

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580342

研究課題名（和文） SOD1 遺伝子欠損マウスを用いた酸化ストレスによる卵の細胞分裂障害の分子機序解明

研究課題名（英文） Study of failure in mitosis and meiosis caused by oxidative stress using oocytes from SOD1 deficient mice

研究代表者

木村 直子 (KIMURA NAOKO)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：70361277

研究成果の概要（和文）：哺乳類培養系卵や老化卵で頻発する発生障害の分子機序の解明を目的に、酸化ストレスに注目し、銅-亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ遺伝子欠損(SOD1KO)マウス卵および卵巣を用いて解析を行った。その結果、SOD1KOの排卵卵子では2細胞期発生停止、体外成熟卵では減数分裂異常や受精直後の発生停止が頻発し、これらの異常の主原因は、ミトコンドリア機能障害ではなく、細胞周期制御の異常と考えられた。また加齢による卵巣内卵胞数の減少が通常よりも亢進していることが示された。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to elucidate the molecular mechanism of early developmental arrest in *in vitro*-produced embryos and oocyte aging, using superoxide dismutase 1-deficient (SOD1KO) mice. We found total 2-cell arrest of embryos from SOD1-deficient mice oocytes in culture under atmospheric oxygen conditions. Since the mitochondrial function of ATP production via oxidative phosphorylation was almost normal in the embryos, the mechanism of cell cycle regulation might be a target of elevated ROS. Also, the oxidative stress caused by a SOD1 deficiency during oocyte maturation causes the failure of pronucleus formation after fertilization. This impairment seems to be irrelevant to the abnormality of egg activation events, CGs exocytosis and CaMK γ activation, implying an injury to the cell cycle regulation of the meiosis II exit. Thus, investigation of oocytes/embryos from SOD1KO mice would provide a useful clue to an understanding of the mechanisms involved in early developmental arrest in *in vitro*-produced embryos and oocyte aging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：卵母細胞、受精卵、酸化ストレス、SOD1、発生障害、細胞周期、老化

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の培養系卵では、体内発生ではみられない発生停止やアポトーシスが頻発することが報告されている。

(2) 老化雌個体由来の卵では、若齢期の卵と比較し、受精率や受精後の発生能が低く、また染色体異常性が頻発することが報告されている。

(3) (1)や(2)の現象には、酸化ストレスが関与していることが報告されているが、卵における酸化・還元(レドックス)の制御機構については未だ解明途中にあり、酸化ストレスに起因した卵の発生異常や老化の分子機序については、生体の酸化ストレス環境を再現するような実験系の不足から解析が進んでいない。

2. 研究の目的

研究背景(1)および(2)の解析モデルとして、SOD1 遺伝子を欠損させた (SOD1KO) マウス卵を用い、特に①細胞周期の制御に焦点を当てた卵の酸化ストレス障害の分子機序、②卵母細胞の老化現象への酸化ストレスの関与、について効率的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養系でみられる SOD1KO 受精卵の 2 細胞期発生停止の分子機序の解明：①発生停止卵のクオリティ評価(呼吸量、ATP 含量、ミトコンドリア膜電位)、②培地への抗酸化物質の添加あるいは低酸素培養系で発生停止が回避されるかを検討する。

(2) 成熟培養系でみられる SOD1KO 卵の減数分裂障害のプロファイリング：①体外受精後の受精率と発生能の評価を行い、さらに②成熟培養後の第二減数分裂中期卵について、紡錘体と染色体の形態、ミトコンドリアの動態の観察、卵内 GSH 含量の測定、紡錘体形成と分裂中期(M 期)染色体分配を制御する因子の発現動態について解析する。

(3) SOD1KO マウスの卵巣機能と卵母細胞のクオリティについての経時的解析：野生、ヘテロ、KO の各遺伝子型の雌マウスの若齢期(2~3 ヶ月齢)および老齢期(12 ヶ月齢)における、①卵巣内各発育ステージの卵胞の組織学的評価、②卵母細胞の発生能と免疫組織化学的評価について検討する。

(4) SOD1KO 雌マウスへ有効な抗酸化物質を長期間投与し、(3)と同様の方法で卵巣機能の解析を行う。

4. 研究成果

(1) 20%酸素濃度下での培養系でみられる SOD1KO 受精卵の 2 細胞期発生停止は、卵子側の SOD1 欠損によって、不可逆的に引き起こされることが明らかとなった。この 2 細胞期発生停止胚では、高濃度のスーパーオキシドが検出されているものの、ミトコンドリア膜障害や ATP 含量の著しい減少はみられなかった(図 1)。このことから発生停止の原因は、ミトコンドリア障害によるエネルギーの枯渇やアポトーシス誘導ではなく、別の機構が関与するものと考えられた。一方、SOD1KO マウス卵由来の受精卵を 4 細胞期まで 1%酸素濃

度下で培養し、その後 20%酸素濃度下で培養した場合、発生停止はみらず桑実期胚に発生した後、全て細胞変性により退行することが確認された。以上から、マウスでは、2 細胞期とそれ以降の発生ステージにおける酸化ストレスに起因する発生異常の機構が異なることが考えられた。一連の実験結果から、哺乳類培養系卵の発生障害の解析に、この SOD1KO マウス卵が、非常に有効なモデルになり得るものと考えられた。今後、この 2 細胞期発生停止の機構については、細胞周期チェックポイントの制御因子の発現動態に注目し、解析を進めていく。

以上の研究結果については、論文 2、学会発表 5, 9, 13、図書 1 で報告している。

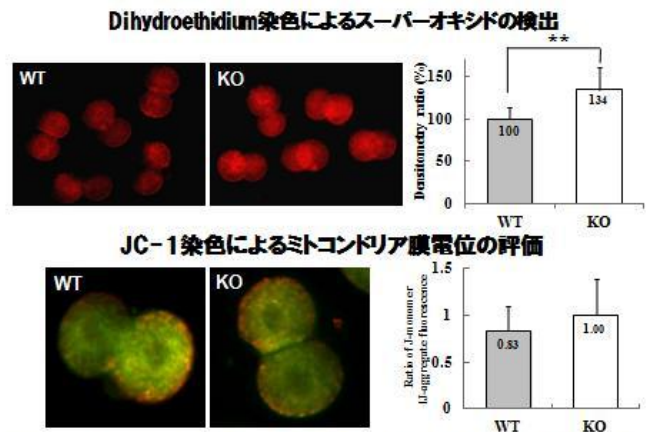


図1. SOD1欠損マウス卵由来受精卵の受精後36時間におけるスーパーオキシドの検出とミトコンドリア膜電位の評価

(2) 20%酸素濃度下で体外成熟-受精させた SOD1KO 卵は、2 細胞期へ卵割せず、第二減数分裂中期から後期で発生停止することが明らかとなった(図 2)。またこの受精障害は、β-メルカプトエタノールなどの還元剤やグルタチオンエチルエステルなどの抗酸化物質の添加、低酸素(5%酸素濃度)下での培養によっても、顕著に解消されなかった。SOD1KO 卵では、活性酸素種であるスーパーオキシドが高濃度に検出され、抗酸化物質であるグルタチオン含量が著しく少ないことから、SOD1 欠損により卵成熟中に酸化ストレスが亢進し、受精障害が起きていることが示された。しかし、卵内 ATP 含量やミトコンドリア活性は低下していないため、研究成果(1)と同様に、ミトコンドリア障害が原因ではないものと考えられた。

以上の研究結果については、学会発表 6-8, 10, 12、図書 1 で報告している。

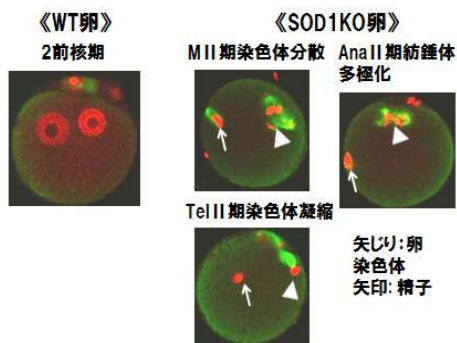


図2. IVMF6時間後のSOD1欠損卵にみられる染色体像

一方、培養系 SOD1KO 卵の減数分裂速度や第二減数分裂中期の卵内紡錘体形態について、評価を行ったところ、野生型卵と比較し、卵核胞の崩壊が早期化し、その結果、卵成熟の終了が、1~2時間程度早まっていることが明らかとなった。さらに第二減数分裂中期紡錘体の染色体の不整列が、有意に増加していた。受精後 1~6 時間の MPF 活性を測定したところ、野生型では顕著な減少がみられた一方、SOD1KO 卵ではわずかに減少したのみで、高いレベルを維持していた。これらことから、SOD1KO 卵では、減数分裂の異常によって、結果的に受精後の減数分裂の終了ができないため、受精直後で発生停止しているものと考えられた。したがって今後は、この SOD1KO 卵の染色体異数性について、詳細に検討を行う。

以上の研究結果については、学会発表 1, 2, および 4 で報告している。

(3) C57BL 系および ICR 系いずれも、若齢期では、排卵数にゲノタイプによる差はみられなかったが、老齢期では SOD1KO で減少していた。卵巢中の卵胞数については、若齢期では各卵胞発育ステージに著しい差はなかったが、老齢期の二次卵胞数が SOD1KO マウスで、有意に低かった。しかし TUNEL 法による各ゲノム間での卵巢内アポトーシスの発現に大きな違いはみられなかった。以上から、SOD1 欠損による卵巢老化への影響として、二次卵胞数の減少によりグラフ卵胞数が減少し、その結果、排卵数が減少するものと考えられた。

また老齢個体から得られた卵の培養系での発生能は、SOD1KO で有意に低下することが明らかとなった。これらから、SOD1 欠損により卵巢あるいは卵の老化が亢進している可能性が示唆された。

以上の研究結果については、学会発表 3, 11, 図書 2 で報告している。

(4) 抗酸化物質として N-アセチルシステイン (NAC) を野生型マウスに、離乳直後から長期間にわたって飲水投与した場合、無添加区と比較し、若齢期では卵巢重量の減少、二次卵

胞や初期胞状卵胞の数の減少傾向がみられた。一方、老齢期では二次卵胞や初期胞状卵胞の数が有意に高くなった。予想に反して、SOD1KO マウスにおける長期 NAC 投与による卵胞数への影響は、明らかではなかった。これらから、NAC の長期間投与は、若齢期の負の影響については更なる解析が必要であるものの、加齢を伴う発育卵胞の減少を緩慢にする可能性が示唆された。酸化ストレス起因する卵巢あるいは卵の老化現象とそれらの分子機構については、今後さらに解析を進める予定である。

以上の研究結果については、図書 2 で報告している。

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)

1. Yokoo M, Kimura N, Sato E. 2010 (平成 22 年) 【査読なし】 Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. The Journal of Reproduction and Development, Vol. 56:15-19.
2. Kimura N, Satoshi T, Iuchi Y, Abe H, Totsukawa K, Fujii J. 2010 (平成 22 年) 【査読あり】 Intrinsic oxidative stress causes either two-cell arrest or cell death depending on developmental stage of the embryos from SOD1-deficient mice. Molecular Human Reproduction, 2010, Vol. 16: 441-451.

[学会発表] (計 13 件)

1. 佐藤康子, 末永真奈美, 藤井順逸, 木村直子. 卵成熟過程における SOD1 の役割: SOD1 欠損卵でみられる透明帯への多精子進入. 第 104 回日本繁殖生物学会大会要旨集, j124. 2011 年 9 月 13~17 日, いわて県民情報交流センター・アイーナ(岩手県盛岡市).
2. 名古満, 小田嶋和治, 藤井順逸, 木村直子. 卵成熟培養系での SOD1 の欠損は卵核胞崩壊の早期化と紡錘体の矮小化を引き起こす. 第 104 回日本繁殖生物学会大会要旨集, j124. 2011 年 9 月 13~17 日, いわて県民情報交流センター・アイーナ(岩手県盛岡市).
3. 小野寺寛典, 松岡直也, 高野智枝, 藤井順逸, 角田智志, 木村直子. 老齢 SOD1 遺伝子欠損マウス卵の発生能とクオリティの評価. 第 104 回日本繁殖生物学会大会要旨集, j148. 2011 年 9 月 13~17 日, いわて県民情報交流センター・アイーナ(岩手県盛岡市).
4. Kimura N, Sato Y, Suenaga M, Tsunoda S, Fujii J. Failure of pronucleus formation

in in vitro matured and fertilized oocytes from SOD1-deficient mice. International Society for in vitro fertilization 16th World Congress Abstract p252. Sep. 10-13, 2011, Keio Plaza Hotel Tokyo (Shinjuku-Ku, Tokyo).

5. 角田智志, 木村直子, 藤井順逸. 内在性酸化ストレス蓄積によるマウス2細胞期発生停止へのCDKインヒビターの関与の可能性. 第52回日本哺乳動物卵子学会大会要旨集 S86. 2011年5月21~22日, 国際医療福祉大学(栃木県大田原市).
6. 佐藤康子, 末永真奈美, 藤井順逸, 木村直子. 体外成熟させたSOD1遺伝子欠損マウス卵でみられる受精障害の解析. 第52回日本哺乳動物卵子学会大会胚培養士セッション受精障害ワークショップ1, 大会要旨集 S17. 2011年5月21~22日, 国際医療福祉大学(栃木県大田原市).
7. 木村直子. 卵子における酸化ストレスと発生障害. 日本哺乳動物卵子学会第2回生殖補助医療胚培養士セミナー要旨集 p3-5. 2010年10月24日, 都市センターホテル(東京都千代田区). (招待講演)
8. 佐藤康子, 小田島和治, 角田智志, 戸津川清, 藤井順逸, 木村直子. 体外成熟させたSOD1遺伝子欠損マウス卵でみられる受精障害の解析. 第103回日本繁殖生物学会大会要旨集 j100. 2010年9月2~4日, 北里大学獣医学部キャンパス(十和田市).
9. Kimura N, Sato Y, Tsunoda S, Iuchi Y, Odajima K, Totsukawa K and Fujii J. Intrinsic oxidative stress in SOD1-deficient embryo under atmospheric oxygen culture causes developmental arrest without mitochondrial malfunction. Society for Reproduction and Fertility 2010. 11-13 July 2010. The Sutton Bonington Campus of the University of Nottingham, UK.
10. 佐藤康子, 木村直子, 井内良仁, 佐藤英世, 藤井順逸, 戸津川清. SOD1欠損マウス卵でみられる卵成熟過程での酸化ストレスによる受精障害. 第51回日本哺乳動物卵子学会大会要旨集 S64. 2010年5月29~30日, 朱鷺メッセ(新潟市).
11. 木村直子, 猪野友香里, 戸津川清, 藤井順逸. SOD1欠損老化マウスでみられる排卵数および発育卵胞数の減少. 第112回日本畜産学会大会講演要旨集 p73. 2010年3月28~29日, 明治大学駿河台キャンパス(東京都千代田区).
12. 木村直子, 佐藤康子, 井内良仁, 佐藤英世, 戸津川清, 藤井順逸. 体外成熟させたCu, Zn-superoxide dismutase欠損マウス卵でみられる受精障害. 第102回日本繁殖生物学会大会要旨集 j69. 2009年9月10~

12日, 近畿大学農学部(奈良県奈良市).

13. 角田智志, 木村直子, 阿部宏之, 戸津川清, 藤井順逸. 通常培養下のSOD1欠損胚では内因性酸化ストレスがミトコンドリア機能障害を伴わない2細胞期発生停止を引き起こす. 第50回日本哺乳動物卵子学会大会要旨集 S50. 2009年5月8~9日, 都市センターホテル(東京都千代田区).

[図書] (計 2 件)

1. Kimura N and Fujii J. 2010 (平成22年) 【査読なし】 Active oxygen species as a signal of embryonic developmental arrest and death. In Male and Female Infertility: Genetic Causes, Hormonal Treatments and Health Effects (Eds. By Glantz B and Edquist). Nova Science Publishers, Inc, Hauppauge, p55-75, 2010 NY. ISBN-10: 1608766543.
2. Fujii J, Tsunoda S, and Kimura N. 2011 (平成23年) 【査読あり】. Antithetical Roles of Reactive Oxygen Species in Mammalian Reproduction. Handbook of Systems Biology of Free Radicals and Anti-Oxidants: Free radicals and reproductive health (Eds by I. Laher). Springer-Verlag, Germany. in press.

[その他]

ホームページ等

<http://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~animal-reprod/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 直子 (KIMURA NAOKO)

山形大学・農学部・教授

研究者番号: 70361277

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: