

背景

現在日本社会において、高齢化および少子化による労働人口の減少は、国の根幹を揺るがす喫緊の課題である。不妊症はこの少子化の一因となっており、また、子供を望む国民の QOL にも大きな影響を及ぼしうる重要な課題であると考えられる。不妊治療の現場では、体外で受精、培養した胚を母体の子宮へと移植する場面が必ず存在する。多胎は母体に極めて大きな負担を強い、ヒトであればその後の家族の人生にも大きな影響を及ぼすため、闇雲に沢山の胚を移植することはできない。しかしその一方で、確実に妊娠、出産までを成功させなければ、肉体的、精神的、経済的負担は増すばかりである。

また家畜においても、妊娠、出産の失敗は経済的損失を生じる。したがって、もし移植する際に、確実に出生に到達することのできる「個体形成能」を有する胚を選択することが出来れば、そのメリットは多岐に及ぶ。また、一見顕著な異常を持たない胚の中から、高い確率で出産には至らない胚であることを高精度に予測することが可能になれば意義がある。しかし現在のところ、このような技術は未だ確立されていない（図 1）。

本研究では、DNA の構造上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。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 stem (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（分化多能性）に重要であると言われている。興味深いことに、分化全能性を持つ 1 細胞期の受精卵はこれらの幹細胞よりも 4 倍以上も緩んだ DNA の緩さを有している。我々は、

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

この DNA の緩さについて、受精卵を殺さず、また胚発生能を損なわずに評価することができる技術 (zygotic fluorescence recovery after photobleaching: **zFRAP** 受精卵光退色後蛍光回復法)を開発し (Ooga et al 2017, 2018)、その有益性を検証している段階にある。具体的には、毒性なく DNA を染色するのは困難なため、糸巻きに相当するヒストンタンパク質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 :eGFP**) を融合して発現させ、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。ヒストンへの DNA の結びつきが緩ければ、ヒストンの動性は高まり、ヒストンと DNA の結びつきがタイトであれば、ヒストンの動性が低下する仕組みである。

eGFP は強い励起光を受けると不可逆的に退色する。zFRAP ではこの性質を利用している (図 2)。つまり、細胞核内の DNA の一部の領域に強力なレーザー光を照射すると、その

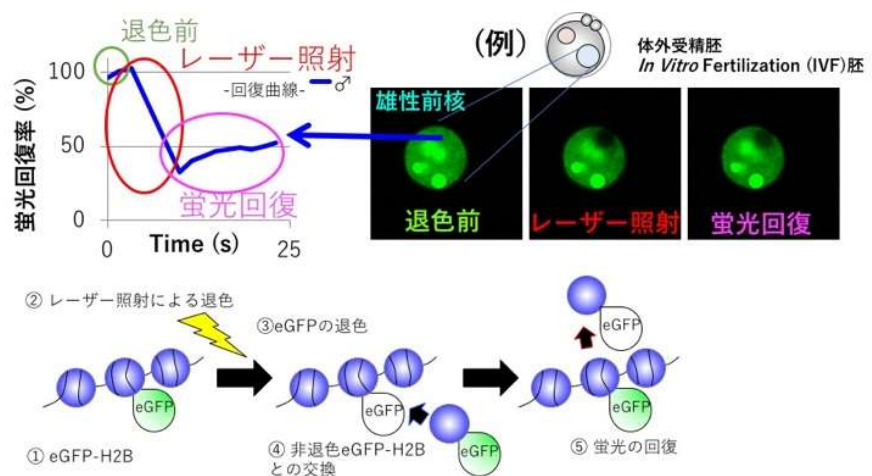


図 2 zFRAP法

領域に存在していた eGFP 融合ヒストンタンパク質 (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。その結果図 2 に示す回復曲線が得られる。この回復速度を測定し、mobile fraction: MF (%) (可動性画分) を算出することで、その分子

内部の動性を解析するのが FRAP 法であり、zygotes (接合子)、すなわち 1 細胞期の胚で行うのが、我々が開発した zFRAP である。zFRAP 法で個々の胚を解析すると、DNA が緩いものも存在すれば、緩

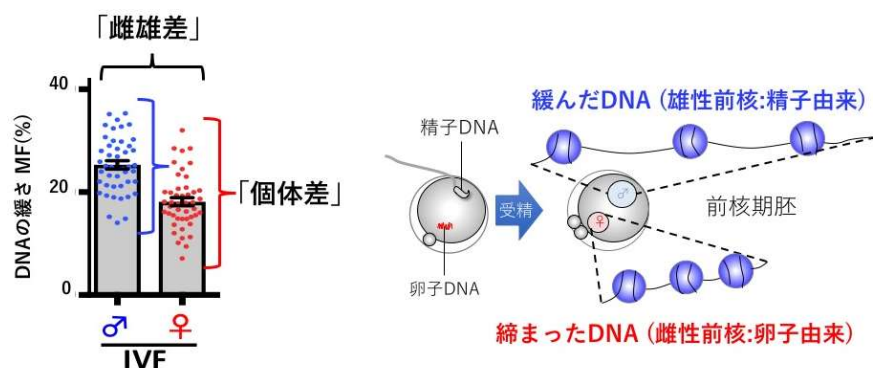


図3 DNAの緩さは各胚ごとにバラツキ (個体差) があり、雌雄前核間でアシンメトリック (雌雄差) である。

んでいないものも存在しており、その差は約2倍程度である。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、受精卵では精子由来のDNA(雄性前核)と卵由来(雌性前核)のDNAの2つのDNA(前核:pronuclei以下PN)が存在する。この両者の間では精子由来DNAの方が緩い構造、「**雌雄差**」を持つことも明らかにしている。成熟した精子を顕微注入して得られるICSI(Intra cytoplasmic sperm injection)胚では、精子由来/卵子由来の比が1.2倍以上のものが約70%を占める(図4中オレンジ)。だが、興味深いことに、未成熟な精子細胞である円形精子細胞を顕微注入して得られるROSI(round spermatid injection)胚では、この精子と卵子のDNAの緩さの差に変化が起こり、精子由来と卵子由来DNAの差が小さくなることわかっており、精子由来/卵子由来の比1.2倍以上のものは43%となる(Ooga unpublished data 図4)。なお、この未成熟な精子による受精卵の産仔率は成熟精子のものと比較し、半分程度(60% vs. 30%)である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の緩さについて以下の仮説が考えられた。

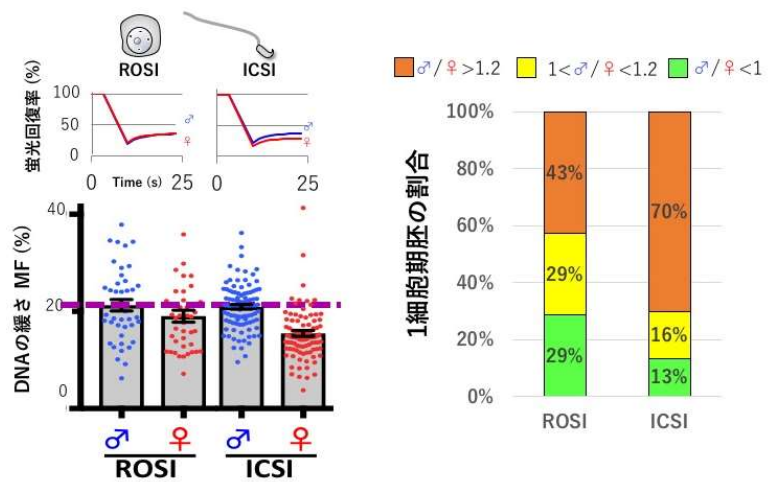


図4 未成熟精子授精胚では、DNAの緩さは雌雄差が小さい

- (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)

本研究では、この2つの仮説を検証するために、個体形成能の異なる様々な種類の1細胞期の受精卵についてzFRAP解析を行い、個体形成能を評価するためのDNAの緩さの規格値を設定することを目的に設定し、実験1, 2とその検証実験3を行なった。また、精子由来DNAと卵子由来DNAの間に緩さの違い、「**雌雄差**」がどのようなメカニズムで生じるかにも焦点を当て、実験4, 5, 6を行なったので報告する。

方法

eGFP にヒストン H2B を融合したコンストラクトを鋳型にして、mRNA を *in vitro* transcription によって合成した。zFRAP 解析のために、様々な種類の受精卵（体内受精卵: **vivo 胚**；体外受精卵: *in vitro* fertilization **IVF 胚**；体外成熟卵子受精胚: **IVM-IVF 胚**）に合成した mRNA を顕微注入して、zFRAP に必要な蛍光標識ヒストン (eGFP-H2B) を発現させた。IVF, IVM-IVF 胚については、前核形成が見られ始める受精後 3-4 時間の時点で mRNA を注入した。Vivo 胚については前核形成が見られ始めたのを確認してから mRNA を注入した。これらの胚を受精後 8 時間から 12 時間の 4 時間間に zFRAP 解析に供試した。

未受精卵 (MII 卵) へ mRNA を顕微注入し、除核した後、必要に応じて円形精子細胞、精子、あるいは未受精卵からの DNA を注入し、単為発生胚を作成した。また、精子を注入しない単為発生胚の場合は、5 mM のストロンチウム (Sr^{2+}) によって、活性化を行った。複数前核単為発生胚を作成する場合は、サイトカラシン B (CB) で極体放出を阻害した。

共焦点顕微鏡 FV1200 を用いて、それぞれの胚の eGFP-H2B の退色後の約 23 秒間蛍光回復を観察し、DNA の緩さを評価した。評価指標としては、**回復曲線**から算出され、退色前の蛍光輝度を 100 (%) とした回復率を退色率で割り算し得られる **mobile fraction: MF (%)** (図 3) を用いた。グラフ中では一つの胚から得られた値を一つのドットで表示し、平均値を灰色の棒グラフで示した。

結果と考察

1. -各種 1 細胞期胚の zFRAP 解析による規格値の探索とその検証-

実験 1. vivo 胚、IVF 胚、IVM-IVF 胚の zFRAP 解析

実験室で得られる受精卵には様々な種類があり、その個体形成能は大きく異なる。例えば、個体形成能が高い（産仔率が高い：多くの受精卵が出生に至れる）のは、体内 (*in vivo*) で受精した胚 (**vivo 胚**) である。これに続くのは体外受精 (*in vitro* fertilization: **IVF**) 胚となる。**IVF 胚**の調製には未受精卵を用いるのに対して、未成熟な卵子を得て、体外成熟 (*in vitro* maturation: **IVM**) をさせた卵から胚 (**IVM 胚**) を得ることも可能であるが個体形成能は IVF 胚よりも低くなる。一般に vivo 胚を一度回収した後、偽妊娠マウスへ移植した場合、80-90%の胚が出生に至り、IVF 胚では 60-70%、IVM-IVF 胚では 30-40%となる。本研究ではこれまで IVF 胚を主に使用して解析を続けてきた。そこで、Vivo 胚と IVM-IVF 胚の zFRAP 解析を行うことで、胚の個体形成能にとってより理想に近い DNA の緩さの状態を把握することが出来ないかと考えた。

まず、vivo 胚について zFRAP 解析を行った。 vivo 胚は卵管膨大部から回収したものに対して、mRNA を injection し、zFRAP 解析に供試した。しかし、IVF 胚と比較して違いは見られなかった(図 5)。一方、IVM-IVF 胚については、精子および卵子由来 DNA のいずれもが、IVF 胚と比べてより緩んでいた(図 5)。だが雌雄の前核の差について違いは見られなかった。以上のことから、1 細胞期胚の個体形成能には、極端に DNA が緩んだ構造をとらないことが重要であると考えられた。

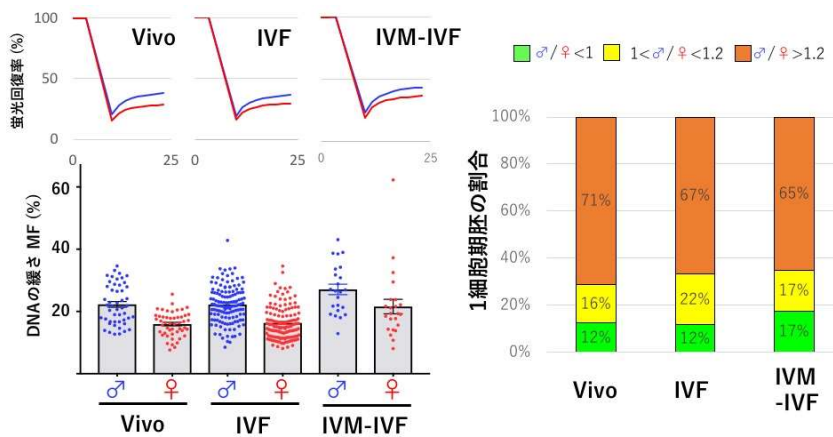


図5 vivo、IVF、IVM-IVF胚のzFRAP解析

実験 2. B6N, ICR, BDF1 胚の zFRAP 解析

マウスには様々な系統が存在し、性質の違いも報告されている。一般に、近交系は体外培養に対する抵抗性は低く、交雑種(雑種)は体外培養に対する抵抗性が強い。このような系統間による特徴が受精卵での DNA の緩さにも見られるのではないかと、そしてその知見が個体形成能の評価系に役立つかも知れないと考え、近交系同士の掛け合わせ(B6N X B6N)と雑種同士の掛け合わせ(BDF1 X BDF1)の受精卵について、zFRAP 解析を行った。

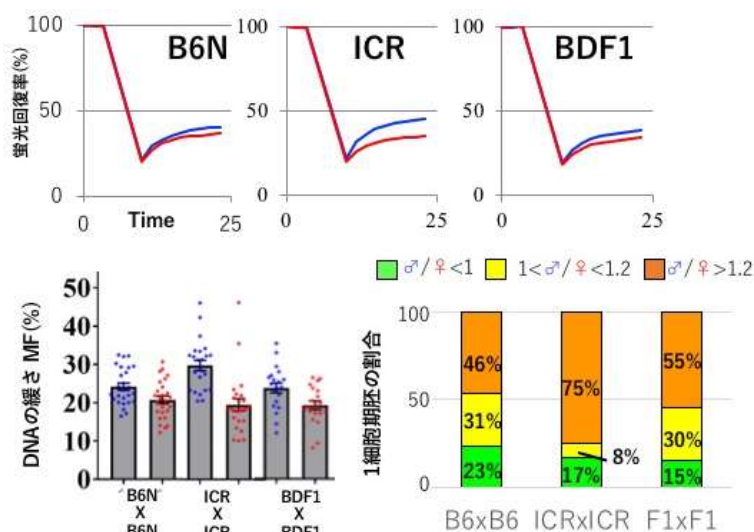


図6 各系統の1細胞期胚のzFRAP解析

しかしながら、その結果、この両者の受精卵に関しては、大きな違いは見られなかった(図 6)。

一方、マウスの系統にはクローズドコロニーと呼ばれる系統が存在する。近交系は極力個体間のバラツキ(個体差)を小さくした系統であり、BDF1 を始めとした雑種もまた同様とされているが、このクローズドコロニーは一定の個体差を有する集団である。また、体外培養については、B6N のような近交系よりも強く、BDF1 のような雑種より弱い

という位置付けになる。興味深いことに、クローズドコロニーに分類される ICR X ICR の受精卵では、卵子由来 DNA は他の系統と同等であったのに対して、精子由来 DNA の緩さが非常に顕著であり、系統による DNA の緩さの違いが存在することがわかった。以前の研究で卵の由来となる系統を BDF1 に固定し、近交系 (B6N, C3H) と雑種 (BDF1) およびクローズドコロニー (ICR) 精子と体外受精させ、その DNA の緩さを調べたところ、大きな違いは見られなかった (Ooga and Wakayama 2017) ことを鑑みると、卵子の由来する系統によって受精後の DNA の緩さに違いが生じることが考えられた。だが、いずれにせよ体外培養への耐性と DNA の緩さとの間に関連性は見られなかった。

実験 3. DNA の緩さの程度と胚発生率の相関性の解析

これまでの知見と実験 1 の結果から、適度に緩んだ DNA の構造を獲得する胚が、個体形成能が高いと考えられたので、この仮説を検証した。通常、マウスの胚培養では、図 1 に示したように一つの培地で複数の胚を培養する方法が慣習的に行われるが、IVF 胚を zFRAP 法により評価をし、一つ一つの胚を個別の培地で培養することで、MF と発生能とを紐づけて解析を行った。その結果、 $20 < MF < 22.5$ (図 7 中赤) の胚は全て胚盤胞 (Blastocyst : B1) へ発生し、この範囲から離れるに従い、胚盤胞率が低下することがわかった (図 7 中黒、緑と紫)。また、興味深いことに発生ごく初期の 2PN 期、2 細胞期 (2c) に発生停止した胚の半分は $MF < 15$ の胚であった。これらのことから、DNA が緩み過ぎず、締まり過ぎていない胚が胚盤胞へ高率に発生することができ、zFRAP 法による評価が胚の個体形成能の予測に有効である可能性が示された。今後は zFRAP 法で DNA の緩さを評価した胚を偽妊娠マウスへ移植することで、発生の途中段階である胚盤胞率ではなく、出生に至る胚の割合となる産仔率を用いて解析し、個体形成能の評価法としての有効性について結論を得る計画である。またさらに、雌雄前核の差も個体形成能への重要である可能性が示されているので、 $20 < MF < 22.5$ の群の胚に関して、雌雄前核差によって分類を行い、偽妊娠マウスへの移植実験も行う計画である

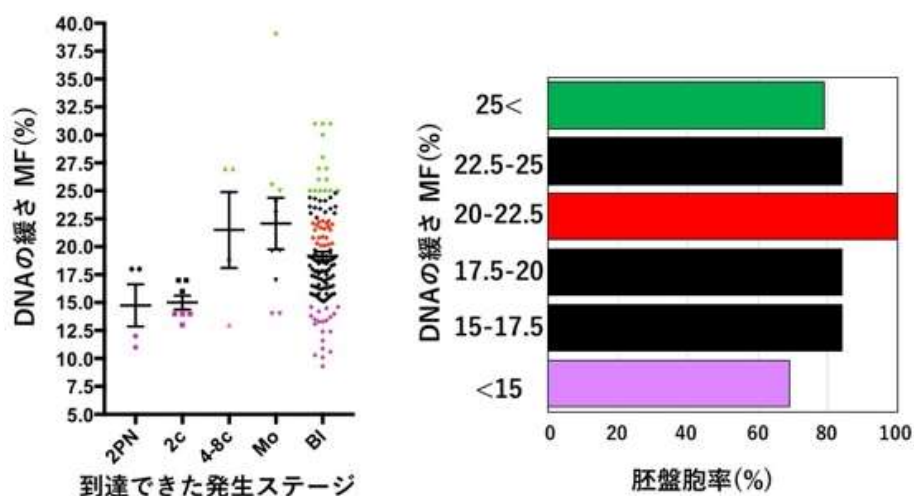


図7 IVF胚のDNAの緩さごとの胚盤胞(B1)への発生

2. -DNAの緩さの「雌雄差」の形成機構について-

我々の先行研究によって、卵子由来 DNA の緩さは同一細胞質内に共存する精子、あるいは精子細胞由来 DNA によって影響を受けることがわかっている (図 4, Ooga unpublished data)。未成熟な精子細胞である円形精子細胞を顕微注入して得られる ROSI 胚は、成熟精子を顕微注入した ICSI 胚と比較した場合、精子細胞と精子由来 DNA の緩さ (MF=21% vs. 21%) は変わらないが、卵子由来の DNA は ROSI 胚の方が ICSI 胚よりも高くなる (MF=20% vs. 16%) (図 4)。ROSI 胚は ICSI 胚と比較して、産仔率が半分程度であることから、この雌雄の DNA の緩さの違い、「雌雄差」の減少は個体形成能の指標の設定のための手がかりにもなる可能性がある。また、卵に注入される雄性配偶子の成熟度によって、卵子由来 DNA の緩さが変化するという現象はこれまで報告もなく、生物学的にも非常に興味深い現象であることから、この現象の原因解明を試みた。

実験 4. 1 前核雄性(♂)単為発生胚の zFRAP 解析

まず、ROSI 胚と ICSI 胚の違いは当然、円形精子細胞と成熟精子がそれぞれ受精していることである。それぞれの雄性配偶子由来 DNA が”緩さ”において、どのような違いを持つのか

を明らかにするためには、卵子由来 DNA を排除して比較する必要があると考えた。そこで、卵子由来 DNA 除去卵子 (除核卵) に対して、ROSI あるいは ICSI を行い、父親由来 DNA のみを持つ、1 前核 (pronuclear: PN) 雄性単為発生胚 (1PN_ROSI, 1PN_ICSI 胚) を作製し、zFRAP 解析に供試した (図 8)。その結果、

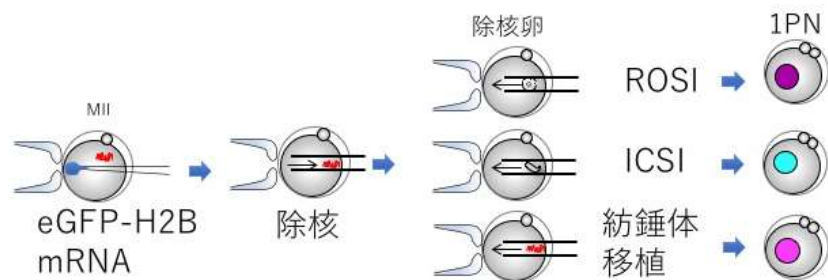


図8 各種1PN単為発生胚の作成手順

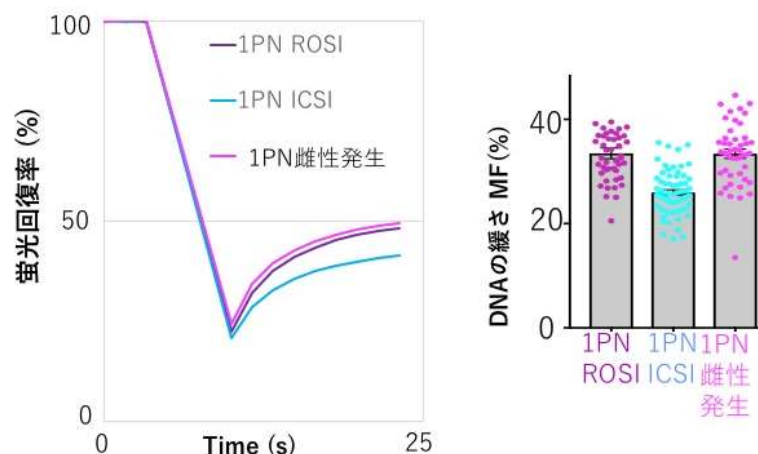


図9 各種1PN単為発生胚のzFRAP

驚いたことに、この両者は雌性前核と共存した ROSI, ICSI 胚では同レベルの DNA の緩

さを示した (図 4) にも関わらず、1PN_ROSI 胚での円形精子細胞由来 DNA は、1PN_ICSI 胚での精子由来 DNA よりも高いレベルの緩さを示した (MF=34% vs 26%) (図 9) コントロールとして行った、卵子由来 DNA のみを持つ、1PN 雌性単為発生胚は 1PN_ROSI 胚と同等レベルの DNA の緩さを示した (MF=33.5% vs. 33.4%)。これらのことから精子だけが、緩んだ DNA の構造を獲得しにくく、この性質は精子形成過程で精子細胞が成熟することで獲得されることがわかった。しかし、上述のようにこの結果は IVF 胚において、精子由来 DNA は卵子由来 DNA よりも緩んだ構造を獲得していること、ICSI、ROSI 胚で精子 (細胞) 由来 DNA の緩さが同レベルであったことと一見矛盾する。ここに、雌雄差が形成されるメカニズムのヒントがあるのではないかと考えた。つまり、単純に精子由来 DNA は緩んだ構造を獲得しやすい性質を持つために、卵子由来 DNA よりも緩んだ構造になるのではなく、むしろ緩みにくい性質を持つため、卵子由来 DNA が緩さを失ったと考えられた。この仮説を説明するためには、精子由来、卵子由来 DNA の間で、緩んだ構造にするための活性を奪い合う機構が存在するはずである。

実験 5 1、2、4 前核雌性 (♀) 単為発生胚の zFRAP 解析

前核間で DNA を緩める活性を奪い合う機構が存在するという仮説を検証するために複数の前核を持つ単為発生胚について解析を行った (図 10)。仮に前核間で DNA を緩める活性を奪い合う機構が存在するのであれば、前核数が増えるにつれて、DNA の緩さは低下するはずである。また、2、4 前核の雌性単為発生胚ではいずれの前核も同一の性質を有する。そのため、同程度の DNA の緩さを呈するはずである。結果は、1 PN の雌性単為発生胚は極端に緩んだ構造を示し、そして、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

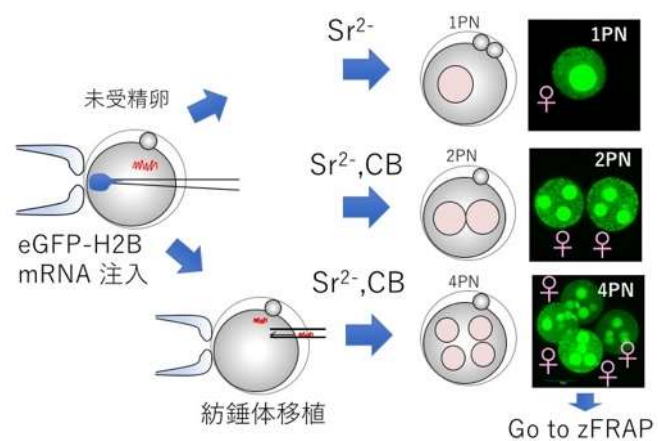


図10 1-4 PNパルセノ胚の作製方法

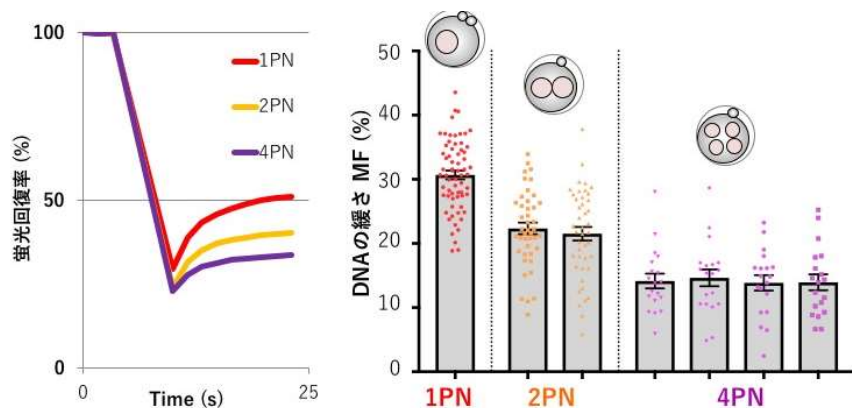


図11 雌性単為発生胚のzFRAP

11)。また、2PN 胚でそれぞれの MF は 22, 21%、4PN 胚では 14, 15, 14, 14%と同一の値を示した。以上のことから、1 細胞期胚では、緩んだ DNA の構造を形成する活性を各前核が奪い合う機構の存在が示唆された。また、同じ性質の卵子由来 DNA が同等のレベルの緩さのレベルを呈したことから、精子由来なのか卵子由来によって、DNA を緩める活性を奪う能力に関して違いがあることが示唆された。

実験 6 2PN 雄性(♂)単為発生胚の zFRAP 解析

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。このことから、精子と円形精子細胞では、DNA を緩める活性の奪い合いに差が生じているのではないかと考えた。この両者の能力を比較するために、同一 1 細胞期胚に両者を共存させ、zFRAP 解析に供試した。つまり、除核卵に精子と円形精子細胞を同時に注入し、2PN 雄性単為発生胚を作製し解析した(図 12)。この場合、2つの雄性前核が存在し、その由来の判別が難しい。そこで由来を正確に識別するために、円形精子細胞由来 DNA では核小体周囲でより強い蛍光を発する MBD-mCherry を利用した。図 12 に示したように円形精子細胞由来 DNA がより強く染色されているのが確認された。この系を用い zFRAP 解析を行った結果、精子由来 DNA は円形精子細胞由来 DNA よりも緩んだ構造を獲得した(MF14% vs. 10%) (図 12)。一方コントロールとして精子を 2 匹打ち込んだ胚については、MBD-mCherry の蛍光は 2つの前核で違いは認められず、DNA の緩さについても両者に差は見られなかった(MF9% vs. 8%)。これらのことから、精子は円形精子細胞よりも DNA を緩める活性を多く取り込むことが

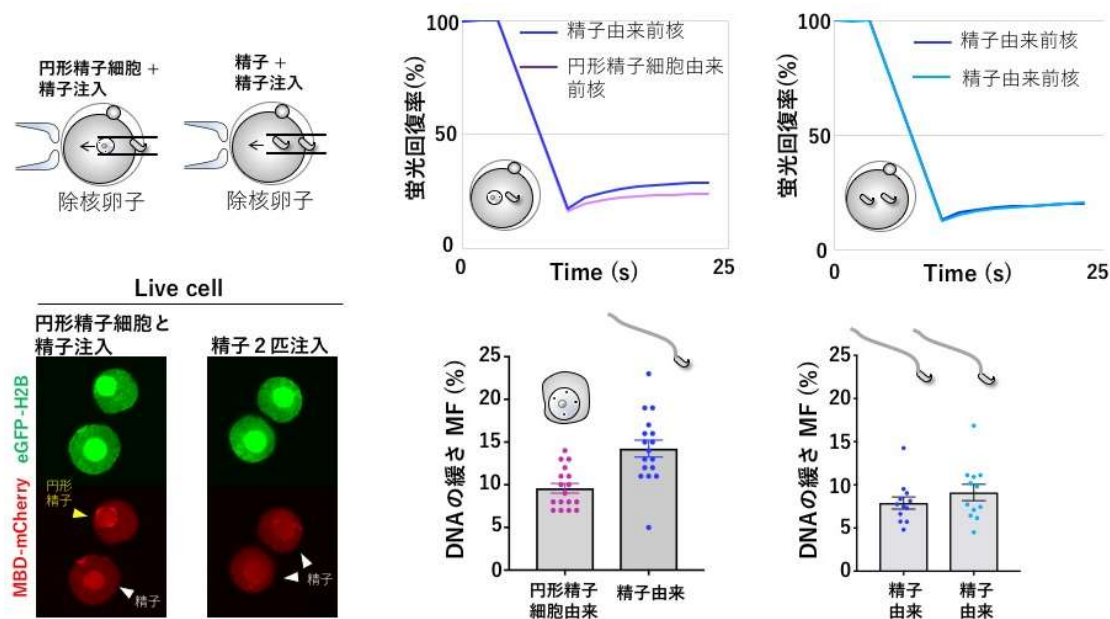


図12 2PN雄性単為発生胚のzFRAP

示唆された。さらに、精子由来 DNA は本来緩んだ構造を獲得しにくい、これまで示してきたように DNA を緩める活性を卵子由来 DNA よりも多く取り込むことができる。その

結果、雌雄差が形成されるのであろうと考えられた。また、ROSI 胚では雌雄差が小さいのは、円形精子細胞は精子よりも DNA を緩める活性を取り込むことができないため、卵子由来 DNA がより緩んだ構造を獲得することが原因であらうと考えられた。

今後の展望

今回、適度に緩んだ DNA を持つ胚が、個体形成能が高い可能性が示された。zFRAP の利点として、解析した胚をその後の解析に利用できることが挙げられる。したがって、顕微鏡観察では一見何も違いのない 1 細胞期胚(図 1)を zFRAP で、個体形成能の高い胚と低い胚を選び分け、その遺伝子発現を解析することが可能である。DNA の緩さは遺伝子発現を介して細胞の性質に影響を与える。DNA の緩さが異なれば、遺伝子発現にも違いが見られることが予想される。今後、zFRAP の有用性が確定できれば、zFRAP により選り分けた胚の遺伝子発現を解析により、個体形成能に重要な 1 細胞期の発現遺伝子を明らかにすることが出来るかもしれない。

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できない仕組みについても引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、その産仔率向上に繋がるのではないかと考えている。この仮説が実現すれば、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。

研究成果

- ・ 第 15 回日本生殖発生医学会学術集会
学術奨励賞受賞 (2020年3月14-15日)
- ・ The second international conference on cell reprogramming and reproductive biotechnology 招待講演 (2019年10月24日)
- ・ 日本繁殖生物学大会 ポスター発表 (2019年9月5日)