

GFP 遺伝子を導入した栄養膜幹細胞の 自発的分化と遺伝子発現量の解析

松原 圭吾¹、竹原 俊幸²、掛川 亮²、福永 直人²、
伊藤 俊介²、大田 浩³、松本 和也¹、佐伯 和弘¹、
若山 照彦³、岸上 哲士¹、入谷 明¹、細井 美彦¹

要 旨

マウス胚盤胞期胚から栄養膜幹細胞 (trophoblast stem cells; TS 細胞) が樹立された。これらは FGF4 とマウス胎仔性線維芽細胞上清 (MEF-CM) の存在下で未分化を維持する。さらに胚体外系譜の細胞への分化能を有する細胞である。この特徴から、胎生であり詳細な研究が困難である哺乳類における胚体外組織の発生を解明する有用な材料であると考えられている。また TS 細胞は自発的分化において栄養膜巨大細胞への分化することが知られている。本実験において GFP 遺伝子を導入した TS 細胞を用いることで倍数体である栄養膜巨大細胞において GFP の蓄積量が変化すれば、形態に加えもう一つの分化の指標になるのではないかと考えられる。GFP の発現は TS 細胞と同等であるか Image J を用いて蛍光強度の解析を行った。その結果、細胞の単位面積あたりの蛍光強度においては栄養膜巨大細胞へ分化することで減少する傾向が示された。しかし、細胞全体への蓄積量においては TS 細胞と比べて栄養膜巨大細胞は約 70 倍蓄積していたことを示した。

1. 緒 論

1998 年、マウスにおいて胚盤胞期胚から樹立された栄養膜幹細胞 (trophoblast stem cells; TS 細胞) [1] は自己複製能を有しており、胚体外系譜への分化能も示されている [2, 3]。また胚盤胞期胚へ注入することで胎盤などの胚体外組織に寄与することができる。TS 細胞の未分化維持には FGF4 およびマウス胎仔性線維芽細胞から分泌される未知な因子 (MEF-CM) が必須とされている。しかし、この培養条件下においてもコロニーの端に分化した栄養膜巨大細胞が見られる。この栄養膜巨大細胞は核内で DNA の複製が続いた状態で細胞分裂が停止した細胞であり、4n 以上の核型を有する倍数体となっている。核および細胞質が巨大化した特徴的な形態を示し、母体への着床の際に重要となる細胞である。また胎盤の全領域にわたって存在するため [4]、胎盤形成にも重要であると考えられる。さらに TS 細胞は FGF4 および MEF-CM の非存在下において、栄養膜巨大細胞に自発的に分化することが報告されている [5]。TS 細胞のこのような特徴から、胎生であるため研究が困難である哺乳類における発生や着床のメカニズムの解明 [6] や、胚体外組織における遺伝子発現などのエピジェネティクスな解析を in vitro で行うための有用な材料となることが期待されている [7, 8]。

1. 近畿大学生物理工学部遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学大学院生物理工学研究科生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3

今回実験に用いた TS 細胞は、B6D2F1 雌マウスとレポーター遺伝子である GFP 遺伝子を導入した C57BL/6J 雄マウスとの交配によって得られた胚盤胞期胚から樹立されたものであり、TS 細胞においても恒常的に GFP 遺伝子は発現している。TS 細胞の分化によってこの GFP の蓄積量がどのように変化するか解析することは TS 細胞の分化の指標となるのではないかと考えられる。

ここで本実験において TS 細胞から自発的に分化した栄養膜巨大細胞に対して、Image J を用いて蛍光強度を解析することで、TS 細胞と栄養膜巨大細胞の GFP 蛍光強度を比較した。

2. 材料と方法

・TS 細胞の培養

コンフルエントな TS 細胞に対してトリプシン-EDTA を用いて単一細胞まで解離し、蛍光顕微鏡下で GFP 陽性細胞のみを数えた。マイトマイシン C 処理したマウス胎仔性線維芽細胞上へ細胞数 $0.1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ となるように播種した後、FGF4 25ng/ml、Heparin $10 \mu\text{g/ml}$ を添加した TS 細胞培地で培養を行った。TS 細胞培地は RPMI1640 [GIBCO] に対し、Fetal Bovine Serum [SIGMA, 44k3398] 100ml、L-Glutamin 溶液 6.25ml、Sodium Pyruvate 100mM [GIBCO] 5ml、2-Mercaptoethanol [GIBCO] $910 \mu\text{l}$ を加え、RPMI1640 で 500ml まで Fill-up した後に、フィルター滅菌し、 4°C で保存した。L-Glutamine 水溶液は超純水 100ml に対し、L-Glutamine [SIGMA] 2.292 g 加え、溶解した後 15ml のコニカルチューブに 6ml 分注し、 -20°C で保存した。

・TS 細胞の自発的分化の誘起

TS 細胞に対してトリプシン-EDTA を用いて単一細胞まで解離し、蛍光顕微鏡下で GFP 陽性細胞のみを数えた。ゼラチンコート処理を行った細胞培養ディッシュへ細胞数 0.1×10^4 個/ cm^2 となるように播種し、分化誘導用培地で培養を行った。分化誘導用培地は 10%FBS [Fetal Bovine Serum, HyClone, KPK22095] 添加 DMEM に PENICILLIN-STREPTOMYCIN [SIGMA, P4333] を 100 倍希釈になるように添加して用いた。DMEM は、超純水 1000ml に対し Dulbecco's modified Eagle's medium [Nissui, 05919] 9.5g を加えスターラーで 30 分間攪拌し、オートクレーブをかけた後、10% 炭酸水素ナトリウム水溶液 12ml、L-Glutamin [Sigma, 25030-081] 0.584g 加えたものをフィルター滅菌し、 4°C で保存した。10% 炭酸水素ナトリウム水溶液は、超純水 100ml に対し、炭酸水素ナトリウム [Wako, 191-01305] 10g 加えてオートクレーブし、 4°C で保存した。

・DAPI 染色および GFP の発現確認

培養 4 日目の細胞に対して、ディッシュ内の培養液を捨て、4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 [Wako, 163-20145] で 4°C 、30 分間処理することにより固定処理とした。固定処理後 1000 倍希釈した DAPI stock 溶液を加え、室温で 20 分間処理した。これ以降は遮光して行った。60 分後、PBS (-) で室温、5 分、2 回洗浄し、3 回目の洗浄は DW で室温、5 分洗浄した。洗浄後、蛍光顕微鏡下で観察を行った。また DAPI stock 溶液は 4', 6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochloride n-Hydrate [Wako, 049-18801] を PBS (-) で希釈し、1mg/ml に調製した。また未分化な TS 細胞を単一細胞の状態では GFP の発現を確認するために、トリプシン-EDTA を用いて単一細胞まで解離した後に、FGF4、Heparin の存在下で 3 時間培養を行った。その後同条件で固定を行い蛍光顕微鏡下で観察を行った。

3. 結 果

自発的分化を誘起した結果、核および細胞質が巨大化した栄養膜巨大細胞への分化が確認された。また栄養膜巨大細胞を蛍光顕微鏡下で観察すると、GFP 蛍光が核の周辺に局在していることが確認された(図 1)。

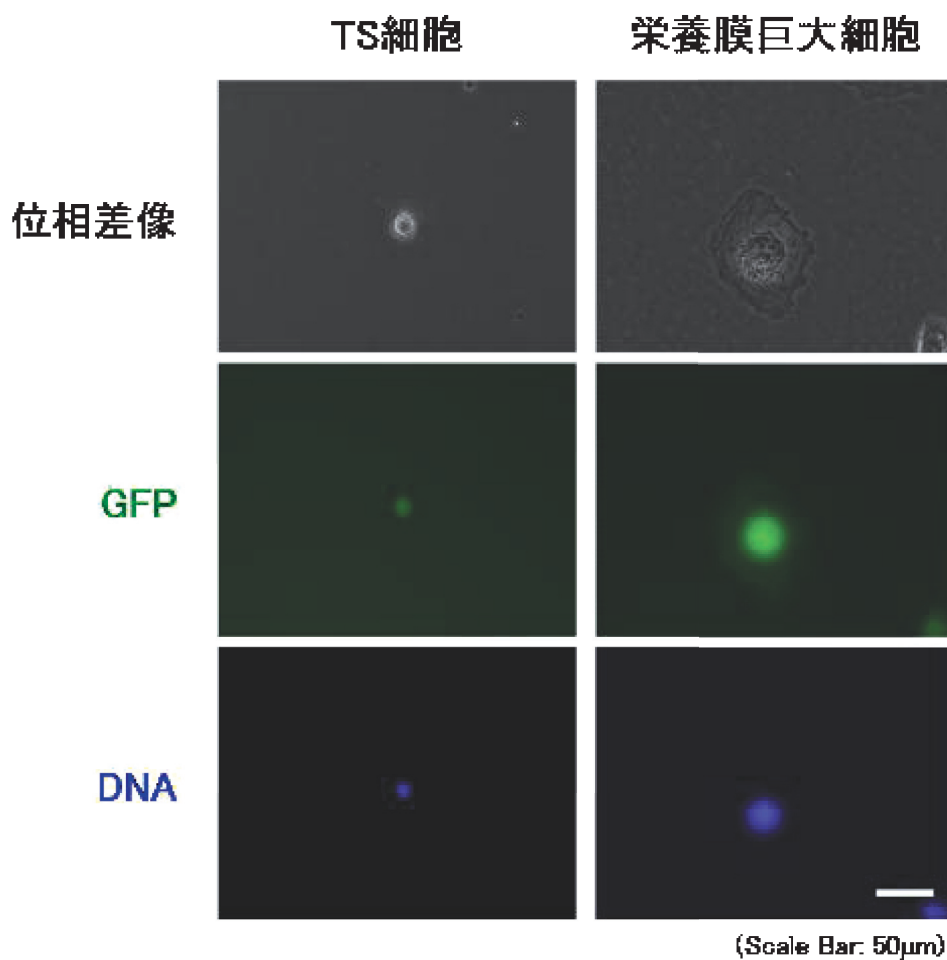


図 1. in vitro における TS 細胞の自発的分化

これらの細胞から Image J を用いて細胞全域における GFP の発現量の解析を行った(図 2)。測定の結果、TS 細胞と栄養膜巨大細胞の細胞全域における GFP 蛍光強度を比較すると、TS 細胞が栄養膜巨大細胞へ分化することで GFP 蛍光強度が低下する傾向にあることが示された。しかし、各細胞あたりの GFP 蛍光強度の総量を見ても TS 細胞と比較して栄養膜巨大細胞において優位に高いことが示された。

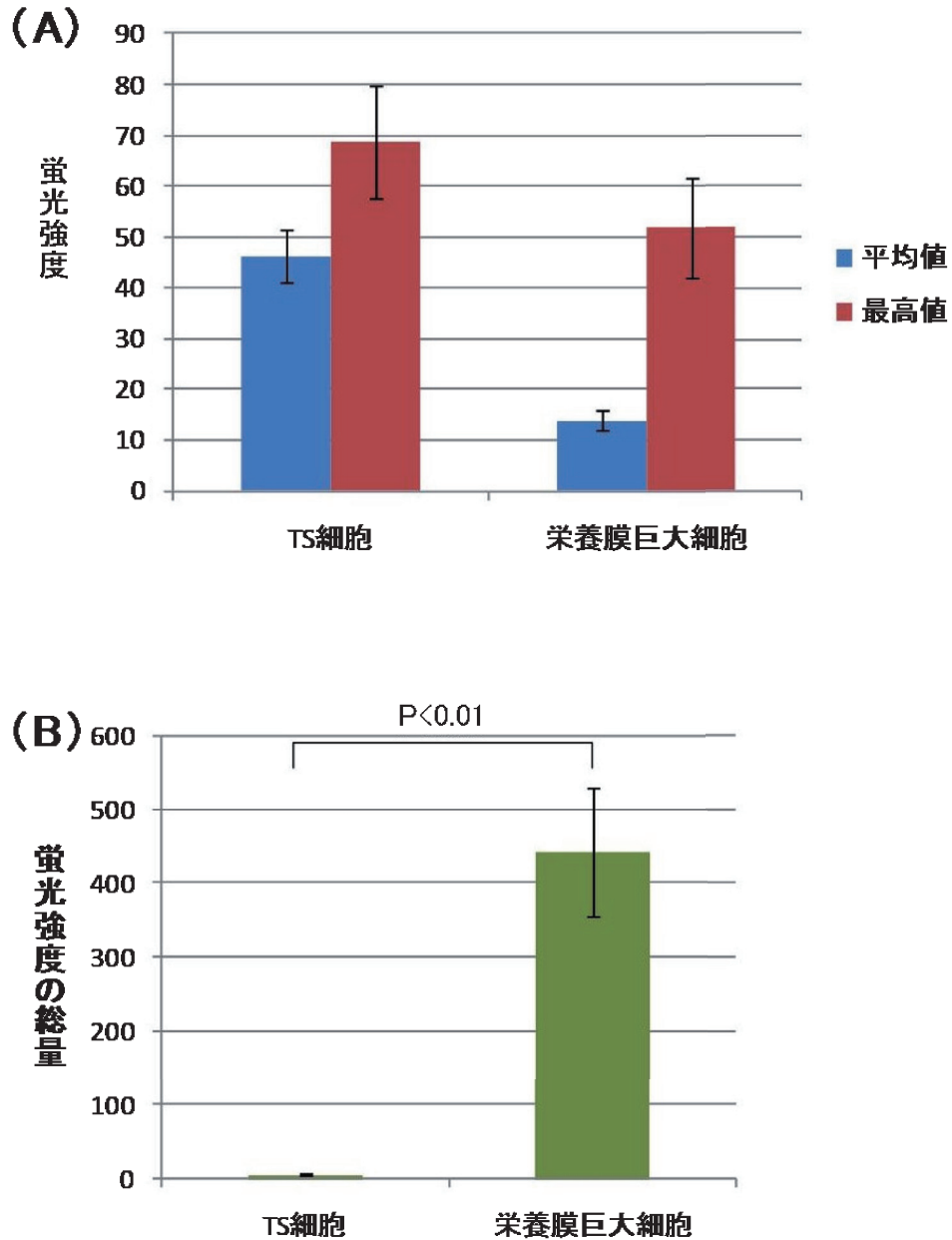


図2. GFPの蛍光強度による比較
 (A) TS細胞および栄養膜巨大細胞におけるGFP蛍光強度の平均値と最高値
 (B) 各細胞におけるGFP蛍光強度の総量

4. 考 察

TS細胞を未分化維持に必須とされているFGF4とマウス胎仔性線維芽細胞の非存在下で培養を行うことで核および細胞質が巨大化した明らかな形態を示す栄養膜巨大細胞へと分化することが示された。このin vitroにおける栄養膜巨大細胞への分化は過去の報告と同様であると思われる。また蛍光顕微鏡下で観察を行うことによって栄養膜巨大細胞におけるGFPが核周辺に局在して蓄積していることが明らかとなった。

またこの局在した蓄積から栄養膜巨大細胞の巨大化した細胞質の末端部分は着床などのために特殊化した細胞質になるのではないかと考えられる。これらの蛍光強度を Image J を用いて測定を行った結果、平均値、最高値ともに TS 細胞に高く、栄養膜巨大細胞へ分化することで減少する傾向にあることが示された。しかし GFP 蛍光強度の総量を比較すると、栄養膜巨大細胞では TS 細胞の約 70 倍となることが示された。このことは TS 細胞が栄養膜巨大細胞へ分化することで細胞分裂が停止するが、転写・翻訳が続くために GFP が蓄積し、一つの細胞あたりの蛍光強度の総量が高くなると考えられる。これらのことより、GFP の蛍光強度および蓄積量を測定することは TS 細胞から栄養膜巨大細胞への分化の指標の一つとなり得るのではないかと考えられる。

参考文献

1. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J. (1998) Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*. 282 (5396):2072-5.
2. Yan J, Tanaka S, Oda M, Makino T, Ohgane J, Shiota K. (2001) Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast stem cells to a giant cell fate. *Dev Biol*. 235 (2) :422-32.
3. Tremblay GB, Kunath T, Bergeron D, Lapointe L, Champigny C, Bader JA, Rossant J, Giguère V. (2001) Diethylstilbestrol regulates trophoblast stem cell differentiation as a ligand of orphan nuclear receptor ERR beta. *Genes Dev*. 15 (7) :833-8.
4. Simmons DG, Fortier AL, Cross JC. Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. (2007) *Dev Biol*. 304 (2) :567-78.
5. Hughes M, Dobric N, Scott IC, Su L, Starovic M, St-Pierre B, Egan SE, Kingdom JC, Cross JC. (2004) The Hand1, Stra13 and Gcm1 transcription factors override FGF signaling to promote terminal differentiation of trophoblast stem cells. *Dev Biol*. 271 (1) :26-37.
6. Hemberger M, Hughes M, Cross JC. (2004) Trophoblast stem cells differentiate in vitro into invasive trophoblast giant cells. *Dev Biol*. 271 (2) :362-71.
7. Kunath T, Arnaud D, Uy GD, Okamoto I, Chureau C, Yamanaka Y, Heard E, Gardner RL, Avner P, Rossant J. (2005) Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development*. 132 (7) :1649-61.
8. Hattori N, Imao Y, Nishino K, Hattori N, Ohgane J, Yagi S, Tanaka S, Shiota K. (2007) Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. *Genes Cells*. 12 (3) :387-96.

英文要旨

Spontaneously differentiation and gene expression analysis
of trophoblast stem cells that introduces GFP gene.

Keigo Matsubara¹, Toshiyuki Takehara², Ryo Kakegawa², Naoto Fukunaga²,
Shunsuke Ito², Hiroshi Ohta³, Kazuya Matsumoto¹, Kazuhiro Saeki¹,
Teruhiko Wakayama³, Satoshi Kishigami¹, Akira Iritani¹ and Yoshihiko Hosoi¹

Abstract

Trophoblast stem (TS) cells are established from the blastocyst of the mouse. It maintains an undifferentiated state of fibroblast growth factor (FGF) 4 and mouse embryonic fibroblast conditioned medium (MEF-CM). Moreover, it is possible to differentiate to the trophoblast cell lineage. In this respect, it is thought to be a useful material that reveals the generation of the trophoblast cell lineage in the mammal that it is viviparity and detailed investigation is difficult. Moreover, TS cells spontaneously differentiate into trophoblast giant cells. In this study, it is believed to become the index of another differentiation in addition to the form if the accumulative amount of GFP changes in trophoblast giant cells that is the polyploid by using TS cells that introduce the GFP gene used. Then, the fluorescent intensity was analyzed by using Image J whether the expression of GFP in trophoblast giant cells was equal to TS cells. As a result, the tendency to decrease because it differentiated into trophoblast giant cells was shown in the fluorescent intensity for each unit area of the cell. However, trophoblast giant cells showed that about 70 times had accumulated to the entire cell compared with TS cells.

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan.

2. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan.

3. Center for Developmental Biology RIKEN Kobe, 650-0047, Japan.

マウス卵子活性化における EGTA の影響

辻本 賀子¹、岸上 哲士²、竹原 俊幸¹、安齋 政幸³、
松本 和也²、佐伯 和弘²、入谷 明¹、細井 美彦²

要 旨

人工的な卵子活性化法は、体細胞核移植や精子細胞を用いた産仔の作出に不可欠な技術である^[3]。Sr²⁺を含んだ培養液は、受精の事象に似た反復的な細胞質内 Ca²⁺ オシレーションを導き、マウス卵子における人工的な卵子活性化剤として広く使用されてきた。しかし、その Sr²⁺ が引き起こす卵子活性化は、Ca²⁺ を除いた培養液 (Ca (-) 培養液) で行われることが必要である。しかし、Ca (-) 培養液を用いた場合、活性化に伴う形態異常や卵子の退行が起こるといった報告もなされている。

近年の研究から、金属イオンキレート剤であるグリコールエーテルジアミン四酢酸 (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid ; EGTA^[9]) を添加することにより、一般的な Ca²⁺ 含有培養液 (Ca (+) 培養液) においても、BDF1 系統のマウスで効率的に活性化卵を作製できることや退行卵の頻度が低いことが明らかにされた。さらにこの活性化方法を用いたクローン胚の作出も報告されている^[1]。しかし、BDF1 系統マウス以外のマウス卵子での有用性は検証されておらず、また EGTA の添加の影響の詳細についても不明である。

そこで本研究では、ICR 系統マウス由来卵子を用いて、EGTA を添加した Ca (+) と Ca (-) 培養液によって活性化を行い、活性化後の卵子の状態について比較・検討を行った。

緒 言

通常、哺乳類における受精後の卵子では、Ca²⁺ 濃度の一過性上昇の波 (Ca²⁺ オシレーション) が連続して起こることが知られている^[2]。これは、M 期促進因子 (MPF) の活性を低下させ、第二減数分裂中期で停止している卵子の減数分裂を再開させる。この一連の事象は、卵子の発生のためには不可欠である。人工的な卵子活性化とは、自発的にこれらの事象が起こらない卵子において、受精と類似した事象を誘起するための刺激を引き起こすことであり、近年の生殖補助技術において重要な役割をもっている。これまでに、人工的な卵子活性化剤としては、エタノール、電気的刺激やカルシウムイオノフォア等を用いた多くの人工的活性化方法が利用されてきた^[4]。しかし、その大部分では、Ca²⁺ の単調な増加が引き起こされたのみであった。一方、Sr²⁺ を含んだ培地では、受精の事象に似た、反復的な細胞質内 Ca²⁺ オシレーションを導くことが判明し、Sr²⁺ による活性化方法は、たとえ、精子によって引き起こされる受精後の事象を完全に模倣していないとしても、通常受精の後におこるものと類似していると仮定されている。現在では、特にマウスにおいて、Sr²⁺ を含む卵子活性化が広く用いられており、近年の研究では、Sr²⁺ が誘導する卵子活性化がマウス以外の哺乳類卵子において適用できることもまた、明らかにされている^[5, 6, 7]。

人工的に卵子を活性化するという過程は、特に核移植において、その後の発生に重要な役割を担っている。そのため、その活性化方法は現在でも様々な改良が成されている。

この Sr²⁺ による効率的な卵子活性化には、Ca²⁺ (-) 培養液が必要である。しかし、Ca²⁺ (-) 培養液を用いた場合、活性化に伴い形態異常や卵子の退行が起こることが報告されており、またその一方で、

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学生物理工学部遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 近畿大学先端技術研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

Ca²⁺ (+) 培養液を用いた活性化では、培地における Ca²⁺ の量に依存し、Ca²⁺ によって Sr²⁺ が引き起こす卵子活性化の阻害がおこることも同様に報告されている^[8]。

この Ca²⁺ 存在下における Sr²⁺ の卵子活性化作用の阻害は、カルシウムキレート剤の添加によって抑制できることが、近年報告されている。金属イオンキレート剤である EGTA は、Sr²⁺ よりも Ca²⁺ に優先的に結合するという性質をもつ。

この EGTA を用いて活性化を行った場合、EGTA の Ca²⁺ キレート作用によって、Ca²⁺ の存在下においても、Sr²⁺ によって効率的に卵子活性化を行えることが明らかになっている。

しかし、現在までに BDF1 系統マウス以外の卵子活性化における EGTA 添加の影響は確認されていない。そこで本研究では、BDF1 以外のマウス系統 (ICR 系統) 卵子を用いて、EGTA 添加が卵子活性化率、またその後の胚発生率に与える影響を検討した。

材料と方法

活性化培溶液の調整

事前に、通常の培溶液 (mKSOM、M16、mCZB) と Ca²⁺ を除いたそれぞれの培養液 (mKSOM、M16、mCZB) を作成し、BSA を適正量加える。また、100mM SrCl₂ ストック溶液、0.5M EGTA ストック溶液を作成。すべて 4℃ 保存。

活性化当日、それぞれの試薬を調整。

活性化用培養液の調整は各培養液 200 μL に SrCl₂ ストック溶液を最終濃度 5mM になるように加え、そこに 2mM EGTA を加える。

卵子の活性化

出生から 8 ~ 12 週齢の ICR 系統成熟雌マウスに血清性性腺刺激ホルモン (PMSG) を 7.5IU 腹腔注射、その 48 時間後にヒト胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG) を 7.5IU、PMSG と同様に腹腔に注射し、過排卵を誘起した。hCG の投与から 15 時間後に開腹し、卵管膨大部より COC (cumulus-oocyte-complex; 卵子卵丘細胞複合体) を摘出し、300IU のヒアルロニダーゼ (nakalai tesque) で裸化をおこない、卵子のみを回収した。それを Ca²⁺ (+) 培養液 (mKSOM, M16, mCZB) に移し、卵丘細胞、および持込みのヒアルロニダーゼを除去した。

回収した未受精卵は、Mineral Oil (Sigma) で覆った Ca²⁺ (+) 培養液の液滴に入れ、実験を供するまで 37℃、5% CO₂、5% O₂ に設定されたインキュベーター内で培養した。

卵子を平衡させた後、Ca²⁺ (+) の培養用培地から、Sr²⁺ を含む活性化用培地へと移動した。これらの卵子は 5mM ストロンチウム、5 μg/ml サイトカラシン B を含む mKSOM 培養液内で、37℃、5% CO₂、5% O₂ で 6h 培養することで単為発生的活性化を誘起した。単為発生の活性化は、Ca²⁺ (-) 培養液あるいは EGTA が入っている Ca²⁺ (+) 培養液など、いづれにしても SrCl₂ によって誘起される。そして卵子活性化 6h 後、マイクロマニピュレーターを使って観察し、以下の項目に従って分類した。

胚の発生能の確認

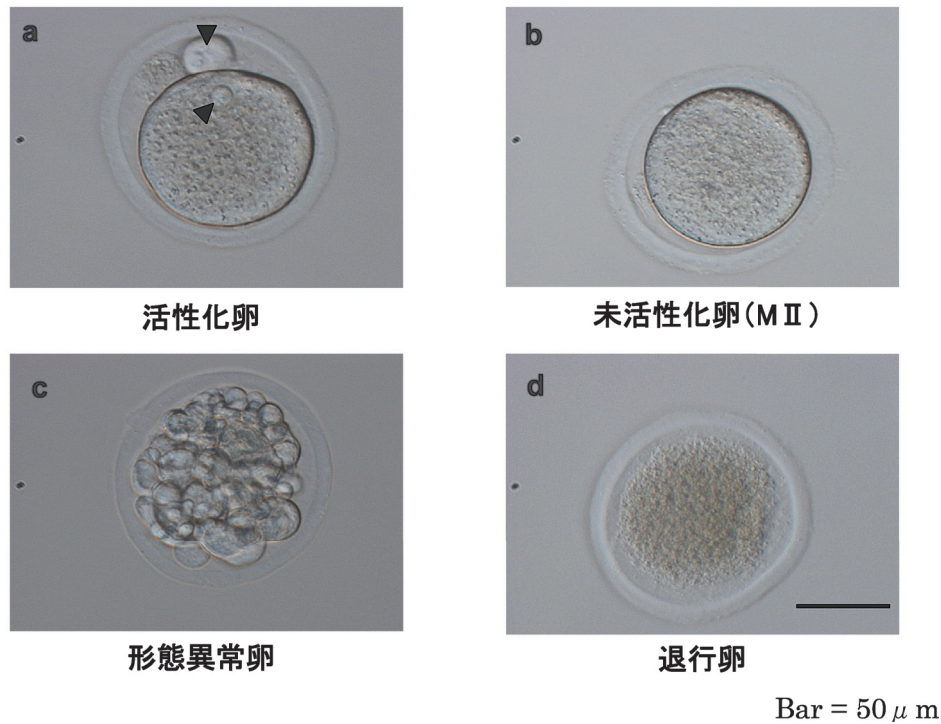
サイトカラシン B (SIGMA) を 0.5mg/ml になるように、dimethyl sulfoxide hybriMAX (以後、DMSO: SIGMA) に溶かし、これをストック液として -20℃ で保存した。このストック溶液を 5 μg/ml になるように活性化用培養液に添加し、活性化を行った。活性化反応後、実体顕微鏡下で 2 つの雌性前核を有する胚のみを選別し、0.3%BSA を添加した mKSOM 内で培養した。

活性化後の卵子の分類

活性化後 6 時間の卵子における分類は、次のように定めた。(図 1)

1) 活性化卵子は、1つの前核と1つの第二極体を放出しているもの(図 1-a)。2) 未活性化卵子は第二減数分裂中期(M II期)で停止したままの卵子(図 1-b)。3) 細胞質の断片化が起こっているもの(図 1-c)。4) 退行卵子(図 1-d)。本研究では、3)、4)をまとめて形態異常卵子としている。

図 1. 活性化後の卵子の形態

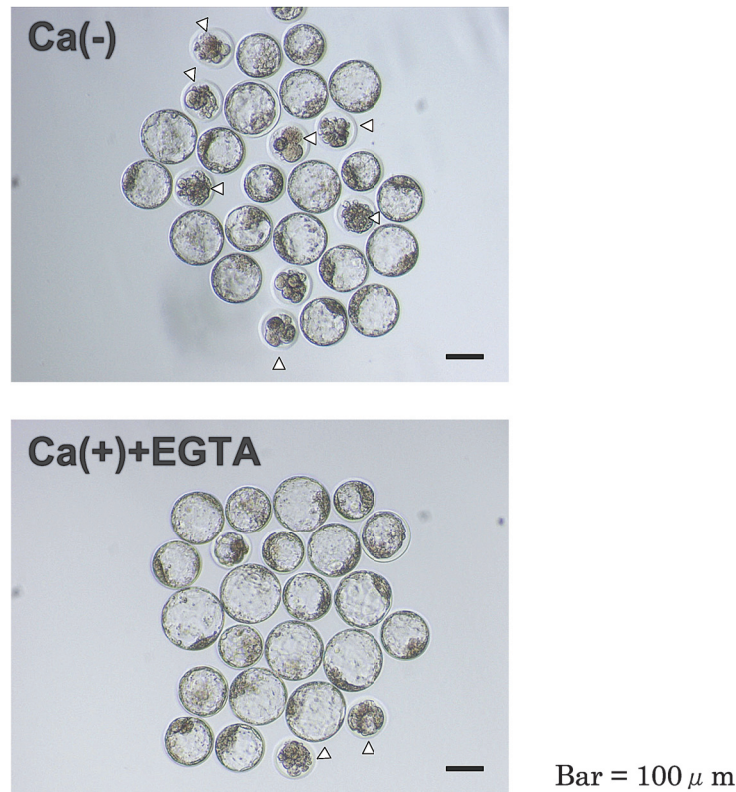


その比率は、 Sr^{2+} 処理された卵子の総数から算出した。それぞれの実験区分によって 3 回以上の試行を繰り返しおこなった。

結果と考察

最初に、サイトカラシン B を添加した活性化用培養液において活性化をおこない、活性化後の発生の観察を行った。サイトカラシン B は、第二極体放出を妨げる。そのため卵子細胞質内部に偽前核形成がおこり、結果として二倍体単為発生胚となる。まず、定法を用いた場合の胚盤胞期胚までの発生確認を行った。しかし、胚盤胞期胚までの発生率は非常に低率であった。これは、ICR 系統マウス由来卵子特有の 2 細胞期における発生停止に起因すると考えられる。そのため、活性化後の発生能を正確に比較するため、BDF1 の卵子を用いて胚盤胞期までの発生を確認した(図 2)。

図 2. 胚盤胞期までの発生



本実験では、ICR 由来排卵卵子を用いて、① Ca^{2+} (-) 培養液 (通常の活性化用培養液) と、② Ca^{2+} (+) 培養液 +EGTA、③ Ca^{2+} (+) 培養液の三種類の活性化溶液 (それぞれ 5mM Sr^{2+} を含む) による卵子活性化の活性化率および、卵子形態の比較をおこなった。

表 1. Ca^{2+} (-) と Ca^{2+} (+)+EGTA の活性化率の比較

		供試卵数	活性化後の卵子 (%)*			
			活性化卵	未活性化卵	形態異常卵	退行卵
mKSOM	Ca(-)	48	35(73) ^a	4(8) ^a	7(15) ^a	2(4) ^{ab}
	Ca(+)+EGTA	58	42(74) ^a	8(13) ^a	8(13) ^a	0(0) ^a
	Ca(+)-EGTA	42	10(24) ^b	29(69) ^b	2(5) ^c	1(2) ^{ab}
M16	Ca(-)	56	45(80) ^{ac}	4(7.3) ^a	3(5.4) ^{ac}	4(7.3) ^{bc}
	Ca(+)+EGTA	61	55(90) ^{ac}	5(8) ^a	0(0) ^c	1(2) ^{ab}
	Ca(+)-EGTA	48	9(19) ^b	29(60) ^b	5(10.5) ^{ac}	5(10.5) ^{ab}
mCZB	Ca(-)	82	55(67) ^a	5(6) ^a	18(22) ^a	4(5) ^{ab}
	Ca(+)+EGTA	84	72(86) ^a	6(7) ^a	5(6) ^{ac}	1(1) ^{ab}
	Ca(+)-EGTA	80	14(16) ^{bc}	44(55) ^b	13(16) ^{ac}	9(11) ^c

*供試卵数を分母とする / 異符号間に有意差有り ($P < 0.05$)

$n \geq 3$

今回の 2mM EGTA を用いた 5mM Sr^{2+} 処理では、1% 以下の M II 卵 (未活性化卵) を残しており、これは Ca^{2+} (-) 培養液を用いた場合と同程度あるいはそれ以上であることが確認された。

また、2mM の EGTA 添加をおこなったすべての実験区において 70% 以上の活性化卵が認められた。

以上の結果により、BDF1 系統マウス由来卵子と同様に ICR 系統マウス由来卵子においても、EGTA の培養液中への添加が卵子活性化率を有意に上昇させることが明らかとなった。

参考文献

- 1 . Kishigami S and Teruhiko Wakayama T. Efficient strontium-induced activation of mouse oocytes in standard culture media by chelating calcium rol.
- 2 . Cuthbertson KS, Whittingham DG, Cobbold PH. Free Ca²⁺ increases in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature* 1981; 294: 754-757.
- 3 . Yanagimachi R. Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and applications in humans and animals. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 247-288.
- 4 . Kishikawa H, Wakayama T, Yanagimachi R. Comparison of oocyte-activating agents for mouse cloning. *Cloning* 1999; 1: 153-159.
- 5 . Tomashov-Matar R, Tchetchik D, Eldar A, Kaplan-Kraicer R, Oron Y, Shalgi R. Strontium-induced rat egg activation. *Reproduction* 2005; 130: 467-474.
- 6 . Ma SF, Liu XY, Miao DQ, Han ZB, Zhang X, Miao YL, Yanagimachi R, Tan JH. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium chloride: a search for the best conditions. *Theriogenology* 2005; 64: 1142-1157.
- 7 . Marcus GJ. Activation of cumulus-free mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 159-162
- 8 . Yokoyama A, Eto K, Igarashi T, Ueno K, Kitagawa H. Embryotoxic effects of EGTA-induced hypocalcemic condition on cultured rat embryos. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985; 48: 309-312
- 9 . Raz V, Fluhr R. Calcium Requirement for Ethylene-Dependent Responses. *Plant Cell* 1992; 4: 1123-1130

英文要旨

The impact of EGTA as chelating calcium on oocyte activation in mice

Yoshiko Tsujimoto¹, Satoshi Kishigami², Toshiyuki Takehara¹, Masayuki Anzai³,
Kazuya Matsumoto², Kazuhiro Saeki², Akira Iritani², and Yoshihiko Hosoi²

Now, such an activation method is essential for the current assisted reproductive technology for somatic cell nuclear transfer (SCNT) and producing offspring using spermatid. In mouse, Sr²⁺-induced oocyte activation is widely used for full term development. However, effective Sr²⁺-induced activation requires Ca²⁺-free media (Ca (-)) (Cuthbertson *et al.*, 1981). The recent study demonstrated chelating calcium in media using ethyleneglycol bis (2-aminoethylether) tetraacetic acid (EGTA) as the metal ion chelator can cause the efficient Sr²⁺-induced oocyte activation under the Ca²⁺-containing media (Ca (+)) by using B6D2F1 mice oocytes (Kishigami *et al.*, 2007). In the present study, to evaluate the effect of EGTA on efficiency of Sr²⁺-induced activation of oocyte derived from ICR were activated in three different media (mKSOM, CZB, M16) in 2 mM EGTA-included or Ca²⁺-free media.

1. Graduate School of Biology Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

2. Department of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

3. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama 642-0017, Japan