

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292160

研究課題名(和文)ブタ着床前発生胚におけるシーリングタンパク質クローデインの発現性と胚の発生能

研究課題名(英文)Expression of claudin family proteins in preimplantation embryos in the pig

研究代表者

三宅 正史(MIYAKE, MASASHI)

神戸大学・統合研究拠点・名誉教授

研究者番号：60093316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,500,000円

研究成果の概要(和文)：ブタ胚盤胞はclaudin-1, -4, -6, -7, -8, -9, -12, -14を発現し, claudin-4, -6, -7はTJ上に, 他のclaudinsは細胞質性のTJ異所性に分布しており, ブタ胚盤胞には claudin-4, -6, -7が重要である。claudin-1, -4のKDは初期分割率を著しく低下させることが分かった。claudinsの発現変化から胚の潜在的発生能力を評価するための基礎データとして, ブタ着床前発生によるグルコースの代謝特性を調べ, 糖質代謝特性は4細胞前後で異なること, ヘキソース生合成経路とGlcNAc修飾が着床前発生に重要な役割を持つことが分かった。

研究成果の概要(英文)：The expression of claudin family, tight junction (TJ) were examined in pig blastocysts derived from activated diploids. Blastocysts expressed both mRNAs and proteins of claudin-1, -2, -4, -6, -7, -8, -9, -12 and -14. While claudin-4, -6 and -7 localized along the cell-boundary TJ structure, the other claudins were cytoplasmic. These results suggest that claudin-4, -6 and -7 are important for the TJ functions in pig blastocysts. Knockdown of claudin-1 and -4 by their siRNA severely suppressed the early cleavage.

To examine whether expression patterns of the claudins will be employed as markers for the potential developmental ability of in vitro produced blastocysts in future, features of glucose metabolism was examined in pig preimplantation embryos. It was shown that recommendation of carbohydrates are different depending on the preimplantation developmental stages and hexose biosynthesis pathway and GlcNAcylation have important roles in pig preimplantation development.

研究分野：農学 / 動物生命科学 / 繁殖

キーワード：着床前発生 タイトジャンクション claudins グルコース代謝 活性化2倍体 ブタ

1. 研究開始当初の背景

タイトジャンクション (TJ) の形成過程では、膜貫通型タンパク質 (occludin, claudin, junctional adhesion molecule など)、ならびに zonula occludens (ZO) のような TJ 構造タンパク質を細胞骨格につなぐプララクタンパク質が細胞間境界領域に集まる。TJ を持つシート状の上皮は、外部環境と、上皮が取り囲んだ内部環境の間を、選択的に分子を輸送する。分子は、上皮の細胞経路と細胞間隙を介して輸送 (傍細胞間隙輸送) され、上皮下に固有の内部環境を形成する。このように、外部の環境から隔離された内部環境を形成するためには、上皮細胞間から分子が漏出しないように細胞間をシーリングするバリア構造と、選択的な分子輸送経路の確立が必要になる。傍細胞間隙における、シーリングには TJ とアドヘレンスジャンクションが、また分子の選択的透過性には TJ が深く関わっており、なかでも上皮の頂端膜領域に形成される TJ は重要な機能を持つと考えられていた。上皮に囲まれた内側に固有の環境を形成するには、形成される組織固有のバリア特性とイオンや水などの低分子に対する選択的透過性を、TJ は持つ必要がある (Furuse ら, 2001; Turksen and Troy, 2004)。TJ を構成する多くの膜タンパク質についての分析の結果、claudin タンパク質が同定され (Furuse et al., 1998)、細胞膜密着部の TJ のシーリングストランドを構成する主要分子で、バリア機能の中心的役割を持つことが明らかにされた (Furuse and Tsukita, 2006; Van Itallie and Anderson, 2005)。claudin は多くのアイソフォームから構成され、マウスでは 27 の重複遺伝子群から構成され、分子量が約 23 kDa の 4 回膜貫通型のタンパク質である。N 末、C 末の両端を細胞質側に向けて配置し、細胞の外側には 2 つのループ構造を保有する (Furuse and Tsukita 2006; Günzel and Yu, 2013)。claudin は転写レベルと翻訳後の修飾によって動的に調節され、必要に応じて細胞膜から細胞内へ急速に取り込まれる (Matsuda et al., 2006; Guillemot et al., 2008)。細胞外にある 2 つのループ構造は、ホモあるいはヘテロの形で隣接する細胞の持つ claudin の細胞外ループと結合し、高分子に対しては厳密なバリアとして、またイオンや水のような低分子に対しては、細胞間隙に透過性の高い「孔」や選択透過性の高いチャネル様の機能を持たせ、内部環境を確立することが強く示唆されている (Günzel and Yu, 2013)。

哺乳動物の着床前発生過程では、受精した卵は数回 (回数は種依存的) の初期分割を経た後、E-cadherin が介在する細胞間の接着結合が生じ、それぞれの割球が見かけ上不鮮明になる現象、いわゆるコンパクションを起こす。これに続いて外側の細胞間に TJ が形成され、胚盤胞形成と栄養外胚葉ならびに内細胞塊細胞の分化に重要な役割を果たす (Biggers

et al., 1988; Watson et al., 2004)。体細胞では、TJ 形成と機能について、分子生物学的解析が相当進んでいるが、なお不明な点も多く残されている。

哺乳動物の着床前発生過程では、TJ の形成時期とそれを構成する代表的なタンパク質の細胞間領域への集積について、主にマウスで研究が進んでいる。マウスでは、8 細胞を超えると TE の分化が始まり、E-cadherin と β -catenin (E-cadherin/ β -catenin) 複合体による細胞間接着が生じてコンパクションを開始すると、外側の細胞が分極する (Hyafil et al., 1980; Ohsugi et al., 1996)。16 細胞から 32 細胞にかけて、外側の割球は上皮系組織の栄養外胚葉へ分化し、続いて胞胚腔を形成する (Collins and Fleming, 1995; Eckert and Fleming, 2008)。胚内部に水が貯められると胚盤胞と呼ばれ、内細胞塊細胞に外部から独立した固有の内部環境を提供する。このような上皮によるバリア機能と低分子の選択透過性には、上記のように TJ に発現している claudin family の種類や発現量が深く関わっていることから、着床前胚における claudin family の発現性について情報を得ることは重要である。マウスでは、調べられた 24 の claudin タンパク質の中で、体細胞上皮では広範に発現されている claudin-1, -2 は、直接関与することはなく、claudin-4, -6, -7 が栄養外胚葉の TJ に局在しており、claudin-4, -6 を阻害すると正常な胚盤胞形成が著しく阻害されることから、TJ の正常な機能に claudin-4/-6 が重要であると考えられている (Moriwaki et al., 2007)。一方、ウシやブタに代表される大型有用動物やヒトにおいては、マウスのような系統だった研究はなされていない。ウシ胚では体外生産胚のコンパクション率は体内発生胚より低く (Holm et al., 2002)、培地の組成により、TJ 関連タンパク質の mRNA の転写量に差が見られている (Miller et al., 2003)。ヒト胚では、occludin や ZO-1 α の局在性がアミノ酸代謝に関係し (Eckert et al., 2007)、栄養外胚葉の分化に影響することが懸念されている (Ghassemifar et al., 2003)。ブタ胚では、ZO-1 と occludin の mRNA とタンパク質の発現性について、詳細に明らかにされている (Xu et al., 2011)。

着床前胚の体外発生では、発生遅延や発生率の低下が認められたり、正常に発生していても生存性が低かったりして、子宮へ移植後の妊娠率の低下や周産期死亡率の増加や、異常胎児の発生要因の一つとして考えられている。体外培養における TJ をはじめとする細胞間結合、細胞接着構造の形成不全も、これらの要因の一つとして捉えられる。しかし、研究開始時点では、栄養外胚葉の高分子に対するシーリング機能と低分子の選択透過機能に関わる claudin family について、マウス以外の哺乳動物の着床前胚では何も明らかにされてなかった。研究代表者らは、

claudin-1, -2 と-4 の mRNA とタンパク質の発現性を、ブタ活性化 2 倍体を用いて予備実験として調べ、claudin-2 の発現は見られず、claudin-1 と-4 の発現を確認していた。しかしブタ胚盤胞では、claudin-4 は TJ 構造に局在が確認されたが、claudin-1 は胚細胞の細胞間領域に集積することなく、TJ 構造の観点からは異所性発現を示した。

2. 研究の目的

哺乳動物胚の着床前発生過程では、胚性遺伝子の活性化不全により初期分割期に起こる発生停止と、機能的、有機的統合が胚に起こるコンパクションから胚盤胞形成に至る期間に起こる様々なストレスの蓄積による、胚の体外生産効率の低下が胚生産効率低下の大きな問題として捉えられている。後者では、着床前の発生遅延や発生停止にとどまらず、見かけ上正常な胚でも、体外環境による多様なストレスの蓄積が、胚移植後の体内発生に影響すると推測され、その結果、胚の体外生産効率を下げると考えられている。この時期には、細胞間接着因子の機能的発現と、それに続く栄養外胚葉細胞間における TJ 形成によって、胚固有の内部環境が創成されるので、機能的な TJ は胚盤胞の形成と維持に必須であり、この時期に起こる顕在的、ならびに潜在的な発生能力の低下は、体外における胚生産に大きな問題であるとともに、潜在的発生能力を示すマーカーの重要な候補と考えられる。

しかしながら、大型有用動物のブタやウシでは、発生過程で最初の分化に必須である TJ の機能タンパク質に関連する研究は存在しない。マウス胚盤胞では、細胞間のシーリング機能と TJ の低分子透過性に関わるシーリングタンパク質である claudin-4, -6 ならびに-7 を栄養外胚葉に発現し、機能的役割を持つことが知られている (Moriwaki et al., 2007)。そこで、本研究の開始に先立ち、桑実胚以降のブタ活性化 2 倍体における claudin-1 および claudin-4 の発現性を予備的に調べ、claudin-4 は TJ 構造を反映するが、claudin-1 は反映しない細胞質を中心とする分布を示すことを確認した。予備実験結果をもとに、本研究では、(1)「ブタ着床前発生過程における claudin family タンパク質の発現性」を mRNA レベルとタンパク質レベルで明らかにする、着床前発生におけるそれらの役割の解明を開始する。ここでは、(2)「claudin-1, claudin-4 タンパク質の着床前発生における機能」について分析する。次に、将来 claudins を中心とする TJ 関連の主要タンパク質の発現性と胚の発生能力との関係を分析することによって、胚の潜在的発生能力の評価マーカーとしての可能性を検討することが予測されるが、そのための基礎データの収集を計画した。本研究では、(3)「ブタ着床前発生におけるグルコースの代謝特性」を解析するとともに、研究結果の解釈に

欠かせない、(4)「ブタ活性化 2 倍体における胚性遺伝子の活性化時期」を明らかにする。

3. 研究の方法

哺乳動物の受精では、発生の開始である「卵母細胞の活性化」は精子の細胞内侵入により誘起されるが、物理的あるいは化学的刺激によっても、卵母細胞は活性化される。人為的に活性化された卵母細胞は通常の受精卵のように発生を開始して胚盤胞を形成するが、一般にゲノムを倍数化した活性化 2 倍体の方が発生能力は高くなる。しかし、活性化 2 倍体を移植しても、偏親性発現を起こすジーンインプリンティングが原因となり、種に依存した着床後の一定時期に妊娠は中断される。人為的活性化は、胚の初期発生の基礎研究、精子の細胞質内注入、核移植法によるクローン生産に利用されている。卵巣由来の未成熟卵母細胞を利用し、体外成熟と体外受精技術を活用した胚の体外生産について、ブタにおいても長年研究されているが、高い多精子受精率により、安定的に単精子受精卵を高率で確保するのが未だに困難である。研究代表者らは、電気刺激によるブタ活性化 2 倍体は高率かつ同期的に活性化され、少なくとも胚盤胞までの発生率は非常に高いだけでなく、体内受精卵に匹敵する発生速度と細胞増殖性を示し、受精卵の発生モデルとして十分利用できることを明らかにしてきた (Kure-bayashi et al., 2000; Thuan et al., 2002; 2003)。本研究では、正常発生する胚を安定して得るために、食肉市場で廃棄される卵巣から、卵胞切り出し法により未成熟卵母細胞を採取し、卵丘細胞・顆粒膜細胞・卵胞殻との共培養法で 42 ~ 46 時間成熟培養後、電気刺激法による活性化に続いて、サイトカラシン D 処理により第 2 極体の放出を抑制して作成した活性化 2 倍体を用いた。活性化 2 倍体は基本的に PZM3 (Yoshioka et al., 2002) で、(3)を除いて活性化後 144 ~ 168 時間まで培養し、必要な発生段階の着床前胚を生産した。成熟、発生過程とともに未成熟卵と活性化 2 倍体の培養は、すべて炭酸ガス培養器内で行われた (Thuan et al., 2002; 2003)。

(1) ブタ着床前発生過程における claudin family タンパク質の発現性：

mRNA の発現性：電気刺激活性化後 96, 120, 144 時間に桑実胚、初期胚盤胞、拡張胚盤胞、ならびに対照としてブタ腎上皮細胞株 LLC-PK1 から、市販のキットを用いて全 RNA を抽出後、RT-PCR 法により claudin family の RNA 転写の有無を調べた。Moriwaki et al. (2007) によってマウス胚で解析された 24 の claudin family の内、すでに解析した claudin-1, -2, -4, およびブタの遺伝子配列を確認できなかった claudin-13, -21, -24 を除く 18 の suscrofa の claudin family 遺伝子に対するプライマーを、NCBI および Pub Med のコーディング配列情報を基に Web Primer (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>) を用いて

設計した。

タンパク質の発現性：の結果から、桑実胚以降に mRNA の発現が認められた claudin-6, -7, -8, -9, -12, -14, と、すでに TJ 領域での発現を確認している claudin-4 について、活性化後 72 時間から 144 時間まで 24 時間ごとに得られた後期 4 細胞、桑実胚、初期胚盤胞、拡張胚盤胞、ならびにカバーガラス上に接着培養した LLC-PK1 細胞に対して、間接免疫蛍光法で発現性を調べた。

(2) claudin-1, claudin-4 タンパク質の着床前発生における機能： TJ 異所性発現を示した claudin-1 と TJ 上に機能性発現を示した claudin-4 に対して、siRNA を利用したノックダウン (KD) 法と CLDNs-GFP mRNA の導入により過剰発現を誘導し、それぞれが着床前発生に及ぼす影響について活性化 2 倍体の培養試験で解析した。

claudin-1, -4 の KD が着床前発生に及ぼす影響： RNAi Designer によって gene bank のブタ claudin-1, 4 の EST 配列 (accession number: DN120135) を用いて CLDN1 ならびに CLDN4 の siRNA をそれぞれ 3 種類ずつ設計した。トランスフェクションにより LLC-PK1 細胞に導入後、発現量の低下により KD 効果を確認し、効果の高いものを選択して電気刺激 4 時間後の活性化 2 倍体に 20 μ M の siRNA を卵子当たり約 10 μ l ずつ注入した。siRNA 注入後の活性化 2 倍体を活性化後 168 時間まで培養して、発生への影響を調べた。

claudin-1, -4 の過剰発現が着床前発生に及ぼす影響：市販のキットを用いて in vitro 転写後、ブタ CLDN1-EGFP および CLDN4-EGFP を 1 μ g/ml に濃度調整し、電気刺激後 4 時間後の活性化 2 倍体に siRNA と同様に 10 μ l ずつ注入して過剰発現を誘導した。その後、活性化 2 倍体を 168 時間後まで培養し、発生率および胚盤胞の細胞数を調べた。EGFP の蛍光および WB により claudin-1 の発現レベルを確認した。

(3) ブタ着床前発生におけるグルコース (Glu) の代謝特性の解析：着床前発生期間のブタ胚は、Glu や Fructose (Fru) や、Pyruvate/Lactate (Pyr/Lac) など糖質性の主要エネルギー基質の存在下で発生するが、矛盾する報告も存在している。本研究では、糖質、特に Glu 代謝特性に着目して、以下の項目について調べた。

糖質性主要エネルギー基質、Glu, Fru ならびに Pyr/Lac がブタ着床前発生に及ぼす影響：種々の発生時期から Glu と Fru を培地に添加するとともに、Pyr/Lac の有無と組合せて、ブタ胚における Glu と Fru の代謝特性について、活性化後 216 時間まで培養した時の、胚の発生パターンと発生率から分析した。

ブタ着床前胚の糖新生能力：の結果から、ブタ着床前胚の糖新生能力について以下の方法で調べた。種々の発生段階のブタ活性化 2 倍体における、Glu 合成に必須の 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) の mRNA 発現を RT-PCR 法で、糖新生反応の律速酵素、PEPCK のタンパク質発現を間接免疫蛍光法で解析した。

ブタ着床前胚におけるヘキソサミン合成経路 (HBP) および O-GlcNAc 修飾とその機能：着床前胚による Glu の利用は、エネルギー源の観点から研究が進められてきたが、Glu はエネルギー基質以外に、ペントースリン酸経路を介してリボース生産やタンパク質の O-GlcNAc 修飾に利用される。マウスでは、着床前胚は Glu を HBP を通じて代謝し、この経路が胚盤胞形成に必要とされる (Pantaleon et al., 2008)。しかし、の結果から、ブタでは胚盤胞形成に Glu は必要としないので、HBP とタンパク質の O-GlcNAc 修飾の機能がマウスとは異なることを推測した。ブタ着床前胚における HBP および O-GlcNAc 修飾の有無と着床前発生における機能について、HBP の律速酵素、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), ならびに O-GlcNAc をタンパク質に転移する O-GlcNAc transferase (Ogt), 除去する O-GlcNAcase (Oga) の mRNA の発現性、および OGA および O-GlcNAc 修飾タンパク質の発現性を解析した。また、OGT, OGA の阻害が、胚の着床前発生に及ぼす影響を胚培養試験により解析した。

(4) ブタ活性化 2 倍体における胚性遺伝子の活性化 (ZGA) 時期：ブタ活性化 2 倍体の ZGA は明らかにされていないので、5-ethynyl uridine (5-EU) を RNA の前駆体として、市販のキットを用いて新規合成 RNAs を蛍光染色し、ブタ活性化 2 倍体における胚性 RNAs 合成開始時期を調べた。こ初期分割期の活性化 2 倍体の mRNA 転写能力を確認するために、RNA polymerase II (RNAP II) の転写活性に関わる RNAP II largest subunit C-terminal domain (RNAP II CTD) Ser 2 および Ser 5 のリン酸化パターンを、初期分割期の活性化 2 倍体に間接免疫法を実施し、解析した。

4. 研究成果

(1) ブタ着床前発生過程における claudin family タンパク質の発現性

mRNA の発現性：CLDN6, CLDN7, CLDN9, CLDN12, および CLDN14 は、分析した桑実胚、早期胚盤胞ならびに拡張胚盤胞において発現が認められたが、CLDN8 は胚盤胞から発現していた。また、PCR の増副産物のシーケンス解析を行い、いずれも目的のブタ DNA 配列が増幅されていることを確認した。本研究を開始する前に、予備的に解析を開始していた claudin family を加えると、ブタ胚盤胞では、CLDN1, CLDN4, CLDN6, CLDN7, CLDN8, CLDN9, CLDN12 および CLDN14 の 8 つのアイソフォームを発現していた。

タンパク質の発現性：claudin-1, -4, -6, -7,

-9, -12 ならびに -14 は後期 4 細胞以降桑実胚まで主に細胞質に分布しており、胚盤胞では claudin-8 (胚盤胞のみ分析) を含めて、細胞質と核あるいは核周囲に局在する傾向が認められ、TJ の観点から異所性の分布を示していた。claudin-4, -6 および -7 は、後期 4 細胞では細胞質性分布を示していたが、桑実胚から細胞間領域に集まり始め、ネット状に分布していた。胚盤胞には、claudin-4 は細胞間領域に強く局在していたが、claudin-7 は細胞質にも分布が認められた。claudin-6 は細胞間領域の局在は弱く、その多くが細胞質に分布していた。したがって、ブタ胚においても、マウス同様に claudin-4, -6, -7 が TJ の構造と機能に重要な役割を持つことが示唆された。また、claudin-7 が細胞間領域へ最初に集合し、ついで claudin-4, 最後に claudin-6 の順に集合することが明らかになった。

(2) claudin-1, claudin-4 タンパク質の着床前発生における機能

claudin-1, -4 のノックダウン(KD)が着床前発生に及ぼす影響: siRNA による 1 細胞からの KD によって、胚盤胞における claudin-1 の発現は低下することが確認できた。これによって、卵割率が低下し、コンパクトおよび胚盤胞への発生率も激減するとともに、胚盤胞の細胞数についても有意に減少することが明らかになった。claudin-4 の siRNA による KD でも、胚盤胞における claudin-4 の発現は減少し、卵割率の低下と発生遅延が見られ、コンパクトおよび胚盤胞への発生率も著しく低下することが明らかになったが、現在、メカニズムについてはまったく解明されていない。

claudin-1, -4 の過剰発現が着床前発生に及ぼす影響: CLDN1-EGFP を注入された活性化後 48 時間の早期 4 細胞では claudin-1 の過剰発現が WB により確認された。EGFP の蛍光から、2 細胞、早期 4 細胞では細胞間領域に蛍光が集まっており、この時期に、過剰発現に起因する細胞間領域への集合が起こった可能性を示唆していたが、後期 4 細胞以降には、おそらく発現量の低下から細胞間領域への集合は見られなかった。144 時間後の胚盤胞では、EGFP, WB とともに EGFP の蛍光は非常に弱くなり、過剰発現は認められなかった。一方、卵割率や初期胚盤胞の発生率には影響がみられず、胚盤胞の細胞数にも変化はなかった。CLDN4-EGFP を注入して claudin-4 を過剰発現させると、2 細胞から胚盤胞まで EGFP の蛍光が強く認められ、過剰発現が生じていたが、卵割率、桑実胚および初期胚盤胞の発生率には影響しなかった。しかし、拡張胚盤胞の形成率と構成細胞数の低下が見られた。

(3) ブタ着床前発生におけるグルコースの代謝特性の解析:

糖質性主要エネルギー基質, Glu, Fru ならびに Pyr/Lac がブタ着床前発生に及ぼす影響: 活性化直後から糖を加えると、144 時間以後

の胚盤胞の割合は, Glu と Pyr/Lac が共存するより, Pyr/Lac だけの方が高く, Glu は見かけ上胚盤胞への発生を抑制したが, Fru では差がなかった。早期 4 細胞 (活性化後 48 h) 以降から Glu と Pyr/Lac が共存させても、発生率に差はなかった。一方、糖単独では、Glu は活性化直後から胚盤胞まで常に発生を支持するが、Fru 単独では 4 細胞で発生を停止した。活性化 2 倍体を後期 4 細胞 (72 h) まで Pyr/Lac 存在下で発生させると、その後、糖質のない培地でも、桑実胚から拡張胚盤胞に正常に発生し、192 時間後まで糖質の存在下と同等の拡張胚盤胞への発生率を示した。以上の結果から、ブタ胚では、ZGA 時期 (4) 参照) の 4 細胞前後で、糖の代謝特性が大きく変化することが明らかになった。

ブタ着床前胚の糖新生能力: どの着床前発生段階の胚も、G6p, Fbp, Pepck, および Pc の mRNA と、律速酵素である PEPCK タンパク質を発現していたことから、ブタ着床前胚は Glu 新生能を持つことが示唆された。

ブタ着床前胚における HBP, および O-GlcNAc 修飾の存在と機能: Gfpt および Ogt mRNA はすべての発生段階の 2 倍体に、Oga は 4 細胞以外の発生段階の 2 倍体に発現していた。しかし、OGA タンパク質は 2 細胞から桑実胚まで連続して存在することが分かった。このように、ブタ着床前胚が、HBP による Glu 代謝、および O-GlcNAc 修飾を実施できることを強く示唆している。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、桑実胚までのすべての発生段階にある胚の核および細胞質に O-GlcNAc 修飾タンパク質が発現していたが、桑実胚の一部および胚盤胞では、O-GlcNAc 修飾タンパク質は核内に強く局在していた。O-GlcNAc 修飾をタンパク質に付加する OGT の阻害剤 (BADGP) の添加は、発生率に影響しなかったが、O-GlcNAc 修飾を除去する OGA 阻害剤 (PUGNAc) の添加により、4 細胞で発生を完全に停止した。また、早期 4 細胞より前に PUGNAc で阻害しても、発生率に影響しなかった。以上の結果は、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なことを示唆している。

(4) ブタ活性化 2 倍体における胚性遺伝子の活性化時期: 5-EU 標識による蛍光は、2 細胞から核内に検出され、早期 4 細胞にかけて強くなるとともに、標識胚の割合が有意に増加した。その後、早期 4 細胞以降には、90% 以上の胚に核内蛍光が認められた。したがって、ブタ活性化 2 倍体でも、受精卵と同様、RNA 合成は 2 細胞に始まり、4 細胞にかけて RNA 合成を拡大することが示唆された。後期 4 細胞を境に、核内の RNA 蓄積場所は核質から核小体へ移行した。ブタ胚の核小体は後期 4 細胞から rRNA 合成能を示すので、活性化 2 倍体も、同じ時期に rRNA 合成を始めることが示唆された。また、胚盤胞までのすべての着床前発生段階において、RNAP II CTD は核

と細胞質に分布し、RNAP II CTD 内の Ser-5 は早期 4 細胞からリン酸化され、短期間に脱リン酸化された。桑実胚では Ser-5 は常にリン酸化され、4 細胞から桑実胚にかけて mRNA は安定して合成されることが示唆された。しかし RNAP II CTD 上の Ser-2 は胚盤胞までリン酸化されず、4 細胞および桑実胚では、mRNA は限定的に伸長され、翻訳可能な mRNA 合成量は受精卵より少ない可能性が示唆された。一方、活性化 2 倍体は受精卵と同等の発生能力を示すので、4 細胞から胚盤胞にいたるのに必要な翻訳可能な mRNA は、早期 4 細胞の短期間に、受精卵レベルまで転写されると推測できる。

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 2 件)

Shibutani M., Mori T., Miyano T., Miyake M., Removal of O-GlcNAcylation is important for pig preimplantation development. Journal of Reproduction and Development, 査読有, 61 巻, No. 4, 2015, 341-350
doi.org/10.1262/jrd.2014-173

Shibutani M., Lee J., Miyano T., Miyake M., Demands for carbohydrates as major energy substrates depend on preimplantation developmental stages in pig embryos, Journal of Reproduction and Development, 査読有, Vol. 61, No. 2, 2015, 106-115
doi.org/10.1262/jrd.2014-093

[学会発表](計 8 件)

森 健志, 渋谷 海大, 三宅 正史, ブタ単為発生 2 倍体の胚性遺伝子活性化時期における RNA polymerase II のリン酸化パターン, 第 21 回日本胚移植研究会大会, 2014. 9. 11-12, 講演要旨集 pp23, 岡山大学(岡山県)

Shibutani M., Miyano T., Miyake M., O-GlcNAcylation in pig embryos during preimplantation development, World Congress of Reproductive Biology 2014, 9, 2-4. Programme and Abstract Book: p30, Edinburgh (UK)

渋谷 海大, 森 健志, 三宅 正史, 宮野 隆, O-結合型 N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc) 修飾の除去はブタ着床前胚の胚性遺伝子発現に必要である, 第 107 回日本繁殖生物学会大会, 2014. 8. 21-23, J. Reprod Dev., 60 (suppl.): j79, ホテル日航ノースランド(北海道)

三宅 正史, 董 哲, 渋谷 海大, 李 智博, 宮野 隆 (2014. 8. 21-23): ブタ胚盤胞におけるタイトジャンクション関連タンパク claudin family の発現性, 第 107 回日本繁殖生物学会大会, 2014. 8. 21-23, J. Reprod Dev. 60 (suppl.): p. j80 ホテル日航

ノースランド(北海道)

渋谷 海大, 三宅 正史, 宮野 隆, ブタ着床前胚におけるタンパク質の O-結合型 N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)修飾とその機能, 第 118 回日本畜産学会大会, 2014.3.26-29, つくば国際会議場(茨城県)
渋谷 海大, 宮野 隆, 三宅 正史, O-linked GlcNAcylation はブタ単為発生 2 倍体の着床前発生に必要なものである, 第 63 回関西畜産学会大会, 2013.9.5-6, 講演要旨集, pp17, 滋賀県立大学(滋賀県)
森 健志, 渋谷 海大, 宮野 隆, 三宅 正史, ブタ単為発生 2 倍体における胚性遺伝子活性化時期について, 第 63 回関西畜産学会大会, 2013.9.5-6, 講演要旨集, pp17, 滋賀県立大学(滋賀県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

三宅 正史 (MIYAKE, Masashi)
神戸大学名誉教授
研究者番号: 60093316

(2)研究分担者

原山 洋 (HARAYAMA, Hiroshi)
神戸大学大学院農学研究科・教授
研究者番号: 30281140