

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20134

研究課題名(和文) 哺乳類の初期胚発生におけるアミノ酸受容体の機能解明と卵子老化予防への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the functions of amino acid receptors in the early stage of the development of mammals, and examination of their application methods

研究代表者

西園 啓文(Nishizono, Hirofumi)

富山大学・研究推進機構 研究推進総合支援センター・助教

研究者番号：10502289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：加齢による卵子や受精卵の品質低下の予防方法は、晩婚化が進んだ現代において非常に重要な研究課題であり、2013-2014年度の若手研究B(課題番号25861479)に引き続き、そのメカニズムの解明を行った。本研究では、新たに因子の候補として見出したグリシンレセプターについて、その発生段階ごとの発現パターンを明らかにした。さらに、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集により、卵子および受精卵に発現しているグリシンレセプターのノックアウトマウスの作製に成功した。今後はこのノックアウトマウスを用いて研究を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：Methods for preventing age-related quality deterioration of oocytes and embryos are very important research subjects in modern times when late marriage and late birth has progressed. In this study, the expression pattern of the glycine receptor found as a new candidate factor was clarified at each development stage. Furthermore, we succeeded in producing glycine receptor knockout mice using genomic editing with CRISPR / Cas 9. In the future, we plan to continue research using this knockout mouse.

研究分野：生殖工学

キーワード：卵子品質 受精卵品質 卵子老化

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとした多くの哺乳類では、母親の卵巣から排卵された卵子が、卵管内で精子と受精し、受精卵(胚)となって卵管内を子宮側に移動しながら、胚盤胞期と呼ばれるステージまで卵割がすすみ、その後、子宮に着床して、新生児への発生・分化を開始する。ところが、同じ両親に由来する受精卵でも「着床前発生途中で細胞分裂が止まるもの」と「胚盤胞期に到達し着床するもの」があることは古くから知られていた。この両者の違いについて、1977年ころから卵子や受精卵にも品質(oocyte/embryo quality)が存在し、一定以上の品質を持った受精卵のみが子宮に着床することができるという仮説が提唱され、現在までに胚や核小体の形状、卵割速度、卵丘の量、透明帯の厚さ、染色体異常、ミトコンドリア活性やATP量、BMP15やG-CSF、AMH量などがその具体的な品質決定因子の一例として検討されてきた。

一方で、この卵子や受精卵の品質は、母親の加齢とともに劣化し、やがて発生能を完全に失うということが確認されており、「卵子老化(oocyte aging)」と呼ばれ、高齢女性の不妊の原因の一つとして、近年、特に注目されている。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで「受精卵の品質を決める因子は何か?」という疑問について、胚盤胞形成率の低いDBA/2マウス受精卵を「低品質受精卵のモデル」として、胚盤胞形成率の高いC57BL/6マウス受精卵を「高品質受精卵のモデル」として、キャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)を使った網羅的メタボローム解析を行い、ATPなどについては顕著な差はなかったものの、アミノ酸やサルコシンなどのアミノ酸代謝中間物質に顕著な差が見出した。

その後、機能増強試験や機能欠損試験を行い、アミノ酸受容体の一種であるグリシンレセプターを阻害させると胚発生が完全に停止すること、グリシンレセプター作動薬を低品質卵子・受精卵に作用させることで、胚発生率を向上させることができることを明らかにしてきた。またその一部を利用して、新しい受精卵発生培地の開発も行っている。

しかしながら、「何故、アミノ酸レセプターが哺乳類の胚発生に関わっているのか」の詳細なメカニズムはまだ明らかになっていない。そこで引き続き、これらの研究を行う必要があった。そこで、H27年度、H28年度は、グリシンレセプターと塩化物イオンの胚発生時における役割を明らかにし、グリシンレセプター作動薬の胚発生率改善効果の応用に繋げるために研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 卵子形成および受精卵の胚発生時に

おけるグリシンレセプターの発現プロファイルの解析

これまでにグリシンの輸送に関わるグリシントランスポーター(GlyT)が卵子や受精卵膜上に発現し、卵子や受精卵の体積維持に関わっているという報告はいくつかあるが、グリシン結合部位と塩化物イオンを透過するチャネル構造を有するグリシンレセプター(GlyR)が発現している、胚発生に何らかの役割を持っているという報告はない。

そこで、平成27年度・28年度の研究では、卵子形成時の卵巣および卵子成熟過程の卵子、排卵後から受精直前の卵子、受精直後から2細胞期~胚盤胞期胚の各発生ステージにおいて、免疫組織化学法とqPCR法を用いて、グリシンレセプターの発現量・発現部位について検討した。

(2) CRISPR/Cas9を用いた特定GlyRサブユニット欠損モデル受精卵の作製

グリシンレセプターは2つのサブユニットと、3つのサブユニットからなる5量体であり、さらにサブユニットには1~4までのサブファミリーが部位あるいは時期特異的に働いているとされる。

そこで、比較的容易に1つあるいは複数の遺伝子機能を欠損することができるゲノム編集技術、特にCRISPR/Cas9を用いることで、上記(1)で明らかにした卵子・受精卵で、初期胚発生時に発現している特定のサブユニット(あるいはそれらの組み合わせ)とサブユニットを欠損させた「特定GlyRサブユニット欠損モデル受精卵(GlyR KO受精卵)」を作製した。

具体的には、オフターゲットの少ない最適な1~4およびサブユニットのgRNAを作製し、それぞれCas9 mRNAとともにエレクトロポレーション後、偽妊娠誘導を行った仮親マウスに胚移植を行い、ノックアウトマウスを作製して、そのマウスの受精卵を実験に用いることにした。

4. 研究成果

(1) 卵子形成および受精卵の胚発生時におけるグリシンレセプターの発現プロファイルの解析

グリシンレセプターサブユニット、およびサブユニットの発現パターンをqPCR法で確認した結果、卵子および胚盤胞期までの受精卵には、1、4およびサブユニットだけが発現している、他の2および3サブユニットは発現していないことが明らかになった。なかでもサブユニットとしては、4サブユニットの発現が多く見られたため、卵子や受精卵でのグリシンレセプターの機能は、4サブユニット(1サブユニット)+サブユニットの5量体で担っている可能性が示唆される。

この結果をタンパク質レベルで確認するために、卵子で蛍光免疫組織化学染色を行っ

た結果を下記に示す。

図 1a 卵子上のグリシンレセプター サブユニット (緑色)

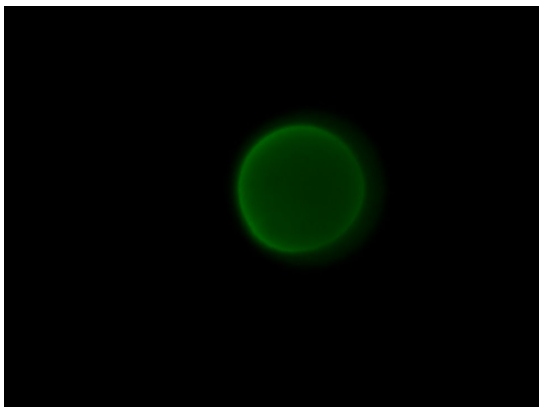
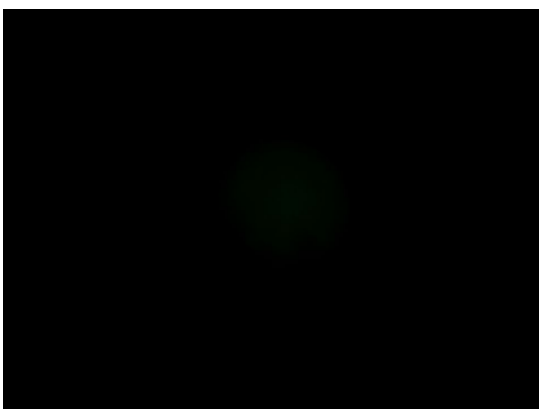


図 1b ネガティブコントロール(一次抗体なし)



この結果から、グリシンレセプターがタンパク質として膜表面に発現していることが確認される。

さらに、胚盤胞期の受精卵での結果を下記に示す。

図 2a 卵子上のグリシンレセプター サブユニット (緑色)

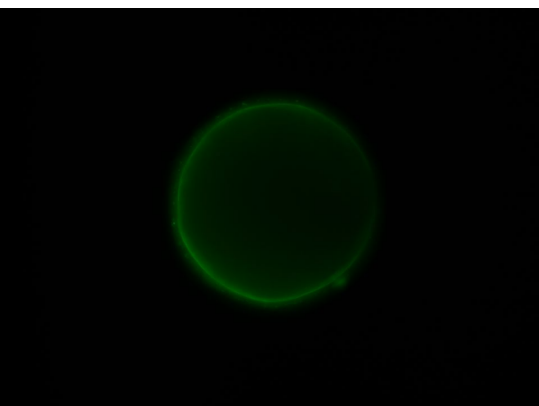
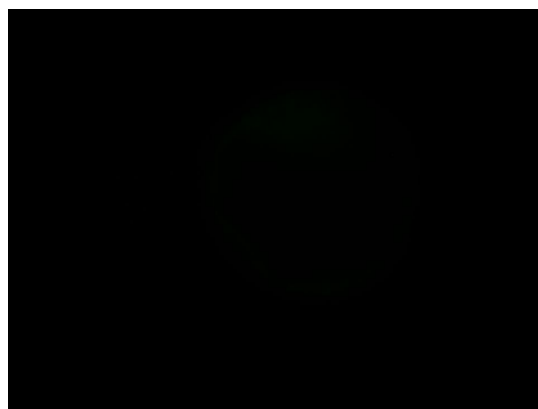


図 2b ネガティブコントロール(一次抗体なし)



胚盤胞期ではやや卵子に比べる少なくなるものの、タンパク質レベルで発現していることが、確認された。この結果は qPCR の発現パターンともほぼ一致している。

これらのことから、グリシンレセプターは卵子から胚盤胞期受精卵まで mRNA およびタンパク質として存在していて、そのサブユニットは 4 およびわずかな 1、サブユニットであることが明らかになった。4 サブユニットは近年になって、ヒトの疾患とも関わっていることが指摘されており、非常に興味深い。

(2) CRISPR/Cas9 を用いた特定 GlyR サブユニット欠損モデル受精卵の作製

次に、グリシンレセプター 4 サブユニットおよび サブユニットをターゲットにした gRNA を設計し、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集による特定 GlyR サブユニット欠損モデルマウスの作製を試みた。

平成 29 年 6 月現在までに、下表のようにノックアウトマウスを得ている。

4 サブユニット欠損マウス

- 4 匹 (homo 欠損 2 匹、hetero 欠損 2 匹)
- 欠損タイプは 2 塩基欠損、5 塩基欠損、12 塩基欠損、1 塩基欠損

サブユニット欠損マウス

- 6 匹誕生
- シークエンス解析実施中

4 サブユニット欠損マウスに関しては、F1 マウスを作製し、homo 欠損受精卵、hetero 欠損受精卵での卵子および受精卵での解析を、平成 29 年度研究で開始する予定である。また サブユニット欠損マウスについても、現在シークエンス解析中である。

これらのノックアウトマウスを交配し、グリシンレセプター非存在下での受精卵発生を確認する予定である。

またチャネルロドプシントランスジェニックマウスとの交配実験も、平成 29 年度以降の実施を予定している。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Nishizono H, Uno Kyosuke, Abe H.
Cleavage Speed and Blastomere Number in DBA/2J Compared with C57BL/6J Mouse Embryos. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, vol. 56, no. 1, pp. 11-17(7), 2017.
査読あり
<http://www.ingentaconnect.com/content/aalas/jaalas/2017/00000056/00000001/art00002>

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 西園啓文, 四ッ島賢二. 低品質胚と高品質胚のメタボローム解析による代謝中間体の解析と体外培養技術への応用. 日本繁殖生物学会 2015 年 9 月 17 - 20 日. 宮崎大学 (宮崎市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西園 啓文 (NISHIZONO, HIROFUMI)
富山大学・研究推進機構研究推進総合支援センター・助教
研究者番号 : 10502289

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()