

マウス卵母細胞におけるクロマチン形態と成熟能および発生能の関連

2008年3月修了

先端生命科学専攻 資源生物制御学分野

学生証番号 66506 氏名 井上梓

指導教員 青木不学准教授

Keywords; 成長卵、成熟能、発生能、クロマチン形態

【序論】

哺乳類の卵母細胞は第一減数分裂前期で減数分裂を停止したまま卵巣内で成長し、その容積は100倍以上にまで増加する。性成熟した哺乳類の卵巣には成長を終えた卵(成長卵)が存在し、ホルモン刺激を受けて減数分裂を再開し、第二減数分裂中期(MII期)に至る(卵成熟)。次いで、受精をきっかけに減数分裂を完了した後、有糸分裂を繰り返して発生する。卵母細胞は成長中に、卵成熟や受精後の発生に必要な数多くの mRNA やタンパク質を蓄積する。このとき卵成熟をおこなう能力(成熟能)および受精後の発生を遂行する能力(発生能)を獲得するが、成長を終えたすべての卵が十分な成熟能および発生能を有しているわけではない(図1)。すなわち、これらの能力は個々の成長卵によって違いがある。そのため、特に畜産分野や医療分野において、成熟能および発生能の高い卵を得ることは非常に重要であり、注目を集めている。しかしながら、これらの能力を決定している要因に関しては未解明な部分が多く、特に発生能に関してはその解析モデルが乏しく、その実体はまったく明らかにされていない。

現在までに、成熟能および発生能は成長卵のクロマチン形態と高い相関があることが、ヒトを含むさまざまな哺乳類で知られている。マウスの成長卵のクロマチン形態にはSN(Surrounded Nucleolus)型とNSN(Non-Surrounded Nucleolus)型の2種類があり、SN型はクロマチンが核小体を取り囲み凝集するような形態で、NSN型は核小体を取り囲まずに核内に一様に広がった形態のことをいう(図2)。SN型核を持つ成長卵(SN卵)はNSN型核を持つ成長卵(NSN卵)に比べて高い成熟能および発生能を有している。本研究では、成長卵における成熟能および発生能の決定要因を調べることを目的とし、クロマチン形態と成熟能および発生能の関連を解析した。

【結果・考察】

1. SN卵とNSN卵の選別方法の確立

SN卵とNSN卵の選別には従来、ヘキストを用いてDNA染色をおこない可視化する方法しか用いられていなかった。しかしこの方法はUV照射を伴うために、卵のDNAを傷つけ、成熟能および発生能を低下させていた。本章では卵に悪影響を及ぼすことなくSN卵とNSN卵を選別する方法を確立した。成長卵を採卵後、自発的な減数分裂再開を

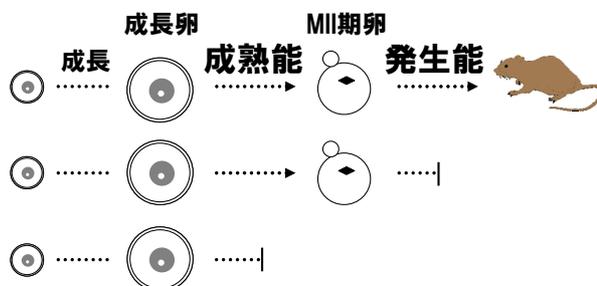


図1. 成長卵の成熟能と発生能

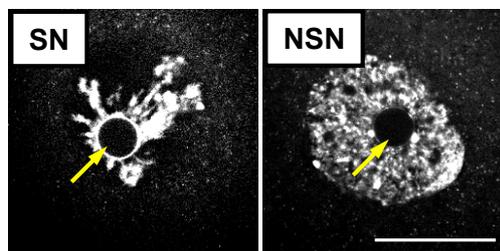


図2. 成長卵のクロマチン形態
矢印は核小体を示す。バーは20 μm。

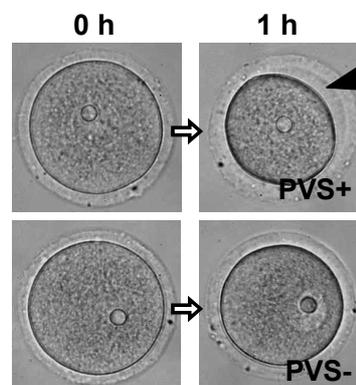


図3. 成長卵の卵卵腔形成
矢頭は卵卵腔 (PVS) を示す。バーは20 μm。

阻害する試薬 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) を含む培地に静置すると、囲卵腔(透明帯と細胞膜の間の空間;PVS)を形成するものが現われた(図3)。その出現率は 60 分でほぼ最大(約 70%)となった。IBMX 存在下の 60 分間の培養で囲卵腔を形成したもの (PVS+)は 93%が SN 型であったのに対し、囲卵腔を形成しなかったもの (PVS-)は 100% NSN 型であった。IBMX 存在下の 60 分間の培養は卵の成熟能および発生能を低下させないことを確認した。このように、囲卵腔を基準として、卵に悪影響を与えずに SN 卵と NSN 卵を選別する方法を確立した。次章の実験はこの新規の選別法を用いておこなった。

2. 成長卵におけるクロマチン形態と成熟能および発生能の関連

成長卵におけるクロマチン形態と成熟能の関連を調べるために、顕微操作により SN 卵と NSN 卵の核を交換し、以下のような核移植卵を作製した(図4);(1) SN 核/SN 細胞質、(2) NSN 核/SN 細胞質、(3) SN 核/NSN 細胞質、(4) NSN 核/NSN 細胞質。これらの核移植卵の成熟率を調べたところ、(1)から(4)の順でそれぞれ、84%、88%、20%、26%であった。この結果から、SN 卵と NSN 卵の成熟能の違いは、クロマチン形態ではなく細胞質因子により決定されていることが示された。続いて (1)、(2) の受精後の発生率を調べたところ、胚盤胞期まで達した胚の割合は、(1) 83%、(2) 4%であった。この結果から、SN 卵と NSN 卵の発生能の違いは、クロマチンを含む核により決定されていることが示された。次に、成長卵のクロマチンと核質に存在する核内因子のどちらがこれらの卵に発生能の違いを生み出しているのかを検証するために、(2) に SN 卵の核内因子を補うことを試みた。成長卵の核内因子は卵核胞崩壊にともなって卵全体に拡散するため、MII 期卵の細胞質にはそれが十分に存在する。体外成熟後の (2) の MII 期染色体を SN 卵の核内因子を含む MII 期卵の細胞質に移植したところ、その発生能は回復し、正常に個体まで発生した(図4;点線内)。これらの結果から、SN 卵と NSN 卵の発生能の違いは、クロマチン形態ではなく核質に存在する核内因子により決定されていることが示された。

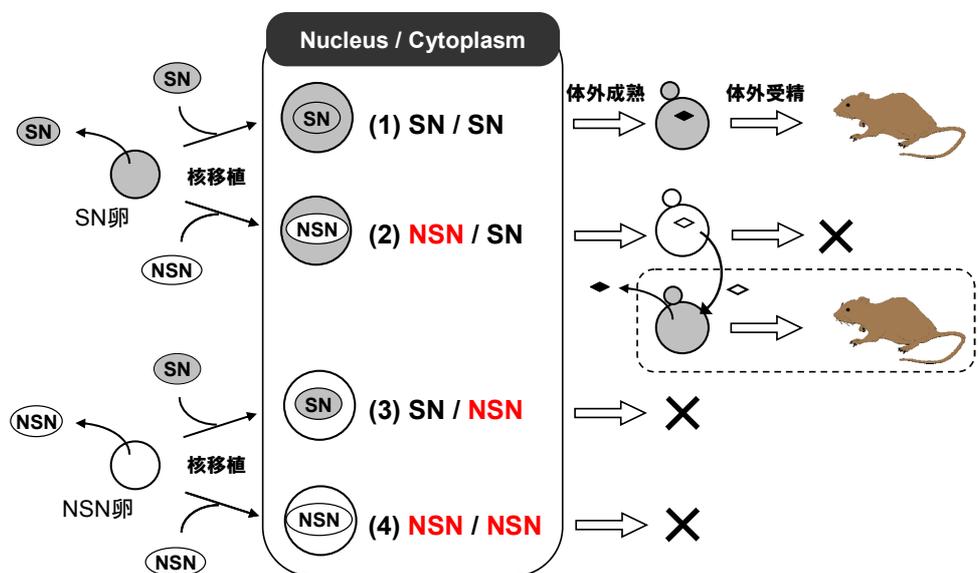


図4. 核移植実験の方法と結果の概要

【結論】

SN 卵と NSN 卵はクロマチン形態だけでなく細胞質内因子も核内因子も異なり、細胞質内因子の違いが卵の成熟能を、卵核胞崩壊に伴い細胞質に拡散される核内因子の違いが発生能を決定していることが明らかとなった。これまで成熟能や発生能に重要と考えられていた SN 型のクロマチンは、これらのいずれにも必要ないことが示された。さらに、卵子に成熟能や発生能が欠けていることが原因の不妊症の事例も知られており、これらの能力を持たない NSN 卵から産仔を得られたことは、医療分野に大きく貢献する成果であるといえる。