

単為発生マウスの誕生

東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科教授 河野 友宏

はじめに

生物が営んでいる生殖方法は、ゲノムの混合の有無の観点からミクシスとアミクシスに分類することができる。ゲノムの混合が生じる最も典型的な生殖方法は、有性生殖において卵子と精子が受精して新しいゲノム構成を持つ新個体が生じるものである。一方、雌の生殖細胞である卵子が単独で新個体を形成する単為生殖は、アミクシスに分類されるが、やはり有性生殖に含まれる。単為発生（生殖）とは、Parthenogenesis はギリシャ語の parthenos「処女」を意味する言葉からつくられたもので、処女生殖とも呼ばれる。本来の意味は、雌が雄との関係を持たずに新個体を生ずることで、卵子が単独で個体発生を遂げることで理解することができる。当然、有性生殖の一つの生殖方法と位置づけられ、生物界では広く採用されている生殖方法といえる。しかしなが

ら、哺乳類は、単為生殖を生殖戦略として完全に放棄している。

哺乳類における単為発生の研究は、1930年代からすでに行われている。哺乳類は一般的に単為発生により個体形成を完成することはできないが、単に自発的に減数分裂を再開して前核形成あるいは数回の細胞分裂する現象は、多くの動物種で観察されている。また、人為的な卵活性化刺激により減数分裂を再開させる試みはウサギ卵子で行われ、電気刺激により発生させたウサギ単為発生胚から個体を誕生させることに成功したと報告がなされたが、追試に失敗したことから完全に否定された。その後のマウス研究では、単為発生胚が着床して発生を継続することは難しいとされていたが、1973年に Witkowska により、マウス単為発生胚が妊娠10日まで生存することが初めて明らかにされた。1983年 Surani らは、センダイウイルスによる細胞融合

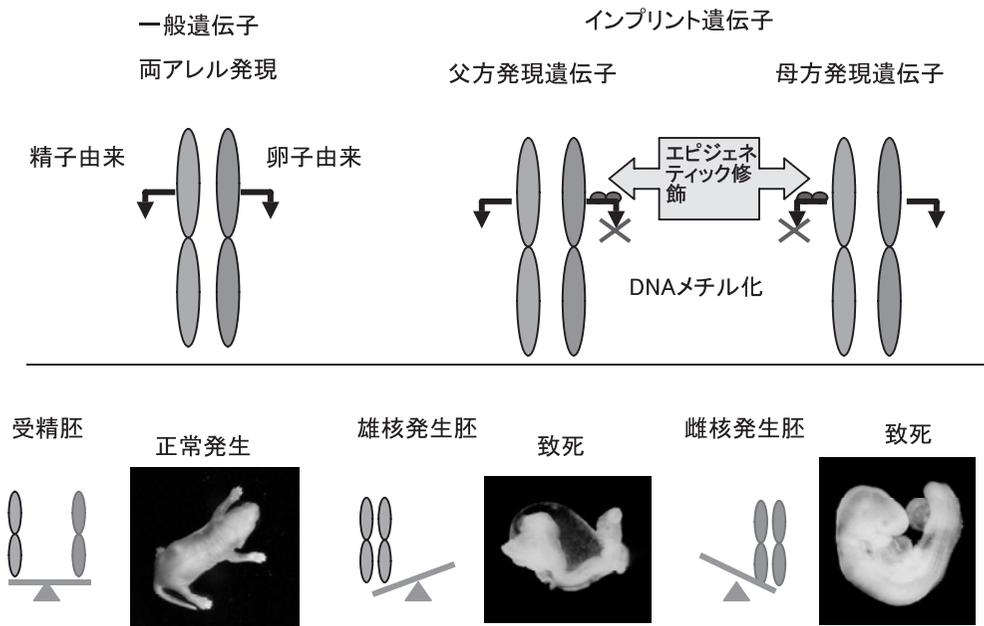


図1 インプリント機構による単為発生の阻止

法を用いた再現性の高い核移植法を開発し、前核置換により雌核発生胚および雄核発生胚を作成して、実験発生学的に両者の発生能を詳細に検討した。その結果、いずれも妊娠10日までに致死となること、また前者では胚自身の発生が良いのに対し、後者では栄養外胚葉組織の増殖が顕著であることが確認され、雌雄ゲノム間の機能に差異のあることが強く示唆された(図1)。この時点で、ようやく哺乳類における単為発生の可能性が実験発生学的に否定されたわけである。同時に、雌雄ゲノムの不等化性を生み出しているゲノムインプリンティング(遺伝子刷り込み)(図1)の概念が強く印象づけられることになった。また同時に、哺乳類における単為発生の阻止機構は、後成的な遺伝子修飾機構(エピジェネシス)であるゲノムインプリンティングに起因することが明らかとなってきた。

ゲノムインプリンティング

哺乳類の個体発生には、精子および卵子に由来する両ゲノムの寄与が不可欠であると結論づけられたが、この現象は哺乳類がゲノムインプリンティング機構を獲得した結果と理解できる。大多数の遺伝子は、精子および卵子に由来する染色体から等しく(biallelic)発現している。ところが、一部の遺伝子はアレルの由来する親の性(父母/精子卵子)に特異的な片親性(monoallelic)遺伝子発現を示す。この遺伝子発現の制御は、ゲノムインプリンティングにより制御されている。それら片親性発現を示す遺伝子はインプリント遺伝子と呼ばれ、現在までに80を超える遺伝子が報告されている。したがって、哺乳類において、単為発生胚が個体にまで発生しない理由は、次のように説明される。雌ゲノムのみから構成される単為発生胚では、母親アレル発現をするインプリント遺伝子が過剰に発現し、一方父親アレル発現をするインプリント遺伝子が発現停止となっているために、正

常な個体発生を遂げることができない。

片親性の遺伝子発現を調節する仕組みは、インプリント遺伝子の発現調節領域におけるCpG配列のシトシン残基に対して行われるメチル基の付加であることが明らかにされている。この雌雄アレル間でメチル化状態の異なる高密度CpG領域はDMR(differentially methylated region)と呼ばれ、一般的にプロモーターおよびエクソン/イントロン内に存在する。また、この性特異的な遺伝子修飾は、雌雄ゲノムが独立して存在する生殖細胞形成過程で行われる。

インプリント遺伝子のすべてが検証されているわけではないが、それらのインプリント遺伝子がメチル化を受ける性を雌雄間で比較すると、圧倒的に多数が雌側、すなわち卵母細胞形成過程で修飾を受けていることが、DMRメチル化解析や胎仔をつかった遺伝子発現解析の結果からわかってきた。これまでに、確実に精子形成過程で発現制御される遺伝子は、5遺伝子に過ぎない。すなわち、7番染色体にあるIgf2およびH19遺伝子と12番染色体に存在するDlk1およびGtl2遺伝子、ならびに9番染色体に位置するRas-grfl遺伝子である。

インプリンティング改変卵子の作出

新生仔の非成長期卵母細胞(ng卵子)および成熟個体に由来する卵核胞期卵(fg卵子)は、い

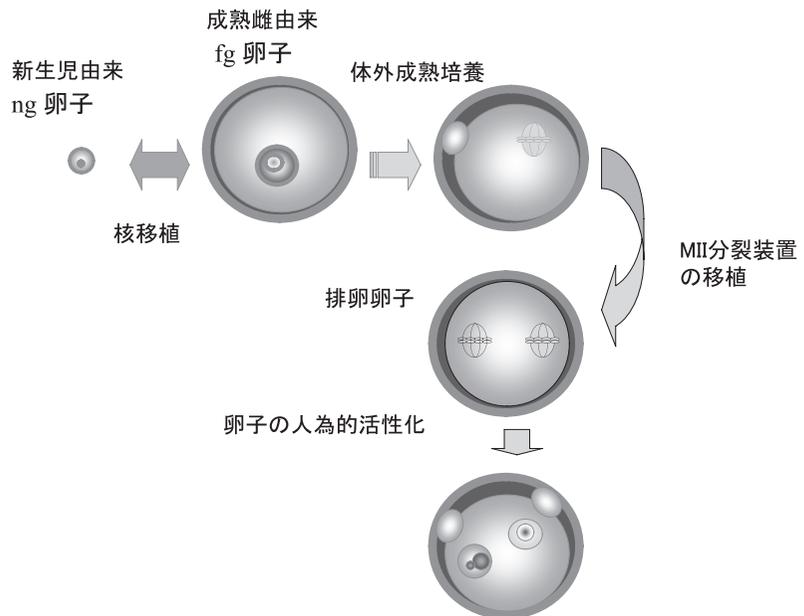


図2 核移植によるng/fg単為発生胚の構築

れも第一減数分裂前期の diplotene 期で細胞周期を停止している。本来、減数分裂を再開するためには卵子成長期を経る必要があるのだが、十分に成長した卵母細胞の細胞質を一時的に借りることにより、ng 卵子でも減数分裂を再開し、半数体ゲノムを構築することができる。この様なトリックは、核移植技術を駆使することにより可能となるが、キアズマが形成されていない時期の卵子では、たとえ成長した卵母細胞の細胞質を借りたとしても、半数体ゲノムの構築は不可能である。そのため、実際に半数体卵子が構築できるのは、マウスでは胎生 18 日以降の卵母細胞に限られる。具体的な卵子構築方法を図 2 に示した。ng 卵子 (約 15 μ m) は新生子雌マウスから、また GV 期卵 (約 75 μ m) は性腺刺激ホルモン投与 42-46 時間後に成熟雌マウスから、それぞれ回収する。GV 期卵は透明帯の切断および除核を行いレシピエント卵とする。次いで、レシピエント卵の囲卵腔内に ng 卵子をセンダイウイルス (HVJ) とともに注入し融合させ、14 時間の体外成熟培養を行う。この間に、操作卵は核膜の崩壊、分裂装置の形成、減数分裂そして第一極体の放出と、GV 期卵を成熟培養した場合とほぼ同じスケジュールで第二減数分裂中期 (M II 期) へと移行する。ついで、形成された構築卵子の MII 染色体を排卵卵子に移植する。活性化処理 (10mM SrCl₂ を含む M 2 培地で 2 ~ 4 時間培養) 後、2 つの第二極体および 2 つの雌性前核が形成され、ng 卵子と fg 卵子の半数体ゲノムを持つ胚 (ng/fg 胚) が完成する。

インプリンティング改変卵子の発生能

上述の実験系により、初めて卵母細胞の成長過程で行われるゲノムインプリンティングの発生における役割を直接解析できるようになった。まず、成熟卵子由来の半数体ゲノムと非成長期卵母細胞由来の半数体ゲノムを持つ 2 倍体 ng/fg 胚を構築してその発生を調べたところ、驚くべき結果が得られた。ng/fg 胚では、形態的にはほぼ受精卵由来の胎子と比べ何ら遜色のない妊娠 13.5 日目の胎仔にまで発生することが明らかとなったのである。この 4 日間の発生の延長により、胎子はド

ラマチックなまでの形態形成を遂げる。すなわち、わずかに体長 2mm 程の (25 体節) 器官形成を始めたばかりであったものが (図 1)、ほぼ成体と等しい器官を形成した体長 10mm の立派な胎仔にまで発生したのである (図 3-a)。もちろん胚外組織の発育も見事で、良く発達した胎盤が形成された。

この事実から、新生仔の卵母細胞ではゲノムインプリンティングがほとんどあるいは全く行われておらず、その半数体ゲノムに由来するインプリント遺伝子の発現が雄パターンに改変されたことにより、単為発生胚の発生延長が生じたと推察された。事実、発生延長を遂げた ng/fg 胎仔におけるインプリント遺伝子発現解析を行った結果、上記の推察が正しいことが証明された。すなわち、本来雌アレルから発現しない父方発現インプリント遺伝子の発現および母方発現をする遺伝子の発現抑制が確認された。しかしながら、雄生殖系列で発現制御される Igf2 および H19 遺伝子の発現には変更が認められなかった。父方発現する Igf2 遺伝子の発現は生ぜず、一方母方発現する H19 遺伝子の発現は両アレル発現であることが確認されたのである。

H19 遺伝子 KO マウスを用いた単為発生胚の発生延長

さらに、単為発生胚の発生延長を目論んで、父方インプリント制御され雌核単為発生胚では両アレル発現となる H19 遺伝子に注目し、この遺伝子の転写領域とその転写調節領域を欠損したマウス (H19

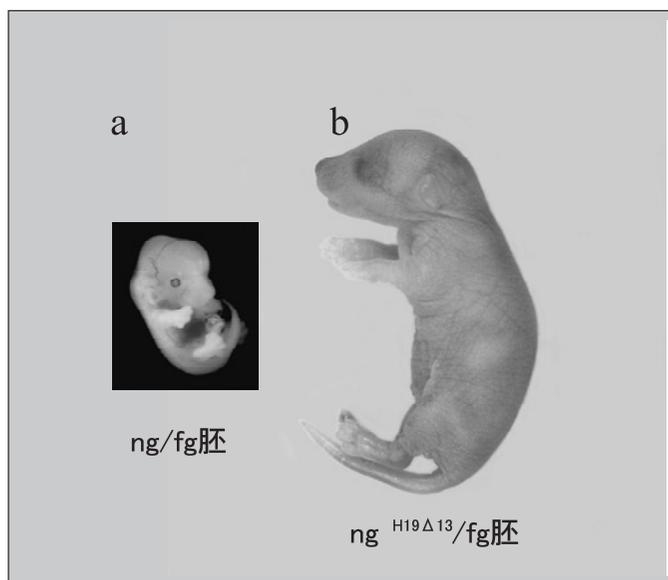


図 3 単為発生胚の発生延長

$\Delta 13$) が活用された。このマウスでは、当然母方(卵子) アレルからの H19 遺伝子の発現は認められないことに加え、父方発現を示す *Igf2* 遺伝子の活性化が認められ、あたかも精子由来のアレルと同じ両遺伝子の発現パターンとなっている。したがって、このホモ型変異マウスおよびこの変異を母方から伝えた場合には、胎仔の成長が有意に増大する。

この H19 Δ 13 マウス新生仔の卵母細胞と成熟野生型マウスの排卵卵子ゲノムからなる雌核発生胚を図2に従って構築し、その発生能を詳細に検討した。総計 457 個の再構築卵子を培養し、91%にあたる 417 胚が胚盤胞にまで発生した。このうち、371 胚が、26 匹のレシピエントマウスの子宮に移植され、24 匹で妊娠が成立した。妊娠後期への発生を確認するために、剖検は妊娠満期の 19.5 日に行われた。その結果、8.2%にあたる 28 匹の胚が妊娠末期にまで発生していることが判明した。その内訳は、死亡胎仔 18 匹、生存胎児 10 匹であった。生存が確認された産子のうち 8 匹は、死亡胎仔の表現型とほぼ同様で、形態的には若干発生遅延が認められ、体重は野生型の 60%程に止まっていた。これらの産子は、自発性呼吸することなく、子宮から回収後 20 分以内に死亡した。ところが、驚くべきことに、残りの 2 匹は明らかに正常な形態の産仔として誕生し、自発性呼吸を開始した(図3-b)。このうち 1 匹は、“KAGUYA”と名付けられ、里親につけ保育させたところ、正常に発育して成熟個体に成長した。さらに、交配により妊娠が成立し無事正常産子を分娩したことから、“KAGUYA”が正常な繁殖能力を保有していることも証明された(図4)。また、他の 1 匹は生存可能なことを確認後、“KAGUYA”誕生の謎に迫るため遺伝子解析に供試された。

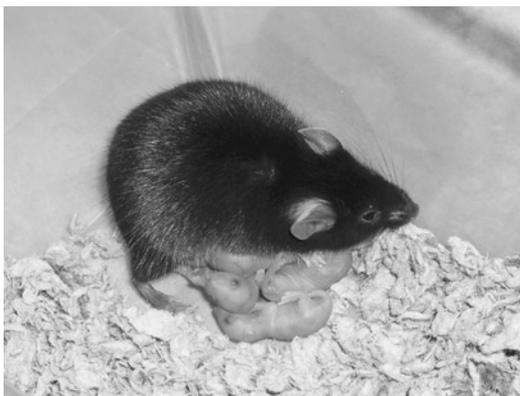


図4 産子を分娩した“KAGUYA”

以上のごとく、ゲノムインプリンティングの改変により、卵細胞に由来するゲノムのみを持つ単為発生マウスの生産に成功した。このことは、哺乳類において、ゲノムインプリンティング機構の成立により雌雄ゲノムの存在が個体発生に不可欠となったことを示す直接的かつ決定的証拠を示したといえる。

発生延長と遺伝子発現正常化

さて、当然何故“KAGUYA”が誕生したのかという疑問が生じる。この疑問に答えるため、11000 遺伝子を対象としたオリゴマイクロアレイによる遺伝子発現解析が行われた。胎齢 12.5 日の胎仔の時点で ng/fg 胚 および ng^{H19 Δ 13}/fg 胚における遺伝子発現プロファイルを比較検討した。解析結果は、1000 を超える遺伝子において発現の差異が認められ、明瞭な変化が浮き彫りとなった。すなわち、ng/fg 胚で異常な発現を示していた遺伝子の大多数において、ng^{H19 Δ 13}/fg 胚では正常発現に向かって修正されていたのである。コントロール胚における遺伝子発現に対し、有意に高発現あるいは低発現を示す遺伝子の数を比較すると明白である。ng/fg 胚では 3/4 匹の胎児において 1300 を超える遺伝子発現に異常が認められた、一方 ng^{H19 Δ 13}/fg 胚では、わずか 11 ~ 42 の遺伝子に発現異常が認められたのみである。したがって、この広範な遺伝子発現の正常化が、ng^{H19 Δ 13}/fg 胚の妊娠満期への発生延長に繋がったものと推察できる。

おわりに

ゲノムインプリントが、やはり哺乳類の雌雄ゲノムの相違を決定づけていた。その実証は、単為発生マウスの誕生というセンセーショナルな出来事として捉えられたが、背後にある哺乳類の生殖戦略発達の軌跡を考えると、やはり雌雄ゲノム間の競合が垣間見える。哺乳類の個体発生においては、雌雄ゲノムの適切な競合関係の上に個体発生がなりたっている。哺乳類が行った生殖戦略の選択は、雌雄ゲノムにそれぞれどのようなメリットをもたらしたのだろうか。哺乳類の誕生の過程や哺乳類の生態と重ね合わせて考えてみるのも興味深い。