

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関

山梨大学生命環境学部生命工学科

職名・氏名

助教・大我政敏

Ⓔ

1 研究テーマ

zFRAP 法による生きたマウス 1 細胞期胚の個体形成能評価法の確立

2 研究の目的

本研究の目的はマウス胚を用いて、受精卵の個体形成能を評価する方法の確立である。個体形成能とは、個体を形成できる能力、すなわち赤ちゃんとして出生に至れる能力のことであり、この予測を可能にする方法の確立を目指す。本研究では、受精直後の細胞分裂をしていないごく初期の受精卵(1細胞期胚)で、この予測を可能にする技術の開発を目指している(図1)。将来的には、畜産分野や不妊治療現場において、どの1細胞期胚を母体へ戻すかを定めるための選抜方法につながる知見を得られることが期待される。

どの胚が赤ちゃんになれて、
どの胚は途中で死んでしまうのか？



見分ける技術は今の所ない。

図1 マウスの体外受精卵

3 研究の方法

本研究では、**DNAの緩さ**を指標として、胚の今後の発生を予測する系の確立を試みてきた。DNAは一つの細胞にヒトであれば、2 mにも及ぶひも状の物質として存在する。この長いDNAを細胞の核に収めるために、糸巻きのような物質に巻き付けられて細胞内では存在している(図2)。この糸巻きに相当するのがヒストンと呼ばれるタンパク質である。この糸巻きへの巻きつき方が個々の細胞で異なり、その細胞の性質に重要であることがわかっている。興味深いことに、再生医療への実用化が期待されている Embryonic stem (ES) 細胞や induced pluripotent (iPS) 細胞では、DNAのヒストンへの巻きつき方が非常に緩く、この緩さが様々な種類の細胞に変化できる万能性(多分化能)に重要であると言われている。

本研究では、このDNAの緩さについて、受精卵を殺さずに評価することができる技術 **zFRAP(zygotic fluorescence recovery after photobleaching:受精卵**

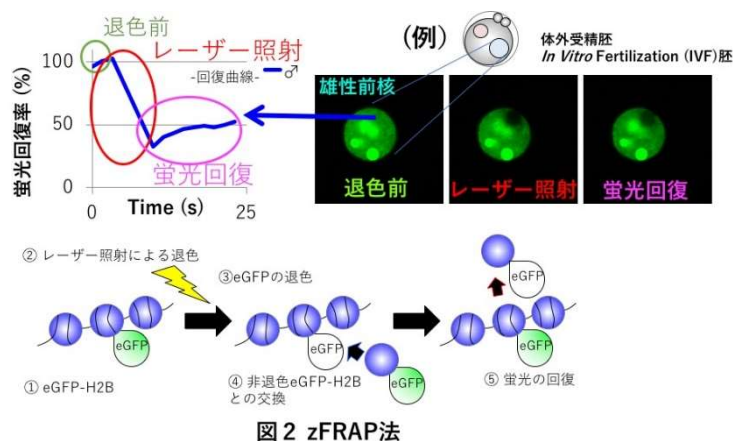


図2 zFRAP法

光退色後蛍光回復法; 図2)を開発し、その有益性を検証している段階にある。具体的には、毒性を避けるためにDNAを直接染色はせず、糸巻きに相当するヒストンタンパク質(H2B)にオワンクラゲから同定された緑色蛍光タンパク質(enhanced Green Fluorescent Protein :GFP)を融合して発現

留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

させ(eGFP-H2B)、この緑色の蛍光を観察することで、DNAの巻きつきの状態を調べることができる。ヒストンとDNAの結びつきが緩ければ、eGFP-H2Bの動性は高まり、ヒストンとDNAの結びつきがタイトであれば、eGFP-H2Bの動性は低下するという仕組みである。eGFPは強い励起光を受けると不可逆的に退色する。FRAPではこの性質を利用している(図2)。つまり、細胞内のDNAの一部の領域に強力なレーザー光を照射する。すると、その領域に存在していたeGFP-H2Bは不可逆的に退色する。しかし、細胞核内部ではタンパク質は動性を持つ。すなわち動いている。したがって、退色された分子が存在していた場所から離れ、退色をしていない分子がその領域に流入してくるという現象が起こる。その結果、その領域内の蛍光強度は退色により著しく低下した後、一定期間を経て、回復する。この回復速度を測定することで、その分子の可動性画分(Mobile fraction:MF%)を算出するのがFRAP法であり、zygotes(接合子)、すなわち1細胞期胚で行うのが、我々が開発したzFRAP法である。

個別の胚に着目してみると、DNAが緩いものも存在すれば、緩んでいないものも存在する。つまり、1細胞期の胚はDNAの緩さに「個体差」が存在することがわかっている(図3)。また、1細胞期胚には精子由来のDNA(雄性前核:♂)と卵由来のDNA(雌性前核:♀)、2つのDNAが存在する(図2)。この両者の間では精子由来DNAの方が緩い構造を持つ「雌雄差」が存在する(図3)ことがわかっていたが、興味深いことに、未成熟な精子(円形精子細胞)を授精した胚(ROSI胚)では、この雌雄差に変化が起こり、精子由来と卵子由来DNAの差が小さいことを見出している(図4)。なお、この未成熟な精子による受精卵の個体形成能は成熟精子のもの(ICSI胚)と比較し、半分程度であり、3割程度の胚しか出生に至らないことが広く知られている。

以上のことから、zFRAP解析により得られるDNAの緩さが胚の個体形成能を予測する指標となりうると仮説を立て、

- (1) DNAがより緩んだ胚の方が締まった胚よりも個体形成能が高い(個体差の検証)

- (2) 精子由来のDNAが卵子由来よりも緩んだ構造を持つ胚は個体形成能が高い(雌雄差の検証)

という予測の元、さらに様々な種類の1細胞期の受精卵についてzFRAP解析を行うことで、より個体形成能の高い胚を選ぶためのDNAの緩さの規格値を設定することを試みることにした。それと同時にどのようなメカニズムでDNAの緩さの雌雄差が生じるかにも焦点を当て解析を行うことにした。

4 研究の成果

[1] zFRAP法による個体形成能評価法における規格値の設定

留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

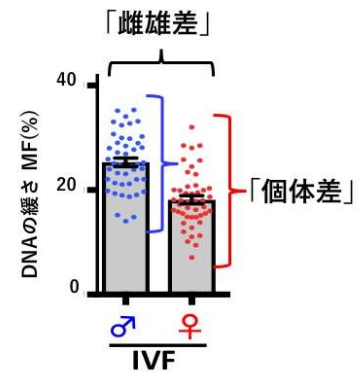


図3 受精卵におけるDNAの緩さの個体差と雌雄差

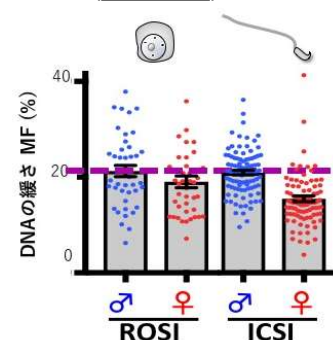


図4 未成熟精子授精(ROSI)胚では、DNAの緩さは雌雄差が小さい

① 体内受精胚、体外受精胚、体外成熟卵受精胚の zFRAP 解析

受精卵を調製する方法は複数あり、体内(in vivo)で受精させた胚(**vivo 胚**)、体外で受精(*in vitro* fertilization: **IVF**)させた胚(**IVF 胚**)がまず挙げられる。次に、体外で成熟 (*in vitro* maturation)させた卵子を IVF により受精させた胚(**IVM-IVF 胚**)である。これらの赤ちゃんとして出生に至る割合 (産仔率) は、体外で培養する時間が長くなるほどに低下するため、**IVM-IVF 胚 < IVF 胚 < Vivo 胚**となる。そこで、これらの胚について zFRAP を行うことで、より個体形成能が高い胚の DNA の緩さの規格値決定のための参考にしようと考えた。その結果、**Vivo 胚**と **IVF 胚**では差がなかったが、**IVM-IVF 胚**では、他の2つに比べて、**雄性前核**がおよそ **1.2 倍**、**雌性前核**で **1.5 倍**ほど DNA が緩んでいた(**図 5**)。ただし、雌雄差については、他の胚と比較し、差は見られなかった。これより、DNA は過剰に緩んでいる胚では個体形成能が低下し、適度に緩んでいる胚が、個体形成能が高い可能性が考えられた。

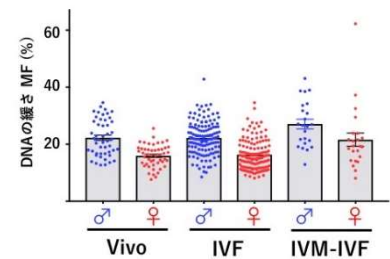


図5 vivo、IVF、IVM-IVF胚のzFRAP解析

② zFRAP 法の個体形成能評価法としての有効性の検証

これまでの知見と上記の検討から、DNA が緩み過ぎず締め過ぎず、適度に緩んでいる胚が、個体形成能が高いことが考えられた。zFRAP 後の IVF 胚を個別に培養し、胚盤胞期まで発生できた胚の割合 (胚盤胞率) を調べた。その結果、**20 < MF < 22.5** (**図 6 中赤**)の胚は全て胚盤胞へ発生し、この範囲から離れるに従って、胚盤胞率は低下した(**図 6 中緑と紫**)。このことから、DNA が中程度に緩んでいる胚を選別することで、個体形成能が高い胚の選抜が可能であり、zFRAP 法が個体形成能の評価系として有効である可能性が示唆された。

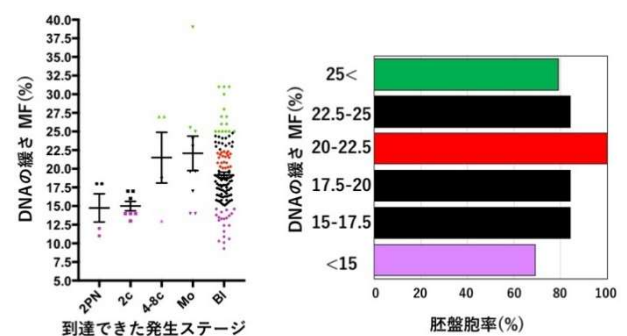


図6 IVF胚のDNAの緩さごとの胚盤胞(BI)への発生

上述のように、1細胞期胚では精子由来と卵子由来の DNA の間に緩さの違いが存在する。個体形成能が低い、未成熟精子を受精した **ROSI 胚**ではこの雌雄差が小さくなる異常が見られたことから、この雌雄差も1細胞期胚の質には重要であると考え、その制御機構の解明も試みた。

留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

[2] DNAの緩さにおける雌雄差の形成メカニズムの解析

① 1前核雄性単為発生(1PN_ICSI, 1PN_ROSI)胚のzFRAP解析

まず、1細胞期胚中での精子由来と円形精子細胞由来DNAの性質を比較するために、卵子由来DNAを除去した除核卵子に精子と円形精子細胞をそれぞれ顕微授精し、1前核(pronuclei: PN)を持つ雄性単為発生胚(1PN_ICSIおよび1PN_ROSI)を作成し、zFRAP解析に供試した。その結果、精子由来DNAは円形精子細胞由来のものよりも緩んだ構造を獲得しにくいことが示された(図7)。

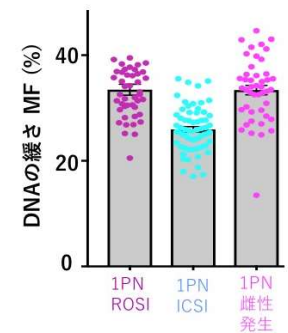


図7 各種1PN単為発生胚のzFRAP

② 単一および複数前核を有する雌性単為発生(1, 2, 4PN パルセノ)胚のzFRAP解析

精子と卵子に由来するそれぞれのDNAからなるPN間に、DNAを緩める活性を取り合う機構が存在するのではないかと考え、これを調べるために、前核の数が1, 2, 4個となる雌性単為発生胚(1, 2, 4PN パルセノ胚)を作製し、zFRAP解析を行った。1, 2, 4とPN数が増加するにつれて、MFは30, 22, 15%と次第に低下した(図8)。

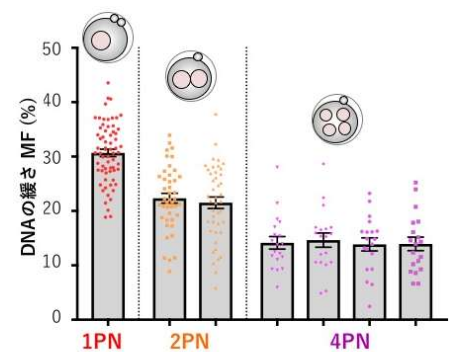


図8 雌性単為発生胚のzFRAP

③ 精子および円形精子細胞同時注入胚のzFRAP解析

最後に、ICSI胚とROSI胚では精子由来DNAは同等の緩さを示すが、卵子由来のDNAの緩さはICSI胚がROSI胚よりも低レベルである(図4)。このことから、精子と円形精子細胞では、DNAを緩める活性の取り合いに差があるのではないかと考えた。この両者の活性を比較するために、同一1細胞期胚に共存させ、zFRAP解析に供試した。結果、精子由来DNAが円形精子細胞由来DNAの1.5倍ほど緩んだ構造を獲得した(図9)。

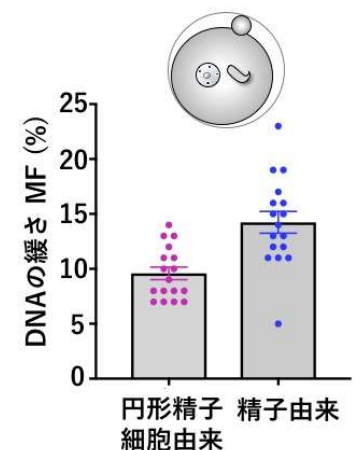


図9 2PN雄性単為発生胚のzFRAP

5 今後の展望

今回、DNAが適度に緩んでいる胚が高い胚盤胞率を示し、個体形成能を有している可能性が示された。現在はまだ胚盤胞率での検証しか行えていないので、今後はzFRAP法で解析した胚をグループ分けし、偽妊娠マウスへ移植して産仔への発生を調べることで、zFRAP法の個体形成能評価系としての真価を検証する。なお、雌雄差に関しても評価項目として加えることで、個体形成能評価法としての確度を高めていく予定である。

精子が受精した場合にのみ卵子由来DNAが緩んだ構造を獲得しにくい現象の仕組みについても引

留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

き続き解析を行っていく。この研究から、雌雄差の形成機構に関する知見を得て、ROSI 胚で雌雄差の形成を促進することが可能になれば、ROSI 胚の産仔率向上に繋がるのではないかと考えている。この目標が実現すれば、無精子症の不妊治療現場において、実用化が今一步である ROSI 技術の普及に貢献できることが期待される。

6 研究成果の発信方法（予定を含む）

- ・ 1 日も早い国際誌での論文の公表を目指す。
- ・ 論文の掲載が確定した段階でプレスリリースなどによって新聞はもちろん TV も含むメディアの力を借りて成果を発信する。
- ・ 国内に加えて、国際学会での発表を積極的に行う。

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。