

## 研究課題構想・概要

○研究課題名 「哺乳類における受精後期の分子機構の解明」  
○提案者名 「山縣一夫」  
○所属機関名 「筑波大学応用生物化学系」

### 研究の目標・概要

1. 目標：哺乳動物の受精において精子・卵の融合から雌雄前核の融合に至る比較的後期のイベントは、個体発生という意味において体細胞クローン法によりバイパス可能であることが示された。しかし、この時期のイベントを欠くクローン胚では発生率の低下や胎盤の肥大、肥満といったエピジェネティックな異常が報告されてきている。一方、受精後期の現象に関してはこれまで分子レベルでの解析はあまり行われていない。そこで、本研究では受精後期の現象がその後の胚発生やエピジェネティックな表現型に重要であるという見地から、その分子メカニズムの解明を目指す。年次ごとの目標：1年目、各種実験系の立ち上げ。2年目、各テーマから同定された遺伝子の解析およびカタログ化。3年目、ノックアウト、ノックダウンを用いた遺伝子の機能解析。4年目、応用を見据えた研究の総括。
2. 内容：以下にあるように大きく3つのテーマを平行させながら研究を進めていきたい。
  - 1) 卵子に持ち込まれる精子由来因子の同定とその機能解析：精子核周辺部の抽出物に対するモノクローナル抗体ライブラリーを作製し、網羅的に同定していく。それらのノックアウトマウスを作製し、機能解析を行う。
  - 2) 前核時期に転写される遺伝子の同定とその機能解析：免疫沈降法を応用した方法により受精卵前核期の *de novo* mRNAを抽出。それら遺伝子の詳細なプロファイリングとカタログ化。RNAi法を用いた機能解析。
  - 3) 初期発生に見られるDNA脱メチル化の解析：トランスジェニックマウスを用いた受精卵におけるDNA脱メチル化の可視化。酵母を用いたエクスプレッションクローンングによるDNA脱メチル化因子の同定。
3. 新規性・独創性：研究の着想だけでなく、手法においても独自のアイデアで進めていくことで、これまでにない新規な結果を導き出せることを期待している。
4. 必要性：受精後期の分子メカニズムに関してこれまで十分な知識の蓄積がなされていない。生殖医療や畜産などにおける発生工学的手法の安全性や技術の向上のためにも、早急に基礎的研究の発展が望まれている。
5. 他の競争的資金等には馴染まない理由：本申請中にある研究計画に関しては、申請者にとってほぼゼロからのスタートになるため、実験系の立ち上げ等、比較的ゆとりのある期間と研究費が必要となってくる。

### 諸外国の現状等

1. 現状：欧米では以前から不妊カップルの率が高いことから生殖医療への関心が高く、技術的な応用研究に関してはこれまで一步リードを許してきた感がある。また、受精そのものの形態学的、生理学的研究に関してもその歴史はかなり古い。しかし、その分子レベルでの解析となると哺乳動物の配偶子の性質や量的問題から世界的に見てもこれまであまり進んでいなかった。
2. 我が国の水準：マウスを用いた体細胞クローンの作製は、世界に先駆けて日本人の手により行われた。このことを皮切りに、その応用研究やそれに付随したエピジェネティックな解析が日本において活発になされてきている。また、精子と卵子の接着・融合などの配偶子間相互作用に関しては、申請者らの研究成果も含めて近年日本から続々と分子レベルでの解析結果が報告されており、基礎的側面においても諸外国に対して決して遅れを取っていないと思われる。

### 研究の進展及び成果がもたらす利点

1. 世界の水準との関係：配偶子間相互作用などの受精初期イベントだけでなく、本申請において受精後期における分子機構の一端が明らかになれば、生殖の基礎的研究における日本の寄与に関してはかなり高いものになることが期待される。また、本研究において受精後期のイベントがその後の胚発生やエピジェネティックな表現型に重要であることが示されれば、それは世界に先駆けてこの分野に脚光をあてることとなり、かなり高い水準で研究を進めていくものと確信している。
2. 波及効果：近年、顎微授精や体細胞クローン法など発生工学的手法が発達してきており、実際応用化に向けて徐々に動き始めている。しかし、これらの技術が受精などにおける基礎知識の蓄積を飛び越して一人歩きしている感が強い。本申請において受精後期に卵子の中で起きるイベントに関して分子メカニズムの一部でも明らかになれば、当該分野における基礎的研究の発展につながることが予想される。さらに、ゆくゆくはそこで得られた基礎的科学理論が、生殖医療の安全性や技術の向上との橋渡し的役割になることを期待している。

# 哺乳類における受精後期の分子機構の解明

(研究機関名) 筑波大学  
(研究者氏名) 山縣一夫

## 1. 研究の意義、目的、必要性

受精後期では精子による卵子の活性化が引き起こされた後、形態的には精子核の膨化、卵子の第二減数分裂、雌雄前核の形成、核の融合といった一連のステップを踏む(図)。また、分子レベルでもこの時期でドラスティックな変化がおきていることが想像される。一方、マウスなどの哺乳動物において体細胞クローン技術が開発され、適切な条件で産出されたクローン胚は個体にまで発生することが示された。このことは、先に述べた受精後期での形態、分子レベルでのイベントは個体発生という目的において必須な生命現象ではないことを示唆している。しかし、体細胞クローンでは胚の発生率の低さや産仔の胎盤の肥大、個体の肥満といった異常を示すことが最近になり明らかになってきている。申請者は受精後期で見られる一連のイベントこそがその後の発生やエピジェネティックな表現型に重要であり、クローンではこれがバイパスされてしまうことにより異常が引き起こされるのではないかと考えた。しかし、受精後期における分子生物学的な知見に関しては、これまで十分な知識の蓄積がなされていない感がある。そこで本申請では、受精後期で見られるイベントについての詳細な分子メカニズムを明らかにするとともに、その現象がエピジェネティクスにあたえる影響を解明する。

## 2. 研究概要

以下にあるように大きく3つのテーマを平行させながら研究を進めていきたい。

- 1) 卵子に持ち込まれる精子由来因子の同定とその機能解析：精子核周辺部の抽出物に対するモノクローナル抗体ライブラリーを作製し、網羅的に同定していく。それらのノックアウトマウスを作製し、機能解析を行う。
- 2) 前核時期に転写される遺伝子の同定とその機能解析：免疫沈降法を応用した方法により受精卵前核期の *de novo* mRNAを抽出。それら遺伝子の詳細なプロファイルリングとカタログ化。RNAi法を用いた機能解析。
- 3) 初期発生に見られるDNA脱メチル化の解析：トランスジェニックマウスを用いた受精卵におけるDNA脱メチル化の可視化。酵母を用いたエクスプレッショングローニングによるDNA脱メチル化因子の同定。

## 3. 研究目標

近年、顕微授精や体細胞クローン法など発生工学的手法が発達しており、実際応用化に向けて徐々に動き始めている。しかし、これらの技術が受精などにおける基礎知識の蓄積を飛び越して一人歩きしている感が強い。本申請において受精後

期に卵子の中で起きるイベントに関して分子メカニズムの一部でも明らかになれば、当該分野における基礎的研究の発展につながることが予想される。さらに、ゆくゆくはそこで得られた基礎的科学理論が、生殖医療の安全性や技術の向上との橋渡し的役割になることを期待している。

