

卵子の細胞分化・死滅調節系の解明による次世代型動物 発生工学技術の基盤形成

Development of fundamental basis for embryo-biotechnology
in next generation by clarifying the regulatory mechanisms of
cell differentiation and apoptosis of oocytes

佐藤 英明 (SATO EIMEI)

東北大学・大学院農学研究科・教授



研究の概要

1 個体からの受精可能卵子の大量生産を目標として卵子の細胞分化・死滅の調節系の解明を行い、新規調節因子を同定するとともに、これを踏まえ受精能・体細胞初期化能高発現卵子生産などの技術を開発した。さらに、直径70 μ m未満のマウス卵胞卵子由来の産子や家畜ブタ体外成熟卵子をレシピエントとする体細胞ミニブタ作出に成功した。

研究分野：家畜繁殖学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：受精、体細胞初期化、卵巣特異的遺伝子、卵母細胞の死滅、
卵母細胞の生存促進

1. 研究開始当初の背景

次世代の発生工学の基盤形成には、1 個体からの卵子の大量生産、受精能・体細胞初期化能の高い卵子の生産、受精能の改良に係わる現象の解明や関連技術の開発が重要である。

2. 研究の目的

次の4点に集中して研究を行う。(1) 受精能・体細胞初期化獲得の分子メカニズムの解明、(2) 卵母細胞の死滅のメカニズムの解明、(3) 卵胞におけるシグナルの生成・伝搬のメカニズムの解明、(4) 受精能・体細胞初期化能の高い卵子の大量生産及びミトコンドリア置換技術の開発

3. 研究の方法

研究の目的ごとの方法は次の通りである。(1) 受精能・体細胞初期化獲得の分子メカニズムの解明：受精能・体細胞初期化能発現の調節系は成熟の調節系のカスケードの下流とリンクすると予想されることから卵母細胞の成熟に係わる因子の解析を通して研究を進める。(2) 卵母細胞の死滅のメカニズムの解明：卵胞顆粒膜細胞にのみ局在する細胞死受容体とそのデコイ受容体及び卵母細胞の生存を促進するヒアルロン酸合成酵素3を同定しているが、これを踏まえ研究を深化させる。(3) 卵胞におけるシグナルの

生成・伝搬のメカニズムの解明：卵母細胞内で発現するコネクシン分子やその発現調節因子を同定する。(4) 受精能・体細胞初期化能の高い卵子の大量生産及びミトコンドリア置換技術の開発：上記の(1)～(3)の研究をもとに卵巣卵子の高度利用につながる技術開発を行う。

4. 研究の主な成果

1) 卵子の細胞分化・死滅の調節系の解明
(1) Protein kinase B やアクチンフィラメントが減数分裂完了や発生開始能に関与し、紡錘体形成・配列が卵子の細胞分化の最終フェーズに関与することを明らかにした(図1)。(2) 細胞死阻害因子の同定に取り組み、2種類の新規細胞死阻害因子を同定した。(3) 卵胞発育・生存促進にはマクロファージによる閉鎖卵胞の速やかな除去が必要であることや、polylactosamine で修飾されたCD44 がマクロファージの活性化に関与することを明らかにした。(4) ヒアルロン酸・CD44 が卵胞内細胞(顆粒膜細胞)のアポトーシス抑制に関与することを明らかにした。(5) 卵子特異的な新規コネクシン(Cx60)を同定した。Cx43のリン酸化にFSH及びPKAが関与することを明らかにした。(6) 甲状腺ホルモンに卵巣血管網増殖促進作用があり、かつ閉鎖卵胞救助作用のあることを明らかにした。

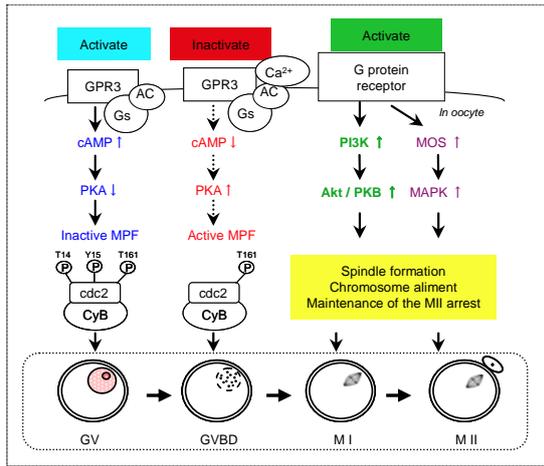


図1. 卵成熟の進行を制御するシグナル伝達

2) 卵子の細胞分化・死滅の調節系の解明を基盤に開発した技術

(1) ブタ、マウス及びラットにおいて受精能・体細胞初期化能を強く発現する体外成熟培養法を開発した。(2) TAP 発現ベクターを用いて GDF-9 遺伝子を卵巣に導入し、初期卵胞のアポトーシス抑制・発育促進を可能にした。さらにラットにおいて GDF-9 と VEGF 遺伝子を組み合わせることにより、より強力な卵胞のアポトーシス抑制・発育促進法を開発した。(3) ES 細胞由来の二次卵胞様構造体の形成に成功した。また、この構造体における性染色体型依存インプリンテイングを確認した。(4) 直径 70 μm 未満のマウス初期卵胞卵子由来の産子を世界で初めて誕生させた(図2)。(5) 体外培養によって得た家畜ブタ成熟卵子をレシピエントとしてミニブタ体細胞クローン作出に成功した(図3)。(6) 体外成熟ブタ卵子をレシピエントとしてイヌ ES 様細胞を樹立した(図4)。



図2. Tap-GDF-9 遺伝子断片導入体外培養システムによる獲得産子



図3. 体細胞ミニブタクローン

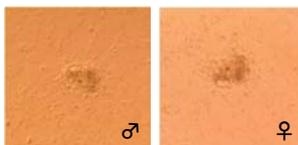


図4. ブタ卵細胞質をレシピエントとしたイヌ異種 SCNT 胚盤胞のアウトグロス像

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

家畜を含む哺乳類の卵子形成は「少数のものを排卵させ、大多数を死滅させる」という独特なものであるが、調節系には不明な点が多い。少数の卵子しか分離できず、生化学的解析が難しいことに加え、卵子形成や死滅は卵胞の中で、卵胞構成細胞とのクロストークによって誘起される複雑な現象であることも、解明が遅れた原因であった。しかし、近年、体外培養系や結合装置に関する知見が集積され、分子生物学的解析も行われるようになってきている。本研究は卵子の分化・死滅に関し研究成果をあげてきた佐藤、西森、眞鍋、竹家及び星野が、今までの研究成果を融合し、さらに共通の目標の下で協力関係を築きながら研究を深化させ、次世代型動物発生工学の基盤形成を行なったものである。国際的な視野からみてその学術的価値・インパクトは高いと自己評価する。国際誌への掲載論文数及び国際学会等からの招待講演数も一定程度あることがその証左と考える。

6. 主な発表論文

- 1) Hoshino, Y., Sato, E.: Protein kinase B (PKB/Akt) is required for the completion of meiosis in mouse oocytes. *Dev. Biol.*, 314:215-223, 2008
- 2) Jiang, J. Y., Miyabayashi, K., Nottola, S. A., Umezumi, M., Cecconi, S., Sato, E., Macchiarelli, G.: Thyroxine treatment stimulated ovarian follicular angiogenesis in immature hypothyroid rat. *Histol Histopathol.*, 23:1387-1398, 2008
- 3) Miyake, Y., Sakurai, M., Tanaka, S., Tunjung, W. A. S., Yokoo, M., Matsumoto, H., Aso, H., Yamaguchi, T., Sato, E.: Expression of hyaluronan synthase 1 and distribution of hyaluronan during follicular atresia in pig ovaries. *Biol. Reprod.*, 80:249-257, 2009
- 4) Tunjung, W. A. S., Yokoo, M., Miyake, Y., Hoshino, Y., Sato, E.: Effect of hyaluronan to inhibit caspase activation in porcine Granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 382:160-164, 2009
- 5) Sugimura, S., Narita, K., Yamashiro, H., Sugawara, A., Shoji, T., Terashita, Y., Nishimori, K., Konno, T., Yoshida, M., and Sato, E.: Interspecies somatic cell nuclear transfer with porcine oocytes as recipients: A novel bioassay system for assessing the competence of canine somatic cells to develop into embryos. *Theriogenology*, 72:549-559, 2009

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/seisyoku/index-j.html>