

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16040

研究課題名（和文）雌雄半数体融合胚生産方法を用いたマウス1細胞期の雌雄ゲノム解析

研究課題名（英文）Analysis of male and female genomes in one-cell stage mouse zygotes using the method of producing male-female haploid fusion embryos

研究代表者

長友 啓明（Nagataomo, Hiroaki）

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：30746813

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類初期胚は受精後全能性を獲得するために一細胞期にダイナミックな変化を起こす。個体発生の起点となる一細胞期に起きる現象は他の細胞に類を見ない特異な現象であり不明な点も多い。そこで本研究では1細胞期の雌雄ゲノムを半数体の状態で別々に作製し、2細胞期に融合することで1つの2倍体胚とする雌雄半数体融合胚生産方法を検討し、1細胞期に別々の転写制御処理を可能とし、1細胞期における雌雄ゲノムの機能差を調査することを目的とした。その結果、雌性前核の遺伝子発現を抑制しても胚盤胞期への発生は進行するが、雄性前核の遺伝子発現を抑制した場合発生が停止することが明らかとなり、雌雄ゲノムの機能差が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚性ゲノム活性化は胚発生過程における最初の起点となる遺伝子発現であり、非常に興味深く重要な現象だが、その特異な遺伝子発現機構を解析する手法は難しく、生物学的な重要性を示す知見は間接的あるいは断片的にしかなっていない。1細胞期では雌雄ゲノムは別々に雌性前核、雄性前核として存在しており遺伝子発現も異なると考えられているが、雌雄ゲノムの機能差を直接的に比較し、その後の発生への影響を調査する方法がこれまで存在しなかった。本研究では雌雄ゲノムの機能差を示しており、1細胞期に起きている現象を理解することは効率的な体細胞クローンの作製やより安全かつ効率的なiPS細胞作製等にも役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mammalian early embryos undergo dynamic changes in the one-cell stage after fertilization to acquire totipotency. The phenomena that occur at the one-cell stage, which mark the beginning of individual development, are unique and not observed in other cell types, leaving many aspects unclear. In this study, we aimed to analyze the functional differences between male and female genomes at the one-cell stage by separately producing male and female haploid genomes and fusing them at the two-cell stage to create a single diploid embryo. This approach allows separate transcriptional control in the one-cell stage. Our results revealed that while development to the blastocyst stage proceeded even when gene expression in the female pronucleus was suppressed, development halted when gene expression in the male pronucleus was suppressed. This finding elucidates the functional differences between male and female genomes.

研究分野：発生工学、発生生物学

キーワード：胚性ゲノム活性化 雌性前核 雄性前核 細胞融合

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

分化した生殖細胞である卵母細胞および精子は接合し受精卵へと変化する。受精後、1細胞期胚はあらゆる細胞へ分化可能な全能性を獲得し、新しい遺伝子発現プログラムをスタートさせる。この時期にはエピジェネティック制御による、クロマチン構造や遺伝子の発現様式の転換という核内構造の変化が重要であるが、それだけではなく細胞質成分の再編成が起きることも知られている。このようにわずかな時間の間に細胞全体でここまで劇的な変化がみられる細胞は他に類がない。近年、細胞のリプログラミング技術を利用して、体細胞クローン動物や再生医療に重要な iPS 細胞などが一般的にも知られるまでに普及しているが未だ初期化のメカニズムもほとんど明らかになっていない。したがって、1細胞期に起きている現象を理解することは効率的な体細胞クローンの作製やより安全かつ効率的な iPS 細胞作製等にも役立つと考えられる。

胚性ゲノム活性化(ZGA)は胚発生過程における最初の起点となる遺伝子発現であり、非常に興味深く重要な現象だが、その特異な遺伝子発現機構を解析する手法は難しく、生物学的な重要性を示す知見は間接的あるいは断片的にしか得られておらず、多くの謎が残されている。もっとも研究が進んでいる実験動物マウスでは、1細胞期から最初の遺伝子発現が開始され、minorZGAとmajorZGAが連続して起こる。受精後、minorZGAが起こる1細胞期では雌雄ゲノムは別々に雌性前核、雄性前核として存在しており、それぞれの遺伝子転写も異なると考えられている。しかし雌雄ゲノムの機能差を直接的に比較し、その後の発生に及ぼす影響を調査する方法がこれまで存在しなかった。

### 2. 研究の目的

哺乳類初期胚は受精後全能性を獲得するために一細胞期にダイナミックな変化を起こし、その後細胞分裂を経るに従いあらゆる細胞に分化し1つの個体となる。この個体発生の起点となる一細胞期に起きる現象は他の細胞に類を見ない特異な現象であるため、不明な点も多い。詳細な解析が難しい理由の一つに1細胞期は雌雄ゲノムがそれぞれ前核として別々に存在していることがある。別々に存在しているからには異なる遺伝子発現をしていると考えられるが、1つの細胞内に存在するため、それぞれの遺伝子発現を特異的に制御し、なおかつ解析およびその後の発生を調査する方法がこれまでなかった。そこで本研究では発生工学的な手法で1細胞期の雌雄ゲノムを半数体の状態で別々に作製し、2細胞期に融合することで1つの2倍体胚とする雌雄半数体融合胚生産方法を検討し、1細胞期に別々の転写制御処理を可能とし、1細胞期における雌雄ゲノムの機能差を調査することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) 2細胞期におけるhPaおよびhAn胚の融合による産仔の作出

雌核発生胚(hPa胚)は塩化ストロンチウムによる人為的活性化で作出し、雄核発生胚(hAn胚)は卵子の紡錘体を除去したのち、精子の顕微注入により作製した。2細胞期に発生したhPa、hAn胚の片割球を顕微操作によりそれぞれ置換しセンダイウイルスを用いて融合し、2倍体胚とした(図1)。受精後20-22時間で顕微操作により割球を融合させた。作製した2倍体胚は、胚盤胞期まで培養もしくは卵管移植により発生率、産仔率を検証した。

#### 2) 転写阻害剤による雌雄ゲノムのminor ZGAが発生に及ぼす機能差

minor ZGAによる遺伝子発現を抑制するために、転写阻害剤としてRNA polymerase IIのリン酸化酵素を可逆的に阻害する5,6-dichloro-1-β-ribofuranosylbenzimidazole (DRB)を培地に添加した。hPa胚またはhAn胚についてDRB処理後、雌雄半数体融合胚を作製し、胚盤胞期までの発生率および移植後の産仔率を調査した。DRB処理時間は、minor ZGAが起こる期間とされている1細胞期のG1期から2細胞期のDNA複製期前までの間の16時間とした。その後融合胚を作製し、その後の胚発生を観察した。また、網羅的に遺伝子発現を調査するために、RNA seqを行なった。RNA seqのサンプル

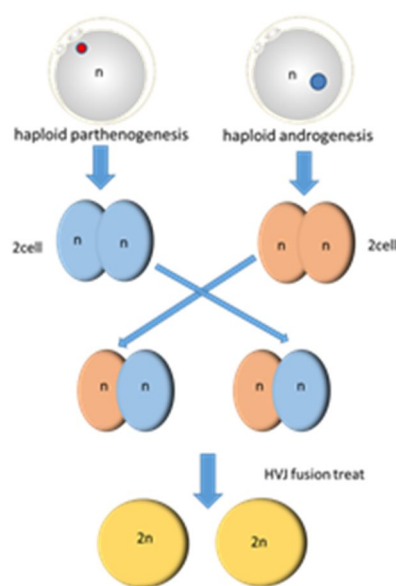


図1 hPa胚とhAn胚の融合による新規胚生産法

としては hPa 胚、hAn 胚、hPa + hAn 胚、hPa DRB+ hAn 胚および hPa + hAn DRB 胚と通常胚を用い、minor ZGA 発現量を補正するため MII 卵を用いた。1 サンプルあたり胚を 5 個とし、SMART-Seq Stranded Kit を用いてライブラリを調整し、NovaSeq X Plus にて RNA seq を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1) 2 細胞期における hPa および hAn 胚の融合による産仔の作出

融合操作の実際の過程を図 2 に示す。内径 25  $\mu$ m のガラスキャピラリーを用いて hPa 胚と hAn 胚を片割球ずつ置換した。置換する際にわずかにセンダイウイルス液を含むことで融合を誘起下させた。その後培養し 30min で細胞融合を確認した。融合操作を行わずに培養した hPa および hAn 胚の胚盤胞期への発生率は約 40%、10%であったが、融合した胚では 90%以上の胚が胚盤胞期まで発生した。また、驚くべきことに、卵管移植による産仔率は 70%であり、体外受精卵とほぼ同様の割合であった(表 1)。以上のことより、二細胞期に hPa 胚と hAn 胚を融合させた二倍体胚は十分な発生能力を有することが分かった。

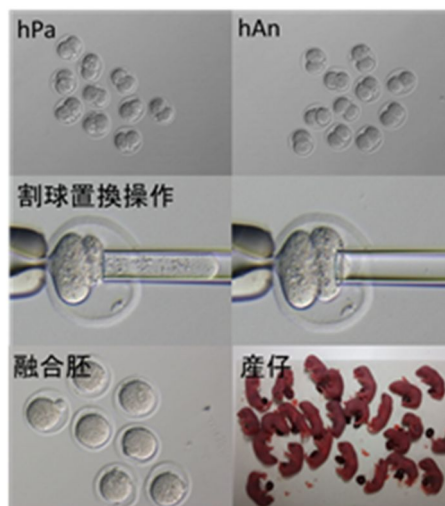


図2 細胞融合による二倍体胚構築

表 1 2Cell で融合した胚の産仔率

	No.of 2cell	Successfully separated embryos	Fused embryo	No. of ETs	No. of pups (%)	Fetus weight (g)	Placenta weight (g)
IVF	52	-	-	52	38(73)	1.48( $\pm$ 0.27)	0.09( $\pm$ 0.01)
1/2 cell	72	-	-	72	13(19)	1.69( $\pm$ 0.42)	0.12( $\pm$ 0.02)
Fusion	partheno	31	29	56	39(70)	1.59 ( $\pm$ 0.21)	0.09 ( $\pm$ 0.01)
	andro	35	29	56			

1/2 cell : 2細胞期胚の片方の割球を壊して1割球にしたもの

##### 2) 転写阻害剤による雌雄ゲノムの minor ZGA が発生に及ぼす機能差

雌雄ゲノムそれぞれの minor ZGA が発生に及ぼす影響に差があるのかを調べた。hPa 胚または hAn 胚について DRB 処理後、雌雄半数体融合胚を作製し、胚盤胞期までの発生率および移植後の産仔率を調査した。DRB 処理時間は、minor ZGA が起こる期間とされている 1 細胞期の G1 期から 2 細胞期の DNA 複製期前までの間の 16 時間とした。5-EU により新規 RNA の転写を観察すると、DRB 濃度は 100  $\mu$ M で受精卵の minor ZGA がほぼ阻害できることがわかった(図 3)。実際に半数体胚で DRB 添加後に融合胚を作製し発生を調べたところ、hPa の minor ZGA を阻害した hPa DRB + hAn 胚では胚盤胞期へと発生したが、hPa + hAnDRB 胚では胚盤胞期へと発生しなかった。minor ZGA における雌雄ゲノムの機能差が存在することが予測され、さらに雄ゲノム由来の minor ZGA が胚発生に重要である可能性が高いことが考えられた。RNA-seq による遺伝子発現調査の結果でも同様に雌雄ゲノムでの発現パターンの差がみられ、雌雄ゲノムで機能が異なる結果が裏付けられた。以上の結果について現在論文投稿中である。

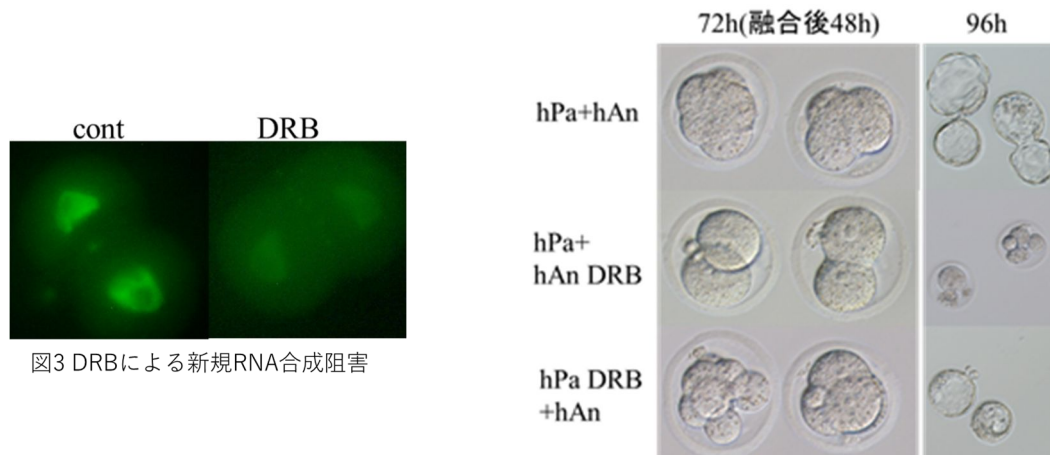


図3 DRBによる新規RNA合成阻害

図4 雌雄ゲノムの遺伝子発現抑制が発生に及ぼす影響

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimozono Keisuke, Nan Haitian, Hata Takanori, Saito Kozo, Kim Yeon-Jeong, Nagatomo Hiroaki, Ohtsuka Toshihisa, Koizumi Schuichi, Takiyama Yoshihisa	4. 巻 67
2. 論文標題 Ubp1 knock-in mice reproduced the phenotype of SPG80	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 679 ~ 686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-022-01073-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 TORIKAI Kohei, SHIMIZU Kazuma, NAGATOMO Hiroaki, KASAI Mariko, KATO-ITOH Megumi, KAMADA Yuko, SHIBASAKI Ikue, JEON Hyojung, KIKUCHI Riko, WAKAYAMA Sayaka, SUCHY Fabian, NAKAUCHI Hiromitsu, WAKAYAMA Teruhiko, MIZUTANI Eiji	4. 巻 69
2. 論文標題 Removal of sperm tail using trypsin and pre-activation of oocyte facilitates intracytoplasmic sperm injection in mice and rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 48 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2022-065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wakayama Sayaka et al.,	4. 巻 7
2. 論文標題 Evaluating the long-term effect of space radiation on the reproductive normality of mammalian sperm preserved on the International Space Station	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabg5554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abg5554	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 -
1. 著者名 Tanaka Masayoshi, Shigetomi Eiji, Parajuli Bijay, Nagatomo Hiroaki, Shinozaki Youichi, Hirayama Yuri, Saito Kozo, Kubota Yuto, Danjo Yosuke, Lee Ji Hwan, Kim Sun Kwang, Nabekura Junichi, Koizumi Schuichi	4. 巻 69
2. 論文標題 Adenosine A2B receptor down regulates metabotropic glutamate receptor 5 in astrocytes during postnatal development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2546 ~ 2558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.24006	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 -

1. 著者名 Abe Shusaku, Nagatomo Hiroaki, Sasaki Hiroyuki, Ishiuchi Takashi	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 A histone H3.3K36M mutation in mice causes an imbalance of histone modifications and defects in chondrocyte differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Epigenetics	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592294.2020.1841873	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Narita Keishi, Nagatomo Hiroaki, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Takeda Sen	4. 巻 23
2. 論文標題 Discovery of a Vertebrate-Specific Factor that Processes Flagellar Glycolytic Enolase during Motile Ciliogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100992 ~ 100992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100992	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 標智仁・兼平雅彦・神沼修・長友啓明
2. 発表標題 Development of vaginal image-based murine estrus detection system by deep learning
3. 学会等名 日本実験動物学科
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------