

初期発生時における体外受精由来ウシ胚のタンパク質パターンについて

森 優美子・松本 浩道・菅原 七郎

東北大学農学部動物生殖科学講座 宮城県仙台市 〒981

要旨：ウシの未成熟卵子から胚盤胞までそれぞれ1個または3個ずつの着床前胚をキャピラリーチューブに吸引し、SDS + 2-メルカプトエタノール溶液と混合してチューブ内の胚を融解させた。それらの胚はファーストシステム（ファルマシア社製）を用いた電気泳動-銀染色法により蛋白パターンを出現させ、デンシトメーター（シマズ社製）を用いて解析し、以下の結果を得た。この方法で検出された分画は、1レーンにつき17~32本であった。未成熟卵子でみられた59~62 KD の分画は発生が進むにつれて少しずつ高分子側にずれ、胚盤胞期では70~76 KD に変異する事が示唆された。また、84~91 KD の分画はほぼ全ての発生時期の胚で、101~108 KD の分画は成熟期以後の胚で認められた。これらの分画と卵子以外の体細胞や血清・卵胞液成分などの分画と共にしていたものは顆粒層細胞でみられた100~103 KD、卵胞液、ウシ胎子血清でみられた63~65 KD の分画であった。

キーワード：タンパク質パターン、ウシ胚、初期発生、ファーストシステム、銀染色。

哺乳類の初期発生過程における卵子のタンパク質の経時的变化は、成熟過程から初期発生時のある限られた時期での合成パターンを中心に解析が行われている [1, 2]。ウシでは、成熟段階でのC-MOS（第2成熟分裂中期抑制因子）と呼ばれているものの研究 [3-7] や生体内発生卵子についての胚ゲノム活性と蛋白質合成との関係について解析が行なわれている [8]。これらの報告は In Vitro での卵子および受精卵のタンパク質合成に関し放射性物質の一定時間内でのタンパク質分画への取り込みを見たものであり、その時点でのタンパク質合成能を表すものといえる。一方、これとは異なり、生体内や培養系での各発生段階において、膜タンパク質、機能タンパ

ク質などの胚の構成タンパク質の動態ということに着目した研究は、ラット卵子での報告 [9] を除いて殆ど研究されていない。

さらにこれらの方では³⁵S メチオニン等の放射性物質を用いているため、長時間の培養には不適である。そのため目的とした時点での卵子構成タンパク質組成を探る上でこの方法は適当とはいえない。既報 [9] において、ラット卵子の構成タンパク質の解析に用いたファーストシステム（ファルマシア）が適用できるとの利点から、同じ装置を用いウシ卵子の解析を試みた。

本研究では、この方法により、屠場由来卵巣から採取したウシ卵母細胞を、IVM・IVF・IVC をすることによって得た卵子を各発生段階毎に割球数によって分別し、それらの卵子の構造、構成タンパク質を解析することを目的に実験した。すなわちウシの未成熟卵子、成熟卵子、1 細胞期胚、2 細胞期胚、4 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚、胚盤胞期胚の各発生時での構成タンパク質について解析し、そこで得られた結果を、ウシ胎子血清、卵胞液、顆粒層細胞のタンパク質パターンと比較した。

材料および方法

生体試料の採取方法：屠場由来卵巣を用い、体外成熟 (IVM)、体外受精 (IVF)、体外培養 (IVC) によって各発生段階の卵子を採取した。未成熟卵子と成熟卵子の区別は極体の有無によって行った。また、未受精卵と1細胞期胚の区別は極体数の違い (1個または2個以上) によって区別した。また、各発生段階での分類は媒精後の発生日数および割球数によって行った。媒精を行った日を Day 0 とした。すなわち、未成熟卵子は直徑 2~3 mm の卵胞から吸引採卵直後の卵子、成熟卵子は TCM199 + 10% FCS 中で 22 時間成熟培養した後に第一極体を持つ卵子、受精卵子は B.O. 液 + caffeine + Heparin + B.S.A. 中で 6 時間の媒精を行なった直後に回収し、その後、発生

(受付 1996年1月6日／受理 1996年3月8日)

別刷請求先：〒981 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1
東北大学農学部動物生殖科学講座

培地で培養し発生培養の時間に従って、Day 1.5 で2細胞期胚、Day 2.5 で4細胞期胚、Day 4 で8細胞期胚、Day 6 で桑実胚、Day 8 で胚盤胞期胚を各々回収した。

血清、卵胞液、顆粒層細胞の採取と前処理：血清はウシ胎子血清を 56°C 30 分で非働化し培養液に添加したもの用いた。また、卵胞液は、採卵時に直径 2~3 mm の卵胞より吸引した卵胞液を 1,600 r.p.m. × 5 min 程度で遠心して得た上澄みを用いた。ウシ胎子血清、卵胞液は共に再留水で 100 倍に希釈した。顆粒層細胞は、0.2% ヒアルロニダーゼ処理で卵子と分離させた顆粒層細胞を生理的食塩水 (10 mg/ml ストレプトマイシン + 250 MG ポリビニールピロリドン (SIGMA) を含む。以下生食) に懸濁と遠心を数回繰り返して洗浄したものを再留水に懸濁させて電気泳動に用いた。

条件の吟味：電気泳動に際し、卵子を 3 個ずつまたは 1 個ずつを 1 セットとして処理し、泳動に供した。発生段階が進むにつれて、卵子の回収率が低下していくことなどから、可能な限り卵子を少数にして泳動を行った。先のラット卵子の報告では、ウシ卵子については卵子 1 個の場合でも肉眼で判別できるバンドが十分に出現したとあったが、卵子 1 個では分画の判別が不十分となる可能性もあることから、卵子 3 個と 1 個を用いてそれぞれ泳動を行った。卵子タンパク質溶解溶媒の量をほぼ一定にするためキャピラリーチューブを用い、その中にメディウムと一緒に卵を吸い込む方法で卵子の処理と調整を行った。

採卵直後の未成熟卵子は、0.2% ヒアルロニダーゼ処理並びにピベッティング操作によって顆粒層細胞を除去し、PBS (−) 並びに生食で数回洗浄した後、各発生段階別に 1 個又は 3 個ずつ生食約 1 μl と共にキャピラリーチューブ (1~5 μl 用 Drummond Scientific Company) 内に封入し −60°C で凍結し、分析時まで保存した。顆粒層細胞も同様に処理した。凍結した試料は泳動直前に解凍し、SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) + 2-ME (2-メルカプトエタノール) 溶液を各々の最終濃度が約 1% となるように、前記試料と混合した。すなわちあらかじめ作成しておいた 3% SDS + 3% 2-ME 溶液を卵溶液に対して 1/2 になるようにチューブ内に吸入し、5,000 r.p.m. × 1 Sec で軽く遠心して混合した。その後反応を進ませるために 60°C の乾燥用オーブン内に 1 時間放置した。

泳動装置：電気泳動と染色にはファーストシステム (ファルマシア) を用いた。ゲルは、GRADIENT8-25 (M.W. 6-30 KD), サンプルアプリケーターは 8/1 を用いた。SDS 電気泳動マーカーとしてファルマシア社製の High Molecular (H. M.) (ミオシン: 212 KD, α₂ マクログロブリン: 170 KD, β-ガラクトシダーゼ: 116 KD, トランスフェリン: 76 KD, グルタミックデヒドロゲナー

ゼ: 53 KD) を用いた。

泳動パターンの分析：泳動パターンの分析にはデンシトメーター (CS-9300PC, Shimadzu) を用い、泳動パターンの分析を行った。簡易型の屈折計 (Hand Protein Refractometer, Hitachi) を用いて FCS 中のタンパク質含有割合を測定し希釈倍率、各分画の相対的濃度から換算してタンパク質量 3 pg の分画まで検知できることができた。1 レーン内に含まれる全タンパク質量に対して 3% 以上のタンパク質量を持つ分画についてそれらを比較パーセントとして示し検討した。

結果

実験は 3 回繰り返し行い、同様の解析パターンを得た。

同定されたタンパク分画数：この分析法によって、17~32 本のタンパク質分画が各発生段階の卵子で同定された (Fig. 1)。

各発生段階におけるウシ卵子内タンパク質分画の変動：検出された全タンパク質量に対して 3% 以上のタンパク質を持つ分画について Table 1 に示した。全体的には卵子については 101~108 KD 以下のタンパク質含量が多く、卵子以外の体成分についてはさらに高分子のタンパク質が比率的に多く含まれていた。84~91 KD のタンパク質分画は、1, 2 細胞期では分子量が 77~81 KD とやや低めではあるものの、各発生段階卵子で認められた。また、成熟期以後の各発生段階卵子では 101~108 KD のタンパク質が認められた (Table 2)。

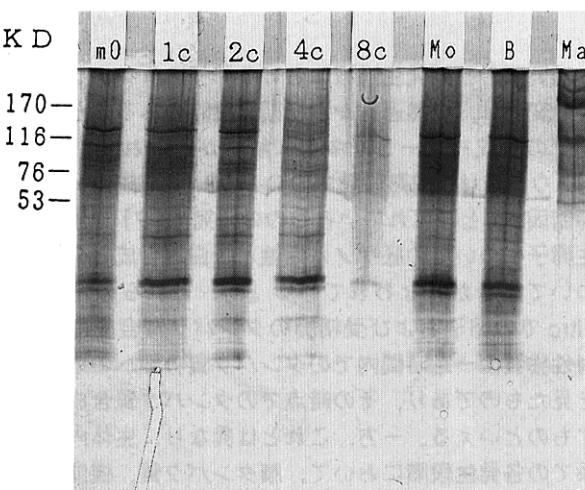


Fig. 1. Protein patterns of bovine eggs. mO: mature oocytes, 1c: 1 cells (zygotes), 2c: 2 cells, 4c: 4 cells, 8c: 8 cells, Mo: morulae, B: blastocysts, Ma: marker.

Table 1. Major proteins (>3%) in bovine eggs at different cell stages and somatic components

KD	imO	mO	1c	2c	4c	8c	Mo	B	G	FF	F
190 - 200									9.1*		
170 - 189											5.8
140 - 169		11							13	10	
110 - 139		21							8.0		7.8
90 - 109		6.5	19		26	34	28	30	6.4		
80 - 89	29	18	17		8.0	7.9		9.4	10		
65 - 79		7.6		14	14	12		13		12	34
54 - 64	26		15	15			5.6	4.7		33	
40 - 53					8.8						
- 39					3.3	5.3	7.7	13			

*Each value means a percentage in total protein. imO: immature oocytes, mO: mature oocytes, Mo: morulae, B: blastocysts, G: granulosa cells, FF: follicular fluid, F: fetal calf serum.

Table 2. Comparison among major proteins (>3%) in bovine eggs at different cell stages and other somatic components

M. W. of protein	Bovine eggs								Other somatic components			
	KD	imO	mO	1c	2c	4c	8c	Mo	B	G	FF	F
59 - 62	—	*		—						○*		
63 - 65			—							○	○	
66 - 69				—								
70 - 76					—							
84 - 91					—	—	—	—	—			
101 - 108		—	—	—	—	—	—	—	—	○		

*Each line (broken line) and circle means a presence of protein. The details are as in the text.

ウシ卵子とウシ胎子血清、顆粒層細胞、卵胞液との泳動パターンの比較：血清、卵胞液、顆粒層細胞、マークー、成熟卵子、未成熟卵子の泳動パターンを示した (Fig. 2). 卵子のタンパク質と共にみられたタンパク質は、顆粒層細胞では 101~103 KD, 卵胞液とウシ胎子血清では 63~65 KD のものであった。

考 察

ファーストシステムを用いたウシ卵子構成タンパク質の経時的变化について、発生ステージが同じものでは卵子3個の場合でも1個の場合でも解析結果が同じであることから、卵子1個でも解析が可能であることが明らかになった (Fig. 3).

各発生段階の卵子を1個または3個ずつについてそれぞれ泳動した結果、成熟卵子と受精卵子で同定された101~108 KD のタンパク質は顆粒層細胞にも6%含まれていた。これは一部コンタミが考えられたが、未成熟卵子では検出されず、受精後恒常に存在することから、顆粒層細胞由来ではなく、質の異なる卵子特有のタンパ

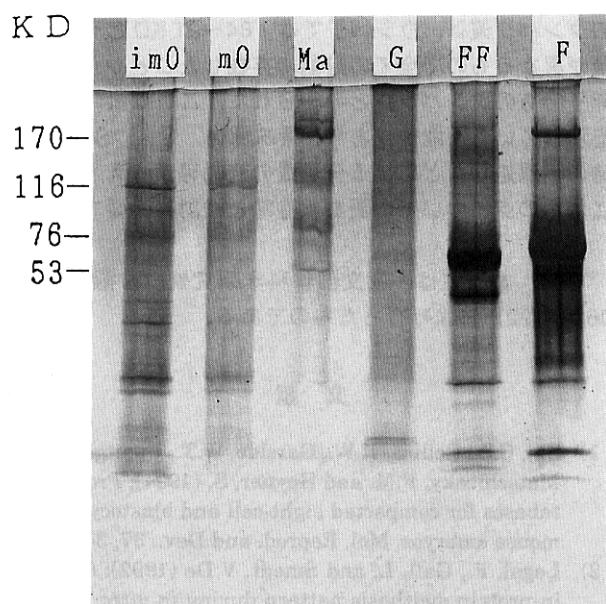


Fig. 2. Protein patterns of bovine oocytes and other somatic components. imO: immature oocytes, mO: mature oocytes, Ma: marker, G: granulosa cells, FF: follicular fluid, F: fetal calf serum.

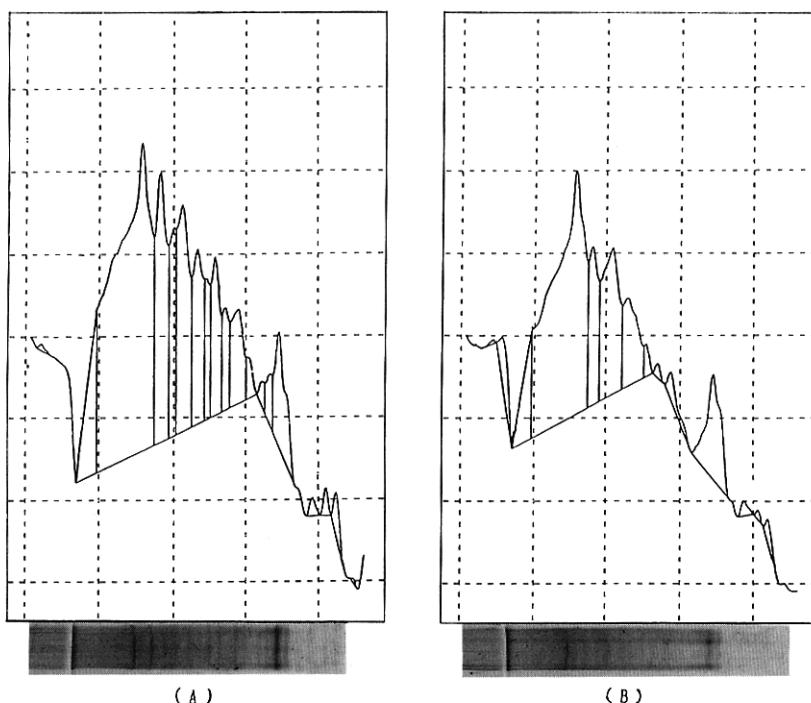


Fig. 3. Electrophoregrams of bovine morulae. A: applied for 3 embryos, B: applied for 1 embryo.

ク質であることが示唆された。又、ラット卵子で排卵直後～胚盤胞期を通して存在すると報告された78～81 KDのタンパク質は、ウシ卵子では、84～91 KDとやや分子量が異なるもので全ての時期に存在したことから、ウシ卵子特有のタンパク質と考えられた。これは動物の種差を示している可能性があり、興味深い。今後、SDS融解時の高温処理などによる分子量の変動等が考えられるがこれらの点についての更なる吟味と検討が必要である。

なお、本研究は一部文部省科学研究費（一般研究B, 06454122）により行ったものである。

文 献

- 1) Shi, C.Z., Collins, H.W., Garside, W.T., Buettger, C.W., Matschibsky, F.M. and Heyner, S. (1994): Protein databases for compacted eight-cell and blastocyst-stage mouse embryos. *Mol. Reprod. and Dev.*, 37, 34–47.
- 2) Legal, F., Gall, L. and Smedt, V. De (1992): Changes in protein synthesis pattern during *in vitro* maturation of goat oocytes. *Mol. Reprod. and Dev.*, 32, 1–8.
- 3) Kruip, T.A.M., Cran, D.G., Van Beneden, T.H. and Dielman, S.J. (1983): Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Gamete Res.*, 8, 29–47.
- 4) Hunter, A.G. and Moor, R.M. (1983): Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 70, 1646–1651.
- 5) Sirard, M.A., Florman, H.M., Leibfried-Rutledge, M.L., Barnes, F.C., Sims, M.L. and First, N.L. (1987): Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 40, 1257–1263.
- 6) Kastrop, P.M.M., Bevers, M.M., Destree, O.H.J. and Kruip, Th.A.M. (1990): Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 90, 305–310.
- 7) Kastrop, P.M.M., Bevers, M.M., Destree, O.H.J. and Kruip, Th.A.M. (1990): Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation *in vitro*. *Molec. Reprod. Dev.*, 26, 222–226.
- 8) Frei, R.E., Schultz, G.A. and Church, R.B. (1989): Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8–16 cell stage of embryo genesis in the cow. *J. Reprod. Fert.*, 86, 637–641.
- 9) 青島義明・松本浩道・梅津元昭・菅原七郎（1995）：ファーストシステムを用いたラット卵子の初期発生胚の構成タンパク質パターンの変化の検討. *J. Mamm. Ova Res.*, 12 : 51–57.

Protein Patterns in Bovine Oocytes to Early Embryos Derived from IVF

Yumiko Mori, Hiromichi Matsumoto, Shichiro Sugawara

*Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, Tohoku University,
Sendai 981, Japan*

Bovine embryos derived from IVM, IVF, IVC were subjected to analyze of programmed SDS-electrophoresis with silver staining, using Phast system (Pharmacia Co. Ltd.). Embryos in early stage of development with immatured oocytes, matured oocytes, 1 cells (zygotes), 2 cells, 4 cells, 8 cells, morulae and blastocysts were aspirated into 1 μ l capillary tube and kept at -60°C until used for electrophoresis. The embryos of each developmental stage were dissolved in saline solution containing SDS and 2-mercaptoethanol, incubate containing for 1 hour at 60°C , and applied to the electrophoresis. One or three embryos were standarized to analyze their protein

pattern in each stage. The pattern of protein bands were analyzed with a densitometer (CS-9300-PC, Shimadzu). The band of 59–62 KD in immaturated oocytes become high molecular weights eggs developed. The band of 84–91 KD and 101–108 KD were identified in eggs at each stage of the early development except for 101–108 KD in immature oocytes. In addition the bovine embryos during early development had the protein bands that were the same bands recognized as 101–103 KD in granulosa cells, 63–65 KD in FCS and follicular fluid, respectively.

Key words: Protein patterns, Bovine embryos, Early development, Phast system, Silver staining.