

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580405

研究課題名(和文) 抗酸化機能欠損マウス卵を用いた染色体異数性発症機構の解明による新規IVM法の開発

研究課題名(英文) Investigation into the cause of oocyte aneuploidy using antioxidant capacity deficient mice and application to advanced IVM methods

研究代表者

木村 直子(KIMURA, Naoko)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：70361277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：3系統の抗酸化機能遺伝子欠損マウス卵をモデルに、卵成熟培養(IVM)系で、減数分裂時の酸化ストレスによる染色体異数性発生の原因因子の特定を目指した。SOD1KO卵でみられる減数分裂進行の早期化、染色体不整列、異数性の増加には、SACの機能低下の関与が示された。動原体上BubR1の局在は、異数性頻度の指標となり得、これを利用した異数性を防ぐIVM培地のための添加剤のスクリーニングが可能と考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to investigate effects of intrinsic oxidative stress using antioxidant capacity deficient mice during in vitro maturation (IVM). SOD1-deficient oocytes under 20% O₂ IVM substantially increased chromosome misalignment and a withering spindle assembly compared with wild-type oocytes or in vivo oocytes. SOD1-deficient oocytes accelerated the timing of germinal vesicle break down and progression of anaphase I compared with wild-type oocytes. The percentage of aneuploidy was two times higher in SOD1-deficient oocytes than in wild-type oocytes under 20% O₂ IVM while in vivo oocytes showed similar percentage regardless of genotype. BubR1 signals on kinetocore were apparently weakened in SOD1-deficient oocytes compared with wild-type oocytes. Our results suggest that intrinsic oxidative stress during oocytes meiotic maturation impairs spindle assembly, regular timing of meiosis progression and localization of BubR1, which would consequently lead to aneuploidy.

研究分野：生殖生物学、生殖・発生工学

キーワード：減数分裂 卵母細胞 異数性 酸化ストレス 体外成熟,IVM 紡錘体形成チェックポイント 発生障害
老化

1. 研究開始当初の背景

(1)哺乳類の培養卵の発生率や移植後の受胎率は、生体由来卵と比較し著しく低く、家畜生産現場での経済性の向上や受精卵移植技術の普及を阻む一因と考えられている。これらの培養系特有の卵の発生障害や、加齢に伴い頻発する卵の染色体異数性には、酸化ストレスの関与が示唆されている。

(2)培養卵や加齢個体由来卵の受胎率の向上や流産率の低下には、卵発生障害の主因となる因子やカスケードを明らかにすることが必須であるが、現状では十分に理解されていない。その一因に、生理的条件下で発生障害卵を大量に効率よく得て、解析する実験モデルがないことが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、培養系で卵の発生障害が予測される抗酸化機能遺伝子を欠損させた3系統のマウス卵(SOD1KO, xCTKO, ALRKO)をモデルに、特に卵成熟培養(IVM)系での紡錘体形成や染色体分配の異常を中心に解析し、減数分裂時の酸化ストレスによる染色体異数性発症の原因因子とその因子の発現・活性化制御カスケードの特定を目指した。

特に動原体-微小管上の因子に注目して、検討を進めた。さらにそれらの因子を制御する薬剤の添加により、染色体異数性を防ぐ新規 IVM 法の開発を目指した。また卵の酸化ストレスと老化による染色体異数性発症機構の同異についても明らかにし、抗酸化機能欠損卵が、卵の老化研究のモデルになり得るかについて評価を行った。

3. 研究の方法

(1)染色体異数性がみられる卵成熟培養(IVM)系 SOD1KO 卵の詳細な解析： 減数分裂中期の紡錘体形態と異数性の評価、 発現異常を起こしている動原体-微小管上因子の探索、

の因子の発現および活性化の制御に関わるホスファターゼの発現解析、 卵成熟時間の早期化と上記 および で発現異常がみられた因子との関わり等の検証について検討する。

(2)(1)の解析結果で、動原体-微小管上因子の発現異常が認められた場合、1)xCTKO マウスおよび ALRKO マウスの卵、2) 加齢個体マウス由来卵でも同様の異常がみられるかについて、検証を行う。

(3) 染色体異数性を防ぐ新規 IVM 法の開発：
(1)から明らかとなった染色体異数性の原因因子の発現あるいは活性化を促進あるいは抑制する薬剤を IVM 系へ添加し、3種の抗酸化機能欠損卵を用いて、その効果について評価する。

4. 研究成果

(1) 20%O₂ 下で、SOD1KO 卵を IVM した場合、WT 卵と比較し、卵核崩壊への進行が早まり

2 時間程度早く MI 期進行のピークを示した(WT 卵：6 時間、SOD1KO 卵：8 時間)。さらに MI 期の滞留時間が短くなっており、結果的に早期に核成熟が終了することが明らかとなった。また、IVM 後 18 時間(MII 期)における紡錘体極間距離および紡錘体面積は、WT 卵と比較し、SOD1KO 卵では有意に小さく、IVM 後の卵の染色体分散が有意に増加していた(図 1)。染色体の異数性頻度は、排卵卵子では両ゲノタイプに差がみられなかった一方で、5% O₂ 下 IVM では、SOD1KO 卵は WT 卵の 2 倍高かった(図 2)。また老齢マウス由来の同条件下の IVM 卵では、ゲノタイプに関わらず、若齢マウス卵と比較し、有意な異数性の増加がみられた。

以上の主な研究結果については、学会発表の 15、16、19 で報告している。

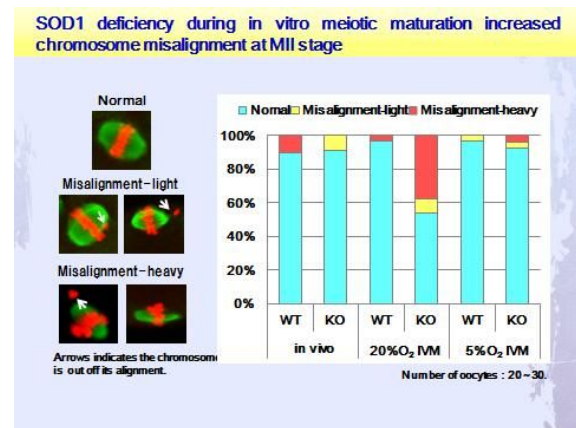


図 1. 20% O₂ 下で成熟培養した SOD1KO 卵で見られる染色体不整列の増加

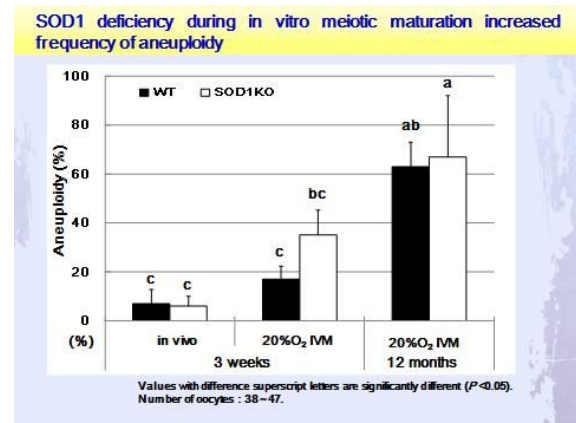


図 2. 20% O₂ 下で成熟培養した SOD1KO 卵で見られる染色体異数性の増加

(2)(1)の解析結果から、SOD1KO 卵では、紡錘体形成チェックポイント(SAC)に関わる動原体-微小管上タンパク質の発現異常あるいは機能障害、コヒーシタンパク質の発現が異常となっている可能性が考えられた。これまでの動原体-微小管上タンパク質のノックダウンあるいはノックアウト実験の報告から、SOD1KO 卵の異常と似た表現型を示す SAC 因子である BubR1 の発現動態に注目し、解析を行うこととした。ウェスタンブロット

解析による BubR1 発現量は、両ゲノタイプとも減数分裂の進行に伴い IVM 後 6~8 時間まで増加した後、減少していた。しかし SOD1KO 卵では、WT 卵と比較し、発現量のピークが 2 時間程度早まっており、MI 期到達時間の早期化と相関があった。SOD1KO 卵のピーク時の発現量は、WT 卵と比較し、低い傾向にあった。MI 期の動原体上の BubR1 の局在解析では、SOD1KO 卵では、WT 卵と比較し、BubR1 の相対的蛍光強度に有意な低下がみられた (図 3)。一方、コヒーシタンパク質である Rec8 の発現は、MI 期において、染色体腕と姉妹動原体間での局在が確認されたが、両ゲノタイプで発現局在やシグナル強度に大きな違いはみられなかった。このことから Rec8 の発現量が、SOD1KO 卵の異数性の主因にはなっていないものと考えられた。

以上の主な研究結果については、学会発表の 3、5、9 で報告している。

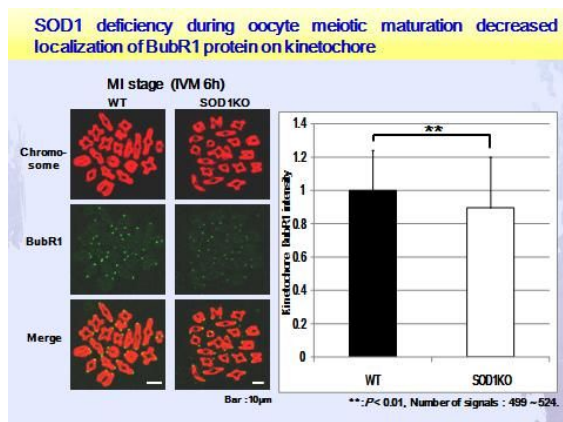


図 3. 5% O₂ 下で成熟培養した SOD1KO 卵の動原体上 BubR1 局在の減少

(3)(2)の解析結果から、BubR1 のシグナル強度は、異数性発生の指標に利用できるものと考えられた。異数性の増加が確認されている加齢個体マウス由来卵でも、BubR1 の局在低下がみられるかについては、現在検証を行っている。また IVM した xCTKO マウス卵では、WT 卵と比較し、胚盤胞への発生率が低下することから、異数性頻度と BubR1 の発現動態について、今後調査を行う。

一方、IVM した ALRKO マウス卵では、原因は不明だが、野生型より胚盤胞への発生率が 2 倍程度高いことが明らかとなっており、このことから異数性頻度は非常に低いことが考えられた。これまでの研究から、培地への適量のアスコルビン酸の添加は、卵の発生能を向上させることが明らかとなっている。しかし AKRKO マウス卵では、アスコルビン酸が検出限界であることを確認している。これらのことは、卵の発生にアスコルビン酸が必須でないことを示唆しており、AKRKO 卵内では、アスコルビン酸が合成されない代わりにグルクロン酸が蓄積しているものと予測された。今後、このグルクロン酸を経由した反応系が、卵の発生能にどのように関わっている

かについては、現在も調査を行っている。

以上の主な研究結果については、学会発表の 1、2、4、12、14、20 で報告している。

(4) (2)の解析結果から、BubR1 のシグナル強度を指標に、染色体異数性を低下させる成熟培地への添加剤について、現在検討を行っている。現在までに、抗酸化物質の中で、アスコルビン酸やアスコルビン 2 リン酸の成熟培地への添加は、SOD1KO 卵の動原体上 BubR1 のシグナル強度を増加させ、受精後の 2 前核形成率や、2 細胞への分割率が改善することが明らかとなっている。

以上の主な研究結果については、2015 年度中に外部報告する予定である。

以上、本研究から、SOD1KO 卵でみられる減数分裂進行の早期化、染色体不整列、染色体異数性の増加は、SAC 機能の低下が原因であることを明らかとなった。この機能低下には、卵細胞質から動原体への BubR1 のリクルートの阻害が関与しているものと考えられた。また動原体上の BubR1 の局在強度は、異数性頻度の指標になり、この局在シグナル強度を利用して効果的に異数性を防ぐ添加剤のスクリーニングが可能であることが示された。本研究の一連の研究成果については、原著論文採択に向けて準備をしている。今後は、SOD1KO 卵での BubR1 局在を指標とした添加剤のスクリーニングによる異数性を防ぐ IVM 培地の開発をさらに進めるとともに、老化個体由来卵でみられる異数性発生のメカニズムとの同異についても、さらに詳細に検討を行っていく予定である。

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 2 件)

Tsunoda S, Kimura N and Fujii J. Oxidative stress and redox regulation of gametogenesis, fertilization, and embryonic development. *Reproductive Medicine and Biology*, 査読有, 2014, 13:71-79. DOI:10.1007/s12522-013-0170-0.

Tsunoda S, Kawano N, Miyado K, Kimura N, Fujii J. Impaired fertilizing ability of Sod1-deficient mouse sperm during in-vitro fertilization. *Biology of Reproduction*, 査読有, 2012, 87; 1-6. DOI: 10.1095/biolreprod.112.102129.

[学会発表](計 20 件)

Hoshino Y, Watanabe R, Yoshida K, Fujii J, Kimura N. The role of vitamin C in in vitro mouse early embryonic development - the effects of Supplementation of

ascorbic acid 2-phosphate - . World Congress of Reproductive Biology(WCRB 2014, 生殖生物学会世界大会 2014), Proceeding Poster Abstract 40. 2014 年 9 月 2 日~9 月 4 日. Edinburgh, Edinburgh International Conference Centre, Scotland. (ポスター発表)

Watanabe R, Fujii J, Sato H, Kimura N. Evaluation of oocyte quality and ovarian function in aged female cystine-glutamate transporter gene-deficient mice. World Congress of Reproductive Biology(WCRB 2014, 生殖生物学会世界大会 2014), Proceeding Poster Abstract 45. 2014 年 9 月 2 日~9 月 4 日. Edinburgh, Edinburgh International Conference Centre, Scotland. (ポスター発表)

Kimura N, Nago M, Odajima K, and Fujii J. Intrinsic oxidative stress increases meiotic chromosome misalignment and aneuploidy in in vitro matured oocytes from SOD1-deficient mice. World Congress of Reproductive Biology(WCRB 2014, 生殖生物学会世界大会 2014), Proceeding Poster Abstract 20. 2014 年 9 月 2 日~9 月 4 日. Edinburgh, Edinburgh International Conference Centre, Scotland. (口頭発表)

渡辺 連, 李 允熙, 木村 直子. マウス卵における抗酸化機能遺伝子の発現パターンに及ぼす加齢の影響~野生型と xCT 遺伝子欠損型との比較. 第 107 回日本繁殖生物学会大会要旨集, j125. 2014 年 8 月 21~24 日. 帯広畜産大学, 北海道帯広市. 名古 満, 藤井 順逸, 木村 直子. MI 期動原体への BubR1 の局在性低下が卵染色体の異数性を増加させる~成熟培養系 SOD1 遺伝子欠損マウス卵を用いた研究~. 第 32 回日本受精着床学会総会・学術講演会抄録集, p194. 2014 年 7 月 31 日~8 月 1 日. ハイアットリージェンシー東京(東京都新宿区).

鈴木 あやめ, 渡辺 連, 星野 由貴, 木村 直子. 卵成熟培地への親電性試薬の添加によるマウス胚発生の向上. 第 55 回日本卵子学会大会要旨集, S61. 2014 年 5 月 17~18 日. 神戸国際会議場(神戸市).

鈴木 あやめ, 渡辺 連, 星野 由貴, 木村 直子. マウス卵成熟培養系への親電性試薬スルフォラファン添加の効果. 日本畜産学会第 118 回大会要旨集, p21. 2014 年 3 月 28 日. つくば国際会議場(つくば市).

羽賀 萌実, 名取 友来, 名古 満, 木村 直子. マウス卵成熟過程における PTEN の発現動態と阻害剤の影響. 第 106 回日本繁殖生物学会大会要旨集, j65. 2013 年 9 月 12 日. 東京農工大学農学部府中キャンパス(府中市).

名古 満, 藤井 順逸, 木村 直子. 酸化ス

トレスによる染色体異数性誘発卵における紡錘体形成チェックポイントタンパク質 BubR1 の発現動態. 第 106 回日本繁殖生物学会大会要旨集, j64. 2013 年 9 月 12 日. 東京農工大学農学部府中キャンパス(府中市).

渡辺 連, 角田 智志, 藤井 順逸, 佐藤 英世, 木村 直子. 老齢シスチン・グルタミン酸トランスポーター遺伝子欠損マウスにおける卵巣機能の解析. 日本畜産学会第 117 回大会要旨集, p98. 2013 年 9 月 9 日. 新潟大学五十嵐キャンパス(新潟市).

窪田 有里子, 藤井 順逸, 木村 直子. 老齢 SOD1 欠損マウスにおける排卵数減少の原因解明. 日本畜産学会第 117 回大会要旨集, p98. 2013 年 9 月 9 日. 新潟大学五十嵐キャンパス(新潟市).

星野 由貴, 鈴木 あやめ, 吉田 康一, 藤井 順逸, 木村 直子. マウス初期胚発生におけるビタミン C の役割-活性持続型ビタミン C の効果-. 日本畜産学会第 117 回大会要旨集, p58. 2013 年 9 月 9 日. 新潟大学五十嵐キャンパス(新潟市). 日本畜産学会第 117 回大会優秀発表賞受賞.

鈴木 あやめ, 星野 由貴, 渡辺 連, 木村 直子. マウス卵成熟培養系への親電性試薬ジエチルマレイン酸添加の影響. 要旨第 63 回東北畜産学会大会要旨集, p22. 2013 年 8 月 30 日. 山形テルサ(山形市).

星野 由貴, 梅田 彩, 高橋 素子, 宮田 哲, 吉田 康一, 藤井 順逸, 木村 直子. 培養系卵の初期発生におけるビタミン C の役割~アルデヒド還元酵素遺伝子欠損卵を用いた検証~. 第 31 回日本受精着床学会総会・学術講演会抄録集, p196. 2013 年 8 月 8 日. 別府国際コンベンションセンター(別府市).

名古 満, 藤井 順逸, 木村 直子. 体外成熟させた SOD1 遺伝子欠損マウス卵でみられる異数性増加の解析. 第 54 回日本卵子学会大会要旨集, vii. 2013 年 5 月 25 日. 学術総合センター(東京都千代田区).

木村 直子. 抗酸化機能欠損マウスを利用した卵子の酸化ストレスと老化の研究. 日本受精着床学会第 9 回 ART 生涯研修. 2013 年 3 月 10 日. ベルサール九段イベントホール(東京都). (招待講演)

星野 由貴, 樋口 謙太, 梅田 彩, 高橋 素子, 宮田 哲, 吉田 康一, 藤井 順逸, 木村 直子. マウス卵初期発生過程におけるアスコルビン酸(VC)含量と VC 合成系・取込み系遺伝子の発現. 第 105 回日本繁殖生物学会大会要旨集, j186. 2012 年 9 月 7 日. 筑波大学大学会館(つくば市).

窪田 有里子, 猪野 友香里, 藤井 順逸, 木村 直子. SOD1 欠損マウスにおける加齢による排卵卵子数および卵胞数の変化. 第 105 回日本繁殖生物学会大会要旨集,

j150. 2012年9月6日. 筑波大学大学会館
(つくば市).

名古 満, 佐藤 康子, 角田 智志, 藤井
順逸, 木村 直子. マウス卵成熟過程での
SOD1 欠損による受精障害の解析. 第 30 回
日本受精着床学会総会・学術講演会抄録集,
p253. 2012年8月30日~2012年9月2日.
大阪国際会議場(大阪市).

Takano T, Kubota Y, Sato H, Kimura N.
Glutathione contents and expressions of
cystine-glutamate transporter and
glutathione synthesis related genes in
mouse oocytes and early developmental
embryos. ASPIRE 2012, 4th Congress of
the Asia Pacific Initiative on
Reproduction, Final Program, p56. 2012
年 8 月 31 日~2012 年 9 月 2 日. Osaka
International Convention Center (大阪
市).

〔図書〕(計 1 件)

Fujii J, Tsunoda S and Kimura N.
Antithetical Roles of Reactive Oxygen
Species in Mammalian Reproduction, in
“Handbook of System Biology of Free
Radicals and Anti-oxidants” (I. Larher
ed), Springer-Verlag, Germany, 2014,
2705-2721. ISBN-10: 3642300170.

〔その他〕

研究代表者の研究室ホームページ:

[http://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~animal-reprod./](http://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~animal-reprod/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 直子 (KIMURA Naoko)

山形大学・農学部・教授

研究者番号: 70361277

(2) 連携研究者

藤井 順逸 (FUJII Junichi)

山形大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00222258