

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580398

研究課題名(和文)プリン塩基代謝がウシ胚発生に及ぼす影響とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文)Effects of metabolism of purine derivatives on bovine embryo development

研究代表者

木村 康二(Kimura, Koji)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所家畜飼養技術研究領域・主任研究員

研究者番号：50355070

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)：本研究ではプリン誘導体のウシ胚発生に及ぼす影響について検討した。de novo プリン合成を抑制したところ、ウシ胚の胚性ゲノム活性化以前(8細胞期前)では胚発生に影響を与えなかったが、胚性ゲノム活性化後は胚発生が著しく低下した。さらに、この抑制効果はプリン誘導体(アデニン、ヒポキサンチン)の低下により回復することが示された。以上の結果から、胚性ゲノム活性化後はde novoプリン合成は胚発生に必要であることが示唆された。しかしながら過剰なプリン誘導体の存在は発生に悪影響を及ぼす(特にアデニン)ことが明らかとなった。さらに過剰なアデニンは核の断片化を誘起することが示された。

研究成果の概要(英文)：The effects of metabolism of purine derivatives on bovine embryo development were investigated. When de novo purine synthesis was inhibited, the embryo development after maternal-to-zygotic transition (MZT) was severely compromised. Moreover, when the purine derivatives (adenine or hypoxanthine) were supplemented in the presence of the inhibitor for de novo purine synthesis, the inhibitory effect disappeared. These results suggested that purines are necessary for bovine embryo development after MZT. However, excess amount of purine derivatives (especially adenine) deteriorated bovine embryo development. In the presence of excess amount of adenine after fertilization, the cleavage of the embryo was arrested and the fragmentation of nuclear was induced.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：ウシ 胚 代謝 プリン誘導体

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の卵子の体外成熟・受精・胚の体外培養技術は、生殖医療に貢献しただけでなく、畜産においても優良子畜生産性の向上をもたらすと期待されている。ウシにおいては、食肉センターで本来廃棄される卵巣から未成熟卵子を採取し、体外で成熟・受精・培養することによって胚盤胞期胚の作出が可能となっており、この技術を用いることによって子畜生産が行われているが、その普及率は極めて低い。体外で作出された胚は体内で受精・発育した胚と形態的には見分けがつかないが、細胞生理学的・分子生物学的には大きく異なることが示唆されており、これに起因すると見られる生存性の低下や産子の異常(過大子)がこの技術の普及を妨げている一因である。さらに現在のところ、使用される卵子のうち胚盤胞期胚へ発生するものは、40%に過ぎず、これらの状況は現在の体外成熟・受精・培養技術には改良の余地があることを示唆している。

ウシ発生初期胚は成体細胞と比べて特異な特徴を備えている。例えば受精したのち、胚は自らのゲノムの転写をほとんど行わず、卵子由来の mRNA やタンパク質を利用して発生する。その後、胚ゲノムを活性化させて転写・翻訳を開始し、胚主導性の発生を行う。またこの間、DNA の脱メチル化とメチル化等により胚性ゲノムのインプリンティングが生じる。これらエピジェネティックな変化だけでなく、胚発生においてエネルギー代謝も大きく変化し、ウシの場合、胚ゲノム活性化以前はほとんどグルコースを代謝・利用することは無いが、その後は徐々にその利用を高め、胞胚腔形成時(桑実期から胚盤胞期)にかけて急激に利用レベルが上昇することが知られている。これらウシ胚特有のエネルギー代謝系の解明は培養液の改良につながり、飛躍的に体外培養での発生率を向上させた。しかしながら、その他の物質についての詳細な検討は少なく、体外での胚培養技術の改良には解決しなければならない問題である。

細胞の分裂には、その動力源となるエネルギー基質だけでなく、酵素や様々な物質を構成するタンパク質や RNA、DNA の原料となる核酸が必要とされる。現在のウシ胚体外培養には合成卵管培地(SOF)や CR1aa を基礎とした培養液が用いられているが、いずれもエネルギー基質およびアミノ酸を含むが、核酸を構成する塩基は添加されていない。DNA や RNA を構成する塩基はプリンおよびピリミジン塩基である。プリン塩基はグアニン・アデニン・ヒポキサンチン等を含み、グルコースからペントース・リン酸経路(PPP)を経て生合成され、ピリミジン塩基はウラシル・チミン・シトシン等を含み、L-グルタミンを原料にウリジル酸を経て生合成される。ウシ培養液にはL-グルタ

ミンが添加されているため、ピリミジン塩基の生合成が行える可能性があるが、グルコース利用性の低いウシ胚では PPP を経たプリン塩基の生合成は低いと考えられる。このようなウシ胚の特徴的な代謝系を考慮すると、プリン塩基のウシ胚における代謝と発生に及ぼす影響は非常に興味深いが、プリン塩基のウシ胚での代謝およびその胚発生への関与についての報告は見られない。

2. 研究の目的

ウシ初期発生胚は成体細胞と比べて特異な性質を備えている。そのため胚の培養法(低グルコース・低酸素等)は非常に特殊である。ウシ胚培養系の改善のため、さまざまな物質のウシ胚における代謝が明らかとなっているが、核酸の主要構成成分である塩基については未解明な点が多い。本研究ではプリン塩基に注目し、ウシ胚におけるこの物質代謝を明らかにすることでウシ胚培養系の改良に新規の情報をもたらすとともに、プリン塩基のウシ胚発生に及ぼす影響のメカニズムについて検討する。

3. 研究の方法

食肉センター由来卵巣より卵丘細胞・卵子複合体を回収し、22-24 時間 FSH およびピルビン酸ナトリウムを含む 10%FBS 添加 M199 培地中で成熟させた。成熟後パコールで洗浄した凍結融解精液を用いて 0.6% BSA, 20 μ g/mL ヘパリンを含む IVF-TL 中で IVF を行った。媒性後 18 時間後、胚を培地中から取り出し、卵丘細胞を除去した。これらの胚を 0.4% BSA 添加修正合成卵管液(mSOF) 25 μ L に 25 個ずつ移し、低酸素(5%)下で培養した。培養後 48 時間で 8 細胞期胚への発生率を検討するとともに 8 細胞期胚を回収し、25 個ずつ 50 μ L の 1.5mM Glucose, 0.4% BSA 加 mSOF に移し、低酸素下で培養した。培養開始 5 日後胚盤胞期胚への発生を検討した。

(1) de novo プリン合成抑制がウシ胚発生に及ぼす影響: プリン合成がウシ胚発生に必要なことを検討するために de novo プリン合成阻害剤であるアミノプテリンを 0, 1, 10 または 100 μ M を 1-8 細胞および 8 細胞-胚盤胞期の発生培地に添加し、分割率、8 細胞への発生率、胚盤胞期胚への発生率について検討した。

(2) de novo プリン合成抑制状態におけるプリン誘導体の培養液への添加がウシ胚発生に及ぼす影響:(1)で 8 細胞以降に de novo プリン合成を抑制すると胚発生が抑制されることが明らかとなったが、この状態がプリン誘導体の添加により解除されるか否かについて検討した。8 細胞期胚以降の培養液にアミノプテリン 100 μ M を添加し、さらにこの培地に 0, 0.1, 1mM のヒポキサンチン(HTX)またはアデニン(AD)を加え胚盤胞期胚への発生率を検討した。

(3) プリン誘導体のウシ胚発生に及ぼす影

響：プリン誘導体(HXT, AD)のウシ胚発生に対する影響を検討するために、ウシ胚発生培地に HXT および AD をそれぞれ 0, 0.1, 1mM(1-8 細胞期)または 0, 1, 5mM(8 細胞期-胚盤胞期)添加し、卵割率、8 細胞期胚への発生率および胚盤胞期胚への発生率について検討した。

(4) アデニンの第一卵割に及ぼす影響：アデニンは顕著に 1 細胞期胚の初期卵割に影響を及ぼしていたため、卵割を停止した胚の核相について検討した。授精後 18 時間のウシ胚にアデニン 1mM またはオロモウシン(プリン誘導体、cdk2 阻害剤)を添加し、24 時間後に卵割を停止した胚の核膜を免疫染色し、核相の評価を行った。

4. 研究成果

(1) de novo プリン合成抑制がウシ胚発生に及ぼす影響：de novo プリン合成阻害剤であるアミノプテリンの授精後 18 時間(前核期)から 66 時間(8 細胞期)までの添加は卵の分割率、8 細胞期胚への発生率に影響を及ぼさなかった(表 1)。しかしながら、8 細胞期から胚盤胞期への添加では、10 および 100 μM のアミノプテリン添加により有意に胚盤胞期胚への発生が阻害された(図 1)。

表 1. プリン合成抑制がウシ初期胚発生(1~8 細胞期)に及ぼす影響

AP coc. (μM)	No. embryos		
	treated	cleaved (%)	>8 cell (%)
0	400	283 (70.8) ^a	129 (32.3) ^a
1	400	284 (71.0) ^a	130 (32.5) ^a
10	400	293 (73.3) ^a	141 (35.3) ^a
100	400	283 (70.8) ^a	119 (29.8) ^a

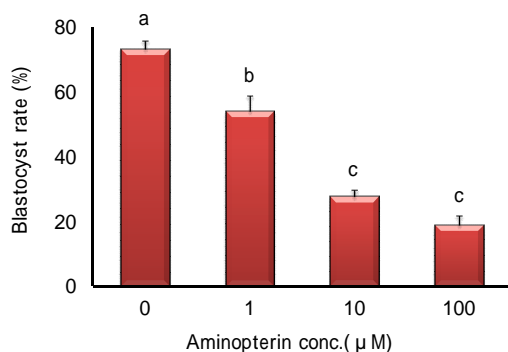


図 1. プリン合成抑制がウシ初期胚発生(8 細胞期~胚盤胞期)に及ぼす影響。

異符号間で有意差有 (P<0.05)

(2) de novo プリン合成抑制状態におけるプリン誘導体の培養液への添加がウシ胚発生に及ぼす影響：アミノプテリン添加により 8 細胞期胚の胚盤胞期胚への発生は有意に低

下したが、HXT および AD の添加により発生率は有意に改善した(図 2)。

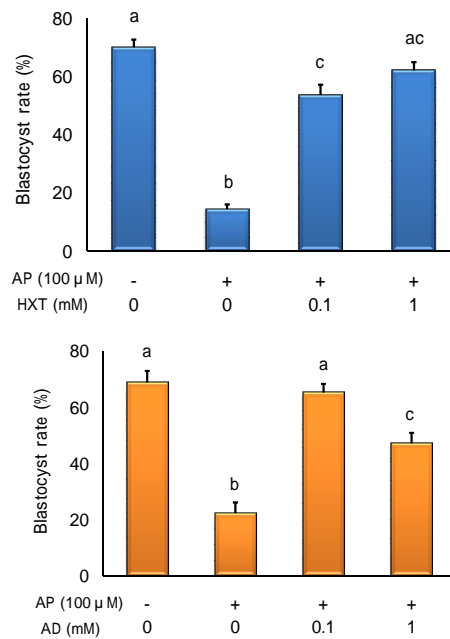


図 2. プリン合成抑制剤存在下でのプリン誘導体(HXT または AD)の添加がウシ胚発生に及ぼす影響

異符号間で有意差有 (P<0.01)

(3) プリン誘導体のウシ胚発生に及ぼす影響：1-8 細胞期胚への培地への HXT 添加は卵割率および 8 細胞期胚への発生率に影響を及ぼさなかったが、1mM の AD 添加は有意に卵割率と 8 細胞期胚への発生率を有意に低下させた(表 2)。8 細胞期胚-胚盤胞期胚への HXT 添加は 5mM 濃度で有意に発生を抑制したが、AD では 1mM 濃度で有意に発生を抑制した(図 3)。

表 2. プリン誘導体添加がウシ初期胚発生(1~8 細胞期)に及ぼす影響

purine	conc.(mM)	no. of embryos		
		treated	cleaved (%)	>8-cell (%)
-	-	550	402(73.1) ^a	245(44.5) ^a
adenine	0.1	550	358(65.1) ^a	200(36.4) ^a
	1	550	3(0.5) ^b	0(0) ^b
hypoxanthine	0.1	550	381(69.3) ^a	216(39.3) ^a
	1	550	381(69.3) ^a	210(38.2) ^a

異符号間で有意差有 (P<0.01)

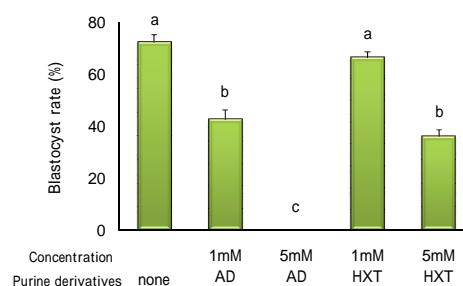


図3. プリン誘導体添加がウシ初期胚発生(8細胞期～胚盤胞期)に及ぼす影響

異符号間で有意差有(P<0.01)

(4) アデニンの第一卵割に及ぼす影響：授精後18時間では77%の胚に2つの前核が確認された。アデニンを添加し発生を停止した胚においては二前核を保有していた胚は13%と有意に低下していたが、オロモウシンを添加により発生を停止した胚では二前核を保有していた胚は40%と有意に高い値であった。また、アデニンを添加し発生を停止した胚においては核の断片化が見られ(図4)、その率は51%に昇ったが、オロモウシン添加では14%と有意に低い値であった。

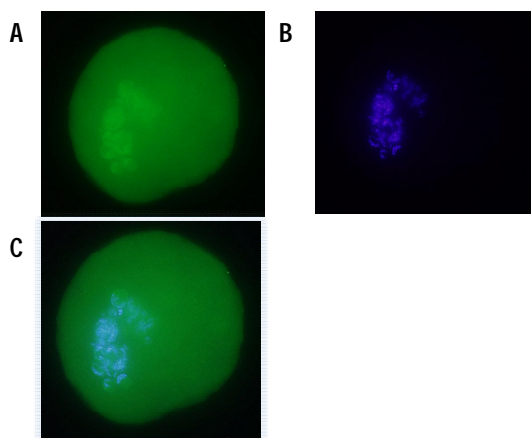


図4. 1mM アデニンで処理した卵割停止ウシ1細胞期胚。A: ラミンA/C抗体での免疫染色。各の核の胞状化が見られる。B: DAPIによるDNA染色。染色質が断片化している。C: AとBを重ねた写真

以上の結果から、ウシ胚の胚性ゲノム活性化以後(8細胞期以降)ではde novoプリン合成は必要である、しかしながら過剰なプリン誘導体の存在は発生に悪影響を及ぼす(特にアデニン)ことが明らかとなった。さらに過剰なアデニンは核の断片化を誘起することが示された。

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)

[雑誌論文](計 1件)

Kimura K, Matsuyama S: Sexual Dimorphism during Early Embryonic Development in Mammals, *J. Mam. Ova Res.*, 29, 103-112 (2012). DOI:10.1274/jmor.29.103

[学会発表](計 1件)

木村康二、松山秀一、プリン塩基代謝のウシ胚発生に及ぼす影響、第105回日本繁殖生物学会大会(2012.9.7) 筑波大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 康二 (KIMURA Koji)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜飼養技術研究領域・主任研究員

研究者番号：50355070

