

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580384

研究課題名(和文)ウシ体外受精胚のエピジェネティクス特性とその制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of epigenetic characters in bovine IVF embryos.

研究代表者

澤井 健(SAWAI, Ken)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：90390864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ウシ体外受精(IVF)胚において体外発生培地へ添加したタンパク質成分、成長因子およびプロゲステロンが胚発生およびアポトーシスへおよぼす影響を明らかにすることを目的とした。本研究の結果から、体外発生培地に成長因子を添加することによりウシ初期胚におけるアポトーシス関連遺伝子発現を変化させ、アポトーシスを抑制することが明らかとなった。また、ウシ初期胚において発生培地へのプロゲステロン添加はウシIVF胚の発生率を向上させ、プロゲステロンがウシ初期胚への直接的な作用を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study were to determine the effects of protein components, growth factors and progesterone (P4) on development competence and expression of apoptosis-related genes of bovine IVF embryos. Our results suggest differences in levels of transcripts of apoptosis related genes in bovine embryos cultured with or without GF. Protein components, growth factors and P4 in culture medium improve the development competence and change the gene transcript of bovine IVF embryos.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・応用動物科学

キーワード：IVF胚 遺伝子発現 体外発生 ウシ アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、ウシの体外受精(IVF)技術は、効率的な産子生産法として世界的に広く普及している。我が国においても、ウシ IVF 胚の移植頭数は年間約 1 万頭(胚移植全体の約 15%)で推移しており、IVF 技術は胚移植を利用した産子生産にとって重要な技術となっている。最近では、経膈採卵による優良雌畜卵子の反復採取や、X および Y 染色体精子の選別など新規開発技術との組み合わせにより、IVF 技術を利用した優良産子の効率的生産が可能となっている。その一方で、ウシ IVF 胚の受胎率が体内受精・体内発生胚と比較して低いこと、IVF 産子に過大化傾向がみとめられることなどが問題となっており、これらの異常はウシ IVF 技術の利用促進にとって阻害要因となっている。

(2) 近年、ウシ IVF 胚における DNA メチル化パターンの異常が報告され、それにとまなう IVF 胚の遺伝子発現(エピジェネティクス)異常が懸念されている。実際に申請者は、ウシ IVF 胚におけるエネルギー代謝および組織分化を制御する遺伝子の発現異常やそれら遺伝子の発現制御を担うヒストン修飾の異常を明らかにした(*Cloning & Stem Cells* 2005, *Cell. Reprog.* 2010a など)。また、研究代表者らは、マウスおよびウシクローン胚のエピジェネティクス制御に X 染色体不活化(Xist)遺伝子が関与することを見出したが(*Science* 2010)、大変興味深いことに、ウシ IVF 胚においても本来 Xist 遺伝子が発現しない雄胚の約半数において同遺伝子が発現しており、さらに雌胚においても Xist 遺伝子が過剰に発現している胚がみとめられた。これら遺伝子の発現異常は胚の受胎率低下や産子の過大化が高頻度で発生するウシクローン胚においても同様にみとめられており、エネルギー代謝や組織分化および X 染色体不活化を制御する遺伝子の発現動態とその制

御機構の異常がウシ IVF 胚の低受胎や産子過大化の原因となっていることが考えられる。

(3) ウシ IVF 胚においては、体外発生培地に添加する血清やウシ血清アルブミン(BSA)などのタンパク質成分が、胚盤胞期までの発生率を向上させ、さらに胚細胞数を増加させることが知られている。しかしながら、家畜胚においては体外発生培地のタンパク質成分が産子の生時体重に影響をおよぼすことが報告されており、培地中のタンパク質成分がウシ IVF 胚の遺伝子発現異常に関与していることが考えられる。実際に申請者は、体外発生培地のタンパク質成分の種類や添加の有無によって、ウシ IVF 胚のアポトーシス関連遺伝子の発現量が異なり、アポトーシス細胞が増減することを明らかにした。このことは、体外発生培地のタンパク質成分がウシ IVF 胚の遺伝子発現を変化させる要因となることを示している。

(4) 体外発生培地のタンパク質成分が上記したエネルギー代謝や組織分化関連遺伝子および Xist 遺伝子の発現動態やその制御機構におよぼす影響については明らかではなく、ウシ IVF 胚および産子の異常原因の解明とその克服のためにはこれら知見の集積が必要である。また近年、ウシ IVF 胚の体外発生においては、血清由来感染症の回避などを目的に、血清無添加の体外発生培地(無血清培地)の利用が行われているが、ウシ IVF 胚の無血清培地での発生率は低く、効率的な胚生産と産子過大化など IVF 胚特有の異常を回避できる無血清培地の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

体外発生(IVC)培地のタンパク質成分の種類や添加の有無によるウシ IVF 胚のエネルギー代謝、アポトーシス関連遺伝子発現動態

の差異を明らかにし、さらに体内受精・体内発生胚との比較からウシ IVF 胚のエピジェネティクス特性を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) IVC 培地に添加した成長因子がウシ IVF 胚の発生およびアポトーシスにおよぼす影響を明らかにするため、成長因子(GF; 100 ng/ml IGF-I、10 ng/ml EGF)添加 TALP 培地におけるウシ IVF 胚の胚発生率、TUNEL 法による胚盤胞期胚のアポトーシス陽性細胞率、アポトーシス関連遺伝子である *Bax*、*Bcl-X<sub>L</sub>*、*p53* のウシ胚盤胞期胚における mRNA 発現について検討した。

ウシ体外成熟培養卵子を IVF し、PVA 区、PVA+GF 区、BSA 区、BSA+GF 区および CS 区に分け IVC を行なった。IVF7 日目または 8 日目に得られた胚盤胞期胚における各遺伝子の mRNA 発現量解析をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

(2) p53 依存性アポトーシス経路に着目し、ウシ IVF 胚における p53 依存性アポトーシス経路に関わる遺伝子である *p53*、*MDM2* および *CHD8* の mRNA 発現を比較検討した。

ウシ体外成熟培養卵子を IVF し、PVA 区、PVA+GF 区、BSA 区、BSA+GF 区および CS 区に分け IVC した。IVF 後 7 日目または 8 日目に得られた胚盤胞期胚における各遺伝子の mRNA 発現量解析をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

(3) 卵巣黄体で産生されるプロゲステロン(P4)はウシ初期胚において抗アポトーシス作用を示す可能性がある。そこで本研究では、体外発生培地への P4 添加がウシ IVF 胚の発生とアポトーシスにおよぼす影響について検討した。

ウシ IVF 胚を 15 ng/ml P4 を添加または無添加の TALP 培地中で 8 日間培養した。P4 の添加条件は発生培養開始後 3 日間(前半)と、その後 5 日間(後半)に分けて設定し、全培養期間 P4 添加(+ + 区)、前半のみ P4 添加(+ - 区)、後半のみ P4 添加(- + 区)、および全培養期間 P4 無添加(- - 区)の以上 4 区を設けた。また、培養開始後 8 日目の胚盤胞(BC)期以上の胚を固定し TUNEL 陽性細胞数を計測した。

### 4. 研究成果

(1) IVF6 日目に桑実期胚以上に発生した胚の割合および IVF7 日目胚盤胞期発生率は CS 区と比較して PVA 区において有意 ( $P < 0.05$ )に低い値を示した。IVF8 日目胚盤胞発生率は CS 区において有意 ( $P < 0.05$ )に高い値を示した。また、BSA 区においては IVF7 日目と比較して IVF8 日目において有意 ( $P < 0.05$ )に低い胚盤胞発生率を示した。胚盤胞期胚の総細胞数は IVF7 日目において BSA+GF 区で PVA 区、BSA 区と比較して有意 ( $P < 0.05$ )に高い値を示した。アポトーシス陽性細胞の割合は IVF7 日目胚で CS 区と比較して PVA 区で有意 ( $P < 0.05$ )に高い値を示し、IVF8 日目胚では CS 区と比較して BSA 区で有意 ( $P < 0.05$ )に高い値を示した。アポトーシス抵抗性を示す *Bax* に対する *Bcl-X<sub>L</sub>* の発現量比は IVF7 日目胚盤胞期胚において CS 区に比べ BSA+GF 区で有意 ( $P < 0.05$ )に高い値を示した。*p53* の発現量は IVF8 日目胚において CS 区に比べ BSA+GF 区で有意 ( $P < 0.05$ )に高い値を示した。

(2) Day7 の胚盤胞期胚においては *p53*、*MDM2* および *CHD8* の発現量に処理区の違いによる有意な差は認められなかった。一方、Day8 の胚盤胞期胚における *p53* の発現量は PVA 区および PVA+GF 区と比較して CS 区

で有意に高い値を示した( $P<0.05$ )。Day8 の胚盤胞期胚における *MDM2* の発現量は PVA 区に比べ CS 区で有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。Day8 の胚盤胞期胚における *CHD8* の発現量に処理区の違いによる有意な差は認められなかった。

(3)Day6 において、桑実期以上に発生した胚の割合は + - 区(19.9%)、- - 区(17.2%)と比較して + + 区(34.1%)で有意に高く ( $P<0.05$ )、Day7 および Day8 の早期 BC 期以上への発生率は - - 区(4.9%、9.3%)と比較して + + 区(12.7%、22.0%)で有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。BC 期胚の総細胞数および TUNEL 陽性細胞の割合においては、処理区による有意な差は認められなかった。TUNEL 陽性細胞が総細胞数の 5%以上を占める胚の割合は - - 区(72.7%)、- + 区(63.0%)、+ + 区(62.5%)、+ - 区(56.3%)の順に高い値を示し、同じく、TUNEL 陽性細胞が 10%以上であった胚の割合は - - 区(13.6%)、+ + 区(12.5%)、+ - 区(12.5%)、- + 区(7.4%)の順に高い値を示した。

本研究結果から、血清代替物質の IVC 培地への単独添加による、胚の発生遅延および IVC 時間の延長によるアポトーシス増加は、IVC 培地への成長因子の添加により改善されることが示された。また IVC 培地への成長因子添加は、*vivo* 胚または CS 区に類似した胚の生産が可能であることが明らかとなった。さらに、IVC 培地への成長因子の添加は、アポトーシス関連遺伝子の発現を変化させ、アポトーシス抑制に働くことが示唆された。

また、ウシ初期胚において発生培地への P4 添加はウシ IVF 胚の発生率を向上させ、P4 はウシ初期胚への直接的な作用を有することが明らかとなった。また本研究では、ウシ IVF 胚での P4 添加による抗アポトーシス作用は確認されなかった。

## 5 . 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計5件)

櫻井伸行, 羽田雅紀, 橋爪 力, 澤井健 体外発生培地へのプロジェステロン添加がウシ体外受精胚の発生におよぼす影響. 第106回日本繁殖生物学会, 2013. 9. 13, 東京農工大 (東京都)

Sawai, K. Epigenetic abnormality in bovine cloned embryos, and approaches for the overcoming. 2013 Biomodulation Symposium, Joining of Korea and Japan for the study on "From Germplasm to Cloning", 5 June, Seoul, Republic of Korea. (2013)

澤井 健 ウシ体細胞クローン胚のエピジェネティクス特性とその人為的制御. NIAS/NILGS 合同シンポジウム「動物生殖技術研究の現状と今後の展望」2013. 2. 26, エポカルつくば (茨城県)

館山奈江, 櫻井伸行, 熊谷仁, 寺田幸弘, 澤井 健 体外発生培地への成長因子添加はウシ体外受精胚のアポトーシスを抑制する. 第15回日本 IVF 学会, 2012. 9. 29, 大阪国際会議場 (大阪府)

Tateyama, N., Hashizume, T. and Sawai, K. Effects of protein components and growth factors on development competence and gene expression of bovine IVF embryos. 2<sup>nd</sup> World Congress on Reproductive Biology, 9-12 October, Cairns, Australia. (2011)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

澤井 健 (SAWAI, Ken)  
岩手大学・農学部・准教授  
研究者番号: 90390864