

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34504

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25560212

研究課題名(和文) ラマン分光法を用いた“受精卵の質”の判別

研究課題名(英文) Discrimination of embryonic quality using Raman spectroscopy

研究代表者

石垣 美歌 (Ishigaki, Mika)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：60610871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胚の発生に伴う卵内物質の変化及び卵質の評価を、ラマン分光法を用いて実施した。まず発生に伴って、タンパク質の2次構造がヘリックスからシートへ変化し、それに伴うチロシン/アラニン比の変化も検出された。また、受精後に一時的にタンパク質の濃度が上昇することを示唆する結果も得られた。そしてこれらの変化は2細胞期の前後で異なるふるまいを示しており、2細胞期前後で卵内物質が母性由来から胚由来へと移行するという他者の先行研究結果と一致している。さらに卵質に関しては、形態学的に不良胚と判断される胚では、脂質、ハイドロキシアパタイトの相対濃度が良質胚に高くなっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I explored the development of mouse embryo and its quality based on molecular information, obtained nondestructively using Raman spectroscopy. The detailed analysis of Raman spectra measured in situ during embryonic development revealed a temporary increase in protein content after fertilization. Proteins with a beta-sheet structure present in the early stages of embryonic development are derived from maternal oocytes, while alpha-helical proteins are additionally generated by switching on a gene after fertilization. The transition from maternal to embryonic control during development can be non-destructively profiled, thus facilitating the in situ assessment of structural changes and component variation in proteins generated by metabolic activity. Furthermore, it was indicated that embryos with low-grade morphology had high concentrations of lipids and hydroxyapatite.

研究分野：分子分光学

キーワード：ラマン分光法 マウス胚 卵質

1. 研究開始当初の背景

体外受精とは不妊治療の1つであり、通常は体内で行われる受精を体外で行う方法である。体外受精の成功率は“受精卵の質”に依ると言われており、“受精卵の質”は卵割の速度と形態学で評価されている。しかし1回当たりの体外受精の成功率は30%程度であり、成功率の更なる上昇のために“受精卵の質”の新たな評価方法が模索されている。例えば、ピルビン酸の摂取量とヒト胚の生存率との関係を調べた研究や、高いグレード胚はグルコース摂取量が多いことなどを示す結果が得られているが、現在の評価方法に取って替わる、或いは補助できる新たな評価技術は開発されていない。体外受精の成功率を上げるためには、より生存率の高い受精卵を選別する必要があり、最良胚を特定する新たな技術の開発は必須であると考えられる。

光学計測の一種であるラマン分光法とは、物質に光を照射し、光子が物質に含まれる分子の振動遷移に相当するエネルギーを交換することで、照射光の波長とは異なる波長を持つ散乱光(ラマン散乱光)を観測する手法である。ラマン散乱光は物質を構成する分子レベルの構造の違いを反映するため、生体から非侵襲的に生体内分子構造の情報を取得することが出来る。そのため、受精卵からラマンシグナルを取得することで、非侵襲的に“受精卵の質”を判別することができると考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ラマン分光法によって非侵襲的にマウス受精卵の分子組成の情報を取得し、科学的データに基づいてより生存率の高い受精卵を選別する技術の開発を行うことを目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

受精卵発生過程及び卵質をラマン分光法でモニタリング・評価するにあたり、ICR系統マウスの未受精卵・前核期・2細胞期・4細胞期・8細胞期の卵からラマンスペクトルを取得し、発生過程に伴う分子組成変化の分析と、形態学的特徴から判断される受精卵の質とラマンスペクトルとの関係を解析した。測定にはCO₂インキュベータ搭載の顕微ラマンシステム(Nanofinder, 東京インストルメンツ)を用い、温度37℃、CO₂5%に設定してラマン測定を行った(図1)。

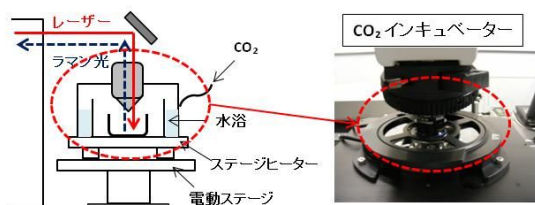


図1: 顕微ラマンシステム。

4. 研究成果

研究結果

まず、各卵割段階のデータセットに対して主成分分析(PCA)を行ったところ、形態学的に良質胚・不良胚と判断されるマウス胚(図2A)がPC1成分によって2つのグループに分けられた。PC1のローディングプロットには脂質とヒドロキシアパタイトのバンドが表れており、これらの成分で両者を分けることができた。また、全発生段階のデータセットに対してPCA解析を行ったところ、同様に形態学的特徴によって2つのグループに分けることができた(図2B)。そして上記同様、脂質・ヒドロキシアパタイトの濃度が不良胚で高くなっていることが示された。さらに、発生段階の違いによる分子組成の違いよりも、形態学的特徴による成分の違いの方が大きいことも示唆された。脂質は一般に、胚発生のエネルギー源と考えられており、これらの成分は代謝によって消費されるものであると考えられる。しかし卵質の低い胚においては、胚の代謝が異常を示し、これらの成分が適切に消費されていない可能性がある。また、細胞死に伴い、ヒドロキシアパタイトの成分が高くなること他の先行研究によって示されている。不良胚において本成分濃度が高くなっている可能性が、ラマン分光法によって示唆された。

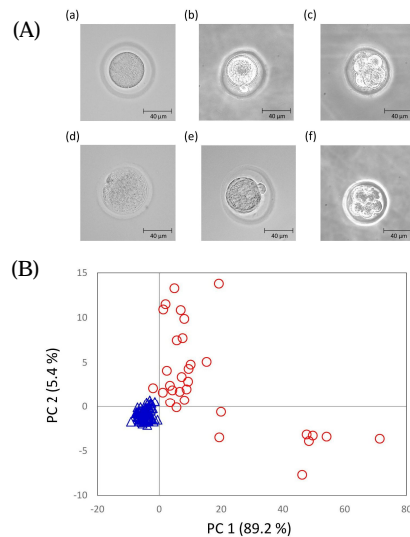


図2: (A) マウス胚の可視画像。(a)-(c): 良質胚, (d)-(f): 不良胚。(B) 主成分分析(PCA)のスコアプロット。

次に、良質胚にグループ化されたデータセットのみを抽出し、再度PCA解析を行ったところ、各卵割段階のデータセットがグループ化され、PC1スコアが周期的に変化する様子が観測された。PC1のローディングには脂質のバンドが観測され、受精後の前核期、及び2細胞期にかけてタンパク質が急激に増加する現象により、相対的に脂質の成分が一時的に減少する様子が捉えられた。さらにPC2の成分では、未受精卵・受精卵の2つの大きなグループに分けられ(図3A)、PC2のローディ

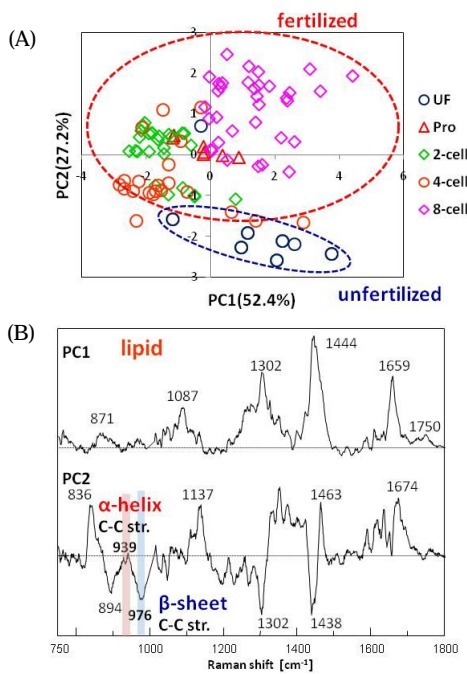


図3: 主成分分析 (PCA) の解析結果。(A) スコアプロット, (B) ローディングプロット。

ングには、タンパク質の2次構造変化を示唆する α ヘリックス、 β シート構造由来のバンドが観測された(図3B)。

タンパク質の2次構造変化をさらに詳細に検証するため、 $910\text{--}980\text{ cm}^{-1}$ のスペクトルの2次微分を計算し、ヘリックスとシートからくるラマンバンドへの分解とピーク位置の特定を行った(図4)。その結果、受精後シートのバンド強度が小さくなり、一方ヘリックスのバンド強度が強くなっていることが分かった。つまり、受精卵の発生に伴ってヘリックス2次構造の割合が多くなっていることが示唆された。

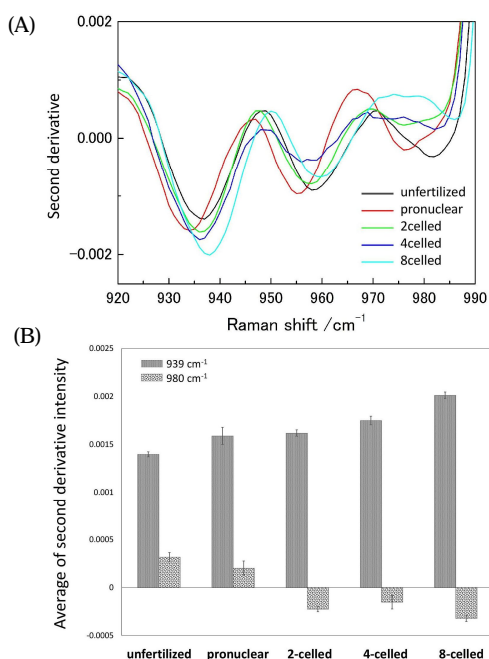


図4: (A) 2次微分スペクトル, (B) 939 cm^{-1} の2次微分バンド強度の絶対値。

さらに、チロシンダブレットの強度比 ($850/830\text{ cm}^{-1}$) を各卵割段階で計算したところ、初めにOH基が強い水素結合をしていたものが、受精後一旦イオン状態を経由し、再び強い水素結合をしていることを示唆する結果が得られた。この水素結合状態の変化は、上記のタンパク質の2次構造変化と連動しており、2細胞付近で変化が観測された。これらタンパク質の濃度及び構造変化に関する一連の結果は、2次元電気泳動法を用いた他の先行研究によって示されている、2細胞期付近でのタンパク質生成量の増加の結果と一致しているものと考えられる。

以上のように、マウス胚の生きた状態でのラマンスペクトルの取得に成功し、卵質及び発生に伴う卵内物質の変化をモニタリングすることができた。

国内外における位置付けとインパクト

本研究は、ラマン分光法を用いて生きたままのマウス胚からラマンスペクトルを取得し、分子レベルで非破壊に発生過程及び卵質を評価した世界で初めての研究である。現在までに他の研究グループによってラマンイメージングを用いたマウス胚の解析は行われているが、イメージング測定には非常に長い測定時間を要するため、胚を固定しての測定・分析であるが、ポイント測定で生きたままの胚を分析した点が、まず本研究の新規性である。ポイント測定には場所依存性の問題が生じるが、スペクトルの場所依存性による違いと、卵質及び発生段階に伴うスペクトル変化とを比較し、場所依存性に伴う不定性を超えてポイント測定で卵質及びは生段階を議論できることを数学的に証明した。このことにより、今後のラマン分光法を用いた卵質評価において、ポイント測定が可能であることを示すことができ、レーザーによる侵襲性の問題に解決策を見出すことに成功したことは、本研究の新規性であり、独創性であるといえることができる。

本研究結果は、Scientific Reports に掲載された。学会発表等では多くの方から質問を受け、また議論する機会が与えられ、多くの反響を得ることができた。実際に、畜産学が専門の先生と、共同研究を展開することができる運びとなり、不妊治療及び畜産学の研究分野においてインパクトのある研究を実施することができた。

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 1件)

1. Mika Ishigaki, Kosuke Hashimoto, Hidetoshi Sato, Yukihiko Ozaki, "Non-destructive monitoring of mouse embryo development and its qualitative evaluation at the molecular level using

Raman spectroscopy”, Scientific Reports, 7:43942, 2017, DOI: 10.1038/srep43942, 査読あり。

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Mika Ishigaki, Kosuke Hashimoto, Hidetoshi Sato, Yukihiro Ozaki, “Non-destructive monitoring of mouse embryo development and its qualitative evaluation at the molecular level using Raman spectroscopy”, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium (招待講演) (国際学会), 2016年12月4日~2016年12月7日, 淡路国際会議場(兵庫県・淡路市)
2. 石垣美歌, 橋本剛佑, 尾崎幸洋, 佐藤英俊, “ラマン分光法を用いたマウス受精卵発生過程モニタリングと卵質評価”, 分子科学討論会, 2016年9月13日~2016年9月15日, 神戸ファッションマート(兵庫県・神戸市)
3. 石垣美歌, 橋本剛佑, 尾崎幸洋, 佐藤英俊, “ラマン分光法を用いたマウス受精卵発生過程のモニタリング”, 分析化学討論会, 2016年5月28日~2016年5月29日, 岐阜薬科大学・岐阜大学(岐阜県・岐阜市)
4. Mika Ishigaki, Kosuke Hashimoto, Naoya Ogawa, Kana Morimoto, Yukihiro Ozaki, Hidetoshi Sato, “Study of mouse embryo by Raman spectroscopy”, Pacificchem 2015, 2015年12月15日~2015年12月20日, ホノルル(USA)(国際学会).
5. 石垣美歌, 橋本剛佑, 森本佳奈, 小川尚也, 尾崎幸洋, 佐藤英俊, “Analysis of mouse embryo by Raman spectroscopy”, 第53回日本生物物理学会年会, 2016年5月28日~2016年5月29日, 金沢大学(石川県・金沢市)(招待講演).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織
(1)研究代表者
石垣 美歌 (ISHIGAKI, Mika)
関西学院大学・理工学部・助教
研究者番号: 60610871

(4)研究協力者
尾崎 幸洋 (OZAKI, Yukihiro)
佐藤 英俊 (SATO, Hidetoshi)
橋本 剛佑 (HASHIMOTO, Kosuke)