

2010 年度 日本生殖工学会 ワークショップ

プログラム & 要旨

日時： 2010 年 11 月 28 日(日) 13 時 00 分より

場所： 麻布大学 獣医学部棟 7 階 大会議室

2010年度 日本生殖工学会ワークショップ

開催日時：2010年11月28日（日）午後1時から

開催場所：麻布大学 獣医学部棟 7F 大会議室

参加費：（懇親会費を含む）：正会員（2,000円）、学生会員（1,000円）、非会員（10,000円）

プログラム

13:00～13:05 開会の辞

13:05～13:40 講演Ⅰ：金田 正弘（農研機構 畜草研：精子形成のエピジェネティクス
～ クローン牛から見えてきたこと ～）

13:40～14:15 講演Ⅱ：兼子 智（東京歯科大 市川病院：ヒト精子の品質管理）

14:15～14:50 講演Ⅲ：野口 純子（生物研：精子形成におけるFK506結合蛋白質6
（FKBP6）の機能解析）

14:50～15:10 Coffee Break

15:10～15:45 講演Ⅳ：平尾 雄二（農研機構 東北農研：体外での卵母細胞の発育）

15:45～16:20 講演Ⅴ：杉浦 幸二（東大：卵胞発育過程での卵由来シグナルと
エストロゲンシグナルの相互作用）

16:20～16:55 講演Ⅵ：中井 美智子（生物研：ブタ卵細胞質内精子注入卵における受精と発生）

16:55～17:30 講演Ⅶ：林 克彦（京大：多能性幹細胞から生殖細胞への分化）

17:30～17:35 閉会の辞

17:35～ 懇親会（7F ラウンジ）

お問い合わせ先：柏崎 直巳（麻布大：〒252-5201 相模原市中央区淵野辺 1-17-71）

E-mail: nkashi@azabu-u.ac.jp

学会HP: <http://sre.ac.affrc.go.jp/Index.htm>

Coffee Break 提供

メルクセローノ株式会社 不妊治療領域事業部

精子形成のエピジェネティクス ～クローン牛から見えてきたこと～

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所
高度繁殖技術研究チーム 主任研究員
金田 正弘

哺乳類の精子形成過程では、減数分裂による半数体形成とともに、相同組換えが起こることで遺伝的な多様性を確保している。このような「ジェネティック」な変化とともに、DNA塩基配列の変化によらない遺伝子発現制御機構である「エピジェネティック」な変化も精子形成過程においてダイナミックに起こることが知られている。その一例がゲノムインプリンティングであり、父由来・母由来の一方の遺伝子のみが特異的に発現するように刷り込み（インプリント）されることで、単為発生胚の発生を防いでいると考えられている。その他にも、トランスポゾン発現抑制や、ヒストンからプロタミンへの核タンパク質の置換、成熟精子形成過程における核の凝集、減数分裂時の染色体構造構築など精子形成過程における様々な現象に、DNAのメチル化やヒストン修飾などエピジェネティクス機構が関与していることが知られている。

一方、我々が研究している体細胞クローン動物はエピジェネティックな観点から非常に興味深い研究対象であるが、世界初の体細胞クローン羊ドリーが誕生して14年経つものの、クローン動物の発生率は依然として5%以下と極めて低いままである。しかし、クローン動物から通常の受精によって誕生した子孫（後代）には、クローン動物で見られるような異常は観察されない。その理由は生殖系列を通過することによって、エピジェネティックなエラーが「リセット」されたことによると考えられている。そこで我々は、体細胞クローン雄牛の体細胞と精子DNAのメチル化レベルを非クローン雄牛と比較し、クローン雄牛の精子形成過程において適切なリプログラミングが起こっていることを明らかにした。この結果は、クローン後代牛の健全性に資するものである。さらに、体細胞におけるメチル化レベルの個体差が精子では無くなっていることから、精子形成過程におけるリプログラミングは、体細胞におけるエピジェネティックメモリーをリセットし、次世代へ「真っさらな状態」のゲノムを受け渡すための機構ではないかと考えられる。

クローン牛の研究から見えてきたことを紹介させて頂きたい。

ヒト精子の品質管理

東京歯科大学 市川病院

兼子 智

これまで、精子の最も特徴的な機能である運動性に着目して精子妊孕性の評価が行われてきた。ART の高度化に伴い、媒精、穿刺に供する精子に対してより詳細な機能評価、さらにそれらに基づく品質保証が求められるようになった。演者らは精子機能の多面的な観察による精子品質管理を目指し、多種類の精子観察法を開発してきた。当日は、その一部を紹介する。

精子形成における FKBP6 結合蛋白質 6 (FKBP6) の機能解析

(独) 農業生物資源研究所
生殖機構研究ユニット
野口 純子

精子形成は精祖細胞の増殖と分化、精母細胞から精子細胞への減数分裂および変態による精子への分化という 3 つの連続する過程から成ります。精子形成調節機構を解析するモデル動物として相同組み換え技術により多くのノックアウトマウスが作出されました。一方で、この遺伝子操作技術が開発される以前は、突然変異動物を遺伝的に固定し連鎖解析等の遺伝学的手法により原因遺伝子を解析することで、種々の疾患モデル動物が作出されました。本日紹介する **TT** ラットは、ウイスターイマミチラットに由来する (財) 動物繁殖研究所において開発されたモデル動物で、その表現型の特徴は減数分裂前期 (厚糸期) で精子形成が停止し無精子症を発症することです。

90 年代後半に連鎖解析のツールであるラットのマイクロサテライトマーカーが多数開発され、更にゲノム塩基配列に関する情報が入手可能となったことから、発表者らは **TT** ラットの原因遺伝子の遺伝子座 (**as** と命名) の染色体上の位置の詳細な解析を実施しました。ほぼ同時期に共通する表現型を示すノックアウトマウスが作出される幸運が重なり、**as** が **Fkbp6** の変異遺伝子であることを証明できました。このように **TT** ラットは、ある遺伝子の発現抑制がマウスと共通する表現型をもたらすことを証明できた貴重な例と言えます。

これまでに多くのノックアウトマウスで減数分裂前期厚糸期に精子形成が停止することが報告され、こうした動物の多くに厚糸期精母細胞で進行する重要な細胞内イベントである相同染色体の対合の異常が報告されています。**FKBP6** 欠損マウス・ラットにおいても、発生頻度に差違はあるものの、同様の対合異常が観察されました。その分子生物学的機序として、対合維持装置であるシナプトネマ構造の主要な構成蛋白である **SCP1** と **FKBP6** の相互作用が示唆されています。一方で、**FKBP6** 欠損厚糸期精母細胞には、他の対合異常による減数分裂停止では観察されない特徴的な所見が認められます。それは、核の近傍に出現するリボソームの‘巨大な’集塊です。厚糸期は転写活性が亢進する時期で多くの遺伝子が転写されますが、転写産物は直ちに翻訳されるのではなくリボ核酸蛋白等の形態により翻訳抑制を受けることが明らかにされています。しかし、その機構については多くが不明なままです。**FKBP6** 欠損で出現するリボソーム集塊は、**FKBP6** の機能解明と共にこの時期の翻訳調節機構を解析するモデルとして期待されます。現在、リボソーム集塊形成機序の解明は道半ばではありますが、本発表ではこれまでに得た知見を紹介させていただきます。

体外での卵母細胞の発育

農研機構 東北農研

平尾 雄二

哺乳類の卵巣内には大量の卵母細胞が蓄えられているが、それらのほぼ全ては発育開始前あるいは発育途上のいずれかの状態にある。そして、さらにそれらの大多数はそのまま退行する運命にある。自然では、発育を完了し成熟にいたる卵母細胞はごくわずかにすぎない。私たちが本来失われるはずの卵母細胞を利用するためには、体外に取り出し、成熟能力が獲得されるまで発育させる必要がある。その目的に添う培養システムは、1) 卵母細胞の細胞としての機能を維持すると同時に生殖細胞としての分化を促進することができる、2) 卵母細胞と顆粒膜細胞層との物理的な接着を維持することができる、3) 卵母細胞と顆粒膜細胞の機能的な相互作用を維持することができる、などの条件を満たさなければならない。これまでに、卵母細胞の発育を目的として多くの培養方法が開発されてきた。卵母細胞を発育させるという最終的な目的は同じでも、アプローチの方法は様々である。簡潔に言えば、「卵母細胞を中心として計算された培養システム」と「完璧な卵胞の構築を目指し、その結果として内部の卵母細胞の発育を達成しようとするシステム」に分けられる。さらに、培養後の組織形態や、組織を構成する細胞の種類、あるいは組織内の卵母細胞の位置などによって、大きく4つに分類することができる。4つの特徴的な組織形態は、卵巣から卵胞を分離する方法、培養基質の材質、あるいは性腺刺激ホルモン等の有無などの要素の組み合わせで決定される。今回、異なる組織形態とその結果得られる卵母細胞の発育状態について考察してみたい。今後の卵母細胞の体外発育研究において、最適な組み合わせを決めていくことが重要である。

卵胞発育過程での卵由来シグナルとエストロゲンシグナルの相互作用

東京大学農学生命科学研究科応用動物科学専攻

応用遺伝学研究室

杉浦 幸二

哺乳類の卵胞発育には、下垂体から分泌される性腺刺激ホルモンや卵胞の体細胞が生産するステロイドホルモン・増殖因子に加えて、卵母細胞が分泌する増殖因子などが複雑に関与している。これらのシグナルのバランスが崩れてしまうと、卵胞は正常に発育できず、機能的な卵子は生産されない。我々は、これらの卵胞内シグナルの相互作用メカニズムを理解することを目指し、その第一歩として卵母細胞の正常な発達に不可欠である卵丘細胞の機能・発達制御に着目した。

卵丘細胞の正常な機能や発達には、Bone morphogenetic protein 15 (BMP15)、Growth differentiation factor 9 (GDF9)や Fibroblast growth factor 8 (FGF8)などの卵母細胞由来の増殖因子やエストロゲンが重要な役割を果たすことが知られている。これらの増殖因子やエストロゲン受容体のノックアウトマウスでは、卵丘細胞が正常に発達せず、卵母細胞は十分な発生能を獲得できない。しかし、それらのシグナルが生体内でどのように相互作用してバランスを保っているのかは不明である。本講演では、最近の研究成果に基づいた、卵母細胞由来の増殖因子とエストロゲンシグナルとの相互作用メカニズムについての我々の仮説を議論したい。

ブタ卵細胞質内精子注入卵の受精と発生

(独)農業生物資源研究所

中井 美智子

近年、ヒトや家畜の生殖補助技術の一つとして、精子を卵細胞質内に直接注入することで受精卵を作出する卵細胞質内精子注入 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI)法が発達してきた。ICSI 技術の主な利点としては、運動性の乏しい精子を用いての受精卵作出、多精子受精が頻発する動物種では単精子受精卵の効率的な作出が可能であることが挙げられる。特にブタでは非常に有効な手法であると考えられる。しかし、その反面、本来ならば受精過程において精子あるいは精子-卵子間に生じるはずの生理的現象(精子の前進運動性、受精能獲得、先体反応、精子と卵子の膜融合)を伴うことなく精子は卵細胞質内に注入されることになる。

我々は、ブタの生殖工学研究をテーマとしている。その中で重要な基礎技術としてICSIの研究を行ってきたが、ブタ ICSI 卵では雄性前核形成不全、胚発生能の低さなどが問題となっている。それが何に起因するのかを、体外受精卵と ICSI 卵において生じる受精現象の違いに着目して研究を行ってきた。本ワークショップでは、ICSI に用いる精子の先体や核の凝縮状態、卵活性化誘起能が受精と胚発生にどのような影響を及ぼすかについての研究成果を紹介する。

多能性幹細胞から生殖細胞への分化

京都大学大学院医学研究科

林 克彦

すべての生殖細胞の源である始原生殖細胞は、胚発生のごく初期に体細胞系列と分岐する。その後独自の発生過程をたどり、最終的には精子や卵子に分化する。生殖細胞系列の発生における最も大きな特徴は、体細胞系列が発生・分化の進行に従い分化可塑性が失われるのに対し、生殖細胞系列の最終分化産物である精子と卵子は全能性をもつ受精卵になることである。「生殖細胞がその発生過程において、どのようにして全能性を再獲得するのか？」という問いは生命科学において最も基本的かつ重要なテーマの一つである。我々はマウスを用いて始原生殖細胞の発生を制御する分子機構を明らかにすることにより、そのテーマに迫ろうと研究を行っている。

マウスの始原生殖細胞は胎生6日目前後に多能性細胞集団であるエピプラストから BMP4 のシグナルにより分化する。エピプラストから分化した始原生殖細胞では、転写因子 **Blimp1** などの働きにより体細胞化のプログラムが抑制されると同時に、多能性細胞特異的遺伝子 **Nanog** や **Sox2** が発現する。これらの転写因子の発現に加え、始原生殖細胞では、以下のような特徴的なエピジェネティックな変化（エピジェネティックリプログラミング）がゲノムワイドに認められる。胎生7日目から12日目前後の始原生殖細胞はヒストン **H3K9** のジメチル化の減少と **H3K27** のトリメチル化の亢進、DNA のメチル化の減少、さらに刷り込み遺伝子の消去や、雌の胚では不活性 X 染色体の再活性化などが認められる。始原生殖細胞の分化機構およびそれに続いて起こるエピジェネティックリプログラミング機構を詳細に明らかにすることは、生殖細胞系列における全能性の獲得機構の解明に大きな意義をもつ。しかしながら、発生初期の始原生殖細胞はごく少数の細胞集団であることから研究材料としては限定的であり、それらのメカニズムは不明な点が多い。

初期胚より樹立される多能性幹細胞は体外培養において無制限に増殖し、至適条件下で生殖細胞を含む様々な細胞に分化する。体外培養において多能性幹細胞から安定的に始原生殖細胞が誘導されれば、胚からは多数回収することが困難な始原生殖細胞を容易に得ることが可能となり、その分化機構やエピジェネティックリプログラミング機構の解明に大きく貢献すると考えられる。また体外培養での始原生殖細胞の誘導は将来的に不妊治療への貢献や遺伝子資源の確保といった意味からも重要な意義をもつと考えられる。本講演では、胚盤胞中の内部細胞塊から樹立される ES 細胞と着床後の胚のエピプラストから樹立される EpiS 細胞からの始原生殖細胞の分化についてその可能性と問題点について議論したい。



2010年度 日本生殖工学会 ワークショップ

講演要旨集

編集・発行 SRE[日本生殖工学会]

発行代表者 柏崎 直巳

〒252-5201

神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71

麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室内

電話:042-769-2339

FAX:042-769-1762

発行 平成22年11月28日