

令和元年8月30日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04584

研究課題名(和文) 哺乳類着床・妊娠維持におけるカルシウムオシレーションの生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Role of calcium oscillations in embryo implantation and pregnancy in mammals

研究代表者

伊藤 潤哉 (Ito, Junya)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：30454143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の受精時メカニズムを解明する目的で研究を行った。その結果卵活性化因子にはPLCz以外の卵活性化因子関与する可能性があること、またカルシウムオシレーションとともに亜鉛スパークも重要であることがあきらかとなった。そこで亜鉛スパークの意義を明らかにする目的で遺伝子改変マウスを用いて卵特異的な亜鉛トランスポーター遺伝子欠損マウスを作製し、その妊孕性を確認した。その結果、卵特異的な亜鉛トランスポーター遺伝子欠損マウスでは完全には不妊とはならなかったが、産子の数が著しく減少していた。このことから、受精時において卵の亜鉛トランスポーターが重要な役割を持っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで研究されてきたすべての動物種において、受精時には卵内カルシウムの上昇が認められることから哺乳類においても受精メカニズムはカルシウムシグナルを中心に論じられてきた。本研究成果により、哺乳類の受精時におけるカルシウム上昇には卵活性化因子(PLCz)が重要なこと、また哺乳類動物種によってPLCzの活性は異なることが明らかとなった。さらにカルシウムシグナルと同様に亜鉛シグナルも哺乳類の受精において重要な役割を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In mammals, developmental ability of in vitro produced embryos is low because the molecular mechanism of fertilization still remains unclear in mammals. In this study, we focused on the oocyte-activating factor derived from sperm. Our results showed phospholipase C zeta (PLCz) has an important role in inducing calcium oscillations in the mouse. In addition, we identified PLCz has species dependent activity. Our results also showed zinc signaling as well as calcium signal has an essential role in mammalian fertilization.

研究分野：生殖生物学

キーワード：受精 着床 妊娠 カルシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ほとんどの動物の受精時には、卵内 Ca^{2+} イオンの急激な上昇が認められる。特に哺乳類では Ca^{2+} の反復上昇が誘起され、この現象は Ca^{2+} オシレーションと呼ばれている。 Ca^{2+} オシレーションが誘起されることにより、卵の減数分裂再開(卵活性化)、母性 mRNA の分解および胚性遺伝子の発現が起こる。近年、この哺乳類特異的な Ca^{2+} オシレーションの動態が、前着床期胚での遺伝子発現さらには出生後の個体の成長にまで影響を及ぼしている可能性が示唆されている(図 1)。一方、実験動物や家畜において、円形精子細胞を用いた顕微授精や体細胞核移植によるクローン作製は可能となったが、個体への発生率は通常の受精時に比べて著しく低く、さらに体細胞クローンに関しては死産、流産あるいは過大仔といった発生・成長過程における異常が報告されている。その原因として、操作した胚を発生させるためには、通常の受精機構を模倣した人為的活性化処理を行う必要があるが現在、家畜卵の活性化に用いられている方法のほとんどは、一過性の卵内 Ca^{2+} イオンの上昇しか誘起できず、 Ca^{2+} オシレーションによる卵活性化を再現できていないことが考えられていた。

2. 研究の目的

Ca^{2+} オシレーションは、精子内に存在する精子内卵活性化因子(phospholipase C zeta, PLCz)が卵細胞質内に進入することによりイノシトール 3 リン酸(IP_3)を産生し、 IP_3 が小胞体(ER)上の IP_3 受容体(IP_3R)に結合し ER に蓄えられた Ca^{2+} を卵細胞質内へ放出させることにより起こる。これらのことから PLCz と IP_3R は、 Ca^{2+} オシレーションの制御に関わる精子側・卵子側の分子としてそれぞれ研究されてきた。研究代表者は、受精時の Ca^{2+} オシレーションの制御機構について PLCz および IP_3R の機能を中心に検討を行ってきた。その結果、排卵前の卵において IP_3R はタンパク質レベルでもすでに発現しており、減数分裂の過程で IP_3R の機能が変化することにより、卵は Ca^{2+} オシレーションを誘起できる能力を獲得することをブタおよびマウスを用いて初めて明らかにした。また MAPK や PIK1 等の卵の減数分裂に関わる因子が、 IP_3R をリン酸化することで、 IP_3R の機能や局在を変化させているとも報告し、多くの哺乳動物で卵活性化時の Ca^{2+} の重要性を明らかにしてきた。これらの研究過程において、マウス精子をマウス卵に顕微注入した場合は卵活性化(前核形成)が誘起されたのに対し、ラット精子をマウス卵に注入しても卵活性化は誘起されなかった。さらに同量のマウス PLCz mRNA を異なる系統のマウス卵に注入した場合、体細胞クローンの作製等によく用いられる BDF1 マウス卵は、近交系の C57BL/6J マウス卵よりも、注入後短い時間で Ca^{2+} オシレーションが観察された。これらの結果は、 IP_3R の Ca^{2+} オシレーション誘起能は種・系統によって異なる可能性を示している。

以上の研究から、研究代表者は『哺乳類の受精時において Ca^{2+} オシレーションは、精子側(PLCz)および卵側(IP_3R)の両因子で制御されており、両因子の機能の違いが、種および系統特異的な受精現象を特徴づけている』という結論に至った。しかし『 Ca^{2+} オシレーションが受精後の胚発生、特に着床および妊娠維持にどのような影響を与えているか』および『受精メカニズムは Ca^{2+} シグナルだけが重要なのか』は不明のままであった。そこで本研究では、それぞれの実験動物(マウス)および家畜(ブタ)をモデルとして、哺乳類の Ca^{2+} 動態が受精以降の胚着床や妊娠に関わるメカニズムを明らかにする、また Ca^{2+} 動態以外の受精メカニズムがどのように関与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

過剰排卵処置をした雌マウス卵管から排卵卵子を回収し、体外受精により得られた胚を偽妊娠させた雌マウス(D3)の卵管に胚移植を行う。胚移植後、妊娠 4 日目および妊娠 5 日目のマウ

ス尾部より Chicago blue dye を注入し，着床時期・着床数をカウントする．また採取した組織を用い，ISH および免疫染色により着床関連遺伝子の発現動態を調べる．また，妊娠 6 日目および妊娠 8 日目で採取した子宮組織切片を HE 染色および Ki67 抗体を用いた免疫染色を行い，脱落膜化の程度を比較した．また ISH を用い，脱落膜化関連遺伝子の発現動態を調べた．

さらにカルシウム以外の受精メカニズムの関与を明らかにするため，近年哺乳類の受精時において亜鉛スパークが観察されたことから，亜鉛シグナルに焦点を当て，マウスおよびブタ卵活性化時における亜鉛シグナルの関与を調べた．マウスおよびブタ卵を採取後，亜鉛イオンのキレート剤を添加した培養液で培養し，胚発生を調べた．また亜鉛輸送体の卵子特異的遺伝子欠損マウスを作製・解析することで，分子レベルでの役割を調べた．

4．研究成果

哺乳類(マウス)の胚着床に関して，エストロジェンを引き金とするエストロジェンシグナル (ERα-LIF-LIF 受容体/Gp130-Stat3)が関与していることが明らかとなった．また脱落膜化においては間質の細胞増殖が認められ，脱落膜化関連因子の発現量が上昇することが明らかとなった．これらの胚着床および脱落膜化関連因子の発現は，カルシウムオシレーションを誘起させなかった卵を胚移植した際には低下しており，また胚着床数も著しく低下していた．以上のことから卵におけるカルシウムオシレーションと子宮における胚着床および脱落膜化の誘起には密接な関係があると考えられた．

また，マウスおよびブタ卵において亜鉛イオンのキレート剤で処理したところ，多くの卵が単為発生を起こし，胚盤胞へと発生した．このことから，卵内の亜鉛イオンを低下させることで，カルシウムイオンの上昇がなくても卵活性化が誘起できることが明らかとなった．そこで卵内への亜鉛イオンの取り込みについて明らかにするため，亜鉛イオン輸送体の遺伝子欠損マウスを作製・解析した．その結果，亜鉛イオン輸送体の遺伝子欠損マウスから採取した卵で妊孕性が著しく低下した．そこで遺伝子欠損マウスから卵を採取し，体外受精をおこなったところ受精率の著しい低下が認められた．以上のことから，哺乳類卵では受精までに亜鉛イオンを卵内に蓄積すること，また卵活性化時には卵内での亜鉛イオンの低下が必要なことが明らかとなった．

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Namiki T, Ito J, Kashiwazaki N. Molecular mechanisms of embryonic implantation in mammals: Lessons from the gene manipulation of mice. *Reprod Med Biol.* 2018 17: 331-342. doi: 10.1002/rmb2.12103.
2. Miura K, Matoba S, Ogonuki N, Namiki T, Ito J, Kashiwazaki N, Ogura A. Application of auxin-inducible degron technology to mouse oocyte activation with PLC . *J Reprod Dev.* 2018 64: 319-326. doi: 10.1262/jrd.2018-053.
3. Kawahara T, Okamoto N, Takae S, Kashiwagi M, Nakajima M, Uekawa A, Ito J, Kashiwazaki N, Sugishita Y, Suzuki N. Aromatase inhibitor use during ovarian stimulation suppresses growth of uterine endometrial cancer in xenograft mouse model. *Hum Reprod.* 2018 33: 303-310. doi: 10.1093/humrep/dex368.
4. Kamoshita M, Kato T, Fujiwara K, Namiki T, Matsumura K, Hyon SH, Ito J, Kashiwazaki N. Successful vitrification of pronuclear-stage pig embryos with a novel cryoprotective agent, carboxylated -poly-L-lysine. *PLoS One.* 2017 12: e0176711.

doi: 10.1371/journal.pone.0176711.

5. Kaneko H, Kikuchi K, Men NT, Nakai M, Noguchi J, Kashiwazaki N, Ito J. Production of sperm from porcine fetal testicular tissue after cryopreservation and grafting into nude mice. *Theriogenology*. 2017 91: 154-162. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.12.036.
6. Fujiwara K, Kamoshita M, Kato T, Ito J, Kashiwazaki N. Generation of rats from vitrified oocytes with surrounding cumulus cells via in vitro fertilization with cryopreserved sperm. Fujiwara K, Kamoshita M, Kato T, Ito J, Kashiwazaki N. *Anim Sci J*. 2017 88: 180-184. doi: 10.1111/asj.12666.
7. Hisamatsu S, Sakaue M, Takizawa A, Kato T, Kamoshita M, Ito J, Kashiwazaki N. Knockout of targeted gene in porcine somatic cells using zinc-finger nuclease. *Anim Sci J*. 2015 86: 132-7. doi: 10.1111/asj.12259.
8. Sathanawongs A, Fujiwara K, Kato T, Hirose M, Kamoshita M, Wojcikiewicz RJ, Parys JB, Ito J, Kashiwazaki N. The effect of M-phase stage-dependent kinase inhibitors on inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1 (IP3 R1) expression and localization in pig oocytes. *Anim Sci J*. 2015 86: 138-47. doi: 10.1111/asj.12258.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：柏崎 直巳

ローマ字氏名：(KASHIWAZAKI, naomi)

所属研究機関名：麻布大学

部局名：獣医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：90298232

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。