

Apoptosis Related Gene Expression and in vitro
Development of Porcine Parthenotes by
Exogenous Supplements

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 崔, 香順 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/3115

氏 名 (本 國 籍)	崔 香 順 (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博乙第 98 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 9 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	Apoptosis Related Gene Expression and <i>in vitro</i> Development of Porcine Parthenotes by Exogenous Supplements (外因性添加物によるアポトーシス関連遺伝子の発現 とブタ単為発生卵の体外における発生に関する研 究)
審 査 委 員 会	主査 信州大学 教 授 辻 井 弘 忠 副査 信州大学 教 授 濱 野 光 市 副査 静岡大学 教 授 高 坂 哲 也 副査 岐阜大学 教 授 土 井 守

論 文 の 内 容 の 要 旨

動物種毎に着床前の胚の培養液を開発することは、動物の生物工学および医学分野において重要な課題である。これまで添加タンパク質とcytokine/成長因子の培養液への添加が、着床前の胚の発達に及ぼす影響に関する研究は、いろいろ行われてきている。cytokine/成長因子が 着床前胚の発生に影響することが報告されたが、これらの物質が胚の発生ならびにアポトーシスに影響を及ぼすメカニズムについては十分に解明されていない。そこで、崔論文は、*in vitro* でのブタの着床前単為発生卵の培養において、添加タンパク質、epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1)あるいはpolyamineを培養液に添加し、その後の胚の発生およびアポトーシスならびにアポトーシスに関連する遺伝子の発現について研究を行ったものである。

崔論文は4つの実験から成り立っている。

1. 添加タンパク質

培養液にpolyvinyl alcohol (PVA), fetal bovine serum (FBS), bovine serum albumin (BSA)を添加した場合、胚盤胞期卵の形成、総細胞数、アポトーシスとアポトーシス関連遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた。その結果、アポトーシスに関連する遺伝子は添加タンパク質によって影響を受け、*in vitro*の培養システムでは、これら添加タンパク質が着床前の胚の生存性を大きく左右することを明らかにした。

2. Epidermal growth factor (EGF)

EGF添加がブタ単為発生卵の発生に及ぼす影響を調べた。EGFおよびBSAの単独添加は卵の発生に影響を及ぼさなかった。しかし、培養液中にBSAが存在する時、外因性EGFは、ブタ単為発生卵の発生率を高めなかったが、総細胞数を増加させ、Bcl-xL mRNAの発現を上昇させた。この結果から、外因性のEGFはアポトーシス関連遺伝子Bcl-xLの発現を高め、BSAからの有害物質の作用を抑制すると考察した。

3. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

*In vitro*の培養後得られた単為発生2細胞期卵をIGF-1添加培養液中で胚盤胞期卵まで培養した。その結果、IGF-1は、培養液にBSAが存在する時に総細胞数を増加させ、アポトーシスを減少させた。Real time RT-PCRの結果、IGF-1はBSAが存在する培養液で胚盤胞期卵におけるFas/Bcl-xLとBak/Bcl-xLの比率を下降させた。このことから、IGF-1はBSAと協同作用があり、ブタの着床前の単為発生卵にmitogenとapoptotic viability効果があると考察した。

4. Polyamines

*in vitro*の培養システムにおいて培養液にputrescine, spermidineまたはspermineを添加し、ブタの着床前単為発生卵の発生率を調べた。各polyamineを単独で添加した場合、2細胞期から胚盤胞期までの卵の発生率と胚盤胞期の総細胞数には影響がみられなかった。3種のpolyamine componentを同時に添加した時は胚盤胞期卵への発生率が高まり、総細胞数は増加し、アポトーシスは減少した。Real time PCRの結果、polyamineを添加した培養液で培養した胚盤胞期卵はアポトーシス発現遺伝子の発現を阻止し、Polyamineのbiosynthesisの阻害剤を培養液に加えるとアポトーシスがみられた。これらのことから外因性のpolyaminesは着床前単為発生卵のアポトーシスを阻止し、生存性を上昇させることが明らかになった。

崔論文は、BSA、FBS、EGF、IGF-1およびpolyamineが、着床前卵の発生率、胚盤胞期卵の総細胞数とアポトーシスに影響を及ぼすことを明らかにした。

これら結果は今後、ブタ着床前卵ならびに単為発生卵の*in vitro*培養システムへの応用が期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文の公開学位論文発表会は、審査委員全員を含む関連教員や学生の出席のもと平成17年5月27日 信州大学農学部11番教室において実施された。提出された学位論文の主な審査結果は以下の通りである。

哺乳動物の着床前の胚の発生時の代謝を研究することは、着床前の胚の培養液を開発することにつながり、さらには動物の生物工学および医学分野においても重要な課題である。

着床前の胚の発達に及ぼす成長因子などの添加物の影響に関する研究はいろいろ行われてきているが、これらの物質が胚にどのように影響を及ぼすメカニズムについては十分

に解明されていない。そこで、崔論文は、*in vitro* でのブタの着床前単為発生卵の培養において、添加タンパク質、epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1)あるいは polyamine を培養液に添加し、その後の胚の発生およびアポトーシスならびにアポトーシスに関連する遺伝子の発現について研究を行ったものである。崔論文の研究成果の中で、特に注目される点は以下の4点である。

1. 添加タンパク質

培養液にpolyvinyl alcohol (PVA), fetal bovine serum (FBS), bovine serum albumin (BSA)を添加した場合、胚盤胞期卵の形成、総細胞数、アポトーシスとアポトーシス関連遺伝子の発現についての影響を調べた。その結果、アポトーシスに関連する遺伝子は添加タンパク質によって影響を受け、*in vitro*の培養システムでは、これらの添加タンパク質が着床前の胚の生存性を大きく左右することを明らかにした。

2. Epidermal growth factor (EGF)

EGF添加がブタ単為発生卵の発生に及ぼす影響を調べた。EGFおよびBSAの単独添加は卵の発生に影響を及ぼさなかった。しかし、培養液中にBSAが存在する時、外因性EGFは、ブタ単為発生卵の発生率を高めなかったが、総細胞数を増加させ、Bcl-xL mRNAの発現を上昇させた。この結果から、外因性の EGF は アポトーシス関連遺伝子Bcl-xLの発現を高め、BSAからの有害物質の作用を抑制すると考察した。

3. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

*In vitro*の培養後得られた単為発生2細胞期卵をIGF-1添加培養液中で胚盤胞期卵まで培養した。その結果、IGF-1は、培養液にBSAが存在する時に総細胞数を増加させ、アポトーシスを減少させた。Real time RT-PCRの結果、IGF-1は BSAが存在する培養液で胚盤胞期卵におけるFas/Bcl-xLと Bak/Bcl-xLの比率を下降させた。このことから、IGF-1はBSAと協同作用があり、ブタの着床前の単為発生卵にmitogenとapoptotic viability 効果があると考察した。

4. Polyamines

*in vitro*の培養システムにおいて培養液にputrescine, spermidineまたはspermineを添加し、ブタの着床前単為発生卵の発生率を調べた。各polyamineを単独で添加した場合、2細胞期から胚盤胞期までの卵の発生率と胚盤胞期の総細胞数には影響がみられなかった。3種の polyamine componentを同時に添加した時は胚盤胞期卵への発生率が高まり、総細胞数は増加し、アポトーシスは減少した。Real time PCRの結果、polyamineを添加した培養液で培養した胚盤胞期卵はアポトーシス発現遺伝子の発現を阻止し、Polyamineのbiosynthesisの阻害剤を培養液に加えるとアポトーシスがみられた。これらのことから外因性の polyaminesは着床前単為発生卵のアポトーシスを阻止し、生存性を上昇させることが明らかになった。

崔論文は、BSA, FBS, EGF, IGF-1および polyamineが、着床前卵の発生率、胚盤胞期卵の総細胞数とアポトーシスに影響を及ぼすことを明らかにした。

これらの結果は今後、ブタ着床前卵ならびに単為発生卵の*in vitro*培養システムへの応用が期待される。

以上、論文内容を慎重に審議した結果、審査委員全員一致で、本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

基礎となる学術論文

1. Xiang-Shun Cui, Yu-Jeong Jeong, Hwa-Yong Lee, Sun-Hong Cheon and Nam-Hyung Kim. Fetal bovine serum influences apoptosis and apoptosis-related gene expression in porcine parthenotes developing in vitro. *Reproduction*. 2004; 127: 125-130.
2. Xiang-Shun Cui, Nam-Hyung Kim. Epidermal growth factor induces Bcl-xL gene expression and reduces apoptosis in porcine parthenotes developing in vitro. *Mol Reprod Dev*. 2003; 66(3):273-8.
3. Xiang-Shun Cui, Yu-Jeong Jeong, Jin-Hyun Jun, Nam-Hyung Kim. Insulin-like growth factor-I alters apoptosis related genes and reduces apoptosis in porcine parthenotes developing *in vitro*. *Theriogenology*. 2005; 63: 1070-1080.
4. Xiang-Shun Cui, Nam-Hyung Kim. Polyamines Inhibit Apoptosis in Porcine Parthenotes Developing in vitro. *Mol Reprod Dev*. 2005; 70: 471-477.

既発表学術論文

1. Youn-Jeong Lee, Bong-Ki Kim, Xiang-Shun Cui, Nam-Hyung Kim. Male pronuclear formation and sperm mitochondria in porcine oocytes following intracytoplasmic injection of pig or mouse sperm. *Zygote*. 2002; 10 :117-122
2. Bong-Ki Kim, Youn-Jeong Lee, Xiang-Shun Cui, Nam-Hyung Kim. Chromatin and microtubule organisation in maturing and pre-activated porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote*. 2002; 10 :123-129.
3. Bong -Ki Kim, Sun-Hong Cheon, Youn Jeong Lee, Sun Ho Choi, Xiang-Shun Cui, Nam-Hyung Kim. Pronucleus formation, DNA synthesis and metaphase entry in porcine oocytes following intracytoplasmic injection of murine spermatozoa. *Zygote*. 2003; 11: 261-270.
4. Nam-Hyung Kim, Xiang-Shun Cui, Yong-Man Han. Epigenetic reprogramming in cloned embryos. *IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY MAGAZINE*. 2004; 23: 47-51.
5. Mi-Ra Shin, Xiang-Shun Cui, Jin-Hyun Jun, Yu-Jeong Jeong, Nam-Hyung Kim. Identification of Mouse Blastocyst Genes that are Downregulated by Double-stranded RNA-mediated Knockdown of Oct-4 Expression. *Mol Reprod Dev*. 2005; 70: 390-396.
6. Xiang-Shun Cui, Mi-Ra Shin, Kyung-Ah Lee, Nam-Hyung Kim. Identification of Differentially Expressed Genes in Murine Embryos at the Blastocyst Stage Using Annealing Control Primer System. *Mol Reprod Dev*. 2005; 70: 278-287.