞれの実験区における供試 2 倍体の数は PZM3, PZM3+G, PZM3+F 区でそれぞれ 30, 31 および 33 個であった。小文字の a, b はそれぞれの実験区間において、各観察時間における最も進んだ発生ステージにある 2 倍体の割合に有意差があることを示し、大文字の A, B はそれぞれの実験区間において、各観察時間における正常発生した 2 倍体の割合に有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

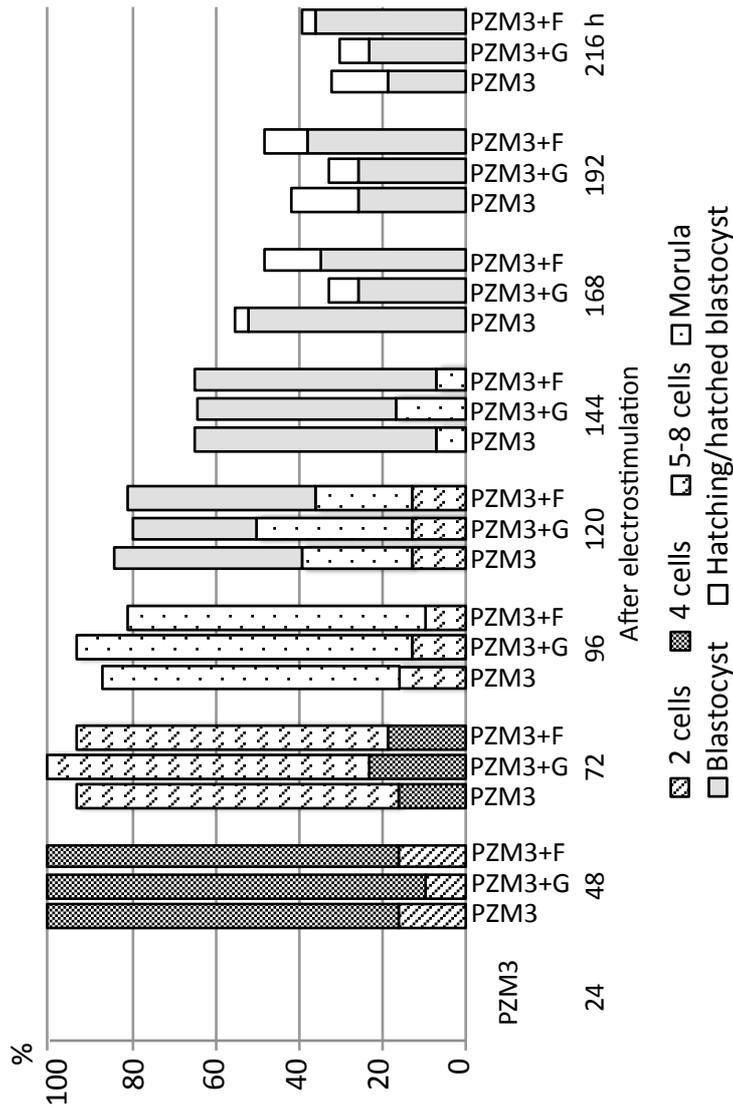


Fig. 2-4. Pyr·Lac を含む PZM3 培地への、電気刺激 48 時間後から Glu または Fru の添加がブタ単為発生 2 倍体の着床前発生に及ぼす影響。サイトカリン B 処理直後から単為発生 2 倍体を、PZM3 で電気刺激 48 時間後まで培養し、その後、PZM3, Glu 添加 (PZM3+G) あるいは Fru 添加 PZM3 (PZM3+F) で 216 時間まで培養した。各実験区において、少なくとも 3 回実験を行い、それぞれの実験区における供試 2 倍体の数は PZM3, PZM3+G, PZM3+F 区でそれぞれ 31, 30 および 31 個であった。いずれの実験区間にも、各観察時間、各発生段階において有意差は認められなかった。

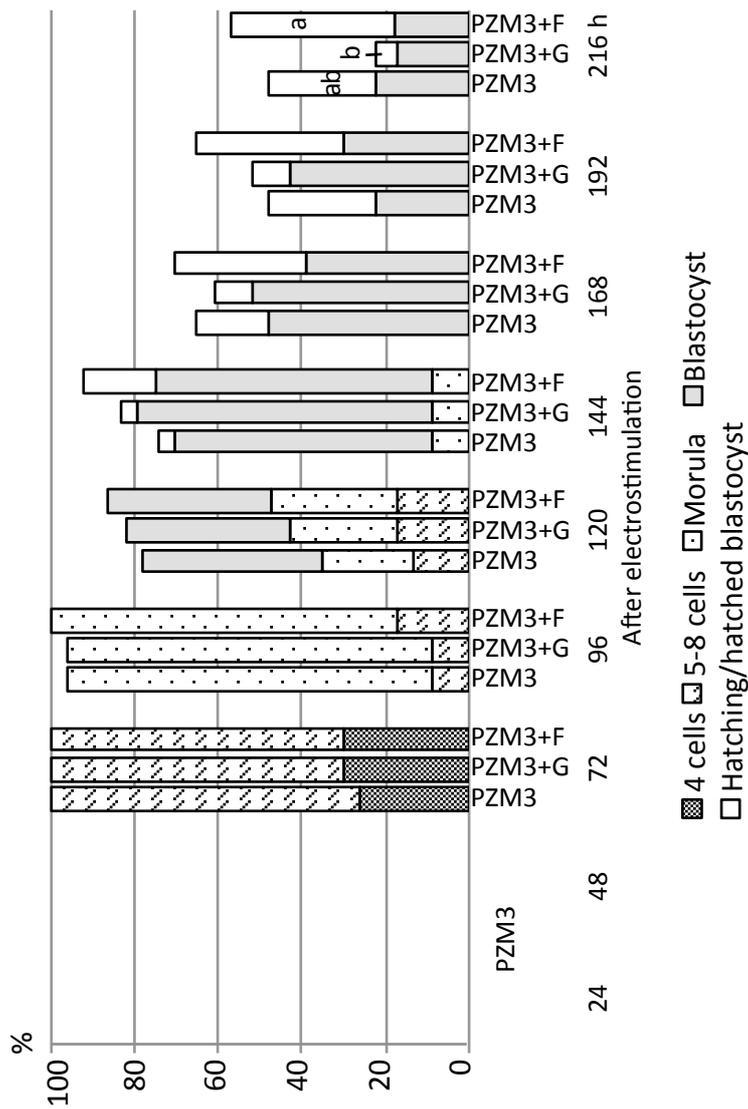


Fig. 2-5. Pyr·Lac を含む PZM3 培地への電気刺激 72 時間後からの Glu または Fru の添加がブタ単為発生 2 倍体の着床前発生に及ぼす影響。サイトカリン B 処理直後から単為発生 2 倍体を, PZM3 で電気刺激 72 時間後まで培養し, その後, PZM3, Glu 添加 (PZM3+G) あるいは Fru 添加 PZM3 (PZM3+F) で 216 時間後まで培養した。各実験区において, 少なくとも 3 回実験を行い, それぞれの実験区における供試 2 倍体の数は PZM3, PZM3+G, PZM3+F でそれぞれ 23 個ずつであった。小文字の a, b はそれぞれ実験区間において, 各観察時間における最も進んだ発生ステージにある 2 倍体の割合に有意差があることを示し, 大文字の A, B はそれぞれの実験区間において, 各観察時間における正常発生した 2 倍体の割合に有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

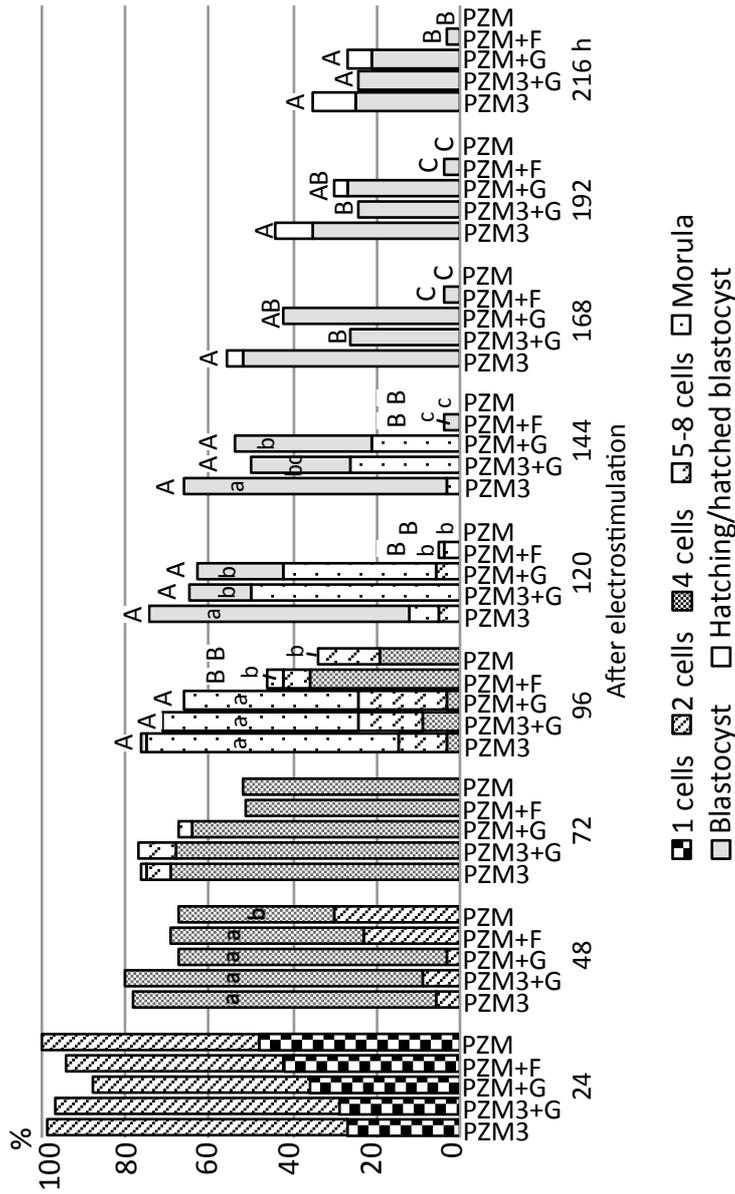


Fig. 2-6. Pyr·Lac を含まない PZM 培地への電気刺激 4 時間後からの Glu または Fru の添加がブタ単為発生 2 倍体の着床前発生に及ぼす影響。サイトカラシン B 処理直後から単為発生 2 倍体を、PZM (negative control), Glu 添加 (PZM+G) あるいは Fru 添加 PZM (PZM+F) で 216 時間まで培養した。実験 1 と比較するため、PZM3 (positive control), および Glu 添加 PZM3 (PZM3+G) も培養区に設定した。各実験区において、少なくとも 3 回実験を行い、それぞれの実験区における供試 2 倍体の数は PZM3, PZM3+G, PZM+G, PZM+F, PZM 区において、それぞれ 86, 34, 33, 69, 27 個であった。小文字の a-c は、それぞれの実験区において、各観察時間における最も進んだ発生ステージにある 2 倍体の割合に有意差があることを示し、大文字の A-C は各実験区間において、各観察時間における正常発生した 2 倍体の割合に有意差があることを示す (P<0.05)。

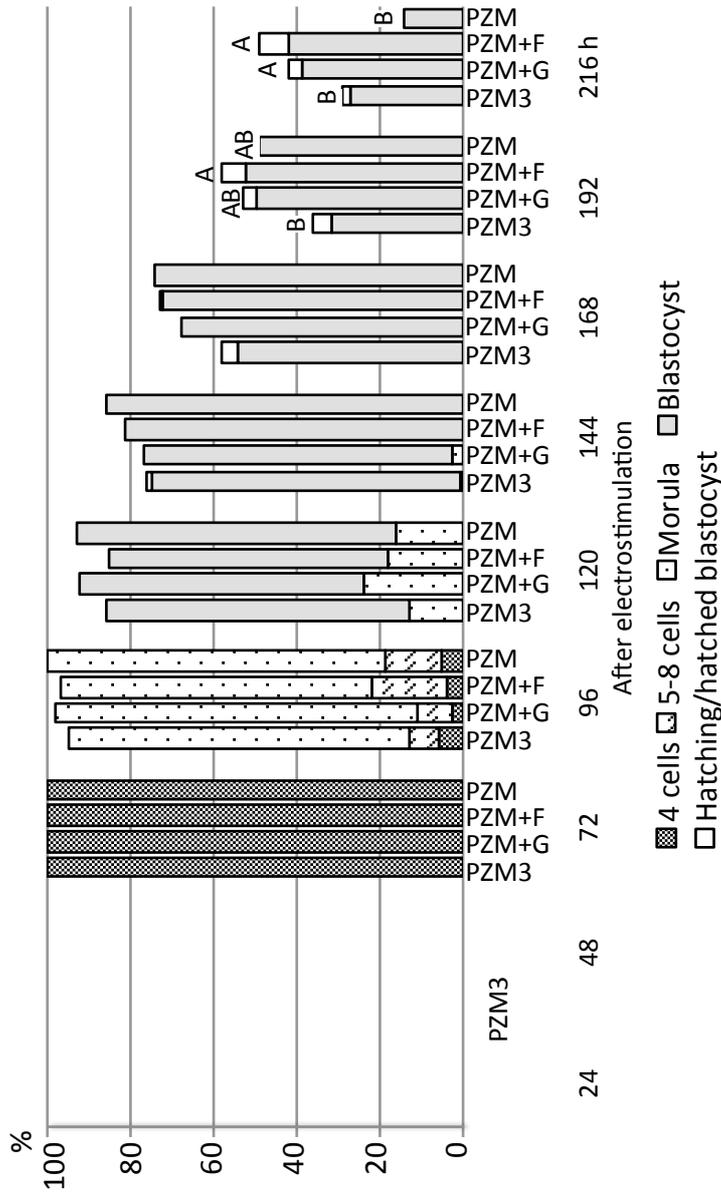


Fig. 2-7. Pyr·Lac を含まない PZM 培地への電気刺激 72 時間後からの Glu または Fru の添加がブタ単為発生 2 倍体の着床前発生に及ぼす影響。電気刺激 72 時間後まで単為発生 2 倍体を PZM3 で培養し、4 細胞期の 2 倍体を選び、その後 PZM3 (positive control), PZM (negative control), Glu 添加 (PZM+G) あるいは Fru 添加 PZM (PZM+F) で 216 時間後まで培養した。各実験区において、少なくとも 3 回実験を行い、各実験区における供試 2 倍体の数は PZM3, PZM+G, PZM+F, PZM 区において、それぞれ 85, 38, 67, 43 個であった。大文字の A, B は各実験区間において、各観察時間における正常発生した 2 倍体の割合に有意差があることを示す ($P < 0.05$)。それぞれの実験区間において、各観察時間における最も進んだ発生ステージにある 2 倍体の割合には、有意差が認められなかった。

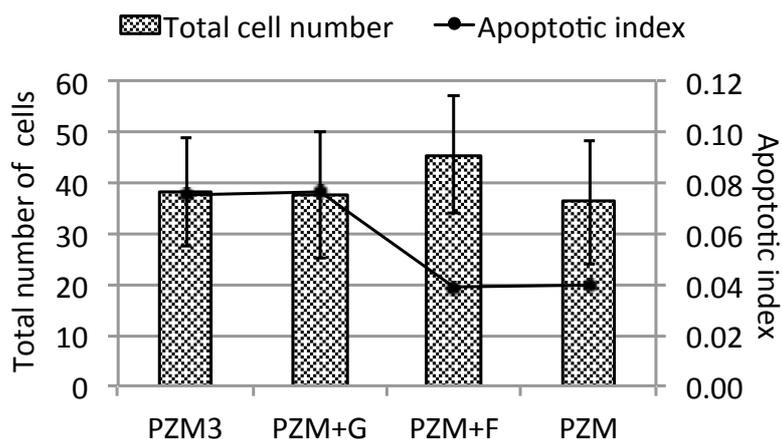


Fig. 2-8. Pyr·Lac を含まない PZM 培地への電気刺激 72 時間後から Glu または Fru の添加が 144 時間後に胚盤胞に発生したブタ単為発生 2 倍体の総細胞数とアポトーシスに及ぼす影響。電気刺激 72 時間後まで単為発生 2 倍体を PZM3 で培養して 4 細胞胚を選んだ。その後, 144 時間まで PZM3, PZM+G, PZM+F および PZM 中で培養した。供試 2 倍体数は PZM3, PZM+G, PZM+F, PZM においてそれぞれ 43, 19, 17, 21 個であった。各実験区において少なくとも 3 回実験を行った。各培地で培養した胚盤胞に含まれる総細胞数, apoptotic index の間に有意な差は認められなかった。Apoptotic index = number of apoptotic cells / number of cells in a blastocyst.

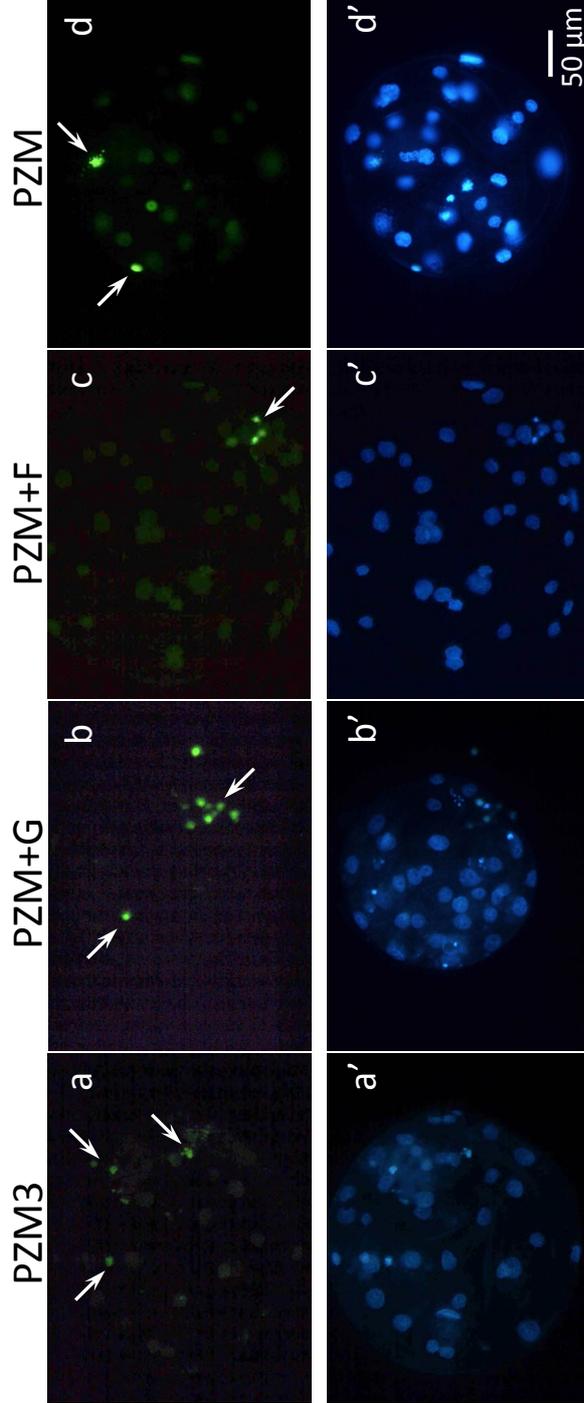


Fig. 2-9. 培養液への Glu あるいは Fru 添加が胚盤胞の総細胞数と TUNEL 陽性細胞の割合に及ぼす影響。単為発生 2 倍体を、電気刺激 72 時間後まで PZM3 で培養後, PZM3 (a, a'), Glu (PZM+G; b, b') または Fru 添加 PZM (PZM+F; c, c'), および PZM 培地(d, d')で 144 時間後まで培養して胚盤胞を得た。これらの胚盤胞を DeadEnd Fluorometric TUNEL assay (a-d, green)を行い, 総細胞数と TUNEL 陽性細胞数を計測した。矢印はアポトーシスを起こした細胞を示している。核を Hoechst 33342 を用いて対比染色した (a'-d', blue)。Scale Bar = 50 μm。

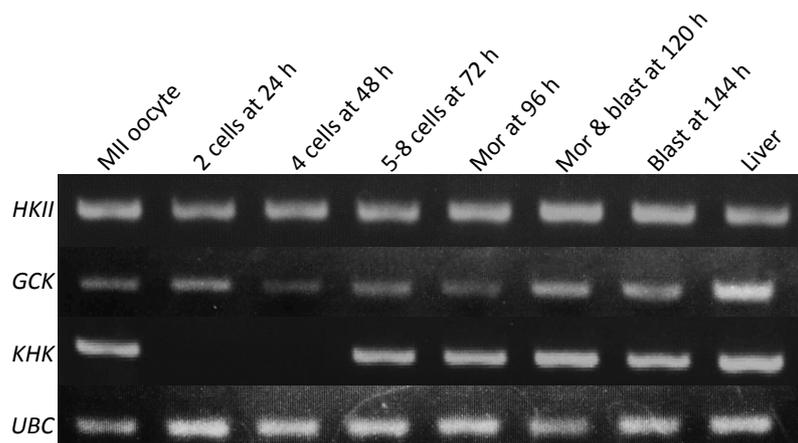


Fig. 2-10. 着床前発生段階のブタ単為発生 2 倍体における主な解糖系酵素 mRNA の逆転写 PCR による発現。単為発生 2 倍体を PZM3 で電気刺激 144 時間後まで培養した。2 細胞期胚, 早期 4 細胞期胚, 5-8 細胞期胚, 桑実胚, 桑実胚と胚盤胞, および胚盤胞を, それぞれ, 電気刺激 24, 48, 72, 96, 120 および 144 時間後に採取し, 成熟卵母細胞とともに RT-PCR で発現解析した。*HKII*, *Hexokinase II*; *GCK*, *glucokinase*; *KHK*, *ketohexokinase*; *UBC*, *ubiquitin*. mor, morula; blast, blastocyst.

第四節 考察

本章では、着床前哺乳動物胚の培養にエネルギー源として使用される炭水化物、Glu, Fru ならびに Pyr·Lac に着目し、これらのエネルギー源の、単独または組合せがブタ着床前胚の発生に及ぼす影響について、単為発生 2 倍体を使用して、特に発生時期特異的な影響について調べた。また、ブタ着床前胚の、ヘキソースの代謝能力を確認するために、着床前の各発生段階の 2 倍体における、*HKII*, *GCK* ならびに *KHK* の mRNA 発現を調べた。

実験 1 において、Pyr·Lac を含む PZM3 に Glu あるいは Fru を電気刺激後の異なる時期から添加して 216 時間後まで培養し、ブタ単為発生 2 倍体の着床前発生への影響を調べた。電気刺激 4 時間後から培養期間を通してヘキソースが存在した場合、PZM3+G で培養された 2 倍体では、96 時間後における桑実胚の割合と 120 および 144 時間後における胚盤胞の割合、また 144~192 時間後における正常発生胚の割合は、PZM3 および PZM3+F で培養されたものに比較して有意に低かった ($P<0.05$)。しかし、電気刺激 48 あるいは 72 時間後から Glu が存在した場合、胚盤胞形成率には影響しなかった。一方、4 時間後から Fru が存在しても胚盤胞形成率が低下することはなかった。活性化 72 時間以降に PZM3 にヘキソースを添加した場合、144 時間以降の胚盤胞および孵化胚盤胞の割合は、PZM3+F の方が PZM3 より高い傾向にあった ($P>0.05$)。これらの結果は、初期卵割期における Glu の存在がブタ着床前発生に対して抑制的に働くが、Fru にはそのような性質はなく、むしろ胚盤胞形成後の発生に促進的に作用することを示唆している。

実験 2 では、Pyr·Lac を含まない PZM を使い、主要エネルギー源として単独で存在する Glu, あるいは Fru が、ブタの着床前の発生に及ぼす影響について調べた。4 時間後から Glu を添加すると、120 および 144 時間後における胚盤胞形成率は、Pyr·Lac の有無にかかわらず、PZM3 に比較して有意に低下した。したがって、ブタ単為発生 2 倍体は、体内、体外受精卵と同じように (Yoshioka et al., 2002; Im et al., 2004; Karja et al., 2004), 培養初期から Pyr·Lac を含み、Glu を添加せずに培養することで、最も良い結果が得られた。また、Glu は、活性化直後から胚盤胞期までのブタ着床前発生を支持できるが、Glu が Pyr·Lac と活性化直後から共存すると (PZM3+G), 144 時間における胚盤胞形成率や、168 および 192 時間における正常発生胚の割合が低下した。Glu が 4 時間後から存在すると、

PZM3+G および PZM+G では、120 時間後の胚盤胞の割合が、PZM3 に比べて有意に低下し、桑実胚の割合が増加した。この桑実胚期での発生の停滞は、その後の胚盤胞形成率の低さに反映されている。しかし、活性化 216 時間後の胚盤胞形成率には、PZM3, PZM3+G, および PZM+G 間で有意差は見られなかった。Glu 単独 (PZM+G)でも、胚発生が支持されるにもかかわらず、Glu と Pyr·Lac の共存によって、ブタ胚の発生が抑制される理由は不明である。

実験 1 において、電気刺激 48 時間後から、PZM3 で 4 細胞期にまで発生した 2 倍体を、その後 PZM3 にヘキソースを添加した培地で培養した場合、いずれの観察時間においても着床前発生に明らかな差は見られなかった。しかし、168 時間以降に正常に発生している 2 倍体は、PZM3+G において PZM3 や PZM3+F よりも低い傾向にあった ($P>0.05$)。ヘキソースを 72 時間後から加えた場合、活性化 192 時間後までの PZM3+G における正常発生胚の割合は、PZM3 とほぼ同じであった。これに対して、72 時間後からヘキソースを PZM に加えた場合、168 時間後の正常発生胚の割合は、PZM3 において最も低く ($P>0.05$)、216 時間後では PZM+G および PZM+F に対して有意に低くなった ($P<0.05$)。なお、体外受精によって得た胚を、Glu を Pyr·Lac に置換した NCSU37 で媒精 53 時間後まで培養し、その後、NCSU37 で培養することによって、効率的に胚盤胞へと発生させることができると報告されている (Karja et al., 2004)。PZM および PZM3 を用いた今回の結果は、この NCSU37 を用いた結果と基本的に良く似ている。この結果は、既報のように、ブタ胚の胚盤胞期への発生には、Pyr·Lac の方が Glu や Fru よりも効果的なエネルギー基質であること (Karja et al., 2004; Wongsrikeao et al., 2006) を支持している。また、day 5 から、L-グルタミンを PZM3 の 2 倍量含んだ PZM5 に 2.5~10 mM のグルコースを加えると、ブタ胚盤胞の day 7 における生存率が高くなるとの報告 (Mito et al., 2012) とも矛盾しない。

実験 2 では、ブタ着床前発生に関する 2 つの重要な特性が明らかとなった。一つは電気刺激 4 時間後から PZM+F で 2 倍体を培養すると、電気刺激 96 時間後の桑実胚の割合と 120 時間以降の胚盤胞の割合が、炭水化物由来の主要エネルギー基質を含まない PZM で培養したものと、同じように低く、PZM3, PZM3+G, PZM+G に比較して、大幅に低いことである。体外受精胚を用いた実験では、NCSU23 を基礎培地として、Fru のみを含むか、あるいは主要なエネルギー基質を含まない培地では卵割率が非常に低く、胚盤胞は得られていない (Park et al., 2005)。このような現象は、72 時間後の後期 4 細胞から Fru のみを添加しても見

られることはなく、この場合 192 時間以降の正常発生率は PZM より有意に高い。これらの結果は、後期 4 細胞期に至るまでブタ胚は Fru を実質的に代謝できず、そのために 4 細胞期を越える発生がほとんど起こらないことを示している。二つ目は、PZM3 で 72 時間培養し、後期 4 細胞期に達したブタ胚は、主要なエネルギー基質を含まない培地中でも胚盤胞を形成し、その後、拡張および孵化過程へと発生できることである。ただし、今回使用した培地には、必須および非必須アミノ酸が PZM3 と同じ濃度で含まれており、これらのアミノ酸をエネルギー源として利用している可能性が高い。144 時間以降、生存胚盤胞の割合は減少したが、PZM+G や PZM+F における低下は、PZM3 や PZM に比較して穏やかで、216 時間後の生存胚盤胞率は、PZM3 や PZM に比べて有意に高くなった ($P < 0.05$)。PZM3 および PZM における生存胚盤胞率の低下は、拡張および孵化胚盤胞による急速なエネルギー要求の増大によるものかもしれない。day 5 から PZM5 に Glu を加えた培地で培養した体外受精胚に由来する胚盤胞は、Glu を無添加の場合に比較して、day 6 の時点でおおよそ 3 倍の ATP を保有している (Mito et al., 2012)。したがってヘキソースが存在しないと、ブタ胚盤胞が急速に拡張する電気刺激 168 時間以降に、ATP 欠乏によって胚盤胞の生存性が低くなることが考えられる。

HKII および GCK は、解糖系による Glu 代謝の第一段階である、Glu のリン酸化を触媒し、KHK は、同様に Fru 代謝の第一段階である、Fru のリン酸化を触媒する。HKII および GCK の mRNA は着床前発生期間を通して発現していたのに対して、KHK の mRNA は 2 細胞期および早期 4 細胞期には検出されなかった。これらの結果は、単為発生 2 倍体が Glu をエネルギー基質として着床前発生期間を通して利用できるのに対して、初期卵割期には Fru を利用できない可能性を示唆している。HKII は、本来 Glu と Fru の両方を代謝できると考えられるが、実験 2 で示されたように、PZM+F では 2 倍体は 4 細胞期を越えてほとんど発生せず、HKII は、本研究で使用した濃度の Fru を効率的に代謝できない可能性がある。したがって、本実験条件下では、Fru は KHK によって主に代謝されることが示唆された。ブタ着床前胚では後期 4 細胞期頃から Fru を代謝できるようになり、その後は Glu と Fru の両方を代謝できると考えられる。ブタ単為発生 2 倍体における GCK の mRNA 発現は、ブタ胚が Glu を着床前発生中に積極的に利用できることを示唆しているが、PZM3 への Glu 添加がブタ単為発生 2 倍体の発生を促進せず、むしろ抑制的に働く理由は、酵素の mRNA の発現性からも説

明できなかった。

第五節 引用文献

Beckmann LS, Day BN. Effects of media NaCl concentration and osmolarity on the culture of early-stage porcine embryos and the viability of embryos cultured in a selected superior medium. *Theriogenology*. 1993; 39:611-622.

Bhuiyan MM, Kang SK, Lee BC. Supplementation of fructose in chemically defined protein-free medium enhances the in vitro development of bovine transgenic cloned embryos. *Zygote*. 2007; 15:189-198.

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil*. 1989; 86:679-688

Flood MR, Wiebold JL. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *J Reprod Fertil*. 1988; 84:7-12.

Im GS, Lai L, Liu Z, Hao Y, Wax D, Bonk A, Prather RS. In vitro development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology*. 2004; 61:1125-1135.

Jarrell VL, Day BN, Prather RS. The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *Sus scrofa*: quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Biol Reprod*. 1991; 44:62-68.

Karja NW, Medvedev S, Onishi A, Fuchimoto D, Iwamoto M, Otoi T, Nagai T. Effect of replacement of pyruvate/lactate in culture medium with glucose on preimplantation development of porcine embryos in vitro. *J Reprod Dev*. 2004; 50:587-592.

Kim JH, Funahashi H, Niwa K, Okuda K. Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology*. 1993; 39:875-886.

Kuijk EW, du Puy L, van Tol HT, Haagsman HP, Colenbrander B, Roelen BA. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies in porcine oocytes and preimplantation embryos. *BMC Dev Biol*. 2007; 7:58.

Kure-Bayashi S, Miyake M, Katayama M, Miyano T, Kato S. Development of porcine blastocysts from in vitro- matured and activated haploid and diploid oocytes. *Theriogenology*. 1996; 46:1027-1036.

- Kwun J, Chang K, Lim J, Lee E, Lee B, Kang S, Hwang W.** Effects of exogenous hexoses on bovine in vitro fertilized and cloned embryo development: Improved blastocyst formation after glucose replacement with fructose in a serum-free culture medium. *Mol Reprod Dev.* 2003; 65:167-174.
- Ludwig TE, Lane M, Bavister BD.** Differential effect of hexoses on hamster embryo development in culture. *Biol Reprod.* 2001;64:1366-1374.
- Mito T, Yoshioka K, Yamashita S, Suzuki C, Noguchi M, Hoshi H.** Glucose and glycine synergistically enhance the in vitro development of porcine blastocysts in a chemically defined medium. *Reprod Fertil Dev.* 2012; 24:443-450.
- Miyano T, Hiro-Oka RE, Kano K, Miyake M, Kusunoki H, Kato S.** Effects of hyaluronic acid on the development of 1- and 2-cell porcine embryos to the blastocyst stage in vitro. *Theriogenology.* 1994; 41:1299-12305.
- Nguyen VT, Kure-bayashi S, Harayama H, Nagai T, Miyake M.** Stage-specific effects of the osmolarity of a culture medium on the development of parthenogenetic diploids in the pig. *Theriogenology.* 2003; 59:719-734.
- Park Y, Hong J, Yong H, Lim J, Lee E.** Effect of exogenous carbohydrates in a serum-free culture medium on the development of in vitro matured and fertilized porcine embryos. *Zygote.* 2005; 13:269-275.
- Petters RM, Wells KD.** Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil.* 1993; Suppl 48: 61–73.
- Schini SA, Bavister BD.** Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod.* 1988; 39:1183-1192.
- Wongsrikeao P, Otoi T, Taniguchi M, Karja NW, Agung B, Nii M, Nagai T.** Effects of hexoses on in vitro oocyte maturation and embryo development in pigs. *Theriogenology.* 2006; 65:332-343.
- Wright RW Jr.** Successful culture in vitro of swine embryos to the blastocyst stage. *J Anim Sci.* 1977; 44:854-858.
- Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM, Iwamura S.** Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod.* 2002; 66:112-119.

第三章

ブタ着床前胚の糖新生能

第一節 緒言

体外培養された哺乳類胚の着床前発生におけるエネルギー基質要求性は、胚の発生段階だけでなく、培地の塩濃度やアミノ酸の存在などによっても変化する (Wirtu et al., 2003; Behringer et al., 2014)。マウスでは受精卵から胚盤胞までの着床前発生にグルコース (Glu) を必要とするが (Chatot et al., 1989, 1990, 1994), 初期卵割期に存在すると分割を抑制することが報告されている (Leese and Barton, 1984)。しかし、初期卵割期においても、乳酸との共存によって抑制的に作用しているとの報告 (Park et al., 2005) や、過剰なリン酸塩との共存によって抑制的に作用しているとの報告 (Scott and Whittingham, 1996) などがあり、系統間差や純系と交雑種などの問題もあり、はっきりとした結論は出ていない。これらの点の解明には、同じ培地をベースにして、特定の成分を変化させることによって、着床前胚の生理学的特性を解析する必要がある。

第二章の結果から明らかになったように、ブタ着床前胚の発生は Pyr·Lac のみを含む PZM3 によって支持されるが、この時の各発生段階にある 2 倍体に Glu を代謝するヘキソキナーゼおよびグルコキナーゼの発現が検出された。また、Glu はマウスおよびブタの卵管液や子宮液中に含まれており (Iritani et al., 1974; Gardner and Leese, 1990; La Bonnardiere et al., 1991), 放射性同位体を用いた実験では、ブタ胚は卵割期を含めた着床前の全ての発生段階において Glu を代謝し、その一部はペントースリン酸経路によって代謝されることが明らかとなっている (Flood and Wiebold, 1988)。その他にも、体内で受精および発生しているブタ着床前胚は、体外受精後に体外培養された胚よりも、Glu の代謝量が多く、主に解糖系によってエネルギー生産を行っている (Swain et al., 2002)。これらの結果は、いずれもブタ着床前胚が Glu を利用していることを示唆しているが、Glu を含まない PZM3 中で培養されたブタ着床前胚での Glu の利用性については明らかになっていない。そこで、本章では PZM3 で培養された胚においても Pyr·Lac から必要な Glu を作る糖新生 (gluconeogenesis) を行い、必要な

Glu を補填している可能性を検討した。

糖新生は、基本的に解糖系の逆反応によって、Pyr·Lac から Glu を作る。解糖系の多くの反応は酵素によって可逆的に行われているが、この途中のいくつかの経路には不可逆的な反応が存在し、それを迂回するために 4 つの酵素、ピルビン酸カルボキシラーゼ (PC), ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK), フルクトースビスホスファターゼ (FBP), グルコース-6 リン酸-ホスファターゼ (G6P) が必要である (Fig. 1-3)。本章では、これら 4 つの酵素 mRNA の発現と糖新生の律速酵素である PEPCK のタンパク質レベルでの発現を、それぞれ RT-PCR および免疫染色を用いて、各発生段階にあるブタ単為発生 2 倍体において解析した。

第二節 材料および方法

卵母細胞の採取，活性化および培養

卵母細胞の採取および単為発生 2 倍体の作出は，第二章と同様に行った。

2 倍体を最長活性化 144 時間後まで PZM3 で培養した。

卵母細胞および着床前発生期にある単為発生 2 倍体のピルビン酸カルボキシラーゼ (PC), ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK), フルクトースビスホスファターゼ (FBP), グルコース-6 リン酸-ホスファターゼ (G6P) mRNA 発現解析

卵母細胞, および各発生段階にある 2 倍体の *PC*, *PEPCK*, *FBP*, *G6P* の mRNA 発現を, 逆転写 (RT) PCR を用いて検出した。*PEPCK* は糖新生を行う上での律速酵素である。

RT-PCR および増幅産物の検出は, 第二章と同様に行った。用いたプライマー配列を Table 3-1 に示す。

卵母細胞および着床前発生期にある単為発生 2 倍体のホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) タンパク質の間接免疫蛍光染色

第二減数分裂中期 (MII 期) 卵母細胞および 2 細胞期から胚盤胞期までの, 2 倍体のホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (*PEPCK*) タンパク質の発現を, 免疫染色によって検出した。活性化 24 時間後に 2 細胞期, 48 時間後に 早期 4 細胞期, 72 時間後に 後期 4 細胞期, 96 時間後に 桑実胚期, 120 時間後に 桑実胚期あるいは胚盤胞期, 144 時間後に 胚盤胞期へと発生した 2 倍体を回収した。その後, 2 倍体を 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), および 4% パラフォルムアルデヒドを含む PBS-PVA (PFA) 中で, 室温で 25 分間, 固定および透過処理を行った。固定した 2 倍体を PBS-PVA で 2 度洗浄後, 1% のウシ血清アルブミン (BSA; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を含む PBS-PVA (1% BPP) 中で, 4°C で使用するまで保管した。免疫染色は以下の通り行った。2 倍体を 1% BPP 中で, ウサギ抗ヒト *PEPCK* 抗体 (1: 100; GeneTex, Inc., Irvine, CA, USA) と 4°C で一晩, 反応させた。その後 2 倍体を 3 度 PBS-PVA 中で洗浄し, Alexa Fluor 555 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies) と, 室温の BPP 中で 1 時間反応させた。negative control として, 一部の 2 倍体を二次抗体のみで

処理した。PBS-PVA で洗浄後、2 倍体の核を 2 $\mu\text{g/ml}$ の Hoechst 33342 を含む室温下の PBS-PVA 中で 20 分反応させて、対比染色した。その後、減光防止剤である Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) とともにスライドガラス上にマウントし、落射型蛍光顕微鏡 (BX53-FL; Olympus) 下で観察した。

PEPCK 免疫染色の positive control としてブタ肝臓凍結切片を用いた。肝臓のサンプルを一晩以上 PFA 固定した後、厚さ約 5 mm に切り 5%、7.5% (w/v) スクロース溶液の順にそれぞれ室温で 1 時間、10% (w/v) スクロース溶液中に 4°C で一晩浸漬することにより、脱水処理を行った。つぎに、液体窒素を用いて OTC コンパウンドに包埋した。切片は -20°C 下で 3 μm の切片を作製した。シランコート処理したスライドガラスに切片を張り付け、室温で 1 時間乾燥させた後、1% (w/v) PFA-PBS-PVA で 10 分間固定した。その後、5% BSA を含む PBS-PVA (BSA-PBS-PVA, 5% BPP) で 5 分間ずつ 3 回洗浄後、5% BPP により 1 時間ブロッキングした。2 倍体と同様に免疫染色を行った後、切片を PBS で 5 分間 3 回洗浄し、2 $\mu\text{g/ml}$ の Hoechst 33342 を含む PBS-PVA と 20 分間反応させて、核を染色した。PBS で 5 分間 3 回洗浄後、減光防止剤である Vectashield Mounting Medium を切片に滴下し、カバーガラスで封入した。落射型蛍光顕微鏡下で観察した。

第三節 結果

卵母細胞および着床前発生時期にある単為発生 2 倍体のピルビン酸カルボキシラーゼ (*PC*), ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (*PEPCK*), フルクトースビスホスファターゼ (*FBP*), およびグルコース-6 リン酸-ホスファターゼ (*G6P*) の mRNA は, 第二減数分裂中期 (MII 期) 卵母細胞, およびすべての発生段階の 2 倍体に検出された (Fig. 3-1)。また, 糖新生の律速酵素である *PEPCK* タンパク質も, MII 期の卵母細胞, およびすべての着床前発生段階の 2 倍体に発現していた (Fig. 3-2)。

Table 3-1. 実験でもちいたプライマーの配列

Genes		Sequence	GenBank accession number
<i>PEPCK</i>	Forward	TTGGCATCCACACCCCTT	XM_005673043
	Reverse	ACAGCTTGGCGCTGCTCT	
<i>PC</i>	Forward	AGATCGCCATCCGTGTGTT	NM_214349
	Reverse	TTGTTTTCTTGGCCACCTT	
<i>FBP</i>	Forward	AGGGCGCACTCCAACCTTAT	NM_213979
	Reverse	GGTTAGGGTGACGATATTGGT	
<i>G6P</i>	Forward	AGCAGAGCAATCAGTGCCAA	NM_001113445
	Reverse	AAAAGGCATTTCTGAGGTCC	
<i>UBC</i>	Forward	TTCGTGAAGACCTTGACTG	M18159
	Reverse	GGACTCCTTCTGGATGTTG	

UBC を PCR 反応のポジティブコントロールとして用いた。プライマー配列は Kuijk et al. (2007) を参考にした。

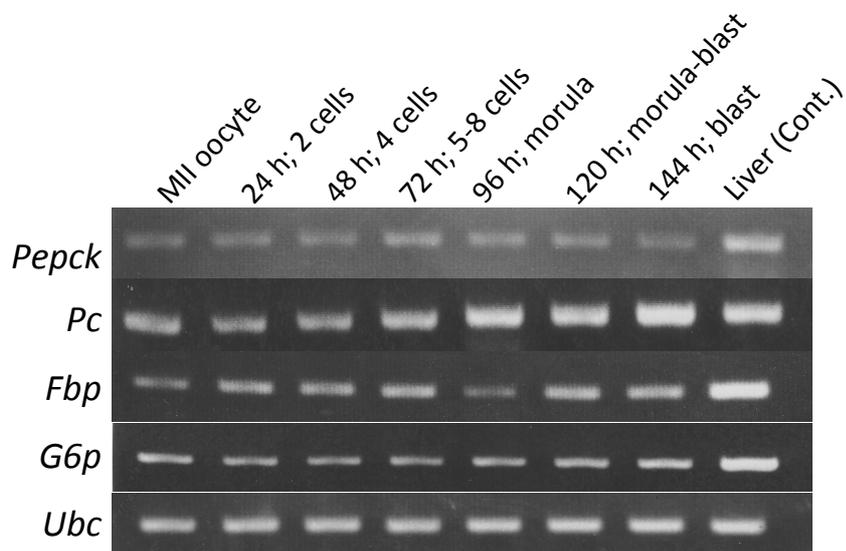


Fig. 3-1. PZM3で培養したブタ単為発生2倍体中での糖新生関連酵素 mRNA 発現の逆転写 PCR を用いた検出。*PEPCK*, *Phosphoenolpyruvate carboxykinase*; *PC*, *Pyruvate carboxylase*; *FBP*, *Fructose bisphosphatase*; *G6P*, *Glucose 6-phosphatase*。control として *UBC* (Kuijk et al., 2007) を使用した。blast; blastocyst。

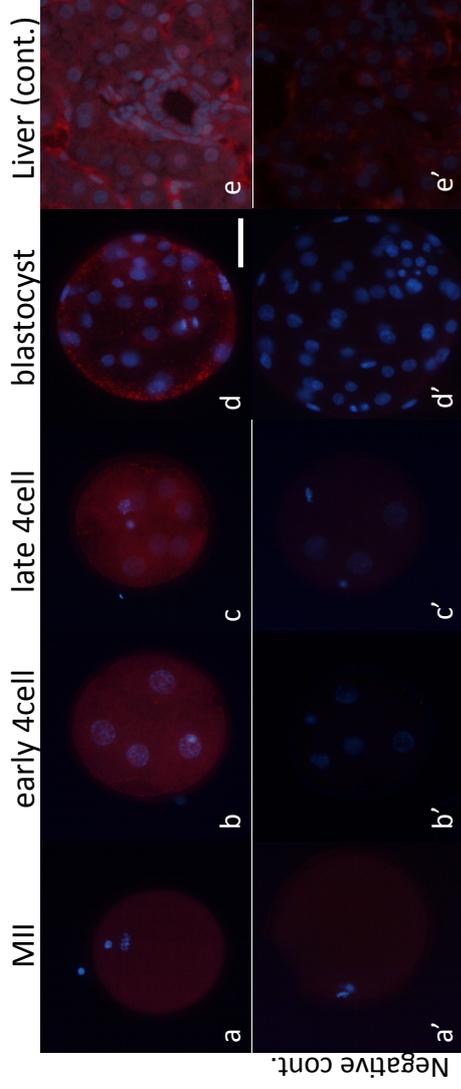


Fig. 3-2. 卵母細胞，ならびに着床前発生過程のブタ単為発生2倍体における PEPCK の発現。上段には，MII 期卵母細胞 (a)，早期 4 細胞期 (b)，後期 4 細胞期 (c)，胚盤胞期 (d) の 2 倍体，ならびに肝臓 (positive control (e))における PEPCK タンパク質の発現性を，下段には，二次抗体のみで処理したそれぞれの発生ステージ胚での negative control (a'-e')を示す。PEPCK は，全ての着床前発生ステージの 2 倍体の細胞質に観察された (赤)。全ての 2 倍体を Hoechst 33342 によって対比染色した (青)。Scale Bar = 50 μ m。

第四節 考察

着床前発生段階の哺乳類胚がグルコースを代謝していることについて、多くの報告がある (Brinster 1967; Brinster and Wales, 1968; Leese and Barton, 1984; Flood and Wiebold, 1988; Swain et al., 2002)。しかし、これらの報告はいずれも、Glu をエネルギー源としての観点から捉えていたために、Glu 無添加培地で培養できるブタ着床前胚でのグルコースの重要性についての詳細な考察はなされていない。本章では、Pyr·Lac のみをエネルギー源として含む PZM3 で培養したブタ着床前胚は、発生に必要な Glu を自ら作り出している可能性について検討した。特に、PZM3 に添加されている Pyr·Lac から、解糖系と逆の経路にあたる、糖新生によって Glu を作り出すことが予測されたので、糖新生に必要な 4 つの酵素の mRNA 発現および糖新生の律速酵素である PEPCK タンパク質の発現を、それぞれ RT-PCR および間接免疫蛍光染色法を用いて調べた。その結果、着床前のすべての発生段階において PZM3 中で培養された 2 倍体では糖新生関連酵素の mRNA が発現していることが明らかになった。また、RNA の発現が母性から胚性へ変化すると考えられる 4 細胞期の前後においても、途絶えることなく PEPCK を発現していることが明らかになった。これらの結果は、ブタ着床前胚が糖新生によって必要な Glu を自ら作り出す潜在能力を保有していることを示唆している。

ブタ胚は、着床前のすべての発生段階において Glu を代謝しており (Swain et al., 2002)、取り込んだ Glu の一部をペントースリン酸経路 (PPP) を介して代謝している (Flood and Wiebold, 1988)。PPP は核酸の合成に必要であり、初期卵割期胚では細胞の増殖のために重要であると考えられていることから、Glu を含まない培地で培養されたブタ着床前胚では、核酸合成の前駆体としての Glu を合成する必要があるのかもしれない。また、体内受精・体内発生胚では、体外生産胚よりも解糖系を介した Glu 代謝を活発に行っていることが知られており (Swain et al., 2002)、体内生産胚により近い環境を作るためには、適切な Glu の添加が体外発生に効果的かもしれない。しかし、第二章において示されたとおり、PZM3 への Glu 添加が初期卵割期ブタ胚の発生を改善することはなく、むしろ、抑制的に作用しており、糖新生関連酵素がこの時期にも発現している理由は不明である。

おそらく Glu が欠乏しても自ら補えるブタとは対照的に、マウスの着床前胚

は、一時的にでも Glu に接触する必要がある (Chatot et al., 1989, 1990; Pantaleon et al., 2008; Amarnath et al., 2011)。この違いは、マウスとブタの着床前胚では、糖新生能力が異なることを示唆している。しかし、これまでに着床前胚が糖新生を行う能力を持っているかどうかを検討した報告はなく、今後、さらに解明する必要がある。

第五節 引用文献

Amarnath D, Wakayama S, Zhu J, Moawad AR, Wakayama T, Campbell KH. The novel use of modified pig zygotic medium for the efficient culture of the preimplantation mouse embryos. *Theriogenology*. 2011; 76:1639-1646.

Behringer R, Gertsenstein M, Nagy KV, Nagy A. Critical components of preimplantation embryo culture in ‘Manipulating the mouse embryo’, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014; pp113-114.

Brinster RL, Wales RG. The uptake of hexoses by pre-implantation mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil*. 1968; 15:415-422.

Brinster RL. Carbon dioxide production from glucose by the preimplantation mouse embryo. *Exp Cell Res*. 1967; 47:271-277.

Chatot CL, Lewis JL, Torres I, Ziomek CA. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol Reprod*. 1990; 42:432-440.

Chatot CL, Lewis-Williams J, Torres I, Ziomek CA. One-minute exposure of 4-cell mouse embryos to glucose overcomes morula block in CZB medium. *Mol Reprod Dev*. 1994; 37:407-412.

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL and Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil*. 1989; 86: 679-688.

Flood MR, Wiebold JL. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *J Reprod Fertil*. 1988; 84:7-12.

Gardner DK, Leese HJ. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fertil*. 1990; 88:361-368.

Iritani A, Sato E, Nishikawa Y. Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine and uterine fluids in sows. *J Anim Sci*. 1974; 39:582-588.

Kuijk EW, du Puy L, van Tol HT, Haagsman HP, Colenbrander B, Roelen BA. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies in porcine oocytes and preimplantation embryos. *BMC Dev Biol*. 2007; 7:58.

La Bonnardiere C, Martinat-Botte F, Terqui M, Lefevre F, Zouari K, Martal J, Bazer FW. Production of two species of interferon by Large White and Meishan pig conceptuses during the peri-attachment period. *Reprod Fertil Dev*. 1991; 91:469-478.

Leese HJ, Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil.* 1984; 72:9-13.

Pantaleon M, Scott J, Kaye PL. Nutrient sensing by the early mouse embryo: hexosamine biosynthesis and glucose signaling during preimplantation development. *Biol Reprod.* 2008; 78:595-600.

Park Y, Hong J, Yong H, Lim J, Lee E. Effect of exogenous carbohydrates in a serum-free culture medium on the development of in vitro matured and fertilized porcine embryos. *Zygote.* 2005; 13:269-275.

Scott L, Whittingham DG. Influence of genetic background and media components on the development of mouse embryos in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1996; 43:336-346.

Swain JE, Bormann CL, Clark SG, Walters EM, Wheeler MB, Krisher RL. Use of energy substrates by various stage preimplantation pig embryos produced in vivo and in vitro. *Reproduction.* 2002; 123:253-260.

Wirtu G, Pope CE, Damiani P, Miller F, Dresser BL, Short CR, Godke RA, Bavister BD. Development of in-vitro-derived bovine embryos in protein-free media: effects of amino acids, glucose, pyruvate, lactate, phosphate and osmotic pressure. *Reprod Fertil Dev.* 2003; 15:439-449.

第四章

ブタ着床前胚における

O-結合型 N-アセチルグルコサミン修飾

第一節 緒言

グルコース(Glu) が哺乳動物の着床前発生に及ぼす影響について、数多くの研究が報告されている (Brinster, 1965; Biggers et al., 1967; Leese and Barton, 1984; Kane, 1987; Flood and Wiebold, 1988; Schini and Bavister, 1988; Chatot et al., 1989, 1990; Seshagiri and Bavister, 1989; Petters et al., 1990; Ludwig et al., 2001; Swain et al., 2002; Wirtu et al., 2003; Karja et al., 2004; Park et al., 2005; Wongsrikeao et al., 2006; Mito et al., 2012; Sakagami et al., 2014) が、そのほとんどの研究では、Glu の役割はエネルギー基質という観点から限定的に捉えられている。Glu は解糖系や TCA 回路を介して代謝されるエネルギー基質であるだけでなく、ペントースリン酸経路を介して、リボースの生産やタンパク質の修飾にも用いられる (Fig. 1-1)。ブタ着床前胚においても、Glu は全ての発生段階で消費され (Sturme y and Leese, 2003)、桑実胚形成以前の胚では、その一部がペントースリン酸経路を介して代謝されることが報告されている (Flood and Wiebold, 1988)。近年、マウス胚において、Glu がヘキソサミン生合成経路 (HBP) を介して代謝されることが明らかにされ、この Glu 代謝経路は、正常な胚盤胞形成に必要であることが示された (Pantaleon et al., 2008)。すなわち、マウスの着床前胚が、胚盤胞への発生にグルコースを必要とする (Chatot et al., 1994; Amarnath et al., 2011) 理由が、少なくとも一つ明らかになったと言える。これに対して、ブタ受精卵は、胚盤胞への発生に Glu を必要としない (Yoshioka et al., 2002)。このような着床前発生における Glu 要求性の違いは、HBP とタンパク質の O-GlcNAc 修飾のどちらか、あるいは両方の役割が、マウスとブタで異なっていることによる可能性がある。

HBP は、解糖系から枝分かれし、最終的にウリジン 2 リン酸 N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) に至る代謝経路である。すべての真核生物の細胞に HBP が備わっており、作り出された UDP-GlcNAc はタンパク質のセリン (Ser)、あるいはトレオニン (Thr) 残基に可逆的に付加される (Torres and Hart, 1984; Holt et al., 1987; Hanover et al., 1987)。動物細胞では、細胞内に取り込まれた Glu

の2~5%がHBPを介して代謝されると言われている (Marshall et al., 1991)。フルクトース-6-リン酸 (F6P) は解糖系の中間代謝物であると同時に、HBPの最初の代謝物でもある。F6Pはまずグルタミン-フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ (Glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, GFPT) によって代謝されるが、この段階はHBPの律速反応となっている (Fig. 1-4)。

O-GlcNAc修飾はタンパク質翻訳後修飾の一種である。O-GlcNAc修飾とリン酸化は、しばしばSer/Thr残基上で競合し、タンパク質の機能を調整する (Hardivillé et al., 2010; Hanover et al., 2012; Hart, 2014)。O-GlcNAcはO-GlcNAc transferase (OGT) によって標的のタンパク質に付加され、O-GlcNAcase (OGA) によって除去される。このO-GlcNAc修飾タンパク質における、GlcNAcの付加および除去はO-GlcNAc cyclingと呼ばれている。これまでに、RNAポリメラーゼ II (Pol II; Comer and Hart, 2001; Ranuncolo et al., 2012), 転写因子 (Jang et al., 2012), ヒストン (Sakabe et al., 2010; Fujiki et al., 2011; Fong et al., 2012) など、多くのタンパク質がO-GlcNAc修飾を受けることが報告されている。また、これらの報告は、O-GlcNAc cyclingが遺伝子発現、細胞内シグナリングおよび分化などを制御していることを示唆している。最近、Pol IIのlargest subunitのC-terminal domain (CTD) におけるO-GlcNAc修飾が、Pol IIのDNAプロモーター領域へのリクルートに関与し、さらにCTDのリン酸化がmRNA転写の開始に必要であることが示され (Ranuncolo et al., 2012), CTDにおけるO-GlcNAc修飾とリン酸化のターンオーバーが、mRNA発現の制御を介して胚性遺伝子の活性化 (ZGA) の制御に関わることが示唆された。

ブタでは、着床前胚発生におけるHBPおよびO-GlcNAc修飾に関する報告は存在しない。本章では、ブタ着床前胚におけるHBPおよびO-GlcNAc修飾の存在と、着床前発生における機能について調べた。

第二節 材料および方法

卵母細胞の採取および活性化

卵母細胞の採取および単為発生 2 倍体の作出は、第二章と同様に行った。

2 倍体の培養および発生

サイトカラシン B 処理した 2 倍体を PZM3 で 3 度洗浄した。5% CO₂, 38.5°C の CO₂ インキュベータ内で、8~12 個の 2 倍体を、ミネラルオイル (Wako) を重層した 10 μ l の PZM3 中で電気刺激 144 時間後まで培養した。2 倍体を 24 時間ごとに観察し、その発生段階を形態的に分類した (Kure-Bayashi et al., 1996)。2 倍体は活性化 24 時間後に 2 細胞期、48 時間後に早期 4 細胞期、72 時間後に後期 4 細胞期、96 時間後に桑実胚期、120 時間後に桑実胚期あるいは胚盤胞期、144 時間後に胚盤胞期へと発生していた。すべての実験において、培地を培養開始 2 時間以上前から CO₂ インキュベータ内に静置し、気相および温度を平衡させた。

卵母細胞および着床前発生期にある単為発生 2 倍体におけるグルタミン-フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ (GFPT), O-GlcNAc transferase (OGT), O-GlcNAcase (OGA) の mRNA 発現解析

卵母細胞あるいは各発生段階にある 2 倍体中での *GFPT*, *OGT*, *OGA* の mRNA 発現を、逆転写 (RT) PCR を用いて検出した。*GFPT* は HBP の律速酵素、*OGT* および *OGA* はそれぞれ、タンパク質に GlcNAc を修飾ならびに脱修飾する酵素であり、使用した RT-PCR 用のプライマー配列を Table 4-1 に示す。動物細胞において、O-GlcNAc 修飾に関与する酵素は *OGT* と *OGA* の 2 つであることが知られている (Hanover et al., 2012; Hart, 2014)。

RT-PCR および増幅産物の検出を第二章と同様の方法で行った。

2 細胞期から胚盤胞期までの 2 倍体における O-GlcNAcase (OGA) タンパク質の間接免疫蛍光染色

電気刺激 24 時間後に 2 細胞期、48 時間後に早期 4 細胞期、72 時間後に後期 4 細胞期、96 時間後に桑実胚期、120 時間後に桑実胚期あるいは胚盤胞期、144 時間後に胚盤胞期へ発生した 2 倍体を回収した。その後、2 倍体を 0.2% (v/v)

Triton X-100, 4% (w/v) パラフォルムアルデヒドを含む PBS-PVA (PFA) 中で、室温下で 25 分間、固定および透過処理を行った。固定した 2 倍体を PBS-PVA で 2 度洗浄後、1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS-PVA (1% BPP) 中で、4°C で使用するまで保管した。免疫染色は以下の通り行った。2 倍体を、rabbit anti-human OGA antibody (1: 100; Proteintech Group, Inc., Chicago, IL, USA) を含む BPP に 4°C で一晩、浸漬した。その後 2 倍体を PBS-PVA で 3 度洗浄し、Alexa Fluor 568 anti-rabbit IgG antibody (Life Technologies) を含む 1% BPP 中に入れて、室温で 1 時間処理した。PBS-PVA で洗浄後、4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含む Pro-Long gold (Life Technologies) とともにスライドガラス上に 2 倍体をホルマウントし、落射型蛍光顕微鏡 (BX53-FL; Olympus) 下で観察した。

卵母細胞および着床前発生過程の 2 倍体における O-GlcNAc 修飾タンパク質の間接免疫蛍光染色

第二減数分裂中期 (MII 期) にある卵母細胞および 2 細胞期から胚盤胞期までの 2 倍体中の O-GlcNAc 修飾タンパク質を 2 種類の抗体を用いた間接免疫蛍光染色によって検出した。CTD 110.6 (Covance, Princeton, NJ, USA) と RL2 (Novus Biological, LLC, Littleton, CO, USA) は、それぞれ serine-O-GlcNAc を含む合成タンパク質と、細胞質内および核質内の O-結合型の糖タンパク質に対する抗体である。CTD110.6 を用いて検出を行う場合、卵母細胞と 2 倍体を 4% PFA を含む PBS-PVA 中で、4°C で一晩処理し、その後 0.2% Triton X-100 を含む PBS-PVA で 20 分間透過処理を行った。RL2 を用いて検出する場合は、OGA の検出と同様の方法で固定および透過処理を行った。固定された卵母細胞および 2 倍体を PBS-PVA で 2 度洗浄後、BPP に浸漬して 4°C で使用まで保存した。免疫染色は OGA の検出と同様に、CTD110.6 (1:100) または RL2 (1:100) を一次抗体として、Alexa Fluor 546 標識 anti-mouse IgM 抗体と Alexa Fluor 488 標識 anti-mouse IgG 抗体 (Life Technologies) を、それぞれ二次抗体として用いた。CTD 110.6 を使用する場合の negative control には、10 mM の GlcNAc (Sigma-Aldrich) を一次抗体とともに添加した。RL2 では二次抗体のみで処理したものを negative control とした。スライド標本の作製および観察は、OGA の検出と同様に行った。

OGT 阻害剤 (BADGP) , OGA 阻害剤 (PUGNAc) および GFPT 阻害剤 (Azaserine) 処理

ブタ着床前発生における O-GlcNAc cycling の役割を調べるために、単為発生 2 倍体を BADGP あるいは PUGNAc によって処理した。OGT 阻害の影響を調べるために、サイトカラシン B 処理した 2 倍体を、0 (control), 1, 2, 4 mM の BADGP, ならびに 4 mM の BADGP 添加区と等量の DMSO を添加した PZM3 (vehicle control) に移し、電気刺激 144 時間後まで培養した。2 倍体を 24 時間毎に顕微鏡下で観察し、発生段階を前述の通り分類、記録した。ブタ着床前発生における OGA 阻害の影響も同様に調べた。OGA 阻害の影響は、OGA 阻害剤である PUGNAc を 0 (control), 75, 150, 300 μ M, ならびに 300 μ M PUGNAc 添加区と等量の DMSO を含む実験区 (vehicle control) を設定した。2 倍体の発生と観察を前述の通り行った。

300 μ M PUGNAc の添加によって胚が 4 細胞期で発生停止したことから、4 細胞期以降の OGA 活性が 4 細胞期を越える発生に必要であるかどうかを調べた。2 倍体を 300 μ M の PUGNAc を添加した PZM3 で活性化 48 時間後まで培養した。その後、48 時間の時点で 4 細胞期の 2 倍体を回収し、0 (control) ならびに 300 μ M PUGNAc を添加した PZM3 の 2 区に分けて電気刺激の 144 時間後まで培養した。2 倍体の発生を前述の通り、24 時間毎に観察した。

また、マウスで報告されている Azaserine による HBP 阻害 (Pantaleon et al., 2008) がブタ着床前発生に及ぼす影響を調べるために、0 (control), 2.85, 5.70, 11.4 μ M の Azaserine を添加した実験区を設定した。2 倍体の発生と観察を前述の通り行った。

RNA ポリメラーゼ II (Pol II) ならびにリン酸化型 Pol II (pPol II) の間接蛍光免疫染色

Pol II のリン酸化は、mRNA 転写に重要であり (Ranuncolo et al., 2012), マウス胚では pPol II が mRNA 転写開始に先立って検出されていることから (Tokoro et al., 2010), 非リン酸化型, ならびにリン酸化型 Pol II の発現を 4 細胞期のブタ単為発生 2 倍体を用いて調べた。

免疫染色には、一次抗体として抗 Pol II モノクローナル抗体 (8WG16; Covance), および抗 pPol II モノクローナル抗体 (H14; Covance) を使用した。これらの抗体の免疫グロブリンのサブクラスは、それぞれ、IgG と IgM であった

ので、はじめに、これらの一次抗体と、二次抗体、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体ならびに Alexa Fluor 546 標識ヤギ抗マウス IgM 抗体間の交差反応を調べた。PZM3 中で 144 時間まで培養した胚盤胞期 2 倍体を、4°C の 4% PFA を含む PBS-PVA 中で一晩固定後、0.2% の Triton-X を含む PBS-PVA で 20 分間透過処理した。次に、PBS-PVA で 2 度洗浄し、BPP 中に 4°C で使うまで保存した。胚を BPP 中で 8WG16 (1:100) および H14 (1:100) による一次抗体処理した後、Alexa Fluor 488 標識された抗マウス IgG 抗体および Alexa Fluor 564 標識された抗マウス IgM 抗体と室温で 1 時間、反応させた。胚をスライドガラス上に前述の方法と同様にマウントし、落射式蛍光顕微鏡を用いて観察した。

以上の検討により交差性が認められなかったことから、0 あるいは 300 μ M PUGNAc を添加した PZM3 中で電気刺激 48 時間後まで培養し、4 細胞期に発生した 2 倍体を回収し、前述の通り、間接免疫蛍光法に供した。免疫染色後、前述のように 2 倍体をホールマウントし、落射型蛍光顕微鏡下、あるいは共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000; Olympus) 下で観察した。

OGA 阻害が単為発生 2 倍体の RNA 合成に及ぼす影響

2 倍体の RNA 合成に及ぼす PUGNAc 処理の影響を明らかにするために、0 (control), あるいは 300 μ M PUGNAc を含む PZM3 中で培養した 2 倍体において、新たに合成された RNA を Click-iT RNA Alexa Fluor 594 Imaging Kit (Life Technologies) を用いて可視化した。メーカーの説明書に従って新規合成 RNA を検出した。Control および PUGNAc 存在下で単為発生 2 倍体を電気刺激 96 時間後まで培養後、10 μ l の 20 mM 5-ethynyl uridine (EU) を 10 μ l の培地に添加し、1 時間培養した。ついで、2 倍体を、室温の 4% PFA および 0.2% Triton X-100 を含む PBS-PVA に 20 分浸漬し、固定および透過処理した。2 倍体を PBS-PVA で 2 回洗浄後、43 μ l reaction buffer, 5 μ l reaction buffer additive, 2 μ l CuSO₄ solution, および 0.2 μ l Alexa Fluor 594 標識 azide からなる reaction cocktail に移した。2 倍体に取り込まれた EU を Alexa Fluor 594 標識 azide と 37.0°C で 1 時間反応させた後、付属の rinse buffer で 2 倍体を洗浄し、さらに 3 度 PBS-PVA で洗浄した。染色した 2 倍体を前述の通りホールマウントし、落射式蛍光顕微鏡下で観察した。

OGA 阻害が単為発生 2 倍体における Claudin-4 の発現性に及ぼす影響

PUGNAc 処理によって、2 倍体の RNA 合成、Pol II のリン酸化、ならびに 4 細胞以降への発生に影響が認められたことから、タイトジャンクションの構成タンパク質の一つである Claudin-4 (Moriwaki et al., 2007) の発現性を胚盤胞形成開始時期の胚における新規タンパク質合成の指標として、2 倍体の PUGNAc 処理の影響を調べた。0, あるいは 300 μ M PUGNAc 存在下で、電気刺激 72 時間～120 時間後、退行の兆候を示していない 2 倍体を回収し、間接蛍光免疫染色法に供した。一次抗体としてマウス抗 Claudin-4 抗体 (1:100, Life Technologies), 二次抗体に Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体 (1:500, Life Tehnologies) を用いた。固定および染色法は OGA の検出で記述した方法に従って行った。

統計解析

各実験における胚の発生率を試行毎に arcsine 変換し、その後、変換された値を one-way ANOVA を用いて解析した。ANOVA によって有意差があると認められたものについて Tukey-Kramer 法を用いて、実験区間の差を比較した。

第三節 結果

GFPT, *OGT*, *OGA* の mRNA 発現の RT-PCR による検出結果を Fig. 4-1 に示す。*GFPT* と *OGT* は全ての着床前発生段階において発現していた。一方, *OGA* は 4 細胞期では発現していなかったが, それ以外の全ての発生段階で発現していた。

次に, MII 期卵母細胞および 2 細胞期から胚盤胞期 2 倍体における, O-GlcNAc 修飾タンパク質の有無を調べるために, O-GlcNAc 修飾タンパク質を認識する 2 種類の抗体, RL2 および CTD110.6 を用いて分析した (Fig. 4-2 および Fig. 4-3)。二つの抗体による染色パターンは類似していた。O-GlcNAc 修飾タンパク質は, MII 期卵母細胞では細胞質中に存在し, 桑実胚期よりも前の 2 倍体では, 細胞質と核の両方に, ほぼ同じレベルで存在した。しかし, 桑実胚や胚盤胞期では細胞質よりも核に強く局在するようになった (Fig. 4-2, e2 および f2, Fig. 4-3, f2)。

上記の結果はいずれも, ブタ卵母細胞および着床前発生過程にある 2 倍体には O-GlcNAc 修飾が存在することを示していたので, 次の実験では *OGT* 阻害剤である BADGP, および *OGA* 阻害剤である PUGNAc の存在下で 2 倍体を培養した。1.0~4.0 mM の BADGP を添加した PZM3 中で 2 倍体を培養しても, 各実験区間の正常発生胚の割合および発生速度に有意差は見られなかった (Fig. 4-4)。同様に O-GlcNAc 修飾の基質である UDP-GlcNAc を作る HBP を Azaserine によって阻害しても, 2 倍体の発生に有意な影響はなかった (Fig. 4-5)。また, サイトカラシン B 処理の後, PUGNAc を添加した培地で 2 倍体を培養した場合, 活性化 72 時間後までは各実験区間に有意差は認められなかった (Fig. 4-6A)。しかし, 300 μ M PUGNAc 添加区において, 電気刺激 96 時間後における桑実胚の割合, および 120, 144 時間後における桑実胚と胚盤胞の割合が, 他の実験区より有意に低く ($P < 0.05$, Fig. 4-6A), 正常に発生した 2 倍体の割合は, 300 μ M PUGNAc 添加区においてその他の実験区よりも有意に低かった ($P < 0.05$, Fig. 4-6A)。電気刺激 144 時間培養後の vehicle control, および 300 μ M PUGNAc 添加区における, 典型的な 2 倍体の状態を Fig. 4-6B に示す。PUGNAc 添加区における 2 倍体が 4 細胞付近で発生を停止しているのに対して, vehicle control では 10 個中 7 個 (70%) の 2 倍体が拡張胚盤胞期へと発生している。

300 μ M PUGNAc 処理した 2 倍体が, 4 細胞期で発生を停止したことから, 電気刺激 48 時間後の前後における *OGA* 阻害処理の, どちらが 2 倍体の発生に強

く影響するのかを調べた。電気刺激 48 時間後まで 300 μ M PUGNAc 添加培地で 2 倍体を培養し、4 細胞へと発生した 2 倍体を選んだ。この時の 4 細胞期 2 倍体の割合は、 $70.0 \pm 4.2\%$ (average \pm S.E.) であった。ついで、PZM3 (PUGNAc 処理時間は 4~48 時間 ; PUG48) あるいは 300 μ M PUGNAc 添加 PZM3 (PUGNAc 処理時間は 4~144 時間 ; PUG144) で、2 倍体を電気刺激 144 時間後まで培養した。96 時間後の桑実胚の割合は、PUG144 区の方が PUG48 区より有意に低くなり (Fig. 4-7, $P < 0.05$)、PUG144 区では、ほとんどの 2 倍体が 4 細胞期で発生を停止した。この割合は、120 および 144 時間後における胚盤胞形成率にも反映されていた (Fig. 4-7, $P < 0.05$)。

OGA の阻害が、2 倍体の 4 細胞期以降への発生を抑制したことから、次に着床前の 2 倍体における OGA タンパク質の発現を、間接免疫蛍光染色法を用いて調べた。2 細胞期から胚盤胞期まで、全ての発生段階において OGA は検出された (Fig. 4-8)。300 μ M PUGNAc 処理が Pol II のリン酸化に対する影響を確かめる前に、一次抗体 (8WG16 および H14) と二次抗体 (Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG および Alexa Fluor 564 標識抗マウス IgM 抗体) との間の交差性を確認した (Fig. 4-9A)。8WG16 は Alexa Fluor 564 標識抗 IgM 抗体とは反応せず (Fig. 4-9A, a3)、Alexa Fluor 488 標識抗 IgG 抗体とは反応した (Fig. 4-9A, a2)。一方、H14 は Alexa Fluor 488 標識抗 IgG 抗体とは反応せず (Fig. 4-9A, b2)、Alexa Fluor 564 標識抗 IgM 抗体と反応した (Fig. 4-9A, b3)。Pol II は全ての胚盤胞の核に検出されたが (Fig. 4-9A, a2)、pPol II は、胚盤胞の一部の核にしか検出されなかった (Fig. 4-9A, b3)。

Fig. 4-9B は、300 μ M PUGNAc 存在下で電気刺激 48 時間後まで培養した胚の、8WG16 および H14 による二重免疫染色の結果を示している。ブタ着床前胚では RNA 転写が、4 細胞期に起こると考えられている (Jarrel et al., 1991) ことから、Pol II のリン酸化の状態を活性化 48 時間後に調べた。Pol II は、PUGNAc 処理の有無に関わらず、核に観察された (Fig. 4-9B, a2 および b2)。一方、pPol II は、control 区の 2 倍体の核にのみ観察され (Fig. 4-9B, a3 および a4)、PUGNAc 処理された 2 倍体では観察されなかった (Fig. 4-9B, b3 および b4)。

次に、PUGNAc 処理が、2 倍体における RNA 合成に及ぼす影響を調べるために、コンパクションが始まる電気刺激 96 時間後に、2 倍体に EU を取り込ませた。PUGNAc 処理の有無に関わらず、桑実胚へと発生した 2 倍体の核には EU が検出された (Fig. 4-10, a2 および c2)。しかし、PUGNAc 処理によってコンパ

クシオンを起こさなかった大半の2倍体にEUは検出されなかった (Fig. 4-10, b2)。EUのシグナルはPUGNAc処理の有無に関わらず、96時間よりも前の2倍体では検出できなかった。

PUGNAc処理にも関わらず、桑実胚期の2倍体ではRNA合成が検出されたので、その後のタンパク質の発現性を調べるために、この時期に細胞境界に発現するタイトジャンクション構成タンパク質の一つ、であるClaudin-4の発現を調べた。電気刺激120時間後のcontrol区で、胚盤胞の細胞境界面にClaudin-4は観察された (Fig. 4-11, a)。PUGNAc処理にも関わらず、120時間後に桑実胚を形成した2倍体では、少なくとも一部の細胞境界領域にClaudin-4の発現が認められたが (Fig. 4-11, c)、コンパクションを起こさなかった2倍体では、細胞境界面での発現は全く検出されなかった (Fig. 4-11, d)。このような局在パターンは、電気刺激72時間後のcontrol区で5細胞に達した正常発生胚においても観察された (Fig. 4-11, b)。

Table 4-1. 実験でもちいたプライマーの配列

Genes		Sequence	GenBank accession number
<i>GFPT</i>	Forward	ACTCGCTGTTTCCTGTGCC	XM_005662490
	Reverse	TCCAGTGCCTTAACTTTTCCC	
<i>OGT</i>	Forward	AGCGGGACTCAATTACCCTTT	NM_001039748
	Reverse	ATTGTCTGGCTCTTGTCTCCA	
<i>OGA</i>	Forward	AAAAGCATGATGGCTTGCCT	NM_012215
	Reverse	CCACCCACCAGGTGAAGTTAA	
<i>UBC</i>	Forward	TTCGTGAAGACCTTGACTG	M18159
	Reverse	GGA CTCCTTCTGGATGTTG	

UBC を PCR 反応のポジティブコントロールとして用いた。プライマー配列は Kujik et al. (2007) を参考にした。

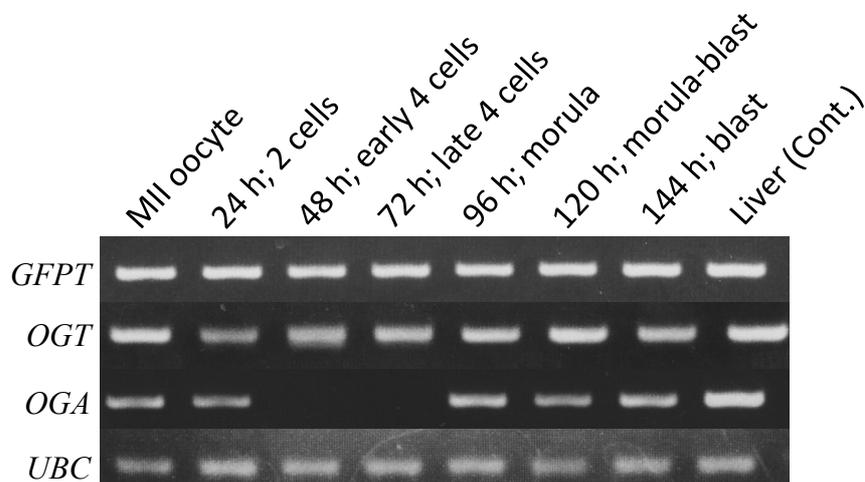


Fig. 4-1. 着床前発生過程のブタ単為発生 2 倍体における HBP 代謝律速酵素ならびに O-GlcNAc 修飾関連酵素の mRNA 発現の逆転写 PCR による検出。HBP 律速反応酵素 *Glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase* (GFPT), *O-GlcNAc transferase* (OGT), および *O-GlcNAcase* (OGA) の発現性を、成熟卵母細胞 (MII), ならびに電気刺激 24 時間, 48 時間, 72 時間, 96 時間, 120 時間および 144 時間後に回収した, それぞれ 2 細胞期 (2 cells), 早期 4 細胞期 (early 4 cells), 後期 4 細胞期 (late 4 cells), 桑実胚期 (morula), 桑実胚期と胚盤胞期 (morula-blast), ならびに胚盤胞期 (blast) の単為発生 2 倍体で調べた。

発現の positive control としてブタの肝臓 (Liv) を使用し, 正常に PCR が行われていることを示すために *UBC* (Kuijk et al., 2007) を用いた。

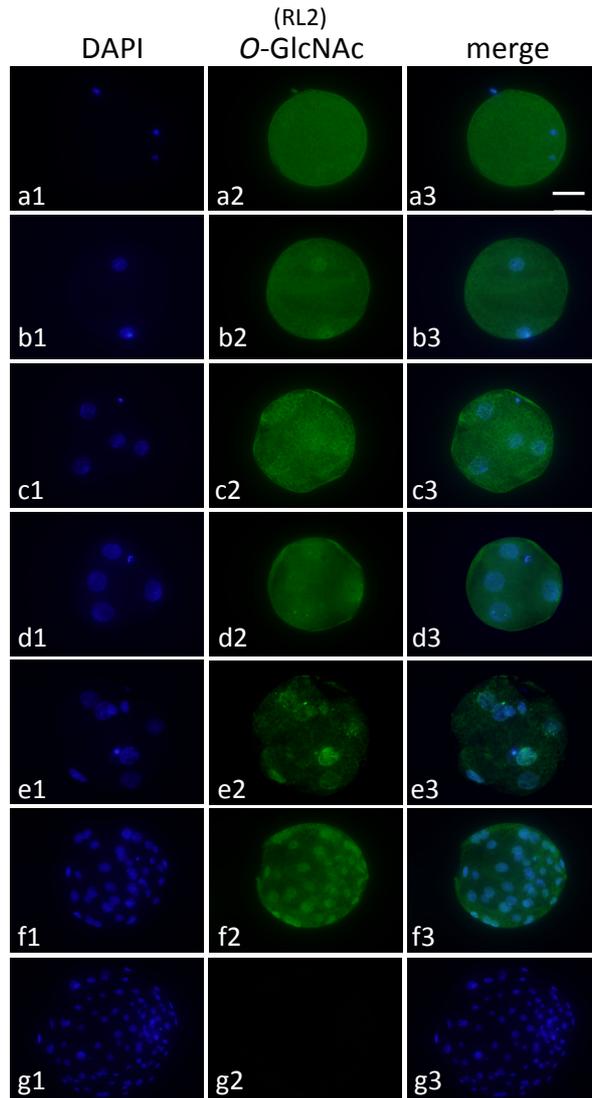


Fig. 4-2. 着床前発生過程のブタ単為発生2倍体におけるO-GlcNAc修飾タンパク質の局在 (RL2)。成熟卵母細胞 (a1-a3), ならびに電気刺激24時間, 48時間, 72時間, 96時間, および120時間後に得られた, それぞれ2細胞期 (b1-b3), 早期4細胞期 (c1-c3), 後期4細胞期 (d1-d3), 桑実胚期 (e1-e3), 胚盤胞期 (f1-f3) の単為発生2倍体におけるO-GlcNAc修飾タンパク質の局在性を, 抗O-GlcNAc修飾タンパク質抗体, RL2 およびAlexa Fluor 488 標識二次抗体(緑)を使った間接免疫蛍光法で調べた。negative controlとして, 胚盤胞期の2倍体を二次抗体のみで処理した (g1-g3)。2倍体をすべてDAPIによって対比染色した (青)。Scale Bar = 50 μ m。

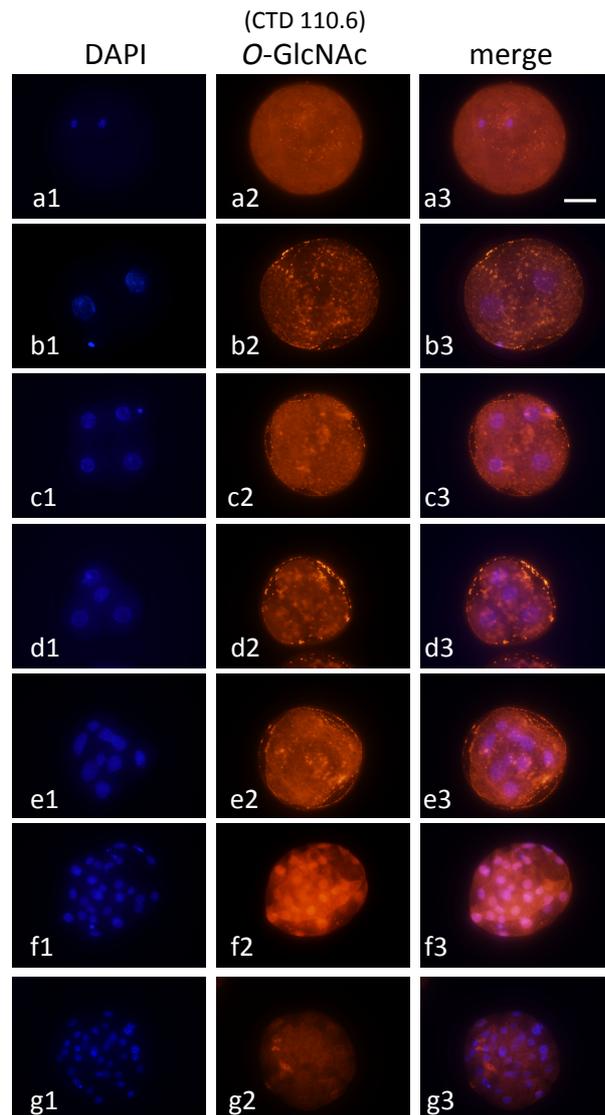


Fig. 4-3. 着床前発生過程のブタ単為発生 2 倍体における O-GlcNAc 修飾タンパク質の局在性 (CTD110.6)。成熟卵母細胞 (a1-a3), ならびに電気刺激 24 時間, 48 時間, 72 時間, 96 時間および 120 時間後に得られた, それぞれ 2 細胞期 (b1-b3), 早期 4 細胞期 (c1-c3), 後期 4 細胞期 (d1-d3), 桑実胚期 (e1-e3), 胚盤胞期 (f1-f3) の単為発生 2 倍体における O-GlcNAc 修飾タンパク質の局在性を抗 O-GlcNAc 修飾タンパク質抗体, CTD110.6 および Alexa Fluor 564 標識次抗体(赤)を使った間接免疫蛍光法で調べた。negative control として胚盤胞期 2 倍体を二次抗体のみで処理した (g1-g3)。2 倍体をすべて DAPI によって対比染色した (青)。Scale Bar = 50 μ m。

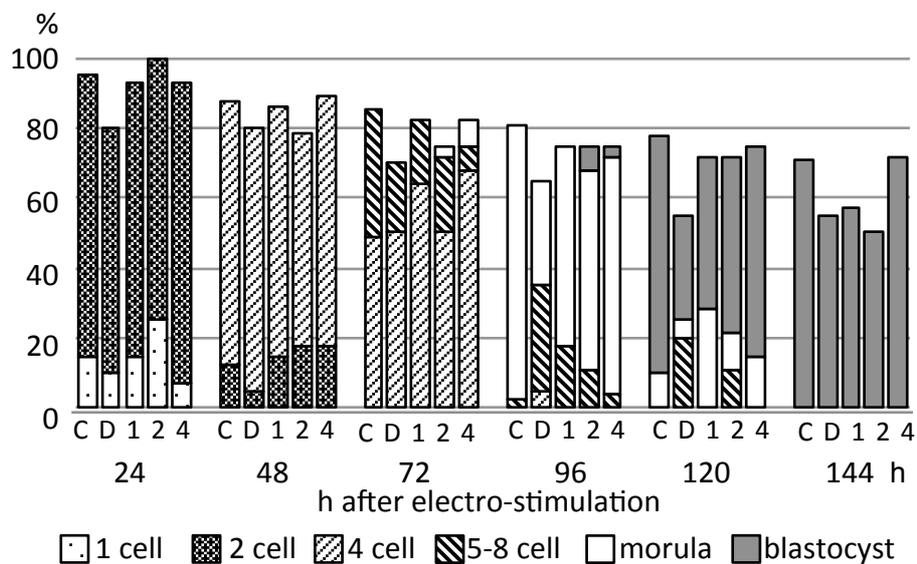


Fig. 4-4. BADGP の添加がブタ単為発生 2 倍体の着床前発生に及ぼす影響。2 倍体を 0 (C, control; D, DMSO, vehicle control), 1.0, 2.0, および 4.0 mM の BADGP を添加した PZM3 で, CB 処理後から電気刺激 144 時間後まで培養した。各実験区で少なくとも 3 回以上実験を行い, それぞれの実験区に用いた 2 倍体の数は, control 区, vehicle control 区, 1.0, 2.0, 4.0 mM BADGP 添加区において 48, 28, 28, 28 および 27 個であった。すべての観察時間において, 最も優勢な発生段階および正常発生している 2 倍体の割合に, 実験区間の有意差はなかった ($P < 0.05$)。

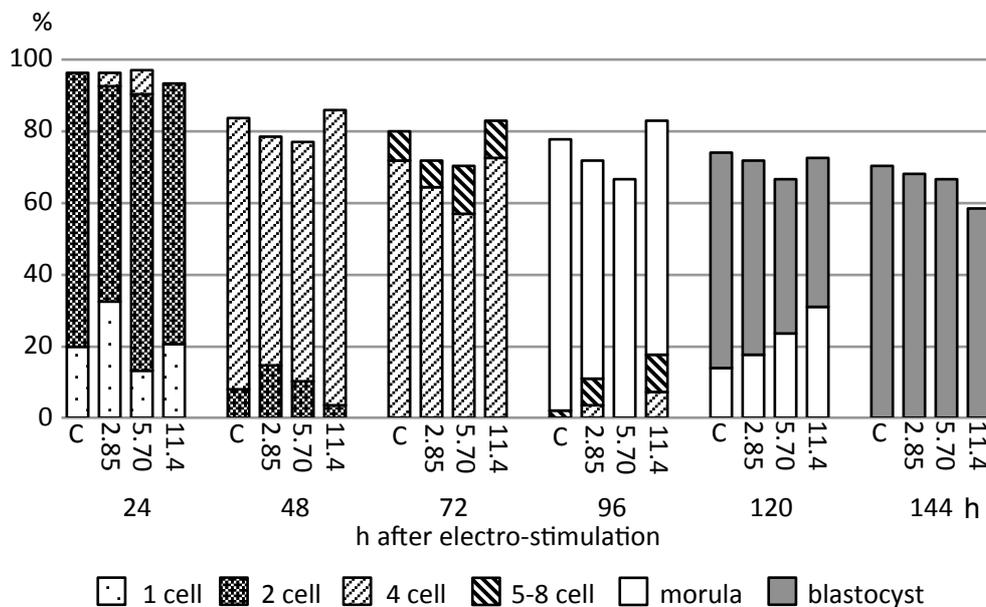


Fig. 4-5. Azaserine の添加がブタ単為発生 2 倍体の着床前発生に及ぼす影響。2 倍体を 0 (C, control), 2.85, 5.70, および 11.4 μM の Azaserine を添加した PZM3 で、CB 処理後から電気刺激 144 時間後まで培養した。各実験区で少なくとも 3 回以上実験を行い、それぞれの実験区に用いた 2 倍体の数は、control 区と 2.85, 5.70, および 11.4 μM Azaserine 添加区において 50, 28, 30 および 29 個であった。すべての観察時間において、正常発生している 2 倍体の割合、正常発生に含まれる各発生段階に実験区間の有意差はなかった ($P < 0.05$)。

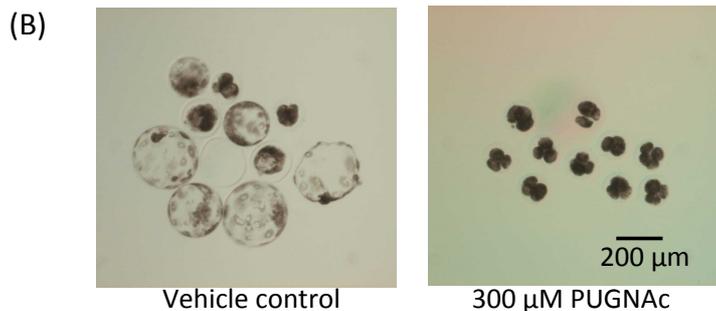
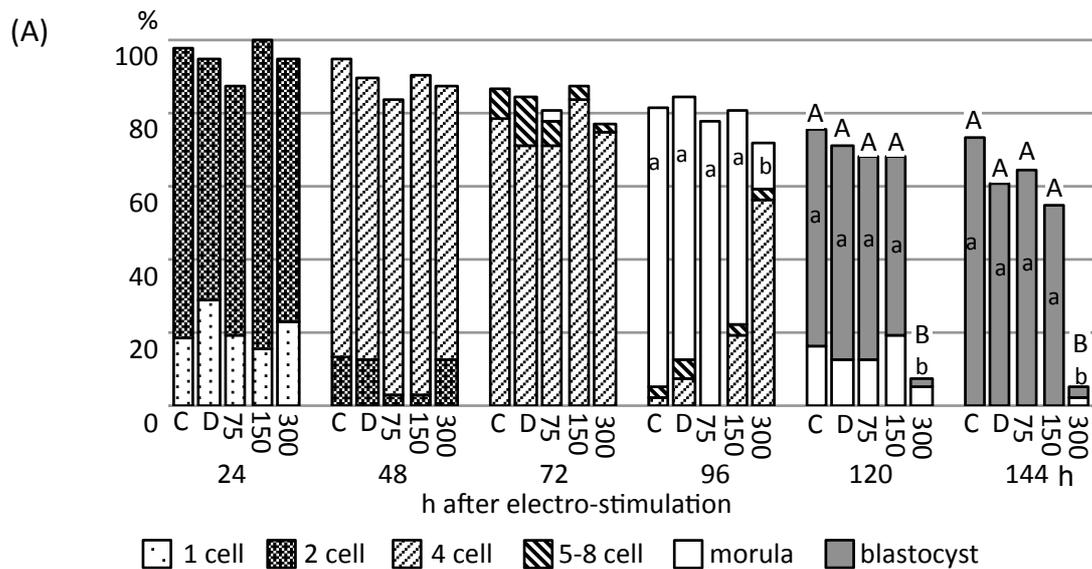


Fig. 4-6. PUGNac の添加がブタ単為発生 2 倍体の着床前発生に及ぼす影響。2 倍体を 0 (C, control; D, DMSO, vehicle control), 75, 150, および 300 μ M の PUGNac を添加した PZM3 で, CB 処理後から電気刺激 144 時間後まで培養した。各実験区で少なくとも 3 回以上実験を行い, それぞれの実験区に用いた 2 倍体の数は, control 区, vehicle control 区, 75, 150 および 300 μ M PUGNac 添加区において 37, 38, 31, 31 および 39 個であった。(A) それぞれの観察時間における正常発生している 2 倍体の割合 ($P < 0.05$)。小文字の a, b は各実験区間において, 各観察時間における最も進んだ発生ステージにある 2 倍体の割合に有意差があることを示している ($P < 0.05$)。大文字の A, B は, それぞれの実験区間において, 各観察時間に正常発生 2 倍体の割合に有意差があることを示す ($P < 0.05$)。(B) vehicle control 区および 300 μ M PUGNac 添加区における, 電気刺激 144 時間後における 2 倍体の発生状況。Scale Bar = 200 μ m。

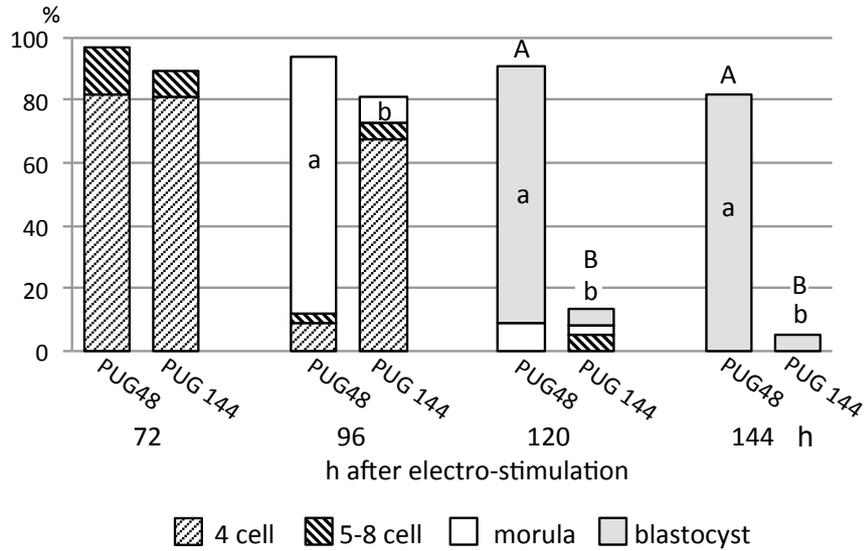


Fig. 4-7. 活性化 48 時間以降の PUGNAc の添加がブタ単為発生 2 倍体の着床前発生に及ぼす影響。2 倍体を CB 処理後から活性化 48 時間後まで 300 μ M の PUGNAc を添加した PZM3 で培養し、4 細胞期へと発生した 2 倍体を選別後、0 (PUG48) および 300 μ M の PUGNAc を添加した PZM3 (PUG144) で、電気刺激 144 時間後まで培養した。各実験区で少なくとも 3 回以上実験を行い、それぞれの実験区に用いた 2 倍体の数は、PUG48 区および PUG144 区において 33 および 37 個であった。電気刺激 96 時間後における桑実胚の割合、120 時間および 144 時間後における、胚盤胞と正常発生段階にある 2 倍体の割合が、PUG144 において、PUG48 より有意に低かった ($P < 0.05$)。

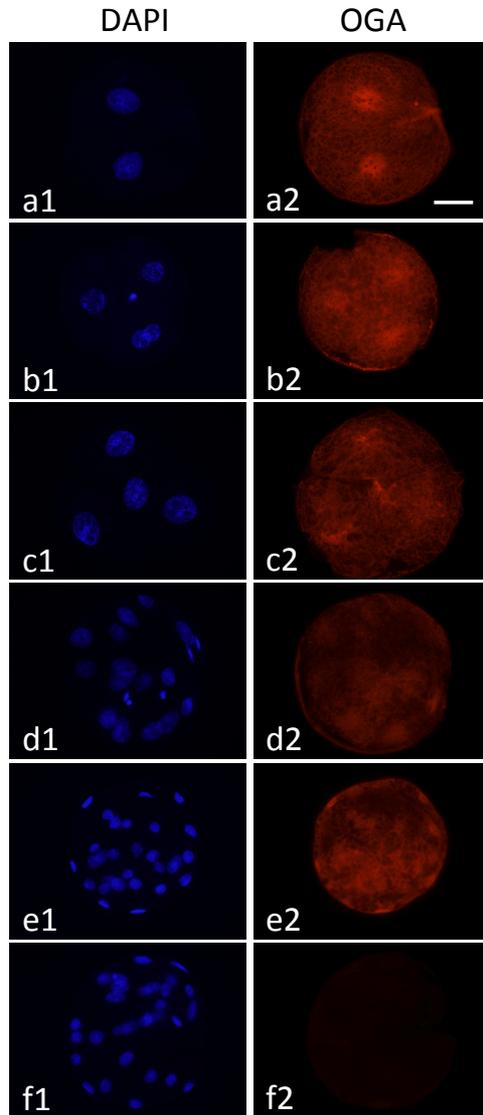


Fig. 4-8. 着床前発生段階の2倍体における OGA タンパク質の局在。電気刺激 24 時間, 48 時間, 72 時間, 96 時間および 120 時間後に得られた, それぞれ 2 細胞期 (a2), 早期 4 細胞期 (b2), 後期 4 細胞期 (c2), 桑実胚期 (d2), 胚盤胞期 (e2) にある単為発生 2 倍体における OGA タンパク質の局在性を, 抗 OGA 抗体, および Alexa Fluor 564 標識二次抗体(赤)を使った間接免疫蛍光法で調べた。negative control として胚盤胞期 2 倍体を二次抗体のみで処理を行った (f2)。2 倍体をすべて DAPI によって対比染色した (a1-f1, 青)。Scale Bar = 50 μ m。

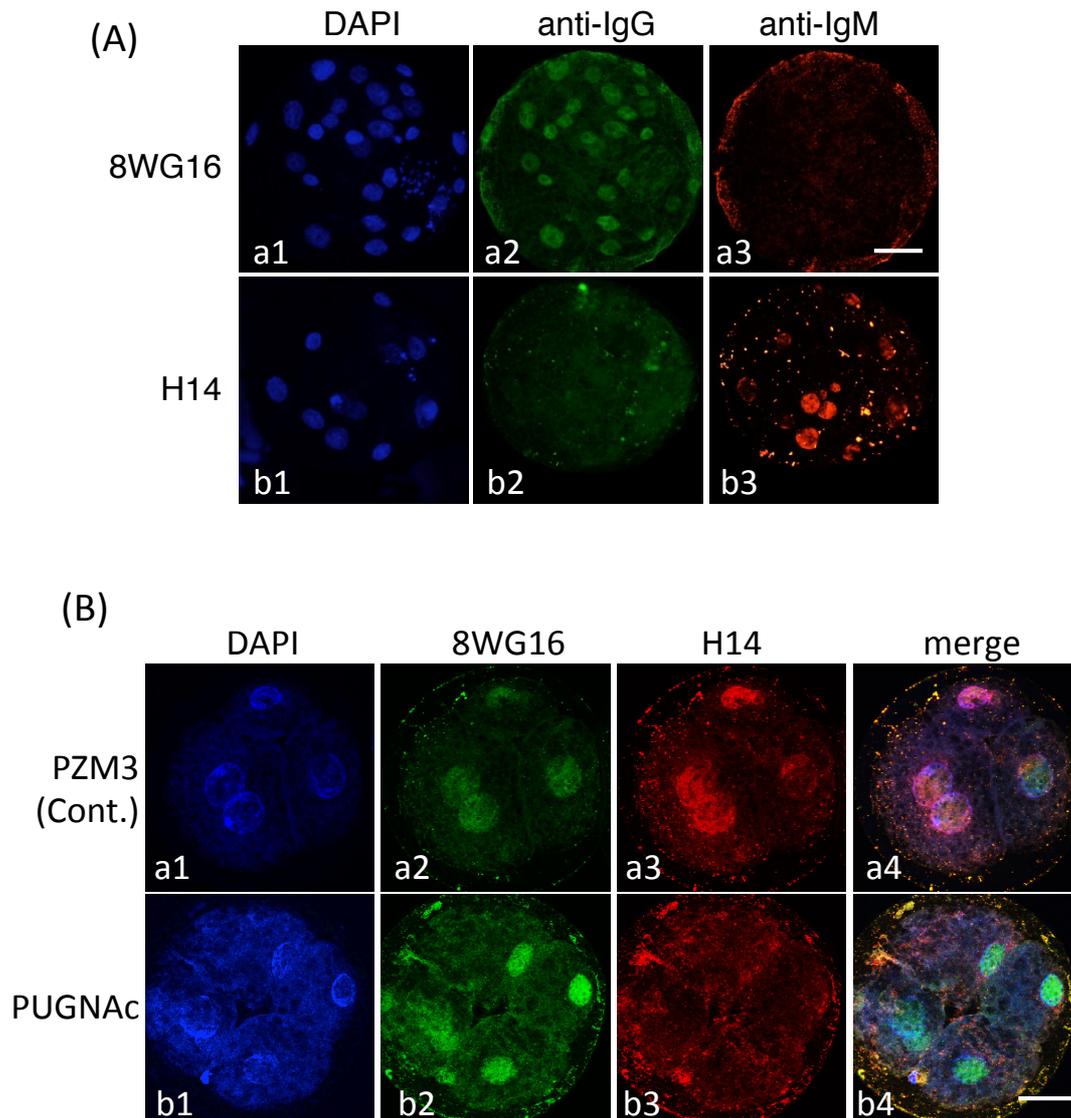


Fig. 4-9. 着床前発生段階の単為発生 2 倍体における Pol II およびリン酸化型 Pol II (pPol II) の局在性。(A) 一次抗体 (8WG16, 抗 Pol II 抗体, マウス IgG; H14, 抗 pPol II 抗体, マウス IgM) および二次抗体 (Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG および Alexa Fluor 564 標識抗マウス IgM) 間の交差性試験。活性化 144 時間後の胚盤胞期 2 倍体を 8WG16 (a2, b2), または H14 (a3, b3) で処理後, 抗マウス IgG 抗体および抗マウス IgM 抗体で処理した。二次抗体はそれぞれ, IgG および IgM 特異的に反応した。(B) PUGNAc 処理が電気刺激 48 時間後の 2 倍体における Pol II およびリン酸化型 Pol II (pPol II) の局在性に及ぼす影響。Pol II は PUGNAc 処理の有無に関係なく核に局在し (a2, b2), pPol II は PUGNAc 未処理区でのみ, 核での局在が確認された (a3, b3)。2 倍体の核を DAPI によって対比染色した。Scale Bar = 50 μm。

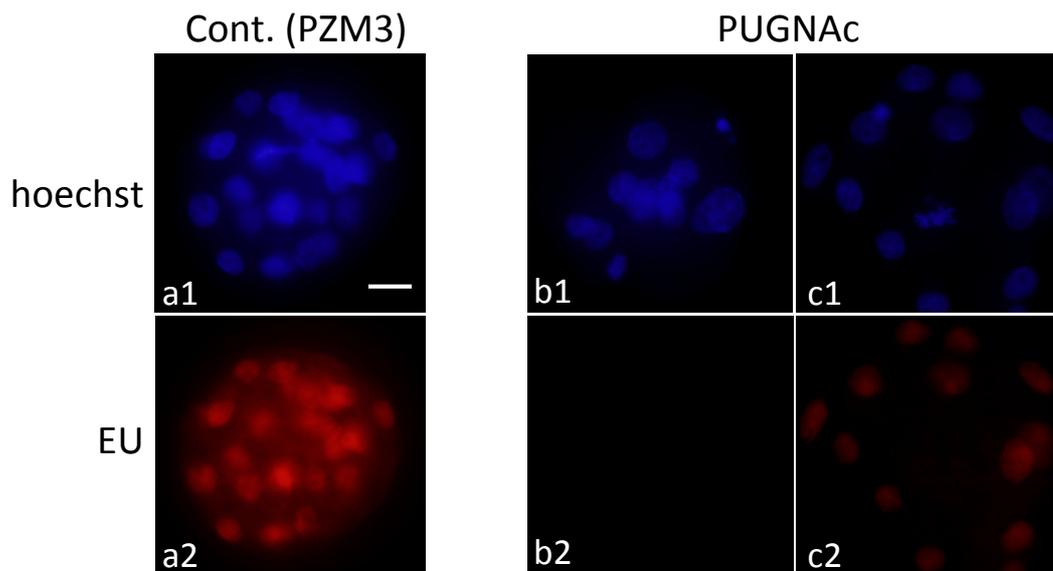


Fig. 4-10. PUGNAc 処理が電気刺激 96 時間後の 2 倍体における RNA の合成に及ぼす影響。ブタ単為発生 2 倍体を 0 (a1, a2; control) および 300 μ M PUGNAc を添加した PZM3 (b1, b2, c1, c2; PUGNAc) で 96 時間培養し, その後 5-ethyl uridine (EU) を 1 時間取り込ませた。新規合成された RNA を Click-iT RNA Alexa Fluor 594 Imaging Kit を用いて可視化した (赤)。Control 区において桑実胚期まで正常に発生した 2 倍体では RNA 合成が確認された。一方, PUGNAc 処理区においてコンパクション前の 2 倍体 (b1, b2) では RNA 合成が確認されなかった。しかし, PUGNAc 処理に関係なく, コンパクションを起こした 2 倍体では RNA 合成が検出された。Scale Bar = 50 μ m。

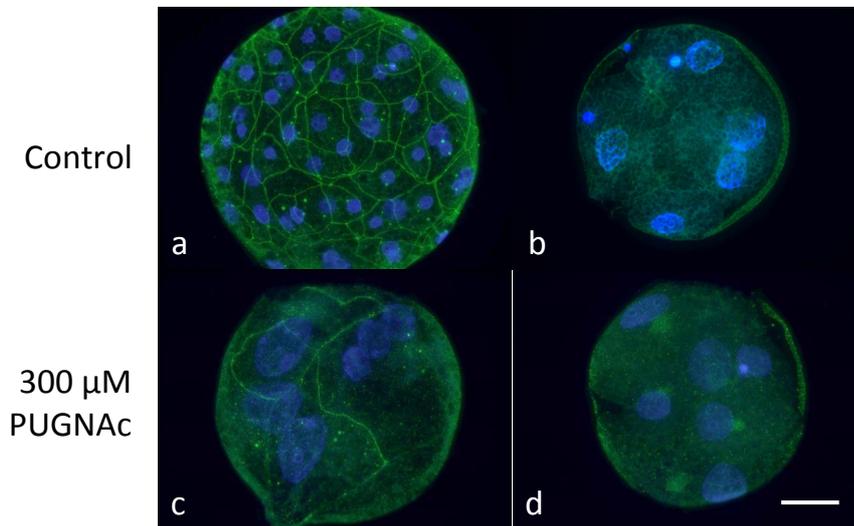


Fig. 4-11. PUGNAc 処理がブタ単為発生 2 倍体の Claudin4 の発現に及ぼす影響。ブタ単為発生 2 倍体を 0 (a, b; control) および 300 μ M PUGNAc を添加した PZM3 (c, d; PUGNAc) で、電気刺激の後 72~120 時間培養した。Control 区では 120 時間において正常に発生した 2 倍体 (a), PUGNAc 添加区では退行していない 2 倍体 (c, d) を選び、免疫染色を行った。また、PUGNAc 添加区においてコンパクション前の 2 倍体の発現パターンと比較するために、活性化 72 時間後の、ほぼ同じ発生段階に正常発生した 2 倍体を選び、同様に処理した (b)。Control 区の、120 時間後の 2 倍体では Claudin4 は細胞間に局在していた (a)。PUGNAc 添加区においては、コンパクション後の胚では細胞間に局在していたが、部分的であった (c)。コンパクション前の胚では細胞間に局在することはなく (d), 発現パターンは control 区で得られた同時期の正常発生胚と類似していた (b)。Scale Bar = 50 μ m。

第四節 考察

ブタ着床前発生期の単為発生 2 倍体における，哺乳類の機能的なタンパク質修飾の一つである O-GlcNAc 修飾の存在と役割について調べた。はじめに，ブタ着床前胚における O-GlcNAc 修飾に関与する 3 つの酵素の mRNA 発現と O-GlcNAc 修飾を受けたタンパク質の局在性について調べた。また，着床前発生における O-GlcNAc 修飾役割を解析するために，タンパク質の O-GlcNAc 修飾に関与する 2 つの酵素，O-GlcNAc transferase (OGT) と O-GlcNAcase (OGA) を阻害した。

HBP の律速酵素である *GFPT* および *OGT* の mRNA は，着床前発生期間を通じて発現していた。*OGA* も，4 細胞期を除いて全ての発生段階の 2 倍体において発現しており，*OGA* タンパク質は 2 細胞期から胚盤胞期まで，全ての発生段階で発現していた。これらの結果は，ブタ着床前胚では，グルコースが HBP を介して代謝され，O-GlcNAc 修飾に用いられている可能性を示唆している。これまで全ての真核細胞において O-GlcNAc 修飾は存在し，タンパク質の O-GlcNAc 修飾および脱修飾が起こることから (Hanover et al., 2012; Hart, 2014)，MII 期卵母細胞には，成熟完了以前に母性由来の *OGA* mRNA およびタンパク質が蓄積されていると考えられる。また，正常な着床前発生に寄与する RNA は，ブタ着床前胚では 4 細胞期に，母性から胚性由来に変化すると考えられている (Jarrell et al., 1991)。したがって，*OGA* は 4 細胞期の間は転写されず，桑実胚期以降に転写されるようになり，発生に貢献すると思われる。*OGA* の桑実胚期からの再発現は，4 細胞期を越える発生に，*OGA* が重要な役割を担っていることを示唆している。

O-GlcNAc 修飾タンパク質は，MII 期卵母細胞の細胞質および核中に存在するとともに，着床前発生過程の全ての胚に存在した。しかし，O-GlcNAc 修飾タンパク質は，桑実胚期以降は主に核内に局在した。これは，O-GlcNAc 修飾タンパク質の機能が，桑実胚期あるいは胚盤胞期では，それ以前と異なることを示唆している。本研究では，細胞質中の O-GlcNAc 修飾タンパク質が核内へ移動したのか，細胞質中の O-GlcNAc 修飾タンパク質が脱 O-GlcNAc 化したのかは不明であり，桑実胚期や胚盤胞に含まれる O-GlcNAc 修飾タンパク質の同定が必要である。Oct4 や Sox2 などの多くの転写因子が O-GlcNAc 修飾のターゲットであること (Jang et al., 2012)，また，哺乳類胚では，最初の分化が桑実胚から胚盤胞に

始まることから (Guo et al., 2010; Fujii et al., 2013), このような O-GlcNAc 修飾タンパク質の局在の変化は, O-GlcNAc 修飾が分化と関係する可能性を示唆している。

電気刺激 144 時間後までの連続した 300 μ M PUGNAc 処理は, 単為発生 2 倍体の 4 細胞期で発生を著しく抑制したが, 48 時間後までの PUGNAc 処理では, 胚盤胞への発生に明瞭な影響は見られなかった。一方, OGT 阻害剤である BADGP の培地への添加は, 2 倍体の胚盤胞への発生に影響しなかった。さらに, Azaserine による GFPT の阻害も発生に抑制的な効果は示さなかった。これらの結果は, 4 細胞期以降の PUGNAc 処理によって発生停止が起こることを示しており, ブタ胚では 4 細胞期を越える発生に O-GlcNAc 修飾の除去が必要なことを示唆している。本章の結果は, O-GlcNAc 修飾のタンパク質への付加が重要であるマウスと異なり (Pantaleon et al., 2008), ブタ着床前発生では O-GlcNAc 修飾の除去が重要であることを示唆している。

control 区の 4 細胞期では, Pol II の CTD (Pol II-CTD) におけるリン酸化が検出されたが, 300 μ M PUGNAc 処理区の 4 細胞期 2 倍体では検出されなかった。また, PUGNAc 処理区の 2 倍体の, 電気刺激 96 時間後における RNA 合成活性も低下していた。胚性遺伝子の活性化 (ZGA) に先立って, Pol II-CTD はリン酸化されることが報告されており (Tokoro et al., 2010), これらの結果は OGA の阻害が ZGA の失敗, あるいは遅延を起こしたことを示唆している。

ZGA は胚性のゲノムを用いて RNA を転写し始めることを意味しており (Shin et al., 2010), ブタ胚では 4 細胞期に起こる (Jarrel et al., 1991)。また, 第二章で明らかとなったように胚の糖代謝特性や RNA 転写パターン (Cao et al., 2014) も, 4 細胞期に変化する。本章の結果から, PUGNAc 処理によって Pol II-CTD のリン酸化が影響を受け, RNA 転写が低下し, 結果として 4 細胞期での発生停止が起こったと考えられる。しかし, どのタンパク質が O-GlcNAc 修飾を受けるのかは今後明らかにする必要がある。

近年, O-GlcNAc 修飾された Pol II-CTD が, プロモーター領域上でプレイニシエーションコンプレックスを形成するために必要であることが示された (Ranuncolo et al., 2012)。Pol II-CTD の脱 O-GlcNAc 修飾が直接阻害された場合, 異常に O-GlcNAc 修飾を受けた Pol II が, PUGNAc 処理を受けた 4 細胞期ブタ胚の, プロモーター領域上に検出できるかもしれない。また, Pol II 以外のタンパク質に O-GlcNAc 修飾が残留している可能性も考えられる。母性由来タンパク質

の減少が ZGA には必要であり (Shin et al., 2010), OGA の阻害はプロテアソーム系の活性を下げる (Zhang et al., 2003)。さらに O-GlcNAc 修飾を受けたタンパク質はしばしば半減期が長いことも知られている (Park et al., 2010; Hardivillé et al., 2010)。したがって、母性タンパク質の減少が PUGNAc 処理によって滞り、異常に残留した母性タンパク質が胚発生停止につながった可能性も考えられる。ヒストンファミリータンパク質も O-GlcNAc 修飾のターゲットであることから (Fujiki et al., 2011; Sakabe et al., 2010; Fong et al., 2012), クロマチンリモデリングの異常が PUGNAc 処理によって誘起された可能性もある。

PUGNAc 処理に関わらず、桑実胚期に達した 2 倍体では RNA の転写が起っていたことから、タイトジャンクションのシーリングタンパク質であり、哺乳類胚の最初の分化に重要な機能を持つ Claudin-4 (Moriwaki et al., 2007) の発現性を調べた。Claudin-4 タンパク質の発現は control 区の 120 時間の胚盤胞において、細胞の境界に発現していたが、300 μ M PUGNAc 処理区の 2 倍体では部分的に発現、あるいは全く発現が検出されなかった。このような Claudin-4 の発現パターンはおそらく、PUGNAc 処理による ZGA の不完全性によって起こされたであろう。より早い時間の正常発生胚においても同様の傾向が得られたことから、この現象が、発生停止の原因ではなく、結果である可能性を否定できない。

本章の結果から、O-GlcNAc 修飾タンパク質は、ブタ MII 期卵母細胞およびすべての着床前発生期の胚に存在し、O-GlcNAc cycling はブタ着床前胚において働いていること、また、OGA 阻害によって、ブタ着床前胚は 4 細胞期において発生停止することが明らかになった。4 細胞期の発生停止は、Pol II のリン酸化が阻害され、RNA 転写が抑制されることによると考えられる。

第五節 引用文献

Amarnath D, Wakayama S, Zhu J, Moawad AR, Wakayama T, Campbell KH. The novel use of modified pig zygotic medium for the efficient culture of the preimplantation mouse embryos. *Theriogenology*. 2011; 76:1639-1646.

Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oöcyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967; 58:560-567.

Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interaction of energy sources. *J Reprod Fertil*. 1965; 10:227-240.

Cao S, Han J, Wu J, Li Q, Liu S, Zhang W, Pei Y, Ruan X, Liu Z, Wang X, Lim B, Li N. Specific gene-regulation networks during the pre-implantation development of the pig embryo as revealed by deep sequencing. *BMC Genomics*. 2014; 15:4.

Chatot CL, Lewis JL, Torres I, Ziomek CA. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol Reprod*. 1990; 42:432-440.

Chatot CL, Lewis-Williams J, Torres I, Ziomek CA. One-minute exposure of 4-cell mouse embryos to glucose overcomes morula block in CZB medium. *Mol Reprod Dev*. 1994; 37:407-412.

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL and Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil*. 1989; 86:679-688.

Comer FI, Hart GW. Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry*. 2001; 40:7845-7852.

Flood MR, Wiebold JL. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *J Reprod Fertil*. 1988; 84:7-12.

Fong JJ, Nguyen BL, Bridger R, Medrano EE, Wells L, Pan S, Sifers RN. β -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a novel regulator of mitosis-specific phosphorylations on histone H3. *J Biol Chem*. 2012; 287:12195-12203.

Fujii T, Sakurai N, Osaki T, Iwagami G, Hirayama H, Minamihashi A, Hashizume T, Sawai K. Changes in the expression patterns of the genes involved in the segregation and function of inner cell mass and trophectoderm lineages during porcine preimplantation development. *J Reprod Dev*. 2013; 59:151-158.

Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder RG, Brown M, Kato

S. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature*. 2011; 480:557-560.

Guo G, Huss M, Tong GQ, Wang C, Li Sun L, Clarke ND, Robson P. Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev Cell*. 2010; 18:675-685.

Hanover JA, Cohen CK, Willingham MC, Park MK. O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J Biol Chem*. 1987; 262:9887-9894.

Hanover JA, Krause MW, Love DC. Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13:312-321.

Hardivillé S, Hoedt E, Mariller C, Benaïssa M, Pierce A. O-GlcNAcylation/phosphorylation cycling at Ser10 controls both transcriptional activity and stability of delta-lactoferrin. *J Biol Chem*. 2010; 285:19205-19218.

Hart GW. Three decades of research on O-GlcNAcylation - A major nutrient sensor that regulates signaling, transcription and cellular metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014; 5:183.

Holt GD, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L, Hart GW. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J Cell Biol*. 1987; 104:1157-1164.

Jang H, Kim TW, Yoon S, Choi SY, Kang TW, Kim SY, Kwon YW, Cho EJ, Youn HD. O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell*. 2012; 11:62-74.

Jarrell VL, Day BN, Prather RS. The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *Sus scrofa*: quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Biol Reprod*. 1991; 44:62-68.

Kane MT. Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. *Biol Reprod*. 1987; 37:775-778.

Karja NW, Medvedev S, Onishi A, Fuchimoto D, Iwamoto M, Otoi T, Nagai T. Effect of replacement of pyruvate/lactate in culture medium with glucose on preimplantation development of porcine embryos in vitro. *J Reprod Dev*. 2004; 50:587-592.

Kuijk EW, du Puy L, van Tol HT, Haagsman HP, Colenbrander B, Roelen BA. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies in porcine oocytes and

preimplantation embryos. *BMC Dev Biol.* 2007; 7:58.

Kure-Bayashi S, Miyake M, Katayama M, Miyano T, Kato S. Development of porcine blastocysts from in vitro- matured and activated haploid and diploid oocytes. *Theriogenology.* 1996; 46:1027-1036.

Leese HJ, Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil.* 1984; 72:9-13.

Ludwig TE, Lane M, Bavister BD. Differential effect of hexoses on hamster embryo development in culture. *Biol Reprod.* 2001; 64:1366-1374.

Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem.* 1991; 266:4706-4712.

Mito T, Yoshioka K, Yamashita S, Suzuki C, Noguchi M, Hoshi H. Glucose and glycine synergistically enhance the in vitro development of porcine blastocysts in a chemically defined medium. *Reprod Fertil Dev.* 2012; 24:443-450.

Moriwaki K, Tsukita S, Furuse M. Tight junctions containing claudin 4 and 6 are essential for blastocyst formation in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol.* 2007; 312:509-522.

Pantaleon M, Scott J, Kaye PL. Nutrient sensing by the early mouse embryo: hexosamine biosynthesis and glucose signaling during preimplantation development. *Biol Reprod.* 2008; 78:595-600.

Park SY, Kim HS, Kim NH, Ji S, Cha SY, Kang JG, Ota I, Shimada K, Konishi N, Nam HW, Hong SW, Yang WH, Roth J, Yook JI, Cho JW. Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *EMBO J.* 2010; 29:3787-3796.

Park Y, Hong J, Yong H, Lim J, Lee E. Effect of exogenous carbohydrates in a serum-free culture medium on the development of in vitro matured and fertilized porcine embryos. *Zygote.* 2005; 13:269-275.

Petters RM, Johnson BH, Reed ML, Archibong AE. Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo in vitro. *J Reprod Fertil.* 1990; 89:269-275.

Ranuncolo SM, Ghosh S, Hanover JA, Hart GW, Lewis BA. Evidence of the involvement of O-GlcNAc-modified human RNA polymerase II CTD in transcription in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2012; 287:23549-23561.

Sakabe K, Wang Z, Hart GW. Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the

histone code. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:19915-19920.

Sakagami N, Nishino O, Adachi S, Umeki H, Uchiyama H, Ichikawa K, Takeshita K, Kaneko E, Akiyama K, Kobayashi S, Tamada H. Improvement of preimplantation development of in vitro-fertilized bovine zygotes by glucose supplementation to a chemically defined medium. *J Vet Med Sci*. 2014; 76:1403-1405.

Schini SA, Bavister BD. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod*. 1988; 39:1183-1192.

Seshagiri PB, Bavister BD. Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biol Reprod*. 1989; 40:599-606.

Shin SW, Tokoro M, Nishikawa S, Lee HH, Hatanaka Y, Nishihara T, Amano T, Anzai M, Kato H, Mitani T, Kishigami S, Saeki K, Hosoi Y, Iritani A, Matsumoto K. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system leads to delay of the onset of ZGA gene expression. *J Reprod Dev*. 2010; 56:655-663.

Sturmey RG, Leese HJ. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction*. 2003; 126:197-204.

Swain JE, Bormann CL, Clark SG, Walters EM, Wheeler MB, Krisher RL. Use of energy substrates by various stage preimplantation pig embryos produced in vivo and in vitro. *Reproduction*. 2002; 123:253-260.

Tokoro M, Shin SW, Nishikawa S, Lee HH, Hatanaka Y, Amano T, Mitani T, Kato H, Anzai M, Kishigami S, Saeki K, Hosoi Y, Iritani A, Matsumoto K. Deposition of acetylated histones by RNAP II promoter clearance may occur at onset of zygotic gene activation in preimplantation mouse embryos. *J Reprod Dev*. 2010; 56:607-615.

Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*. 1984; 259:3308-3317.

Wirtu G, Pope CE, Damiani P, Miller F, Dresser BL, Short CR, Godke RA, Bavister BD. Development of in-vitro-derived bovine embryos in protein-free media: effects of amino acids, glucose, pyruvate, lactate, phosphate and osmotic pressure. *Reprod Fertil Dev*. 2003; 15:439-449.

Wongsrikeao P, Otoi T, Taniguchi M, Karja NW, Agung B, Nii M, Nagai T. Effects of hexoses on in vitro oocyte maturation and embryo development in pigs. *Theriogenology*. 2006; 65:332-343.

Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod.* 2002; 66:112-119.

Zhang F, Su K, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Kudlow JE. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell.* 2003; 115:715-725.

第五章

総括

本研究では、ブタ着床前胚発生におけるグルコース (Glu) の代謝特性を発生時期特異的に明らかにすること、またこれまで知られてない Glu 代謝経路の存在、およびエネルギー基質と異なる Glu の発生における機能を明らかにすることを目的とした。

第二章では、化学的合成培地に、種々の発生時期から Glu とフルクトース (Fru) を添加し、ピルビン酸および乳酸 (Pyr·Lac) の有無と合わせて、ブタ胚における Glu と Fru の代謝特性について検討した。これまでの報告では、Glu 代謝特性が着床前発生期間の途中で変化するが、これは胚におけるエネルギー生産経路が切り替わることによると考えられている。初期卵割期胚では、主に Pyr·Lac から TCA 回路を介して ATP を作るが、ある時期を境に解糖系を主としたエネルギー生産に切り替わり、胚盤胞期では解糖系および TCA 回路・酸化的リン酸化を利用したエネルギー生産が主になる。この切り替えは、おそらく胚性遺伝子の活性化 (ZGA) による胚の代謝特性の変化によるものと考えられている。ZGA とは、胚が自らのゲノム遺伝子発現を始める現象である。ZGA の時期は動物種によって異なり、マウスでは 2 細胞期、ブタでは 4 細胞期、ウシでは 8~16 細胞期の間に起こる。母性から胚性由来の mRNA への変化とともに、異なる遺伝子が発現するようになり、胚の代謝特性を含む多くの生理特性の変化が起こると考えられる。

活性化直後から糖を添加した場合、144 時間以後の胚盤胞の割合は、Glu と Pyr·Lac が共存するよりも、Pyr·Lac だけの方が有意に高く、Glu は胚盤胞への発生に見かけ上抑制的に作用したが、Fru の場合には差がなかった。早期 4 細胞 (48 h) 以降に Glu と Pyr·Lac が共存しても、そのような影響は見られなかった。一方、単独で糖を加えると、Glu は活性化直後から胚盤胞期までの発生を支持するが、Fru 単独では、5~8 細胞期に発生を停止することが明らかになった。また、4 細胞まで Pyr·Lac 存在下で 2 倍体を培養し、その後、糖添加、あるいは炭水化物不含の培地に置き換えると、Glu の抑制的な作用は全く見られることなく、168 時間以降の胚盤胞の生存性を改善する傾向があった。この場合、炭水化物が不

在でも、120 時間後には 2 倍体は正常に桑実胚から胚盤胞期に達し、192 時間後まで、Fru, Glu, あるいは Pyr·Lac の存在下と同等の胚盤胞率を維持した。このように、ZGA 時期と推測される 4 細胞の前後で、糖の代謝特性が大きく変わることが明らかになった。

第二章の結果から、ブタ着床前胚が外因性の Glu を必要としないので、第三章では、Pyr·Lac から Glu を同化する、ブタ胚の糖新生能について検討した。Pyr·Lac のみの存在下で培養した 2 倍体において、糖新生に必須の 4 つの酵素、*G6P*, *FBP*, *PEPCK*, および *PC* の mRNA と、この反応の律速酵素である *PEPCK* タンパク質の発現を、それぞれ、RT-PCR と免疫蛍光染色法を用いて調べた。その結果、いずれの着床前発生段階の胚も、すべての酵素の mRNA, *PEPCK* タンパク質をともに発現していた。したがって、ブタ着床前胚は Glu 新生能力を持つ可能性が示唆された。

第四章では、ブタ着床前胚におけるヘキソサミン生合成経路 (HBP), およびそれに続く O-GlcNAc 修飾の存在と機能について検討した。各着床前発生段階にある胚において、HBP および O-GlcNAc 修飾に必要な 3 種の酵素、*GFPT*, *OGT*, *OGA* の mRNA 発現を調べた。*GFPT* および *OGT* は全ての発生段階の 2 倍体に、*OGA* もほぼ全ての発生段階の 2 倍体で認められたが、4 細胞期では発現が認められなかった。しかし、*OGA* タンパク質は 2 細胞期から桑実胚期まで連続して存在していた。これらの結果は、ブタ着床前胚が、HBP による Glu 代謝および O-GlcNAc 修飾を行えることを示唆している。つぎに、O-GlcNAc 修飾タンパク質の局在性を免疫染色によって調べたところ、第二減数分裂中期 (MII 期) の卵母細胞、および桑実胚期までの全ての発生段階の 2 倍体の核および細胞質に、O-GlcNAc 修飾タンパク質の発現が認められた。しかし、桑実胚の一部および胚盤胞期胚では、O-GlcNAc 修飾タンパク質は核内に強く局在していた。タンパク質への O-GlcNAc 修飾を触媒する *OGT* を阻害剤 (BADGP) により阻害しても、発生率に影響は見られなかったが、脱 O-GlcNAc 修飾を触媒する *OGA* 阻害剤 (PUGNAc) により、2 倍体は 4 細胞期で発生を停止した。また、早期 4 細胞期までの PUGNAc による阻害は、2 倍体の発生率に影響しなかった。これらの結果は、ブタにおいて O-GlcNAc 修飾の除去が 4 細胞期を越える発生に必要であることを示唆している。また、HBP の律速酵素 *GFPT* 阻害剤 (Azaserine) の添加も、ブタ着床前胚の発生に影響しなかった。マウスでは Azaserine の添加により発生率の低下を招くことが報告されていることから、本研究の結果は、HBP を介し

た Glu 代謝と GlcNAc cycling の役割が、ブタとマウス胚で異なることを示唆している。

以上のように、本研究では、ブタ着床前胚では Glu に代表されるエネルギー代謝特性が 4 細胞期の間に変化することが明らかにされるとともに、4 細胞以前の胚においても Pyr・Lac から Glu を新生できる可能性が示唆された。また、ブタでは、O-GlcNAc 修飾経路が MII 期卵母細胞およびすべての着床前胚に存在し、4 細胞以降の発生には脱 O-GlcNAc 修飾が必要なことが示唆された。

謝辞

本研究の遂行ならびに本研究の遂行にあたり、終始温かい指導と教授を賜りました、三宅 正史 教授に謝意を表すとともに、本研究の実験計画から論文作成の細部にわたる多くのご教示、ご助言を頂きました、宮野 隆 教授、原山 洋 教授、李 智博 准教授に深く感謝いたします。また、本論文の作成に多くのご教示を賜りました 吉川 潮 教授に謝意を表します。

また、実験材料を快く提供してくださいました、大阪食肉臓器の職員の方々に厚く御礼申し上げます。さらに、研究室における様々な面、多くのご協力を頂きました当研究室の諸先輩に心から感謝いたします。最後に、研究に打ち込める環境を与えてくれた私の家族と、常に温かい励ましをおくってくれた友人と後輩に感謝します。