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〕。Sr^{2+} を含んだ培養液は、受精の事象に似た反復的な細胞質内 Ca^{2+} 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 Sr^{2+} が引き起こす卵子活性化は、Ca^{2+} 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う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 Ca^{2+} 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、Ca^{2+} 濃度の一過性上昇の波（Ca^{2+} 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、Ca^{2+} の単調な増加が引き起こされたのみであった。一方、Sr^{2+} を含んだ培地では、受精の事象に似た、反復的な細胞質内 Ca^{2+} オシレーションを導くことが判明し、Sr^{2+} 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、Sr^{2+} 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、Sr^{2+} 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 Sr^{2+} による効率的な卵子活性化には、Ca^{2+}（－）培養液が必要である。しかし、Ca^{2+}（－）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

Ca^{2+}（＋）培養液を用いた活性化では、培地における Ca^{2+} の量に依存し、Ca^{2+} によって Sr^{2+} 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 Ca^{2+} 存在下における Sr^{2+} 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、Sr^{2+} よりも Ca^{2+} 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 Ca^{2+} キレート作用によって、Ca^{2+} の存在下においてでも、Sr^{2+} 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 Ca^{2+} 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 $SrCl_2$ 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 $SrCl_2$ 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 Ca^{2+}（＋）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 Ca^{2+}（＋）培養液の液滴に入れ、実験を供するまで 37℃、5% CO_2、5% O_2 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、Ca^{2+}（＋）の培養用培地から、Sr^{2+} 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% CO_2、5% O_2 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、Ca^{2+}（−）培養液あるいは EGTA が入っている Ca^{2+}（＋）培養液など、いづれにしても $SrCl_2$ 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

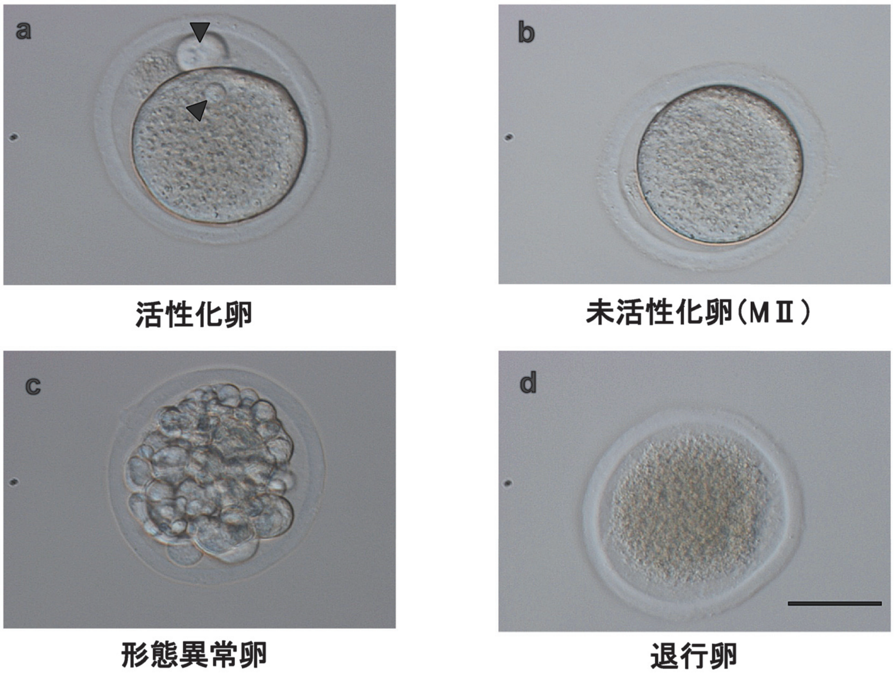
サイトカラシン B（SIGMA）を 0.5mg/ml になるように、dimethyl sulfoxide hybriMAX（以後、DMSO: SIGMA）に溶かし、これをストック液として -20℃で保存した。このストック溶液を 5 μg/ml になるように活性化用培養液に添加し、活性化を行った。活性化反応後、実体顕微鏡下で 2 つの雌性前核を有する胚のみを選別し、0.3%BSA を添加した mKSOM 内で培養した。

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(MⅡ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



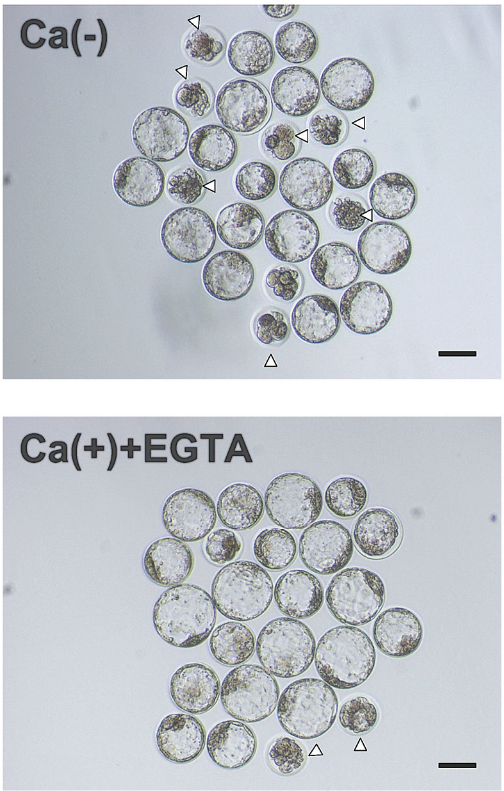
Bar = 50 μm

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



Bar = 100 μ m

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≧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 Tsujimoto [1], Satoshi Kishigami [2], Toshiyuki Takehara [1], Masayuki Anzai [3], Kazuya Matsumoto [2], Kazuhiro Saeki [2], Akira Iritani [2], and Yoshihiko Hosoi [2]

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, Sr^{2+}-induced oocyte activation is widely used for full term development. However, effective Sr^{2+}-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 Sr^{2+}-induced oocyte activation under the Ca^{2+}-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 Sr^{2+}-induced activation of oocyte derived from ICR were activated in three different media（mKSOM, CZB, M16）in 2 mM EGTA-included or Ca^{2+}-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