

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450383

研究課題名(和文) 時計遺伝子Clockによる着床制御機構の解明

研究課題名(英文) Involvement of Clock in mechanism of implantation

研究代表者

天野 朋子 (Amano, Tomoko)

酪農学園大学・農食環境学群・准教授

研究者番号：60388585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：Clock遺伝子(以下Clock)は多くの遺伝子の転写に関与し、特定のタイミングに起きる現象に関わっている。哺乳類の生殖には、排卵や着床、出産など特定のタイミングに起こるイベントが多く、Clockを含めた時計遺伝子群との関連が想定される。本課題からClock変異を持つマウスを親に用いた交配では、子宮内での着床胚の位置取り(スペーシング)の異常とともに、これに基づく着床数と産仔数の減少を認め、Clockが着床の機序に関わることが明らかになった。またスペーシングの良否には母体とともに胚のClockの影響があり、子宮や胚盤胞期胚において着床を促進する遺伝子の発現へのClockの関与も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Clock gene (Clock) is involved in expression of many genes to control events occurring at particular timing in a day. Since there are many events that occur timely in mammalian reproduction processes, it is likely that circadian genes including Clock are involved in reproduction physiologies. In our study, we found a decrease in the number of pups and abnormal spacing (abnormality of length between implantation sites in the uterus) when one or both parents bore a Clock homozygote mutation. The pup number and implantation sites were decreased more when the spacing abnormality was greater, suggesting spacing abnormality affected the implantation process. We also revealed that not only Clock mutation of the mother but also that of embryos affected the spacing abnormality. We are now searching for implantation-promoting genes regulated by Clock among genes expressed in blastocysts such as Cox2, known as a gene activating implantation ability of blastocysts.

研究分野：生殖生理学

キーワード：生物時計

## 1. 研究開始当初の背景

人工授精や体外受精・体外胚培養、胚移植技術は、哺乳類の生殖の人為制御に重要な技術として、ヒトの不妊治療や家畜の生産技術に応用されている。しかしこれらの諸技術は決して完全ではない。この受胎率をさらに向上させるためには、受胎を規定する未知の要因を明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

時計遺伝子群のひとつである *Clock* は、多くの遺伝子(発現遺伝子の 1/10)に関与する転写促進因子をコードしており、その発現量には環境の明暗(昼と夜)に沿った 24 時間周期の増減が認められる。この発現量の周期的な増減は、*Clock* に転写が制御される遺伝子の発現量を周期的に変化させ、特定のタイミングに起きる生命現象の制御に関わる。

哺乳類の生殖には、排卵や着床、出産など、特定のタイミングに起こるイベントが多く、時計遺伝子との強い関連が想定される。本研究では、哺乳類の生殖に関わるイベントのうち、時計遺伝子に関わるものを同定するために、変異によって転写因子としての機能を失った *Clock* を持つマウスの繁殖成績を検討し、その生殖特性を明らかにするとともに、異常が認められた場合はその現象における *Clock* の関与について追求することとした。

## 3. 研究の方法

### 1) 生殖特性の解析

野生型(WT)の雌雄どうしの交配とともに、*Clock* 変異をホモに持つマウス(CL-/-)の雄と野性型マウスの雌、WTの雄とCL-/-の雌、及びCL-/-の雌雄どうしの交配を行い、交尾の成否、排卵や受精の確認、着床の成否、妊娠継続、および出産の成否の各項目について解析し、その生殖の特性を解析した。

### 2) 1) で *Clock* が影響する項目における *Clock* の機能解析

1)の結果から、着床直前の胚盤胞期胚における *Clock* 変異が着床の成否と関係があることを認めたので、胚盤胞期胚にて *Clock* に転写が制御される遺伝子を発見するために、*Clock* の変異を持つ胚盤胞期胚と WT どうしの交配から得られた胚盤胞期胚にて遺伝子発現の比較を行うこととした。その前段階の解析として、CL-/- どうしの交配から得られた CL-/-の胚盤胞期胚と、雄がCL-/-、雌がWTの交配から得られたCL-/+の胚を作成し、野生型どうしの交配から得られた胚をコントロールとしてPI染色を行い、細胞種の構成や細胞数を確認した。

胚盤胞期胚では着床直前に *Cox2* や *EGF-R* といったいくつかの遺伝子の発現が高まり、着床にむけ「活性化」された状態となる。

特に *Cox2* はプロモーター領域に *Clock* のターゲットとなる E-box 配列があり、関与が疑われる。そこで、まず *Cox2* といくつかの遺伝子に絞り、その発現を *Clock* 変異胚と野生型胚と比較することとし、この結果がクリアになったのち、両処理区の胚盤胞期胚における遺伝子発現をマイクロアレイなどにて比較し、*Clock* に制御されるものを探ることとした。

## 4. 研究成果

### 1) 概要

本課題の結果から、*Clock* 変異マウスは着床に異常を呈しており、子宮内での着床位置が乱れるスペーシングの異常とともに、産仔数の異常が認められた。またこれらの異常は、母体の *Clock* だけでなく、胚の *Clock* と関連することも示された。これまでに母体の時計遺伝子の欠損が流産や死産と関係することを示す報告はあったが、胚の時計遺伝子との関連を示す結果はなく、これは本課題における大きな成果といえる。一方、本課題では *Clock* 変異による生殖の異常が見出された場合、その異常と関わり深い器官において、*Clock* により転写が制御されるなど、*Clock* と関わりが深い遺伝子を検出する予定であった。しかし、*Clock* 変異を持つ胚とWTの胚との細胞数や細胞種の構成が異なることや、ターゲットとする遺伝子の発現がはじまる時期が個々の胚でずれているなど様々な問題が生じ、研究期間中に実験を終了させることができなかった。今後の課題として、さらに取り組む予定である。

さらに本課題では、母親に *Clock* 変異マウスを用いると、妊娠期間が延長することや、出産時刻が変化することも新たに見出した。本課題は着床機構に焦点をあてたものであり、これらの形質については深く追求しなかったが、妊娠期間や出産のタイミングの制御はヒトの生殖医療だけでなく、家畜の効率的な繁殖とも関係が深く、今後の課題として提示された。

### 2) 研究結果

雌のCL-/-の性周期がWTと同じであることを確認した後、交配実験にすすんだ。WT雄×WT雌、CL-/-雄×WT雌、WT雄×CL-/-雌、CL-/-雄×CL-/-雌の交配区について、14、10、14、15つがいを検討した。また交尾までの日数に異常はなく、全ての交配に交尾が起きていることを確認した。交配実験の結果、WTどうしの交配では13.4±0.8匹の産仔が得られ、CL-/-雄×WT雌では12.6±0.4、WT雄×CL-/-雌では12.3±0.7、CL-/-どうしでは8.5±1.5匹となり、WTどうしの交配とCL-/-どうしの交配では有意な差が認められた(P<0.05)。

このような産仔数の低下が何に起因したかを追及するため、4つの交配区の雌につい

て、交尾から出産直前(妊娠 17 日目)まで毎日体重を計測し、妊娠に伴う増加を調べた。その結果、これら 4 処理区にて妊娠継続の不備を示すような体重増加の停滞などは認められなかった。この結果から、CL-/-を用いた交配では、妊娠のごく初期に排卵の異常や受精の異常によって胚の数が減少した可能性が示唆されたので、4 つの交配処理にて着床直前の時期に子宮から胚を回収し、その数や発生ステージを調べた。その結果、どの処理区からも正常な数(10-12 個)の胚が回収され、排卵卵数や受精の異常などは考えにくかった。また、胚盤胞期(着床直前のステージ)への発生率も全ての処理区で同じであり、胚発生への *Clock* の影響も考えにくかった(図 1)。

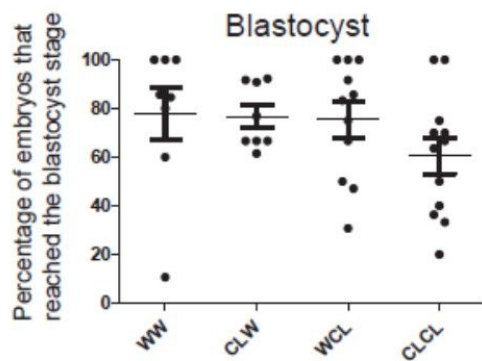


図 1: 各交配処理の胚盤胞への発生率を示す。各区間に有意差はない(WW は野生型マウスの雌雄の交配、CLW は CL-/-雄と野生型雌の交配、WCL は野生型雄と CL-/-雌の交配、CLCL は CL-/-の雌雄の交配を指す。)

以上の結果から CL-/-マウスを親に持つ交配で見られた産仔数の減少は、着床の段階で起こる可能性が示唆されたので、着床 6.5 日目に各交配区の雌マウスから子宮を回収し、図 2 のようにその着床痕を観察した。

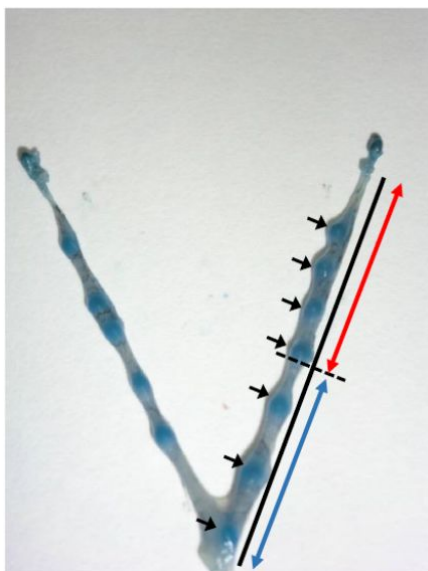


図 2: WT どちらの交配における着床痕。着床

の位置取りの解析では、片側の子宮角の全着床痕数に対する上側(赤線部)と下側(青線部)の着床数の割合を求めた。

その結果、CL-/-を片親に持つ交配にてわずかな着床痕の下降を認め、両親とも CL-/-であると、その傾向はさらに強まることが示された(図 2, 3)。この傾向を図 2 の注釈のように数値化し、子宮角の上側への着床率を求めると、図 3 のように有意な傾向を認めた( $P < 0.05$ )。またこの傾向は、WT どちらの交配と CL-/-雄 × WT 雌(胚は CL-/+で母親は WT-/-)、及び WT 雄 × CL-/-雌(胚は CL-/+で母親は CL-/-)と CL-/- どちらの間で有意( $P < 0.05$ )であることが確認でき(図 4)、「母親の遺伝子型は同じだが胚の遺伝子型が異なる」もの間でも強い傾向があることが示された。このことは、胚の *Clock* が着床痕の下降や産仔数の低下と関係することを示唆するものであった。

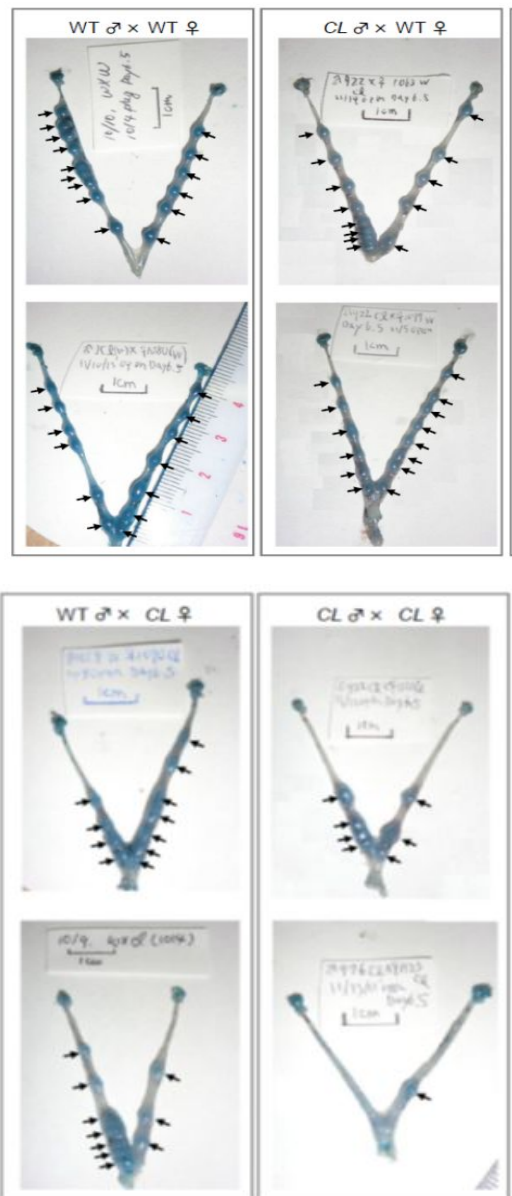


図 3: 各交配区における着床 6.5 日目の典型的な着床痕(典型的な 2 個体のデータを示す)。

交配の組み合わせは図 1 を参照)

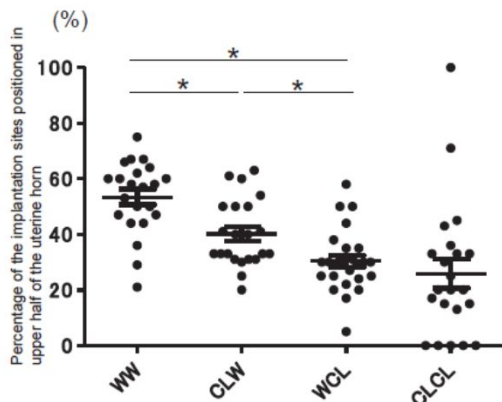


図 4：各交配区における子宮の上側へ着床した率(上側への着床率の算出は図 2 注釈を参照。交配の組み合わせは図 1 を参照)。

その後、WT どうしの交配から得られた胚盤胞期胚(以下 WT 胚)と CL-/- どうしの交配から得られた胚盤胞期胚(以下 CL-/-胚)の間にて、胚の活性化と関わる遺伝子の発現を比較することとした。これについては、胚の細胞数や細胞の構成が発現量に影響する可能性があるため、前もってそれぞれの胚の細胞の構成(ICM 細胞の割合と TE 細胞の割合)や細胞の総数などに違いがないか確認した。

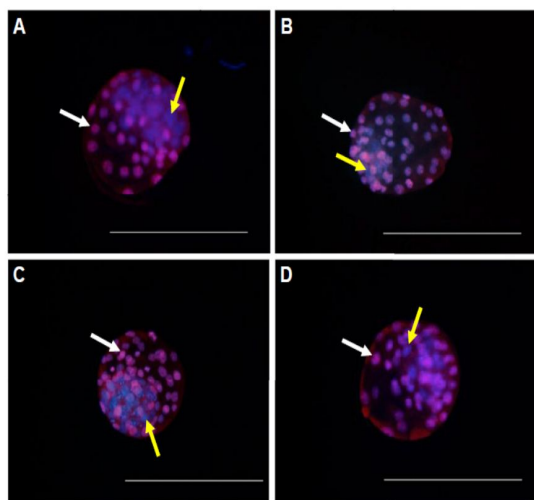


図 5：PI 染色像、A は WT x WT、B は CL 雄 x WT 雌、C は WT 雌 x CL 雌、D は CL どうしの交配から得られた胚盤胞期胚。青は ICM の細胞、赤紫は TE の細胞を示す。

その結果、細胞の総数は各区で変わらなかったが、WT 胚の ICM の数は  $28.4 \pm 2.5$  個、CL-/-胚は  $13.8 \pm 2.9$  個となり、有意に異なっていた ( $P < 0.05$ )。一方、CL-/+胚は 19.6 個から 22.1 個となり、WT 胚と有意な差は認められなかった。そのため、その後の遺伝子発現の比較は WT 胚と CL-/+胚にて行うこととした。

一方、着床直前の交尾後 3-4 日に胚盤胞期

胚を回収すると、すでに着床が開始しているためか、回収できる胚の数が少なくなっており、さらに WT 胚の個々の遺伝子発現(*Cox2*)に大きなばらつきがあり、胚の活性化の時期が胚ごとにかなり違っていることが示唆された。これらのことから、in vivo から回収した WT 胚と CL-/+胚での遺伝子発現の比較は難しいと考えられたので、in vitro にて活性化剤(4-OH-E2)を用いて胚の活性化時期をそろえる検討も試みた。しかし本剤では *Cox2* 発現の誘導は認められなかった。今後、他の活性化剤を試行することや、*Cox2* に代えて *EGF-R* の発現なども確認するとともに、活性化の前の段階での遺伝子発現を比較する検討なども行う予定である。

#### 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 1 件)

Theriogenology(査読有). 2016 Oct

15;86(7):1670-84. doi:

10.1016/j.theriogenology.2016.05.027.

Epub 2016 Jun 6.

The Clock mutation reduces reproductive performance of mice by affecting the implantation capacity: Maternal Clock mutation is not the only factor affecting implantation.

Amano T, Anzai M, Matsumoto K.

[学会発表](計 3 件)

1. 2017 年 43<sup>rd</sup> International Embryo Transfer Society Annual Conference

発表者名：天野 朋子

発表標題：

「Clock mutant mice having a diminished circadian clock show abnormal implantation」

発表年月日：2017 年 1 月 17 日

発表場所：オースチン(アメリカ合衆国)

2. 日本分子生物学会 第 39 回年会

発表者名：天野 朋子

発表標題：

「Mice bearing mutated Clock show abnormal implantation」(英文標題)

「時計遺伝子 Clock の変異は着床に影響する」(和文標題)

発表年月日：2016 年 12 月 2 日

発表場所：パシフィコ横浜(横浜)

3. 日本 DNA 多型学会 第 23 回学術大会(優秀

賞受賞)  
発表者名：天野 朋子  
発表標題：「生物時計を形成する時計遺伝子  
*Clock* が変異したマウスの生殖能力の解析」  
発表年月日：2014年 11月 28日  
発表場所：愛知県産業労働センター「ウイン  
クあいち(名古屋)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
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 天野 朋子(AMANO, Tomoko)  
酪農学園大学 農食環境学群 准教授  
研究者番号：60388585

(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  
Urs Albrecht 教授  
(Department of Medicine, Division of  
Biochemistry, University of Fribourg,  
Switzerland)

Juergen Ripperger 研究員  
(Department of Medicine, Division of

Biochemistry, University of Fribourg,  
Switzerland)