

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19325

研究課題名(和文)核内DNA密度に着目した哺乳動物一倍体細胞の効率的作出

研究課題名(英文)Improving the production efficiency of mammalian haploid cells by controlling nuclear DNA density

研究代表者

大杉 美穂(Ohsugi, Miho)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00332586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物の一倍体単為発生胚は胚盤胞到達率が低くゲノムの偶発的な倍化が起こるため、一倍体ES細胞の樹立効率が低い。本研究では、これらの問題点が「一倍体単為発生胚は核内DNA密度が二倍体胚の半分しかない」ことに起因するとの仮説をたて、検証した。単為発生開始時に第二極体の放出ではなく均等分割を引き起こす手法を確立し、細胞サイズが従来の半分になることで核内DNA密度が二倍体胚と同等となる一倍体胚を得た。得られた一倍体胚にも発生過程で一部にゲノム倍化は生じたが、約7割という高効率の胚盤胞到達率を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「核内DNA密度が二倍体胚の半分しかない」という細胞生物学的な特徴がゲノムの倍化と発生率の低下を引き起こすのではないかと、という当初の仮説は、ゲノム倍化については否定され二倍体化の抑制はできなかったが、発生率については大幅な向上が達成できたことから、一倍体ES細胞の樹立の効率化につながる成果となった。さらに、従来の一倍体胚がもつ二倍体胚との2つの違いのうち、ゲノムを1セットしかもたないという倍数性の違いがゲノム倍化を引き起こし、核内DNA密度が半減していること、あるいはゲノムDNAの量と細胞質の量とのバランスの崩れが、初期胚の発生、特に最初の数回の卵割に重要である、という新規の知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Mammalian haploid parthenogenetic embryos show low blastocyst developmental rate and some cells become diploid during development for unknown reasons, resulting in low haploid ES cell establishment efficiency. In this study, we hypothesized that these problems were caused by the fact that "haploid parthenogenetic embryos have only half the nuclear DNA density of diploid embryos". We established a method that induces symmetric division, instead of extremely asymmetric division or formation of the second polar body, after parthenogenetic activation. By halving the cell size, we produced haploid embryos whose nuclear DNA density is equivalent to that of diploid embryos. Although half-sized haploid embryos also showed genome duplication during the developmental process, they showed a highly efficient blastocyst developmental rate of about 70%.

研究分野：発生細胞生物学

キーワード：マウス胚 一倍体 倍数性 雄性発生胚

1. 研究開始当初の背景

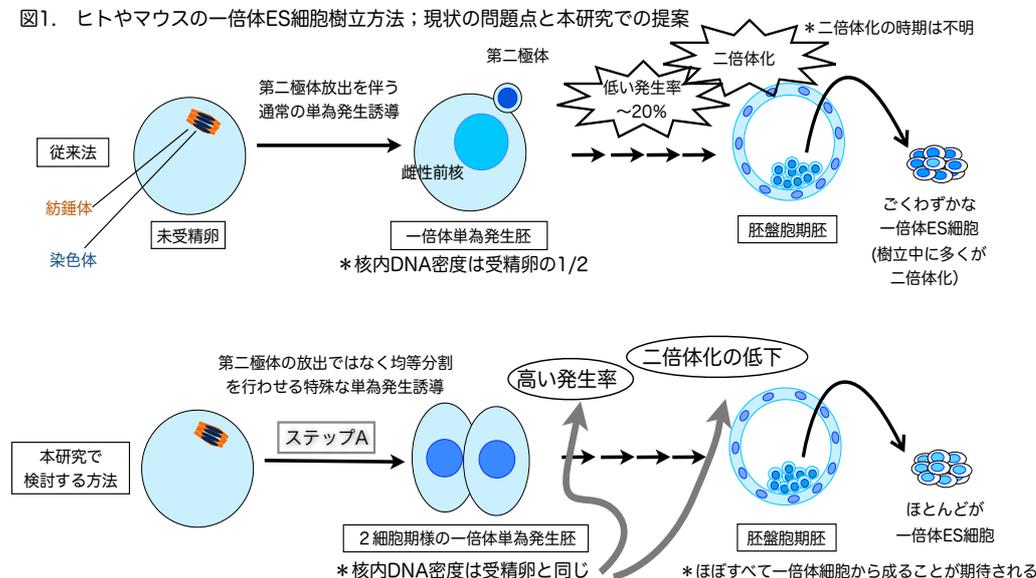
(1) ヒトを含む哺乳動物はゲノムを2組もつ二倍体生物である。多くの遺伝子に”スペア”が存在することは、個体や種の生存に有利である一方、生物学的・基礎医学的な知見を得る研究対象としては一倍体細胞に利がある。このため、2011年以降マウスやヒトの一倍体ES細胞の樹立と研究における有用性が相次ぎ報告された。

哺乳類の排卵後の未受精卵は減数第二分裂の中期 (Meta II) で細胞周期を停止し、受精をまつ。卵減数第二分裂は、精子との融合により生じる細胞内カルシウム濃度の上昇がひきがねとなり再開し、後期 (Ana II) に分配された染色体の一方は小さな極体に、他方は受精卵の雌性前核となる。卵減数分裂の再開は、電気刺激や、エタノールや塩化ストロンチウムを含む培地での培養によっても可能であり、こうした人為的な刺激 (卵の活性化刺激) により、一倍体の単為発生胚として発生が開始され、得られた胚盤胞期胚から上記の一倍体ES細胞が樹立された。しかし哺乳類の一倍体単為発生胚の胚盤胞到達率は低く、さらに樹立直後のES細胞でさえすでに多くが二倍体化しており、わずかに含まれる一倍体をソーティングする必要がある。すなわち「樹立効率の低さ」という問題が残されていた (図1)。また、ES細胞樹立までのどの発生段階でどのようにしてゲノムの倍化 (二倍体化) が起こるのかは不明であったが、申請者は一倍体単為発生胚から得られた胚盤胞は一部に二倍体細胞を含むことを確認していた。

(2) 多くの体細胞において、細胞の大きさとその細胞がもつ核の大きさには正の相関があることがわかっている。つまり、大きな細胞には大きな核が、小さな細胞には小さな核ができる。また、細胞の大きさとゲノムDNA量にも相関があり、二倍体の細胞は一倍体の細胞の倍の大きさとなる。細胞分裂により細胞の大きさは半減するが、間期にゲノムDNA量に応じた大きさまで細胞が成長することでこれらの相関が保たれる。一方、受精や卵の活性化後に起こる数回から十数回の分裂は卵割とよばれ、分裂後に細胞が成長せず、細胞の大きさは分裂ごとに減少するという特性をもつ。このため、卵割期の胚はゲノム量に合わせた細胞の大きさ調節は起こらず、二倍体の胚も一倍体の胚も、同じ発生段階であれば同じ大きさの細胞をもつことになる。

申請者は、マウスの卵割期胚の細胞と核の大きさを測定し、一倍体胚においても二倍体胚においても、細胞の大きさと核の大きさは相関することを確認した。すなわち、一倍体胚でも二倍体胚でも同じ発生段階にあれば細胞の大きさも核の大きさも同じになる。このことは「一倍体胚は核内のDNA密度が二倍体胚の半分しかない」ということを意味する。

図1. ヒトやマウスの一倍体ES細胞樹立方法；現状の問題点と本研究での提案



2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では一倍体単為発生胚の発生率の低さや二倍体化の原因が、一倍体単為発生胚がもつ「核内DNA密度が通常胚の半分しかない」という細胞生物学的特徴にあるとの仮説をたてた。この仮説に基づき、特殊な単為発生誘導法により核内DNA密度が二倍体胚と同等である一倍体単為発生胚を得ることで「一倍体細胞のみからなる胚盤胞発生法の確立」を目的とした。具体的な達成目標としては以下の2つを設定した。

- (1) 未受精卵を人為的に活性化する場合、第二極体の放出という極端な非対称分裂ではなく、

等割分裂を引き起こさせる方法を確立する。これにより、細胞の大きさが半分となった、割球を二つもつ一倍体胚が形成でき、この胚では核内クロマチン密度が二倍体胚と同等になる(図1)。この胚(これ以降、この一倍体胚を半サイズ一倍体と呼ぶ)を胚盤胞期まで発生させ、発生率や胚盤胞の細胞の倍数性を検証する。

(2) 従来法による一倍体単為発生胚において、発生停止が起こる時期の同定やメカニズムの解明および、ゲノム倍化が起こる時期の同定やメカニズムの解明を行い、得られた知見を(1)の目的達成のための実験に利用することで、一倍体胚の発生率向上やゲノム倍化の抑制を目指す。

3. 研究の方法

(1) 卵減数第二分裂後期に等割分裂を誘導する手法の確立(図1ステップAの確立)

極体放出という極端にアシンメトリーな細胞分裂が起こるためには、(A)染色体からのシグナルにより、細胞膜直下に肥厚した分枝アクチンのネットワークであるアクチンキャップが形成され細胞膜が突出する、(B)分裂後期の中央紡錘体からのシグナルにより、突出部の根本部分にアクチンからなる収縮環が形成され細胞質分裂が完了する、という2つのアクチンの働きが必要となる(図2)。アクチン重合阻害剤であるサイトカラシンB(以下CB)存在下でマウス未受精卵に人為的な活性化刺激を加えてAnaIIを開始させ、分配した染色体が核膜に覆われると、たとえCBが存在しなくても上記(A)が成立しなくなる。しかし、中央紡錘体構造はその後も短期間維持される。そのため、核膜形成直後にCBを除去すると残存中央紡錘体からのシグナルにより卵細胞の中央部に収縮環が形成されて等割分裂が起こり、半サイズ一倍体が生じると考えられる。予備実験では単為発生開始から4-5時間後にCBを除去すると~5%の胚でこれが起こるが、その多くは2つの割球サイズに差がある不均等割となってしまう。そこで本研究ではRSK阻害剤を作用させることで核膜形成タイミングを早め、収縮環形成誘導が可能なタイムウィンドウを長くする。さらに、CB以外のアクチン重合阻害剤の使用を検討する。

(2) 従来の一倍体単為発生胚に生じるゲノム倍化および発生停止の時期と原因の解明

セントロメア局在タンパク質CENP-Aの免疫染色を行い、点状シグナル数を数えることで染色体の概数を把握して一倍体か二倍体かを簡易的に判断し、二倍体化が起こる時期の目安をつける。さらに、目安をつけた時期を中心に、染色体とCENPAを可視化した単為発生胚をライブイメージングし、二倍体化が分裂期での染色体不分離で起こるのか、分裂期のスキップで起こるのかについて検討を行う。同時に、ライブイメージングによってまた二倍体化と割球の核体積、二倍体化前の染色体不分離の有無、二倍体化前、あるいは二倍体化時の細胞周期や分裂期の長さを調べ、相関の有無を明らかにすることで二倍体化誘引の原因を探る。

一倍体単為発生胚は2細胞期まではほぼ確実に発生するが、その後様々な発生段階で発生停止していく。最初の停止は2細胞期胚の割球の1方のみが分裂した3細胞期で生じることから、2細胞期までの過程ですでに高頻度に異常が生じていると考えられる。そこで、第一、第二卵割分裂での染色体分配異常の有無を同様のライブイメージングにより調べる。

4. 研究成果

(1) サイトカラシンB(CB)を用いた方法による半サイズ一倍体胚の作出

複数のマウス系統の卵を用い、高効率で減数第二分裂時に等割分裂を引き起こす条件の検討を行なった。卵活性化時に加えるCBの濃度および、CB除去タイミングについて最適条件を検討した結果、ICR系統では約50%で半サイズ一倍体胚が得られる条件を見出した。しかし、その後の胚盤胞到達率は約10%と低かった。Balb/cとC56Black6の交配で得られたF1(CB6F1)の卵を用いた場合、得られた半サイズ一倍体胚は比較的高い発生率を示したが、半サイズ一倍体胚形成率が5%未満と低く、定量的な解析は困難であるとの結論に至った。

(2) 他のアクチン重合阻害剤を用いた方法による半サイズ一倍体胚の作出

CB以外の複数のアクチン重合阻害剤を用いる方法を検討した結果、ある阻害剤を適正な濃度で作用させることにより、アクチンキャップの形成は阻害するが細胞質分裂は阻害しない、という条件を見出した。この方法を用いることで、検討した複数系統のマウス卵はいずれも約3割が半サイズ一倍体胚となった。以降の実験では、発生率の高い系統の1つであったCB6F1を用いた。従来法による一倍体単為発生胚の胚盤胞到達率は20%未満であったのに対し、半サイズ一倍体胚は約70%という高い胚盤胞達成率を示した。一方、セントロメア局在タンパク質CENP-Aの免疫染色結果から、半サイズ一倍体胚から発生した胚盤胞においても、一部の細胞は二倍体となっていることがわかった。

(3) 一倍体胚の発生停止の時期

従来法によって得られた一倍体雌性単為発生胚は、雌性二倍体胚と比較した場合、軽度な細胞周期遅延を示すが、90%以上の胚が第一卵割を経て二細胞期胚となった。しかし、その後は多くの割球が大幅な細胞周期遅延ののちに第二卵割を起こす、または第二卵割を起こさないまま停

止した。一方、半サイズ一倍体胚は第一卵割、第二卵割ともに二倍体胚と同等のタイミング、効率で起こした。しかしその後コンパクト化を起こさない割球が生じるなど、桑実胚以降には発生遅延、異常が認められた。最終的には上述の通り約 70%が胚盤胞となったが、これには半サイズ一倍体胚は最初から細胞数(割球数)が通常の数あることが影響している可能性が考えられた。

以上の結果から、「核内 DNA 密度が二倍体胚の半分しかない」という細胞生物学的な特徴がゲノムの倍化と発生率の低下を引き起こすのではないかと、という当初の仮説は、発生率については支持されたが、ゲノム倍化については否定された。二倍体化の抑制はできなかったが発生率の大幅な向上が達成できたことから、一倍体 ES 細胞の樹立の効率化につながる成果となった。さらに、従来の一倍体胚がもつ二倍体胚との2つの違い、すなわち、ゲノムを1セットしかもたない、という倍数性の違いがゲノム倍化を引き起こし、核内 DNA 密度が半減していること、あるいはゲノム DNA の量と細胞質の量とのバランスの崩れが、初期胚の発生、特に最初の数回の卵割に重要である、という新規の知見を得た。

(4) 簡便に雄性発生胚を作出する方法の確立

他の研究の過程で偶然見出された「低濃度の微小管重合阻害剤(ノコダゾール)存在下で卵に活性化刺激を与えることにより、卵染色体がすべて第二極体へと放出される現象」について、本研究において検討した中央紡錘体からのシグナルによる細胞質分裂誘導についての知見を応用することにより、この現象の原因を解明した。すなわち、低濃度のノコダゾールにより紡錘体の機能が一部不全となり、AnaII に入っても染色体の分配が起こらず、紡錘体が丸ごと細胞膜の突出部に入り込んだ。染色体分配が起こらないため明確な中央紡錘体は形成されないが、通常であれば中央紡錘体に集積する因子は機能不全を起こした紡錘体微小管に集積しており、これにより突出部の根本部分に収縮環が誘導されることですべての卵染色体が第二極体として放出されることがわかった。さらに適切なノコダゾール濃度を再検討することで、ノコダゾール存在下での体外受精を行い前核を1つのみもつ胚を選別することで、90%以上の効率で精子由来の雄性前核のみをもつ雄性発生胚が得られることを見出した。従来、雄性発生胚を作出するためには未受精卵あるいは受精卵から雌性染色体、雌性前核を外科的に取り除くという高い技術が必要とする侵襲的な手法が必要であったが、低濃度ノコダゾールを用いる本手法により技術的なハードルの高さが解消され、非侵襲的な方法により簡便に雄性発生胚を得ることが可能となった。この成果は Scientific reports に報告し、また日本語による解説も発表した (<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2020/6815/>)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Totsuka Takaya, Ohsugi Miho | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Production of mouse androgenetic embryos using spindle perturbation | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1-9 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-63010-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takaya Totsuka, Miho Ohsugi |
| 2. 発表標題 Production of mouse androgenetic embryos using spindle perturbation |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Natsumi Taira, Takaya Totsuka, Tomo Kondo, Miho Ohsugi |
| 2. 発表標題 The impact of DNA-to-cytoplasmic ratio on mouse preimplantation development |
| 3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

難しい技術を使わずに受精卵から卵子の染色体だけを取り除くことに成功～簡便な雄性発生胚作出法～
<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2020/6815/>

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|-------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 戸塚 隆弥 (Totsuka Takaya) | | |
| 研究協力者 | 平良 夏実 (Taira Natsumi) | | |
| 研究協力者 | 近藤 興 (Kondo Tomo) | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|