

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500507

研究課題名(和文) ライブセルイメージング技術を用いた一次精母細胞顕微授精技術の改善

研究課題名(英文) Improvement of microinsemination techniques with primary spermatocytes of mice based on live-cell imaging analysis

研究代表者

越後貫 成美(Ogonuki, Narumi)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・専任技師

研究者番号：40373287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにおける顕微授精技術はほぼ完成した技術といえるが、一次精母細胞の顕微授精は実用レベルに達していない。本研究では産仔効率がきわめて低率である一次精母細胞を用いた顕微授精の異常メカニズムを明らかにした。ライブセルイメージング技術を用いて、一次精母細胞顕微注入直後から卵子内の雌雄染色体の挙動について解析したところ、雌雄両染色体の分裂スピードが一致していないことが明らかとなった。さらに通常の受精卵では精子侵入後に卵子のヒストンアセチル化レベルが低下するところ、一次精母細胞顕微注入胚では高アセチルを維持している胚が多く観察され、ヒストンアセチル化の異常が卵子の発生を阻害している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Microinsemination is a technique to deliver male germ cells directly into oocytes, and is a very effective technique to fertilize oocytes consistently, even male germ cells that are unable to fertilize oocytes under conventional in vivo and in vitro conditions. Although offspring can be obtained by primary spermatocyte injection in mice, its efficiency is still low (2-4%) compared with that by spermatid (30%) or by spermatozoa (40-50%). To know whether the poor full-term development, primary spermatocyte injected oocytes were monitored by live-cell imaging techniques. The gap of the chromosome division timing was observed between male and female chromosomes. And a histone, which are globally deacetylated in mammalian oocytes during meiosis, was remained acetylated in primary spermatocyte injected oocytes. Thus, inadequate histone deacetylation may be caused chromosome abnormalities and low oocyte developments.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：マウス 一次精母細胞 顕微授精 ライブセルイメージング

(1) 研究開始当初の背景

マウスにおける顕微授精技術は近年多くの研究が行われており、安定した技術といえる。現在のところ、実用的に顕微授精に利用できるのは、減数分裂を完了した半数体以降のステージにある精細胞（円形精子細胞、伸長精子細胞、精子）に限られているが、技術的には減数分裂前の段階である、一次精母細胞を用いても産仔獲得が可能である。この特殊な顕微授精では、注入した一次精母細胞の染色体は、減数分裂途上の未成熟卵子の中で雌の染色体と同期化し、同時に減数分裂を完了することで最終的に二倍体胚の構築に寄与する。しかし得られた二倍体胚は着床後に多くが死滅し、最終的な産仔率は2-4%以下と極めて低率である。以前の報告では、顕微授精胚の染色体標本において、第一減数分裂中に姉妹染色体が早期分離を起こしている胚が多数見られることが挙げられている。このことが着床後の胚死滅の主な原因であると想定されるが、具体的にどのようなメカニズムで染色体の早期分離・分配異常が起きているのかは明らかでない。一般に細胞の分裂過程で染色体が正常に姉妹細胞に分配されるためには、ヒストンがメチル化やアセチル化といった化学的な修飾による調整を受けることが重要である。最近、減数分裂期の卵子におけるヒストンの化学修飾状態が明らかにされ、減数分裂において正常に染色体が分離されるためには、ヒストンが脱アセチル化されることが重要であると指摘されている。また、精巣での雄性生殖細胞の減数分裂過程でも、ヒストンは一時的に脱アセチル化されることが知られる。申請者は予備実験から、一次精母細胞を用いた顕微授精胚では、父性染色体においてヒストンアセチル化が亢進していることを示唆する結果を得ている（未発表）。このような父性染色体特異的なヒストンアセチル化の亢進は自然な受精過程でも起こるが、この場合、卵子が受け入れる精

子は既に減数分裂を完了している。これに対し、精母細胞を用いた顕微授精の場合、雄性染色体の減数分裂が卵子内で行われるという特殊性がある。おそらく、精母細胞由来染色体のヒストンが卵子内の因子によってアセチル化を受けるため、染色体の分配異常が引き起こされると考えられるが、アセチル化の程度やタイミング、さらに関連する酵素などの詳細なメカニズムは明らかでなく、そのため対策を講じることもできない段階にあった。

2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究では一次精母細胞を用いた顕微授精の異常メカニズムを明らかにし、その効率を実用レベルまで引き上げることを目的に設定した。そこで着目したのが、近年開発されたライブイメージング技術である(Yamagata et al., 2009)。このシステムでは、mRNA や抗体フラグメントを注入して、着床前胚の様々なタンパク質や細胞内小器官、さらに染色体の化学修飾状態などをリアルタイムに観察することが可能である。しかも、この観察を行った後の胚は蛍光観察によるダメージをほとんど受けておらず、子宮内へ移植することで正常に産仔に至ることが示されている。すなわち、このシステムを用いることで、染色体の動態や化学修飾状態と、その胚の発生能との関係を遡及的に直接比較解析することが可能になる。

3. 研究の方法

本研究では、このライブセルイメージング技術を用いて一次精母細胞顕微授精胚の、

- (1)染色体動態を観察し、染色体の分配異常と産仔能との関連性を明らかにする。
- (2)ヒストンの化学修飾状態と染色体分配異常の関連性を明らかにする。

これらの解析から一次精母細胞顕微授精胚の染色体分配異常のメカニズムを明らかにする。

(3) (1)および(2)の結果を踏まえて、  
卵子あるいは一次精母細胞の化学修飾  
状態や顕微注入の時期を人為的に操作  
することで産仔率の改善を目指す。

#### 4. 研究成果

ライブセルイメージング技術を用いて、一  
次精母細胞顕微注入直後から卵子内の雌雄  
染色体の挙動について解析したところ、雌雄  
両染色体の分裂スピードが一致していない  
ことが明らかとなった。また、通常の受精卵  
では精子侵入後に卵子のヒストンアセチル  
化レベルが低下するところ、一次精母細胞顕  
微注入胚では、高アセチルを維持している胚  
が多く観察された。すなわち、一次精母細胞  
顕微注入胚のヒストンアセチル化の異常が、  
卵子の発生を阻害している可能性が考えら  
れた。

その結果を踏まえて、人工的操作を加えて  
いない、自然の状態での卵子の染色体異常が高  
率に起こり、また、低産仔率の傾向が報告さ  
れている、老齢マウス由来の卵子を実験モデ  
ルとして、卵子の染色体異常とヒストンアセ  
チル化の関係について解析を行った。老齢マ  
ウス卵子(12-15ヶ月齢)では、第二減数分  
裂中期において染色体の正常整列が見られ  
ないものが多く観察された。また、多くの卵  
子においてヒストンアセチル化が高い状態  
で維持されていることが明らかになった。こ  
の結果より、一次精母細胞顕微注入胚は老齢  
マウス卵子における減数分裂パターンと非常  
に近い状態であることが明らかになった。

この結果を受けて、現在、老齢マウス卵子  
のヒストン化学修飾状態を人為的に操作し、  
染色体改善にともなう卵子全体の質的改善  
を図る研究を開始した。将来的にヒト加齢卵  
子の非侵襲的治療の技術的基礎の確立を目  
指すとともに、一次精母細胞顕微授精の受精  
率向上の応用に繋がるものと考えている。

#### 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16件)すべて査読あり。

- (1) Udagawa O, Ito C, Ogonuki N, Sato H, Lee S, Tripuvanuntakul P, Ichi I, Uchida Y, Nishimura T, Murakami M, Ogura A, Inoue T, Toshimori K, Arai H. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking ORP4, a sterol-binding protein in the OSBP-related protein family. *Genes Cells* 19: 13-27, 2014.
- (2) Okae H, Matoba S, Nagashima T, Mizutani E, Inoue K, Ogonuki N, Chiba H, Funayama R, Tanaka S, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Ogura A, Arima T. RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. *Hum Mol Genet* 23: 992-1001, 2014.
- (3) Takashima S, Hirose M, Ogonuki N, Ebisuya M, Inoue K, Kanatsu-Shinohara M, Tanaka T, Nishida E, Ogura A, Shinohara T. Regulation of pluripotency in male germline stem cells by Dmrt1. *Genes Dev* 27: 1949-1958, 2013.
- (4) Morimoto H, Iwata K, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Kanatsu-Shinohara M, Morimoto T, Yabe-Nishimura C, Shinohara T. ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 12: 774-786, 2013.
- (5) Fujiwara Y, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Handel MA, Noguchi J, Kunieda T. t-SNARE Syntaxin2 (STX2) is implicated in intracellular transport of sulfoglycolipids during meiotic prophase in

- spermatogenesis. Biol Reprod 88: 141, 1-9, 2013
- (6) Kamimura S, Inoue K, Ogonuki N, Hirose M, Oikawa M, Yo M, Ohara O, Miyoshi H, Ogura A. Mouse cloning using a drop of peripheral blood. Biol Reprod 89 24, 1-6, 2013.
- (7) Oikawa M, Matoba S, Inoue K, Kamimura S, Hirose M, Ogonuki N, Shiura H, Sugimoto M, Abe K, Ishino F, Ogura A. RNAi-mediated knockdown of Xist does not rescue the impaired development of female cloned mouse embryos. J Reprod Dev 59: 231-237, 2013.
- (8) Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Takashima S, Takehashi M, Ogonuki N, Morimoto H, Nagasawa T, Ogura A, Takashi Shinohara. Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture. Cell Stem Cell 11:567-578, 2012.
- (9) Sato T, Yokonishi T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Matoba S, Ogonuki N, Ogura A, Yoshida S, Ogawa T. Testis tissue explantation cures spermatogenic failure in c-Kit ligand mutant mice. Proc Natl Acad Sci USA 109:16934-16938, 2012.
- (10) Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, Nakamura T, Abe K, Nakano T, Ishino F, and Ogura A. RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. Proc Natl Acad Sci USA 108; 20621-20626, 2011
- (11) Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Inoue K, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Ogawa T. In vitro differentiation of germline stem cells into fertile sperm in testis tissue explants. Nature Commun 2:472, 2011. doi: 10.1038/ncomms1478
- (12) Kohda T, Ogonuki N, Inoue K, Furuse T, Kaneda H, Suzuki T, Kaneko-Ishino T, Wakayama T, Wakana S, Ogura A, Ishino F. Intracytoplasmic sperm injection induces transcriptome perturbation without any transgenerational effect. Biochem Biophys Res Commun. 410: 282-288, 2011
- (13) Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, & Ogawa T. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. Nature 471: 504-507, 2011
- (14) Ogonuki N, Inoue K, Ogura A. Birth of normal mice following round spermatid injection without artificial oocyte activation. J Reprod Dev 57: 534-538, 2011
- (15) Fulka H, Hirose M, Inoue K, Ogonuki N, Wakisaka N, Matoba S, Ogura A, Mosko T, Kott T Fulka, J. Jr. Production of mouse embryonic stem cell lines from maturing oocytes by direct conversion of meiosis into mitosis. Stem Cells 29: 517-527, 2011
- (16) Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Morimoto H, Ogura A, Shinohara T. Serum- and Feeder-Free Culture of Mouse Germline Stem Cells. Biol. Reprod. 84 :97-105, 2011.

- (1) 及川 真実ほか、Nuclear transfer provides a new picture of the X chromosome inactivation cycle、26th Mouse Molecular Genetics、2013 年 9 月 20 日、ケンブリッジ
- (2) 及川真実ほか、卵子由来の Xist のインプリントは着床期マウス胚から完全に消失する、第 106 回日本繁殖生物学会、2013 年 9 月 12 日、東京
- (3) 上村悟氏ほか、Production of cloned mice from a drop of peripheral blood、The 10th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society、2013 年 8 月 22 日、ベトナム
- (4) 及川真実ほか、Xist ノックダウン処理は雌クローン胚の発生能を改善しない、第 54 回日本卵子学会、2013 年 5 月 26 日、東京
- (5) 及川真実ほか、核移植技術による Xist 遺伝子のインプリント確立時期の解析、第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 11-14 日、福岡
- (6) 及川真実ほか、核移植技術を利用した Xist 遺伝子のインプリント確立時期の解析、第 105 回日本繁殖生物学会、2012 年 9 月 6-8 日、つくば
- (7) 幸田 尚 ほか、Transcriptome perturbation induced by intracytoplasmic sperm injection in the mouse、第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月 13-16 日、横浜
- (8) 的場章悟ほか、RNAi ノックダウンシステムを利用した Xist 発現抑制による体細胞クローン胚の発生能改善、2011 年 9 月 15-17 日、盛岡
- (9) 越後貫成美ほか、人為的活性化処理なしでの凍結円形精子細胞の顕微注入によるマウス産仔の作出、第 58 回日本実験動物学会、2011 年 5 月 25-27 日、東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.brc.riken.jp/lab/kougaku/index.html>

<http://www.riken.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

越後貫 成美 (OGONUKI NARUMI)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・専任技師

研究者番号：40373287