

博士論文

小卵胞由来ブタ卵母細胞の成熟能及び初
期発生能に関する研究

令和2年3月

小野 千由貴

岡山大学大学院
環境生命科学研究科

目次

宣誓および署名	3
学会発表リスト	4
論文業績リスト	5
謝 辞.....	6
略語リスト.....	7
学位論文の要旨	8
学位論文の概要	10
第一章 諸言	11
卵形成について.....	11
卵母細胞の成長と成熟.....	11
卵成熟後の受精及び初期発生.....	12
ブタ卵母細胞の体外生産	12
ブタ卵母細胞の IVM 中の遺伝子転写量	13
オートファジーと卵成熟	15
トレハロース	15
本研究の目的	15
第二章 本研究で用いた材料および方法	17
試薬および培養液	17
COCs の採取と IVM	17
卵母細胞の減数分裂評価	18
卵母細胞の単為発生と IVC	18
ウエスタンブロッティング法によるタンパク質レベルの解析	18
蛍光染色法による卵丘細胞の生存性判定	19
統計分析.....	19
第三章 中卵胞および小卵胞由来ブタ卵母細胞の減数分裂および初期発生能は、オートファジー誘導剤と阻害剤に対する感受性が異なる	20
緒言	20
実験デザイン	21
結果.....	22
考察.....	26
第四章 トレハロースは、小卵胞由来ブタ卵母細胞のオートファジー能に影響することなく、卵丘細胞の生存性を維持することで体外成熟能および初期発生能を改善する	28

緒言	28
実験デザイン	29
結果	30
考察	37
第五章 総合考察.....	39
引用文献リスト	42

宣誓および署名

本論文に含まれる研究内容は、他の研究機関および他の大学で学位や報告のために受理されたものを含んでいないこと、および、本論文内に引用文献として引用したものを除いて、他人がすでに公表または執筆中の内容を含んでいないことを宣誓します。

氏名 _____

日付 _____

学会発表リスト

- 小卵胞由来体外成熟ブタ卵母細胞の体外成熟および前核形成能（口頭発表）
小畑千由貴、舟橋弘晃
日本畜産学会 112 回大会 講演要旨集 p.85 （東京 2010 年 3 月）
- Pronuclear formation and developmental competence of mature porcine oocytes derived from small- and middle-size follicles. （ポスター発表）
Chiyuki Kohata, Hiroaki Funahashi,
37th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (Orland, Florida, USA, Jan, 2011)
- Transcripts during in vitro maturation in porcine oocytes collected from different size follicles. （ポスター発表）
Maria jose Izquierdo-Rico, Raquel Romar, Chiyuki Kohata, Hiroaki Funahashi,
37th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society （Orland, Florida, USA, Jan, 2011）
- 小中卵胞由来ブタ卵母細胞のオートファジー能と VEGF による助長効果（口頭発表）
小野千由貴、若井拓哉、舟橋弘晃
日本受精着床学会総会・学術講演会 第 36 回大会 講演要旨集 p.203（千葉、2018 年 7 月）
- 体外成熟時のブタ卵母細胞のオートファジー能は由来する小中卵胞で異なる（口頭発表）
小野千由貴、Maria Serrano Albal、Maria Bobis Rodriguez、若井拓哉、舟橋弘晃
日本卵子学会学術集会 第 60 回大会 講演要旨集 p.56 （広島、2019 年 6 月）
- トレハロースは、小卵胞由来ブタ卵母細胞の体外成熟率を改善するがオートファジー能に影響しない
小野千由貴、Maria Serrano Albal、Maria Bobis Rodriguez、Laura Cuenca Rico、若井拓哉、舟橋弘晃
日本受精着床学会総会・学術講演会 第 37 回 講演要旨集 p.132（東京、2019 年 8 月）

論文業績リスト

- Development competence and relative transcript abundance of oocytes derived from small and medium follicles of prepubertal gilts.
Chiyuki Kohata, Maria jose Izquierdo-Rico, Raquel Romar, Hiroaki Funahashi
Theriogenology 2013;80:970-978.
- The autophagic inducer and inhibitor display different activities on the meiotic and developmental competences of porcine oocytes derived from small and medium follicles.
Chiyuki Kohata-Ono, Takuya Wakai, Hiroaki Funahashi
Journal of Reproduction and Development 2019;65:527-532.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、最後まで熱心なご指導とご鞭撻を賜りました岡山大学大学院環境生命科学研究科 舟橋弘晃教授および若井拓哉准教授に厚く感謝の意を表します。共同研究を行いましたスペイン、ムルシア大学からの留学生、Maria Serrano Albal さん、Maria Bobis Rodriguez さん、Laura Cuenca Rico さんに感謝致します。また、研究を進めるにあたり、研究生生活において多くの討論を交わさせていただき、苦楽をともにした留学生の皆さん、研究の進行をサポートしていただいた研究室の皆様にご心より感謝致します。研究生生活を理解していただき、励ましていただきました全ての友人にご心より感謝致します。最後に、精神面、経済面、研究生生活の全てをこれまで支えてくださった両親（父母および義父母）、夫、二人の娘にご心より感謝致します。

略語リスト

A- I	Anaphase I
Aurora-A	Aurora Kinase A
Aurora-B	Aurora Kinase B
Bcl2	B-cell lymphoma2
BSA	Bovine serum albumin
c-MOS	Moloney sarcoma oncogene
COCs	Cumulus oocytes complexes
dbcAMP	Dibutyl cyclic 3',5-monophosphate
eCG	Equine chorionic gonadotropin
GVBD	Germinal vesicle break down
GV	Germinal vesicle
hCG	Human chorionic gonadotropin
HSF1	Heat shock transcription factor 1
IVC	In vitro culture 体外培養
IVF	In vitro fertilization 体外受精
IVM	In vitro maturation 体外成熟
M199	Medium 199
M- I	Metaphase- I
M- II	Metaphase- II
MF	Middle follicle 中卵胞
MPF	Maturation promoting factor
mPOM	Modified porcine oocyte medium
NALP9	NACHT (NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from Podospora anserina) and TP1 (telomerase-associated protein))-, LRR (leucine-rich repeat) and PYD (pyrin domain)-containing protein 9
ProM- I	Pro-metaphase I
PZM-5	Porcine zygote medium 5
SF	Small Follicle 小卵胞
T- I	Telophase- I
mTL-HEPES	Modified Hepes - buffered Tyrode's lactate
ZP3	Zona pellucida 3
ZP4	Zona pellucida 4

哺乳動物の卵巣中には出生前に準備された多くの雌性生殖資源が存在する。これまで、これらのうち成長を終えた卵母細胞をそれらが含まれている中卵胞(MF; 直径 3~6 mm)から採取して受精卵の体外生産に利用されてきた。しかし、卵巣中にはそれらよりはるかに数多くの小卵胞(SF; 直径 1~2 mm)が存在するが、それらに含まれている卵母細胞は、成長過程にあり、体外に取り出しても体外成熟 (IVM) 効率や胚盤胞期までの初期発生能が MF 由来の卵母細胞のそれらよりも低いとされ、これまで利用されていなかった。これら MF および SF 由来卵母細胞における IVM 能や初期発生能におよぼす卵母細胞内の違いを明らかにすることが出来れば、それらの克服により、SF 由来卵母細胞の IVM 能や初期発生能を改善し、哺乳動物の卵巣内卵母細胞の利用による受精卵の体外生産効率を大きく向上できる。そこで、本研究は、ブタ卵巣中の SF 由来卵母細胞の IVM 能、体外受精 (IVF) 能および胚盤胞期までの初期発生能が MF 由来卵母細胞のそれらと比較して低いかどうかを再度検証するとともに、その違いを生み出す原因を検討するために行った。これまでの他者による研究では、IVM 後に未成熟卵母細胞を含む状態で IVF や初期発生のための体外培養 (IVC) を行っており、未成熟卵母細胞の存在がその後の IVF 率や初期発生率に影響を及ぼす可能性が考えられた。先行研究において、IVM 後に第一極体の放出を確認した成熟卵母細胞のみを選別して IVF とその後の IVC に供することで、MF および SF 由来卵母細胞の IVM 能、IVF 能および胚盤胞期への初期発生能を再度検証した結果、SF 由来卵母細胞の IVM 能は MF 由来卵のそれと比較して有意に低いことが確認できた。一方、MF および SF 由来卵母細胞の IVF 後の精子侵入率および雌雄前核形成率、卵割率に有意な差がないことを明らかにしたが、SF 由来卵母細胞の胚盤胞期への初期発生能は、MF 由来卵母細胞と比較して有意に低かった。また、卵成熟、受精、初期発生などに関係する幾つかの遺伝子

(AURKA、AURKB、MOS、ZP3、ZP4、NALP9、HSF1、BCL2) の mRNA 量が MF および SF 由来卵母細胞の IVM 培養の前後で差があるか否かについて比較したところ、調べた全ての遺伝子の転写産物量は IVM 培養の間に有意に低下していたものの、c-MOS 遺伝子を除く、ほとんど遺伝子の mRNA 量について MF および SF 由来の卵母細胞の間に有意な差は認められなかった。一方、IVM 培養開始前の c-MOS 遺伝子の mRNA 量については、SF 由来卵母細胞内で MF 由来卵と比較して有意に低く、c-MOS 遺伝子を含む細胞周期制御因子の転写産物量の違いが SF 由来卵母細胞の IVM 能や初期発生能に影響を及ぼす可能性が考えられた。

そこで本研究では、先行研究において多くの遺伝子由来の mRNA 量が IVM 培養開始後に顕著に低下することを明らかにしたことや、MF 由来ブタ卵母細胞でのオートファジー活性の亢進が IVM 能や初期発生能を更に向上させることが報告されていることから、SF 由来卵母細胞でも何らかの違いが認められれば、SF および MF 由来卵母細胞の体外成熟能や初期発生能の違いにオートファジー調節機構が関与している可能性を示すことができるかもしれない。そこで、mTOR シグナル経路依存性のオートファジー誘導剤であるラパマイシンと、同シグナル経路依存性のオートファジー阻害剤である 3-MA が、SF および MF 由来卵母細胞の IVM 能や IVC 時の胚盤胞期への発生率で評価した初期発生能に影響を及ぼすか否かについて調べた。

その結果、ラパマイシン存在下で MF 由来卵母細胞の IVM 能及び初期発生能がともに向上し、3-MA 存在下でともに有意に低下した。一方、SF 由来卵母細胞の IVM 能及び初期発生能は、ラパマイシン及び 3-MA の存在下で何ら影響を受けなかった。これらの結果から、mTOR シグナル経路依存性オートファジー誘導剤であるラパマイシンや同シグナル経路依存性のオートファジー阻害剤である 3-MA に対する反応や mTOR シグナル経路を介してオートファジー能を調整する能力は、MF 由来卵母細胞と SF 由来卵母細胞で異なることを明らかにし、それらの違いが MF および SF 由来卵母細胞の IVM 能や初期発生能の違いに影響する可能性を示唆した。

次に、mTOR 非依存的なオートファジー誘導剤としても知られる二糖類のトレハロースを IVM 培地に添加して、SF 由来卵母細胞のオートファジー能を mTOR 非依存的に制御することで、結果として同卵の IVM 能や初期発生能を改善出来ないかということについて、検討を行った。その結果、オートファゴソーム形成能と高い相関性を示す LC3-II および標的物質とオートファゴソームをつなぐアダプタータンパク質である p62 のタンパク質レベルで評価した SF および MF 由来卵母細胞のオートファジー能は、IVM 培養の進行とともに低下したが、10 mM トレハロース添加の有無による変化は認められなかった。一方、SF 由来卵母細胞の IVM 能および初期発生能は、10 mM トレハロースの添加によって、有意に改善された。さらに、SF および MF 由来卵母細胞を取り囲む卵丘細胞塊の生存性について調べたところ、MF 由来 COCs の卵丘細胞の生存性は IVM 培養の前半 20 時間の間、安定していたが、SF 由来 COCs の卵丘細胞の生存性は IVM 培養開始 20 時間までに顕著に低下すること、さらには、10 mM トレハロース添加によりその生存性は維持された。これらの結果から、IVM 培地への 10 mM トレハロースの添加は、卵母細胞のオートファジー能に影響することなしに、卵丘細胞の培養開始 20 時間での死滅を防ぎ、卵母細胞と卵丘細胞との十分なコミュニケーションを遂行し、結果的に SF 由来卵母細胞の IVM 能や胚盤胞期への初期発生能を向上させる可能性があることを示した。

以上の研究から mTOR シグナル経路を介するオートファジー能の調節能は、SF および MF 由来卵母細胞間で明らかに異なることを見出した。またさらに、LC3-II および p62 のタンパク質レベルで評価したオートファジー能についても IVM 培養の進行とともに低下することや、mTOR 非依存的なオートファジー誘導剤であるトレハロースを用いても SF 由来卵母細胞のオートファジー能を制御することは出来ないが、トレハロースの存在が SF 由来 COCs の卵丘細胞の生存性を少なくとも IVM 培養前半 20 時間維持するとともに IVM 能および胚盤胞期までの初期発生能を向上させることを明らかにした。これらの結果から、MF 由来卵母細胞の IVM 能および初期発生能は、オートファジー能調節によりさらに改善できるが、SF 由来卵母細胞のそれらは、トレハロースなどの存在下で卵丘細胞の死滅を防ぎ、卵母細胞と卵丘細胞との十分なコミュニケーションを確保することで改善される可能性を明らかにした。これらの知見は、卵巣内生殖細胞資源をさらに有効に活用することを可能にし、家畜生産や生殖補助医療での受精卵の体外生産効率を改善し、ゲノム編集などによる動物生産での生殖細胞供給をより容易にし、生殖バイオテクノロジーの更なる発展に大いに資すると考えられる。

本研究は、ブタ卵巢由来小卵胞(SF；直径 1～2 mm)および中卵胞(MF；直径 3～6 mm)由来卵母細胞の体外成熟(IVM)能や体外受精(IVF)能、初期発生能の違いと、それらを生み出す原因を検討することを目的とした。先行研究において、SF および MF 由来卵丘細胞－卵母細胞塊を IVM 培養に供し、それらの卵母細胞の IVM 能を比較するとともに、第一極体を確認できた成熟卵母細胞のみを用いて、それらの IVF 能および初期発生能を調べた。その結果、SF 由来卵母細胞の IVM 能および初期発生能は既報と同様に MF 由来卵のそれらと比較して低いことが確認されたが、IVF 率や前核形成率で評価される IVF 能および卵割率で評価される母系効果能は SF および MF 由来卵母細胞間に有意な差がないことを明らかにした。また、SF および MF 由来卵母細胞の AURKA, AURKB, MOS, ZP3, ZP4, NALP9, HSF1, BCL2 遺伝子由来 mRNA 量を IVM 培養の前後で比較した結果、全ての mRNA 量は IVM 培養の間に有意に低下したが、c-MOS 遺伝子を除く他の遺伝子の mRNA 量は MF および SF 由来卵母細胞間で差はなかった。一方、IVM 培養前の SF 由来卵母細胞の c-MOS 遺伝子転写産物量は、MF 由来卵より有意に低く、SF 由来卵母細胞の IVM 能や初期発生能に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで本研究において、IVM 培養中での mRNA 量の低下や卵母細胞のオートファジー能の重要性に関する報告の存在から、mTOR シグナル経路依存性オートファジー誘導剤のラパマイシンと同阻害剤の 3-MA が MF および SF 由来卵母細胞の IVM 率能および初期発生能におよぼす影響を調べた。その結果、IVM 培養時のラパマイシンまたは 3-MA 存在は、MF 由来卵母細胞の IVM 能および初期発生能をそれぞれ改善または阻害したが、SF 由来卵母細胞で同様の効果が全く観察されなかった。これらの結果から、mTOR シグナル経路を介してオートファジー能を調整する能力は、MF および SF 由来卵母細胞間で異なることを見出し、その違いがそれらの卵母細胞の IVM 能や初期発生能での違いに影響している可能性を示唆した。さらに、mTOR 非依存的なオートファジー誘導剤でもある二糖類のトレハロースが MF および SF 由来卵母細胞のオートファジー能および IVM 能や初期発生能におよぼす影響を調べた。その結果、トレハロースは LC3-II および p62 のタンパク質レベルで評価した SF 由来卵母細胞のオートファジー能に影響を及ぼさなかったが、卵丘細胞塊の生存性維持をサポートし、SF 由来卵母細胞の IVM 能および初期発生能を有意に改善した。以上の研究から、MF 由来卵母細胞の IVM 能および初期発生能は、オートファジー能調節によりさらに改善できるが、SF 由来卵母細胞のそれらは、トレハロースなどの存在下で卵丘細胞の死滅を防ぎ、卵母細胞と卵丘細胞との十分なコミュニケーションを確保することで改善される可能性を明らかにした。これらの知見は、雌性生殖細胞資源の有効活用を促進し、家畜生産や生殖補助医療での受精卵の体外生産効率の改善に大いに資すると考えられる。

第一章 諸言

卵形成について

哺乳動物での卵形成は、胎生期に始原生殖細胞が生殖巣原基に移動後に、卵原細胞となり、体細胞分裂による増殖を経て、一次卵母細胞へと分化することから始まる。一次卵母細胞は第一減数分裂前期で休止し、その周囲を一層の扁平な体細胞で囲まれ、さらにその周囲を基底膜で囲まれることで、原始卵胞が形成される。その後、一層の立方体型の顆粒層細胞で囲まれた一次卵胞を形成し、さらに二層以上の顆粒層細胞に囲まれた二次卵胞が形成される頃に、卵母細胞からの分泌物により、顆粒層細胞との間に透明帯が形成される。さらに、卵胞周囲に細血管が現れ、顆粒層細胞が3～6層に成長すると莢膜細胞が形成される。その後は、卵胞腔が顆粒層細胞の間隙に出現し、三次卵胞（胞状卵胞）へと成長し、卵胞腔同士が結合して一つの卵胞腔を持つグラーフ卵胞へと成長する。グラーフ卵胞内で一次卵母細胞は、卵胞腔に突出した卵丘と呼ばれる部分に押しやられ、卵丘細胞と呼ばれる顆粒層細胞の層で覆われる。

卵母細胞の成長と成熟

卵胞の発育に伴って、一次卵母細胞は卵母細胞-顆粒層細胞間の双方向コミュニケーションにより成長する。双方向コミュニケーションには、多くのトランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β)ファミリーの因子が関与している[1]。中でも、成長分化因子9 (Growth differentiation factor 9; GDF9) は卵母細胞内で強く発現しており[2]、GDF9欠損マウスは卵胞形成に異常が生じて不妊となる[3]ことから卵胞発育に関与する重要因子であると考えられている。卵母細胞で強く発現する骨形成タンパク質15 (Bone morphogenetic protein 15; BMP15)もまた、GDF9と協調して働くことで顆粒層細胞を増殖させ、卵胞形成を促進することが知られている[4]。卵胞の発育には、卵丘細胞を含む顆粒層細胞の増殖や、卵胞刺激ホルモン FSH や黄体形成ホルモン LH に対する応答性に係る顆粒層細胞の分化が重要である。これらの環境の中で卵母細胞は卵細胞質の直径を増大させる。卵細胞質の直径の増大が止まるまでの過程を卵母細胞の成長と呼ぶ。

また、FSH や LH は卵胞形成を促進し、LH サージは卵母細胞の減数分裂再開、卵丘細胞の膨化、排卵を誘起する。体外で FSH や LH の培養液への添加は卵丘細胞の膨化や卵母細胞の体外成熟を促進する[5,6]。FSH レセプターは顆粒層細胞と卵母細胞で、LH レセプターは莢膜細胞と顆粒層細胞で発現している[7]。FSH や LH は、卵丘細胞内での cAMP 産生量の増加 [8]と MAPK の活性化[9]を促すことで、卵母細胞内の cAMP レベルの一過性の上昇と卵丘細胞と卵母細胞間のギャップジャンクションの切断、それに伴う卵母細胞内 cAMP および cGMP レベルの低下を引き起こす。それらの一連の機構により、減数分裂の再開が誘起され、卵核胞膜が消失し、卵核胞が崩壊して、第一減数分裂中期へと細胞周期が回り出す。その後、第一極体を放出し二次卵母細胞となり、M-II 期で再度減数分裂を停止し、排卵に至

る。第一減数分裂前期で減数分裂を停止し、十分な大きさに成長した卵母細胞が再度減数分裂を停止する M-II 期まで移行する過程を卵成熟と呼ぶ。

卵成熟後の受精及び初期発生

排卵された成熟 (M-II 期) 卵母細胞は、卵管膨大部に運ばれ、そこで受精する。精子が侵入すると、成熟卵母細胞は直ちに第二極体を放出し、減数分裂は完了する。その後、侵入精子頭部はプロタミンのジスルフィド結合の還元などを経て膨化し、卵細胞周期の G1 期への進行とともに雄性前核が形成される。雌性前核と雄性前核は、微小管の働きで微小管形成中心に引き寄せられ、卵中央に移動して体細胞分裂紡錘体を形成することで受精現象が完結する。受精後、哺乳動物の卵は均等分割を繰り返しながら卵管から子宮へと移動し、将来主に胎児となる内部細胞塊と胎盤になる栄養膜細胞を含む胚盤胞を形成する。その後、胚盤胞内の胞胚腔が増大して拡張胚盤胞となり、透明帯から脱出し、着床する。

ブタ卵母細胞の体外生産

ブタを含む、多くの哺乳動物種で受精卵の体外生産技術が確立されている。ブタは世界で最も多く生産されている哺乳動物家畜である。先進国の多くでは、生後 6 か月前後の春季発動前未経産ブタを屠畜して食肉としているので、ブタ受精卵の体外生産のために利用される卵巣は、生後 6 か月前後の春季発動前未経産ブタに由来しており、直径 3-6 mm の MF から採取したものが生殖資源として活用されている [10,11]。また、既にブタ受精卵の体外生産のために、完全合成培地として、卵母細胞の体外成熟基礎培地の POM および受精培地の PFM [12]、受精卵の初期発生培地の PZM-5 [13] が既に開発され、利用されている。一方、ブタ卵巣表層には限られた数の MF しか存在せず、SF が大多数を占めている [14]。SF 由来卵母細胞を受精卵の体外生産に利用できれば、卵巣由来生殖細胞の利用効率が格段に向上することが期待できるが、SF 由来の COCs に含まれる卵母細胞の直径は MF 由来卵よりも小さく [15]、卵丘細胞数も少ない [16] ことが知られている。

また、SF 由来卵母細胞の体外成熟能および初期発生能は、MF 由来卵母細胞と比較して、核成熟 [17] や体外受精後の前核形成率 [18]、初期発生の能力 [19] が有意に低いことが知られている。しかし、それらの研究では、IVM 後に未成熟な卵母細胞が含まれており、その後の発生に影響を及ぼした可能性がある。本研究に先行した研究において、IVM 後に光学顕微鏡下で第一極体を放出している卵母細胞を選別し、その後の、IVF 率や初期発生率に及ぼす影響を調べた。その結果、第一極体の放出と固定染色後の細胞学的な観察によって評価された卵母細胞の成熟率は、SF 由来卵よりも MF 由来卵で有意に高かった [19]。SF 由来卵母細胞質内の cAMP および cGMP 量の動態 [20] や、グルタチオンおよび MPF レベル [21] についても、MF 由来卵のそれらと比較して有意に異なることが示されている。また、IVM 培養後に第一極体を伴う成熟卵母細胞のみを選別し IVF に供したところ、授精開始後 6 時間または 9 時間の精子侵入率、雌雄前核形成率および卵母細胞あたりの精子侵入数に SF

および MF 由来卵母細胞間で有意な差は認められなかった。精子侵入のタイミングや前核形成の進行は SF および MF 由来卵母細胞で同様であったので、これらの成熟卵母細胞間に受精能における有意な差はなかった。さらに、先行研究において、SF および MF 由来成熟卵母細胞の発生能を決定するために、第一極体を確認した卵母細胞のみを IVF に供した。それにもかかわらず、MF 由来成熟卵母細胞の胚盤胞形成率は、SF 由来成熟卵母細胞のそれと比較して有意に 2 倍程高かった。成熟した経産ブタから採取した卵母細胞の IVM-IVF-IVC 後に胚盤胞に発生する能力は直径 3~8 mm の卵胞に由来する卵母細胞間で違いはないが、春季発動前の未経産ブタでは、3~4 mm の直径の卵胞から採取した卵母細胞の発生能は 5~8 mm の卵胞から採取した卵母細胞のそれより低いようである[22]。したがって、SF 由来卵母細胞の発生能は、IVP や他の生殖バイオテクノロジーのための卵母細胞の資源利用として主要な制約になる可能性がある。

ブタ卵母細胞の IVM 中の遺伝子転写量

卵母細胞が初期胚発生を維持する能力は、IVM、IVF、および IVC に影響する遺伝子の相対的な転写産物量の複雑なパターンや特異性を反映するはずである。したがって、SF 由来卵母細胞の成熟、受精、および発生能力の違いは、それらの転写量に関連している可能性がある。性的に成熟したブタ卵巢由来卵母細胞を用いた研究[23]はあるが、春季発動前の卵巢の異なる卵胞由来の卵母細胞中の遺伝子の転写量を比較した研究はほとんどない。抗体マイクロアレイを用いた比較分析は、多くのタンパク質がブタ卵母細胞の成熟時に別々に調節されているようであることを明らかにしている[24]。これらのタンパク質は、細胞周期の調節、受精、増殖、代謝など、多くの生物学的なプロセスに含まれている遺伝子と関連する。これらのプロセスに関連する遺伝子の転写量の違いが、春季発動前の未経産雌ブタの SF 由来卵母細胞の低い能力に関係するかもしれない。そこで本研究の先行研究として、卵母細胞の成熟、受精、受精卵の発生や抗アポトーシス効果の調節に関係する

(AURKA、AURKB、MOS、ZP3、ZP4、NALP9、HSF1、BCL2) のトランスクリプトーム解析に焦点を当てた研究を行った。

減数分裂の進行に関連する 3 つの遺伝子 (AURKA、AURKB、および MOS) とアポトーシスに関連する 1 つの遺伝子 (BCL2) の転写産物量を IVM の前後に分析した結果、COCs を収集した直後、これらの遺伝子はすべて GV 期卵母細胞で発現していた。しかし、M-II 期での減数分裂停止に関与し、ブタ卵母細胞の MPF 活性を介在する[25,26] MOS 転写産物のみが、GV 期卵母細胞において SF よりも MF 由来の卵母細胞に多く存在していた。IVM 培養後、サイクリン B および Mos の合成を促進し、ブタ卵母細胞の減数分裂再開を促進する[27] AURKA を含む遺伝子の発現レベルは、SF および MF の卵母細胞で同様に基底レベルまで大幅に低下した。BCL2 遺伝子の転写量は、春期発動前ブタの卵母細胞の老化中に徐々に減少し、抗アポトーシスタンパク質 BCL2 を減少させ、第二減数分裂中期での姉妹染色分体の異常分配、胚の断片化、アポトーシスを引き起こした[28]。ゆえに、これら 4 つの

遺伝子の卵母細胞での転写量は、第二減数分裂中期でのタンパク質量を反映しないかもしれない。春季発動前未経産ブタの SF 由来卵母細胞での MPF レベルは、MF 由来卵のそれより低い [21] ので、SF 由来卵母細胞が M-II 期へ到達する能力の低さは、MPF に関連するシグナル経路の能力低下による可能性がある。

精子-卵母細胞間の相互作用に関連する遺伝子発現の分析により、GV 期および M-II 期にある SF および MF 由来卵母細胞での ZP3 および ZP4 遺伝子の発現に有意な差は見られなかった。これらの観察結果は、ブタ卵母細胞の被精子侵入能や前核形成能に関するこれまでの報告 [17,18] とは異なった。これまでの報告では、より大きな卵胞に由来する卵母細胞は、より多く第二減数分裂中期に到達し、IVF 時に精子に侵入され、結果としてより多くの卵母細胞が受精終了時まで少なくとも 2 つの雌雄両前核を形成することを示唆していた。しかしながら、これらの研究では、第一極体の存在などによって IVF の前に成熟卵母細胞を選抜していなかったため、異なる結果が得られたと考えられた。

先行研究において、初期発達能力のマーカーとして母性効果遺伝子のいくつかを分析した。これらの遺伝子は成熟能や受精後の胚性ゲノムの活性化に必要な転写物やタンパク質を卵形成の間にコードする [29]。HSF1 転写産物の総量は、大きな卵胞よりも SF 由来ウシ卵母細胞で高かった [30] が、先行研究において、GV 期および M-II 期の卵母細胞における NALP9 および HSF1 の転写産物量に SF および MF 由来卵母細胞の間で有意差はなかった。SF 由来卵母細胞での胚盤胞あたりの細胞数は、MF 由来卵のそれより少なかったことから、NALP9 および HSF1 の細胞転写産物量に関する本観察結果は、(細胞数で評価される) 受精卵の品質に反映されている可能性がある。したがって、未成熟卵母細胞は IVM 後に廃棄されたが、MF 由来成熟卵母細胞の発生能は SF 由来のそれより依然として高いと言える。

先行研究において、GV 期にある卵母細胞の MOS 転写レベルのみが、SF 由来卵よりも MF 由来卵で有意に高かった。モロニー肉腫腫瘍遺伝子は、脊椎動物の卵母細胞の減数分裂成熟 (または G2 期/M 期進行) において重要な役割を果たすタンパク質である細胞増殖抑制因子 (CSF) の一成分である。SF 由来卵での低い発生能は、SF 由来卵母細胞でのこの遺伝子の相対転写産物量が低いことに関係している可能性がある。この遺伝子の発現が低いことは、SF 由来卵母細胞の成熟と初期発生に影響を与える可能性のあるタンパク質が低レベルにあることを示している可能性がある。

先行研究において、卵丘細胞での転写の変化を調べていないが、そのような解析は興味深いと思われる。性的に成熟した雌牛では、卵丘細胞での FSHR、EGFR および GHR mRNA の発現は、卵胞直径の成長とともに増加した [31]。EGF に対する卵丘細胞の反応は、直径 3~4 mm の卵胞よりも直径 6 mm 以上のブタ卵胞から採取された卵母細胞でより強いことが知られている [32]。卵母細胞だけでなく卵丘細胞における遺伝子の転写量に関するさらなる解析は、春期発動前の未経産ブタの SF および MF 由来卵母細胞の発生能の違いを検出するために必要である。

オートファジーと卵成熟

オートファジーは、標的物質を取り囲んだオートファゴソームがリソソームと融合することで、細胞内の不要なタンパク質や細胞小器官を除去するために重要なメカニズムである [33]。哺乳動物生殖細胞でのオートファジー活性は、受精卵の初期発生[34-36]だけでなく、卵母細胞の成熟[37,38]時に重要な役割を担っている。オートファゴソーム形成と正の相関を示す微小管結合タンパク質軽鎖 3 (LC3) -II レベルによって評価されるオートファジー活性は、未成熟ブタ卵母細胞で観察されるが、成熟卵母細胞より有意に高いことが知られている [37]。また、オートファジー阻害剤 LY294002 を IVM 培養液中に添加すると、MF 由来卵母細胞の第一極体の放出率（体外成熟率）が有意に低下する [39]。また、オートファジー誘導剤であるラパマイシンは、細胞の増殖を調節する経路で重要な役割を果たすセリン/スレオニンプロテインキナーゼであるラパマイシン標的物質（mTOR）を抑制することで、オートファゴソーム膜形成を誘導し、その結果オートファジーを活性化することが知られている [40] が、IVM 培地中への 1 nM ラパマイシンの添加は、体外での MF 由来ブタ卵母細胞の成熟率と胚盤胞期への発生率を改善することが報告されている [38]。さらに、mTOR シグナル経路の活性化を誘導してオートファジー能を阻害する 3-メチルアデニン (3-MA) は、2.5 mM [35] および 0.02~2 mM [41] のレベルで、それぞれ、ブタおよびウシ受精卵のオートファジー活性を阻害することが示されている。

トレハロース

1,1-グリコシド結合で D-グルコースが結合した非還元二糖であるトレハロースは、細菌、酵母、真菌、昆虫、無脊椎動物、植物を含む多くの生物に存在するが、脊椎動物には存在しない。トレハロースは、細胞タンパク質の変性を防ぐことで、極端な温度、乾燥、脱水、酸化など、様々な環境ストレスから細胞を保護する生理学的機能を有する [42]。またトレハロースは、非 mTOR シグナル経路を介してオートファジー能を高めることが示されている [43]。さらに、トレハロースを培地に添加すると、ヒト神経細胞 [44,45] や HeLa 細胞 [46] 中に、分解標的物質とオートファゴソームをつなぐアダプタータンパク質として機能する p62 [47] が蓄積されることが報告されている。

本研究の目的

以上の知見を踏まえた上で、SF 由来ブタ卵母細胞の体外成熟能および初期発生能に関する一連の研究を実施した。本研究の目的は、ブタ卵巢中に多数存在する小卵胞 (SF；直径 1~2 mm) 由来卵母細胞の体外成熟能、受精能および胚盤胞期までの初期発生能が中卵胞 (MF；直径 3~6 mm) 由来卵母細胞のそれらと比較して低いという報告 [17-18,48] を検証するとともに、その違いを生み出す原因を考察することであった。

先ず、これまでの報告[17-18,48]では、体外成熟後の卵母細胞を全て体外受精に供して、体外受精能や初期発生能の評価をしている。これでは、SF 由来および MF 由来卵母細胞の体外成熟能に差がある場合、その差が体外受精能や初期発生能の評価にまで影響を及ぼすことから、正確にそれらを再評価する必要があった。そこで、本研究の先行研究において、IVM 後に第一極体の放出が確認できた成熟した卵母細胞のみを選別して IVF に供し、体外受精率や前核形成率、胚盤胞到達率を調べた。さらに、減数分裂や受精、初期発生に關与する遺伝子の卵母細胞中の転写物質 (AURKA,AURKB, MOS,ZP3,ZP4,NALP9,HSF1,BCL2)量が SF 由来および MF 由来卵母細胞間で異なるために、体外成熟能や初期発生能に差が生じるのかもしれない。そこで、IVM に供する SF 由来および MF 由来卵母細胞のそれらの転写量に差があるか否かについて明らかにした。

本件研究の先行研究において、ブタ卵母細胞の転写量が IVM 開始前後で大きく変化したことから、またブタ卵母細胞の活性化や 4-細胞期での母系転写物から胚性転写物への移行時にも卵細胞室内のタンパク質などのパターンが大きく変動することが知られており[49]、オートファジーによる不要物質等の除去が重要と考えられる。SF 由来卵母細胞の IVM 能や初期発生能が MF 由来卵母細胞のそれらに劣ることは、それらの卵母細胞のオートファジー能の調整機構の違いに起因するかもしれない。そこで、mTOR 阻害によってオートファジーを促進する効果が知られているラパマイシンとオートファジーの阻害剤である 3-MA に対する卵母細胞の IVM 能および初期発生能に及ぼす影響を明らかにするために、SF および MF 由来卵母細胞のそれらを比較した。

さらに、二糖類のトレハロースは、体細胞のオートファジー能誘導を誘起することが知られている[43,50]。そこで、トレハロースが SF 由来卵母細胞のオートファジー能を誘起することで IVM 能や初期発生能をも改善できるかもしれないとの仮説の下、SF および MF 由来卵母細胞の IVM 培地中にトレハロースを添加し、IVM 能や胚盤胞期への初期発生能率とともにウェスタン・ブロッディング法によりオートファジーマーカーである LC3-II 量と p62 量、さらに卵丘細胞の生存性を比較検討した。

第二章 本研究で用いた材料および方法

試薬および培養液

NaCl、KCl、 KH_2PO_4 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、NaOH、Gentamicin、酢酸、流動パラフィンは、ナカライテクス株式会社より購入した。 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ は、石津製薬株式会社より購入した。eCG (Serotropin) および hCG (Gonotropin) は、あすか製薬株式会社より購入した。M199 粉末は、Invitrogen より購入した。その他の試薬は、特に記述しない限り、シグマアルドリッチ株式会社より購入した。

COCs の回収、洗浄、選抜には modified TL-HEPES-PVA (mTL-HEPES-PVA) を使用した。COCs の体外成熟 (In vitro maturation, IVM) には、基礎培地として BSA を含まない mPOM に $50 \mu\text{M}$ beta-mercaptoethanol を加えた[51]。成熟卵母細胞の IVF には、mM199 を使用した。胚の体外培養には、PZM-5 を用いた[13]。これらの mTL-HEPES-PVA を除くすべての試薬は、気相条件、5% CO_2 、39°C 下で、少なくとも 3 時間以上平衡化させた。

COCs の採取と IVM

岡山県営食肉地方卸売市場で屠畜された春期発動前の未経産ブタから卵巣を採取し、 $75 \mu\text{g/ml}$ potassium penicillin G および $50 \mu\text{g/ml}$ streptomycin sulfate を添加した滅菌済み 0.9% NaCl 溶液 (37°C) に浸して、研究室に輸送した。卵巣の取得から 3 時間以内に卵巣表面に存在する直径 1-2 mm の SF および直径 3-6 mm の MF から、18-gauge 針と 10-ml シリンジを用いて COCs を吸引採取し、mTL-HEPES-PVA で 3 回洗浄した[52]。3 層以上の卵丘細胞塊および均質な細胞質を有する COCs を実体顕微鏡下で選抜し、実験に供した。

POM 培地で 3 回洗浄した 40-50 個の COCs を $500 \mu\text{l}$ の POM が入った 4-well 培養プレート (Thermo Fisher Scientific, Inc) に移し、ゴナドトロピン (10 IU eCG/ml および 10 IU hCG/ml) および 1 mM dbcAMP を添加した POM $500 \mu\text{L}$ を、5% CO_2 、39 °C 下で 20 時間培養した。これらの培地には、ラパマイシン (1 または 10 nM ; Santa Cruz Biotechnology, Inc) または 3-メチルアデニン (0.2 または 2 mM ; 3-MA; Santa Cruz Biotechnology, Inc)、トレハロース (10 mM ; 林原株式会社) の非存在下または存在下で別々に培養した。次に、COCs を POM で 3 回洗浄し、ゴナドトロピンおよび dbcAMP を含まない $500 \mu\text{l}$ の IVM 培地 (ラパマイシン、3-MA、およびトレハロース存在下または非存在下) で 24 時間培養した[52,53] IVM 後、0.1% (w/v) ヒアルロニダーゼを含む mTL-HEPES-PVA 培地でピペッティングすることにより卵丘細胞を除去した。その後、卵丘細胞を除去した卵母細胞

を酢酸アルコールで固定もしくは、光学顕微鏡下で第一極体の放出を観察した。第一極体の観察された成熟卵母細胞は、その後の実験に供した。

卵母細胞の減数分裂評価

IVM 培養後、卵丘細胞を除去した卵母細胞を四隅にワックススポットを置いたスライドガラス中央部に載せ、カバーガラスで壊れない程度に圧迫保定した後に、酢酸アルコール（エタノール中の 25% (v/v) 酢酸）中で 2 日以上固定した。その後、標本を 45% (v/v) 酢酸中の 1% (w/v) オルセインで 5 分間染色し、200 倍および 400 位の位相差顕微鏡下で卵母細胞の減数分裂の核成熟を評価した。

卵母細胞の単為発生と IVC

IVM44 時間後、第一極体を確認された成熟卵母細胞のみを選択し、エレクトロポーション培地に移した。同培地で 3 回洗浄後、活性化チャンバー内に同液を満たした中に導入し、BTX-Electro-Cell Manipulator 2001M (BTX、カリフォルニア州サンディエゴ) を使用して、1.2kV / cm の DC 強度で 30 μ s の直流電気パルスを成熟卵母細胞に付与した。刺激した卵母細胞を 0.4% (w/v) BSA および 5 μ M サイトカラシン B を添加した m199 中で洗浄後、同培地で 5% CO₂ in air の気相条件下、39 °C にて 4 時間培養した。その後、卵母細胞を PZM-5 で 3 回洗浄し、4-well 培養プレート (Thermo Fisher Scientific, Inc., Roskilde, デンマーク) のパラフィンオイルで覆われた 500 μ l の PZM-5 で 5% CO₂ in air の気相条件下、39 °C にて 5 日間培養した。卵割率および胚盤胞形成率を培養開始後 2 日および 5 日にそれぞれ観察し、卵母細胞の初期発生能を評価した。胚盤胞期胚は Hoechst 33342 で核を 15 分間染色後に、蛍光顕微鏡下で細胞数を調べた。

ウエスタンブロッティング法によるタンパク質レベルの解析

卵巣からの採取直後に mTL-HEPES 下でピペッティングにより卵母細胞を裸化し、0.125 M Tris-HCL (pH 6.8)、4% ドデシル硫酸ナトリウム、10% (v/v) 2-メルカプトエタノール、10% (w/v) スクロース、0.01% (v/v) ブロモフェノールブルーで構成されるサンプルバッファ (10 μ l) に入れて -80 °C で保存した。また、IVM 開始から 20 時間後の卵母細胞を裸化して 10 μ l サンプルバッファとともに -80 °C で保存した。さらに、第一極体を観察した成熟卵母細胞を同様に 10 μ l サンプルバッファとともに -80 °C で保存した。卵母細胞を 95 °C で 5 分間ボイル後に、等量をゲルにロードして、30 mA、40~50 分でポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)。その後、ゲル内にあるタンパク質を 100 V で 2 時間かけて、PVDF 膜 (Merck, ドイツ) に転写した。膜を PVDF ブロッキング試薬 (東洋紡、大阪、日本) でブロック後、一次抗体とともに

1 時間培養し、0.1% (v/v) Tween 20 含有 PBS で 3 回洗浄後、二次抗体と 1 時間培養した。使用した一次抗体は、ウサギ LC3A / B (Cell Signaling Technology、12741、1 : 100)、ウサギ p62 (Cell Signaling Technology 5114S、1 : 100)、マウス α チューブリン (SIGMA ALDRICH、T5168) であった。使用した二次抗体は、Anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology、7074S、1 : 2000)、Anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology、7076S、1 : 2000) を使用した。ECL (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA) を用いて化学発光を強化し、膜上の標的タンパク質を視覚化した。各タンパク質の発現状況は、ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA) にて観測した。

蛍光染色法による卵丘細胞の生存性判定

IVM 培養の前後あるいは途中での SF および MF 由来 COCs 卵丘細胞の生存性を評価するために、COCs を PI/SYBR green (それぞれ $1 \mu\text{g/mL}$) を含む PBS 中で 15 分間染色した。その後、VectaShield (Vector Laboratories Inc.、カリフォルニア州バーリングゲーム) を少量滴下したスライドガラス上にマウントし、カバーガラスにて保定後直ちに蛍光顕微鏡 (BZ-X710、Keyence、Osaka、Japan) 下で観察した。すべての細胞膜に浸透し核 DNA を染色する SYBR green 由来緑色蛍光と細胞膜の透過性が高まった死細胞にのみ透過する PI 由来の赤色蛍光の組み合わせにより、緑色蛍光細胞を生存細胞、オレンジ色の蛍光が観察される細胞を死細胞とみなした。以上 2 色の蛍光度合いにより、COCs を 4 つの範疇に分類した。75% 以上の卵丘細胞が生存している COCs を範疇 A、50% 以上 75% 未満の卵丘細胞が生存している COCs を範疇 B、25% 以上 50% 未満の卵丘細胞が生存している COCs を範疇 C、生存細胞が 25% 未満の COCs を範疇 D とした。それぞれの範疇に含まれる COCs の割合で IVM を通して卵丘細胞の生存性がどのように変化したのかを評価した。

統計分析

GraphPad Prism 6 ソフトウェア (GraphPad Software Inc.、カリフォルニア州サンディエゴ) を使用し、One-Way または Two-Way ANOVA により、反復実験データを解析した。90% 以上または 10% 以下のデータが含まれる場合、全てのパーセンテージデータをアークサイン変換し、統計解析を行った。全てのデータは、アークサイン変換前のデータの平均 $\pm$ SEM として示された。ANOVA 解析で有意な効果があった場合、Bonferroni/Dun のアドホックテストにより、各実験区を比較した。全ての解析結果は、 $P < 0.05$ の場合にのみ有意差があると見なした。

第三章 中卵胞および小卵胞由来ブタ卵母細胞の減数分裂および初期発生能は、オートファジー誘導剤と阻害剤に対する感受性が異なる

緒言

ブタ受精卵の体外生産では、およそ生後6か月に屠殺された未経産ブタ卵巢から得られた直径3-6 mmの中卵胞(MF)に由来するCOCsを使用することが一般的である[10-11,54]。しかしながら、ブタ卵巢の表面に存在するMFは、直径2 mm以下の小卵胞(SF)に比べて顕著に少なく[14]、限られた数しか存在していない。加えて、SF由来卵母細胞から得た卵母細胞の直径[15]や卵母細胞を取り巻く卵丘細胞数[16]は、MF由来卵母細胞よりそれぞれ有意に小さく、少ない。さらに、体外成熟能や初期発生能はMF由来卵母細胞と比較して有意に低い[17-19]、本研究の先行研究で明らかにした通り、IVM培養後に第一極体の放出を確認した成熟卵母細胞のみをIVFに供すると、精子侵入率や前核形成率がSF由来卵母細胞とMF由来卵母細胞で同等であった[19]。また、MOS遺伝子の転写量[19]やcAMPやcGMP[20]、グルタチオンやMPFのレベル[21]など、細胞質成熟に関係のある因子は、MFおよびSF由来卵母細胞間で異なることが報告されている。しかし、MFおよびSF由来卵母細胞の体外成熟能および初期発生能の違いの詳細については未だ解明されていない。

オートファジーは、リソームと融合することで細胞質内の不要になったタンパク質や細胞小器官を除去する重要なメカニズムである[33]。哺乳類において、高いオートファジー活性は、初期発生に重要である[34-36]だけでなく、卵母細胞の体外成熟に重要であることが報告されている[39]。オートファジーの活性を示すLC3-IIレベルは採卵直後の未熟なブタ卵母細胞で観察され、それらは成熟した卵母細胞より高い活性を示している[37]。また、ラパマイシンは、細胞増殖やオートファジーを制御するセリンスレオニンプロテインキナーゼのmTORを抑制することでオートファゴソーム膜形成を誘導するオートファジー活性作用のあることが知られている[40]。IVM培地への1 nMのラパマイシンの添加は、MF由来ブタ卵母細胞の体外成熟率や初期発生率を改善することが知られている[38]。

さらに、3-MAは、mTOR経路の制御をすることでオートファジー活性を抑制する。IVC培養液への2.5 mMの3-MA添加により、ブタ受精卵の初期発生[35]、0.02–2 mMの3-MA添加により、ウシ受精卵の初期発生を抑制する[41]ことが報告されている。MF由来卵母細胞のオートファジー誘導剤や阻害剤に対する相互作用に関する研究については、報告があるが、SF由来卵母細胞に対するオートファジー誘導剤や阻害剤の効果は、解明されていない。オートファジー誘導剤や阻害剤に対する反応は、SFおよびMF由来ブタ卵母細胞の間で異なり、それが成熟能や初期発生能の違いを生じさせている可能性がある。そこで本研究では、オートファジー

誘導剤であるラパマイシンと同阻害剤である 3-MA が SF および MF 由来ブタ卵母細胞の体外成熟能および初期発生能に及ぼす効果について調べた。

実験デザイン

IVM 培地へのラパマイシン (0, 1, 10 nM)、3-MA (0, 0.2, 2 mM) 添加が SF および MF 由来卵母細胞の体外成熟能に及ぼす影響

吸引採取された SF および MF 由来卵丘細胞 - 卵母細胞塊 (COCs) を POM 培養液で洗浄後、同培養液にゴナドトロピン (eCG および hCG) と 1 mM dbcAMP、ラパマイシン (0, 1, 10 nM) もしくは 3-MA (0, 0.2, 2 mM) を加えて IVM 培養開始から 20 時間培養した。その後、ゴナドトロピン、1 mM dbcAMP、ラパマイシン、3-MA 不含の POM 培養液に移し、さらに 24 時間培養した。IVM 後、核成熟を評価するために固定・染色した。400 倍の位相差顕微鏡下でそれらの卵母細胞を観察し、GV 期、Metaphase-I (M-I) 期、Anaphase-I/Terophase-I (A-I/T-I) 期、および Metaphase-II (M-II) 期に分類した (Funahashi et al., 1993)。実験は 4-5 回繰り返した。

IVM 培地へのラパマイシン (0, 1, 10 nM)、3-MA (0, 0.2, 2 mM) 添加後が SF および MF 由来卵母細胞の初期発生能に及ぼす影響

吸引採取された SF および MF 由来 COCs を POM 培養液で洗浄後、同培養液にゴナドトロピンと 1 mM dbcAMP、ラパマイシン (0, 1, 10 nM) もしくは 3-MA (0, 0.2, 2 mM) を加えて IVM 培養開始から 20 時間培養した。その後、ゴナドトロピン、1 mM dbcAMP、ラパマイシン、3-MA 不含の POM 培養液に移し、さらに 24 時間培養した。IVM 培養終了時に、第一極体を確認できた成熟卵母細胞を選抜し、1.2 kV/cm の DC 強度で 30 μ s の電気パルスを与え、0.4% BSA および 5 μ g/ml cytocharacin B 添加 m199 培地で 3 回洗浄後、同液で 4 時間培養し、単為発生卵の第二極体の放出を抑制した。その後、PZM-5 で 3 回洗浄後、同液中で、5% CO₂ in air、39 °C の気相条件下で 5 日間培養した。単為発生 2 日後に卵割率を、同 5 日後に胚盤胞期胚形成率を光学顕微鏡下で観察した。胚盤胞期胚は、Hoechst 33342 で核を染色後、蛍光顕微鏡下で細胞数を測定した。実験は 4-5 回繰り返した。

結果

MF 由来 COC s を IVM 培養開始から 20 時間、1 または 10 nM ラパマイシンの不在または存在下で培養した場合、1 nM ラパマイシン存在下での卵母細胞の成熟率($80.0 \pm 1.5\%$)は、同不在対照区のそれ($72.3 \pm 1.4\%$)より有意に高かった(Table 1、 $P < 0.05$)。ただし、10 nM ラパマイシンの存在下での成熟率 ($77.6 \pm 1.5\%$)は、同不在対照区と有意差はなかった(Table 1)。一方、SF 由来卵母細胞の体外成熟率に関して、1 および 10 nM のラパマイシン添加の影響はなく (0 nM 区 $50.7 \pm 2.7\%$ 、1 nM 区 $62.5 \pm 1.9\%$ 、10 nM 区 $60.4 \pm 4.9\%$ 、Table 2)、MF 由来の対象区のそれ ($80.1 \pm 2.3\%$) より有意に低かった (Table 2、 $P < 0.05$)。

Table1. Effect of rapamycin during the first 20h of culture on the meiotic maturation of medium follicle (MF-) derived porcine oocytes in vitro

Conc. (nM) of Rapamycin	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes degenerated	No. (%) of oocytes proceeded to the stage of			
			GV	M- I	A- I /T- I	M- II
0	173	1 (0.6 ± 0.6)	5 (2.9 ± 2.7)	40 (23.1 ± 2.4)	2 (1.2 ± 0.7)	125 (72.3 ± 1.4^a)
1	195	1 (0.5 ± 0.5)	10 (5.1 ± 1.8)	27 (13.8 ± 2.4)	1 (0.5 ± 0.5)	156 (80.0 ± 1.5^b)
10	170	2 (1.2 ± 0.7)	7 (4.1 ± 2.1)	28 (16.5 ± 2.2)	1 (0.6 ± 0.6)	132 (77.6 ± 1.5^{ab})

Percentage data in parentheses are shown as mean $\pm$ SEM from four replicates.

Abbreviations: GV, germinal vesicle; M- I , metaphase- I ; A- I /T- I , anaphase- I /telophase- I ; M- II , metaphase- II .

^{ab} Within a column, percentage with different superscript differed significantly ($P < 0.05$).

Table2. Effect of rapamycin during the first 20h of culture on the meiotic maturation of small follicle (SF-) derived porcine oocytes in vitro.

Origin of COCs	Conc. (nM) of Rapamycin	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes degenerated	No. (%) of oocytes proceeded to the stage of			
				GV	M- I	A- I /T- I	M- II
MF	0	221	2 (0.9 ± 1.1^a)	3 (1.4 ± 0.9^a)	35 (15.8 ± 2.6^a)	4 (1.8 ± 1.6)	177 (80.1 ± 2.3^a)
SF	0	215	1 (0.5 ± 0.5^a)	34 (15.8 ± 3.0^b)	71 (33.0 ± 3.5^b)	0 (0)	109 (50.7 ± 2.7^b)
SF	1	224	12 (5.4 ± 1.0^b)	14 (6.3 ± 1.5^{ab})	57 (25.4 ± 3.4^{ab})	1 (0.4 ± 0.4)	140 (62.5 ± 1.9^b)
SF	10	169	3 (1.8 ± 1.2^a)	17 (10.1 ± 2.8^b)	47 (27.8 ± 4.9^{ab})	0 (0)	102 (60.4 ± 4.9^b)

Percentage data in parentheses are shown as mean $\pm$ SEM from five replicates.

Abbreviations: COCs, cumulus-oocytes complexes; MF, middle follicles; GV, germinal vesicle; M- I , metaphase- I ; A- I /T- I , anaphase- I /telophase- I ; M- II , metaphase- II .

^{ab} Within a column, percentage with different superscript differed significantly ($P < 0.05$).

一方、IVM 培養開始から 20 時間の間に 3-MA が存在すると、0.2 mM 3-MA 添加区の MF 由来卵母細胞の体外成熟率($63.0 \pm 1.6\%$)は無添加対象区のそれ($75.1 \pm 3.1\%$)に比べて有意に低下した(Table 3、 $P < 0.05$)が、2 mM 添加区($64.6 \pm 3.0\%$)では有意差がみられなかった。一方、SF 由来の卵母細胞では、0.2 および 2 mM の 3-MA の添加は、体外成熟率に影響せず(0 mM 区 $47.3 \pm 0.4\%$ 、0.2 mM 区 $50.7 \pm 4.0\%$ 、2 mM 区 $46.9 \pm 3.4\%$ 、Table 4、 $P < 0.05$)、SF 由来卵母細胞の成熟率は、3-MA の存否に関わらず MF 由来卵母細胞のそれよりも有意に低かった(Table 4)。

Table3. Effect of 3-methyladenine (3-MA) during the first 20h of culture on the meiotic maturation of medium follicle (MF-) derived porcine oocytes in vitro.

Conc. (mM) of 3-MA	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes degenerated	No. (%) of oocytes proceeded to the stage of:			
			GV	M- I	A- I /T- I	M- II
0	193	0 (0.0)	17 (8.8 ± 3.1)	31 (16.1 ± 2.2^a)	0 (0)	145 (75.1 ± 3.1^a)
0.2	192	2 (1.0 ± 0.6)	21 (10.9 ± 3.1)	48 (25.0 ± 2.2^b)	0 (0)	121 (63.0 ± 1.6^b)
2	192	0 (0.0)	12 (6.3 ± 1.3)	53 (27.6 ± 2.1^b)	3 (1.6 ± 0.5)	124 (64.6 ± 3.0^{ab})

Percentage data in parentheses are shown as mean $\pm$ SEM from four replicates.

Abbreviations: GV, germinal vesicle; M- I, metaphase- I; A- I /T- I, anaphase- I /telophase- I; M- II, metaphase- II.

^{ab} Within a column, percentage with different superscript differed significantly ($P < 0.05$).

Table4. Effect of 3-methyladenine (3-MA) during the first 20h of culture on the meiotic maturation of small follicles (SF-) derived porcine oocytes in vitro.

Origin of COCs	Conc. (mM) of 3-MA	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes degenerated	No. (%) of oocytes proceeded to the stage of:			
				GV	M- I	A- I /T- I	M- II
MF	0	201	11 (5.5 ± 1.8)	16 (8.0 ± 1.6)	32 (15.9 ± 3.0^a)	2 (1.0 ± 0.6)	140 (69.7 ± 2.8^a)
SF	0	186	7 (3.8 ± 1.5)	36 (19.4 ± 2.9)	55 (29.6 ± 1.9^b)	0 (0)	88 (47.3 ± 0.4^b)
SF	0.2	213	8 (3.8 ± 1.7)	30 (14.1 ± 3.0)	66 (31.0 ± 3.0^b)	1 (0.5 ± 0.4)	108 (50.7 ± 4.0^b)
SF	2	224	2 (0.9 ± 1.0)	19 (8.5 ± 3.2)	97 (43.3 ± 2.1^c)	1 (0.4 ± 0.4)	105 (46.9 ± 3.4^b)

Percentage data in parentheses are shown as mean $\pm$ SEM from five replicates.

Abbreviations: COCs, cumulus-oocytes complexes; MF, middle follicles; GV, germinal vesicle; M- I, metaphase- I; A- I /T- I, anaphase- I /telophase- I; M- II, metaphase- II.

^{a-c} Within a column, percentage with different superscript differed significantly ($P < 0.05$).

MF 由来卵母細胞では、IVM 開始 20 時間の間に 1 nM ラパマイシンが存在すると、ラパマイシン無添加の対照区と比較して、単為発生後の胚盤胞期への発生能力が著しく増加した(0 nM 区 $23.6 \pm 2.3\%$ 、1 nM 区 $35.3 \pm 2.4\%$ 、Table 5、 $P < 0.05$) が、10 nM ラパマイシン添加区の胚盤胞形成率($28.5 \pm 2.7\%$)は無添加対象区と比較して有意差はなかった(Table 5)。一方、SF 由来卵母細胞では、ラパマイシンの添加は単為発生後の胚盤胞形成率に影響を及ぼさなかった (0 nM 区 $18.1 \pm 3.4\%$ 、1 nM 区 $15.6 \pm 3.1\%$ 、Table 6)。また、それらは MF 由来卵母細胞の胚盤胞形成率($30.6 \pm 2.6\%$)より有意に低かった(Table 6、 $P < 0.05$)。COCs 由来の卵胞の大きさ(SF vs. MF)に関係なく、ラパマイシンの存在は、卵割率と胚盤胞あたりの細胞数の両方に有意な影響を及ぼさなかった (Table 5 および Table 6)。

Table 5. Effect of rapamycin during the first 20h of in vitro maturation on the early developmental competence following parthenogenetic activation of medium follicle (MF-) derived porcine oocytes

Conc. (nM) of Rapamycin	No. of mature oocytes examined	No. (%) of oocytes		No. of blastomeres per blastocyst
		cleaved	formed blastocyst	
0	144	128 (88.9 ± 2.6)	34 (23.6 ± 2.3^a)	30.1 ± 1.5
1	153	141 (92.2 ± 2.4)	54 (35.3 ± 2.4^b)	28.3 ± 1.4
10	144	131 (91.0 ± 1.1)	41 (28.5 ± 2.7^{ab})	28.1 ± 1.6

Percentage data in parentheses are shown as mean $\pm$ SEM from five replicates.

Only mature oocytes with an extruded first polar body were used following IVM culture.

^{ab} Within a column, percentage with different superscript differed significantly ($P < 0.05$).

Table 6. Effect of rapamycin during the first 20h of in vitro maturation on the early developmental competence following parthenogenetic activation of small follicle (SF-) derived porcine oocytes

Origin of COCs	Conc. (nM) of Rapamycin	No. of mature oocytes examined	No. (%) of oocytes		No. of blastomeres per blastocyst
			cleaved	formed blastocyst	
MF	0	121	106 (87.6 ± 2.7)	37 (30.6 ± 2.6^a)	30.1 ± 2.2
SF	0	127	114 (89.8 ± 3.5)	23 (18.1 ± 3.4^b)	26.2 ± 2.2
SF	1	122	114 (93.4 ± 3.4)	19 (15.6 ± 3.1^b)	27.1 ± 2.9
SF	10	120	110 (91.7 ± 2.8)	28 (23.3 ± 2.9^{ab})	28.6 ± 2.4

Percentage data in parentheses are shown as mean $\pm$ SEM from five replicates.

Abbreviations: COCs, cumulus-oocytes complexes; MF, middle follicles.

Only mature oocytes with an extruded first polar body were used following IVM culture.

^{ab} Within a column, percentage with different superscript differed significantly ($P < 0.05$).

IVM 培養開始から 20 時間の間に 3-MA が存在すると、単為発生後の MF 由来卵母細胞の胚盤胞形成率は有意に低下した(0 mM 区 $49.0 \pm 5.8\%$ 、0.2 mM 区 $22.2 \pm 5.7\%$ 、2 mM $22.5 \pm 6.3\%$ 、Table 7、 $P < 0.05$)が、SF 由来卵母細胞の胚盤胞形成率は 3-MA 添加の影響はなかった(0 mM 区 $9.2 \pm 3.1\%$ 、0.2 mM 区 $6.7 \pm 2.5\%$ 、2 mM 区 $5.8 \pm 2.7\%$ 、Table 8)。3-MA の添加は、MF および SF 由来卵母細胞の卵割率および胚盤胞あたりの細胞数に影響を及ぼさなかった (Table 7 および Table 8) が、SF 由来の卵母細胞の胚盤胞形成率は、3-MA 無添加区の MF 由来卵母細胞のそれ($24.8 \pm 3.9\%$)より有意に低かった(Table 8、 $P < 0.05$)。

Table7. Effect of 3-methyladenine (3-MA) during the first 20h of in vitro maturation on the early developmental competence following parthenogenetic activation of medium follicle (MF-) derived porcine oocytes

Conc. (mM) of 3-MA	No. of mature oocytes examined	No. (%) of oocytes		No. of blastomeres per blastocyst
		cleaved	formed blastocyst	
0	102	93 (91.2 ± 3.9)	50 (49.0 ± 5.8^a)	31.6 ± 1.2
0.2	99	89 (89.9 ± 2.8)	22 (22.2 ± 5.7^b)	27.4 ± 1.0
2	102	89 (87.3 ± 4.9)	23 (22.5 ± 6.3^b)	28.0 ± 1.1

Percentage data in parentheses are shown as mean $\pm$ SEM from four replicates.

Only mature oocytes with an extruded first polar body were used following IVM culture.

^{a,b} Within a column, percentage with different superscript differed significantly ($P < 0.05$).

Table8. Effect of 3-methyladenine (3-MA) during the first 20h of in vitro maturation on the early developmental competence following parthenogenetic activation of small follicle (SF-) derived porcine oocytes

Origin of COCs	Conc. (mM) of 3-MA	No. of mature oocytes examined	No. (%) of oocytes		No. of blastomeres per blastocyst
			cleaved	formed blastocyst	
MF	0	141	134 (95.0 ± 1.4)	35 (24.8 ± 3.9^a)	27.7 ± 1.2
SF	0	120	105 (87.5 ± 3.2)	11 (9.2 ± 3.1^b)	25.2 ± 2.4
SF	0.2	105	84 (80.0 ± 3.0)	7 (6.7 ± 2.5^b)	30.5 ± 2.0
SF	2	104	88 (84.6 ± 7.0)	6 (5.8 ± 2.7^b)	27.8 ± 2.2

Percentage data in parentheses are shown as mean $\pm$ SEM from five replicates.

Abbreviations: COCs, cumulus-oocytes complexes; MF, middle follicles.

Only mature oocytes with an extruded first polar body were used following IVM culture.

^{a,b} Within a column, percentage with different superscript differed significantly ($P < 0.05$).

考察

LC3-II レベルによって評価されたオートファジー活性は、ゴナドトロピンや dbcAMP に暴露される IVM 培養の前半で高く、IVM 培養終了時に低下したことが報告されている[37]。1 nM ラパマイシンの添加は、ブタ成熟卵母細胞の LC3-II レベルと減数分裂能および初期発生能を上昇させる[38]が、卵胞の大きさによる影響については明らかではなかった。本研究において、ラパマイシンが MF 由来卵母細胞の減数分裂能や初期発生能に及ぼす効果は、以前の研究と同様であった。本研究で、IVM 培養前半に 1 nM ラパマイシンを添加すると、体外成熟率および単為発生後の胚盤胞期への初期発生率が有意に向上した。これらの結果から、MF 由来卵母細胞では、ラパマイシンが mTOR を抑制することでオートファジーが活性化され、減数分裂能や初期発生能が促進されることが示唆された。逆に、3-MA の添加により、MF 由来卵母細胞の体外成熟率および胚盤胞期への初期発生率は低下した。これらの結果は、他者によるオートファジー抑制剤の LY294002 を用いた研究と類似する[39]。3-MA の同様の濃度は、ブタ卵母細胞の単為発生の研究で効果的に初期発生能を低下させたレベル[35]と同様であった。ゆえに、これらの結果から、MF 由来卵母細胞は、3-MA に対して感受性を持ち、オートファジーが抑制されることで、体外成熟率や初期発生率が減少したと考えられる。このように、MF 由来卵母細胞は、mTOR 経路を通してオートファジーを制御する能力を有することが明らかとなった。

しかしながら、SF 由来卵母細胞は、1、10 nM ラパマイシンを IVM 培養の前半 20 時間の間に添加しても、M-II 期に進行する減数分裂能や単為発生後の胚盤胞期への初期発生能に影響しなかった。この結果は、MF とは対照的で、以前の MF 由来卵を用いた研究報告[38]とも異なる。この結果は、ブタ SF 由来卵母細胞がラパマイシンに対する感受性を欠いており、ラパマイシンがオートファジーを活性化せず、減数分裂能や初期発生能に影響を及ぼさないことを示唆している。さらに、SF 由来卵母細胞は、IVM 培養の前半 20 時間の間にオートファジー能の抑制剤である 3-MA を用いても、減数分裂能や初期発生能に影響しなかった。SF 由来卵母細胞は、3-MA に対して、低いもしくは全く感受性を持たないようである。この結果は、MF 由来卵母細胞を用いた場合の結果と全く違っていた。ゆえに、これらの結果から、SF 由来卵母細胞は、mTOR を通したオートファジー制御が欠落もしくは非常に低レベルにあることを示唆している。

本研究において、ラパマイシンや 3-MA に対する感受性が MF 由来卵母細胞と比較して SF 由来卵母細胞で全く異なっていることが示唆されたが、MF 由来卵母細胞の有する能力が、卵胞形成時にどのようなメカニズムで獲得されるかは未だに解明できていない。SF 由来卵母細胞の卵母細胞の直径は MF 由来卵母細胞と比較して有意に小さく[15]、SF 由来卵母細胞の減数分裂遂行能や初期発生能も、MF 由来卵母細胞と比較して同様に有意に低い[17-19]。本研究において、mTOR 経路を通した

オートファジー活性の制御能は、減数分裂遂行能や初期発生能に作用するが、これらは MF 由来卵母細胞のみで観察され、SF 由来卵母細胞では観察されなかった。また本研究で、オートファジー制御能の MF および SF 由来卵母細胞での違いは、減数分裂や初期発生の能力を表す指標となることが示唆された。卵母細胞は、減数分裂や初期発生時に、卵母細胞とそれらの周囲を取り巻く卵丘細胞などの体細胞とのコミュニケーションが必要である[55]。卵母細胞からの分泌因子である GDF9 や BMP15[55-57]、および卵丘細胞からの分泌因子である VEGF[16,58]は、卵母細胞の減数分裂遂行能や初期発生能を促進させることが知られている。卵丘細胞が少ない低品質の COCs の IVM 培養時にラパマイシンを添加すると、初期発生率が改善するため[59]、mTOR 経路を介した卵母細胞のオートファジー活性は体外成熟能や初期発生能を反映すると考えられる。MF 由来卵母細胞の mTOR を介したオートファジー活性に関する能力について理解するためには、卵丘細胞と卵母細胞のコミュニケーションを介したさらなる研究が必要である。

結論として、本研究は、オートファジーの誘導剤であるラパマイシンや阻害剤である 3-MA に対する反応や mTOR シグナル経路を介してオートファジー能を調整する能力は、MF 由来卵母細胞と SF 由来卵母細胞で異なる可能性があり、体外成熟能や初期発生能に影響することを明らかにした。

第四章 トレハロースは、小卵胞由来ブタ卵母細胞のオートファジー能に影響することなく、卵丘細胞の生存性を維持することで体外成熟能および初期発生能を改善する

緒言

トレハロースは、 α -グルコースが1,1-グリコシド結合した非還元二糖であり、細菌、酵母、真菌、昆虫、無脊椎動物、植物を含む多くの生物に存在するが、脊椎動物には存在しない[60]。トレハロースの生理学的機能の1つとして、細胞タンパク質の変性を防ぐことにより、極端な温度、脱水、酸化などのさまざまなタイプの環境ストレスから細胞を保護することが知られている[42]。トレハロースの存在は、ブタ精子の凍結融解後の生存性を維持する[61]ことが報告されている。しかし、IVM 培養液中へのトレハロース添加が、どのような機構で卵母細胞の初期発生能を改善するのかについては明らかではなく、また、トレハロースがSF 由来卵母細胞の体外成熟能や初期発生能をMF 由来卵母細胞並みに高める効果があるか否かについても未だ明らかではない。

また、トレハロースは、mTOR 経路非依存的にオートファジー能を促進する機能を有することが知られている[62]。第三章の結果から、オートファジー誘導剤ラパマイシンおよび同阻害剤3-MAのIVM 培地への添加は、mTOR シグナル経路を介して、MF 由来卵母細胞の減数分裂達成能および初期発生能をそれぞれ有意に向上または低下させるが、一方、SF 由来卵母細胞のそれらには影響を及ぼさなかった[63]。SF 由来COCs 培養液へのトレハロースの添加は、mTOR 経路非依存的にSF 由来卵母細胞のオートファジー能を促進し、体外成熟能および初期発生能を改善するかもしれない。

そこで本研究は、IVM 培地へのトレハロースの添加に対するMF およびSF 由来ブタ卵母細胞の体外成熟能および胚盤胞期への初期発生能力を調べるとともに、オートファゴソーム形成と正の相関を示すLC3-II と、選択的に分解される物質とオートファゴソームをつなぐアダプタータンパク質として機能するp62[47]を指標として、トレハロースの存在がそれらの卵母細胞のオートファジー能に影響を及ぼすか否かについて検証を行った。さらに、トレハロースの存在が、IVM 培養中の卵丘細胞の生存性に及ぼす影響についても調べた。

実験デザイン

IVM 培地への 10 mM トレハロース存在下の核成熟率

吸引採取した SF および MF 由来 COCs を POM 培養液に集めた後、10 mM トレハロース含有または不含の POM 培養液にゴナドトロピンと 1 mM dbcAMP を添加して IVM 培養を開始した。その 20 時間後に、ゴナドトロピンおよび 1 mM dbcAMP を含まない同液に移し、さらに 24 時間培養した。IVM 培養後、卵母細胞を裸化し、固定・染色後に核相を 400 倍の位相差顕微鏡下で観察した。実験は 12 回反復した。

IVM 培地への 10mM トレハロース存在下の初期発生率

上述の通り IVM 培養を合計 44 時間行った後、卵母細胞を裸化し、顕微鏡下で第一極体の放出が確認できた卵母細胞のみを選抜して、実験に供した。卵母細胞を 1.2 kV/cm の DC 強度で 30 μ s の電気パルスで 1 回付与後、cytocharacin B 含有培地中で単為発生卵の第二極体放出を阻害した後、PZM-5 中で 5 日間、39 °C、5% CO₂ in air 気相条件下で 5 日間培養した。培養開始の 2 日後に卵割率を、5 日後に胚盤胞形成率を観察した。胚盤胞期胚は、Hoechst 33342 で染色し、蛍光顕微鏡下で細胞数を調べた。実験は 5 回繰り返した。

ウエスタンブロッティング法によるタンパク質レベルの解析

卵巣からの採取直後に mTL-HEPES 下でピペッティングにより卵母細胞を裸化し、0.125 M Tris-HCL (pH 6.8)、4%ドデシル硫酸ナトリウム、10%(v/v) 2-メルカプトエタノール、10%(w/v)スクロース、0.01%(v/v)ブロモフェノールブルーで構成されるサンプルバッファ(10 μ l)に入れて -80 °Cで保存した。また、IVM 開始から 20 時間後の卵母細胞を裸化して 10 μ l サンプルバッファとともに-80 °Cで保存した。さらに、第一極体を観察した成熟卵母細胞を同様に 10 μ l サンプルバッファとともに-80 °Cで保存した。卵母細胞を 95 °Cで 5 分間ボイル後に、等量をゲルにロードして、30 mA、40~50 分でポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA)。その後、ゲル内にあるタンパク質を 100 V で 2 時間かけて、PVDF 膜 (Merck、ドイツ) に転写した。膜を PVDF ブロッキング試薬 (東洋紡、大阪、日本) でブロック後、一次抗体とともに 1 時間培養し、0.1% (v/v) Tween 20 含有 PBS で 3 回洗浄後、二次抗体と 1 時間培養した。使用した一次抗体は、ウサギ LC3A / B (Cell Signaling Technology、12741、1 : 100)、ウサギ p62 (Cell Signaling Technology 5114S、1 : 100)、マウス α チューブリン (SIGMA ALDRICH、T5168) であった。使用した二次抗体は、

Anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology、7074S、1 : 2000)、Anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology、7076S、1 : 2000) を使用した。ECL (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA) を用いて化学発光を強化し、膜上の標的タンパク質を視覚化した。各タンパク質の発現状況は、ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA) にて観測された。

蛍光染色法による卵丘細胞の生存性判定

IVM 培養の前後あるいは途中での SF および MF 由来 COCs 卵丘細胞の生存性を評価するために、COCs を PI/SYBR green (それぞれ $1 \mu\text{g/mL}$) を含む PBS 中で 15 分間染色した。その後、VectaShield (Vector Laboratories Inc.、カリフォルニア州バーリンゲム) を少量滴下したスライドガラス上にマウントし、カバーガラスにて保定後直ちに蛍光顕微鏡 (BZ-X710、Keyence、Osaka、Japan) 下で観察した。すべての細胞膜に浸透し核 DNA を染色する SYBR green 由来緑色蛍光と細胞膜の透過性が高まった死細胞にのみ透過する PI 由来の赤色蛍光の組み合わせにより、緑色蛍光細胞を生存細胞、オレンジ色の蛍光が観察される細胞を死細胞とみなした。以上 2 色の蛍光度合いにより、COCs を 4 つの範疇に分類した。75% 以上の卵丘細胞が生存している COCs を範疇 A、50% 以上 75% 未満の卵丘細胞が生存している COCs を範疇 B、25% 以上 50% 未満の卵丘細胞が生存している COCs を範疇 C、生存細胞が 25% 未満の COCs を範疇 D とした。それぞれの範疇に含まれる COCs の割合で IVM を通して卵丘細胞の生存性がどのように変化したのかを評価した。

結果

10 mM トレハロースの IVM 培地への添加は、MF 由来卵母細胞の体外成熟能に影響を及ぼさなかったが、SF 由来卵母細胞の成熟率は有意に改善した (0 mM 区 $49.1 \pm 3.0\%$ 、10 mM 区 $64.6 \pm 2.1\%$ ($P < 0.05$) ; Table 9)。トレハロース添加によって、卵核胞期に留まっていた卵の割合が有意に低下したことから、卵核胞崩壊を経た卵の割合が高くなったことが明らかであった。しかし、トレハロース添加によって改善した SF 由来卵母細胞の成熟率は、トレハロース無添加区の MF 由来卵母細胞の体外成熟率よりも有意に低かった (Table 9)。

また同様に、MF 由来卵母細胞の単為発生後の胚盤胞期への初期発生率は、10 mM トレハロースの IVM 培地への添加によって影響されなかったが、SF 由来卵母細胞の胚盤胞形成率は、有意に改善された (0 mM 区 $10.8 \pm 2.6\%$ 、10 mM 区 $23.4 \pm 2.1\%$ ($P < 0.05$) ; Table 10)。しかし、トレハロース添加によって改善した SF 由来卵母細胞の胚盤胞形成率は、トレハロース無添加区の MF 由来卵母細胞のそれより有意に低かった (Table 10) さらに、卵割率および胚盤胞当たりの細胞数は、卵

母細胞が由来する卵胞の大きさおよびトレハロースの有無によって有意な差はなかった (Table 10)。

Table9. Effect of trehalose during the in vitro maturation on the meiotic maturation of small follicle (SF-) and middle follicle (MF-) derived porcine oocytes in vitro

Origin of COCs	Conc. (mM) of Trehalose	No of oocytes examined	No. (%) of oocytes proceeded to the stage of ;		
			GV	M- I	M- II
MF	0	499	52 (10.4 ± 1.5 ^a)	65 (13.0 ± 1.9 ^a)	382 (76.6 ± 1.6 ^a)
MF	10	488	25 (5.1 ± 1.0 ^a)	53 (10.9 ± 1.6 ^a)	410 (84.0 ± 1.6 ^a)
SF	0	509	128 (25.1 ± 3.8 ^b)	131 (25.7 ± 3.7 ^b)	250 (49.1 ± 3.0 ^b)
SF	10	506	55 (10.9 ± 1.3 ^a)	124 (24.5 ± 2.7 ^b)	327 (64.6 ± 2.1 ^c)

Percentage data in parentheses are shown as mean ± SEM from twelve replicates.

Abbreviations: COCs, cumulus-oocytes complexes; GV, germinal vesicle; M- I , metaphase- I ; A- I /T- I , anaphase- I /telophase- I ; M- II , metaphase- II .

^{a,b,c} Within a column, percentage with different superscript differed significantly (P<0.05).

Table10. Effect of trehalose during the in vitro maturation on the early developmental competence following parthenogenetic activation of small follicle (SF-) and middle follicle (MF-) derived porcine oocytes

Origin of COCs	Conc. (mM) of Trehalose	No. of mature oocytes examined	No. (%) of oocytes		No. of blastomeres per blastocyst
			cleaved	formed blastocyst	
MF	0	144	129 (89.6± 1.6)	51 (35.4 ± 1.9 ^a)	28.5 ± 1.5
MF	10	144	130 (90.3 ± 2.1)	50 (34.7± 2.2 ^a)	27.3 ± 3.1
SF	0	120	103 (85.8 ± 2.2)	13 (10.8 ± 2.6 ^b)	26.6 ± 1.8
SF	10	137	123 (89.8± 2.8)	32 (23.4 ± 2.1 ^c)	25.4 ± 1.9

Percentage data in parentheses are shown as mean ± SEM from five replicates.

COCs, cumulus-oocytes complexes.

Only mature oocytes with an extruded first polar body were used following IVM culture.

^{a,b} Within a column, percentage with different superscript differed significantly (P<0.05).

一方、LC3-II および p62 のタンパク質レベルは、COCs が由来する卵胞の大きさ (MF vs. SF) の間で有意な差は存在しなかった (それぞれ $P=0.26$ および $P=0.08$) が、IVM 培養が進むにつれて有意に低下した ($P<0.05$ 、Figure 1)。

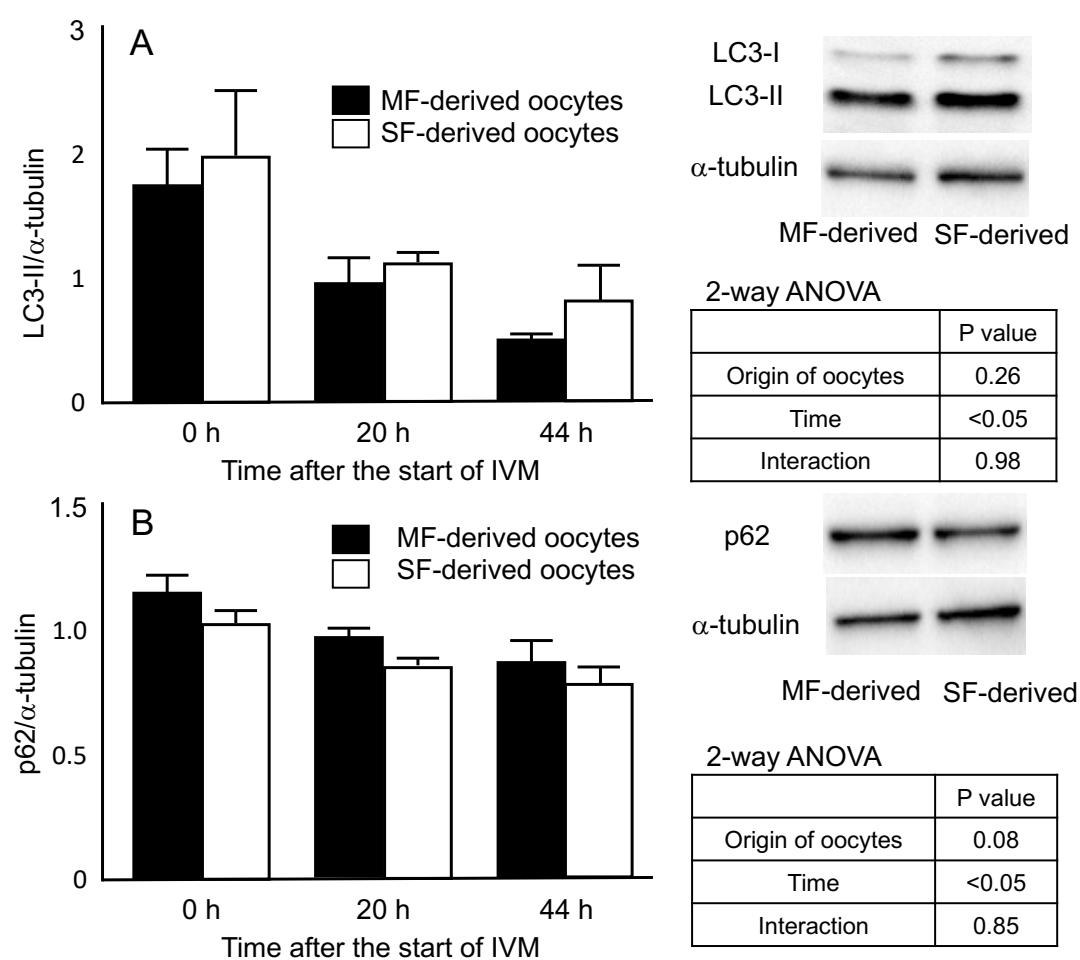


Figure 1. LC3-II and p62 levels during IVM of MF- and SF-derived porcine oocytes

また、IVM 培養開始 20 時間後での卵母細胞中の LC3-II および p62 タンパク質レベルは、COCs が採取された卵胞の大きさ (MF vs. SF) によって有意な差はなかった (それぞれ $P=0.48$ および $P=0.50$ 、Figure 2)。また同様に IVM 培養液へのトレハロース添加の有無によって、LC3-II および p62 タンパク質レベルは影響しなかった (それぞれ $P=0.27$ および $P=0.25$ 、Figure 2)。

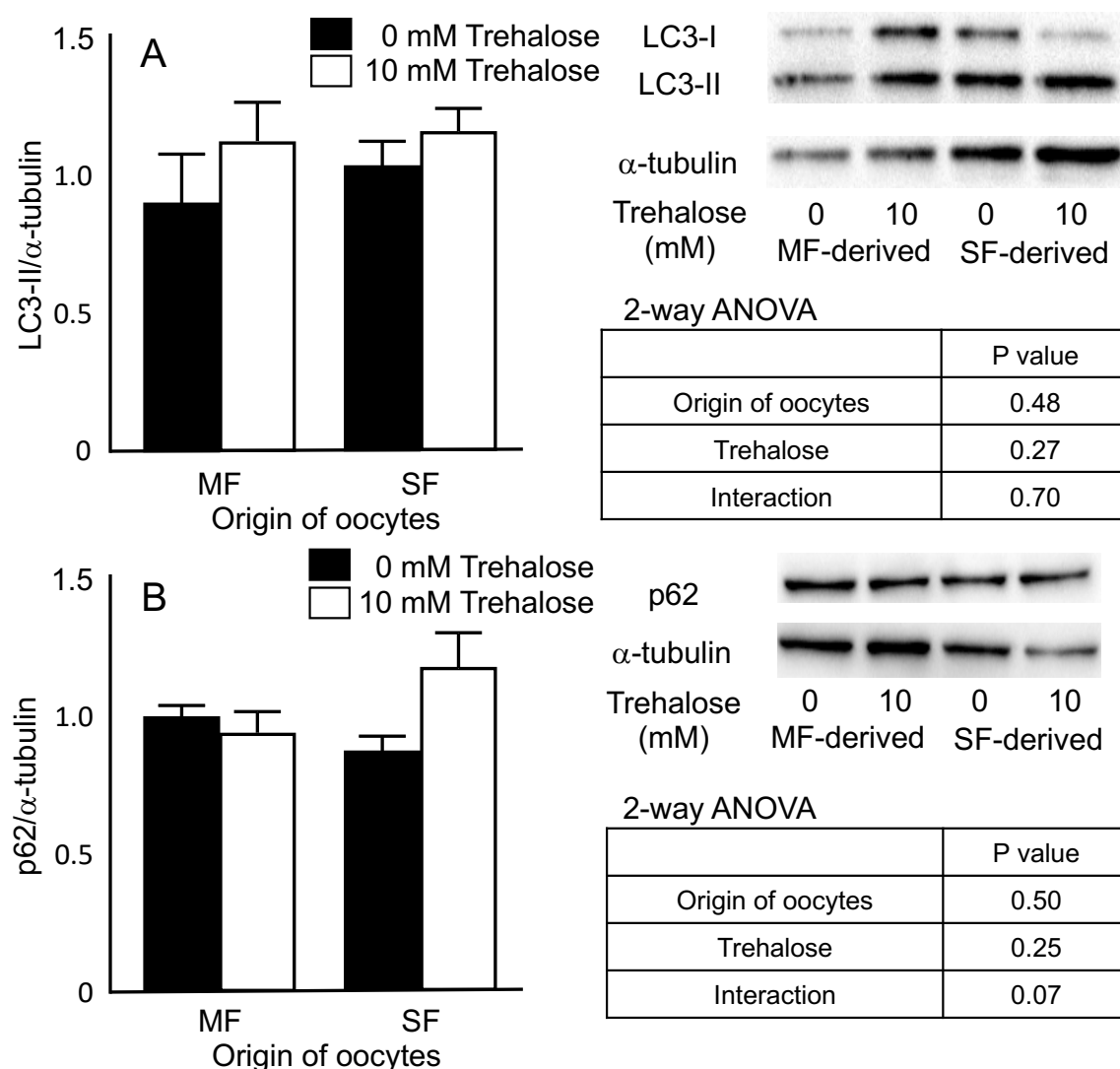


Figure 2. LC3-II and p62 levels in MF- and SF-derived porcine oocytes at 20 h after the start of IVM in the absence or presence of trehalose

同様に、IVM 培養終了時（培養開始 44 時間後）での卵母細胞中の LC3-II および p62 タンパク質レベルは、COCs が採取された卵胞の大きさ（MF vs. SF）によって有意な差はなかった（それぞれ $P=0.23$ および $P=0.95$ 、Figure 3）。また同様に IVM 培養液へのトレハロース添加の有無によって、LC3-II および p62 タンパク質レベルは影響しなかった（それぞれ $P=0.29$ および $P=0.53$ 、Figure 3）。

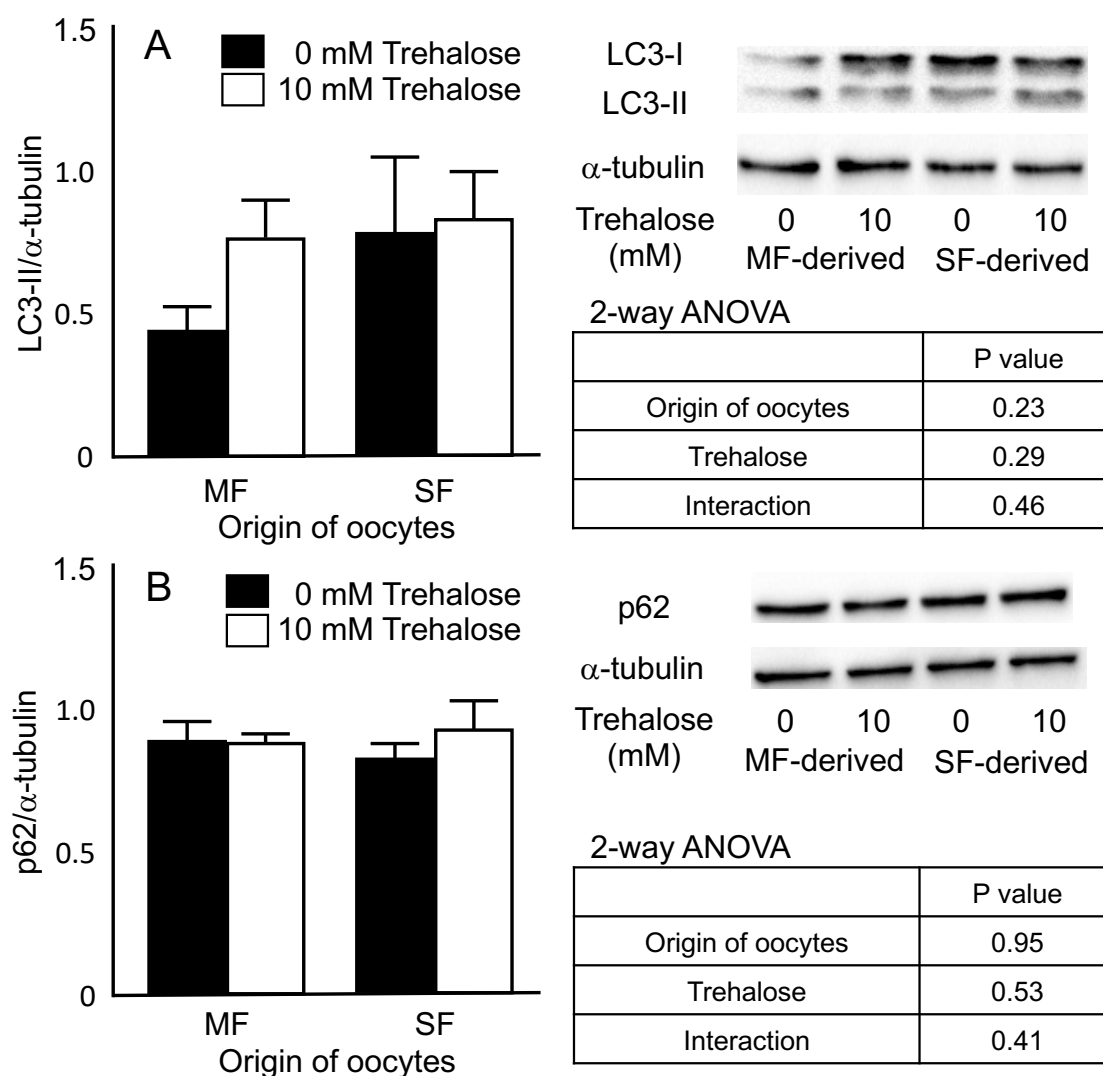


Figure 3. LC3-II and p62 levels in MF- and SF-derived porcine oocytes after IVM in the absence or presence of trehalose for totally 44 h

また、卵母細胞を取り囲む卵丘細胞塊の 75%以上の細胞が生存していると思われる COCs の割合を調べたところ、IVM 培養開始時には MF および SF 由来 COCs 間で有意な差はなかったが、培養開始 20 時間後にはその割合は、MF 由来 COCs では有意な低下は見られなかったのに対して、SF 由来 COCs で有意に低下した (Figure 4)。IVM 培養開始時 20 時間と培養終了時 (培養開始 44 時間後) でのその COCs 割合に有意な変化がなく、MF および SF 由来 COCs 間でさえも差はなかった (Figure 4)。

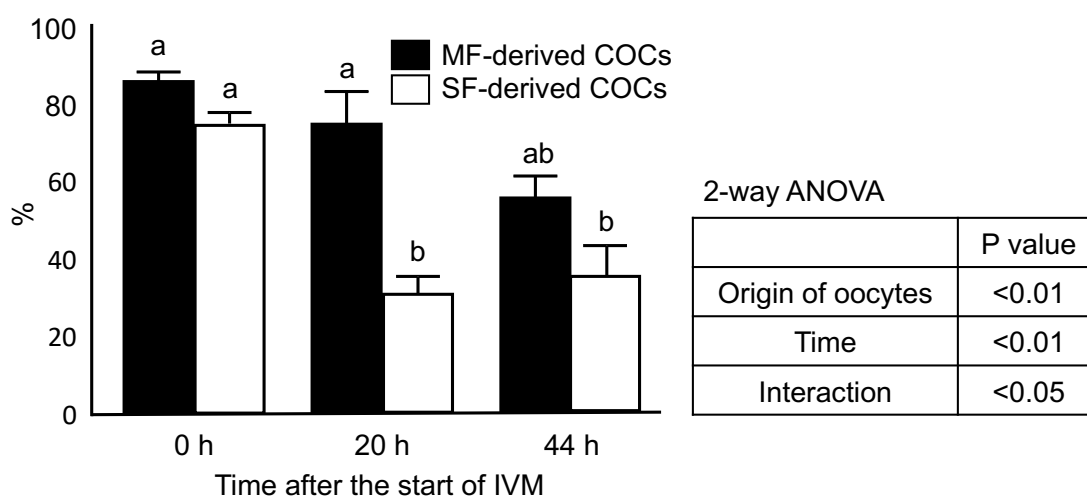


Figure 4. The incidence of MF- or SF-derived porcine COCs with high viability (more than 75%) of cumulus cell masses during IVM for totally 44 h

さらに、卵丘細胞塊の 75%以上の細胞が生存していると思われる COCs の割合は、IVM 培養液への 10 mM トレハロースの添加により、IVM 培養開始前と有意な差がないレベルにまで有意に改善した (Figure5、 $P<0.05$)。しかし、IVM 培養終了時でのそれらの割合は、トレハロースの添加の有無によって MF 由来卵母細胞に対して有意差はなかった (Table9)。

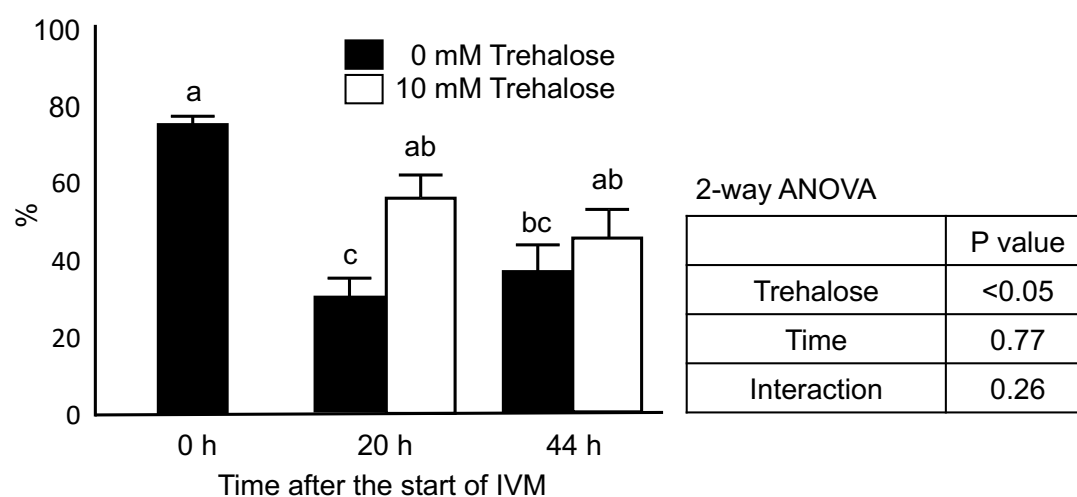


Figure 5. Effect of supplementation of trehalose on the percentage of MF- or SF-derived porcine COCs with high viability (more than 75%) of cumulus cell masses during IVM

考察

トレハロースは、mTOR 非依存的にオートファゴソーム形成能と関係のある LC3-II レベルで評価されたオートファジー能を活性化し[43]、選択的に分解される物質とオートファゴソームをつなぐアダプタータンパク質として機能する p62[47]を蓄積して Keap1-Nrf2 の正のフィードバック機構の活性化に貢献すること[64]が報告されている。しかし、本研究では、トレハロースの IVM 培養液への添加は、MF および SF 由来ブタ卵母細胞のオートファジー能に影響を及ぼすことはなかった。トレハロースのオートファジー活性の働きは、細胞によって異なることが報告されている[44-46]。ブタ卵母細胞の IVM 時には、10mM トレハロースは、LC3-II や p62 のタンパク質レベルで評価されるオートファジー能に関与していない可能性が示された。第四章で、ラパマイシンや 3-MA による mTOR シグナル経路を介したブタ卵母細胞のオートファジー能の促進や阻害は、MF 由来卵母細胞のみで体外成熟能や胚盤胞期までの初期発生能を改善したが、SF 由来卵では変化がなかった[63]。本章の研究では、10mM トレハロースによって mTOR 非依存的に SF 由来卵母細胞のオートファジー活性を制御することで、体外成熟能や胚盤胞期までの初期発生能の改善の可能性を探ろうとしたが、その可能性は非常に低いことが示唆された。

一方、本章の研究では、IVM 培地への 10 mM トレハロースの添加は、MF 由来卵母細胞の体外成熟能及び胚盤胞期までの初期発生能には影響を及ぼさなかったが、SF 由来卵母細胞のそれらを有意に改善した。

また、おもしろいことに、卵丘細胞塊の 75%以上の細胞が生存している MF 由来 COCs の割合は IVM 開始の 20 時間で有意差は存在しなかったが、SF 由来 COCs の割合は同時期に有意に低下した。このことは、SF 由来 COCs では MF 由来のものと比較して有意に多くの卵丘細胞が IVM 培養の最初の 20 時間で死滅することを示唆しているが、IVM 培地への 10 mM トレハロースの添加により、卵丘細胞塊の 75%以上の細胞が生存している SF 由来 COCs の割合の低下を阻止することが出来た。卵母細胞の減数分裂能および初期発生能は、周囲の体細胞である卵丘細胞とのタイムリーで適切なコミュニケーションを通して獲得される[55,65]。卵母細胞から分泌される GDF9[66]や BMP15[67]が、卵丘細胞のアポトーシスを抑制し、その結果として卵母細胞の初期発生能を改善することが報告されている[55]。また、SF 由来 COCs に含まれる卵丘細胞数は MF 由来 COCs 中のそれと比較して少なく、また卵母細胞の直径も小さいが、卵丘細胞塊を SF 由来卵母細胞の IVM 培地に添加することで、SF 由来卵母細胞の体外成熟率および初期発生能が MF 由来卵母細胞のそれらと同程度にまで改善することが当研究室から報告されている[16]。また、卵丘細胞塊は重要なパラクライン作用を有し、卵胞液に存在する血管内皮増殖因子 VEGF[68]を IVM 培養液に添加することで、SF 由来ブタ卵母細胞の体外成熟率や単為発生後の胚盤胞期への初期発生率を改善することも報告している[58]。VEGF は、血管新生を促進するだけでなく[69]、卵胞形成時にも重要である[70]ことが知

られている。また、体外で成熟した卵母細胞や初期発生中の卵表層には、VEGFR2が発現していることが報告されており[68]、VEGFがP13K/Akt経路やEME/MEKの活性化を進める可能性が示唆されている。IVM培地への10 mMトレハロース添加は、卵丘細胞の培養開始当初20時間での死滅を防ぐことで、卵丘細胞から分泌されるVEGFなどの因子レベルを確保し、卵母細胞と卵丘細胞との適切なコミュニケーションを遂行し、結果的にSF由来卵母細胞の体外成熟能や胚盤胞期への初期発生能を向上させている可能性がある。

以上のことから、結論として、IVM培地への10 mMトレハロース添加は、卵母細胞のオートファジー能に影響することなしに、卵丘細胞の培養開始当初20時間での死滅を防ぎ、卵母細胞と卵丘細胞との十分なコミュニケーションを遂行し、結果的にSF由来卵母細胞の体外成熟能や胚盤胞期への初期発生能を向上させている可能性がある。

第五章 総合考察

多くの先進国で、ブタは生後6か月前後で屠畜されるため、入手が容易な春季発動前雌ブタの卵巣から採取したMF（直径3～6 mmの中卵胞）由来COCsが主にブタ受精卵の体外生産に利用されている[10,11]。しかし、その卵巣表面にはMFよりも多数のSF（直径1～2 mmの小卵胞）が存在する[14]が、SF由来卵母細胞の体外成熟能や初期発達能力は、MF由来卵母細胞のそれらよりも有意に低いことがよく知られている[17,18]。本研究は、ブタ卵巣中に多数存在するSF由来卵母細胞の体外成熟能、受精能および胚盤胞期までの初期発生能が、MF由来卵母細胞のそれらと比較して低いという報告[17-18,48]を検証するとともに、その違いを生み出す諸原因を明らかにすることを目的として実施した。

本研究の先行研究において、それまでの研究では、IVM培養後に全ての卵母細胞をIVFやIVCに供していたことから、SF由来卵母細胞の体外受精能や初期発生能の評価には、未成熟卵母細胞を含んでいたことから、IVM後に第一極体の放出を確認した成熟卵母細胞のみを選別してIVFとその後のIVCに供した。その結果、それらの卵母細胞での体外受精後の精子侵入率および雌雄前核形成率、卵割率は、MF由来成熟卵母細胞と同程度であることが明らかとなった。一方、SF由来卵母細胞の胚盤胞期への初期発生能は、MF由来卵母細胞と比較して有意に低いことが明らかになった。また、卵成熟、受精、初期発生などに関係する幾つかの遺伝子のSF由来卵母細胞での転写量をMF由来卵でのそれとIVM培養の前後で比較したところ、調べた全ての多くの遺伝子の転写量はIVM培養開始後に有意に低下していたが、c-MOS遺伝子を除く、ほとんどの遺伝子の転写量でSFおよびMF由来の卵母細胞間で有意な差は認められなかった。一方、採卵直後のc-MOS遺伝子の転写量は、MF由来卵母細胞と比較して、SF由来卵母細胞で有意に低かった。c-MOS遺伝子の転写物は、脊椎動物卵母細胞の減数分裂の進行で重要な役割を果たす細胞増殖抑制因子（CSF）の成分として知られている[71]。SF由来成熟卵母細胞のMPFレベルは、MF由来成熟卵のそれよりも低いことも知られている[21]ことから、c-MOS遺伝子産物を含む細胞周期制御因子の違いがSF由来卵母細胞の体外成熟能や初期発生能に影響を及ぼしている可能性が考えられ、更なる研究が期待される。

第三章では、本研究の先行研究で多くの遺伝子転写物量がIVM培養開始後に顕著に低下することを明らかにしたことや、MF由来ブタ卵母細胞でのオートファジー活性の亢進が体外成熟能[38]や初期発生能[36]を向上させることが報告されていることから、SF由来卵母細胞でも何らかの違いが認められれば、SFおよびMF由来卵母細胞の体外成熟能や初期発生能の違いにオートファジー調節機構が関わっている可能性を示せるかもしれない。そこで、第三章では、mTORシグナル経路依存性のオートファジー誘導剤であるラパマイシンおよび同阻害剤である3-MAが、SFおよびMF由来卵母細胞の体外成熟能や初期発生能に影響を及ぼすか否かについて調べた。その結果、MF由来卵母細胞の体外成熟能及び初期発生能は、ラパマイシン

存在下でともに改善され、3-MA 存在下で低下した。一方、SF 由来卵母細胞の体外成熟能及び初期発生能は、ラパマイシン及び 3-MA の存在下で何ら変化はなかった。これらのことから、オートファジーの誘導剤であるラパマイシンや阻害剤である 3-MA に対する反応や mTOR シグナル経路を介してオートファジー能を調整する能力は、MF 由来卵母細胞と SF 由来卵母細胞で異なる可能性があり、体外成熟能や初期発生能に影響することを明らかにした。

第四章では、mTOR 非依存的なオートファジー誘導剤[43]として知られるトレハロースを用いて、SF 由来卵母細胞のオートファジー能に影響することで体外成熟能や初期発生能を向上できるかとの仮説の下で検討を行った。その結果、LC3-II および p62 のタンパク質レベルで評価した SF および MF 由来卵母細胞のオートファジー能は、IVM 培養の進行とともに低下したが、トレハロース添加の有無による変化は認められなかった。一方、SF 由来卵母細胞の体外成熟能および初期発生能は、10 mM トレハロース添加によって有意に改善された。さらに、SF および MF 由来卵母細胞周囲を取り囲む卵丘細胞の生存性について調べたところ、MF 由来 COCs の卵丘細胞の生存性は安定していたが、SF 由来 COCs の卵丘細胞の生存性は IVM 培養開始 20 時間までに有意に低下することと、トレハロース添加によりその生存性の低下が阻止された。これらの結果から、IVM 培地への 10 mM トレハロース添加は、卵母細胞のオートファジー能に影響することなしに、卵丘細胞の培養開始当初 20 時間での死滅を防ぎ、卵母細胞と卵丘細胞との十分なコミュニケーションを遂行し、結果的に SF 由来卵母細胞の体外成熟能や胚盤胞期への初期発生能を向上させている可能性があることを示した。

以上の研究から、SF 由来卵母細胞の体外成熟能および胚盤胞期までの初期発生能は、MF 由来卵のそれらより低いものの、精子侵入や前核形成を指標とした体外受精能に差はないことを明らかにした。また、細胞周期に関係する一部の遺伝子産物量に差を認めるとともに、IVM 培養開始後に多くの遺伝子転写量は低下することを明らかにした。さらに、mTOR シグナル経路を介するオートファジー能の調節能力は、SF および MF 由来卵母細胞間で明らかに異なっていることを見出した。またさらに、LC3-II および p62 のタンパク質レベルで評価したオートファジー能についても IVM 培養の進行とともに低下することや、mTOR 非依存的なオートファジー誘導剤であるトレハロースを用いても SF 由来卵母細胞のオートファジー能は影響されないが、トレハロースは SF 由来 COCs の卵丘細胞の生存性を維持するとともに体外成熟能および胚盤胞期までの初期発生能を向上させることを明らかにした。これらの結果から、MF 由来卵母細胞の体外成熟能および初期発生能は、オートファジー能調節によりさらに改善できるが、SF 由来卵母細胞のそれらは、トレハロースなどの存在下で卵丘細胞の死滅を防ぎ、卵母細胞と卵丘細胞との十分なコミュニケーションを確保することで改善されることを明らかにすることが出来た。

これらの新たな知見は、卵巣内生殖細胞資源をさらに有効に活用することを可能にし、家畜生産やヒトでの生殖補助医療における受精卵の体外生産効率を改善し、ゲノム編集など今後の動物生産に必要な技術の適用のための生殖細胞供給に必要な不

可欠であり、今後の生殖バイオテクノロジーの更なる発展に大いに資すると考えられる。

引用文献リスト

- [1] Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, and Erickson G. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999;96:7282-7287.
- [2] Mcgrath SA, Esquela AF, and Lee SJ Oocyte-Specific Expression of Growth/Differentiation. *Mol Endocrinol* 1995;9:131-136
- [3] Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996;383:531-535.
- [4] Su YQ, Wu X, O' Brien MJ, Pendola FL, Denegre JN, Matzuk MM, Eppig JJ. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. *Developmental Biology* 2004;276:64-73
- [5] Funahashi H, Day BN. Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 1993;98:179-185.
- [6] Kobayashi K, Yamashita S, and Hoshi H. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J Reprod Fertil* 1994;100:439-446
- [7] Liu JY, Aronow, BJ, Witte DP, Pope WF, & La Barbera ARL. Cyclic and maturation dependent regulation of follicle stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the porcine ovary. *Biol Reprod* 1998;58:648-658.
- [8] Downs SM, Daniel SA, & Eppi JJ Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle stimulating hormone and epidermal growth factor : evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *Journal of experimental Zoology* 1988;245:86-96.

- [9] Liang CG, Huo LJ, Zhong ZS, Chen DY, Schatten H, and Sun QY. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent activation of mitogen-activated protein kinase in cumulus cells is essential for germinal vesicle breakdown of porcine cumulus-enclosed oocytes. *Endocrinology* 2005;146:4437-4444.
- [10] Day BN, Funahashi H. In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. In: H. MR, Pursel VG, Norman HD (eds.), *Beltsville symposia in agricultural research XX. Biotechnology's role in the genetic improvement of farm animals*. Savoy, IL, USA: American Society of Animal Science; 1996:125-144.
- [11] Funahashi H, Day BN. Advances in in vitro production of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 1997;52:271-283.
- [12] Yoshioka K, Suzuki C, Onishi A. Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium. *J Reprod Dev* 2008;54:208-213.
- [13] Yoshioka K. Development and application of a chemically defined medium for the in vitro production of porcine embryos. *J Reprod Dev* 2011;57:9-16.
- [14] Morbeck DE, Esbenshade KL, Flowers WL, Britt JH. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biol Reprod* 1992; 47: 485-491.
- [15] Lucas X, Martínez EA, Roca J, Vázquez JM, Gil MA, Pastor LM, Alabart JL. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology* 2002; 58: 871-885.
- [16] Matsunaga R, Funahashi H. Supplementation with cumulus cell masses improves the in vitro meiotic competence of porcine cumulus-oocytes complexes derived from small follicles. *Reprod Domest Anim* 2017; 52: 672-679.
- [17] Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology* 2002; 57: 1523-1532.

- [18] Yoon KW, Shin TY, Park JI, Roh S, Lim JM, Lee BC, Hwang WS, Lee ES. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reprod Fertil Dev* 2000; 12: 133-139.
- [19] Kohata C, Izquierdo-Rico MJ, Romar R, Funahashi H. Development competence and relative transcript abundance of oocytes derived from small and medium follicles of prepubertal gilts. *Theriogenology* 2013; 80: 970-978.
- [20] Okudaira Y, Wakai T, Funahashi H. Levels of cyclic-AMP and cyclic-GMP in porcine oocyte-cumulus complexes and cumulus-free oocytes derived from small and middle follicles during the first 24-hour period of in vitro maturation. *J Reprod Dev* 2017; 63: 191-197.
- [21] Kim J, You J, Hyun SH, Lee G, Lim J, Lee E. Developmental competence of morphologically poor oocytes in relation to follicular size and oocyte diameter in the pig. *Mol Reprod Dev* 2010; 77: 330-339.
- [22] Bagg MA, Nottle MB, Armstrong DT, Grupen CG. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:797-803.
- [23] Antosik P, Kempisty B, Bukowska D, Jackowska M, Wlodarczyk R, Budna J, et al. Follicular size is associated with the levels of transcripts and proteins of selected molecules responsible for the fertilization ability of oocytes of puberal gilts. *J Reprod Dev* 2009;55:588-593.
- [24] Pelech S, Jelinkova L, Susor A, Zhang H, Shi X, Pavlok A, et al. Antibody microarray analyses of signal transduction protein expression and phosphorylation during porcine oocyte maturation. *J Proteome Res* 2008;7:2860-2871.
- [25] Zhang DX, Cui XS, Kim NH. Involvement of polyadenylation status on maternal gene expression during in vitro maturation of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2009;76:881-889.

- [26] Zhang DX, ParkWJ, SunSC, XuYN, LiYH, CuiXS, et al. Regulation of maternal gene expression by MEK/MAPK and MPF signaling in porcine oocytes during in vitro meiotic maturation. *J Reprod Dev* 2011;57:49-56.
- [27] Nishimura Y, Endo T, Kano K, Naito K. Porcine Aurora A accelerates Cyclin B and Mos synthesis and promotes meiotic resumption of porcine oocytes. *Anim Reprod Sci* 2009;113:114-124.
- [28] Ma W, Zhang D, Hou Y, Li YH, Sun QY, Sun XF, et al. Reduced expression of MAD2, BCL2, and MAP kinase activity in pig oocytes after in vitro aging are associated with defects in sister chromatid segregation during meiosis II and embryo fragmentation after activation. *Biol Reprod* 2005;72:373-383.
- [29] Acevedo N, Smith GD. Oocyte-specific gene signaling and its regulation of mammalian reproductive potential. *Front Biosci* 2005;10: 2335-2345.
- [30] RomarR, DeSantisT, PapillierP, PerreauC, ThelieA, Dell'AquilaME, et al. Expression of maternal transcripts during bovine oocyte in vitro maturation is affected by donor age. *Reprod Domest Anim* 2011;46:e23-30.
- [31] Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Junior JB, Dode MA. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reprod Fertil Dev* 2009;21: 655-664.
- [32] Prochazka R, Kalab P, Nagyova E. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biol Reprod* 2003;68: 797-803.
- [33] Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 823-830.
- [34] Tsukamoto S, Kuma A, Mizushima N. The role of autophagy during the oocyte-to-embryo transition. *Autophagy* 2008; 4: 1076-1078.

- [35] Xu YN, Shen XH, Lee SE, Kwon JS, Kim DJ, Heo YT, Cui XS, Kim NH. Autophagy influences maternal mRNA degradation and apoptosis in porcine parthenotes developing in vitro. *J Reprod Dev* 2012; 58: 576-584.
- [36] Elahi F, Lee H, Lee J, Lee ST, Park CK, Hyun SH, Lee E. Effect of rapamycin treatment during post-activation and/or in vitro culture on embryonic development after parthenogenesis and in vitro fertilization in pigs. *Reprod Domest Anim* 2017; 52: 741-748.
- [37] Lee S, Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Quantitative analysis in LC3- II protein in vitro maturation of porcine oocyte. *Zygote* 2014; 22: 404-410.
- [38] Song BS, Kim JS, Kim YH, Sim BW, Yoon SB, Cha JJ, Choi SA, Yang HJ, Mun SE, Park YH, Jeong KJ, Huh JW, Lee SR, Kim SH, Kim SU, Chang KT. Induction of autophagy during in vitro maturation improves the nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 2014; 26: 974-981.
- [39] Shen XH, Jin YX, Liang S, Kwon JW, Zhu JW, Lei L, Kim NH. Autophagy is required for proper meiosis of porcine oocytes maturing in vitro. *Sci Rep* 2018; 8: 12581.
- [40] Foster KG, Fingar DC. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem* 2010; 285: 14071-14077.
- [41] Song BS, Yoon SB, Kim JS, Sim BW, Kim YH, Cha JJ, Choi SA, Min HK, Lee Y, Huh JW, Lee SR, Kim SH, Koo DB, Choo YK, Kim HM, Kim SU, Chang KT. Induction of autophagy promotes preattachment development of bovine embryos by reducing endoplasmic reticulum stress. *Biol Reprod* 2012; 87: 8: 1-11.
- [42] Chen Q, & Haddad GG. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. *J Exp Biol* 2004;207:3125-3129.

- [43] Mayer AL, Higgins CB, Heitmeier, Kraft TE, Qian X, Crowley JR, Hyrc KL, Beatty WL, Yarasheski, Hruz PW, & DeBosch BJ. SLC2A8 (GLUT8) is a mammalian trehalose transporter required for trehalose-induced autophagy. *Sci Rep* 2016;6:1-15.
- [44] Tien NT, Karaca I, Tamboli IY, & Walter J. Trehalose alters subcellular trafficking and the metabolism of the Alzheimer-associated amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 2016;291:10528-10540.
- [45] Yoon YS, Cho ED, Ahn WJ, Lee KW, Lee SJ, and Lee HJ. Is trehalose an autophagic inducer? Unraveling the roles of non-reducing disaccharides on autophagic flux and alpha-synuclein aggregation. *Cell Death Dis* 2017;8:e3091.
- [46] Kaizuka T, Morishita H, Hama Y, Tsukamoto S, Matsui T, Toyota Y, Kodama A, Ishihara T, Mizushima T. An autophagic flux probe that releases an internal control. *Mol Cell* 2016;64:835-849.
- [47] Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou Y, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, Kominami E, Yamane T, Tanaka K, and Komatsu M. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J Biol Chem* 2008;283:22847-22857.
- [48] Liu RH, Li YH, Jiao LH, Wang XN, Wang H, Wang WH. Extracellular and intracellular factors affecting nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes collected from different sizes of follicles. *Zygote* 2002;10:253-260.
- [49] Jarrell VL, Day BN, and Prather RS. The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *sus scrofa*: quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Biol Reprod* 1991;44:62-68.
- [50] Honma Y, Morita MS, Katsuki Y, Mihara H, Baba R, and Harada M. Trehalose activates autophagy and decreases proteasome inhibitor-induced endoplasmic reticulum stress and oxidative stress-mediated cytotoxicity in hepatocytes. *Hepatol Res* 2018;48:94-105.

- [51] Akaki Y, Yoshioka K, Noguchi M, Hoshi H, Funahashi H. Successful piglet production in a chemically defined system for in vitro production of porcine embryos: dibutyryl cyclic amp and epidermal growth factor-family peptides support in-vitro maturation of oocytes in the absence of gonadotropins. *J Reprod Dev* 2009; 55: 446-453.
- [52] Funahashi H, Cantley TC, Day BN. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine mono-phosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1997;57:49-53.
- [53] Funahashi H, Cantley TC, Day BN. Different hormonal requirement of pig oocyte-cumulus complexes during maturation in vitro. *J Reprod Fertil* 1994;101:159-165.
- [54] Romar R, Funahashi H, Coy P. In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. *Theriogenology* 2016; 85: 125-134.
- [55] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 159-177.
- [56] Hussein TS, Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Temporal effects of exogenous oocyte-secreted factors on bovine oocyte developmental competence during IVM. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23: 576-584.
- [57] Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol* 2006; 296: 514-521.
- [58] Bui TMT, Nguyễn KX, Karata A, Ferré P, Trần MT, Wakai T, Funahashi H. Presence of vascular endothelial growth factor during the first half of IVM improves the meiotic and developmental competence of porcine oocytes from small follicles. *Reprod Fertil Dev* 2017; 29: 1902-1909.

- [59] Lee J, Park JI, Yun JI, Lee Y, Yong H, Lee ST, Park CK, Hyun SH, Lee GS, Lee E. Rapamycin treatment during in vitro maturation of oocytes improves embryonic development after parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer in pigs. *J Vet Sci* 2015; 16: 373-380.
- [60] Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem Toxicol* 2002;40:871-898.
- [61] Athurupana R, Takahashi D, Ioki S. & Funahashi H. Trehalose in glycerol-free freezing extender enhances post-thaw survival of boar spermatozoa. *J Reprod Dev* 2015;61: 205-210.
- [62] Hosseinpour-Moghaddam K. Autophagy induction by trehalose: molecular mechanisms and therapeutic impacts. *J Cellular Physiology* 2018;233:6524-6543
- [63] Ono CK, Wakai T, Funahashi H. The autophagic inducer and inhibitor display different activities on the meiotic and developmental competencies of porcine oocytes derived from small and medium follicles. *J Reprod Dev* 2019;65:527-532
- [64] Mizunoe Y, Kobayashi M, Sudo Y, Watanabe S, Yasukawa H, Natori D, Hoshino A, Negishi A, Okita N, Komatsu M, Higami Y. Trehalose protects against oxidative stress by regulating the Keap1-Nrf2 and autophagy pathways. *Redox Biol* 2018;15:115-124.
- [65] Miyano T, Lee J, & Fulka J. G2/M transition of pig oocytes: how do oocytes initiate maturation? *Reprod Med Biol* 2003;2:91-99.
- [66] Duffy DM. Growth Differentiation factor-9 is expressed by the primate follicle throughout the periovulatory interval. *Biol Reprod* 2003;69:725-732.

- [67] Hosoe M, Kaneyama K, Ushizawa K, Hayashi K, Takahashi T. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:33.
- [68] Kere M, Siriboon C, Liao JW, Lo NW, Chiang HI, Fan YK, Kastelic JP, Ju JC. Vascular endothelial growth factor A improves quality of matured porcine oocytes and developing parthenotes. *Domest Anim Endocrinol* 2014;49:60-69
- [69] Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, and Claesson-Welsh L. VEGF receptor signaling in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:359-371.
- [70] Ortega HH, Veiga-Lopez A, Sreedharan S, Velazquez MMDL, Salvetti NR, and Padmanabhan V. Developmental programming: Does prenatal steroid excess disrupt the ovarian VEGF system in sheep? *Biol Reprod* 2015;93:1-11.
- [71] Glotzer M, Murray AW, & Kirschner MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 1991;349:132-138.