

2008 年
第 10 回 SSRE 記念シンポジウム
講演要旨集

*Proceedings of the 10th (2008) Commemorative
Annual Symposium of
the Society for Study of Reproduction Engineering*

ほ乳類における個体発生開始の制御について

2008 年 3 月 8 日(土曜日)
明治大学駿河台校舎リバティータワー(12 階)1123 教室
東京都千代田区神田駿河台 1-1

SSRE 生殖工学研究会

第 10 回記念シンポジウム講演要旨集目次

- 12:30 開会の挨拶会長
- 座長 鈴木秋悦 (生殖バイオロジー東京シンポジウム代表)
石川孝之 ((財)日本生物科学研究所)
- 12:35-13:20 遺伝子操作動物を通してみる受精のメカニズム
大阪大学微生物病研究所・附属遺伝情報実験センター 岡部 勝
- 13:20-14:05 ほ乳類における卵母細胞カルシウムオシレーション
麻布大学獣医学部 動物応用科学科動物繁殖学研究室 伊藤 潤哉・柏崎直巳
- 14:05-14:50 雄性生殖細胞の発生と受精能
理化学研究所バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室 小倉淳郎
- 座長 柏崎直巳 (麻布大学獣医学部動物応用科学科)
竹下直樹 (東邦大学医学部産科婦人科学講座)
- 15:10-15:55 父母ゲノムの次世代に対する役割
東京農業大学応用生物科学部 バイオサイエンス学科
動物発生工学研究室 河野友宏
- 15:55-16:40 ヒト生殖補助医療になぜ品質管理、製造管理が必要なのか
東京歯科大学 市川総合病院リプロダクションセンター(婦人科) 兼子 智
- 16:45-17:15 総合討論 総合座長 尾川昭三(SSRE 初代会長)
- 17:20 閉会の挨拶.....後藤正幸(明治大学農学部)

遺伝子操作動物を通してみる受精のメカニズム

○岡部 勝(大阪大学微生物病研究所・附属遺伝情報実験センター)

受精卵に外から遺伝子を注入すると染色体に取り込まれてしまうことがある。Niwaらが作製していたウイルスのエンハンサー、ニワトリのベータアクチンのプロモーター、牛のイントロン配列を利用しながらクラゲ由来の GFP の配列を結合し、ウサギの polyA 付加シグナルを組み合わせたものを作製し、マウスに導入すると全身の組織から蛍光を発する“グリーンマウス”が作製できる。

われわれはその中から X 染色体にトランスジーンが入ったものを利用して、これまで非常に困難であった着床前の胚の雌雄の分別を簡単に行えるような系を作製した。この系を用いて雌雄キメラを作製すると精巣内に「卵子」ができることを見出すことができた¹⁾。このほか、受精のメカニズムを知るために精子の先体内に GFP を発現する“green sperm”をもつトランスジェニックマウスを作製した。この精子は先体反応により GFP が遊離するのでマウス精子の先体反応を可視化することに成功した。このマウスを用いることにより先体の様子を非侵襲的にしかも連続的に観察することが可能になった。

また ES 細胞に遺伝子を導入してそこから望みどおりの遺伝子と組換えをおこしたものを選択すると、特定の遺伝子をデザインどおりに変化させた ES 細胞を得ることが可能である。さらにその ES 細胞をもとに、遺伝子が組換えられた遺伝子操作動物(ノックアウトマウスやノックインマウス)を作りだすことができる。受精に関与する分子群が遺伝子ノックアウトマウスの作製によって証明されている。最初の報告はカルメジンのノックアウトマウスで、このマウスは精子の形態や運動性には問題がないにもかかわらず、射出された精子が子宮に存在するが、輸卵管内に移行できないことと、精子が卵の透明帯に結合できないという2重の表現型が見られる²⁾。その後同様の表現型を示す因子として ADAM 遺伝子やアンジオテンシン変換酵素(ACE)が知られるようになったが、現在、これら因子の相互関係がかなり明確になってきた³⁾。

われわれは融合のステップを特異的に阻害する抗精子モノクローナル抗体を約 20 年前に見出していた。最近になってやっと抗原の Izumo を同定することができた。Izumo をノックアウトすると、雌は正常であるが雄マウスは交配しても妊孕性を示さず、Izumo ノックアウト精子を用いて体外受精を行うと、精子は正常に先体反応を引き起こし、透明帯を無事通過するが全く受精卵を得ることはできない。この精子は卵子との融合能力を完全に欠失していることがわかった。またヒトの場合も Izumo が、卵子との結合または融合に機能するタンパク質でないかということが、特異的抗体を用いた受精阻害実験から示唆された⁴⁾。

さまざまな遺伝子組換え動物を通じてみる受精のメカニズムについて考察する。

参考論文

1. Isotani et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 102, 4039-44 (2005)
2. Ikawa et al., Nature, 387, 607-11 (1997)
3. Yamaguchi et al., Biol Reprod, 75, 760-6 (2006)
4. Inoue et al., Nature, 434, 234-8. (2005)

ほ乳類の受精時における Ca^{2+} オシレーション制御機構

○伊藤 潤哉・柏崎 直巳（麻布大学 獣医学部）

多くのほ乳動物卵は、LH サージによって第一減数分裂前期(GV 期)から減数分裂を再開し、第二減数分裂中期(Metaphase-II 期)まで進行して再び減数分裂を停止する。この状態で卵は排卵され、その後受精が起こることにより減数分裂を再開、完了する。この受精に関するメカニズムとして、現在以下のような機構が考えられている(図および参考文献 1, 2 参照)。①透明帯を通過した精子および卵細胞膜が融合する(岡部先生の項参照)、②精子内にある卵活性化因子(Sperm Factor, SF)が卵細胞質内に放出される。③SFによりホスファチジルイノシトール(4,5)2リン酸(PIP_2)の加水分解が起こり、ジアシルグリセロール(DG)およびイノシトール 3リン酸(IP_3)が生産される。④ IP_3 は小胞体上に存在する IP_3 受容体(IP_3R)に結合し、小胞体から Ca^{2+} が放出されることにより、卵細胞質内の Ca^{2+} 濃度が上昇する。⑤卵細胞質内に増加した Ca^{2+} により、他の IP_3R が刺激され、 Ca^{2+} の反復上昇(Ca^{2+} オシレーション)が誘起される。⑥誘起された Ca^{2+} オシレーションにより、卵はMII期から減数分裂を再開し(卵の活性化)、胚発生へと移行する。

近年の研究から、 Ca^{2+} オシレーションは卵の活性化だけでなく、胚性遺伝子の発現や産子の成長にも重要な役割を起すことが明らかになりつつある(文献 3)が、 Ca^{2+} オシレーションを制御する機構自体は明らかにされていなかった。

Ca^{2+} オシレーションの誘起に関わる因子の一つとして、精子内に存在するSFに関しては、2002年にSaundersらによって精巣特異的に発現するphospholipase C ζ (PLC ζ)がマウスにおいて初めてクローニングされ、PLC ζ の

cRNA をマイクロインジェクションすると，受精時と同様な Ca^{2+} オシレーションが誘起されることが報告された(文献 4)．現在までにラット，ウシ，ブタ，ヒト，ニワトリ等でも $\text{PLC}\zeta$ が存在し高い相同性をもつこと，また $\text{PLC}\zeta$ により Ca^{2+} オシレーションが誘起されることも報告されている(文献 5)．

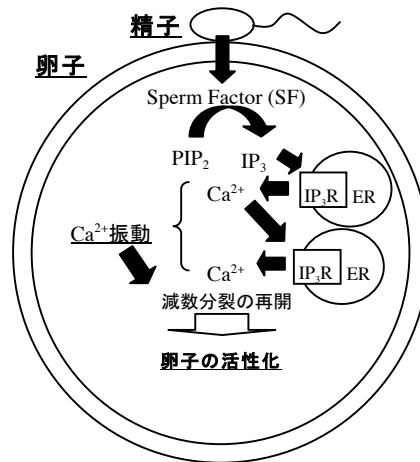


図 卵活性化機構

一方，卵内において Ca^{2+} オシレーションに関与する因子の一つである IP_3R に関しては，GV 期の卵において既に発現していること(文献 6)，しかし顕微受精技術を用い GV 期に精子を注入しても Ca^{2+} オシレーションは誘起されないことから(文献 7)，卵は減数分裂中に何らかの機構(因子)により Ca^{2+} オシレーション誘起能を獲得すると考えられる．

近年我々のグループは，卵内に存在する IP_3R タイプ 1($\text{IP}_3\text{R}1$)が，減数分裂の進行に伴いリン酸化されること，また減数分裂の再開，MII 期での停止に必要な因子の一つである Mitogen-Activated Protein kinase (MAPK)が $\text{IP}_3\text{R}1$ を直接リン酸化することを初めて明らかにした(文献 8)．本講演では，MAPK が Ca^{2+} オシレーションの制御に果たす役割について解説するとともに， Ca^{2+} オシレーションの制御に関与する他の因子について最新の知見を報告する予定である．

参考文献

1. Miyazaki, S. and Ito, M. (2006). Calcium signals for egg activation in mammals. *J. Pharmacol Sci.* **100**, 545-552.
2. Miyazaki, S. (2006). Thirty years of calcium signals at fertilization. *Semin Cell Dev Biol.* **17**, 233-243.
3. Ozil, J. P., Banrezes, B., Toth, S., Pan, H. and Schultz, R. M. (2006). Ca²⁺ oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Dev. Biol.* **300**, 534-544.
4. Saunders, C. M., Laman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K. and Lai, F. A. (2002). PLC zeta: a sperm-specific triggers of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development.* **129**, 3533-3544.
5. Swann, K., Saunders, C. M., Rogers, N. T. and Lai, F. A. (2006). PLC ζ (zeta): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Semin. Cell Dev. Biol.* **17**, 264-273.
6. Mehlmann, M. L., Mikoshiba, K. and Kline, D. (1996). Redistribution and increase in cortical inositol 1,4,5-triphosphate receptors after meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* **180**, 489-498.
7. Jones, K. T., Carroll, J. and Whittingham, D. G. (1995). Ionomycin, thapsigargin, ryanodine, and sperm induced Ca²⁺ release increase during meiotic maturation of mouse oocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 6671-6677.
8. Lee, B., Vermassen, E., Yoon S. Y., Vanderheyden, V., Ito, J., Alfandari, D., De Smedt, H., Parys, J. B. and Fissore, R. A. (2006) Phosphorylation of IP₃R1 and the regulation of [Ca²⁺]_i responses at fertilization: a role for the MAP kinase pathway. *Development.* **133**, 4355-4365.

雄性生殖細胞の発生と受精能

○小倉淳郎（理研バイオリソースセンター）

哺乳動物の生殖細胞は、胎仔期に始原生殖細胞（PGC）として出現し、生殖巣に到達した後に雌雄それぞれの生殖細胞としての分化を開始する。通常 of 体細胞系列は最終分化後は細胞死に至るのみであるが、生殖細胞系列はその最終分化後に配偶子として新たな生命を誕生させるという非常に重要な役割を持つ。この役割のために生殖細胞のゲノムはその発生過程から特殊な変化を遂げていく。主な **genetic** な変化としては減数分裂があり、**epigenetic** な変化としてはゲノム刷込みや初期化（あるいはその準備）がある。近年はこれらのゲノム変化の生化学的・分子生物学的特性を明らかにするために、生殖細胞そのものを極めて高感度かつ再現性良く解析する技術が開発されている。しかし、実際にこれらのゲノム機能を明らかにするためには、生殖細胞を用いて胚を構築し、それを解析しなければならない。それらを可能にする技術が、顕微授精および核移植クローン技術である。

我々は長年にわたって雄性生殖細胞ゲノムの解析のためにこれらの技術を用いてきた。マウスにおいては、顕微授精技術により一次精母細胞、精子細胞、精子を用いて正常産子を得ることができる。すなわち、一次精母細胞ゲノムは、すでに精子とほぼ同等の能力（受精能）を持つと考えられる。また、核移植クローン技術により胎齢 10.5 日 PGC から正常産子が生まれるが、11.5 日以降は生まれない。これはゲノム刷込みの状態が 10.5 日 PGC は体細胞と同等であり、その後刷込み記憶が消去されることを示す。また、出生前後の **gonocyte** を用いた核移植クローンにより、父方ゲノム刷込みが確立している過程も観察できる。

そして生殖細胞は、ゲノム刷込み以外にも、受精と同時に全能性獲得という大きな epigenetic な変化を遂行する。全能性獲得のための初期化因子は、卵子細胞質内にあることは明らかであり、カエルの卵子などを用いて精力的に研究がすすめられている。しかしながら、初期化される側のゲノムについての研究は少ない。すなわち、生殖細胞ゲノムは正常に初期化されるのに、体細胞ゲノムはなぜ異常な初期化をされてしまうのか、という疑問が放置されている。このための研究にも核移植クローン技術は大きく役立つと考えられる。

本講演では、雄性生殖細胞を精子から順に遡り、その胚構築能（受精能）を解説し、そこから得られる生物学的な意義について述べてみたい。

参考総説

Ogura A, Ogonuki N, Miki H, and Inoue K: Microinsemination and nuclear transfer using male germ cells. **Int Rev Cytol**, 246: 189-229, 2005.

父母ゲノムの次世代に対する役割

○河野友宏(東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科)

生殖系列で行われるゲノムのエピジェネティクス修飾は、生殖細胞ゲノムの本質的な機能を調節する必要不可欠な機構です。哺乳類ではエピジェネティクス修飾により調節されるゲノムインプリンティング(遺伝子刷り込み)は、対立遺伝子が母親と父親のどちらから由来したかにより著しい発現差を示します。その破綻は、胚発生停止、さらに新生児の発育障害さらにはガンを始めとする重篤な疾患などを惹起します。また、ゲノムインプリンティング(GI)に起因する父母ゲノム機能の差異は、両ゲノムが個体発生に寄与することを責務とし、一方単為発生を完全に放棄させています。

GIの分子生物学的制御機構の主要因は、配偶子の形成課程で遺伝子の発現制御領域に対して行われる DNA メチル化修飾によると考えられます。父母生殖系列では、独立的にその性に従った DNA メチル化修飾が行われ、メチル化インプリントが成立します。このことは、未発育の生殖系列細胞ゲノムではGIの情報が刷り込まれていないことを意味し、事実、誕生直後の新生仔マウス卵母細胞では母性メチル化情報の刷り込みが行われていません。さらに、雌生殖系列のメチル化インプリントにより発現制御されるインプリント遺伝子の数は、雄生殖系列のメチル化インプリントにより発現制御されるインプリント遺伝子の数に比べ、圧倒的に多いことも知られています。

我々は核移植技術を駆使して新生仔卵母細胞に由来する半数体ゲノムと正常卵子の半数体ゲノムを持つ2倍体胚の作出方法を開発し、メチル化インプリントが個体発生に及ぼす影響を実際に評価するシステムを構築しました。この胚では、新生仔卵母細胞アレルで母性メチル化インプリントにより制御される遺伝子の発現パターンが父性が誘導されるために、臓器形成が認められる妊娠中期にまで発生延長します。さらに、

父性メチル化インプリントにより発現調節を受ける2領域、すなわち7番および12番染色体の父性メチル化インプリント領域のインプリント遺伝子群の発現を、遺伝子欠損マウスを利用して改変して新生仔卵母細胞から発現させ、ほぼ完全な個体発生を誘導することに成功しました。ここでは、雌雄両ゲノムの個体発生における協調的作用に焦点をあて、二母性マウス誕生の背景を紹介します。

ヒト生殖補助医療 (ART) になぜ品質管理、製造管理が必要なのか

○兼子 智(東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンター・婦人科)

1. 再生医療としての ART、医薬資源としての配偶子、胚

胚性および体性幹細胞による再生医療を健全な形で発展させていくために厚生科学審議会科学技術部会“ヒト幹細胞を用いた臨床研究の在り方に関する専門委員会”が発足し、“ヒト幹細胞を利用した臨床研究に対する指針”作成が進められている。特に注目すべきは細胞、組織を *intelligent drug* として位置付け、従来の医薬品の開発、製造、販売と同等の安全性を求めている点である。細胞治療の普及に伴い米国の FDA(連邦食品医薬品局)から *Good Tissue Practice (GTP)* ガイドラインが施行された。GTP とはヒト細胞、組織に由来する医薬品の製造工程において感染性物質の混入、細胞の取り違い防止、細胞の変異防止など、製造工程管理と品質管理の基準を示すことで、安全性および細胞機能を保証しようとするものである。そのため、細胞、組織の操作、培養等を行う施設を *cell processing center (CPC)* と定義し、細胞処理に用いる器具や物質等の *Good Manufacturing Practice (GMP)* 準拠、標準業務手順書 (*standard operating procedures, SOP*) の作成と記録の保存、厳格な品質管理体制の確立などの諸整備を求めている。

ヒト ART は配偶子、胚移植により挙児を図る再生医療の一分野であるが、他と最も異なる点は、1. 他の再生医療は緊急避難的要素が強いのにに対し、治療動機が“挙児”希望である、2. 治療対象が2名以上で構成される、3. 患者(夫婦)が治療法を選択する時点で治療の結果生まれてくる児は存在せず、両親の治療に対する許諾は代理許諾となる、4. 人権保護の観点から治療経過の安全性(患者保護)とともに治療結果の安全性(児への配慮)が求められる、ことである。

ART は、狭義には IUI、IVF、ICSI 等の人工的な授精を指す場合が多い。これらはいずれも体外に取り出した配偶子に操作を加える。IUI では射精精液を分画して精子調製を行い、子宮腔内に移植する。IVF は分画した精子と卵を体外で受精させる。受精は卵への遺伝子(染色体)導入であり、染色体構成が変化した胚はすでに recipient にとって異物である。ICSI では、把持した精子の安全性をどのように品質保証するかが問題となる。GTP はヒトへの移植を目的とする細胞、組織を医薬資源とし、これらの体外操作は製造(製薬)行為であり、その過程が GMP に準拠することを求めている。

2. 精子から始めるヒト ART の品質管理、製造管理

ヒト精子、卵は機能的に不均一な集団であり、それらの品質が受精、発生ひいては児の長期予後に至るまで大きく影響することは言を待たない。ヒト ART 臨床において採卵数は 10 個程度であり、これらを侵襲的に検査、評価することは困難である。他の再生医療では移植予定の組織について詳細な機能評価が求められるが、培養胚は生命であり、顕微鏡観察程度の評価しかできない現状である。

過排卵誘発等により妻から卵が得られると、夫精液所見がどのような状況でも受精卵(胚)を得ることが要求される。夫精液所見は個々の症例間で最も変動する因子の一つである。これまで単純に運動精子＝良好精子と考えてきたが、精子運動能は他の精子機能の正常性を保証するものではないことが明らかになった。ART 臨床において、卵および胚の侵襲的観察、機能評価が困難な現状では、1. 多面的な精子機能評価法を確立する、2. それらに基づく精子調製(望ましい精子の選別: positive selection と望ましくない精子、異物の除去: negative selection)を徹底する、3. 調製した精子の一部を用いて機能検査を施行(抜き取り検査)する、ことが ART における品質管理、品質保証の基礎となる。将来的には培養の GTP 準拠(製造管理)も課題となる。