



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウス初期発生におけるギャップ結合の形成機構と機能的役割に関する研究
Author(s)	小川, 英彦
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第4171号
Issue Date	1997-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3122329
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51427
Type	doctoral thesis
File Information	000000307520.pdf



マウス初期発生におけるギャップ結合の形成機構と
機能的役割に関する研究

畜産学専攻 博士後期課程

小川英彦

目次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 各章に共通する実験材料および方法	5
第 3 章 4 細胞期胚の割球間接着とギャップ結合形成との関連性の検討	8
第 1 節 緒言	8
第 2 節 4 細胞期胚の割球間接着とコンパクションおよびギャップ結合形成との関連性	9
第 3 節 考察	20
第 4 節 要約	21
第 4 章 ギャップ結合タンパク質の細胞内輸送開始時期の検討	
第 1 節 緒言	23
第 2 節 4 細胞期以降の胚発生に及ぼす BFA の影響	24
第 3 節 BFA のコンパクションに及ぼす影響	33
第 4 節 Cx43 の細胞内輸送開始時期の検討	36
第 5 節 考察	46
第 6 節 要約	49
第 5 章 ギャップ結合形成と Cx43 のリン酸化との関連性の検討	
第 1 節 緒言	51
第 2 節 ギャップ結合形成と Cx43 のリン酸化との関連性	51
第 3 節 考察	59
第 4 節 要約	60

第 6 章	ギャップ結合形成を制御する条件の検討	61
第 1 節	緒言	61
第 2 節	ギャップ結合形成に及ぼすフィットヘマグルチニン (PHA) の影響	61
第 3 節	ギャップ結合形成に及ぼす dibutyryl cAMP の影響	65
第 4 節	ギャップ結合形成に及ぼす TPA の影響	69
第 5 節	Cx43 のリン酸化に及ぼす dbcAMP および TPA の影響	73
第 6 節	考察	74
第 7 節	要約	79
第 7 章	ギャップ結合形成の制御が胚の発生に及ぼす影響	81
第 1 節	緒言	81
第 2 節	dbcAMP が体内受精胚および体外受精胚の発生に及ぼす影響	81
第 3 節	TPA が胚の発生に及ぼす影響	87
第 4 節	考察	88
第 5 節	要約	91
第 8 章	総括	92
	謝辞	97
	引用文献	98

第 1 章 緒論

哺乳動物胚の初期発生は、卵管内で受精することにより開始する。受精した卵子は、細胞分裂を繰り返し細胞数を増加させながら子宮へ移動し、透明帯から脱出して着床する。着床期の胚は胚盤胞と呼ばれており、分化した2つの細胞集団、内部細胞塊と栄養芽層とが存在する。着床後、前者は主に胎仔に後者は胎盤、胎膜に分化する (Gardner, 1983)。

8細胞期中期までの胚では、全ての割球は内部細胞塊、栄養芽層のどちらにも分化できる全能性を持っている (Hillman, et al., 1972, Balakier and Pedersen, 1982)。8細胞期後期にコンパクションと呼ばれる形態学的な変化が胚に見られるようになる。コンパクション胚では、割球間の接触面が大きくなり、その結果として割球が扁平化し (Lehtonen, 1980)、細胞膜 (Handy-side, 1980, Ziomek and Johnson, 1980, Izquierdo, et al., 1980, Reeve and Ziomek, 1981, Nuccitelli and Wiley, 1985, Pratt, 1985)、細胞質 (Reeve, 1981, Reeve and Kelly, 1983, Maro, et al., 1985, Fleming and Pickering, 1985) および細胞骨格 (Sobel, 1983, Johnson and Maro, 1984, Houliston, et al., 1989) に極性が生じる。また、ギャップ結合を通じた細胞間コミュニケーションが可能となる (Lo and Gilula, 1979, Goodall and Johnson, 1982, Goodall and Johnson, 1984, Goodall, 1986, Becker, et al., 1992)。コンパクション胚では、一部の割球を除いて全能性を失う。コンパクションは、胚盤胞形成に必要である (Johnson and Maro, 1986) ことから、細胞が内部細胞塊と栄養芽層とに分化する過程で重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究で着目するギャップ結合は、タイト結合、アドヘレンス結合、デスマソームと同様に機能的に特殊化した細胞間接着装置で、細胞膜に存在し、隣接する細胞間を直接連絡するチャンネルである。その名称は細胞間に 2~4

nm の細隙 (ギャップ) として観察されることに由来する。ギャップ結合を通して、分子量 1000 以下の物質の通過が可能であり、その中には、 Ca^{2+} 、cAMP、イノシトール三リン酸等の細胞内情報伝達物質が含まれる (Saez, et al., 1986, Saez, et al., 1989, Spray, et al., 1986)。ギャップ結合は生体内のさまざまな組織や臓器に存在しており、細胞の恒常性と関連していると考えられている。また、ギャップ結合による細胞間コミュニケーションは、細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしていると考えられている。

ギャップ結合は、隣接する細胞膜に存在するコネクソンが 2 個接着することにより形成される。コネクソンは、構成タンパク質であるコネキシンが 6 個集合したものである (Bennett, et al., 1991)。コネキシンは、アミノ酸配列に類似性を有する 1 つのファミリーを構成しており、各々のコネキシンの名称は、cDNA から予測される分子量をつけて、コネキシン 26、32、43 等と呼ばれている (Haefliger, et al., 1992)。これまでに見つけられている十数種類のコネキシンのうち、初期胚ではコネキシン 43 の発現が報告されており (Valdimarsson, et al., 1991, Nishi, et al., 1991, Becker, et al., 1995)、さらに最近になって、3 種類のコネキシン (コネキシン 31, 31.1, 45) の発現が報告された (Davies, et al., 1996)。

初期発生におけるギャップ結合の果たす機能と必要性については、アフリカツメガエルとマウスで報告されている。Warner ら (1984) は、アフリカツメガエルの 4 細胞期胚の 1 割球にコネキシンの抗体を注入してギャップ結合の形成を阻害したところ、Stage 37 のオタマジャクシで発生は停止し、目、脳、耳小胞や三叉神経の神経節に異常がみられたことを報告している。また、Bevilacqua ら (1989) は、マウス 2 および 4 細胞期胚のすべての割球にコネキシンのアンチセンス RNA を注入してコネキシンタンパク質の合成を阻害したところ、コンパクション胚の割合の低下がみられ、4 細胞期胚の 1 割球

に注入したところ、コンパクション胚はアンチセンス RNA を注入した割球を排除した形態をしていた、と報告している。Buehr ら (1987) は、近交系マウスの一つである DDK 系雌マウスと異系雄マウスとから得られた胚の胚盤胞への発生率の低下 (Wakasugi, 1973) の原因が、ギャップ結合による細胞間コミュニケーションの欠如によることを明らかにした。最近、Reaume ら (1995) は、コネクシン 43 のノックアウトマウスを作成した。胎仔は正常に成長し出産したが、生後数時間以内に心臓の右心室の流出路肥大による肺動脈狭窄症で死亡した。また、卵巣にも異常が生じていたと報告している。したがって、哺乳動物の初期発生過程において、ギャップ結合はコンパクションの維持と胚盤胞形成、細胞分化に重要な働きをしていると考えられる。また、ギャップ結合による細胞間コミュニケーションは、個々の割球が互いに共存しながら増殖、分化していく過程で必要な情報を割球間で共役するために必要な手段であると考えられる。

家畜繁殖学の分野において、体外受精・体外培養の技術は、優良家畜の作出、希少動物の絶滅危機からの保護等を目的として用いられている。今後、遺伝子導入家畜の作出にも必要な技術である。体外培養については、培養時間が長くなるに従い発生率が低下すること (Lane and Gardner, 1992) や、体内胚と比較して細胞分裂が遅くなることにより、細胞数が減少すること (Harlow and Quinn, 1982) が問題であった。このような体外培養胚の発生の低下の要因として子宮内環境の欠如が指摘された。現在では、体外培養条件を子宮内環境に近づけることにより、体外培養胚の発生は改善された。しかし、培養条件が胚に及ぼす作用機序については不明な点がまだ多く残されている。今後、それらの作用機序を追求するうえで、胚発生のメカニズムを把握することが必要であると思われる。

本研究では、細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしていると考えられて

いるギャップ結合に着目し、その形成を制御する（促進または遅延させる）ことにより、体外培養胚の発生に影響を及ぼすかを調べることを目的とした。

そこで、

- 1) マウス初期発生過程におけるギャップ結合の形成機構を解明する
 - 2) 1) で得られた知見をもとにギャップ結合形成を制御する方法を開発する
 - 3) ギャップ結合形成の制御がその後の発生に及ぼす影響を明らかにする
- 以上の3項目について検討した。

第 2 章 各章に共通する実験材料および方法

1. 供試マウス

卵供試用雌マウスとして本講座動物飼育室で繁殖、飼育した 7~10 週齢の系統間雑種 (F1; C57BL/6×C3H) を用いた。また、交配用雄マウスとして 3~8 ヶ月齢の ICR 系マウスを用いた。飼育条件は、温度 23℃、湿度 55~60%、照灯時間 11 時間、餌および水は不断給餌とした。

2. 胚の採取および体外培養

卵供試用雌マウスに 8 IU の妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG : ピーマックス、三共) を腹腔内注射し、48 時間後に 8 IU のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG : ゴナトロピン、帝国臓器) を腹腔内注射して過排卵を誘起した。hCG 投与後、ICR 系雄マウスと同居させた。翌日、膣栓の確認できたマウスを実験に供した。

2 細胞期胚、4 細胞期胚の採取は、それぞれ hCG 投与 44~46 時間後ないし 50~52 時間後に行った。膣栓を確認できたマウスを頸椎脱臼法により屠殺後、卵管を摘出し、あらかじめ 37℃ に温めておいた 3 mg/ml 牛血清アルブミン (BSA: Fraction V, Sigma) を添加した胚体外操作用培養液 PBI (PBI+BSA) (Quinn, et al., 1982) の入った時計皿に移した。先端を丸めた 30 ゲージ針を付けた注射筒を用いて卵管内の受精卵を PBI+BSA で灌流した。数回洗浄後、胚発生用培養液で培養した。胚発生用培養液には、5 mg/ml BSA、0.04 mg/ml EDTA 添加 BWB 培養液 (BWB+BSA) (Bigger, et al., 1971) を用いた。培養条件は、温度 37℃、気相 5% CO₂、95% 空気、飽和湿度とした。

3. 走査電子顕微鏡用試料作成法

胚の割球表面の微絨毛の分布を走査電子顕微鏡で観察するため、Koyamaら(1994)の方法に従って走査電子顕微鏡用試料を作成した。0.5% プロナーゼ溶液で透明帯を除去した胚を、3% グルタルアルデヒドと0.5% パラホルムアルデヒドを含む0.1% ポリビニルアルコール (PVA: Sigma) 添加ハンクス塩類溶液 (Hanks' balanced salt solution) (HBSS-PVA) に1時間浸漬し、固定した。固定後、HBSS-PVAで3回洗浄し、poly-L-lysine (Sigma) でコートしたスライドガラス (5×5 mm) に接着させた。スライドガラスに接着した胚を1% 四酸化オスミウムを含むHBSS-PVAで1時間、後固定した。3回水洗後、1% タンニン酸水溶液に2時間浸漬し、水洗後、1% 四酸化オスミウム水溶液に2時間浸漬した。水洗後、アルコール脱水系列で脱水を行った。アルコール脱水系列に用いたエタノール濃度は、30, 50, 70, 80, 90, 95, 99.5, 100% とし、処理時間は各20分間とした。途中、エタノール濃度70%で、4℃で一晩静置した。これら固定から脱水までの一連の処理では胚のスライドガラスからの剥離を防ぐために、胚の接着したスライドガラスをメッシュチャンバー (Millicell-PCF: Millipore) に入れ、24 ウェルマルチディッシュ (Nunc) に入れた各処理液にメッシュチャンバーを移し替えて処理を行った。脱水後、臨界点乾燥を行い、スライドガラスを試料台にのせ、イオンスパッタリング装置で試料面に金を被覆した。観察は本学部電顕センターの日立 S-800 型走査電子顕微鏡で行った。加速電圧は5または10 kV とした。

4. 間接蛍光抗体染色法

0.5% プロナーゼ溶液で透明帯を除去した胚を、4% パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液 (PBS) で30分間浸漬し、固定した。固定後、0.05% Tween-20 を含む PBS (PBS-Tween) で3回洗浄した。次に、抗体の非特異

的結合を防ぐためにブロッキングを 37℃ で 30 分以上行った。ブロッキング溶液には、3% BSA を含む PBS を使用した。ブロッキング後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体中で、4℃ で一晩静置した。PBS-Tween で 3 回洗浄後、PBS で希釈した二次抗体に 37℃ で 30 分間浸漬した後、PBS-Tween で 3 回洗浄した。以上の処理は、96 ウェルマルチディッシュ (Falcon) に入れた各処理液に胚を移し替えて行った。スライドガラス上にワセリンでリングを作り、その中央にグリセロールを満たし、グリセロール内に処理を終了した胚を移した。カバーガラスをワセリンのリングの上に静かに置き、実体顕微鏡下でカバーガラスの四隅を針で順次軽く押して、適度に胚を圧して胚を固定した。最後に、カバーガラスの周りをマニキュアで封入した。蛍光分布の観察は、本学部生物組織画像解析システム室の共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 (LSM-400, Carl Zeiss) および本学医学部電子顕微鏡室の共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 (MRC 500, Bio-Rad) で行った。FITC およびローダミンの蛍光を観察する際、レーザーの波長をそれぞれ 488 および 543 nm、Emission Filter を LP515 および LP590、Dichrotic beam splitter は FT488/543 とした。また、透過光で観察する際、レーザーの波長を 488 nm、Dichrotic beam splitter を NT80/20/543 とした。

第3章 4細胞期胚の割球間接着とギャップ結合形成との 関連性の検討

第1節 緒言

哺乳動物胚の初期発生は、卵形成過程で蓄積した母方 mRNA を利用して進行する。胚ゲノムの転写が開始するのは動物種により異なり、マウスでは2細胞期である (Schultz, 1986)。コンパクションに関与するタンパク質の mRNA の転写は4細胞期中期に完了している (Kidder and McLachlin, 1985, McLachlin and Kidder, 1986, Levy, et al., 1986)。また、コンパクションに関与するタンパク質のうち、細胞接着分子である E-カドヘリンやギャップ結合構成タンパク質であるコネクシン 43 (以下 Cx43) は、4細胞期に合成されていることが報告されている (Vestweber, et al., 1987, Valdimarsson, et al., 1991, Softon, et al., 1992, De Sousa, et al., 1993)。また、これらのタンパク質は、8細胞期中期に細胞膜で機能を発現し始める。Cx43 はコネクソンを形成し、隣接する細胞膜上のコネクソンと接着してギャップ結合を形成することで機能を発現する。ギャップ結合形成には割球間接着が強まる必要がある (Eggens, 1989) が、割球間接着が比較的弱い4細胞期胚の割球間接着の必要性については明らかにされていない。

そこで本章では、ギャップ結合の形成に4細胞期胚の割球間接着が関与しているかどうかを調べることを目的とする。

第2節 4細胞期胚の割球間接着とコンパクションおよびギャップ結合 形成との関連性

本章では、コンパクションおよびギャップ結合の形成に4細胞期胚の割球間接着が関与しているかどうかを調べた。

1. 材料および方法

1) 供試胚

2細胞期胚を採取し、BWW培養液で培養した。初期4細胞期胚を得るために、4細胞期への細胞分裂の開始の確認は、2時間毎の顕微鏡観察により行った。4細胞期胚への細胞分裂が認められた胚を、4細胞期胚への分裂0時間後の胚と定義し、実験に供した。

2) 4細胞期胚の割球分離および集合胚の作成

4細胞期胚への分裂0時間後の胚を、0.4% (W/V) ポリビニルピロリドン (PVP: Sigma) を含み、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} を含まない PBS (PBS+PVP) に37°C、8分間保持して割球間の接着を弱めた後、0.5% (W/V) プロナーゼ溶液に移し、37°C、3~5分間保持して、透明帯を除去した。透明帯除去胚をPBS+PVPで2度洗浄し、先端を細くした毛細ピペットを用いて、慎重にピペッティングを繰り返し、4個の割球に分離した。4個の割球に分離後、0、4および8時間各々の割球を個々に培養することで割球の集合までの時期を変えた3種類の集合胚（それぞれ前期集合胚、中期集合胚、後期集合胚とした）を作成した。割球の集合には、50 $\mu\text{g/ml}$ のフィトヘマグルチニン P (Difco Laboratories) を添加した BWW 培養液を割球接着用培養液として用いた。割

球接着用培養液中で、約 5 分間、37°C で保持して、割球接着を完了した。4 細胞期胚への分裂 0 時間後の胚を PBS+PVP 中に保持することで割球間の接着を弱めた後、0.5% (W/V) プロナーゼ溶液で透明帯を除去した胚を、コントロール胚とした。

再集合時期が胚のコンパクションに及ぼす影響を調べるために、作成した集合胚を個々に培養し、2 時間毎に顕微鏡観察を行った。また、コンパクション後の発生に及ぼす影響を調べるために、hCG 投与 120 時間後の胚盤胞形成について顕微鏡観察を行った。

3) コンパクション胚の判定

割球間の接触が大きく、境界が不明瞭であり、胚の輪郭がなめらかな胚をコンパクション胚と判断した (図 3.1B)。

4) 走査電子顕微鏡による観察

集合胚の割球表面の微絨毛分布を走査電子顕微鏡で観察し、その経時的変化を調べた。試料の作成は、第 2 章の方法に従った。胚の全ての割球表面の微絨毛を観察し、微絨毛の分布から細胞膜の極性を下記の 3 区に分類した。全ての割球で微絨毛の分布が均一であった胚を「無極性胚」(図 3.2A)、一部の割球で微絨毛の局在が見られたが他の全ての割球で微絨毛の分布が均一であった胚を「一部極性胚」(図 3.2B)、全ての割球で微絨毛の局在が見られた胚を「有極性胚」(図 3.2C)とした。



A



B

図 3.1 8細胞期胚の顕微鏡像
(A) コンパクション前
(B) コンパクション後
×400

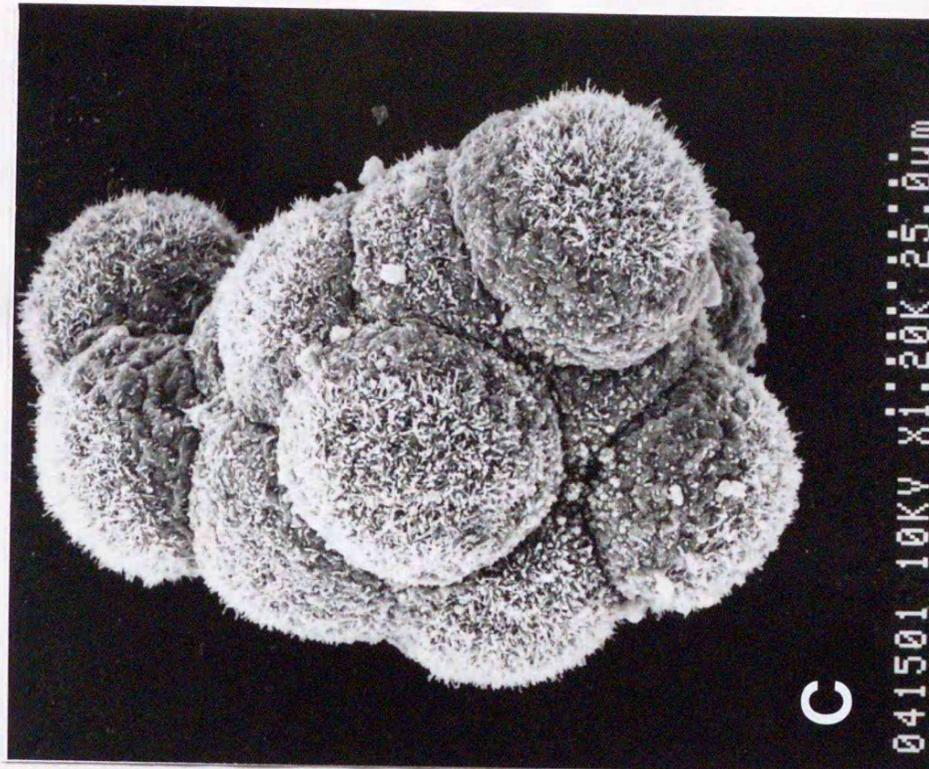
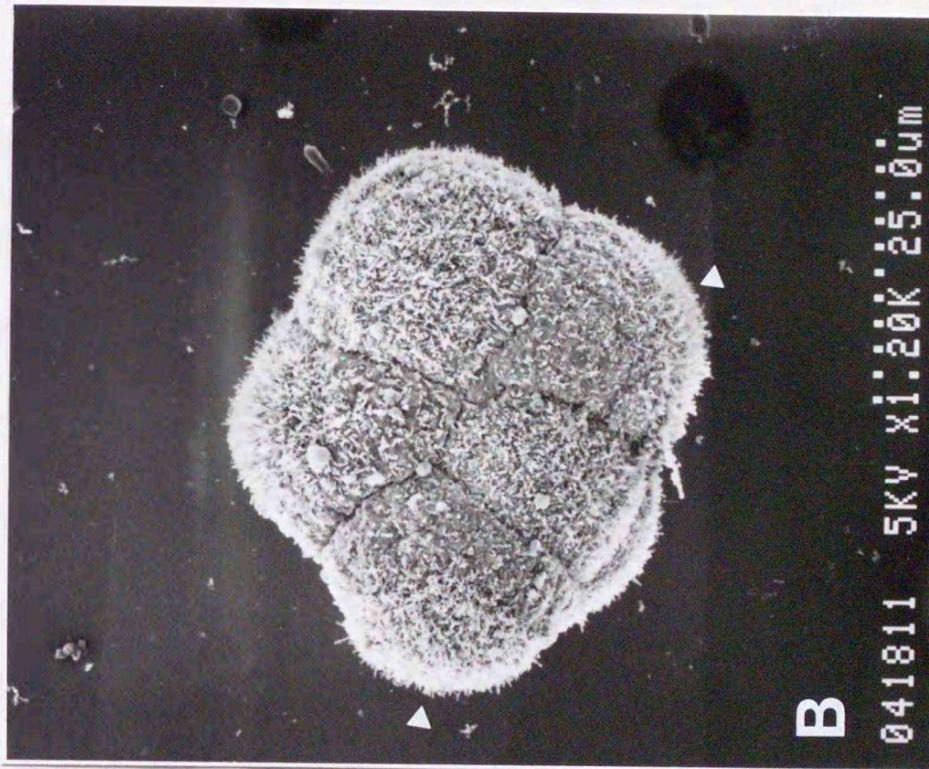
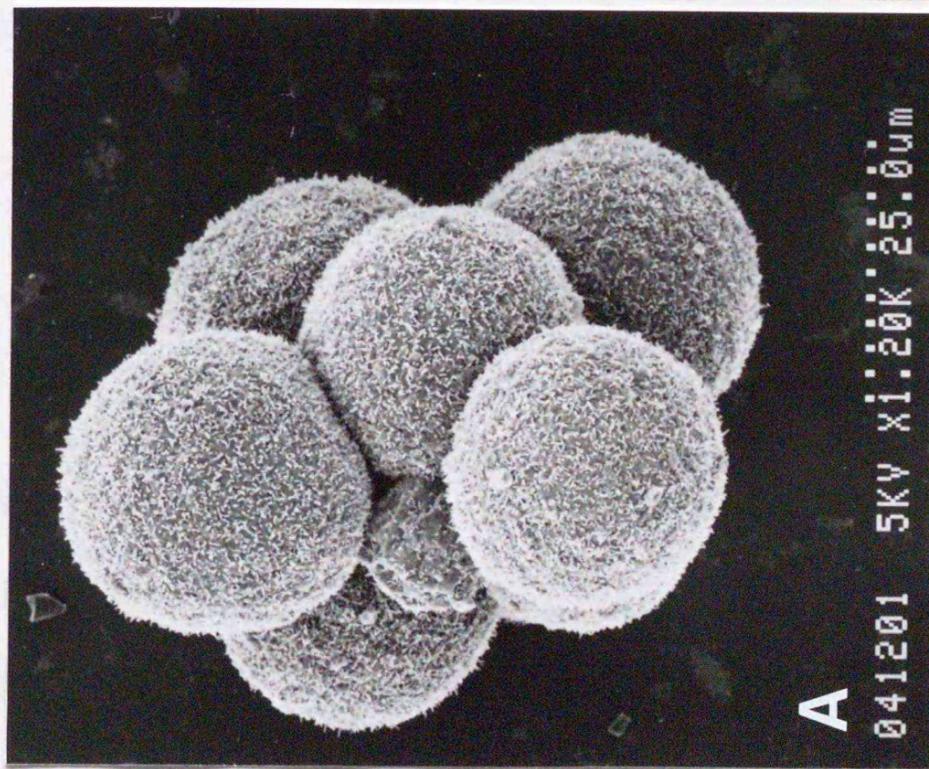


図 3.2 集合胚の電子顕微鏡像

(A) 無極性胚、(B) 一部極性胚、(C) 有極性胚
 (B) の三角印は微絨毛が局在した割球を示す

5) 集合胚のギャップ結合の検出

集合胚のギャップ結合の検出を、間接蛍光抗体染色法により行った。一次抗体として抗 Cx43 モノクローナル抗体 (Zymed Laboratories) をブロッキング溶液で 200 倍に希釈して用いた。また、二次抗体は FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (Tago) を 180 倍に希釈して、第 2 章にしたがって試料を作成した。共焦点レーザースキャン顕微鏡 (MRC 500, Bio-Rad) で蛍光分布を観察した。

6) ギャップ結合形成割合の経時的変化

集合胚におけるギャップ結合の形成割合の経時的変化を明らかにするために、胚の割球間接触数と、ギャップ結合の検出できた割球間接触数を測定した。ギャップ結合の形成割合は胚の割球間接触数に対するギャップ結合の検出できた割球間接触数の割合と定義した (図 3.3)。割球間接触数の観察を容易にするために 2/4 胚 (4 細胞期胚の割球を 4 個に分離し、そのうちの 2 個の割球を再集合した胚) を用いた。分裂 0 時間後の 4 細胞期胚を 4 個の割球に分離後、第 2 節方法 2) と同様の時期に 2 個の割球を再集合した 2/4 胚を、前期 2/4 集合胚、中期 2/4 集合胚、後期 2/4 集合胚とした。また、割球分離の際に 2 個の割球が未分離であった 2/4 胚を、コントロール 2/4 胚とした。

2. 結果

1) 割球分離・再集合操作が発生に及ぼす影響

割球分離・再集合操作がその後の発生に影響を及ぼすかどうかを、各集合胚、コントロール胚の hCG 投与 120 時間後の胚盤胞への発生率で比較した。胚盤胞への発生率には差は認められず (表 3.1)、各区とも 80% 以上であった。したがって、割球集合・再集合操作はその後の発生に影響を及ぼさないこと

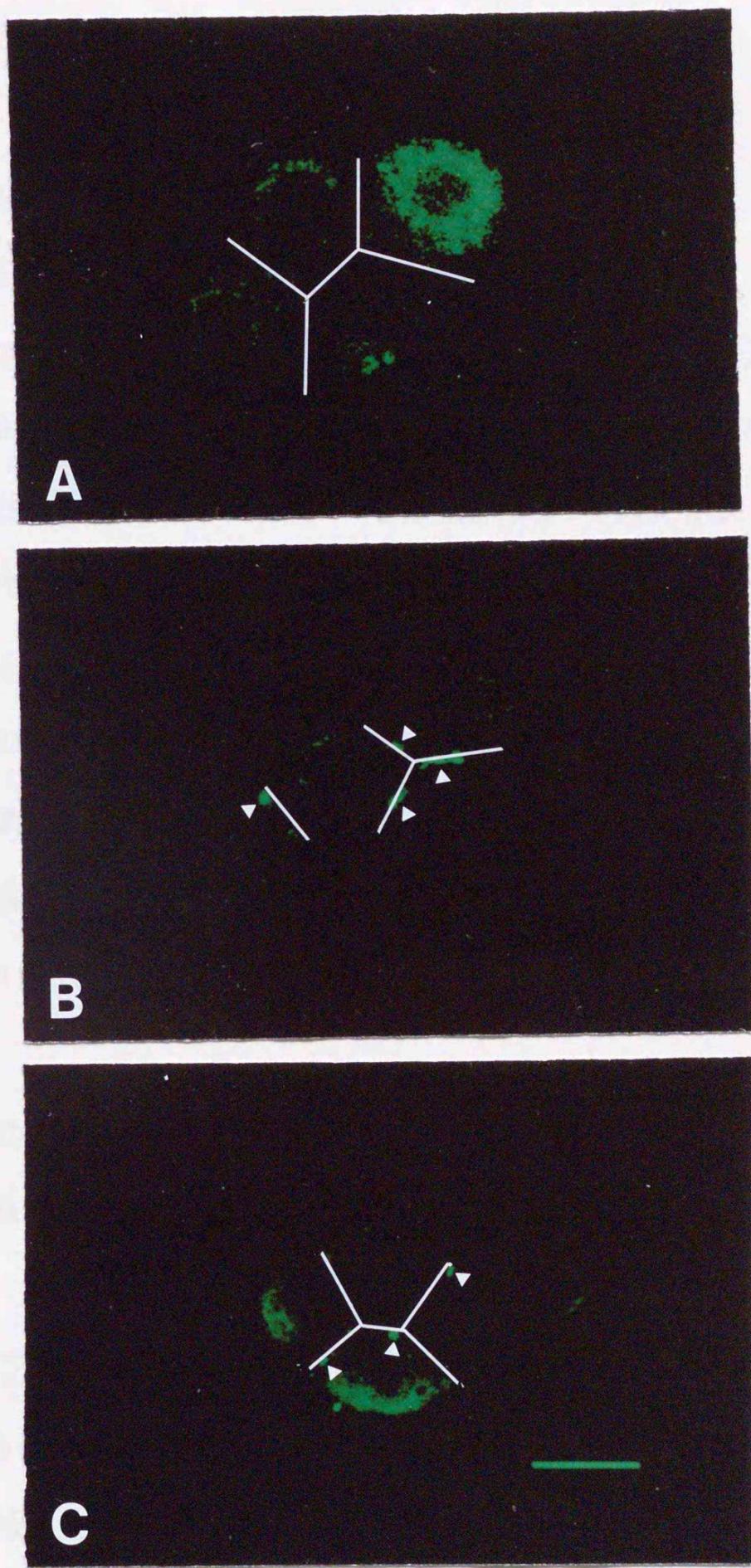


図 3.3 2/4 集合胚の Cx43 抗体染色像

割球間接触数は (A) 5, (B) 4, (C) 5

ギャップ結合が検出できた割球間接触数は (A) 0, (B) 4, (C) 3

実線は割球間接触、三角印は検出されたギャップ結合を示す

Bar = 25 μ m

が明らかとなった。

2) 割球間接触のコンパクションへの関与

4 細胞期胚への分裂 12~20 時間後に 2 時間毎に、コンパクション胚の観察を行った。コンパクション胚の割合を表 3.2 に示した。コントロール胚、各集合胚とも時間の経過にともないコンパクション胚の割合は増加し、コントロール胚では 18 時間後にほぼすべての胚がコンパクションを完了していた。前期集合胚では、4 細胞期胚への分裂 14 時間後の割合はコントロール胚より有意に低い値であった ($p < 0.05$) が、その後はほぼ同じ値であった。中期集合胚および後期集合胚では、4 細胞期胚への分裂 14~18 時間後にコンパクション胚の割合は有意に低い値であった ($p < 0.01$)。これらの結果から中期集合胚および後期集合胚でコンパクションの起こる時期は、コントロール胚より 2 時間遅れると考えられた。

3) 割球間接触の細胞膜の極性への関与

細胞膜の極性の有無により分類した胚数の経時的推移を表 3.3 に示した。4 細胞期胚への分裂 14 時間後では、ほとんどの胚が「無極性胚」および「一部極性胚」であった。その後の発生が進むにつれて「有極性胚」の数が増え、分裂 18 時間後ではすべての胚が「一部極性胚」および「有極性」であった。このような傾向はコントロール胚、集合胚で同様にみられた。

表 3.1 再集合時期が発生に及ぼす影響

再集合時期 (割球分離 後の時間)	供試 胚数	胚数 (%)		
		胚盤胞	異常	退化
コントロール	49	45 (91.8)	3 (6.1)	1 (2.1)
前期 (0)	50	42 (84.0)	2 (4.0)	6 (12.0)
中期 (4)	49	44 (89.8)	1 (2.0)	4 (8.2)
後期 (8)	48	45 (93.8)	3 (6.2)	0 (0.0)

各集合期間に有意差なし

表 3.2 再集合時期がコンパクションに及ぼす影響

再集合時期 (割球分離 後の時間)	供試 胚数	コンパクション胚 (%)				
		4細胞期胚への分裂後 (時間)				
		12	14	16	18	20
コントロール	49	7 (14.3)	21 (42.9)	34 (69.4)	46 (93.9)	47 (95.9)
前期 (0)	50	2 (4.0)	11 (22.0) ^a	33 (66.0)	43 (86.0)	47 (94.0)
中期 (4)	49	3 (6.1)	9 (18.4) ^b	22 (44.9) ^b	38 (77.6) ^b	43 (87.8)
後期 (8)	48	2 (4.2)	5 (10.4) ^b	22 (45.8) ^b	37 (77.1) ^b	46 (95.8)

^a コントロールとの間に有意差あり (p<0.05)

^b コントロールとの間に有意差あり (p<0.01)

表 3.3 再集合時期が細胞膜の極性に及ぼす影響

4細胞期胚 への分裂後 の時間	再集合時期 (割球分離 後の時間)	供試 胚数	細胞膜の極性 ^a		
			無極性胚	一部極性胚	有極性胚
14	コントロール	23	16	6	1
	前期 (0)	17	11	4	2
	中期 (4)	17	9	7	1
	後期 (8)	19	12	7	0
16	コントロール	21	1	9	11
	前期 (0)	18	5	10	3
	中期 (4)	15	2	6	7
	後期 (8)	19	4	7	8
18	コントロール	11	0	3	8
	前期 (0)	7	0	3	4
	中期 (4)	8	0	1	7
	後期 (8)	7	0	3	4

^a 細胞膜の極性の分類については本文参照

4) 割球間接触のギャップ結合形成への関与

抗 Cx43 モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体染色に先立ち、この抗体によって検出可能な Cx43 を明らかにした。後期 4 細胞期胚、前期 8 細胞期胚 (コンパクション前の胚)、後期 8 細胞期胚 (コンパクション胚) を用いて蛍光分布を観察した。その結果、Cx43 は後期 8 細胞期胚でのみ検出された。また、割球間接触部の細胞膜にスポット状に蛍光がみられたことから、本抗体は隣接する細胞膜に存在するコネクソンが 2 個接着した部位、すなわちギャップ結合の検出に有効であることが明らかとなった。したがって、以後の実験では、本抗体で検出された蛍光スポットをギャップ結合と判断した。

中期集合胚および後期集合胚を用いて経時的にギャップ結合を検出した。コントロール胚では 4 細胞期胚への分裂 14 時間後にギャップ結合を検出できたが、中期集合胚および後期集合胚では分裂 16 時間後に初めて検出できた。

2/4 胚を用いた時、全割球間接触数に対するギャップ結合が検出できた割球間接触数の割合を表 3.4 に示した。コントロール胚では、分裂 12 時間後以降ギャップ結合を有する割球間接触数は増加し、分裂 18 時間後ではほぼすべての割球間接触面にギャップ結合が形成されていた。集合胚において分裂 12 時間後では、再集合時期にかかわらずほとんど全ての割球間接触面でギャップ結合は検出できなかった。分裂 18 時間後には、コントロール胚で 97.2% の割球間接触面でギャップ結合を検出できたが、中期集合胚および後期集合胚では約 50% の割球間接触面でしか検出できなかった。

表 3.4 ギャップ結合が検出できた割球接触数の割合の経時的推移 (2/4 胚)

4 細胞期胚 への分裂後 の時間	再集合時期 (割球分離 後の時間)	供試 胚数	割球接触 総数 (A)	ギャップ結合が 検出できた 割球接触数 (B)	B/A (%)
12	コントロール	7	29	3	10.3
	前期 (0)	13	60	0	0.0
	中期 (4)	10	48	4	2.1
	後期 (8)	13	55	0	0.0
14	コントロール	14	63	17	27.0
	前期 (0)	18	76	32	42.1
	中期 (4)	13	56	3	5.4
	後期 (8)	16	73	4	5.5
16	コントロール	11	54	28	51.9
	前期 (0)	16	76	36	47.4
	中期 (4)	15	65	21	32.3
	後期 (8)	25	114	33	28.9
18	コントロール	8	36	35	97.2
	前期 (0)	15	79	53	67.1
	中期 (4)	14	76	37	48.7
	後期 (8)	12	83	36	43.3

第3節 考察

コンパクション胚では、細胞膜の極性がみられる (Ziomek and Johnson, 1980, Johnson and Ziomek, 1981, Johnson and Maro, 1984, Maro, et al., 1985)。Ziomek と Johnson (1980) は、細胞膜の極性は、他の細胞との接触により促進される、としている。しかし、本研究では中期および後期集合胚ではコンパクションがコントロール胚より遅れる一方で、細胞膜の極性の出現時期に違いは認められなかった。したがって、細胞膜の極性は割球の平坦化とは無関係であり、4細胞期での割球間接着は細胞膜の極性に影響を及ぼしていないと考えられた。

細胞間コミュニケーションは、8細胞期に中心体によるものからギャップ結合によるものへと変わる。ギャップ結合による細胞間コミュニケーションはコンパクションに先立ち開始する (Goodall and Johnson, 1982)。ギャップ結合による細胞間コミュニケーションは割球の平坦化とは無関係である (Goodall, 1986, Kidder, et al., 1987) が、コンパクションの形態維持と胚盤胞形成に必要である (Buehr, et al., 1987, Lee, et al., 1987)。本実験では、ギャップ結合形成の遅れはコンパクションの遅れと一致したことから、コンパクションにはギャップ結合形成が関与していると考えられた。また、ギャップ結合形成の遅延は、4細胞期の前期から中期および後期まで割球間接着を遮断したときに見られたことから、この時期の割球間接着がギャップ結合形成時期に関与していると考えられた。マウス胚では、8細胞期中期まで割球間接着は比較的小さく (Lehtonen, 1980)、細胞分裂のなごりの中心体からなる中心体チャンネルにより2つの娘細胞は連絡している (Goodall and Johnson, 1984, Soltynska, 1982, Kidder, et al., 1988)。本研究では、4細胞期胚の割球分離により中心体チャンネルを破壊し、その直後に再集合すれば、

その後の発生やコンパクションの見られる時期に差は見られなかった。したがって、4細胞期胚の中心体チャンネルは発生やコンパクションにはそれほど重要ではなく、割球間接着によってギャップ結合形成やコンパクションを調節する他の因子の存在が考えられた。

マウスでは、2細胞期に胚ゲノムの活性化が起こり (Flach, et al., 1982, Piko and Clegg, 1982)、同時期に Cx43 の転写が開始する (Schultz, 1986)。また、タンパク質の合成は、4細胞期には開始している (Valdimarsson, et al., 1991, De Sousa, et al., 1993)。合成された Cx43 は、細胞内輸送によって細胞膜に運搬され、ギャップ結合を形成し、機能する (De Sousa, et al., 1993, Kidder, 1992)。本研究では、4細胞期前期から中期まで割球間接着が無い場合、ギャップ結合の形成が遅れた。ギャップ結合の形成の遅れが、Cx43 の転写、合成、細胞内輸送のどの過程に因るものであるかは明らかではない。本研究の結果から、ギャップ結合の形成時期は、特に4細胞期前期の割球間接着の有無により影響を受けることが明らかとなった。

第4節 要約

マウス4細胞期胚の割球間接着がコンパクションにとって必要であることを、初期4細胞期胚を割球分離し、0, 4, 8時間後に再集合した胚を用いて検討した。その結果、4および8時間後に再集合した胚で、コンパクションに2時間の遅れがみられた。そこで、コンパクションの遅れの原因を明らかにするために、走査電子顕微鏡による割球表面の微絨毛の分布の観察と、Cx43抗体を用いた間接蛍光抗体染色法によりギャップ結合の検出を行ったところ、微絨毛の分布に差は認められなかったが、ギャップ結合の形成は4および8時間後に再集合した胚で2時間の遅延がみられた。これらの結果が

ら、コンパクションにギャップ結合の形成が関与していると考えられた。また、ギャップ結合の形成時期は、4細胞期前期の割球間接着の有無により影響を受けることが明らかとなった。

第4章 ギャップ結合タンパク質の細胞内輸送開始時期の検討

第1節 緒言

細胞膜タンパク質はリボソームで合成された後、粗面小胞体に移行する。その後、ゴルジ体のシス部層板に輸送され、中間部、トランス部を経てトランスゴルジ網様体に到達し、トランスゴルジ網様体から細胞膜へ輸送される。このようなタンパク質の一連の移動を細胞内輸送と呼んでいる。

コンパクションに必要な膜タンパク質をコードする遺伝子の転写は4細胞期中期に完了しており (Kidder and McLachlin, 1985, McLachlin and Kidder, 1986, Levy, et al., 1986)、タンパク質の合成は4細胞期後期に開始する (Valdimarsson, et al., 1991, Softon, et al., 1992)。膜タンパク質が細胞膜で機能を発現するまでには、タンパク質合成後1細胞周期以上の時間間隔がある。この膜タンパク質の合成から機能発現までの時間差の原因の一つとして、タンパク質の細胞内輸送の存在が挙げられる。

ブレフェルジンA (以下 BFA) は糸状菌などが産生するマクロライド系抗生物質で、タンパク質の細胞内輸送阻害剤の1つとして知られている。BFAは、粗面小胞体からゴルジ体へのタンパク質の輸送を阻害する (Klausner, et al., 1992)。また、BFAの存在下では、ゴルジ体のシス部、中間部、トランス部が粗面小胞体と融合し (Lippincott-Schwartz, et al., 1991, Chege and Pfeffer, 1990, Reaves and Banting, 1992, Wood, et al., 1991)、トランスゴルジ網様体が初期エンドソームと融合する (Wood, et al., 1991)。マウス初期胚へのBFAの影響について、De Sousaら (1993) は8細胞期胚の細胞分裂やコンパクションを阻害することを報告している。特に、BFAによる細胞分裂の阻害は、その後の発生をも阻害することが考えられる。

本章では、Cx43 の細胞内輸送開始時期を解明することを最終目的とする。BFA を用いて細胞内輸送開始時期を解明するに先立ち、BFA がマウス初期胚の細胞分裂に影響を及ぼさない培養条件 (特に培養時間) を確立し、その後の発生に影響を及ぼすかどうかを 4 細胞期胚を用いて調べた。また、得られた培養条件をもとに、BFA によるタンパク質の細胞内輸送の阻害時期とコンパクションの阻害との関連性を明らかにするとともに、コンパクションに及ぼす影響について、4 および 8 細胞期胚を用いて調べた。

第 2 節 4 細胞期以降の胚発生に及ぼす BFA の影響

本節では、BFA がマウス初期胚の細胞分裂およびその後の発生に及ぼす影響を、4 細胞期胚を用いて調べた。

1. 材料および方法

1) 供試胚

2 細胞期胚を採取し、BWW 培養液で培養した。1 時間毎に 4 細胞期への細胞分裂の確認を顕微鏡観察により行い、4 細胞期胚への細胞分裂が認められた胚を分裂 0 時間後の胚と定義し、実験に供した。

2) BFA 添加培養液

BFA (Sigma) 10 mg を 1 ml のメタノールで溶解し、 -20°C で保存した。胚の培養には、最終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ になるように BFA を BWW 培養液に添加した。胚を BFA 添加培養液で培養 (以下 BFA 処理) する際、BFA の阻害効果の低下を防ぐために、4~5 時間毎に胚を新しい BFA 添加培養液に移し替え

た。

3) BFA 添加培養液での培養

実験 1: 4 細胞期胚への分裂後の BFA 処理開始時期がその後の細胞分裂に及ぼす影響

4 細胞期胚への分裂 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8 時間後に胚を BFA 添加 BWB 培養液で培養を開始し、8 細胞期胚への細胞分裂について 1 時間毎に観察した。

実験 2: 4 細胞期胚への分裂後の 6 時間の BFA 処理がその後の細胞分裂に及ぼす影響

4 細胞期への分裂 0 時間後から、あるいは 6 時間後から 6 時間 BFA 処理し (以下それぞれ、4 細胞期胚への分裂 0 時間後 BFA 処理区、分裂 6 時間後 BFA 処理区とした)、8 細胞期胚への細胞分裂について 1 時間毎に観察した。同濃度 (0.05%) のメタノールを添加した BWB 培養液で培養したものを、対照区とした。

4) 核の染色

割球内の核の位置を確認するために、ヘキストを用いてクロマチンを染色した。5 mg/ml の Hoechst dye 33342 (Polyscience Inc.) を含む 4 mg/ml BSA 添加 M2 培養液に、37°C、30 分間浸漬した。Hoechst 蛍光観察には、V 励起用ダイクロイックミラーユニットを装着した落射蛍光装置 (オリンパス) を使用した。

5) 走査電子顕微鏡による BFA 処理胚の微絨毛分布の観察

BFA 処理胚の割球表面における微絨毛の分布を、走査電子顕微鏡で観察し

た。試料の作成は、第 2 章の方法に従った。

2. 結果

1) BFA 処理開始時期ならびに処理時間が 4 細胞期胚の細胞分裂に及ぼす影響

BFA 処理開始時期がその後の細胞分裂に及ぼす影響 (実験 1)

4 細胞期胚への分裂後、1 時間毎に遅らせて BFA 処理を開始した胚の、8 細胞期胚への細胞分裂のみられた胚の割合を表 4.1 に示した。対照区において、8 細胞期胚への細胞分裂は、4 細胞期胚への分裂 8~14 時間後に見られた。しかし、4 細胞期胚への分裂 6 時間後までに BFA 処理を開始した時、8 細胞期胚へ分裂した胚の割合は有意に低下し ($p < 0.01$)、約半数以上の胚で分裂が阻害された。細胞分裂を阻害された胚の中には、2 および 3 割球からなる胚が観察され、核染色像からそれらの割球は 2 つ以上の核を有していた (図 4.1)。以上の結果より、BFA 処理時間が長くなるにつれ、細胞分裂が阻害されることが明らかとなった。

表 4.1 4 細胞期胚への分裂後の BFA 処理開始時期が
その後の細胞分裂に及ぼす影響

BFA 処理 ^a 開始時期	供試 胚数	8 細胞期胚への細胞分裂の認められた胚の割合 (%)					
		4 細胞期胚への分裂後の時間					
		10	11	12	13	14	15
対照区	75	37.3	66.7	80.0	86.7	89.3	89.3
0 時間	61	8.2 ^b	13.1 ^b	14.8 ^b	16.4 ^b	16.4 ^b	16.4 ^b
2 時間	64	10.9 ^b	17.2 ^b	23.4 ^b	25.0 ^b	25.0 ^b	25.0 ^b
3 時間	63	20.6	38.1 ^b	39.7 ^b	42.9 ^b	42.9 ^b	42.9 ^b
4 時間	60	35.0	51.7	56.7 ^b	56.7 ^b	56.7 ^b	56.7 ^b
5 時間	72	31.9	51.4	55.5 ^b	56.9 ^b	56.9 ^b	56.9 ^b
6 時間	83	38.6	69.9	83.1	85.5	85.5	85.5
7 時間	83	56.6	80.7	90.4	94.0	94.0	94.0
8 時間	43	32.6	86.0	97.7 ^b	100.0 ^b	-	-

^a4 細胞期胚への分裂後の時間

^b対照区との間に有意差あり (p<0.01)

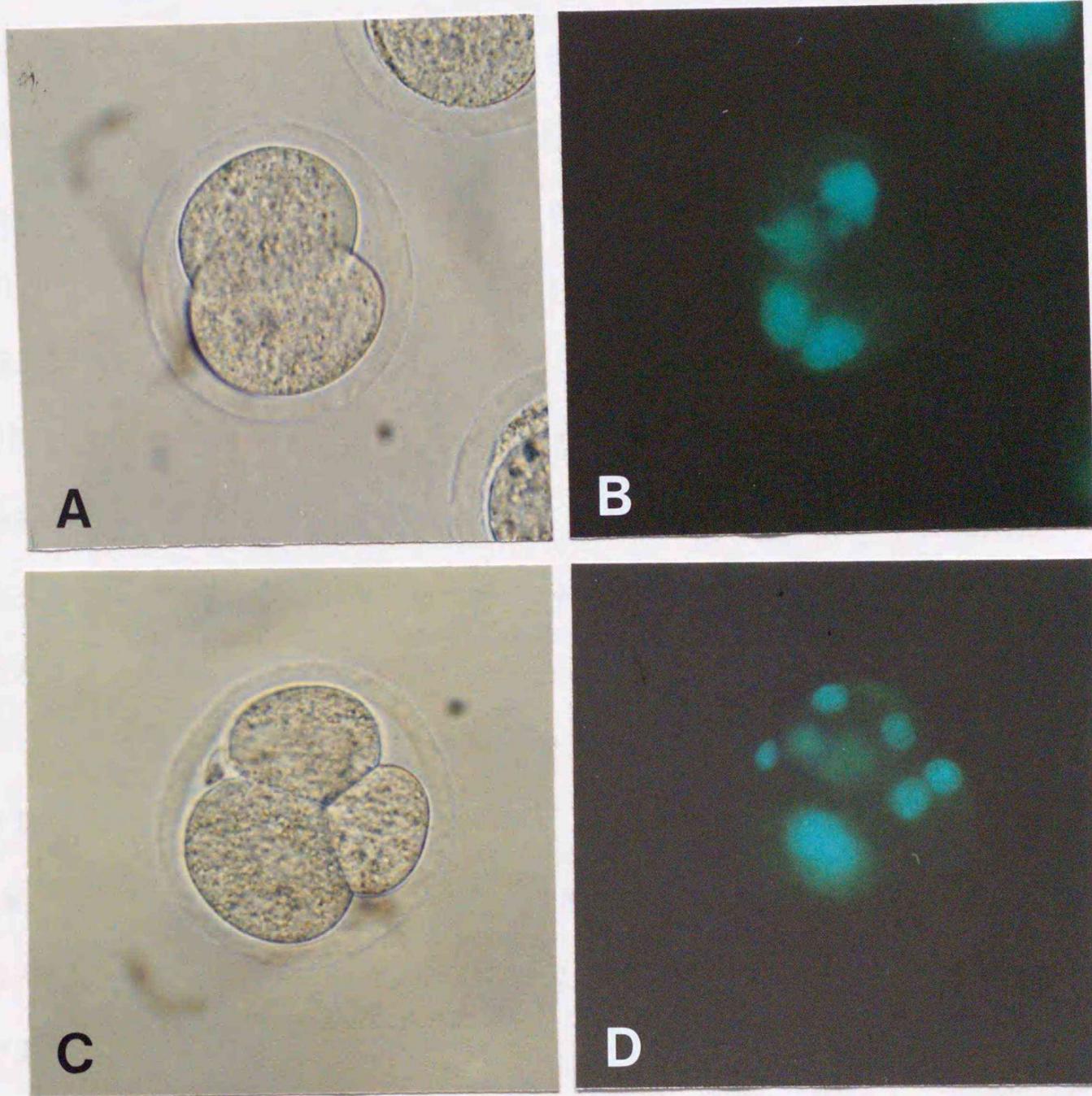


図 4.1 15 時間 BFA 処理でみられた 2 および 3 細胞胚

(A), (B) 2細胞胚、(C), (D) 3 細胞胚

(A), (C) 位相差顕微鏡像、(B), (D) Hoechst dye 33342 蛍光像

× 400

6 時間の BFA 処理がその後の細胞分裂に及ぼす影響 (実験 2)

4 細胞期胚への分裂 0 時間後ないし、6 時間後から BFA 処理時間を 6 時間に限定したとき、8 細胞期胚へ細胞分裂した胚の割合を表 4.2 に示した。実験 1 では分裂 0 時間後から 6 時間後までに BFA 処理を開始することにより 8 細胞期胚への細胞分裂が著しく阻害されたが、分裂 0 時間後から BFA 処理時間を 6 時間に限定した場合、8 細胞期胚への細胞分裂に差が認められなかった。一方、4 細胞期胚への分裂 6 時間後 BFA 処理区では、8 細胞期胚への細胞分裂は遅れ、その割合は低下したが、分裂 15 時間後ではその割合は 83.5% と比較的高率であった。

対照区、BFA 処理区ともに 4 細胞期胚への分裂 32~40 時間後に腔形成がみられた (図 4.2)。以上の結果から、6 時間の BFA 処理は 8 細胞期胚への細胞分裂を遅らせたが、その後の細胞分裂能および発生能が正常に回復したことが明らかとなった。

2) BFA が胚の形態に及ぼす影響

4 細胞期胚への分裂 0 時間後から 15 時間 BFA 処理を行った胚の各割球の形は不均一であり、割球間の境界は不明瞭であった。また、微絨毛の分布は疎であった (図 4.3)。

表 4.2 6 時間 BFA 処理が 4 細胞期胚の細胞分裂に及ぼす影響

BFA 処理 ^a 開始時期	供試 胚数	8 細胞期胚への細胞分裂の認められた胚の割合 (%)					
		4 細胞期胚への分裂後の時間					
		10	11	12	13	14	15
対照区	72	43.1	62.5	83.3	94.4	95.8	97.2
0 時間	67	50.7	74.6	95.5	98.5	100.0	100.0
6 時間	103	36.9	64.1	74.8	77.7 ^b	80.6 ^b	83.5 ^b

^a4 細胞期胚への分裂後の時間

^b対照区との間に有意差あり (p<0.01)

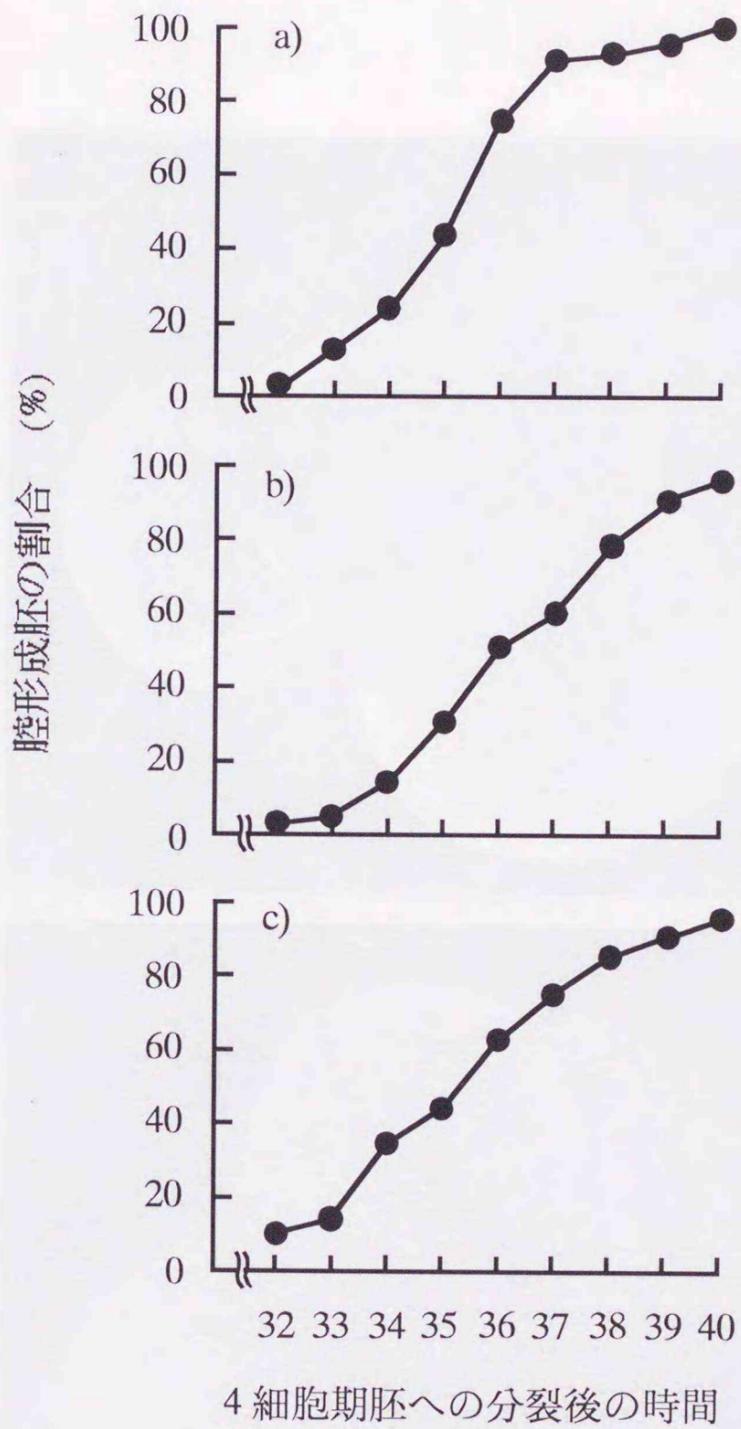


図 4.2 6 時間 BFA 処理時期の違いが腔形成に及ぼす影響
 a) 対照区 (胚数= 56)
 b) 4 細胞期胚への分裂 0 時間後 BFA 処理区 (胚数= 63)
 c) 4 細胞期胚への分裂 12 時間後 BFA 処理区 (胚数= 55)

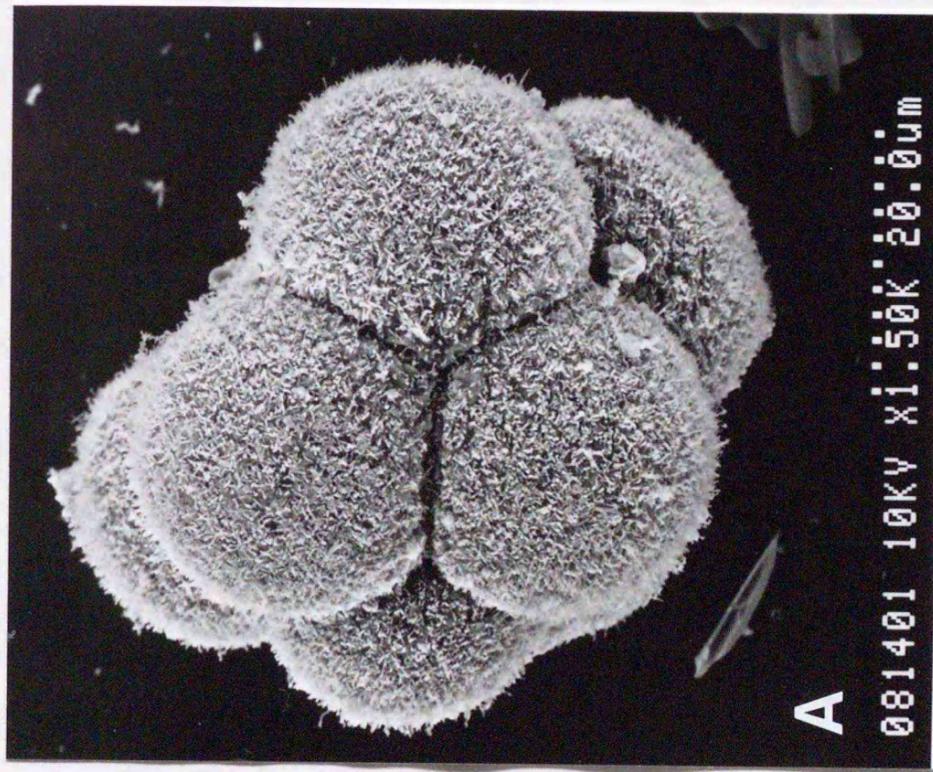


图 4.3 4 細胞期胚への分裂 15 時間後の胚の電子顕微鏡像

(A) BFA 無処理胚、(B) 15 時間 BFA 処理胚

第3節 BFA のコンパクションに及ぼす影響

本節では、4 および 8 細胞期胚を 3 ないし 6 時間 BFA 処理し、コンパクション胚の出現時期の遅れによって、コンパクションに必要な膜タンパク質の細胞内輸送開始時期を明らかにしようとした。また、細胞膜と細胞質の極性を調べることにより、BFA 処理がコンパクション阻害に及ぼす影響も明らかにすることを目的とする。

1. 材料および方法

1) BFA 処理

実験 1: 4 細胞期胚への分裂後の BFA 処理がコンパクションに及ぼす
処理時期の違いの影響

4 細胞期胚への分裂 6 時間後、12 時間後、あるいは 18 時間後から 6 時間 BFA 処理し (以下それぞれ、4 細胞期胚への分裂 6 時間後 BFA 処理区、分裂 12 時間後 BFA 処理区、分裂 18 時間後 BFA 処理区とした)、コンパクションについて 1 時間毎に観察した。

実験 2: 8 細胞期胚への分裂後の BFA 処理がコンパクションに及ぼす
処理時期の違いの影響

8 細胞期胚への分裂 0 時間後、3 時間後、あるいは 6 時間後から 3 時間 BFA 処理し (以下それぞれ、8 細胞期胚への分裂 0 時間後 BFA 処理区、分裂 3 時間後 BFA 処理区、分裂 6 時間後 BFA 処理区とした)、コンパクションについて 1 時間毎に観察した。

2) 細胞の極性の観察

細胞の極性について、細胞膜および細胞質の極性を観察した。細胞膜の極性を調べるために、ローダミン標識コンカナバリン A (Rh-ConA) の蛍光分布、走査電子顕微鏡による微絨毛の分布を観察した。一方、細胞質の極性を調べるためにクラスリンの蛍光分布を観察した。

8 細胞期胚への分裂 6 時間後の胚を 3 時間 BFA 処理後、透明帯を除去し、25 μ g/ml の Rh-ConA を含む 0.2 mg/ml アジ化ナトリウムおよび 4 mg/ml BSA 添加 M2 培養液に、5 分間室温に保持して細胞膜を標識し、クラスリン抗体を用いた間接蛍光抗体染色 (第 2 章参照) を行った。なお、一次抗体として抗クラスリンモノクローナル抗体 (Progen) 100 mg を 1 ml のミリ Q 水で溶解し、ブロッキング溶液でさらに 10 倍に希釈して用いた。また、二次抗体は FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (Tago) を PBS で 500 倍に希釈して用いた。蛍光の観察には共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-400, Carl Zeiss) を使用した。

走査電子顕微鏡での観察のための試料作成は、第 2 章の方法に従った。

2. 結果

1) 4 細胞期胚への分裂後の BFA 処理がコンパクションに及ぼす

処理時期の違いの影響 (実験 1)

4 細胞期胚への分裂後の時期を変えて、6 時間 BFA 処理した胚のコンパクション胚の割合を図 4.4 に示した。分裂 12 時間後 BFA 処理区および 18 時間後 BFA 処理区において、分裂 23~25 時間後までコンパクション胚の割合が低く推移し、コンパクションの遅延が認められた。また、コンパクション胚が BFA 処理されたとき、脱コンパクション化がみられた。以上のことか

ら、コンパクションに必要な膜タンパク質の細胞内輸送開始時期は、8細胞期胚への分裂後であると推測された。

2) 8細胞期胚への分裂後の BFA 処理がコンパクションに及ぼす

処理時期の違いの影響 (実験 2)

実験 1 の結果から BFA がコンパクションに影響を及ぼす時期は 8細胞期であると思われたことから、8細胞期胚を処理時期を変えて 3時間 BFA 処理することによるコンパクションへの影響を調べた。各処理区のコンパクション胚の割合を図 4.5 に示した。5 $\mu\text{g/ml}$ の BFA 濃度ではコンパクションを阻害できなかったため、3時間 BFA 処理の濃度は、10 $\mu\text{g/ml}$ とした。コンパクション胚の出現様相について、分裂 0 時間処理区と対照区との間で大きな差はなかった。8細胞期胚への分裂 3 時間後 BFA 処理区、6 時間後 BFA 処理区において、分裂 11 時間後までコンパクション胚の増加はみられず、コンパクションの遅延が認められた。また、8細胞期胚への分裂 6 時間後 BFA 処理区では、すでにコンパクションした胚の脱コンパクション化がみられた。以上の結果から、コンパクションに必要な膜タンパク質の細胞内輸送開始時期は、8細胞期胚への分裂 3 時間後、すなわち 8細胞期中期であることが明らかとなった。

3) BFA が細胞の極性に及ぼす影響

8細胞期胚の細胞膜上の Rh-ConA の蛍光分布を図 4.6 に示した。BFA 無処理胚では割球間接触のない頂端部の細胞膜に均一な蛍光の分布がみられた (図 4.6A) のに対し、BFA 処理胚では割球間接触部の細胞膜にも蛍光の分布がみられた (図 4.6B)。また、BFA 処理胚の頂端部での蛍光強度は BFA 無処理胚のものと比較して弱いものであった。

走査電子顕微鏡による微絨毛の分布を図 4.7 に示した。微絨毛の分布は BFA 処理胚、無処理胚ともに割球の表面に均一にみられたが、微絨毛の密度は BFA 処理胚で疎であった。以上から、頂端部での Rh-ConA の蛍光強度と微絨毛の密度は一致した。

クラスリンの蛍光分布を図 4.8 に示した。割球の頂端部の細胞質に蛍光が分布していたことから、クラスリンがこの部分に局在していることが明らかとなった。このような蛍光分布に、BFA 処理胚と無処理胚との間で差はみられなかった。

第4節 Cx43 の細胞内輸送開始時期の検討

第 3 節において、コンパクションに必要なタンパク質の細胞内輸送開始時期は 8 細胞期中期であることが明らかとなった。そこで、この結果をもとに Cx43 の細胞内輸送開始時期について、8 細胞期胚を 3 時間 BFA 処理し、Cx43 抗体を用いた免疫組織学的手法でギャップ結合を検出することにより検討した。

1. 材料および方法

8 細胞期胚への分裂 3 時間後 BFA 処理区、6 時間後 BFA 処理区の胚について、ギャップ結合数を経時的に調べた。間接蛍光抗体染色法によりギャップ結合を検出した胚を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて Z 軸方向に 20 等分に切断し、それぞれの切断面における蛍光スポットを加算して、胚 1 個当りのギャップ結合数の概数を算出した。検出できた蛍光スポットの数から、胚をランク付けした。蛍光スポットのみられなかった胚をランク A (図 4.9A)、

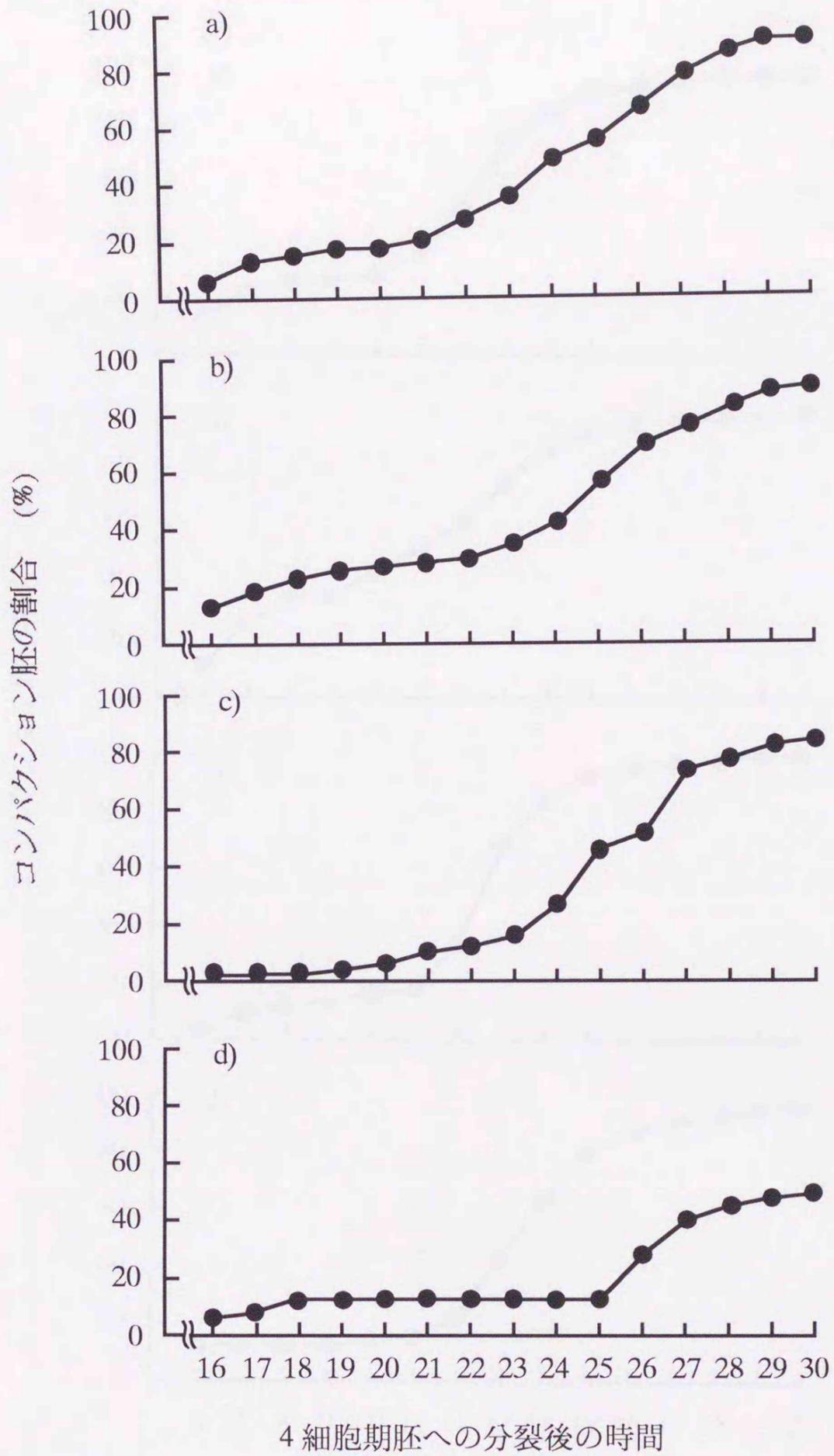


図 4.4 6 時間 BFA 処理時期の違いがコンパクト胚に及ぼす影響
 a) 对照区 (胚数= 48)
 b) 4 細胞期胚への分裂 6 時間後 BFA 処理区 (胚数= 103)
 c) 4 細胞期胚への分裂 12 時間後 BFA 処理区 (胚数= 79)
 d) 4 細胞期胚への分裂 18 時間後 BFA 処理区 (胚数= 80)

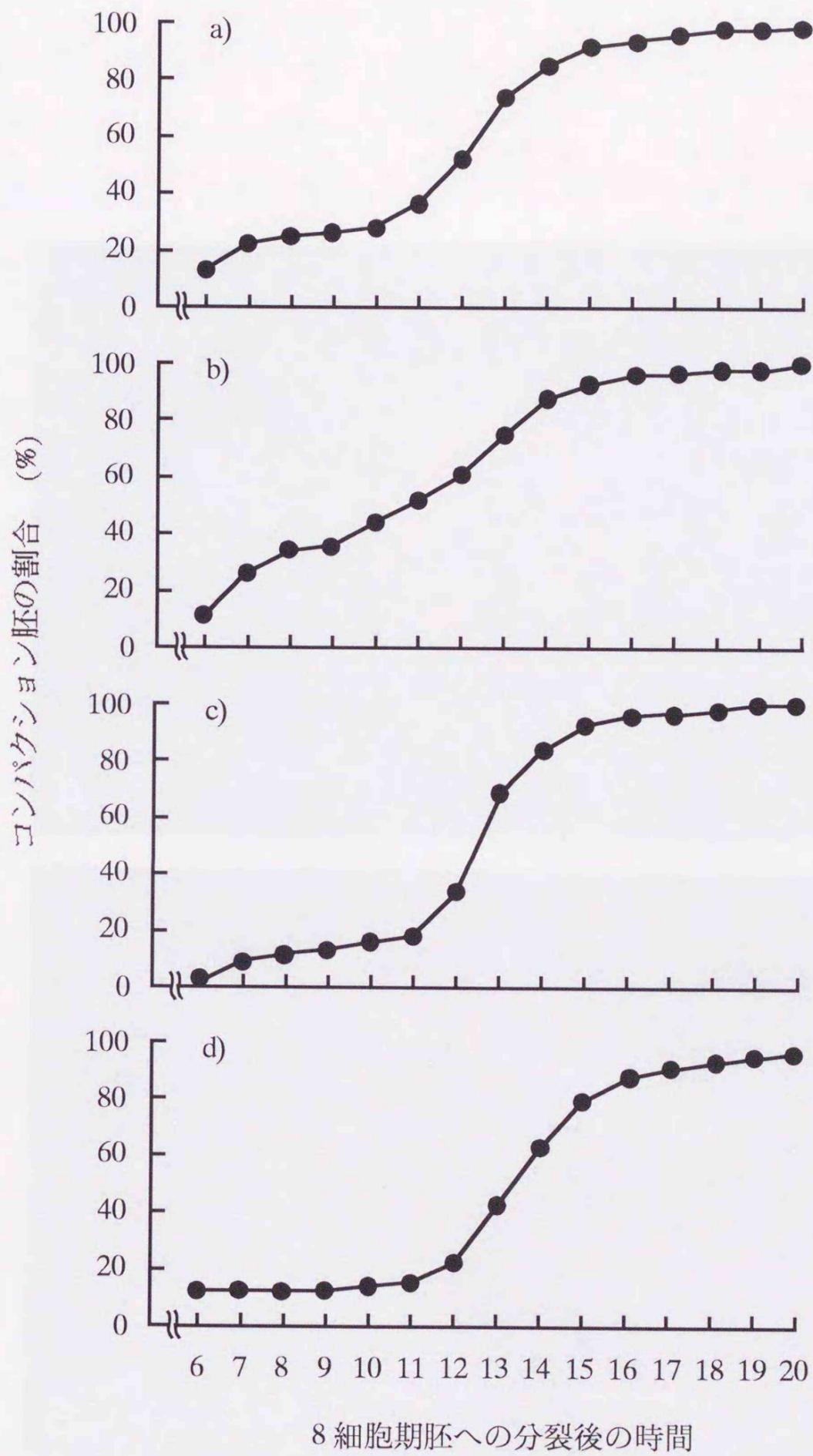


図 4.5 3 時間 BFA 処理時期の違いがコンパクト胚に及ぼす影響
 a) 对照区 (胚数=90)
 b) 8 細胞期胚への分裂 0 時間後 BFA 処理区 (胚数=78)
 c) 8 細胞期胚への分裂 3 時間後 BFA 処理区 (胚数=80)
 d) 8 細胞期胚への分裂 6 時間後 BFA 処理区 (胚数=103)

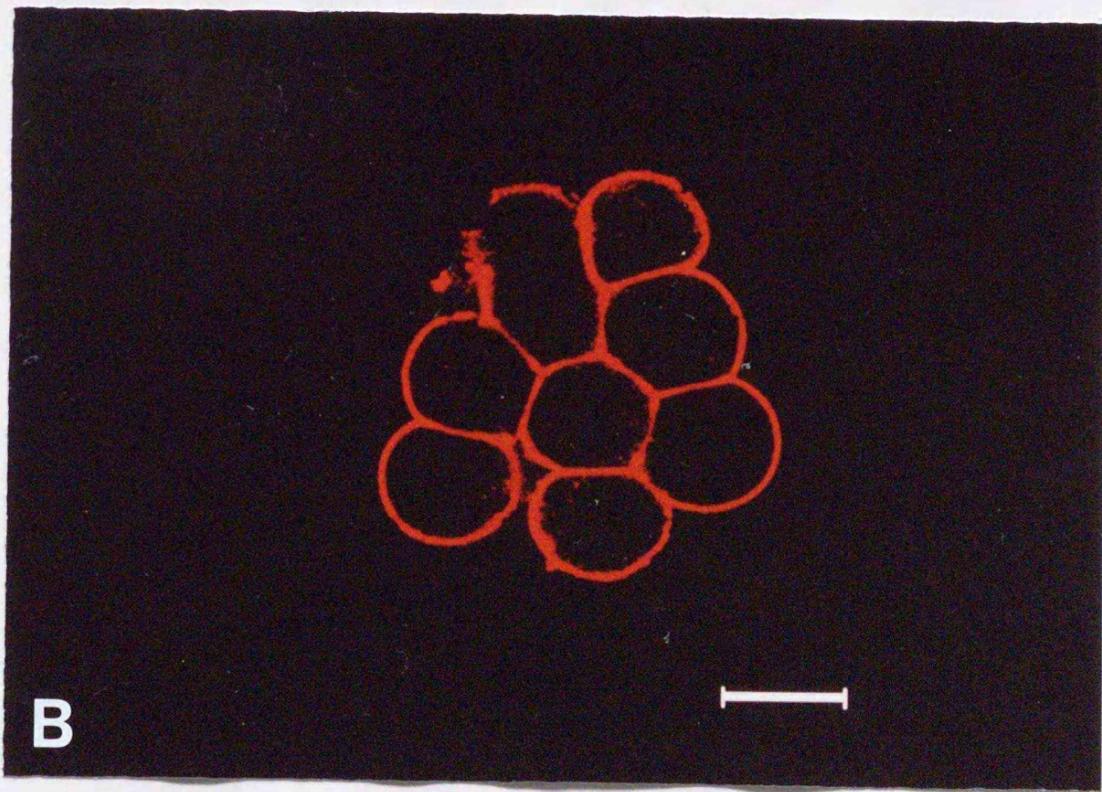
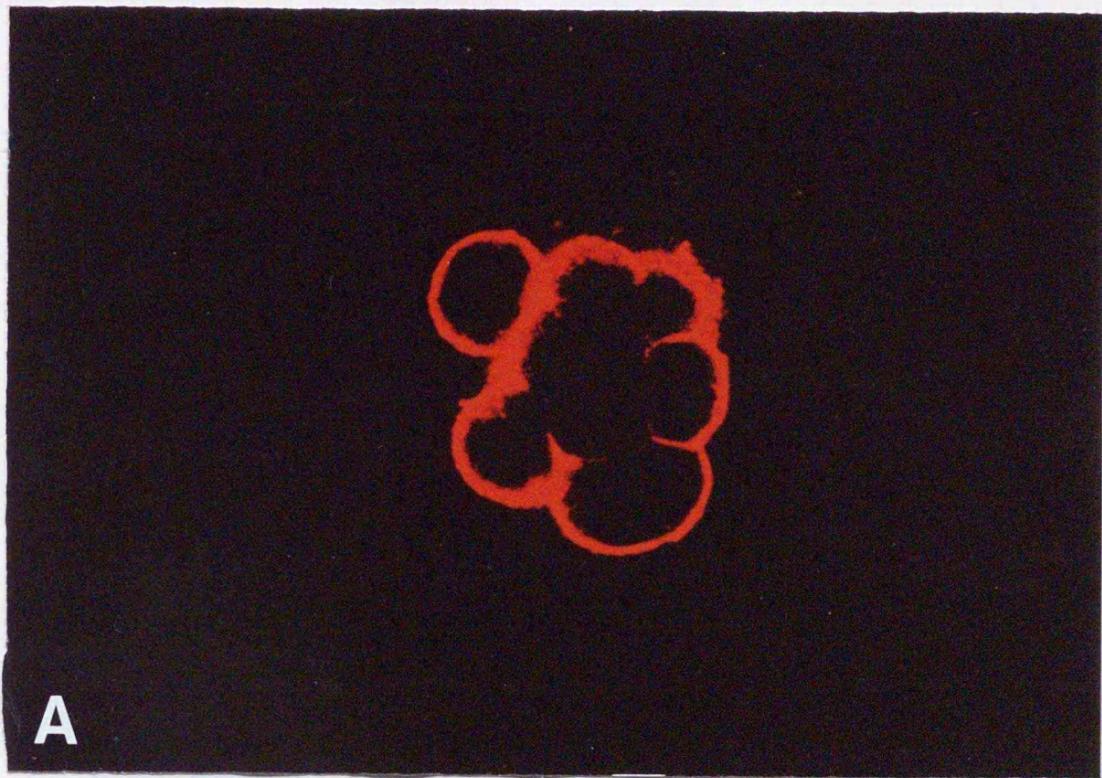


図 4.6 Rh-ConA の蛍光染色像
(A) BFA 無処理胚、(B) BFA 処理胚
Bar = 25 μ m

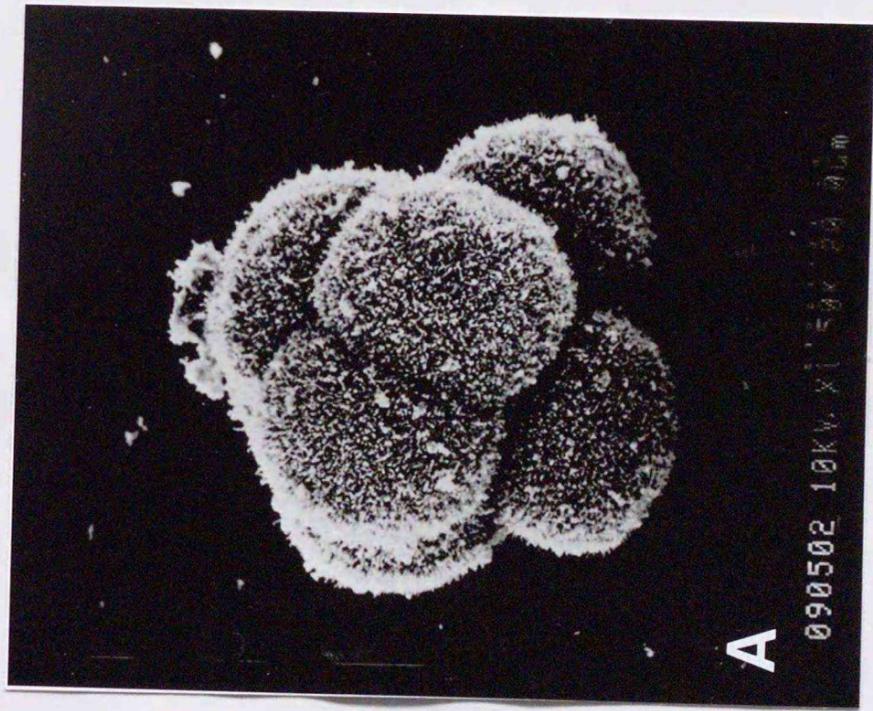


図4.7 3時間BFA処理後の胚の電子顕微鏡像

(A) BFA無処理胚、(B) BFA処理胚

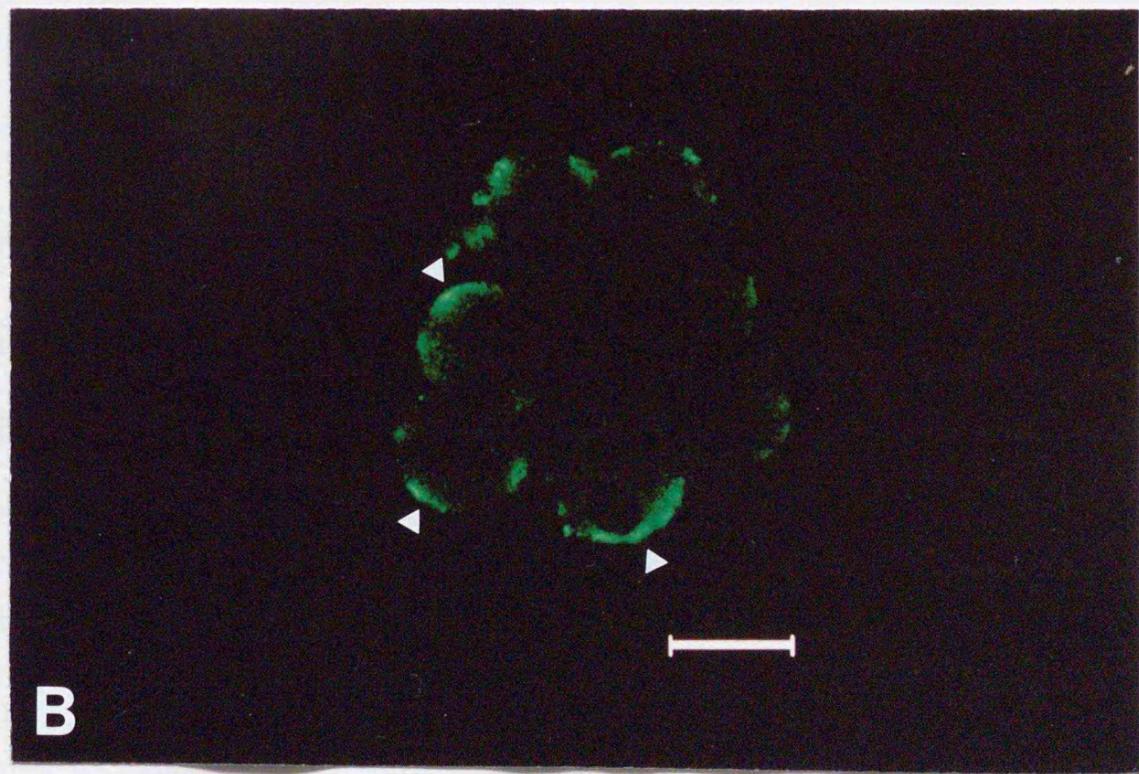
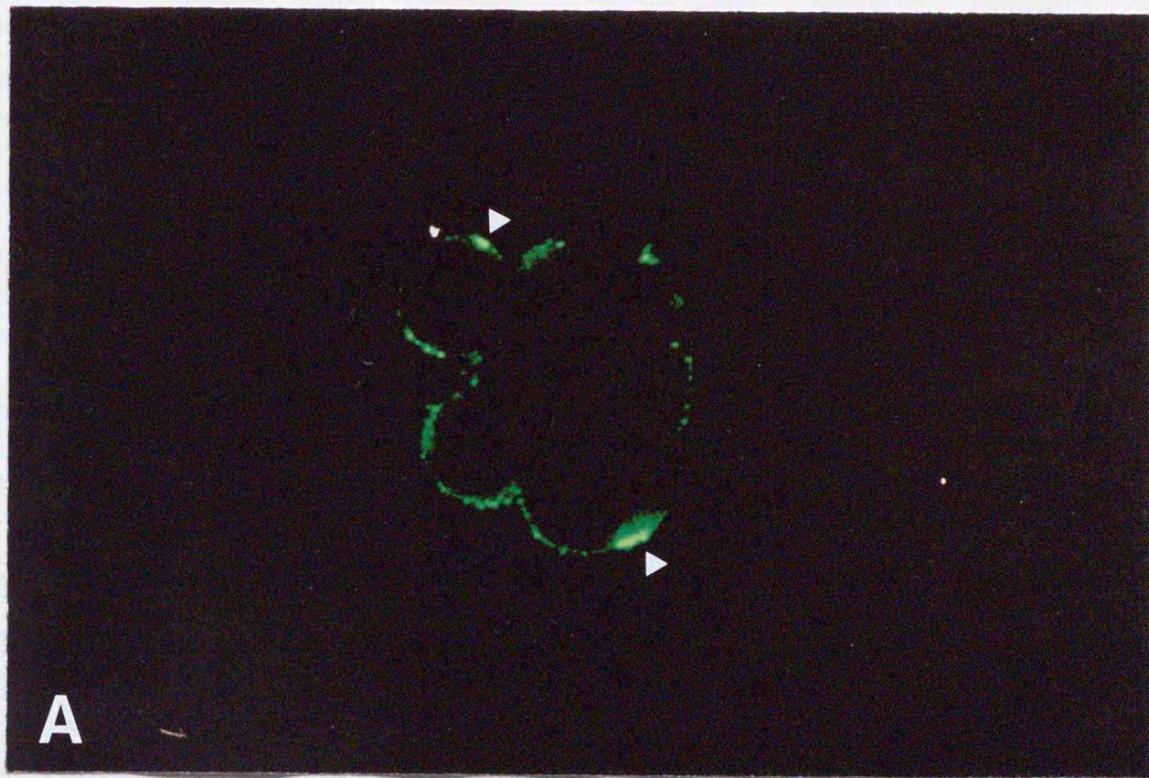


図 4.8 抗クラスリン抗体による蛍光染色像
(A) BFA 無処理胚、(B) BFA 処理胚
三角印はクラスリンの局在部位を示す
Bar = 25 μ m

蛍光スポットが 1~5 個みられた胚をランク B (図 4.9B)、6~10 個みられた胚をランク C (図 4.9C)、11~15 個みられた胚をランク D (図 4.9D)、16 個以上みられた胚をランク E (図 4.9E)とした。

2. 結果

ギャップ結合が検出できた胚の割合を表 4.3 に示した。対照区では 8 細胞期胚への分裂 6~15 時間後の間にギャップ結合が検出できた胚の割合は増加したのに対し、8 細胞期胚への分裂 3 時間後 BFA 処理区では分裂 12 時間後に低下した。また、8 細胞期胚への分裂 6 時間後 BFA 処理区では、分裂 9 時間後にはほとんどの胚でギャップ結合は検出できなかった。

胚 1 個当りの平均ギャップ結合数を表 4.4 に示した。対照区では平均ギャップ結合数は 8 細胞期胚への分裂 6~15 時間後の間に増加したのに対し、8 細胞期胚への分裂 3 時間後 BFA 処理区では分裂 12 時間後に減少した。また、8 細胞期胚への分裂 6 時間後 BFA 処理区では、分裂 9, 12 時間後には平均ギャップ結合数は 1 個以下であったが、分裂 15 時間後には 8 細胞期胚への分裂 3 時間後 BFA 処理区とほぼ同数であった。

ギャップ結合数による胚のランク別割合の経時的変化を図 4.10 に示した。BFA 無処理区においてギャップ結合の検出できた胚のランクは、8 細胞期胚への分裂 6 時間後ではランク A, B のみであったが、分裂 15 時間後では 57.9% (8/19) がランク D 以上であった。8 細胞期胚への分裂 3 時間後 BFA 処理区では、分裂 15 時間後ですべてのランクの胚がみられたが、ランク A, B (それぞれ 28.6% (6/21)) のものが多かった。8 細胞期胚への分裂 6 時間後 BFA 処理区において分裂 12 時間後まではランク B の胚しかみられず、分裂 15 時間後でもランク B の割合が半数 (52.0% (13/25)) を占めた。

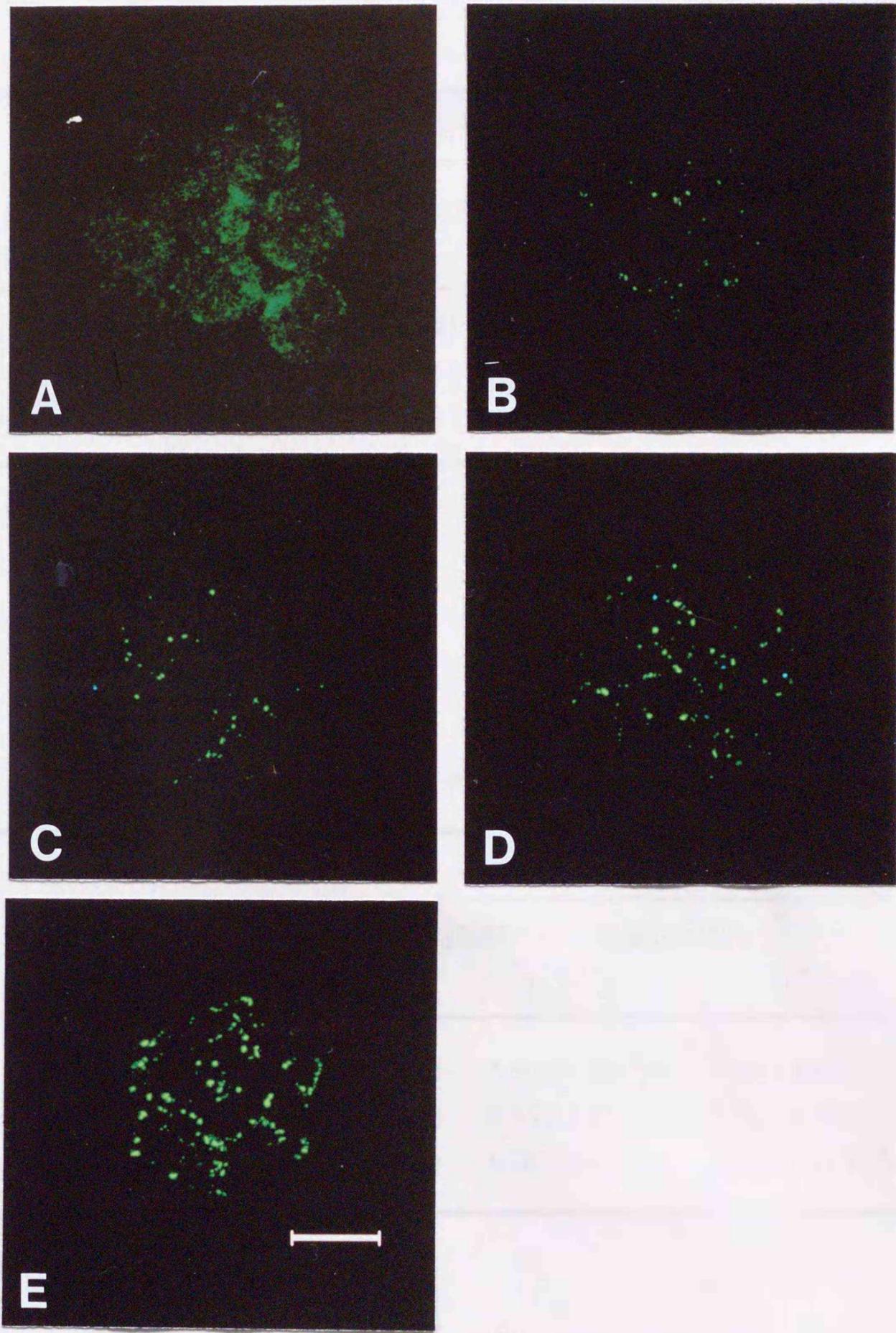


図 4.9 ギャップ結合数による胚のランク付け
 (A) ランク A、(B) ランク B、(C) ランク C、
 (D) ランク D、(E) ランク E
 Bar = 25 μ m

表 4.3 ギャップ結合が検出できた胚の割合

BFA 処理 ^a	ギャップ結合が検出できた胚数 / 供試胚数 (%)			
	検出時期 (8 細胞期胚への分裂後の時間)			
	開始時期	6	9	12
対照区	5/21 (23.8%)	7/16 (43.8%)	14/18 (77.8%)	16/19 (84.2%)
3 時間	6/14 (42.9%)	5/13 (38.5%)	7/22 (31.8%)	15/21 (71.4%)
6 時間	-	1/11 (9.4%)	9/9 (50.0%)	21/25 (84.0%)

^a8 細胞期胚への分裂後 (時間)

表 4.4 胚 1 個当りの平均ギャップ結合数

BFA 処理 ^a	胚 1 個当りの平均ギャップ結合数 (平均値 ± 標準誤差)			
	検出時期 (8 細胞期胚への分裂後の時間)			
	開始時期	6	9	12
対照区	0.29 ± 0.13 (21)	2.00 ± 0.71 (16)	5.50 ± 1.21 (18)	8.95 ± 1.49 (19)
3 時間	1.71 ± 0.83 (14)	2.38 ± 1.48 (13)	0.86 ± 0.45 (22)	5.81 ± 1.36 (21)
6 時間	-	0.09 ± 0.10 (11)	0.78 ± 0.27 (18)	5.00 ± 1.11 (25)

^a8 細胞期胚への分裂後 (時間)

() 内の数字は供試胚数を示す

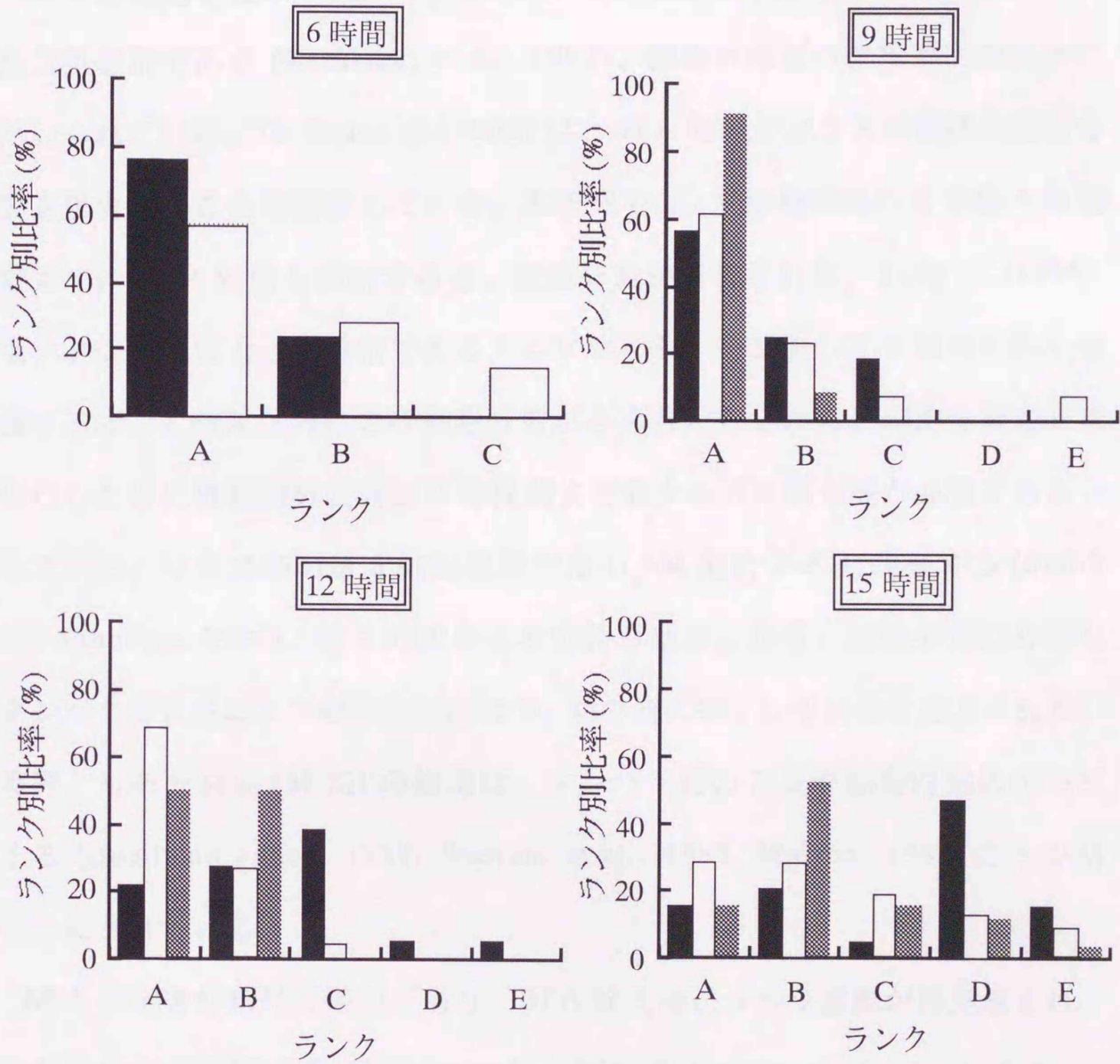


図 4.10 ギャップ結合数による胚のランク別比率の経時的変化
 ■ : 対照区
 □ : 8細胞期胚への分裂3時間後BFA処理区
 ■ (点線) : 8細胞期胚への分裂6時間後BFA処理区
 □ (数字) : 内の数字は8細胞期胚への分裂後の時間を示す

第 5 節 考察

BFA は粗面小胞体からゴルジ体への小胞輸送を阻害するタンパク質細胞内輸送阻害剤であり (Klausner, et al., 1992)、細胞内輸送の機構解明のために用いられている。De Sousa ら (1993) は、BFA 処理がマウス初期胚の細胞分裂を阻害することを報告している。本研究では、4 細胞期胚への分裂 6 時間後までに BFA 処理を開始すると、細胞分裂が阻害された。Levy ら (1986) は、タンパク質合成阻害剤であるアニソマイシンを添加して 4 細胞期胚を培養すると、2 時間以内にのみ細胞分裂がみられたことから、細胞分裂を正常に行うためには細胞分裂開始 2 時間前までのタンパク質合成が必要であるとしている。マウス胚の第 3 細胞周期では G_2+M 期に 2~5 時間要する (Smith and Johnson, 1986)。彼らの結果と本実験の結果とから、細胞分裂に必要なタンパク質合成および細胞内輸送は G_2 期の前に完了していると考えられた。実際、有糸分裂期 (M 期) の細胞は、タンパク質の合成や細胞内輸送が中断する (Buell and Fahey, 1969, Warren, et al., 1983, Warren, 1985) ことが明らかにされている。

BFA の阻害作用は可逆的であり、BFA 除去後、ゴルジ層板が再形成され、細胞内輸送が再開する (Doms, et al., 1989, Fujuwara, et al., 1988, Lippincott-Schwartz, et al., 1989, Lippincott-Schwartz, et al., 1990, Misumi, et al., 1986)。BFA 処理を 6 時間に限定したとき、ほとんど全ての胚がその 6 時間後に 8 細胞期胚に分裂した (表 4.2)。この結果は、BFA 除去後数時間でタンパク質の細胞内輸送が正常なレベルに回復したことを示している。

BFA はタンパク質の細胞内輸送だけでなく細胞分裂も阻害する。BFA により細胞分裂を阻害された胚の中には、細胞膜が融合したのがみられた。Zuzack と Tasca (1985) は、糖鎖である N-アセチル-D-グルコサミンに結合

するレクチン WGA が、透明帯のある 4 細胞期胚の細胞分裂を阻害し、2, 3 倍核がみられることを報告している。しかし、本研究でみられた 2 倍核は 4 細胞期胚の細胞膜が融合したことによるものである。細胞膜の融合については以下のように考えられる。タンパク質の細胞内輸送が阻害されることにより糖タンパク質のような細胞膜タンパク質の量が減少し、細胞膜の構造が不安定になり、最終的に細胞膜融合が生じたのではないかと推測された。

De sousa ら (1993) は、BFA がコンパクション胚の脱コンパクション化を引き起こすことを報告している。本研究においても、8 細胞期中期の胚を BFA 処理することにより、コンパクションの遅延や脱コンパクション化がみられた。しかし、クラスリンの分布には影響を及ぼさなかった。クラスリンは、細胞外物質を細胞膜上の受容体を介して細胞内に取り込む (エンドサイトーシス) 過程で細胞膜にみられるようになるタンパク質であり、細胞質に極性をもつ細胞でみられる。BFA がクラスリンの分布に影響を及ぼさなかった理由として、8 細胞期初期に細胞質の極性が起こる (Maro, et al., 1985) ため、本研究で行った BFA 処理の時期にはすでに細胞質の極性が生じていたため、と考えられた。また、BFA はエンドサイトーシスには影響を及ぼさない (Klausner, et al., 1992)。

一方、8 細胞期胚の細胞膜の極性は Rh-ConA の蛍光分布、微絨毛観察からは認められなかった。しかし、BFA 処理胚では、割球間接触部の細胞膜に Rh-ConA の蛍光がみられた。Clayton ら (1995) は、卵母細胞を BFA 処理することにより細胞膜でのウボモルリンの発現が阻害されると報告している。ウボモルリンは細胞接着分子であり、コンパクション胚の細胞間接着を強める役割を果たしている (Shirayoshi, et al., 1983, Johnson, et al., 1986)。本研究により得られた結果は、BFA 処理によりウボモルリンの細胞内輸送が阻害されたため細胞間接着が弱まり、割球間接触部の微絨毛に Rh-ConA が結

合しやすくなったことによるものと推測された。また、Rh-ConA の蛍光強度および微絨毛の密度が減少したことから、BFA 処理により細胞膜の構造が変化したと考えられた。以上のことから、BFA 処理による脱コンパクション化は、細胞内輸送の阻害により細胞接着分子が減少した結果、割球間の結合が弱くなり、割球が球状を呈したためと推測された。

本研究の結果より、Cx43 の細胞内輸送開始時期は 8 細胞期胚への分裂後 3 時間以内すなわち 8 細胞期初期であると推測され、De Sousa ら (1993) の結果と一致した。しかし、ギャップ結合の形成に及ぼす BFA の影響については異なる結果となった。彼らはコンパクションしていない 8 細胞期胚を 12 時間 BFA 処理することによりギャップ結合の形成が阻害されたが、コンパクションした 8 および 16 細胞期胚を 4 時間 BFA 処理することによりギャップ結合の形成は阻害されなかったことを報告している。本実験において、コンパクションしていない 8 細胞期胚を BFA 処理 (8 細胞期への分裂 3 時間後 BFA 処理区) した直後には、ギャップ結合形成は阻害されなかった。本結果と彼らの結果との違いは BFA 処理時間に因るものであり、3 時間の処理時間は Cx43 の細胞内輸送を完全に阻害するには短かかったことが考えられた。また、BFA 処理直後 (8 細胞期胚への分裂 6 時間後) にギャップ結合の形成が約半数の胚で見られたことから、これらの胚では BFA 処理を開始するまでに Cx43 がゴルジ体に輸送されていたため BFA による影響がなかったものと推測された。

本研究では、コンパクションがみられる時期の 8 細胞期胚を BFA 処理 (8 細胞期胚への分裂 6 時間後 BFA 処理区) することによりギャップ結合の形成は阻害された。De Sousa ら (1993) は BFA の最終濃度を $5 \mu\text{g/ml}$ で使用していたが、本研究では同濃度ではコンパクションに影響を及ぼさず (第 3 節参照)、 $10 \mu\text{g/ml}$ で使用したため阻害作用が強くなったことにより異なる

結果を生じさせた可能性がある。また、細胞分裂時にはギャップ結合が消失する (Goodall and Maro, 1986)。BFA 処理終了直後 (8 細胞期への分裂 9 時間後) にはすでに細胞分裂期に入っていたことにより、ギャップ結合の形成が観察されなくなったと考えられた。

BFA 処理によりコンパクションの遅延や脱コンパクション化がみられたにもかかわらずギャップ結合形成がみられたことから、コンパクションとギャップ結合形成とは独立した事象であると思われ、これまでの観察 (Goodall, 1986, Kidder, et al., 1987) と一致した。

第 6 節 要約

タンパク質の細胞内輸送阻害剤である BFA がマウス初期胚の細胞分裂に及ぼす影響について、4 細胞期胚を用いて調べた。4 細胞期胚への分裂 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8 時間後に BFA 処理を開始し、8 細胞期胚への分裂について観察した。4 細胞期胚への分裂 6 時間後までに BFA 処理を開始した場合、8 細胞期胚への細胞分裂は阻害された。しかし、BFA 処理時間を 6 時間に限定すれば、細胞分裂能は回復した。これらのことから、BFA 処理時間を限定することにより、胚の発生能を阻害することなくタンパク質の細胞内輸送機構解明に用いることができることが明らかとなった。

次に、コンパクションに必要な膜タンパク質の細胞内輸送開始時期を明らかにするために、4 および 8 細胞期胚を BFA 処理し、コンパクション胚の出現時期に及ぼす影響を調べた。その結果、8 細胞期胚への分裂 3 時間後に 3 時間 BFA 処理した胚でコンパクションの遅延がみられた。また、8 細胞期胚への分裂 6 時間後に 3 時間 BFA 処理した胚では、すでにコンパクションした胚の脱コンパクション化がみられた。これらの結果から、コンパクシ

ンに必要なタンパク質の細胞内輸送開始時期は 8 細胞期胚への分裂 3~6 時間後であることが明らかとなった。また、BFA 処理による脱コンパクション化の原因を追求するために、細胞質と細胞膜の極性について調べた。細胞質の極性についてクラスリンの分布を観察した結果、BFA 処理による影響はみられなかった。一方、細胞膜の極性について Rh-ConA の分布および微絨毛の分布を調べた結果、細胞膜の極性は認められなかった。しかし、BFA 処理胚で Rh-ConA の蛍光強度および微絨毛の密度が減少した。また、BFA 処理胚では割球間接触部にも Rh-ConA が分布しており、割球間接着が弱くなったと考えられた。以上の結果から、BFA 処理による脱コンパクション化は、細胞内輸送の阻害により細胞接着分子が減少した結果、割球間の結合が弱くなり、割球が球状を呈したためと推測された。

最後に、Cx43 の細胞内輸送開始時期を明らかにするために、第 2 節の結果をもとに 8 細胞期胚を 3 時間 BFA 処理し、ギャップ結合の形成に及ぼす影響を調べた。その結果、8 細胞期胚への分裂 3 時間後に 3 時間 BFA 処理した胚では、処理直後にはギャップ結合の形成への影響は認められなかったが、処理 6 時間後にギャップ結合の形成が低下した。また、8 細胞期胚への分裂 6 時間後に 3 時間 BFA 処理した胚では、処理直後にギャップ結合の形成が阻害された。これらの結果から、Cx43 の細胞内輸送開始時期は 8 細胞期胚への分裂後 3 時間以内すなわち 8 細胞期初期であることが明らかとなった。

第5章 ギャップ結合形成とCx43のリン酸化との 関連性の検討

第1節 緒言

ギャップ結合の形成にはCx43のリン酸化が必要であることが細胞株を用いた研究で報告されている (Musil and Goodenough, 1991)。しかし、マウス初期胚についての同様の研究はほとんど報告されていない。そこで、本研究ではマウス初期胚のギャップ結合形成過程においても同様の機構が存在するかをウエスタンブロット法により明らかにすることを目的とする。また、間接蛍光抗体染色法により検出したギャップ結合数とウエスタンブロット法により検出したリン酸化Cx43量から、ギャップ結合の出現とCx43のリン酸化との関連性を検討した。

第2節 ギャップ結合形成とCx43のリン酸化との関連性

1. 材料および方法

1) 胚の採集

体外培養により得られた、4細胞期胚への分裂6時間後、8細胞期胚への分裂0, 6, 9, 12, 15時間後、hCG投与96時間後の胚盤胞の合計7種類の胚を実験に供した。胚をPBI+BSAで3回洗浄後、0.3% (W/V) PVPを含むPBS (PBS+PVP) で5回洗浄した。洗浄後、35 μ l のPBS+PVPを入れた1.5 ml チューブに胚を移し替え、遠心分離 (13000 rpm, 5分間, 4°C) した。遠心分離後、胚のみが残るよう実体顕微鏡下でピペットを用いてPBS+PVP

を除去し、 -70°C で凍結保存した。

2) 胚の処理

1200 個の胚を、リン酸化 Cx43 の脱リン酸化を防ぐために phosphatase inhibitors (10 mM NaF, 1 mM Na orthovanadate, 10mM Na pyrophosphate) を添加した SDS lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, pH 6.8) 50 μl で回収した。回収後、超音波処理装置 (Branson) で 30 秒間処理し胚を完全に破壊し、遠心分離 (15000 rpm, 5 分間, 4°C) 後、約 40 μl の上清を回収し、約 10 μl ずつ (胚 300 個相当量) 分注し、実験に供するまで -70°C で凍結保存した。

3) ウェスタンブロッティング

約 10 μl のサンプルに loading buffer 3.5 μl と 1 μM の DTT 1.5 μl を添加して 15 分間静置後、電気泳動を行った。電気泳動用ゲルには 12% SDS ポリアクリルアミドゲルを、電極液にはトリス-グリシン電気泳動 buffer (5 mM Tris, 50 mM glycine (pH 8.3), 0.02% SDS) を用いた。電気泳動後、ゲル上のタンパク質をセミドライ型ブロッティング装置を用いて PVDF メンブレン (Millipore) にブロッティングした。ブロッティング用電極液には、transfer buffer (48 mM Tris, 48 mM glycine, 0.037% SDS, 20% Methanol, pH 8.3) を用いた。メンブレンへのタンパク質のブロッティングの確認のため、Ponceau S (Sigma) で染色した。ブロッティングの確認後、Ponceau S を脱色し、抗体の非特異的結合を防ぐためのブロッキングを 4°C で一晩行った。ブロッキング溶液として、Vistra ECF Western blotting kit (Molecular Dynamics) の Membrane blocking reagent を 50 mg/ml 含む 0.1% Tween-20 添加 PBS (T-PBS) を用いた。ブロッキング終了後、T-PBS で 3 回洗浄し、

T-PBS で 1000 倍希釈した一次抗体、抗 Cx43 モノクローナル抗体 と 1 時間反応させた。その後 T-PBS で 3 回洗浄し、T-PBS で 5000 倍希釈した二次抗体、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗マウス抗体 (Vistra ECF Western blotting kit) と 1 時間反応させ、T-PBS で 3 回洗浄した。Cx43 のバンドを確認するためのポジティブコントロールとして、ギャップ結合による細胞間コミュニケーションがよく発達し、リン酸化および非リン酸化 Cx43 の存在が確認されているラット肝臓上皮細胞由来細胞株の IAR 20 (Asamoto, et al., 1991) (札幌医科大学病理学第二講座の小山田正人先生に提供していただいた) を用いた。また、リン酸化 Cx43 のバンドと非リン酸化 Cx43 のバンドの移動度の差を明らかにするために、最終濃度 $0.9 \text{ U}/\mu\text{l}$ のアルカリフォスファターゼ (Boehringer-Mannheim) を添加し、 37°C 、2 時間反応させて脱リン酸化 (Oyamada, et al., 1994) した IAR 20 をサンプルとして用いた。

4) Cx43 のバンドの検出

メンブレンを detection buffer (0.1 mM Tris-HCl , 0.1 mM NaCl , 50 mM MgCl_2 , pH 9.5) に 5~10 分間浸漬後、100 倍希釈した CSPD 液 (DIG Luminescent Detection Kit, Boehringer-Mannheim) に、 37°C で 5 分間反応させた。その後、メンブレンを X-線フィルムに感光させてバンドを検出した。

5) Cx43 のバンドのパターン解析

画像解析プログラム NIH Image (Wayne Rasband) を用いて各レーンの濃度プロフィールプロットを作成し、Cx43 バンドのパターン解析をした。

2. 結果

ラット肝臓上皮細胞由来細胞株の IAR 20 では分子量約 41, 42, 43 kDa の 3 本のバンドが検出できた (図 5.1 レーン a)。アルカリフォスファターゼ処理した IAR 20 では、分子量約 42, 43 kDa の 2 本のバンドが検出できなかった (図 5.1 レーン b) ことから、この 2 本のバンドがリン酸化 Cx43 であることが分かった (以後、分子量約 41, 42, 43 kDa のバンドを Cx43-NP, Cx43-P₁, Cx43-P₂ とした)。マウス胚では全ての時期を通じて Cx43-NP のバンドが検出できた (図 5.1 レーン c-i)。hCG 投与 96 時間後の胚盤胞では Cx43-NP, Cx43-P₁, Cx43-P₂ の 3 本のバンドがはっきりと検出できた (図 5.1 レーン i) が、その他の時期では正確には判断できなかったため、画像解析プログラム NIH Image を用いて、バックグラウンドを除去し (図 5.2)、バンドのパターン解析を行った (図 5.3)。バンドのパターン解析結果から、8 細胞期胚への分裂 6~15 時間後の胚および hCG 投与 96 時間後の胚盤胞について各バンドの濃度のピーク値を数値化し、濃度比を算出した (表 5.1)。その結果、発生が進むにつれて Cx43-NP, Cx43-P₁, Cx43-P₂ のバンドのピーク値が高くなった (図 5.3)。Cx43-P₁ 量の非リン酸化 Cx43 量に対する濃度比 (Cx43-P₁/Cx43-NP)、および Cx43-P₂ 量の非リン酸化 Cx43 量に対する濃度比 (Cx43-P₂/Cx43-NP) は hCG 投与 96 時間後の胚盤胞においては 70% 以上と高かったのに対し、8 細胞期胚への分裂 6~15 時間後の胚では 29.1~62.3% といずれの時期でもばらつきがみられた。Cx43-P₂ 量の Cx43-P₁ 量に対する濃度比 (Cx43-P₂/Cx43-P₁) は、すべての時期を通して 70.0% 以上であった。また、間接蛍光抗体染色法ではギャップ結合が検出できなかった 4 細胞期胚への分裂 6 時間後および 8 細胞期胚への分裂 0 時間後の胚でも、少量ながら Cx43-P₂ のバンドが検出された。

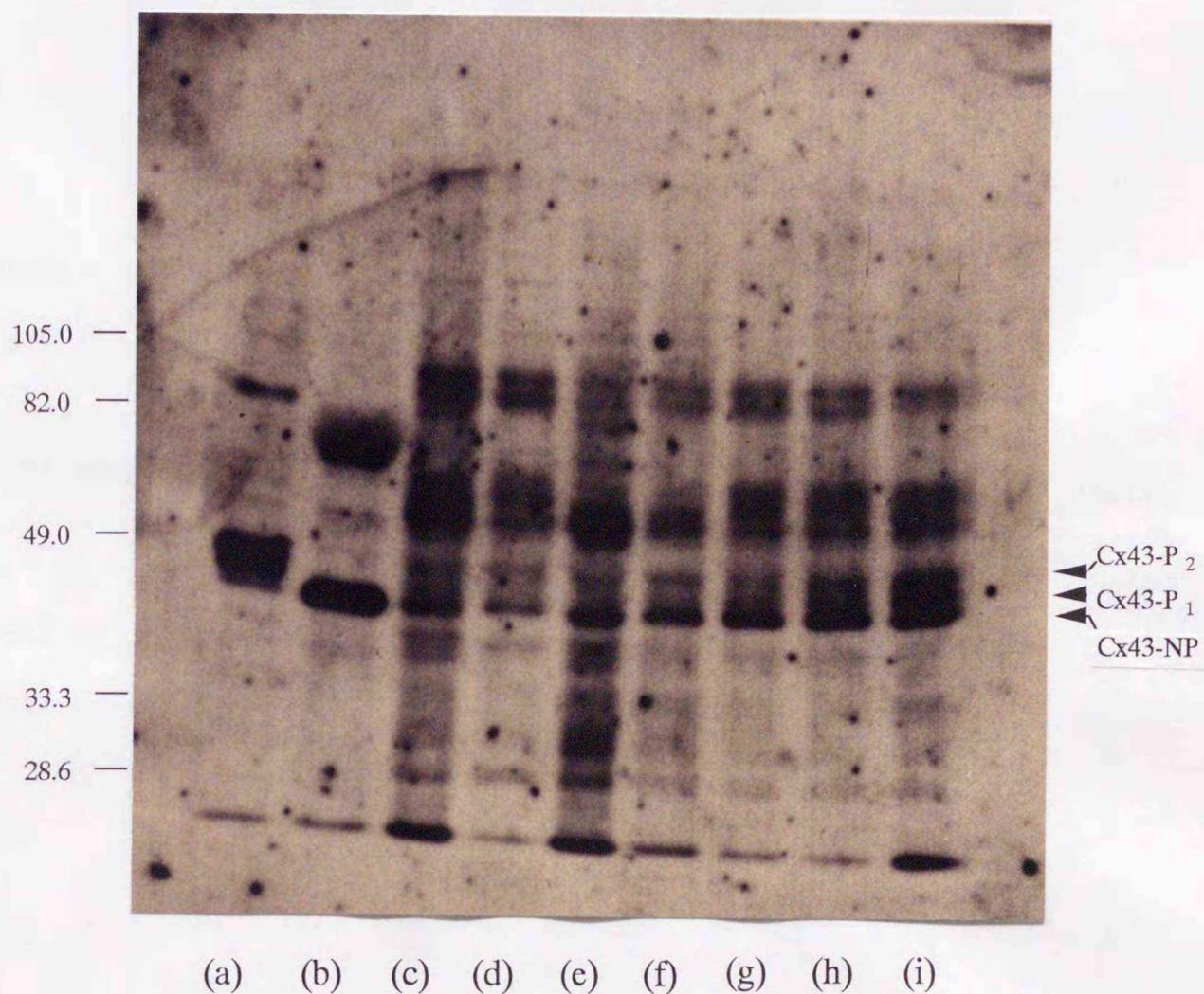


図 5.1 ウェスタンブロット法による Cx43 バンドの経時的変化

- (a) IAR 20、(b) IAR 20 (アルカリフォスファターゼ処理)、
 (c) 4 細胞期胚への分裂 6 時間後、
 (d) 8 細胞期胚への分裂 0 時間後、(e) 同 6 時間後、(f) 同 9 時間後、
 (g) 同 12 時間後、(h) 同 15 時間後、
 (i) hCG 投与 96 時間後の胚盤胞

左端の数字は分子量 (kDa) を示す

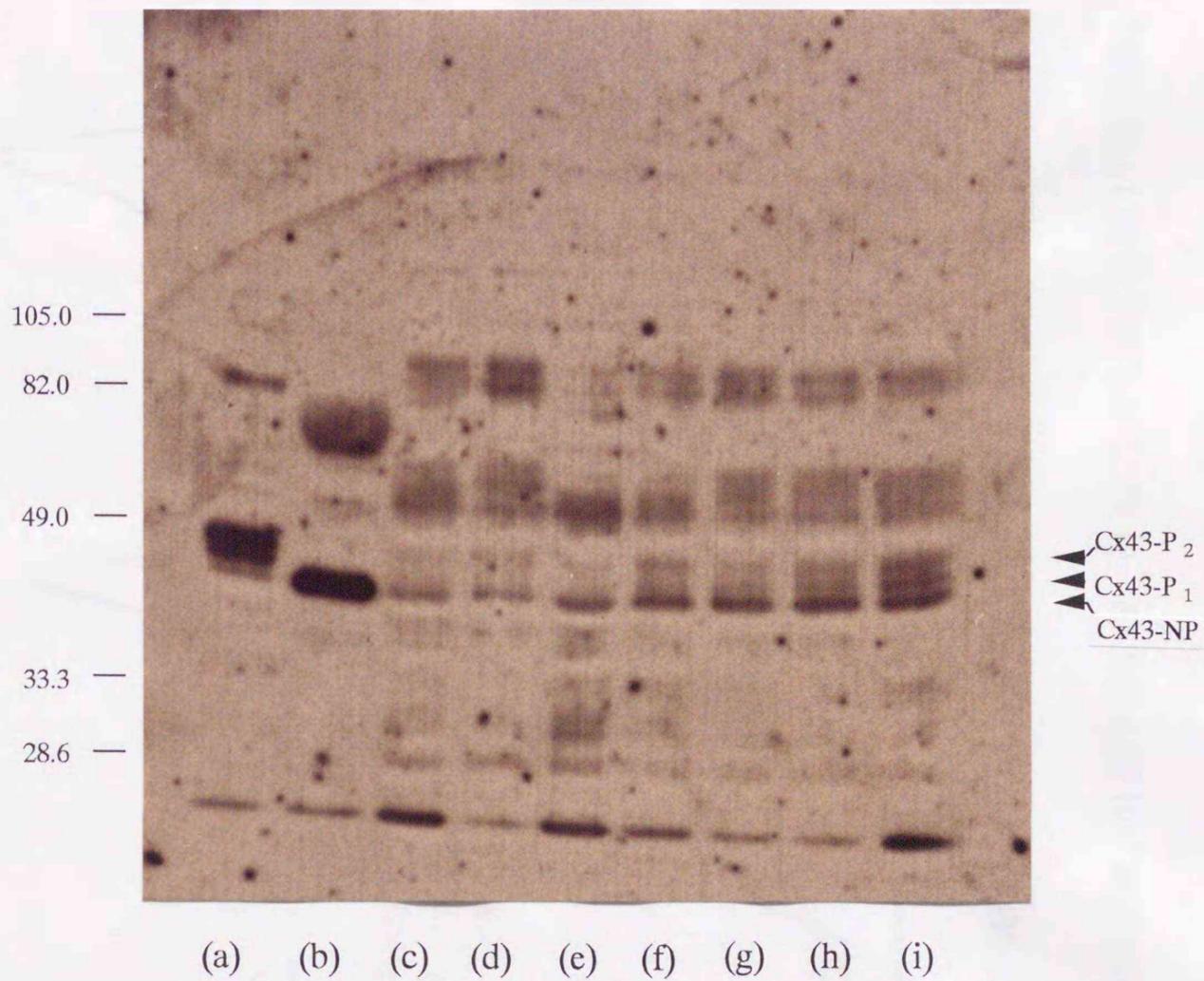


図 5.2 ウェスタンブロット法による Cx43 バンドの経時的変化

(NIH Image によるバックグラウンド除去後)

- (a) IAR 20、(b) IAR 20 (アルカリフォスファターゼ処理)、
- (c) 4 細胞期胚への分裂 6 時間後、
- (d) 8 細胞期胚への分裂 0 時間後、(e) 同 6 時間後、(f) 同 9 時間後、
- (g) 同 12 時間後、(h) 同 15 時間後の胚、
- (i) hCG 投与 96 時間後の胚盤胞

左端の数字は分子量 (kDa) を示す

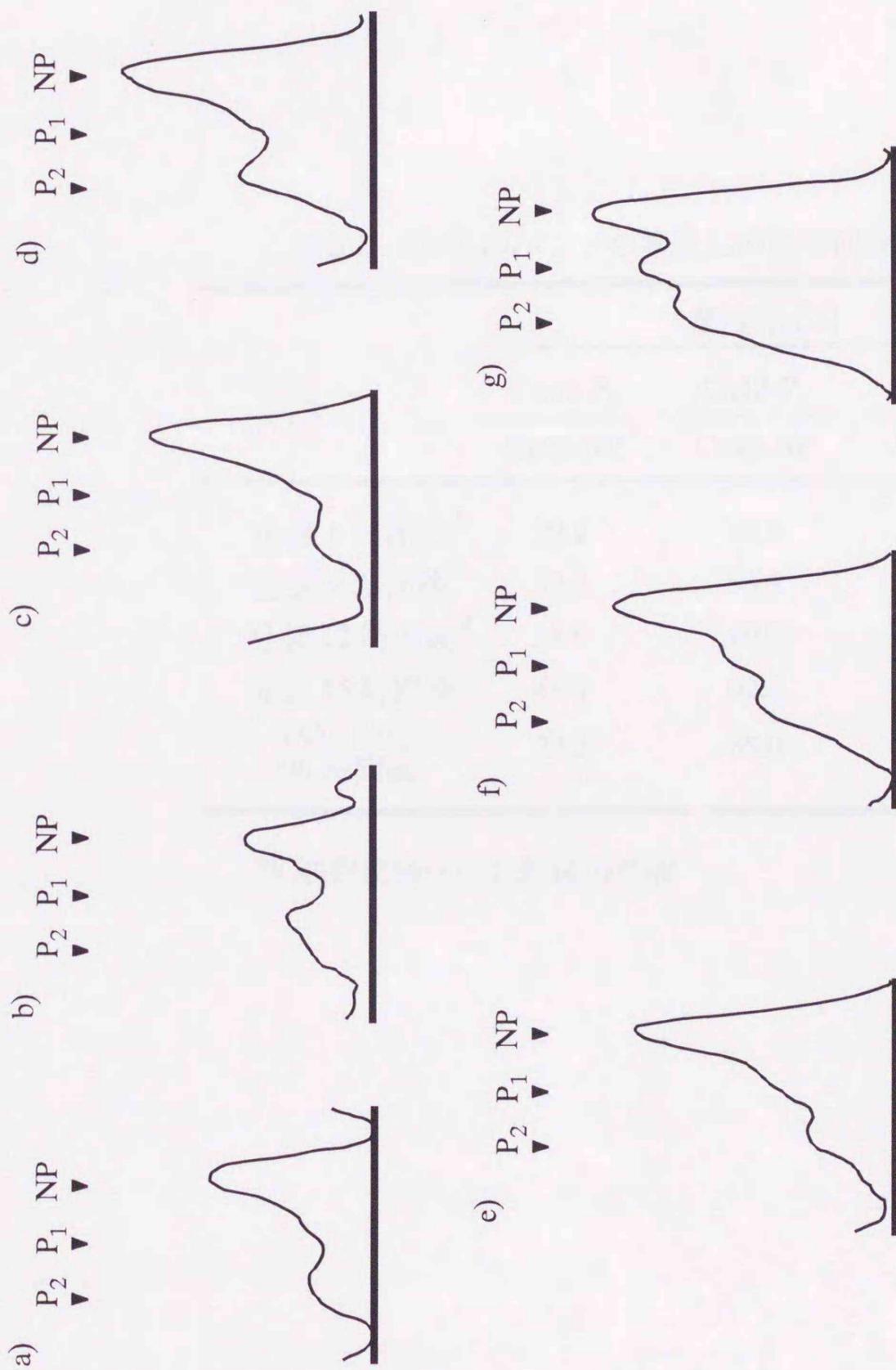


図 5.3 Cx43 のバンドのプロファイルプロットの経時的変化

a) 4 細胞期への分裂 6 時間後、

b) 8 細胞期胚への分裂 0 時間後、c) 同 6 時間後、d) 同 9 時間後、e) 同 12 時間後、f) 同 15 時間後、

g) hCG 投与 96 時間後

NP; Cx43-NP, P₁; Cx43-P₁, P₂; Cx43-P₂

表 5.1 Cx43 のバンドの濃度比の経時的変化

	濃度比 (%)		
	$\frac{\text{Cx43-P}_2}{\text{Cx43-NP}}$	$\frac{\text{Cx43-P}_1}{\text{Cx43-NP}}$	$\frac{\text{Cx43-P}_2}{\text{Cx43-P}_1}$
	分裂 6 時間後 ^a	29.1	40.5
分裂 9 時間後 ^a	52.2	53.9	96.8
分裂 12 時間後 ^a	34.9	49.8	70.0
分裂 15 時間後 ^a	48.9	62.3	78.5
hCG 投与 96 時間後	73.2	85.0	86.1

^a8 細胞期胚への分裂後の時間

第3節 考察

本研究では、全ての時期を通じて Cx43-NP バンドが検出できたことから、4 細胞期中期 (4 細胞期胚への分裂 6 時間後) にはすでに Cx43 は合成されており、Valdimarsson ら (1991) の結果と一致した。Musil ら (1991) は細胞株を用いて、Cx43 のリン酸化とギャップ結合形成との関連性について報告している。ギャップ結合の形成がみられる細胞株 NRK (normal rat kidney) では、Cx43-NP, Cx43-P₁, Cx43-P₂ の 3 本のバンドが検出できたが、ギャップ結合の形成がみられない細胞株 S180 と L929 では、それぞれ低分子側の 2 本のバンド (Cx43-NP, Cx43-P₁)、低分子側の 1 本のバンド (Cx43-NP) しか検出できなかったことから、Cx43-P₂ がギャップ結合形成に必要であるとしている。Valdimarsson ら (1991) は、マウス胚では 8 細胞期以降に Cx43 のバンドが 2 本みられるようになることから、このうちの 1 本のバンドがリン酸化した Cx43 であると報告している。本研究において、ギャップ結合の形成がみられるようになる 8 細胞期胚への分裂 6 時間後の胚で Cx43-NP, Cx43-P₁, Cx43-P₂ の 3 本のバンドが検出された。その後の発生過程において Cx43-NP, Cx43-P₁, Cx43-P₂ の 3 本のバンドの濃度が増加したことから、マウス初期胚においてもギャップ結合の形成には Cx43 のリン酸化が関与していることが示唆された。各バンドの濃度のピーク値と濃度比の結果から、胚の発生が進むにつれて 2 つのリン酸化 Cx43 はその濃度比を変えることなく量を増加させながら、胚盤胞期には非リン酸化 Cx43 と同濃度に達すると考えられた。間接蛍光抗体染色法によりギャップ結合を検出できなかった胚でも、Cx43-P₂ と思われるバンドが検出された。第 4 章第 3 節の結果から Cx43 の細胞内輸送開始時期は 8 細胞期初期であることが明らかとなったことから、これらの時期には Cx43 は細胞質に存在していると思われる。した

がって、Cx43 の合成後、ギャップ結合形成にまだ関与していないリン酸化した Cx43 がこれらの時期の胚の細胞質内に微量に存在していることが推測された。

コンパクション胚では、それまでの時期にはみられないリン酸化タンパク質の発現がみられることが報告されている (Bloom and McConnell, 1990, Bloom, 1991, Mayor and Izuquierdo, 1994)。本研究でみられたリン酸化 Cx43 の増加する時期はコンパクション胚の割合が増加する時期とほぼ一致した (第 4 章第 3 節) ことから、Cx43 のリン酸化はコンパクション胚形成へ関与していることが示唆された。

第 4 節 要約

ギャップ結合形成における Cx43 のリン酸化の関与を明らかにするために、ウエスタンブロット法により Cx43 のバンドを検出した。胚の発生が進むにつれて 2 本のリン酸化したバンド (Cx43-P₁, Cx43-P₂) の濃度がその比を変えることなく増加したことから、Cx43 のリン酸化がギャップ結合形成に関与していることが再確認できた。しかし、ギャップ結合形成のみられない時期の胚でも 1 本のリン酸化したバンド (Cx43-P₂) がわずかにみられたことから、Cx43 合成後ギャップ結合形成に関与しないリン酸化した Cx43 が細胞質に微量に存在していることを明らかにすることができた。

第 6 章 ギャップ結合形成を制御する条件の検討

第 1 節 緒言

第 3 章の結果からギャップ結合形成時期は 4 細胞期の細胞間接着の有無により影響を受けることが明らかとなった。また、第 4 章の結果から 8 細胞期にみられるようになる Cx43 のリン酸化が、ギャップ結合形成に関与していることが明らかとなった。そこで、4 細胞期胚の割球間接着および 8 細胞期胚の Cx43 のリン酸化に着目し、これらの発現を制御することによりギャップ結合の形成も制御できる可能性を探求することを本節の研究の目的とする。

第 2 節 ギャップ結合形成に及ぼすフィトヘマグルチニン (PHA) の影響

第 3 章の結果から、ギャップ結合の正常な形成には 4 細胞期胚前期の割球間接着が関与していることが示唆された。そこで本節では、4 細胞期胚の割球間接着を強めることによりギャップ結合形成の促進が可能であるかを調べることを目的とする。割球間接着を強化するために、細胞の接着を目的に用いられているフィトヘマグルチニン (PHA) を用いた。

1. 材料および方法

初期 4 細胞期胚を $10 \mu\text{g/ml}$ の PHA を添加した BWB 培養液で培養した (PHA 添加区)。1 時間毎に 8 細胞期への細胞分裂の確認を顕微鏡観察により行い、8 細胞期胚への細胞分裂の認められた胚を分裂 0 時間後の胚とした。分裂 9, 12, 15 時間後の胚を間接蛍光抗体染色法によりギャップ結合を共焦

点レーザー顕微鏡で観察した。第4章第4節の方法に従いギャップ結合数の概数を算出し、胚をギャップ結合数によりランク付けした。BWW培養液で培養したものをPHA無添加区とした。

2. 結果

ギャップ結合が検出できた胚の割合を表6.1に示した。PHA無添加区と比べ、PHA添加区では8細胞期胚への分裂12時間後にギャップ結合が検出できた胚の割合は低くなったが、分裂9時間後および15時間後では差は認められなかった。胚1個当りの平均ギャップ結合数を表6.2に示した。PHA添加区ではPHA無添加区に比べて、ギャップ結合数が減少したが、PHA無添加区と同様8細胞期胚への分裂9~15時間後の間に増加がみられた。ギャップ結合数による胚のランク別比率の経時的变化を図6.1に示した。分裂15時間後の胚のランクはCの胚がPHA無添加区で、A, B, D, Eの胚がPHA添加区で多くみられた。しかし、これらの結果からPHAがギャップ結合形成を促進したとは断言し難かった。

表 6.1 ギャップ結合が検出できた胚の割合

処理区	ギャップ結合が検出できた胚数 / 供試胚数 (%)		
	8 細胞期胚への分裂後の時間		
	9	12	15
PHA 無添加区	6/13 (46.2)	16/18 (88.9)	17/17 (100.0)
PHA 添加区	9/20 (45.0)	16/23 (69.6)	15/16 (93.8)

表 6.2 胚 1 個当りの平均ギャップ結合数

処理区	胚 1 個当りの平均ギャップ結合数 (平均値 ± 標準誤差)		
	8 細胞期胚への分裂後の時間		
	9	12	15
PHA 無添加区	2.00 ± 0.71 (16)	5.50 ± 1.21 (18)	8.95 ± 1.49 (19)
PHA 添加区	0.90 ± 0.31 (20)	4.09 ± 0.93 (23)	7.94 ± 1.32 (16)

() 内の数字は供試胚数を示す

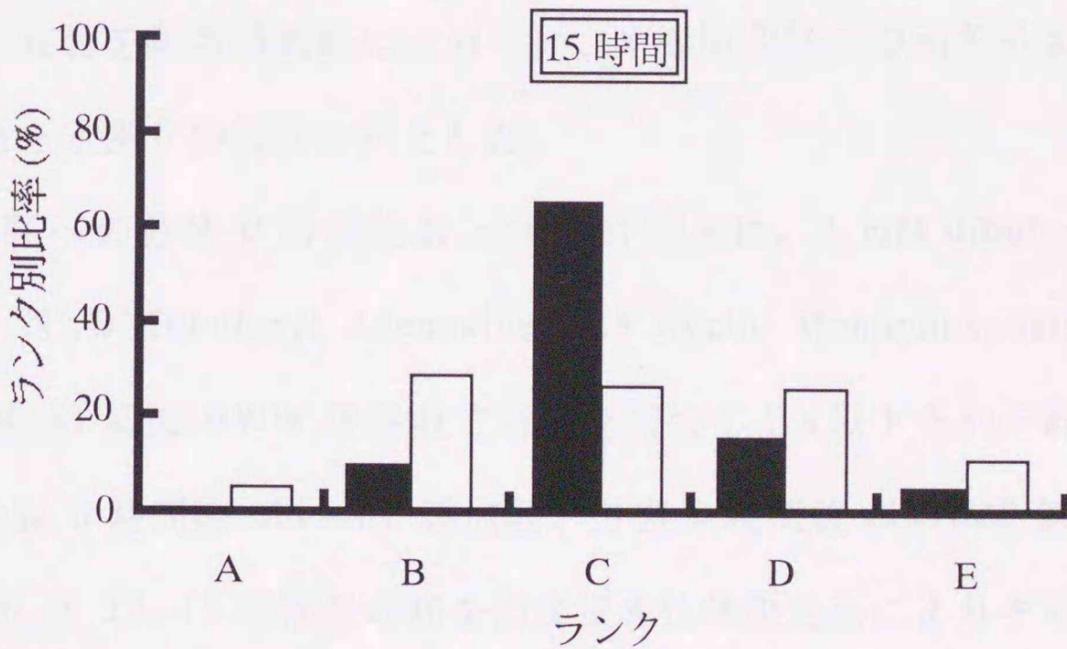
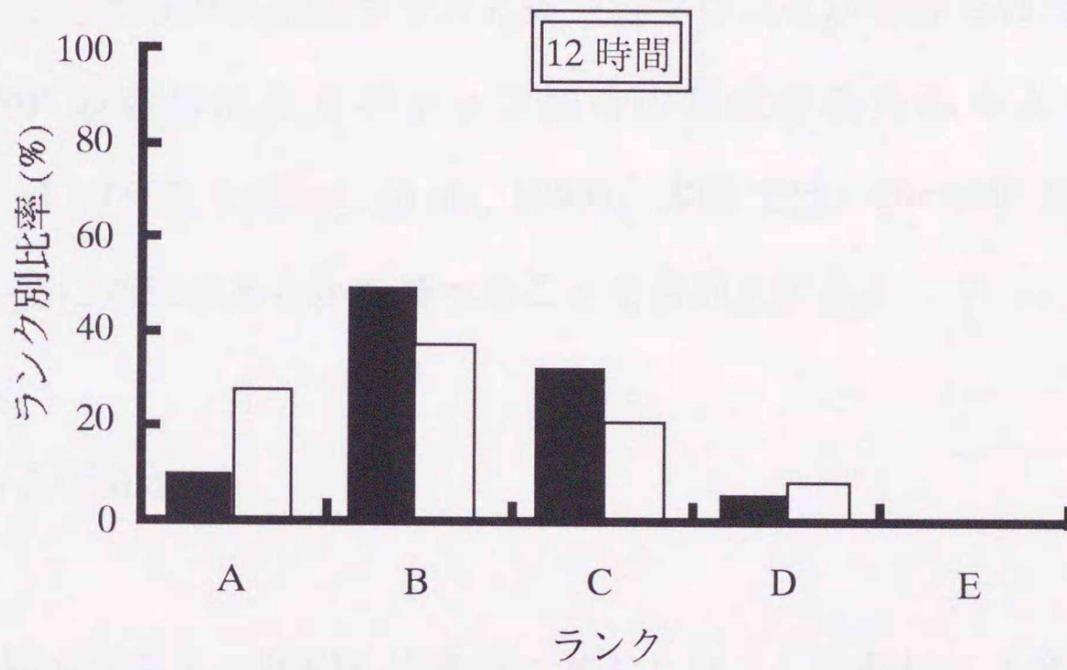
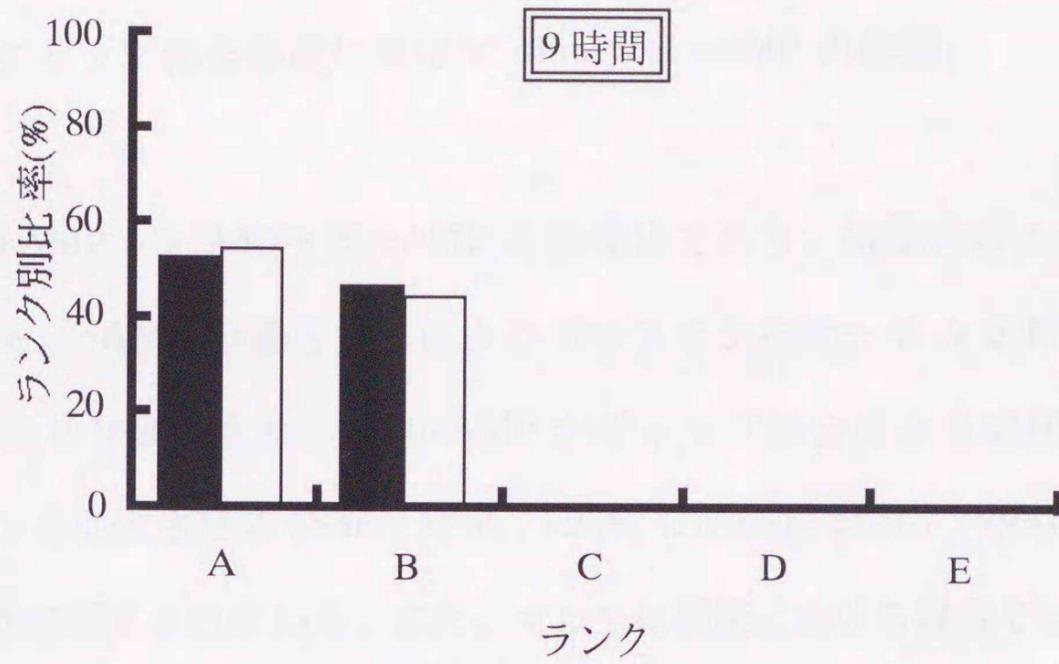


図 6.1 ギャップ結合数による胚のランク別比率の経時的変化

■ : PHA 無添加区

□ : PHA 添加区

□ 内の数字は 8 細胞期胚への分裂後の時間を示す

第3節 ギャップ結合形成に及ぼす dibutyryl cAMP の影響

dibutyryl cAMP (dbcAMP) は cAMP の誘導体であり、細胞内の cAMP 濃度を上昇させる。cAMP の濃度上昇によりプロテインキナーゼ A が活性化し、タンパク質がリン酸化される。dbcAMP がギャップ結合による細胞間コミュニケーションを促進させる (Saez, et al., 1986, Godwin, et al., 1993) ことが、多くの細胞株で報告されている。また、マウス初期胚における報告では、ギャップ結合が欠如した DDK 系雌マウスと異系雄マウスとから得られた胚において、dbcAMP の添加によりギャップ結合の形成がみられるようになる (Becker, et al., 1992, Leclerc, et al., 1994)。本節では、dbcAMP がギャップ結合形成促進に効果があるかを調べることを目的とする。

1. 材料および方法

4 細胞期胚を採取し、BWW 培養液で培養した。1 時間毎に 8 細胞期への細胞分裂の確認を顕微鏡観察により行い、8 細胞期胚への細胞分裂の認められた時の胚を分裂 0 時間後の胚とした。

8 細胞期胚への分裂 0 時間後および 3 時間後に、1 mM dibutyryl cAMP (dbcAMP: N⁶,O⁷-Dibutyryl Adenosine 3',5' Cyclic Monophosphate Sodium Salt; 和光純薬) 添加 BWW 培養液で培養を開始した (以下それぞれ、8 細胞期胚への分裂 0 時間後 dbcAMP 添加区、分裂 3 時間後 dbcAMP 添加区とした)。分裂 6, 9, 12, 15 時間後の胚を間接蛍光抗体染色法によりギャップ結合を検出し、第 4 章第 4 節の方法に従いギャップ結合数の概数を算出し、胚をランク付けした。

2. 結果

ギャップ結合が検出できた胚の割合を表 6.3 に示した。8 細胞期胚への分裂 6, 9 時間後にギャップ結合が検出できた胚の割合は、分裂 0 時間後 dbcAMP 添加区および 3 時間 dbcAMP 添加区において、dbcAMP 無添加区より高かった。胚 1 個当りの平均ギャップ結合数を表 6.4 に示した。分裂 0 および 3 時間後 dbcAMP 添加区において、平均ギャップ結合数はすべての時期を通して dbcAMP 無添加区より多かった。ギャップ結合数による胚のランク別比率の経時的変化を図 6.2 に示した。分裂 15 時間後におけるランク D 以上の胚の割合は、分裂 0 および 3 時間後 dbcAMP 添加区において、それぞれ 44.4% (8/18), 50.0% (9/18) と dbcAMP 無添加区の 23.5% (4/17) より高かった。

表 6.3 ギャップ結合が検出できた胚の割合

処理区	ギャップ結合が検出できた胚数 / 供試胚数 (%)			
	8 細胞期胚への分裂後の時間			
	6	9	12	15
dbcAMP 無添加区	7/14 (50.0)	6/13 (46.2)	16/18 (88.9)	17/17 (100.0)
8 細胞期胚への分裂 0 時間後 dbcAMP 添加区	13/15 (86.7)	14/19 (73.7)	23/23 (100.0)	18/18 (100.0)
8 細胞期胚への分裂 3 時間後 dbcAMP 添加区	13/14 (92.9)	9/12 (75.0)	20/22 (90.9)	18/18 (100.0)

表 6.4 胚 1 個当りの平均ギャップ結合数

処理区	胚 1 個当りの平均ギャップ結合数 (平均値 ± 標準誤差)			
	8 細胞期胚への分裂後 (時間)			
	6	9	12	15
dbcAMP 無添加区	2.07 ± 0.73 (14)	1.23 ± 0.49 (13)	4.78 ± 0.93 (18)	7.75 ± 0.77 (17)
8 細胞期胚への分裂 0 時間後 dbcAMP 添加区	4.07 ± 0.93 (15)	2.21 ± 1.60 (19)	7.30 ± 1.04 (23)	10.11 ± 1.36 (18)
8 細胞期胚への分裂 3 時間後 dbcAMP 添加区	4.07 ± 0.98 (14)	3.15 ± 0.93 (12)	5.32 ± 0.80 (22)	10.67 ± 1.06 (18)

()内の数字は供試胚数を示す

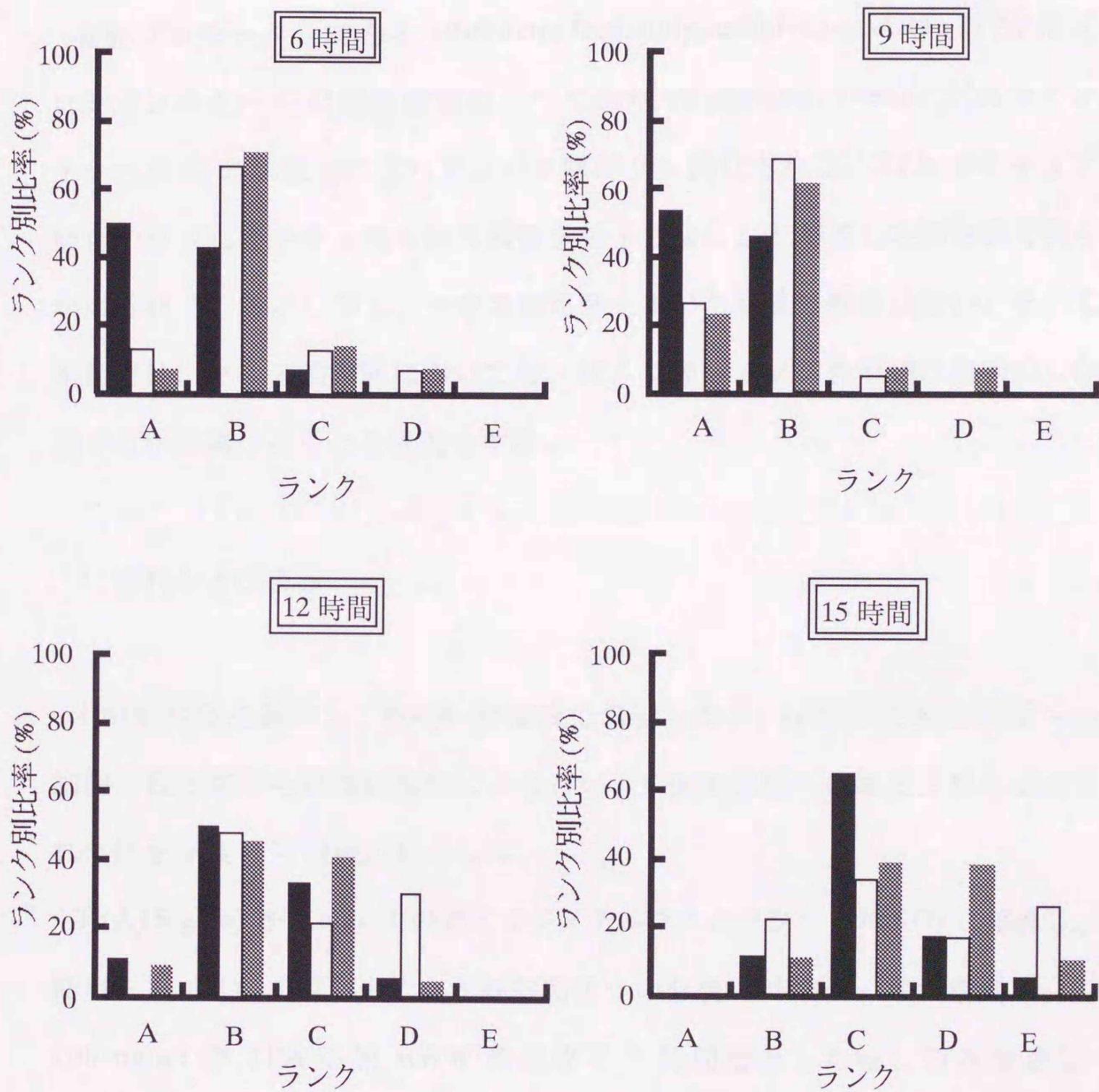


図 6.2 ギャップ結合数による胚のランク別比率の経時的変化

■ : dbcAMP 無添加区

□ : 8細胞期胚への分裂0時間後から dbcAMP 添加区

▨ : 8細胞期胚への分裂3時間後から dbcAMP 添加区

□ (数字) : 内の数字は8細胞期胚への分裂後の時間を示す

第4節 ギャップ結合形成に及ぼす TPA の影響

発癌プロモーターである 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) はプロテインキナーゼ C 活性化剤の 1 つであり (Nishizuka, 1986)、プロテインキナーゼ C の活性化によりタンパク質がリン酸化される。TPA はギャップ結合の形成阻害やチャネルの透過性を低下させることが多くの細胞株で明らかにされている。しかし、マウス初期胚を用いた同様の報告はない。そこで本節では、マウス初期胚においても、TPA がギャップ結合形成に阻害的に作用するかを調べることを目的とする。

1. 材料および方法

4 細胞期胚を採取し、BWW 培養液で培養した。1 時間毎に 8 細胞期への細胞分裂の確認を顕微鏡観察により行い、8 細胞期胚への細胞分裂の認められた胚を分裂 0 時間後の胚とした。

TPA (Sigma) を 1 mg/ml の濃度でジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、使用まで -20°C で保存した。8 細胞期胚への分裂 0 時間後、最終濃度 1, 10, 100 ng/ml の TPA 添加 BWW 培養液で 3 時間培養した後、TPA 無添加 BWW 培養液で 12 時間培養した (以下それぞれ、1 ng/ml TPA 添加区、10 ng/ml TPA 添加区、100 ng/ml TPA 添加区とした)。TPA 無添加区は、0.1% DMSO 添加 BWW 培養液で 3 時間培養後、DMSO 無添加 BWW 培養液で 12 時間培養したものとした。分裂 15 時間後の胚を間接蛍光抗体染色法によりギャップ結合を検出し、第 4 章第 4 節の方法に従いギャップ結合数の概数を算出し、胚をランク付けした。

2. 結果

ギャップ結合が検出できた胚の割合を表 6.5 に示した。TPA 濃度に関係なくほぼすべての胚でギャップ結合が検出できた。胚 1 個当りの平均ギャップ結合数を表 6.6 に示した。1 ng/ml TPA 添加区でギャップ結合数が多くなったが、TPA 濃度がさらに高くなるにともないギャップ結合数が減少した。ギャップ結合数による胚のランク別比率に及ぼす TPA 濃度の影響を図 6.3 に示した。ランク E の割合は、TPA 無添加区で 61.9% (13/21), 1 ng/ml TPA 添加区で 78.3% (18/23), 10 ng/ml TPA 添加区で 28.6% (6/21), 100 ng/ml TPA 添加区で 0% (0/24) であった。また、1 ng/ml TPA 添加区では TPA 無添加区と同様、ランク E の割合が最も高かったが、10 ng/ml TPA 添加区ではランク D の割合が最も高く、100 ng/ml TPA 添加区ではランク C の割合が最も高くなり、ランク D 以上の胚はみられなかった。以上の結果から、ギャップ結合数は TPA 濃度依存的に減少したことが明らかとなった。

表 6.5 8細胞期胚への分裂15時間後にギャップ結合が検出できた胚の割合

処理区	供試胚数	ギャップ結合が検出できた胚数	(%)
TPA 無添加区	21	21	100.0
1 ng/ml TPA 添加区	23	23	100.0
10 ng/ml TPA 添加区	21	21	100.0
100 ng/ml TPA 添加区	24	21	87.5

表 6.6 胚1個当りの平均ギャップ結合数

処理区	供試胚数	胚1個当りの平均ギャップ結合数 (平均値±標準誤差)
TPA 無添加区	21	18.57±2.20
1 ng/ml TPA 添加区	23	22.91±2.09
10 ng/ml TPA 添加区	21	13.45±1.36
100 ng/ml TPA 添加区	24	4.21±0.76

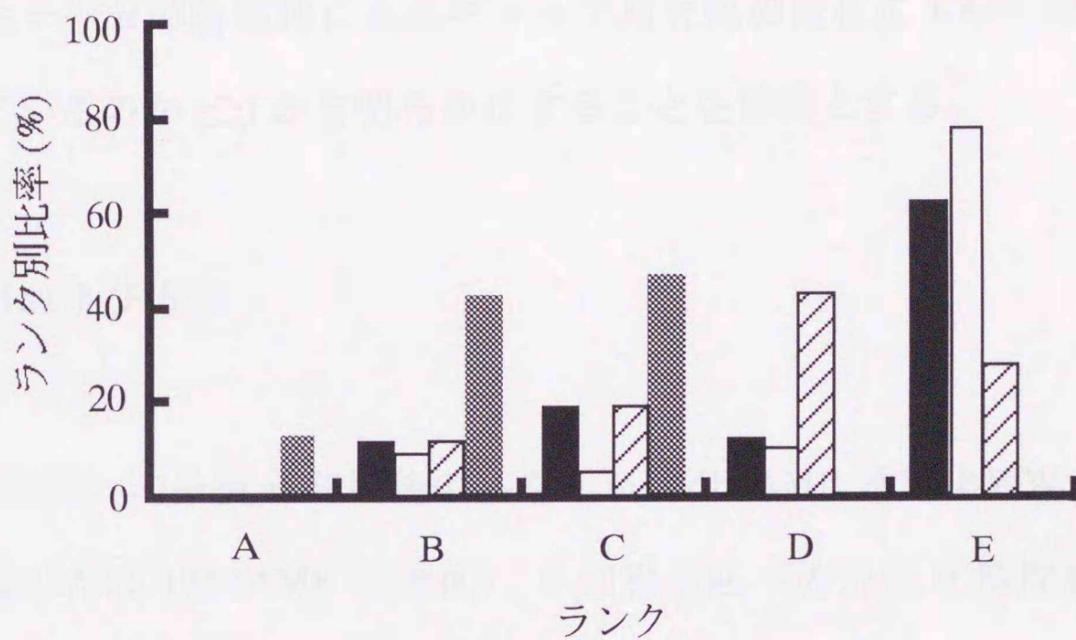


図 6.3 ギャップ結合数による胚のランク別比率に及ぼす TPA 濃度の影響

- : TPA 無添加区
- : 1 ng/ml TPA 添加区
- ▨ : 10 ng/ml TPA 添加区
- ▩ : 100 ng/ml TPA 添加区

第 5 節 Cx43 のリン酸化に及ぼす dbcAMP および TPA の影響

第 5 章の結果から、ギャップ結合の機能発現に Cx43 のリン酸化が関連していることが示唆された。さらに、本章 3 節においてプロテインキナーゼ A の活性化によるギャップ結合数の増加、4 節においてプロテインキナーゼ C の活性化によるギャップ結合数の減少がみられた。本節では、これらのプロテインキナーゼの活性化によるギャップ結合数の変化に Cx43 のリン酸化が関与しているのかどうかを明らかにすることを目的とする。

1. 材料および方法

8 細胞期胚への分裂 0 時間後の胚を 1 mM dbcAMP 添加 BWW 培養液で 15 時間培養した胚 (dbcAMP 添加区)、8 細胞期胚への分裂 0 時間後の胚を 10 ng/ml の TPA 添加 BWW 培養液で 3 時間培養後 TPA 無添加 BWW 培養液で 12 時間培養した胚 (TPA 添加区)、8 細胞期胚への分裂 0 時間後の胚を BWW 培養液で 15 時間培養した胚 (無添加区) を実験に供した。胚の採集および処理、ウエスタンブロッティング、Cx43 のバンドのパターン解析は第 5 章の方法に従った。

2. 結果

dbcAMP 添加区 (図 6.4 レーンc)、TPA 添加区 (図 6.4 レーンd) とともに、無添加区 (図 6.4 レーンb) と同様、Cx43-NP, Cx43-P₁, Cx43-P₂ の 3 本のバンドが検出された。第 5 章と同様に、画像解析プログラム NIH image を用いてバックグラウンドを除去し (図 6.5)、バンドのパターン解析を行った

(図 6.6)。バンドのパターン解析結果から、各添加区について各バンドの濃度のピーク値を数値化し、濃度比を算出した (表 6.7)。その結果、Cx43-P₁ 量の非リン酸化 Cx43 量に対する濃度比 (Cx43-P₁/Cx43-NP)、Cx43-P₂ 量の非リン酸化 Cx43 量に対する濃度比 (Cx43-P₂/Cx43-NP) は、TPA 添加区、dbcAMP 添加区、無添加区の順に高くなった。また、Cx43-P₂ 量の Cx43-P₁ 量に対する濃度比 (Cx43-P₂/Cx43-P₁) は、dbcAMP 添加区と TPA 添加区とは変わらず、無添加区より高くなった。

第 6 節 考察

PHA は糖鎖と結合するタンパク質であるレクチンの 1 つで、リンパ球のチミジン取り込みや細胞分裂を促進させる働きのあることで知られている (Goldstein and Hayes, 1978)。本研究で用いた PHA-P は赤血球凝集能を有する E サブユニットと白血球凝集能を有する L サブユニットからなる 4 量体で、赤血球凝集能および白血球有糸分裂促進能をもつ。PHA-P は、キメラ胚を作出する際に胚や割球を接着させるために用いられている。また、PHA には胚盤胞への発生率を高める効果があることが報告されている (Menino, et al., 1989)。本研究では、PHA はギャップ結合形成に影響を及ぼさなかった。Aghion ら (1994) は、セリン-スレオニンキナーゼの阻害剤である 6-dimethylaminopurine が 4 細胞期胚の割球間接着を強め、ギャップ結合を形成させること、またこれらの現象の過程に E-カドヘリンが関与していることを報告している。また、E-カドヘリンは細胞間認識した細胞間の接着を強化する役割を有しており (Eggens, et al., 1989)、ギャップ結合の形成にも E-カドヘリンが関与していることが示唆されている (Jongen, et al., 1991, Musil, et al., 1990)。本研究では PHA を割球間接着の促進を目的に用いたが、ギャップ結

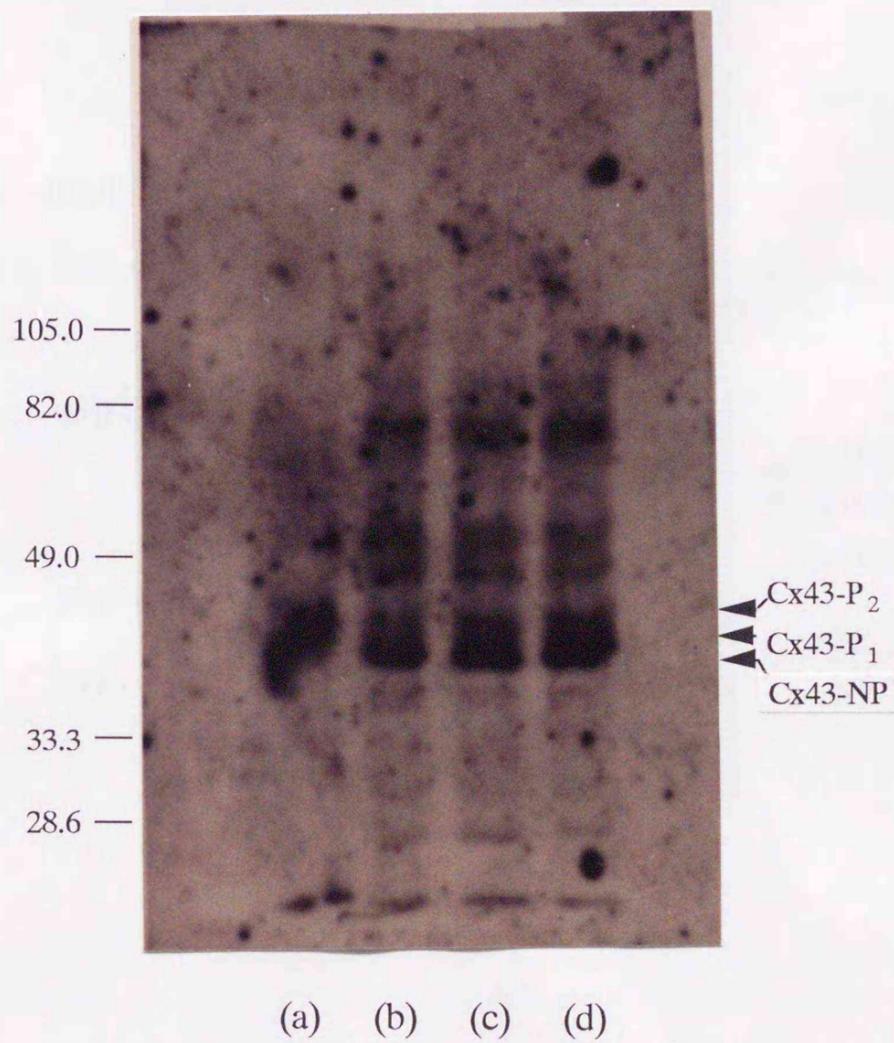


図 6.4 dbcAMP, TPA が Cx43 のバンドパターンに
及ぼす影響
(a) IAR 20
(b) 無添加区
(c) dbcAMP 添加区
(d) TPA 添加区
左端の数字は分子量 (kDa) を示す

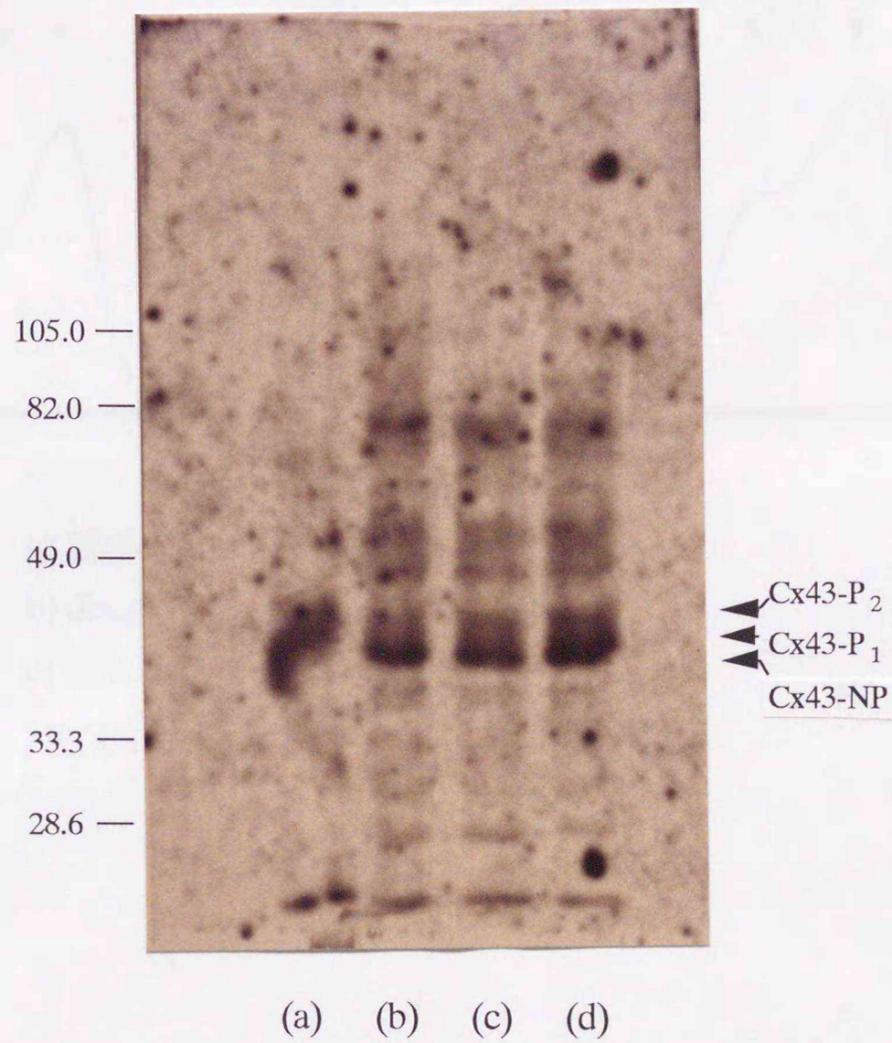


図 6.5 dbcAMP, TPA が Cx43 のバンドパターンに
 及ぼす影響
 (NIH Image によるバックグラウンド除去後)
 (a) IAR 20
 (b) 無添加区
 (c) dbcAMP 添加区
 (d) TPA 添加区
 左端の数字は分子量 (kDa) を示す

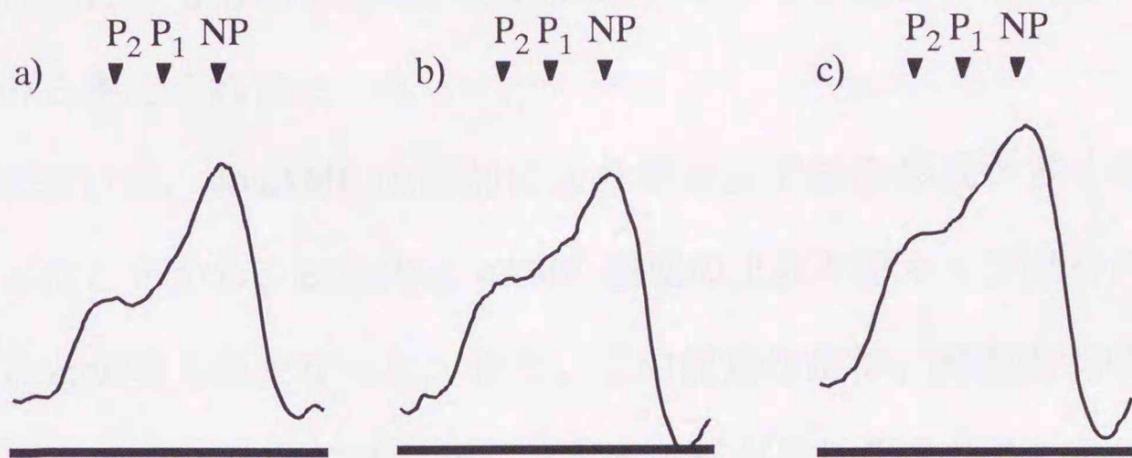


図 6.6 Cx43 のバンドのプロフィールプロット

a) 無添加区

b) dbcAMP 添加区

c) TPA 添加区

NP; Cx43-NP, P₁; Cx43-P₁, P₂; Cx43-P₂

表 6.7 各添加区における Cx43 のバンドの濃度比

	濃度比 (%)		
	$\frac{\text{Cx43-P}_2}{\text{Cx43-NP}}$	$\frac{\text{Cx43-P}_1}{\text{Cx43-NP}}$	$\frac{\text{Cx43-P}_2}{\text{Cx43-P}_1}$
無添加区	57.6	71.9	80.1
dbcAMP 添加区	65.5	75.9	86.4
TPA 添加区	69.2	80.3	86.2

合数を増加させる効果は認められなかった。PHA を介した割球間接着の強化は細胞膜糖鎖間を連結させる効果はあるものの、割球間接着による細胞間情報伝達を可能にするものではなかったため、ギャップ結合の形成を促進しなかったものと考えられた。

本研究において、dbcAMP の添加によりギャップ結合形成が多くみられるようになったことから、細胞内の cAMP 濃度の上昇がギャップ結合の形成を促進することが明らかとなった。また、この促進作用は、細胞内 cAMP 濃度の上昇により cAMP 依存的プロテインキナーゼが活性化されることによるものと考えられる (Godwin, et al., 1993)。Cx43 のリン酸化バンドの濃度比の結果から、dbcAMP の添加によるギャップ結合の形成促進はリン酸化 Cx43 量の増加によるものと考えられた。

TPA を添加後 1 時間以内に急速にギャップ結合の形成が阻害されることが多種の細胞株で明らかにされている (Asamoto, et al., 1991, Lampe, 1994, Reynhout, et al., 1992, Berthoud, et al., 1992, Kenne, et al., 1994)。TPA によるギャップ結合形成阻害は、すでに形成されているギャップ結合を分解するためではなく、新しいギャップ結合の形成を阻害することによるものであると報告されている (Lampe, 1994)。また、阻害作用は添加濃度や添加時間に依存する (Rivedal, et al., 1994, Lampe, 1994, Kenne, et al., 1994, Brissette, et al., 1991)。本研究では、TPA が低濃度 (1 ng/ml) のとき、ギャップ結合の形成には影響がみられなかった。これは、ギャップ結合形成を阻害するには TPA 濃度が低すぎたため、または TPA 無添加培養液で 12 時間培養している間にギャップ結合形成能が正常なレベルにまで回復したためであると推測された。一方、TPA が高濃度 (100 ng/ml) のとき、ギャップ結合形成は阻害されなかったが、胚 1 個当りにみられるギャップ結合数は減少した。この結果から、TPA 濃度が高い場合、その強い阻害作用によって、ギャップ

結合形成能が正常なレベルに回復しない可能性が示唆された。ラット肝臓上皮細胞由来細胞株 IAR 20 では、TPA 添加培養液での培養時間を長くする (培養時間 24 時間) と TPA 添加培養液での培養前と同程度のギャップ結合の形成がみられるようになる (Asamoto, et al., 1991, Kenne, et al., 1994) ことが報告されている。本研究では培養時間を 3 時間に限定し、TPA 無添加培養液でさらに 12 時間培養したにもかかわらずギャップ結合形成が低下したことから、細胞株と初期胚とでは、TPA によるギャップ結合形成阻害作用が異なるのかも知れない。TPA は mRNA の発現や Cx43 のタンパク質合成には影響を及ぼさない (Asamoto, et al., 1991) が、リン酸化 Cx43 の量を増加させる (Lampe, 1994, Berthoud, et al., 1992, Kenne, et al., 1994) ことが報告されている。本研究においても、リン酸化 Cx43 量の増加がみられた。TPA によりリン酸化 Cx43 量が増加したにもかかわらずギャップ結合形成が低下した原因として、TPA はギャップ結合形成が可能なリン酸化したコネキシンがコネクソンを形成するのを阻害している、または隣接する 2 つの細胞膜上での 2 個のコネクソンの接着を阻害した、と考えられた。

第 7 節 要約

ギャップ結合形成を制御する培養条件について検討を行った。その結果、dbcAMP を添加することによりギャップ結合の形成が促進され、TPA を添加することにより阻害されることが明らかとなった。これらの培養条件下で Cx43 のバンドパターンを調べた結果、dbcAMP 添加区、TPA 添加区において、いずれも無添加区と比較してリン酸化した Cx43 の濃度が増加した。dbcAMP 添加区におけるリン酸化 Cx43 の増加は、ギャップ結合形成の促進をもたらす、TPA 添加区におけるリン酸化 Cx43 の増加は、ギャップ結合形

成を阻害したことから、Cx43 のリン酸化は直接ギャップ結合の形成を調節してはいないことが判明した。

第7章 ギャップ結合形成の制御が胚の発生に及ぼす影響

第1節 緒言

第6章第2節の結果から、dbcAMP 添加培養液で胚を培養することによりギャップ結合数が増加すること、また、第6章第3節の結果から、TPA 添加培養液で胚を培養することにより、ギャップ結合数が TPA の濃度に依存して減少することが明らかとなった。ギャップ結合形成を阻害する実験により、初期発生におけるギャップ結合形成の必要性を明らかにした報告がある (Warner, et al., 1984, Bevilacqua, et al., 1989)。しかし、ギャップ結合形成を阻害した胚は、発生停止や胚盤胞形成不全など発生能を失う。本章では、初期発生におけるギャップ結合の機能を解明する目的で、ギャップ結合形成を制御した培養条件がその後の発生に及ぼす影響について、胚盤胞への発生率および発生した胚盤胞の細胞数を基準に比較検討した。また、ギャップ結合形成促進が体外培養胚に与える効果を明らかにするために、dbcAMP 添加培養液での培養では、体内受精胚と体外受精胚を用いて胚盤胞への発生率および発生した胚盤胞の細胞数を基準に比較検討した。

第2節 dbcAMP が体内受精胚および体外受精胚の発生に及ぼす影響

第6章第3節の結果から、dbcAMP 添加培養液で胚を培養することが、ギャップ結合形成を促進することが明らかとなった。そこで、本節では dbcAMP が胚の発生に及ぼす影響を体内受精胚および体外受精胚を用いて、胚盤胞への発生率、胚盤胞の総細胞数および内部細胞塊の細胞数を基準に比較検討した。

1. 材料および方法

1) 実験 1: 体内受精胚の dbcAMP 添加培養液での培養

雄マウスと同居させ、翌日膣栓の確認できた雌マウスの卵管より 4 細胞期胚を採取し、BWW 培養液で培養した。3 時間毎に 8 細胞期への細胞分裂の確認を顕微鏡観察により行い、8 細胞期胚への細胞分裂の認められた胚を 1 mM dbcAMP 添加 BWW 培養液で 15 時間培養した。その後、dbcAMP を含まない BWW 培養液で培養を行った (dbcAMP 15 時間添加区)。また、一部の胚は dbcAMP 添加培養液でさらに培養を続けた (dbcAMP 添加区)。BWW 培養液で培養したものを、dbcAMP 無添加区とした。

2) 実験 2: 体外受精胚の dbcAMP 添加培養液での培養

雄マウスを頸椎脱臼法により屠殺し、精巣上体を摘出した。精巣上体尾部を切開し、精子塊をすくい取り、300 μ l の 0.5% BSA 添加 HTF 培養液 (HTF+ BWW) (Quinn, et al., 1985) に導入し、1 時間前培養した。雌マウスを hCG 投与 14 時間後に頸椎脱臼法により屠殺し、卵管を取り出し切開して卵丘に包まれた卵子塊を引き出し、200 μ l の HTF+BSA 培養液に導入した。前培養した精子の浮遊液 10 μ l を卵子塊の入った培養液中に導入し、媒精した。媒精 5 時間後、第 2 極体の放出の認められた卵子を受精卵と判断し、発生用培養液 BWW+BSA に移し替えた。dbcAMP 添加培養液での培養時期は実験 1 と同様とした。

3) 免疫手術法による内部細胞塊の単離

hCG 投与 120 時間後の胚盤胞の透明帯を 0.5% プロナーゼで除去した後、1% PVP 添加 PBS (PBS+PVP) で 50 倍希釈した抗血清に移し、インキュベ-

ター内で 30 分間培養した。PBS+PVP で 3 回洗浄後、PBS+PVP で 10 倍希釈したモルモット補体 (Cedarlane Laboratories) に移し、インキュベーター内で 45 分間培養した。PBS+PVP で 3 回洗浄後、融解した栄養芽層をピペッティングにより除去し、内部細胞塊を単離した。

4) 細胞数の測定

胚盤胞および免疫手術法により単離した内部細胞塊をスライド標本にし、核数を数えて細胞数とした。スライド標本は、Takagi ら (1978) の方法を一部変更して作成した。胚盤胞および内部細胞塊を低張液 (36% に希釈した PBS) に約 3 分間保持して細胞を膨潤化させた後、固定液 (カルノア液; エタノール 3: 氷酢酸 1) が入った 96 ウェルマルチディッシュに移し、 -20°C で一晩放置した。固定完了後、胚を少量の固定液とともにスライドガラス上に移し、固定液が蒸発する直前に細胞質分散液 (乳酸 1: 蒸留水 1: 氷酢酸 6) を数滴落として核から細胞質を分離した。細胞質を十分に分離させた後、希釈した固定液 (カルノア液 12: 蒸留水 1) を滴下して核の適度な分散と固定ならびに細胞質の除去を行い、続いてカルノア液の滴下により核の固定を確実にした。風乾後、ギムザ液で染色を行い、青く染まった核を計測し細胞数とした。

2. 結果

1) dbcAMP が体内受精胚の発生に及ぼす影響 (実験 1)

hCG 投与 96 時間後および 120 時間後における胚盤胞への発生率は、dbcAMP 15 時間添加区、dbcAMP 添加区ともに 90% 以上で、dbcAMP 無添加区と差はなかった。しかし、hCG 投与 120 時間後における脱出胚盤胞の

割合は、dbcAMP 15 時間添加区で 7.0%、dbcAMP 添加区で 4.8% と dbcAMP 無添加区の 24.1% と比較して有意に低かった ($p < 0.01$) (表 7.1)。また、hCG 投与 120 時間後の胚盤胞の総細胞数は両 dbcAMP 添加区とも dbcAMP 無添加区と差はなかったが、内部細胞塊の細胞数は dbcAMP 添加区で有意に多くなった ($p < 0.05$) (表 7.2 上段)。

2) dbcAMP が体外受精胚の発生に及ぼす影響 (実験 2)

hCG 投与 96 時間後における胚盤胞への発生率は、dbcAMP 15 時間添加区、dbcAMP 添加区でそれぞれ 35.8%、30.1% で、dbcAMP 無添加区の 38.1% と差はなかった。hCG 投与 120 時間後における胚盤胞への発生率は、dbcAMP 15 時間添加区、dbcAMP 添加区でそれぞれ 95.5%、90.4% で、dbcAMP 無添加区の 95.2% と差はなかった (表 7.3)。また、hCG 投与 120 時間後の胚盤胞の総細胞数は両 dbcAMP 添加区とも dbcAMP 無添加区と差はなかったが、内部細胞塊の細胞数は dbcAMP 添加区で有意な差はないものの実験 1 の結果と同様多くなる傾向があった (表 7.2 下段)。

表 7.1 dbcAMP の体内受精胚の発生への効果

処理区	供試 胚数	96時間 ^a		120時間 ^a		
		胚盤胞 (%)	胚盤胞			
			胚盤胞 (%)	孵化 (%)	脱出 (%)	合計 (%)
dbcAMP 無添加区	83	78 (94.0)	29 (34.9)	32 (38.6)	20 (24.1)	81 (97.6)
dbcAMP 15 時間添加区	86	80 (93.0)	35 (40.7)	43 (50.0)	6 ^b (7.0)	84 (97.7)
dbcAMP 添加区	83	78 (94.0)	43 (51.8)	31 (37.3)	4 ^b (4.8)	78 (94.0)

^a hCG 投与後の時間

^b dbcAMP 無添加区との間に有意差あり (p<0.01)

表 7.2 胚盤胞の細胞数 (hCG 投与後 120 時間)

受精胚の 由来	処理区	総細胞数 (胚数)	ICM 細胞数 (胚数)
		(平均値±標準誤差)	(平均値±標準誤差)
体内受精胚	dbcAMP 無添加区	138.6±4.0 (24)	25.9±1.3 (24)
	dbcAMP 15 時間添加区	139.0±4.1 (29)	25.3±1.2 (30)
	dbcAMP 添加区	137.5±3.9 (26)	32.4±2.1 (34) ^b
体外受精胚	dbcAMP 無添加区	99.9±5.6 (27)	18.6±1.5 (17)
	dbcAMP 15 時間添加区	100.6±3.6 (34)	18.5±3.3 (8)
	dbcAMP 添加区	99.6±5.0 (30)	21.3±2.2 (11)

^a hCG 投与後の時間

^b dbcAMP 無添加区との間に有意差あり (p<0.05)

表 7.3 dbcAMP の体外受精胚の発生への効果

処理区	供試 胚数	96時間 ^a	120時間 ^a
		胚盤胞 (%)	胚盤胞 (%)
dbcAMP 無添加区	63	24 (38.1)	60 (95.2)
dbcAMP 15 時間添加区	67	24 (35.8)	64 (95.5)
dbcAMP 添加区	73	22 (30.1)	66 (90.4)

^ahCG 投与後の時間

dbcAMP 無添加区との間に有意差なし

第 3 節 TPA が胚の発生に及ぼす影響

第 6 章第 4 節の結果から、TPA 添加培養液で胚を 3 時間培養することにより、ギャップ結合数は TPA 濃度依存的に減少することが明らかとなった。そこで、本節では TPA が胚の発生に及ぼす影響を、桑実胚および胚盤胞への発生率、胚盤胞の総細胞数を基準に比較検討した。

1. 材料および方法

4 細胞期胚を採取し、BWW 培養液で培養した。3 時間毎に 8 細胞期への細胞分裂の確認を顕微鏡観察により行い、8 細胞期胚への細胞分裂の認められた胚を 0 (TPA 無添加区), 1, 5, 10, 25, 100 ng/ml TPA 添加 BWW 液で 3 時間培養した。その後、BWW 培養液でさらに培養を行った。hCG 投与 72 時間後に桑実胚への発生、96 および 120 時間後に胚盤胞への発生について観察した。また、hCG 投与 120 時間後に前節の方法に従って胚盤胞の総細胞数を求めた。

2. 結果

hCG 投与 72 時間後における桑実胚への発生率、96 および 120 時間後における胚盤胞への発生率を表 7.4 に示した。hCG 投与 72 時間後における桑実胚への発生率は、TPA 無添加区で 62.2% であったのに対し、1, 5, 10, 25, 100 ng/ml TPA 添加区ではそれぞれ 52.5%, 29.8%, 18.8%, 11.1%, 5.9% と有意に低くなった (1 ng/ml TPA 添加区, $p < 0.05$; 5, 10, 25, 100 ng/ml TPA 添加区, $p < 0.01$)。hCG 投与 96 時間後における胚盤胞への発生率は各添加区

で75%以上で差はなかった。hCG投与120時間後における胚盤胞への発生率は、各添加区で90%以上であったが、5 ng/ml TPA添加区で有意に低下した ($p < 0.05$) (表7.4)。また、hCG投与120時間後の胚盤胞の総細胞数はTPA無添加区で 131.6 ± 3.7 個であったのに対し、1, 5, 10, 25, 100 ng/ml TPA添加区ではそれぞれ 121.7 ± 4.5 個, 97.6 ± 3.2 個, 100.0 ± 4.6 個, 80.5 ± 3.3 個, 69.7 ± 2.7 個とTPA濃度依存的に減少し、5, 10, 25, 100 ng/ml TPA添加区でTPA無添加区より有意に少なくなった ($p < 0.01$) (表7.5)。

第4節 考察

マウス初期胚において、cAMPは胚盤胞形成期に Na^+ の細胞内への取り込みを促進することにより腔形成を早めることが報告されている (Manejwala, et al., 1986, Manejwala and Schultz, 1989)。また、cAMPの細胞内濃度を上昇させることにより胚盤胞への発生率が上昇する (Leclerc, et al., 1994)。しかし、本研究では体内受精胚、体外受精胚ともに胚盤胞への発生率に培養液へのdbcAMP添加の効果は認められなかった。本研究で用いた胚は、胚盤胞への発生率が高かった (dbcAMP無添加区のhCG投与120時間後の胚盤胞への発生率；体内受精胚：97.6%、体外受精胚：95.2%)ため、cAMPの上昇による発生への効果が確認できなかったものと思われた。胚盤胞の総細胞数に対するdbcAMPの効果はみられなかったが、内部細胞塊の細胞数は増加した。内部細胞塊の細胞数を増加させることで知られているインスリン様増殖因子-1 (IGF-1) について、HarveyとKaye (1992)はIGF-1が内部細胞塊に直接作用することにより細胞増殖を促進させると考えている。本来、細胞内cAMP濃度は後期胚盤胞で増加がみられるようになる (Dardik and Schultz, 1992)。本研究では、胚盤胞形成過程で細胞内cAMPが高濃度で持続された

表 7.4 TPA の発生への影響

処理区	供試 胚数	72h ^a	96h ^a	120h ^a
		桑実胚 (%)	胚盤胞 (%)	胚盤胞 (%)
TPA 無添加区	99	62 (62.6)	80 (80.8)	97 (98.0)
1 ng/ml TPA 添加区	101	53 (52.5) ^b	77 (76.2)	100 (99.0)
5 ng/ml TPA 添加区	104	31 (29.8) ^c	87 (83.6)	95 (91.3) ^b
10 ng/ml TPA 添加区	101	19 (18.8) ^c	87 (86.1)	98 (97.0)
25 ng/ml TPA 添加区	99	11 (11.1) ^c	87 (87.9)	93 (93.9)
100 ng/ml TPA 添加区	101	6 (5.9) ^c	88 (87.1)	100 (99.0)

^a hCG 投与後の時間

^b TPA 無添加区との間に有意差あり (p<0.05)

^c TPA 無添加区との間に有意差あり (p<0.01)

表 7.5 胚盤胞の細胞数 (hCG 投与後 120 時間)

処理区	供試 胚数	細胞数 (平均値±標準誤差)
TPA 無添加区	27	131.6±3.7
1 ng/ml TPA 添加区	35	121.7±4.5
5 ng/ml TPA 添加区	35	97.6±3.2 ^a
10 ng/ml TPA 添加区	34	100.0±4.6 ^a
25 ng/ml TPA 添加区	38	80.5±3.3 ^a
100 ng/ml TPA 添加区	40	69.7±2.7 ^a

^a TPA 無添加区との間に有意差あり (p<0.01)

ことにより、プロテインキナーゼ A が活性化され、種々のタンパク質がリン酸化し活性化することで内部細胞塊の細胞増殖を促進させたものと推察された。

TPA によるプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化は、TPA が細胞膜に存在するジアシルグリセロールと置き変わり、不活化 PKC と結合することにより起こると考えられている (Castagna, et al., 1982, Kraft and Anderson, 1983, Das and Rand, 1984)。2, 4 細胞期胚およびコンパクト前の 8 細胞期胚に TPA を添加するとコンパクト胚のように割球間接触を強める (Ohsugi, et al., 1993) が、それは、PKC の一過性の活性化によるものであることが報告されている (Winkel, et al., 1990)。TPA はマウス初期胚の細胞分裂 (Sawicki and Mystkowska, 1981, Mystkowska and Sawicki, 1987)、細胞質分裂を阻害し細胞膜融合を引き起こす (Mystkowska and Sawicki, 1987)。本研究では、hCG 投与 96 および 120 時間後における胚盤胞への発生率に TPA 添加による影響はほとんどみられなかった。しかし、hCG 投与 72 時間後における桑実胚への発生率、120 時間における胚盤胞の総細胞数は、TPA の濃度が高まるにつれて低下した。Mystkowska ら (1987) は、TPA 濃度 5 ng/ml で 2 時間培養すると、その後の発生が遅れるとしている。本研究では、第 6 章第 4 節でギャップ結合形成に影響を及ぼさなかった 1 ng/ml TPA 添加区においても hCG 投与 72 時間後における桑実胚への発生率、120 時間における胚盤胞の総細胞数の低下がみられたことから、TPA は初期胚の発生には有害であると考えられた。このような発生率および細胞数の TPA 濃度依存的低下の原因として、TPA 存在下で発生が一時的に停止したこと、あるいは TPA の除去後もその作用が持続したこと、が考えられた。

第 5 節 要約

第 6 章でギャップ結合数の増加および減少のみられた培養条件がその後の胚の発生に及ぼす影響について、桑実胚、胚盤胞への発生率および胚盤胞の総細胞数、内部細胞塊の細胞数を比較し、検討した。8 細胞期初期胚を dbcAMP 添加培養液で 15 時間培養した場合 (ギャップ結合数の増加が認められた培養条件)、胚盤胞への発生率、胚盤胞の総細胞数および内部細胞塊の細胞数は dbcAMP 無添加区との間に差が認められなかった。これらの結果から、ギャップ結合数の一時的な増加はその後の発生に影響を及ぼさないことが明らかとなった。しかし、dbcAMP 添加培養液で培養を続けると内部細胞塊の細胞数が増加することが判明した。一方、8 細胞期初期胚を TPA 添加培養液で 3 時間培養した場合 (ギャップ結合数の減少がみられた培養条件)、胚盤胞への発生率は TPA 無添加区との間に差が認められなかったが、桑実胚への発生率および胚盤胞の細胞数が、TPA の濃度に依存して低下した。この濃度依存的な低下は、TPA による発生への阻害作用が関与していると考えられた。

第 8 章 総括

体外培養は哺乳動物初期胚の発生機構解明にとって必要な技術であるとともに、核移植や遺伝子導入動物の作出などによって家畜を改良する上で、有力な手段となっている。長年の間、体外培養時間が長くなるに従い胚の発生率が低下することが問題であった。しかし、培養環境(気相、浸透圧、pH)や培養液の基本組成(各種イオン、グルコース)の改善、培養液への各種物質添加(キレート剤、アミノ酸、成長因子)により体外培養胚の胚盤胞への発生率は改善されてきたものの、動物種により差があり、培養技術が確立しているマウスでさえ系統による差がある。また、体外培養胚の発生に影響を及ぼしている培養液中の個々の添加物質の作用機構についてはまだ不明な点が多い。そこで、本研究ではギャップ結合に着目し、ギャップ結合形成機構解明、およびギャップ結合形成を制御する要因と発生へのその意義を明らかにすることにより、マウス初期胚の発生過程におけるギャップ結合の機能的役割を解明することを目的とした。

哺乳動物胚の初期発生は、卵形成過程で蓄積した母方 mRNA を利用して進行する。胚ゲノムの転写が開始するのは、マウスでは 2 細胞期である。8 細胞期に形態的な変化(コンパクション)が起こり、この時期を境に細胞間コミュニケーションの方法も中心体チャネルからギャップ結合チャネルへと変わる。8 細胞期中期までみられる中心体チャネルによる細胞間コミュニケーションは 2 つの娘細胞間でのみ行われるが、ギャップ結合チャネルにより 8 個全ての細胞間でコミュニケーションを取ることが可能となる。胚盤胞期(32 細胞期以降)には、2 つの細胞集団、内部細胞塊と栄養芽層へ分化する。これら一連のマウス初期発生過程を人生に例えると以下のように考えられる。2 細胞期までは母方の栄養のみで発育する時期(乳児期)、2 細胞期以降は兄弟の

割球とコミュニケーションをとりながら胚自身で生きていけるようになる時期(幼児期)、8細胞期中期からはコンパクションにより兄弟以外の割球ともコミュニケーションをとるようになり胚全体の社会を見渡せるようになる時期(学生時期)、胚盤胞期に割球は独立した社会に入り、その社会で自分の役割を果たすようになる時期(社会人)。より早く、そしてより多くのコミュニケーションを取れるようにした場合、どのような社会が形成されるのか、すなわち、どのような胚形成がみられるのか。

ギャップ結合は細胞膜に存在し、隣接する細胞間を直接連絡するチャネルである。ギャップ結合を通して、分子量1000以下の物質の通過が可能であり、その中には Ca^{2+} 、cAMP、イノシトール三リン酸等の細胞内情報伝達物質が含まれる。一般に、ギャップ結合による細胞間コミュニケーションは、細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしていると考えられている。本研究でも、ギャップ結合形成がコンパクションに関与していたこと(第3章)から、マウス初期胚においてギャップ結合は胚盤胞への細胞分化に重要な役割を果たしていることが推察された。そこで本研究では、マウス初期発生過程におけるギャップ結合の詳細な役割を明らかにすることを目的とした。

1) マウス初期発生過程におけるギャップ結合の形成機構

ギャップ結合の形成を制御するのに先立ち、ギャップ結合形成の機構解明を試みた。ギャップ結合構成タンパク質であるコネキシン43(Cx43)は4細胞期中期にすでに合成されている(第5章)が、ギャップ結合の形成がみられるのは8細胞期中期以降である(第4章第4節)。これらのギャップ結合形成への4細胞期胚の割球間接着の関与を明らかにするために、初期4細胞期胚を割球分離し、4細胞期中期および後期に再集合した胚を用いて検討した。その結果、4細胞期前期での割球間接着阻害によりギャップ結合形成時期に遅れがみられた(第3章)。このことから、割球間接着を介してギャップ

結合形成を制御する細胞間情報伝達系が 4 細胞期にすでに存在していることが示唆された。

タンパク質合成からギャップ結合形成までに 1 細胞周期の時間間隔が存在する理由として、タンパク質の細胞内輸送や翻訳後調節(タンパク質のリン酸化や糖鎖付加等)が必要であるためと考えられる。そこで、ブレフェルジン A (BFA) (タンパク質が粗面小胞体からゴルジ体を経て細胞膜へ移動する細胞内輸送の過程のうち、粗面小胞体からゴルジ体への輸送を阻害する)を用いて、Cx43 の細胞内輸送開始時期を検討した。その結果、Cx43 の細胞内輸送開始時期は 8 細胞期初期であることが明らかとなった(第 4 章第 3 節)。次に、Cx43 をウエスタンブロット法により検出した結果、8 細胞期後期(8 細胞期胚への分裂 6 時間後)から 16 細胞期中期(8 細胞期胚への分裂 15 時間後)へ胚の発生が進むにつれて 2 本のリン酸化 Cx43 がその濃度比を変えることなく増加した。したがって、ギャップ結合形成に Cx43 のリン酸化の関与が明らかにされた(第 5 章)。

2) ギャップ結合形成を制御する条件

ギャップ結合の形成を制御する条件を 3 つの方法を用いて探求した。4 細胞期胚の割球間接着の有無がギャップ結合の形成時期に影響を及ぼした(第 3 章)。そこで、ギャップ結合の形成を制御する第 1 の方法として、赤血球凝集能を有し、割球を接着させる目的で使用されているレクチンの 1 つであるフィトヘマグルチニン (PHA) がギャップ結合形成に及ぼす影響を調べた。その結果、PHA にはギャップ結合形成促進効果は認められなかった(第 6 章第 2 節)。次に、第 5 章の結果から、タンパク質のリン酸化酵素(プロテインキナーゼ)を活性化することによるギャップ結合形成の制御を試みた。ギャップ結合の形成を制御する第 2 の方法としてプロテインキナーゼ A を活性化する dbcAMP を用い、さらに第 3 の方法としてプロテインキナーゼ C を活

活性化する TPA を用いてギャップ結合形成に及ぼす影響を調べた。ギャップ結合形成は、dbcAMP 添加により促進され (第 6 章第 3 節)、TPA 添加により阻害された (第 6 章第 4 節) ことから、プロテインキナーゼ A の活性化はギャップ結合形成に促進的に働き、プロテインキナーゼ C は阻害的に働くことが明らかとなった。ギャップ結合形成のこのような変化への Cx43 のリン酸化の関与を明らかにするために、リン酸化 Cx43 の発現をウエスタンブロットによって調べた。dbcAMP、TPA のどちらを添加した場合にも、リン酸化 Cx43 の量が増加した (第 6 章第 5 節)。以上のことから、dbcAMP によるギャップ結合形成の促進はリン酸化 Cx43 の量の増加によるものであり、TPA による形成阻害はリン酸化 Cx43 のコネクソン形成を阻害するためであると考えられた。

3) ギャップ結合形成の制御が胚の発生に及ぼす影響

ギャップ結合形成の制御がその後の発生に及ぼす影響を明らかにするために、dbcAMP および TPA によりギャップ結合形成を促進または遅延させた胚のその後の発生について比較した。dbcAMP によるギャップ結合形成の促進がその後の発生に及ぼす影響について、体内受精胚および体外受精胚を用いて胚盤胞への発生率、胚盤胞の総細胞数および内部細胞塊の細胞数を比較したところ、dbcAMP 無添加区との間に著しい差は認められなかった (第 7 章第 2 節)。したがって、ギャップ結合形成の一時的な促進は体内受精胚および体外受精胚のその後の発生に影響しないことが明らかとなった。また、dbcAMP 添加培養時間を長くした場合、内部細胞塊数が増加したことから、細胞内 cAMP 濃度の上昇により、内部細胞塊の細胞増殖が活性化されたものと推測された。一方、TPA によるギャップ結合形成の遅延がその後の発生に及ぼす影響については、桑実胚、胚盤胞への発生率、および胚盤胞の総細胞数を比較したところ、胚盤胞への発生率に差は認められなかったが、桑実胚

への発生率および胚盤胞の総細胞数は TPA 濃度依存的に低下した (第 7 章第 3 節)。第 6 章第 4 節ではギャップ結合形成の阻害がみられなかった低濃度 (1 ng/ml) の TPA でも胚盤胞の総細胞数が減少したことから、TPA にはギャップ結合形成の有無とは関係なく、胚発生を阻害する作用があることが考えられた。以上のことから、本研究でみられた TPA による発生率および細胞数の低下は TPA のギャップ結合形成に關与する要因によるものではなく、別の作用によるものであることを明らかにすることができた。

以上のことから、マウス胚の初期発生過程において、Cx43 は 8 細胞期初期に細胞内輸送により細胞膜に移動し、8 細胞期後期にリン酸化すると同時にギャップ結合を形成することを明らかにした。また、ギャップ結合の形成の一時的な促進は、胚の発生に効果がないことを明白にすることができた。最後に、dbcAMP を胚盤胞形成時期に添加することにより総細胞数を増加させることなく内部細胞塊の細胞数を増加できたことは、今後の体外培養技術の改善に新しい知見をもたらしたといえる。

謝辞

本研究を遂行するに当り、御指導、助言、論文の校閲をして頂いた本講座教授 清水 弘 博士 に深く感謝の意を表す。本論文を校閲して頂いた、本学科副生物利用学講座教授 近藤 敬治 博士、本学科畜牧体系学講座教授 大久保 正彦 博士、本講座助教授 上田 純治 博士 に深く感謝の意を表す。本研究ならびに論文の御指導を賜わった本講座助手 森 匡 博士 に深く感謝する。間接蛍光抗体染色法について御指導くださった、本学科副生物利用学講座助教授 中村 富美男 博士、電子顕微鏡試料作成について御指導くださった、酪農学園大学酪農学科家畜繁殖学講座助教授 小山 久一 博士、本学部電顕センター技官 伊藤 利章 氏、本学科副生物利用学講座技官 野村 祐子 氏 に深く謝意を表す。共焦点レーザー顕微鏡の取り扱いを御指導して頂いた本学部森林科学科木材生物学講座助教授 船田 良 博士、本学医学部中央研究部技官 小川 良彦 氏 に深く謝意を表す。ウエスタンブロット法について御指導いただいた、札幌医科大学病理学第二講座 小山田 正人 博士、小山田 ゆみ子 博士、小海 康夫 博士をはじめ同講座の諸先生に心から感謝の意を表す。本研究を推進するにあたり助言していただいた本学部附属農場助手 鈴木 啓太 氏、本講座博士後期過程 佐々木 整輝 氏、統計処理について指導していただいた、本講座博士後期過程 中村 淳 氏 に深く感謝する。本研究を推進するに当り様々な面から私を支えてくださった、本学部附属農場畜産第一部の技官の方々、本講座の事務官の方々、そして本講座の院生、学生ならびに卒業生諸氏に心からお礼を申し上げる。

北海道大学創基 120 周年という記念する時期に終了できたこと、本講座での 7 年間の研究生活を無事過せたことを嬉しく思う。

引用文献

- Adler, R. R. and C. A. Ziomek (1986). Cell specific loss of polarity-induced ability by later stage mouse preimplantation embryos. *Dev. Biol.* 114, 395-402.
- Aghion, J., Gueth-Hallonet, C., Antony, C., Gros, D. and Maro, B. (1994). Cell adhesion and gap junction formation in the early mouse embryo are induced by 6-DMAP in the absence of E-cadherin phosphorylation. *J. Cell Sci.* 107, 1369-1379.
- Asamoto, M., Oyamada, M., El Aoumari, A., Gros, D. and Yamasaki, H. (1991). Molecular mechanisms of TPA-mediated inhibition of gap-junctional intercellular communication: evidence for action of connexin43 in rat liver epithelial cells. *Mol. Carcinog.* 4, 322-327.
- Balakier, H. and Pedersen, R. A. (1982). Allocation of cells to inner cell mass and trophectoderm lineages in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 90, 352-362.
- Becker, D. L., Leclerc-David, C. and Warner, A. (1992). The relationship of gap junctions and compaction in the preimplantation mouse embryo. *Development Suppl.* 113-118.
- Becker, D. L., Evans, W. H., Green, C. R. and Warner, A. (1995). Functional analysis of amino acid sequences in connexin43 involved in intercellular communication through gap junctions. *J. Cell Sci.* 108, 1455-1467.
- Bennett, M. V. L., Barrio, L. C., Bargiello, T. A., Spray, D. C., Hertzberg, E. C. and Saez, J. C. (1991). Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* 6, 305-320.
- Berthoud, V. M., Ledbetter, M. L. S., Hertzberg, E. L. and Saez, J. C. (1992). Connexin43 in MDCK cells: regulation by a tumor-promoting phorbol ester and Ca^{2+} . *Eur. J. Biochem.* 57, 40-50.
- Bevilacqua, A., Loch-Carusio, R. and Erickson, R. P. (1989). Abnormal development and dye coupling produced by antisense RNA to gap junction protein in mouse preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 5444-5448.
- Bigger, J. D., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G. (1971). The culture of mouse embryos *in vitro*. In *Methods of Mammalian Embryology* (ed. J. C. Daniel), pp. 86-116. San Francisco: W. H. Freeman and Company.
- Bloom, T. and McConnell, J. (1990). Changes in protein phosphorylation associated with compaction of the mouse preimplantation embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 199-210.
- Bloom, T. (1991). Experimental manipulation of compaction of the mouse embryo alters patterns of protein phosphorylation. *Mol. Reprod. Dev.* 28, 230-244.
- Brissette, J. L., Kumar, N. M., Gilula, N. B. and Dotto, G. P. (1991). The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5364-5371.
- Buehr, M., Lee, S., McLaren, A and Warner, A. (1987). Reduced gap junctional communication is associated with the lethal condition characteristic of DDK mouse eggs fertilized by foreign sperm. *Development* 101, 449-459.
- Buell, D. N. and j. l. Fahey, J. L. (1969). Limited periods of gene expression in immunoglobulin-synthesizing cells. *Science* 167, 1524-1525.

- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257, 7847-7851.
- Chege, N. W. and Pfeffer, S. R. (1990). Compartmentation of the Golgi complex: brefeldin-A distinguishes trans-Golgi cisternae from the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* 111, 893-900.
- Clayton, L., McConnell, J. M. L. and Johnson, M. H. (1995). Control of the surface expression of uvomorulin after activation of mouse oocytes. *Zygote* 3, 177-189.
- Dardik, A. and Schultz, R. M. (1992). Changes in cAMP phosphodiesterase activity and cAMP concentration during mouse preimplantation development. *Molec. Reprod. Dev.* 32, 349-353.
- Das, S. and Rand, R. P. (1984). Diacylglycerol causes major structural transitions in phospholipid bilayer membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124, 491-496.
- Davies, T. C., Barr, K. J., Jones, D. H., Zhu, D. and Kidder, G. M. (1996). Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse. *Dev. Genet.* 18, 234-243.
- De Sousa, P. A., Valdimarsson, G., Nicholson, B. J. and Kidder, G. M. (1993). Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos. *Development* 117, 1355-1367.
- Doms, R. W., Russ, G. and Yewdell, J. W. (1989). Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 109, 61-72.
- Eggen, I., Fenderson, B., Toyokuni, T., Dean, B., Stroud, M. and Hakumori, S. (1989). Specific interaction between Le^x and Le^x determinants. *J. Biol. Chem.* 264, 9476-9484.
- Flach, G., Johnson, M. H., Braude, P. R., Taylor, R. A. S. and Bolton, V. N. (1982). The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J.* 1, 681-686.
- Fleming, T. P. and Pickering, S. J. (1985). Maturation and polarization of the endocytotic system in outside blastomeres during mouse preimplantation development. *J. Embryol. exp. Morph.* 84, 63-90.
- Fujuwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A. and Ikehara, Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 263, 18545-18552.
- Gardner, R. L. (1983). Origin and differentiation of extra-embryonic tissue in the mouse. In *International Review of Pathology*, vol. 24 (ed. G. W. Richter and M. A. Epstein), pp. 63-133. New York: Academic Press.
- Godwin, A. J., Green, L. M., Walsh, M. P., McDonald, J. R., Walsh, D. A. and Fletcher, W. H. (1993). In situ regulation of cell-cell communication by the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol. Cell. Biochem.* 127/128, 293-307.
- Goldstein I. J. and Hayes, C. E. (1978). The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35, 128-340.

- Goodall, H. and Johnson, M. H. (1982). Use of carboxyfluorescein diacetate to study formation of permeable channels between mouse blastomeres. *Nature (London)* 295, 524-526.
- Goodall, H. and Johnson, M. H. (1984). The nature of intercellular coupling within the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* 79, 53-76.
- Goodall, H. (1986). Manipulation of gap junctional communication during compaction of the mouse early embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* 91, 283-296.
- Goodall, H. and Maro, B. (1986). Major loss of junctional coupling during mitosis in early mouse embryos. *J. Cell Biol.* 102, 568-575.
- Haefliger, J-A., Bruzzone, R., Jenkins, N. A., Gilbert, D. A., Copeland, N. G. and Paul, D. L. (1992). Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 2057-2064.
- Handyside, A. H. (1980). Distribution of antibody and lectin binding sites on dissociated blastomeres from mouse morulae : evidence for polarization at compaction *J. Embryol. exp. Morph.* 60, 99-116.
- Harlow, G. M. and Quinn, P. (1982). Development of preimplantation mouse embryos in vivo and in vitro. *Aust. J. Biol. Sci.* 35, 187-193.
- Harvey, M. B. and Kaye, P. L. (1992). Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 195-199.
- Hillman, B., Sherman, M. I. and Graham, C. F. (1972). The effect of spatial rearrangement on cell determination during mouse development. *J. Embryol. exp. Morph.* 28, 263-278.
- Houliston, E., Pickering, S. J. and Maro, B. (1989). Alternative routes for the establishment of surface polarity during compaction of the mouse embryo. *Dev. Biol.* 134, 342-350.
- Izquierdo, L., Lopez, T. and Marticorena, P. (1980). Cell membrane regions in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 59, 89-102.
- Johnson, M. H. and Ziomek, C. A. (1981). Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability. *J. Cell Biol.* 91, 303-308.
- Johnson, M. H. and Maro, B. (1984). The distribution of cytoplasmic actin in mouse 8-cell blastomeres. *J. Embryol. exp. Morph.* 82, 97-117.
- Johnson, M. H. and Maro, B. (1986). Time and space in the mouse early embryo: a cell biological approach to cell diversification. In *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development* (ed. J. Rossant and R. Pedersen), pp. 35-66. Cambridge: Cambridge University Press.
- Johnson, M. H., Maro, B. and Takeichi, M. (1986). The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. *J. Embryol. exp. Morph.* 93, 239-255.
- Jongen, W. M. F., Fitzgerald, D. J., Asamoto, M., Piccoli, C., Slaga, T. J., Gros, D., Takeichi, M. and Yamasaki, H. (1991). Regulation of connexin43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca^{2+} in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J. Cell Biol.* 114, 545-555.

- Kenne, K., Fransson-Steen, R., Honkasalo, S. and Warngard, L. (1994). Two inhibitors of gap junctional intercellular communication, TPA and endosulfan: different effects on phosphorylation of connexin43 in the rat liver epithelial cell line, IAR 20. *Carcinogenesis* 15, 1161-1165.
- Kidder, G. M. and McLachlin, J. R. (1985). Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenesis in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 112, 265-275.
- Kidder, G. M., Rains, J. and McKoen, J. (1987). Gap junction assembly in the preimplantation mouse conceptus is independent of microtubules, microfilament, cell flattening, and cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 3718-3722.
- Kidder, G. M., Barron, D.J. and Olmsted, J. B. (1988). Contribution of midbody channels to embryogenesis in the mouse. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 197, 110-114.
- Kidder, G. M. (1992). The genetic program for preimplantation development. *Dev. Genet.* 13, 319-325.
- Klausner, R. D., Donaldson, J. G. and Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116, 1072-1080.
- Koyama, H., Suzuki, H., Yang, X., Jiang, S. and Foote, R. H. (1994). Analysis of polarity of bovine and rabbit embryos by scanning electron microscopy. *Biol. Reprod.* 50, 163-170.
- Kraft, A. S. and Anderson, W. B. (1983). Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺ phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature (London)* 301, 621-624.
- Lampe, P. D. (1994). Analyzing phorbol ester effects on gap junctional communication: a dramatic inhibition of assembly. *J. Cell Biol.* 127, 1895-1905.
- Lane, M. and Gardner, D. K. (1992). Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of preimplantation mouse embryos in vitro. *Hum. Reprod.* 7, 558-562.
- Leclerc, C., Becker, D., Buehr, M. and Warner, A. (1994). Low intracellular pH is involved in the early embryonic death of DDK mouse eggs fertilized by alien sperm. *Dev. Dyn.* 200, 257-267.
- Lee, S., Gilula, N. B. and Warner, A. E. (1987). Gap junctional communication and compaction during preimplantation stages of mouse development. *Cell* 51, 851-860.
- Lehtonen, E. (1980). Changes in cell dimensions and intercellular contacts during cleavage-stage cell cycles in mouse embryonic cells. *J. Embryol. exp. Morphol.* 58, 231-249.
- Levy, J. B., Johnson, M. H., Goodall, H. and Maro, B. (1986). The timing of compaction: control of a major developmental transition in mouse early embryogenesis. *J. Embryol. exp. Morphol.* 95, 213-237.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacino, J. S. and Klausner, R. D. (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 56, 801-813.

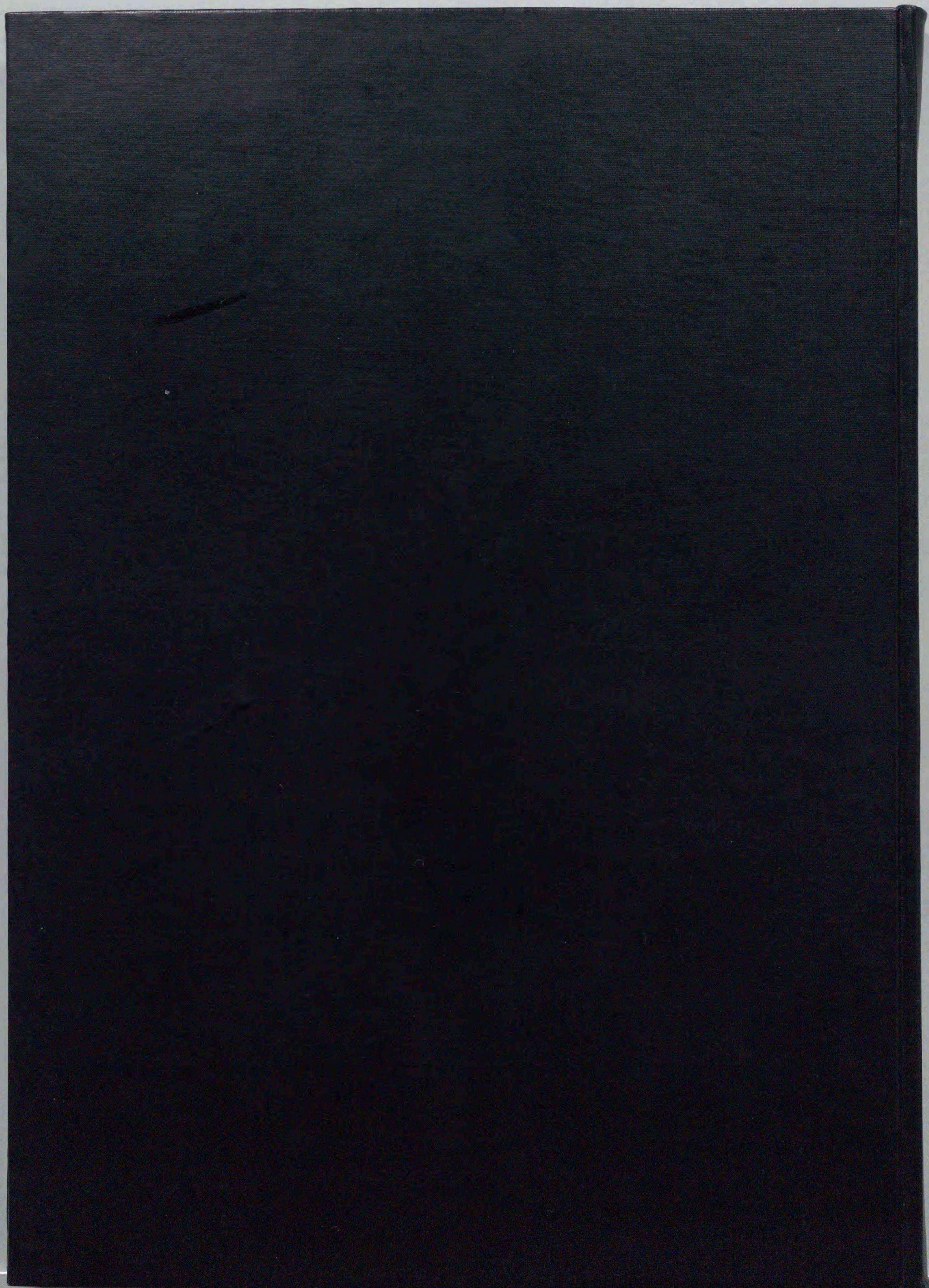
- Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J. G., Schweizer, A., Berger, E. G., Hauri, H. P., Yuan, L. C. and Klausner, R. D. (1990). Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* 60, 821-836.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L. and Klausner, R. D. (1991). Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 67, 601-616.
- Lo, C. W. and Gilula, N. B. (1979). Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo. *Cell* 18, 399-409.
- Manejwala, F. M., Kaji, E. and Schultz, R. M. (1986) Development of activatable adenylate cyclase in the preimplantation mouse embryo and a role for cyclic AMP in blastocoel formation. *Cell* 46, 95-103.
- Manejwala, F. M. and Schultz, R. M. (1989). Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: stimulation of sodium uptake by cAMP and possible involvement of cAMP-dependent protein kinase. *Dev. Biol.* 136, 560-563.
- Maro, B., Johnson, M. H., Pickering, S. J. and Louvard, D. (1985). Changes in the distribution of membranous organelles during mouse early development. *J. Embryol. exp. Morph.* 90, 287-309.
- Mayor, R. and Izuquierdo, L. (1994). Morulae at compaction and the pattern of protein synthesis in mouse embryos. *Differentiation* 55, 175-184.
- McLachlin, J. R. and Kidder, G. M. (1986). Intercellular junctional coupling in preimplantation mouse embryo: effect of blocking transcription or translation. *Dev. Biol.* 117, 146-155.
- Menino, J. A. R., Williams, J. S. and Gardiner, C. S. (1989). Development of mouse embryos in media containing lectins. *Theriogenology* 31, 821-834.
- Misumi, Y., Miki, A., Takatsuki, A., Tamura, G. and Ikehata, Y. (1986). Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 261, 11398-11403.
- Musil, L. S., Cunningham, B. A., Edelman, G. M. and Goodenough, D. A. (1990). Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J. Cell Biol.* 111, 2077-2088.
- Musil, L. S. and Goodenough, D. A. (1991). Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J. Cell Biol.* 115, 1357-1374.
- Mystkowska, E. T. and Sawicki, W. (1987). Modification of cell division by phorbol ester in preimplantation mouse embryos. *Development* 101, 403-408.
- Nishi, M., Kumar, N. M. and Gilula, N. B. (1991). Developmental regulation of gap junction gene expression during mouse embryonic development. *Dev. Biol.* 146, 117-130.
- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233, 305-312.
- Nuccitelli, R. and Wiley, L. (1985). Polarity of isolated blastomeres from mouse morulae: detection of transcellular ion current. *Dev. Biol.* 109, 452-463.

- Ohsugi, M., Ohsawa, T. and Tamamura, H. (1993). Involvement of protein kinase C in nuclear migration during compaction and the mechanism of the migration: analyses in two-cell mouse embryos. *Dev. Biol.* 156, 146-154.
- Oyamada, M., Kimura, H., Oyamada, Y., Miyamoto, A., Ohshika, H. and Mori, M. (1994). The expression, phosphorylation, and localization of connexin 43 and gap-junctional intercellular communication during the establishment of a synchronized contraction of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Exp. Cell Res.* 212, 351-358.
- Piko, L. and Clegg, K. B. (1982). Quantitative changes in total RNA, total poly(A) and ribosomes in early mouse embryos. *Dev. Biol.* 89, 362-378.
- Pratt, H. P. M. (1985). Membrane organisation in the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* 90, 101-121.
- Quinn, P., Barros, C. and Whittingham, D. G. (1982). Preservation of hamster oocyte to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 66, 161-168.
- Quinn, P., Kerin, J. F. and Warnes, G. M. (1985). Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil. Steril.* 44, 493-498.
- Reaume, A. G., De Sousa, P. A., Kulkarni, S., Langille, B. L., Zhu, D., Davies, T. C., Juneja, S. C., Kidder, G. M. and Rossant, J. (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267, 1831-1834.
- Reaves, B. and Banting, G. (1992). Perturbation of the morphology of the trans-Golgi network following brefeldin A treatment: redistribution of a TGN-specific integral membrane protein, TGN38. *J. Cell Biol.* 116, 85-94.
- Reeve, W. J. D. and Ziomek, C. A. (1981). Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: evidence for surface polarization at compaction. *J. Embryol. exp. Morph.* 62, 339-350.
- Reeve, W. J. D. (1981). Cytoplasmic polarity develops at compaction in rat and mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 62, 351-367.
- Reeve, W. J. D. and Kelly, F. (1983). Nuclear position in cells of the mouse early embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* 75, 117-139.
- Reynhout, J. K., Lampe, P. D. and Johnson, R. G. (1992). An activator of protein kinase C inhibits gap junction communication between cultured bovine lens cells. *Exp. Cell Res.* 198, 337-342.
- Rivedal, E., Yamasaki, H. and Sanner, T. (1994). Inhibition of gap junctional intercellular communication in Syrian hamster embryo cells by TPA, retinoic acid and DDT. *Carcinogenesis* 15, 689-694.
- Saez, J. C., Spray, D. C., Narin, A. C., Hertzberg, E. L., Greengard, P. and Bennet, M. V. L. (1986). cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27 KDa principal gap junction polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 2473-2476.
- Sawicki, W. and Mystkowska, E. T. (1981). Phorbol ester-mediated modulation of cell proliferation and primary differentiation of mouse preimplantation embryos. *Exp. Cell Res.* 136, 455-458.

- Schultz, G. A. (1986). Utilization of genetic information in the preimplantation mouse embryo. In *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development* (ed. J. Rossant and R. Pedersen), pp. 239-265. Cambridge: Cambridge University Press.
- Shirayoshi, Y., Okada, T. S. and Takeichi, M. (1983). The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* 35, 631-638.
- Smith, R. K. W. and Johnson, M. H. (1986). Analysis of the third and fourth cell cycles of mouse early development. *J. Reprod. Fert.* 76, 393-399.
- Sobel, J. S. (1983). Cell-cell contact modulation of myosin organization in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 100, 207-213.
- Softon, M., Johnson, M. H. and Clayton, E. (1992). Synthesis and phosphorylation of uvomorulin during mouse early development. *Development* 115, 313-318.
- Soltynska, M. S. (1982). The possible mechanism of cell positioning in mouse morulae: an ultrastructural study. *J. Embryol. exp. Morphol.* 68, 137-147.
- Spray, D. C., Ginzberg, R. D., Morales, E. A., Gatmaitin, Z. and Arias, I. N. (1986). Physiological properties of dissociated rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 103, 135-144.
- Takagi, N., Wake, N. and Sasaki, M. (1978). Cytologic evidence for preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in XX mouse blastocysts. *Cytogenet. Cell Genet.* 20, 240-248.
- Valdimarsson, G., De Sousa, P. A., Beyer, E. C. and Paul, D. L. (1991). Zygotic expression of the connexin43 gene supplies for gap junction assembly during mouse preimplantation development. *Mol. Reprod. Dev.* 30, 18-26.
- Vestweber, D., Gossler, A., Boller, K. and Kemler, R. (1987). Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev. Biol.* 124, 451-456.
- Wakasugi, N. (1973). Studies on fertility of DDK mice: reciprocal crosses between DDK and C57BL/6J strains and experimental transplantation of the ovary. *J. Reprod. Fert.* 33, 282-291.
- Warner, A. E., Guthrie, S. C. and Gilula, N. B. (1984). Antibodies to gap-junctional protein selectively disrupt junctional communication in the early amphibian embryo. *Nature (London)* 311, 127-131.
- Warren, G., Featherstone, C., Griffiths, G. and Burke, B. (1983). Newly synthesized G protein of vesicular stomatitis virus is not transported to the cell surface during mitosis. *J. Cell Biol.* 97, 1623-1628.
- Warren, G. (1985). Membrane traffic and organelle division. *Trends Biochem. Sci.* 10, 439-443.
- Winkel, G. K., Ferguson, J. E., Takeichi, M. and Nuccitelli, R. (1990). Activation of protein kinase C triggers premature compaction in the four-cell stage mouse embryo. *Dev. Biol.* 138, 1-15.
- Wood, S. A., Park, J. E. and Brown, W. J. (1991). Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes. *Cell* 67, 591-600.

Ziomek, C. A. and Johnson, M. H. (1980). Cell surface interactions induce polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell* 21, 935-942.

Zuzack, J. S. and Tasca, R. J. (1985). Lectin-induced blockage of developmental processes in preimplantation mouse embryos in vitro. *Gamete Res.* 12, 275-290.

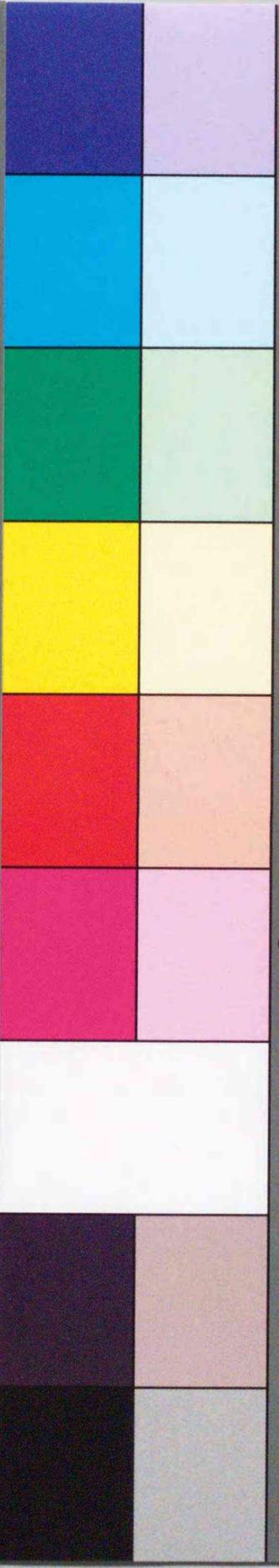


Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

