

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 Nguyen Thi Hiep

題 目 : Study on the efficient selection of porcine *in vitro* produced embryos  
and their expression of pluripotency-associated genes  
(ブタの体外生産胚の効率的な選択とその多能性関連遺伝子の  
発現に関する研究)

---

### 論文要旨 :

*In vitro* embryo production (IVEP) of porcine embryos is an important tool not only for porcine gene banking but also for human biomedical research. However, in pigs, *in vitro* fertilization (IVF) is characteristic with a high frequency of polyspermy, causing chromosomal abnormalities in embryos. Although various approaches have been tried for reduction of polyspermy in pigs, it still remains as major obstacle. Therefore, a reliable selection system for high quality embryos under polyspermy condition is essential for reproduction studies in pigs of which high polyspermy is often unavoidable.

Study on gene expression especially pluripotency-associated genes and their repositioning during embryonic genome activation (EGA) is important for embryonic development and stem cell research. However, the information about allelic expression patterns, location and repositioning of pluripotency-associated genes in mammalian embryos other than mice is little known. Although DNA/RNA fluorescence *in situ* hybridization (FISH) have been established in mouse embryos, they have not been set up in porcine embryos yet. Besides, the efficiency of FISH assays can be affected by frequency of abnormalities in embryos.

Therefore, the first study (Chapter 2) was aimed to examine the efficiency of embryo selection based on morphological features and timing of early cleavage in order to select good quality embryos under polyspermy condition. The embryos were produced by IVF under moderate and high polyspermy conditions. The 4-cell embryos were selected at 48 hr after IVF (single selection) and 8-cell embryos were selected at 79 hr after IVF from the collected 4-cell embryos (double selection). Both of single and double selection embryos showed high developmental competence to blastocyst under both moderate and high polyspermy conditions. However, blastocysts derived under high polyspermy condition had significantly fewer cells than those produced under moderate polyspermy condition. Moreover, the frequency of nuclear

and chromosomal abnormalities in 4- and 8-cell embryos produced under high polyspermy condition were significantly higher in comparison to those under moderate polyspermy condition. These findings suggest that although high polyspermy affects the frequency of anomalies in nucleus and number of chromosome in porcine embryos produced by IVF, subsequent selection based on morphological features of 4- and 8-cell embryos even under high polyspermy condition, could be an alternative option for selecting porcine embryos with high developmental ability. Furthermore, the 4- and 8-cell embryos produced under moderate polyspermy condition showed low rate of abnormalities. It would be associated improving the efficiency of DNA/RNA FISH assays which were utilized to examine allelic gene expression.

The second study (Chapter 3) was designed to evaluate the allelic expression and positioning of two pluripotency-associated genes, *OCT4* and *SOX2*, and two housekeeping genes, *ACTB* and *TUBA*, in 4- and 8-cell porcine embryos which coincide with embryonic genome activation (EGA), utilizing RNA and DNA FISH assays. The expression of *SOX2* in bi-allelism increased from 45% at the 4-cell stage to 60% at the 8-cell stage. Moreover, *SOX2* was expressed bi-allelically in 8-cell embryos in significantly more blastomeres than those of *OCT4*. Also, this was associated with a tendency that *SOX2* alleles move toward the nuclear interior during 4- to 8-cell transition. However, *OCT4* alleles did not change significantly radial location during this transition. The locations of active and inactive alleles also were measured based on DNA/RNA FISH assays. Active *OCT4* alleles were more centrally disposed in the nucleus meanwhile inactive *OCT4* alleles located in very close to the nuclear membrane. Nevertheless, active and inactive *SOX2* alleles did not change location in the nucleus in either 4- or 8-cell blastomeres. The present results provide novel information on the allelic expression patterns and positioning of pluripotency-associated genes, *OCT4* and *SOX2*, during EGA in pigs.

In conclusion, the first study demonstrated that although polyspermy affects the frequency of abnormalities in embryos, subsequent selection of 4- and 8-cell embryos based on morphological features and timing of early cleavage would be effective. This knowledge will contribute as an alternative option for selection of high developmental competence embryos produced by IVF even under high polyspermy condition. The second study revealed that the repositioning of *SOX2* alleles coincided with an increase in the percentage of blastomeres with bi-allelic expression during these stages of EGA, and the expression of *OCT4* correlated with its nuclear location. To my knowledge, it is the first study on allelic expression in mammalian embryos other than mice. The information should be useful for improvement of embryonic development as well as stem cell research.

## 学位論文審査の結果の要旨

|  |  |
|--|--|
| 氏名   | Nguyen Thi Hiep  |
| 審査委員   | 主査：農業・食品産業技術総合研究機構<br>生物機能利用研究部門<br>ユニット長 菊地 和弘  |
|  | 副査：山口大学 教授 佐藤 宏  |
|  | 副査：山口大学 教授 高木 光博   |
|  | 副査：山口大学 教授 佐藤 晃一   |
|  | 副査：鹿児島大学 教授 窪田 力   |
| 題目   | Study on the efficient selection of porcine in vitro produced embryos and their expression of pluripotency-associated genes<br>(ブタの体外生産胚の効率的な選択とその多能性関連遺伝子の発現に関する研究) |
| 審査結果の要旨：   |  |
| <p>ブタ胚の体外生産 (IVP) は、ブタにおける遺伝子バンクだけでなく、人間の生物医学研究にとっても重要なツールとして期待されている。しかし、ブタでは体外受精 (IVF) に特徴的であり、多精子の頻度が高く、胚に染色体異常を引き起こすことが知られている。ブタの多精子を減らすためにさまざまなアプローチが試みられたが、依然として重要な障害として残っている。したがって、高精子率が避けられないことが多いブタの生殖研究には、多精子条件下での高品質胚の信頼性の高い選択システムが不可欠である。</p> <p>また、遺伝子発現、特にゲノム活性化中の多能性関連遺伝子の再配置 (ポジショニング) に関する研究は、胚発生および幹細胞研究にとってたいへん重要である。ただし、対立遺伝子の発現パターン、場所、および多能性関連遺伝子の再配置に関する情報は、マウスではなく他の哺乳類の胚ではほとんど知られていない。DNA/RNA 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) は、マウス胚ではこれらの検出法として成功しており、種々の研究に利用されているが、ブタ胚では検出法としてはまだ確立されていない。また、FISH アッセイの効率性は、胚の異常の頻度によって影響を受ける可能性がある。</p> <p>したがって、最初の研究 (第2章) では、多精子条件下においても良質の胚を選択するために、形態学的特徴と早期卵割のタイミングに基づいて胚選択の効率を調べることを目的とした。中程度および高い多精子条件を示す凍結融解後の精巣上体精子を設定し、IVF によって胚を作製した。IVF 後 48 時間で選別された 4 細胞胚 (単一選択)、さらに選別された 4 細胞胚からの IVF 後 79 時間で再度選別された 8 細胞胚 (二重選択) を用いた。単一選択</p> |  |

胚と二重選択胚の両方が、中程度ならびに高い多精子条件の両方で胚盤胞に対して高い発生能力を示した。ただし、高多精子条件下で作製された胚盤胞は、中程度の多精子条件下で作製された胚盤胞よりも細胞数が大幅に少なかった、すなわち胚の品質が劣っていた。さらに、高多精子条件下で作製された 4 および 8 細胞胚の核および染色体異常の頻度は、中程度の多精子条件と比較して有意に高かった。これらの結果は、高多精子が IVF によって作製されたブタ胚の核の異常の頻度と染色体数に影響を与えるものの、高多精子条件下でも 4 細胞および 8 細胞胚の形態学的特徴に基づいたその後の選択が、高い発生能力を持つブタ胚を選択するための代替オプションになる可能性があることを示唆している。さらに、中程度の多精条件下で作製された 4 および 8 細胞胚は、染色体異常の発生率が低かった。このように正常な胚発生がより担保されている IVP 胚を利用することで、対立遺伝子発現解析のための DNA / RNA FISH アッセイの効率の改善に関連する可能性を示唆した。

そこで、2 番目の研究 (第 3 章) では、2 つの多能性関連遺伝子、*OCT4* と *SOX2*、および 2 つのハウスキーピング遺伝子 *ACTB* と *TUBA* の対立遺伝子発現とポジショニングを RNA および DNA FISH を用い、上記の手法で作製・選別された 4 細胞および 8 細胞のブタ胚で調べた。*SOX2* のバイアリズム (対立遺伝子の双発現) は、4 細胞期の 45% から 8 細胞期の 60% に増加した。さらに、*SOX2* は 8 細胞胚では *OCT4* よりもはるかに多くの割球で発現した。また、これは、4 細胞から 8 細胞への移行中に *SOX2* 対立遺伝子が核内部に移動する傾向と関連していた。一方で、*OCT4* 対立遺伝子はこの移行中に放射状に配置されており移動距離は変更しなかった。DNA / RNA FISH アッセイに基づいて、アクティブおよび非アクティブな対立遺伝子の位置も検出したところ、活動中の *OCT4* 対立遺伝子は核内でより中央に配置されていたが、不活動型 *OCT4* 対立遺伝子は核膜の非常に近くに位置していた。一方で、アクティブおよび非アクティブな *SOX2* 対立遺伝子は、4 または 8 細胞割球の核の位置は変えなかった。これらの結果より、ブタにおける胚性ゲノム活性化中の対立遺伝子発現パターンと多能性関連遺伝子、*OCT4* および *SOX2* の位置に関して新発見を提供することに成功した。

結論として、最初の研究では、多精子が胚の異常の頻度に影響を与えるものの、形態学的特徴と早期卵割のタイミングに基づく 4 細胞および 8 細胞胚のその後の選択が効果的であることを示した。この知識は、高多精子条件下でも IVF によって作製される高発育能力胚の選択のための代替オプションとして貢献する。2 番目の研究では、*SOX2* 対立遺伝子の再配置が、EGA のこれらの段階での二対立遺伝子発現を伴う割球増加の増加と一致し、*OCT4* の発現がその核の位置と相関していることを明らかにした。これはマウス以外では、哺乳類の胚における対立遺伝子発現に関する最初の研究である。今後、胚発生への改善や幹細胞研究に貢献する内容である。

以上から、本論文は博士 (獣医学) の学位を授与するにふさわしいと判断された。