

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660253

研究課題名(和文) 卵母細胞の核小体は胚発生に必要なか？

研究課題名(英文) Do embryos need oocyte nucleolus?

研究代表者

宮野 隆 (MIYANO, TAKASHI)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：80200195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の卵母細胞や受精卵には、体細胞の核小体とは構造の異なる緊密な核小体が存在する。本研究では、ブタおよびマウスの卵母細胞と1細胞期胚/受精卵から核小体を顕微操作によって除去後、発生させた。脱核小体卵母細胞は成熟、受精して前核を形成したが、前核中に核小体は形成されず、発生を途中で停止した。一方、脱核小体1細胞期胚/受精卵は胚盤胞へと発生し、マウスでは移植後、正常な産仔となった。また、脱核小体した受精卵は、発生の過程で体細胞型の核小体を形成した。これらの結果は、卵母細胞の核小体は胚発生に必須であるが、受精卵の核小体は胚発生に必要なこと、胚は自ら体細胞型の核小体を形成しうることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Nucleoli in mammalian oocytes and zygotes, referred to as nucleolus precursor bodies (NPBs), are compact and morphologically different from nucleoli in somatic cells. In this study, nucleoli were removed (enucleolated) from oocytes, parthenogenetically activated pig 1-cell embryos and mouse zygotes by micromanipulation. Nucleoli of oocytes were not necessary for oocyte maturation and fertilization but, in their absence, no nucleoli were formed in zygotes, leading to their developmental failure. Enucleolated 1-cell embryos/zygotes developed to blastocysts and, after transfer of the mouse embryos to recipients, live pups were obtained. Enucleolated zygotes formed new nucleoli after several divisions. These results suggest that oocyte nucleoli are essential for embryonic development, but zygote nucleoli are not. In addition, the enucleolated zygotes formed somatic-type nucleoli during early embryonic development, demonstrating that somatic-type nucleoli do not originate from zygote NPBs.

研究分野：統合動物科学

キーワード：卵母細胞 受精卵 核小体 体外培養 顕微操作

1. 研究開始当初の背景

卵巣内で発育を完了した卵母細胞や、受精卵（1細胞期胚）～2細胞期胚には、極めて緊密で均質な核小体が存在する。この核小体は、体細胞の核小体とは構造的に異なり、転写活性もないことから、「nucleolus-like body」あるいは「nucleolus precursor body (NPB)」とも呼ばれ、機能のない構造体と考えられてきた。この卵母細胞や初期胚に特有な核小体の機能はこれまで知られていなかったが、発育を完了したブタおよびマウスの卵母細胞から顕微操作によって核小体を除去すると、核小体をもたない卵母細胞（脱核小体卵母細胞）は正常に成熟、受精して、雌雄両前核を形成するが、受精卵の前核中に核小体が形成されないこと、また、この脱核小体卵母細胞由来の受精卵は発生の途中で卵割を停止することが明らかとなった（Ogushiら, Science, 319: 613-616, 2008, 右下図）。この結果は、「受精卵の核小体は卵母細胞の核小体に由来する」、また、クローン動物を作出する際、成熟卵に注入された体細胞から形成される「クローン胚の核小体も卵母細胞に由来し、母親由来の核小体がなければ胚は発生しない」との発見となった。

その後の研究で、ブタの脱核小体卵母細胞を成熟させた後、発育途上の卵母細胞あるいは2細胞期胚の核小体を細胞質に注入すると、胚は発生能力を回復することが示された（Kyogokuら, Mol. Reprod. Dev., 77: 167-173, 2010; Biol. Reprod., 87: 113, 2012）。また、成熟後のマウス脱核小体卵母細胞に核小体を戻すと胚は発生するが、前核期の受精卵に戻しても胚発生率が回復しないこと（OgushiとSaitou, J. Reprod. Dev., 56: 495-501, 2010）、脱核小体したブタ卵母細胞に由来する2細胞期胚に2細胞期胚の核小体を入れても発生能はほとんど回復しないことも明らかとなっている（Kyogokuら, Biol. Reprod., 87: 113, 2012）。これらの結果は、卵母細胞の核小体は、受精後の特定の時期にのみ機能する可能性を示唆しているが、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

卵母細胞の核小体は、卵母細胞の成熟から受精の間、核膜の消失にともなって一旦消失し、受精後の前核中に再び出現する。これは核小体の成分が細胞質中に分散することによると考えられるが、脱核小体卵母細胞には成熟から受精の間、核小体の成分は細胞質中にも存在しないことになる。もし核小体の成分が、この間に、あるいは受精後の前核形成過程に、その後の胚発生に必要な何らかの機能を果たしているとするれば、前核期胚あるいはその後の2細胞期胚には、もはや卵母細胞由来の核小体は必要ないことになる。

本研究では、ブタおよびマウス2種の動物

を用い、核小体をもたない前核期の受精卵（1細胞期胚）が発生すること、また発生するならば、これらの胚で形成されるであろう体細胞型の核小体が卵母細胞の核小体（NPB）に由来しないことを示す。

3. 研究の方法

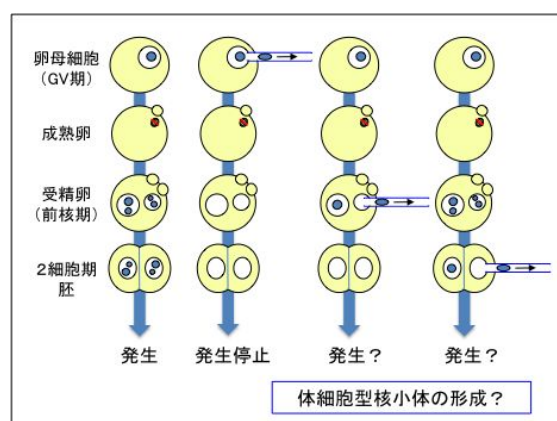
(1) 材料

と畜場で採取したブタの卵巣から直径4～5mmの卵胞を切り出し、直径約120μmの発育を完了した卵核胞期（GV期）の卵母細胞を採取した。また、体外成熟させた卵母細胞を電気刺激によって活性化して、前核期の1細胞期胚を作出した。

マウスのGV期の卵母細胞をeCG投与後のマウス卵巣から、成熟卵をeCGとhCGを投与したマウスの卵管から採取した。前核期胚は、受精後の時間を厳密にコントロールできるように、成熟卵を精巣上体精子で顕微授精することによって作出した。

(2) 脱核小体前核期胚の発生

ブタ1細胞期胚およびマウスの受精卵（ともに前核期）を用いて、脱核小体操作を行った（下図）。ブタ前核期胚の核中には複数の核小体が存在したため、遠心分離によって核小体を1個に融合させたのち、顕微操作によって核小体を除去した。マウスでは前核が発達し、核小体が1個になったものから核小体を除去した。脱核小体後、胚を体外で発生させ、胚盤胞への発生率を調べた。また、マウスについては、2細胞期胚を移植し、産仔への発生を調べた。



(3) 脱核小体前核期胚による体細胞型核小体の形成

脱核小体前核期胚から発生した胚では、卵母細胞型の核小体（NPB）がまったく形成されない。このため、核小体蛋白質（NPM2, B23, C23）に対する抗体を用いて、発生過程

の胚の核小体を染色し、体細胞型核小体の形成を調べた。また、ライブセルイメージングによって核小体の形成過程を調べた。

4. 研究成果

(1) ブタ

GV 期のブタ卵母細胞から顕微操作によって核小体を除去した後、成熟・活性化処理して作出した 1 細胞期胚は、既報 (Ogushi ら, Science, 319: 613-616, 2008) の結果と同様に、2 ~ 4 細胞期で発生を停止した。

前核からの脱核小体操作に先立って、電気刺激による活性化後の胚における前核形成および核小体の形成過程を調べた。電気刺激 4 時間後より前核が形成され始め、電気刺激 21 時間後に胚は第一卵割を開始した。また、前核形成の過程で、核小体の体積は徐々に増加したため、電気刺激 18 時間後の前核期胚を遠心分離後、顕微操作によって核小体を除去し、発生させた。その結果、脱核小体した 1 細胞期胚は胚盤胞へと発生した。

前核期に脱核小体した胚では、2 ~ 4 細胞期の核内に、明瞭な核小体は観察されなかったが、8 細胞期~桑実期には体細胞型の核小体が形成された。

(2) マウス

GV 期のマウス卵母細胞から顕微操作によって核小体を除去した後、体外成熟と顕微授精によって作出した受精卵は、既報 (Ogushi ら, Science, 319: 613-616, 2008) の結果と同様に、発生を途中で停止した。

一方、脱核小体した受精卵は胚盤胞へと発生した (下図: マウス受精卵の脱核小体操作, 矢印は核小体)。また、移植後、正常な産仔へと発生した。



緑色蛍光蛋白質 EGFP と赤色蛍光蛋白質 mCherry でそれぞれ標識した NPM2-EGFP あるいは B23-EGFP とヒストン H2B-mCherry の mRNA をマウス卵母細胞に顕微注入した後、顕微授精し、前核期に脱核小体したところ、脱核小体受精卵は、胚の発生過程で体細胞型の核小体を形成した。

これらの結果は、受精卵 (1 細胞期胚) の前核中の核小体は胚発生には必要なく、胚は自ら体細胞型の核小体を形成しうることを示唆している。しかし、卵母細胞から核小体

を除去した後、成熟・受精させた胚は、発生を途中で停止することから、卵母細胞の核小体は胚発生に必須であると考えられ、核小体は胚発生開始の極めて初期にのみ機能すると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Kyogoku H, Kitajima TS, Miyano T. Nucleolus precursor body (NPB): A distinct structure in mammalian oocytes and zygotes. Nucleus, 査読有, 5(6), 2014, 493-498

DOI: 10.4161/19491034.2014.990858

Kyogoku H, Fulka J Jr, Wakayama T, Miyano T. De novo formation of nucleoli in developing mouse embryos originating from enucleolated zygotes. Development, 査読有, 141(11), 2014, 2255-2259

DOI: 10.1242/dev.106948

Nobata T, Kyogoku H, Miyano T. Hematoxylin staining reveals decrease in nucleolar diameter of pig oocytes before germinal vesicle breakdown. Journal of Reproduction and Development, 査読有, 59(5), 2013, 500-505

DOI: 10.1262/jrd.2012-182

[学会発表] (計 5 件)

Kyogoku H, Fulka J Jr, Kitajima TS, Wakayama T, Miyano T. Nucleoli are formed in developing mouse embryos without nucleolus precursor bodies (NPBs). World Congress of Reproductive Biology 2014, 2014 年 9 月 2~4 日, Edinburgh (Scotland) 京極博久, 若山照彦, 宮野 隆. 顕微注入した核小体がマウス顕微授精胚および体細胞核移植胚に及ぼす影響. 第 107 回日本繁殖生物学会大会, 2014 年 8 月 21~24 日, 帯広畜産大学 (北海道)

京極博久, Fulka J Jr, 若山照彦, 宮野 隆. 脱核小体した前核期胚の発生能力. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~14 日, 東京農工大学 (東京)

羽賀友里菜, 京極博久, 宮野 隆. 脂肪小滴を除去したブタ単為発生 2 倍体胚のライブセルイメージング. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~14 日, 東京農工大学 (東京)

Kyogoku H, Wakayama T, Miyano T. Effect of extra-nucleolus injection on development of ICSI and SCNT embryos. The 10th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society, 2013 年 8 月 19~25 日, Phan Thiet (Vietnam)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮野 隆 (MIYANO Takashi)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：80200195