

初期発生段階におけるニホンウズラの近交胚と 雑種胚でのアミノ酸の取り込み量について

河本泰生・佐藤勝紀^{a)}・木尾幹広^{b)}・ヤヌアルソ エディ ヘディアント^{c)}
猪 貴義^{d)}

(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Received June 15, 1992

Incorporation of Amino Acid into Inbred and Hybrid Embryos of Japanese Quail in the Early Developmental Stage

Yasuo KAWAMOTO, Katsunori SATO^{a)}, Mikihiro KIO^{b)}, Yanuarso Eddy
HEDIANTO^{c)} and Takayoshi INO^{d)}

(Department of Biological Function and Genetic Resources Science)

This study was undertaken to investigate the relationship between embryonic development and the incorporation of ¹⁴C-Glycine, ¹⁴C-Leucine and ¹⁴C-Glutamic acid in embryos of an inbred, hybrid and randombred population of Japanese quail in their early developmental stage.

The incorporation values of ¹⁴C-Glycine, ¹⁴C-Leucine and ¹⁴C-Glutamic acid per embryo were significantly lower in the inbred line than in the F1 hybrid and randombred population, while these values in the F1 hybrid tended to be higher than in the inbred line.

It was found that incorporation values of ¹⁴C-Glycine, ¹⁴C-Leucine and ¹⁴C-Glutamic acid related to embryonic development in all groups; that is, those values decreased when the embryonic development was delayed.

結 言

日本ウズラではきょうだい交配によって近交世代を進めた場合、初期発生段階において胚の発育遅延が増加することが明らかにされている^{1,2)}。一方近交系同志の交雑によって得られる交雑種では胚の生存性の向上と胚発育の回復、胚重量の増加が認められている。

このような初期発生過程での胚の生存性と胚発育にみられる近交退化と雑種強勢の原因についてはいまだ十分解明されていない。これらの原因追究に関連してこれまで、初期発生段階での近交胚と雑種胚のタンパク合成についてタンパク量の面から検討が加えられているが、卵黄中遊離アミノ酸の取り込みの面からは検討は加えられていない。

本研究では初期発生段階における近交群と交雑群での胚のタンパク合成能力の差異を明らかにするために、初期胚におけるアミノ酸の取り込み量について検討を加えた。

a) 家畜機能調節学講座 (Department of Animal Science and Technology)

b) 大塚製薬株式会社 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

c) インドネシア技術評価応用庁 (Bpp Teknologi, Indonesia)

d) 麻布大学客員教授 (Visiting Professor, Azabu University)

材料及び方法

本実験に供したニホンウズラは、当研究室で無作為交配によって維持している閉鎖集団から全兄妹交配によって作出した近交系 (Inbred line), これらの近交系間交雑種 (交雑群: F1 Hybrid), 及び無作為交配によって維持している閉鎖集団 (無作為交配群: Randombred) の3交配群である。近交系は4-6世代のものをを用いた。

上記の交配群から得た種卵の鋭端に穴を開け卵黄中に¹⁴C-ロイシンの水溶液10 μ l (1 μ mol, 0.25 μ Ci), ¹⁴C-グリシンの水溶液10 μ l (1 μ mol, 0.25 μ Ci), ¹⁴C-グルタミン酸の水溶液10 μ l (1 μ mol, 0.125 μ Ci)を各々マイクロシリンジで注入した。注入後, 種卵は穴を塞ぎ, 温度38.2 $^{\circ}$ C, 湿度70%の平面孵卵器で3, 4日間孵卵した。

孵卵終了後, 胚を取りだし, 発育段階を観察, 胚重量 (発育中止, 異常胚を除く) を測定した後, 胚を蒸留水でホモジナイズし, 1mlにメスアップした。得られたホモジネート液0.8mlを放射能測定用バイアルにとり, 液体シンチラント (Amersham 社製) 4mlを加え混合した後, これをシンチレーションカウンター (LSC-700, Aloka 社製) で5分間放射能を測定した。この測定値から nmol 濃度に換算して, 胚当りのアミノ酸の取り込み量を算出した。

結 果

1. グリシン, ロイシン, グルタミン酸の取り込み量

Table 1は, 近交系, 交雑群, 無作為交配群の孵卵後3, 4日目胚の発育段階とグリシンの取り込み量を示した。胚の発育段階は, いずれの孵卵日数においても, ロイシンの場合と同様, 近交系が交雑群, 無作為交配群に比べて有意に低い値を示した。しかし, 交雑群と無

Table 1 Incorporation of ¹⁴C-Glycine in embryos after 3 and 4 days of incubation

Mating group	3 days			4 days		
	N ^{a)}	Developmental stage ^{b)}	Incorporation of ¹⁴ C-Glycine (nmol/embryo)	N	Developmental stage	Incorporation of ¹⁴ C-Glycine (nmol/embryo)
Inbred	26	19.4 \pm 0.3 ^{c)} a ^{d)}	12.0 \pm 1.4a	26	24.5 \pm 0.2a	48.4 \pm 3.5a
F1 Hybrid	26	20.2 \pm 0.1b	15.7 \pm 1.0b	24	25.0 \pm 0.1b	57.5 \pm 2.7b
Randombred	26	20.4 \pm 0.1b	16.8 \pm 1.2b	25	25.2 \pm 0.1b	58.9 \pm 3.4b

a) Number of embryos.

b) Normal stage of chick embryos (Hamburger, V. & H. L., Hamilton)⁴⁾.

c) Mean \pm S. E.

d) Means of different letters in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

Table 2 Incorporation of ¹⁴C-Leucine in embryos after 3 and 4 days of incubation

Mating group	3 days			4 days		
	N ^{a)}	Developmental stage ^{b)}	Incorporation of ¹⁴ C-Leucine (nmol/embryo)	N	Developmental stage	Incorporation of ¹⁴ C-Leucine (nmol/embryo)
Inbred	27	18.7 \pm 0.5 ^{c)} a ^{d)}	28.9 \pm 2.6a	20	24.7 \pm 0.2a	68.5 \pm 3.6
F1 Hybrid	26	19.9 \pm 0.3b	32.0 \pm 2.7a	20	25.3 \pm 0.2b	77.8 \pm 2.9ab
Randombred	31	20.9 \pm 0.2c	42.4 \pm 2.1b	28	25.6 \pm 0.1b	80.4 \pm 2.4b

a) Number of embryos.

b) Normal stage of chick embryos (Hamburger, V. & H. L., Hamilton)⁴⁾.

c) Mean \pm S. E.

d) Means of different letters in the same row are significantly different ($p < 0.01$).

Table 3 Incorporation of ¹⁴C-Glutamic acid in embryos after 3 and 4 days of incubation

Mating group	3 days			4 days		
	N ^{a)}	Developmental stage ^{b)}	Incorporation of ¹⁴ C-Glutamic acid (nmol/embryo)	N	Developmental stage	Incorporation of ¹⁴ C-Glutamic acid (nmol/embryo)
Inbred	24	18.5±0.5 ^{c)a^{d)}}	3.31±0.34a	21	24.4±0.3a	7.15±0.18a
F1 Hybrid	23	19.1±0.3a	3.64±0.49a	26	25.1±0.2a	8.73±0.61ab
Randombred	26	19.9±0.1a	4.93±0.40b	22	25.7±0.1b	9.58±0.77b

a) Number of embryos.

b) Normal stage of chick embryos (Hamburger, V. & H. L., Hamilton)⁴⁾.

c) Mean±S. E.

d) Means of different letters in the same row are significantly different (p<0.01).

Table 4 Relationship between developmental stage and incorporation values of ¹⁴C-Glycine into embryos after 3 days of incubation

Mating group	Developmental stages ^{a)}		
	15~18	19~21	21
Inbred	(8) ^{b)} 4.1 ^{c)}	(9) 13.4	(9) 17.5
F1 Hybrid	(0) —	(18) 13.9	(8) 19.6
Randombred	(0) —	(15) 14.2	(11) 20.5

a) Normal stage of chick embryos (Hamburger, V. & H. L., Hamilton)⁴⁾.

b) Number of embryos.

c) Mean.

作為交配群の間には有意差は見られなかった。グリシンの取り込み量は、いずれの孵卵日数においても、近交系が無作為交配群に比べて有意に低い値を示したが、交雑群はいずれの孵卵日数においても無作為交配群に近い値を示した。

Table 2は近交系、交雑群、無作為交配群の孵卵後3、4日目胚の発育段階とロイシンの取り込み量を示した。ロイシンの取り込み量は、いずれの孵卵日数においても、近交系が無作為交配群に比べて有意に低い値を示した。交雑群は、近交系と無作為交配群の中間の値を示し、孵卵3日目では、無作為交配群との間に有意差が見られたが、孵卵4日目ではこの差は有意でなくなった。

Table 3は近交系、交雑群、無作為交配群の孵卵後3、4日目胚の発育段階とグルタミン酸の取り込み量を示した。胚の発育段階は、いずれの孵卵日数においても、他のアミノ酸と同様、近交系が交雑群、無作為交配群に比べて有意に低い値を示した。グルタミン酸の取り込み量は、ロイシンの取り込み量の場合と同様、いずれの孵卵日数においても、近交系が無作為交配群に比べて有意に低い値を示した。交雑群は、近交系と無作為交配群の中間の値を示し、孵卵3日目では、無作為交配群との間に有意差が見られたが、孵卵4日目ではこの差は有意でなくなった。

2. 胚の発育段階とアミノ酸の取り込み量との関係

Table 4は胚の発育段階とグリシンの取り込み量との関係を示した。発育段階は3段階に分けて検討した。

表から明かなように、近交系は無作為交配群に比べて、発育の遅延した胚の割合が多い傾向を示した。グリシンの取り込み量は、いずれの群においても、胚発育の進んだ胚ほど高く、一方発育の遅延した胚ほど低くなる傾向が見られた。同じ発育段階にある胚へのグリシン取

Table 5 Relationship between developmental stage and incorporation values of ¹⁴C-Leucine into embryos after 3 days of incubation

Mating group	Developmental stages ^{a)}				
	13~17	18~19	20	21~22	23~24
Inbred	(8) ^{b)} 17.2 ^{c)}	(5) 23.6b ^{d)}	(9) 32.4b	(5) 46.5b	(0) —
F1 Hybrid	(3) 15.6	(5) 20.5b	(12) 32.2b	(6) 49.5b	(0) —
Randombred	(0) —	(1) 36.4a	(14) 36.4a	(45) 45.8a	(3) 57.3

a) Normal stage of chick embryos (Hamburger, V. & H. L., Hamilton)⁴⁾.

b) Number of embryos.

c) Mean.

d) Means of different letters in the same row are significantly different ($p < 0.01$).**Table 6** Relationship between developmental stage and incorporation values of ¹⁴C-Glutamic acid in embryos after 3 days of incubation

Mating group	Developmental stages ^{a)}			
	13~17	18~19	20	21~22
Inbred	(6) ^{b)} 1.75 ^{c)}	(9) 4.32b ^{d)}	(6) 3.56b	(3) 2.88a
F1 Hybrid	(4) 2.40	(6) 3.61a	(13) 4.04a	(0) —
Randombred	(0) —	(4) 4.35ab	(20) 4.73a	(2) 8.05b

a) Normal stage of chick embryos (Hamburger, V. & H. L., Hamilton)⁴⁾.

b) Number of embryos.

c) Mean.

d) Means of different letters in the same row are significantly different ($p < 0.01$).

り込み量について見ると、いずれの発育段階においても交配群間には有意の差は見られなかったが、近交系が無作為交配群に比べて低い傾向を示した。

Table 5は胚の発育段階とロイシン取り込み量との関係を示した。発育段階は5段階に分けて検討した。表から明かのように、近交系は無作為交配群に比べて、発育の遅延した胚の割合が多かった。ロイシンの取り込み量は、いずれの群においても、胚発育の進んだ胚ほど高く、一方発育の遅延した胚ほど低くなる傾向が見られた。同じ発育段階にある胚へのロイシン取り込み量について見ると、発育段階20までは、近交系が無作為交配群に比べて有意に低い値を示した。しかし、交雑群は各発育段階とも近交系と類似した値を示した。

Table 6は胚の発育段階とグルタミン酸の取り込み量との関係を示した。発育段階は4段階に分けて検討した。表から明らかのように、近交系は無作為交配群に比べて、発育の遅延した胚の割合が多かった。グルタミン酸の取り込み量は、いずれの群においても、胚発育の進んだ胚ほど高く、一方、発育の遅延した胚ほど低くなる傾向が見られた。同じ発育段階にある胚でのグルタミン酸の取り込み量について見ると、発育段階20では、近交系が無作為交配群に比べて取り込み量が少ない傾向にあった。

考 察

初期胚における¹⁴C-ロイシン、グリシン、グルタミン酸の取り込み量は近交系が交雑種、無作為交配群に比べて有意に低い値となり、近交胚ではタンパク合成に必要なアミノ酸の取り込みが抑制されることが明らかになった。

これまで、ニホンウズラではもちろんのこと鶏でも近交初期胚におけるアミノ酸の取り込みについてはほとんど検討されていない。

一般的には、アミノ酸は細胞の成長、構成物質の補給、修繕および酵素の維持に必要なタンパク質の素材となる³⁾。また、アミノ酸の一部は核酸ヘム（血色素の構成成分）、メラニン類などに転化する。さらに、アミノ酸は脱アミノ化後、TCA 回路に投入されてエネルギー源として利用される。このようにアミノ酸は胚発育にとって体タンパク質、エネルギーの供給などの重要な役割を果たしている。

本実験ではアミノ酸のうち、グリシン、ロイシン、グルタミン酸の3つを取り上げたが、グリシンはアミノ酸のなかで最も簡単な化学構造を持ち、ロイシンは胚発育との関連性が示唆されている^{5,6)}。グルタミン酸はニホンウズラの卵黄中に最も多く含まれているアミノ酸である⁷⁾。近交胚でのこれらのアミノ酸の取り込み量の減少は卵黄中の遊離アミノ酸量の不足や胚での取り込み能の減退などが考えられる。一方、雑種胚での卵黄中のアミノ酸量の増加は胚での取り込み能の行進に起因したものと考えられる。

本実験において胚発育とアミノ酸の取り込み量との関係について検討した結果、近交系で多くみられた発育遅延胚ではこれらの取り込み量が少なく、胚発育とアミノ酸の取り込み量との間に密接な関連のあることが明らかとなっている。

また、交雑種での胚のアミノ酸の取り込み量について無作為交配群と比較してみると、いずれの場合も交雑種では無作為交配群に比べて低い値を示している。このことはアミノ酸の取り込み能に母体効果が関与していることを示唆しているが、今後近交系と無作為交配群との正逆交配などを作出して、検討を加える必要がある。

本実験の結果とこれまでの報告から推察して、近交胚ではタンパク合成能力の低下がみられ、その結果として、初期発生段階での胚の発生と分化が支障をきたし、胚発育遅延、発育異常さらには胚死亡が誘導されたものと考えられる。一方、雑種胚ではタンパク合成能力に関連する代謝機能が亢進し、胚発育の回復が認められたものと推察される。

摘 要

本研究は、ニホンウズラの近交系、交雑群、無作為交配群の初期胚におけるアミノ酸の取り込み量について検討した。取り上げたアミノ酸はグリシン、ロイシン、グルタミン酸である。

結果は要約すると、以下の通りである：

1. 近交系、交雑群、無作為交配群における孵卵後3、4日目の胚での¹⁴C-グリシン、¹⁴C-ロイシン、¹⁴C-グルタミン酸の取り込み量を検討した。その結果、近交系でのこれらの取り込み量は、いずれの孵卵日数においても交雑群、無作為交配群に比べて低い値を示した。しかし、交雑群での取り込み量は近交系よりも高い傾向を示した。

2. 孵卵後3日目胚での胚発育段階と¹⁴C-グリシン、¹⁴C-ロイシン、¹⁴C-グルタミン酸の取り込み量の関係について検討した結果、いずれの交配群においても、取り込み量は胚発育の進んだ胚ほど高く、一方胚発育の遅延した胚では低い値を示した。

謝 辞

この研究は、平成元年度から3年度までの3年間にわたる岡山大学学内特定研究『生物生産のための細胞選抜と細胞育種』を分担して行ったものである。

研究を進めるに当たり、有益なご指導とご助言を賜った岡山大学農学部多田幹郎教授、RI 共同利用津島施設蜂谷欽司助手に深謝の意を表す。なお、本研究は RI 共同利用津島施設において実施されたものである。

文 献

- 1) Berniel, P. E., L. W. Taylor and C. A. Gunns : The relative effects of inbreeding and outbreeding on reproduction in the domestic fowl. *Hilgardia*. 20, 529-628 (1951)

- 2) Kranowska, H. : Early embryonal growth in inbred lines of Brown Leghorn and their crosses. *Poult. Sci.* **38**, 1446—1455 (1959)
- 3) 真島英信 : 生理学 (改訂第 8 版) 文光堂, 東京 (1986)
- 4) Hamburger, V. and H. L. Hamilton : A series of normal stages in the development of the chick embryos. *J. Morphol.* **88**, 49—92 (1951)
- 5) Klein, N. W., E. McConnel and B. J. Buckingham : Growth of explanted chick embryo on a chemically defined medium and effects of specific amino acid. *Develop. Biol.* **5**, 296—308 (1962)
- 6) Deuchar, E. M. : Relation between somite segmentation rate and ATP-ase activity in early chick embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* **8**, 259—267 (1960)
- 7) 小川義文 : ニホンウズラの近交退化現象と初期発生段階での卵黄中遊離アミノ酸, 胚タンパク質, 核酸量について. 岡山大学大学院農学研究科修士論文 (1985)