

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11222

研究課題名(和文) グリシンレセプター作動薬による胚発生率向上作用機序の解明と卵子老化予防への応用

研究課題名(英文) Mechanism of Glycine Receptor Agonist Effect on Embryonic Development and Application to the Prevention of Oocyte Aging

研究代表者

西園 啓文(Nishizono, Hirofumi)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：10502289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウス受精卵でグリシンレセプター 4サブユニットが発現しており、その機能を阻害剤あるいは遺伝子破壊で阻害すると、受精卵の発生が4細胞期以降で停止することを発見した。これらのことからこれまでグリシンレセプター 4サブユニットがマウス受精卵の初期発生に重要であることを初めて明らかにし、この成果はReproduction誌に報告した。またグリシンレセプターの機能を亢進することで、低発生率受精卵の発生率が改善することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまで哺乳類では機能が明らかになっていなかったグリシンレセプター 4がマウスの受精卵で発現しており、さらに4細胞期以降の発生に重要であることを示したこと、またその機能亢進により受精率の向上効果が期待できることを示した点で重要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that the glycine receptor 4 subunit was expressed in mouse fertilized eggs. Also, the inhibition of the glycine receptor 4 subunit function by inhibitors or gene disruption caused embryonic development to stop after the 4-cell stage. Furthermore, we have shown that enhancing glycine receptor function improves the developmental rate of low-developmental-rate fertilized eggs. Thus, we have shown that the glycine receptor 4 subunit is essential for early development.

研究分野：発生工学

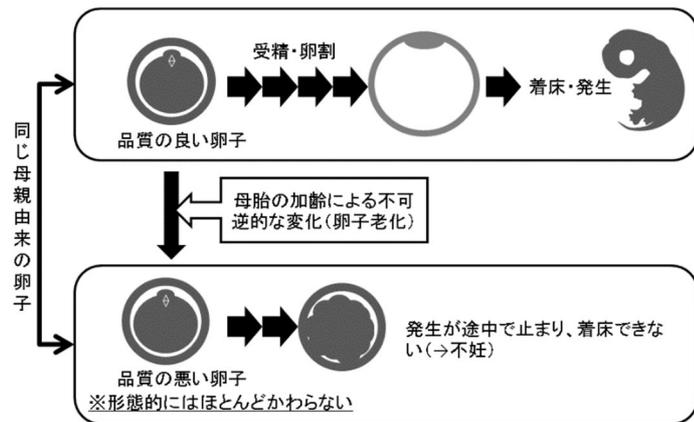
キーワード：卵子老化 グリシンレセプター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトやウシ、マウスなど多くの哺乳類では、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/embryo 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(右図, Tilly JL, Sinclair DA. Cell Metab. 2013)。さらに最近、ヒト体外受精培地の成分が着床率や出産後の新生児



体重などに影響するという報告がなされ、受精卵の品質とその培養環境について議論が高まっている(Kleijkers SH et al. Hum Reprod. 2016)。

これまで哺乳類の卵子や受精卵の品質には、染色体分離装置の正常性や、ミトコンドリア呼吸活性の違いなどが関与すると示唆されてきた。本研究はそれらとは異なる因子の検討を行うと同時に、「低品質の受精卵でも、高率に胚盤胞期まで培養し、着床の機会を向上させる技術」につなげるという点で独創的であり、晩婚化の進むわが国において重要な研究テーマである。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、「受精卵の品質を決める因子は何か?」という疑問について、実験動物であるマウスを用いて研究を行っており、代表的なマウスであるC57BL/6マウスでは90%以上の受精卵が胚盤胞期胚に到達するのに対して、小脳の発達障害を持つDBA/2系統では受精卵の20%以下の胚しか胚盤胞期に達しないこと、また、受精卵品質の指標の一つであるミトコンドリアの活性も、桑実胚から胚盤胞期胚の間で、DBA/2マウス胚のミトコンドリア活性が著しく低下していることなどを明らかにしてきた(Nishizono H et al, JAALAS 2016)。次に、胚盤胞形成率の低いDBA/2マウス受精卵を「低品質受精卵のモデル」として、胚盤胞形成率の高いC57BL/6マウス受精卵を「高品質受精卵のモデル」として用い、キャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)を使った網羅的メタボローム解析を行ったところ、ATPなどについては顕著な差はなかったものの、アミノ酸代謝中間物質に顕著な差が見出された(西園, 臨床獣医 2015; 西園, 日本胚移植研究会雑誌 2012)。そこで、これらのアミノ酸および代謝中間体について、過剰量添加による機能強化実験と阻害剤を用いた機能欠損実験を実施した。その結果、アミノ酸受容体の中でも、グリシンレセプター(GlyR)を阻害することで胚発生が完全に止まることを見出した。グリシンレセプターは、抑制性の神経伝達に関わるだけでなく、精子膜上でも受精に関わる重要な働きをもつ

ていることが分かっているが (Sato Y et al, Dev Biol. 2000) 卵子や受精卵でも機能をもっていたという点は、非常に興味深い発見である。

そこで本研究では、グリシンレセプター作動薬による低品質受精卵の胚発生率改善効果について、より詳しいメカニズムを解析し、応用研究に繋げることを目的として、(1) CRISPR/Cas9 を用いた GlyR 特定サブユニット欠損モデル受精卵の作製・解析することで、グリシンレセプターの胚発生時における役割を明らかにし、またグリシンレセプター作動薬で初期発生を制御することが可能かどうかを検証する。また(2) グリシンレセプター作動薬が受精卵の発生率向上効果があるかどうかの検討を、マウス受精卵だけでなくウシ受精卵でも実施し、受精卵の発生補助薬として応用可能であるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 を用いた GlyR 特定サブユニット欠損モデル受精卵の作製・解析

グリシンレセプターは2つの α サブユニットと、3つの β サブユニットからなる5量体であり、さらに α サブユニットには $\alpha 1 \sim \alpha 4$ までのサブファミリーが部位あるいは時期特異的に働いているとされる。そこで、まずマウス受精卵で特異的に働いている GlyR サブユニットを特定し、その後、比較的容易に1つあるいは複数の遺伝子機能を欠損することができる CRISPR/Cas9 を用い、マウス受精卵特異的 GlyR サブユニットを欠損させた「特定 GlyR サブユニット欠損モデル受精卵 (GlyR KO 受精卵)」を作製し、その機能を解析する。

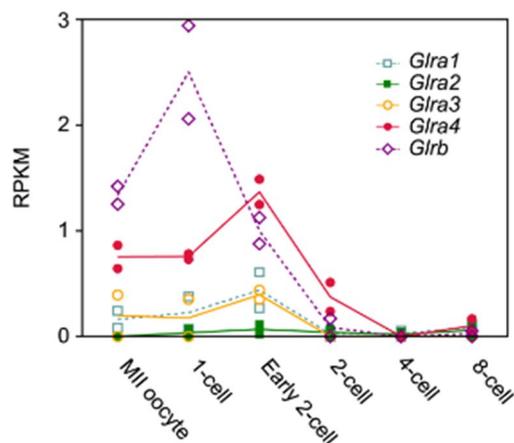
(2) グリシンレセプター作動薬の哺乳類の発生率向上効果の検討

グリシンレセプター作動薬を介した塩化物イオンの胚への流入が哺乳類受精卵にとって胚発生の亢進となるかどうかの検討を、マウス受精卵およびウシ受精卵を使って検討する。

4. 研究成果

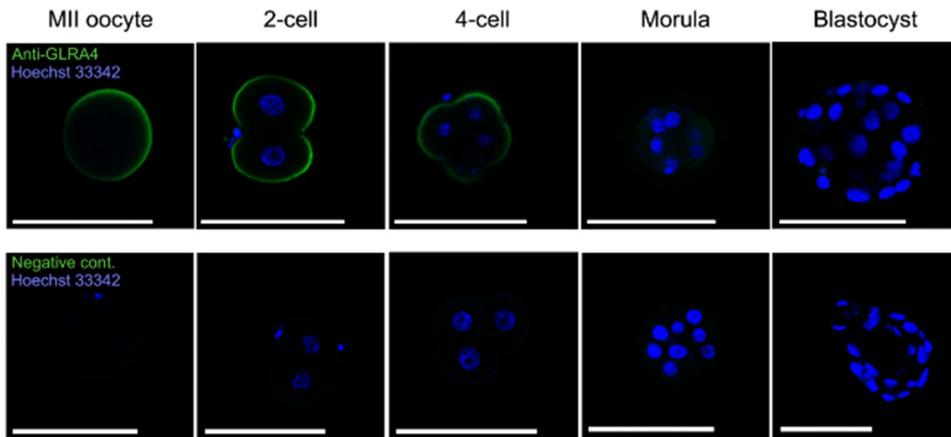
(1) CRISPR/Cas9 を用いた GlyR 特定サブユニット欠損モデル受精卵の作製・解析

はじめにマウス受精卵において、グリシンレセプターのどのサブユニットが発現しているかを調べるために RNA-seq データの解析を実施した。その結果、下図のようにサブユニット (Glrb) が未受精卵で発現しており、さらに4サブユニット (Glr4) が2細胞期をピークに未受精卵から4細胞期まで発現していることがわかった。興味深いことに、Glr4 遺伝子はヒトでは細胞膜貫通ドメインの一部を持っておらず偽遺伝子であると言われており、哺乳類での機能解析がほとんど行われていない。また、Glrb 遺伝子は体細胞や精子細胞膜など広く全身に発現していることがすでに明らかになっているため、本研究では Glr4 遺伝子を中心に解析することとした。



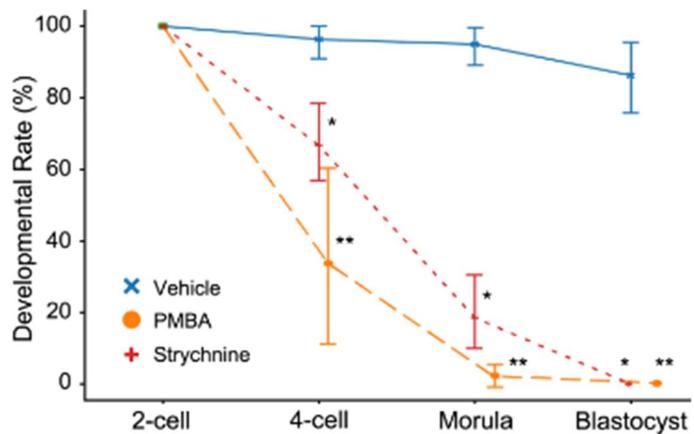
次にこのグリシンレセプターの発現パターンをタンパク質レベルで確認するために、Glr4 特異抗体を用いて免疫組織化学染色を実施した。

その結果、Glr4 タンパク質は未受精卵から発現し、その発現量は 2 細胞期でピークを迎え、4 細胞期まで発現していることがタンパク質レベルでも確認できた（下図、サイズバ
ー 100 μ m）。

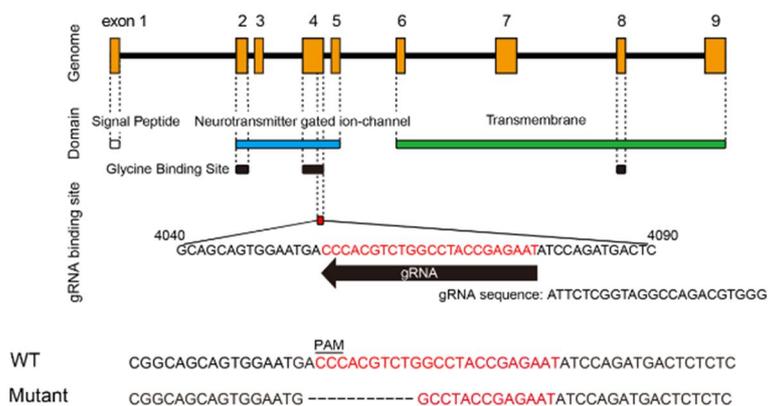


これらのグリシンレセプターサブユニットの機能を解析するために、まず二つの阻害薬（strychnine, PMBA）を使って、機能阻害実験を行った（下図）。その結果、strychnine、PMBA とともに 4 細胞期以降で強力に発生を阻害することがわかった。

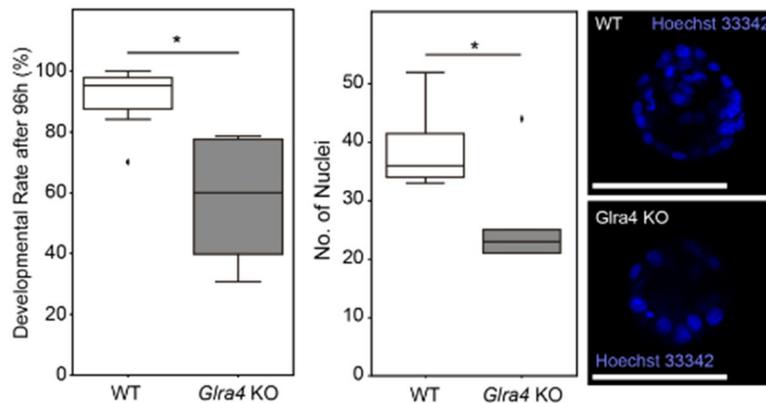
しかし、この阻害が細胞膜や細胞内小器官の破壊などは起こっておらず、顕微鏡下の受精卵はほぼ正常なままであった。これらのことから、グリシンレセプター阻害薬はその細胞毒性で受精卵を破壊するのではなく、グリシンレセプターの機能阻害によって発生が停止することが示唆された。



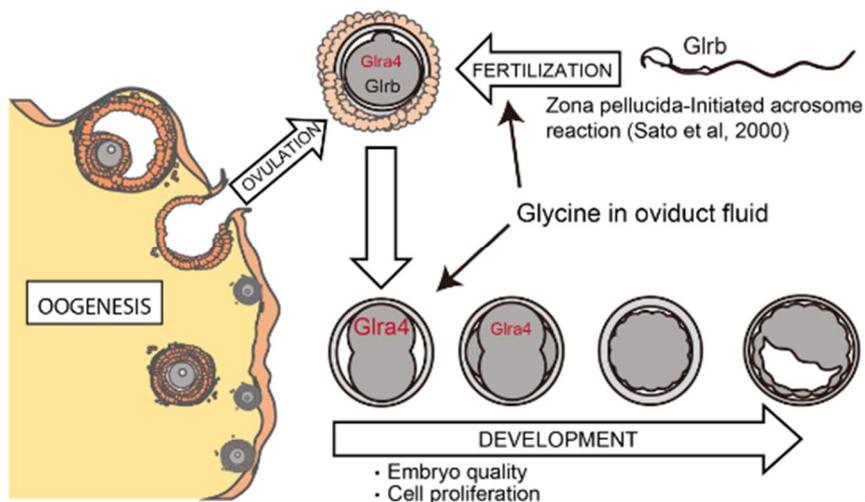
この現象をさらに確認するために、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を使い、Glr4 遺伝子欠損マウスを作製し、その受精卵の発生がどのように変化するかを解析した。マウスの Glr4 タンパク質は細胞膜貫通型のイオンチャネル型レセプターであるため、本研究ではその膜貫通ドメインを破壊することで Glr4 タンパク質が細胞膜に発現しないようにゲノムを欠損させるように gRNA を設計した。その結果、下図のように第 4 エキソンに 11 塩基の欠損を持ち、細胞膜貫通ドメインをすべて持っていない変異体マウスを作製することに成功した（Glr4 KO）。



この *Gla4* KO マウスを解析すると、排卵される卵子の数は野生型マウスおよび *Gla4* KO マウスで差はなかった。しかし、胚盤胞までの発生率は有意に低下しており（下左図）、さらに胚盤胞期胚の細胞数も有意に少ないことがわかった（下右図）。



さらに、この *Gla4* KO マウスでは自然交配での一回の分娩で生まれる子マウスの数が、野生型マウスの 9 匹に比べて、3 匹と著しく少ないことがわかった。これらのことから、*Gla4* は卵子形成・成熟および排卵には影響せず、2 細胞期から 4 細胞期までの発生に関与することが示唆された（下図）。これまで *Gla4* のマウスでの機能は明らかになっておらず、本研究が初めての報告であり、*Reproduction* 誌に掲載された（Nishizono H et al, *Reproduction* 2020 Jan;159(1):41）。



（ 2 ）グリシンレセプター作動薬の哺乳類の発生率向上効果の検討

受精卵でのグリシンレセプター 4 の機能が明らかになったため、次にグリシンレセプター 4 の作動薬がマウス受精卵の発生率を向上させ、生殖補助医療に応用できるかを検討した。結果は低発生率受精卵のモデルである DBA/2 マウス受精卵の発生率を約 2 倍に向上することが可能であることが明らかになった。さらにウシの低発生率受精卵に同様の実験を行ったところ、マウスほど顕著でないものの、効果を確認することができた。この結果については、特許出願を行った（PCT/JP2014/77486）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishizono Hirofumi, Darwish Mohamed, Uosaki Hideki, Masuyama Nanami, Seki Motoaki, Abe Hiroyuki, Yachie Nozomu, Yasuda Ryohei	4. 巻 1
2. 論文標題 Use of Freeze-thawed Embryos for High-efficiency Production of Genetically Modified Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/60808	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishizono Hirofumi, Darwish Mohamed, Endo Takaho A, Uno Kyosuke, Abe Hiroyuki, Yasuda Ryohei	4. 巻 159
2. 論文標題 Glycine receptor 4 subunit facilitates the early embryonic development in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 41 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-19-0312	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Darwish Mohamed, Nishizono Hirofumi, Uosaki Hideki, Sawada Hitomi, Sadahiro Taketaro, Ieda Masaki, Takao Keizo	4. 巻 317
2. 論文標題 Rapid and high-efficient generation of mutant mice using freeze-thawed embryos of the C57BL/6J strain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Methods	6. 最初と最後の頁 149 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.01.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishizono H, Uno K, Abe H.	4. 巻 56
2. 論文標題 Cleavage Speed and Blastomere Number in DBA/2J Compared with C57BL/6J Mouse Embryos	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the American Association for Laboratory Animal Science	6. 最初と最後の頁 11-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 西園啓文
2. 発表標題 Glycine Receptor 4 Subunit Supports The Early Development Of Mouse Embryos.
3. 学会等名 52nd SSR Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mohamed Darwish
2. 発表標題 Generation of glycine receptor alpha 4 knockout mice using high-efficient modified CRISPR-Cas9 protocol.
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西園啓文
2. 発表標題 Generation and Characterization of Glycine Receptor Alpha 4 Knockout Mice.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西園啓文
2. 発表標題 分子探索支援により明らかになったグリシンレセプター 4サブユニットの卵子および脳での機能
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム・若手支援技術講習会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mohamed Darwish
2. 発表標題 Generation of Glycine Receptor Alpha 4 knockout Mice Using High-efficient Modified CRISPR-Cas9 Protocol.
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----