

学位論文

グリシンレセプター $\alpha 4$ サブユニットはマウス受精卵において初期発生に重要な因子である

西園 啓文

目次

| | |
|--|----|
| 要約..... | 2 |
| 1. 序論..... | 3 |
| 2. 結果..... | 9 |
| 2-1 グリシンレセプター阻害剤によるグリシンレセプターの機能阻害は受精卵の発生を 停止させる..... | 9 |
| 2-2 マウス受精卵ではグリシンレセプター α 4サブユニットが特異的に発現している..... | 12 |
| 2-3 グリシンレセプター α 4遺伝子欠損マウスの作製..... | 16 |
| 2-4 グリシンレセプター α 4欠損マウスの受精卵は発生が阻害され、自然交配時の新生 児数も減少する..... | 20 |
| 3. 考察と結論..... | 22 |
| 4. 実験方法..... | 26 |
| 4-1 試薬..... | 26 |
| 4-2 動物..... | 26 |
| 4-3 体外受精によるマウス胚の作製..... | 26 |
| 4-4 受精卵における GlyR 阻害実験..... | 27 |
| 4-5 トランスクリプトーム解析..... | 27 |
| 4-6 免疫組織化学染色..... | 28 |
| 4-7 CRISPR/Cas9 システムを用いた <i>Gtra4</i> ノックアウトマウスの作製..... | 29 |
| 4-8 <i>Gtra4</i> ノックアウトマウスから得られた受精卵の体外受精および胚培養..... | 29 |
| 4-9 統計的な解析..... | 30 |
| 5. 参考文献..... | 31 |
| 謝辞..... | 36 |

要約

体外受精や顕微授精および胚移植などのヒトの高度生殖補助医療において、その成功率を向上させるためには、受精卵や胚、胎児のおかれている状況を基礎医学的に詳細に解析し、生殖工学技術の開発に応用することが必要である。受精卵が最初に経験する環境である哺乳類の卵管に流れている卵管液は受精とその後の受精卵の初期発生に必須な成分であるが、その構成成分のもつ機能については未知な部分が多い。遊離アミノ酸、特にグリシンは卵管液中に豊富に含まれており、哺乳類の受精卵の着床前発達に重要であることがいくつか報告されている。しかし、卵管液中の遊離グリシンが卵子や受精卵にどのようにして作用するのかという詳細なメカニズムはいまだ解明されていない。本研究では、卵管液中の遊離グリシンがマウス受精卵の細胞膜上のグリシンレセプターを介して着床前発生を制御していることを報告する。マウス受精卵には、グリシンレセプターのうち $\alpha 4$ サブユニットと β サブユニットが特異的に発現しており、このグリシンレセプター $\alpha 4$ サブユニットを機能阻害あるいは遺伝子欠損させると、受精卵の胚盤胞期までの胚発生が顕著に停止し、胚盤胞の細胞数や産子数が減少することが明らかになった。本研究では、このように主に神経伝達物質受容体として作用すると考えられているグリシン受容体の胚発生調節因子としての新規機能を明らかにし、卵管液の成分と受精卵との相互作用について新たな知見を得た。これらの知見は、ヒトを含めた哺乳類の受精卵培養培地開発に応用することが期待できる。

1. 序論

ヒトの生殖補助医療において、なかなか子供が生まれない場合に試みる科学的なアプローチとしては、カップルの身体の状態をモニタリングしながら性交渉のタイミングを調節する方法や、あらかじめ採取された精液を子宮内に直接注入する人工授精 (artificial insemination, AI) などの他に、体外受精 (in vitro fertilization, IVF) や顕微授精 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) といった生殖工学技術を用いて受精卵を体外で作製し、母親の子宮に戻す胚移植法 (embryo transfer, ET) などがあり、現在でも新しい技術開発が行われている。特に晩婚化や少子高齢化が進む現代社会においては、IVF-ET や ICSI などの高度生殖補助医療の需要が高まりつつある (de Mouzon et al., 2020)。これらの高度生殖補助医療の革新には受精卵の発生・着床、妊娠、出産の成功率を向上させる必要があり、そのためには、それぞれの段階において、受精卵や胚、胎児のおかれている状況を基礎医学的に詳細に解析し、生殖工学技術の開発に応用することが必要である (Ferrick et al., 2019)。

多くの哺乳類の卵子は、卵管のなかで受精し、卵管内を子宮に向かって移動しながら卵割 (cleavage) と呼ばれる連続した細胞分裂を行い、受精卵 (1 細胞期胚, fertilized egg or 1-cell embryo) から 2 細胞期胚 (2-cell embryo)、4 細胞期胚 (4-cell embryo)、桑実胚 (morula) を経て、胚盤胞 (blastocyst) とよばれるステージまで発生する (着床前発生, implantation embryo development)。胚盤胞はその後、透明帯 (zona pellucida) と呼ばれる多糖類とタンパク質からなる保護膜を脱出し、母胎の子宮内膜に着床する (implantation)。着床後は母胎からの栄養供給を受けながら、各臓器や器官の形態形成 (morphogenesis) を行い、やがて新生児として出産に至る。実験動物として多く用いられているマウスの場合、図 1 の模式図のように胚発生が進行し、交配からおおよそ 20 日後に出産する。

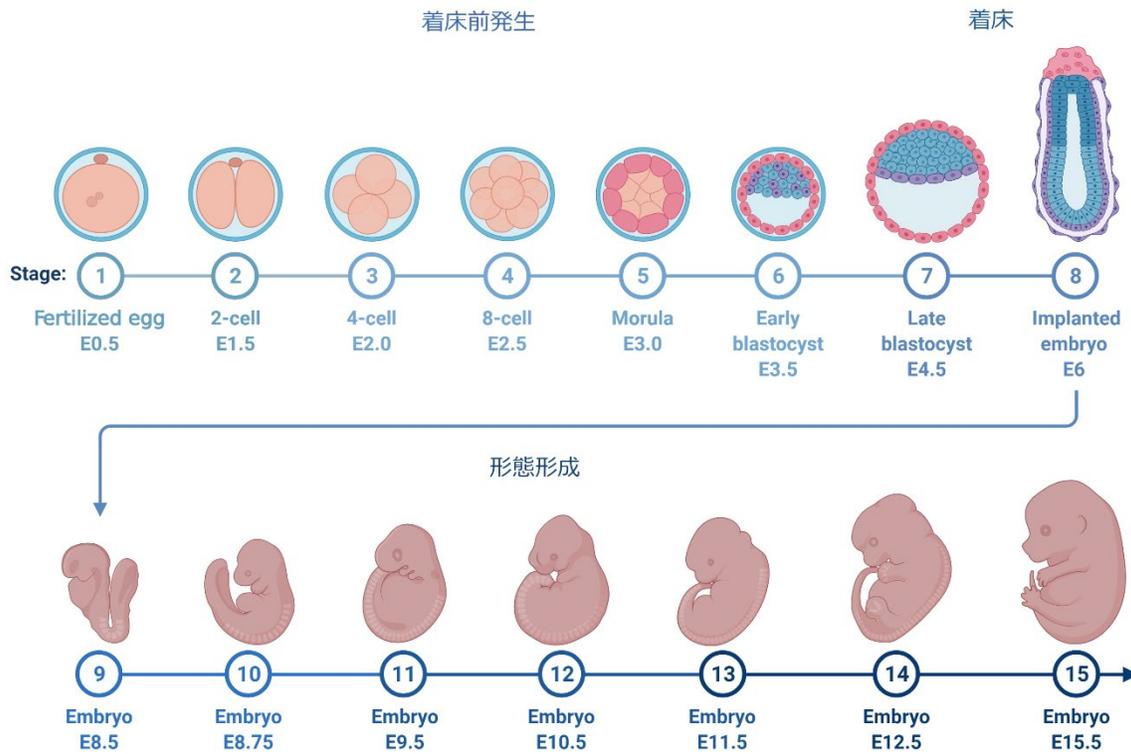


図1 マウスの胚発生の模式図。着床前発生期については、発生ステージ番号の下に各ステージの名称を示し、形態形成期は Embryonic day (E) 番号で表記する。BioRender (<https://biorender.com/>) を使用して作成し、許可を得て記載。

しかし、同じ母親から排卵された卵子と、同じ父親から射出された精子の組み合わせで、かつ同じタイミングで受精した受精卵であっても、胚盤胞にまで発生が進むものと、途中で発生が停止する胚があることが広く知られている（図2）。この現象において生殖発生学領域の研究では、卵子が受精・発生し子宮に着床して新生児になるために必要な因子群を指して、卵子品質（oocyte quality）あるいは受精卵品質（embryo quality）という言葉を使い、それらの品質が「良い／高い（good / high）」あるいは「悪い／低い（poor / low）」という表現で、受精卵に発生・着床し新生児になるための因子群がどの程度備わっているかを表している（Rocha et al., 2016）。言い換えると、卵子や受精卵そのもの、あるいは卵子や受精卵を取り巻く環境に、発生・着床・形態形成そして出産という一連の現象の成否を左右する因子群が存在していて、その状態によって、妊娠や出産の成否が左右されると考えられている。

これらの卵子や受精卵の品質に関わる因子としては、胚の形態や核小体の形状のほかに、卵割速度、卵丘の量、透明帯の厚さ、母体の年齢、染色体異常、受精卵の持つアデノシン三リン酸（adenosine triphosphate, ATP）量、ミトコンドリア活性や胚の呼吸活性の差異、ミトコンドリア DNA とゲノム DNA の比（mtDNA/gDNA）、骨形成タンパク質 15（bone morphogenetic protein-15, BMP-15）の発現量、顆粒球単球コロニー刺激因子（Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF）の発現量、抗ミュラー管ホルモン（anti-Müller hormone, AMH）の影響など様々なものが報告されており、また現在でもこれら以外の因子を探索する研究が行われている（Gao et al., 2017; Li et al., 2010）。本研究では、これらのなかでも受精から着床までの着床前発生ステージに着目し、BMP-15 や AMH などと同様に、母胎から供給される卵管液成分のなかに新たな因子がないかを検討することを目的として研究を開始した。

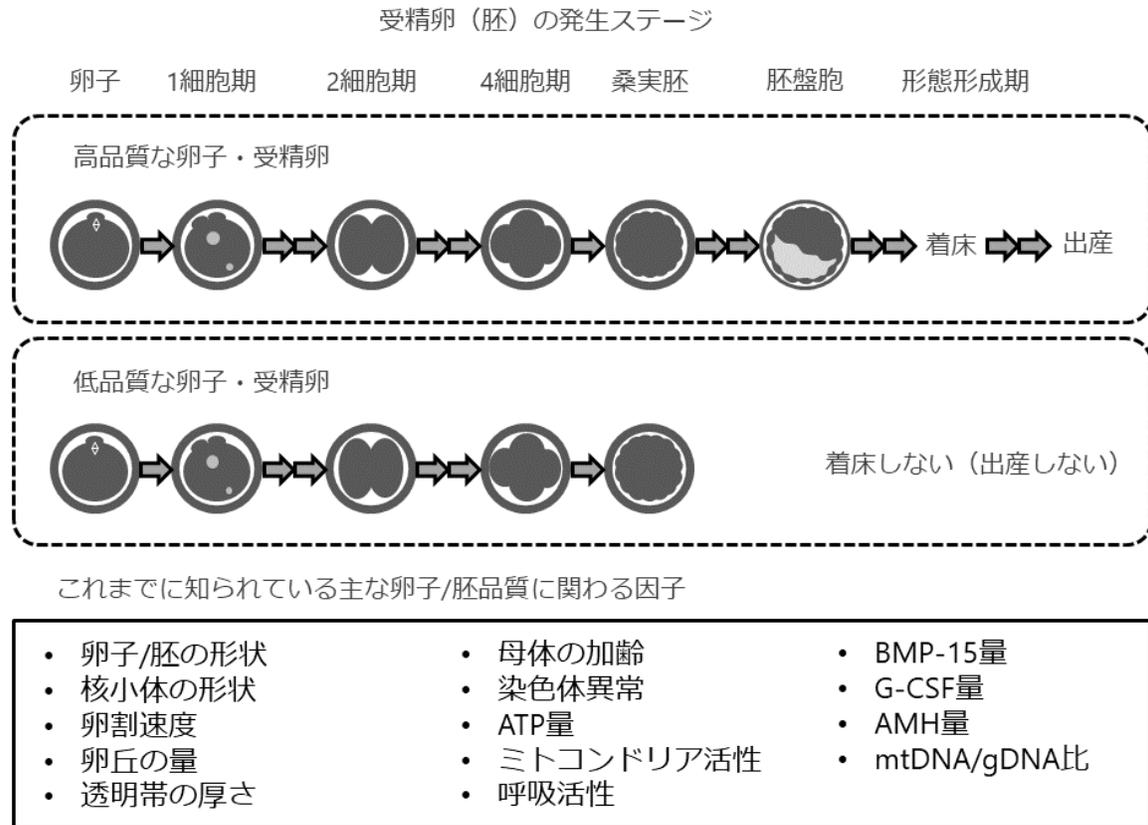


図2 卵子および受精卵の品質の違いと影響する因子の例

卵管液は、卵巣から排卵された卵子が最初に経験する外部環境であり、受精およびその後の着床前発達を積極的に調節することが報告されている (Pérez-Cereales et al., 2018; Rizos et al., 2016)。その組成は、炭水化物、無機イオン、脂質、リン脂質、乳酸塩、ピルビン酸塩、グルコース、タンパク質、および遊離アミノ酸など、様々な分子を含む混合溶液である (Avilés et al., 2010; Leese et al., 2001; Pérez-Cereales et al., 2018; Rizos et al., 2016)。

このうち、炭水化物や脂質・リン脂質やグルコースなど受精卵の生存のために必要なエネルギー代謝に関わる物質の他に、遊離アミノ酸が多く含まれていることが特徴である。なかでも、非必須アミノ酸であるグリシンは、ウシ (Hugentobler

et al., 2007)、ウサギ (Leese et al., 1979; Miller & Schultz, 1987)、およびラット (Nakamura et al., 2016) を含む多くの哺乳類の卵管液において数ミリモル (mM) オーダーにも達するほど、最も豊富な遊離アミノ酸となっている。また、グリシンは最も一般的な哺乳類受精卵用の培養培地であるカリウム添加単純最適化培地 (potassium-supplemented simplex optimization medium, KSOM) の必須成分であることも報告されている (Lee & Fukui, 1996; Moore & Bondioli, 1993; Summers et al., 2000)。さらに、ウシ受精卵においては、培地へのグリシンの添加が胚盤胞への発生を促進する (Dawson et al., 1998; Herrick et al., 2016; Steeves & Baltz, 2005; Takahashi & Kanagawa, 1998; Van Winkle et al., 1990)。このように、卵管液の主要な構成成分の一つであるグリシンは、多くの哺乳類受精卵において重要であることが示唆されているものの、これまでのところ、その分子作用メカニズムについては明らかにされていない。そこで、本研究ではグリシンの哺乳類受精卵への分子作用メカニズムを解明することを目的とした。

卵管液中の遊離グリシンが受精卵に作用を与える可能性のある分子メカニズムの一つは、グリシンと直接結合し細胞内にシグナルを伝えるグリシンレセプターを介したものである。グリシンレセプターは、脊髄および脳における抑制性神経伝達を媒介することが知られているリガンド結合型塩化物チャネルである (Moss & Smart, 2001)。機能タンパク質としてのグリシンレセプターは、 α サブユニットと β のサブユニットからなる五量体であり、ヒトを含む多くの生物種で4つの α サブユニット ($\alpha 1-\alpha 4$) と1つの β サブユニットが同定されている (Miyazawa et al., 2003)。これらのグリシンレセプターサブユニットのうち、 $\alpha 4$ サブユニットは膜貫通ドメインを持たないことから、ヒトでは偽遺伝子と考えられてきたため、その機能はよくわかっていない (Simon et al., 2004)。しかし、最近の研究では、グリシンレセプター $\alpha 4$ サブユニットの欠損がヒトの精神疾患に関連していること (Labonne et al., 2016)、ゼブラフィッシュの驚愕反応や逃避反応に必要とされること (Leacock et al., 2018) などから、グリシンレセプター $\alpha 4$ サブユニットが重要

な機能を持っている可能性が示唆されている。実際に、グリシンレセプターは受精過程においても重要な役割を果たし、マウス、ブタ、ハムスターにおいて先体反応（acrosome reaction）に関与していることが報告されている (C. Bray et al., 2002; Llanos et al., 2001; Meizel & Son, 2005; Sato et al., 2000)。しかし、現在までのところ、受精後の初期発生過程において、卵管液中の遊離グリシンと受精卵のグリシンレセプターが関与しているかどうかは不明なままである。

そこで本研究では、卵管液中の遊離グリシンが受精卵のグリシンレセプターと結合し、そのシグナルを受精卵内部に伝えることで、初期発生にも関与しているのではないかという仮説を立て、モデル動物であるマウスを実験対象として、阻害剤を用いた機能欠損実験、グリシンレセプターの発現プロファイルの調査、CRISPR/Cas9 システムを用いたグリシンレセプターノックアウトマウスの作出と表現型解析などを通じて、この仮説を検証することとした。

2. 結果

2-1 グリシンレセプター阻害剤によるグリシンレセプターの機能阻害は受精卵の発生を停止させる

グリシン-グリシンレセプターによる分子シグナルが、哺乳類受精卵の初期発生へ影響するか否かを調べるために、はじめに試験管内 (in vitro) で培養したマウス受精卵に、すべてのサブユニットに効果のあるグリシンレセプター阻害剤を添加し、その初期発生への影響を確認した (図 3)。検討に際して、グリシンレセプターは精子にも発現し、先体反応と呼ばれる受精に必須な現象にも関与するため (Sato et al., 2000)、グリシンレセプター阻害剤の受精におよぼす影響と初期発生におよぼす影響とを区別する必要がある。そこで、グリシンレセプター阻害剤であるストリキニーネを媒精 (insemination) 後ただちに添加する群 (0-h プロトコール) と、媒精 3 時間後に添加する群 (3-h プロトコール) に分け、その後の受精率を比較した (図 3A)。その結果、0-h プロトコールでは、受精率が劇的に低下し (図 3B)、3-h プロトコールでは、受精率に影響を与えないことがわかった (図 3C)。これらのデータは、精子膜上に発現しているグリシンレセプターが受精に必要とされるのは、媒精の瞬間から 3 時間の間だけであることを示している。また、どちらの群においてもストリキニーネによる細胞毒性で死滅した受精卵はほとんどなく、3-h プロトコール群では、受精卵は正常な形態で 2 細胞期に発生することがわかった (図 3C)。これらの結果から、3-h プロトコールを用いることで、受精現象そのものや精子の機能に深刻な影響を与えることなく、受精卵の初期発生におけるグリシンレセプターの検討を実施することが可能であることが示唆された。

次に、この 3-h プロトコールと 2 種類の異なるグリシンレセプター阻害剤であるストリキニーネと ω -ホスホノ- α -アミノ酸 (PMBA) を用い、胚発生におけるグリシンレセプターの機能をさらに検討することにした。その結果、ストリキニーネ添加群と PMBA 添加群のいずれにおいても、胚盤胞への発生が強く阻害され (図 3D)、特に 4 細胞期から桑実胚への移行時に発生が停止することがわかった (図 3E)。また、この際にいずれの群でも細胞死は起こらなかったが、阻害剤を投与した両群では発生が停止した受精卵の像が得られた (図 3F)。これらの結果から、受精後の初期発生、特に 4 細胞期から桑実胚への移行時には、グリシンレセプター下流の分子シグナルが必要であることが示唆される。

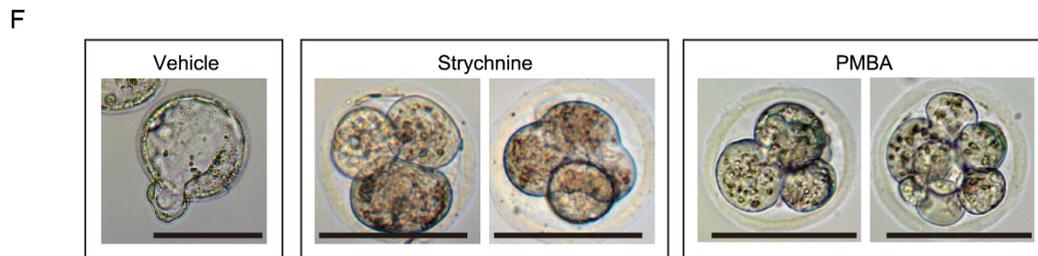
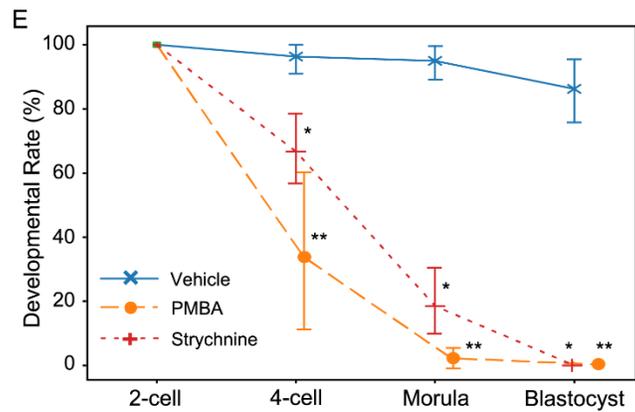
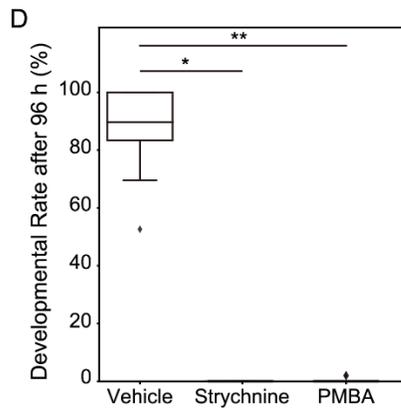
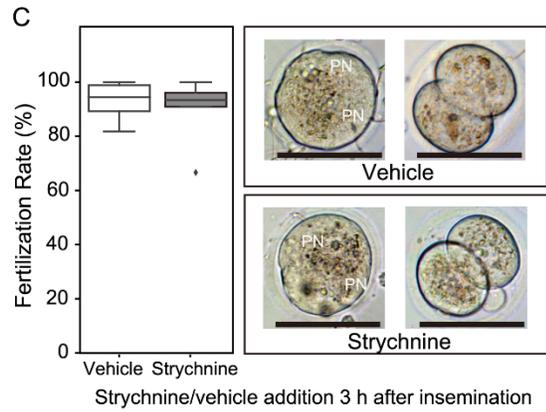
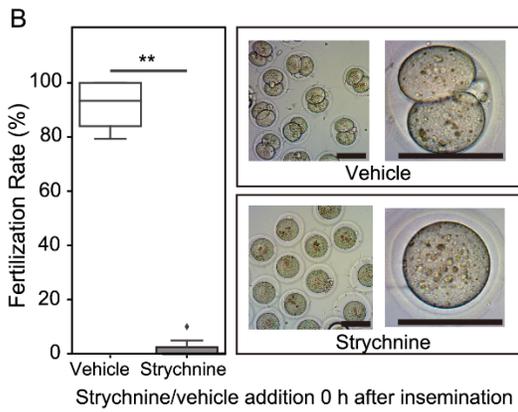
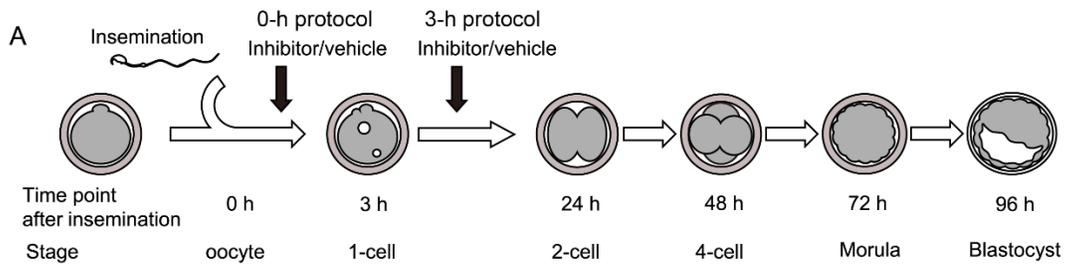


図3 グリシンレセプター阻害剤実験結果。A) 実験スキーム。最初の実験B) では媒精直後に阻害剤を添加し(0-h プロトコール)、その後の実験(C-F)では媒精から3時間後に阻害剤を添加した(3-h プロトコール)。B) 0-h プロトコールを用いた対照群(白, n=9)とストリキニーネ添加群(灰色, n=7)における受精率。右枠は媒精24時間後の対照群とストリキニーネ添加群の受精卵。C) 対照群(白, n=9)とストリキニーネ添加群(灰色, n=5)の3時間プロトコールによる受精率。右枠は、対照群とストリキニーネ添加群の媒精6時間後と24時間後の受精卵。D) 対照群(白, n=9)、ストリキニーネ添加群(灰色, n=5)、PMBA添加群(黒, n=7)を用いた媒精96時間後の発生率。E) 阻害剤添加後の24時間毎の発生率の時間的变化。対照群(青, n=9)、ストリキニーネ添加群(赤, n=5)およびPMBA添加群(オレンジ, n=7)。F) 媒精96時間後の胚の形態。(*) P<0.05、(**) P<0.01、B-C、Fのサイズバーは100 µm。B-Dにおける箱ヒゲ図では、箱の上端は第三四分位数を、下端は第一四分位数を、箱の内の線は中央値を示している。また、箱の外の線分はそれぞれ最小値と最大値を、◇は外れ値を示している。

2-2 マウス受精卵ではグリシンレセプター $\alpha 4$ サブユニットが特異的に発現している

ストリキニーネや PMBA のようなグリシンレセプター阻害剤は、5つのサブユニット ($\alpha 1$ - $\alpha 4$ および β) のすべてを標的とするため (Jensen, 2005; Saitoh et al., 1994)、これらの阻害剤を使った実験では、受精卵においてどのサブユニットが機能しているかを明らかにすることができない。そこで、まずマウスの受精卵で発現しているすべてのグリシンレセプターサブユニットを同定するために、公開データベース (NCBI GEO database) の卵子と初期胚の RNA-seq データを使い再解析したところ、マウス受精卵には β サブユニット遺伝子 (*Glrb*) と興味深いことに機能が未だ明らかになっていない $\alpha 4$ サブユニット遺伝子 (*Glr4*) が MII 期卵子から 2 細胞期胚までの間に一過的に発現していることがわかった (図 4A)。一方で、これらのサブユニットが全身においてどのような発現パターンをしているのかを調べると、*Glrb* は卵子や受精卵の他にも広い範囲の器官や組織で発現していたのに対し、各 α サブユニット遺伝子はそれぞれ脳などの特定の領域でのみ発現していた (図 4B)。これらのことから、グリシンレセプターの細胞種あるいは器官・組織ごとのサブユニットの特異性は、 β サブユニットではなく、 α サブユニットが担っていると考えられる。そこで、本研究では以降の検討において、受精卵において特異的発現を示す $\alpha 4$ サブユニットに着目することとした。

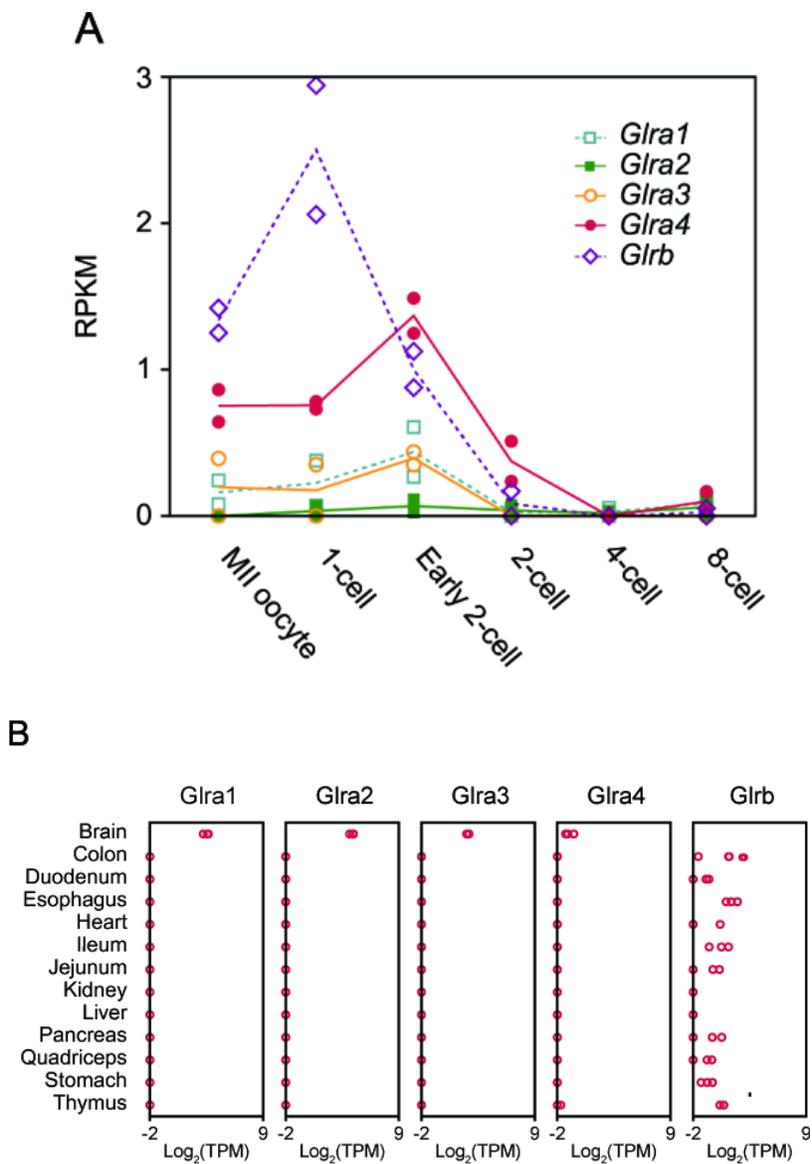


図4 グリシンレセプター $\alpha 4$ サブユニットは、MII期卵子から4細胞期まで発現している。A) グリシンレセプター $\alpha 1$ (*Glra1*)、 $\alpha 2$ (*Glra2*)、 $\alpha 3$ (*Glra3*)、 $\alpha 4$ (*Glra4*)、および β (*Glr b*)サブユニットの発生ステージごとの mRNA 発現レベル。各遺伝子の発現量を RPKM (Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads) で示す。それぞれの遺伝子におけるシンボルは各データセットでの発現量を示し、線分はその中央値を示す。B) 各サブユニットの全身における発現パターン。縦軸は各器官・組織を示し、横軸で各遺伝子の発現量 (transcripts per million, TPM) を示す。

これらの発現パターンを遺伝子レベルだけでなく、タンパク質レベルでも確認するためにマウス受精卵の各発生ステージにおいて抗グリシンレセプター $\alpha 4$ 抗体を用いた蛍光免疫組織化学染色を実施した。その結果、GLRA4タンパク質の発現はMII期卵子から確認でき、2細胞期胚でピークとなり、4細胞期胚まで高い発現レベルが維持され、桑実胚や胚盤胞では検出不能となった(図5)。遺伝子レベルでの解析とタンパク質レベルの解析において、ほぼ同じように桑実胚より前までに発現していることを示していることから、卵子および受精卵のグリシンレセプター $\alpha 4$ サブユニットは初期発生においてもさらにごく初期に発現、機能するものと推測される。

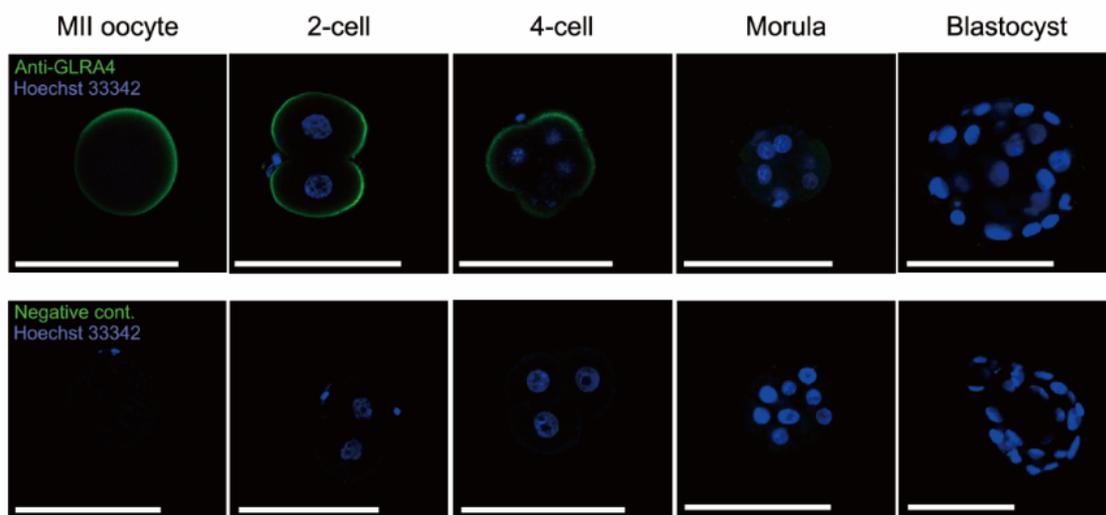


図5 マウス受精卵における MII 期卵子から胚盤胞までのグリシンレセプター $\alpha 4$ タンパク質 (GLRA4) の免疫組織化学的染色像 (n=50 animals, 407 embryos)。緑は GLRA4 タンパク質を示し、青は Hoechst 33342 で核を示す。下段は、抗 GLRA4 抗体の代わりに陰性対照抗体を用いた結果を示す。サイズバーは 100 μ m。

このようなグリシンレセプターの卵子および受精卵での発現パターンがマウス固有のものなのか、それとも他の哺乳類でも同様であるのかを調べるために、公開データベース上で公開されているウシとヒトの受精卵の各発生ステージの RNA-seq データを解析した。その結果、すべての種において卵子と受精卵でグリシンレセプターが発現していることがわかった (図 6)。興味深いことに、マウスと同様に β サブユニットはウシおよびヒトにおいても卵子と受精卵の双方で発現しているが、 α サブユニットの発現は動物種間で異なることもわかった。具体的には、マウスでは $\alpha 4$ サブユニットが、ウシでは $\alpha 1$ サブユニットが、ヒトでは $\alpha 2$ サブユニットが発現していることがわかった。

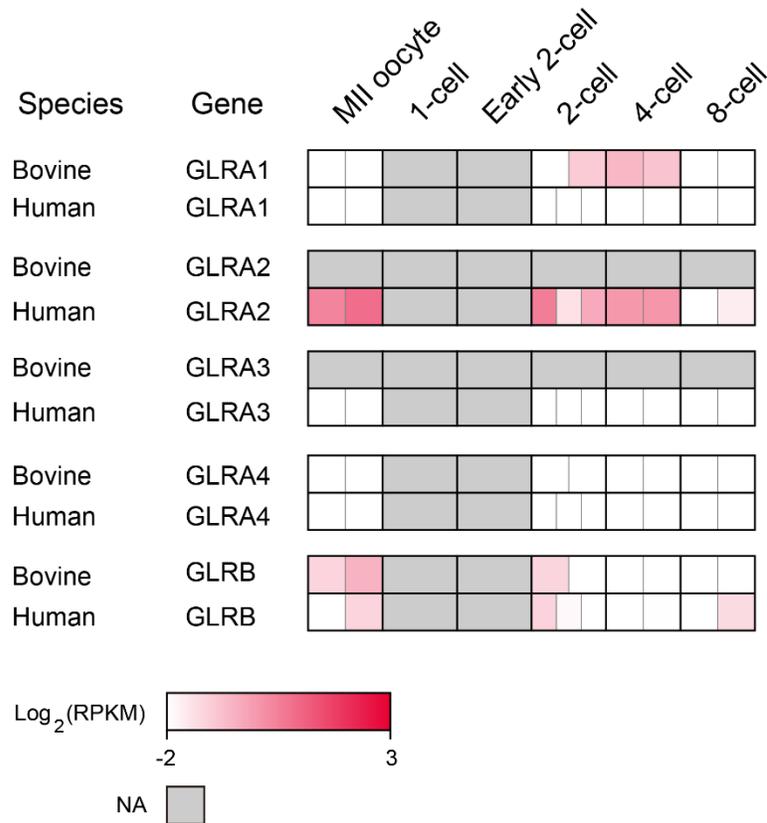


図 6 ウシ (Bovine) およびヒト (Human) の MII 期卵子から 8 細胞期胚までのグリシンレセプター $\alpha 1$ (GLRA1)、 $\alpha 2$ (GLRA2)、 $\alpha 3$ (GLRA3)、 $\alpha 4$ (GLRA4) および β (GLRB) サブユニットの RNA-seq データのヒートマップ解析。発現量は Log₂ (RPKM) で示し、赤色が濃いほど発現量が多いことを表している。

2-3 グリシンレセプター $\alpha 4$ 遺伝子欠損マウスの作製

これまでの検討により、マウスにおいては GLRA4 タンパク質が MII 期卵子から 4 細胞期胚まで発現し、卵管液中の遊離グリシンの受容体として機能しているのではないかと考えられる。この仮説を検証するためには、グリシンレセプター阻害剤実験のようにすべてのサブユニットの機能を欠損させるのではなく、 $\alpha 4$ サブユニットだけを機能欠損させる必要がある。そこで、特定のゲノム領域の DNA 塩基配列を、目的とする配列に変更させるゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 (the emergence and accelerating improvements of clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated protein 9) システムを用いて、*Glra4* 遺伝子を欠損させた遺伝子改変マウス (ノックアウトマウス) を作製することを目指した。

マウスの *Glra4* 遺伝子は、1つのシグナルペプチド (exon 1 にコードされている) と、4つの細胞膜貫通ドメイン (transmembrane domain, TM1-TM4) を有し、細胞外領域 (extracellular region; exon 2 から 7 の前半まで、exon 7 の後半から exon 8 の前半まで) と細胞内領域 (intracellular region; exon 7 の一部, exon 8 の後半から exon 9 の前半まで) で構成されている。グリシン結合部位 (glycine binding site) は exon 2、exon 4、exon 8 の3か所にあると推定されている (図7)。GLRA4 タンパク質の機能を完全に欠損させるためには、リガンドであるグリシンと結合し、イオンチャネルの開閉を制御する細胞外領域を欠損させる必要がある。しかし、*Glra4* 遺伝子は 28,573 塩基と比較的長いコード領域をもつ遺伝子であるため、これらの exon をすべて欠損させる *null* 変異体の作製は困難である。

そこで本研究では、これらの細胞外領域が受精卵の細胞膜上に発現しないことで、細胞外に存在する卵管液中のグリシンと結合できず、結果的に細胞内にグリシン-グリシンレセプターの分子シグナルが導入されずに機能欠損となるノックアウトスキームを考案した。そのためには、最初の膜貫通ドメインである TM1 (exon 7) の前に、従来の転写終結点 (stop コドン) よりも上流に存在する人為的な転写終結点 (premature stop コドン) を導入する必要がある。そこで、ガイド RNA (gRNA) 設計ソフトウェアである CRISPR direct (Naito et al., 2015) を用いて検索したところ、exon 4 のなかにオフターゲット (目的外の遺伝子変異) を引き起こす確率が低い領域を発見したため、この領域で DNA の二重鎖破壊 (double-strand break, DSB) と挿入/欠失変異 (InDel) を導入するように gRNA を設計した (図7、赤字)。

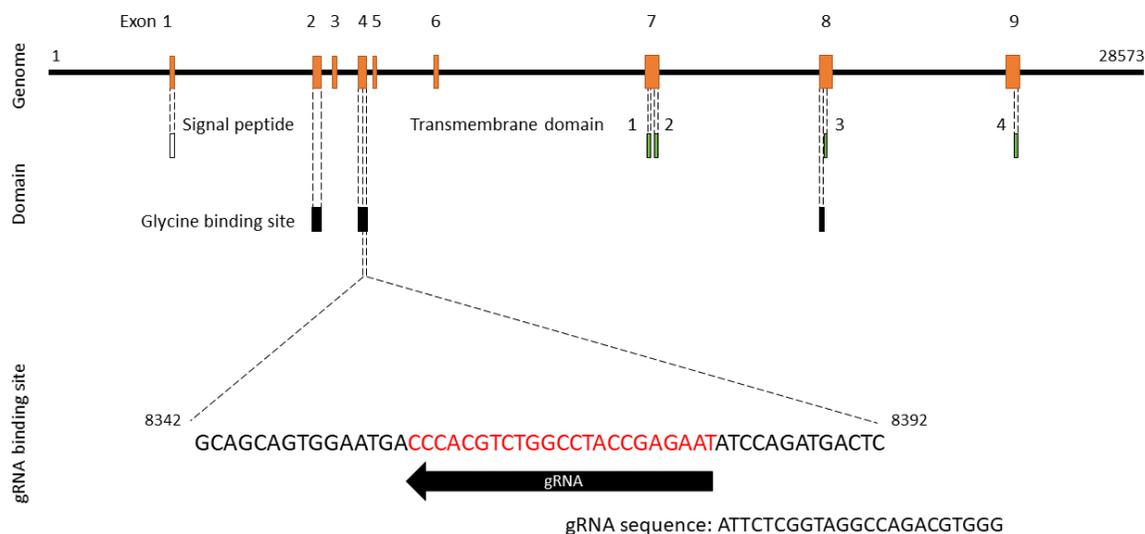


図7 グリシンレセプター $\alpha 4$ ノックアウトマウス作製のための gRNA のデザインスキーム。上段はエクソンとイントロンを含むゲノム構造を示す。中段はドメイン構造を示す。1つのシグナルペプチドと、4つの細胞膜貫通ドメイン (transmembrane domain) を有し、細胞外領域 (extracellular region) と細胞内領域 (intracellular region) で構成されている。グリシン結合部位 (glycine binding site) は3つ推定されている。下段には標的領域と gRNA 配列を示す。塩基番号は、GeneBank 上での表記に合わせ、転写開始点であるマウス X 染色体上の 135655264 塩基を 1 として表記している。

この設計した gRNA と Cas9 タンパク質を、われわれが以前開発した方法と同じように (Darwish et al., 2019; Nishizono, Darwish, Uosaki, et al., 2020)、エレクトロポレーションによって C57BL/6J マウス受精卵に導入した。その後、2細胞期胚に発生したものを仮親に胚移植することで、8356-8366 の位置に 11 塩基の欠失を持つヘテロ接合体の F0 マウスを得た (図 8A)。この *Glr4* 変異アレルの DNA 配列からオープンリーディングフレームを予測したところ、11 塩基の欠損変異下流でフレームシフトが起こり、多くの premature stop コドンが挿入され、ほとんどのゲノム領域が翻訳されていないことが分かった (図 8B)。

A

| | | |
|--------|-------------------------|--------------------------|
| WT | PAM | |
| | CGGCAGCAGTGGAAATGA | CCCACGCTCTGGCCTACCGAGAAT |
| Mutant | CGGCAGCAGTGGAAATG ----- | GCCTACCGAGAAT |

B :

| | |
|--------|--|
| WT | LQGPCRMTTLVPASLFLLWTLPGKVLSSVALAKEDVKSGLKGSQPMSPSDFLDKLMGRTSGYDARIRPNFKGPPVNVTCNIFNSFGSVTETTM DYRVNVLRRQWVNDPRLAYREYPDDSLDLPMSLDIWKPDFFANEKGANFHEVTTDNKLLRFKNGNVLSIRLTLILSCPMDLKNFPMIDIQTC TMOLESFGYTMNDLMFEWLEDAPAVQVAEGLTLPQFILRDEKDLGYCTKHYNTEGKFTCIEVKFHLERQMGYYLIQMIYPSLLVLSWVSFWINMD AAPARVGLGITTTLTMTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFAALLEYAAVNFVSRQHKFMRLLRRRQRMRMEEDIRESRFYFRGGY LGHCLQARDGGPMEGSSISPPPTLLKEGETMRKLYVDRAKRIDTISRVPFTFLVFNIFYWVVYKVLREDIHQALStopIGWRILStopC |
| Mutant | LQGPCRMTTLVPASLFLLWTLPGKVLSSVALAKEDVKSGLKGSQPMSPSDFLDKLMGRTSGYDARIRPNFKGPPVNVTCNIFNSFGSVTETTM DYRVNVLRRQWVNDPRLAYREYPDDSLDLPMSLDIWKPDFFANEKGANFHEVTTDNKLLRFKNGNVLSIRLTLILSCPMDLKNFPMIDIQTC GHTDLYNAAGKWLWHHESStopPHVStopVARRCSCCPSSGStopVVDSTPIYFAGStopEGSRVLYQALQYRKIHLHStopGKVSPGAADGLLSDSNVH PQPTHRRHPVLGLLDQHGGCPCSCRPWHHHSPHHDNSELWIGLFAStopGVLKGNStopHLDGCMALCICCLAStopVCCSQFCLSSAStopGI YETSStopKAETSAYGRRHHKREPLLSWLWPRTLLTSKGVRSNGRFOHLStopSPTSNPSSKGRRNHEETLCGSPQENStopHHLQGCLPFYFS CLQYLLGCLStopSTKVRRYPPGTVNRVEIV |

図8 野生型 (WT) および *Glr4* 変異マウス (Mutant) の DNA 塩基配列と予測されるアミノ酸配列。A) DNA 塩基配列。ダッシュ (-) は元の *Glr4* 塩基配列から欠落しているヌクレオチドを示す。B) ExPASy ソフトウェアを用いて予測した WT マウスと *Glr4* 変異マウスのアミノ酸配列。赤文字は、オープンリーディングフレームを示す。

また、I-TASSER ソフトウェアによるタンパク質構造予測 (Roy et al., 2010; Yang et al., 2014; Zhang, 2008) を行った結果、変異体 GLRA4 タンパク質は単純に短くなっているだけでなく、野生型 GLRA4 とは異なる構造を持っていることが示唆された (図9)。実際に、野生型のマウス受精卵では MII 期卵子から 4 細胞期胚まで発現していた GLRA4 タンパク質が、変異型のマウス受精卵ではどのように発現しているかを免疫組織化学染色で調べた結果、変異型 GLRA4 マウス受精卵ではシグナルが検出されなかった (図10)。今回使用した抗 GLRA4 一次抗体は TM3-TM4 間の細胞内領域部位を認識しているため、変異型マウス受精卵ではこれらの領域が欠失しておりシグナルが検出されなかったと考えられる。これらの結果から、変異マウスは *Glr4* 遺伝子が欠損していると判断できるため、以降の受精卵におけるグリシンレセプター $\alpha 4$ サブユニットの機能を調べるために用いた。

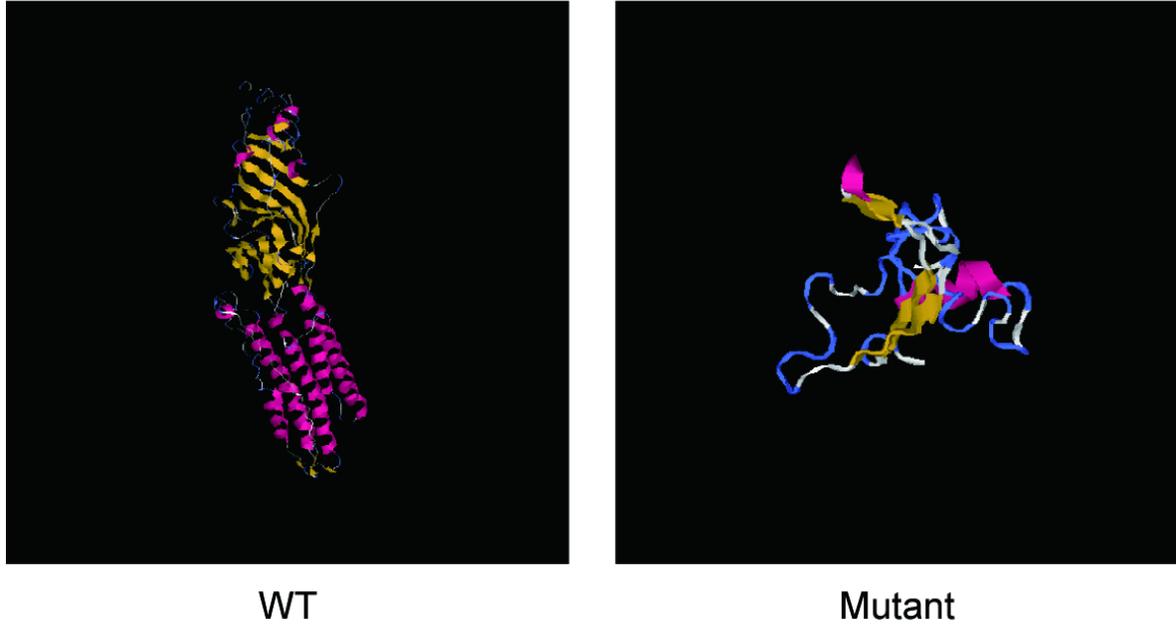


図9 I-TASSER ソフトウェアを用いた野生型 (WT) および変異型 (Mutant) GLRA4 タンパク質の3次元構造予測像

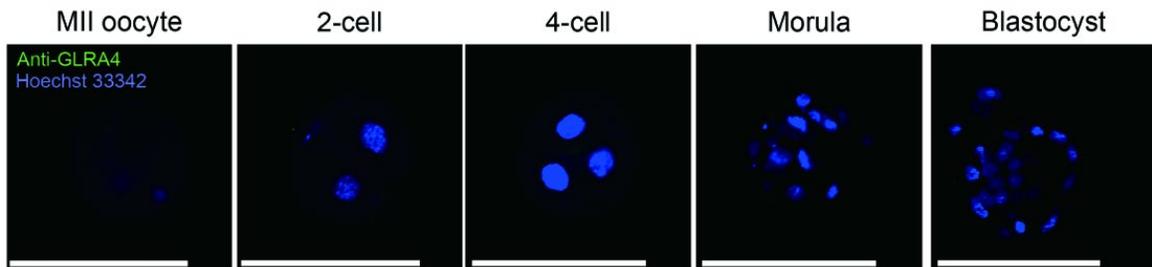


図10 Glra4 変異マウスの受精卵における GLRA4 タンパク質の免疫組織化学的染色 (n = 8 animals, 78 embryos)。緑は GLRA4 タンパク質を示し、青は Hoechst 33342 で核を示す。サイズバーは 100 μ m。

2-4 グリシンレセプター $\alpha 4$ 欠損マウスの受精卵は発生が阻害され、自然交配時の新生児数も減少する

前項までに作製したグリシンレセプター $\alpha 4$ の機能欠損マウスを使い、排卵から初期発生におけるグリシン-グリシンレセプター $\alpha 4$ シグナルの役割を調べるために、過排卵誘発および体外受精、胚培養実験を行った (図 11)。 *Glr4* ノックアウトマウスから得られた過排卵誘導により排卵された卵子数は、野生型マウスと比較して統計的に有意な差はなかった (図 11A)。この結果は、グリシンレセプター $\alpha 4$ の機能が、卵子形成および排卵に必要とされていないことを示している。

次に、体外受精を行い、胚盤胞期までの発生率と胚盤胞内の細胞数を調べた。注目すべきことに、 *Glr4* ノックアウトマウスでは、媒精 96 時間後の胚盤胞形成率が有意に低下した (図 11B, $P < 0.05$)。また、生殖補助医療における胚の品質の指標の一つである胚盤胞期の細胞数は、 *Glr4* ノックアウトマウスにおいて有意に減少していた (図 11C, $P < 0.05$)。さらに、体外受精に限らず、自然交配時の一回に生まれる新生児数 (リッターサイズ) も、野生型マウスの平均 8.64 ± 1.07 匹から、 *Glr4* ノックアウトマウスでは平均 3.89 ± 1.97 匹と顕著に減少していた (図 11D, $P < 0.000001$)。これらの結果は、卵管液中または培養液中の遊離グリシンからのグリシンレセプター $\alpha 4$ を介した分子シグナルが、マウス受精卵の初期発生に非常に重要な機能を持っていることを表している。

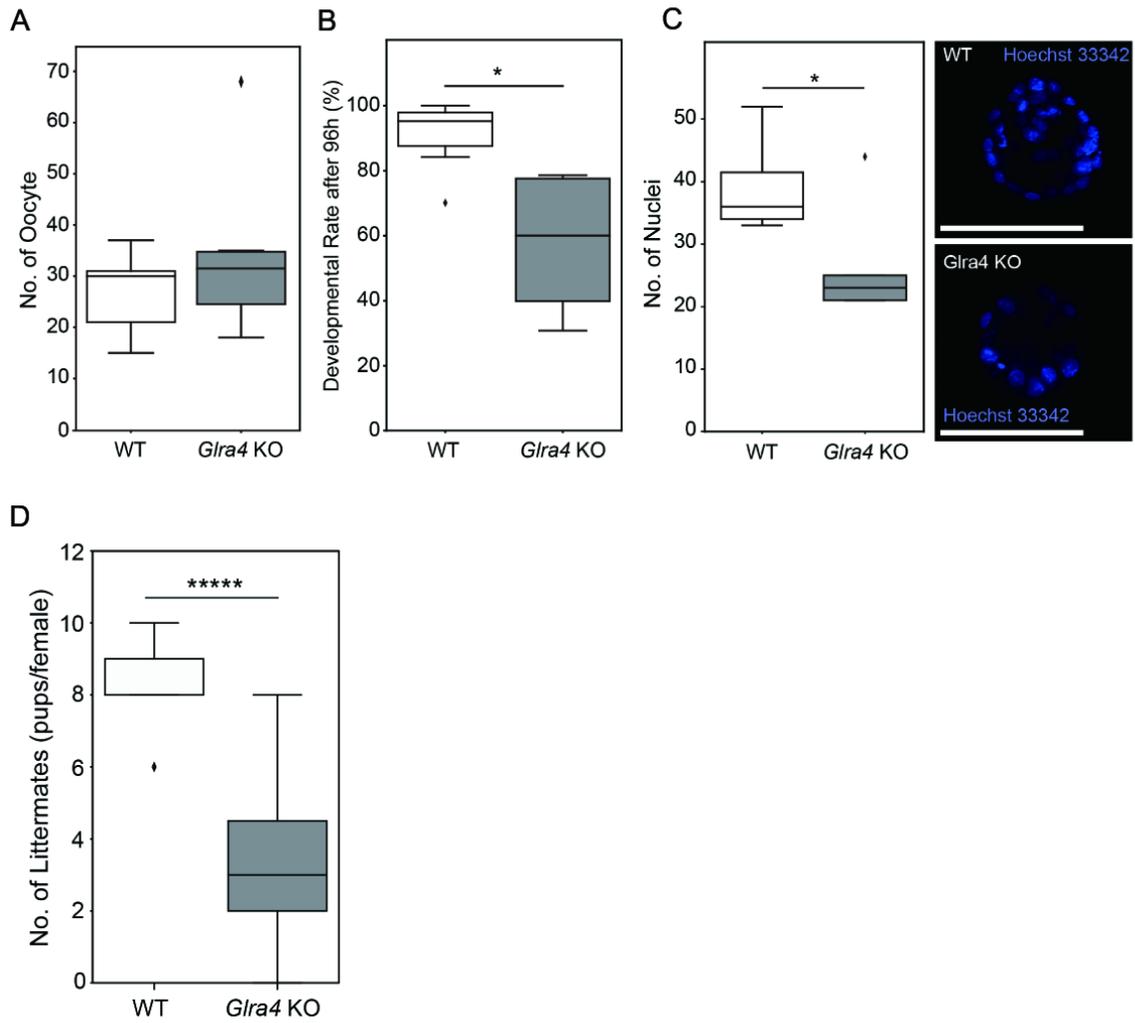


図 11 *Glra4* ノックアウトマウス (*Glra4* KO) の表現型解析。A) 野生型 (WT) マウス (白, n = 9) と *Glra4* KO マウス (灰色, n = 6) の排卵卵子数の比較。B) 媒精 96 時間後の WT (白, n = 7) と *Glra4* KO マウス (灰色, n = 7) の発生率。C) WT マウス (白, n = 7) と *Glra4* KO マウス (灰色, n = 5) における胚盤胞の細胞核数の比較。Hoechst 33342 染色後、核数を測定した。右図は蛍光顕微鏡画像を示す。サイズバーは 100 μ m。D) 自然交配における WT マウス (白, n = 12) と *Glra4* KO マウス (灰色, n = 12) のリッターサイズ。リッターサイズは 1 回の出産で 1 匹の母親から生まれた新生児の数を示す。比較には同週齢の WT マウスと *Glra4* KO マウスを用いた。A-D における箱ヒゲ図では、箱の上端は第三四分位数を、下端は第一四分位数を、箱の内の線は中央値を示している。また、箱の外の線分はそれぞれ最小値と最大値を、◇は外れ値を示している。(*) P < 0.05、(*****) P < 0.000001、WT と *Glra4* KO マウスの差は Brunner-Munzel 検定で検定した。

3. 考察と結論

生殖補助医療技術の革新には、受精卵や胚、胎児のおかれている状況を基礎医学的に詳細に解析し、生殖工学技術の開発に応用することが必要である。本研究では、これらのうち受精卵が卵管液中で発生することに着目し、卵管液の主要成分の一つである遊離グリシンが哺乳類受精卵に与える影響とその分子メカニズムを探索することを目的として、検討を行い、マウス受精卵の初期発生にグリシンレセプターが関与していることを明らかにした。また5つあるグリシンレセプターサブユニットのうち、 $\alpha 4$ と β サブユニットがマウス MII 期卵子および4細胞期までの受精卵で発現していることも明らかにした。さらに、遺伝子改変マウスの解析結果から GLRA4 タンパク質がマウス受精卵の胚盤胞までの発生を促進し、胚の質やリッターサイズを向上させることを明らかにした。これらの知見の概要を図 12 に示す。

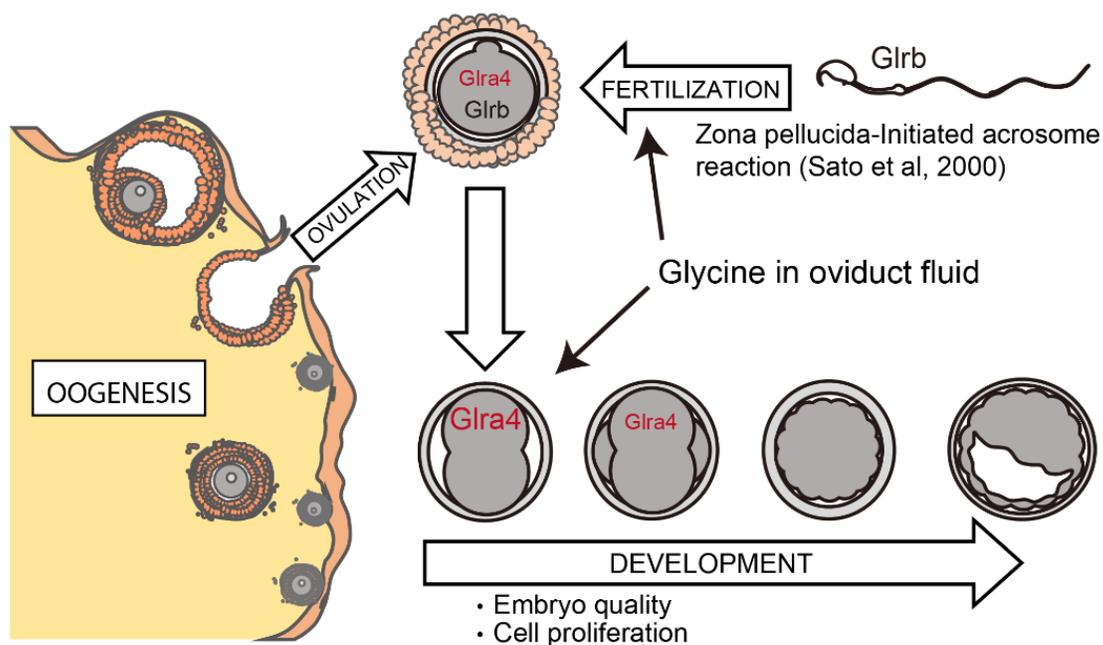


図 12 受精から胚盤胞期までの初期発生におけるグリシンレセプターの役割のイメージ図。

これまでグリシンレセプターが受精卵において何らかの役割を持っているという知見は皆無であったが、図3において示したように、2種類のグリシンレセプター阻害剤がマウス受精卵の桑実胚までの発生を強力に抑制することから、グリシンレセプターがマウス受精卵の初期発生において重要な役割を果たしていることが本研究により新たに明らかになった。また、グリシンレセプターはマウス受精卵だけでなく、ヒトやウシの受精卵でも発現しており（図6）、受精卵の初期発生におけるグリシンレセプターの役割は哺乳類で保存されている可能性が示唆された。マウス受精卵では *Glra4* 遺伝子が発現していたが、他の動物種の受精卵では異なるサブタイプの α サブユニットが発現していたことから、マウス受精卵における GLRA4 タンパク質の機能が、他の動物種の受精卵では別の α サブユニットによって担われていることも推測できる。特筆すべき点として、ヒトでは偽遺伝子と考えられている GLRA4 遺伝子の代わりに GLRA2 遺伝子が発現していることで、グリシンシグナルを下流に伝えることができる機能的グリシンレセプターサブユニットが受精卵に発現していることが重要であると考えられる。

ヒトのグリシンレセプター $\alpha 4$ サブユニットをコードする DNA 領域には、膜貫通ドメインの前の exon 9 に stop コドンが存在するため、機能性ドメインが細胞外に露出せずに、結果として機能性を持たないタンパク質となることから、ヒト GLRA4 は偽遺伝子であると考えられてきた (Simon et al., 2004)。ヒトで偽遺伝子であると推測されていたため、グリシンレセプター $\alpha 4$ サブユニットの研究はほとんど行われてこなかったが、他の生物、例えば、マウス、ラット、およびゴリラでは、膜貫通ドメインに stop コドンが存在せず、ゲノム上の単一コピーの機能性タンパク質としてコードされている (Leacock et al., 2018)。また、ゼブラフィッシュではゲノム上に 2 コピーの機能的なグリシンレセプター $\alpha 4$ 遺伝子が存在している (Hirata et al., 2010; Imboden et al., 2001)。このように、ヒト以外の動物種での状況を鑑みれば、グリシンレセプター $\alpha 4$ サブユニットが細胞内で何らかの機能を有している可能性は高く、これまでの数少ない機能解析でも、魚類の脊髄や後脳で GLRA4 タンパク質が機能している可能性が示唆されていた (Leacock et al., 2018)。本研究はこれらの報告とは異なり、受精卵における初期発生への関与というグリシンレセプター $\alpha 4$ サブユニットの新たな機能を同定したという点でも意義深いと考えられる。

本研究における課題として、図 11 に示したように、*Glr4* ノックアウトマウスの胚発生における表現型が、薬理的なグリシンレセプター阻害剤を用いた実験結果よりもマイルドであることが挙げられる。この点については、マウス受精卵に他の α サブユニットが低レベルとはいえ発現しているため、*Glr4* ノックアウトマウス受精卵では他の α サブユニットが機能補完を行っているのではないかと予想される。これを示唆するいくつかの証拠として、1) すべてのグリシンレセプターサブユニットを薬理的に阻害すると、ほとんどすべての胚が桑実胚で発育を停止する (図 3D)、2) マウスの初期胚では、*Glr4* の他に少量の *Glr1*、*Glr3*、*Glrb* が発現している (図 4A)、3) ウシやヒトでは $\alpha 4$ サブユニットの代わりに他の α サブユニットが発現しており (図 6)、これら他のサブユニットも受精卵で機能性を有する可能性が高い、などが挙げられる。

もう一つの課題として、卵管液中の遊離グリシンが受精卵膜上のグリシンレセプターに結合した後の詳細な分子メカニズムの解明が挙げられる。詳細な下流シグナルの解明にはさらなる検討が必要であるが、現時点で推測される分子メカニズムを以下に示す。グリシンレセプターは Cl⁻ イオンを透過する塩基性イオンチャネルであり、それ自体はシグナル伝達ドメインを持たない (Miyazawa et al., 2003; Moss & Smart, 2001)。したがって、グリシンレセプターを介した卵管液中のグリシンシグナルは、細胞内への Cl⁻ イオンの取り込みを行い、それによって今度は細胞内へのグリシンの取り込みを行うグリシントランスポーターの発現が誘導され、結果として細胞内のグリシン濃度を亢進させることで下流にグリシンシグナルを伝達するのではないかと推測される。このようなグリシンレセプターとグリシントランスポーターの機能共役は、神経細胞の細胞内 Cl⁻ イオンの取り込みによって活性化されるシグナル伝達経路として、すでにいくつか知られている (Gabernet et al., 2004; Kopec et al., 2010)。今後はこれらのグリシンレセプターの下流のシグナル伝達経路を明らかにすることで、さらに卵管液中のグリシンの役割を明らかにしていくことが重要であると考えられる。

結論として、本研究では、グリシンレセプター $\alpha 4$ がマウス受精卵の初期発生に関与していること、グリシン-グリシンレセプターの分子シグナルが受精卵の胚盤胞への発達を促進し、また胚盤胞の細胞数を良好な状態にすること、自然交配時に出産される新生児の

数を増やすことをはじめて明らかにした (Nishizono, Darwish, Endo, et al., 2020)。また、同時にこれらの結果は、卵管液や受精卵培養培地の成分として必要とされてきたグリシンが、グリシンレセプターを介したシグナル伝達経路によって受精卵に作用することも示している。これらのデータは、卵管液成分と哺乳類の受精卵との相互作用についての新たな知見を提供するとともに、ウシやヒト受精卵での知見と合わせて、生殖補助医療の新しい技術開発につながることを期待される。

4. 実験方法

4-1 試薬

すべての試薬は、別段の記載がない限り、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。体外受精および胚培養に使用したヒト卵管模倣液 (human fallopian tube fluid, HTF) およびカリウム添加単純最適化培地 (potassium-supplemented simplex optimization medium, KSOM) は、アークリソース株式会社 (熊本、日本) から購入した。

4-2 動物

実験に使用した C57BL/6J の雄マウス (8-18 週齢) と雌マウス (4-16 週齢) は、日本 SLC (浜松市、日本) から購入した。遺伝子改変マウスの作製には 4-8 週齢の雌マウスを使用した。これは一般的にこの週齢の雌マウスは排卵数が多いためである。また、in vitro の実験や *Glra4* KO 受精卵の表現型解析には、12-16 週齢の雌マウスを使用した。*Glra4* KO マウスを使った実験では、対照群および実験群としたマウスは同腹産子であり、したがって、常に同じ週齢である。胚移植の際に使用する偽妊娠マウスは、日本 SLC から購入した ICR 雌マウス (9-12 週齢) を用いて作製した。動物は、飼料 (CE2、日本クレア株式会社、東京、日本) と水を自由摂取とし、 22 ± 2 °C、40 - 60% の相対湿度で、12 時間ごとの明暗サイクルの下で飼育した。すべての実験は、国立大学法人富山大学および Max Planck Florida Institute for Neuroscience の規則に従って実施された。動物実験計画書は富山大学動物管理委員会および Max Planck Florida Institute for Neuroscience の機関内委員会 (IACUC) の審査を受け、承認を得てから実施した。

4-3 体外受精によるマウス胚の作製

マウス受精卵は、体外受精によって調整した (Nishizono et al., 2017)。まず、C57BL/6J 雌マウスに過排卵誘発剤である HyperOva (九動株式会社、佐賀、日本) を用法通りに腹腔内投与し、その 48 時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピンを投与することによって過排卵させた。ヒト絨毛性ゴナドトロピン投与 16-20 時間後に、マウスを安楽死させ、卵管膨大部から卵子卵丘複合体を、パラフィンオイル (ナカライテスク、京都、日本) で覆われた

100 μL の HTF 培地に入れた。次に、C57BL/6J 雄マウスを安楽死させた後、両方の精巣上体尾部から精子を取り出し、200 μL の HTF 培地中に導入し CO_2 インキュベーター (37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2) で 1.5 時間静置することで前培養した (平均精子数は 8000 cell/ μL であった)。前培養後、精子懸濁液 1 μL を卵子卵丘複合体が入っている 200 μL の HTF 培地に加え、媒精した (最終精子濃度は平均で 200-400 cell/ μL であった)。媒精後は CO_2 インキュベーターで培養し、媒精 3 時間後に、余分な精子を除去するために KSOM で卵子および受精卵を洗浄した。調整した受精卵は、グリシンレセプター阻害実験およびノックアウトマウスの作製に用いた。

4-4 受精卵における GlyR 阻害実験

受精卵におけるグリシンレセプター阻害実験には、硝酸ストリキニーネ 5 水和物 (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、日本) と ω -ホスホノ- α -アミノ酸 (PMBA、Sigma-Aldrich) の 2 種類の阻害剤を用いた。それぞれを水に溶解して高濃度原液を調製し、これを受精卵培養培地に添加して使用した。受精卵培地中の最終濃度は、文献値に従い (Jensen, 2005; Saitoh et al., 1994)、ストリキニーネ 1 mM、PMBA 100 μM になるように調整した。対照群では、受精卵培地に阻害剤と同量の H_2O を添加した。受精卵を 20-50 個のグループに分け、阻害剤または H_2O を添加した KSOM 中で 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 で培養した。培養実験は、各実験群ごとに 5 回以上行った。媒精後 24 時間ごとに立体顕微鏡下で受精卵の発生段階を観察した。発生率は、(4 細胞胚期数あるいは桑実胚数、または胚盤胞数) / (2 細胞期胚数) $\times 100$ として算出した。

4-5 トランスクリプトーム解析

次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現 (RNA-seq) データは、NCBI GEO データベースから収集し、マウス受精卵については GSE66390 の RNA-seq データセットを使用した。マウスの RNA-seq データは、kallisto ソフトウェアを用いて、対応する RefSeq mRNA にアラインメントした (N. L. Bray et al., 2016)。マウスの全身発現データは、Söllner らの公開データ (登録番号 E-MTAB-6081) から得た (N. L. Bray et al., 2016)。ウシ受精卵 (GSE59186) およびヒト受精卵 (GSE101571) の RNA-seq データセットは NCBI GEO データベースから収集し使用した。ヒト受精卵の RNA-seq データは、UCSC コンピュータプログラム STAR バー

ジョン 2.6.0 (Dobin et al., 2013) によって提供されたアノテーションファイルを用いて、アラインメントした。各遺伝子にアラインメントされた配列数は、featureCount バージョン 1.6.0 (Dobin et al., 2013) を用いてカウントした。ウシの配列は ABI SOLiD を用いて取得し、Bowtie バージョン 1.1.2 (Langmead et al., 2009) を用いて、Bovine Genome Database (<http://bovinegenome.org/>) バージョン 1.6 が提供するウシ mRNA 配列に対してアラインメントしカウントした。

4-6 免疫組織化学染色

マウス受精卵の免疫組織化学的染色は、Sauvegarde らの方法に従って行った (Sauvegarde et al., 2016)。GLRA4 タンパク質を検出するために、一次抗体としてマウス Glnr4 タンパク質と相同配列を持つ抗 GLRA4 ウサギポリクローナル IgG 抗体 (HPA044759、Sigma-Aldrich) を使用し、陰性対照として、ウサギ IgG ポリクローナルアイソタイプ対照抗体 (ab37415、Abcam plc、Cambridge、UK) を使用した。抗原配列は GLRA4 タンパク質の TM3-TM4 間の細胞内領域部位

(IRLRRRQRRQRLEEDIIQESRFYFRGYGLGHCLQARDGGPMEGSGIYSPQPPAPLLREGETTRKLYVD) となっている。二次抗体として抗ウサギ IgG-FITC (F0382、Sigma-Aldrich) を用いた。

マウス胚を 4%パラホルムアルデヒド/KSOM で 30 分間、室温で固定する。固定後、0.2% goat serum/PBS で三回洗浄する。0.2% Triton X-100/PBS にて透過処理後、再度洗浄し、2% goat serum/PBS で 30 分間、室温でブロッキングを行う。一次抗体を入れた CanGetSignal®溶液 (NKB-401, TOYOBO Co. Ltd, Osaka, Japan) に胚を入れ、室温で 2 時間一次抗体反応を行った。洗浄後、二次抗体/Hoechst33342/CanGetSignal®溶液中に胚を移し、室温で 1 時間、二次抗体反応と核染色を行った。二次抗体反応後、洗浄し、40%グリセロール/PBS で置換し、35mm ガラスボトムディッシュ (3960-035, AGC TECHNO GLASS Co. Ltd, Shizuoka, Japan) にマウントして、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM780, Zeiss, Jena, Germany) にて観察した。受精卵の蛍光は、ZEN ソフトウェア (Zeiss) を用いて観察および解析した。

4-7 CRISPR/Cas9 システムを用いた *Gtra4* ノックアウトマウスの作製

ゲノム編集に用いる gRNA の設計には、CRISPR direct ソフトウェア (<https://crispr.dbcls.jp>) を用いた (Naito et al., 2015)。オフターゲット効果を低減するために、CRISPR direct で示唆された配列を BLAST で確認し、予測されるオフターゲット効果が最も少ない gRNA を採用した (5' AUUCUCGGUAGGCCAGACGU 3')。crRNA、tracrRNA および Cas9 タンパク質は、すべて IDT 社 (Coralville, IA, USA) から購入した。gRNA および Cas9 タンパク質の C57BL/6J マウス受精卵への導入は、以前報告した方法で行った (Darwish et al., 2019; Nishizono, Darwish, Uosaki, et al., 2020)。アニーリングした crRNA と tracrRNA および Cas9 タンパク質をそれぞれ 100 ng/μL になるように緩衝液で調整した後で、受精卵用電極 (LF501PT1-10、BEX 株式会社、東京、日本) に充填し、その中に ~100 個の 1 細胞期マウス受精卵を入れた。エレクトロポレーターは BEX 社の CUY21EDIT II を使用し、電圧：25V、パルス方向 (Pd)：Pd+、パルス時間：3 msec、パルス間隔：97 msec、パルス回数：5 回という条件で、CRISPR 複合体をマウス受精卵に導入した。エレクトロポレーションした後の受精卵は 16-24 時間 CO₂ インキュベーター内で培養し、翌日 2 細胞期に発生した受精卵を、偽妊娠マウス (仮親マウス) の卵管に移植した。胚移植後、仮親マウスが出産した F0 世代のマウスが 3 週齢に達した時点で、耳組織からゲノム DNA を抽出し、サンガーシーケンシングにより DNA 配列を確認した。DNA 配列解析用プライマーは、5' GTTCAACCTCCTGGCCTACC 3' (F primer)、5' CCAGCACTGTACAGCATGGA 3' (R primer) を使用した。ジェノタイピングは、CRISP-ID ソフトウェア (<http://crispid.gbiomed.kuleuven.be/>) を用いた配列解析により行った (Dehairs et al., 2016)。オフターゲット効果の影響を最小限にするために、F0 マウスを 2 世代にわたってバッククロスした N3 世代のマウスを表現型解析に使用した。

4-8 *Gtra4* ノックアウトマウスから得られた受精卵の体外受精および胚培養

Gtra4 欠損が卵子および受精卵に与える影響を調べるために、野生型マウス (WT) および *Gtra4* ノックアウトマウス (*Gtra4* KO) の卵子の体外受精および胚培養を行った。受精時のグリシンレセプターの影響を排除するために、C57BL/6J マウス精子を用いて、WT マウスおよび *Gtra4* KO マウスの卵子を体外受精し、余分な精子を除去したのち、KSOM 培地で培養した。媒精後 24 時間ごとに実体顕微鏡下で観察した発生率は、(4 細胞胚期数あ

るいは桑実胚数、または胚盤胞数) / (2 細胞期胚数) × 100 として算出した。胚盤胞の細胞数をカウントするために、核を Hoechst 33342 で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてカウントした (Nishizono et al., 2017)。

4-9 統計的な解析

すべての変数は、別段の記載がない限り、平均値 ± 標準偏差 (mean ± s.d.) として表記した。データの正規性は、Kolmogorov-Smirnov 検定を用いて評価した。統計的な差異は、Brunner-Munzel 検定およびノンパラメトリック多重比較検定 (Kruskal-Wallis 検定後の Brunner-Munzel post hoc) によって検討した。有意水準 $P < 0.05$ をすべての統計検定に使用し、両側検定を適用した。すべての解析は Python3 にて Numpy 1.17.0 および Scipy1.6.1 を用いて行った。

5. 参考文献

- Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., & Coy, P. (2010). Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs? In *Molecular Human Reproduction* (Vol. 16, Issue 12, pp. 896–906). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq056>
- Bray, C., Son, J. H., Kumar, P., Harris, J. D., & Meizel, S. (2002). A role for the human sperm glycine receptor/Cl⁻ channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3. *Biology of Reproduction*, *66*(1), 91–97. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.91>
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology*, *34*(5), 525–527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
- Darwish, M., Nishizono, H., Uosaki, H., Sawada, H., Sadahiro, T., Ieda, M., & Takao, K. (2019). Rapid and high-efficient generation of mutant mice using freeze-thawed embryos of the C57BL/6J strain. *Journal of Neuroscience Methods*, *317*(January), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.01.010>
- Dawson, K. M., Collins, J. L., & Baltz, J. M. (1998). Osmolarity-Dependent Glycine Accumulation Indicates a Role for Glycine as an Organic Osmolyte in Early Preimplantation Mouse Embryos1. *Biology of Reproduction*, *59*(2), 225–232. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.2.225>
- de Mouzon, J., Chambers, G. M., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., Ishihara, O., Banker, M., Dyer, S., Kupka, M., & David Adamson, G. (2020). International committee for monitoring assisted reproductive technologies world report: Assisted reproductive technology 2012. *Human Reproduction*, *35*(8), 1900–1913. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa090>
- Dehairs, J., Talebi, A., Cherifi, Y., & Swinnen, J. V. (2016). CRISP-ID: Decoding CRISPR mediated indels by Sanger sequencing. *Scientific Reports*, *6*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1038/srep28973>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, *29*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Ferrick, L., Lee, Y. S. L., Gardner, D. K., & Sakkas, D. (2019). Reducing time to pregnancy and facilitating the birth of healthy children through functional analysis of embryo physiology. *Biology of Reproduction*, *101*(6), 1124–1139. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz005>
- Gabernet, L., Pauly-Evers, M., Schwerdel, C., Lentz, M., Bluethmann, H., Vogt, K., Alberati, D., Mohler, H., & Boison, D. (2004). Enhancement of the NMDA receptor function by reduction of glycine transporter-1 expression. *Neuroscience Letters*, *373*(1), 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.09.064>
- Gao, Y., Liu, X., Tang, B., Li, C., Kou, Z., Li, L., Liu, W., Wu, Y., Kou, X., Li, J., Zhao, Y., Yin, J., Wang, H., Chen, S., Liao, L., & Gao, S. (2017). Protein Expression Landscape of Mouse Embryos during

- Pre-implantation Development. *Cell Reports*, 21(13), 3957–3969.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.111>
- Herrick, J. R., Lyons, S. M., Greene, A. F., Broeckling, C. D., Schoolcraft, W. B., & Krisher, R. L. (2016). Direct and Osmolarity-Dependent Effects of Glycine on Preimplantation Bovine Embryos. *PLOS ONE*, 11(7), e0159581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159581>
- Hirata, H., Carta, E., Yamanaka, I., Harvey, R. J., & Kuwada, J. Y. (2010). Defective glycinergic synaptic transmission in zebrafish motility mutants. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 2, Issue JAN). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.026.2009>
- Hugentobler, S. A., Diskin, M. G., Leese, H. J., Humpherson, P. G., Watson, T., Sreenan, J. M., & Morris, D. G. (2007). Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Molecular Reproduction and Development*, 74(4), 445–454. <https://doi.org/10.1002/mrd.20607>
- Imboden, M., Devignot, V., & Goblet, C. (2001). Phylogenetic relationships and chromosomal location of five distinct glycine receptor subunit genes in the teleost *Danio rerio*. *Development Genes and Evolution*, 211(8–9), 415–422. <https://doi.org/10.1007/s004270100164>
- Jensen, A. A. (2005). Functional characterisation of human glycine receptors in a fluorescence-based high throughput screening assay. *European Journal of Pharmacology*, 521(1–3), 39–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.08.002>
- Kopec, K., Flood, D. G., Gasior, M., McKenna, B. A. W., Zuvich, E., Schreiber, J., Salvino, J. M., Durkin, J. T., Ator, M. A., & Marino, M. J. (2010). Glycine transporter (GlyT1) inhibitors with reduced residence time increase prepulse inhibition without inducing hyperlocomotion in DBA/2 mice. *Biochemical Pharmacology*, 80(9), 1407–1417. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.07.004>
- Labonne, J. D. J., Graves, T. D., Shen, Y., Jones, J. R., Kong, I. K., Layman, L. C., & Kim, H. G. (2016). A microdeletion at Xq22.2 implicates a glycine receptor GLRA4 involved in intellectual disability, behavioral problems and craniofacial anomalies. *BMC Neurology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0642-z>
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10(3), R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
- Leacock, S., Syed, P., James, V. M., Bode, A., Kawakami, K., Keramidas, A., Suster, M., Lynch, J. W., & Harvey, R. J. (2018). Structure/Function Studies of the $\alpha 4$ Subunit Reveal Evolutionary Loss of a GlyR Subtype Involved in Startle and Escape Responses. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 23. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00023>
- Lee, E.-S., & Fukui, Y. (1996). Synergistic Effect of Alanine and Glycine on Bovine Embryos Cultured in a Chemically Defined Medium and Amino Acid Uptake by in Vitro-Produced Bovine Morulae and Blastocysts. *Biology of Reproduction*, 55(6), 1383–1389. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.6.1383>

- Leese, H. J., Aldridge, S., & Jeffries, K. S. (1979). The movement of amino acids into rabbit oviductal fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, *56*(2), 623–626.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0560623>
- Leese, H. J., Tay, J. I., Reischl, J., & Downing, S. J. (2001). Formation of Fallopian tubal fluid: Role of a neglected epithelium. In *Reproduction* (Vol. 121, Issue 3, pp. 339–346). Journals of Reproduction and Fertility Ltd. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210339>
- Li, L., Zheng, P., & Dean, J. (2010). Maternal control of early mouse development. In *Development* (Vol. 137, Issue 6, pp. 859–870). Development. <https://doi.org/10.1242/dev.039487>
- Llanos, M. N., Ronco, A. M., Aguirre, M. C., & Meizel, S. (2001). Hamster sperm glycine receptor: Evidence for its presence and involvement in the acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development*, *58*(2), 205–215. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200102\)58:2<205::AID-MRD10>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200102)58:2<205::AID-MRD10>3.0.CO;2-J)
- Meizel, S., & Son, J. H. (2005). Studies of sperm from mutant mice suggesting that two neurotransmitter receptors are important to the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development*, *72*(2), 250–258.
<https://doi.org/10.1002/mrd.20336>
- Miller, J. G. O., & Schultz, G. A. (1987). Amino Acid Content of Preimplantation Rabbit Embryos and Fluids of the Reproductive Tract1. *Biology of Reproduction*, *36*(1), 125–129.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod36.1.125>
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., & Unwin, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, *423*(6943), 949–955.
<https://doi.org/10.1038/nature01748>
- Moore, K., & Bondioli, K. R. (1993). Glycine and Alanine Supplementation of Culture Medium Enhances Development of in Vitro Matured and Fertilized Cattle Embryos. *Biology of Reproduction*, *48*(4), 833–840. <https://doi.org/10.1095/biolreprod48.4.833>
- Moss, S. J., & Smart, T. G. (2001). Constructing inhibitory synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, *2*(4), 240–250. <https://doi.org/10.1038/35067500>
- Naito, Y., Hino, K., Bono, H., & Ui-Tei, K. (2015). CRISPRdirect: Software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, *31*(7), 1120–1123.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu743>
- Nakamura, K., Morimoto, K., Shima, K., Yoshimura, Y., Kazuki, Y., Suzuki, O., Matsuda, J., & Ohbayashi, T. (2016). The effect of supplementation of amino acids and taurine to modified KSOM culture medium on rat embryo development. *Theriogenology*, *86*(8), 2083–2090.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.001>
- Nishizono, H., Darwish, M., Endo, T. A., Uno, K., Abe, H., & Yasuda, R. (2020). Glycine receptor $\alpha 4$ subunit facilitates the early embryonic development in mice. *Reproduction*, *159*(1), 41–48.
<https://doi.org/10.1530/REP-19-0312>

- Nishizono, H., Darwish, M., Uosaki, H., Masuyama, N., Seki, M., Abe, H., Yachie, N., & Yasuda, R. (2020). Use of freeze-thawed embryos for high-efficiency production of genetically modified mice. *Journal of Visualized Experiments*, 2020(158). <https://doi.org/10.3791/60808>
- Nishizono, H., Uno, K., & Abe, H. (2017). Cleavage speed and blastomere number in DBA/2J compared with C57BL/6J mouse embryos. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 56(1), 11–17. [/pmc/articles/PMC5250490/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/315250490/)
- Pérez-Cerezales, S., Ramos-Ibeas, P., Acuna, O. S., Avilés, M., Coy, P., Rizos, D., & Gutiérrez-Adán, A. (2018). The oviduct: From sperm selection to the epigenetic landscape of the embryo. In *Biology of Reproduction* (Vol. 98, Issue 3, pp. 262–276). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/biolre/iiox173>
- Rizos, D., Maillo, V., & Lonergan, P. (2016). Role of the oviduct and oviduct-derived products in ruminant embryo development. *Animal Reproduction*, 13(3), 160–167. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR863>
- Rocha, J. C., Passalia, F., Matos, F. D., Maserati, M. P., Alves, M. F., De Almeida, T. G., Cardoso, B. L., Basso, A. C., & Nogueira, M. F. G. (2016). Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? In *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida* (Vol. 20, Issue 3, pp. 150–158). Sociedade Brasileira de Reproducao Assistida. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160033>
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Saitoh, T., Ishida, M., Maruyama, M., & Shinozaki, H. (1994). A novel antagonist, phenylbenzene ω -phosphono- α -amino acid, for strychnine-sensitive glycine receptors in the rat spinal cord. *British Journal of Pharmacology*, 113(1), 165–170. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb16189.x>
- Sato, Y., Son, J. H., Tucker, R. P., & Meizel, S. (2000). The zona pellucida-initiated acrosome reaction: Defect due to mutations in the sperm glycine receptor/C1- channel. *Developmental Biology*, 227(1), 211–218. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9882>
- Sauvegarde, C., Paul, D., Bridoux, L., Jouneau, A., Degrelle, S., Hue, I., Rezsóhazy, R., & Donnay, I. (2016). Dynamic pattern of HOXB9 protein localization during Oocyte maturation and early embryonic development in mammals. *PLoS ONE*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165898>
- Simon, J., Wakimoto, H., Fujita, N., Lalande, M., & Barnard, E. A. (2004). Analysis of the set of GABAA receptor genes in the human genome. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41422–41435. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401354200>
- Steeves, C. L., & Baltz, J. M. (2005). Regulation of intracellular glycine as an organic osmolyte in early preimplantation mouse embryos. *Journal of Cellular Physiology*, 204(1), 273–279. <https://doi.org/10.1002/jcp.20284>

- Summers, M. C., McGinnis, L. K., Lawitts, J. A., Raffin, M., & Biggers, J. D. (2000). IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids. *Human Reproduction*, *15*(8), 1791–1801. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.8.1791>
- Takahashi, Y., & Kanagawa, H. (1998). Effects of Glutamine, Glycine and Taurine on the Development of in Vitro Fertilized Bovine Zygotes in a Chemically Defined Medium. *Journal of Veterinary Medical Science*, *60*(4), 433–437. <https://doi.org/10.1292/jvms.60.433>
- Van Winkle, L. J., Haghghat, N., & Campione, A. L. (1990). Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the inorganic ions in oviductal fluid. *Journal of Experimental Zoology*, *253*(2), 215–219. <https://doi.org/10.1002/jez.1402530211>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2014). The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. In *Nature Methods* (Vol. 12, Issue 1, pp. 7–8). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, *9*(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>

謝辞

本研究を行うにあたり、次世代シーケンサーを用いたデータの解析に協力いただいた遠藤高帆博士に感謝します。また同じく共同研究者としてデータ解析を行っていただいた宇野恭介博士、阿部宏之博士、Mohamed Darwish 博士に感謝します。

学位申請にあたり指導いただいた高雄啓三博士、また本研究内容の原著論文投稿にあたり実験指導および執筆指導をいただいた安田涼平博士に深く感謝します。

本研究を遂行するにあたり、実際の実験を行った富山大学および Max Planck Florida Institute for Neuroscience のすべての関係者の皆様に感謝します。

最後に学位申請までの期間、支えてくれた家族に深く感謝します。