

令和元年6月18日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15394

研究課題名(和文) マウス1細胞期胚における個体形成能の評価法の開発および分子基盤の解明

研究課題名(英文) Development of the evaluation method and elucidation of molecular basis of zygotic totipotency

研究代表者

大我 政敏(OOGA, Masatoshi)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：40644886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：精子と卵が受精することで生じる受精卵は将来子供になる。一見同じように見える受精卵であっても、母体に移植すると子供になれるものと途中で死んでしまうものの2者が存在する。本研究では、受精直後の1細胞期の胚で、この両者を見分ける技術を確立することを目的としている。もちろん、胚を殺してしまえば意味がないので、生きたまま細胞を観察する技術live imaging法を用いた技術開発を目標としている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一見同じように見える1細胞期胚を、将来子になるものとなれないものとし生きたまま区別することができることには以下のような意義がある。学術的には、生まれられる胚と途中で死んでしまう胚の比較解析が可能となり、遺伝子発現レベルではどのような違いがあるのかという疑問の解明に繋がる。また、社会的には、母体に移植する前の胚の中から最良の胚を選択できるようになれば、不妊治療ならびに畜産部門においてこの知見は非常に価値あるものとなると考えている。

研究成果の概要(英文)：Zygotes which are derived from sperm and oocytes, can give rise to offspring. However, not all of them can be children: there are two types of zygotes, one can develop to full-term but another one can not. Here, I am trying to establish the technique which can distinguish the former from the later. Importantly the methods needs to be able to distinguish them without killing.

研究分野：繁殖生物学

キーワード：個体形成能

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体内外で受精させて得られた受精卵には、同じ方法で得られたにも関わらず、最終的に個体となり生まれるものと、途中で胚発生を停止し、個体となれないものが混在している。このような個々の胚の個体形成能の違いは発生過程のいつ、どのように生じるのか。この謎は未だ解明されていない。一方で、体細胞クローン個体は、体細胞核を除核した卵に移植し得られるクローン胚から生じる。クローン胚の多くは雌マウスに移植後発生を停止してしまうが、クローン胚の中にもクローン個体として生まれて来られるものは存在する。このように、受精卵にもクローン胚にも個体を形成できる胚と発生を途中で停止してしまう胚が存在するが、これらの胚を早期に、特に1細胞期で見分ける事は現状では不可能であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスの1細胞期胚の個体形成能を評価する技術の確立とその技術を用いて、個体形成能に重要な分子メカニズムを解明することである。つまり、受精直後の1細胞期の時点で、その後の胚発生を正確に予想することができる技術を確立し、その技術を元に良質な胚と悪質な胚を選り分け、比較解析をすることで、個体形成能を決定する分子メカニズムの解明を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)法は、解析対象タンパク質をeGFPのような蛍光タンパク質と融合タンパク質として発現させ、その蛍光を追うことで細胞内での目的分子の動態、ここでは特に動性 (mobility)を解析することができるライブイメージング法である。クロマチンを構成するヒストンタンパク質のH2Bを融合タンパク質(eGFP-H2B)として発現させることで、クロマチン構造の緩さを解析することが可能であり、この緩さが、ES細胞の分化ポテンシャルと関係することが示唆されていた。そこで、申請者は1細胞期胚でeGFP-H2BのFRAPを行なったところ、ES細胞よりも遥かに緩んだクロマチン構造を持つことを報告していた(Ooga et al 2016)。また、クローンの1細胞期胚をFRAPしてみると、受精卵よりも有意に低いレベルのクロマチン構造の緩さを持つことがわかった。このように、クロマチン構造の緩さは、その胚の発生のポテンシャル、いわば個体形成能と相関があることがわかってきた。ところが、1細胞期胚と一言で言っても、全ての1細胞期胚がこの顕著に緩んだクロマチン構造の獲得に成功しているのではなく、それぞれの胚ごとに緩さの程度にはバラツキが見られる。そこで、本研究ではこのクロマチン構造の緩さが、1細胞期の個体形成能の指標として利用できるのではないかと考えた。そこでまず、FRAP解析から得られるクロマチン構造の緩さとその胚のその後の胚発生を観察することで、この仮説を検証するという戦略を立てた。この実験系を可能にするために、FRAP解析を行ったその胚が産仔まで発生 (full term development) できることが必須となる。そこで、本研究では、1細胞期胚(zygotes)におけるeGFP-H2Bを用いたFRAPをzygotic FRAP (zFRAP, Ooga et al 2018a)と命名し、まず、このzFRAP解析をした胚から正常な産仔の獲得が可能なのかを検証することにした。

4. 研究成果

(1) zFRAPの条件設定

まず、zFRAP法では胚に極力ダメージを与えず、クロマチン構造の緩さを解析できる実験条件の設定が必要であるため、その第一段階として、用いるmRNAの濃度の最適化を行なった。50-500 ng/μlの濃度をIn vitro fertilization (IVF)胚に顕微注入し、zFRAPをした場合のRecovery curveと各mRNA濃度ごとの胚発生を調べた。結果、250 ng/μl以上の濃度では若干の胚盤胞への発生率の低下が見られたが(表1)、250 ng/μlのmRNAを用いてzFRAPすることで、既報(Ooga et al 2016)と類似したrecovery curveが得られた。さらに、zFRAP解析による胚盤胞への発生率の影響も認められなかったため、250 ng/μlが最適濃度であると判断した(Ooga et al 2017)。

表1 eGFP-H2B mRNA濃度の最適化 (Ooga et al 2017)

Concentration of mRNA	1 cell (%) (12 hpi)	2 cell (%) (24 hpi)	4-8 cell (%) (48 hpi)	Mor. (%) (72 hpi)	Blast. (%) (96 hpi)
Intact	72 (100)	70 (97.2)	66 (91.7)	68 (94.4)*	66 (91.7)
50	63 (100)	63 (100)	62 (98.4)	61 (96.8)	57 (90.5)
100	70 (100)	70 (100)	67 (95.7)	67 (95.7)	63 (90.0)
250	72 (100)	71 (98.6)	64 (88.9)	64 (88.9)	58 (80.6)
500	71 (100)	71 (100)	67 (94.4)	66 (93.0)	59 (83.1)

*: At 72 hpi, the embryos developed to morula stage

続いて、zFRAP解析した胚から正常な産仔の獲得を可能にするために、zFRAP法でのbleaching

並びに observation の条件の再度見直しを行った。マウスの 1 細胞期胚は通常体内で発生をするため、強い光にさらされることはないが、実験室での体外培養ではしばしば光による毒性が問題となる。live imaging の一種である FRAP 法では、bleaching の際は蛍光タンパクを不可逆的に退色させるために、強力な光を照射する。さらに、その後経時的に励起光を照射し、その蛍光を観察する。そのため、zFRAP 法はその後の胚発生に悪影響を及ぼすことが懸念された。そこで、bleaching time を約半分の 5 秒にし、さらに、observation time を現行の 150 秒から 1/6 のおよそ 25 秒まで短縮した。この条件でも、zFRAP 実験が可能であることを確認した (Ooga et al 2017)。

新たに設定した条件で zFRAP 解析した 1 細胞期胚をそれぞれ 2 細胞期まで発生させ、偽妊娠マウスに移植することで、その産仔率を調べた。その結果、興味深いことに zFRAP 胚からも 41.0% と高い産仔率で産仔を得ることに成功した。この産仔率は control (mRNA を injection するが zFRAP 解析には供さなかった胚) から得られる産仔率 (52.6%) と有意な差がなかったことから、zFRAP 法が非常に低毒性な解析手法であると同時に、zFRAP 解析と full-term development の両立は可能であり、本研究の戦略は実現可能であることが示された (Ooga et al 2017)。

表 2 zFRAP 胚の産仔率 (Ooga et al 2017)

Categories	No. of injected zygotes	No. of recovered zygotes after mRNA injection (%)*	No. of zygotes analyzed	No. of transferred 2-cell stage embryos (%)**	No. of recipients	No. of pups (%)***	Weight of pups (g)	No. of transgenic pups
Intact	-	-	99	98 (99.0)	9	61 (62.2) ^a	1.64±0.02	n.d
No FRAP	420	398 (94.8)	82	78 (95.1)	7	41 (52.6) ^{a, b}	1.66±0.03	n.d
FRAP			79	78 (98.7)	7	32 (41.0) ^b	1.69±0.03	0

*: calculated by dividing with no. of injected zygotes

** : calculated by dividing with no. of zygotes analyzed

***: calculated by dividing with no. of transferred 2-cell stage embryos. a, b: superscripts indicate significant difference (P<0.05). n. d: not determined

なお、これらの胚に由来する産仔の産後の成長を調べたが、zFRAP 解析による adults までの成長への影響も認められなかった (図 1)。また、現在までその寿命にも影響は認められていない。したがって、zFRAP 解析は着床前、着床後の胚発生並びに出生後に大きな影響を及ぼすことなく、クロマチン構造を解析することができる画期的な手法であることが明らかとなった (Ooga et al 2017)。

懸念していたよりも zFRAP 解析が低毒性であったことから、より強力な bleaching 条件でレーザー照射を行い、その胚盤胞率への影響を調べることで zFRAP 法の毒性についてさらに検証した (図 2 左)。実験条件として、レーザー強度を 3 倍にしたもの (300 μ W, 5 s) と、レーザー照射時間を 6 倍にしたもの (110 μ W, 30 s)、レーザー強度を 3 倍かつ照射時間を 6 倍 (300 μ W, 30 s) にした 3 条件について解析した。結果、条件の強度が上がると、前核内の退色領域の面積が広くなり、極端な bleaching が確認できた。しかしながら、驚いたことに最も bleaching 強度を高めた試験区であっても、control 区と同等の 90% 以上の胚盤胞率を示した (図 2 右)。以上のことから、zFRAP は胚発生に大きな影響を及ぼさないため、クロマチン構造と胚の個体形成能の関連の検証する条件が整った。

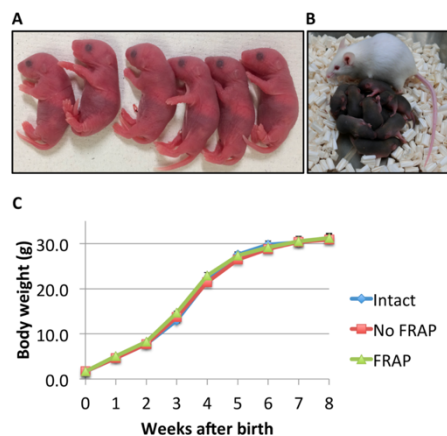


図 1 zFRAP 胚由来の産仔とその後の成長 (Ooga et al 2017)

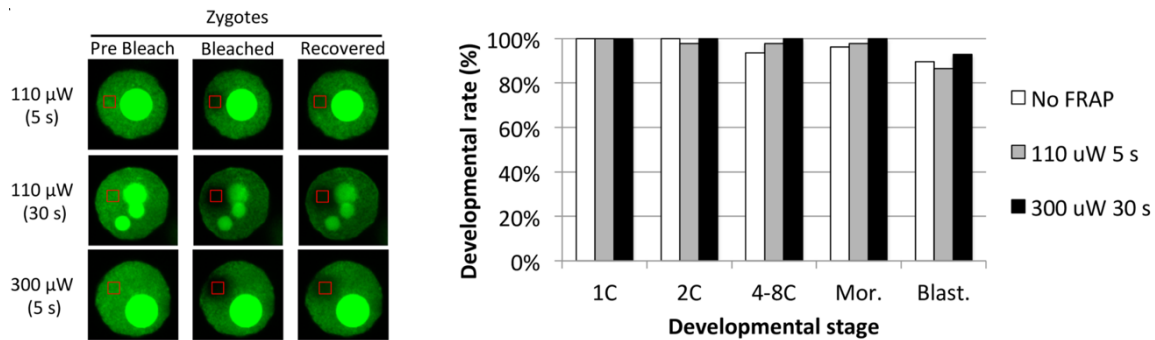


図 2 強力な bleaching 条件(左)とその胚発生への影響 (右) (Ooga et al 2017)

赤い四角は bleaching 領域
Scale bar は 10 μm

(2) zFRAP の個体形成能の評価系としての有効性の検証

zFRAP 法では、クロマチン構造の緩さの指標として、recovery curve から算出される mobile fraction (MF) を使用している。先行研究より、1 細胞期では精子由来の雄性前核と卵子由来の雌性前核の 2 つの前核が存在するが、この両者の間にクロマチン構造の緩さの違いが存在することが報告されている。手始めにこの両者の MF の平均値を用い、1 細胞期胚の個体形成能との相関があるかを調べた。予備実験ではあるが、MF が 25% 以上の胚と 25% 未満の胚ではその産仔率に違いがあり、それぞれ、56, 14% と差が見られた(図 3)。このことから、zFRAP 法の有用性が示唆された。しかしながら、緩さのレベルの低いグループの胚からも産仔が得られたことから、雌雄の前核の平均値だけでは個体形成能の評価の指標としては不十分であることがわかった。そこで、雌雄前核の差に注目し、雄性前核と雌性前核のクロマチン構造の緩さのバランスが重要なのではないかと考えた。まず、この現象が様々な系統で保存されたものであるかを調べた。BDF1 系統の MII 卵と ICR, BDF1, B6N, C3H 各系統の精子を用いて作製した In vitro fertilization (IVF) 胚について zFRAP 解析を行った。結果、調べた全ての系統で雌雄前核差が確認されたことから、1 細胞期での緩んだクロマチン構造が形成されることは、マウスの系統間でも保存された現象であることが判った (Ooga et al 2017)。

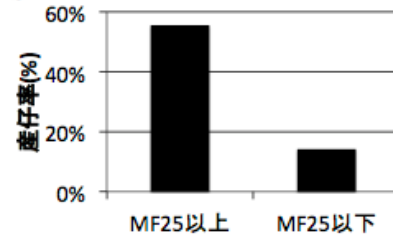


図 3 MF ごとの産仔率 (%)

(3) MF の個体形成能評価系としての規格値の探索

ここまでの検討では IVF 胚を用いて来たのだが、マイクロマニピュレーターを用いることで、IVF 胚以外にも様々な種類の 1 細胞期胚を作成することができる。ELSI (elongated sperm injection) 胚、ROSI (round spermatid injection) 胚は未成熟な精子細胞を未受精卵に顕微注入することで作成され、中でも ROSI 胚は成熟精子を顕微注入した ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) 胚よりも個体形成能が低く、産仔率は半分程度であり約 20-30% 程度と言われている。そこで、この ROSI 胚を zFRAP 解析することで、個体形成能の指標としての新たな知見が得られるのではないかと考えた。ROSI, ELSI, ICSI の 3 種類の zFRAP 解析を行ったところ、興味深いことに、雌雄の前核間のクロマチン構造の緩さの差が ROSI 胚では小さく、その比が 1.2 倍以上 ($\sigma > \rho$) となる胚が、43% と、IVF, ICSI 胚の 70% と大きく異なることが明らかとなった。また、ELSI 胚については、51% と中間的な値を示した。以上のことから、クロマチン構造の緩さは、雌雄の前核間で差が生じている方が、より高い個体形成能を持つものと考えられた。この可能性をさらに追求するために、TSA 処理をした ROSI 胚についても zFRAP 解析を実施した。HDACi 処理は、体細胞クローン胚や ROSI 胚といった個体形成能の低い胚の産仔率を向上する報告がなされている。ROSI 胚については Scriptaid 処理により産仔率が 2 倍近く高まり、ICSI 胚と遜色なく産仔が得られることが報告されている (Human reproduction 2017)。TSA で処理した胚を zFRAP 解析したところ、60% の胚が雌雄比 1.2 倍以上 ($\sigma > \rho$) となった。したがって、MF を指標として利用する際は、雌雄前核の比率も重要であることが考えられた。

(4) 緩んだクロマチン構造の雌雄差の形成メカニズムの解析

成熟した精子が受精した場合に、顕著な雌雄ゲノムのクロマチン構造の違いが生じるのかを明らかにするために、様々な 1 細胞期胚を作製し、zFRAP 解析を行った。BDF1 由来 MII 卵に

eGFP-H2B の mRNA (250ng/μl) を顕微注入し、この卵をもとに以下の①-③の胚を作製しクロマチン構造の緩さの指標である、eGFP-H2B の mobile fraction (MF) を算出した。なお、雄性配偶子は ICR のものを利用した。①前核数が 1 つ、2 つあるいは 4 つの雌性単為発生胚 ②ROSI, ICSI 胚 ③1 前核 ROSI, ICSI, 紡錘体置換胚。まず、①の s1, 2, 4 前核雌性単為発生胚では、前核数の増加に伴い、MF は 30, 22, 15% と次第に低下した。よって、1 細胞期では、緩んだクロマチン構造を形成する活性を各前核が奪い合うものと考えられた。②ROSI, ICSI 胚では、雄性前核はいずれも MF が 21% で差はなかったが、雌性前核は 19, 15% と差があり、ROSI 胚では雌雄前核差が小さくなった。よって、精子由来雄性前核が雌性前核に影響を及ぼし、クロマチン構造の緩さに雌雄前核差が生じることが示唆された。③精子、円形精子細胞、MII 卵ゲノム由来前核を単一で比較するために、除核卵にそれぞれ注入し 1 つの前核を形成させ、その MF を調べた結果、MF は 26, 33, 34% となり、精子ゲノム由来雄性前核が緩んだクロマチンを獲得しにくいことが判った。以上より、1 細胞期胚では前核間でクロマチンを緩める活性を奪い合い、精子ゲノムがこの活性を著しく消費してしまうため、雌性前核が緩さを十分に獲得できず、雌雄前核間差が生じるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

研究代表者に太字下線

1. Zygotic Fluorescence Recovery After Photo-bleaching Analysis for Chromatin Looseness That Allows Full-term Development

Masatoshi Ooga*, Satoshi Funaya, Fugaku Aoki and Teruhiko Wakayama J.Vis.Exp 136 e57068 (2018) 査読有 (*First and corresponding author)

2. Chd9 mediates highly loosened chromatin structure in growing mouse oocytes

Masatoshi Ooga, Satoshi Funaya, Yuki Hashioka, Wataru Fujii, Kunihiko Naito, Masataka G. Suzuki and Fugaku Aoki BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 500(3) 583-588 (2018) 査読有

3. FRAP analysis of chromatin looseness in mouse zygotes that allows full-term development

Masatoshi Ooga* and Teruhiko Wakayama PLoS One 12(5) e0178255 (2017) 査読有 (*First and corresponding author)

[学会発表] (計 4 件)

① ROSI 胚における epigenetic parental asymmetry の消失と回復

大我政敏、風間晃輔、上村悟氏、若山照彦
繁殖生物学会 2018 (信州大学)

② Establishment of zygotic fluorescence recovery after photobleaching for ROSI-derived zygotes

Masatoshi Ooga, Kousuke Kazama and Teruhiko Wakayama
The international Conference on Cell Reprogramming and Reproduction 2018 (ベトナム, ホーチミン)

③ マウス円形精子細胞注入胚の低産仔率の原因究明と向上の試み

風間晃輔、**大我政敏**、上村悟氏、若山照彦
日本卵子学会 2018 (大宮ソニックシティ)

④ Disrupted parental asymmetry of chromatin structure in ROSI-derived zygotes

Masatoshi Ooga, Kousuke Kazama, Satoshi Kamimura and Teruhiko Wakayama
4th World Congress Reproductive Biology 2017 (沖縄コンベンションセンター)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~twakayama/LSHP/Wakayama%20lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：部局名：職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 若山 照彦

ローマ字氏名： WAKAYAMA Teruhiko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。