

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	ドルジ
題 目	マイクロアレイ法を用いた春機発動前後の黒毛和種ウシ卵の体外成熟・体外発生過程における網羅的遺伝子発現解析に関する研究 (Microarray studies on gene expression profiles in ova derived from prepubertal and adult Japanese Black cattle during <i>in vitro</i> maturation and <i>in vitro</i> development)

黒毛和種ウシ胚の体外生産技術は研究や産業目的に利用される大変重要なツールであるが、ウシ卵の体外成熟・受精・発生に係わる分子要因については未解明な点が多い。本研究では、ウシ胚の体外生産技術のさらなる高度化を目的として、春機発動直前および性成熟後の黒毛和種雌ウシに由来する卵の体外成熟過程と体外受精後の体外発生過程における遺伝子発現状況をマイクロアレイ技術を用いて網羅的に調べた。

春機発動直前ウシ卵巢は、9～10 ヶ月齢の黒毛和種雌から経膈卵巢割去法により採取した。一方、性成熟後のウシ卵巢は食肉センターにて24～35 ヶ月齢の黒毛和種雌から採取した。まず、両区の卵巢卵胞から回収した卵は体外成熟、体外受精および体外発生させ、成熟、受精および発生状況を比較した結果、体外成熟・体外受精状況に両区間で差はなかった。しかし、卵割率や胚盤胞形成率は性成熟区が春機発動直前区より有意に増加した ( $P<0.05$  または  $P<0.01$ )。この結果から、黒毛和種ウシ胚の体外生産効率は卵巢採取個体の性成熟状態に顕著に依存することが示された。

次いで、春機発動直前および性成熟後の黒毛和種雌ウシに由来する卵の体外成熟過程における遺伝子発現状況をマイクロアレイ技術を用いて網羅的に調べた。マイクロアレイで解析の可能な約24,000個のウシ遺伝子を比較した結果、体外成熟過程で遺伝子発現量が2倍以上異なりかつ有意な変動 ( $P<0.01$ ) が見られたものは性成熟区卵では695個 (2.9%)、春機発動直前区卵では553個 (2.3%) であった。また、卵巢採取個体の性成熟状況により発現量に有意差 ( $P<0.01$ ) が見られた遺伝子は卵核胞期卵において333個 (1.4%) および第2成熟分裂中期卵において549個 (2.3%) であった。

さらに、春機発動直前および性成熟後の黒毛和種雌ウシに由来する体外成熟卵の体外受精後の体外発生過程における遺伝子発現状況をマイクロアレイ技術を用いて網羅的に調べた。マイクロアレイで解析の可能な約24,000個のウシ遺伝子を比較した結果、体外発生過程で遺伝子発現量が2倍以上異なりかつ有意な変動 ( $P<0.01$ ) が見られたものは性成熟区胚では1,163個 (4.8%)、春機発動直前区胚では1,030個 (4.3%) であった。また、卵巢採取個体の性成熟状況により発現量に有意差 ( $P<0.01$ ) が見られた遺伝子は8～16細胞期胚において591個 (2.4%) および拡張期胚盤胞において490個 (2.0%) であった。

本研究の結果から、黒毛和種ウシ卵の体外成熟過程と体外受精後の体外発生過程において顕著に変動する発現遺伝子群および卵巢採取個体の性成熟状態によって顕著に変動する黒毛和種ウシ卵の発現遺伝子群をマイクロアレイ技術により絞り込めることが初めて示され、黒毛和種ウシ胚の体外生産効率の高度化に資することが示唆された。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	<b>DORJI</b>
題 目	<b>Microarray studies on gene expression profiles in ova derived from prepubertal and adult Japanese Black cattle during <i>in vitro</i> maturation and <i>in vitro</i> development</b> (マイクロアレイ法を用いた春機発動前後の黒毛和種ウシ卵の体外成熟・体外発生過程における網羅的遺伝子発現解析に関する研究)
<p>This study was carried out to examine the gene expression profiles in ova derived from prepubertal (9 to 10 months old) and adult (24 to 35 months old) Japanese Black cattle during <i>in vitro</i> maturation (IVM) and <i>in vitro</i> development (IVD) using microarray gene chips (Bovine genome array containing 24072 probe sets representing over 23000 transcripts). The results in each study were as follows:</p> <p><b>1) Comparison of IVM, <i>in vitro</i> fertilization (IVF) and IVD capacity of ova derived from prepubertal and adult Japanese Black cattle.</b> Oocytes were recovered from antral follicles (2 to 8 mm diameter) of both prepubertal and adult cattle and were subjected to IVM, IVF and IVD under the same conditions and their developmental potential was compared. IVM and IVF rates of prepubertal heifer oocytes did not differ from those of cow oocytes. There was also no significant difference in the total cell number per blastocysts between the two groups. However, cleavage and blastocyst formation rates were significantly lower (<math>P&lt;0.05</math> or <math>P&lt;0.01</math>) for prepubertal than for cows. In addition, the composition of maturation media did not affect on the improvement of lower IVD capacity for prepubertal heifer oocytes. The results of this study indicated that oocytes derived from prepubertal donors were able to mature and fertilize <i>in vitro</i> at par with their adult counter parts however IVD capacity was reduced during the subsequent embryonic developmental stages.</p> <p><b>2) Gene expression differences in oocytes derived from prepubertal and adult Japanese Black cattle during IVM.</b> Microarray experiments were conducted using total RNA isolated from immature (GV) and <i>in vitro</i> matured (MII) oocytes derived from adult and prepubertal animals. A total of 333 (1.4%) and 549 (2.3%) genes were differentially expressed between prepubertal versus adult bovine GV and MII stages oocytes, respectively. Of these, 176 and 312 genes were up-regulated, while 157 and 237 were down-regulated in prepubertal when compared with adult GV and MII oocytes, respectively. It was also observed that 695 (2.9%) and 553 (2.3%) genes were differentially expressed between GV versus MII stage oocytes in the adult and prepubertal groups, respectively. Gene ontological classification of the differentially expressed genes revealed that up-regulated genes in adult oocytes were involved in signal transduction, transcriptional control and transport. This study indicated that significant number of genes were differentially expressed (<math>&gt;2</math>-fold, <math>P&lt;0.01</math>) between oocytes derived from adult and those from prepubertal Japanese Black cattle and this difference increased during IVM.</p> <p><b>3) Gene expression differences in ova derived from prepubertal and adult Japanese Black cattle during IVD.</b> Microarray experiments were performed on populations of 8- to 16-cell stage embryos and blastocysts derived from adult versus prepubertal Japanese Black cattle oocytes matured and fertilized <i>in vitro</i>. In total, 591 (2.4%) and 490 (2.0%) genes were differentially expressed in prepubertal and adult bovine in 8- to 16-cell and blastocyst stage embryos, respectively. Out of these, 218 and 248 genes were up-regulated, while 373 and 242 were down-regulated in prepubertal and adult 8- to 16-cell and blastocysts stage embryos, respectively. Gene ontology classification regarding biological process, molecular functions and cellular component revealed diversity in transcript abundances between prepubertal and adult groups in both the distinct developmental stages. This study indicated that the significant number of genes were differentially expressed (<math>&gt;2</math>-fold, <math>P&lt;0.01</math>) in preimplantation embryos between adult and prepubertal Japanese Black cattle during IVD.</p> <p>These results indicated that oocyte developmental competence was affected by age in Japanese Black cattle and puberty might be important for the events associated with oocyte development competence. To our knowledge, this study indicated for the first time that significant number of genes were differentially expressed (<math>&gt;2</math>-fold, <math>P&lt;0.01</math>) between oocytes/embryos derived from adult versus those from prepubertal Japanese Black cattle during IVM and IVD.</p>	

学位論文審査結果の要旨			
学位申請者 氏 名	DORJI		
審査委員	主査	鹿児島大学	准教授 三好 和睦
	副査	鹿児島大学	教授 岡本 新
	副査	鹿児島大学	教授 板倉 隆夫
	副査	鹿児島大学	教授 侯 徳興
	副査	鹿児島大学	教授 上西 由翁
審査協力者			
題 目	Microarray studies on gene expression profiles in ova derived from prepubertal and adult Japanese Black cattle during <i>in vitro</i> maturation and <i>in vitro</i> development (マイクロアレイ法を用いた春機発動前後の黒毛和種ウシ卵の体外成熟・体外発生過程における網羅的遺伝子発現解析に関する研究)		
<p>黒毛和種ウシ胚の体外生産技術は研究や産業目的に利用される大変重要なツールであるが、ウシ卵の体外成熟・受精・発生に係わる分子要因については未解明な点が多い。本研究では、ウシ胚の体外生産技術のさらなる高度化を目的として、春機発動直前および性成熟後の黒毛和種雌ウシに由来する卵の体外成熟過程と体外受精後の体外発生過程における遺伝子発現状況をマイクロアレイ技術を用いて網羅的に調べた。得られた成果は以下のように要約される。</p> <p>春機発動直前ウシ卵巣は、9～10ヶ月齢の黒毛和種雌から経膈卵巣割去法により採取した。一方、性成熟後のウシ卵巣は食肉センターにて24～35ヶ月齢の黒毛和種雌から採取した。まず、両区の卵巣卵胞から回収した卵を体外成熟、体外受精および体外発生させ、成熟、受精および発生状況を比較した結果、体外成熟・体外受精状況に両区間で差はなかった。しかし、卵割率や胚盤胞形成率は性成熟区が春機発動直前区より有意に増加した (<math>P&lt;0.05</math> または <math>P&lt;0.01</math>)。この結果から、黒毛和種ウシ胚の体外生産効率は卵巣採取個体の性成熟状態に顕著に依存することが示された。</p>			

次いで、春機発動直前および性成熟後の黒毛和種雌ウシに由来する卵の体外成熟過程における遺伝子発現状況をマイクロアレイ技術を用いて網羅的に調べた。マイクロアレイで解析の可能な約 24,000 個のウシ遺伝子を比較した結果、体外成熟過程で遺伝子発現量が 2 倍以上異なりかつ有意な変動 ( $P < 0.01$ ) が見られたものは性成熟区卵では 695 個 (2.9%)、春機発動直前区卵では 553 個 (2.3%) であった。また、卵巣採取個体の性成熟状況により発現量に有意差 ( $P < 0.01$ ) が見られた遺伝子は卵核胞期卵において 333 個 (1.4%) および第 2 成熟分裂中期卵において 549 個 (2.3%) であった。

さらに、春機発動直前および性成熟後の黒毛和種雌ウシに由来する体外成熟卵の体外受精後の体外発生過程における遺伝子発現状況をマイクロアレイ技術を用いて網羅的に調べた。マイクロアレイで解析の可能な約 24,000 個のウシ遺伝子を比較した結果、体外発生過程で遺伝子発現量が 2 倍以上異なりかつ有意な変動 ( $P < 0.01$ ) が見られたものは性成熟区胚では 1,163 個 (4.8%)、春機発動直前区胚では 1,030 個 (4.3%) であった。また、卵巣採取個体の性成熟状況により発現量に有意差 ( $P < 0.01$ ) が見られた遺伝子は 8~16 細胞期胚において 591 個 (2.4%) および拡張期胚盤胞において 490 個 (2.0%) であった。

本研究の結果から、黒毛和種ウシ卵の体外成熟過程と体外受精後の体外発生過程において顕著に変動する発現遺伝子群および卵巣採取個体の性成熟状態によって顕著に変動する黒毛和種ウシ卵の発現遺伝子群をマイクロアレイ技術により絞り込めることが初めて示された。また、春機発動直前の黒毛和種雌ウシから採取した卵を用いた場合の胚生産効率の低さは、異常な遺伝子発現状況に起因していることが示唆された。

本研究の成果は、黒毛和種ウシ胚の体外生産効率の高度化に大いに寄与すると考えられる。よって、審査委員一同、本論文が博士（農学）の学位論文として十分価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨			
学位申請者 氏 名	DORJI		
審査委員	主査	鹿児島大学	准教授 三好 和睦
	副査	鹿児島大学	教授 岡本 新
	副査	鹿児島大学	教授 板倉 隆夫
	副査	鹿児島大学	教授 侯 徳興
	副査	鹿児島大学	教授 上西 由翁
審査協力者			
実施年月日	平成 24 年 1 月 10 日		
試験方法（該当のものを○で囲むこと。） <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> 口答・筆答</span>			
<p>主査及び副査は、平成24年1月10日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>			

学位申請者 氏 名	DORJI
<p>[質問1] 何故ウシ胚を体外生産する必要があるのか。</p> <p>[回答1] ウシは単胎動物なので、通常は1回の性周期に1個しか排卵されない。そのため、体内生産された胚を研究や産業目的に利用する場合には、多数のウシを飼育するための広いスペースや多大な労力、莫大なコストが必要になる。食肉センターで屠殺されたウシの卵巣から回収した卵を体外成熟、体外受精および体外培養することによって胚を生産すれば、これらの問題を解決することができる。</p> <p>[質問2] 春機発動直前のウシから回収した卵の遺伝子発現を正常化し、それらに由来する胚の発生を改善するためのアイディアはあるか。</p> <p>[回答2] 性成熟後のウシから回収した卵は性腺刺激ホルモンの作用を受けているが、春機発動直前のウシから回収した卵は受けていない。よって、性腺刺激ホルモンを添加した培地で春機発動直前のウシから回収した卵を体外成熟することにより、体外受精後の胚発生が改善するのではないと思われる。また、性成熟後のウシから回収した卵の細胞質成分を春機発動直前のウシから回収した卵に注入すれば、それらに由来する胚の発生を改善できるかもしれない。</p> <p>[質問3] 体外培養すると酸化ストレスに関連する遺伝子の発現が高くなるのではないか。</p> <p>[回答3] 高くなるかもしれないが、本研究では春機発動直前のウシおよび性成熟後のウシのいずれから回収した卵も同じ条件下で培養しているので、同程度に高くなり、遺伝子発現状況の傾向には影響を及ぼしていないと考えている。</p> <p>[質問4] 性成熟後および春機発動直前のウシから回収した卵の体外成熟、体外受精および体外発生状況を調べた実験において、成熟培地としてTCM-199とWaymouthを比較したのは何故か。</p> <p>[回答4] TCM-199は、性成熟後のウシから回収した卵の成熟培養に広く用いられている培地である。また、Waymouthを成熟培地として用いることにより、ブタ卵の体外受精および体外発生状況を改善し得ることが報告されている。春機発動直前のウシから回収した卵をTCM-199で体外成熟した場合には、性成熟後のウシから回収した卵を用いた場合と比較して、体外成熟および体外受精状況には差がなかったもののその後の体外発生は阻害された。そこで、Waymouthを用いればブタ卵のように春機発動直前のウシから回収した卵の体外発生状況を改善できるかもしれないと考え、TCM-199との比較実験を行った。</p>	

〔質問5〕特にどのような遺伝子がウシ胚の発生に影響を及ぼしているのか。

〔回答5〕性成熟後のウシから回収した卵と春機発動直前のウシから回収した卵の間において発現の差が大きかった遺伝子には、哺乳動物生殖細胞の機能を調節する *MAPK13*、ミトコンドリアでのタンパク質合成に関与する *MRPL17*、卵胞発育、卵子成熟および排卵を調節する *TGFB111*、細胞分裂を促進し、アポトーシスを調節する *IGF-1R*等が含まれていた。これらの遺伝子がウシ胚の発生に大きな影響を及ぼしている可能性は高いと思う。

〔質問6〕体外発生過程における遺伝子発現状況を調べた実験において、8～16細胞期胚を使用したのは何故か。

〔回答6〕卵は、細胞質内に母性因子と呼ばれるmRNAやタンパク質を蓄えており、受精後の胚発生は当初これら母性因子によって制御される。発生に伴って母性因子は次第に減少し、胚自身のゲノムからの転写が起きるようになる。ウシでは、8細胞期に母性因子依存性の発生から胚自身のゲノム依存性の発生に切り替わることが報告されている。本研究では胚の遺伝子発現を比較しなかったため、8～16細胞期胚を使用した。

〔質問7〕性成熟後および春機発動直前のウシから回収した卵の体外受精状況を調べた実験において、Total fertilization rate、Polyspermic fertilization rateおよびNormal fertilization rateが示されているが、これらの違いは何か。

〔回答7〕Total fertilization rateは、1個以上の精子の侵入が認められた卵の割合である。通常は1個の卵に1個の精子が侵入するが、2個以上の精子が侵入した場合をPolyspermyと呼ぶ。そのような卵の割合がPolyspermic fertilization rateである。1個の精子が侵入して雌雄の前核形成が認められた卵の割合がNormal fertilization rateである。

〔質問8〕体外発生状況のひとつとして胚盤胞の細胞数を調べたのは何故か。

〔回答8〕体外作出された胚盤胞の細胞数は、体内発生した胚盤胞と比較して減少することが分かっている。よって、体外発生した胚盤胞の細胞数が増加することは、体内発生した胚盤胞の細胞数に近付くことを意味するので、細胞数は胚盤胞の質を示す指標のひとつと考えられている。本研究では、得られた胚盤胞の質を比較するために、それらの細胞数を測定した。

〔質問9〕母国に戻った後で、本研究をどのように生かすのか。

〔回答9〕ブータンではウシ胚の体外生産は行われていない。本研究で習得した技術を用いてウシ胚の体外生産システムを確立し、ブータンにおける畜産業の発展に貢献したい。