

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850172

研究課題名(和文)ブタ卵細胞質内精子注入卵における卵活性化機構の解析および新規卵活性化誘起法の開発

研究課題名(英文)Improvement of ICSI technique focused on the induction of oocyte activation in pigs

研究代表者

中井 美智子(NAKAI, Michiko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 動物機能利用研究領域・研究員

研究者番号：30442825

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)：卵細胞質内精子注入(ICSI)法は有用な生殖補助技術だが、ブタではICSI後の卵(ICSI卵)の受精効率が低い。本研究では、その原因が卵活性化誘起不全にあると考え、精子が有する卵活性化誘起因子PLCzetaを用いた生理的な卵活性化誘起法を開発することによる改善を目指した。その結果、精子のPLCzeta保有量不足がICSI後の卵活性化誘起の失敗の原因であると明らかとなった。そして、ブタPLCzeta mRNAのブタICSI卵への注入により、効率的に卵活性化を誘起することができ、受精率の飛躍的な改善が認められた。ブタPLCzetaタンパク質による卵活性化誘起についても引き続き取り組んでいく。

研究成果の概要(英文)：Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is a useful tool for producing live offspring from immotile sperm. However, the efficiency of fertilization after ICSI is low. It is hypothesized that a failure in oocyte activation causes it in this study. Therefore, this study tried to develop new method for induction of physiological oocyte activation using PLCzeta, which is thought to be the oocyte-activating factor in mammalian sperm. As a result, it was clearly that a lack of PLCzeta in sperm led to a failure in an induction of oocyte activation after ICSI. Furthermore, the injection of PLCzeta mRNA into the pig oocyte injected with sperm induced oocyte activation efficiently and promoted dramatically fertilization. In addition, the induction of oocyte activation using PLCzeta protein will be continued to investigate.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：顕微授精 ブタ 卵活性化 PLCzeta

1. 研究開始当初の背景

卵細胞質内精子注入(ICSI)法は、精子を卵内に直接注入し受精卵を作出する生殖補助技術の一つである。しかし、ブタでは、ICSIによる受精、胚発生効率の低さが問題となっており、個体作出効率も1%以下と極めて低い(Nakaiら2003, 2010)。通常の受精では、精子が卵との膜融合時に卵細胞質内へ卵活性化誘起因子とされる Phospholipase Czeta(PLCzeta)(Saundersら2002)を放出し、卵細胞質内のカルシウムイオン濃度の変動を誘起する。これが引き金となって卵の染色体を第二減数分裂中期で維持していた卵成熟促進因子が不活化することで減数分裂が再開され、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼの不活化と精子核形態変化も相まって雌雄前核を形成し受精に至る。この一連の現象を卵活性化現象という。申請者は、これまでの研究で、ブタのICSIした卵(以下ICSI卵)において前核形成を誘導するための最も重要な要因は、卵の活性化誘起であることを明らかとしている(Nakaiら2006)。それでは、何故ブタICSI卵では前核形成不全が頻発するのだろうか。申請者は、ブタ精子PLCzetaは、マウスやラットとは異なり、精子細胞膜に損傷が生じるとすぐに細胞外に漏出するという知見を得ており(Nakaiら2011)、前核形成不全はICSIに用いる精子のPLCzeta量の不足に起因する可能性が考えられた。

一方、精子の数や運動性が乏しい場合、ICSIでしかその遺伝資源を活用することができない。そして、そのような精子がPLCzetaを保有しているとは限らないため、人為的卵活性化誘起法の開発が必要となる。従来の試薬や電気刺激などによる卵活性化誘起法は、通常受精の卵活性化現象を完全に再現するものではなく(Sunら1992)、前核形成効率も通常の受精に比べて低い。そこで、通常の受精時に生じる卵活性化現象を再現し得る人為的手法で卵の活性化を誘起することができれば、前核形成率、さらには胚発生効率の向上が期待できると考えた。

2. 研究の目的

(1) ブタICSI卵での前核形成不全の要因を解明するために、前核形成不全がICSIに用いる精子のPLCzeta不足に起因するのか、他にも何か卵活性化現象の過程に不具合が生じているのかを明らかにする。

(2) 通常の受精卵で生じる卵活性化現象の再現によるブタICSI卵の受精および胚発生効率の向上を目指して、PLCzetaを用いた新たな人為的卵活性化誘起法の開発に取り組む。

3. 研究の方法

(1) ブタ凍結融解射出精子を、40%と80%のパーコール溶液を用いたパーコール密度勾配

遠心分離法(Noguchiら2015)により、性状の良いブタ精子を収集した。そして、それらのPLCzeta保有状況を免疫蛍光染色(Nakaiら2011)により確認を行った。パーコール処理により選抜されたPLCzeta保有精子および無処理精子を、それぞれをブタ卵子にICSIし、その後の前核形成および胚盤胞への発生効率を観察した。

(2) ブタ精巣 total RNA から PLCzeta をクローニングしブタ PLCzeta mRNA を作成した。そして、ブタ卵に注入し、カルシウム濃度変動や前核形成などを指標として、その卵活性化誘起能を確認する。

さらに、無細胞系および細胞系のタンパク質合成方法を用いて PLCzeta タンパク質を合成した。そして、得られた PLCzeta タンパク質を、タンパク質導入試薬を用いて非侵襲的に卵細胞質内に PLCzeta タンパク質を導入し、卵細胞質内カルシウムイオン濃度変動や前核形成などを指標として卵活性化誘起能を評価する。

4. 研究成果

(1) パーコール処理により PLCzeta 保有精子率の高い分画を採取することができた(図1)。

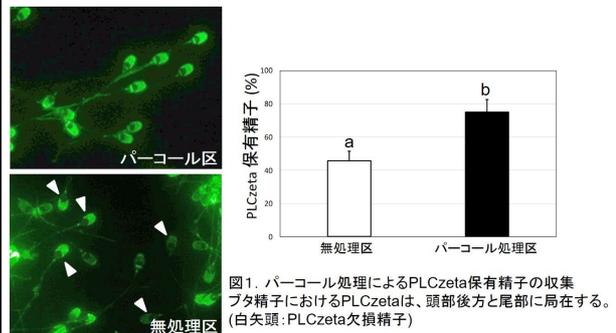


図1. パーコール処理によるPLCzeta保有精子の収集
ブタ精子におけるPLCzetaは、頭部後方と尾部に局在する。
(白矢頭: PLCzeta欠損精子)

これらの精子をブタ卵にICSIしたところ、パーコール処理区が無処理区に対して有意に高い前核形成率および胚盤胞形成率となった(図2)。

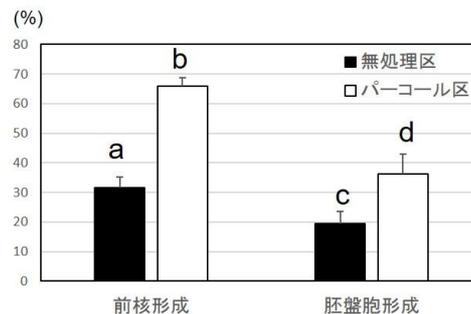


図2. 精子へのパーコール処理の有無がICSI後の受精・胚発生に及ぼす影響
(a-b間、c-d間に有意差あり(P<0.05))

以上の結果から、ブタICSI卵における前

核形成不全は、PLCzeta 保有量が不足している精子を ICSI に用いていることが主要因の一つであることが明らかとなった。

(2) ブタ卵に 300ng/ μ L PLCzeta mRNA を注入したところ、体外受精卵で生じるカルシウムイオン濃度変動と同様なパターンを示した(図3)。さらに、300ng/ μ L PLCzetamRNA

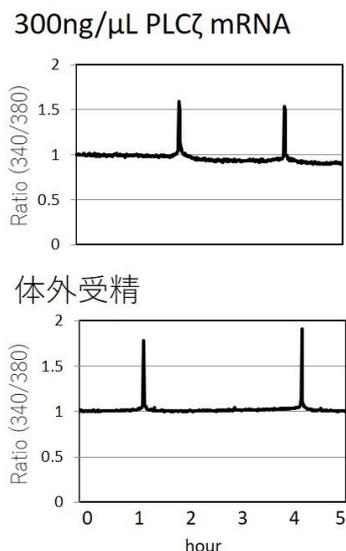


図3. 卵細胞質内カルシウムイオン濃度変動パターンの比較

注入した区では前核形成率も 79.4%となり、注入していない区(25.0%)に対して有意に高い値となった。

無細胞系のタンパク質発現システムでは PLCzeta タンパク質の合成が確認できなかった。それゆえ、菌体内でタンパク質を合成させるプレバチルス分泌発現システム(ヒゲタ醤油)を用いて PLCzeta タンパク質合成を試みた。タンパク質合成をウェスタンブロッ

ティングにて確認したところ、目的タンパク質のバンドが確認された(図4)。しかし、その後の実験に供するには合成量が不足しているのに加え、PLCzeta タンパク質の精製手法に課

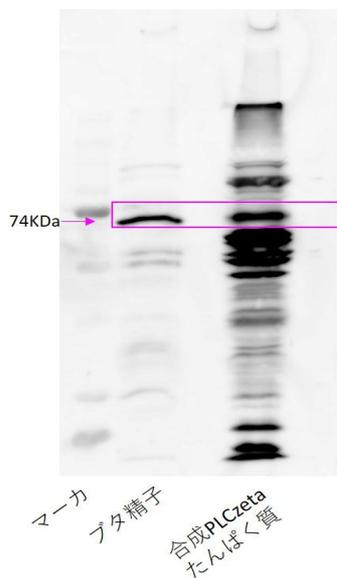


図4. プレバチルスにより合成したブタPLCzetaタンパク質

題があり、現時点では PLCzeta タンパク質による卵活性化誘起の検討に至っていない。

以上の結果から、300ng/ μ L PLCzetamRNA をブタ卵に注入することにより、通常の受精時に生じるものと同様な卵細胞質内カルシウム濃度変動パターンを誘起することができ、前核形成率を向上させることができることが分かった。なお、PLCzeta タンパク質を用いた卵活性化誘起法の確立については、引き続き検討を行っていく。

<引用文献>

Nakai et al., Biol Reprod (2003) 68: 1003-1008.
 Nakai et al., Reproduction (2006) 131: 603-611.
 Nakai et al., Reproduction (2010) 139: 331-335.
 Nakai et al., Reproduction (2011) 142: 285-293.
 Noguchi et al., Zygote (2015) 23:68-75.
 Saunders et al., Development (2002) 129: 3533-3544
 Sun et al., Development (1992) 115: 947-956.

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)

Nakai M, Ito J, Suzuki S, Fuchimoto D, Sembon S, Suzuki M, Nuguchi J, Kaneko H, Onishi A, Kashiwazaki N, Kikuchi K.

Lack of calcium oscillation causes failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection in pigs. Journal of Reproduction and Development (査読あり)2016 Dec 20;62(6):615-621. doi: 10.1262/jrd.2016-113.

Nakai M, Suzuki S, Ito J, Fuchimoto D, Sembon S, Noguchi Jm Onishi A, Kashiwazaki N, Kikuchi K.

Efficient pig ICSI using Percoll-selected spermatozoa; evidence for the essential role of phospholipase C- in ICSI success. Journal of Reproduction and Development (査読あり)2016 Dec 20;62(6):639-643. doi: 10.1262/jrd.2016-103.

[学会発表](計 2 件)

中井美智子, 伊藤潤哉, 鈴木俊一, 淵本大一郎, 千本正一郎, 野口純子, 金子浩之, 柏崎直巳, 大西彰, 菊地和弘. 卵細胞質内精子注入(ICSI)後のブタ卵における卵活性化不全の原因究明

第 106 回日本繁殖生物学会.
2016.09.11-15 麻布大学(神奈川県相模原
市)

Nakai M, Suzuki S, Ito J, Fuchimoto
D, Sembon S, Noguchi J, Kashiwazaki N,
Kikuchi K. Lack of phospholipase C ζ
causes fertilization failure after
intracytoplasmic sperm injection in pigs.
International Congress on Animal
Reproduction. 2016.06 月 27-29 Tours
(France).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中井 美智子 (NAKAI, Michiko)

国立研究開発法人農業・

食品産業技術総合研究機構・生物機能利用

研究部門 動物機能利用研究領域・研究員

研究者番号：30442825