

Participation of Fatty Acids in Preimplantation Development of Rat Embryo

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: Mobarak Aktar Md. Yahia Khandoker メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2452

氏 名 (国 籍)	Mobarak Aktar Md. Yahia Khandoker(バングラデシュ人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農 学)
学 位 記 番 号	農博甲第 1 1 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 0 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	信州大学
学 位 論 文 題 目	Participation of Fatty Acids in Preimplantation Development of Rat Embryo
審 査 委 員	主査 信 州 大 学 教 授 辻 井 弘 忠 副査 信 州 大 学 教 授 太 田 克 明 副査 静 岡 大 学 教 授 番 場 公 雄 副査 岐 阜 大 学 教 授 上 吉 道 治 副査 静 岡 大 学 助 教 授 吉 田 光 敏

論 文 の 内 容 の 要 旨

論文名は「ラット着床前初期胚の発育における脂肪酸の関与に関する研究」である。過去 20 年間、哺乳動物胚における炭水化物、蛋白質の代謝に関しては多くの研究がなされてきたが、脂質に関しては余り多く研究がなされてきたとは言えない。そこで本論文では、着床前ラット胚の体外発生において脂質がどのように関与しているのかを調べる目的で、ガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーによる分析、放射性アイソトープを用いての代謝実験、胚の培養などを組み合わせて実験を行なった。着床前胚、および卵管、子宮洗浄液の含有脂質の脂肪酸構成分析、着床前胚の培養成績に対する脂肪酸の添加効果、着床前胚の脂肪酸の取り込みとその利用状況、各種脂肪酸の単独および複合添加が卵子の発育に及ぼす効果について検討した。

具体的には、まずラット 1 細胞期胚および桑実胚と各時期の卵管、子宮洗浄液、血清中の脂質の脂肪酸構成をガスクロマトグラフィーで分析し、11 種の脂肪酸および数種の未知物質を検出したが、それらの間の比率は、胚、卵管、子宮洗浄液でそれぞれ異なっていた。

次に、卵子の培養の際、培養液への添加が不可欠な牛血清アルブミン(BSA)についてその効果が同タンパク質に結合する脂肪酸によるのかどうかを、脂肪酸除去 BSAあるいは合成高分子物質であるポリビニールアルコールにエネルギー源(ブドウ糖、ピルビン酸、乳酸)を組み合わせて添加し胚発育に与える効果を見ることで検討した。

その結果、BSA 添加効果の多くの部分が BSA 結合脂肪酸によることを明らかにした。さらに同脂肪酸の大部分は胚のエネルギー源として使用されるが、一部は胚脂質中に取り込まれることにより胚発生に貢献することを示唆した。また BSA 結合脂肪酸構成は、桑実胚期子宮液中脂質の脂肪酸構成に非常によく似ていることなども明らかになった。

次に RI 標識脂肪酸を用いて、添加脂肪酸の胚脂質への取り込みおよびエネルギー源としての利用を、脂質の分画及び炭酸ガスへの放出測定により解析した。その結果、着床前の胚においては胚脂肪を β 酸化-TCA 回路を介してのエネルギー生産に使うほか種々の脂質合成の基質として使うことを明らかにした。

最後に、4 種の脂肪酸を単独ないしは組み合わせて添加して胚の体外培養を行なったところ、オレイン酸、リノレイン酸、アラキドン酸は単独添加でも胚発生を促進すること、パルミチン酸は僅かではあるが発育を抑えることなどを明らかにした。また、これらの脂肪酸を組み合わせて胚を培養することによって、生体内での胚発生とほぼ同じ細胞数までに発生が可能になることなどを明らかにした。

以上の結果から、ラット胚の初期発生の段階から卵子内に脂肪酸が取り込まれ、これら取り込まれた脂肪酸は種々の脂質合成および β 酸化-TCA 回路を介してのエネルギー生産に使われていることを明確にした。

審 査 結 果 の 要 旨

平成 10 年 1 月 12 日(月)に信州大学農学部において審査委員を含む関連教官、学生出席のもと Khandoker 論文の公開発表会が行われ、引き続き質疑応答が行なわれた。

Khandoker 論文名は「ラット着床前初期胚の発育における脂肪酸の関与に関する研究」である。過去 20 年間哺乳動物胚における炭水化物、蛋白質の代謝に関しては多くの研究がなされてきたが、脂質に関しては余り多くの研究はなされていない。本論文は、そのため、着床前ラット胚の体外発生において脂質がどのように関与しているのかを調べる目的で、ガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーによる分析、放射性アイソトープを用いての代謝実験、胚の培養などを組み合わせて実験を行なったものである。その結果、ラット胚のごく初期の発生段階から卵子内に脂肪酸が取り込まれること、また、取り込まれた脂肪酸は種々の脂質合成および β 酸化-TCA 回路を介してのエネルギー生産に使われていることを明らかにした。

具体的には、まずラット 1 細胞期胚および桑実胚と各時期の卵管、子宮洗浄液、血清中の脂質の脂肪酸構成をガスクロマトグラフィーで分析し、その結果、11 種の脂肪酸および数種の未知物質を検出し、さらにそれらの比率が胚、卵管、子宮洗浄液でそれぞれ異なることを明らかにした。このガスクロマトグラフィーによる分析には卵子を 1 試料あたり 200 個以上も集めなければならないなどのことがあるため従来ほとんど知見がないと言ってよい。この点、今回の結果は基礎的でありながら欠

けている部分を補ったものとして評価できる。

次に、卵子の培養の際、培養液に添加が不可欠な牛血清アルブミン(BSA)がその効果をそれに結合する脂肪酸を通じて表わしているかどうかの問題を、脂肪酸除去 BSA あるいは合成高分子物質のポリビニールアルコールとエネルギー源(ブドウ糖、ピルビン酸、乳酸)を組み合わせ添加した培養液を用いて検討した。その結果、BSA 結合脂肪酸はその大部分はエネルギー源として使用されるとともに、一部は胚脂質の基質としても胚発生に貢献することを明らかにした。また BSA 結合脂肪酸の構成が、桑実胚期の子宮洗浄液中脂質の脂肪酸構成に非常によく似ていることも明らかにした。BSA 添加効果の大部分がその結合脂肪酸によることを具体的かつ詳細に明らかにした点が評価できる。

次に RI 標識脂肪酸を用いて、添加脂肪酸の胚脂質への取り込みおよび代謝の結果としての炭酸ガスの放出を検討した。その結果、着床前の胚においては脂肪酸を β 酸化-TCA 回路を介してのエネルギー生産に使うとともに種々の脂質合成にも用いていることを明らかにした。また、標識脂肪酸が胚に直接取り込まれることを明らかにし、しかもそれがどのように使われるかを具体的に示した点など評価できる結果である。

最後に、4 種の脂肪酸を単独ないしは組み合わせて添加しラット胚の体外培養を行なったところ、オレイン酸、リノレイン酸、アラキドン酸は単独でも胚発生を促進すること、パルミチン酸は僅かではあるが発育を抑えることなどを明らかにした。また、これらの脂肪酸を組み合わせて培養することによって、生体内での胚発生とほぼ同じ細胞数までに発育が行われうることなどを明らかにした。これら本実験の結果は、新しい知見で極めて興味のある結果であると同時に高く評価される。発表は英語で行われたが、発表態度は極めて良好でスライドによる説明は理路整然としており、研究成果の理解に十分なものであった。また質問に対する対応も的確であった。

以上の結果から、審査委員全員一致で、本論文は岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分評価できるものと認めた。

主な質問は以下の通りであった。

- 1) パルミチン酸は着床前胚の発育を抑えたが、なぜ RI 標識のパルミチン酸を用いて取り込みや炭酸ガスのトラップを行なったのか。
- 2) ^3H -パルミチン酸添加培養液中で培養した場合の各種中性および極性脂質に分画した場合、他種の胚との違いについて。
- 3) 今後この研究の利用および展開について。

基礎となる既発表論文

- 1) Khandoker, M. A. M. Y; Nisioka, M. and Tsujii, (1995) Effect of BSA binding fatty acids on mouse and rat embryo development. J. Mamm.OvaRes.12, 113-118
- 2) Khandoker, M. A. M.Y., Tsujiii, H. and Karasawa, D.(1997). Fatty acid Composition of blood serum, oocytes, embryos and reproductive tract fluids of rat and comparison with BSA. Anim. Sci.Techol.68, 1070-1074