

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06363

研究課題名(和文) 鳥類卵の受精における多精防止の分子機構の解明と鳥類卵の長期保存法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of polyspermy block system in avian eggs and development of a long-term preservation method for avian egg

研究代表者

水島 秀成 (Shusei, Mizushima)

北海道大学・理学研究院・助教

研究者番号：20515382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、多精受精動物であるウズラの卵賦活化(卵の発生開始)に関わるシグナリングの解析を中心に行った。ウズラの卵賦活化に必須である2つのCa²⁺増加反応(一過性型と反復振動型)を仲介する3つの母性Ca²⁺受容体を同定することに成功を収めるとともに、卵の減数分裂再開シグナリングの活性化には一過性型のCa²⁺波のみが関与することを突き止めた。また雌性核との融合に与らない精子核の分解に、卵由来の核分解酵素は関与しないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1細胞期受精卵を材料とした哺乳類生命工学技術を鳥類へ外挿するという点で、鳥類に特異な多精受精シグナリングの解析は必要不可欠な研究課題である。特に「受精直後に起こる卵由来DNA分解酵素の消失」という発見は、ゲノム編集ウズラを作出する上で、重要な知見として働いた。また本課題では、これまでに成功例を見ていない「受精能を保持した未受精卵」の保存法の確立にも成功を収め、これらの応用は新規鳥類生命工学技術の発展・構築に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the analysis of molecular signaling related to egg activation (initiation of egg development) in Japanese quail, a polyspermy animal. We successfully identified three maternal Ca²⁺ receptors that mediate two Ca²⁺-increasing responses (transient and spiral-like oscillation) essential for quail egg activation and found that only transient Ca²⁺ signaling activates meiotic resumption signaling in the eggs. It was also found that egg derived deoxyribonucleases are not involved in the degradation of sperm nuclei that are not fused with female nucleus.

研究分野：鳥類生殖工学

キーワード：ウズラ 受精 卵賦活化 ゲノム編集 卵の保存

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物における受精の仕組みは無脊椎動物から哺乳類に至るまで種を超えて保存されているが、脊椎動物では受精成立のために2つの異なる戦略をとっている。1つは単精受精で、1個の精子のみが卵内に侵入する(魚類、無尾目両生類、真獣類哺乳類)。これらの動物卵では、最初の精子が卵内に侵入すると、卵細胞外での多精拒否反応が機能し、第2以降の精子の侵入が阻止される。もう1つは生理的多精受精で、多精拒否機構が備わっていないため、1個の卵内に複数の精子が連続的に侵入する(板鰓類魚類、有尾目両生類、爬虫類、単孔類哺乳類、鳥類)。鳥類の場合、卵内に侵入した複数の精子のほとんどが雄性前核へと変化するが、実際に雌性核と融合できる雄性前核は1個のみ(主雄性前核)であるため、2倍体での発生が保障されている。その他の余剰雄性前核は、生殖盤の辺縁部に押し出された後、初期の卵割時に分解される運命にあり、これは多精受精動物の中でも鳥類に特異な現象として知られている。しかしながら、何故複数の精子が卵内に侵入する必要があるのか、卵内においてどのようにして主雄性前核が選択されているのか、またどのようにして余剰雄性前核のみが分解されるのか、それらの卵内分子機構についてはまったく理解されていなかった(引用文献1)。

(2) これまでに我々は、ウズラの受精時に卵細胞質内に放出される精子由来の卵賦活化因子として、ホスホリパーゼCゼータ(phospholipase C zeta: PLCZ1)、クエン酸合成酵素(citrate synthase: CS)およびアコニット酸ヒドラターゼ(aconitate hydratase2: ACO2)を同定することに成功し、卵の減数分裂の再開にはそれぞれのタンパク質が精子100個分含有量以上必要であることを明らかにしてきた。またPLCZ1が生み出す卵細胞質内におけるCa²⁺ウェーブやCSとACO2が生み出すスパイラル様Ca²⁺オシレーションが、それぞれ卵減数分裂の再開と受精胚の第一卵割細胞周期の進行に重要な役割を果たしていることも突き止めてきた(引用文献2)。しかし、Ca²⁺ウェーブやスパイラル様Ca²⁺オシレーションの惹起に関わる母性因子等を含めた卵内受精シグナリングの詳細は未だ十分に分かっていない。特に鳥類卵に特異に発現する核分解酵素(deoxyribonuclease: DNase)の精子・卵核に与える影響やその回避(引用文献3)における詳細な解析は、主雄性前核の選択や余剰雄性前核の分解機構の解明の一助となるだけでなく、clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 (CRISPR/Cas9)やtranscription activator-like effector nucleasesといった外来人工制限酵素核酸を1細胞期卵への導入する上で重要な研究課題である。

2. 研究の目的

本研究では、本研究代表者の注目した“鳥類における多精受精成立機構”の全貌を明らかにすることを目的に、①精子由来卵賦活化因子であるPLCZ1、CS、ACO2による卵細胞質Ca²⁺濃度増加反応を仲介する母性Ca²⁺受容体の同定およびその後のCa²⁺シグナルカスケード解析、②配偶子DNaseの発現動態解析をウズラ卵を用いて行った。さらに③卵細胞質内精子注入法(intracytoplasmic sperm injection: ICSI)によって作出した1細胞期ウズラ卵にcyclin D1(CCN1)遺伝子座をターゲットとするCRISPR/Cas9システムの導入解析を行うとともに、④これまで不可能であった鳥類未受精卵の長期間保存を可能にする新技術の開発に着手することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 母性Ca²⁺受容体の同定およびCa²⁺シグナルカスケード解析: 排卵直後のウズラ卵の胚盤からtotal RNAを抽出し、発現するCa²⁺受容体をRT-PCR法によって同定した。また発現の見られた受容体のタンパク質発現を特異的抗体を用いて検出するとともに、PLCZ1、CS、ACO2 cRNA投与後におけるタンパク質発現の変動を調査した。さらにその後の減数分裂の再開を司る母性因子群の解析を実施した。

(2) DNase発現動態解析: DNaseに対する特異的抗体を用いて射出精子および排卵直後の卵胚盤における発現解析を行うとともに、受精に伴うそれらの発現変化等を制御する分子群の同定を目指してプロテオーム解析を実施した。

(3) CRISPR/Cas9によるCCN1遺伝子座ゲノム編集ウズラ胚の解析: CCN1タンパク質をコードする領域をターゲットとするsgRNAを作製し、それをCas9 cRNAとともにICSIによって作成した1細胞期受精卵に投与した。またその後における発生および胚ゲノム解析を分子生物学的手法を駆使して実施した。

(4) 未受精卵の長期保存法の開発: 排卵直後の卵を採取し、その採取卵を各種プロテアーゼ阻害剤の存在下で(15°C)数日間暴露した。処理卵の受精能を確認するため、PBSで洗浄後、ICSI

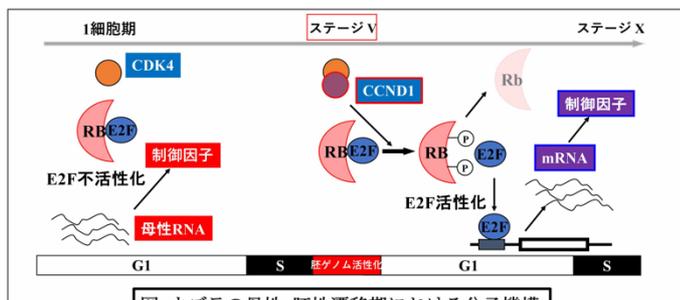
処理・24時間の体外培養を行った。

4. 研究成果

(1) 母性Ca²⁺受容体の同定とCa²⁺シグナルカスケード解析: 排卵されたウズラ卵におけるCa²⁺受容体、イノシトール三リン酸受容体 (ITPR) とリアノジン受容体 (RYR) のアイソフォームの発現をRT-PCR法を用いて解析した結果、ITPRタイプ1 (ITPR1) とタイプ3 (ITPR3) およびRYRタイプ3 (RYR3) の発現が認められ、また抗体を用いたウェスタンブロット解析からそれらのタンパク質発現も認められた。また母性ITPR1とITPR3の分解はPLCZ1 cRNAの単独投与によって惹起され、重要にもその完全分解は一過性のCa²⁺増加が終了する時刻と一致していた。さらにITPR1およびITPR3によって増加した一過性のCa²⁺シグナルは、c-MOSやcyclin B (CCNB)の分解を介して、卵の第二減数分裂の再開を誘起していることがわかった。対照的にRYR3の分解は、PLCZ1 cRNAの注入では惹起されず、CSおよびACO2 cRNA注入後3時間(第一卵割の開始時)においてのみ誘発された。またRYR3によるスパイラル様Ca²⁺オシレーションシグナルは、c-MOSやCCNBの分解に寄与しないこともわかった。

(2) DNase発現動態解析: DNase抗体を用いた免疫化学解析を実施した結果、射出精子では頭部の核領域に、排卵直後の卵胚盤の細胞質に局在していることがわかった。この特徴に加え、母性DNaseはユビキチン化されているのに対して(U-DNase)、精子由来の産物にそのような化学修飾は確認されなかった。しかしながら、精子由来DNase、U-DNase共に精子DNAに対する分解能は保持されていた。また自然交配に得られた受精卵のU-DNaseは受精直後に分解されることが判明し、この分解は精子由来CSおよびACO2の投与によって人為的に再現できることがわかった。さらに卵細胞質には複数のプロテアソームタンパク質が発現しており、これらによるDNaseの分解は、精子由来CS、ACO2が母性プロテアソーム関連タンパク質との結合を介して惹起されることがわかった。一方、精子由来のDNaseは精子頭部と共に卵細胞質に取り込まれることがわかったが、その後の動態については現在調査中である。

(3) CCND1遺伝子座ゲノム編集ウズラ胚の解析: ウズラ卵割ステージの初期胚において、ステージV以降にCCND1 mRNAおよびそのタンパク質発現が認められた一方で、CCND1のリン酸化ターゲットタンパク質である母性retinoblastoma (Rb)の分解がステージVIから誘起されていた。またCRISPR/Cas9システムによりCCND1遺伝子座がゲノム編集されたウズラ胚の全てが、ステージVでの発生停止を示すとともに、Rbの分解も起こっていなかった。さらにRb抗体を用いた免疫沈降解析から、CCND1の存在下で、Rb構成アミノ酸であるセリン・スレオニンがリン酸化されることがわかり、それが起点となって母性Rbは分解されることがわかった。Rbは転写因子であるE2Fの抑制因子として作用することが知られており、Rbの分解が亢進されているステージV以降においてはE2Fによる胚ゲノムの転写が活性化されていることが予想される(図)。ステージVから発現が見られるmRNAの存在やステージVのみで観察されるRbやCCND1の核局在移行もこの仮説をサポートする。



(4) 未受精卵の長期保存法: Protein kinase Aおよびprotein kinase Cの阻害剤を排卵直後の卵に混合暴露することで、最低でも2日間保存した未受精卵に、ICSIによる受精・発生能が保持されていることを突き止めた。対照的に、阻害剤を暴露していない無添加培地で保存した卵に、受精・発生能は認められなかった。

<引用文献>

1. Mizushima S. Polyspermic fertilization 2. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1007:105-123, 2017.
2. Mizushima S, Hiyama G, Shiba K, Inaba K, Dohra H, Ono T, Shimada K, Sasanami T. The birth of quail chicks after intracytoplasmic sperm injection. Development, 141: 3799-3806. 2014.
3. Stepińska U, Olszańska B. DNase I and II present in avian oocytes: a possible involvement in sperm degradation at polyspermic fertilization. Zygote, 11: 35-42, 2003.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mizushima, S., Sasanami, T., Ono, T., Kansaku, N., Matsuzaki, M., and Kuroiwa, A.	4. 巻 476
2. 論文標題 Cyclin D1 gene expression is essential for cell cycle progression from the maternal-to-zygotic transition during blastoderm development in Japanese quail	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 249-258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2021.04.005.	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 Okuno, M., Mizushima, S., Kuroiwa, A., and Itoh, T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Analysis of Sex Chromosome Evolution in the Clade Palaeognathae from Phased Genome Assembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 evab242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/gbe/evab242	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 -

1. 著者名 Mizushima, S., Sasanami, T., Ono, T., Kansaku, N., and Kuroiwa, A.	4. 巻 59
2. 論文標題 Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor-1 and -3 and ryanodine receptor-3 may increase ooplasmic Ca ²⁺ during quail egg activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 175-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0210041	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 -

1. 著者名 Okuno M, Miyamoto M, Itoh T, Seki M, Suzuki Y, Mizushima S, Kuroiwa A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Expression profiling of sexually dimorphic genes in the Japanese quail, Coturnix japonica.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20073
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-77094-y	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 -

1. 著者名 Matsuzaki M, Hirohashi N, Tsudzuki M, Haqani MI, Maeda T, Mizushima S, Sasanami T.	4. 巻 100
2. 論文標題 Longer and faster sperm exhibit better fertilization success in Japanese quail.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Poultry Science	6. 最初と最後の頁 100980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psj.2021.01.003	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 Matsuzaki M, Hirohashi N, Mizushima S, Sasanami T.	4. 巻 227
2. 論文標題 Effect of sperm surface oligosaccharides in sperm passage into sperm storage tubules in Japanese quail (<i>Coturnix japonica</i>).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Reproduction Science	6. 最初と最後の頁 106731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anireprosci.2021.106731	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 Matsuzaki, M., Mizushima, S., Dohra, H., Sasanami, T.	4. 巻 57
2. 論文標題 Expression of transferrin and albumin in the sperm-storage tubules of Japanese quail and their possible involvement in long-term sperm storage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 88-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2141/jpsa.0190049	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 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 水島秀成, 笹浪知宏, 小野珠乙, 神作宜男, 松崎芽衣, 黒岩麻里
2. 発表標題 ウズラ初期胚の母性-胚性遷移期における retinoblastoma 分解シグナリング解析
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 程田大智, 水島秀成, 奥野未来, 伊藤武彦, 黒岩麻里
2. 発表標題 ニホンウズラ (Coturnix japonica) におけるW染色体遺伝子の機能解析
3. 学会等名 染色体学会第72回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水島秀成, 塚田光, 笹浪知宏, 小野珠乙, 黒岩麻里
2. 発表標題 ウズラDAZL (deleted in azoospermia-like) mRNAの3' -UTRに結合するタンパク質の解析
3. 学会等名 第45回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹浪知宏, 松崎芽衣, 高塚夢々, 水島秀成
2. 発表標題 精子貯蔵管への精子侵入を阻害するタンパク質
3. 学会等名 第45回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹浪知宏, 松崎芽衣, 水島秀成
2. 発表標題 ウズラの精子表面で精子貯蔵管への精子侵入に関与するタンパク質
3. 学会等名 日本家禽学会2022年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水島秀成, 黒岩麻里
2. 発表標題 ウズラ胚の母性-胚性遷移期におけるサイクリンDの役割
3. 学会等名 第6回北大・部局横断シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水島秀成
2. 発表標題 鳥類多精受精における主精子選択と余剰精子排除メカニズムに関する研究
3. 学会等名 第21回日本畜産学会若手企画シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水島秀成, 塚田光, 笹浪知宏, 小野珠乙, 黒岩麻里
2. 発表標題 ウズラ初期胚におけるDAZL (deleted in azoospermia-like) の発現解析
3. 学会等名 第44回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市川佳伸, 松崎芽衣, 水島秀成, 笹浪知宏
2. 発表標題 ウズラの精子-卵子相互作用におけるAnnexin6の役割
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎芽衣, 水島秀成, 広橋教貴, 堀内浩幸, 笹浪知宏
2. 発表標題 ウズラの精子表面の糖鎖が精子貯蔵管への精子侵入へ果たす役割
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水島秀成
2. 発表標題 ウズラの性染色体遺伝子ノックアウト技術の開発
3. 学会等名 遺伝研研究会「有性生殖にかかわる染色体・クロマチン・核動態に関する研究会」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizushima, S., Sasanami, T., Ono, T., Kuroiwa, A.
2. 発表標題 The role of inositol-trisphosphate receptors during egg activation in Japanese quail
3. 学会等名 The 2nd International conference on Tropical Animal Science and Production 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹浪知宏, 松崎芽衣, 水島秀成
2. 発表標題 ウズラ精子のダイニンATPase活性
3. 学会等名 日本家禽学会2019年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水島秀成, 佐藤望, 塚田光, 笹浪知宏, 小野珠乙, 黒岩麻里
2. 発表標題 ウズラの生殖腺における生殖細胞特異的遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本淳太郎, 奥野未来, 伊藤武彦, 水島秀成, 黒岩麻里
2. 発表標題 ニホンウズラにおける性分化関連遺伝子および新規性決定候補遺伝子の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水島秀成, 塚田光, 笹浪知宏, 小野珠乙, 黒岩麻里
2. 発表標題 雄ウズラの生殖腺におけるDAZLの発現解析
3. 学会等名 日本家禽学会2020年度春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

水島秀成 鳥類の不思議な受精機構
<https://www2.sci.hokudai.ac.jp/faculty/researcher/shusei-mizushima>
 北海道大学大学院理学研究院HP
<https://www2.sci.hokudai.ac.jp/faculty/researcher/shusei-mizushima>

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
研究協力者	黒岩 麻里 (Kuroiwa Asato)		
研究協力者	笹浪 知宏 (Sasanami Tomohiro)		
研究協力者	小野 珠乙 (Ono Tamao)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関