

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10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21248032

研究課題名（和文） 卵子の微小器官動態制御因子の同定による次世代型 IVMFC 技術開発

研究課題名（英文） Next generation of IVMFC technical development by identification of the microtubule control factor of oocyte.

研究代表者

佐藤 英明（SATO EIMEI）

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：80093243

研究成果の概要（和文）：卵子の体外成熟・体外受精・体外培養法の中核をなす未成熟卵子の体外成熟（in vitro maturation: IVM）の飛躍的改良を目指し、未成熟卵子の微小管（ギャップ結合、核膜、染色体、小胞体、紡錘体、ミトコンドリア、表層顆粒など）の配置や形態、機能に焦点を当てて、その制御因子を同定した。さらに、制御因子の発現を人為的に操作しうる化学物質を検索した。

研究成果の概要（英文）：Improve spectacularly of in vitro maturation (IVM) of an immature oocyte which makes the core of in vitro culture system of oocyte is aimed, it focused on localization, morphology and function of the microtubules (e.g. gap junction, nuclear membrane, chromosome, endoplasmic reticulum, spindle, mitochondria, cortical granule) of an immature oocyte, and identified the control agent. Furthermore, the chemical substance which controls expression of a control agent artificially was searched.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
2010年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2011年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
年度			
年度			
総計	37,000,000	11,100,000	48,100,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：卵子、微小器官動態、IVMFC 技術、ギャップ結合、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

佐藤（研究代表者）らは、約 35 年前に未成熟卵子の体外成熟、体外受精、体外培養（IVMFC）法の基礎を築いた。これを基に研究が進められ、ウシでは屠場卵巣由来未成熟卵子を用いる IVMFC は既に実用的な技術に成長し、これによって年間 2,000 頭を超える講師が誕生している。また、ブタにおいても受

精卵の非外科的移植法が考案され、IVMFC 技術の普及が進みつつある。このようなことから、IVMFC 法は日本で独自に高度に発達した技術として世界的にも認知されている。しかし、ウシ、ブタとも 1 個体から得られる受精可能卵子及び胚盤胞期胚（着床期胚）の数は少なく、IVMFC 技術普及のボトルネックになっている。これを克服するためには、IVMFC

技術の中核を占める卵子の体外成熟 (IVM) 技術について、新たな発想に基づく大胆な改良が必要である。未成熟卵子の成熟過程においては、ギャップ結合、核膜、染色体、小胞体、紡錘体、ミトコンドリア、表層顆粒などの微小器官の配置・携帯・機能 (動態) が大きく変化する。そしてその結果、卵子は受精能・発生能を獲得する。すなわち、受精可能卵子・胚盤胞期胚の大量生産には、IVM 過程における微小器官動態を正確に理解するとともに体外培養下においても正常な動態を誘起させる技術開発が必要である。また、成熟過程で染色体の半数化が誘起されるが、これに伴う染色体異常の発生制御技術の開発も必要となっている。

2. 研究の目的

屠場由来卵巣 1 個からブタでは約 100 個の未成熟卵子が採取できるが、明らかな退行卵子は除き、約 30 個が受精能を獲得し、胚盤胞への発生が可能と判断される。本研究では、未成熟卵子の微小器官の動態を正確に理解するとともに、その制御因子を同定し、発現制御を可能にすることにより、受精能・発生能の高い卵子及び染色体正常性維持卵子をブタで 1 卵巣から 30 個生産する技術基盤創生を目的とする。

3. 研究の方法

未成熟卵子は周囲を卵丘細胞に取り囲まれ、互いにギャップ結合で結ばれ、一つの単位とし機能している。また、卵丘細胞を除去した裸化卵子は第二減数分裂中期にまで進行するが、染色体の分配に異常が生じることが知られている。そこで卵子卵丘複合体を一体のものとして未成熟卵子と呼び研究を進めた。また、ブタを最終ターゲットとして卵子の微小器官、特にギャップ結合、核膜、染色体、紡錘体、ミトコンドリアについて研究を進めるが、知見の豊富なマウスで研究を先行させ、その成果を踏まえブタで解析を進めることとする。

(1) ギャップ結合制御因子の同定： 卵丘細胞からのびる突起の先で卵子と結合する結合装置タンパク質 (コネクシン 60 : Cx60) の調節系を明らかにする。特に卵丘細胞間の結合装置タンパク質 (コネクシン 43 : Cx43) の調節系であるヒアルロン酸・ヒアルロン酸受容体 (CD44) が Cx60 の制御にも関与しているかどうかを明らかにする。さらに、ヒアルロン酸・CD44 の結合を特異的に阻害する抗体を作製し、ギャップ結合遮断制御の受精能・発生能におよぼす影響を明らかにする。

(2) 核膜・染色体の動態制御因子の同定：

ブタで cAMP やヒポキサンチンの情報を MAP キナーゼカスケード活性化抑制につなげる分子を同定する。マウスで MAP キナーゼカスケードと Akt、mTOR とその関連タンパク質、cdc2 キナーゼ活性化、Lamin B リン酸化のカスケード上での位置を明確にすることや具体的目的とするが、まず Akt 活性を阻害すると、MPF によるリン酸化を受けて核膜の消失や染色体の凝縮を起こす各分子のリン酸化レベルがどのように変化するか検証する。さらに、Sphingosine 1 phosphate を中心とした脂質メディエーターの卵丘細胞における合成抑制機構の解明と脂質メディエーターによる卵子減数分裂進行制御を明らかにする。

(3) ミトコンドリア配置制御因子の同定：これまでの研究で、マウス卵子のミトコンドリアの動態を解析し、体内成熟と体外成熟、また体外成熟培養液の違いによりミトコンドリアの動態の違いが生じることを発見した。さらにミトコンドリア動態に相違が生じる原因を解析するために、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った結果、電子伝達系で呼吸能に影響する脱共役タンパク質関連遺伝子の発現に差が認められ、脱共役タンパク質の現象により呼吸量に差が生じる可能性を指摘した。これを踏まえて、細胞骨格に関連する遺伝子発現解析を行うことで、その分布異常の原因解明を行い、それを改善する体外培養系を開発する。ミトコンドリア関連遺伝子の発現を制御し、ミトコンドリア動態を体内成熟卵子に近づける体外成熟培養技術を開発する。

(4) 紡錘体の動態制御因子の同定： 紡錘体の配置は中心小体周辺物質の配置に影響され、中心小体周辺物質の配置は染色体数異常にも関係すると推察している。そのため、紡錘体や中心小体周辺物質の配置を決定するメカニズムを明らかにする。

(5) 研究成果の融合による新規体外成熟培養液の開発： マウスで明らかにした調節系がブタでも機能するかを明らかにするとともに、その知見を活かしてブタ体外成熟培養液を開発する。

4. 研究成果

(1) ギャップ結合制御因子、核膜・染色体の動態制御因子、ミトコンドリアの配置制御因子の検索を行い、以下の結果を得た。

- ① マウス卵子・卵丘複合体の成熟誘起、特に核膜・染色体の配列の分子制御において Nitric oxide が重要な役割を果たすことを明らかにした。

- ② ブタにおいてヒアルロン酸・CD44 のシグナルは卵胞顆粒膜細胞のアポトーシスのみならず卵母細胞の caspase 活性化のカスケードにも影響を与え、アポトーシスを抑制することを明らかにした。
- ③ ブタ卵細胞はラットに加えてイヌ体細胞の初期化を誘導し、ES 細胞株の樹立に貢献することを明らかにした。
- ④ Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 がマウス初期胚の細胞分化に関与することを明らかにした。
- ⑤ アセチル化レベルがギャップ結合制御因子、核膜・染色体の動態制御因子及びミトコンドリア配置制御因子の機能発現に影響することを明らかにした。
- ⑥ ブタにおいて、体細胞核移植胚の染色体挙動が受精卵の動態と異なることを明らかにした。
- ⑦ ブタ卵細胞をレシピエントとするラット体細胞核移植胚の紡錘体形成について調べ、異種卵細胞でもブタ卵子はラット体細胞の初期化を誘導しうることを明らかにした。
- ⑧ dbcAMP で卵成熟を抑制することにより、体細胞核移植胚の発生が改善されることを明らかにした。これによって、dbcAMP 含有培養液で培養したブタの第二減数分裂中期の初期段階の卵子が体細胞核移植胚のレシピエント卵子として適していることを発見した。あわせて、dbcAMP の最適投与濃度・時間の詳細を明らかにした。
- ⑨ ミトコンドリア昨日の変化が核移植胚の発生に影響することや栄養膜細胞の細胞死を誘起することを明確に証明した。これらの事実を踏まえ、核移植胚の融合により胚発生能が顕著に改善されることを明らかにした。
- ⑩ ブタ体外成熟卵子をレシピエントとしてラットおよびイヌ体細胞核移植胚を作製し、胚盤胞期胚まで発生させることに成功した。
- ⑪ 紡錘体の動態制御因子の同定：受精能の高い紡錘体（染色体）の形態を明らかにし、その形態を得る培養系を確立した。
- ⑫ ブタ卵子及び卵胞細胞におけるコネクシン遺伝子群の発現を網羅的に解析し、さらに卵子に特異的に発現するコネクシンの分子種を解析し、コネクシン 60 及び 45 をコードする GJA10 を同定した。

(2) 微小管やミトコンドリアに機能を解析し、以下の結果を得た。

- ① ブタ核移植胚の発生能を解析し着床前

胚の内部細胞界の呼吸能・ミトコンドリア機能の低下が発生能の低下をもたらすこと、レシピエント卵の成熟培養条件の違いが発生能に影響することを明らかにした。

- ② 核移植は光学顕微鏡下で行われるが、レシピエント卵母細胞への照射する蛍光ランプの強度が核移植胚の発生に影響することを明らかにした。
- ③ ブタ未成熟卵母細胞の小胞体タンパク質 Protein disulfide isomerase の細胞内局在が卵母細胞の成熟・受精能指標になることを明らかにした。
- ④ ブタ卵母細胞の成熟能に過酸化水素が阻害作用を有することや L-カルニチンがその阻害作用を低減化することを明らかにした。
- ⑤ マウス卵子・卵丘細胞複合体の形態と成熟卵母細胞の染色体構成に相関があることを明らかにし、培養前に卵子・卵丘細胞の形態に基づいた最適卵母細胞を選抜することで染色体異常の発生を低減化できることを明らかにした。
- ⑥ 卵丘細胞の変化は減数分裂の再開のみならず、卵母細胞の死滅誘導にも関与することを明らかにした。
- ⑦ マウス卵母細胞の成熟過程におけるアクチン制御因子 (Formin-2) が成熟能に関与し、極体サイズに影響することを明らかにした。
- ⑧ マウス未成熟卵母細胞の成熟を誘導する単独培養法を開発した。
- ⑨ 卵胞液に浸潤する白血球のプロファイルが卵母細胞の成熟能、受精能のマーカーになることを明らかにした。

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 10 件)

- ① Terashita, Y., Sugimura, S., Kudo, Y., Amano, R., Sato, E., Combination of co-culture with parthenogenetic embryo and agregation enhances in vitro development and quality of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos, *Reprod. Biotechnol.*, 査読有, (巻数、ページ数未定)、印刷中
<http://www.sciencedirect.com/science/journal/>
- ② Takeda, N., Yoshii, N., Hoshino, Y., T anemura, K., Sato, E., Odawara, Y, A new human spermatozoon selection method for intracytoplasmic sperm injection based on penetration into cerv

- ical mucus, *J. Mamm. Ova Res.*, 査読有、(巻数、ページ数未定)、印刷中
<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/jmor>
- ③ Ishikawa, T., Doshida, M., Kyoya, T., Takizawa, T., Sakura, M., Hoshino, Y., Tanemura, K., Kyono, K., Sato, E., Leukocyte count in follicular aspirate samples could be a prognostic biomarker of the developmental competence of human metaphase II oocytes, *J. Reprod. Engineer.*, 査読有、(巻数、ページ数未定)、印刷中
<http://sre.ac.affrc.go.jp/Contents.htm>
- ④ Ohashi, Y., Hoshino, Y., Tanemura, K., Sato, E., Distribution of protein disulfide isomerase during maturation of pig oocytes, *Anim Sci J.*, 査読有、2013, Vol. 84, No. 1, 15-22.
 DOI: 10.1111/j.1740-0929.2012.01030.x.
- ⑤ Terashita, Y., Sugimura, S., Kudo, Y., Amano, R., Hiradate, Y., Sato, E., Improving the quality of miniature pig somatic cell nuclear transfer blastocysts: aggregation of SCNT embryos at the four-cell stage, *Teprod. Domest. Anim*, 査読有、2011, Vol. 46, No. 2, 189-196.
 DOI: 10.1111/j.1439-0531.2010.01614.x.
- ⑥ Sugimura, S., Yokoo, M., Yamanaka, K., Kawahara, M., Moriyasu, S., Wakai, T., Nagai, T., Abe, H., Sato, E., Anomalous oxygen consumption in porcine somatic cell, *Cell. Reprogram.*, 査読有、Vol. 12, No. 4, 2010, 463-474.
 DOI: 10.1089/cell.2009.0111.
- ⑦ Nitta, M., Yogo, K., Ohashi, M., Akiyama, M., Kunitomo, Y., Ogawa, T., Ishida-Kitagawa, N., Miyoshi, J., Sato, E., Takeya, T., Identification and expression analysis of CX45 and CX60 as major connexins in porcine oocytes, *J. Anim. Sci.*, 査読有、Vol. 88, No. 10, 2010, 3269-3279.
 DOI: 10.2527/jas.2009-2781.
- ⑧ 佐藤英明、家畜繁殖学の挑戦と近未来、*ブレインテクノニュース*、査読無、No. 14、2010、1-6。
<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201002227784400104>
- ⑨ Cecconi, S., Rossi, G., Santilli, A., Stefano, L.D., Hoshino, Y., Sato, E., Palmerini MG, Macchiarelli G. Akt expression in mouse oocytes matured in vivo and in Vitro, *RBM Online*, 査読有、2010, Vol. 20, No. 1, 54-41.
 DOI: 10.1016/j.rbmo.2009.10.011.
- ⑩ Sugimura, S., Yokoo, M., Yamanaka, K., Kawahara, M., Moriyasu, S., Wakai, T., Nagai, T., Abe, H., Sato, E., Anomalous oxygen consumption in porcine somatic cell nuclear transfer embryos, *Cell. Reprogram.*, 査読有、2010, Vol. 12, No. 4, 463-474.
 DOI: 10.1089/cell.2009.0111.
- [学会発表] (計 3 件)
- ① Sato, E., P31 inhibition of mTOR induces cumulus expansion and meiotic maturation in mouse oocytes without gonadotropin stimulation. Annual Dconference 2010 of Society for Reproduction and Fertility, Annual Dconference 2010 of Society for Reproduction and Fertility, 2011年7月11日、University of Nottingham, UK.
- ② Sato, E., Role of capillary blood vessels and macrophages in follicular development and atresia, 16th ICBAR, 2011年4月5日、Sri Lanka, Kandy.
- ③ Sato, E., Molecular basis of follicular growth and oocyte maturation-Use of farm animals for biology and biomedical science, 3rd Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE 2010), 2010年4月9日、Pattaya, Thailand.
- [図書] (計 2 件)
- ① 佐藤英明、排卵と受精、生殖卵巣学 (石塚文平、鈴木秋悦 編)、医歯薬出版、2011年、80-86.
- ② 星野由美、佐藤英明 (鈴木秋悦 編)、医歯薬学出版株式会社、カラーアトラス不妊治療のための卵子学、2010年、22-27.
- [その他]
 ホームページ等
<http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/34b0b77a410b78164106dee5e216fef4.html>
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
佐藤 英明 (SATO EIMEI)
 東北大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：80093243
- (2) 研究分担者
島田 昌之 (SHIMADA MASAYUKI)
 広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教

授

研究者番号：20314742

星野 由美 (HOSHINO YUMI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：10451551

(3)連携研究者

()

研究者番号：