

# 哺乳類胚発生研究チーム

## Laboratory for Mammalian Molecular Embryology

チームリーダー PERRY, Anthony C. F.

哺乳類の胚発生は配偶子の融合、つまり精子と卵子の受精によって始まる。卵子は受精によって全能性を再獲得し、後に一個体をつくりあげる。これは、受精卵が究極の幹細胞であり、体を構成するあらゆる種類の細胞に分化できることを意味している。卵子を全能性幹細胞に転換する発生最初期のプロセスは、精子による卵細胞活性化である。卵細胞活性化は、精子の進入を卵子に伝えるとともに、胚発生を開始させるシグナルネットワークを確立させる。しかし、この重要なプロセスの分子の実体はほとんど明らかになっていない。受精直後の卵子でいったい何が起きているのか。我々はマウスを用いて、卵細胞活性化のメカニズムを明らかにしたいと考えている。

### 1. 受精における配偶子間の機能的相互作用 (Perry)

精子頭部の膜内に存在する成分は、正常な発生を誘導するのに必要十分な父性情報を含んでいる。この部位は、精核とそれを取り囲むタンパク質複合体からなるマトリックス (Peri-nuclear matrix, PNM) が含まれている。また、頭部以外の構造は、精子を卵子に到達させるために機能している。

我々は、精子頭部に含まれる成分と卵子との相互作用について、特に精子の進入直後に注目して、網羅的な解析を行っている。具体的にどのような相互作用が卵子を全能性の1細胞胚へと転換するのだろうか。これを決定付けるタンパク質を同定し、その機能を分子レベルで明らかにすることで、精子による卵細胞活性化の重要な一端を明らかにしたいと考えている。

このテーマはシンプルで平凡にも見えるが、実験的には非常に挑戦的といっても良い。なぜなら、精子頭部の膜下には、核を構成する巨大な多因子複合体があるのみならず、230種ものタンパク質からなるPNMが存在するからである。PNMは膜直下に位置するため、受精直後に卵細胞質と接触して胚発生の開始に影響を与える因子を含んでいると予想される。しかし、PNMはその巨大で複雑な構造ゆえ、全てのタンパク質が解離するには数時間を要すると考えられる。つまり、これらのタンパク質は、(1) 受精直後に卵細胞活性化に関与するもの、(2) 後に機能するために保管されるもの、(3) 迅速にタンパク質分解を受けるもの、のいずれかに分類できるだろう。そしていずれの場合も、周囲の卵細胞質との相互作用が予想される。しかし現在までに解析されたPNMタンパク質は少なく、その機能はほとんど分かっていない。

それでは、受精における配偶子間の相互作用をどの様に解析すれば良いだろうか。我々は、界面活性剤によって膜を穏やかに取り除いた精子を用いて研究を行っている。その様な精子頭部は、卵子に進入した精子頭部と同様の構造を持つことが電子顕微鏡で確認されている。膜除去した精子頭部を、卵細胞質の還元的環境を再現した条件に置くことで、受精のときと同様に精子タンパク質が可溶化する。可溶化した精子タンパク質をマイクロインジェクションによって卵子へ導入することで、それぞれの因子の機能解析が可能となった。このような機能解析は、クロマトグラフィーや

最新の二次元電気泳動技術を用いた分離同定といった分子レベルの解析と並行して行っている。さらに、この方法で同定したタンパク質に対する抗体を作成し、受精前・中・後における局在を免疫染色によって解析している。組換えタンパク質を用いることで、受精卵において低濃度で機能しているタンパク質の相互作用も検出可能となっている。このような多角的な研究により、配偶子間の相互作用によって確立される重要なシグナル経路を同定し、それが後の胚発生に与える影響を明らかにしたいと考えている。受精時の細胞内の環境は、短期的な影響のみでなく、成体に至るまでの中・長期に渡って影響を与えることが示されつつある。

### 2. 新規ゲノム操作技術の開発 (Perry)

当研究チームでは、研究手段または研究成果の応用、両方の側面から遺伝子操作技術の開発を行っている。我々は現在までに、mII (metaphase II, 分裂中期) トランスジェネシスと呼ばれる新規のゲノム操作技術を確立している。この手法では、通常 mII 期で停止している卵子に、膜除去した精子核と目的遺伝子を混合して共注入することで、効率的な遺伝子改変が可能となっている。mII トランスジェネシスは、ウイルスベクターの複製や分配を必要とせず、さらにメガベース単位の DNA 断片が導入できるなど、レンチウイルスを用いた遺伝子導入と比較して多くの利点がある。我々はこの方法を応用して、遺伝子ノックアウトおよびノックダウンをハイスループットで行う技術を確立しつつある。この技術の確立は、精子タンパク質の胚発生への機能、さらには成体への影響を研究する上で、非常に重要な手段となる。

In mammalian fertilization, a haploid sperm and an unfertilized egg (oocyte) unite. The result is truly remarkable; the formation soon afterwards of a transiently triploid cell that rapidly undergoes a profound transformation. Whereas its sperm and oocyte progenitors were unable to divide productively, the newly-formed one-cell embryo — a state from which we all developed — is able to divide to give rise to an entire individual. In a literal sense, the one-cell embryo is the ultimate stem cell — the cell from which all others derive. The first moments in the life of this remarkable cell are known as oocyte ac-

tivation. Oocyte activation includes the establishment of a network of signals that tell the oocyte that a fertilizing sperm has arrived and initiate the developmental program. But although this is a profoundly important process, activation and many of the other processes that occur during very early development are poorly understood. To address some of the many mysteries of the mammalian organism in a single cell state, we combine molecular and cellular biology with piezo-actuated micromanipulation of mouse (*Mus musculus*) gametes and embryos.

#### **Functional gametic engagement within the oocyte**

The compartment of the sperm head that lies beneath its membranes is sufficient to support full development. This compartment includes the sperm nucleus and a complex layer of surrounding proteins known as the perinuclear matrix (PNM). The other components of the sperm seem to be required to ensure its delivery to the oocyte, but if a sperm head is injected into an oocyte, these components are unnecessary. We are systematically elucidating interactions between sub-membrane sperm head components and the oocyte at fertilization, particularly during the moments soon after the sperm has entered the oocyte. What are the crucial interactions that enable the transformation from gamete to embryo? The interests of the lab center on attributing molecular identities to the proteins involved in these interactions and characterizing them functionally.

This task is conceptually trivial, but experimentally ambitious, because beneath the membrane of a sperm head reside not only multi-component macromolecular complexes of the nucleus but some 230 protein species comprising the PNM. Since it is juxtaposed to the inner leaflet of enshrouding sperm head membranes, the PNM rapidly comes into contact with the oocyte cytoplasm at fertilization and is an immediate source of paternally-contributed molecules that might modulate development. However, owing in part to its size and complexity, the excoriation and disassembly of the PNM takes hours to complete during oocyte activation. During this time, it is likely to release molecules that may be placed in one of several categories, according to whether they (1) have an immediate function in embryogenesis, (2) are stored for later use, or (3) are targeted for rapid proteolytic degradation. Each category implies an intimate series of interactions with the surrounding cytoplasm. To date, few proteins of the PNM have been described, and the function of almost none of them is known. This represents an extraordinary gap in the understanding of a conserved biological structure.

How might one describe critical gametic interactions at fertilization? Analysis of sperm-oocyte interactions at fertilization by the lab begins with sperm whose membranes have artificially been removed by mild detergent treatment. Such sperm heads can be shown electron-microscopically to resemble sperm heads that enter the oocyte, and they are subsequently exposed to standardized conditions that reproduce the reducing environment of the oocyte cytoplasm. When treated in this way, sperm proteins become solubilized — rather like they do at fertilization — and can be introduced into eggs by piezo-actuated microinjection. This allows us to probe their function. Such functional analysis is coupled to molecular analyses that span several disciplines, starting with protein purification and identification; the lab employs chromatographic and state-of-the-art 2D electrophoretic methods. Antibodies raised against recombinant versions of proteins identified in this way are used to localize the proteins before, during and after fer-

tilization. We restrict the use of frogs (*eg Xenopus*) in our work because of fundamental differences between frog and mouse fertilization. Using recombinant assays for protein-protein interactions, we are able to identify interactions even when they involve proteins that are present at low concentrations within oocytes and embryos. Collectively, these studies promise the identification of oocyte signaling pathways and processes that become operational at fertilization and establish what roles they play in subsequent development. Such roles may not be restricted to short-term development, as a growing body of evidence indicates that they have far-reaching consequences, even after the resulting adult is in old age.

#### **Hijacking oocyte machinery for transgenesis**

Studies in the lab provide an opportunity for genome manipulation, both by applying what is learned and the techniques employed to learn it. We have developed a novel method of genome manipulation known as metaphase II (mII) transgenesis. This efficient method of transgenesis works when oocytes (normally arrested at mII) are co-injected with a nucleus and transgene (tg) DNA. Typically, sperm heads are depleted of their membranes by detergent extraction prior to mixing with tg DNA and co-injection. This has several advantages over lentiviral methods of tg introduction; cloning and propagation in viral vectors is not required and the method lends itself to tgs in the megabase range, which is too large for lentiviral delivery. The lab is adapting the method to facilitate high throughput targeted knock-out and -down phenotypes. Developing these approaches is an important supplementary part of their work to facilitate the molecular dissection of sperm protein function in the context of embryos and whole animals.

#### *Research Subjects*

1. To determine interactions between gamete cytoplasm during oocyte activation.
2. To establish novel methods of genetic modulation using gametes.

#### *Staff*

##### *Team Leader*

Dr. Anthony C. F. Perry

##### *Research Scientists*

Dr. Tomoyuki FUKUI

Dr. Maki OHGISHI

Dr. Shisako SHOJI

Dr. Naoko YOSHIDA

##### *Technical Staff*

Ms. Manami AMANAI

Ms. Satoko FUJIMOTO

Ms. Yoshikazu NAKANO

##### *Assistants*

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) \*印は査読制度がある論文

Lanza R., Moore M. A., Wakayama T., Perry A. C. F., Shieh J., Hendrikx J., Leri A., Chimenti S., Monsen A., Nurzynska D., West M. D., Kajstura J., and Anversa P.: “Regeneration of the infarcted heart with stem cells derived by nuclear transplantation”, *Circ. Res.* **94**, 820–827 (2004). \*

Fujimoto S., Yoshida N., Fukui T., Amanai M., Isobe

T., Itagaki C., Izumi T., and Perry A. C. F.: “Mammalian phospholipase C $\zeta$  induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix”, *Dev. Biol.* **274**, 370–383 (2004). \*

(その他)

Perry A. C. F.: “Nuclear transfer cloning and the United Nations”, *Nat. Biotechnol.* **22**, 1506–1508 (2004).

[単行本・Proc.]

(その他)

Perry A. C. F. and Studer L.: “ES cells and nuclear transfer cloning”, *Handbook of Stem Cells Vol. 1: Embryonic Stem Cells*, edited by Lanza R., Elsevier Academic Press, USA, pp. 623–633 (2004).