

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名 山梨大学 大学院医工農学総合教育部

職名・氏名 学生 風間晃輔

㊞

1 研究テーマ

マウス受精卵の”DNA の揺れ”から良好な胚を選別する技術の開発

2 研究の目的

少子高齢化の進む日本において、人口の増加は喫緊の課題であり、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。多くの人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、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、どのような性質を持つ受精卵が良好胚なのか、を解明するため、”DNA の揺れ”を測定する方法の開発並びにその技術を用いた胚の特性解析を目的とした。

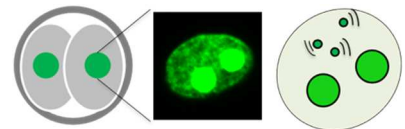


Fig. 1 DNA/ヒストンのドメインの揺れイメージ

3 研究の方法

8週齢以上の B6D2F1 (C57BL/6 × DBA2; 以下 BDF1 と記載)雌マウス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の7時間時点で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 及びヒストンの粒状ドメイン(以下ドメイン)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

留意事項

①3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。

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。

4 研究の成果

[1] DNA の揺れを計測する新規手法の開発

①. DNA 及びヒストンの可視化の決定

ドメインの揺れを測定するにあたり、DNA またはヒストンの揺れを検出する技術を開発した。第一に、DNA 及びヒストンの揺れの可視化のため、蛍光ラベリング DNA(Cy3-dCTP, Fluorescein-dUTP)、蛍光タンパクや低分子リガンドを融合したヒストンの mRNA(eGFP-H2B, mCherry-H2B, Halo-Tag H2B)をそれぞれ体外受精(IVF)胚に注入し、DNA 及びヒストンの可視化を試みた(Fig. 2)。結果、最も安定してドメインを検出出来るのは eGFP-H2B であった。

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 mRNA の最適注入濃度の検討を行なった。mRNA 注入濃度を 5, 10, 25, 50, 125, 250 ng/μL で検討した(Fig. 3)。eGFP-H2B の濃度は 250 ng/μL で最も鮮明にドメインを確認することが出来たため、250 ng/μL の適正濃度とし、以降ヒストンの可視化を行なった。

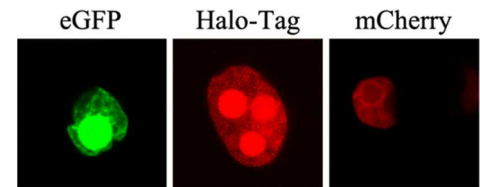


Fig. 2 蛍光タンパク及び低分子リガンドによるヒストン可視化の試み

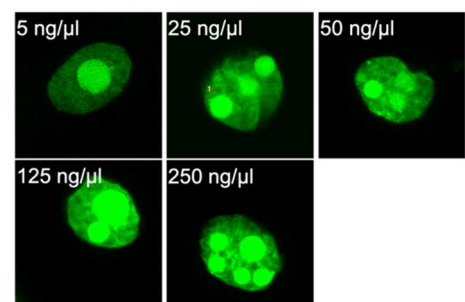


Fig. 3 eGFP-H2B mRNA 処理濃度の検討

②. 画像解析ソフトを用いた解析法の確立

①の濃度条件で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、揺れの定量解析を行なった(Fig. 4)。ヒストンのドメインの解析の妨げとなる、核小体部分及び背景を除去した後、Fiji に搭載されている trackmate(粒子追跡用 Plugin)を使用することで粒状ドメインの追跡を可能としたため、以降この設定を適用し粒子追跡を行なった。以降、この解析を motion 解析と表記する。

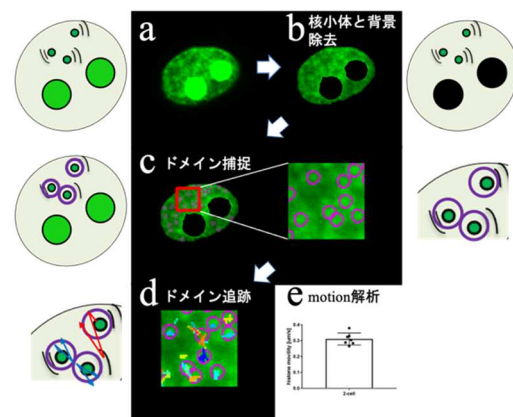


Fig. 4 ヒストンの揺れの追跡法の開発

[2] ヒスト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

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。

胚の特性を解析するにあたり、**motion** 解析が胚発生に対し無害な手法であることが重要である。そこで、**motion** 解析の胚発生に対する負荷を確認するため、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. 5**)。本実験では、安定してドメインが核で観察できるのが 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た。**Fig** 右上には胚盤胞発生率を示している。全ての試験区において、有意な差は見られなかったことから、**motion** 解析は着床前初期胚発生においては無害な解析手法であることが確認された。

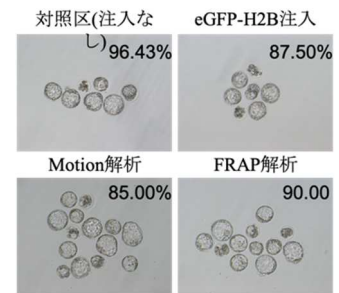


Fig. 5 motion 解析による胚に対する負荷の検証

②. 胚発生に伴うドメインの揺れの変化

zFRAP 法を使用した先行研究から、発生が進むと DNA の緩み(Mobile fraction: MF [%])が低下することが報告されている。そこで、ドメインの揺れも同様に発生に従い低減するのか検証するため、IVF 胚を 2 細胞期以降の各発生段階(2,4 細胞期、桑実期、胚盤胞期)で **motion** 解析を行った(**Fig. 6, 左**)。結果、2 細胞期胚と 4 細胞期胚のドメインの揺れには差は見られなかったが、桑実期胚では揺れの低減が見られた。**zFRAP** 法による解析(**Fig. 6, 右**)と同じ傾向を示したことから、胚発生に伴う MF とドメインの揺れの変化は相関することが考えられる。

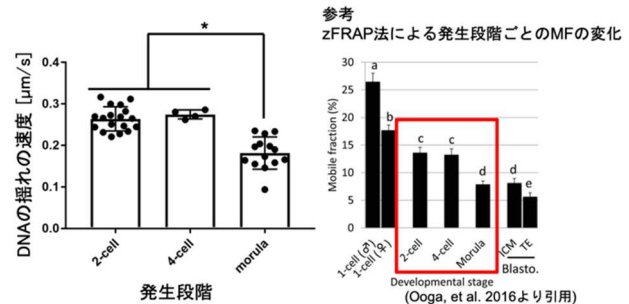


Fig. 6 各発生段階の胚の **motion** 解析

③. マウス系統による核内のドメインの揺れの差

動物実験に使用されるマウスには様々な系統がある。中でも、一般的に使用される系統に交雑種の **BDF1** とクローズドコロニーの **ICR** がある。**BDF1** は **ICR** に比べて発生率が高いことが知られる。そこで、これらの系統の受精卵のドメインの揺れの差は見られるか検証することで発生率とドメインの揺れの間を探るため、**BDF1** と **ICR** それぞれの系統の卵子から作製した胚の **motion** 解析を行なった(**Fig. 7**)。結果、**BDF1** 系統マウスよりも **ICR** 系統マウスの方が高かった。この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。

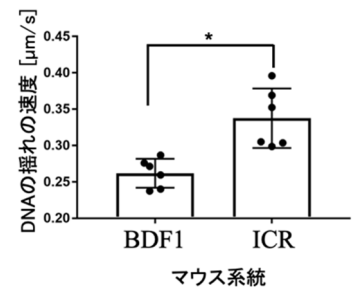


Fig. 7 BDF1, ICR 系統由来受精卵の **motion** 解析

[3] **motion** 解析を用いた胚の個別解析への応用

2 で確立した揺れの解析を用いて、将来的に良好胚選別を行いたいと考えている。そこで、発生率との関連が報告(大我, 2019 年度 山梨県若手研究者奨励事業成果報告書)されている MF とドメインの揺れとの間に相関があるか検証した。

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。

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

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、その後一つ一つの胚を個別に培養を行なった(Fig. 8)。赤色に示した点は、2細胞期に発生停止した胚である。結果、現状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。よって、今後2細胞期以降の4細胞期、桑実期でそれぞれmotion解析を行うことで胚発生とドメインの揺れの関連を探る。

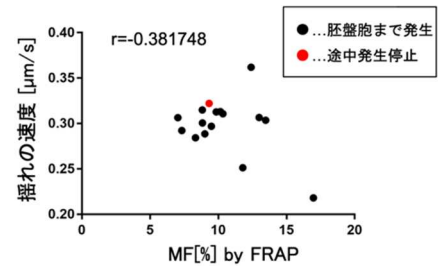


Fig. 8 1-cell zFRAP, 2-cell motion解析による
発生能予測の試み

②DNAの揺れと緩みの関係

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、揺れとMFに相関は見られるか探るため、2細胞期時点で揺れの解析とzFRAP法を行った(Fig. 9)。結果、MFとドメインの揺れとの間に相関は確認出来なかった。

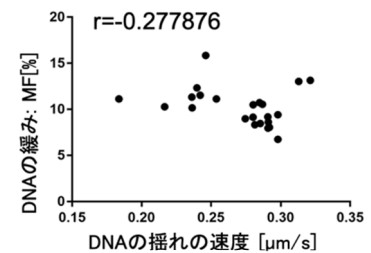


Fig. 9 2細胞期でのDNAの緩みとヒストンの揺れの解析

③. DNAの揺れを人為的に変化させることは可能か

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トリコスタチンA(TSA)を受精卵に処理しmotion解析を行なった。(Fig. 10)。結果、DMSO区と比較するとTSA処理区では揺れが低減していたが、未処理の区と比較すると有意な差はなかった。まだサンプル数が少なく、今後サンプル数を追加してTSAの効果を検証する。また、本実験ではTSAを50 nMの濃度で使用したが、今後より高濃度で短時間処理することも行う。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。

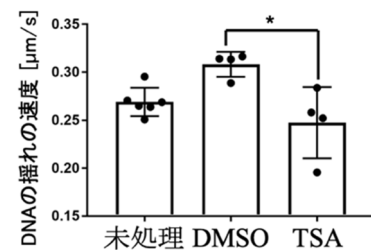


Fig. 10 TSA処理による胚のヒストンの揺れに対する影響の解析

5 今後の展望

DNAの揺れを解析するための解析手法の開発を行なった。今後、この手法が適切にヒストンドメインを解析出来ているか確認した後、胚盤胞まで至ることのできる胚の特性、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。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、様々な胚の特性の解析に活かしたいと考えている。

6 研究成果の発信方法 (予定を含む)

- ・一日も早い学術雑誌への公表、学会での発表を目指す
- ・プレスリリースでの発信や地元新聞への研究成果の投稿により、県民への成果発信を行う

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。