

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03135

研究課題名(和文) 家畜胚の発生能向上を目指した発生制御の分子機構探求に関する基盤研究

研究課題名(英文) Research for the molecular mechanism of developmental control aimed at improving the developmental potential of livestock embryos

研究代表者

内藤 邦彦(Naito, Kunihiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：20188858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：第一卵割時のM期促進因子(MPF)活性化の制御機構に焦点を絞り、近年Xenopusで関与が報告されたCyclin Aに端を発しBORA、PLK1と続くカスケードが、哺乳類の初期発でも機能している可能性を、ブタ胚の第一卵割開始時と、比較のためブタ卵母細胞の減数分裂開始時において解析した。各因子の動態解析より、両開始時でこのカスケードの存在が示唆された。しかし、前者では生理的にはこの経路は機能していないことが示された。一方、後者では、このカスケードが機能している可能性が示され、それと同時に、ブタ胚ではCyclin AがCyclin Bに代わってMPFとして直接作用するという可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで十分に解明されていない哺乳類胚の卵割の制御機構の一端を、ブタ初期胚の第一卵割における分裂誘導因子のMPFの活性化機構に焦点を当て解析し、その結果、減数分裂では機能していないCyclin Aの合成を起点としてBORA、PLK1へと続く新たなカスケードの関与が示唆された。また、従来、卵母細胞や体細胞でMPFと考えられてきたCDK1/Cyclin B複合体が、ブタ初期胚では重要な役割を持たない可能性が示唆された。これは学術的には全く新しい視点であり大きな意義がある。今後の研究にこの視点を持つことで、哺乳類初期胚の体外発生率向上につながる可能性もあり、社会的にも意義あるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Focusing on the regulatory mechanism of M-phase promoting factor (MPF) activation during the cleavage of mammalian embryos, the possibility of functioning the cascade that originated in Cyclin A followed by BORA and PLK1, which was recently reported in Xenopus embryos, was analyzed at the start of first cleavage of porcine embryos and at the start of meiosis of porcine oocytes for comparison.

Dynamic analysis of each factor suggested the existence of this cascade at both initiations. However, it was shown that this pathway did not work physiologically in the former. On the other hand, in the latter case, it was suggested that this cascade may be functioning, while at the same time suggested that Cyclin A may act directly as MPF in place of Cyclin B in pig embryos.

研究分野：生殖遺伝学

キーワード：家畜胚 Cyclin A MPF Cyclin B BORA

### 1. 研究開始当初の背景

動物バイオテクノロジーの技術革新に伴い、遺伝子改変動物の作出法が劇的な変化を遂げ、多大な貢献をしていることは周知の事実である。このバイオテクノロジー技術に不可欠の材料が初期胚である。畜産分野において重要となる家畜胚として、我が国ではウシとブタの胚が技術の確立に多用されてきた。しかし、家畜胚では体外発生率の低さが問題となっている。ブタ胚では一般に発生率が 50% を大きく超えるのは難しく、胚盤胞率は 1 割 ~ 2 割程度である。この値は体外受精後に体外培養したマウス卵の 80% 以上が胚盤胞まで発生するのとは対比的である。

真核生物では、細胞が分裂を起こすためには細胞質内の M 期促進因子 (MPF) の活性が上昇する必要があることから、ブタ卵では受精後に MPF が十分に活性化されないことが示唆される。哺乳類の細胞分裂開始時の MPF の活性化機構については、培養細胞株を用いた体細胞分裂期の報告、および減数分裂開始時の報告がある。しかし、初期胚を用いた卵割開始時の MPF 活性化機構の報告は哺乳類では皆無である。卵割は体細胞分裂に属するが、成長因子など外部からの分裂シグナルが不要であり、胚の成長を伴わず短時間に分裂が繰り返すといった非常に特殊な体細胞分裂である。にもかかわらず、この時の MPF 活性化機構は培養細胞の結果がそのまま敷衍されると考えられており、真実は不明なままなのである。このような状況にもかかわらず、哺乳類胚を用いた研究は技術面の開発研究が主流であり、胚発生率高上に向けた胚そのものの生理機構を理解する基盤研究が十分行われていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、家畜胚における卵割開始時の MPF 活性化機構を探求することで、哺乳類胚の卵割を制御する分子機構の全体像を考察し、もって家畜胚の発生能高上に資することを目標とする。近年、アフリカツメガエルの初期胚において、Cyclin A に端を発し、Bora、Aurora A、PLK1 と続くカスケード (図 1) が第一卵割開始時の MPF 活性化に関与することが報告された [1]。

しかし、この時期の哺乳類胚にこのカスケードが存在し、MPF 活性化に機能しているかはマウス胚も含め全く調べられていない。そこで、代表的な家畜であるブタの初期胚の第一

卵割開始時をモデルに用い、このカスケードの存在、および MPF 活性化に対する機能を中心に検討した。なお、これまで MPF 活性化の制御機構に関する多くの研究があり比較的解析が進んでいるブタ卵母細胞の減数分裂再開時についても比較検討した。

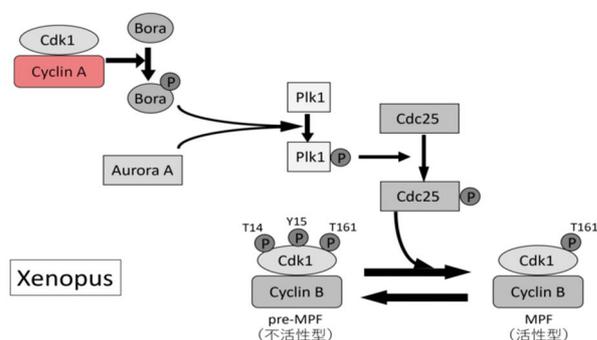


図1 Xenopus初期胚で報告されたMPF活性化カスケード

### 3. 研究の方法

(1) 使用するブタ卵は、屠場より得た未経産ブタ卵巣の、直系 2 ~ 5mm の卵胞より吸引採取した。体外成熟培養は mNCSU に 10% ブタ卵胞液 (pFF) と 1 U/ml 性腺刺激ホルモンを添加した培地を用い、38 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件で 48 時間培養した。その後、卵丘細胞を除去してから 150 V/mm DC pulse、99μ秒の電気刺激で活性化し、5.0 μg/mL cytochalasin B の 2 時間の処理により第 2 極体放出を抑制し 2 倍体胚を作成した。体外発生培養は pFF、ホルモンの代わりに 0.4% BSA を添加した mNCSU37 培地を用い、活性化後 48 時間まで行った。

(2) カスケードの各因子の存在と、減数分裂および第一卵割期の動態はウエスタンブロットによって確認した。これまでの私の研究で減数分裂では既に CDK1、Cyclin B、Aurora A、CDC25 の存在は確認されているので Cyclin A2、BORA、PLK1 のみ確認した。カスケードの活性化の指標として PLK1 のリン酸化を用いることとし、リン酸化型 PLK1 も確認した。

(3) カスケードの機能解析には、各因子の人為的発現制御を主として行うこととし、未成熟卵の Total RNA より RT-PCR により Cyclin A2、BORA および PLK1 をクローニングし発現確認のための FLAG タグを付加したコンストラクトを作成した。実験には、以前クローニングした Cyclin B1、Cyclin B2 の asRNA も用いた。発現促進のためには mRNA を、発現抑制のためにはアンチセンス RNA (asRNA) を、ブタ未成熟卵あるいは活性化後 4 時間の卵の細胞質に顕微注入することとし、これらの RNA を in vitro 合成した。機能解析には補助的に因子の阻害剤も用いることとし、PLK1 阻害剤として 100nM BI2536、CDC25 阻害剤として 500μM パナデイトを培地に添加した。

(4) S 期の進行はプロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込みにより確認した。終濃度が 10μM

となるよう発生培地に添加して 24 時間の発生培養を行った後、ウエスタンブロットにより取り込まれた BrdU の量を画像解析により数値化した。

#### 4. 研究成果

(1) 各因子の動態解析では、Cyclin A2 (CCNA2) CDK1、BORA、PLK1 の存在、および MPF 活性化と同時期に PLK1 がリン酸化し活性化されることが、減数分裂(図 2)及び第一卵割期(図 3)の両開始時で明らかとなり、このカスケードの存在が示唆された。

(2) しかし、減数分裂開始時には Cyclin A の合成が起こらなかった(図 2)。また CDC25 抑制剤のバナデイトで減数分裂の開始 (GVBD) を抑制すると PLK1 のリン酸化が見られなくなるため(図 4)、PLK1 のリン酸化はカスケードが活性化したためではなく MPF 活性化の結果であると考えられた。

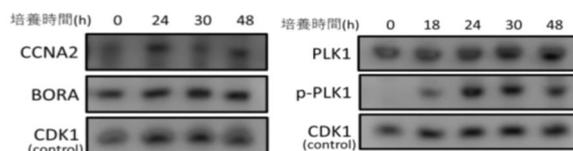


図 2 減数分裂期の各因子の動態

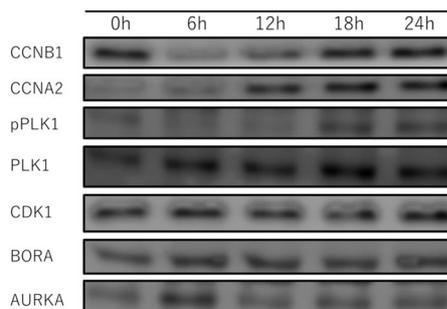


図 3 第一卵割期の各因子の動態

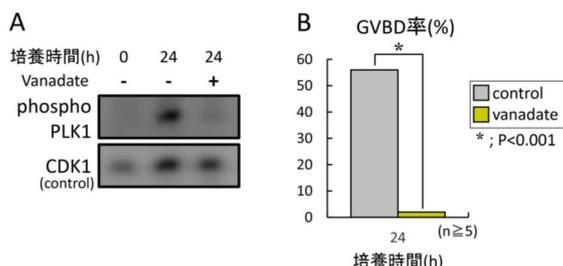


図 4 バナデイト添加培養卵の PLK1 リン酸化

分裂を抑制しても PLK1 のリン酸化が起こり、この機能は Cyclin A によるリン酸化部位の変異により消失する(図 6)ことから、Cyclin A → BORA → PLK1 と続くこのカスケードは機能す

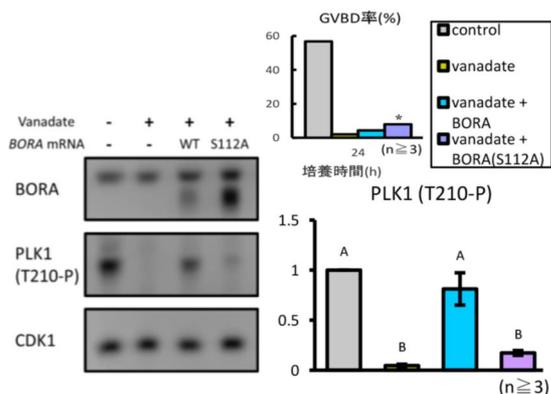


図 6 BORA による PLK1 のリン酸化

た。

(3) 一方、初期胚の第一卵割の開始時には PLK1 のリン酸化に加え、Cyclin A の合成も確認されており(図 3)、このカスケードの関与が期待される。そこで、この Cyclin A の増加を asRNA 顕微注入により抑制(図 7A)したところ、第一卵割が有意に低下し(図 7B)、多くの胚

また、PLK1 阻害剤の BI2536(図 5A)や PLK1 の asRNA(図 5B)で PLK1 を抑制しても減数分裂が開始することは、減数分裂期にこのカスケードは必要ないことを示している。

なお、BORA の発現を促進すると減数

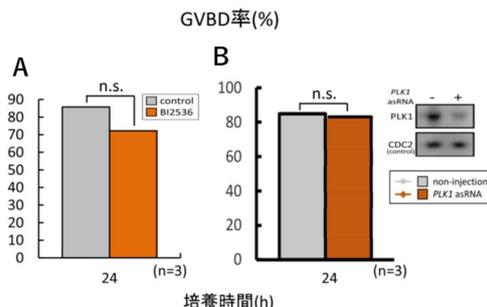


図 5 PLK1 阻害時の GVBD 率

ることが示唆される。

すなわち、このカスケード自体は減数分裂期にも機能し得るが Cyclin A が合成されないため、生理的には減数分裂開始に機能してないことが示唆され

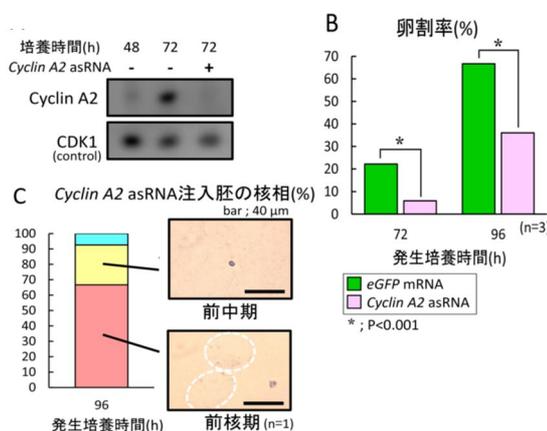


図 7 Cyclin A2 asRNA 注入胚の発生

が1細胞期の前核期に留まる(図7C)ことが示され、カスケードの関与を支持する結果であった。

Cyclin AはS期の進行にも機能するとされるため、S期抑制の結果として第一卵割を抑制している可能性も考えられる。そこで、DNAに取り込まれることが知られるプロモデオキシウリジン(BrdU)を培地に添加しCyclin A2の発現抑制下でのDNA合成をBrdUの免疫染色により確認した。その結果、Cyclin A2抑制区のBrdUの陽性率は94%と対照区の70%よりむしろ高かった。染色強度は対照区の約80%と若干低いもののDNA合成は十分起こっていると考えられた(図8)。したがって、Cyclin A2抑制がS期進行を妨げ第一卵割を抑制したという可能性は否定される。

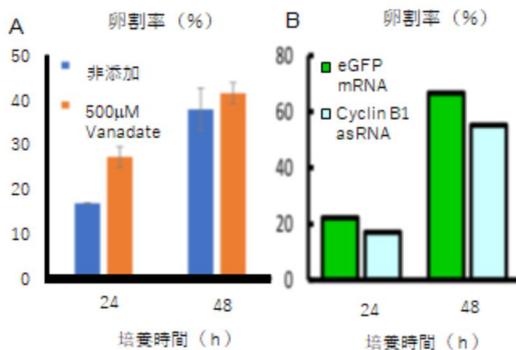


図9 バナデイト添加とCyclin B抑制による発生

Cyclin A/CDK1はCDC25活性への依存が低いことが知られており、これらの結果はブタ胚ではCyclin AがCyclin Bに代わってMPFとして直接作用するという重大な結果も示唆される。そこで、Cyclin A2を過剰発現したところ、全ての卵割が停止する(図10A)という予想外の結果であった。しかし停止した胚の核相は多くの胚が分裂中期像を示していた(図10B)。この結果は高濃度のCyclin A2が分解能を凌駕し、MPFとして作用したCDK1/Cyclin A2が分裂中期を誘導したと考えられ、Cyclin AがMPFとして働くことを支持する結果である。

以上、本実験結果はいずれもブタ初期胚ではCyclin AがCyclin Bに代わってCDK1複合体を形成しMPFとして直接作用する可能性を支持している。従来、卵母細胞や体細胞でMPFと考えられてきたCDK1/Cyclin B複合体が、ブタ初期胚では重要な役割を持たない可能性が示唆されたのは驚くべきことである。今後のさらなる研究確認が必要ではあるが、この示唆が得られたことは本研究の大きな成果である。

< 引用文献 >

(1) Vigneron S, et al., Dev Cell, 45, 637-650. (2018).

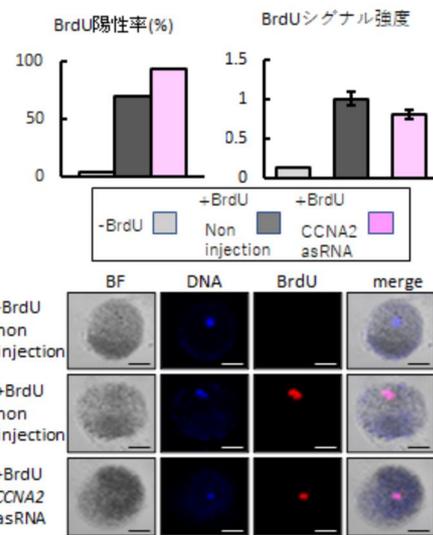


図8 Cyclin A2 asRNA注入胚のS期進行

第一卵割の開始時に見られたPLK1リン酸化がMPF活性化の結果である可能性を否定するためバナデイトでCDC25を阻害したところ、驚くべきことに減数分裂とは異なり第一卵割は抑制されないことが示された(図9A)。また、Cyclin B1を発現抑制した場合の卵割率はコントロールとほとんど差が無く(図9B)、Cyclin BがMPFとして作用しないことが示唆された。

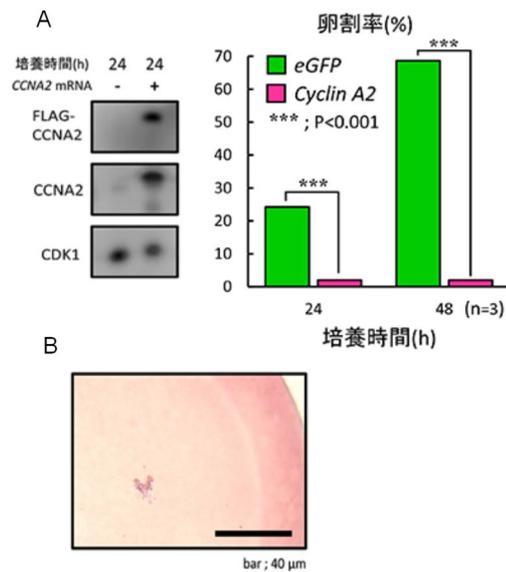


図10 Cyclin A2過剰発現による発生

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江口諒・淀澤天斗・藤井渉・杉浦幸二・内藤邦彦
2. 発表標題 ブタ卵成熟、初期胚発生におけるCyclin A(CCNA)の機能解析
3. 学会等名 第128回日本畜産学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------