

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

先端生命科学専攻 資源生物制御学分野

66506 井上 梓

指導教員 青木 不学

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。

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

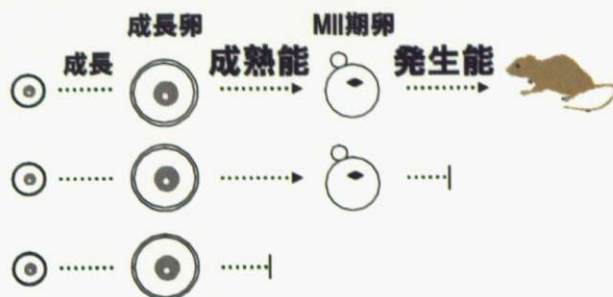


図1. 成長卵の成熟能と発生能

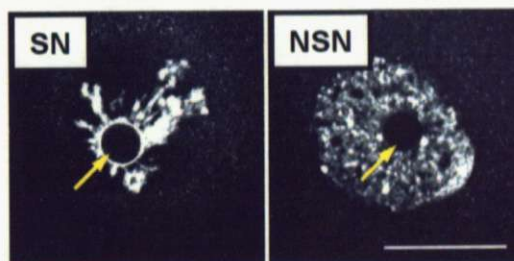


図2. 成長卵のクロマチン形態
矢印は核小体を示す。バーは20 μm。

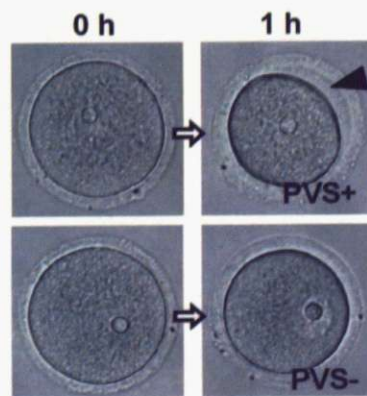


図3. 成長卵の圍卵腔形成
矢頭は圍卵腔(PVS)を示す。バーは20 μm。

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。

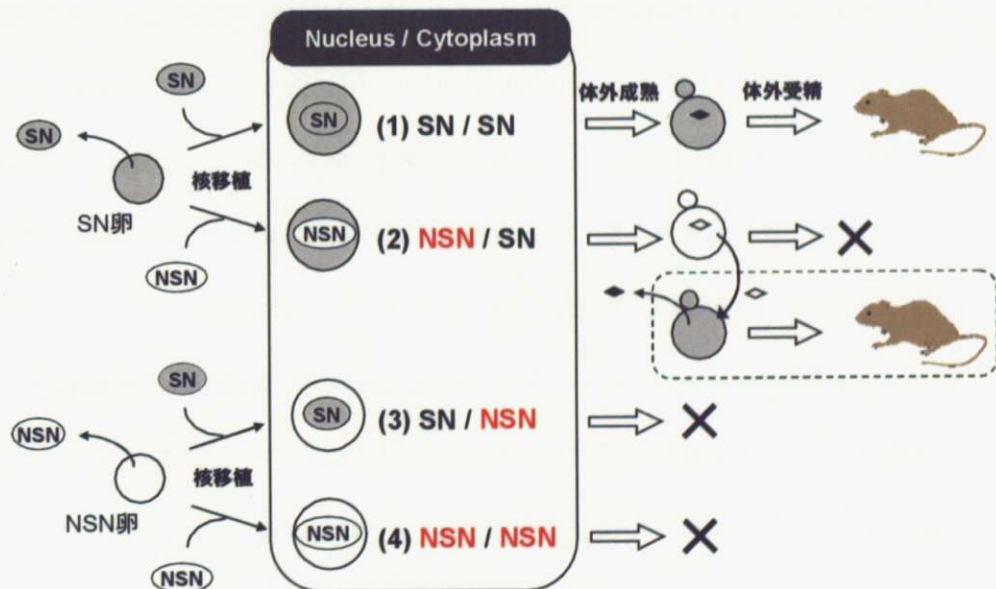


図4. 核移植実験の方法と結果の概要

【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。

Summary

Mammalian oocytes progressively acquire meiotic and developmental competence during their growth in the ovaries. However, all of full-grown oocytes (FGOs) are not able to accomplish meiotic maturation or achieve preimplantation development; some FGOs possess competence for full-term development, but others do not. The factors determining meiotic and developmental competence of oocytes are unknown.

The chromatin configuration of FGOs has been reported to be associated with meiotic and developmental competence in several mammals, including human. In mice, two types of FGOs are known; those with germinal vesicles (GVs) in which the chromatin is condensed and surrounds the nucleolus (SN-type), and those in which the chromatin is less condensed and does not surround the nucleolus (NSN-type). Although SN oocytes possess higher meiotic and developmental competence than NSN oocytes, the determinants underlying this difference are unknown. The purpose of this study is to examine the contribution of chromatin configuration to the determination of meiotic and developmental competence in oocytes.

I first established a method for distinguishing between SN and NSN oocytes, without injury to the oocytes. In previous studies, the classification of SN- and NSN-oocytes was performed by DNA staining with Hoechst. However, this method needs to have oocytes exposed with ultraviolet light to visualize the fluorescence, resulting in a decrease in meiotic and developmental competence of them. In this study, I found that FGOs could be classified into two groups using the criterion of formation of the perivitelline space (PVS), the space between the surface of the oocyte and the zona pellucida, after culturing with 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) for 1 h. In oocytes with a PVS, actin-filled projections within zona pellucidae originating from cumulus cells were reduced, while they were rich in oocytes without a PVS, suggesting that the reduction of those projections contributes to PVS formation. There was a very high correlation between PVS formation and chromatin configuration. More than 90% of oocytes that form a PVS had a GV with the SN-type

configuration, while all of the oocytes that lack a PVS had a GV with the NSN-type configuration. The treatment with IBMX for 1 h had no detrimental effect on accomplishment of meiosis or preimplantation development. Therefore, PVS formation was used as an index to distinguish SN oocytes from NSN ones in the following experiments.

To determine which factors in the cytoplasm or nucleus contribute to meiotic and developmental competence in FGOs, I exchanged the nuclei of SN and NSN oocytes. The nucleus/cytoplasm of each reconstructed oocytes was classified as follows: SN/SN, NSN/SN, SN/NSN, or NSN/NSN. After reconstruction, the meiotic competence of the oocytes was analyzed. Few mature SN/NSN and NSN/NSN oocytes were observed (20–26%), whereas 88% of the NSN/SN oocytes matured, which is comparable to the percentage for the SN/SN oocytes (84%). These results demonstrated that cytoplasmic factor(s), and not the chromatin configuration, is involved in the determination of meiotic competence. Next, they were fertilized following *in vitro* maturation and their developmental competence was analyzed. The NSN/SN oocytes rarely developed to the blastocyst stage (4%), whereas most of the SN/SN oocytes reached the blastocyst stage (83%). These results clarified that developmental competence is determined by the nucleus. When the MII plates of *in vitro*-matured NSN/SN oocytes were transferred into enucleated MII oocytes in which the contents of the SN-type GVs were spread into the cytoplasm, most of them become enable to develop to the blastocyst stage (76%) and completed full-term development. These results suggest that factor(s) contained in the GV, and not the chromatin configuration, is involved in the determination of developmental competence. Thus, the differences in meiotic and developmental competence among FGOs are determined by factors in the cytoplasm and nucleus, respectively. In addition, material(s) within SN-type GVs, but not the SN-type chromatin configuration, is essential for full-term development.

目次

要旨	1
緒言	3
材料と方法	6
1. SN 卵と NSN 卵の選別方法の確立	
結果	10
考察	14
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	
結果	16
考察	20
謝辞	25
参考文献	26
図表	33

要旨

卵母細胞は成長過程で、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(発生成)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成を有しているわけではない。成長卵の成熟能および発生成は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。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成を有している。しかしながら、SN 卵と NSN 卵にこれらの能力の違いを生み出す要因はまったく明らかにされていない。本研究では、クロマチン形態の違いが成熟能および発生成に与える影響を調べることで、卵母細胞の成熟能と発生成の決定要因を明らかにすることを目的とした。

第一章では、SN 卵と NSN 卵の選別法を確立した。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、成熟能および発生成を低下させていた。本項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。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 80.1%が卵成熟を完了した一方で、囲卵腔を形成しなかったもの (PVS-)は 5.5%にとどまった。また、クロマチン形態に関して、PVS+は 90.5%が SN 型であったのに対し、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、囲卵腔を基準とした SN 卵と NSN 卵の新規の選別法を用いて次章の実験をおこなった。

第二章では、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を解析した。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；(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。このことから、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明らかになった。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、発生能を持たない (2) の卵に 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細胞質に拡散するため、MII 期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。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。以上のように、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く、成熟能は細胞質因子により、発生能は核内因子により決定されていることが明らかとなった。

緒言

卵形成は次世代の生命を創り出す重要な過程である。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。例えばマウスでは、出生直後の雌の卵巣にある卵は直径が15-20 μm であるが、性成熟した雌においては75-80 μm にまで成長する。この時期の卵は卵核胞 (Germinal Vesicle; GV) と呼ばれる核を持ち、その大きさも卵の成長とともに増大する。成長を終えた卵を成長卵といい、ホルモン刺激を受けて減数分裂を再開し、卵核胞崩壊 (Germinal Vesicle Breakdown; GVBD) の後、第一極体を放出し、第二減数分裂中期 (Metaphase II; MII) で再停止する。この一連の過程は卵成熟と呼ばれる。受精をきっかけに第二極体を放出して減数分裂を完了し、母方ゲノムと父方ゲノムを別々に保有する2つの前核を持つ1細胞期胚となる (Fig. 1)。

卵は成長中に、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 (Sorensen and Wassarman, 1976, Eppig and Schroeder, 1989, Erdogan *et al.*, 2005)、成長を終えたすべての卵が成熟能および発生能を有しているわけではない。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、成長卵のクロマチン形態と成熟能に相関があることが、ヒトを含むさまざまな哺乳類で知られている (Mouse, Zuccotti *et al.*, 1998; Porcine, Sun *et al.*, 2004; Bovine, Liu *et al.*, 2006; Canine, Lee *et al.*, 2006; Monkey, Schramm *et al.*, 1993; Human, Combelles *et al.*, 2002)。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 (Fig. 2)。15 日齢以下のマウス卵巣における成長中のすべての卵は NSN 型の核を持つが、それ以降 SN 型に変化する卵と NSN 型のまま成長する卵とが存在する (Zuccotti *et al.*, 1995)。性成熟したマウスでは、卵胞刺激ホルモンの作用で SN 型核を持つ成長卵 (SN 卵) の割合が増加することや (Zuccotti *et al.*, 1995)、排卵直前の発達した卵胞で SN 卵が多く見られることが知られており (Mattson and Albertini, 1990)、卵胞の卵胞腔形成の前後で NSN 型のクロマチンが SN 型に変化すると考えられている (De La Fuente, 2006)。NSN 型核を持つ成長卵 (NSN 卵) は SN 卵とほとんど変わらない大きさであるが、その成熟能は SN 卵よりも低い (Zuccotti *et al.*, 1998, 2002, Liu and Aoki, 2002)。さらに受精後、SN 卵は高い割合で胚盤胞期まで発生できるが、NSN 卵は 2 細胞期以降発生できないことがマウスにおいて報告されている (Zuccotti *et al.*, 2002)。このように、SN 卵は NSN 卵に比べて高い成熟能および発生能を有している。

クロマチン形態以外にも、マウスの SN 卵と NSN 卵の間にはさまざまな違いが知られている。例えば、NSN 卵には転写活性があるが、SN 卵は転写を完全に停止している (Bouniol-Baly *et al.*, 1999, Miyara *et al.*, 2003)。他にも、SN 卵では M 期特異的リン酸化タンパク MPM-2 がリン酸されていることや (Wickramasinghe and Albertini, 1992)、SN 卵の核周囲には微小管形成中心が存在するが、NSN 卵にはそれが形成されないこと (Can *et al.*, 2003)、SN 卵の核小体は NSN 卵よりも緊密であること (Debey *et al.*, 1993)、SN 卵細胞膜の微柔毛はより密でより短いことなどが挙げられる (Cecconi *et al.*, 2006)。さらに、ゲノム全体の DNA のメチル化やヒストンのアセチル化、ヒストンのメチル化などのエピジェネティック修飾レベルは SN 卵の方が高いことも知られている (Kageyama *et al.*, 2007)。このように、SN 卵と NSN 卵は細胞質、核、エピジェネティクスに関するさまざまな性質が異なっている。しかし、両者間に成熟能および発生能の違いを与えている因

子はまったく知られていない。

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、これらの能力が大きく異なる SN 卵と NSN 卵に着目した。第一章では、DNA を染色せずに成長卵を SN 卵と NSN 卵に選別する方法を確立した。従来の研究では、ヘキストを用いた DNA 染色をおこなってクロマチン形態を判別する方法しか用いられていなかったが (Zuccotti *et al.*, 1998, 2002, Liu and Aoki, 2002)、この方法は UV 照射をとまなうために卵の活性を大きく低下させていた (Bradshaw *et al.*, 1995, Velilla *et al.*, 2002)。本選別法により卵の活性に悪影響を及ぼすことなく SN 卵と NSN 卵を選別することが可能になった。第二章では、顕微操作により SN 卵と NSN 卵の間で核交換を行うことで、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。

材料と方法

成長卵の採取と体外成熟

8-12 週齢の BDF1 雌マウス (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を頸椎脱臼法により屠殺後、卵巣を取り出し 1 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA; Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.2 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む KSOM-HEPES 培地 (Lawitts and Biggers, 1993) に移した。卵巣内の卵胞を注射針で破壊した後、ガラスピペットを用いたピペッティングにより卵周囲の卵丘細胞を取り除いた。直径 75 μm 以上の卵のみ成長卵として用いた。続いて、採取した成長卵を 5% Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma-Aldrich), 10 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF; Sigma-Aldrich), 0.2 mM IBMX を含む α -MEM 培地 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) に移した。体外成熟をおこなう際は、上記より IBMX を除いた α -MEM 培地で成長卵を 5 回以上洗い、炭酸ガスインキュベータ (5% CO_2 / 95% air, 38°C) 内で 16-18 時間培養した。

体外受精

リタイア ICR 雄マウス (SLC Japan Inc., Shizuoka, Japan) の精巣上体尾部から精子を採取し、受精能を獲得させるために 10 mg/ml BSA を含む HTF 培地 (Quinn and Begley, 1984) で 2 時間前培養した。体外成熟を完了し、第二減数分裂中期に到達した卵を HTF 培地に移して、媒精した。媒精 6 時間後、受精卵を KSOM 培地に移して培養を継続した。媒精 8 時間後に実体顕微鏡下で前核を 2 つ有する卵のみ選択し、単為発生卵や多精子受精卵をその後の解析から除いた。培養は全て炭酸ガスインキュベータ内でおこなった。

単為発生胚の作出

単為発生用培地として、塩化カルシウムの代わりに 10 mM 塩化ストロンチウムを加えた Whitten 培地 (Whitten, 1971) を用いた。第二極体の放出を防ぐことで 2 倍体の雌性単為発生胚を作出するために、最終濃度 5 $\mu\text{g/ml}$ のサイトカラシン B (CB; Sigma-Aldrich) を添加した。体外成熟を完了し、第二減数分裂中期に到達した卵を上記の単為発生用培地に移し、90-120 分培養した。続いて、塩化ストロンチウムを含まずに塩化カルシウムと CB を含む Whitten 培地に卵を移してさらに 4 時間培養した。活性化 6 時間後、2 つの前核を有する卵のみ選択し、KSOM 培地に移して培養を継続した。

成長卵直径と透明帯内径の測定

成長卵採取後、IBMX を含む α -MEM 培地に卵を 1 つ 1 つ移してナンバリングし、すぐに写真を撮った。ここまでの操作を 10 分以内で終わることができる程度の個数 (15-20 個) を一回の実験で扱った。1 時間の培養後、再びそれらを撮影した。培養前と後の卵の写真をプリントアウトして、透明帯を含まない卵細胞質の直径と、透明帯の内径を測定した。楕円形の卵に関しては、長径と短径を測定し平均した。

免疫染色

リン酸緩衝液 (Phosphate Buffered Saline; PBS) に最終濃度 3.7% のパラホルムアルデヒドを加えたものを卵サンプルの固定液として用いた。卵を固定液で室温 1 時間処理した後、1 mg/ml BSA を含む PBS (PBS/BSA) で卵を洗った。次に 0.5% Triton X-100 を含む PBS/BSA 中で室温 15 分間、50 $\mu\text{g/ml}$ RNase (Roche, Indianapolis, IN, USA) を含む PBS/BSA 中で室温 40 分間処理した。アクチンフィラメントの蛍光染色には、0.2 $\mu\text{g/ml}$ Fluorescein-phalloidin (Sigma-Aldrich) を含む PBS/BSA 中で 37°C、90 分間処理した。アセチル化ヒストン H4 の免疫染色には、PBS/BSA で 100 倍希釈した抗アセチル化ヒストン H4 抗体 (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA) を用いて室温 60 分間一次抗体処理をおこない、続いて 50 倍希釈した FITC 標識二次抗体

(Jackson Immuno-Research, West Grove, PA, USA) を室温で 60 分間反応させた。PBS/BSA で洗浄後、卵を Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) に移して標本を作製した。DNA 染色のために、Vectashield には最終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ の Propidium Iodide (Sigma-Aldrich) を添加した。蛍光観察には、Zeiss 社の共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Oberkochen, Germany) を用いた。

GV 核交換

全ての顕微操作は 0.2 mM IBMX を含む KSOM-HEPES 培地でおこなった。最初に成長卵の透明帯に穴を開けるために、内径約 5 μm のマイクロピペットにあらかじめ酸性 MEMCO 液 (Evans *et al.*, 1995) を吸引しておき、支持ピペットで保持した卵にゆっくりと吹き付けて透明帯の一部分を溶かした。囲卵腔のない卵はカッティングナイフやピエゾインパクトドライブマニピュレータ (Prime Tech Ltd., Ibaraki, Japan) で透明帯を開孔することができなかつたため、このような方法を考案し用いた。続いて、卵を 0.2 mM IBMX, 10 $\mu\text{g/ml}$ CB, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ Colcemid (Sigma) を含む KSOM-HEPES 培地に移し、38 C で 15 分間処理することで、細胞骨格を破壊した。内径 25 μm のマイクロピペットを用いて、GV 核を最小限の細胞質と共に吸引除去した。レシピエントとなる細胞質と GV 核の融合にはセンダイウイルス (HVJ; Ishihara Sangyo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いた。顕微操作を終えた卵は、0.2 mM IBMX を含む α -MEM 培地に移して、融合が完了するまで 60 分間インキュベートした。

MII 期染色体移植

3 週齢の BDF1 雌マウスに、5 IU の Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG; ASKA Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を腹腔内投与し、その 48 時間後に 5 IU の human Chorionic Gonadotropin (hCG; ASKA Pharmaceutical Co., Ltd.) を腹腔内投与して過排卵を誘導した。hCG 投与後、15 時間後に卵管膨大部より第二減数分裂

中期の未受精卵 (MII 期卵) を採取した。ヒアルロニダーゼ処理により周囲の卵丘細胞を除去した。MII 期卵の透明帯をカッティングナイフで開孔し、内径 20 μm のマイクロピペットを用いて、5 $\mu\text{g/ml}$ CB 存在下で最小限の細胞質と共に染色体を吸引除去して、レシピエント細胞質とした。ドナー染色体として、体外成熟後、第二減数分裂中期に到達した卵の染色体を顕微操作により回収し、レシピエント細胞質と融合させた。融合にはセンダイウイルスを用いた。全ての顕微操作は KSOM-HEPES 培地でおこなった。顕微操作を終えた卵は、 α -MEM 培地に移して、融合が完了するまで 90 分間インキュベートした。

胚移植

精管結紮切断した ICR 雄マウス (SLC Japan Inc.) と交配させ、偽妊娠させた 8-16 週齢の ICR 雌マウス (体重 30-40 g; SLC Japan Inc.) を胚移植用の受容雌として用いた。体外培養し胚盤胞期に到達した胚を、2.5 日前に偽妊娠した受容雌の子宮に移植した。胚移植から 17 日後 (妊娠 19.5 日目) に、受容雌を頸椎脱臼により屠殺し、帝王切開により産仔を得た。同時に着床痕数も記録した。産仔を代理母に預けて、その後の成長を追って体重を毎週記録した。

1. SN 卵と NSN 卵の選別方法の確立

結果

体外培養中の囲卵腔形成

in vivo において、透明帯と卵細胞質の間の空間 [囲卵腔 (Perivitelline Space; PVS)] は成長卵の時期には存在せず、卵成熟過程に形成される (Talbot and Dandekar, 2003)。*in vitro* における成熟時の囲卵腔形成を経時的に観察したところ、囲卵腔を形成した卵の割合は徐々に増加し、体外成熟開始後 60 分以内にほぼプラトーに達した [Fig. 3A, B(IBMx-)]。体外成熟開始後 30 分および 60 分の時点で、卵成熟開始の指標である卵核胞崩壊 (Germinal Vesicle Breakdown; GVBD) を起こしたものの割合はそれぞれわずか 0%、10%であったことから、*in vitro* において囲卵腔形成は卵成熟とは独立に起こる事象であることが考えられた。そこで、卵成熟の開始を阻害する試薬である 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMx; cAMP の分解をおこなうホスホジエステラーゼの阻害剤) 存在下で成長卵を培養したところ、囲卵腔は IBMx 非存在下と同様の割合で形成した (Fig. 3B)。これらの結果から、成長卵は *in vitro* において卵成熟とは独立に囲卵腔を形成することが示された。

卵丘細胞由来の透明帯内突起の減少が囲卵腔形成の原因である

続いて、*in vitro* における囲卵腔形成のメカニズムを明らかにすることを試みた。体外培養中に卵体積の減少と透明帯の拡張のどちらが起きているのかを調べるために、IBMx 存在下での 1 時間の培養前と後で、卵細胞質直径 (Ooplasm) と透明帯内径 (Zona Pellucida; ZP) をそれぞれ測定した。1 時間の培養後、囲卵腔を形成した卵を PVS(+)、形成しなかった卵を PVS(-)、判断不能であった卵を PVS(±) とした。PVS(±) はその後の解析から除いた。75 個の卵のうち、52 個 (69%) が PVS(+)、20 個 (27%)

が PVS(-)、3 個 (4%) が PVS(±) であった。PVS(+) の卵細胞質は 1 時間の培養後 10.9%減少したが、その減少率は PVS(-) と同程度であった (10.4%)。一方で、PVS(+) の透明帯内径の減少率は 2.4%のみであり、PVS(-)のそれ (10.4%) と有意な差があった ($p<0.001$; Fig. 4A)。すなわち、体外培養中に卵の体積は減少するが、そのときに透明帯も同時に収縮する卵には囲卵腔が形成されず、透明帯が収縮しない卵には囲卵腔が形成されることがわかった。この結果から PVS(-) の透明帯は卵細胞質と結合していることが示唆された。そこで卵をさらに収縮させるために、1%グリセロールを含む緩衝液に卵を移したところ、PVS(+) は囲卵腔をさらに拡大したのに対し、PVS(-) は透明帯も同時に収縮し、囲卵腔を形成しなかった (Fig. 4B)。これらの結果から、透明帯と卵細胞質との結合力の違いが囲卵腔形成能の違いを生み出すことが明らかとなった。

成長中の卵は周囲の卵丘細胞とギャップ結合を介して物質のやり取りをおこなっている (Albertini and Rider, 1994, Albertini *et al.*, 2001)。その際に、卵丘細胞は卵の透明帯を貫通する突起を伸ばしており、その突起が卵細胞膜に絡み付いてギャップ結合の形成と維持に関わっている (De Smedt and Szollosi, 1991)。そこで私は、透明帯内に存在する卵丘細胞由来の突起の量の違いが卵の囲卵腔形成能の違いを生み出しているという仮説を立てて、それを検証した。透明帯内突起はアクチンフィラメントを多量に含んでいるため (Carabatsos *et al.*, 1998, Suzuki *et al.*, 2000)、アクチンフィラメントを特異的に認識する蛍光試薬を用いて透明帯内突起量を調べたところ、PVS(+) の透明帯にはそれがほとんど検出されなかった一方で、PVS(-) には多量に検出された (Fig. 5A)。続いて、透明帯内の突起の消失が囲卵腔形成を引き起こすことを検証するために、アクチンフィラメントの脱重合剤である Cytochalasin B (CB) 存在下で PVS(-) を培養したところ、4 時間の培養過程で囲卵腔形成が促進された ($p<0.05$; Fig. 5C)。このとき、CB 存在下で培養した卵では透明帯内突起の減少が見られた (Fig. 5B)。これらの結果から、卵丘細胞由来の透明帯内突起の減少が囲卵腔形成の原因であることが強く示唆された。

囲卵腔形成能と成熟能の相関

体外成熟過程で、卵核胞崩壊を起こしたすべての卵に囲卵腔が見られた一方で、まだ卵核胞崩壊を起こしていない卵にはほとんど囲卵腔が見られなかったことから、成長卵の成熟能と囲卵腔形成能に相関があることが予想された。そこで、IBMX 存在下での1時間の培養後、卵をPVS(+)、PVS(-) に選別し、それらをIBMX 非存在下で17時間培養することで成熟能を評価した。228 個の卵のうち、159 個 (70%) が PVS(+), 63 個 (28%) が PVS(-)、6 個 (3%) が PVS(±) であった。IBMX 非存在下での4時間の培養後、卵核胞崩壊 (GVBD) を起こした卵の割合は、PVS(+)は 91.0%、PVS(-)は 14.9%であった (Fig. 6)。同17時間の培養後、第一極体 (First Polar Body; 1st PB) を放出した卵の割合は、PVS(+)は 80.1%、PVS(-)は 5.5%であった (Fig. 6)。このように、囲卵腔形成能と成熟能には高い相関があることがわかった。なお、IBMX 存在下での1時間の前培養は、卵の成熟能および受精後の発生能に悪影響を及ぼさなかった (Fig. 7)。

囲卵腔形成能とクロマチン形態の相関

成長卵において、クロマチン形態は成熟能と相関がある —SN 卵はNSN 卵よりも高い成熟能を持つ— ことが知られている (Zuccotti *et al.*, 1998, Liu and Aoki, 2002)。本研究で囲卵腔形成能と成熟能には高い相関があることが示されたため、次に囲卵腔形成能とクロマチン形態の相関を調べた。290 個の卵のうち、200 個 (69%) が PVS(+), 84 個 (29%) が PVS(-)、6 個 (2%) が PVS(±) であった。ヘキストを用いてDNA 染色をおこない、これらの卵のクロマチン形態を評価した。既存の論文に倣い、核小体の周囲をDNA が取り囲み凝集するクロマチン形態をSN 型、DNA が核内に一様に広がり核小体を囲まないクロマチン形態をNSN 型とした (Fig. 8A)。低い割合でこれらの中間の形態(DNA が核内に一様に広がるが核小体を囲むもの)を示す卵が存在したため、

これらを M 型とした (Fig. 8A)。PVS(+) のクロマチンは、91%が SN 型で 7%のみ NSN 型であった。一方で PVS(-) のクロマチンはすべて NSN 型であった (Fig. 8B)。ddY 系統のマウスや、培地を TYH (Choi and Toyoda, 1998), Waymouth's (De La Fuente *et al.*, 1999), KSOM, HTF に変えてもこの相関が見られたことから、BDF1 系統のマウスや α -MEM 培地特異的な現象ではないことが確認された (data not shown)。

成長期卵における囲卵腔形成能とクロマチン形態の相関

成長卵で見られた囲卵腔形成能とクロマチン形態の相関が成長期卵でも同様に見られるのかを検証するために、14 日齢から 25 日齢のマウス卵巣から卵を回収し、IBMX 存在下 1 時間の培養後、PVS(+) の割合と SN 型クロマチンを持つ卵の割合を調べた。16 日齢以降、卵の成長に伴って SN 卵、PVS(+) 共に増加したが、SN 卵は PVS(+) よりも早い日齢で現れることがわかった (Fig. 9)。特に 20 日齢の成長期卵においては、SN 卵の割合は PVS(+) よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。また、成長期卵において、PVS(+) の多くが SN 型のクロマチンを有していた一方で [PVS(+) に占める SN 卵の割合は、16, 18, 20, 23, 25 日齢の順でそれぞれ 100, 76, 73, 83, 86%であった]、SN 卵は必ずしも囲卵腔形成能を有していなかった [SN 卵に占める PVS(+) の割合は、16, 18, 20, 23, 25 日齢の順でそれぞれ 6, 44, 44, 82, 97%であった]。これらの結果から、卵は成長中に SN 型のクロマチンを獲得し、その後で囲卵腔形成能を獲得することが示唆された。

考察

本研究において、成長卵は体外培養中に卵成熟の進行とは独立に囲卵腔を形成することがわかった (Fig. 3)。体外培養時の囲卵腔形成は、卵細胞質と透明帯の乖離が原因であり、それは卵丘細胞由来の透明帯内突起の消失が引き起こすことが示唆された (Fig. 4, 5)。そして、囲卵腔形成能と成熟能、クロマチン形態に非常に高い相関があることが明らかとなった (Fig. 6, 8)。これにより、囲卵腔の指標を用いて、卵の活性に悪影響を与えずに成熟能のある卵 (SN 卵) とない卵 (NSN 卵) に選別する方法を確立した。

IBMX 存在下 1 時間の培養後、囲卵腔を形成しなかった卵 [PVS(-)] の透明帯には卵丘細胞由来の突起が多量に存在し、囲卵腔を形成した卵 [PVS(+)] にはほとんど存在しなかった (Fig. 5)。しかし卵胞からの採取直後には、ほぼすべての成長卵でその突起が多量に検出されたことから (data not shown)、体外培養の過程で透明帯から突起が徐々に外れていくことが考えられる。これらのことから、体外培養時における囲卵腔形成のメカニズムについて次のような説明ができる。成長卵を体外培養すると、卵が *in vitro* の浸透圧の変化によって収縮しはじめ、このとき透明帯内突起が外れていく卵と外れずに残存する卵が存在する (Fig. 10)。突起が残存する卵は透明帯とともに収縮するため、囲卵腔を形成しないが、突起が減少した卵では透明帯と細胞膜との結合力が弱まるため、透明帯と細胞質が乖離して囲卵腔を形成する。NSN 卵 [PVS(-)] の細胞膜の微柔毛は SN 卵 [PVS(+)] のそれよりも長いことが知られており (Cecconi *et al.*, 2006)、この微柔毛形態の違いが突起の外れやすさの違いに関与しているのかもしれない。

囲卵腔形成能と成熟能およびクロマチン形態が高い相関を示す理由を考察したい。透明帯内突起は、卵—卵丘細胞間のギャップ結合の確立と維持に重要であると考えられており (Albertini *et al.*, 2001)、ギャップ結合は成熟能の獲得と SN 型クロマチンの確

立に必要である (Simon *et al.*, 1997, Carabatsos *et al.*, 2000)。いったん卵が成熟能および SN 型クロマチンを獲得すると、もはやギャップ結合は必要なくなり、透明帯内突起を維持する必要がなくなる(囲卵腔形成能を獲得する)のではないだろうか (Fig. 10)。その結果、成熟能および SN 型クロマチンが囲卵腔形成能と高い相関を示すことが考えられる。実際、卵に成熟能の獲得と SN 型クロマチンの確立を促進させる卵胞刺激ホルモンによって透明帯内突起は減少することが知られている (Allworth and Albertini, 1993, Plancha and Albertini, 1994)。また、SN 型クロマチンの確立は囲卵腔形成能の獲得よりも先に起こることから (Fig. 9)、SN 型への変化が囲卵腔形成能の獲得に必要なことが考えられ、この考えを支持している。

囲卵腔形成能は成長卵においてクロマチン形態と非常に高い相関を示すため、今回確立された囲卵腔による選別法は、DNA を染色することなく SN 卵と NSN 卵を選別する有効な手法である。従来の研究では、クロマチン形態によって成長卵を分類する際に、ヘキストを用いて DNA 染色をおこなった後 UV を照射するという、卵の活性に悪影響を及ぼす方法しか用いられていなかった (Zuccotti *et al.*, 1998, 2002, Liu and Aoki, 2002, Ola *et al.*, 2007)。実際、クロマチン形態を評価するのに最小限のヘキスト濃度と最低限の UV 照射を用いたときですら、卵の成熟能および受精後の発生能は低下することが報告されている (Bradshaw *et al.*, 1995, Zuccotti *et al.*, 2002, Velilla *et al.*, 2002)。一方で、囲卵腔を指標とした選別に必要な IBMX 存在下での 1 時間の前培養は、成熟能にも受精後の発生能にも悪影響がなかった (Fig. 7)。第二章では、本選別法を用いて成長卵における成熟能および発生能に関する研究をおこなった。

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

結果

GV 核交換卵の成熟能

成長卵のクロマチン形態と成熟能との関連を調べるために、SN 卵と NSN 卵の GV 核を顕微操作により交換した (Fig. 11, 12)。除核した SN 細胞質または NSN 細胞質に SN 核または NSN 核を移植することで、以下のような GV 核交換卵を作製した: 1). SN 核/SN 細胞質 (SN/SN)、2). NSN 核/SN 細胞質 (NSN/SN)、3). SN 核/NSN 細胞質 (SN/NSN)、4). NSN 核/NSN 細胞質 (NSN/NSN)。すべてのグループで、GV 核交換の成功率は 85% 以上であった。これらの卵を構築後、IBMX を除いた培地で成熟培養を開始し、培養 4 時間後の卵核胞崩壊 (GVBD) と培養 17 時間後の第一極体 (1st PB) 放出率を調べることで、これらの卵の成熟能を評価した (Table 1)。GV 核交換をおこなっていない SN 卵は 88% が GVBD を起こし、82% が第一極体を放出した。同 NSN 卵は 17% が GVBD を起こし、8% が第一極体を放出した。NSN/SN 卵の 80% が GVBD を起こしたが、この割合は有意に SN/SN 卵 (92%) よりも低かった ($p < 0.05$)。しかし、NSN/SN 卵の第一極体放出率は 88% であり、SN/SN 卵のそれよりもわずかに高かった (84%)。すなわち、NSN/SN 卵は少し遅れて GVBD を起こすが、最終的には卵成熟を終えることができた。一方で、NSN 細胞質を持つ卵にはほとんど成熟能がなかった。SN/NSN 卵と NSN/NSN 卵は 4 時間の培養でわずか 3-5% しか GVBD を起こさず、培養 17 時間後の第一極体放出率も 20-26% にとどまった。これらの結果から、成長卵の成熟能は、クロマチン形態ではなく細胞質因子によって決定されていることが明らかとなった。SN 細胞質に移植された NSN 型のクロマチンが SN 型に変化していた可能性があるため、NSN/SN 卵を IBMX 存在下で 2 時間培養したときのクロマチン形態を調べたところ、すべての卵において NSN 型は維持されていることが確認された (Fig. 13)。このとき、

SN 卵と NSN 卵で修飾レベルが大きく異なるアセチル化ヒストン H4 (H4ac) をエピジェネティクスの変化を検出するマーカーとして調べたが、SN 細胞質内で NSN 型の H4ac レベルは変化しなかった (Fig. 13)。

GV 核交換卵の発生能

体外成熟後、第一極体を放出した卵のみ回収し、体外受精をおこなって GV 核交換卵の発生能を評価した (Table 2)。各グループ間で受精率に有意な差は見られなかった。SN/SN 卵は 83% が胚盤胞期まで発生し、その割合は核交換をおこなっていない SN 卵と変わらなかった (73%)。一方で NSN/SN 卵は 2 細胞期までは正常に発生したが (96%)、4 細胞期以降の発生率が SN/SN 卵よりも有意に低く ($p < 0.05$)、胚盤胞期までわずか 4% しか到達しなかった (Fig. 14)。次に、父方ゲノム(精子)の影響を除くために 2 倍体雌性単為発生胚を作成し、その発生能を調べたところ、受精した胚と同様に NSN/SN 卵は有意に低い発生能を示した (Table 3)。これらの結果から、成長卵の発生能はクロマチンを含む核により決定されていることが明らかとなった。

興味深いことに、NSN/SN 卵と SN/SN 卵で 1 細胞期の前核の形態が異なることが観察された。一般的に、1 細胞期の前核には核小体が一つに集まっているもの (mono-type) と、いくつかの核小体が散らばっているもの (multi-type) が存在する (Fig. 15A)。SN/SN 卵の雌性単為発生胚の前核は 80% が mono-type であったのに対し、NSN/SN 卵では mono-type はわずか 31% であった (Fig. 15B; $p < 0.05$)。このように、NSN/SN 卵の前核には多数の核小体が観察された。

SN 核内因子補填時の発生能

NSN/SN 卵の 1 細胞期の前核の様子に違いが見られたことから、SN 卵と NSN 卵ではクロマチン形態以外に、核質に存在する核内因子にも違いがあることが考えられた。そこで、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という仮説を立て、NSN/SN 卵に SN 卵の核内因子を補填したときの発生能を評価することで、この仮説を検証した。この仮説が正しければ、NSN/SN 卵の発生能が回復することが予想される。成長卵の核内因子は、卵核胞崩壊によって卵全体に拡散するため、第二減数分裂中期 (MII 期) の卵細胞質には成長卵の核内因子が含まれている (Fig. 16)。一方で、卵核胞崩壊前に SN 核を取り除いた NSN/SN 卵由来の MII 期卵細胞質には SN 卵の核内因子は存在しない。そこでこのような、卵核胞崩壊に伴って卵全体に拡散する核内因子を NSN/SN 卵に補填するために次のような実験を計画した。まず NSN/SN 卵を体外成熟させた後、MII 期にある染色体を顕微操作により回収し、ドナー染色体とした。続いて *in vivo* で成熟させた SN 核内因子を含む MII 期卵 (*in vivo* MII oocyte) の染色体を除去し、レシピエント卵を作成した。これらのレシピエント卵とドナー染色体を融合させることで、NSN/SN 卵細胞質に SN 卵の核内因子を補った (Fig. 16)。融合後、体外受精をおこない、受精後の発生能を調べたところ、NSN/SN 卵は同様の操作 (GV 核交換および MII 期染色体移植) をおこなった SN/SN 卵と同程度の高い割合で胚盤胞期まで到達した (Table 4)。その割合は核移植を行っていない *in vivo* MII 卵の発生率と変わらなかった。父方ゲノムの影響を除いた 2 倍体雌性単為発生胚についても同様の結果が得られた (Table 5)。このとき興味深いことに、NSN/SN 卵の 1 細胞期において、mono-type の前核の割合は MII 期染色体移植によって顕著に増加し、SN/SN 卵や *in vivo* MII 卵由来の 1 細胞期と同程度まで増加していた (67%; Fig. 17)。これらの結果から、成長卵の発生能にクロマチン形態は関与しておらず、発生能は核質に存在し、卵核胞崩壊の後に卵全体に拡散する核内因子によって決定されていることが明らかとなった。

体外培養後、胚盤胞期まで到達した胚を偽妊娠マウスの子宮に移植したところ、NSN/SN 卵から 29% の割合で産仔が得られた (Table 6)。この割合は SN/SN 卵や *in vivo* MII 卵からの産仔率とほとんど変わらなかった。生後も NSN/SN 卵から生まれた仔は正常に成長した (Fig. 18A)。さらに、NSN/SN 卵由来のマウス同士を交配させたところ

ろ、正常に仔を出産し、育てることができた (Fig. 18B)。これらの結果より、SN 型のクロマチン形態をもつことは個体の発生に必須ではないことが示された。

考察

多くの哺乳類において、成長卵のクロマチン形態は成熟能および発生能と相関することが知られている (Schramm *et al.*, 1993, Zuccotti *et al.*, 1998, Combelles *et al.*, 2002, Sun *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2006)。しかし本研究により、クロマチン形態の違いは成熟能にも発生能にも関与せず、成熟能は細胞質内因子により、発生能は核質内因子により決定されていることが明らかとなった。このことは、成熟能と発生能がそれぞれ異なる因子により決定されていることを示唆している。さらに本研究では、GV 核交換と MII 期染色体移植という 2 段階の核移植操作をおこなうことで、NSN 核を用いた世界初の産仔を得ることに成功した。このことは、SN 型のクロマチン形態をとることが個体の発生に必須ではないことを示している。また、NSN 卵は成熟能および発生能をほとんど持たない卵であり、このような卵を用いて正常な個体を得られたことは、不妊症の治療という応用面において特に価値のある成果であるといえる。

既存の研究では、卵の成熟能と発生能の間には高い相関が見られる。例えば、クロマチン形態・卵細胞質の様相・卵周囲の卵丘細胞数・卵胞の位置などによって成長卵をいくつかのグループに分類後、各グループの卵の成熟能と発生能を評価した場合、より高い割合で成熟したグループは、より高い発生能を示すことが知られている (Arlotto *et al.*, 1996, Stojkovic *et al.*, 2001, Zuccotti *et al.*, 2002)。これらの結果は、卵の発生能が自身の成熟能に影響されることを示唆しており、これらの能力の決定因子が共通のものであることを予想させる。しかし本研究において、NSN/SN 卵は高い成熟能を持つ一方で発生能は非常に低かった (Table 1-3)。この結果は、発生能が必ずしも成熟能に影響されるものではないことを示唆しており、成長卵における発生能の決定因子は成熟能のそれとは異なるものであることを強く示唆している。

細胞質内因子が卵の成熟能を決定することが示されたが (Table 1)、このことはこれまでのいくつかの報告と一致するものである。Kono *et al.* (1996) は、除核した成長卵に

出生1日目のマウスの卵の核を移植したところ、この核移植卵は通常の成長卵と同程度の成熟能を有することを示した。さらに、成長卵から GV 核を除いても、その後の卵成熟過程で CDK1 活性と MAP キナーゼ活性が通常どおり変化することが明らかとなっている (Ogushi *et al.*, 2005)。クロマチン形態と成熟能の相関はさまざまな哺乳類で知られているが、このように成長卵の成熟能は細胞質内因子により決定されているようである。NSN 型のクロマチンは卵胞の卵胞腔形成の前後で SN 型に変化すると考えられており (Mattson and Albertini, 1990, De La Fuente, 2006)、この時期に卵はクロマチン形態の変化と平行して成熟能に関与する細胞質内因子を獲得し、その結果としてクロマチン形態と成熟能に相関が生じていると考えられる。

GV 核質内因子が卵の発生能を決定し、NSN 核にはそれが欠けていることが示唆された (Table 2-6)。NSN 核を SN 卵細胞質に移植した NSN/SN 卵は、MII 期まで高い割合で成熟できる一方で、受精後は胚盤胞期までほとんど達しなかった (Table 2)。しかし、成熟後の NSN/SN 卵の MII 期染色体を、*in vivo* で成熟した MII 期卵の細胞質に移植すると、その発生能は回復し、高い割合で胚盤胞期まで発生した (Table 4, 5)。この結果は、卵核胞崩壊に伴って細胞質に放出された SN 卵の核質内因子が NSN/SN 卵に高い発生能を与えたことを示唆している。しかしながら、この実験では *in vivo* で成熟した卵をレシピエントとして用いており、この卵は体外培養の影響がない分 *in vitro* で成熟した卵よりも高い発生能を持っている。そのため、MII 期染色体移植による NSN/SN 卵の発生能の回復は、核質内因子以外の要因による可能性がある。そこで、*in vitro* で成熟させた MII 期卵をレシピエントとして NSN/SN 卵の MII 期染色体を移植したところ、受精後 76%が胚盤胞期まで到達した。この割合は核移植を行っていない体外成熟卵の発生率と変わらなかった (67%)。さらに偽妊娠雌マウスに胚移植後、正常な個体を得ることができた (data not shown)。この結果は、発生能への核質内因子の関与を強く示唆するものである。

卵の発生能を決定する核質内因子として、胚性遺伝子発現に関与するものが考え

られる。マウスの受精卵を RNA 合成阻害剤の α -amanitin 存在下で培養すると 2 細胞期で発生を停止する (Golbus *et al.*, 1973, Warner and Versteegh, 1974)。このことは、4 細胞期以降の発生に受精前後で停止していた遺伝子発現の再開 (胚性遺伝子発現) が必要であることを示している。近年、*Mater*, *Zar1*, *Npm2*, *Zfp3612*, *Brg1* などの母性タンパク質が初期発生に必須であり、これらが胚性遺伝子発現に関与していることが明らかになってきた (Tong *et al.*, 2000, Burns *et al.*, 2003, Wu *et al.*, 2003, Ramos *et al.*, 2004, Bultman *et al.*, 2006)。NSN/SN 卵は 2 細胞期までは正常に到達するものの、4 細胞期以降の発生率が非常に低くなることから、この卵は受精後の胚性遺伝子発現に異常があることが考えられる。SN 型へのクロマチン形態の変化と平行して、このような胚性遺伝子発現に関わる母性タンパク質を獲得するのかもしれない。

NSN/SN 卵の 1 細胞期の前核には多数の小さな核小体が観察されたが、SN 卵の核質内因子を補うとその核小体数は減少し、ほとんどの前核で一つに集合した核小体が見られるようになった (Fig. 15, 17)。この結果は、GV 核に前核の核小体編成に関わる因子が存在し、それは SN 型への移行過程で獲得されることを示唆している。ところが興味深いことに、成長卵の時点では多くの NSN 卵で核小体は一つに集合している (Fig. 3, 4, 5 の PVS(-)を参照)。前核の核小体編成に関わる因子は GV 核のそれとは異なるのかもしれない。ヒトの胚において、前核の核小体分布と発生能に相関があることが知られている (Tesarik and Greco, 1999, Gianaroli *et al.*, 2003)。さらに、前核内の核小体が消失している *Npm2* ノックアウトマウスの胚は、初期発生段階で致死となることが知られている (Burns *et al.*, 2003)。最近、顕微操作により GV 期に核小体を除去した卵は、受精後も前核内に核小体を形成せず、着床前に致死になることが報告された (Ogushi *et al.*, 2008)。本研究においても前核形態と発生能に相関が見られたことから、核小体の分散が何らかの機構で NSN/SN 卵の低発生能の原因になっていることが考えられる。GV 期と 1 細胞期の核小体は他の時期の胚や体細胞では見られないような高度に凝集した形態をしており (このことから、この時期の核小体は Nucleolus-like bodies (NLBs)

と呼ばれる)、核小体と発生能との関連は興味深く、今後の解析が期待される。

父方あるいは母方のどちらか一方のアレルのみから発現する遺伝子をインプリント遺伝子といい、アレルがどちらの親に由来するのかを識別する後天的遺伝子修飾機構を‘遺伝子刷り込み(ゲノムインプリンティング)’という。インプリント遺伝子の発現調節領域(DMRs; Differentially Methylated Regions)においてDNAシトシン残基のメチル化状態が異なり、その遺伝子の発現が制御されている。母方ゲノムのDMRsは、卵母細胞の成長過程で徐々にメチル化されていくことがバイサルファイト解析により明らかにされた(Lucifero *et al.*, 2004, Hiura *et al.*, 2006)。このとき調べられたDMRsのメチル化は、15日齢マウスの卵においては完了しておらず、25日齢マウスの卵ではすでに完了していた(Lucifero *et al.*, 2004)。除核した成長卵に1-15日齢マウスの成長期卵のGV核を移植した後体外成熟させ、続いてMII期染色体移植をおこなったところ、産仔は得られなかったが、これは1-15日齢マウスの卵は遺伝子刷り込みが確立していないことが原因であった(Kono *et al.*, 1996, Bao *et al.*, 2000)。しかし、16-20日齢マウスの成長期卵や8週齢マウスの成長卵をドナー核として用いた場合、産仔率はドナーの日齢に比例して高まった(Bao *et al.*, 2000)。SN型核を持つ成長期卵は16日齢で初めて現れ、その後その割合はおよそ23日齢まで増加するため(Inoue *et al.*, 2007)、クロマチン形態は遺伝子刷り込みの確立に関与しているように捉えることができる。しかしながら、本研究においてNSN型核をドナー核として用いた場合でも、SN型核を用いた場合と同様の割合で産仔を得ることができた(Table 6)。この結果は、遺伝子刷り込みがクロマチン形態の変化とは独立に起こる現象であることを示唆している。

ヒトの不妊症例のひとつとして、卵が成熟できない症例や受精しても発生できない症例が報告されており、現在のところその治療法は存在しない(Hartshorne *et al.*, 1999, Lervan *et al.*, 2002, Neal *et al.*, 2002, St John, 2002)。このようなタイプの不妊症のメカニズムは明らかにされていないが、成熟能や発生能の高い卵を形成できなかったことが原因であろう。本研究は成熟能および発生能をもたないNSN卵から正常な個体を得るこ

とに成功した初めての報告であり、この成果はこのようなタイプの不妊症の治療に貢献するかもしれない。

謝辞

本論文を完成するにあたり、二年間の研究活動及び論文の作成を懇切丁寧にご指導頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科 青木不学 准教授に心より感謝致します。また、研究全般において貴重なご助言を頂きました同研究科 永田昌男 教授に深謝致します。

また、実験に際して技術のご指導をはじめ多くのご意見、ご助言を頂きました研究室の素晴らしい先輩方、共に協力し合い研究に打ち込んだ同期生 菊田真吾君、曾根原弘樹君、平坂聡君、湯川将之君、中島壘君、そして後輩諸君に感謝します。

最後に、研究生活に理解を示し支援して頂いた両親ならびに本研究に関わったすべての人に感謝致します。

参考文献

- Albertini DF & Rider V 1994 Patterns of intercellular connectivity in the mammalian cumulus-oocyte complex. *Microsc Res Tech* **27** 125-133.
- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E & Carabatsos MJ 2001 Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* **121** 647-653.
- Allworth AE & Albertini DF 1993 Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev Biol* **158** 101-112.
- Arlotto T, Schwartz JL, First NL & Leibfried-Rutledge ML 1996 Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* **45**, 943-956.
- Bao S, Obata Y, Carroll J, Domeki I & Kono T 2000 Epigenetic modifications necessary for normal development are established during oocyte growth in mice. *Biol Reprod* **62**, 616-621.
- Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Guibert J, Beaujean N, Szollosi MS & Debey P. 1999 Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biol Reprod* **60**, 580-587.
- Bradshaw J, Jung T, Fulka J, Jr. & Moor RM 1995 UV irradiation of chromosomal DNA and its effect upon MPF and meiosis in mammalian oocytes. *Mol Reprod Dev* **41** 503-512.
- Bultman SJ, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda P, Schultz RM & Magnuson T 2006 Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes Dev* **20**, 1744-1754.
- Burns KH, Viveiros MM, Ren Y, Wang P, DeMayo FJ, Frail DE, Eppig JJ & Matzuk MM
-

-
- 2003 Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* **300**, 633-636.
- Can A, Semiz O & Cinar O 2003 Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. *Mol Hum Reprod* **9** 749-756.
- Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM & Albertini DF 1998 Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol* **204** 373-384.
- Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA & Albertini DF 2000 Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev Biol* **226** 167-179.
- Cecconi S, Rossi G & Palmerini MG 2006 Mouse oocyte differentiation during antral follicle development. *Microsc Res Tech* **69** 408-414.
- Choi YH & Toyoda Y 1998 Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium. *Biol Reprod* **59** 1328-1333.
- Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C & Albertini DF 2002 Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Hum Reprod* **17** 1006-1016.
- De La Fuente R 2006 Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev Biol* **292** 1-12.
- De La Fuente R, O'Brien MJ & Eppig JJ 1999 Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Hum Reprod* **14** 3060-3068.
- De Smedt V & Szollosi D 1991 Cytochalasin D treatment induces meiotic resumption in follicular sheep oocytes. *Mol Reprod Dev* **29** 163-171.
- Debey P, Szollosi MS, Szollosi D, Vautier D, Girousse A & Besombes D 1993 Competent
-

-
- mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics. *Mol Reprod Dev* **36** 59-74.
- Eppig JJ & Schroeder AC 1989 Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod* **41**, 268-276.
- Erdogan S, FitzHarris G, Tartia AP & Baltz JM 2005 Mechanisms regulating intracellular pH are activated during growth of the mouse oocyte coincident with acquisition of meiotic competence. *Dev Biol* **286**, 352-360.
- Evans JP, Schultz RM & Kopf GS 1995 Identification and localization of integrin subunits in oocytes and eggs of the mouse. *Mol Reprod Dev* **40** 211-220.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D & Grieco N 2003 Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril* **80**, 341-349.
- Golbus MS, Calarco PG & Epstein CJ 1973 The effects of inhibitors of RNA synthesis (alpha-amanitin and actinomycin D) on preimplantation mouse embryogenesis. *J Exp Zool* **186**, 207-216.
- Hartshorne G, Montgomery S & Klentzeris L 1999 A case of failed oocyte maturation in vivo and in vitro. *Fertil Steril* **71**, 567-570.
- Hiura H, Obata Y, Komiyama J, Shirai M & Kono T 2006 Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice. *Genes Cells* **11**, 353-361.
- Inoue A, Akiyama T, Nagata M & Aoki F 2007 The Perivitelline Space-Forming Capacity of Mouse Oocytes is Associated with Meiotic Competence. *J Reprod Dev* **53**, 1043-1052.
- Kageyama S, Liu H, Kaneko N, Ooga M, Nagata M & Aoki F 2007 Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction* **133**, 85-94.
-

-
- Kono T, Obata Y, Yoshimzu T, Nakahara T & Carroll J 1996 Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse. *Nat Genet* **13**, 91-94.
- Lawitts JA & Biggers JD 1993 Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol* **225** 153-164.
- Lee HS, Yin XJ, Jin YX, Kim NH, Cho SG, Bae IH & Kong IK 2006 Germinal vesicle chromatin configuration and meiotic competence is related to the oocyte source in canine. *Anim Reprod Sci*, in press.
- Levrán D, Farhi J, Nahum H, Glezerman M & Weissman A 2002 Maturation arrest of human oocytes as a cause of infertility: case report. *Hum Reprod* **17** 1604-1609.
- Liu H & Aoki F 2002 Transcriptional activity associated with meiotic competence in fully grown mouse GV oocytes. *Zygote* **10** 327-332.
- Liu Y, Sui HS, Wang HL, Yuan JH, Luo MJ, Xia P & Tan JH 2006 Germinal vesicle chromatin configurations of bovine oocytes. *Microsc Res Tech* **69**, 799-807.
- Lucifero D, Mann MR, Bartolomei MS & Trasler JM 2004 Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* **13**, 839-849.
- Mattson BA & Albertini DF 1990 Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol Reprod Dev* **25** 374-383.
- Miyara F, Migne C, Dumont-Hassan M, Le Meur A, Cohen-Bacrie P, Aubriot FX, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A & Debey P 2003 Chromatin configuration and transcriptional control in human and mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* **64**, 458-470.
- Neal MS, Cowan L, Louis JP, Hughes E, King WA & Basrur PK 2002 Cytogenetic evaluation of human oocytes that failed to complete meiotic maturation in vitro. *Fertil Steril* **77**, 844-845.
-

-
- Ogushi S, Palmieri C, Fulka H, Saitou M, Miyano T & Fulka J Jr 2008 The maternal nucleolus is essential for early embryonic development in mammals. *Science* **319**, 613–616.
- Ogushi S, Fulka J Jr & Miyano T 2005 Germinal vesicle materials are requisite for male pronucleus formation but not for change in the activities of CDK1 and MAP kinase during maturation and fertilization of pig oocytes. *Dev Biol* **286**, 287-298.
- Ola SI, Wang Q, Ai JS, Yin S, Liang CG, Chen DY & Sun QY 2007 Meiotic competence and acetylation pattern of UV light classified mouse antral oocytes after meiotic arrest with isobutylmethylxanthine. *Mol Reprod Dev* **74**, 591-599.
- Plancha CE & Albertini DF 1994 Hormonal regulation of meiotic maturation in the hamster oocyte involves a cytoskeleton-mediated process. *Biol Reprod* **51** 852-864.
- Quinn P & Begley AJ 1984 Effect of human seminal plasma and mouse accessory gland extracts on mouse fertilization in vitro. *Aust J Biol Sci* **37** 147-152.
- Ramos SB, Stumpo DJ, Kennington EA, Phillips RS, Bock CB, Ribeiro-Neto F & Blackshear PJ 2004 The CCCH tandem zinc-finger protein Zfp3612 is crucial for female fertility and early embryonic development. *Development* **131**, 4883-4893.
- Schramm RD, Tennier MT, Boatman DE & Bavister BD 1993 Chromatin configurations and meiotic competence of oocytes are related to follicular diameter in nonstimulated rhesus monkeys. *Biol Reprod* **48** 349-356.
- Sorensen RA & Wassarman PM 1976 Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* **50**, 531-536.
- St John JC 2002 Ooplasm donation in humans: the need to investigate the transmission of mitochondrial DNA following cytoplasmic transfer. *Hum Reprod* **17**, 1954-1958.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB & Wolf E 2001 Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of
-

-
- bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* **64**, 904-909.
- Sun XS, Liu Y, Yue KZ, Ma SF & Tan JH 2004 Changes in germinal vesicle (GV) chromatin configurations during growth and maturation of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* **69**, 228-234.
- Suzuki H, Jeong BS & Yang X 2000 Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod* **63** 723-729.
- Talbot P & Dandekar P 2003 Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Microsc Res Tech* **61** 349-357.
- Tesarik J & Greco E 1999 The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* **14**, 1318-1323.
- Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, Dorward H, Lee E, Bondy CA, Dean J & Nelson LM 2000 Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet* **26**, 267-268.
- Velilla E, Lopez-Bejar M, Rodriguez-Gonzalez E, Vidal F & Paramio MT 2002 Effect of Hoechst 33342 staining on developmental competence of prepubertal goat oocytes. *Zygote* **10** 201-208.
- Warner CM & Versteegh LR 1974 In vivo and in vitro effect of alpha-amanitin on preimplantation mouse embryo RNA polymerase. *Nature* **248**, 678-680.
- Wickramasinghe D & Albertini DF 1992 Centrosome phosphorylation and the developmental expression of meiotic competence in mouse oocytes. *Dev Biol* **152**, 62-74.
-

- Whitten WK 1971 Nutritional requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. *Adv Biosci* **6**, 129-139.
- Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL & Matzuk MM 2003 Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet* **33**, 187-191.
- Zuccotti M, Piccinelli A, Giorgi Rossi P, Garagna S & Redi CA 1995 Chromatin organization during mouse oocyte growth. *Mol Reprod Dev* **41** 479-485.
- Zuccotti M, Giorgi Rossi P, Martinez A, Garagna S, Forabosco A & Redi CA 1998 Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes. *Biol Reprod* **58** 700-704.
- Zuccotti M, Ponce RH, Boiani M, Guizzardi S, Govoni P, Scandroglio R, Garagna S & Redi CA 2002 The analysis of chromatin organisation allows selection of mouse antral oocytes competent for development to blastocyst. *Zygote* **10** 73-78.

Table 1. GV核交換卵の卵成熟

Nuclear Transfer		No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes	
Nucleus	Cytoplasm		GVBD	1 st PB
SN	SN	522	480 (92) ^a	438 (84) ^a
NSN	SN	485	389 (80) ^b	426 (88) ^a
SN	NSN	55	3 (5) ^c	11 (20) ^b
NSN	NSN	39	1 (3) ^c	10 (26) ^b
No Nuclear Transfer (SN) *		514	451 (88) ^a	421 (82) ^a
No Nuclear Transfer (NSN) **		52	9 (17) ^c	4 (8) ^b

GVBD, germinal vesicle breakdown; 1st PB, the first polar body

*SN oocytes not subjected to nuclear transfer.

**NSN oocytes not subjected to nuclear transfer.

The superscripts indicate significant differences (χ^2 analysis, $p < 0.05$).

Table 2. GV核交換卵の体外受精後の初期胚発生

Nuclear Transfer		No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes fertilized	No. (%) of embryos developed to			
Nucleus	Cytoplasm			Two-cell	Four-cell	Morula	Blastocyst
SN	SN	46	29 (63) ^a	29 (100) ^a	28 (97) ^a	29 (100) ^a	24 (83) ^a
NSN	SN	41	28 (68) ^a	27 (96) ^a	14 (50) ^b	7 (25) ^b	1 (4) ^b
No Nuclear Transfer *		40	26 (65) ^a	26 (100) ^a	24 (92) ^a	23 (88) ^a	19 (73) ^a

*SN oocytes not subjected to nuclear transfer.

The superscripts indicate significant differences (χ^2 analysis, $p < 0.05$).

The number of embryos developed to two-cell, four-cell, morula, and blastocyst was evaluated at 24, 48, 72, and 96 hours post insemination.

Table 3. GV核交換卵の活性化後の初期胚発生

Nuclear Transfer		No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes activated	No. (%) of embryos developed to			
Nucleus	Cytoplasm			Two-cell	Four-cell	Morula	Blastocyst
SN	SN	92	68 (74) ^a	47 (69) ^a	45 (66) ^a	40 (59) ^a	25 (37) ^a
NSN	SN	93	57 (61) ^a	33 (58) ^a	9 (16) ^b	5 (9) ^b	0 (0) ^b
No Nuclear Transfer *		107	64 (60) ^a	45 (70) ^a	41 (64) ^a	39 (61) ^a	22 (34) ^a

*SN oocytes not subjected to nuclear transfer.

The superscripts indicate significant differences (χ^2 analysis, $p < 0.05$).

The number of embryos developed to two-cell, four-cell, morula, and blastocyst was evaluated at 24, 48, 72, and 96 hours post insemination.

Table 4. GV核交換およびMII期染色体移植後の初期胚発生(体外受精時)

Nuclear Transfer		No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes fertilized	No. (%) of 1-cell embryos developed to			
Nucleus	Cytoplasm			Two-cell	Four-cell	Morula	Blastocyst
SN	SN	90	59 (66)	57 (97)	56 (95)	56 (95)	52 (88)
NSN	SN	74	50 (68)	48 (96)	48 (96)	47 (94)	43 (86)
<i>in vivo</i> MII oocyte		146	112 (77)	112 (100)	105 (94)	107 (96)	102 (91)

The number of embryos developed to two-cell, four-cell, morula, and blastocyst was evaluated at 24, 48, 72, and 96 hours post insemination.

Table 5. GV核交換およびMII期染色体移植後の初期胚発生(活性化時)

Nuclear Transfer		No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes activated	No. (%) of 1-cell embryos developed to			
Nucleus	Cytoplasm			Two-cell	Four-cell	Morula	Blastocyst
SN	SN	30	24 (80)	17 (71)	9 (38)	10 (42)	8 (33)
NSN	SN	25	22 (88)	17 (77)	12 (55)	13 (59)	11 (50)
<i>in vivo</i> MII oocyte		61	52 (85)	42 (81)	32 (62)	34 (65)	27 (52)

The number of embryos developed to two-cell, four-cell, morula, and blastocyst was evaluated at 24, 48, 72, and 96 hours post insemination.

Table 6. GV核交換およびMII期染色体移植後の着床後胚発生

Nuclear Transfer		No. of recipients	No. of blastocysts transferred	No. (%) of implantation sites	No. (%) of pups
Nucleus	Cytoplasm				
SN	SN	8	45	25 (56)	11 (24)
NSN	SN	6	31	21 (68)	9 (29)
<i>in vivo</i> MII oocyte		5	44	25 (57)	15 (34)

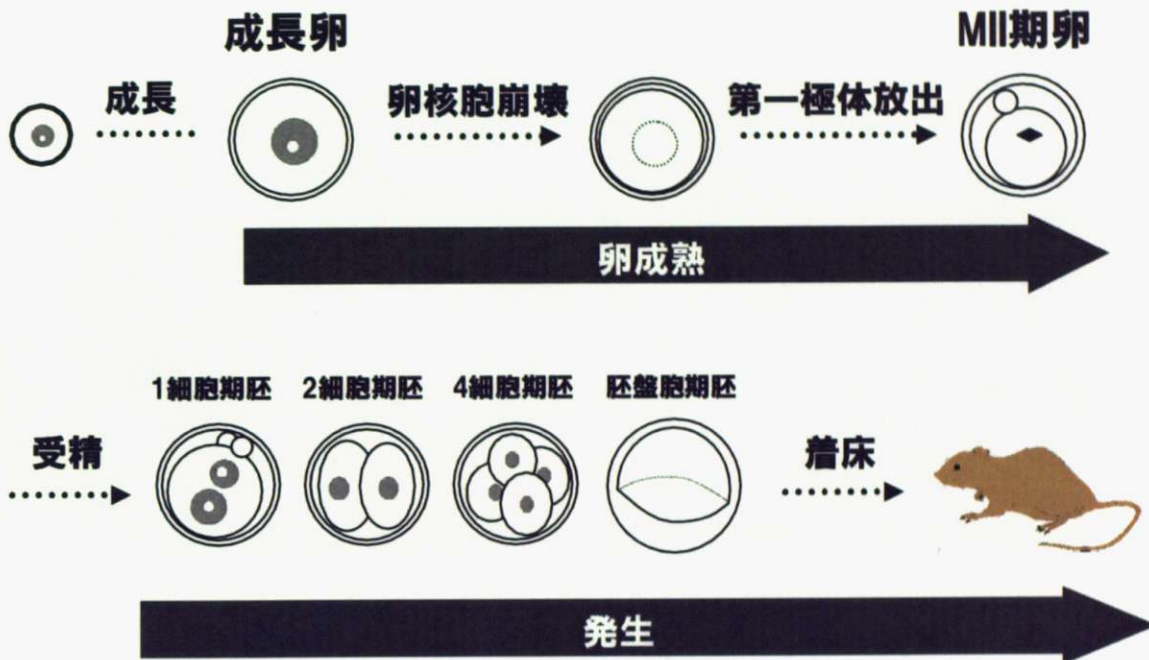


Fig 1. マウス卵形成および胚発生の概要

第一減数分裂前期の卵母細胞は卵巣内で成長する。成長を終えた卵(成長卵)はホルモン刺激を受けて(あるいは体外に単離されて)減数分裂を再開する。最初に卵核胞崩壊が起こり、続いて第一極体を放出して第二減数分裂中期で再停止する(MII期卵)。成長卵からMII期卵までの過程は卵成熟と呼ばれる。受精をきっかけに第二極体を放出して減数分裂を完了し、母方ゲノムと父方ゲノムを別々の前核に有する1細胞期胚となる。その後、有糸分裂を繰り返して発生していく。*In vitro*では胚盤胞期まで培養することができる。

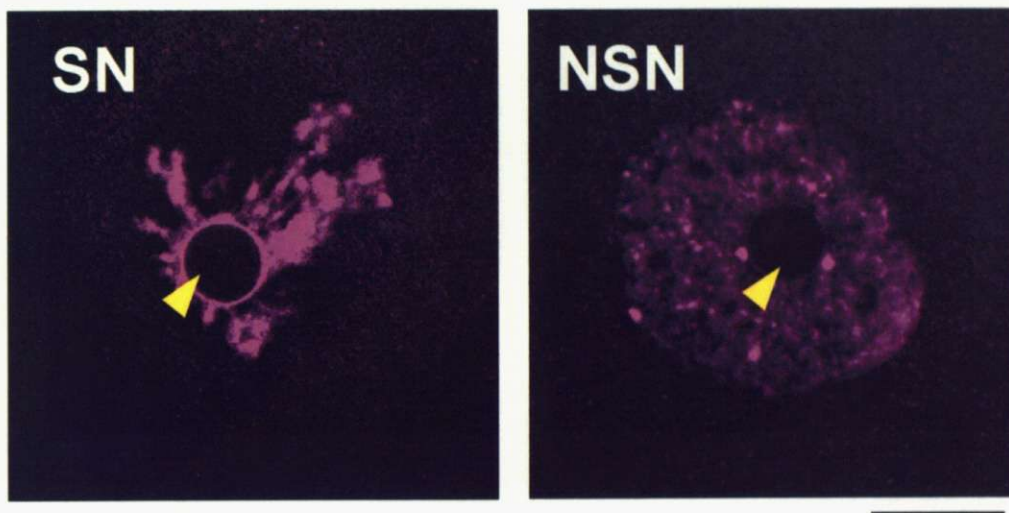


Fig 2. 成長卵のクロマチン形態

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種類が存在する。Propidium iodide により DNA を染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察したときの画像を示す。SN型は DNA が核小体(矢頭)を取り囲み凝集するような形態で、NSN型は DNA が核小体を取り囲まずに核内に一様に広がった形態をいう。Bar = 10 μ m。

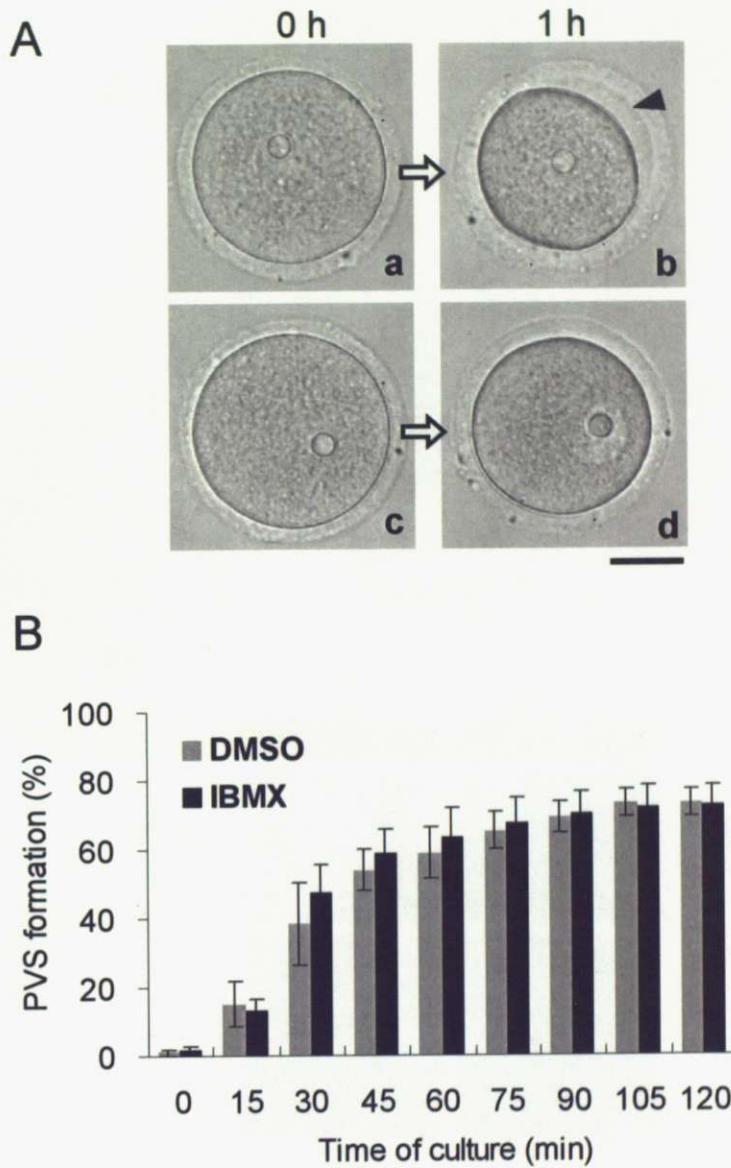


Fig 3. マウス成長卵の体外培養時の困卵腔形成

(A) 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 存在下1時間の培養前 (a, c) と培養後 (b, d) の成長卵。困卵腔(矢頭: PVS) は b の卵で形成されているが d の卵では形成されていない。Bar = 30 μ m。 (B) IBMX 存在下または非存在下での体外培養中の困卵腔形成率。IBMX 非存在下の培地には、IBMX の溶媒として用いた DMSO を最終濃度0.1% で加えた。実験は各回27-63個の卵を用いて3回行った。調べた合計の卵の数は99 個 (DMSO)、169個 (IBMX)。エラーバーは標準誤差を示す。

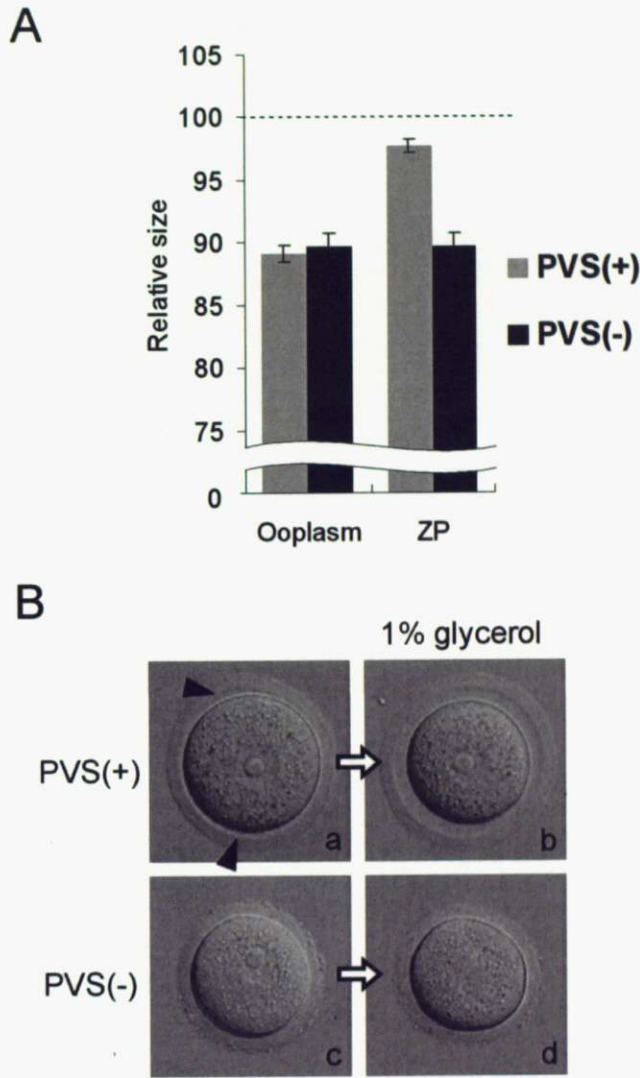


Fig 4. 体外培養時における卵細胞質と透明帯の乖離

(A) IBMX 存在下1時間の培養前後における卵直径 (Ooplasm) と透明帯内径 (Zona Pellucida: ZP) の変化。培養前の径を100として、培養後の相対値を示した。52個の PVS (+) と20個の PVS (-) を調べた。エラーバーは標準誤差を示す。(B) PVS (+) と PVS (-) を1%グリセロールを含む緩衝液に移した。PVS (+) の囲卵腔(矢頭)はさらに顕著になった一方で (b)、PVS (-) には囲卵腔が形成されなかった (d)。Bar = 30 μ m。

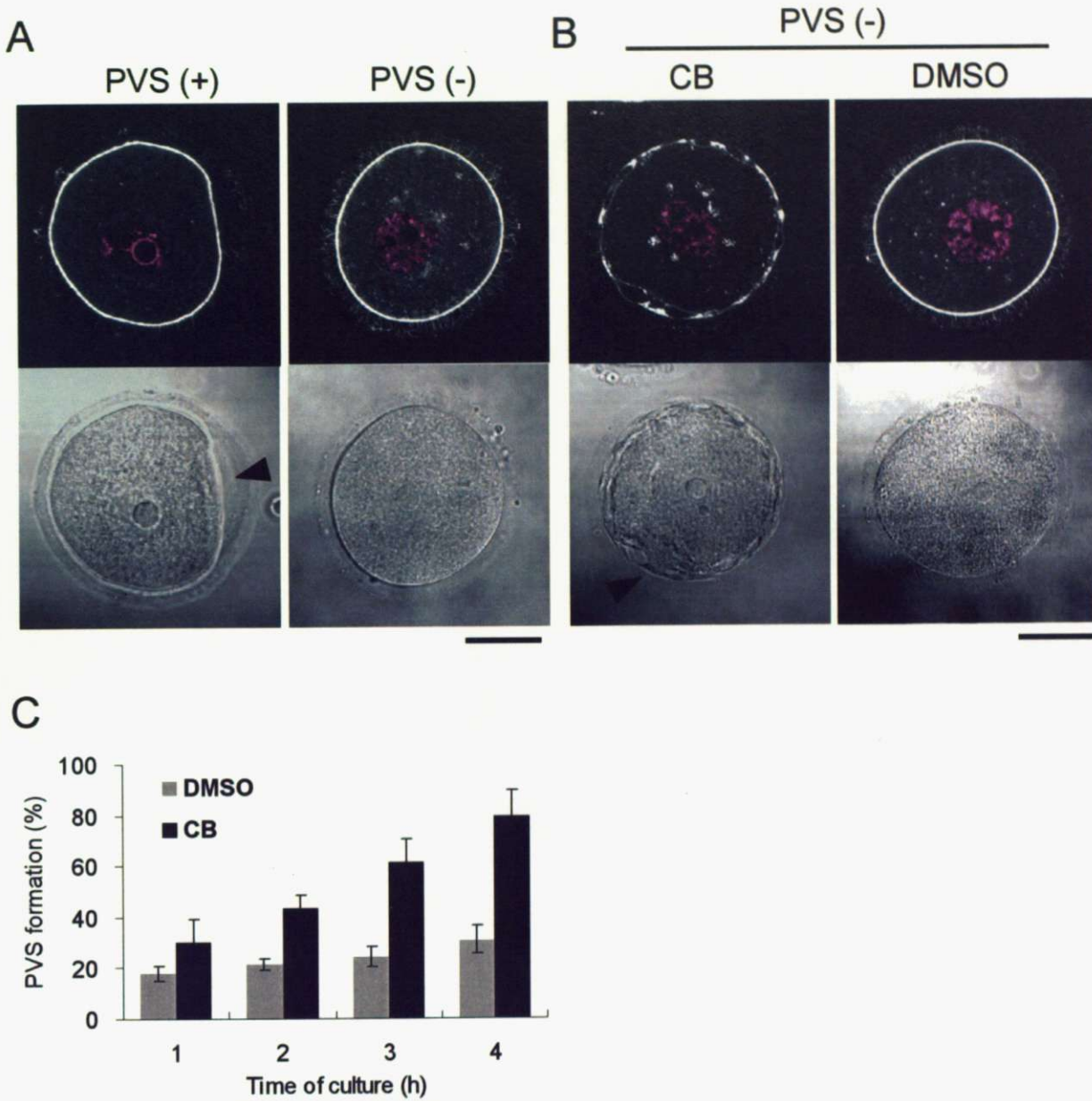


Fig 5. 体外培養過程の透明帯内突起の減少

(A) IBMX 存在下1時間の培養後のPVS (+)とPVS (-)のアクチン繊維を Fluorescein-phalloidin により (white)、DNA を Propidium iodide により染色した (purple)。明視野の写真を下段に示す。困卵腔を矢頭で示す。Bar = 30 μ m。(B) PVS (-)を Cytochalasin B (CB) 存在下または非存在下 (DMSO)で4時間培養した後、アクチン繊維および DNAを染色した。CB 非存在下の培地には、CB の溶媒として用いた DMSO を最終濃度1%で加えた。実験は3回行い、同様の結果が得られた。Bar = 30 μ m。(C) PVS (-)を CB存在下 (CB)または非存在下 (DMSO)で培養したときの困卵腔形成率。実験は各回11-33個の卵を用いて5回行った。調べた合計の卵の数は54個 (CB)、49個 (DMSO)。エラーバーは標準誤差を示す。

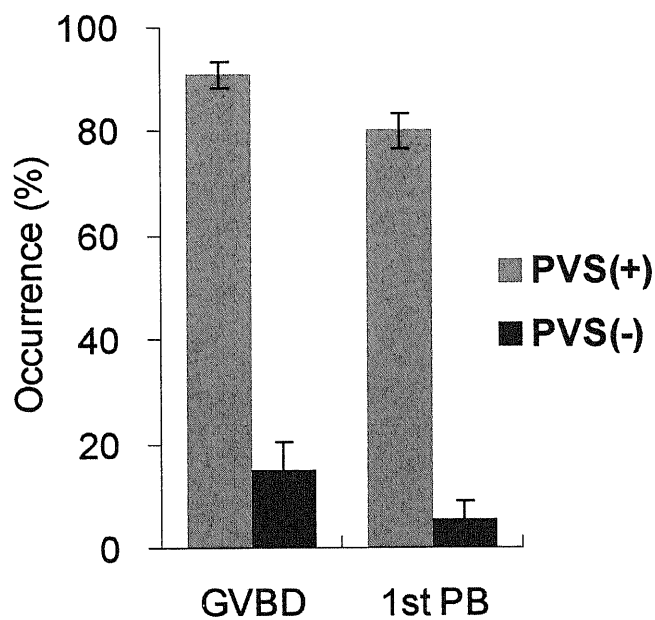


Fig 6. 困卵腔形成能と成熟能の相関

IBMX 存在下1時間の培養後、PVS (+)とPVS (-)に選別し、IBMXを除いた培地で培養した。培養4時間後に卵核胞崩壊 (GVBD)を起こした卵の割合を、培養16-18時間後に第一極体 (1st PB)を放出した割合を調べた。実験は各回36-51個の卵を用いて5回行った。調べた合計の卵の数は159個 [PVS (+)]、63個 [PVS (-)]。エラーバーは標準誤差を示す。

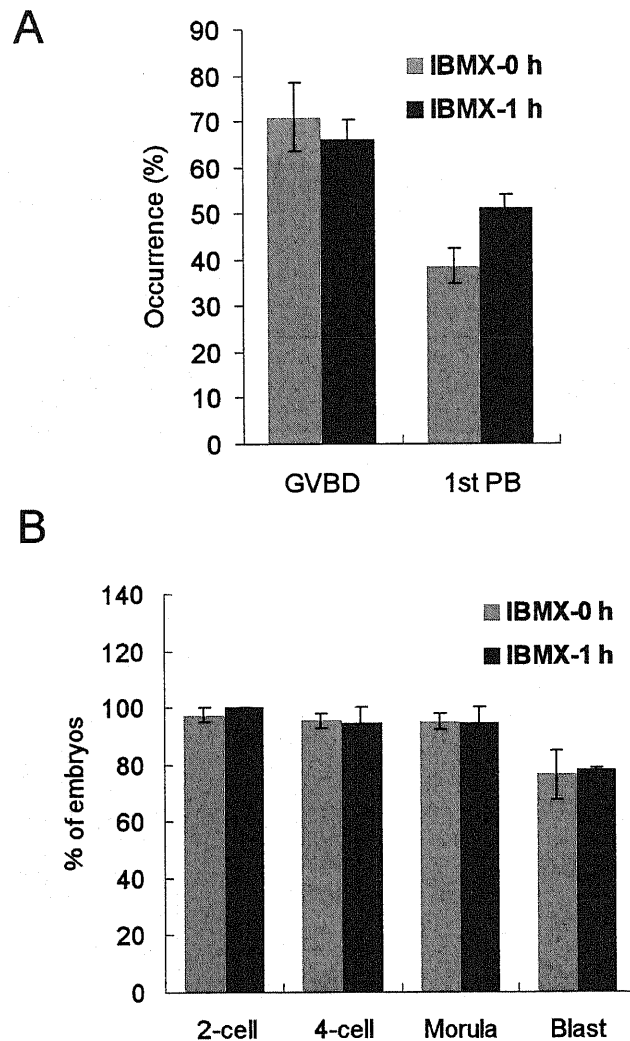


Fig 7. 卵成熟および初期胚発生への 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) の影響
 成長卵を IBMX 存在下 (IBMX-1 h) または IBMX 非存在下 (IBMX-0 h) で採取した。IBMX-0 h 群ではそのまま IBMX 非存在下で培養した。IBMX-1 h 群では採卵後も IBMX 存在下で 1 時間培養し、その後 IBMX を除いた培地で培養した。(A) 培養 4 時間後に卵核胞崩壊 (GVBD) を起こした卵の割合を、培養 16-18 時間後に第一極体 (1st PB) を放出した割合を調べた。実験は各回 32-50 個の卵を用いて 4 回行った。それぞれの群で合計 162 個ずつの卵を調べた。エラーバーは標準誤差を示す。(B) 体外成熟を終えた MII 期卵を体外受精させて、その後の発生率を調べた。1 細胞期胚の数を 100% として、媒精 24, 48, 72, 96 時間後に 2 細胞期 (2-cell)、4 細胞期 (4-cell)、桑実胚期 (Morula)、胚盤胞期 (Blast) に達した胚の割合をそれぞれ調べた。実験は各回 9-17 個の胚を用いて 4 回行った。調べた合計の胚の数は 42 個 (IBMX-0 h)、50 個 (IBMX-1 h)。エラーバーは標準誤差を示す。

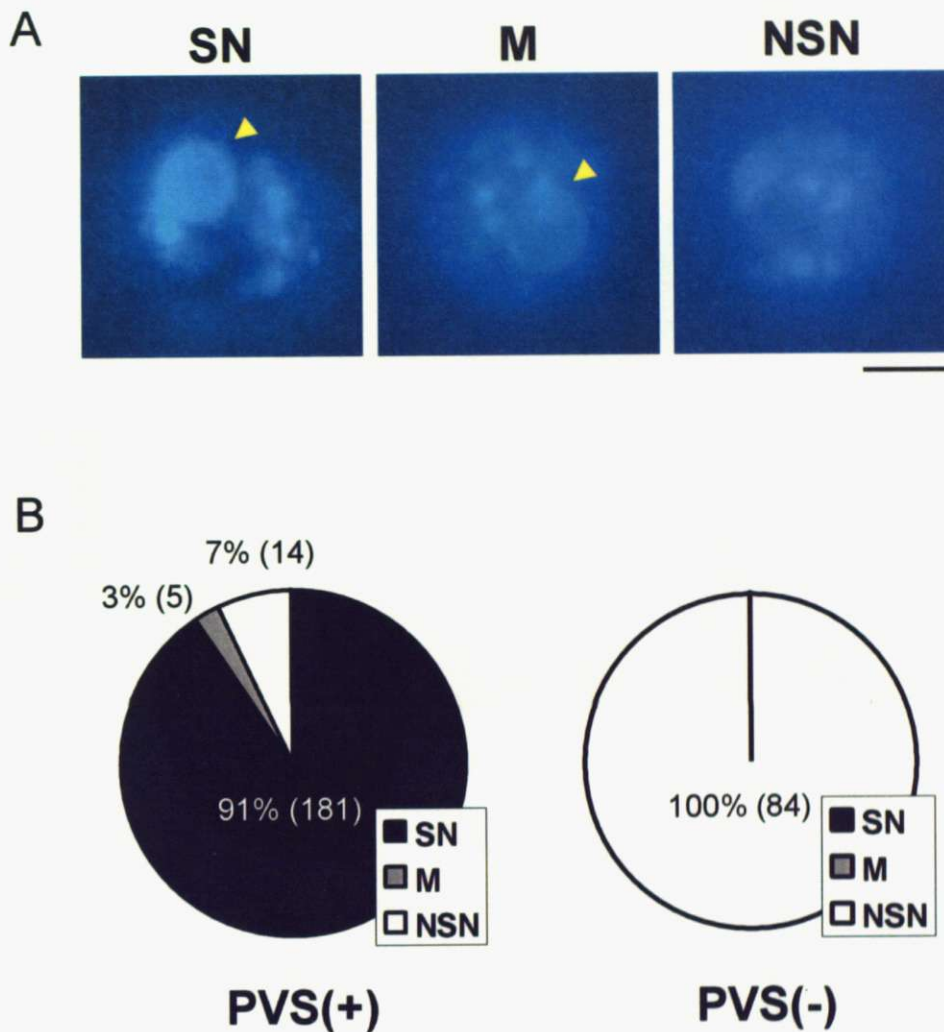


Fig 8. 卵母細胞形成能とクロマチン形態の相関

(A) Surrounded Nucleolus (SN) 型、Intermediate (M) 型、Non-Surrounded Nucleolus (NSN) 型クロマチンの染色像を示す。矢頭は核小体を示す。Bar = 10 μ m。 (B) IBMX 存在下1時間の培養後、PVS (+) と PVS (-) に選別し、ヘキストを用いて DNA を染色してクロマチン形態を評価した。合計8回の実験を行い、PVS (+) は200個、PVS (-) は84個の卵を調べた。

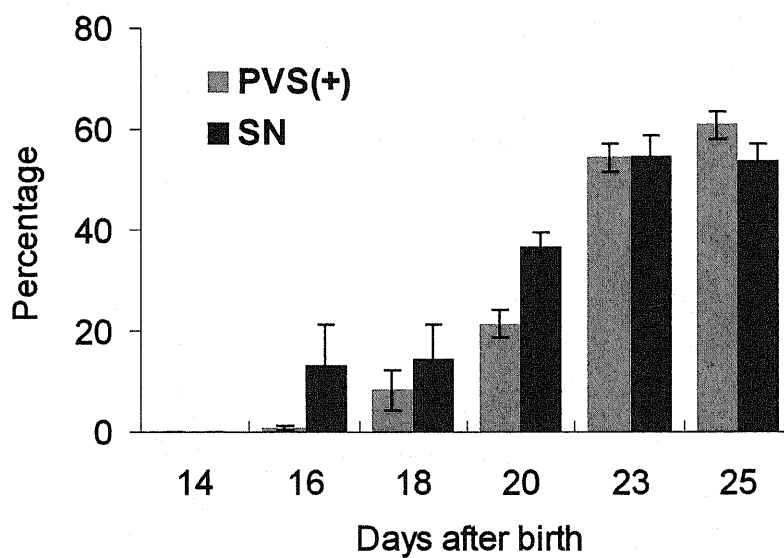


Fig 9. 成長期卵における囲卵腔形成能とクロマチン形態の相関

14, 16, 18, 20, 23, 25日齢マウスから成長期卵または成長卵を採取し、IBMX 存在下1時間の培養後、囲卵腔を形成した卵の割合を調べた [PVS (+)]。続いてヘキストを用いて DNA を染色してすべての卵のクロマチン形態を評価し、SN型のクロマチンを呈する卵の割合を調べた。実験は各回42-101個の卵を用いてそれぞれ4回ずつ行った。調べた合計の卵の数は141個 (14日齢)、231個 (16日齢)、287個 (18日齢)、313個 (20日齢)、342個 (23日齢)、232個 (25日齢)。エラーバーは標準誤差を示す。

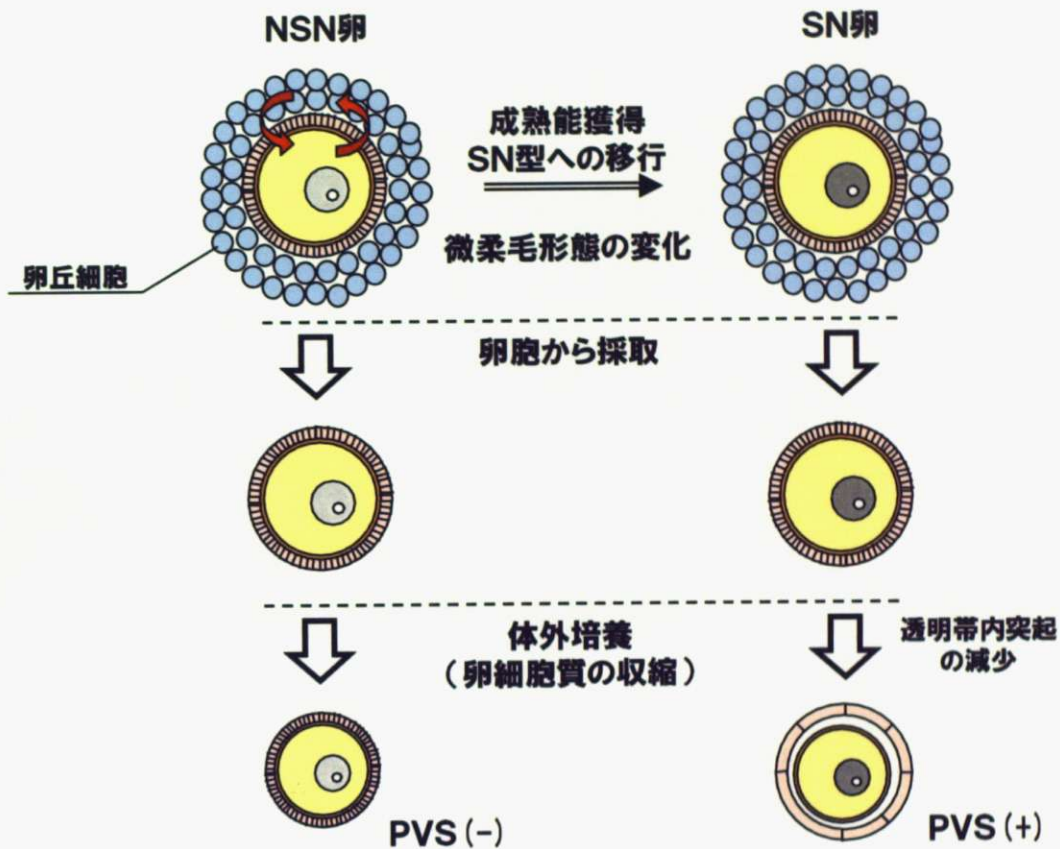


Fig 10. 困卵腔形成能と成熟能およびクロマチン形態が関連するメカニズム(考察)
 卵丘細胞(青)由来の透明帯内突起は、成熟能の獲得とSN型クロマチンの確立に必要な卵-卵丘細胞間ギャップ結合の維持に必要であることが知られている。NSN卵は成熟能をいまだに獲得していないため、卵丘細胞とのインタラクションを維持している(赤矢印)一方で、SN卵は十分な成熟能をすでに獲得しており、ギャップ結合は必要ないため、透明帯内突起と卵の結合力が減少していると考えられる。この結合力の減少には、突起が絡みつく部位である卵微柔毛の形態の変化が関与しているかもしれない。これらの卵を卵胞から採取し体外で培養すると、浸透圧の変化によって卵細胞質が収縮する。このとき、透明帯内突起との結合力が弱いSN卵は突起を減少させる。その結果、SN卵でのみ困卵腔を形成する。

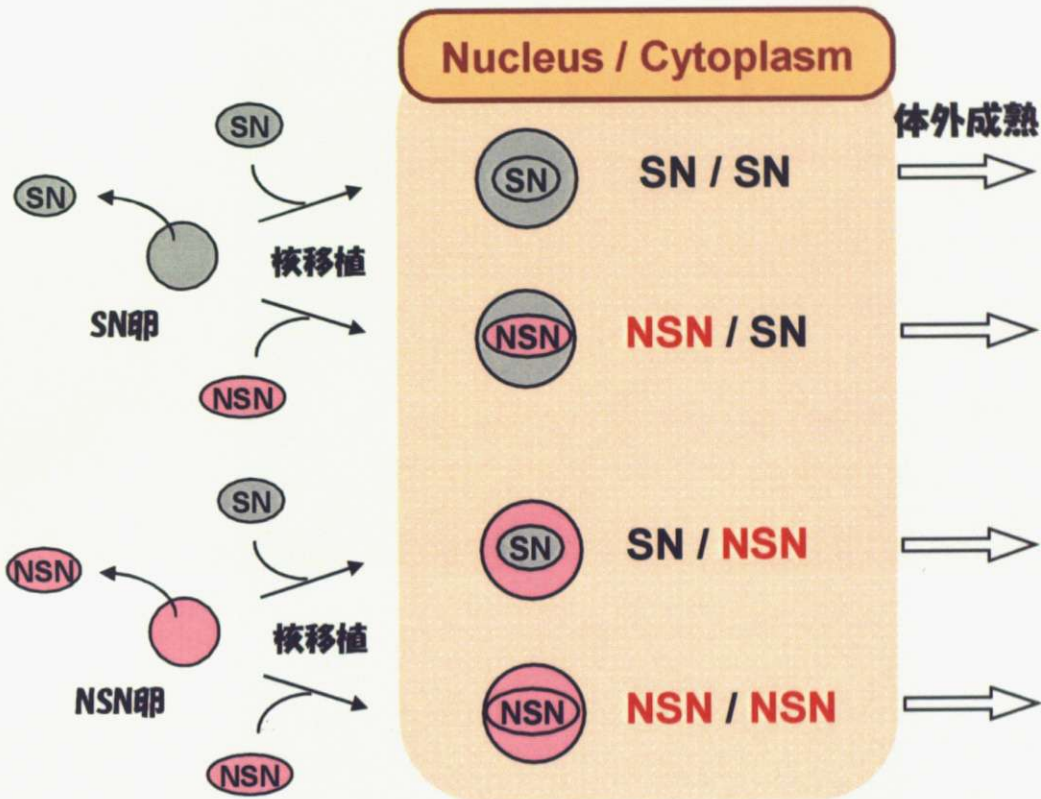


Fig 11. GV核交換実験の概要

SN卵を除核後、SN卵細胞質にSN核を(SN/SN)、またはNSN核を(NSN/SN)移植した。続いてNSN卵を除核後、NSN卵細胞質にSN核を(SN/NSN)、またはNSN核を(NSN/NSN)移植した。

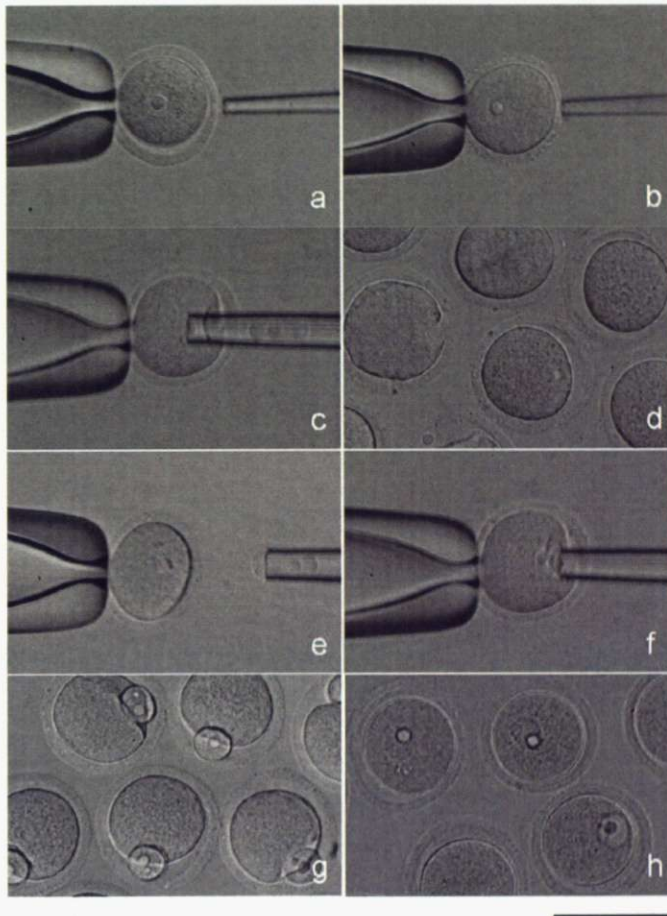


Fig 12. GV核交換の方法 (ここではNSN/SN卵の作製過程を示す)

(a) SN卵に対する酸性MEMCO液処理。マイクロピペットにあらかじめ酸性MEMCO液を吸引しておき、支持ピペットで保持した卵にゆっくりと吹き付けて透明帯の一部分を開孔した。(b) NSN卵に対する酸性MEMCO液処理。困卵腔のない卵は、ピエゾドライブやカッティングナイフなどを用いた従来行われてきた方法では透明帯を開孔できないため、このような方法を用いた。(c) レシピエント細胞質の作製。SN卵からGV核を吸引除去した。(d) レシピエントとなるSN卵細胞質。(e) NSN卵からGV核を吸引し、ドナー核とした。(f) ドナー核をセンダイウイルスとともにレシピエント細胞質に移植した。(g) 移植直後の卵。(h) 融合完了後のNSN/SN卵。Bar = 100 μ m。

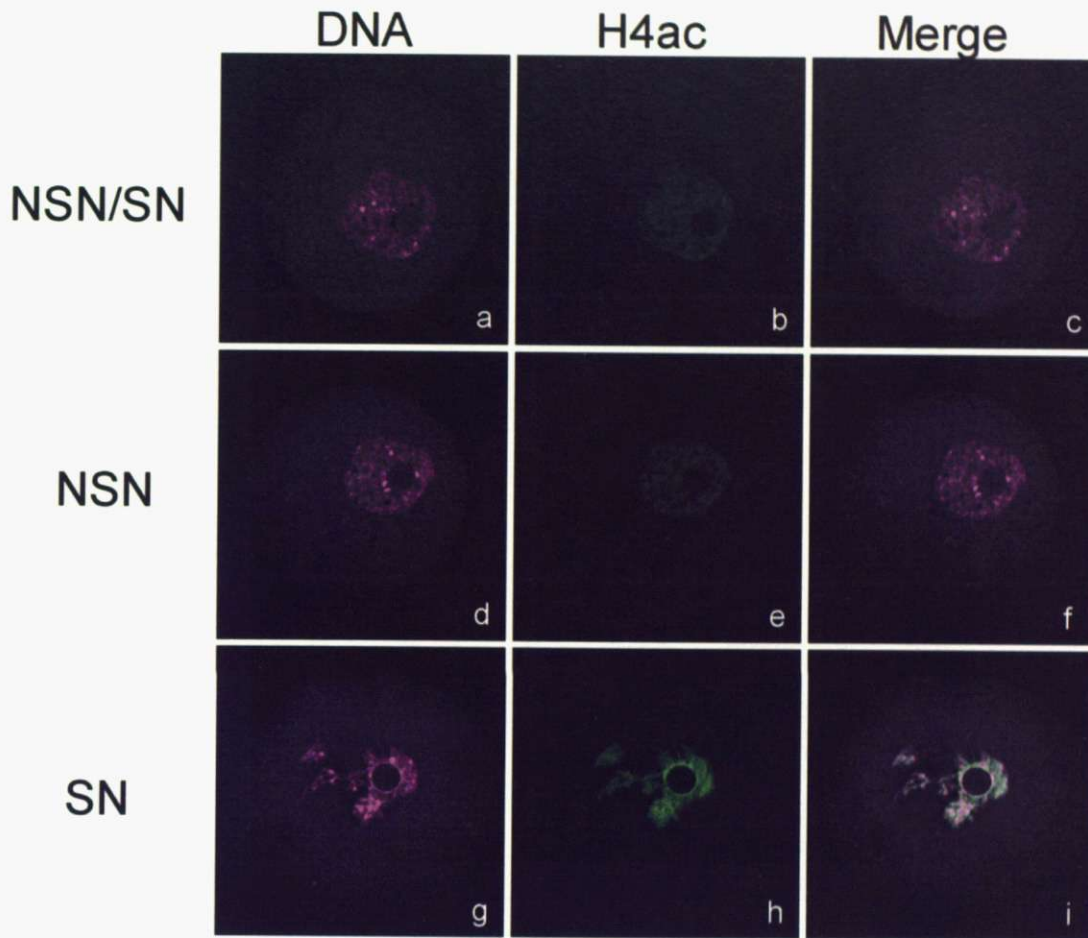


Fig 13. NSN/SN卵のクロマチン形態とエピジェネティクス

NSN核をSN卵細胞質に移植し (NSN/SN卵)、融合後 IBMX 存在下で2時間培養した卵 (a-c) およびコントロールとして核移植を行っていないNSN卵 (d-f) とSN卵 (g-i) を抗アセチル化ヒストンH4 (H4ac) 抗体により免疫染色した。その抗体を FITC 標識二次抗体 (green) を用いて可視化した。また、DNA を Propidium Iodide により染色した (purple)。実験は各回4-13個の卵を用いて3回行った。調べた合計の卵の数は35個 (NSN/SN)、30個 (NSN)、21個 (SN)。Bar = 20 μ m。

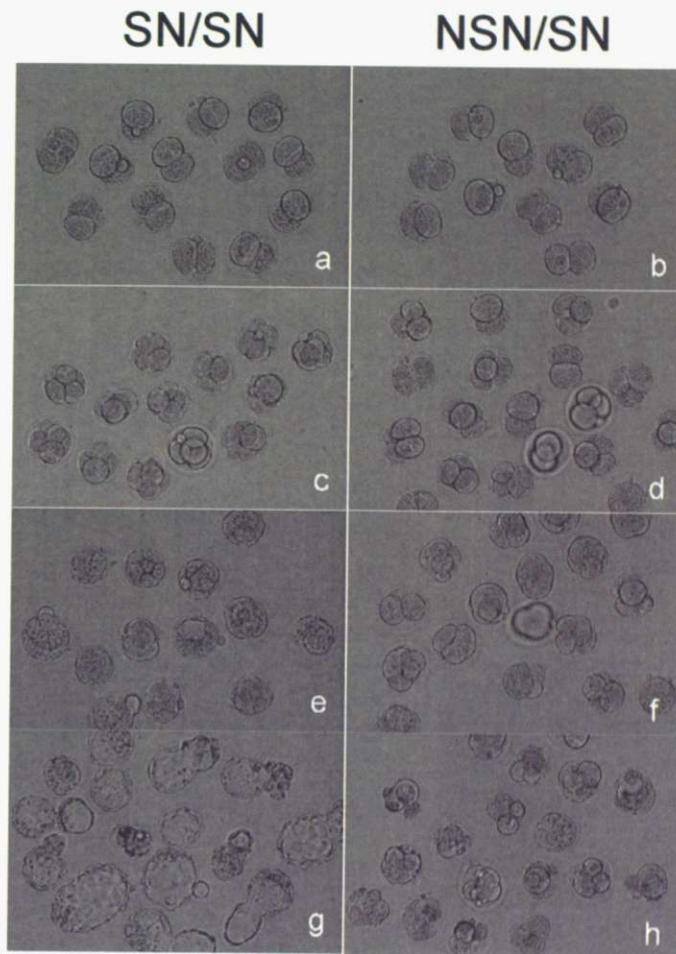


Fig 14. GV核交換卵の初期発生

SN卵細胞質にNSN核を (NSN/SN)、またはSN核 (SN/SN) を移植した後、体外成熟を行い、MII期に達した卵を体外受精させてその後胚盤胞期までの発生能を調べた (a, c, e, g: SN/SN卵、b, d, f, h: NSN/SN卵)。媒精24時間後 (a, b)、48時間後 (c, d)、72時間後 (e, f)、96時間後 (g, h) の様子を示す。Bar = 200 μ m。

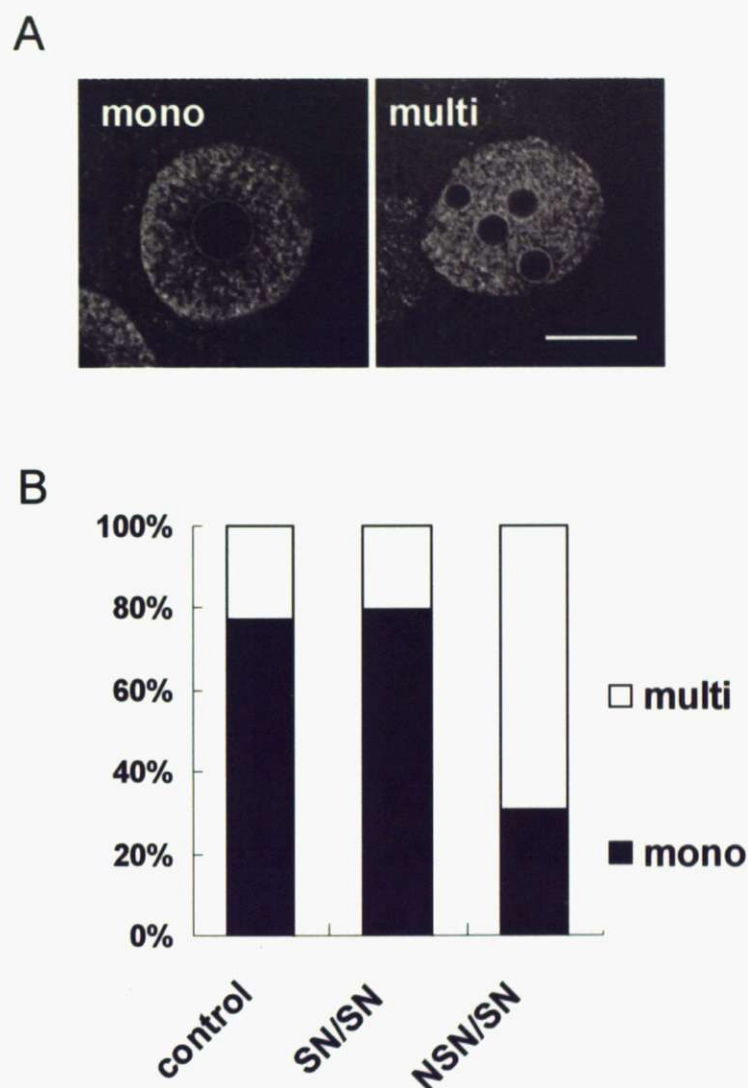


Fig 15. GV核交換卵の1細胞期の前核内核小体

SN卵細胞質にNSN核を (NSN/SN)、またはSN核 (SN/SN) を移植した後、体外成熟を行った。MII期に達した卵を Cytochalasin B存在下で活性化して、2倍体雌性単為発生胚を作出した。活性化8時間後、DNA を Propidium Iodide により染色した。(A) 一つの核小体を持つ前核 (mono-type) と複数の核小体を持つ前核 (multi-type) の形態。Bar = 10 μ m。(B) 活性化8時間後の1細胞期胚における mono-type と multi-type の割合。コントロールとして核移植を行っていないSN卵由来の1細胞期胚を用いた (control)。実験は各回4-15個の卵を用いて4回行い、データを合計して示した。調べた前核の数は88個 (control)、84個 (SN/SN)、72個 (NSN/SN)。

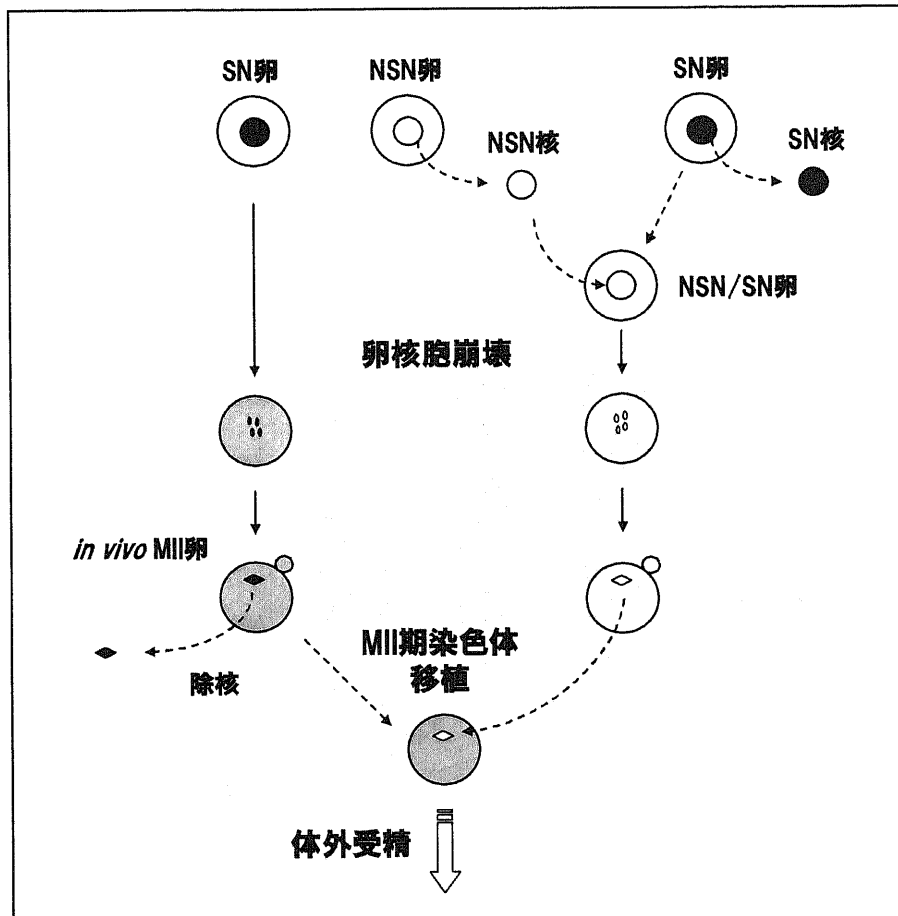


Fig 16. SN核内因子をNSN/SN卵に補う方法の概要

発生に必須な因子を含んでいると仮定したSN核を黒で、それを含まないと仮定したNSN核を白で示した。MII期卵には卵核胞崩壊に伴って細胞質に放出された核内因子が含まれている。*in vivo*で成熟したMII期卵 (*in vivo* MII卵)にはSN卵の核内因子が十分に存在する一方で(灰色)、NSN/SN卵由来のMII期卵にはそれが存在しない(白)。除核した*in vivo* MII卵(灰色)に、NSN/SN卵由来のMII期染色体を移植することで、NSN/SN卵にSN卵の核内因子を補った。

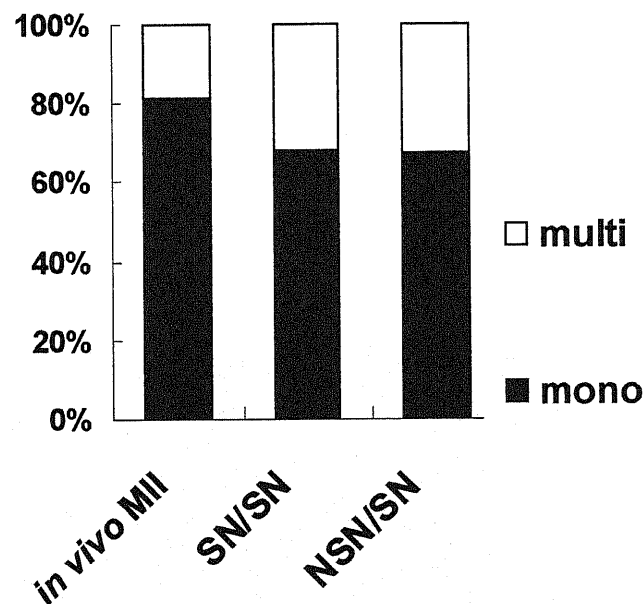
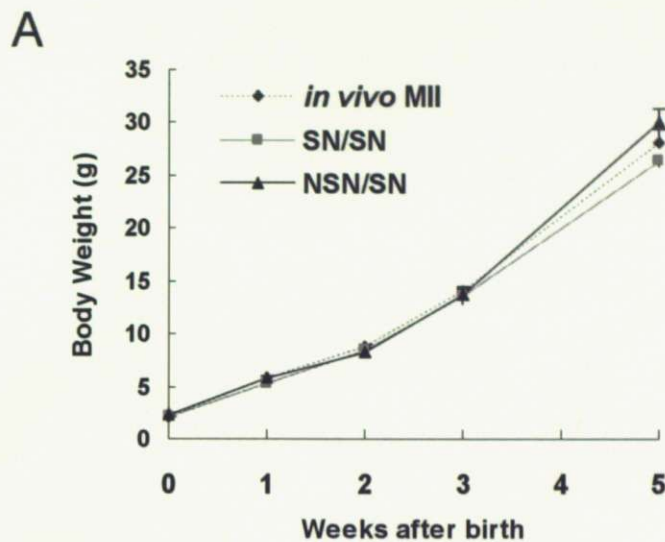


Fig 17. SN核内因子補填時の1細胞期の前核内核小体
SN卵細胞質にNSN核を (NSN/SN)、またはSN核 (SN/SN) を移植した。体外成熟後、MII期染色体移植によりSN卵の核内因子を補った。融合後、Cytochalasin B存在下で活性化して、2倍体雌性単為発生胚を作出した。活性化8時間後の1細胞期胚における mono-type と multi-type の前核の割合を示す。コントロールとして *in vivo* で成熟したMII期卵由来の1細胞期胚を用いた (*in vivo* MII)。実験は2回行い、データを合計して示した。調べた前核の数は64個 (*in vivo* MII)、28個 (SN/SN)、52個 (NSN/SN)。



B



Fig 18. GV核交換およびMII期染色体移植によりNSN卵から得られた個体の成長

(A) SN卵細胞質にNSN核を(NSN/SN)、またはSN核(SN/SN)を移植した。体外成熟後、MII期染色体移植を行った。コントロールとして *in vivo* で成熟した、核移植を行っていない卵を用いた(*in vivo* MII)。体外受精後、胚盤胞期まで体外培養した胚を偽妊娠雌の子宮に移植した。産仔の体重を1週間おきに記録した。測定したマウスの数は、6匹(*in vivo* MII)、7匹(SN/SN)、8匹(NSN/SN)。エラーバーは標準誤差を示す。

(B) NSN/SN卵から得られた産仔(雌)を10週齢まで育て、同雄と交配させた。正常な妊娠期間を経て、仔を出産した。