

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 5月26日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780248

研究課題名 (和文) 農学的利用を目指した新規雌雄初期胚選別法の開発

研究課題名 (英文) Novel method for the embryo sexing using live-cell imaging

研究代表者

山縣 一夫 (YAMAGATA KAZUO)

独立行政法人理化学研究所・ゲノムプログラミング・研究チーム・研究員

研究者番号：10361312

研究成果の概要：雌雄産み分けは、家畜動物の効率的生産という意味で非常に重要な技術であり、特に胚移植前の段階で雌雄胚選別することが望まれる。本研究では細胞にダメージを与えないライブセルイメージング技術を応用し、性染色体を認識する蛍光プローブを開発することで新規雌雄初期胚選別技術の開発を目指した。期間中、雌胚特異的に見られる X 染色体不活性化現象をレポートする蛍光プローブを開発し、実際に雌雄胚選別を試みたところ、マウス胚において雌雄の 100%の産み分けに成功した。なお、本技術は産仔に対して無害であり、かつ遺伝子組み換え動物にはならないことから、現場への応用が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学、応用分子細胞生物学

キーワード：雌雄産み分け、ライブセルイメージング、X 染色体不活性化、着床前初期胚

### 1. 研究開始当初の背景

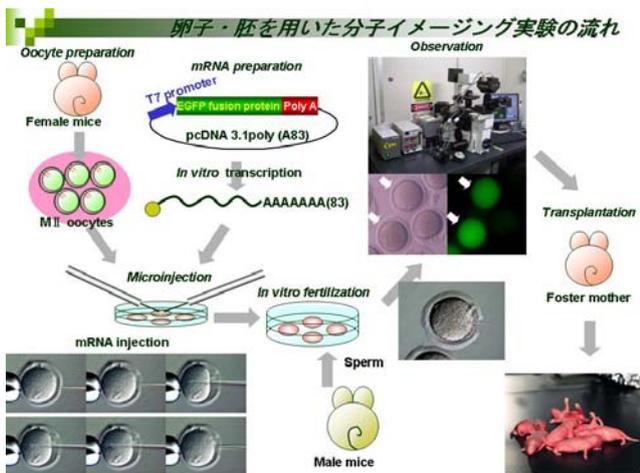
家畜動物や愛玩動物ではその産業性質上、雌雄どちらかの個体が必要とされることが多い。しかし、産仔の段階で雌雄の選別を行うことはコスト的にも倫理的にも不適切であるため、発生のごく初期、特に胚移植可能な着床前初期胚以前の段階での雌雄選別が望まれる。現在行われている代表的な雌雄選

別法として、精子や初期胚の段階での選別が知られている。前者では FACS 装置や遠心分離法を用いて Y 精子・X 精子を選別し、それを受精させる方法である。しかし、選別後の精子の運動性が低いなど多くの問題を抱えている。後者は受精卵割球を一部切除 (バイオプシー) し、そのゲノムから PCR を用いて Y 染色体特異領域を増幅する性別判別方法であ

る。その正確性は90%以上であるが、高度なインジェクション技術を必要とし、かつ検定胚の凍結保存が困難である。つまり、以上のような問題点をクリアできる着床前初期胚の雌雄選別技術は、畜産分野において非常に有効となる。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでに卵子や初期胚を用いた蛍光ライブセルイメージング技術の構築を行ってきた(下図, Yamagata et al. Genesis 2005)。具体的には特定タンパク質と蛍光タンパク質との融合タンパク質をコードしたmRNAをin vitroで合成し、これを卵子内に顕微注入することによって分子動態を追跡するという手法である。その最大の特徴はサンプルへの侵襲性の低さである。つまり、本システムでは初期胚の蛍光観察を行った後もその胚を培養し続ければ個体にまで発生する。そこで、申請者はこのシステムを発展させ、性染色体を認識する蛍光プローブを開発することで新規雌雄初期胚選別技術に応用できるのではないかと着想した。



具体的には、雌特異的に見られるX染色体不活性化現象(後述)を利用して、不活性化型のX染色体特異的に結合する蛍光プローブを開発し、それを受精卵に導入する。検体に対して低侵襲の顕微鏡システムで胚の核を観察する。核内にシグナルがあれば雌、なければ雄という判断基準で雌雄選別を行う(下図)。最終的には家畜動物において雌雄胚の選別を可能にすることを最終目標として、年度ごとに以下の目標を設定する。

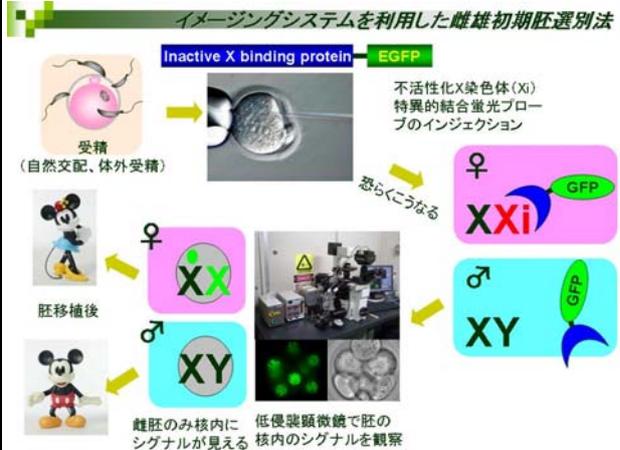
### 平成19年度

十分な蛍光観察を行った後も問題なく胚が発生するようなライブセルイメージング技術の開発を行う。蛍光プローブの開発を行う。

本年度は基礎研究としてまずはマウス、ウサギなどの実験動物を利用する。

### 平成20年度

19年度で得られた成果を応用し、ウシ・ブタなどの家畜胚を用いた着床前での効率的な性選別モデル系の確立を行う。



## 3. 研究の方法

性染色体としてX染色体を2本持つ雌の細胞では、1本しか持たない雄とのバランスを保つためいずれか一方がヘテロクロマチン化によって不活性化される。これはX染色体不活性化と呼ばれる遺伝子量補償のメカニズムであり、ヒトやマウスなどをはじめ、多くの哺乳動物において広く保存されている。この破綻はX染色体上遺伝子の過剰発現に起因するさまざまな異常を引き起こす。近年、このX染色体不活性化のメカニズムについて、マウス初期胚を用いた精力的な研究が成されている。その結果不活性化X染色体(Xi)特異的に、①Xistと呼ばれるnon-coding RNAの集積、②Histone H3K27のトリメチル化の亢進とそれを認識して結合するポリコームタンパク質Ezh2やEedの集積、③macro-H2Aと呼ばれるヒストンバリエーションの取り込みが見られ、この3つの時空間的制御が初期胚における不活性化X染色体の成立と維持に重要であることが示された。本申請では不活性化X染色体に見られるこれら特徴を利用し、雌雄胚の選別を行おうと考えている。

### 平成19年度

#### 不活性化X染色体を可視化する分子プローブの開発

具体的には上で述べた、不活性化X染色体に集積する分子についてGFPやRFPなど蛍光タンパク質との融合コンストラクトを作製し、それらをin vitroで転写後、そのmRNAを受精卵や2細胞期胚、4細胞期胚にマイクロインジェクションすることにより、不活性

化 X 染色体の可視化を試みる。Ezh2 (Enhancer of Zeste 2) や Eed (Embryonic Ectoderm Development) の全長、またはメチル化ヒストンに結合するドメインをクローニングし、蛍光タンパク質との融合コンストラクトを作製する。また、不活性化 X 染色体に存在するヒストンバリエーションである macro-H2A についても同様の発現コンストラクトを作製する。細胞毒性を最小限に抑えながらも確実に不活性化 X 染色体をレポートできるプローブ開発を行う。申請者は、これまでに数多くの GFP 融合タンパク質を作製し初期胚でのイメージングを成功させてきたため、リンカー配列の選択などのプローブの設計、条件検討は円滑に進められると考えている。

#### 不活性化 X 染色体を可視化する実験システムの構築

マウス初期胚発生において、不活性化 X 染色体は 2 細胞期の早期から着床前の胚盤胞期にかけて父性ゲノム特異的に生じることが Xist RNA の集積によって示された。Xist RNA が 2 細胞期に検出されるのに対し、Ezh2/Eed 複合体、macro-H2A の不活性化 X 染色体への集積はもっと遅く、8 細胞期以降から観察される。このように不活性化 X 染色体のマーカースによって違いがあることから、より内在性のものを反映させる意味でそれぞれの蛍光プローブについて発現させる量やタイミングの調整が必要である。過剰発現による異所的な局在化や胚への毒性へ十分考慮しながら適切なアッセイ系の確立を試みる。

#### 性選別に用いた胚の性別確認及び個体発生への検討

まずはマウスをモデルに、イメージング後の胚を胚盤胞期まで培養し、PCR で検定することによりイメージングによる性判別の正確性を確認する。また、イメージング胚を仮親に胚移植することによって、胚へのプローブの導入→性のイメージング→選別→培養→産仔作出というプロセスから成る性選別システムの構築を試みる。

#### 平成 20 年度

#### 家畜胚における X 染色体不活性化の基礎的解析

マウスで得られた知見を応用し、家畜胚を用いて不活性化 X 染色体を検出することによる性選別のアプリケーションが可能かどうかを検討していく。具体的にはウシ・ブタ・ウサギ等の胚を用いることを現段階として検討しているが、X 染色体の不活性化が生じる時期や細胞系譜は、種ごとに異なる可能性

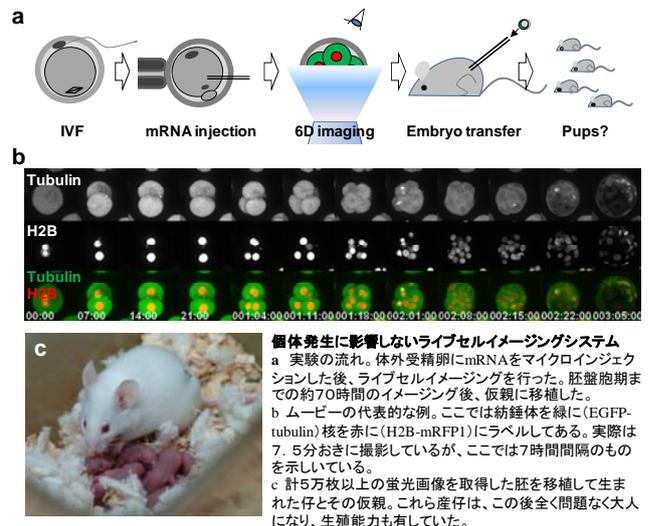
がある。そこでこれら家畜胚における Xist RNA による RNA-FISH や免疫染色など、従来確立された手法を用い、着床前初期胚において「いつ」「どの細胞で」X 染色体の不活性化が生じているかを検討する。また、同時に不活性化 X 染色体を検出するマーカー分子の検討も行う。

#### 家畜における性選別技術の応用

上記の実験で得られた基礎的データを用い、家畜胚を用いた性選別に挑戦する。マウス胚と同様、胚へのプローブの導入→性のイメージング→選別→培養→産仔作出というプロセスで、性選別を行い、最終的には PCR による検定によって正確性の評価を行う。

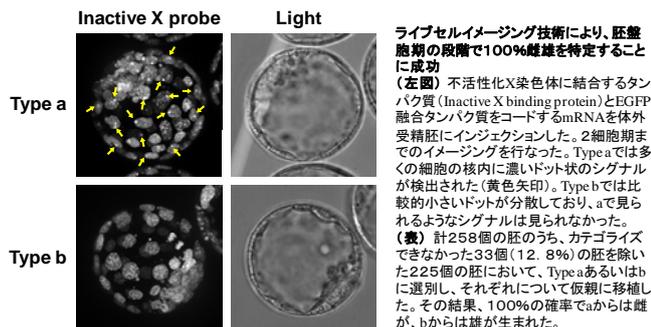
#### 4. 研究成果

平成 19 年度は、発生に全く影響のないイメージング技術を確立するため、蛍光観察後に胚を移植し、問題なく産仔が得られるような蛍光観察の条件を詳細に検討した。その結果、1 細胞期から胚盤胞期にかけての約 70 時間にわたり、計 6 万枚の蛍光画像を取得した後も問題なく胚を個体にまで発生させることができた。その他、胚選別を行うには同時に多くの胚を詳細に観察する必要が生じるため、100 個以上の胚を同時にイメージングできるような機器の改良を行った（下図）。なお、本件については現在特許出願中である。



平成 20 年度は、雌胚特異的に見られる X 染色体不活性化現象をレポートする蛍光プローブを開発し、実際に雌雄胚選別を試みた。実験計画に既述したように様々なプローブを試みたところ、目的に合ったものを開発することに成功した。特許未出願のため、ここ

では不活性化 X 染色体結合タンパク質 (Inactive X binding protein) とする。このプローブ (Inactive X probe) をコードする mRNA を 1 細胞期胚に  $\mu$  インジェクション後、受精後 4 日目の胚盤胞期胚で蛍光観察したところ、約半数の胚において核内に明確な不活性化 X 染色体のシグナルが観察された。実際にこれらの胚を仮親に移植してみると、100%の確率で雌が生まれ、残りの胚からは雄胚のみが生まれた (下図)。この実験系における産仔作出効率は無操作のコントロールと遜色ないことから、マウス胚において雌雄の 100%の産み分けに成功したと言える。



ライブセルイメージング技術により、胚盤胞期の段階で100%雌雄を特定することに成功 (左図) 不活性化X染色体に結合するタンパク質 (Inactive X binding protein) とEGFP融合タンパク質をコードするmRNAを体外受精胚にインジェクションした。2細胞期までのイメージングを行なった。Type aでは多くの細胞の核内に濃いドット状のシグナルが検出された (黄色矢印)。Type bでは比較的小さいドットが分散しており、aで見られるようなシグナルは見られなかった。(数) 計258個の胚のうち、カテコライズできなかった33個 (12.8%)の胚を除いた225個の胚において、Type aあるいはbに選別し、それぞれについて仮親に移植した。その結果、100%の確率でaからは雌が、bからは雄が生まれた。

Total No. of embryos	No. (%) of embryos not examined	No. (%) of embryos screened	Type	No. embryos screened	No. (%) of pups	
					Female	Male
258	33 (12.8)	225 (87.2)	a	104 (40.3)	41 (39.4)	0 (0)
			b	121 (46.9)	0 (0)	36 (29.8)

残念ながら、イメージングシステムの構築や、胚を活かしたまま X 染色体を長時間観察しうる蛍光プローブの開発に多くの時間を要したため、本研究期間中において当初の目標であった家畜胚でのイメージング、選別には至らなかった。しかし、マウス胚においても遺伝子組み換え技術を使わずに 100%の確率で雌雄産み分けに成功した例はこれまでなく、畜産分野だけでなく、生殖医療分野からみても十分画期的だと考えている。今後は、ウシ胚を用いて実際に雌雄胚の選別を行い、その農学的有用性を証明していきたいと考えている。

### 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 7 件)

① Yamagata K, Suetsugu R, Wakayama T. Assessment of chromosome integrity using a novel live-cell imaging

technique in mouse embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. Human Reproduction In press (査読あり)

② Yamagata K, Capturing Epigenetic Dynamics during Preimplantation Development Using Live Cell Imaging. Journal of Biochemistry, 143, 279-86, 2008 (査読なし)

③ Yamagata K, Suetsugu R, Wakayama T. Long-term, Six-dimensional Live-cell Imaging for the Mouse Preimplantation Embryo That Does Not Affect Full-term Development. Journal of Reproduction and Development, 55, 328-331, 2009 (査読あり)

④ Hara Y, Yamagata K, Oguchi K, Baba T. Nuclear localization of profilin III-ArpM1 complex in mouse spermiogenesis. FEBS letters, 582, 2998-3004, 2008 (査読あり)

⑤ Yamaguchi R, Yamagata K, Hasuwa H, Inano E, Ikawa M, Okabe M. Cd52, known as a major maturation-associated sperm membrane antigen secreted from the epididymis, is not required for fertilization in the mouse. Genes to Cells, 13, 851-61, 2008 (査読あり)

⑥ Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, et al. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 105, 12921-6, 2008 (査読あり)

⑦ Ohta H, Sakaide Y, Yamagata K, Wakayama T. Increasing the Cell Number of Host Tetraploid Embryos Can Improve the Production of Mice Derived from Embryonic Stem Cells. Biology of Reproduction, 79, 486-92, 2008 (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

① 山縣一夫、マウス初期胚のライブセルイメージングにより見えてきたもの、日本受精着床学会、2007年8月30日、仙台国際センター

② 山縣一夫、哺乳動物初期胚ライブセルイメージングシステムの開発と応用、日本

繁殖生物学会、2007年10月21日、  
東京大学農学部

山縣 一夫 (YAMAGATA KAZUO)  
独立行政法人理化学研究所・ゲノムリプロ  
グラミング・研究チーム・研究員

- ③ Kazuo Yamagata, Live-cell imaging technique for the preimplantation embryos and its application., Asian Reproductive Biotechnology Society, November 26, 2007, Singapore, National University of Singapore
- ④ 山縣一夫、ライブセルイメージングによる受精・初期胚発生時のエピジェネティクス変化の解析、日本分子生物学会、2007年12月12日、パシフィコ横浜
- ⑤ 山縣一夫、ライブセルイメージングを用いたマウス着床前初期胚の運命予測、第101回繁殖生物学会大会、2008年9月20日、九州大学医学部百年講堂
- ⑥ 山縣一夫、着床前初期胚ライブセルイメージング技術の開発と胚診断法への応用、第53回日本生殖医学会総会、2008年10月24日、神戸国際会議場

〔図書〕(計2件)

山縣一夫ら、共立出版、蛋白質核酸酵素増刊号「生殖細胞の発生・エピジェネティクスと再プログラム化」2007、7ページ

山縣一夫、羊土社、顕微鏡なるほどQ&A、6章 観察(応用編)に関するQ&A、2008、24 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：哺乳動物胚のインビトロ蛍光観察方法及び着床不全又は流産のリスクの低い哺乳動物胚の選択方法

発明者：山縣一夫、若山照彦

権利者：理化学研究所

種類：

番号：特願 2008-213296

出願年月日：平成 20 年 8 月 21 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者