

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650096

研究課題名（和文）

生きたまま初期胚の染色体異数性を可視化する技術の開発

研究課題名（英文）

Visualization of chromosome aneuploidy in living embryo

研究代表者

山縣 一夫 (YAMAGATA KAZUO)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：10361312

研究成果の概要（和文）：

卵子・初期胚で生じる染色体異数性は、流産の主たる原因になるだけでなく、出生した場合はダウン症などの重大な先天性の染色体異常疾患を生じる。しかし、その発生原因については研究手法が限られていることから不明な点が多い。本研究では、胚発生に対してダメージの少ないライブセルイメージングの系を確立し、かつ細胞内の特定の染色体を可視化するプローブを開発することで、生きたまま初期胚において染色体異数性を可視化する技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：

Chromosomal aneuploidy in oocyte and early embryo is major cause of early pregnancy loss and evokes severe chromosome disorder such as Down syndrome after birth. However, the mechanisms for the chromosome abnormality were still enigmatic due to the experimental limitations inherent to the early embryo. In this study, we established a new protocol to visualize the chromosomal aneuploidy in living embryo by developing the fluorescently probe that binds to the specific chromosomes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	0	600,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	660,000	3,460,000

研究分野：ライフサイエンス

科研費の分科・細目：（申し訳ありませんが、記録がございました）

キーワード：初期胚発生、ライブセルイメージング、染色体異数性、トリソミー

1. 研究開始当初の背景

卵子で生じた染色体異数性は、発生停止や流産の原因になるだけでなく、出生に至った場合はダウン症などのトリソミー症の原因になる。特に、高齢女性の胚ではその出現頻

度が顕著に増加することが知られている。一方、近年の着床前遺伝子診断により、実に70%以上のヒト胚において染色体モザイシズム（胚の割球ごとに染色体の構成が異なるという現象）が起きていることが分かってきた。

この現象もその程度によっては胚の発生不全や流産を引き起こすと考えられている。これら染色体異常は、原理的には減数分裂や初期卵割時における染色体分配過程で生じると考えられるが、驚いたことにその原因究明に関する研究はほとんど進んでいない。その理由として、解析手法の少なさが挙げられる。初期胚はその数が限られるため、生化学的解析には向かない。その代わり固定・染色による観察に頼ってきたが、この方法では染色体分配という「動的」な現象を捉えるには不十分であり、かつ当然ながら観察後の胚はそれ以上発生することはない。これらの問題を解決すべく、申請者らは発生にダメージを与えることなく初期胚発生過程を連続的に蛍光観察できるライブセルイメージング技術の開発を行ってきた (Yamagata et al., Genesis, 2005; Yamagata et al. J Reprod Dev, 2009)。これにより初期胚発生を時空間的に捉えることが可能になっただけでなく、観察後の胚を移植することで、観察された何らかの異常が個体発生に与える影響を直接知ることができる。この技術を用いて、これまでに初期発生にけるメチル化 DNA の核内配置変化や (Yamagata et al., Dev. Biol., 2007)、顕微授精胚における染色体分配異常と流産の関係 (Yamagata et al., Hum. Reprod., 2009) を明らかにしてきた。そこで、このイメージング技術を用いて任意の染色体を観察することができれば、染色体異数性の発生現場を捉えることが可能になるだけでなく、そのような胚の遡及・予後解析により、異常の原因や発生への影響を研究できるようになるはずである。

2. 研究の目的

これまでの解析では、染色体全体、あるいはセントロメアやヘテロクロマチンなどの

染色体の特定領域を可視化することはできたが、異数性や染色体モザイシズムを検出するためにはどうしても任意の染色体のみを卵子や初期胚において特異的に可視化する必要があった。そんな折、ジンクフィンガータンパク質 (Zinc Finger Protein, ZFP) テクノロジーが開発された。この技術は、ZFP が持つ特異的な DNA シス配列に結合する性質を利用して、任意の配列に結合する ZFP を人為的にデザイン・合成するものである。そこで申請者は、染色体特異的繰り返し配列に結合する ZFP をデザインし、それと蛍光タンパク質とを融合させたプローブを使って染色体異数性の検出ができるのではないかと考えた。また、これとは別の方法も検討する。申請者はこれまでに共同研究によって特異的なヒストン修飾状況のグローバルな動的変化を生きた細胞の中で観察するシステムを構築している。ヒストンの修飾状況で染め分けられる染色体上のヘテロクロマチンなどの領域は、染色体ごとに異なっていることは古くから知られており、ギムザ染色などはその性質を利用した染色体識別法であると言える。そこで、特異的な蛍光標識ヒストン修飾抗体を細胞内に導入し、生きたままの初期胚のM期を観察することで、染色パターンの違いや大きさに基づいて染色体1本1本を見分ける方法を試みる。以上の試みで作製されたプローブを用いて、申請者がこれまでに開発してきた「発生にダメージを与えない」初期胚ライブセルイメージング技術によって減数分裂や卵割時における染色体分配を動的に観察し、異数性発生の原因解明につなげていくことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

ZFP プローブによる染色体ラベル

ジンクフィンガータンパク質 (ZFP) は DNA 配

列中の特定のシス配列に特異的に結合する性質を持ち、多くの転写因子や調節タンパク質がこのファミリーに分類される。これまで同定された多数の ZFP の構造とシス配列との関係を元にアルゴリズムを組み立て、任意の DNA 配列に結合する ZFP を人為的にデザインし、合成するのが「ZFP テクノロジー」である。そこで、本技術を提供しているシグマ社に依頼し、一部協力を得ながら作製を進める。まず、ZFP と蛍光タンパク質の融合タンパク質が実際に初期胚の中で確実にプローブとして機能し得るのかについて明らかにせねばならない。しかし、いきなり構造や配列特異性に不明な部分が多い繰り返し配列を使って ZFP プローブを作製するのはリスクが伴う。そこで、まずは FISH などによりすでにその染色体上での局在や構造が明らかになっているセントロメア領域のサテライト配列である major satellite や minor satellite、あるいは染色体上に広く分布している LINE1 や IAM などのレトロトランスポゾン由来の繰り返し配列などに対する ZFP をデザインし、プローブを作製する。

上記検討の後、いよいよ任意染色体を認識する ZFP プローブのデザインに移る。ヒト染色体においてはセントロメアやテロメア近傍に染色体特異的な繰り返し配列、あるいはマイクロサテライトの存在が知られている。実際に着床前遺伝子診断で使われる FISH プローブはそれら配列を利用している。最近になってマウスでも同様の染色体特異的繰り返し配列がいくつか報告されている。それらのうち有力な候補について ZFP をデザインする。想定通りにいけば、間期では核内に 2 つ、中期なら染色体 2 本（厳密には姉妹染色分体を含めた 4 本）がラベルされるはずである。また、特に性染色体に対する ZFP プローブの開発に重点を置く。それは、オス胚の場合シ

グナルが必ず核内に一つになるはずなので、プローブの特異性を判断するのに好都合であるという理由のほかに、性染色体の異数性がヒト胚では特に頻発しているという事由による。

蛍光標識ヒストン修飾抗体を用いた染色体ラベル

大阪大学生命機能研究科の木村宏博士は、これまでに特異的ヒストン修飾モノクローナル抗体を各種作製しており、Fab 断片にしたものに蛍光ラベルを施したものを直接細胞内へ導入することにより、生きたままグローバルなヒストン修飾変化を追跡することを可能にした。申請者は木村博士との共同研究により、この技術を初期胚に応用し、初期胚発生におけるグローバルなエピジェネティック変化を動的に捉えることに成功している (Hayashi et al. JCB, 2009, Hayashi et al. NAR, 2011)。そこで、これまでに作製した複数種の蛍光標識抗ヒストン修飾抗体に関して、初期卵割時 M 期染色体での結合性やその染色パターンなどを観察し、目的通りに染色体の識別が可能かどうかを検討する。

ライブセルイメージング

受精卵内で迅速に蛍光タンパク質を発現させるため、それをコードする mRNA を 1 細胞期にマイクロインジェクションする。その胚をこれまでに申請者が独自に構築した共焦点レーザー顕微鏡システムを用いて培養しながら観察する。本システムはニポウディスク式共焦点システムユニットを使っているため、厚みのある卵子でもその内部構造を 3 次元的に詳細に取得することができる。また、自動フィルターホイールにより複数色観察を可能にしている。さらに、自動 XY ステージを装備することで多点観察を可能にして

おり、同時に 200 個近くの胚を観察できる。その最大の特徴としては、サンプルに対してきわめて低侵襲性であり、顕微鏡上で3日間胚を培養し、計6万枚近くの蛍光写真を取得した後も移植すれば全く問題なく個体発生することを確認している(Yamagata et al., J Reprod Dev, 2009)。このシステムを用いて、マウス卵子の第1、第2減数分裂や初期卵割時の染色体分解過程を観察する。その後、卵子・初期胚で染色体異常を生じるモデルマウス胚などと比較しながら、染色体異数性の発生機序に関して新しい知見を得る。

4. 研究成果

研究目的・方法の項にも書いた通り、当初は任意の染色体を特異的に可視化するためのツールとして、デザインしたZFPドメインに蛍光タンパク質を融合するプローブを検討していた。しかし、諸般の理由によりこのZFPテクノロジーを応用することがかなわなかったため、もう一方の案である、特異的なヒストン修飾状況を生きた細胞の中で観察する技術を応用することにした。具体的には、M期染色体を特異的に認識するヒストンH3セリン10番目リン酸化抗体、さらに同じくM期染色体を特異的に認識するが、H3のリジン9番目がメチル化されたときにのみ結合する抗体をそれぞれ別の色で蛍光標識し、卵子に同時にインジェクションした。すると、未受精卵や受精卵のM期染色体において、少なくともX染色体やY染色体を識別することが可能になった。合わせて、染色した卵子を顕微鏡上でダメージなく蛍光観察し、さらに蛍光を見ながら顕微操作ができるような顕微鏡の開発を行った。これらの成果は、本研究の最終目標が近い将来に達せられる可能性を強く示していると思われる。今後は、他の染色体に関しても特異的に識別できるように、

プローブの選定、および胚に対してダメージなくさらに解像度の高い画像が取得できるような顕微鏡システムの構築を行ってゆく。

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10件)

主要論文のみ記載

- ① Yamagata K, Iwamoto D, Terashita Y, Li C, Wakayama S, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Saeki K, Wakayama T., Fluorescence cell imaging and manipulation using conventional halogen lamp microscopy., PLoS One, 7(2), 2012, E31638, (DOI: 10.1371/journal.pone.0031638).査読有
- ② Mizutani E, Yamagata K, Ono T, Akagi S, Geshi M, Wakayama T., Abnormal chromosome segregation at early cleavage is a major cause of the full-term developmental failure of mouse clones., Developmental Biology, 364(1), 2012, 56-65, (DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.01.001).査読有
- ③ Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Wakayama T, Stasevich TJ, Kainuma T, Tsurimoto T, Tachibana M, Shinkai Y, Kurumizaka H, Nozaki N, Kimura H., Tracking epigenetic histone modifications in single cells using Fab-based live endogenous modification labeling., Nucleic Acid Research, 39(15), 2011, 6475-88, (DOI: 10.1093/nar/gkr343).査読有
- ④ Yamagata K, Ueda J, Mizutani E, Saitou M, Wakayama T., Survival and death of epiblast cells during embryonic stem cell derivation revealed by long-term live-cell imaging with an Oct4 reporter system., Developmental Biology, 346, 2010, 90-101, (DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.07.021).査読有
- ⑤ Yamagata K., DNA methylation profiling using live-cell imaging, Methods, 52, 2010, 259-266, (DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.04.008).査読有

[学会発表] (計18件)

国際学会での招待講演のみ記載

- ① Yamagata K., Genetic and Epigenetic Landscape of Mouse Preimplantation Development Revealed by Live-cell Imaging., 2nd World Congress of Reproductive Biology, 2011年10月11日, オーストラリアクイーンズランド州, Cairns Convention Centre
- ② Yamagata K., Assessment of Embryo Quality by Live-cell Imaging., ESHRE Campus course at the 2nd World Congress

of Reproductive Biology, 2011年10月9日,
オーストラリアクイーンズランド州、Cairns
Convention Centre

- ③ Yamagata K., Genetic and Epigenetic Landscape of Mouse Preimplantation Development Revealed by Live-cell Imaging., CDB symposium 2011 “Epigenetic Landscape in Development and Disease”, 2011年3月14日, 兵庫県神戸市、RIKEN, Center for Developmental Biology
- ④ Yamagata K., Nuclear and Chromosomal Dynamics during Preimplantation Development Revealed by Multi-dimensional, Long-term Live-cell Imaging., International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities, 2011年1月25日, 淡路市淡路夢舞台国際会議場
- ⑤ Yamagata K., A novel approach based on the live-cell imaging which allows the identification of defective embryos in mouse ART., International Symposium for Immunology of Reproduction, 2010年8月29日, 大阪府吹田市大阪大学
- ⑥ Yamagata K., Assessment of Embryo Quality by Live-cell Imaging., The Third World Congress on Mild Approaches in Assisted Reproduction, 2010年7月30日, 横浜市パシフィコ横浜

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：顕微鏡および光透過ユニット
発明者：若山照彦、山縣一夫、今井雄一郎、
田村恵裕
権利者：独立行政法人理化学研究所、オリン
パス株式会社
種類：特願
番号：2011-286996
出願年月日：2011年12月27日
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山縣 一夫 (YAMAGATA KAZUO)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：10361312

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：