

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780272

研究課題名(和文)種特異的な哺乳類受精時におけるカルシウムオシレーション誘起機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of species--dependent calcium oscillations during fertilization 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) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で同定されたウマPLCzは、それまでほ乳類で報告されてきた最も高い活性をもつヒトPLCzよりもさらに高い活性をもつことを明らかにした。またウマPLCzを注入し、ブタ円形精子細胞注入卵の発生能を向上させることにも成功した。一方、卵減数分裂に重要な役割を持つpolo like kinase 1が少なくともブタにおいてIP3Rの発現量を制御していることを初めて明らかにした。以上のことから、精子側因子(PLCz)および卵側因子(IP3R)ともに動物種ごとに異なる活性および制御機構を持ち、それぞれの動物種に特有な活性・機能がかみ合うことで、受精現象が引き起こしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in molecular cloning of horse PLCz. We also showed that horse PLCz has higher activity compared to those in other mammalian species studied to date. As for the regulation of IP3R in pig oocytes, inhibition of polo-like kinase 1(Plk1) dramatically decreased the expression level of IP3R, suggests that Plk1 is involved in the regulation of IP3R expression at least in pig oocytes.

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：受精

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、初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。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

生殖工学・発生工学技術の進歩により、体細胞核移植や顕微授精を用いて産仔作出が可能となったが、現在でもその発生率は低く、家畜ではさらに低い。その原因の一つとして、それらの技術により作製した卵の発生には、受精時の現象を模倣した人為的活性化処置が必要となるが、現在の人為的活性化処置は卵内で一過性の Ca^{2+} 上昇しか誘起できず、本来の哺乳類における受精時に起こる卵内 Ca^{2+} 反復上昇(Ca^{2+} オシレーション)を再現できていないことが挙げられる。本研究では Ca^{2+} オシレーションの制御に関連する因子(精子側: $\text{PLC}\zeta$, 卵子側: IP_3R)に焦点を当て、種特異的な受精機構を解明する。得られた知見を元に、新しい受(授)精制御技術の開発に応用

する。

3. 研究の方法

本研究は、 Ca^{2+} オシレーションに關与する各動物種の精子側($\text{PLC}\zeta$)と卵側(IP_3R)因子をそれぞれ分子レベルで比較解析し、種および系統特異的な受精時の Ca^{2+} オシレーション動態の原因を明らかにし、種特異的な受精機構の解明を行い、新しい受(授)精制御技術の開発に応用する。本研究は、各哺乳類動物(実験動物および家畜)を用いて精子側因子($\text{PLC}\zeta$)の分子機能の比較解析、卵子側因子(IP_3R)の分子機能の比較解析により、各動物の $\text{PLC}\zeta$ および IP_3R が、受精時の Ca^{2+} オシレーションにどのように関わっているか分子レベルで解明する。

4. 研究成果

初めに各動物種の $\text{PLC}\zeta$ の機能を比較・検討する目的で、ウマを用い、未だ同定されていないウマ $\text{PLC}\zeta$ の遺伝子クローニングと機能解析を行った。その結果、ウマ精巣から RT-PCR により全長 1917 bp の産物が得られ、シーケンス解析の結果により、他種の $\text{PLC}\zeta$ と高い相同性を示したことから、ウマ $\text{PLC}\zeta$ を同定したと考えられた。またこの cDNA から mRNA を作製し、また他動物種の $\text{PLC}\zeta$ の mRNA をそれぞれマウス卵に注入することで動物種間での $\text{PLC}\zeta$ の活性を比較検討した。その結果、ウマ $\text{PLC}\zeta$ はそれまでほ乳類で報告されてきた最も高い活性をもつヒト $\text{PLC}\zeta$ よりもさらに高い活性をもつことが初めて明らかにされた。またウマ $\text{PLC}\zeta$ を注入することで、ブタ円形精子細胞注入卵の発生能を向上させることにも成功した。また、マウス $\text{PLC}\zeta$ 、ラット $\text{PLC}\zeta$ の mRNA を作製し、それぞれマウス卵に注入し、卵活性化について検討した。その結果、マウス $\text{PLC}\zeta$ をラット卵に注入した場合には卵活性化が誘起されたのに対し、ラット $\text{PLC}\zeta$ をマウス卵に注入した場合には卵活性化が認められなかった。以上のことから、 $\text{PLC}\zeta$ はそれぞれの動物種ごとに異なる活性を持つことが明らかとなった。

一方, IP₃R に関しては, どの因子が IP₃R の機能を制御しているかについて検討した. 卵の減数分裂に重要な役割を持つ polo like kinase 1(Plk1)の抑制剤でブタ成熟卵を処理すると, IP₃R のリン酸化量および発現量が著しく低下した. また MAP kinase および p34^{cdc2} kinase の阻害剤ではそのような影響は認められなかった. 一方, Plk1 抑制剤による IP₃R 発現量の低下は, マウス卵では認められなかった. 以上のことから, 少なくともブタにおいて IP₃R は Plk1 によって制御されていることが初めて明らかとなった.

さらに, 受精卵のその後の発生能を向上させる目的で, 受精時のシグナルが胚発生および胚の着床にどのような影響を及ぼすか調べた. その結果, PLC ζ による加水分解で産生されたジアシルグリセロールが, 胚の発生および着床に関わっている可能性が考えられた.

以上のことから, 精子側の因子(PLC ζ)および卵側の因子(IP₃R)ともに動物種ごとに異なる活性および制御機構を持ち, それぞれの動物種に特有な活性・機能がかみ合うことで, 各動物種における受精現象が起こっていることが明らかとなった.

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 5 件)

1. Anucha Sathanawongs, Katsuyoshi Fujiwara, Tsubasa Kato, Masahiko Hirose, Maki Kamoshita, Richard J.H. Wojcikiewicz, Jan B. Parys, Junya Ito, Naomi Kashiwazaki. The effect of M-phase stage-dependent kinase inhibitors on inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1 (IP₃R1) expression and localization in pig oocytes. Animal Science Journal (in press). 査読有.
2. Kana Sato, Takuya Wakai, Yasunari Seita, Akiko Takizawa, Rafael A. Fissore, Junya Ito, Naomi Kashiwazaki (2013) Molecular

- characteristics of horse phospholipase C zeta (PLC ζ). Animal Science Journal 84: 359-368. 査読有. doi: 10.1111/asj.12044.
3. Natsuki Kohaya, Katsuyoshi Fujiwara, Junya Ito, Naomi Kashiwazaki (2013) Generation of live offspring from vitrified mouse oocytes of C57BL/6J strain. PLoS ONE 8: e58063. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0058063.
 4. Masahiko Hirose, Maki Kamoshita, Katsuyoshi Fujiwara, Tsubasa Kato, Ayaka Nakamura, Richard Wojcikiewicz, Jan B. Parys, Junya Ito, Naomi Kashiwazaki (2013) Vitrification procedure decreases inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, resulting in low fertility of pig oocytes. Animal Science Journal 84: 693-701. 査読有. doi: 10.1111/asj.12061.
 5. Junya Ito, Naomi Kashiwazaki (2012) Molecular mechanism of fertilization in the pig. Animal Science Journal 83: 669-682. 査読有. doi: 10.1111/j.1740-0929.2012.01044.x.

[学会発表](計 3 件)

1. Junya Ito, Yuki Yamashita, Koji Furukawa, Ayaka Nakamura, Kana Sato, Akiko Takizawa, Hoi Chang Lee, Rafael A. Fissore, Naomi Kashiwazaki. Characteristics of transgenic rats expressing horse PLC ζ . Gordon Research Conference, 2013年7月, アメリカ合衆国
2. Junya Ito, Emi Yuhara, Ayaka Nakamura, Naomi Kashiwazaki. Activation of round spermatid-injected oocytes using phospholipase C zeta in pigs. Annual Meeting of International Embryo Transfer Society, 2013年1月, ドイツ
3. Junya Ito. Improvement of in vitro and in vivo development of vitrified mammalian oocytes and embryos. Annual Meeting of

Asia Reproductive Biology Society, 2012
年 10 月, フィリピン

〔図書〕(計 1 件)

1. Junya Ito and Rafael A. Fissore (2012)
The Ca^{2+} signal at fertilization in
mammals: PLC ζ , sterility, and
species-specific differences in activity.
Sperm Cell Research in the 21st Century:
Historical Discoveries to New Horizons
Chapter 10: 180-183.

6. 研究組織

(1) 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