

日本産科婦人科学会雑誌 ACTA OBST GYNAEC JPN Vol. 56, No. 10, pp.1201—1209, 2004 (平成 16, 10 月)

シンポジウム 2 に関するレビュー

配偶子形成

¹⁾群馬大学大学院医学系研究科器官代謝制御学講座生殖再生分化学

²⁾慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

峯 岸 敬¹⁾ 吉 村 泰 典²⁾

Gametogenesis

Takashi MINEGISHI¹⁾, Yasunori YOSHIMURA²⁾

¹⁾*Department of Gynecology and Reproductive Medicine, Gunma Graduate School of Medicine,
Subdivision of Metabolic Regulation, Gunma*

²⁾*Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Tokyo*

Key words : Genomic imprinting · Androgen · Epigenetics · Sperm centrosome · Linker histone

はじめに

古代ギリシャのアリストテレスは、発生の前成説と後成説の2つの仮説を提唱した。発生の前成説とは、成体の形態は発生の最初からできあがっており、それが単に成長するだけであるという説であり、後成説は個体の形態は徐々に形成されるというものである。

前成説では、すべての生物は、かつて神によって一度に創造されたものであって、体の内にロシア人形のような入れ子状態になって存在し、適切な時期に生まれ出てくるという学説である。これは、卵子細胞や精子細胞の内部にはすでに形作られたミニチュアの人間が体を丸めて入っており、その人間の生殖細胞には次の世代の人間が同様に包含されているという考えで、17世紀には前成説を信じる者が出現した。それは、顕微鏡の拡大率が不十分であったため、昆虫を対象とした場合、サナギを卵と見誤ったことや、アリマキなどの単為発生を観察したため、成体のひな形はすでにできており、それは卵にあると考えた。一方、精子の方が成体の形態に似ており、かつ運動能力もあるという理由でひな形は精子にあるという説もあり、ハルトゼーガーの精子の中の人間のミニチュア図は有名である。この時代はキリスト教にも影響を受け、サイエンスのレベル全体からは、致し方ない誤った論理ではあるが、この時代の科学者の興味と努力を考えると単純に退けられない説と思われる。1840年代には、受精

卵が1つの細胞であることがわかり、さらにはウニの研究から、受精卵の核の中の染色体が精子と卵子の両方から均等に由来することが証明され、この問題に決着がついた。

遺伝子工学的手法を用いることにより、いままで困難であった微細な構造をもつ卵子、精子の解析が可能となり、さらに現在では、stem cellを利用して卵子または精子が発生させることが可能になってきている¹⁾²⁾。このような時代にあって、ヒトの発生の第1歩である精子と卵子の形成と、その受精をテーマに研究成果を持ち寄って議論を展開することは大変有意義であり、時機を得たシンポジウムのテーマと考えられる。今回のシンポジウムの配偶子形成とその成熟の分子機構では、ゲノムインプリンティングの分子メカニズムについて有馬隆博先生、精子形成過程におけるアンドロゲン作用の分子生物学的解析は小森慎二先生、卵子形成・精子成熟過程におけるエピジェネティクスの解明は田中守先生、配偶子形成過程における細胞骨格系の形成と受精における機能発現について寺田幸弘先生に担当して頂いた。

一方、シンポジウムで紹介される議論は、最近では遺伝子レベルの実験が多く、理解し難い面もあり、各シンポジストの内容を含めて概説を試み、その理解を深めて頂きたいと考え、この項を進めた。

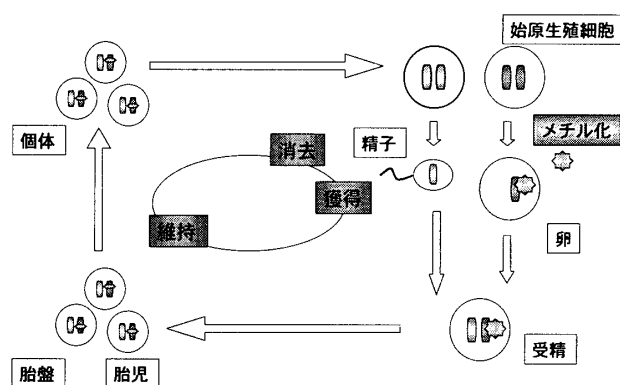


図1 インプリンティングの獲得と消去
(卵形成過程でインプリンティングが獲得される場合)

配偶子形成とゲノムインプリンティング

哺乳類においては、父親と母親に由来する一対のゲノムをもち、相同染色体上の対立遺伝子(allele)は等しく発現する。しかし、予め発現するようにプログラムされた遺伝子があり、これらの遺伝子に優先性を備えることをインプリンティングと呼ぶ。

父親または母親由来のどちらか一方の対立遺伝子だけが発現するようになるためには、精子や卵子の形成過程において何らかの形で遺伝子に標記が付される機構があると考えられる。インプリンティングは親の生殖細胞で起こり、配偶子形成過程で刷り込まれ、そして、体細胞でインプリントに従った父性、母性対立遺伝子特異的発現が起こる。このインプリンティングは遺伝情報、DNA配列には変化を与えないエピジェネティックな機構である(図1)。

インプリンティングは始原生殖細胞で一旦インプリントの消去が起こり、配偶子形成の際に新たなインプリントの獲得が行われる。マウスでは、胎生7.5日頃に尿膜の基部に40個前後primordial germ cell(PGC)が形成され分裂増殖を繰り返しながら胎生10.5~11.5日までに最終的な生殖隆起へ移動し、その後性分化を始める。メチル化インプリンティングの消去はこのPGCが移動する間に始まり、生殖隆起に入った後に急激に進行する。つまり、卵あるいは精子が、それぞれ特異的なインプリンティングを受けるためには、それに先だって、生殖細胞の発生過程で、親のインプリンティングが消去される必要がある。このようにPGCで一旦消去されたインプリントは、配偶子形成過程において精子、卵特異的なメチル化を受ける。雄の生殖

系列で特異的なメチル化を受けるH19遺伝子のDMRは、胎生14.5~18.5日のプロ精原細胞期にメチル化を受け、また雌の生殖系列で特異的なメチル化を受けるIgf2rなどの遺伝子は、生後5~20日の卵細胞成長期にそのインプリントを確立することがわかっている。

マウスの受精卵では、精子、卵子由来の核がそれぞれ雄性前核、雌性前核として細胞内に存在するが、一方の前核を除去して別の受精卵から前核を移植することが可能である。二倍体の雄性発生や雌性発生の胚は子宮内致死であり、このことからマウスの父親・母親由来ゲノムが機能的に不等価であることが判明している。ヒトの場合は、雄性発生は胎状奇胎を生じ、卵巣で未熟卵が単為発生すると奇形種を生じる。

一方体細胞では、インプリンティングに従って、父親または母親対立遺伝子特異的な発現が生じる。インプリンティングを受ける遺伝子は全遺伝子の数パーセントにすぎないが、個体発生や癌などの疾患と密接に関わっている。

インプリンティングの分子機構としては、DNAメチル化が考えられている。DNAのCpGのシトシン基にメチル基を付加する酵素としてメチルトランスフェラーゼ(Dnmt1)が知られている。体細胞の遺伝子でのメチル化の分布パターンは細胞系により異なるが、この維持メチル化酵素の作用によって個々の体細胞のメチル化パターンは維持されている。Dnmt1遺伝子産物は哺乳類細胞の主な維持メチル化酵素であるが、同時に主要な新生メチル化酵素としても働く。つまり、細胞分裂におけるDNAメチル化パターンは、DNA複製直後に維持型メチル化酵素Dnmt1によって付加される。しかし、卵細胞では体細胞型とは異なるエキソン構造をもつ卵細胞特異的アイソフォームのみが発現する。この卵細胞型Dnmt1のみをノックアウトすると個体は正常に生育し、卵形成も起こる。しかし、-/-雌に形成されるDnmt1-/-卵子は野生型精子と受精した場合でもその受精卵は正常な遺伝子発現を示さず、胚発生を維持できない。このように卵細胞由来Dnmt1は受精後の卵割過程でゲノムDNAメチル化の維持に必須の役割を果たすことが推察されている。

有馬らは、マウス精子、卵子、桑実胚、胎仔のDNAを用い、Bisulphite PCR法で(HYMAI/ZAC)の上流プロモーター領域内のCpG島のメチル化の解析を行った。このCpG島はヒト、マウス間で保存されていた。

そしてマウス精子ではメチル化されず、桑実胚、胎仔では約 50% のメチル化を示した。

卵形成過程におけるメチル化について詳細に検討し、生直後の卵ではメチルされていなかったが、生後 5 日目以降の卵ではメチル化を獲得し、受精後成体までこのメチル化パターンは維持された(すなわち、アレル特異的 DNA メチル化領域(DMR)であった)。さらに未成熟卵(生後 1 日目、5 日目、10 日目、15 日目、20 日目)と成熟卵を用いた改変単為発生胚を作製し、DMR のメチル化の獲得とインプリントが確立する時期について解析した。つまりインプリントが確立した時期の未成熟卵と成熟卵から構成される改変単為発生胚ではインプリント遺伝子の発現が消失することになる。このマウスを用い ZAC は生後 5~10 日目の成長過程にある卵でインプリントが開始することが判明し、メチル化の獲得時期との相関がみられた。次に Hela 細胞を用い、DNA メチル化による DMR の転写抑制作用をルシフェラーゼ活性で調べた。その結果、DMR の下流 500bp でメチル化した場合、メチル化しなかった場合と比較し転写抑制作用は約 6 倍となり、この DMR がインプリントコントロール領域(ICR)として機能することが示唆された。

精子形成

精子形成とは、精祖細胞と呼ばれる未熟な生殖細胞が精子と呼ばれる高度に分化された細胞になるまでの全過程を含むすべての現象を指す。ヒトの場合、精祖細胞が精子となるまでに 70 日前後を要し、1 日に約 10^8 個の精子が産生されている。この精子形成は思春期に始まり、老年期まで継続される。

思春期に入ると、生殖幹細胞である精祖細胞は体細胞分裂によって増殖し、精子への分化を開始する。精祖細胞は生涯分裂能力を有し、精細管の基底側に位置する。精祖細胞には A 型と B 型があり、増殖した一部の A 型細胞は自己増殖のための幹細胞として残り、大多数の B 型細胞は分化して減数分裂を開始する。A 型精祖細胞の細胞膜表面には c-kit 分子がレセプターとして発現して、Sertoli cell 表面にはそのリガンドである steel factor が発現すると考えられており、パラクライン的に作用し、分化が進行すると考えられている。

この精祖細胞は成長しつつ徐々に変化し、精細管中で最も大型の生殖細胞である精母細胞に変化する。この時期に相同染色体が密着して対合と交叉の結果、遺

伝子の組み換えが起こり、遺伝子の多様性をもつ配偶子を作る。また、精母細胞(第 1 精母細胞)は思春期以降に造り続けられる。この精母細胞は第 1 次減数分裂を行い、精母細胞のほぼ半分の大きさの 2 個の一倍体の染色体を有する精娘細胞(第 2 精母細胞)を形成する。精娘細胞は第 2 減数分裂を開始し、4 個の一倍体の染色体を有する精子細胞を形成し、この減数分裂の間には、DNA 複製を伴わない。

精子細胞は先体の形成、核の濃縮、尾部の形成、細胞質の脱落などの一連の形態学的変化を受けて高度に分化した精子となる。1 個の精母細胞から 4 個の成熟精子が形成される。そのうちの 2 個の成熟精子の染色体は 23, X であり、残りの 2 個の精子の染色体は 23, Y となる。しかし、23, X あるいは 23, Y として染色体数が同じであっても、4 個の精子の遺伝情報はすべて異なる。精子は父親の遺伝情報を卵子に運ぶために高度に分化した細胞で、父方の DNA が充満している頭部と鞭毛運動を行う尾部とで構成される。

精子形成周期の制御には、LH や FSH などのホルモンの関与が必要であり、その作用は分化した生殖細胞に直接的または、体細胞である Sertoli cell などを介して間接的に行われる。Leydig cell において LH により産生が促進されるアンドロゲン(A)は、精粗細胞の分化と精母細胞の減数分裂に関与し、FSH は精子完成の段階で精子細胞の成熟に必要であると考えられている。

アンドロゲン不応症(androgen insensitivity syndrome: AIS)は、遺伝的性は男性(46, XY)であるが、アンドロゲン作用機構の障害により種々の程度の男性化障害を呈する疾患で、ステロイドホルモン不応症では最も多い疾患である。ヒト AR 遺伝子は X 染色体上に存在するため、X 連鎖性の伴性劣性遺伝を示し、保因者の女性を通して異常 AR 遺伝子をもつ男性に発症する。また最近、X 染色体の inversion による孤発症例も報告されている。その病態は、アンドロゲン作用不全によるさまざまな程度の男性化障害を来す疾患であり、従来から男性化障害の強い順に、完全型精巢性女性化症(complete testicular feminization: CTF)、不完全型精巢性女性化症(incomplete testicular feminization: ITF)、Reifenstein 症候群、男性不妊症の 4 型に分類されてきた。

近年では、androgen insensitivity syndrome(AIS)と呼ばれることも多く、程度により complete AIS, par-

tial AIS, mild AIS などと表現される。complete AIS (完全型精巢性女性化症)では、男性内性器が欠損し、外性器が完全女性型であり、体格などは女性的である。partial AIS(不完全型精巢性女性化症)では、陰核の肥大や陰唇の融合を認める。mild AIS では社会的性は男性であり、尿道下裂などの軽度の男性化障害をもつものや男性不妊のみのものがある。しかし、これらは広いスペクトラムをもつ連続した病態の一部を示している表現であり、明確には分類できない。アンドロゲン不応症は、アンドロゲンの結合から転写活性発揮までの各段階の障害により発症するが、症例のほとんどは AR 遺伝子の異常により生じ、これまでに 300 以上の AR 遺伝子変異が報告されている。

精巣では A は、精細管に存在するセルトリ細胞に作用するが、一方でヒト精巣の germ cell にも AR の発現があるとの報告もあり、作用機序について未だ明らかでない。この点で小森らは、すでに AR の点突然変異が性分化異常の原因となることを多数の症例について報告してきた。また、この AR の異常の中で、Exon A の CAG repeat 数 (Glutamine repeat 数は CAG repeat 数より 1 つ多くなる)の寡多が機能に影響していることも報告されており、この Exon A の CAG repeat 数 (Glutamine repeat 数)と疾患との関連についても報告した。

また、減数分裂の後、半数体となった球形の精子細胞は分化するに従い、細長い円錐状の細胞となり、核の凝縮、先体(acrosome)の形成、鞭毛の形成などの時期を特に精子完成(spermiogenesis)と呼んでいる。核の凝縮については、まず核蛋白質であるヒストンが精子特異的塩基性蛋白質である TP1, TP2 に置きかわり、これらは多くのシステイン残基の S-S 結合により核の凝縮を起こすと考えられている。さらにこの蛋白も精子特異的塩基性蛋白であるプロタミンに変化する。この点に関しても、小森らはこれらの精子特異的蛋白の発現に対する A の作用機序を検討し、その関与を示唆している。精子細胞が変態を完了して Sertoli cell から離れると“精子”と呼ばれる。完成精子は形態的・機能的に高度に分化した頭部と鞭毛からなる。核は頭部全体にある。鞭毛は中間部に精子運動に必要な ATP を供給するミトコンドリアが存在する。細胞間の局所制御に関する検討では、A の Sertoli cell に対する影響を見るためにプロテインチップを用いて解析をした。DHT 添加により増加する蛋白が、6 種類同定さ

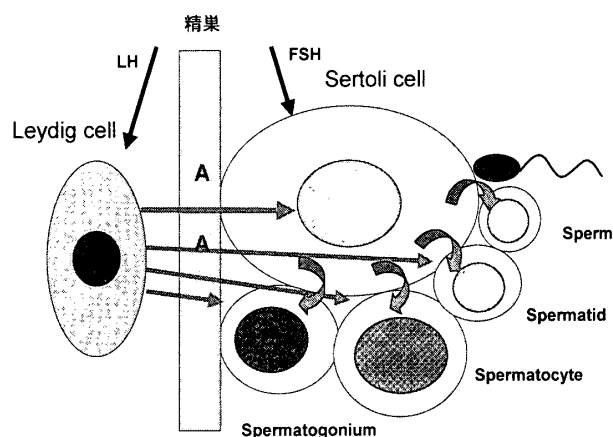


図2 精子形成過程におけるアンドロゲン作用の分子生物学的解析

れた。そのうち、5.0K の分子は、添加後 15 分にて増加し、他の 4.3K, 5.7K, 5.8K, 10.0K, 10.0K の分子は 48 時間後に増加した。一方、減少する分子も 6 種類同定された。そのうち、6.3K と 8.6K の分子は、添加後 30 分にて減少し、他の 4.9K, 5.0K, 12.4K, 19.8K の分子は 48 時間後に減少した。この中で、48 時間にて減少する分子はアミノ酸配列の解析の結果、translationally controlled tumor protein (TCTP) であることが判明した。この分子は、ヒト精巣では、germ cell, Leydig cell, Sertoli cell などに分布し、その機能としては、tubulin-binding protein, Ca^{2+} binding protein, guanine nucleotide dissociation inhibitor, histamine-releasing factor としての作用があると考えられている。このように TCTP は cell cycle やシグナル伝達に関与しており、これが精子形成過程に影響していると示唆された。また、Sertoli cell line: TM4 に DHT を添加した場合に、変動する分子には、短時間で変動する分子と長時間を経て変動する分子が存在することも判明している(図2)。

卵子形成

卵子形成とは卵祖細胞と呼ばれる未熟な生殖細胞が成熟した卵子へと変化していく過程をいう。卵子の胎児期における成熟過程では、初期に卵祖細胞は体細胞分裂を繰り返し増殖し、卵祖細胞はより大型の卵母細胞に分化し、周囲を単層の扁平な顆粒膜細胞に取り囲まれ“原始卵胞(primordial follicle)”を構成する。胎生 5 カ月頃をピークに男性と異なり卵祖細胞と一次卵母細胞が退化するため、その数が減少する。胎生 6

カ月に入ると退化しなかったすべての卵母細胞はDNAの複製を終えて減数分裂の前期に入る。この数は出生時には100~200万個となり、この数は減少し続けると考えられている。これ以降の細胞分裂は配偶子の形成であるために二回の減数分裂(成熟分裂)が行われる。出生後の原始卵胞は、卵子径の増大、透明帯の形成、顆粒膜細胞の立方化・多層化などの形態的な変化をし、一次卵胞へ変化する。一次卵母細胞は出生後まもなく複糸期に入り、第一分裂を停止する。一次卵母細胞が1~2層の顆粒膜細胞によって取り囲まれる状態を“一次卵胞”という。一次卵胞の状態では思春期に至るが、卵母細胞は減少する。一方、成長した卵母細胞は大きな核(卵核胞)を有する。この一次卵胞までの卵胞発育は幼少期、思春期、性成熟期、さらには妊娠中を通じて絶え間なく継続されていて、ゴナドトロピンに依存しない自立的な卵胞発育過程と推察されている。

思春期以降になると、通常一個の卵胞が各月に成熟し、排卵が起こる。つまり、卵子は第一次成熟分裂の前期で分裂を停止した状態で、最大卵胞の卵子に至る。この時期の卵子は胚盤部(germinal disc)に卵核胞(germinal vesicle)やミトコンドリア、滑面小胞体、グリコーゲンなどを豊富に含む。卵核胞は著しく大型で明瞭な核膜を有するが、核質の染色性は乏しい。顆粒層細胞の細胞質突起は卵子の細胞膜とギャップ結合を形成し、両者の間で機能的連絡関係があることが示唆される。LHサージは排卵の約16時間前に起こるが、このLH刺激後2時間以内に卵子細胞膜と顆粒層細胞とのギャップ結合が解離し、卵核胞崩壊(germinal vesicle breakdown)が起こる。次いで、LH刺激後約4時間以内に胚盤内に紡錘体(spindle)が形成されるとともに小胞が多数出現し、6時間以内に第一極体(first polar body)が放出されて第1次減数分裂を終え、排卵される状態の卵子になる。

第1減数分裂の結果、染色体数は23,Xの2つの細胞に分裂することになるが、卵娘細胞のみが細胞質を独占するために、片方はほとんど細胞質のない1次極体(第1極体)となる。この1次極体は小さくて機能のない細胞であり、まもなく退行変性する。

排卵時に卵娘細胞の核は第2減数分裂を開始するが、細胞分裂中期まで、分裂はその段階で中断される。精子が卵娘細胞内に貫入すると第2減数分裂は完了し、大部分の細胞質は再び1つの細胞に引き継がれ受

精卵細胞となる。もう一方の細胞である2次極体は機能のない細胞で、まもなく退行変性してしまう。2次極体が放出されると卵細胞の成熟は完了する。1個の卵母細胞が2回の減数分裂を繰り返すことによって1個の成熟卵子が生じ、その染色体は23,X(常染色体が22本と1本の性染色体)である。

精子形成は性成熟が進むにつれて、男性の精巣の精細管の中で起こり、2回の減数分裂によって生じた4つの配偶子はすべて成熟し、4つの精子になる。ところが卵子形成では細胞質の分裂は均等に行われず、4つのうち1つだけが卵子となり他はほとんど細胞質をもたない極体となって消失する。さらに、卵子形成と精子形成過程の相違は、精子が生殖幹細胞から作られ続けるのに対して、出生時にもっていた未成熟卵の数が時間と共に減少を続ける。さらに、こうした成熟卵は閉経期ごろには、成熟過程で50年もの間保存されていたことになり、卵の質の低下、すなわち生殖能の低下が年齢とともに問題になると考えられてきた。しかし、ハーバード大学医学系大学院 Jonathan Tilly et al. により、哺乳動物の卵巣が一生の間を通して新しい卵子を作り出すことを示す報告もみられるようになってきている³⁾。

クロマチン動態と卵子形成

DNAはヒストンを巻き込んでビーズ状に連なり、さらに多種のタンパク質を巻き込みながら折れ曲がり、クロマチンを構成する。これがさらに折れ曲がり高次の染色体を構成し、この集まりが核を構成している。クロマチン構造は細胞の種類により特定領域が活性化されやすいように、また不活性状態を維持しやすいように変化がつけられている。ゲノムDNAの塩基配列が表す遺伝コードに対比して、エピジェネティックコード、またヒストンコードが提唱されている。DNAの生理的な化学修飾としてのメチル化、クロマチンの基本単位としてのヌクレオゾームを構成するヒストンの修飾が、高次の遺伝情報として認識され始めている。ヒストンのC末端はクロマチンの基本単位であるヌクレオゾームの構成に携わっているのに対して、N末端側はヌクレオゾーム構造より離脱しており、さまざまな蛋白質修飾が行われる。これがエピジェネティクスであり、DNAに直接つけられているシトシンのメチル化やヒストンにつけられている修飾(アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビチン化)のほか、リンカーヒストンやヒストン類似蛋白質、転写因子などのDNA

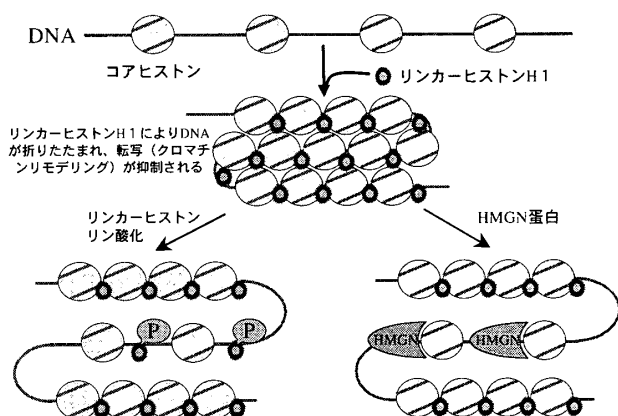


図3 リンカーヒストンによるクロマチンのリモデリング
クロマチン構造の不安定化により転写を活性化

の脱メチル化結合蛋白質などが含まれている。

哺乳類ゲノムは、さまざまな蛋白質因子とともにコンパクトに折りたたまれ、細胞核内に納められている。DNAと蛋白質の複合体であるクロマチンの基本単位をヌクレオソームと呼んでいる。ヒストンH2A、H2B、H3、H4がそれぞれ2つずつの8量体を形成してDNAが巻き付く構成をとっている。ゲノム領域でのヌクレオソームの密度や分布は大きく異なっていて、存在する遺伝子の転写状態やクロマチンの規定する因子が相互に関係している。高度に凝縮したクロマチン領域では遺伝子発現は抑制されており、進展したクロマチン領域では、逆に活性化されやすい。DNAは、ヌクレオソームコアパーティクルと呼ばれるコアヒストン8量体の周りに2周巻き付いた構造をとっている。さらにリンカーヒストンH1と呼ばれるヒストン蛋白質が加わると高次構造をとって折りたたまれる。このリンカーヒストンが、リン酸化を受けたり、HMGN蛋白のようなリンカーDNAに直接結合するような蛋白質が存在したりすると、DNAの高次構造が不安定化し、転写の抑制が解除されることが知られている(図3)。

固体内のほとんどの細胞が受精卵で決定されたゲノムを基本に保持し、さらに細胞特異性を発揮している機構と、クロマチンの構造と転写因子の役割が注目されている。例えば、ヒストンの脱アセチル化については、転写が盛んに行われているクロマチン領域では、ヒストンがアセチル化されており、逆に遺伝子の転写のみられない不活性なクロマチン領域では脱アセチルされている。これらの事実と最近注目されてい

るコアアクチベーターがヒストンアセチル化酵素活性をもち、逆に転写コリプレッサー複合体の中でヒストン脱アセチル化酵素が働いていることから、ヒストンのアセチル化状態と転写活性の関係が一部明らかとなった。

ヒストンには、コアヒストンとリンカーDNAに結合するリンカーヒストンの2種類が存在している。リンカーヒストンは卵子を除くすべての細胞に発現する体細胞型リンカーヒストンと、卵子のみに発現する卵子特異的リンカーヒストンが存在する。

田中らは、哺乳類で初めて発見した卵子特異的リンカーヒストンに注目し、受精過程におけるクロマチンの修飾機構から見た配偶子形成、成熟のメカニズムを明らかにしている。まず、卵子特異的cDNAライブラリーを作成し、哺乳類で初めて卵子特異的リンカーヒストンH1fooを発見した。このH1fooは、卵子形成期の卵子核から受精後初期胚の遺伝子発現が開始するまでの配偶子核に局在していることが確認された。体細胞核を卵子に移植すると体細胞型リンカーヒストンが速やかに卵子型に置換されることも明らかになった。また、卵子特異的リンカーヒストンは、その動態や性質が体細胞型と異なり、卵子におけるエピジェネティクスを調節している重要な因子であると考えられた。

卵子成熟

卵子成熟とは、未成熟卵子が受精可能な成熟卵子になることであり、その過程において種々のシグナル伝達系を経由した後、最終的に卵成熟促進因子(MPF: Maturation promoting factor)の活性化により最終段階を迎えることが知られている。このMPFにより誘起される作用としては、卵核胞崩壊(GVBD: germinal vesicle breakdown)、染色体凝集、紡錘体形成が知られ、成熟した卵子は減数分裂第2中期(MII)で静止することにより、精子の受け入れ準備が完了し、受精を待つこととなる。MPFは、その機能および分子機構が種を超えて共通しており、卵成熟促進のみならず、全真核生物においてM期促進因子として機能することも明らかになっており、すべての細胞周期の調節に関与している。このMPFの本体は、触媒サブユニットのCdc2と調節サブユニットのサイクリンBからなるセリン/スレオニンリン酸化酵素である。一方、MPF活性は体細胞型リンカーヒストンを基質として使用し、そのリン酸化能をもって測定されている。しかしなが

ら、体細胞型リンカーヒストンは卵子内に存在しないことより、卵子における MPF の本当の基質は今まで明らかでなかった。田中らは、彼らが発見した卵子特異的リンカーヒストンが、MPF の触媒サブユニットである Cdc2 でリン酸化されることを示し、最終的な卵子成熟に卵子特異的リンカーヒストンが関与している可能性を明らかにした。

細胞骨格系と受精

配偶子成熟とは雌雄の配偶子が受精を正常に完了するために必要な能力を得る過程であり、それぞれの形成細胞には極めてダイナミックな細胞構造の変化が要求される。それら生命誕生への“動き”を司るのが細胞骨格系である。すなわち、細胞骨格とは、命より指令を受けて、現実には観察される配偶子の形態、運動を具現する現場の仕事人の役割を果たしているのである。細胞骨格系には微小管(MT)、微小繊維(MF)などがある。卵細胞質内に取り込まれた精子は、前核形成に向けての変化を受ける。頭部では、核膜が消失し、核内の DNA 結合蛋白質はプロタミンからヒストンに急速に置きかわる。この変化は卵細胞質内に豊富に含まれる還元型グルタチオンとヌクレオプラスミンの作用によって起こる。

また、MT 形成中心である中心体はヒト受精では精子より導入され、卵内に MT による精子星状体を形成する。精子星状体は両性ゲノムの融合に必須の細胞骨格構造である。

ヒト精子形成細胞は極めて激しい形態変化ののち成熟精子となる。特に、円形精子細胞から精子までの精子成熟過程(spermiogenesis)では、MF は精子先体側に、MT は細胞質中にマンシェット状に形成され、精子形成段階の Sb2 期を中心とする細胞骨格の動きが精子成熟過程の大きな形態変化のモーターとなっていることが明らかになった。成熟精子の産生が認められない不妊男性の造精過程細胞では、マンシェット形成不全などの精子成熟段階での細胞骨格形成異常が観察された。ヒト精子成熟過程では核に近接し、マンシェットに囲まれた部に中心体機能蛋白 centrin がスポット状に発現していた。これは、精子成熟段階で精子中心体が機能的に成熟してゆく過程であると推測され、マウス精子成熟過程では認められなかった。

卵子内に導入された精子中心体は MT の形成を誘導し、精子星状体と呼ばれる放射状の細胞骨格を形成する。精子中心体は雌雄前核の融合に必要な動きを卵

子細胞質内に作り出す。ICSI がある程度技術的に確立した現在の ART がさらに飛躍するためには、精子中心体機能の発現に代表される、post ICSI events in fertilization に注目してゆく必要がある。精子中心体機能が測定可能であれば、ICSI 後の受精過程を予測できるアッセイとなりうるものと考えられる。以上の検討より、配偶子の形成にはしなやかな細胞骨格系のダイナミックな動きが存在して、その機能発現は配偶子の正常な形成に必要な条件であることが示された。また、精子成熟段階でその機能的成熟が認められた精子中心体は ICSI 後の受精の成立に向けた動きに必須の構造であり、ヒト不妊症の一因としてその機能不全が存在することが明らかになった。

動物細胞では、中心体が MT の形成中心となるが、細胞の形態変化や、紡錘体を形成するために絶えず作り直されている。長年に渡って研究されているがその構造と機能に関しては不明点が多い。生化学的な解析が進まない理由は、他の蛋白でも同様であるが、中心体蛋白質が微量であり、均一になるまで精製できないことにある。最近の蛋白質相関プロファイリングと呼ばれるプロテオミクスに基づいた新手法によって、この状況が変化するかもしれない⁴⁾。この方法は細胞の破碎液を基に密度勾配遠心分離法・ショ糖密度勾配法を用いて、細胞小器官を分離する方法を基本に用いている。この方法を用いて新たな中心体蛋白質 23 種が同定されこれまで不明であった中心体の詳しい構造と機能の関係が解析されることが期待される。

おわりに

哺乳類の体細胞クローン動物は分化した細胞の核を脱核した卵細胞に移植することによって作製される。このことは、卵細胞質には分化型細胞の分化や老化の経歴をキャンセルする作用があることを示しており、卵核及び受精後の精子核を白紙状態に戻す機構と同様のメカニズムに起因すると推定される。実際には、体細胞クローンの出生率は極めて低く、さまざまな発生異常が認められるという報告があり、初期化はかなり低い確率でしか行われていないものと思われる。この点で、配偶子形成の分子機構の解明は生殖分野の発展のみならず再生医学を含めた医療全般に重要な意義をもつと考えられる。

Scholer et al. のグループは先述のごとく、ES 細胞の培養下における細胞分化系から卵子形成が起きることを示した¹⁾。彼らは Oct4 の生殖細胞特異的発現

性を示すプロモーターに GFP 遺伝子を連結したレポーター遺伝子を作り、これを遺伝子導入した ES 細胞株から生殖細胞の出現を GFP 蛍光陽性細胞として識別する方法をとった。培養約 12 日目以降には Oct4-GFP 陽性細胞は大きなコロニーを形成した。この Oct4-GFP 陽性コロニーを回収して、さらに 1~2 カ月に及ぶ長期培養を行って、約 2 週間以降に卵胞に似た構造が形成された。さらに 1 カ月以上経過した段階では卵胞様構造において単為発生を示す卵割や胚盤胞形成が観察されている。

本年の 3 月 11 日号の Nature において、Tilly et al. は哺乳類の雌の卵巢では卵細胞の数は減少していくのみであると 50 年以上も信じられてきた事実疑問を投げかけている³⁾。彼らは、減数分裂のマーカーとされる、SCP3 の存在を成熟卵巢に認めることや、GFP を一様に発現するトランスジェニックマウスの卵巢に野生型の卵巢の一部を移植し、3~4 週間後のその卵巢の観察から GFP でラベルされた卵子が透明な顆粒膜細胞に囲まれている像を示した。これらの結果は卵胞形成が成熟マウス卵巢で維持されていることを示し、マウスが成体となった後にも依然として生殖力のある卵子を作ることができることを結論している。

これらのことより、生殖機能の低下は出生前より蓄えられてきた老朽化した生殖細胞によって生ずるのではなく、補充力の低下によると考えられる。この実験結果は年齢の増加とともに卵子が老化して生殖力が低下するという考えを強く否定することになる。重大な問題提起ではあるが、この結論を支持するさらなる研究成果が待たれるところである。

このシンポジウムでは、卵子および精子といった配偶子がさまざまなステップを経て、成熟、形成される複雑精緻な過程の分子メカニズムの議論を行った。

哺乳動物では一方の親から継承した遺伝子が選択的に機能するインプリント機構が存在し、この機構は受精卵の正常な発育や生体の恒常性の継続に極めて重要な役割を果たしている。有馬らは、正常胎盤絨毛と全奇胎間で異なるメチル化パターンを示すクローンを選別し、新規インプリント遺伝子である HYMAI/ZAC を単離した。このインプリント機構の破綻が卵巢癌化や新生児一過性糖尿病の発症に関与することが示され、また卵形成過程におけるインプリント遺伝子の DNA メチル化の確立と胎盤形成との関連性が示された。

ついで小森らは、精子形成過程における A 作用について検討し、A は AR を介して標的遺伝子に作用するが、AR に point mutation があると重症の性分化異常から軽症の造精機能障害まで幅広い異常が発生する。この AR の異常の中で、exon A の CAG repeat 数に注目し、AR の機能発現に repeat 数の関与を明らかにした。プロテインチップを利用した解析では、A は sertoli cell に作用してさまざまな蛋白を誘導し、その結果 germ cell に影響を及ぼす可能性を示した。

次に田中らは卵子形成、受精、体細胞核移植における epigenetics 機構の解明にあたり、卵子特異的リンカーヒストンに注目した。ヒトを含めた哺乳動物で世界で初めて卵子特異的リンカーヒストンを発見し、体細胞の核移植時には体細胞型リンカーヒストンが速やかに卵子型に置換されることを示した。この発見は核のリプログラミング機構やその制御因子を明らかにするうえで重要な意義をもつものと考えられた。

最後に寺田らは、配偶子の形成にはしなやかな細胞骨格系のダイナミックな動きが存在して、その機能発現は配偶子の正常な形成に必要な条件であることを示した。また、精子成熟段階でその機能的成熟は認められた精子中心体は ICSI 後の受精の成立に向けた動きに必須の構造であり、ヒト不妊症の一因としてその機能不全が存在することも明らかとなった。

これらの発表は現時点では独立した現象のように捉えられがちであるが、近い将来、これらの知見が相互に緊密に関連し合うことが理解される時代が必ず到来すると思われる。現在までの研究においては genetics の解明と機能解析が中心的役割を果たしてきたが、特に本シンポジウムでは epigenetics や細胞骨格系に視点が当てられた。最も強調しておきたい点は、ヒトを含めた哺乳動物の個体発生は、受精の時点より遡り、生殖細胞の発生・分化のステップから連続した一連の過程であって、一続きの epigenetic な制御によって進んでいくということである。生殖医療のさまざまな技術革新により、先天奇形、染色体異常などの genetic な検討はかなりなされるようになってきた。今後は核移植や胚操作におけるゲノムの epigenetic な修飾や細胞内骨格を介した signal transduction についての基礎研究を行っていく必要があり、それらの基礎的研究が IVF-ET や microfertilization などの ART における限界を乗り越える新たなストラテジーの開発につながるかもしれない。

文 献

1. *Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, 3rd, Boiani M, Scholer HR.* Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003 ; 300 : 1251—1256
 2. *Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ.* Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 2004 ; 427 : 148—154
 3. *Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL.* Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004 ; 428 : 145—150
 4. *Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M.* Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* 2003 ; 426 : 570—574
-