

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861479

研究課題名(和文)母体の含硫アミノ酸代謝制御による哺乳類卵子老化の予防法の開発

研究課題名(英文)Development of an in vitro culture methods for low quality embryos

研究代表者

西園 啓文(NISHIZONO, Hirofumi)

富山大学・生命科学先端研究センター・助教

研究者番号：10502289

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000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メカニズムとその予防方法は、晩婚化の進んだ現代では重要な研究課題である。本研究では、遺伝的に卵子や受精卵の品質が高いC57BL/6Jマウスと、品質が低いDBA/2Jマウスの受精卵を用いて、アミノ酸代謝に関する比較と、それらの作動薬を用いた新しい培養技術の開発を行った。その結果、品質の低い受精卵でも効率良く胚盤胞まで発生させる培地の開発に成功した

研究成果の概要(英文): We are interested in developing a prophylactic method for oocyte aging. To compare small molecule metabolites and embryo quality, we used embryos from C57BL/6J mice (as a model of high quality embryo) and DBA/2J mice (as a model of low quality embryo). Our results showed that the amount of specific metabolites associated with amino acids contained in DBA/2J embryos are lower than the amount of metabolites contained in C57BL/6J embryos. Also we found that the developmental rate of DBA/2J embryos were improved using novel medium including these specific metabolites.

研究分野：生殖工学

キーワード：胚培養 メタボローム

1. 研究開始当初の背景

ヒトやウシ、マウスなど哺乳類では、母親の卵巣から排卵された卵子が、卵管膨大部で精子と受精し、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、その後子宮に着床することで新生児への発生・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」があり、卵子や受精卵にも品質(oocyte 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考えられている。この卵子の品質は、母胎の加齢とともに劣化し、やがて発生能を完全に失うと考えられており、「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が、その詳細なメカニズムは明らかにされてはいなかった。

2. 研究の目的

研究代表者は本研究計画以前に、細胞生物学的な解析やメタボローム解析などの結果から、遺伝的に卵子の品質が悪い DBA/2 マウスの卵子や胚では、卵子品質が良い C57BL/6 マウスの卵子や胚と比べて、桑実胚から胚盤胞期でのミトコンドリア活性が低いこと、ミトコンドリア機能に関連するタウリンおよびサルコシンが著しく低いことを明らかにしてきた。

そこで本研究では、平成 25 年から 26 年にかけて、マウス近交系における卵巣内のタウリンおよびサルコシンなどの含硫アミノ酸代謝関連分子の動態解明と、タウリントランスポーターノックアウトマウスやサルコシン合成酵素・GNMT ノックアウトマウスの卵巣機能および排卵卵子の品質の解析、in vitro や in vivo での人為的タウリン・サルコシン量の制御により、卵子・胚品質への薬理作用を期待できるかどうかの検討を行い、タウリンやサルコシンなどの含硫アミノ酸代謝と卵子および胚品質劣化との関連を探り、その予防方法の開発につなげることを目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究は以下に示す 6 つのサブテーマに分けて、一部を変更してそれぞれ実施した。

(1) C57BL/6 および DBA/2 マウス卵巣における含硫アミノ酸代謝産物の測定と比較

品質の良い卵子(=胚盤胞達成率が高い卵子)を産生する C57BL/6 マウスと、品質の悪い卵子(=胚盤胞達成率が低い卵子)を産生する DBA/2 マウスの卵巣において、タウリンおよびサルコシンなどの含硫アミノ酸代謝産物量に差が無いかを、測定・比較した。

(2) 卵巣、卵子・胚中におけるタウリンおよびサルコシン生合成酵素群の発現プロファイル

タウリンの生合成に関しては、ユビキタスに存在するシステインジオキシゲナーゼ(CDO1)とシステインスルフィン酸デカルボキシラーゼ(CSD)、ヒポタウリンデヒドロゲナーゼの 3 つの酵素が関与している。またサルコシンについては、サルコシン合成酵素(GNMT)とサルコシン分解酵素(SARDH)によって細胞内で生合成と分解が行われている。そこで、これらの酵素群について、凍結切片浮遊染色-免疫組織化学法を用いて、卵巣内や、卵子および着床前発生期胚での発現量・発現部位について、C57BL/6 および DBA/2 マウスで比較検討した。

平成 25 年度実績報告書にて述べた通り、サブテーマ(3)タウリントランスポーター(SLC6a6)レポーターマウスの導入とバッククロス、(4)Gnmt 遺伝子ノックアウトマウスおよび Slc6a6 遺伝子ノックアウトマウスの導入、(5)Gnmt 遺伝子ノックアウトマウスおよび Slc6a6 遺伝子ノックアウトマウスの解析に関しては、RNAi および阻害剤実験に切り替えて実施した。

具体的には、C57BL/6J マウス受精卵に各種阻害剤および siRNA を作用させ、その胚盤胞形成率を測定した。

(6) In Vitro および In Vivo での DBA/2 マウス低品質卵子・胚のレスキュー実験

「母体のタウリンおよびサルコシンなどの含硫アミノ酸代謝を制御することで、卵子や胚の品質を高めることができるか?」という疑問を明らかにするために、外部から卵巣・卵子・胚にタウリンおよびサルコシンを導入する実験を H26 年度に実施した。

始めに In Vitro での実験として、タウリンを卵子・胚品質の低い DBA/2 マウス 2 細胞期胚を培養している培地に導入し、胚盤胞達成率が改善されるか否か、ミトコンドリア活性が亢進されるか否か、胚盤胞期での胚移植を実施し、受胎率が改善されるか否かを検証する。また、サルコシンについては、トランスポーターが明らかになっていないため、前駆物質であるグリシンを用いて、同様のレスキュー実験を行った。

4. 研究成果

(1) C57BL/6 および DBA/2 マウス卵巣における含硫アミノ酸代謝産物の測定と比較

品質の良い卵子を産出する C57BL/6J マウスと、品質の低い卵子を産出する DBA/2J マウスの卵巣内アミノ酸を比較測定した結果を下表に示す。

(単位：mg/100g-卵巣湿重量)

	C57BL/6J	DBA/2J
アスパラギン酸	33.75 ± 1.73	43.45 ± 2.51
トレオニン	13.20 ± 0.34	22.66 ± 3.42
セリン	17.53 ± 0.99	27.80 ± 5.17
アスパラギン	11.38 ± 0.97	17.3 ± 3.62
グリシン	34.13 ± 1.78	34.53 ± 4.90
アラニン	51.60 ± 5.95	54.10 ± 10.27
バリン	10.85 ± 0.51	15.35 ± 2.06
シスチン	0	0
メチオニン	0	2.83 ± 1.94
イソロイシン	9.68 ± 1.03	12.33 ± 2.53
ロイシン	13.90 ± 0.77	20.43 ± 3.71
チロシン	10.30 ± 0.62	14.75 ± 2.51
フェニルアラニン	6.85 ± 1.38	11.68 ± 2.68
ヒスチジン	3.93 ± 0.76	6.98 ± 1.93
リジン	12.58 ± 1.79	21.58 ± 4.57
アルギニン	11.10 ± 1.13	21.58 ± 4.19
ヒドロキシプロリン	14.75 ± 2.43	19.70 ± 1.86
プロリン	7.98 ± 2.43	15.53 ± 5.86
タウリン	230.13 ± 7.05	246.15 ± 31.40
グルタミン酸	57.80 ± 2.59	69.23 ± 4.83
グルタミン	31.55 ± 0.48	31.03 ± 3.56
GABA	0	0

意外なことに、C57BL/6J マウス卵巣および DBA/2J マウス卵巣において、明確なアミノ酸の差はほとんどなく、今回着目していたタウリンやグリシンも有意な差はなかった。

しかしながら、CE-TOFMS で測定した受精卵そのもののアミノ酸の含有量比(下表)では、サルコシンやその前駆物質であるグリシン、タウリンが DBA/2J マウス受精卵で少ないことが明らかになっているため、受精卵内部でのこれらの代謝経路やトランスポーターなどの関与が示唆された。

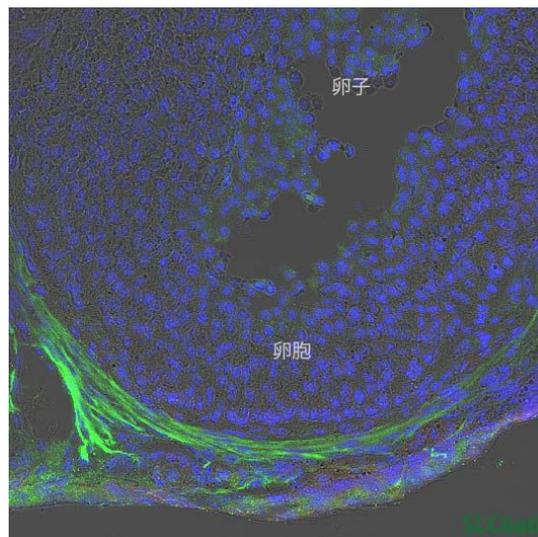
代謝物質	比率 (DBA/2J vs C57BL/6J)
Glutathione	5.0
Glucose-6-phosphate	3.0
GTP	2.0
Val, Ile, His, Arg	1.8
Leu, Phe	1.7
Thr	1.5
Tyr, Met	1.3
ATP	1.4
Lactic acid	1.0
ADP	0.9
GMP, Pyruvic acid	0.8
AMP	0.7
Gly	0.5
Hypotaurine	0.4
Taurine	DBA/2J, 検出限界以下

比率は、DBA/2J受精卵1個あたりの含有量/C57BL/6J受精卵1個あたりの含有量から算出した

(2) 卵巣、卵子・胚中におけるタウリンおよびサルコシン生合成酵素群の発現プロファイル

上記サブテーマ(1)の結果を受け、サルコシンやタウリンの卵巣・卵子・胚中におけ

る関連遺伝子の発現プロファイルを実施した結果、下図に示す通り、卵巣、特に卵胞の最外層である卵胞上皮細胞において、タウリントランスポーターの発現が亢進していることがわかった。これは、サブテーマ(1)のアミノ酸含有量のうちタウリンが最も高かったこととも矛盾せず、タウリンが卵子形成において何らかの保護的機能を持っていることが推察される。



(3)(4)(5) 各種トランスポーター阻害剤を用いた loss of function 実験

方法の欄で述べた通り、遺伝子欠損マウスの入手が困難となったため、C57BL/6J マウス受精卵(通常であればそのままほとんどが胚盤胞に成長する受精卵)に、各種阻害剤を作用させて胚盤胞形成率を測定した。

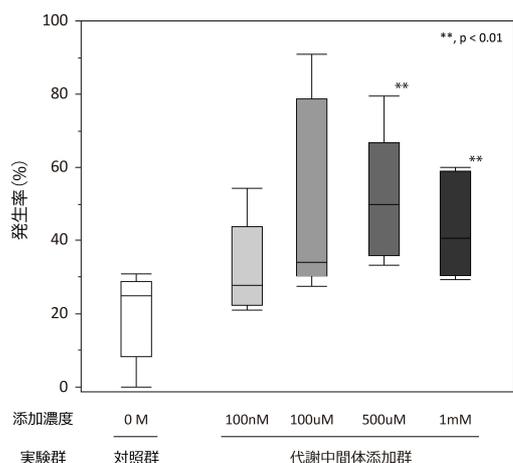
グリシントランスポーターを阻害した結果を下表に示す。

実験群	胚盤胞発生率 (Mean ± SD, %)
通常培地	90.32 ± 5.83
グリシントランスポーター 阻害剤添加培地	89.03 ± 8.95

この結果からも明らかのように、サルコシンの前駆物質であるグリシンについては、トランスポーターの関与するシグナル伝達経路はマウス初期発生にはほとんど影響がないと思われる。この点については、これまで複数の報告で「グリシントランスポーターが受精卵の体積維持に必要な」と言われていたため、既報とは異なる結果となった。

(6) In VitroおよびIn VivoでのDBA/2マウス低品質卵子・胚のレスキュー実験

これらの成果を踏まえて、アミノ酸代謝中間体強化培地でのDBA/2Jマウス受精卵が高率的に発生するかを試した結果、下図のように、発生率を最大2.7倍にまで向上させることが可能となり、特許申請を行った。



またこの効果をウシ受精卵でも試した結果、同様に低品質受精卵の発生率を向上させる効果があることがわかった。

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)

1. Ohkawa N, Saitoh Y, Suzuki A, Tsujimura S, Murayama E, Kosugi S, Nishizono H, Matsuo M, Takahashi Y, Nagase M, Sugimura YK, Watabe AM, Kato F, Inokuchi K.

“Artificial association of pre-stored information to generate a qualitatively new memory.” Cell Rep. 2015;11(2):261-9.

2. 西園啓文, “受精卵の発生率改善培地の開発研究”, 臨床獣医. 2015;33(5):18-23

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 西園啓文, 低発生能を示すDBA/2Jマウス胚におけるミトコンドリア機能の解析と表現形との関連性, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月4日, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 低受胎率受精卵の発生率改善培地
発明者: 西園啓文
権利者: 国立大学法人富山大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-216688

出願年月日: 2013年10月17日

国内外の別: 国内

名称: 低受胎率受精卵の発生率改善培地

発明者: 西園啓文, 四ッ島賢二

権利者: 国立大学法人富山大学, 富山県

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/77486

出願年月日: 2014年10月16日

国内外の別: 国外

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西園 啓文 (NISHIZONO Hirofumi)

富山大学・生命科学先端研究センター・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: