

マウス胚の発生に及ぼすグルタミンの効果

○大矢康貴、矢野久美子、小木曾昇

部局系技術支援室 医学技術系 第1医学系

概要

近年、遺伝子破壊（以下、K.O.）マウスは遺伝子の機能を個体レベルで解析する上で必要不可欠な材料となっている。一般的な K.O.マウスの作製は、目的とする遺伝子を破壊した ES 細胞を 8 細胞期胚または胚盤胞期に導入することにより行われる。しかし、培養の過程で 30~40%程度の胚では発生が止まり、K.O.マウス作製に必要な数の胚が得られないことがある。培地へのグルタミン（以下、Gln）の添加は 1 細胞期胚の胚盤胞への発生率を上昇させることが報告されている^[1-3]。そこで、胚の発生率向上を目的とし、培地への Gln の添加が 1 細胞期胚（新鮮胚）および 2 細胞期胚（凍結-融解胚）の発生に及ぼす効果を検討した。

1 材料および方法

1.1 供試動物

体外受精には 12~24 週齢の C57BL/6J Jcl 雄マウスおよび 9 週齢の C57BL/6J Jcl 雌マウスを用いた。

1.2 供試胚

体外受精をした 1 細胞期胚（新鮮胚）および 2 細胞期胚（凍結-融解胚）を用いた。

1.3 胚の採取・体外受精、凍結-融解

体外受精は豊田らの方法に従った^[4]。精子は C57BL/6J Jcl 雄マウスの精巢上体尾部より採取し、HTF 培地に懸濁、1 時間の前培養を行った。一方、卵子は妊馬血清性腺刺激ホルモン（PMSG）とヒト絨毛性腺刺激ホルモン（hCG）により過排卵処理を施した C57BL/6J Jcl 雌マウスの卵管膨大部より採取、HTF 培地中に導入した。体外受精は精子前培養後、最終精子濃度が 150 精子/ μ l となるように精子懸濁液を、卵子を含む HTF 培地内に導入することにより行った。なお、受精の有無は、媒精後 6~7 時間に倒立顕微鏡下で観察を行い、2 前核が認められた卵子を受精卵と判定した。

媒精 24 時間後に得られた 2 細胞期胚の凍結保存は簡易ガラス化法に従った^[5]。すなわち、まず 2 細胞期に発生した胚を室温にて 1M DMSO のドロップ（100 μ l）へ移し、胚を均等に小分けした（通常、1 ドロップに 40 個）。さらに新しい 1M DMSO のドロップへ移し、5 μ l の 1M DMSO 溶液と共に胚をチューブへ移し、あらかじめ 0 $^{\circ}$ C にしておいた冷却装置（CHILL HEAT:CHT-100 IWAKI）に移した。5 分後、0 $^{\circ}$ C に冷やしておいた凍結保存液 DAP213（2M dimethylsulphoxide, 1M acetamide, 3M propylene glycol in PB1）を 45 μ l 添加し、さらに 5 分後、チューブをケーンに装着し、直ちに液体窒素中に浸漬した。凍結胚の融解は、チューブを液体窒素保管器から取出し、速やかに中の液体窒素を捨て、室温で約 30 秒放置した。次にあらかじめ 37 $^{\circ}$ C に加温しておいた 900 μ l の 0.25 M sucrose 溶液をチューブ内に添加し、完全に保存液が溶けるまで素早くピペッティングし、内容液をシャーレに移し、さらに 400~500 μ l の 0.25 M sucrose 溶液でチューブ内を共洗いし、胚を回収した。回収した胚は modified Whitten 培地（以下、Gln (-) mW 培地）（100 μ l）で洗浄し、胚の形態的な観察を行った。

1.4 培地

胚の培養には、Gln (-) mW 培地および Gln (L-Glutamine,non-animal source,SIGMA) 添加 mW 培地（以下、Gln (+) mW 培地）を用いた。Gln 濃度は、予備試験の結果から最終濃度が 1.0mM となるよう調整した。

1.5 胚の発生速度（実験 I）

胚の発生速度は、Gln (-) mW 培地または Gln (+) mW 培地で培養を行った胚の発生ステージを 6 時間毎に顕微鏡下で観察することにより算出した。

1.6 胚の発生能（実験 II）

Gln が各細胞期胚の発生能に与える影響について検討するため、1 細胞期胚（新鮮胚）および 2 細胞期胚（凍結-融解胚）を Gln (-) mW 培地へ導入・培養し、2 細胞期～桑実期までの各細胞期となるまで培養を行った。その後、各細胞期胚を 1.0mM-Gln (+) mW 培地へ導入し直し、胚盤胞期までの各段階への発生率を Gln (-) mW 培地で培養したものと比較した。

1.7 統計解析

得られた測定値は、 χ^2 検定法、Fisher の直接確率検定法あるいは Student's t-test を用いて、それぞれ有意水準 5% で検定した。

2 結果

2.1 胚の発生速度（実験 I）

Gln (+) mW 培地で培養した場合、1 細胞期胚（新鮮胚）および 2 細胞期胚（凍結-融解胚）の 8 細胞期以降への発生速度は Gln (-) mW 培地の場合より有意に高くなった。4 細胞期までの各ステージへの発生速度は、Gln (-) mW 培地と比較して有意差はないが高い値を示す傾向が見られた（表.1）。

表.1 1 細胞期胚および 2 細胞期胚の発生速度 (hr)

	Gln	供試胚数	2 細胞期	4 細胞期	8 細胞期	桑実期	胚盤胞期
新鮮胚	-	60	15.2±1.1	39.1±1.4	57.2±3.1	70.4±2.6	93.2±3.6
	+	60	15.1±0.7	38.6±1.7	54.3±3.0*	68.8±4.4*	86.3±1.8*
凍結-融解胚	-	76		39.0±1.5	57.1±3.0	70.4±2.5	93.1±3.6
	+	76		38.6±1.6	54.2±3.0*	68.7±4.2*	86.3±1.9*

*p<0.05

2.2 胚の発生能（実験 II）

新鮮胚の 1 細胞期胚および 2 細胞期胚を Gln (+) mW 培地で培養すると、胚盤胞期への発生率は、Gln (-) mW 培地で培養したものより有意に高くなった。しかし、4 細胞期以降に Gln (+) mW 培地へ導入・培養した場合、胚盤胞期へ発生率は、Gln (-) mW 培地と比較して高い傾向を示すものの、有意差は認められなかった（表.2）。一方、凍結-融解胚では、どの発生段階から Gln (+) mW 培地に移し替えても、桑実期以降に有意な差が認められた（表.3）。

表.2 新鮮胚からの発生率 (%)

発生ステージ	Gln	供試胚数	2細胞期	4細胞期	8細胞期	桑実期	胚盤胞期
1細胞期	-	60	56 (93.3)	53 (88.3)	53 (88.3)	53 (88.3)	25 (41.7)
	+	60	58 (96.7)	55 (91.7)	55 (91.7)	54 (90.0)	38* (63.3)
2細胞期	-	56		53 (94.6)	53 (94.6)	53 (94.6)	25 (44.6)
	+	60		60 (100)	60 (100)	60 (100)	39* (65.0)
4細胞期	-	53			53 (100)	53 (100)	30 (56.6)
	+	60			60 (100)	60 (100)	41 (68.3)
8細胞期	-	53				53 (100)	31 (58.4)
	+	60				60 (100)	45 (75.0)
桑実期	-	53					33 (62.2)
	+	48					38 (79.1)

*p<0.05

表.3 凍結-融解胚からの発生率 (%)

発生ステージ	Gln	供試胚数	2細胞期	4細胞期	8細胞期	桑実期	胚盤胞期
2細胞期	-	76		72 (94.7)	72 (94.7)	66 (86.8)	42 (55.3)
	+	76		74 (97.4)	74 (97.4)	74* (97.4)	62* (81.6)
4細胞期	-	72			72 (100)	66 (91.7)	42 (58.3)
	+	69			69 (100)	69* (100)	52* (75.3)
8細胞期	-	72				66 (91.7)	42 (58.3)
	+	70				70* (100)	60* (85.7)
桑実期	-	66					42 (63.6)
	+	68					68* (100)

*p<0.05

3 まとめ

アミノ酸は *in vitro* での細胞培養において細胞内代謝の鍵となる成分であることが報告されており、雌の生殖管内の分泌液中にも高濃度に存在することが知られている^[6]。実際に、*in vitro* での胚培養において、アミノ酸が胚の発生を向上させることが様々な動物種で報告されている。アミノ酸の一種である Gln は、胚の発生に特に重要であると言われており、イーグル培地への Gln 添加が 1 細胞期胚の胚盤胞への発生率を上昇させたとの報告もある^[7-8]。

本研究では、我々が技術支援業務の際に使用している mW 培地へ Gln を添加した場合にもマウス胚の発生速度・発生率が向上することが示され、さらにその効果は凍結-融解胚においても同様であることが示された。また、Gln 添加のタイミングは、新鮮胚、凍結-融解胚で異なるという興味深い結果が得られた。今後、マウス系統による差異や他種のアミノ酸添加による効果、またその後の産仔率等を検討することで、より効率的な K.O.マウス作製のほか、稀少系統の維持にもつながることと思われる。

参考文献

- [1] Chatot, C.L. et al, "An improved culture medium supports development of random-bred 1cell mouse embryos *in vitro*", *J. Reprod. Fert.*, 1989, 86, 679-688.
- [2] Chatot, C.L. et al, "Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium", *Hum. Reprod.*, 2001, 16, 749-756.
- [3] Nasr-Esfahani, M.H. et al, "Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo *in vitro*." *J. Reprod. Fert.*, 1992, 96, 219-231.
- [4] 豊田裕 et al, "マウス卵子の体外受精に関する研究", 家畜繁殖研究会誌, 1971, 16, 147-151
- [5] Kazuki NAKAO et al, "Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos", *Exp. Anim.*, 1997, 46, 231-234.
- [6] F.Devreker, et al, "Amino acids promote human blastocyst development *in vitro*", *Hum. Reprod.*, 2001, 16, 749-756.
- [7] Gardner, D.K. and Lane, M., "Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture", *Biol. Reprod.*, 1993, 48, 377-385
- [8] Lane, M. and Gardner, D.K., "Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids", *J. Reprod Fert.*, 1997, 109, 153-164