

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380156

研究課題名（和文） 卵成長過程における成熟能および発生能獲得機構の解明

研究課題名（英文） Acquisition of the meiotic and mitotic competence during oocyte growth

研究代表者

青木 不学（AOKI FUGAKU）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20175160

研究成果の概要（和文）：哺乳類の卵は卵巣内での成長過程でその後の成熟能および発生能を獲得する。しかし、十分に成長した卵においても、一部にこれらの能力を獲得していないものが存在する。本研究においては、これらの能力に関わる因子を同定するため、まずそれらの能力を有する卵とそうでないものについて RNA シーケンス法による網羅的発現解析を行い、候補となる遺伝子を探索した。次いで成長期卵におけるそれらの発現を RNAi により抑制することで目的の因子を同定することができた。

研究成果の概要（英文）：Mammalian oocytes acquire the competence for meiotic maturation and subsequent development during their growth in the ovaries. However, a part of fully grown oocytes do not have this competence. In the present study, to determine the factor(s) involved in this competence, I conducted the transcriptome analysis for the oocytes with and without the competence. Several candidates for the factor were obtained from this analysis. By inhibiting the expression of these candidates in the growing oocytes, I determined the target factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：農学

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：発生、成熟能、発生能

1. 研究開始当初の背景

（1）発生工学における高品質卵使用の重要性について

畜産分野では、これまで様々な優良遺伝形質を持つ家畜個体の選別・育種が進められてきた。そして、これらの形質を可能な限り次

世代に多く残すための方策として、発生工学的手法が用いられている。すなわち、体外受精・受精卵凍結・胚移植などの試みがこれまでに実際の事業としてなされてきている。さらには近年、優良遺伝形質を確実に次世代に繋げるためにクローン動物を作成するとい

う研究プロジェクトも進められている。また将来においては、より良い遺伝形質を創り出すために遺伝子改変動物作成の実用化も視野に入れる必要がある。

これらの発牛工学的手法は今後の畜産物の生産性を高めることに非常に重要と考えられるが、現在のところ大きな問題に直面している。それは、その成功率が低く、実際の応用に際してのコストがかかり過ぎるという問題である。例えば、現在、家畜改良事業団・家畜バイオセンターで牛の体外受精・胚移植事業を展開しているが、その受精後の発生率は約40%と極めて低い。また、文献によると豚においては体外成熟率は80%以上と比較的高いが、発生率は20%程度と極めて低い。また、クローン動物作成の成功率はわずか数%である。そして、これらすべての作成効率の低さの大きな原因の1つとなっているのが、これらの技術の基礎になっている体外受精に用いる卵の品質である。ここでいう卵の品質とは、成熟能と発生能に関するものであり、すなわち、品質の低い卵では、まず体外での成熟（減数分裂）が良好な状態で完遂されず、さらにはその後の受精・発生が十分に進行しない。またクローン動物の作成においても、核移植操作を行って尚、良好な発生を遂げるためには、卵の質が重要な要素となることはいままでのない。

以上のように、家畜の生産性を高めるための発牛工学的手法における基礎技術として、体外での卵成熟および胚発生技術の改良が重要であり、そのための最も重要なベースとして、より品質の良い卵を得るための技術が必須と考えられる。

(2) 卵の品質—成熟能と発生能—について現在、牛や豚などのほとんどの大型家畜における体外受精、あるいはクローン動物・トランスジェニック動物作成に際しては、卵巣から採取した卵核胞期卵（GV卵）を体外で成熟させ、さらに受精した胚を体外で発生させる必要がある。しかしながら、卵巣から得られるGV卵はすべてが成熟能、あるいは受精後の発生能を持つものではないことが知られている。

GV核のDNAを染色して観察すると、DNAが核小体の周囲に局在しているもの（Surrounded nucleolus; SN型）とGV核内に一様に広がっているもの（Non-surrounded nucleolus; NSN型）の2種類があるが、これらの核相の違いと成熟能および発生能に明確な相関関係があることが知られている。すなわち、SN型のもは成熟率および発生率が高いが、NSN型のもはそれが低いというものである。このことは、GV卵の時点で、将来、卵成熟および胚発生が可能かどうかの運命決定がなされている

ことを示している。また申請者は近年、成熟能と発生能は共通の因子で決定されているのではなく、それぞれ異なった因子で決められていることを明らかにした。上述したように、SN型の核相を持つGV卵は成熟率および発生率が高く、NSN型卵はその両方が低いことが報告されていた。そこで、成熟能および発生能に関わる因子が核あるいは細胞質のどちらに存在するのかを明らかにするために、SN卵とNSN卵の核と細胞質をそれぞれ交換する核移植実験を行った。その結果、NSN型のGV核をSN型の細胞質に移植した卵において元のSN型卵と同様の高い成熟率が得られたことから、SN型の核それ自身は直接には成熟能と関係しておらず、SN型卵の細胞質が成熟能に重要であることが分かった。しかし、このような「NSN型の核/SN型の細胞質」を持つ卵は受精後の発生率が低かったことから、良好な発生にはSN型の核が必要であり、発生能には核が関与しているということが明らかとなった。

(3) 卵成長過程における成熟能および発生能の獲得について

卵巣内には第1減数分裂のディプロテン期で細胞周期を停止した卵が多数存在するが、それらの1部がホルモンの刺激によって成長し体積を増加させる。その際、卵周囲を取り巻く卵丘細胞やその他の細胞からなる卵胞も大きさを増す。卵における成熟能および発生能はこの期間に獲得されると考えられている。実際に、直径60 μ m以下の卵（成長を終えたマウスのGV卵の直径は約80 μ m）では、まったく成熟が起こらない。また、十分に成長した卵においても、上述したようにNSN型の核を持つ卵では成熟能、あるいは発生能がない。しかし、これらの卵でどのような因子が不足して（あるいは過剰にあり）、これらの能力が欠けているのかはこれまでにほとんど明らかにされていない。唯一、卵成長過程で減数分裂に必要なp34cdc2の量が増加することが報告されているが、これがNSN卵でどのような状態にあるかはまったく調べられていない。このように、卵の成熟能、および発生能を決定する因子がほとんど明らかになっていないことから、当然のことながら、その獲得機構についてもまったく明らかになっていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究プロジェクトでは、発牛工学技術の向上、ひいては畜産物の生産性を高めることを将来の最終目標に見据えて、その基盤となる研究を行いたい。すなわち、卵成長過程における成熟能および発生能獲得のメカニズムを明らかにし、さらに一部の卵でこれらの能力を獲得できない原因を探ることである。そこで、本研究計画では、まず、卵成長過程

で獲得される成熟能および発生能に関わる因子を明らかにし、次いで、卵成長過程におけるそれらの因子の発現調節機構を解明する。

3. 研究の方法

卵の品質（成熟能、発生能）に関わる諸因子の同定とその発現調節機構を解明するため、以下の実験を計画した。

尚、実験動物としてはマウスを用いる。マウスは、古くから卵成熟および初期発生に関する研究に多く用いられており、そのメカニズムに関する知見が集積している。さらに全ゲノムの解読が終わり、分子生物学的な解析が容易であることから、本研究に最適の実験動物である。

(1) 卵の品質に関わる因子の候補探索
本研究で定義されるGV卵の品質とは、成熟能と発生能に関するものである。研究目的の項で記したようにこの両者は最終的にはそれぞれ独立した因子で決定され、また、卵が成長しGV卵に至る過程で独立して獲得されていく。しかし、マウスにおいては完全に成長したGV卵においては成熟能と発生能の関連性は高く、SN型のGVを持つ卵はこの両者が高く、NSN型のものは両者が低いことが核移植の実験などによって明らかとなっている。

そこで、この核相の違いを指標として、成熟能と発生能に関与する因子を同定するという研究戦略を立てた。尚、SN型卵とNSN型卵は、成長卵を卵巣から採取後、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)を含む培地で1時間培養することで分別できる。すなわち、1時間の培養後、SN型卵は卵を取り囲む透明帯と卵の間に隙間（卵腔）が生じるが、NSN型卵ではそれが生じないことから、この性質の違いを用いて両者を顕微鏡下で容易に分別できることを、近年申請者の研究室で明らかにしている。①

①まず、SN型とNSN型の卵を分別し、両者のサブトラクションを行うことで発現量の大きく異なるものを探し出す。また、成熟能と発生能を未だ有していない直径60 μ m以下の成長期卵と80 μ m以上の十分に成長したSN型のGV卵についてもマイクロアレイを行って、上記のSN/NSNを用いた実験の結果と比較する。両社に共通した違いのある遺伝子が、成熟能あるいは発生能に関与する可能性が高いと考えられる。

②上記①で有力な候補が得られなかった場合、定量性の高いRNAシーケンスを行い、そのSN型卵とNSN型卵での結果を比較して、発現量が大きく異なるものを成熟能あるいは発生能に関与する因子の候補とする。

尚、成長卵を用いたマイクロアレイの結果が近年報告されているが、これはSN型とN

SN型を分けることなく一括した試料を用いて実験したものである。一般にマウスの成長卵は40%程度NSN型を含んでいるため、そのような実験結果では、成熟能あるいは発生能に関与する因子を探索するには不十分である。

(2) 卵の品質に関わる因子の同定

③上記(2)①、②で発見された候補遺伝子についてsiRNAを作成し、SN卵に顕微注入して実際に成熟能あるいは発生能に関与しているかどうかを確かめる。成熟あるいは発生が進行しなかったものについては、細胞分裂調節因子との関連を解析して分裂停止のメカニズムを明らかにする。

④上記③の実験において考えられる問題点として、十分に成長しきったSN卵ではすでに卵成長中に合成・蓄積されたmRNAから翻訳されたタンパク質が多量に存在しており、そこにsiRNAを注入しても、もはや成熟能・発生能に影響を与えない可能性もある。そこで、卵胞培養系を用いて成長期卵にsiRNAを注入して卵成長中のターゲットmRNAの蓄積を抑制し、そのタンパク質量を減少させる実験系を確立する。この実験系を用いて、候補因子をノックダウンして卵成熟および発生への影響を調べる。

4. 研究成果

まず平成22年度には、卵成長過程で獲得される成熟能および発生能に関わる因子を明らかにするため、これらの能力を持つSN(surrounding nucleorus)タイプと持たないNSN(not surrounding nucleorus)タイプの卵についてサブトラクション法により、発現量の異なる遺伝子を探索した。その結果、数十の候補遺伝子が得られたが、RT-PCRによる精密な発現量の解析を行ったところ、いずれもSN卵とNSN卵で顕著な差が見られなかった。したがって、今後は定量性の高い網羅的遺伝子解析法であるRNA sequence法により、SN卵とNSN卵で発現量の異なる遺伝子の探索を行う予定である。

また、一方でin vitroでの卵成長(in vitro growth; IVG)を行う実験系の確立を行った。すなわち、SN卵とNSN卵で発現量の異なる遺伝子が発見された場合、これらが実際に成熟能あるいは発生能に関与しているかどうかを調べるために、成長期卵にこれらの遺伝子のsiRNAを顕微注入し、IVGにより成長させた後にその成熟能および発生能を調べる必要がある。これまでに申請者の研究室でIVGにより十分に成長した卵を得ることは成功していたが、今回はRNAiを顕微注入することで、実際に特異的に標的タンパク質の発現を低下させ期待した表現型が得られるかどうかの確認を行った。そこで、未受精卵のMII期停止に関わるc-MosのsiRNAを用いた

ところ、単為発生が進行するという期待された表現型が得られ、IVG の実験系が機能することが確認された。

平成 22 年度に成熟能および発生能に関わる因子を探索するためにサブトラクション法を試みたが、候補因子を得ることができなかったため、平成 23 年度は定量性の高い網羅的遺伝子解析法である RNA sequence 法による解析を行った。その結果、成長過程で著しく発現量が増加する数十の遺伝子が発見できた。さらに近年、成長卵で mRNA としては発現しているが翻訳が行われておらず、減数分裂再開後あるいは受精後に翻訳量が増加する遺伝子が存在することが明らかとなってきた。そこで、これらの遺伝子がそれぞれ成熟能および発生能に関与している可能性を踏まえて、poly(A)鎖によるセレクションを行った後に RNA sequence を行うこととした。そのための予備実験として、poly(A)鎖が減数分裂の前後で変化することがすでに知られている遺伝子について oligo(dT)カラムを用いるセレクションを試みたところ、poly(A)鎖が短い mRNA は取り除かれ、逆に poly(A)鎖が伸長した mRNA を効率よく回収できることが明らかになった。以上により、poly(A)セレクション後の mRNA について RNA sequence を行う準備が完了した。

そこで平成 24 年度は成熟能および発生能に関わる因子を明らかにするため、成長卵で mRNA としては発現しているが翻訳が行われておらず、減数分裂再開後あるいは受精後に翻訳量が増加する遺伝子の探索を行うことにした。何故なら、成熟能あるいは発生能に関する因子であれば、それは減数分裂再開前には必要なくその再開後あるいは受精後に必要となるものであることから、減数分裂前には翻訳レベルが低く、それが減数分裂後あるいは受精後に増加するものと考えられるからである。そこで、これらの遺伝子がそれぞれ成熟能および発生能に関与している可能性を踏まえて、poly(A)鎖によるセレクションを行った後に RNA sequence を行うこととした。一般に、poly(A)鎖の長さが翻訳に関わっており、すでに数種類の遺伝子の mRNA において減数分裂再開後に poly(A)鎖が伸長して翻訳量が増えることが知られている。RNA sequence の結果、poly(A)セレクションを行うことでまったく発現が見られなくなった遺伝子が数十種類見つかった。さらにこの中で、卵特異的な発現を示す遺伝子が数種類あり、卵成長中におけるそれらの発現を RNAi により抑制したところ、卵成熟に異常をきたしたものが認められた。したがって、これらが卵成熟能に関わる因子であることが明らかとなった。

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 4 件)

- ① Kawamura M, Akiyama T, Tsukamoto S, Suzuki MG & Aoki F: The expression and nuclear deposition of histone H3.1 in murine oocytes and preimplantation embryos. *J. Reprod. Dev.*, 28, 557-562, 2012. (査読有)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/58/5/58_2012-074/_article
- ② Nashun B, Akiyama T, Suzuki MG & Aoki F: Dramatic replacement of histone variants during genome remodeling in nuclear-transferred embryos. *Epigenetics*, 6: 1489-1497, 2011. (査読有)
DOI: 10.4161/epi.6.12.18206
- ③ Inoue A, Ogushi S, Saitou M, Suzuki MG & Aoki F: Involvement of murine nucleoplasmin 2 in the decondensation of sperm chromatin after fertilization. *Biol. Reprod.*, 85: 70-77, 2011. (査読有)
DOI: 10.1095/biolreprod.110.08934
- ④ Abe K, Inoue A, Suzuki MG & Aoki F: Global gene silencing is caused by the dissociation of RNA polymerase II from DNA in mouse oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 56, 502-507, 2010. (査読有)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/56/5/56_10-068A/_article

[学会発表] (計 9 件)

- ① 大我政敏、青木不学：マウス着床前初期胚におけるヒストン H2B ユビキチン化。第 116 回日本畜産学会、広島、2013 年 3 月 30 日
- ② 金綾奈、鈴木元、阿部健一郎、青木不学：マウス受精前後における母性 mRNA 分解に関する網羅的な動態解析。第 116 回日本畜産学会、広島、2013 年 3 月 28 日
- ③ 阿部健一郎、山本龍馬、曹旻君、鈴木穰、青木不学：RNA シーケンスによるマウス一細胞期胚の遺伝子発現解析。第 116 回日本畜産学会、広島、2013 年 3 月 28 日
- ④ Abe K, Yamamoto R, Oka G, Franke V, Vlahovicek K, Suzuki Y & Aoki F: Characterization of the gene

expression in the 1-cell stage embryos.
The American Society for Cell Biology,
San Francisco, USA, December 18, 2012.

- ⑤ Ooga M & Aoki F: Histone H2B ubiquitination in the mouse preimplantation embryos. The American Society for Cell Biology, San Francisco, USA, December 18, 2012.
- ⑥ Yamamoto R, Abe K, Franke V, Vlahovicek K, Suzuki Y & Aoki F: The profile of the genes transcribed at the onset of gene expression after fertilization. The American Society for Cell Biology, San Francisco, USA, December 18, 2012.
- ⑦ Aoki F: Genome-scale profiling of the chromatin composition of histone H2A and H3 variants in mouse embryonic stem cells. The 24th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. Seoul, Korea, October 10-12, 2012
- ⑧ 大我政敏、青木不学：マウス着床前初期胚における Histone H3 lysine 79 メチル化の調節機構について。第 115 回日本畜産学会、名古屋、2012 年 3 月 28-29 日。
- ⑨ 河村真愛、秋山智彦、塚本智史、青木不学：発生過程におけるゲノムリモデリングへの H3 変異体の関与について。第 115 回日本畜産学会、名古屋、2012 年 3 月 28-29 日。

[図書] (計 1 件)

- ① 青木不学：受精前後の遺伝子発現プログラム、「卵子学」、森崇英編、京都大学

[その他]

青木不学：卵のクオリティーについて。第 19 回セント・ルカセミナー、大分、2012 年 6 月 3 日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 不学 (AOKI FUGAKU)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20175160