

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15126

研究課題名(和文) 哺乳類の胚発生を開始させる新規卵活性化機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of novel oocyte activation mechanism which induce mammalian embryonic development

研究代表者

佐藤 裕公 (Satouh, Yuhkoh)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：40545571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者らが見出した精子PLCz1非依存性のマウス卵子活性化能について、その生理活性と重要性を解析した。卵内Ca²⁺濃度ライブイメージングの結果、顕微授精では生じないにも関わらず体外受精下ではPLCz1依存活性化と比べ変動発生が非常に遅く、かつ頻度が著しく少ないことを見出した。また、融合した精子数に対し変動頻度は加算的な関係を示した。さらに、断片化した細胞の注入実験と既知の可溶性因子とPLCz1の多重遺伝子欠損動物の解析から、この弱い活性化能は細胞融合の過程が必須であることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在わが国では少子化や高齢出産化という課題に面しているが、哺乳類の受精は未だ不明なことが多い。本研究では、申請者らが発見した、卵子を活性化するはずの精子PLCz1蛋白質がないときのみに見られる弱い活性化能について解析した。結果、この弱い活性化は、顕微授精のような人為的な授精法で回避される、精子と卵子の細胞融合過程を経るときのみ観察され、低い頻度ではあるが子を成せることがわかった。また、たくさんの精子の融合で活性化能が強くなった。これは、臨床研究で示唆された活性化不全患者における他精子受精ともよく一致し、多くの精子が卵に融合するより原始的な受精様式とも共通することから、進化的な関連も示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we characterized the physiological activity and the significance of sperm PLCz1-independent mouse egg activation. As a result of low-invasive live-imaging of egg calcium concentration, although it does not occur in intracytoplasmic sperm injection, it occurs under in-vitro fertilization condition, but the onsets of the calcium concentration were delayed, and the frequency of the changes were significantly reduced compared to those of PLCz1-dependent activation. On the other hand, the number of fused spermatozoa has an additive relationship to the oscillation frequencies. In addition, injection of fragmented cells and the analysis of double gene knockout mice for known candidates for the activation factors and the PLCz1, we obtained results suggesting that this weak activating ability is observed only through the cell fusion process.

研究分野：生殖生物学

キーワード：ライブイメージング 受精 初期発生 卵子活性化 カルシウム

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の受精では、半数体の卵と精子が融合することで、個体発生の起源となる2倍体の受精卵(胚)が作られる。このとき、配偶子融合と発生開始は同義ではなく、受精の刺激が正しく卵に与えられ、卵内 Ca^{2+} 濃度が大きく変化する Ca^{2+} 振動によって細胞周期が再開される必要がある。 Ca^{2+} 振動はさらに、胚の発生に有利な様々な反応(卵活性化反応)を起こすし、中でも、 Ca^{2+} 振動の波形は初期胚の発生の質に強い影響を及ぼす(図1)。

しかしながら、その重要性にも関わらず、未だに卵活性化の分子メカニズムの理解は十分でない。人為活性化法の鍵となる受精刺激の機構も、諸説のうち、 IP_3 産生酵素である PLCz1 (Phospholipase C zeta 1) が哺乳類精子の頭部に発見され、これが IP_3 を通じて Ca^{2+} 振動を誘起したことから、精子由来卵活性化因子(SOAF; sperm-borne oocyte activating factor) 説が有力となったが、他の SOAF 候補も報告されているほか、SOAF 説以外の説については検証が十分でない(図2)。

図1: 生殖医療と卵活性化。ガラス針で精子頭部だけを打ち込む ICSI 法が主流である。

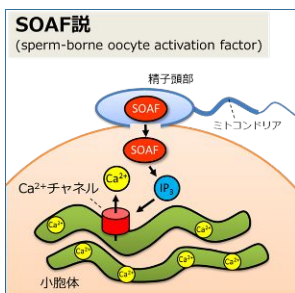
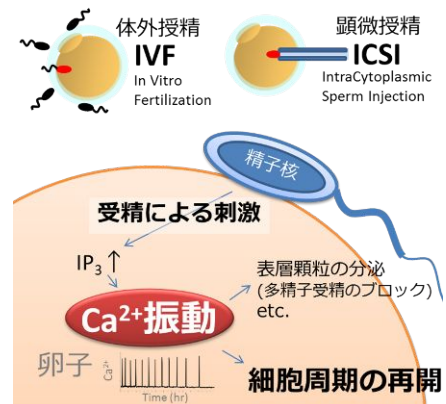
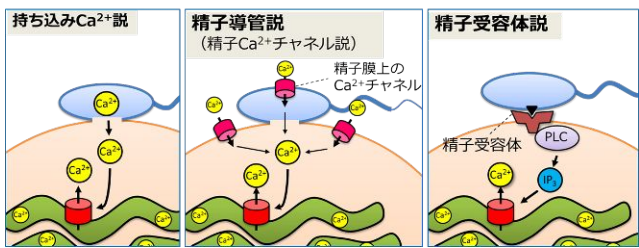


図2: 卵活性化の主な4つの説。いずれも、卵内の Ca^{2+} 貯蔵庫である小胞体上のイオンチャネルを IP_3 または Ca^{2+} を介して開放させることで自律的 Ca^{2+} 振動を促すモデルである。ICSI でも Ca^{2+} が起こることから、近年は PLCz1 をはじめとした頭部 SOAF 説が有力とされてきた。受容体説で用いられる PLC は卵由来の弱活性 PLC と見られている
Machaty, Z. *Cell Tissue Res.* (2015).



胚の質を予測し、向上(補助)するには、哺乳類の卵活性化はどのようにして惹起されているのか、や、胚発生にとって Ca^{2+} の変動はどの程度必要なのか、といった基礎的な知識が欠けていた。

これらの問題の背景には、生殖細胞の研究には細胞培養系から機能的な卵・精子が得にくい、遺伝子改変動物動物を用いた研究が必須になるのに対して、PLCz1 の遺伝子改変動物が得られていなかったことや、哺乳類の受精や初期発生という現象が観察ストレスに弱く、生きたまま定量的に評価することが難しい、という技術的課題が存在していた。

2. 研究の目的

受精は個体発生の開始地点であり、哺乳類の受精に関する研究は基礎生物学と医療の発展に寄与してきた。しかし近年は、晩婚化に伴う“卵と精子の質の低下”が頻繁に報道される一方で、その問題の鍵となる“卵の質”に関する統合的な理解はまだまだ十分ではない。とくに現在注目されている、卵に発生をスタートさせる能力(卵活性化能)への基礎的な理解については未だ不十分な面が多い。

本研究では、この問題に対して、精子が卵に与える卵活性化因子に対する CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いた遺伝子欠損マウスの作製と、近年開発した哺乳類の受精と初期発生に関する低侵襲性イメージング法とを駆使して、哺乳類の卵活性化を起こす因子の決定とメカニズムの解明、そして、胚発生にとって必要な Ca^{2+} の変動の度合いの定量化といった、基礎生物学のかつ根本的な課題を解決することを目的としている。

3. 研究の方法

研究開始当初、精子に含まれる卵活性化因子の候補であった PLCz1 遺伝子について、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて遺伝子欠損マウスの作製に成功していた。PLCz1 欠損精子は顕微授精(ICSI: Intracytoplasmic sperm injection)や体外受精(IVF: In vitro fertilization)といった受精の様式によって Ca^{2+} 振動惹起能が完全に消失する、あるいはごく弱い活性化能を発揮するという結果を示していた。

そこで、本研究では、まずはこのマウスの精子における卵活性化能力について詳細に解析した。具体的には、ICSI、IVF という異なる受精過程を経る場合に、それぞれ PLCz1 欠損精子がどのような影響を卵に対して与えているのかについて、低侵襲性イメージングを用いて、細

胞内 Ca^{2+} の変動とこの卵の発生結果について逆及的に解析した。また、存在が示唆された、PLC ζ 1 非依存性の卵子活性化メカニズムについて解析を行った。これにはまず、PLC ζ 1 非存在下で弱い活性を發揮する SOAF 候補因子があると仮定し、これらと PLC ζ 1 との多重遺伝子破壊マウス/精子を作出して検証した。次に、活性化メカニズム探索では、主に顕微操作技術を用いて、精子の特定の部位を卵に複数導入したり、膜融合などの素過程を再現することで SOAF 説以外の諸説が存在する可能性についても検証した。これらについても、低侵襲性イメージングの技術を活用して解析を行った。

4. 研究成果

PLC ζ 1 欠損精子を用いたイメージング解析から、ICSI 条件下においては、卵内の Ca^{2+} 濃度変化はまったく生じないことが分かった。このことは、現在の不妊治療の症例において最も多く行われる技術である ICSI において、PLC ζ 1 こそが長年同定されてこなかった哺乳類の卵を活性化必須の活性化因子であることを示している。

一方で、PLC ζ 1 を失った精子でも産仔が得られることから、より自然に近い IVF 条件下での卵子活性化状況について詳細に比較解析を行った。この結果、体外受精のように精子と卵子とで細胞融合を経る受精の様式では、わずかではあるが必ず卵内の Ca^{2+} 濃度変動がごくわずかに（通常の振幅数が 10 数回なのに対して、1-4 回程度）起こることを発見した。さらに、さまざまな条件を変えた IVF において得られる受精卵と、自然交配後で得られる受精卵について詳細に活性化状態と発生能力を比較したところ、これらがたとえ非常に精子濃度が低い状態でも、高い活性化不全と他精子受精のリスクを伴っていることを発見した。同時に、その中でも一部の卵は正常な染色体構成を伴って発生することから、これらが産仔に寄与するものと推察された。複数の精子が融合する影響については、融合した精子の数が増えるほど、受精時に起こる Ca^{2+} 濃度変動が大きくなることを見出した。これらを併せて、論文として発表することが出来た (Nozawa and Satouh et al., Sci Rep 2018)。

また、PLC ζ 1 以外の卵活性化因子の探索として、これまでの知見から候補を絞り、PLC ζ 1 と他の活性化因子候補とで多重遺伝子破壊マウス/精子を作出し、雄マウスの生殖能力、精子の卵活性化能力および Ca^{2+} 濃度上昇活性について解析を行った。この結果、いずれの候補についてもマイナーな活性の欠損は見られず、 Ca^{2+} 濃度上昇頻度にも PLC ζ 1 欠損精子との差異が生じないことを証明した。一方で、精子頭部・精子全体・精子中片部を特異的に断片化して、部位特異的に注入する新しい顕微操作手法を開発できたため、これを用いて各部を多量に打ち込む処置を行ったが、いずれも Ca^{2+} 振動を起こすことは出来なかった。これらの結果は、このマイナーな卵子活性化システムが生理的な卵-精子の融合過程を経る場合のみ發揮される可能性を示唆しており、他の動物の卵子活性化でも精子の数に応じた加算的な卵活性化が見られることから、その、現象としての類似性や今後の本分野の方向性について論文で提言した (Satouh and Ikawa, Trends Biochem Sci. 2018)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Satouh Y., Ikawa M., New Insights into the Molecular Events of Mammalian Fertilization., Trends Biochem Sci., 2018 年, 43(10):818-828., 査読有
Nozawa K.*, Satouh Y.*, Fujimoto T., Oji A, Ikawa M. (*: 共同筆頭著者), Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice., Sci Rep., 2018 年, 8(1):1315., 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

Yuhkoh Satouh, Kaori Nozawa, Masahito Ikawa, Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice, The 4th IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism, 2018 年

Yuhkoh Satouh, Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice, The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences joint with the 3rd Symposium of the Inter-University Research Network for Trans-Omics Medicine and the 28th Hot Spring Harbor Symposium, 2018 年

佐藤裕公、野澤香織、伊川正人、哺乳類卵子は PLC ζ 1 非依存的で生理的な経路によっても活性化されうる、第 36 回日本受精着床学会総会、2018 年

Satouh Y, Nozawa K, Ikawa M. Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice, The 13th International Symposium on Spermatology, 2018

年

佐藤裕公、野澤香織、伊川正人、 マウス精子 PLCZ1 は単精子受精を担保するための卵子活性化因子である、 第 65 回日本実験動物学会総会、 2018 年

佐藤裕公、野澤香織、伊川正人、 マウスの受精における PLCz1 非依存的な卵子活性化、 第 59 回日本卵子学会学会、 2018 年

佐藤裕公、 マウス卵の活性化とライブイメージング、 第 6 回生殖若手の会、 2018 年

佐藤裕公、 ゲノム編集を用いた哺乳類生殖因子の包括的解析、 第 39 回 関西生殖発生毒性フォーラム、 2017 年

Satouh Y., Low-invasive Imaging of Ca²⁺ Oscillations and Quantitative Analysis of the Cortical Reaction in Mammalian Eggs、 大阪大学医学系研究科若手研究フォーラム 2017 年

Satouh Y., Nozawa K., Yamagata K., Ikawa M., Low-invasive Imaging of Ca²⁺ Oscillations and Quantitative Analysis of the Cortical Reaction in Mammalian Eggs、 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction、 2017 年

〔図書〕(計 1 件)

佐藤裕公、伊川正人、 中外医学社、 実践よくわかる臨床生殖免疫学入門 各論 "受精と免疫"、 2018 年 5 月、 75-85 頁

〔産業財産権〕

特になし

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/view/yuhkohsatouh/home>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

特になし

(2)研究協力者

特になし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。