

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06386

研究課題名（和文）卵活性化因子PLCzeta欠損モデルを用いたブタ卵活性化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of pig oocyte activation mechanism using Phospholipase Czeta deficiency model

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・上級研究員

研究者番号：30442825

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ブタにおける卵活性化機構の解明を目的として、Phospholipase C（PLCzeta）が唯一の卵活性化因子（sperm factor）なのかを検証した。そして、PLCzetaとともにsperm factor候補として挙げられているPost-Acrosomal WW Binding Protein（PAWP）はsperm factorである可能性が低いことを示唆する結果を得た。引き続き、PLCzetaノックアウトモデルを用いて、その他の因子についても検証を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Sperm factorの正体については長年議論されてきており、PLCzetaとともにsperm factor候補とされてきたPAWPが少なくとも主たるsperm factorとして機能していない可能性を示唆する本研究成果は、議論に一石を投じるものとなる。さらに、哺乳類の代表的なモデルとされるマウスとは大きく異なる卵活性化現象が生じるブタでのsperm factorに関する本研究成果は、哺乳類の卵活性化機構における動物種間でのバリエーションを示す生物学的に意義深いものともいえる。また、顕微授精など卵活性化誘起法に課題のある生殖補助技術の発展にも寄与する。

研究成果の概要（英文）：In this study, I investigated whether Phospholipase Czeta is the only sperm factor to elucidate the mechanism of oocyte activation in pigs. I then obtained the data suggested that Post-Acrosomal WW Binding Protein (PAWP), which has been considered to be one of the candidate sperm factor as well as PLCzeta, was unlikely to be sperm factor. I will continue investigation focused on other factors using knock down or knock out models of PLCzeta.

研究分野：家畜繁殖

キーワード：卵活性化 PLCzeta ブタ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景：本研究課題の申請時における背景・動機について、簡潔に記入すること。

哺乳類における通常の受精では、精子と卵子の膜融合に伴い卵子内で Ca^{2+} 濃度の一過性の上昇が反復して生じる Ca^{2+} オシレーションが誘起される。これが引き金となって第二減数分裂中期で停止している卵子が活性化し、一連の受精現象が進行する卵細胞質内精子注入 (ICSI) 技術は、精子を卵子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り、家畜の品種改良や優良家畜の遺伝資源の保存のための強力なツールとなる。しかし、ブタでの ICSI では、注入精子による卵活性化が十分に誘起されず前核形成不全による受精の失敗が頻発する。それを補うために、電気刺激や試薬を用いた人為的卵活性化が施されているが未だに前核形成率が低い。これは、現行の人為的卵活性化法では単発の Ca^{2+} 上昇しか誘起できず、通常の受精で生じる Ca^{2+} オシレーションの様式とかけ離れているためと考えられる。それゆえ、通常の受精で精子が誘起する卵活性化を再現する人為的活性化法を開発することができれば、ICSI による前核形成率の向上が期待できる。しかし、精子がどのように卵子を活性化させているか完全には分かっていない。現在、卵子との膜融合時に精子が卵活性化因子を卵子内に放出し卵を活性化させると考えられており、その因子として加水分解酵素 Phospholipase C zeta (PLCzeta) が最有力候補とされているが、他の因子や卵活性化機構を示唆する報告もなされている。

2. 研究の目的：研究の目的 本研究課題の申請時における当初の研究目的について、簡潔に記入すること。

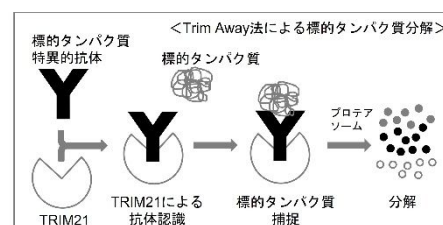
ブタにおける卵活性化機構の解明を目的として、主たる sperm factor として機能すると考えられる PLCzeta を欠損させることで、PLCzeta 以外の因子が卵活性化に寄与しているかを明らかにする

3. 研究の方法：研究の方法 本研究課題の研究方法について、その具体的内容を簡潔に記入すること。

(1) PLCzeta 以外の sperm factor の探求

Trim-Away 法による PLCzeta ノックダウン

受精時の PLCzeta による卵活性化を阻害するため、Tripartite motif-containing protein-21 (TRIM21) に抗体を結合させ標的タンパク質を分解する Trim-Away 法による PLCzeta ノックダウンを試みた (右図参照)。まず、ブタ PLCzeta モノクローナル抗体を作成し、精子 PLCzeta に対する特異性を免疫蛍光染色で確認する。次に、その抗体で Trim-Away システムが機能



することを評価するために、Cos7 細胞に PLCzeta 発現ベクター、TRIM21 発現ベクター、PLCzeta モノクローナル抗体をエレクトロポレーションし、PLCzeta 量が減ることをウェスタンブロッティングで確認する。また、ブタ卵子内でも Trim-Away が機能するかを評価するために、PLCzeta mRNA、TRIM21 mRNA、PLCzeta モノクローナル抗体を注入し、体外培養後の前核形成を調べることで PLCzeta による卵活性が阻害されたかを確認する。卵子内でも Trim-Away が機能することが確認できれば、TRIM21 mRNA、PLCzeta モノクローナル抗体を注入した卵子を用いて体外受精あるいは ICSI し、卵活性化現象 (減数分裂再開、 Ca^{2+} 反応、前核形成) が生じるかを調べる。

PAWP の卵活性化能評価

sperm factor 候補の 1 つとされる Post-Acrosomal WW Binding Protein (PAWP) の卵活性化能を評価する。PLCzeta は PAWP と異なり精子膜に損傷を受けると大部分が精子外に流出することから、ブタ精子を界面活性剤で処理し、ウェスタンブロッティングで PAWP は検出されるが PLCzeta は検出されない精子を作出する。この精子を用いて ICSI し、卵活性化現象 (減数分裂再開、 Ca^{2+} 反応、前核形成) が生じるかを調べる。

(2) 卵子と精子の膜融合を起点とする卵活性化機構の探究：

受精時に生じる膜融合が卵活性化に寄与するのかを調べる。本実験を行うためには、運動性を有する PLCzeta KO ブタ精子を用いる必要がある。ブタ精子の運動性や膜の完全性を保持したまま PLCzeta を取り除くことはできないため、PLCzeta KO ブタを作出し、その精子を実験に供することとする。具体的には、CRISPR/Cas9 システムにより PLCzeta 遺伝子領域の両アレルに変異の導入が確認できたブタ体細胞を用いて核移植を行い、仮親ブタの卵管に外科的に移植することで PLCzetaKO ブタを作出する。そして、PLCzeta KO ブタ精子を用いて膜融合を伴う体外受精と、膜融合が伴わない ICSI を行い、 Ca^{2+} オシレーションや、その他卵活性化現象 (第

二極体放出、前核形成など)を比較することで、膜融合が卵活性化に寄与しているかを明らかにする。

4. 研究成果：研究成果 本研究課題の成果について、研究の主な成果、得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望などの点から記入すること。

(1) PLCzeta 以外の sperm factor の探求

Trim-Away 法による PLCzeta ノックダウン
 ブタ PLCzeta モノクローナル抗体の特異性を免疫蛍光染色により評価したところ、PLCzeta の局在箇所とされる頭部後方にシグナルが確認できた(図1.)。これまで、ブタ PLCzeta の抗体はポリクローナル抗体しかなく、本研究で作製したモノクローナル抗体は、これまで以上に精度の高い研究に寄与することが期待される。

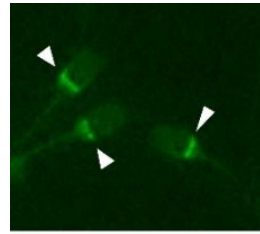


図1. PLCzetaモノクローナル抗体によるブタ精子PLCzeta検出
 (白矢頭：PLCzeta局在部位)

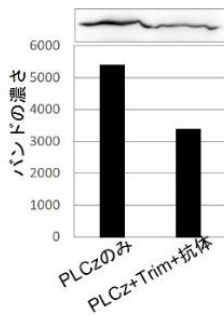


図2. Cos7細胞を用いたTrim-AwayによるPLCzノックダウン

次に、この抗体により Trim-Away システムが機能するかを、Cos7 細胞を用いて確認した。PLCzeta と Trim21 の各発現ベクターと PLCzeta モノクローナル抗体を導入した細胞では、PLCzeta 発現ベクターのみ導入した細胞に比べて、ウェスタンブロットングで検出された PLCzeta のバンドが薄かったため、Trim-Away システムが機能していると判断した(図2.)

次に、ブタ卵子内でも Trim-Away システムが機能するかを確認するために、PLCzeta モノクローナル抗体と Trim21 mRNA を同時に注入、その2時間後に PLCzeta mRNA を注入し、10時間後の前核形成が阻害されるかを調べた。その結果、各々の注入濃度を変えて検討を行ったが現時点では前核形成阻害効果は認められておらず、引き続き注入条件の検討を行う。

PAWP の卵活性化能評価

凍結融解ブタ精子を Triton X-100 (TX)に感作させ、ウェスタンブロットングにより PAWP は検出されるが、PLCzeta は検出されない精子を得ることに成功した(図3)。これらの精子をそれぞれブタ卵子に頭微注入し10時間後に観察したところ、TX区では、79.1%が全く卵活性化現象が生じていない metaphase II (M2)期のままであった。これは無処理区(19.5%)に比べて有意に高い値だった(図4)。それに対し、無処理区では M2 期以外(anaphaseII 期~pronuclear formation 期)が 80.5%であり、TX 区(20.9%)より有意に高かった。これは、PAWP は、卵活性化能が PLCzeta に比べて極めて低い、あるいは sperm factor として機能していない可能性を示唆する結果といえる。

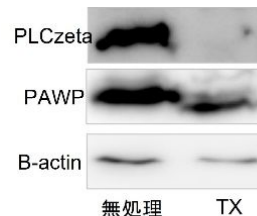


図3. Triton X-100処理後のウェスタンブロットング像

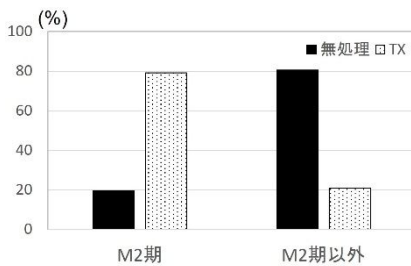


図4. 精子へのTX処理の有無と卵活性化率

(2) 卵子と精子の膜融合を起点とする卵活性化機構の探究

CRISPR/Cas9 システムにより、PLCzeta 遺伝子領域の両アリルに変異が導入されたホモノックアウトのブタ体細胞を得ることに成功した。この細胞を用いて核移植を行い、体外培養後に得られた胚盤胞を解析したところ、ホモノックアウトの胚であることを確認した。次に、核移植胚を仮親ブタの卵管に外科的に移植し、PLCzeta ノックアウトブタの作出を試みた。1例において、分娩日まで発情が回帰しなかったが分娩誘発後も分娩兆候も認められなかったため、妊娠は継続されず途中で胚死滅したと考えられる。引き続き胚移植に取り組んでいく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 中井美智子、鈴木俊一、淵本大一郎、千本正一郎、菊地和弘 |
| 2. 発表標題 卵活性化において卵細胞質内Ca ²⁺ 濃度が反復上昇する意義 |
| 3. 学会等名 115回 日本繁殖生物学会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|