

哺乳動物の受精および妊娠時における 亜鉛イオンの役割

1) 麻布大学院 獣医学研究科

2) 麻布大学 獣医学部

植原 紗季¹⁾, 杉田陽美季¹⁾, 財部 駿介¹⁾, 伊藤 潤哉^{1,2)}

はじめに

近年、わが国をはじめとして世界中で不妊症が深刻な社会問題となっており、世界の成人人口およそ6人に1人が不妊症（妊娠を望む男女が1年間妊娠に至らない）であると試算されている¹⁾。わが国では、実際に不妊の検査や治療を受けたことがある（または現在受けている）夫婦は23%でこれは夫婦全体の約4組に1組の割合であり、また不妊症を心配したことがある夫婦は39%と全体の2.6組に1組の割合にのぼる²⁾。さらに、2022年には新生児77,206人が生殖補助医療技術（Assisted Reproductive Technologies: ARTs）の1つである体外受精（In Vitro Fertilization, IVF）により誕生しており、これは全新生児（770,747人）の約10人に1人の割合となる^{3,4)}。現在、不妊治療を受けて妊娠に至る割合は約20%程度であるといわれており³⁾、治療成績のさらなる向上や不妊症の予防には受精や妊娠といった生殖機能についてより詳細に理解する必要がある。

受精や妊娠といった生殖機能にはさまざまな因子が関係していると考えられており、その1つに必須微量元素があげられる^{5,6)}。微量元素とは成人体内量が10g未満のミネラルであり、そのうち生命維持に必要な微量元素を「必須」微量元素といい、ヒトでは鉄(Fe)、亜鉛(Zn)、銅(Cu)、セレン(Se)、クロム(Cr)、マンガン(Mn)、モリブデン(Mo)、コバルト(Co)およびヨウ素(I)の9種類が知られている^{7,8)}。このうち亜鉛は、生体内で鉄の次に多い必須微量元素で成人体内に約2~4g含まれているといわれ、食事摂取基準によれば1日に男性で11mg、女性で8mg、さらに妊娠女性では10mg以上の摂取が推奨されている^{9,10)}。血清亜鉛値としては80ug/dL以上が正常であるとされているが、わが国の成人女性のおよそ半数、不妊症患者では8割以上において血清亜鉛値が基準を満たしておらず、60~80ug/dLの潜在性亜

鉛欠乏症、あるいは60ug/dL未満の亜鉛欠乏症となっているという報告がある^{11,12)}。これらのことから、亜鉛（イオン）が生殖機能に重要な役割を持ち、潜在性を含む亜鉛欠乏症という亜鉛恒常性の破綻が、現代における不妊症の一因となっている可能性が考えられる。しかし、その詳細は明らかにされていない。

われわれはこれまでに生殖機能における亜鉛イオンの役割を明らかにするため、亜鉛イオン輸送体（亜鉛トランスポーター）に着目し（図1）、主に遺伝子改変マウスを用いて研究を行っている。これまでのわれわれの結果から、亜鉛イオンが受精や妊娠といった雌性生殖機能に重要な機能を持つことを明らかにしている。本トピックスではわれわれの知見も含め、現在までに明らかになっている雌性生殖機能、特に受精や妊娠における亜鉛イオンの役割について概説する。

受精および胚発生における亜鉛イオンの役割

受精時には精子の侵入により、卵活性化（表層顆粒の開口分泌、第二減数分裂中期（MII）からの減数分裂再開、第2極体の放出、前核（PN）形成等）が起こり、受精卵（胚）となり初期胚発生へと移行する¹³⁾。これまでに報告されたすべての動物種において、卵活性化には卵細胞質内のカルシウムイオン濃度の上昇が必要であることが明らかとなっている¹⁴⁾。無脊椎動物や両生類の受精時には、一過性のカルシウムイオン上昇が起こるが¹⁵⁾、哺乳類では反復的なカルシウムイオン上昇（カルシウム振動）が認められる¹⁶⁾。これらのことから、卵活性化にはカルシウムイオンが必須な役割を持つと考えられており、これまでに多くの研究が行われてきた。

一方、マウス受精時において卵外への亜鉛イオンの一過的放出が起こることも報告され、「亜鉛スパーク」と名付けられた^{17,18)}（図1A）。その後の研究により、亜鉛スパークはマウスのみならずヒトやウシといった他の哺

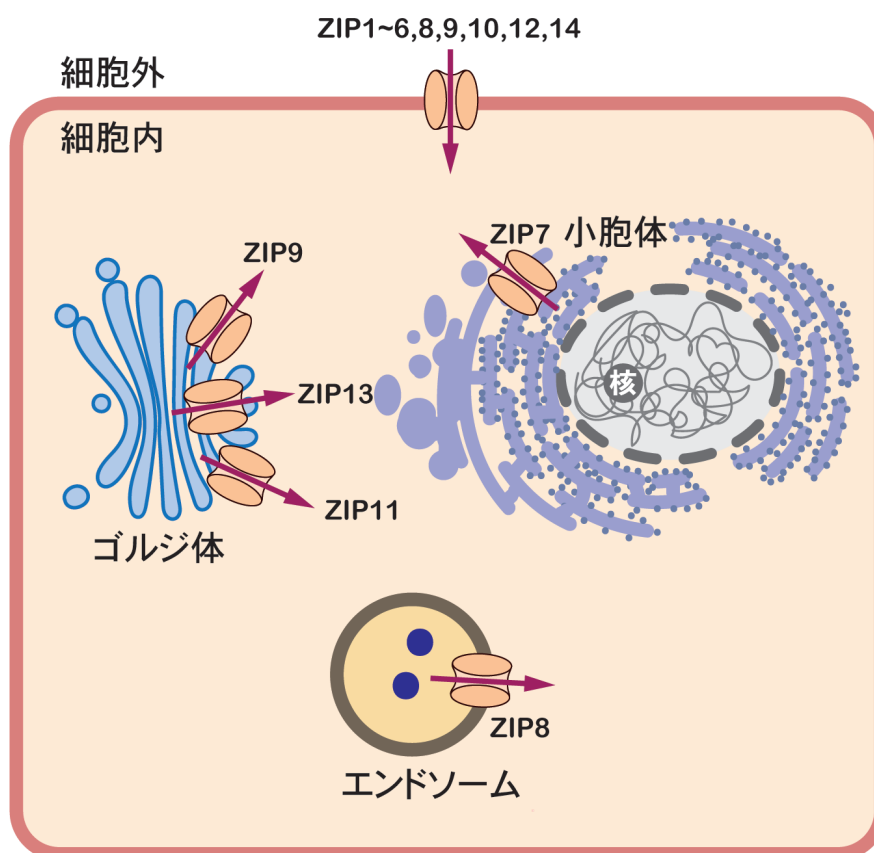


図1 細胞内における亜鉛トランスポーター ZIPs の局在

乳類，さらには両生類の受精時においても起こることが確認されている¹⁸⁻²¹⁾。これらのことから，受精にはカルシウムイオンのみならず亜鉛イオンが重要な役割を持つ可能性が示されている。さらにマウス卵を亜鉛イオンのキレート剤である TPEN で処理するとそれだけで卵活性化が誘起されること²²⁾，また，卵活性化能を失わせた精子頭部を卵に注入した後，TPEN で処理すると卵活性化およびその後の胚発生が起これ，それらの胚は胚移植後に産子まで発生することが示されている²³⁾。以上の結果は，卵内カルシウムイオン上昇を誘起しなくても，亜鉛イオンを低下させることで個体まで発生可能な卵活性化を誘起可能であることを示している。

受精時の亜鉛スパークが誘起されるためには，あらかじめ卵内に亜鉛イオンが蓄積される必要がある。卵巣内に存在している未成熟卵は減数分裂の過程で亜鉛イオンが蓄積されることで^{19, 24)}，その量は排卵される MII 卵で最大になる^{25, 26)}。この時，卵細胞質内への亜鉛イオンの取り込みには，亜鉛トランスポーター (ZIPs) が関与し

ていると考えられている。マウス卵では全14種類の ZIP のうち (図1)，ZIP 6 および ZIP10 が高い発現を示していることが報告されている^{27, 28)} (図2 A)。われわれの研究結果からも，マウス卵では ZIP6 と ZIP10 の両方が発現していること，また ZIP6 よりも ZIP10 がマウス卵の減数分裂過程における亜鉛イオンの取り込みに関与しており (図2 A)，卵特異的 *Zip10* 遺伝子欠損マウス卵では，卵細胞質内の亜鉛イオンの蓄積が減り，受精時の亜鉛スパークが抑制されることが明らかとなっている²⁸⁾。亜鉛スパークの生物学的意義は十分には明らかになっていないが，その役割の一つとして透明帯硬化による多精子受精の防止に関与することが示されている^{29, 30)}。また亜鉛スパークでより多くの亜鉛イオンを放出した卵は胚盤胞への発生率が高く，胚盤胞における細胞数が多かったことも報告されている³¹⁾。初期胚発生における亜鉛イオンの役割についても十分には明らかになっていないが，マウス初期胚の細胞質において亜鉛イオンが存在すること^{26, 32)}，またわれわれの研究結果から *Zip10* 遺伝子欠損

マウス卵では受精後の胚盤胞への発生率が著しく低いことが明らかとなっている²⁸⁾。これらのことから、未成熟卵から胚盤胞に至るまでの亜鉛イオンの恒常性は、受精や胚発生において重要であると考えられる。

胚着床および妊娠における亜鉛イオンの役割

妊娠中の亜鉛欠乏は、自然流産、妊娠中毒症、長期妊娠、早産、形態異常および成長遅延を引き起こす可能性がある³³⁻³⁶⁾。哺乳類の妊娠中における亜鉛欠乏状態が生殖機能へ及ぼす影響は、その程度、持続時間および時期によって異なるが、低亜鉛飼料を給餌した雌ラットでは発情周期の異常および産子数の低下を引き起こす³⁷⁾。また、亜鉛欠乏雌ラットでは、妊娠後の胎子吸収および胎盤着床部の異常が観察され、これが胎子組織内の亜鉛欠乏の主な原因となることが報告されている^{37, 38)}。ヒトにおいても、亜鉛欠乏がFSHおよびLHの合成・分泌の障害、卵巣発育不全、発情周期異常、妊娠期間の延長、催奇形性、死産、分娩の困難、妊娠高血圧症および妊娠中毒症などと関連することが報告されている³⁶⁾。これらのことから、亜鉛イオンが妊娠中に必須であることは明らかであるが、生殖機能における詳細な役割は依然として不明である。亜鉛イオンの取り込みはZIPによって制御されていることから、ZIPを介した亜鉛恒常性が妊娠においても重要な役割を果たすと考えられる。

われわれは上記の仮説の下、マウス子宮内膜で発現するZIPを調べ、ZIP10が高い発現を示すことを明らかにした³⁹⁾。そこで、子宮特異的*Zip10*遺伝子欠損(cKO)雌マウスを作製し、解析することで妊娠時における亜鉛イオンの役割を調べた。その結果、cKO雌マウスは雄マウスと交尾は可能なものの、そのほとんどは出産せず不妊の表現型を示した³⁹⁾。またcKO雌マウスでは子宮内膜への胚の浸潤が認められず、胚は妊娠中期までに退行し、流産を起こしていた³⁹⁾。またcKO雌マウスの妊娠初期において、エストロゲンおよびプロゲステロン濃度には異常が認められなかったことから、不妊の原因は子宮内膜の機能異常によるものであると考えられた。そこでcKO雌マウスの子宮内膜を詳しく調べたところ、プロゲステロンの受容体(PGR)の発現異常や、間質細胞においてPGRの下流因子である*Hoxa10*、*Bmp2*、および*Wnt4*等の遺伝子の発現低下、さらには上皮細胞での*Ihh* 遺伝子の発現上昇が認められた³⁹⁾。IHHが活性化されるとPatched receptor 1 (*Ptch1*)に作用して

smoothened (*Smo*) 阻害を解除し⁴⁰⁾、亜鉛イオン依存性のGlioma-associated oncogene homolog 1 (*Gli1*) や、Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II (COUP-TFII, 遺伝子名*Nr2f2*)などの転写因子を誘導することで子宮内膜の機能を変化させる^{40, 41)}。実際に妊娠5日目のcKO雌マウスの子宮内膜では、GLI1およびCOUP-TFIIの発現が顕著に減少していた³⁹⁾。以上のことから、マウス子宮内膜においてZIP10を介した亜鉛イオンは、PGRの下流シグナルを制御していることが明らかとなった³⁹⁾(図2B)。さらにわれわれは、マウスおよびヒト子宮間質由来の培養細胞を用いることで、亜鉛イオンがZIP10を介して細胞質に取り込まれ、その結果転写因子であるGLI1の核—細胞質への局在が制御されていることを明らかにした³⁹⁾。これらの結果は、マウス・ヒトに共通して、胚着床時の子宮内膜では、亜鉛イオンが必須な役割を果たしていることを初めて明らかにしたものである。今後研究がすすめば、より詳細なメカニズムが明らかとなり、胚着床不全や不育症といった不妊症の治療法や予防法の開発に貢献できると考えられる。

終わりに

これまでの主にマウスを用いた研究により、受精や胚発生および妊娠時における亜鉛イオンの役割が明らかになりつつあるが、さらなる分子レベルでの解明が必要である。また今後、ZIP10のみならず他の亜鉛トランスポーターに関する基礎および臨床研究を進めることで、受精や妊娠を含めた雌性生殖機能、さらには今回のトピックスでは触れなかった雄側の生殖細胞や生殖機能における亜鉛の役割も分子レベルで明らかにすることができると考えられる。それらの知見は、不妊症の予防や治療法の開発に貢献できると期待される。

謝 辞

本トピックスの作成に関わる研究成果について、麻布大学獣医学部の柏崎直巳 博士、寺川純平 博士、影山敦子 博士、川田由以氏には特にご協力いただいた。この場を借りて深謝する。

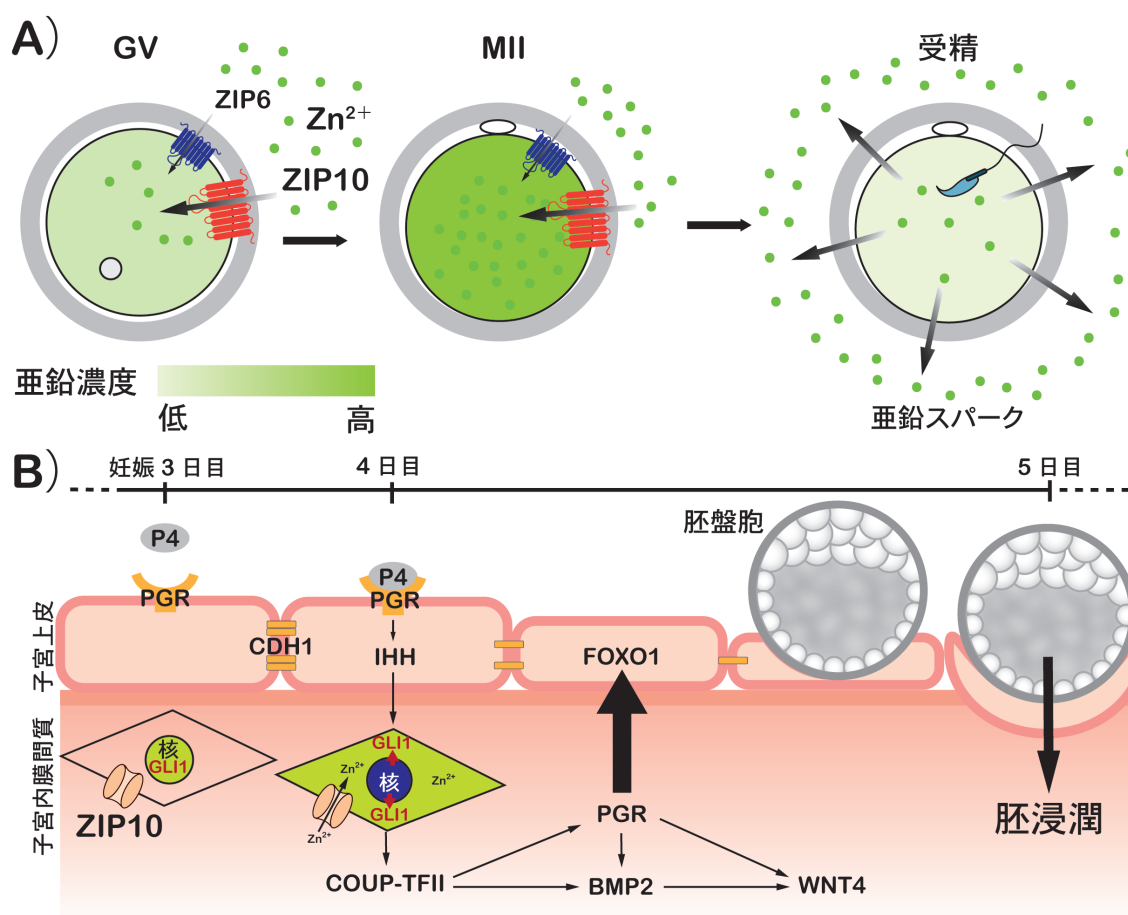


図2 雌性生殖機能における亜鉛トランスポーターの役割

A) 卵成熟および受精における ZIP の役割, B) 子宮内膜細胞における ZIP の役割

引用文献

- World Health Organization (2023) Infertility Prevalence Estimates, 1990–2021. WHO Global report.
- 厚生労働省 (2020) 不妊治療と仕事との両立サポートハンドブック
～不妊治療を受ける方と職場で支える上司、同僚の皆さんのために～.
- 日本産科婦人科学会 (2024) 2022年 ART データブック (体外受精・胚移植等の臨床実施成績).
- 厚生労働省 (2024) 令和 5 年 (2023) 人口動態統計月報年報 (概数) の概況.
- Grieger JA, Grzeskowiak LE, Wilson RL, Bianco-Miotto T, Leemaqz SY, Jankovic-Karasoulos T, Perkins AV, Norman RJ, Dekker GA, Roberts CT (2019) Maternal Selenium, Copper and Zinc Concentrations in Early Pregnancy, and the Association with Fertility. *Nutrients* 11, 1609.
- Mirnamniha M, Faroughi F, Tahmasbpour E, Ebrahimi P, Beigi Harchegani A (2019) An overview on role of some trace elements in human reproductive health, sperm function and fertilization process. *Rev Environ Health* 34, 339–348.
- Mertz W (1998) Review of the scientific basis for establishing the essentiality of trace elements. *Biol Trace Elem Res* 66, 185–191.
- Aggett PJ (1985) 1 Physiology and metabolism of essential trace elements: An outline. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 14, 513–543.
- Bhattacharya PT, Misra SR, Hussain M (2016) Nutritional Aspects of Essential Trace Elements in Oral Health and Disease: An Extensive Review. *Scientifica (Cairo)* 2016, 5464373.
- 厚生労働省・健康・生活衛生局 健康課 栄養指導室 (2024) 「日本人の食事摂取基準 (2025年版)」策定検討会報告書.
- Kodama H, Tanaka M, Naito Y, Katayama K, Moriyama M (2020) Japan's Practical Guidelines for Zinc Deficiency with a Particular Focus on Taste Disorders, Inflammatory Bowel Disease, and Liver Cirrhosis. *Int J Mol Sci* 21, 2941.
- 徳永義光, 佐久川政男, 比嘉季子, VAUGHAN DL (2004)

- 不妊症患者における血清亜鉛濃度. *Japanese Journal of Fertility and Sterility* 49, 359.
13. Sugita H, Takarabe S, Kageyama A, Kawata Y, Ito J (2024) Molecular Mechanism of Oocyte Activation in Mammals: Past, Present, and Future Directions. *Biomolecules* 14, 359.
 14. Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y (1993) Essential role of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 158, 62–78.
 15. Whitaker M (2006) Calcium at fertilization and in early development. *Physiol Rev* 86, 25–88.
 16. Whitaker M, Swann K (1993) Lighting the fuse at fertilization. *Development* 117, 1–12.
 17. Kim AM, Bernhardt ML, Kong BY, Ahn RW, Vogt S, Woodruff TK, O'Halloran TV (2011) Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in mammalian eggs. *ACS Chem Biol* 6, 716–723.
 18. Que EL, Bleher R, Duncan FE, Kong BY, Gleber SC, Vogt S, Chen S, Garwin SA, Bayer AR, Dravid VP, Woodruff TK, O'Halloran TV (2015) Quantitative mapping of zinc fluxes in the mammalian egg reveals the origin of fertilization-induced zinc sparks. *Nat Chem* 7, 130–139.
 19. Duncan FE, Que EL, Zhang N, Feinberg EC, O'Halloran TV, Woodruff TK (2016) The zinc spark is an inorganic signature of human egg activation. *Sci Rep* 6, 24737.
 20. Que EL, Duncan FE, Lee HC, Hornick JE, Vogt S, Fissore RA, O'Halloran TV, Woodruff TK (2019) Bovine eggs release zinc in response to parthenogenetic and sperm-induced egg activation. *Theriogenology* 127, 41–48.
 21. Seeler JF, Sharma A, Zaluzec NJ, Bleher R, Lai B, Schultz EG, Hoffman BM, LaBonne C, Woodruff TK, O'Halloran TV (2021) Metal Ion Fluxes Controlling Amphibian Fertilization. *Nat Chem* 13, 683–691.
 22. Bernhardt ML, Kong BY, Kim AM, O'Halloran TV, Woodruff TK (2012) A zinc-dependent mechanism regulates meiotic progression in mammalian oocytes. *Biol Reprod* 86, 114.
 23. Suzuki T, Yoshida N, Suzuki E, Okuda E, Perry ACF (2010) Full-term mouse development by abolishing Zn^{2+} -dependent metaphase II arrest without Ca^{2+} release. *Development* 137, 2659–2669.
 24. Kim AM, Vogt S, O'Halloran TV, Woodruff TK (2010) Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nat Chem Biol* 6, 674–681.
 25. Lisle RS, Anthony K, Randall MA, Diaz FJ (2013) Oocyte-cumulus cell interactions regulate free intracellular zinc in mouse oocytes. *Reproduction* 145, 381–390.
 26. Kageyama A, Suyama A, Kinoshita R, Ito J, Kashiwazaki N (2022) Dynamic changes of intracellular zinc ion level during maturation, fertilization, activation, and development in mouse oocytes. *Anim Sci J* 93, e13759.
 27. Kong BY, Duncan FE, Que EL, Kim AM, O'Halloran TV, Woodruff TK (2014) Maternally-derived zinc transporters ZIP6 and ZIP10 drive the mammalian oocyte-to-egg transition. *Mol Hum Reprod* 20, 1077–1089.
 28. Kageyama A, Ogonuki N, Wakai T, Namiki T, Kawata Y, Ozawa M, Yamada Y, Fukada T, Ogura A, Fissore RA, Kashiwazaki N, Ito J (2024) The oocyte zinc transporter Slc39a10/Zip10 is a regulator of zinc sparks during fertilization in mice. *bioRxiv*, 2024. 09. 11. 612381.
 29. Tokuhiko K, Dean J (2018) Glycan-Independent Gamete Recognition Triggers Egg Zinc Sparks and ZP2 Cleavage to Prevent Polyspermy. *Dev Cell* 46, 627–640. e5.
 30. Que EL, Duncan FE, Bayer AR, Philips SJ, Roth EW, Bleher R, Gleber SC, Vogt S, Woodruff TK, O'Halloran TV (2017) Zinc sparks induce physiochemical changes in the egg zona pellucida that prevent polyspermy. *Integr Biol (Camb)* 9, 135–144.
 31. Zhang N, Duncan FE, Que EL, O'Halloran TV, Woodruff TK (2016) The fertilization-induced zinc spark is a novel biomarker of mouse embryo quality and early development. *Sci Rep* 6, 22772.
 32. Kong BY, Duncan FE, Que EL, Xu Y, Vogt S, O'Halloran TV, Woodruff TK (2015) The inorganic anatomy of the mammalian preimplantation embryo and the requirement of zinc during the first mitotic divisions. *Dev Dyn* 244, 935–947.
 33. Gallaher D, Hurley LS (1980) Low zinc concentration in rat uterine fluid after 4 days of dietary deficiency. *J Nutr* 110, 591–593.
 34. Masters DG, Keen CL, Lönnerdal B, Hurley LS (1983) Zinc deficiency teratogenicity: the protective role of maternal tissue catabolism. *J Nutr* 113, 905–912.
 35. Apgar J (1977) Effects of zinc deficiency and zinc repletion during pregnancy on parturition in two strains of rats. *J Nutr* 107, 1399–1403.
 36. Bedwal RS, Bahuguna A (1994) Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia* 50, 626–640.
 37. Hurley LS (1969) Zinc deficiency in the developing rat. *Am J Clin Nutr* 22, 1332–1339.
 38. Solé D, Rieckmann B, Lippelt RM, Lippelt RT, Amâncio OM, Queiroz SdS, Naspitz CK (1995) Zinc deficient diet consequences for pregnancy and offsprings of Wistar rats. *Sao Paulo Med J* 113, 681–686.
 39. Kawata Y, Terakawa J, Takeshita A, Namiki T, Kageyama A, Noguchi M, Murakami H, Fukada T, Ito J, Kashiwazaki N (2025) Endometrial zinc transporter Slc39a10/Zip10 is indispensable for progesterone responsiveness and successful pregnancy in mice. *PNAS Nexus* 4, pgaf047.
 40. Franco HL, Lee KY, Rubel CA, Creighton CJ, White LD, Broadus RR, Lewis MT, Lydon JP, Jeong J, DeMayo FJ (2010) Constitutive activation of smoothened leads to female infertility and altered uterine differentiation in the mouse. *Biol Reprod* 82, 991–999.
 41. Kinzler KW, Ruppert JM, Bigner SH, Vogelstein B (1988) The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature* 332, 371–374.