

## 背景

少子高齢化の進む日本において、人口の増加は必須の課題であり、その対策として不妊治療は人口増加に非常に重要な役割を担っている。不妊治療では採卵した平均6～10個の卵子と精子から胚を作製するが、全てが発生し子どもへ至る訳ではない。不妊治療では、受精卵を胚盤胞期まで培養した後、子どもが生まれやすい胚(良好胚)と判別された胚が移植される。しかしながら、胚の完全な選別方法は確立しておらず、担当の胚培養士が形態的な指標を元に良好な受精胚を1つ(最大でも2つ)選別し女性の胎内に移植することになる。確実に良好胚を選別することは非常に難しく、体外受精においてもその妊娠率は約3割に留まっている。結果として不妊治療に取り組む患者は何度も治療を繰り返す事となり、経済的にも肉体的にも大きな負担を強いられることとなる。そのため、多くの人々が安心して不妊治療に取り組むことが出来るようにするためには、胚へのダメージがなく良好受精胚を確実に選別出来るようにし、極力少ない回数で治療を終えることが出来るようにすることが必須である。そのためには、どのような性質を持つ受精卵が良好胚なのか、を解明する必要がある。

現在、胚の個体形成能を判定する手段として同研究室では **zFRAP 法**(zygotic fluorescence recovery after photobleaching)という手法が開発されている(Fig. 1)。この手法は、DNA が巻きついているタンパク質(ヒストン)に蛍光ラベリングを行い(Fig. 1 a)、一部分に強い光を当て褪色させる(Fig. 1 b)。その後、褪色部の蛍光の回復(Fig. 1, c)を観察、褪色から回復した割合を計測し、その比率を算出することでヒストンの入れ替わり(mobile fraction: MF)を測定し受精卵の前核中の **DNA の緩み**を調べる手法である。これまでの研究から、受精後、卵子と精子それぞれから持ち込まれたゲノムは前核を形成する。卵子と精子それぞれに由来する前核の MF の比を解析し、その後胚発生を観察すると、MF が一定の値の胚は他の値の胚と比較し胚発生が良好であることが報告されている(大我, 2019 年度 山梨県若手研究者奨励事業成果報告書)。この結果から、DNA の

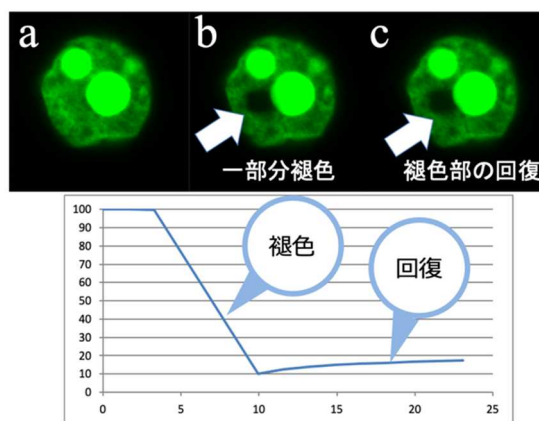


Fig. 1 zFRAP 法概要

構造と発生能に相関があるのではないかと推測している。MF を測定する際、ヒストンの蛍光を退色させるために当てる強い光が受精卵に負担となり、未処理の胚と比較するとその産仔率は減少してしまう(Ooga and Wakayama, 2017)。そこで注目したのがDNA の揺れ(Fig. 2)である。

生命活動に必要不可欠な遺伝子発現は、DNA の情報を写しとる転写からはじまる。DNA は細胞核内で折り畳まれ小さな粒状のドメイン(以下ドメイン)を形成しており、培養細胞におい

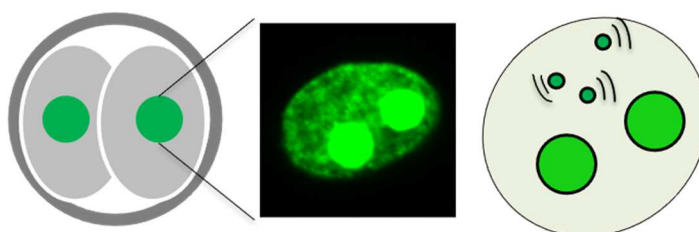


Fig. 2 DNA/ヒストンのドメインの揺れ

て、このドメインは揺れ動いて存在していることが知られている。ドメインの揺れの程度により、DNA が締まっている(MF が小さい)と揺れも小さい、といったように核内の状態に影響され、また揺れの大小によりタンパク質との接触の頻度が決まり、遺伝子発現の起こりやすさが決まる(Nozaki *et al.*, 2017)とされるため、生命活動においてドメインの揺れは重要な要素の一つである。また、化学薬剤を用いることでDNA の構造を変化させることでDNA の揺れの程度を人為的に改変することも可能である(Nozaki *et al.*, 2017)。さらに、揺れの解析にはFRAPのような強い光を当てる褪色処理がなく細胞への負荷も少ないため、DNA の揺れを解析することで核の特性を動的に評価する研究が培養細胞では盛んに行われている。しかし、受精卵についてDNA の揺れを評価する研究はこれまで行われていない。先述の通り、DNA の緩さ(MF の大小)は揺れに関連する一要因であり、MF と胚発生に相関があることが示唆されている。そこで、受精卵においてもMF とドメインの揺れに相関があれば、FRAP よりも負荷の少ない胚発生前予測法として使えるのではないかと考え、DNA の揺れ解析技術の開発及びMF と揺れの関係性の解析を行なった。

本研究ではまず、実験系の確立を行った。これまで培養細胞を用いた先行研究において、蛍光ラベリング dNTP をDNA 複製期の細胞に注入すると、核内DNA に取り込ませることが出来、生きたままDNA の揺れを捉えることができることが報告されている。また、核内でDNA はヒストンに巻きつきヌクレオソームを形成し存在しており、このヒストンを可視化し動きを計測することによっても細胞の特性を解析することが可能であることが報告されている(Nozaki *et al.*, 2017)。本研究では、DNA の揺れを計測するため、蛍光ラベリング dNTP によるDNA 本体の揺れ、及びヒストンの揺れの解析を試みた。

## 方法

SLC より購入した 8 週齢以上の B6D2F1 (C57BL/6 × DBA2; 以下 BDF1 と記載)雌マウス(第 1 章及び第 2 章)及び発生工学研究センター内で自家繁殖を行った ICR 雌雄マウスを使用し体外受精卵(in vitro fertilization; IVF 胚)を作製した。

IVF 胚を作製後、DNA 可視化のため蛍光ラベリング DNA(Cy3-dCTP, Fluorescein-dUTP)を前核が形成される媒精後 3 時間時点、及び前核形成が終わり 1 細胞期での解析を行う直前での細胞質中または前核内に注入し、DNA の可視化を試みた。次に、ヒストン可視化のためヒストン H2B に蛍光タンパク質(eGFP,mCherry)を融合させた mRNA、またヒストン H2B に低分子リガンド Halo-Tag を付与した mRNA をそれぞれ媒精後 3 時間マイクロインジェクションしヒストンの可視化を試みた。その後、DNA の粒状ドメインを追跡出来る撮影条件及び解析法(以下 motion 解析)の確立を行った。

次に、確立した motion 解析を用いて①IVF 胚の胚発生段階毎の揺れ、②BDF1 及び ICR 系統由来 IVF 胚の 2 細胞期での揺れの解析を行った。

また、①媒精後 8 時間後に zFRAP 解析を行い、媒精 26-30 時間時点で motion 解析しその後個別に培養し媒精後 120 時間まで胚発生観察、②媒精 26-30 時間時点で zFRAP 解析及び motion 解析、③揺れの人為的変動のため媒精後 24 時間まで 0.1% DMSO 処理、50 nM TSA 処理をそれぞれ行った胚の motion 解析を行なった。

## 結果

### 第 1 章. 受精卵の核内 DNA の揺れを測定する技術の開発

揺れを測定するにあたり、DNA または DNA が巻きついているタンパク質(ヒストン)の揺れの速度を検出する技術を開発した。第一に DNA 及びヒストンの可視化を試みた。次に、eGFP-H2B が DNA の揺れの可視化に最適であると判明したため、eGFP-H2B を用いドメインを鮮明に観察出来る最適条件の検討を行なった。

#### 1. 解析機器の決定及び撮影法の選定

DNA の揺れを解析するためには、高倍率の連続画像を鮮明に、且つ極力短い時間のうちに撮影する必要がある。そこで、核を拡大して撮影できる高倍率を有し、且つ連続画像の撮影できる解析機器の中でどの機器が揺れの解析に適しているか決定するため、共焦点レーザー顕微鏡 FV1200(Fig. 3 a, olympus), 共焦点スキャナユニット CSU(Fig. 3 b, 横河電機)を用い、検討を行なった。画像は各機器で核が鮮明に撮影できる最大の倍率で撮影した画像である。検討の結果、FV1200 を使用し、

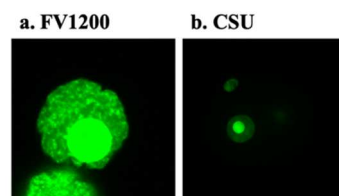


Fig. 3 解析機器の検討

倍率 420 倍, 撮影条件: 4.0 us/pix での撮影が核内の様相を鮮明にかつ短時間で撮影する方法であると確定し、以降は FV1200 で同設定のもと解析を行なった。

## 2. DNA 可視化の試み (Cy3-dCTP, Fluorescein-dUTP)

蛍光ラベリングされた DNA(Cy3-dCTP, fluorescein-dUTP)を用い DNA の可視化を試みた。Fluorescein-dUTP は現状どのような条件で細胞内に注入しても蛍光を得ることは出来なかった(data not shown)。一方、Cy3-dCTP は受精後 3 時間時点でマイクロインジェクションした場合(早期注入)には蛍光は得られなかったが、受精後 7 時間でマイクロインジェクションした場合(後期注入)には核内で蛍光を観察することが出来た(Fig. 4)。しかし、核内と同時に細胞質についても蛍光が強く確認され motion 解析が困難であることから、核内への直接注入も試みた。すると、細胞質内の蛍光は軽減されたが、核内 DNA の鮮明なドメイン及びその揺れ動きは確認出来なかった。蛍光ラベリング DNA では、受精卵 DNA の motion 解析には適していないことが確認されたため、ヒストンの可視化により核内 DNA の揺れの捕捉を試みた。

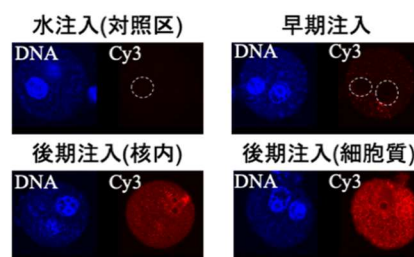


Fig. 4 蛍光ラベリング DNA による DNA 可視化の試み

## 3. ヒストンの可視化の試み (eGFP, mCherry, Halo-Tag)

eGFP-H2B(緑), mCherry-H2B(赤)及び低分子リガンドと蛍光によりヒストンを可視化できる Halo-Tag H2B(以下 HT-H2B)の mRNA を受精卵細胞質にそれぞれマイクロインジェクションを行い、ヒストンの可視化を試みた(Fig. 5)。これらの mRNA を注入後、核内の蛍光を共焦点顕微鏡で確認すると、eGFP-H2B mRNA を注入した受精卵の核では、ヒストンのドメインを鮮明に確認することが出来た。一方、mCherry-H2B mRNA を注入した受精卵では、核内の赤色蛍光は確認出来たが、核質全体的に平滑な蛍光となっており、ドメインを観察することが出来なかった。HT-H2B mRNA を注入した受精卵においては核質部分で蛍光を確認出来たが、ドメインは解析に十分な傾向は検出出来ず、motion 解析には適していなかった。この結果から、以下の実験においては motion 解析には eGFP-H2B を用いて実験を行った。

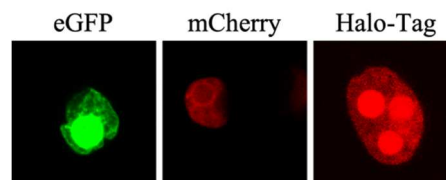


Fig. 5 蛍光タンパク及び低分子リガンドによるヒストン可視化の試み

## 4. ドメインの揺れを見るための eGFP-H2B の最適濃度検討



motion 解析を行う際に最も大切な要素は、解析を行うヒストンのドメインの鮮明さである。そこで、次に eGFP-H2B によるドメインが最も鮮明に観察できるようにするため、eGFP-H2B の注入濃度の検討を行なった。eGFP-H2B は、500 ng/μL で処理すると受精卵への毒性があることが知られている(Ooga and Wakayama, 2017)そこで、mRNA 注入濃度を 5, 25, 50, 125, 250 ng/μL で検討した(Fig. 6)。すると、図のように eGFP-H2B の濃度が 25 ng/μL 以下では核内ヒストンの粒状ドメインはほとんど確認することが出来なかった。50 ng/μL 以上においては 2 細胞期以降の核内でドメインを確認出来、250 ng/μL で最も鮮明にドメインを確認することが出来た。そのため、以降の実験では eGFP-H2B の mRNA を 250 ng/μL の濃度で受精卵内に注入し、ヒストンの可視化を行なった。

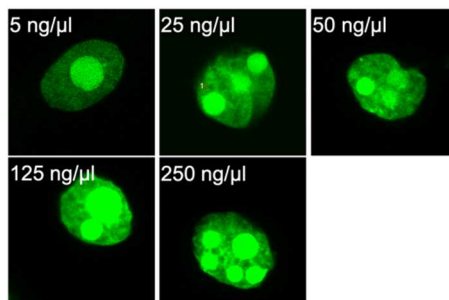


Fig. 6 eGFP-H2B mRNA の注入濃度検討

## 5. 画像解析ソフトを用いた解析法の確立

第 1 章-4 にてヒストンの可視化及び撮影法を決定したため、最後に解析手法の確立を行なった。画像解析ソフトウェア Fiji を使用し、motion 解析を行なった。eGFP-H2B でヒストンの可視化を行な

った受精卵の連続画像(Fig. 7, a)に対し、ヒストンの motion 解析の妨げとなる、核小体部分及び背景を画像処理によって除去した(Fig. 7, b)。その後、Fiji に搭載されている trackmate(粒子追跡用 Plugin)を使用し 1 μm 以下の点を捕捉(Fig. 7, c)(紫の丸がドメイン捕捉箇所)、1 μm 以下の移動を追跡する設定にすることでドメインを追跡(Fig. 7, d)を行なった。追跡処理後、核内のドメインの移動の速度[μm/s]の定量化解析を行なった(Fig. 7, e)。

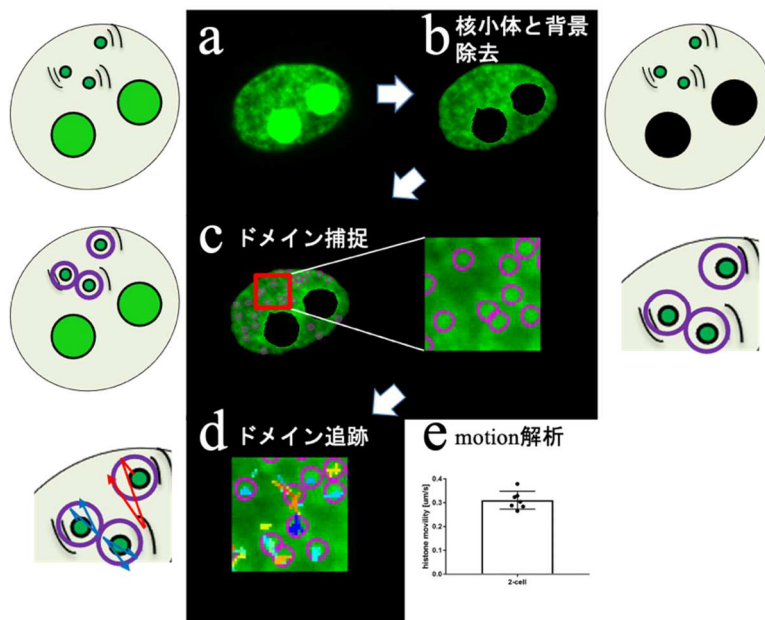


Fig. 7 ヒストン粒状ドメインの揺れの追跡概要

## 第 2 章. ドメインの揺れを用いた胚の特性の解析

## 1. motion 解析の胚発生への負荷の検証

motion 解析を受精卵に適用する際、受精卵に対して負荷のかかる解析法であった場合、受精卵のありのままの特性を解析しているとは言えない。しかし、motion 解析は zFRAP 法のような強い光を使用した褪色処理を行っていないため zFRAP 法のような胚発生に対する負荷がないことが考えられる。そこで、motion 解析が胚発生に対しほとんど負荷のない解析法であることを確認するため、未処理の体外受精(IVF)胚、eGFP-H2B を注入した IVF 胚、motion 解析及び FRAP 解析を行なった IVF 胚をそれぞれ作製し、胚盤胞期までの胚発生率を確認した(Fig. 8 及び

Table. 1)。本実験では、ドメインが核で安定して観察できるのが 2 細胞期以降であることから、2 細胞期で motion 解析を行い以降の胚発生率を確認している。未処理の IVF 胚と比較し、eGFP-H2B 注入した胚では若干胚発生率が減少する傾向が見られるが、有意な差は見られなかった。Motion 解析を行なった区、FRAP 解析を行なった区に関しても、他の区と有意な差はなかった。よって、motion 解析は着床前初期胚にとって無害な解析法であることが確認された。



Fig. 8 motion 解析後の胚盤胞期胚 (120 hpi)

Table. 1 motion 解析による胚発生への負荷の評価

	2 細胞期	4 細胞期 (%)*	桑実期 (%)*	胚盤胞期 (%)*
対照区(注入無し)	28	27 (96.43)	27 (96.43)	27 (96.43)
eGFP-H2B注入のみ	16	14 (87.50)	14 (87.50)	14 (87.50)
Motion解析	20	19 (95.00)	19 (95.00)	17 (85.00)
FRAP解析	20	18 (90.00)	18 (90.00)	18 (90.00)

\*: 2 細胞期胚に対する割合

## 2. 胚発生に伴うドメインの揺れの変化

FRAP 法を使用した先行研究から、胚発生が進行すると、MF が低下することが報告されている(Ooga *et al.*, 2016)。そこで、IVF 胚を 2 細胞期以降の各発生段階(2 細胞期 [媒精開始後 26-30 時間(26-30 hpi)], 4 細胞期[48 hpi]、桑実期[72 hpi]、胚盤胞期[96 hpi]) で motion 解析を行った(Fig. 9, 左)。

結果、2 細胞期胚と 4 細胞期胚の揺れには差は見られなかったが、桑実期胚では有意な揺れの低減が見られた。また、胚発生進行に伴う揺れの低減は FRAP 法による解析と同じ傾向を示した(Fig. 9, 右)。胚盤胞期で

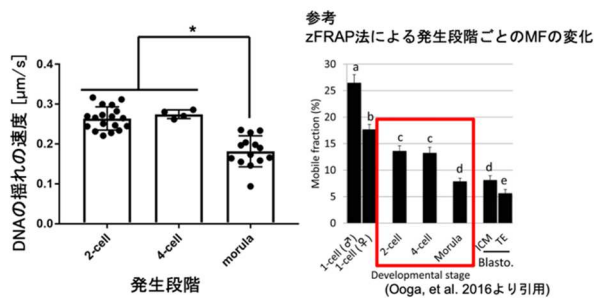


Fig. 9 胚発生段階と DNA の揺れの関係

はドメインを計測することが出来なかった。

胚にとっては体外での培養自体が大きな負荷となる。motion 解析を早い発生ステージで行うことが出来ると、その分早く母体に移植することが可能になり、胚への負荷が軽減される。また、2細胞期胚であれば核は2つでありその全てを解析することが可能だが、4細胞期胚や桑実期胚では全ての核で motion 解析を行うことは難しく、主観に基づき 1-2 つの核を選択し解析することとなる。その場合、胚の特性を解析結果に完全に反映することは難しいため、ため以降の実験では motion 解析を 2細胞期の胚に対して行うこととした。

### 3. マウス系統による核内の DNA の揺れの差

動物実験に使用されるマウスには様々な系統がある。交雑種(雑種)系統のマウスは、近交系やクローズドコロニーと呼ばれる系統のマウスと比較し体外培養に対する耐性が高いことが知られる。また、当研究室での研究から、雑種(BDF1 系統)と近交系(B6 系統)、クローズドコロニー(ICR 系統)の系統間で 1細胞期の MF に差があることが報告されている(大我, 2019 年度山梨県若手研究者奨励事業成果報告書)。2細胞期のドメインの揺れにも系統間で差が見られるか、また差があればその差は体外培養耐性と相関が見られるのか検証するため、BDF1 と ICR それぞれの系統の卵子を使用し受精卵を作製、motion 解析を行なった(Fig. 10)。先行研究と同様に精子はどちらも ICR 系統のものを使用している。結果、BDF1 系統マウスよりも ICR 系統マウスの方が高かった。今回は BDF1, ICR と 2系統間での比較であるため、近交系 B6 系統など、他系統由来の受精卵においても解析を行い、系統間の揺れの差が胚発生に関係するのか、今後検証を行う。

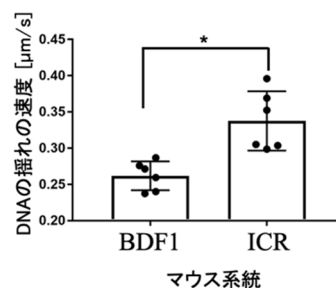


Fig. 10 マウス系統間の DNA の揺れの比較

## 第 3 章. motion 解析技術の応用

第 2 章で確立した motion 解析を用いて、どのような胚が良好胚であるのか解析を行った。最終目標は、正常に個体へ至る胚の特性を知ることであるが、その前段階として正常に胚盤胞期胚まで胚発生する胚の特性について解析を行なった。

### 1. 1細胞期時の MF と 2細胞期時のドメインの揺れの関連性

現在、当研究室の先行研究から1細胞期時点でzFRAP法を行いMFを解析しその後の胚発生を追跡すると、一定のMF値を取る胚は特に発生良好であることを報告している(大我, 2019年度 山梨県若手研究者奨励事業 成果報告書)。1細胞期時点でのMFと2細胞期でのドメインの揺れに何らかの相関があれば、1細胞期で胚にとって負荷の大きなzFRAPを行うことなく2細胞期での低侵襲的なmotion解析だけで胚選別が可能ではないかと考えた。そこで本実験では、1細胞期胚でzFRAPを行った後、2細胞期胚でmotion解析を行ない、1細胞期のMFと2細胞期のドメインの揺れの相関を調べた(Fig. 11)。その後個々の胚を個別に培養を行なった。グラフ中に赤色で示した点は発生停止を起こした胚である。結果、現状では1細胞期のDNAの揺れと2細胞期でのDNAの緩みの間に相関は確認出来なかった(相関係数  $r=-0.381746$ )。そのため、今後ドメインの揺れと発生率の関連を追跡を行うことで、良好受精卵のドメインの揺れの関連を探る。また、今回は2細胞期胚でmotion解析を行なったが、今後は胚発生に必須な細胞極性の偏りが出現し始める4細胞期胚、胎児になる細胞がより厳密に決定される桑実期胚など、より後期の発生段階の胚で解析を行うことで、胚発生とドメインの揺れの関係を探る。

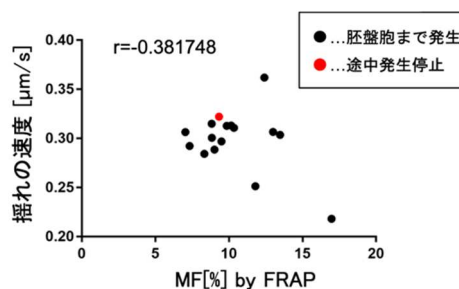


Fig. 11 1-cell zFRAP, 2-cell motion 解析による発生能予測の試み

## 2. 2細胞期胚のドメインの揺れとMFの関係

1の実験で、1細胞期胚のMFと2細胞期胚のドメインの揺れには相関は見られなかった。2細胞期胚時点で核内のドメインの揺れとMFを解析した時、ドメインの揺れとMFに相関は見られるだろうか。2細胞期時点でmotion解析とzFRAP法を行い、MFとドメインの揺れの解析を行った(Fig. 12)。結果として、MFとドメインの揺れに関して相関は見られなかった(相関係数  $r=-0.277876$ )。これがmotion解析時のドメインの揺れの解析不備によるものか、受精卵では必ずしもMFと揺れが相関を示すわけではないためであるのか、今後検証を行う必要がある。そこで、次に培養細胞でドメインの揺れを活性化することが報告されているトリコスタチンA(TSA)を受精卵に処理し、影響が見られるか検証した。

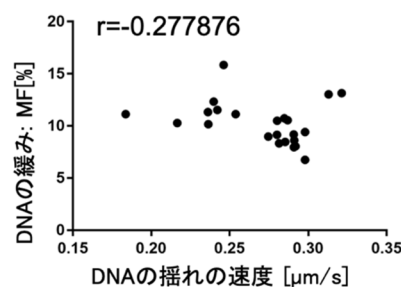


Fig. 12 2細胞期胚におけるzFRAP, motion 解析結果

## 3. TSA 処理によるドメインの揺れに対する影響の検証



ドメインの揺れ解析が正常に行われていることを確認するため、これまで培養細胞で揺れへの影響が報告されている TSA を受精卵に処理し motion 解析を行なった。培養細胞を使用した過去の研究から、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)の一種であるトリコスタチン A(TSA)を細胞に処理することで核内の DNA の揺れを上昇することが報告されている(Nozaki *et al.*, 2017)。そこで、通常の IVF 胚(未処理), TSA の溶媒である DMSO のみを処理した IVF 胚(DMSO), 受精卵に 50 nM の TSA 処理を行なった IVF 胚(TSA)

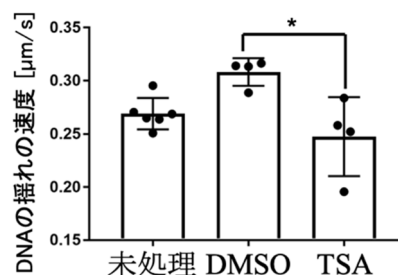


Fig. 13 TSA 処理による DNA の揺れの変化

の三種類の胚を作製し、motion 解析を行った(Fig. 13)。結果、今回の実験では TSA 処理することにより、DMSO 区と比較しドメインの揺れの低減が見られた。本実験では、受精卵への影響を考慮し TSA を 50 nM の濃度で使用したが、先行研究では培養細胞に 500 nM の濃度で処理しており、今後はより高濃度で TSA 処理した際のドメインの揺れの解析を行う。さらに、揺れに影響を及ぼすことが知られるポリメラーゼ阻害剤や DNA メチル基転移酵素阻害剤を受精卵に処理した際に揺れに影響が見られるか検証する計画である。

## 今後の展望

ここまでの研究で、ヒストンのドメインの揺れを解析する解析手法の開発を行なった。しかし、MF と揺れの間に関係が見られなかったことから、適切にドメインの揺れを検出しているのか今後検証する必要がある。そのため、今後①解析プログラムの細部の見直し、②ドメインの揺れに影響を及ぼすことが知られるポリメラーゼ阻害剤や DNA メチル基転移酵素阻害剤を受精卵に処理した際に揺れに影響が見られるか、③今回はヒストンのドメインの揺れを解析したが、DNA の可視化をより詳細に検討し DNA の揺れの解析を試みる、などを計画している。

また、motion 解析が適切に行われていることを確認した後、本解析手法を用いることにより①胚盤胞まで至ることのできる胚の特性、②赤ちゃんに至ることの出来る胚の特性を段階的に求めていく計画である。今回は 2 細胞期胚を用いて発生能予測を試みたが、今後は他の段階の胚も対象に解析を行う。特に、4 細胞期胚は胚発生に必須の細胞極性の偏りが観測され始める時期であり、正常な胚盤胞に至る胚と至らない胚とで DNA の様相が違うことが期待される。

また、現在は IVF 胚に対してのみドメインの揺れの解析を行なっているが、体外成熟胚や顕微授精胚など IVF 胚以外に対してもこの解析を行い、ドメインの揺れと胚発生に相関が見られるか検証する。

さらに、本手法の開発により、受精卵中の分子の動きを簡便に直接捉えることが可能となった。この手法を応用することで、受精卵の分子的な異常を直接捉えることが可能となり、若山研究室で行われている[凍結乾燥精子を使った受精卵の異常解明]など様々な研究に応用可能であると考えている。本研究で開発した手法を様々な研究へ応用出来るよう、本技術を適切に行うことのできる環境構築を行っていきたいと考えている。

## 引用

- Nozaki T, Imai R, Tanbo M, Nagashima R, Tamura S, Tani T, Joti Y, Tomita M, Hibino K, Kanemaki MT, *et al.* Dynamic Organization of Chromatin Domains Revealed by Super-Resolution Live-Cell Imaging. *Mol Cell* 2017;**67**:282-293.e7.
- Ooga M, Fulka H, Hashimoto S, Suzuki MG, Aoki F. Analysis of chromatin structure in mouse preimplantation embryos by fluorescent recovery after photobleaching. *Epigenetics* 2016;**11**:85–94.
- Ooga M, Wakayama T. FRAP analysis of chromatin looseness in mouse zygotes that allows full-Term development. *PLoS One* 2017;**12**..