



二価陽イオンと精子抽出物によるブタ体外成熟卵母細胞の活性化に関する研究

岡田, 幸之助

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Date of Publication)

2010-06-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3069

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003069>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 334 】

氏 名・(本 籍)	岡田 幸之助	(京都府)
博士の専攻分野の名称	博士 (農学)	
学 位 記 番 号	博い第76号	
学位授与の 要 件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の 日 付	平成16年3月31日	

【 学位論文題目 】

二価陽イオンと精子抽出物によるブタ体外成熟卵母細胞の
活性化に関する研究

審 査 委 員

主 査	教 授	三宅 正史
	教 授	深見 泰夫
	教 授	宮野 隆

これまで研究されたすべての哺乳類において受精時に卵母細胞の細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇が認められている。卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を人為的に誘起する、あるいは阻害する実験によって、卵母細胞の活性化における $[Ca^{2+}]_i$ の上昇の必要性が示されている。卵母細胞の活性化は、精子の侵入以外にも、機械的あるいは電氣的刺激、浸透圧、イオンなど多くの物理学的、あるいは化学的な要因によって引き起こされる。マウスの卵母細胞を効率よく活性化するには、二価陽イオンのストロンチウム (Sr^{2+}) が広く用いられている。ブタの卵母細胞は、電気刺激によって効率的に活性化されることから、その他の活性化処理についての報告は少なく、活性化を起こす機構の詳細は明らかにされていない。卵母細胞の活性化に関する研究は、精子侵入に伴って起こる卵母細胞の応答反応機構の解明に役立つと考えられる。また、男性不妊治療に用いられる卵母細胞質中への精子の顕微注入 (ICSI)、あるいは核移植によるクローン動物の作出において、卵母細胞の胚発生を開始させるための方法としても、卵母細胞の活性化は重要な課題となってきた。本研究では、体外成熟培養によって得られた第II減数分裂中期のブタ卵母細胞を用いて、二価陽イオン (Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+})、およびブタ精子抽出物の活性化誘起能、ならびに活性化処理後に生じる卵母細胞の応答反応について検討した。

第1章では、哺乳類の卵母細胞の活性化および人為的活性化法について解説し、活性化機構に関する詳細な情報がほとんどマウスに限られていることなど、活性化に関する研究の背景について概説した。

第2章では、電気刺激以外の卵母細胞の活性化を誘起する方法として、マウス卵母細胞を効率的に活性化する Sr^{2+} を含む培養液への浸漬、および精子抽出物注入に対するブタ卵母細胞の反応性を検討した。マウスあるいはブタの卵母細胞を Sr^{2+} を含む培養液に浸漬し、処理後の卵母細胞の核相について調べた結果、マウスの卵母細胞は高率に活性化することが確認されたが、ブタ卵母細胞の活性化は全く認められなかった。ついで、ブタ卵母細胞にブタ精子抽出物を顕微注入し、卵母細胞の反応を調べるとともに、種々の時間成熟培養した卵母細胞

胞を用いて、第II減数分裂中期に成熟した後の経過時間がブタ卵母細胞の活性化に及ぼす影響について電気刺激と比較検討した。第II減数分裂中期へ達した後、しばらく時間が経過した (42あるいは48時間成熟培養) ブタ卵母細胞に精子抽出物を注入すると、電気刺激と同様に卵母細胞は高率に活性化した (90~100%)。また、第II減数分裂中期へ達した直後 (36時間成熟培養) のブタ卵母細胞は、電気刺激によって40%弱しか活性化しなかったが、精子抽出物の注入では電気刺激より有意に高い割合 (67%) で活性化した。これらの結果より、ブタ卵母細胞はマウス卵母細胞とは異なり、培養液中の Sr^{2+} によっては活性化しないことが明らかになった。一方、精子抽出物の顕微注入によって、ブタ卵母細胞は、卵母細胞の成熟後の時間経過にかかわらず高率に活性化することが明らかになった。

第3章では、 Sr^{2+} による処理によってブタ卵母細胞が活性化しなかったことから、その他の二価陽イオンの Ba^{2+} および Ca^{2+} がブタ卵母細胞の活性化に及ぼす影響について調べた。まず、1~10 mMの Sr^{2+} , Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む培養液でマウスおよびブタ卵母細胞を処理した。前章と同様に Sr^{2+} を含む培養液によって処理したマウス卵母細胞は高率に活性化した。低濃度の Ba^{2+} を含む培養液によって処理した卵母細胞は高率に活性化したが、培養液中の Ba^{2+} 濃度の上昇とともにマウス卵母細胞の活性化率は低下した。 Sr^{2+} や Ba^{2+} と比較すると卵母細胞の活性化率は低かったが、 Ca^{2+} を含む培養液で処理した卵母細胞も活性化された。一方、ブタ卵母細胞では、いずれの二価陽イオンを含む培養液の処理によっても、まったく活性化しなかった。これらの結果は、培養液中の二価陽イオンはマウス卵母細胞の活性化を十分に引き起こすが、ブタ卵母細胞においては培養液中の二価陽イオンはうまく作用しないことを示唆している。したがって、マウスとブタの卵母細胞では二価陽イオンの流入および排出に関わる機構に相違があると推察された。そこで、細胞膜に存在して Ca^{2+} 輸送に関わると考えられている Na^+/Ca^{2+} 交換系と Ca^{2+} ATPaseを阻害した条件で、二価陽イオンのブタ卵母細胞の活性化に及ぼす影響を調べた。 Na^+ を含まない培養液 (Na^+ -free-TL液) を用いてブタ卵母細胞の Na^+/Ca^{2+} 交換系の機能を逆転させるか、 Na^+ -free-TL液にカルボキシエオシン

(氏名： 岡田 幸之助 NO. 3)

(GE)を加えてCa²⁺ ATPaseの機能を阻害した条件下で、ブタ卵母細胞をSr²⁺あるいはCa²⁺で処理した。Sr²⁺あるいはCa²⁺の存在下において、Na⁺/Ca²⁺交換系の機能の逆転、あるいはCa²⁺ ATPase機能阻害のいずれかの単独処理では、卵母細胞の活性化率は低かった。しかし、両処理を併用した場合、卵母細胞の活性化率が上昇することが明らかになった。Ca²⁺蛍光指示薬を用いて、Ca²⁺輸送系を阻害した条件下でブタ卵母細胞の[Ca²⁺]_iの変化について調べた結果、Sr²⁺あるいはCa²⁺の存在下で、Na⁺/Ca²⁺交換系の機能を逆転、あるいはCa²⁺ ATPaseの機能を阻害しても、[Ca²⁺]_iの上昇を示す変化は認められなかったが、Sr²⁺の存在下で両処理を併用した場合には、[Ca²⁺]_iの上昇と推測される変化が観察された。これらの結果より、培養液中の二価陽イオンによってブタ卵母細胞はまったく活性化しないが、ブタ卵母細胞のCa²⁺輸送系を阻害した条件下では、培養液中の二価陽イオンによって低率ながら卵母細胞が活性化することが示された。また、この活性化は、Ca²⁺輸送系の阻害によって培養液中の二価陽イオンが卵母細胞に流入・蓄積し、ブタ卵母細胞の[Ca²⁺]_iの上昇を引き起こしたことによる可能性が示唆された。

第4章では、Sr²⁺、Ba²⁺あるいはCa²⁺をブタ卵母細胞に直接顕微注入した。その結果、Sr²⁺あるいはBa²⁺を注入したブタ卵母細胞もCa²⁺の場合と同様に活性化されることが明らかとなった。つぎに、これらのブタ卵母細胞において、[Ca²⁺]_iの上昇、表層粒の崩壊、Cdc2キナーゼの不活性化といった、受精時にみられる活性化に伴う反応が誘起されるか否かについて、精子抽出物を注入、あるいは電気刺激したブタ卵母細胞と比較検討した。また、活性化処理後の発生能力についても検討した。

Ca²⁺蛍光指示薬を注入したブタ卵母細胞に各活性化処理を行い、処理後の[Ca²⁺]_iの変化を調べた。すべての活性化処理によって、[Ca²⁺]_iの急激な上昇が起こった。Sr²⁺、Ca²⁺あるいは精子抽出物を注入した卵母細胞の[Ca²⁺]_iの上昇持続時間は短かったが、Ba²⁺の注入では、[Ca²⁺]_iがもとのレベルに低下するには長時間を要した。また、受精時に観察されるCa²⁺オシレーションは、精子抽出物を注入した卵母細胞でのみ観察された。

(氏名： 岡田 幸之助 NO. 4)

fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 peanut agglutininを用いて活性化処理後の表層粒の動態を調べた。活性化処理前の卵母細胞では、表層粒は細胞膜付近に均一に分布していた。精子抽出物を注入した卵母細胞では、FITCの蛍光は細胞膜付近から完全に消失し、透明帯外層へと移行した。電気刺激、あるいは二価陽イオンを注入した卵母細胞では、細胞膜付近のFITCの蛍光は不連続となり、卵母細胞の表層では凝集したパッチ状の蛍光として観察された。

活性化処理後のCdc2キナーゼの変化を調べた。卵核胞期ではCdc2キナーゼ活性はほとんどなかったが、第II減数分裂中期ではCdc2キナーゼ活性は高かった。活性化処理後、いずれの活性化処理によっても、処理後の時間の経過とともにCdc2キナーゼの不活性化は進行した。

それぞれの活性化処理後、卵母細胞をサイトカラシンB処理で極体の放出を阻害することによって2倍体胚を作出し、168時間培養して胚盤胞への発生を検討した。いずれの活性化処理によっても、処理された卵母細胞は胚盤胞へと発生した。電気刺激あるいはCa²⁺を注入した卵母細胞の胚盤胞への発生率は、Sr²⁺、Ba²⁺あるいは精子抽出物を注入した卵母細胞の発生率より高かった。

以上の結果から、ブタの成熟卵母細胞は、二価陽イオン (Sr²⁺、Ba²⁺、Ca²⁺) の細胞内濃度上昇に反応して活性化するが、これらの二価陽イオンが細胞外に存在しても、卵母細胞内の二価陽イオン濃度が急激に高まることはなく、卵母細胞は活性化しないことが明らかとなった。また、精子抽出物の注入によって、電気刺激の場合と同様にブタ卵母細胞は活性化し、他の活性化処理では認められないCa²⁺オシレーションを起こすことが明らかとなった。さらに、二価陽イオンあるいは精子抽出物を注入した卵母細胞は、[Ca²⁺]_iの上昇、表層粒の崩壊、Cdc2キナーゼの不活性化、雌性前核の形成などの受精時にみられる一連の反応を起こし、その後、胚盤胞へと発生することが明らかとなった。

氏名	岡田 幸之助		
論文題目	二価陽イオンと精子抽出物によるブタ体外成熟卵母細胞の活性化に関する研究		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	三宅 正史
	副査	教授	深見 泰夫
	副査	教授	宮野 隆
	副査		
要 旨			
<p>哺乳類の卵母細胞は、受精時に卵母細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇が誘起される。これによって卵母細胞は第2減数分裂中期から脱して発生を開始する。これを活性化と呼び、この現象は、受精以外の多くの物理的、あるいは化学的な刺激によっても誘起できる。マウス卵母細胞は、外因性の2価陽イオンのストロンチウム (Sr^{2+}) によって活性化され、受精時に起こる $[Ca^{2+}]_i$ の反復の上昇、いわゆるCaオシレーションが誘起できるので、エタノールに代わって広くマウス卵母細胞の活性化に用いられる。また、精子抽出物の細胞内注入や、Mg^{2+}欠損下で細胞内外に存在する2価陽イオンによっても活性化が生じる。一方、ブタでは応用研究が中心となり、電気刺激によって効率よく活性化されることから、活性化誘起法に関する詳細な報告は少なく、活性化機構などの詳しいことは明らかにされていない。卵母細胞の活性化は、精子進入に対する卵母細胞の応答反応とその機構の解明に加えて、卵細胞質内への精子注入 (ICSI)、あるいはクローン動物の作出において利用される。精子注入や核移植処理では、卵母細胞が十分に活性化されず、処理後の卵母細胞に人為的活性化刺激を追加する必要があることから、発生開始をとまなう人為操作に重要な要因の一つとして卵母細胞の活性化は注目を集めている。</p> <p>本研究では、と場で採取した卵巣から得られる卵胞卵母細胞を体外成熟させたブタ卵母細胞を用いて、ブタ精子抽出物、および二価陽イオン (Sr^{2+}, Ba^{2+}, Ca^{2+}) の活性化誘起作用を検討し、引き続き誘起される卵母細胞の応答について調べ、これらの物質による活性化誘起能と作用機構、ならびにその後卵母細胞に起こる応答の正常性を検討している。第1章では、哺乳動物の活性化について解説し、活性化機構の解明に関する詳細な情報がマウスに限られることなど、研究の背景を概説している。</p> <p>第2章では、ブタ卵母細胞に活性化を誘起する電気刺激以外の要因、とくにマウス卵母細胞を効率的に活性化する Sr^{2+} を含む培養液への浸漬と、ブタ精子抽出物に対するブタ卵母細胞の反応性について検討している。はじめに、Sr^{2+} を含む培養液に浸漬後の卵母細胞核の状態について調べ、外因性の Sr^{2+} はマウス卵母細胞を高率に活性化するが、ブタ卵母細胞をまったく活性化しないことを示した。次に、種々の時間成熟培養したブタ卵母細胞にブタ精子抽出物を注入して、精子抽出物に対するブタ卵母細胞の反応性を調べるとともに、第2減数分裂中期 (MII期) 到達 (核成熟) 後の経過時間がブタ卵母細胞の活性化に及ぼす影響について比較検討している。核成熟後少し加齢したブタ卵母細胞に精子抽出物を注入した場合、卵母細胞は電気刺激と同程度に高率に活性化され、成熟直後の卵母細胞に対しては、電気刺激より有意に高い活性化能力を示した。このようにブタ卵母細胞は、マウスと異なり外因性 Sr^{2+} では活性化されないことを明らかにした。また、精子抽出物が一定時間加齢した卵母細胞に対して高い活性化能力を示すだけでなく、核成熟直後のブタ卵母細胞にも良好な活性化能を示すことを明らかにしている。</p> <p>第2章において、Sr^{2+} 処理ではブタ卵母細胞が活性化されなかったため、その他の2価陽イオンの Ba^{2+} および Ca^{2+} のマウスおよびブタ卵母細胞に及ぼす影響を調べ、マウス卵母細胞はこれらの外因性2価陽イオンによって活性化されるが、ブタではまったく活性化されないことを明らかにしている。したがって、</p>			

氏名	岡田 幸之助
<p>マウスとブタでは2価陽イオンのトランスポートに関わる機構が異なることを推察した。そこで、3章では、細胞膜に存在する Ca^{2+} 輸送系の Na^+/Ca^{2+} 交換系と Ca^{2+}-ATPase の阻害がブタ卵母細胞に及ぼす影響を調べた。まず、マウスの卵母細胞を 1~10 mM の Sr^{2+}, Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む培養液で処理した結果、Sr^{2+} を含む培養液では、すべての濃度において高い割合で活性化が見られた。低濃度の Ba^{2+} も、マウス卵母細胞を高率に活性化したが、濃度の上昇とともにその割合は低下した。Sr^{2+} や Ba^{2+} に比べて活性化率は低かったが、Ca^{2+} でも活性化された。一方、ブタでは、いずれの外因性2価陽イオンによっても、まったく活性化されなかった。これらの結果は、マウスの卵母細胞では外因性2価陽イオンは卵母細胞内に入り、活性化の閾値に達するが、ブタでは活性化の閾値に達していないと推測している。</p> <p>外因性2価陽イオンによってブタ卵母細胞が活性化されなかった原因を調べるために、Na^+ を含まない培養液 (Na^+-free-TL液) を用いて Na^+/Ca^{2+} 交換系機能の逆転、またはカルボキシエオシン (CE) による Ca^{2+}-ATPase 機能を阻害した条件下でブタ卵母細胞を処理した。Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} の存在下では、Na^+/Ca^{2+} 交換系の機能逆転、あるいは Ca^{2+}-ATPase 機能阻害の単独の処理で活性化されたが、その割合は非常に低かった。しかし、両処理の併用によって、活性化率は上昇することを明らかにした。また、Ca^{2+} 輸送系の阻害下で、fluo-4 デキストランを用いてブタ卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を調べた結果、Na^+/Ca^{2+} 交換系の機能逆転、あるいは Ca^{2+}-ATPase の機能阻害の単独処理では、Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} の存在下でも $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認められなかった。しかし、Sr^{2+} の存在下で両処理を併用すると、$[Ca^{2+}]_i$ の上昇を示す変化が生じた。これらの結果より、外因性の Sr^{2+}, Ba^{2+}, Ca^{2+} はブタ卵母細胞をまったく活性化できないが、ブタ卵母細胞の Ca^{2+} 輸送系の阻害下では外因性の2価陽イオンによって低率ながら活性化され、培養液中の2価陽イオンの卵母細胞への流入・蓄積による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が活性化の要因であることを示唆した。</p> <p>第4章では、2価陽イオンに対するブタ卵母細胞の反応性を調べるために、Sr^{2+}, Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} をブタ卵母細胞の細胞質に注入したところ、ブタ卵母細胞は活性化された。つぎに、これらのブタ卵母細胞において、受精時に見られる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、表層粒の崩壊、Cdc2 キナーゼの不活性化について検討した。また、2価陽イオン、ならびに精子抽出物の注入後の発生能力についても調べた。すべての2価陽イオンや精子抽出物の注入によって、$[Ca^{2+}]_i$ の急激な上昇が起こった。Sr^{2+}, Ca^{2+} あるいは精子抽出物を注入した卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇時間は正常であったが、Ba^{2+} では、$[Ca^{2+}]_i$ レベルが元に戻る時間が非常に長かった。また、受精時に観察される Ca^{2+} オシレーションは、精子抽出物を注入した卵母細胞でのみ観察され、Sr^{2+} に対しては、マウスと異なり、オシレーションを起こさないことを明らかにしている。表層粒の分布を FITC-PNA で調べた結果、精子抽出物の注入により、表層粒は細胞膜付近から完全に消失して透明帯外層に移行することを示し、細胞膜付近にパッチ状に観察される、電気刺激や2価陽イオンの注入とは表層粒の放出パターンが異なることを示している。活性化処理後における卵母細胞の Cdc2 キナーゼは、高活性を示す第2減数分裂中期のレベルから、いずれの活性化処理においても時間経過とともに低下した。つぎに、活性化処理後、卵母細胞をサイトカラシン B 処理することによって2倍体を作り出し、体外における胚盤胞への発生率を検討した結果、いずれの処理を施された卵母細胞も胚盤胞へ発生した。電気刺激あるいは Ca^{2+} を注入した卵母細胞の胚盤胞への発生率は、Sr^{2+}, Ba^{2+} あるいは精子抽出物を注入した卵母細胞の発生率より高いことを示した。</p> <p>本研究は、ブタ成熟卵母細胞は、2価陽イオン (Sr^{2+}, Ba^{2+}, Ca^{2+}) の細胞内濃度上昇に反応して活性化されるが、これらの2価陽イオンが細胞外に存在しても卵母細胞内に2価陽イオン濃度が高まることなく、活性化に至らないことを明らかにし、精子抽出物は、電気刺激と同様にブタ卵母細胞を効果的に活性化し、その他の活性化誘起法では認められない Ca^{2+} オシレーションをブタ卵母細胞に誘起できることを示した。さらに、2価陽イオン、あるいは精子抽出物を注入した卵母細胞は、$[Ca^{2+}]_i$ の上昇、表層粒の崩壊、Cdc2 キナーゼの不活性化、および雌性核の形成などの受精時にみられる一連の反応を起こし、その後、胚盤胞へと発生することを明らかにしている。</p> <p>よって、学位申請者 岡田 幸之助は博士 (農学) の学位を得る資格があると認める。</p>	