

## アクチビンAのウシ初期胚体外発生促進作用に関する研究

吉岡 耕治

### Role of activin A on *in vitro* development of bovine early preimplantation embryos

Koji YOSHIOKA

哺乳動物の胚の発生や分化は、母体の卵管、子宮および胚自身から産生される様々なサイトカインにより制御されている。しかし、ウシ胚の発生過程におけるサイトカインの作用および役割に関する情報は少ない。アクチビンAはウシの卵管や子宮に存在するが、初期胚の発生に及ぼす影響や作用は検討されていない。本研究では、アクチビンAのウシ初期胚の発生に及ぼす影響とその作用機序を解明するため、化学的組成の明らかな修正合成卵管液（SOF）を用いて体外成熟・体外受精由来のウシ初期胚を培養して検討を加えた。

はじめに、アクチビンAがウシ初期胚の発生に及ぼす影響を明らかにするため、修正SOFを用いてウシ1細胞期胚を培養して、体外発生成績を調べた。媒精後20時間目の1細胞期胚を0.1～100ng/mlのアクチビンAを含む修正SOF中で培養した結果、1ng/ml以上のアクチビンAの添加により胚盤胞への発生率が向上することが明らかになった。また、胚の体外発生率の向上は、媒精後120時間目まで10ng/mlのアクチビンAを添加した場合に認められた。さらに、異なる酸素濃度（5および20%）の気相中で胚を培養してもアクチビンA濃度依存性に胚発生率が向上することも分かった。

つぎに、アクチビンAの胚発生促進作用がアクチビン特異的な作用であることを確認するとともに、内因性のアクチビンも胚発生に関与している可能性を明らかにするため、アクチビンAとアクチビン結合タンパク質であるホルスタチンの相互作用について検討した。その結果、修正SOFに1～100ng/mlのホルスタチンを添加するとウシ1細胞期胚の発生率は低下することが判明した。また、アクチビンA（10ng/ml）を添加した培地に同濃度のホルスタチンを添加するとアクチビンAの胚発生促進効果が中和され、10倍量（100ng/ml）のホルスタチンを添

加すると胚の発生は抑制されることも分かった。このことから、アクチビンは胚自身によっても産生され、ホルスタチンは内因性のアクチビンを中和することが示唆された。さらに、アクチビンA（10ng/ml）あるいはホルスタチン（10ng/ml）は、1～8細胞期の時期に培地に添加すると胚盤胞への発生率に影響するが、9～16細胞期以降に添加しても発生率に影響のないことも明らかになった。

ついで、アクチビンAおよびホルスタチンが作用する胚の発生ステージを特定するとともに作用機序を解明するため、微速度撮影法を用いてウシ胚の発生速度と卵割期における細胞周期について検討した。ウシ1細胞期胚は、修正SOF（対照）、アクチビンA（10ng/ml）あるいはホルスタチン（10ng/ml）を添加した修正SOF中で9日間、微速度撮影下で培養した。まず、微速度撮影下における胚の発生率をインキュベーター内で培養した場合の発生率と比較して差異のないことを確認した。また、ホルスタチンの添加により9～16細胞期への発生に要する時間の延長が観察された。ウシ胚の体外発生では、9～16細胞期以上に発生した培養胚の95%で4～8細胞期の間に卵割が一時休止する“lag-phase”が認められ、“lag-phase”が短時間に終了する胚ほど、その後の発生能は高かった。アクチビンAを添加した培地で培養すると第3細胞周期は短くなり、“lag-phase”は短時間で終了した。一方、ホルスタチンを添加した培地では、ホルスタチンによる内因性アクチビン中和作用に起因すると考えられる“lag-phase”持続時間の延長と第4細胞周期の延長が認められた。これらの結果から、アクチビンAは“lag-phase”を軽度抑え、第3～4細胞周期をスムーズに進行させて胚発生促進作用を示すものと考えられた。“lag-phase”の起こる時期は胚発生を制御する遺伝

子が母性から胚性へ切り替わる時期にあたり、アクチビンAはこの発生を制御する遺伝子の切り替え機構を調節していることが示唆された。

最後に、未成熟卵子から孵化胚盤胞へ発生する過程での卵子および初期胚におけるアクチビンに関連する遺伝子の発現動態を明らかにするため、ウシ卵子および初期胚中のインヒビン/アクチビンサブユニット<sub>A</sub>および<sub>B</sub>), ホリスタチンおよびアクチビンレセプター・型; ActR-IおよびActR-IB, 型; ActR-IIおよびActR-II(B)のmRNAをRT-PCR法により調べた。インヒビン/アクチビンサブユニットの遺伝子発現を解析した結果、<sub>A</sub>サブユニット遺伝子は検査したすべての発生ステージの卵子と胚で発現していることが分かった。とくに、1細胞期から桑実胚期にかけては<sub>A</sub>サブユニット遺伝子のみが発現しており、この発生ステージのウシ胚はアク

チビンAを生成していると推察された。また、ホリスタチン遺伝子は検査したすべての発生ステージの卵子と胚で発現していることも分かった。さらに、未成熟卵子から孵化胚盤胞までの発生ステージで<sub>A</sub>型および<sub>B</sub>型の両方のアクチビンレセプター遺伝子が発現していることが明らかになった。

以上の研究結果から、アクチビンはウシ胚の体外発生を促進する作用を有し、発生培地中に存在しないと第3~4細胞周期の卵割の遅延をまねき、胚発生率を低下させることが明らかになった。また、アクチビンは卵管や子宮だけでなくウシ初期胚からも分泌され、胚の有する機能的なアクチビンレセプターを介して4~8細胞期の間起こる胚発生を制御する遺伝子が母性から胚性へ切り替わる機構を調節していることが示唆された。