

氏 名 にしぞの ひろふみ
西園 啓文

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富生命博乙第10号

学位授与年月日 令和3年9月22日

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第4項該当

学位論文題目

グリシンレセプター α 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

(Glycine receptor α 4 subunit facilitates the early embryonic development in mice)

論文審査委員

(主査) 教授 森 寿

(副査) 教授 伊藤 哲史

(副査) 教授 北村 寛

(副査) 教授 中島 彰俊

(紹介教員) 教授 高雄 啓三

様式2

論 文 要 旨

論 文 題 目

グリシンレセプター α 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

氏 名 _____ 西園 _____ 啓文 _____

備考 ① 論文要旨は，2,000字程度とする。

② A4判とする。

〔目的〕

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。例えば遊離アミノ酸、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。そこで本研究では、マウスを対象に、卵管液中のグリシンがどのような分子メカニズムで卵子や受精卵に作用しているかを明らかにすることを目的として、グリシンレセプターの阻害剤を用いた検討およびグリシンレセプターノックアウトマウスの作製と表現型解析を行った。

〔方法並びに成績〕

はじめに、卵管液中の遊離グリシンがグリシンレセプターを介して受精卵に作用している可能性を確かめるために、グリシンレセプター阻害剤の添加によりマウス受精卵の発生がどのように変化するかを検討した。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) を用いた結果、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、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。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た。

次に、4種類あるグリシンレセプターサブユニットのうち、どのサブユニットがマウス受精卵では発現しているのかを調べるため、RNA-seqデータによる遺伝子発現解析を実施した。その結果、マウス受精卵には β サブユニット遺伝子 (*Glrb*) と機能が未だ明らかになっていない α 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。*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るため、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。また蛍光免疫組織化学染色によるタンパク質レベルでの発現解析では、*Glr4*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。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た。


さらに*Glr4*遺伝子の受精卵での機能を解析するために、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集技術により*Glr4*遺伝子欠損（ノックアウト）マウスを作出し、その受精卵の胚発生における表現型を解析することを試みた。*Glr4*遺伝子の膜貫通ドメインを欠損させ、細胞膜上に機能ドメインが発現しなくなるようにガイドRNAを設計し、マウス受精卵に導入し、ゲノム編集を行った。結果として、第4エクソン以降のタンパク質が発現せず、細胞膜上に*Glr4*タンパク質が蛍光免疫組織化学染色で検出されない*Glr4*ノックアウトマウスを作出することに成功した。

*Glr4*ノックアウトマウスから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く、*Glr4*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（ $P < 0.05$ ）。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（ $P < 0.05$ ）。さらに、体外受精に限らず、自然交配で一回に生まれる新生児数も、野生型マウスの平均9匹から、*Glr4*ノックアウトマウスでは平均3匹と顕著に減少していた（ $P < 0.000001$ ）。これらの結果は、卵管液中の遊離グリシンがグリシンレセプター $\alpha 4$ を介してマウス受精卵の初期発生に非常に重要な影響を与えていることを示唆している。

〔総括〕

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、遺伝子欠損マウスの表現型解析結果から*Glr4*タンパク質が欠損すると、マウス受精卵の胚盤胞までの発生率や、胚の質、リッターサイズが低下することを発見し、*Glr4*タンパク質の初期発生における重要性を明らかにした。またヒトの受精卵にも別のグリシンレセプター α サブユニットが発現していることも明らかになっており、これらの知見はヒト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。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富生命博乙第 号	氏 名	西園 啓文
論文審査委員	職 名	氏 名	
	(主査) 教授	森 寿	
	(副査) 教授	伊藤 哲史	
	(副査) 教授	北村 寛	
(副査) 教授	中島 彰俊		
指導 (紹介) 教員	教授	高雄 啓三	
(論文題目 英文の場合は和訳, 日本語の場合は英訳を付記すること) 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 (Glycine receptor $\alpha 4$ subunit facilitates the early embryonic development in mice)			(判定) 合格
(論文審査の要旨)			
研究目的 :			
<p>晩婚化や少子高齢化が進む現代社会において生殖補助医療は重要であり、様々な技術開発が行われている。高度生殖補助医療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環境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必要がある。受精卵が最初に接する環境である卵管液には、受精とその後の初期発生に必要な成分が含まれているが、その構成成分の機能には未知な部分が多い。遊離アミノ酸の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との報告がある。しかし、グリシンが卵子や受精卵に対する作用メカニズムの詳細は解明されていない。</p> <p>これらの背景のもと本研究で西園氏は、マウス受精卵の着床前発生にグリシンがどのように作用しているのかを解明することを目的に、グリシンレセプター (GlyR)$\alpha 4$サブユニットに着目して、薬理学的方法、分子遺伝学的方法、発生工学的方法を用いて検討を行った。</p>			
研究方法と結果 :			
<p>1) GlyR阻害薬の効果 : in vitro で培養したマウス受精卵に対するGlyR阻害薬 (ストリキニーネと Phenylbenzene ω-phosphono-α-amino acid (PMBA)) の添加は、4細胞から桑実胚への移行期に胚発生を停止させた。なお、GlyR阻害薬は、精子に作用し受精阻害効果もあることから、受精3時間後に添加する条件を設定し、胚発生に対する効果のみを検討した。一方、グリシントランスポーター阻害薬では、胚発生停止効果は観察されなかった。従って、マウス受精卵の初期発生にはGlyRが関与することが示唆された。</p> <p>2) 受精卵でのGlyRサブユニットの発現解析 : 公開データベース (NCBI GEO database) を用いた解析で、GlyR$\alpha 4$とβサブユニットが卵子から2細胞期胚の時期に一過的に発現しているこ</p>			

とが明らかになった。このうち、GlyR β サブユニットは卵子や受精卵以外の多くの組織でも発現していること、またGlyR α 4サブユニットは、機能解析がほとんど行われていないことから、GlyR α 4サブユニットに着目して解析を進めた。GlyR α 4サブユニットに対する特異抗体を用いた免疫組織化学的解析により、このサブユニットが卵子から4細胞期胚の細胞膜上に発現していることが明らかとなった。

- 3) GlyR α 4遺伝子欠損マウスの作製と解析: GlyR α 4サブユニットの初期発生における機能を明らかにするためにCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集法による遺伝子破壊を行った。1番目の膜貫通ドメインよりアミノ末端側領域をコードするエクソン4にガイドRNAを設定しCas9タンパク質とともにエレクトロポレーション法によりマウス受精卵により導入し、目的としたゲノム領域に11 bpの遺伝子欠損を誘導しGlyR α 4タンパク質が発現しないGlyR α 4欠損マウス系統を樹立した。
- 4) GlyR α 4欠損マウスの受精卵発生及び自然交配の解析: GlyR α 4欠損マウスの排卵数は野生型マウスと差がなかった。体外受精後の胚発生では、GlyR α 4欠損マウスでの胚盤胞形成率の有意な低下、胚盤胞期の細胞数の有意な減少が観察された。また自然交配では、出産1回あたりの産仔数が有意に減少していた。

総括:

晩婚化や少子高齢化が進む現代社会において、高度生殖補助医療の成功率を向上させるためには、受精卵や胚、胎児の環境を詳細に解析し医療応用する必要がある。本研究で西園氏は、卵管液中に豊富に含まれている遊離アミノ酸のグリシンに着目し、マウス受精卵の着床前発生にグリシンがどのように作用しているのかをグリシンレセプター(GlyR) α 4サブユニットに着目して研究を行った。本研究で西園氏は、GlyR阻害薬が培養マウス受精卵の発生を阻害すること、卵子ならびに初期胚特異的にGlyR α 4サブユニットが一過的に発現すること、ゲノム編集により作製したGlyR α 4欠損マウスでは、培養受精卵での正常発生率の低下と自然交配での産仔数の減少が起こることを明らかにした。さらに、胚発生率が低いDBA/2系統マウスの受精卵培養液にグリシンを添加することで発生率が向上することや、同様に胚発生率の低いウシ受精卵培養液にグリシンを添加することで発生率を向上させる傾向を見いだした。

以上のことから、マウスの初期発生における GlyR α 4 遺伝子の発現とその機能を初めて明らかにした点は新規性が高く、医学における学術的重要性も高い。ヒトでは GLRA4 は偽遺伝子として機能がなく、受精卵では GLRA2 が発現していることが報告されている。従って本研究の成果を元に今後、ヒト卵管内のグリシン濃度測定やヒト受精卵に発現している GLRA2 の機能解析を行うとともに、受精卵培養下でグリシン添加による効果を明らかにすることで、今後の生殖補助医療のさらなる高度化に貢献する臨床的発展性が期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士(医学)の学位に十分値すると判断した。