

PLC ζ -mRNA 同時注入による円形精
子細胞または体細胞由来産仔の作出

山梨大学大学院

医工農学総合教育部

博士課程学位論文

2022 年 3 月

廣瀬 直樹

目次

序章

1. 卵子の活性化に関する先行研究と重要性	3
2. 卵子活性化時のメカニズムと人為的活性化と精子による活性化の差	3
3. PLC ζ とその他ファミリーの構造に関する報告	3-4
4. 人為的活性化の問題点と改善策および PLC ζ -mRNA を使用した卵子活性化の研究の歴史	4-5
5. PLC ζ が卵子を活性化させる際の作用機序	6

参考文献	7-9
------	-----

第一章 ウマ PLC ζ による卵子の活性化

1-1 序論	10
1-2 材料および方法	11-14
1-3 結果	
1-3-1: マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA の最適濃度検討	16
1-3-2: マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA の活性化開始速度の違い	18
1-3-3: マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA の活性化能及び発生能の比較	20
1-4: 考察	25
参考文献	27-28

第二章 PLC ζ -mRNA と円形精子細胞円形精子細胞の同時注入

2-1 序論	29
2-2 材料および方法	30
2-3 結果	
2-3-1: 細胞と PLC ζ -mRNA を同時に注入した際の注入量即定	32
2-3-2: 単為発生胚を用いた PLC ζ -mRNA の同時注入時における最適濃度検討	34
2-3-3: 円形精子細胞と PLC ζ -mRNA を同時に注入した際の脱凝縮率および活性化時間の測定	36
2-3-4: ROSI 胚を PLC ζ -mRNA により活性化させた際のエピジェネティクス修飾の変化	39
2-3-5: PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を同時に注入した際の発生率および胚盤胞の質	41
2-3-6: PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を同時に注入することが及ぼす産仔率への影響	44
2-4: 考察	46
参考文献	48

第三章 PLC ζ -mRNA と体細胞の同時注入による産仔作出

3-1 序論	50
3-2 材料および方法	51
3-3 結果	

3-3-1：体細胞核移植における PLC ζ -mRNA の最適濃度の検討	52
3-3-2：PLC ζ -mRNA を用いて体細胞核移植胚を活性化した際におけるエピジェネティクス修飾の変化	53
3-3-3：PLC ζ -mRNA を用いた体細胞核移植における産仔率	55
3-4：考察	59
参考文献	60
総括	62
論文内容の要旨	63
SUMMARY OF DISSERTATION	66
論文目録	71
謝辞	72

序章

1 卵子の活性化に関する先行研究と重要性

受精は卵子が発生する初期に行われる現象でありその際に引き起こされる先体反応、Ca²⁺ + オシレーションによる卵子の活性化、そして前核形成に至る。この過程でその後の発生に重要と考えられているのが、Ca²⁺ + オシレーションによる卵子の活性化である。卵子の活性化は受精時に精子がカルシウムの反復的な上昇（カルシウムオシレーション）を引き起こし、卵母細胞の MPF (M-phase promoting factor) 活性を減少させることで減数分裂の再開やその後の胚発生を促進する重要な事象である。卵子の活性化に関する歴史は長く、1991 年以前¹から卵子を活性化させる機構の解明に迫ってきた。卵子内の PH の変化や Ca 濃度の変化に着目し、現在では卵子内の Ca 濃度の変化が卵子の活性化に重要な働きを示していることが判明している。具体的な活性化の機構は、卵子内の Ca 濃度が上昇することにより CG(cortical granule)が放出される。その後 CG の放出後に透明帯応により多精子受精を拒否する働きをする。カルシウム濃度の上昇はユビキチン/プロテアソームに関連している。カルシウムはカルモジュリンと結合しカルモジュリン依存性キナーゼ II (CaMK II) を活性化する²。Ca 濃度の上昇が Cam/CaMK II と E3 ユビキチンリガーゼを活性化させることでユビキチン化された CyclinB の加水分解を促進させ、そして第二減数分裂中期を維持させる働きを持つ Cdk1/CyclinB1 を不活性化が起きた後に減数分裂の再開が始まる。

2 卵子活性化時のメカニズムと人為的活性化と精子による活性化の差

活性化方法には精子による活性化と人為的な活性化方法がありその機構は大きく異なる。精子が卵子を活性化させる場合、精子が卵子に侵入した後に、PLC ζ (phospholipase C zeta) が卵細胞膜や細胞小器官に存在するイノシトールリン脂質 (Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate;PIP₂) を加水分解し、ジアシルグリセロール (diacylglycerol; DAG) とイノシトール三リン酸 (Inositol 1,4,5-triphosphate;IP₃) が生成され、このうち IP₃ が小胞体にある IP₃ 受容体に結合することで小胞体内に蓄積されていた Ca²⁺が卵細胞質内に放出されることで引き起こされると考えられている³⁻⁶(図 1-1)。一方で人為的活性化の代表的なものである塩化ストロンチウムの活性化ではアデニル酸シクラーゼ VIII型の刺激や IP₃ 受容体の下方修正により卵子を活性化させることができると報告がある⁵。そのような活性化開始時期に起こるシグナル伝達経路の差により、発生率や産仔率に差が生じているのかもしれない。

3 PLC ζ とその他ファミリーの構造に関する報告

EF ハンドドメインとは PLC ζ の N 末端につくドメインのことで EF1-EF-4 まで存在する。また核局在のシグナルが 374-381 の X/Y リンカー領域に存在する。この核移行シグナルは Arg376,Lys377,Arg378,Lys379 をグルタミン酸に置換することでその機能を失うが、オシレーションの能力は維持される。また PLC ζ は PH ドメインを持っておらず、PH ド

メインを持つ他の PLC は数多く存在している⁷。そのなかの PLC δ は PLC ζ に近い構造を持つが、PH ドメインを持っていることが異なる点である。加えて PLC δ はカルシウム結合部位である EF-hand ドメインだけでなく X,Y ドメイン加えて C2 ドメインを持っている⁸。だが PLC ζ は 100 倍以上カルシウムに対する感受性が PLC δ よりも高い。つまり PLC ファミリーの中で最も高い活性化率を示したのが PLC ζ なのである。Ca-の活性が通常の PLC ζ よりも低下することが分かっている短鎖の PLC ζ -mRNA(EF1-EF3 を欠損) による活性化で産仔が得られることは確認されている⁹。

4 人為的活性化の問題点と改善策および PLC ζ -mRNA を使用した卵子活性化の研究の歴史

人為的活性化は塩化ストロンチウムによる活性化や電気刺激、イオノフォアによるものがある。しかしこれらの活性化によって活性化された胚は新鮮精子による受精よりも産仔率が低下する。つまり卵子の活性化方法の違いが産仔率に影響を与えている可能性があると考えられている。そこで PLC ζ を用いて卵子を人為的に活性化させることができれば、通常の受精に近い活性化機序で卵子を活性化させることが可能になる。しかしながら PLC ζ のタンパク質を精製することは困難であるため、PLC ζ -mRNA を用いて活性化を行う検討が行われてきた。

現在生殖補助技術として知られる円形精子細胞注入法(Round spermatid injection: ROSI) は生殖能力が低い実験動物や精子形成に異常を持つ不妊患者などの応用が期待されている¹⁰。しかしながら精子細胞は成熟した精子と異なり活性化能を持たないため、人為的な活性化が必要となる。このような人為的活性化はクローン作出にも利用されており活性化方法の改良は不妊治療の現場や畜産の分野において必要とされている。卵子を活性化する最適な方法は種によって異なり、マウスでは塩化ストロンチウムによる活性化が有効である一方でウシやブタでは電気パルスによる活性化が有効である。2002 年に、Saunders らはカルシウムオシレーション誘起能を有する卵子活性化因子の候補として PLC ζ を同定した¹¹。種に関係なく PLC ζ -mRNA を卵子に注入することで卵子が活性化されることが報告されており哺乳類間で PLC ζ は卵子において共通の活性化因子として用いることができると考えられている¹²⁻¹⁵。

PLC ζ は多くの脊椎動物で保存されていることが知られているが、その特徴は種によって異なる。Sato らはウマ PLC ζ がマウス PLC ζ に比べ 3 倍以上の頻度で Ca²⁺濃度の上昇を引き起こすことを報告している¹⁶。Ca²⁺オシレーション中における Ca²⁺濃度が上昇して元の Ca²⁺濃度に戻るまでを示すカルシウムスパイク (Ca²⁺スパイク) の数は活性化や遺伝子発現、発生に影響を与えると報告されている¹⁷。

そこで本研究の第一章では、哺乳類で最も強い活性化能を持つとされているウマ PLC ζ -mRNA をマウス卵子に用いることと注入方法の最適化を試みた。第二章では、PLC ζ -

mRNA の活性化方法の検討および円形精子細胞注入法への応用をおこなった。第三章では二章で行った実験が体細胞核移植に応用可能かどうかの検討を行った。

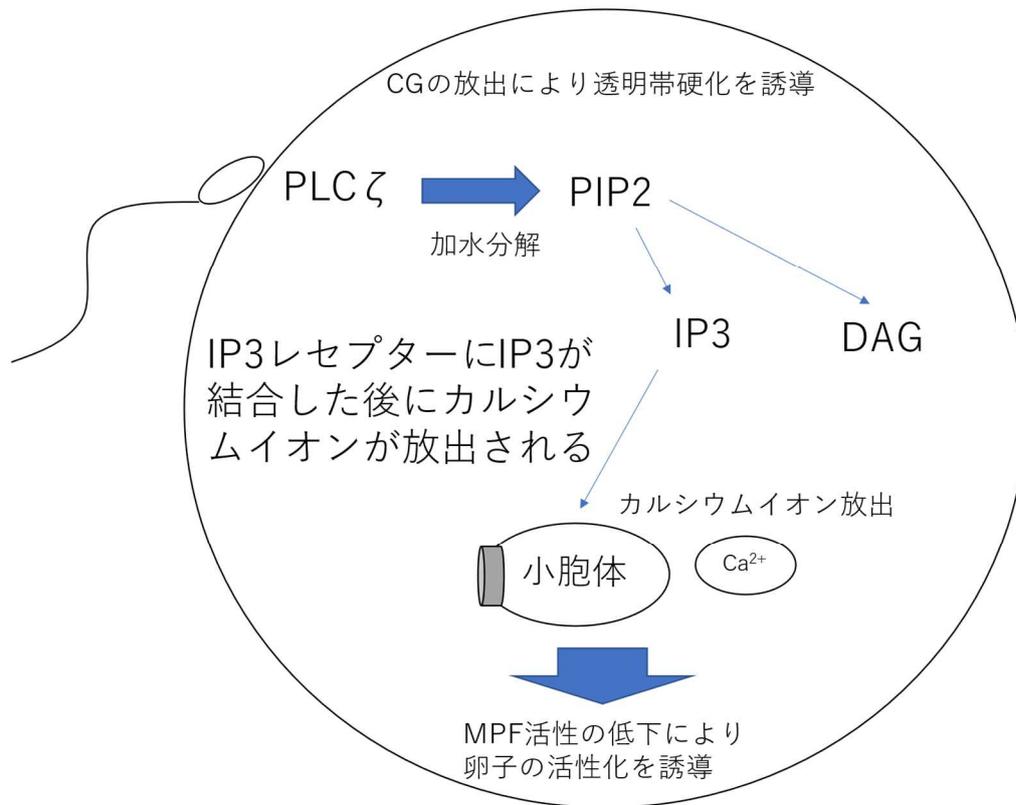


図 1-1 PLCζが卵子を活性化させる際の作用機序

精子が卵子内に侵入した際の活性化機序を示す。PLCζは卵子内に侵入後 PIP2 を加水分解することで IP3 と DAG に分解する。そこで生産された IP3 が小胞体に存在する受容体に結合することでカルシウムイオンの放出を促す。それにより卵子の MPF 活性を低下させ卵子の活性化が起こる。その結果 CG(cortical granule) が透明帯硬化により多精子受精を防ぐ働きをする。

参考文献

1. Nuccitelli, R. 1 How do Sperm Activate Eggs? in *Current Topics in Developmental Biology* (ed. Bode, H. R.) vol. 25 1–16 (Academic Press, 1991).
2. Lorca, T. *et al.* Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* **366**, 270–273 (1993).
3. Miyazaki, S. *et al.* Block of Ca²⁺ wave and Ca²⁺ oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science* **257**, 251–255 (1992).
4. Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K. & Honda, Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev. Biol.* **158**, 62–78 (1993).
5. Jellerette, T., He, C. L., Wu, H., Parys, J. B. & Fissore, R. A. Down-regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in mouse eggs following fertilization or parthenogenetic activation. *Dev. Biol.* **223**, 238–250 (2000).
6. Yoneda, A. *et al.* Molecular cloning, testicular postnatal expression, and oocyte-activating potential of porcine phospholipase C ζ . *Reproduction* **132**, 393–401 (2006).
7. Kouchi, Z. *et al.* The role of EF-hand domains and C2 domain in regulation of enzymatic activity of phospholipase C ζ . *J. Biol. Chem.* **280**, 21015–21021 (2005).
8. Fukami, K. Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J. Biochem.* **131**, 293–299 (2002).

9. Nakanishi, T. *et al.* Birth of Normal Offspring from Mouse Eggs Activated by a Phospholipase C ζ Protein Lacking Three EF-hand Domains. *J. Reprod. Dev.* **54**, 244–249 (2008).
10. Ogura, A., Matsuda, J. & Yanagimachi, R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7460–7462 (1994).
11. Saunders, C. M. *et al.* PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* **129**, 3533–3544 (2002).
12. Cox, L. J. *et al.* Sperm phospholipase Czeta from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* **124**, 611–623 (2002).
13. Coward, K. *et al.* Phospholipase Czeta, the trigger of egg activation in mammals, is present in a non-mammalian species. *Reproduction* **130**, 157–163 (2005).
14. Miura, K. *et al.* Application of auxin-inducible degron technology to mouse oocyte activation with PLC ζ . *J. Reprod. Dev.* **64**, 319–326 (2018).
15. Yamamoto, Y. *et al.* Production of mouse offspring from inactivated spermatozoa using horse PLC ζ mRNA. *J. Reprod. Dev.* **66**, 67–73 (2020).
16. Sato, K. *et al.* Molecular characteristics of horse phospholipase C zeta (PLC ζ). *Anim.*

Sci. J. **84**, 359–368 (2013).

17. Ozil, J.-P., Banrezes, B., Tóth, S., Pan, H. & Schultz, R. M. Ca²⁺ oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Dev. Biol.* **300**, 534–544 (2006).

第1章 ウマ PLC ζ による卵子の活性化

1-1 序論

ウマ PLC ζ -mRNA による卵子の活性化

精子が持つ主要な活性化因子が PLC ζ だと判明してから、数多くの哺乳類が PLC ζ を有することが分かってきた。今まで PLC ζ が確認されている哺乳類は、ラット、ブタ、サル、ヒト、ウシ、ウマなどの哺乳類で PLC ζ が受精時のカルシウムオシレーションに重要な働きを示していることが分かっている¹⁻⁴。そしてそのカルシウムオシレーションの波長は種ごとに異なった波形を示す。

その原因は種で保存されている PLC ζ のアミノ酸配列に差があるためであると考えられる。それぞれマウス、ウシ、ヒト、ウマの PLC ζ のアミノ酸の長さは 639aa、627aa、601aa、621aa と微細ながら差がある⁵。この差が卵子を活性化させる能力に差を与えているのかもしれない。そして興味深いことに、アミノ酸配列の長さは活性化能力に比例していない。上述のようにマウス PLC ζ の方が、ウマの PLC ζ よりもアミノ酸配列としては長鎖であるにも関わらず、活性化時のオシレーションの頻度はウマ PLC ζ のほうが高い頻度で起きている。すでに PLC ζ のアミノ酸配列の 85% はほかの哺乳類と同等であるが、なぜウマ PLC ζ が他の哺乳類の PLC ζ よりも強いオシレーションを示すかは明らかとなっていない⁵。

また卵子の活性化に関係するドメインとしていくつかあげられるものがあり、それは PH ドメイン、C2 ドメイン、EF ハンドドメインがあげられる。これらのドメインの有無によりオシレーションの波に大きな差が生じることが分かっている⁶。これは PLC ファミリーにも共通していることで、PLC ζ のファミリーには PLC β 、PLC γ 、PLC δ などが存在するが、それらは PLC ζ よりも長いアミノ酸配列を有しているが卵子を活性化させる際のオシレーション能力は PLC ζ に劣っている。その大きな違いは PLC ζ のみが PH ドメインを持たない点であるが、なぜ PH ドメインを持たないとオシレーションの能力が上がるかは分かっていない。

現在 PLC ζ がこれらのファミリーの中でオシレーションを起こす能力が最も高いことが分かっているが、その中でもウマ PLC ζ が最もその能力に長けているため、哺乳類における卵子活性化において最適な活性化方法になるかもしれない。そこで本研究は、ウマ PLC ζ を用いた活性化がその後の胚発生に及ぼす影響を調べる目的で発生率および産仔率を調査した。

1-2 材料および方法

1-2-1 マウス

雌マウスは8週齢以上のマウスを使用した。雄マウスはICR系統の雄マウス(10週齢)のものを使用した。BDF1系統のマウスは8週齢をSLCから購入し使用した。

1-2-2 ホルモン調製

10 cm ディッシュに60 mlの生理食塩水を入れ、セロトロピンおよびゴナトロピンを溶かした液を50 ml シリンジを用いて完全に溶かした。1.5 ml エッペンチューブに分注して-30°Cの冷凍庫で保管し、使用前に4°Cの冷蔵庫に入れて溶かした。

1-2-3 採卵

過排卵処理を行ったマウスから卵管を採取した。先端ピンセットで卵管膨大部を裂き、ディッシュ上で1% ヒアルロニダーゼ含有 HEPES-CZB ドロップの中に卵丘卵母細胞複合体を入れて2分程度静置した⁷。卵丘細胞が剥がれた卵子はマウスピペットでHEPES-CZBドロップに移動した。HEPES-CZBドロップで卵子を2回洗った後、あらかじめインキュベーターで温めたCZBドロップディッシュに移動してインキュベーターで培養した(5% CO₂、37°C、100% 湿度)⁸。

1-2-4 鋳型 DNA の直鎖化および鋳型の精製

プラスミドはpCS2(+)-mPLC ζ およびpCS2(+)-ウマ PLC ζ を使用した。鋳型のDNAが5 μ gになるようにDNA溶液をとり、10×High buffer、BSA、TritonXを5 μ lずつ加えた。さらに制限酵素であるNot Iを3 μ l加え、最終液量が50 μ lになるようにnuclease free waterを加えて37°Cで3時間以上酵素処理を行い、直鎖化した。その後1%アガロースゲルで酵素未処理のDNAと一緒に電気泳動を行い、直鎖化を確認した。その後48.5 μ lの直鎖化したDNA溶液に151.5 μ lのnuclease free waterを加えて、200 μ lにし、200 μ lのフェノールクロロフォルムイソアミルアルコールを加えてボルテックスで混合した後に、15000 rpm、4°Cで15分間遠心分離した。遠心分離後、上清を200 μ l新しいエッペンチューブに移し、クロロフォルムイソアミルアルコールを200 μ l加えてボルテックスで混合し、15000 rpm、4°Cで15分間遠心分離した。再び上清を200 μ l新しいエッペンに移し、酢酸ナトリウム20 μ lとエタ沈メイトを1.5 μ l加えて、ボルテックスで混合し、4°Cの100%エタノールを550 μ lを加えて再びボルテックスで混合し、15000 rpm、4°Cで15分間遠心分離しDNAを沈殿させた。ペレットの位置を確認して上清を取り除き、4°Cの70%エタノールを700 μ lを加えて5分間遠心分離した。再び上清を捨て、乾燥させた後7 μ lのnuclease free waterでDNAを溶解し、濃度を測定した。

1-2-5 mRNA の合成および精製

精製した直鎖上プラスミド DNA を鋳型として mMessage mMachine® sp6 kit (Life technologies)を用いて mRNA の合成を行なった。すなわち、DNA 溶液が 1 µg になるような量の DNA 溶液をエッペンチューブに取り、10X Reaction Buffer を 2 µl、2X NTP/CAP を 10 µl、Enzyme Mix を 2 µl 加え、最終液量が 20 µl になるように nuclease free water を加えた。その後タッピングで混合し、37°C で 2 時間インキュベーションした。次に Turbo DNase を 1 µl 加え、37°C で 30 分間インキュベーションした。合成した 20 µl の mRNA に nuclease free water を 36 µl 加え、Poly(A) Tailing Kit (Life technologies)を用いて Poly A の付加を行った。すなわち、MnCl₂ を 10 µl、5X E-PAP Buffer を 20 µl、E-PAP を 4 µl、ATP Solution を 10 µl 加え、37°C でインキュベーションした。その後 PolyA を付加した mRNA に、塩化リチウム沈殿溶液を 60 µl 加え、ボルテックスで混合させ -20°C で 30 分間放置した。その後 15000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を取り除き 700 µl の 70% エタノールを加え再び 15000 rpm で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を捨て 7 分間乾燥させ、ペレットを 30 µl の nuclease free water を加え 65°C で 10 分間溶解した。濃度を測定し、1 µl を poly A tail 後として polyA 前と一緒に 1% アガロースゲルで電気泳動し Poly A の有無を確認した。精製した mRNA は 500 ng/µl の濃度に希釈して 2 µl ずつ分注して -80°C で保存した。

1-2-6 mRNA の注入

mRNA は使用時に nuclease free water で目的の濃度になるように希釈した。マウス PLC ζ はそれぞれ 10、1、0.1 ng/µl、ウマ PLC ζ は 1、0.1、0.01 ng/µl の濃度とした。10cm ディッシュに Hepes-CZB 含有 10% ポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone : PVP) と Hepes-CZB のドロップをつくり間に 2 µl のドロップをつくった。ミネラルオイルでドロップを覆い、マイクロマニピュレーターの作業台に移動した。インジェクション針は、マイクロフォージのガラス玉で先端を小さく折ったもの (直径 1-3 µm) の後ろ側から水銀を入れたものを使用した。PVP のドロップではピエゾを用いて針の先端まで水銀を出した。インジェクション針の中に少量のミネラルオイルを吸い、その後 mRNA を吸った。ピエゾを用いて Hepes-CZB ドロップ中で MII 卵の透明帯と細胞膜をピエゾで破り、数 pl の mRNA を細胞質に注入した。mRNA 注入後の卵子は 5-10 分間作業台の上で休ませてから、100 µl の CZB に 500 µM/ml の濃度のサイトカラシン B (cytochalasin B ; CB) を 2 µl を混合させた培地で 6 時間 2 倍体処理を行った。CZB 卵子を洗浄し、インキュベーターで 96 時間まで培養した (37°C、5% CO₂、100% 湿度)。

1-2-7 培地

CZB

ミリ Q に図 1 の薬品を加えてストック液を作製した。一晩冷蔵庫で静置して、フィルター (Corning Incorporated、500 ml) を用いて滅菌した。49.5 ml のストック液に以下の薬品を加えて一晩冷蔵庫内で静置した。0.22 µm フィルター

(MILLEX)を用いて滅菌を行い、アシストチューブ(ザルスタット株式会社)に分注して冷蔵庫で保管した。CZB 培地は卵子や胚の培養、卵管移植時の移植用培地として使用した。

Hepes-CZB

ミリ Q に図 1 の薬品を加えてストック液を作製した。一晩冷蔵庫で静置して、フィルター滅菌した。0.22 μm フィルターを用いて 50 μl ずつ滅菌を行い、アシストチューブに分注して冷蔵庫で保管した。Hepes-CZB 培地は採卵や ROSI のインジェクション用の培地として使用した。

HTF

ミリ Q に図 1 の薬品を加えてストック液を作製した。一晩冷蔵庫で静置して、フィルター滅菌した。49.5 ml のストック液に以下の薬品を加えて一晩冷蔵庫内で静置した。0.22 μm フィルターを用いて滅菌を行い、アシストチューブに分注して冷蔵庫で保管した。HTF 培地は精子の前培養と精細管懸濁液の作製に使用した。

Ca²⁺フリーCZB

CZB 作成時に CaCl₂ を添加せず、他は CZB 同様にフィルター滅菌したものを使用した。

1-2-8 卵子の活性化

マウス PLC ζ およびウマ PLC ζ による活性化は mRNA 注入により行った。コントロールとして卵子を 5 mM SrCl₂ 含有 Ca²⁺フリーCZB ドロップに入れて 30 分間活性化を行った。活性化後に卵子を CZB ドロップに静置し、ICSI は活性化終了から 1 時間以内に行った。

1-2-9 精子の採取と NaOH 処理

精巣上体尾部は ICR 系統と BDF1 系統の雄マウス(10 週齢)から採取した。精巣上体尾部の管をハサミで切って精子塊をエッペンチューブに入った 100 μl の HTF に採り、37.0°C でインキュベートした。精子懸濁液 10 μl を 10 mM の NaOH 溶液 100 μl と混合して 30 分室温で放置した。30 分後 10 mM の HCl を混合し、中和して使用した。

1-2-10 ICSI

PVP と Hepes-CZB で作ったドロップをミネラルオイルで覆い、マイクロマニピュレーターの作業台に移動した。インジェクション針は MICRO FORGE で内径を約 6 μm に切断し、後ろ側から水銀を入れたものを使用した。新鮮精子をインジェクションする際は、PVP のドロップに精子懸濁液を 1 μl 加えた。精子頭部と尾部をピエゾパルスで分離して頭部だけを MII 卵にインジェクションした。NaOH 処理した精子をインジェクションする時は、

NaOH 処理後中和した精子を PVP に 2 μ l 混ぜ、頭部と尾部が分離している精子だけを活性化後の Telophase II または Anaphase II の卵子にインジェクションした。精子頭部注入後の卵子は 5-10 分間作業台の上で休ませてから、注入前に卵子を培養していた CZB 培地のデイスシュに移動して 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、100% 湿度の気相条件のインキュベーターで 24 時間または 96 時間まで培養した。

1-2-11 胚移植

ICR マウスをレシピエントとして使用し、活性化から 24 時間後の 2cell 胚を 0.5 日目の偽妊娠マウスに胚移植した。レシピエントは胚移植前に精管結紮マウスと交尾させ、膣栓が確認できたものを使用した。それぞれの卵管の移植数が 4~9 個になるように移植した。その後 18.5 日目のレシピエントを帝王切開し、胎子を取り出した。

1-2-12 統計分析

χ^2 検定を用いて活性化後 96 時間の活性化率と胚盤胞発生率の有意差検定を行った。

CZB 培地

Component	mg/100 ml
ストック	mg/100 ml
NaCl 【wako】	476.00
KCl 【wako】	36.00
KH ₂ PO ₄ 【wako】	29.00
NaHCO ₃ 【wako】	16.00
2Na(EDTA · 2Na) 【DOJIDO】	4.00
D-Glucose 【wako】	211.00
MgSO ₄ · 7H ₂ O 【wako】	0.53 ml
Penicillin G 【wako】	100.00
STREPTOMYCIN 【ICN Biochemicals Inc】	5.00
sodium DL-lactate 【SIGMA】	7.00
Phenol Red sodium salt 【SIGMA】	適量
エナジーソース	
Na-pyruvate 【wako】	1.60
L-Glutamine 【SIGMA】	7.70
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.5 ml
BSA 【SIGMA】	250.00

HTF 培地

Component	mg/100 ml
ストック	mg/100 ml
NaCl 【wako】	581.70
KCl 【wako】	35.00
MgSO ₄ · 7H ₂ O 【wako】	5.00
KH ₂ PO ₄ 【wako】	5.00
NaHCO ₃ 【wako】	210.00
Phenol Red sodium salt 【SIGMA】	適量
エナジーソース	
D-Glucose 【wako】	25.00
Na-pyruvate 【wako】	1.80
Na-lactate 【SIGMA】	0.2 ml
Penicillin G 【wako】	5.00
Hypotaurine 【SIGMA】	5.50
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.5 ml
BSA 【SIGMA】	150.00

Hepes-CZB 培地

Component	mg/100 ml
NaCl 【wako】	476.00
KCl 【wako】	36.00
MgSO ₄ · 7H ₂ O 【wako】	29.00
KH ₂ PO ₄ 【wako】	16.00
2Na(EDTA · 2Na) 【DOJIDO】	4.00
NaHCO ₃ 【wako】	42.00
Na-lactate 【SIGMA】	0.53 ml
Hepes · Na(basic) 【SIGMA】	520.00
D-Glucose 【wako】	100.00
Na-pyruvate 【wako】	3.00
L-Glutamine 【SIGMA】	15.00
Penicillin G 【wako】	5.00
STREPTOMYCIN 【ICN Biochemicals Inc】	7.00
PVA 【SIGMA】	10.00
Phenol Red sodium salt 【SIGMA】	適量

図 1-1 本実験に使用した各培地の組成

1-3 結果

1-3-1：マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA の最適濃度検討

まずマウス PLC ζ -mRNA とウマ PLC ζ -mRNA を卵子に注入する際の最適濃度を定めるための濃度検討を行った。マウス PLC ζ -mRNA の濃度を 0.1、1、10 ng/ μ l、そしてウマ PLC ζ -mRNA を 0.01、0.1、1 ng/ μ l に定め、活性化率とその後の発生率を調査した。mRNA により卵子を活性化した後にサイトカラシン B を含む CZB で 6 時間 2 倍体化処理をした胚の観察を 4 日間行った。結果として、マウス PLC ζ -mRNA において 0.1ng/ μ l 区で 18.5%と低い活性化率を示し、1ng/ μ l、10ng/ μ l では 93.8%、96.0%をそれぞれ示した(図 1-2A)。一方で、ウマ PLC ζ -mRNA では 0.01ng/ μ l で 21.5%の活性化率を示し、0.1ng/ μ l と 1ng/ μ l において、88.5%と 97.9%と高い活性化率を示した(図 1-2B)。図表の番号は各章の番号に続ける)

その後活性化された胚を 4 日間観察し、胚盤胞までの発生率を調べた。マウス PLC ζ -mRNA において、0.1 ng/ μ l では全期間において低い発生率を示した。そして 1ng/ μ l と 10ng/ μ l で桑実胚までの発生率に差は見られなかったが、10 ng/ μ l 区では胚盤胞発生率の低下が示された(図 1-2C)。また、ウマ PLC ζ -mRNA において、0.01 ng/ μ l と 1ng/ μ l の両区において、どの段階においても低い発生率を示した。しかし、0.1ng/ μ l 区において、77.2%の胚が桑実胚へと発生し、52.7%の胚が胚盤胞へと発生した(図 1-2D)。

結果として、マウス PLC ζ -mRNA の最適濃度を 1 ng/ μ l、ウマ PLC ζ -mRNA の最適濃度を 0.1 ng/ μ l として今後の実験を行うことにした。

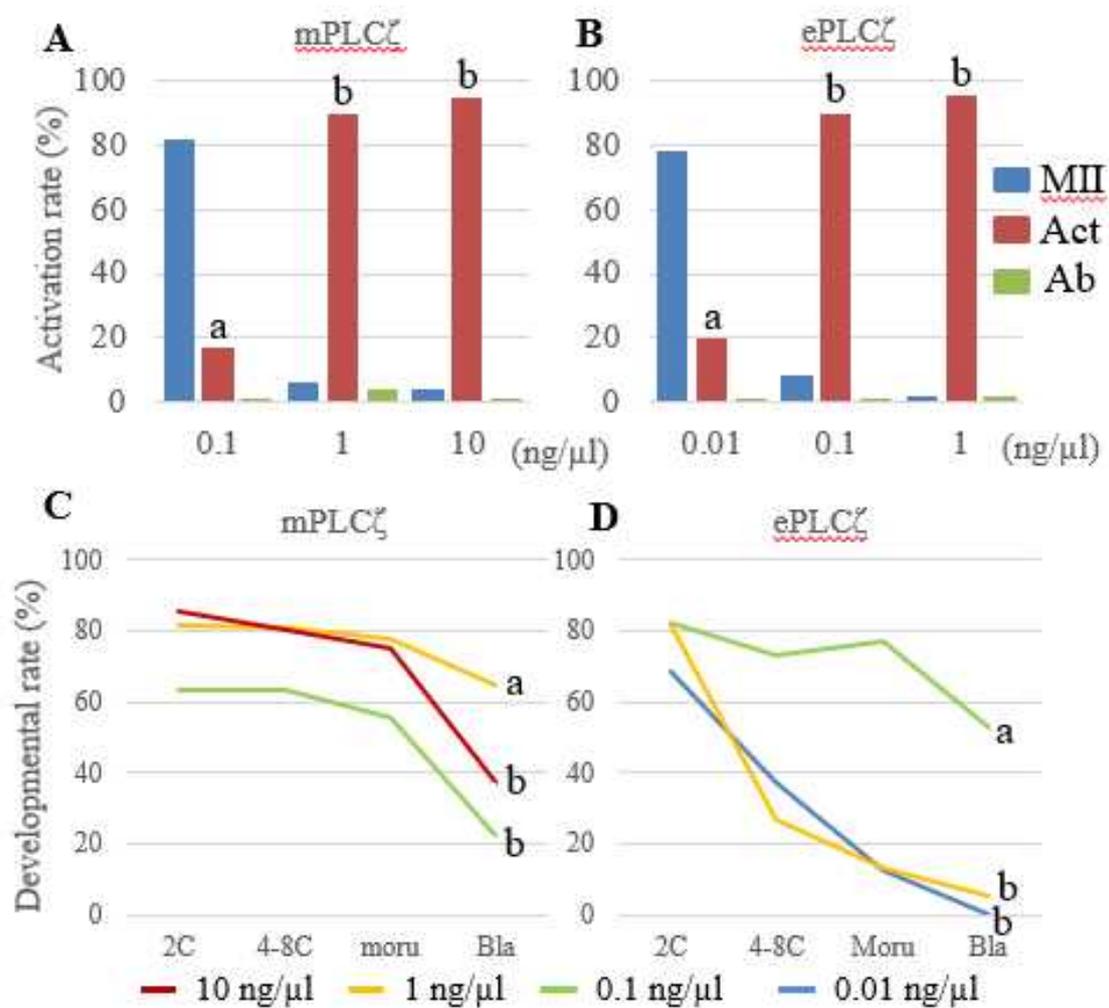


図 1-2 マウス PLCζ-mRNA およびウマ PLCζ-mRNA の活性化率と発生率

(A) 0.1, 1, 10 ng/μl の濃度のマウス PLCζ-mRNA を用いた際における活性化率。(B) 0.1, 1, 10 ng/μl の濃度のウマ PLCζ-mRNA を用いた際における活性化率。(C) 0.1, 1, 10 ng/μl の濃度のマウス PLCζ-mRNA を用いた際における発生率。(D) 0.1, 1, 10 ng/μl の濃度のウマ PLCζ-mRNA を用いた際における発生率。

1-3-2：マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA の活性化開始速度の違い

不活性化した精子の最適な注入時期を調べるために、マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA の注入後からの極体放出までの時間を測定した。注入後の卵子はそれぞれ MII、A/TII、および極体放出の3つに分類を行った(図 1-3 A)。図より、マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA の活性化開始時間は 120~145 分後に活性化が見られた(図 1-3 B,C)。したがって、不活性化精子の注入は PLC ζ -mRNA の注入後に行うことにした。

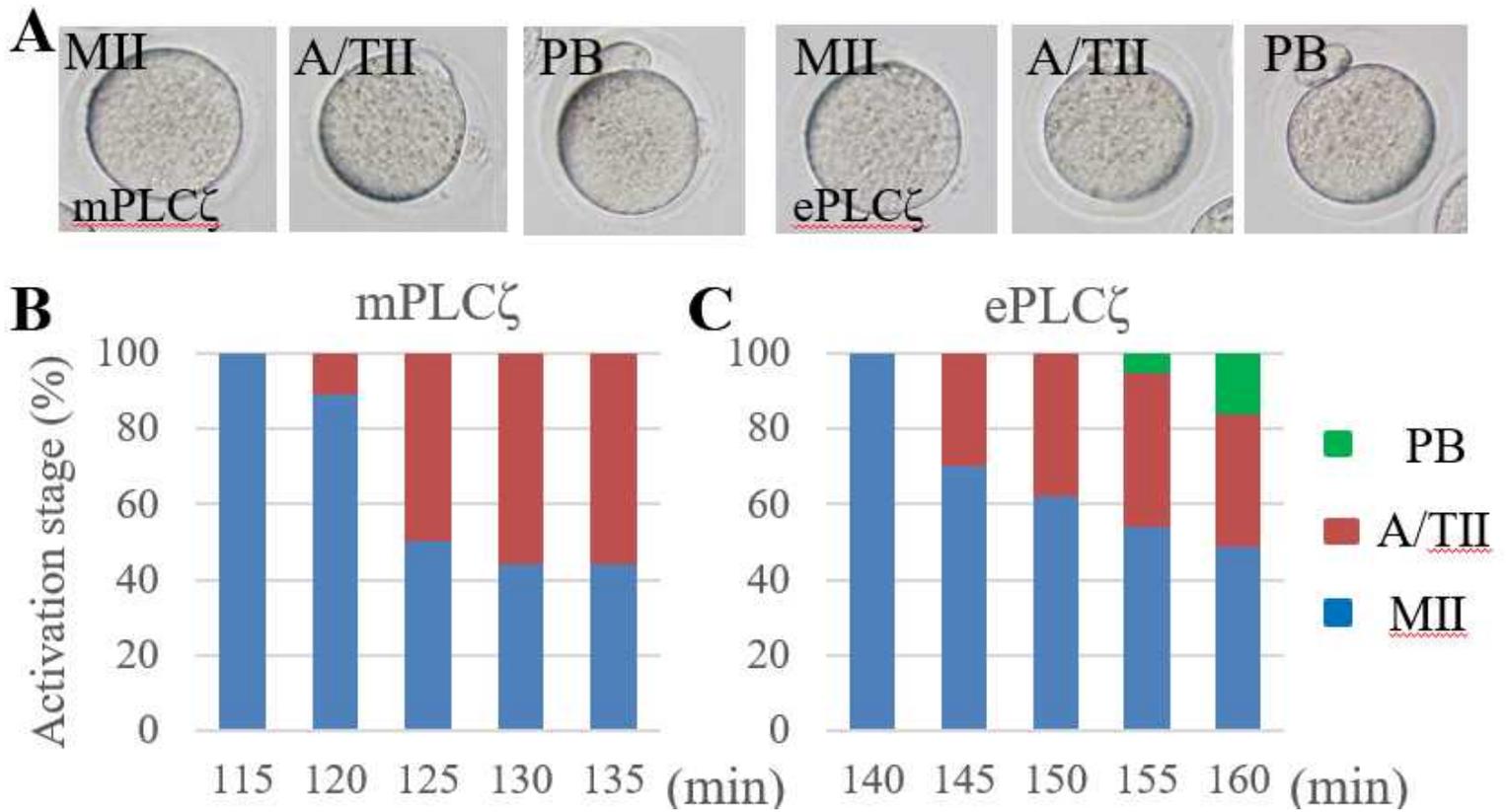


図 1-3 マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA の活性化開始速度の違い

(A-C) マウス PLC ζ -mRNA またはウマ PLC ζ -mRNA を注入した卵子の形状および減数分裂の再開。(A) マウス PLC ζ -mRNA またはウマ PLC ζ -mRNA を注入後、115, 135, 140, 160 分で観察した際の卵子の形状。(B, C)それぞれ区分したステージの割合(PB; 極体放出, A/TII; Anaphase/Telophase II, MII; Meiosis II)

1-3-3：マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA の活性化能及び発生能の比較

次に最適濃度とした PLC ζ -mRNA を用いて不活性化処理を行った精子の顕微授精を行い、発生率および産仔率の検討を行った。実験区は、無処理の精子、不活性化処理をした精子、不活性化処理精子+マウス PLC ζ -mRNA、不活性化処理精子+ウマ PLC ζ -mRNA、不活性化処理精子+塩化ストロンチウムによる活性化で行った。無処理の精子では精子注入後からおよそ6時間後に95%の卵子が活性化した。一方で不活性化処理を行った精子のみ注入した区では、ほとんどの卵子はMII期で停止していた。そしてマウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA を注入した区ではそれぞれ94%、88%の卵子が活性化した。

次に体外培養の結果として、表 1-1 にあるように、マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA それぞれで51%、53%の胚が胚盤胞へと発生した。しかしながら塩化ストロンチウムで卵子を活性化した場合は40%の発生率でありこれらの区で有意な差はみられなかった。BDF1 マウスを用いた場合においても同様な結果が得られた。そしてこれらの胚盤胞を免疫染色により染色したのちにICMとTEの細胞数計測を行った。その結果、マウス PLC ζ およびウマ PLC ζ の胚盤胞の細胞数に差はみられなかった(図 1-4)。

最後に、2細胞期胚をレシピエントマウスに移植を行い産仔率の検討を行った。表 1-2 にあるように、マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA で正常な産仔が得られた(図 1-5)。無処理の精子、マウス PLC ζ -mRNA、塩化ストロンチウムの産仔率はそれぞれ46%、37%、40%であったが、ウマ PLC ζ -mRNA の産仔率は24%となり他の区と比較して有意に産仔率が減少した。

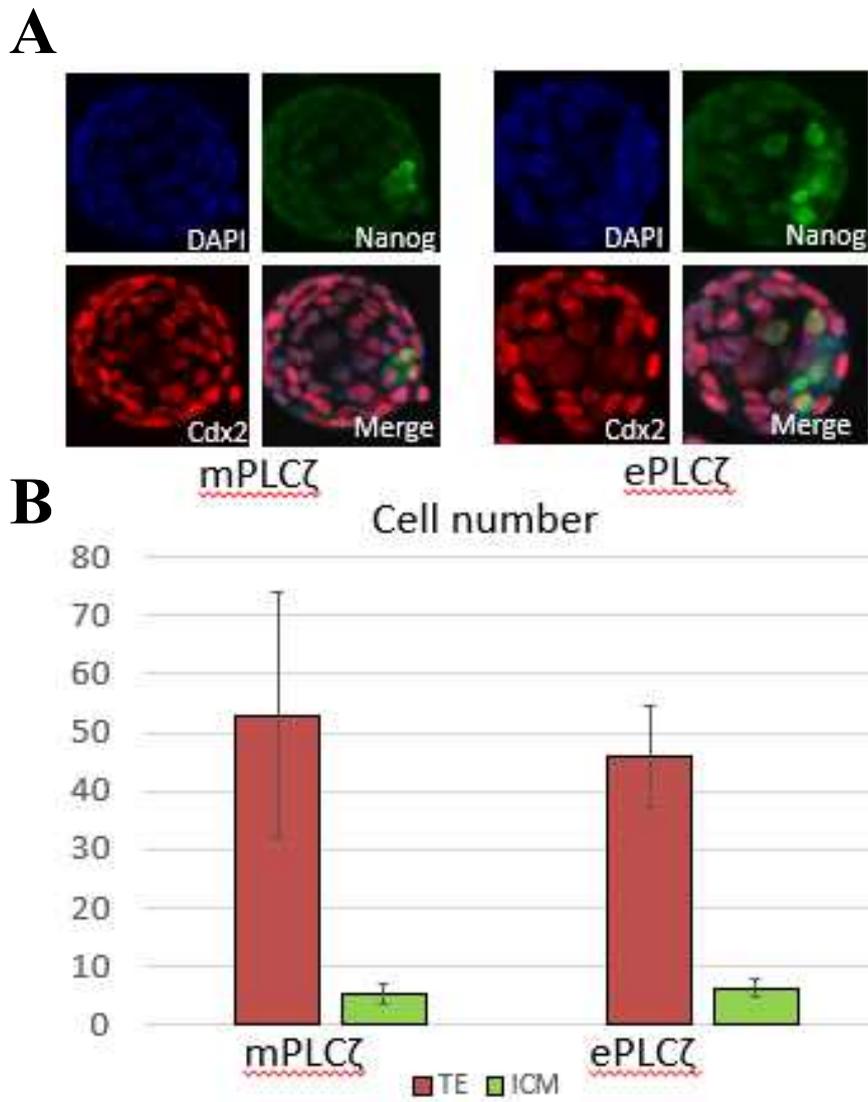


図 1-4 マウス PLC ζ -mNA およびウマ PLC ζ -mRNA で活性化させた際の細胞数
 (A) CDX2+cell(TE;trophectoderm)は赤で染色し、Nanog+cell(ICM;inner cell mass)は緑で染色し細胞数の計測に使用した。(B) 胚盤胞の TE と ICM の細胞数における平均値

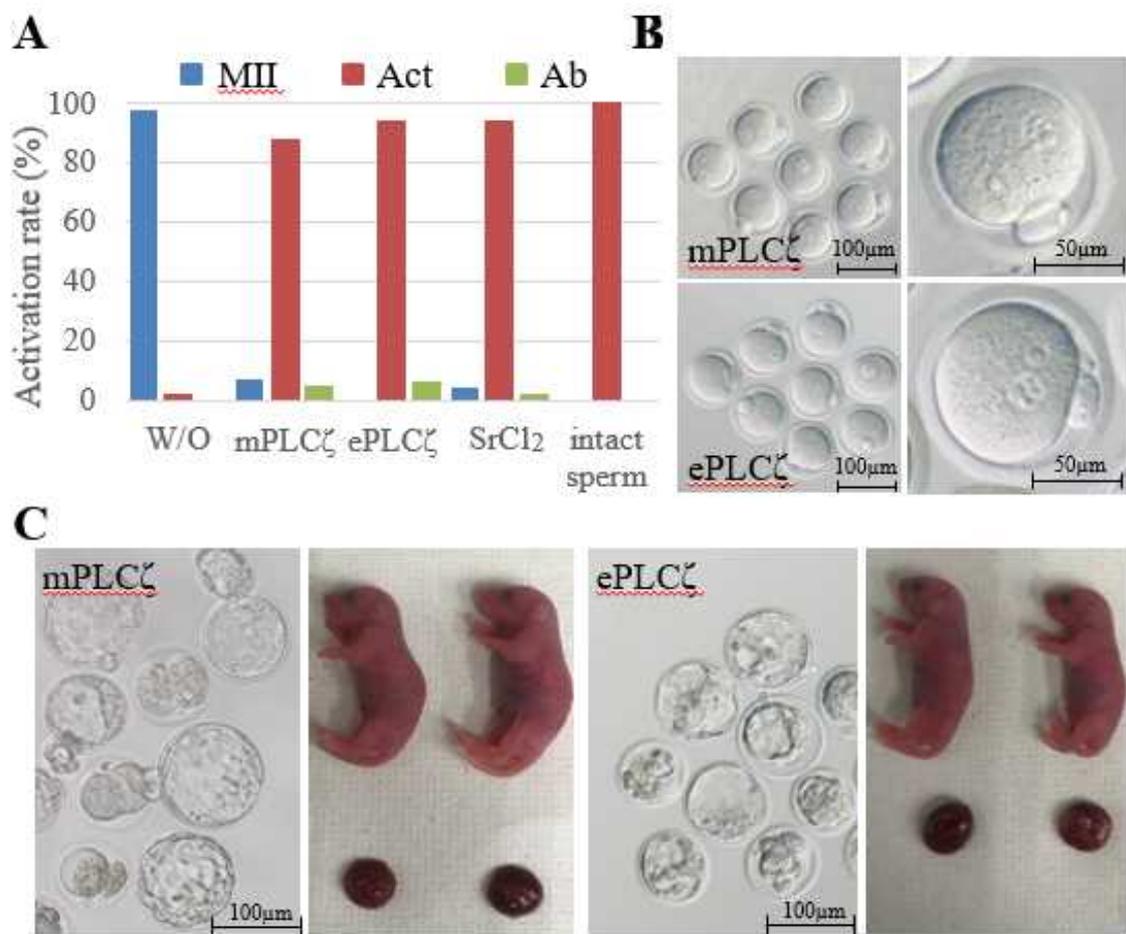


図 1-5 マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA で活性化させた際の活性化率および得られた産仔

(A, B) マウス PLC ζ -mRNA、ウマ PLC ζ -mRNA、塩化ストロンチウムにより不活性化処理を行った精子を活性化させた際の活性化率及び前核の形成。(C) マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA により活性化させた胚の胚盤胞および胎児。

表 1-1 マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA で活性化させた際の胚盤胞発生率

Mouse strain	Oocyte activation method	Sperm treatment	No. of fertilized embryos	No. of 2cell embryos at 24 h (%)	No. of 4-8cell embryos at 24 h (%)	No. of morula /blastocysts at 24 h (%)	No. of expanded blastocysts at 24 h (%)
ICR	-	Intact	57	56 (98)	48 (84)	47 (82)	37 (65) ^a
	mPLC ζ	NaOH	84	73 (87)	68 (81)	66 (79)	43 (51)
	ePLC ζ	NaOH	60	58 (97)	55 (92)	53 (88)	32 (53)
	SrCl ₂	NaOH	85	81 (95)	65 (76)	61 (72)	34 (40) ^b
BDF1	-	Intact	26	25 (96)	24 (92)	24 (92)	19 (73) ^a
	mPLC ζ	NaOH	52	45 (87)	37 (71)	36 (69)	25 (48) ^b
	ePLC ζ	NaOH	48	43 (90)	38 (79)	36 (75)	25 (52) ^b
	SrCl ₂	NaOH	32	25 (78)	24 (75)	24 (75)	14 (44) ^b

*a vs b, P <0.05

表 1-2 マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA で活性化させた際の産仔率

Oocyte activation method	Sperm treatment	No. of fertilized embryos	No. (%) of 2-cell embryos at 24 h	No. of transferred embryos	No. (%) of offspring
-	Intact	184	176 (96)	165	76 (46) ^a
mPLC ζ	NaOH	217	156 (72)	116	43 (37) ^a
ePLC ζ	NaOH	204	187 (92)	173	41 (24) ^b
SrCl ₂	NaOH	145	119 (82)	114	46 (40) ^a

*a vs b, P <0.05

1-4 考察

本研究で初めてウマ PLC ζ -mRNA を注入する活性化によって不活性精子から正常なマウス産仔を得ることができた。これまで、マウス PLC ζ を用いて産仔を得た研究は主に円形精子細胞を用いて得られていた。だが円形精子細胞を用いて産仔率の検討を行う実験では、円形精子細胞がもつ異常により、活性化因子に関する検討が純粋に行うことはできていない。本研究は不活性化処理を行った精子を使用しているため活性化因子の検討を純粋に行うことができているといえる。

ウマ PLC ζ -mRNA はマウス PLC ζ -mRNA よりも活性化能力が約 10 倍高いことが今回の実験結果から明らかとなった。しかしながらマウス PLC ζ -mRNA、ウマ PLC ζ -mRNA とともに、胚発生に最適な濃度が存在することが示された。PLC ζ -mRNA が活性化に要する濃度に最適な濃度が存在することはすでに報告されている⁹。ウマ PLC ζ -mRNA は卵子内でオシレーションを誘導後、細胞質中に滞留することが分かっている¹⁰。一方でマウス PLC ζ -mRNA はオシレーションの誘導後に核内に移動することでオシレーションを停止させる。この違いによりマウス PLC ζ -mRNA とウマ PLC ζ -mRNA の間に活性化に要する濃度に差が生じると考えられる。ウマ PLC ζ -mRNA の転写効率の違いやタンパク質の機能効率の差が影響を与えている可能性もあるため、より今後の検討が求められる。

本実験では哺乳類において高い活性化能を持つウマ PLC ζ -mRNA を用いて NaOH 処理を行った精子での顕微授精を行った。その結果、胚盤胞までの発生率には差が見られなかったが、ウマ PLC ζ -mRNA を用いた場合に産仔率が有意に低下した。このことから卵子の活性化は胚盤胞形成までに大きな影響は与えないが、着床以降の胚発生に大きく関係してることが示された。マウス PLC ζ -mRNA よりもウマ PLC ζ -mRNA はオシレーションを長時間誘起する。Ozil らがカルシウムオシレーションの異常が遺伝子発現に影響を与えていることが報告されており、今回の産仔率の低下に関係している可能性がある¹¹。

また、ウマ PLC ζ -mRNA による活性化で初めて正常な産仔を得られたことから、PLC ζ の機能は種を超えて共通している部分があるのに加え、活性化の際に異種の卵子に注入された場合においても働くことが明らかとなった。マウス PLC ζ -mRNA の変異体を注入した実験では、リンカー領域が卵子の活性化に重要な働きがあることが示されている¹²。ウマ PLC ζ -mRNA がリンカー領域を持つことは明らかであるが、今回の実験からリンカー領域のほかにも活性化を誘起しやすくする機構があると考えられる。また、種によって最適な活性化方法がことなることから PLC ζ は哺乳類において主要な活性化因子ではあるが、そのほかのクエン酸合成酵素や PAWP による活性化が種によっては効果的に機能しているのかもしれない^{13,14}。つまりウマは PLC ζ による活性化に重点を置いており、一方でマウスはそのほかの活性化経路に重点を置いているため PLC ζ の感受性に差が生じていることが考えられる。

これらの結果は、適切な PLC ζ -mRNA 注入法が確立された場合、異種の PLC ζ と比較して同種の PLC ζ を用いて出生率が増加することを示した。PLC ζ -mRNA の活性化と塩

化ストロンチウムによる活性化と比較して産仔率の向上は認められなかったことから、活性化方法の変化により出産率を向上することはできないことが明らかとなった。しかしながら PLC ζ -mRNA の注入は二回に分けて注入が行われており、この作業が胚に悪影響を与えている可能性がある。第二章以降ではこの影響について調査していく。

文献

1. Yoneda, A. *et al.* Molecular cloning, testicular postnatal expression, and oocyte-activating potential of porcine phospholipase Czeta. *Reproduction* **132**, 393–401 (2006).
2. Cox, L. J. *et al.* Sperm phospholipase Czeta from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* **124**, 611–623 (2002).
3. Bedford-Guaus, S. J. *et al.* Molecular cloning and characterization of phospholipase C zeta in equine sperm and testis reveals species-specific differences in expression of catalytically active protein. *Biol. Reprod.* **85**, 78–88 (2011).
4. Ross, P. J. *et al.* Parthenogenetic activation of bovine oocytes using bovine and murine phospholipase C zeta. *BMC Dev. Biol.* **8**, 16 (2008).
5. Sato, K. *et al.* Molecular characteristics of horse phospholipase C zeta (PLC ζ). *Anim. Sci. J.* **84**, 359–368 (2013).
6. Kouchi, Z. *et al.* The role of EF-hand domains and C2 domain in regulation of enzymatic activity of phospholipase Czeta. *J. Biol. Chem.* **280**, 21015–21021 (2005).
7. Kimura, Y. & Yanagimachi, R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* **52**, 709–720 (1995).
8. Chatot, C. L., Ziomek, C. A., Bavister, B. D., Lewis, J. L. & Torres, I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod.*

- Fertil.* **86**, 679–688 (1989).
9. Cox, L. Sperm phospholipase C ζ from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillations, activation and development of mouse oocytes. *J Reprod Fertil* **124**, 611–623 (2002).
 10. Ito, J., Parrington, J. & Fissore, R. A. PLC ζ and its role as a trigger of development in vertebrates. *Mol. Reprod. Dev.* **78**, 846–853 (2011).
 11. Ozil, J.-P., Banrezes, B., Tóth, S., Pan, H. & Schultz, R. M. Ca²⁺ oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Dev. Biol.* **300**, 534–544 (2006).
 12. Kurokawa, M. *et al.* Proteolytic processing of phospholipase C ζ and [Ca²⁺]_i oscillations during mammalian fertilization. *Dev. Biol.* **312**, 407–418 (2007).
 13. Kang, W. *et al.* Correction: Extra-mitochondrial citrate synthase initiates calcium oscillation and suppresses age-dependent sperm dysfunction. *Lab. Invest.* **100**, 665 (2020).
 14. Wu, A. T. H. *et al.* PAWP, a Sperm-specific WW Domain-binding Protein, Promotes Meiotic Resumption and Pronuclear Development during Fertilization*♦. *J. Biol. Chem.* **282**, 12164–12175 (2007).

第二章 PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を卵子へ同時に注入した際の影響と結果

2-1 序論

第一章により PLC ζ -mRNA には最適濃度があり、強い活性化能を持つウマ PLC ζ -mRNA を用いた場合でも産仔率を向上することができなかった。そこで考えられる要因として PLC ζ -mRNA の注入作業が胚に影響を与えている可能性がある。今までに PLC ζ -mRNA を用いて円形精子細胞由来の産仔を得られた結果が報告されているが低産仔率の改善はみられていない¹⁻⁴。現在、その原因は円形精子細胞由来のエピジェネティクス修飾の異常によるものや染色体異常が考えられている^{5,6}。

よって、従来円形精子細胞の注入と PLC ζ -mRNA の注入を同時に行うことで卵子への負荷を減らし、産仔率の向上につながる可能性がある。しかしながら円形精子細胞の注入後には人為的な活性化が必要不可欠であることに加え、活性化を行うタイミングは細胞の注入を行ってから速やかに行う必要がある⁷。円形精子細胞は卵子へと注入された後に染色体上の構造を取り、早期染色体凝縮(Premature chromosome condensation : PCC)が引き起こされる。卵子の活性化時間が遅れることで PCC の発生率が上昇し、産仔率の低下につながる⁸。PLC ζ -mRNA と円形精子細胞の注入を同時に行う場合、卵子への負荷は減る一方で、活性化開始時間が不明瞭であり、細胞と PLC ζ -mRNA を同時に注入することが胚にとってどのような影響があるかは明らかでない。また、細胞操作用培地である PVP と同時に mRNA を細胞内に注入する方法を確立する必要がある。

加えて円形精子細胞は精子と異なるエピジェネティクス修飾を示すことが知られている。例えば、H3K9me3 は通常の精子から作られる雄性前核では検出されない一方で、ROSI 胚では多くの H3K9me3 が確認できる⁵。このようなエピジェネティクス修飾の異常は人為的活性化が原因で引き起こされている可能性も十分にある。正常な活性化がもたらすカルシウムオシレーションが正常な遺伝子発現を誘導し、上記のようなエピジェネティクス修飾に関与するかもしれない。

よって本章では細胞と同時に PLC ζ -mRNA を注入する際の方法の確立とその影響、そして実際に注入した結果を述べる。

2-2 材料および方法

2-2-1 マウス

マウスは第 1 章と同様の条件のマウスを使用した。

2-2-2 ホルモン調製、採卵、鋳型 DNA の直鎖化および鋳型の精製、mRNA の合成および精製は第 1 章に準じて行った。

2-2-3 培地

CZB、Hepes-CZB、PVP は第 1 章と同様に使用した

2-2-4 mRNA の注入量測定

細胞注入用の針を用いて卵子に PLC ζ -mRNA を注入した量を測定するために、インジェクション用の針内で注入する前の時点と注入後の距離を測定し、そこから注入した液量の計算を行った。体細胞核移植には 5-6 μm の直径の針を使用し、円形精子細胞には 4-6 μm の直径の針を使用する。細胞と同時に注入する液量を計算するために本実験では PLC ζ -mRNA に変わってフィコエリスリンを使用した⁹。フィコエリスリンの注入後速やかに顕微鏡下で蛍光強度を測定した。蛍光強度は Image J software を使用して定量を行った。

2-2-5 mRNA 注入

mRNA は使用時に nuclease free water で目的の濃度になるように希釈した。PLC ζ はそれぞれ 2、20、100 ng/ μl の濃度とした。10 cm ディッシュに Hepes-CZB 含有 10 % PVP と Hepes-CZB のドロップをつくり間に 5 μl の PVP+PLC ζ -mRNA ドロップをつくった。ミネラルオイルでドロップを覆い、マイクロマニピュレーターの作業台に移動した。インジェクション針は、MICRO FORGE のガラス玉で先端を小さく折ったもの(直径 1-3 μm)の後ろ側からフロリナートを入れたものを使用した。PVP のドロップではピエゾを用いて針の先端までフロリナートを出した。インジェクション針で PVP+PLC ζ -mRNA を吸いピエゾを用いて Hepes-CZB ドロップ中で MII 卵の透明帯と細胞膜をピエゾで破り、数 pl の PVP+PLC ζ -mRNA を細胞質に注入した。mRNA 注入後の卵子は 5-10 分間作業台の上で休ませてから、100 μl の CZB に 500 $\mu\text{M}/\text{ml}$ の濃度のサイトカラシン B (cytochalasin B ; CB)を 2 μl を混合させた培地で 6 時間 2 倍体処理を行った。CZB 卵子を洗浄し、インキュベーターで 96 時間まで培養した(37 °C、5% CO₂、100% 湿度)。

2-2-6 卵子の活性化

塩化ストロンチウムを用いた従来法での活性化方法は 5 mM の塩化ストロンチウムに 20 分間浸すことでおこなった。PLC ζ による活性化は円形精子細胞と同時に注入することでおこなった。

2-2-7 精巢の採取

精巢は ICR 系統 (10 週齢) から採取した。精巢をハサミで切って PBS の中で切り少しほぐしたらエッペンチューブの中に入れて。精巢内物質混濁液 1 μ l を 9 μ l の PVP+PLC ζ -mRNA に加えよく混合した後にマニピレーション用ディッシュに 5 μ l 置いた。

2-2-8 ROSI

PVP と HEPES-CZB で作ったドロップをミネラルオイルで覆い、マイクロマニピュレーターの作業台に移動した。インジェクション針はマイクロフォーgerで内径を約 7 μ m に切断し、後ろ側からフロリナートを入れたものを使用した。円形精子細胞を精巢内混合液の中から選び MII 卵にインジェクションした。塩化ストロンチウムで事前に活性化する区は活性化後 30 分以内に注入作業を終わらせ、注入後に活性化する区では注入後に 10 分間休ませた後に塩化ストロンチウムにより活性化をおこなった。注入後は染色の時間までの間 37°C、5 % CO₂、100 % 湿度の気相条件のインキュベーターで培養した。

2-2-9 オルセイン染色

スライドガラス状に四点ワセリンを置き、その間にマウスキャピラリーを使って卵子を置いた。卵子を潰さないようにカバーガラスを卵子の上に被せた。円形精子細胞注入後 30 分、1 時間、4 時間の卵子をそれぞれの時間でグルタルアルデヒドにより 5 分間固定した後に、水道水と 100% エタノールで洗浄をおこなった。洗浄後、酢酸オルセイン溶液を一滴流し 5 分間染色をおこなった。染色後、45 % 酢酸で脱色させた後にマニキュアで封入し、観察をおこなった。

2-2-10 統計分析

χ^2 検定を用いて脱凝縮していた割合の有意差検定をおこなった。

2-3 結果

2-3-1：細胞と PLC ζ -mRNA を同時に注入した際の注入量測定

PLC ζ -mRNA の注入後卵子内に注入された PLC ζ -mRNA は視認できなくなる。そのため、注入前と注入後のピペット内にある液量を計測することで実際に注入した量を測定した(図 2-1 A)。まず PLC ζ -mRNA ピペットの内径は 5-6 μm であり、このことから注入された PLC ζ -mRNA の量は 3-5 pl と算出した。一方で、細胞注入用のピペットで注入を行った際に注入した卵子を死滅させないように注入を行うため少量の PLC ζ -mRNA が注入される。図 A、B から分かるように、卵子に注入されたフィコエリスリンの蛍光強度は細胞と同時に注入したほうが明らかに低い蛍光強度を示した。これらの区を比較した結果、細胞と同時に PLC ζ -mRNA を注入した区は PLC ζ -mRNA を単体で注入した場合よりも 27 倍低い蛍光強度を示した。この結果を元に、以前の研究結果で PLC ζ -mRNA の最適濃度は 1 ng/ μl であると定めたが、本実験では 20 ng/ μl が最適濃度となる可能性が高いと指標を立てた。

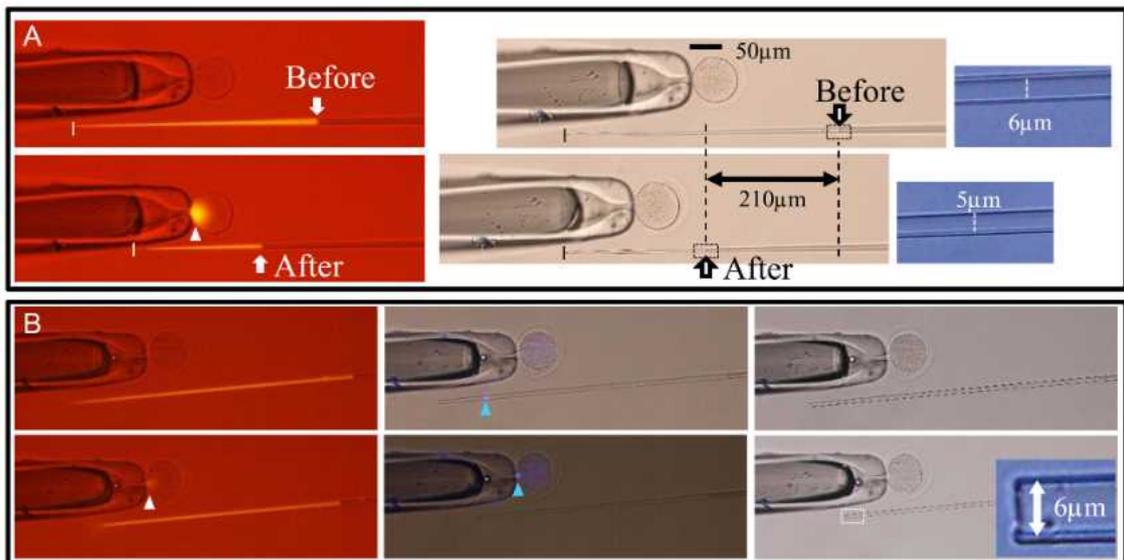


図 2-1 細胞と PLC ζ -mRNA を同時に注入した際の注入量即定

(A) 二段階に分けて注入する方法の注入量を測定するために注入前と注入後の培地の距離引いた液量を円錐形として計算して注入量を求めた。(B) 同時注入法では、Image J ソフトウェアを使用して蛍光強度により注入量の測定を行った。白い矢印は卵子内に注入されたフィコエリスリンを示している。青い矢印は染色された細胞を示している。

2-3-2：単為発生胚を用いた PLC ζ -mRNA の同時注入時における最適濃度検討

卵子内で翻訳される PLC ζ -mRNA の最適注入量を検討するため、マウス卵子へ 2, 20, 100 ng/ μ l の mRNA を注入した後に活性化率と発生率を観察した。20, 100 ng/ μ l 区において高い活性化率を示した(表 2-1)。その後発生率を観察した結果 20 ng/ μ l 区と 100 ng/ μ l と比較して 20 ng/ μ l の方が高い胚盤胞発生率を示した。20 ng/ μ l 区の 2 細胞期胚は形態的に異常がみられないものが多いが、100 ng/ μ l 区では 2 細胞期時に発生が停止する胚が観察された。

表 2-1 単為発生および体細胞核移植における PLCζ-mRNA の濃度検討

	Concentration of mRNA					
	Parthogenesis			Somatic cell nuclear transfer		
	2	20	100	2	20	100
No. of oocytes injected	54	54	55	45	54	46
No. of survived oocytes (%) [*]	46 (85)	50 (93)	51 (93)	33 (67)	42 (75)	25 (56)
No. of PN formed embryos (%) [*]	22 (48)	41 (82)	45 (88)	27 (82)	40 (95)	24 (96)
No. of 2 cell embryos at 24 h (%) ^{**}	22 (100)	38 (93)	37 (82)	26 (96)	36 (90)	21 (88)
No. of 4-8 cell embryos at 48 h (%) ^{**}	19 (86)	37 (90)	33 (73)	12 (44)	27 (68)	13 (54)
No. of morula/blastocysts at 72-96 h (%) ^{**}	8(36)	26 (63)	7 (16)	6 (22) ^b	19 (48) ^a	5 (21) ^b

^{*} Percentage relative to no. of oocytes injected; ^{**} Percentage relative to no. of PN formed embryos.

a vs b; P< 0.05.

2-3-3：円形精子細胞と PLC ζ -mRNA を同時に注入した際の脱凝縮率および活性化時間の測定

本実験の活性化法が従来法である塩化ストロンチウムによる活性化と比べてどの程度活性化に遅延が見られるのかを調べるために、円形精子細胞を注入してから経時的に核相を観察した。精子細胞の核相を染色体凝縮、染色体脱凝縮、前核形成の3つに分類した(図 2-2 A,B,C)。そして同時注入を行った場合、細胞注入の前後で塩化ストロンチウムによる活性化を行った場合よりも早期染色体凝縮の発生率は低下していた(64%、71%、85%)(図 2-2 D)。このことから同時注入を行った場合、活性化がM II 中期まで進行していることが明らかとなった。活性化の1時間後に観察を行った場合、同時注入された胚の脱凝縮率は、活性化を細胞注入前後で行った場合(50~59%)よりも低下していた(17%)(図 2-2 E)。そのため活性化は遅れており、細胞注入後1時間後に活性化を行った場合と同様であった。

(11%)。活性化および注入の4時間後の前核形成率を観察した場合、同時注入法は、1時間後に活性化を行った場合(41%)よりも低下していた(6%)(図 2-2 F)。よって同時注入法の活性化プロセスが1時間以上遅れたことを示唆した。

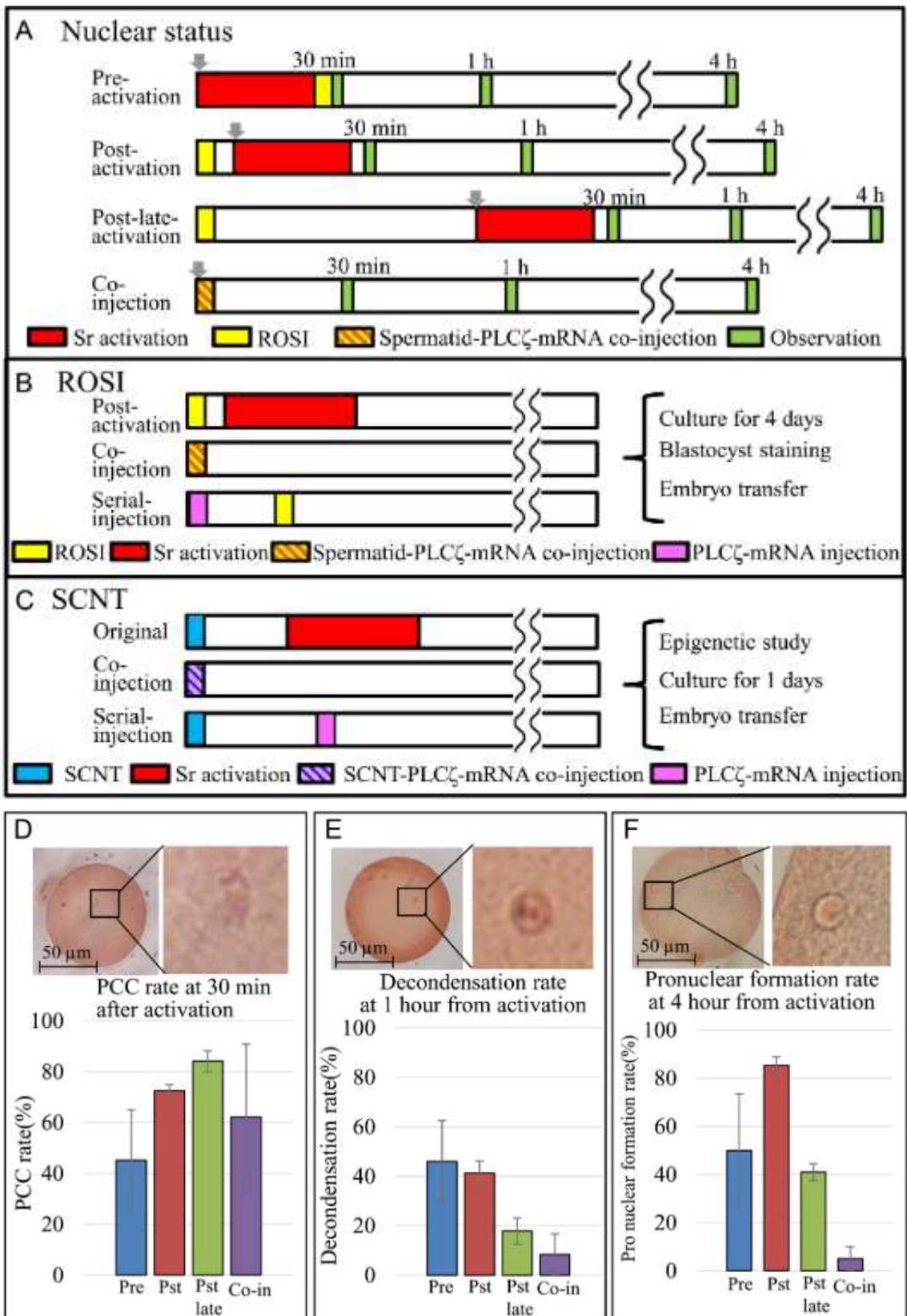


図 2-2 核実験の活性化手順の模式図とそれぞれの活性化手順で活性化した卵子内の雄核の形態

(図 2-2 A, B, C) 各実験における活性化手順を用いた際の核の状態を示した模式図。(図 2-2 A) 4 つの異なる活性化方法(ROSI の前に SrCl_2 で活性化を行う、ROSI の後速やかに SrCl_2 で活性化を行う、ROSI の 1 時間後に SrCl_2 で活性化を行う、PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を同時に注入して活性化させる)を用いて卵子を活性化させ、経時的なオルセイン染色(30 min, 1h, 4h)により核相を観察した際の模式図。矢印は活性化の開始を示す。(図 2-2 B) 3 つの異なる活性化方法(ROSI 後 1 h 後に SrCl_2 で卵子の活性化を行う、PLC ζ -mRNA と細胞を同時に注入し活性化を行う、PLC ζ -mRNA と細胞を別々に注入して活性化を行う)を用いた胚を 4 日間培養し、胚盤胞率およびその品質を調べた。また 2 細胞期胚を偽妊娠メスに移植することで産仔へと発生するかを検討した。(図 2-2 C) 3 つの異なる活性化方法(塩化ストロンチウムによる活性化、PLC ζ -mRNA と細胞を同時に注入する活性化、PLC ζ -mRNA と細胞をそれぞれ分けて注入する活性化)を用いて再構築胚を作成し、1 細胞期胚の際のエピジェネティクス修飾の状態を調べた。また、2 細胞期胚を移植し発生能を調査した。(図 2-2 D,E,F) 4 つの異なる活性化方法で作成した ROSI 胚の雄核の形態。これらの胚は活性化後の 30 min (図 2-2 D)、1 h (図 2-2 E)、または 4 h (図 2-2 F)に染色を行った。

2-3-4: ROSI 胚を PLC ζ -mRNA により活性化させた際のエピジェネティクス修飾の変化
卵子の活性化方法の違いによって卵子のエピジェネティクス修飾が変化するかどうかを
調べるために、円形精子細胞と正常受精胚と比較してすでに異常があることが知られてい
る H3K9me3 の蛍光強度を調べた。その結果、正常受精胚と PLC ζ -mRNA を比較して塩化
ストロンチウムと活性化した場合と同様の高メチル化が観察された。PLC ζ -mRNA を単体
で注入して活性化した場合においても同様の結果が得られた(図 2-3)。

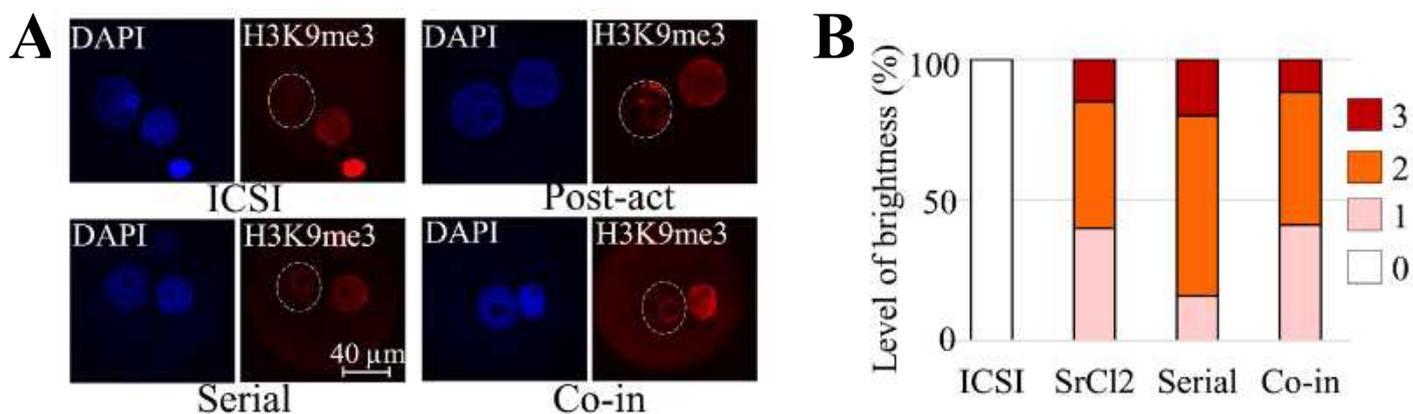


図 2-3 円形精子細胞を PLC ζ -mRNA により活性化させた際のエピジェネティクス修飾の変化
 (A) ICSI、ROSI 後に SrCl₂ で活性化、PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を分けて注入して活性化、PLC ζ -mRNA と細胞を同時に注入して活性化をおこなった。(B) 前核の雄核の蛍光強度を 0-3 の段階に分けてメチル化の高さを調べた。すべての実験は最低 3 回行い、17-25 個の胚を使用した。

2-3-5: PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を同時に注入した際の発生率および胚盤胞の質

実際に円形精子細胞と PLC ζ -mRNA を同時に注入した際の胚盤胞発生率および胚盤胞の質を調べた結果、塩化ストロンチウムで活性化した場合と同等の発生率を示した(65-64%)。一方で PLC ζ -mRNA を単体で注入した場合、胚盤胞発生率は低下した(55%)(図 2-4)。そして胚盤胞の ICM および TE の細胞数を比較した結果、PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を同時に注入した場合と塩化ストロンチウムにより活性化した場合で差はみられなかった(図 2-5)。

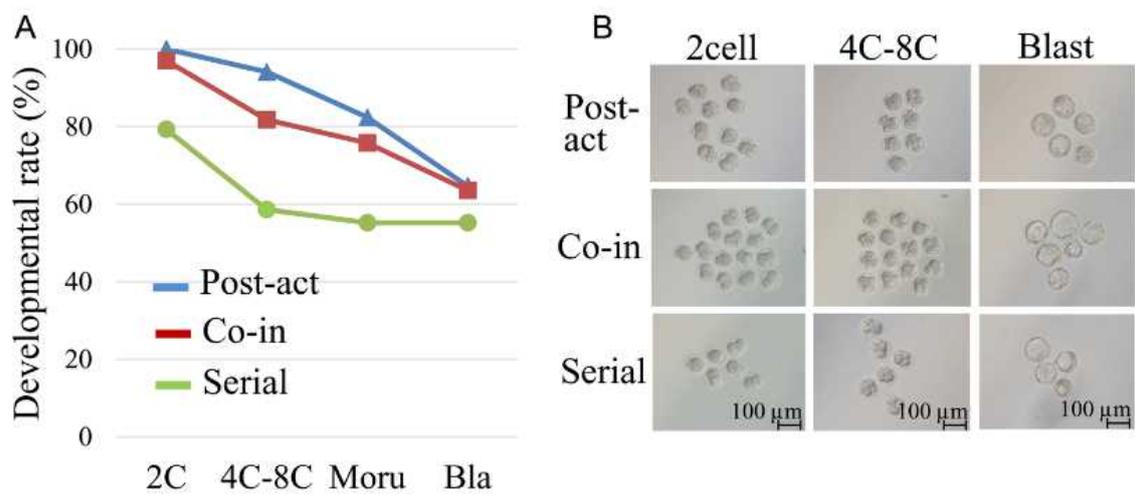


図 2-4 異なる活性化方法を用いた ROSI 胚の体外発生

(A, B) 異なる活性化方法により胚を作成し、2細胞期 (2C: 活性化から 24 h 後)、4-8細胞期 (4-8C: 活性化から 48 h 後)、桑実胚 (Moru: 活性化から 72 h 後)、胚盤胞期 (Bla: 活性化から 96 h 後)

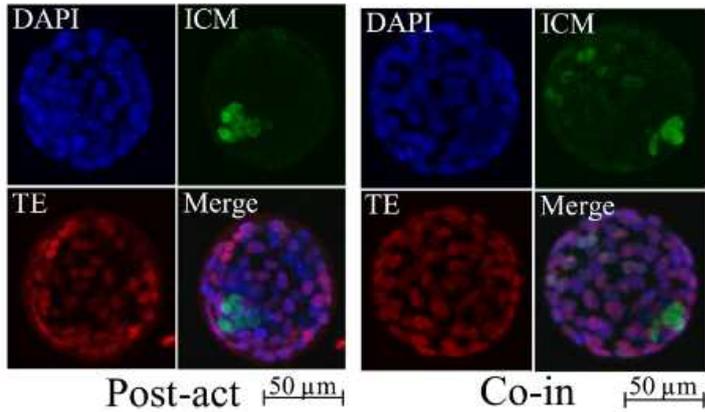
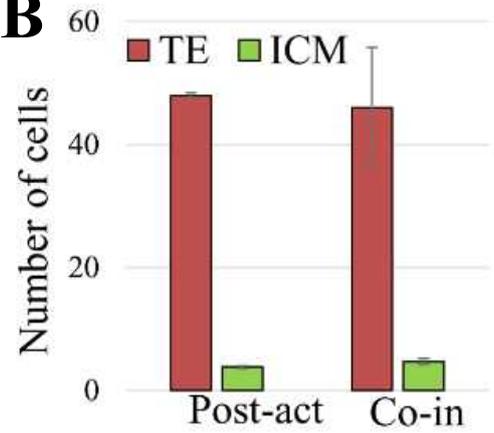
A**B**

図 2-5 PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を同時に注入した際の発生率および胚盤胞の質
 (A, B) ROSI 胚の質を評価するために胚盤胞期で免疫染色の後細胞数計測を行った。これらの胚は塩化ストロンチウムによる活性化と同時注入により活性化したものを使用した。(A) 写真は DAPI を青色に、内部細胞塊を緑色、栄養外胚葉を赤で蛍光染色した。(B) 内部細胞塊と栄養外胚葉の細胞数を計測し平均値を示す。

2-3-6: PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を同時に注入することが及ぼす産仔率への影響

円形精子細胞と PLC ζ -mRNA を同時注入する活性化を繁殖技術に応用することが可能か調べるために、2細胞期の ROSI 胚を偽妊娠雌に移植することで産仔率を調査した。その結果、従来法での生存卵子は 74%、円形精子細胞と PLC ζ -mRNA を同時に注入した区では 77%と有意な差はみられなかった。活性化率においても、2PN の割合が従来法では 49%、同時注入法では 31%と低くなる傾向はみられたが、有意な差はみられなかった。その後 2細胞期に発生する割合は従来法で 62%、同時注入法では 56%であった。その胚を偽妊娠雌に移植した結果、従来法では 30%、同時注入法では 31%と差はみられなかった。そして得られた産仔に異常はみられなかった(図 2-6)。

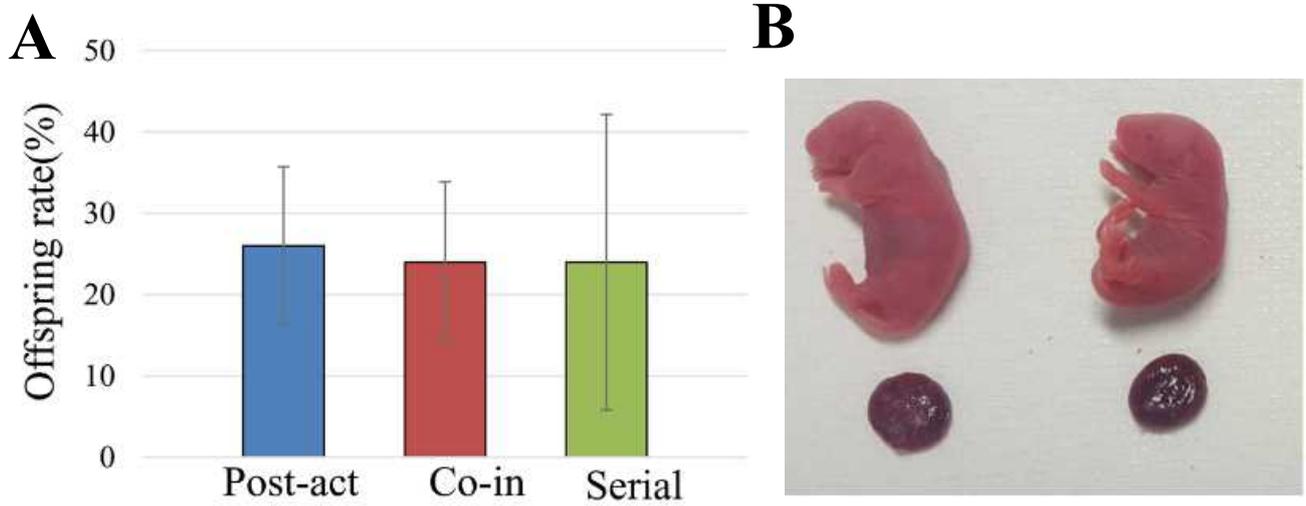


図 2-6 PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を同時に注入した際の産仔および産仔率

(A) 3つの異なる活性化方法を用いた際の産仔率 (B) 同時注入法を用いて得られた産仔

2-4: 考察

通常精子が卵子内に侵入した際に、精子は速やかに卵子を活性化させる。しかしながら、円形精子細胞は活性化能を持たないだけでなく卵子内で速やかに染色体凝縮を引き起こす。そのため人為的活性化が不可欠であるだけでなくその時間も管理する必要がある。そこで PLC ζ と円形精子細胞を同時に注入して異常がなければ、一回の実験中全ての卵子を同じ時間で活性化することが可能となり実験の安定性が向上すると考えられる。

まずこの実験系が正常に機能するためには細胞注入用の針でどの程度の PLC ζ -mRNA が卵子内に注入されているかを調べる必要があった。実際に細胞注入用の針で注入した場合、mRNA を単体で注入する場合より 27 倍低い濃度の mRNA が注入されていることが計算により明らかとなった。細胞注入用の針を使用する場合の一番の目的は卵子の死滅を防ぐことである。そのため注入される液量は自然と少量となってしまう。この点がより活性化に高濃度の PLC ζ -mRNA が必要になった点であると考えられる。発生率を調査した結果でも注入試験と同様に、単体で注入する場合よりも 20 倍高い濃度を使用した場合に高い発生率を示した。逆に 100 倍の濃度では活性化率は高いものの発生率が低下することから、最適濃度を上回っていることが示唆される。

活性化の開始時間は前核形成の開始時間で観察することが可能であるが、ROSI 胚では前核が小さくなり観察が難しいことが知られている^{10,11}。そこで本研究では PLC ζ と円形精子細胞を同時に注入した際の核相を観察することで、活性化の開始時間を調査した。

結果として、PLC ζ -mRNA と細胞を同時にマウス卵母細胞に注入した際に正常にタンパク質に翻訳され卵母細胞は活性化しその後発生することを示した。そして我々は PLC ζ と細胞の同時注入は従来法よりも 60 分ほど遅れた活性化であることを発見した。

従来法の塩化ストロンチウムの活性化は円形精子細胞注入の前後 20~30 分以内に行うことが推奨されている⁷。従来法では注入後すぐに卵子は活性化されるため、活性化後 1 時間では約半分の割合で脱凝縮のステージに進行していた。一方で実験区と円形精子細胞注入してから 1 時間後に活性化をおこなった区では、1 時間後に脱凝縮のステージに進行している割合は 1 割程度であった。このことから本実験でおこなった PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を同時に注入した場合、塩化ストロンチウムの活性化を注入後 1 時間後におこなう方法に類似していることが考えられる。これは以前に PLC ζ の活性化時間が報告された活性化の開始時間を観察した実験に類似している結果となった。このことから PLC ζ と円形精子細胞を同時に注入した場合でも二段階に分けて注入する方法と同様な活性化が起きると示唆される。

PLC ζ を用いた実験で胚発生を調査した実験は多く行われているが、産仔率を報告したデータは少ない。さらに PLC ζ -mRNA と細胞を同時に注入して産仔を得た報告はなく。本実験方法が有効であれば、マイクロマニピレーション中の活性化が省略できる。そして PLC ζ による活性化を用いた活性化は多くの人為的活性化のなかで生体内機序に近いカルシウムオシレーションを引き起こすため有効であると考えられている。そのため本実験の

活性化方法が有効であるか確かめるために ROSI 胚を移植し産仔率を調査した。

今回、我々は PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を同時に注入した際に従来法と同等な割合で産仔を得ることに成功した。このことからこの技術が生殖補助技術に応用できることを示した。しかしながら従来法と比較して産仔率に有意な差はみられなかった。これは ROSI 胚がもつエピジェネティクスな異常は PLC ζ による活性化では改善されなかったことが示唆される。よって ROSI 胚の低い産仔率の原因は活性化ではない可能性が高い。過去の PLC ζ で産仔を得た実験では、産仔は得られたものの低い産仔率となった。これはインジェクション操作を 2 度おこなったためであると考察されていたが、本実験はその問題を解消した^{2,3}。

そして ROSI をおこなう際に活性化の時間が重要であるとされている。本実験の活性化方法は PLC ζ の mRNA の翻訳される時間が必要であるため 60 分ほどの遅れが存在する。だが、PVP に細胞と PLC ζ -mRNA を混ぜて注入した際においても生存率、発生率および産仔率には塩化ストロンチウムの区で差はみられなかった。活性化の時間が遅延することで雄前核の形成率が低下するが 100 分までであれば産仔率に差がないとの報告がある⁷。60 分という時間は mRNA が翻訳されるまでの時間とほぼ同じであることから産仔率に差が生じることがなかったと考えられる。PLC ζ -mRNA の活性化は人為的活性化方法の中で技術的な問題がある一方で、より生体内に近い活性化方法であったが、本実験により技術的問題点を解決することに成功した。

我々は PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を同時に注入することで卵子を簡便に活性化し胚を作ることが可能であることを証明した。この技術を応用することで、活性化能を持たない円形精子細胞や体細胞クローンの研究を発展させることができるかもしれない。

文献

1. Ogura, A., Matsuda, J. & Yanagimachi, R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7460–7462 (1994).
2. Nakanishi, T. *et al.* Birth of Normal Offspring from Mouse Eggs Activated by a Phospholipase C ζ Protein Lacking Three EF-hand Domains. *J. Reprod. Dev.* **54**, 244–249 (2008).
3. Miura, K. *et al.* Application of auxin-inducible degron technology to mouse oocyte activation with PLC ζ . *J. Reprod. Dev.* **64**, 319–326 (2018).
4. Hirose, N. *et al.* Birth of offspring from spermatid or somatic cell by co-injection of PLC ζ -cRNA. *Reproduction* **160**, 319–330 (2020).
5. Kishigami, S. *et al.* Epigenetic abnormalities of the mouse paternal zygotic genome associated with microinsemination of round spermatids. *Dev. Biol.* **289**, 195–205 (2006).
6. Yamagata, K., Suetsugu, R. & Wakayama, T. Assessment of chromosomal integrity using a novel live-cell imaging technique in mouse embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* **24**, 2490–2499 (2009).
7. Kishigami, S., Wakayama, S., Nguyen, V. T. & Wakayama, T. Similar time restriction for intracytoplasmic sperm injection and round spermatid injection into activated oocytes for efficient offspring production. *Biol. Reprod.* **70**, 1863–1869 (2004).

8. Kimura, Y. & Yanagimachi, R. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* **121**, 2397–2405 (1995).
9. Yamagata, K. *et al.* Fluorescence Cell Imaging and Manipulation Using Conventional Halogen Lamp Microscopy. *PLoS One* **7**, e31638 (2012).
10. Ogura, A., Inoue, K. & Matsuda, J. Mouse spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. *Hum. Reprod.* **14**, 1294–1298 (1999).
11. Haigo, K., Yamauchi, Y., Yazama, F., Yanagimachi, R. & Horiuchi, T. Full-term development of hamster embryos produced by injection of round spermatids into oocytes. *Biol. Reprod.* **71**, 194–198 (2004).

第四章 PLC ζ -mRNA と体細胞の同時注入による産仔作出

3-1 序論

体細胞クローンは羊のドリーから始まり様々な種類でのクローン動物作製に成功してきた。初めてクローンマウスが誕生してから技術の向上も重なり、インブレッドのマウス系統でもクローンマウス作出の成功例が上げられる¹。しかしながらそのクローンマウスの作出効率の改善は難しく、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である TSA の報告。そして他にも Xist 遺伝子の KO や Kdm4d の過剰発現によりクローンマウスの作出効率改善が試みられた。しかしながらそれでも正常な胚と比較すると大幅に産仔率が低いことが分かっている²⁻⁴。

体細胞クローンの作出時に必要不可欠な要素として卵子の人為的な活性化があげられる。マウス卵子の人為的活性化は塩化ストロンチウムにより行われる。その活性化方法が最も精子による活性化に近いカルシウムオシレーションの波を示すことは知られているが、その後の産仔率に影響する可能性がある。第 1 章で述べたように、マウス PLC ζ とウマ PLC ζ の産仔率はウマ PLC による活性化が低くなることから、活性化刺激が着床以降の発生に大きな影響を与えていると考えられる。そのため活性化の方法を自然に近い活性化方法に変えることで産仔率の向上が期待できる。クローン胚の活性化方法の検討は塩化ストロンチウム、エタノール、電気刺激による活性化により検討が行われ、塩化ストロンチウムによる活性化が最も胚盤胞率が高くマウス胚にとって最適な活性化方法であると報告がある⁵。過去にクローン胚の活性化のタイミングに関して研究した報告があるが⁶、発生率の向上はみられなかった。また本研究で用いられている PLC ζ -mRNA によりクローン胚を活性化させて産仔を得た報告はない。さらに円形精子細胞で確立した PLC ζ -mRNA と細胞を同時に注入する方法により、今まで mRNA を注入する際に与えてきた 2 回の注入作業による負荷を無くし、純粋に PLC ζ -mRNA の活性化がクローン胚作製に PLC ζ -mRNA が有効かどうかの検討を行えることから新規性が高いといえる。本実験では PLC ζ -mRNA を用いた活性化が再構築胚の活性化にどのような影響があるかを調べた。

3-2 材料および方法

3-2-1 マウス

雌マウスは第1章と同様の条件のマウスを使用した。雄マウスはICR系統を使用した。ホルモン調製、採卵、鋳型 DNA の直鎖化および鋳型の精製、mRNA の合成および精製、mRNA の注入は第1章に準じて行った。

3-2-2 同時注入法を用いた体細胞核移植

卵丘細胞はあらかじめ用意していた PVP+PLC ζ -mRNA と混ぜ、同時注入法に用いた。体細胞の注入前に MII 卵子の徐核を行った。核の徐核後に同時注入法では PLC ζ -mRNA を含んだ PVP に準備した体細胞を注入した。また、コントロールとしての活性化は塩化ストロンチウムによる活性化を行った。活性化後すぐに TSA と LatA を含むカルシウムフリー-CZB に移動させ、9~10 時間活性化処理および2倍体化処理を行った。

3-2-3 免疫染色

PLC ζ -mRNA がマウス 1 細胞期胚のエピジェネティクス修飾に影響を及ぼすか調べるために、免疫染色を行った。活性化処理後 10 時間後に 4%PFA/PBS 0.2%TritonX で卵子の固定処理を行った。その後 2 回の洗浄を PBS で行い、観察まで冷蔵庫で保管した。一次抗体は anti-H3K4me3(1:1000 希釈; アブカム)、anti-H3K9me3(1:1000 希釈 アブカム)、anti-H3K27me3(1:1000 希釈 ミリポア)をそれぞれ使用した。その後 Alexa Fluor 568-labelled goat anti-rabbit IgG(Molecular Probes) で 1 時間静置した。その後洗浄を 2 回行った後に、ガラススライド上での封入作業を行った。封入には Vectashield anti-bleaching solution(Vector Laboratories)を使用した。最後に蛍光顕微鏡(FV-1000; オリンパス)により蛍光強度の測定を行った。

3-2-4 胚移植

第一章と同様な方法で行った。

3-3: 結果

3-3-1 体細胞核移植における PLC ζ -mRNA の最適濃度の検討

体細胞核移植を行う際は円形精子細胞と同様に PLC ζ -mRNA を細胞と同時に注入する必要があるが最適な PLC ζ -mRNA が円形精子細胞とは異なる可能性がある。そのため体細胞核移植における PLC ζ -mRNA の最適濃度を調べるために円形精子細胞と同様に 2, 20, 100 ng/ μ l で濃度検討を行った。その結果、活性化率はそれぞれ、82%、95%、96%と高効率で活性化された。一方で桑実胚期までの発生率は 22%、48%、21%となり 20 ng/ μ l が最も高い発生率を示した (表 3-1)。

3-3-2 PLC ζ -mRNA を用いて体細胞核移植胚を活性化した際におけるエピジェネティクス修飾の変化

PLC ζ -mRNA を用いて再構築胚を活性化させた場合において、再構築胚に対してエピジェネティクス修飾に変化を及ぼすかどうかを調べた。再構築胚において H3K9me3、H3k4me3、H3K27me3 が体細胞の初期化に大きくかかわると考えられていることからこの3つの蛍光強度を観察した。その結果、PLC ζ -mRNA と塩化ストロンチウムで活性化させた場合を比較したが、有意な差はみられなかった(図 3-1)。

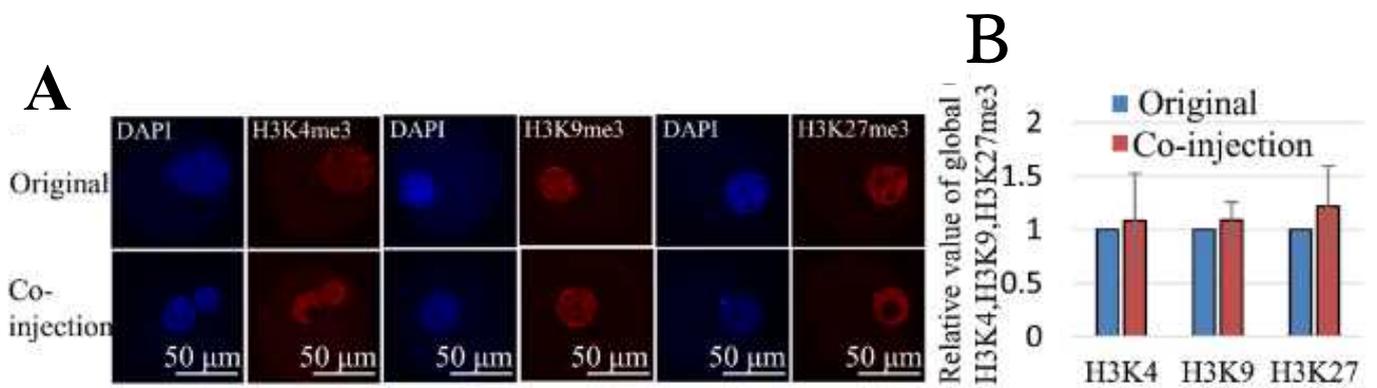


図 3-1 1 細胞期のクローン胚における H3K4 me3, H3K9 me3, H3K27 me3 のメチル化レベル
 (A) 上部の写真は塩化ストロンチウムにより活性化した胚を示し、下部の写真は同時注入法により活性化した胚を示す。(B) 塩化ストロンチウムによる活性化と同時注入による活性化のメチル化レベルの比較。H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 のメチル化レベルを比較した。

3-3-3: PLC ζ -mRNA を用いた体細胞核移植における産仔率

最後に、PLC ζ -mRNA を用いて体細胞核移植を行った。表および図より、卵丘細胞から正常な産仔を得ることに成功した。これらの成功率は同時注入による活性化と塩化ストロンチウムによる活性化は同等の産仔率であった(2.3-1.8%)。一方で、PLC ζ -mRNA を単体で注入した場合には他の実験区と比較して産仔率は低下した(0.5%)(表 3-1)。また、胎児の重量および胎盤重量に関してすべての区において差は見られなかった(図 3-2)。

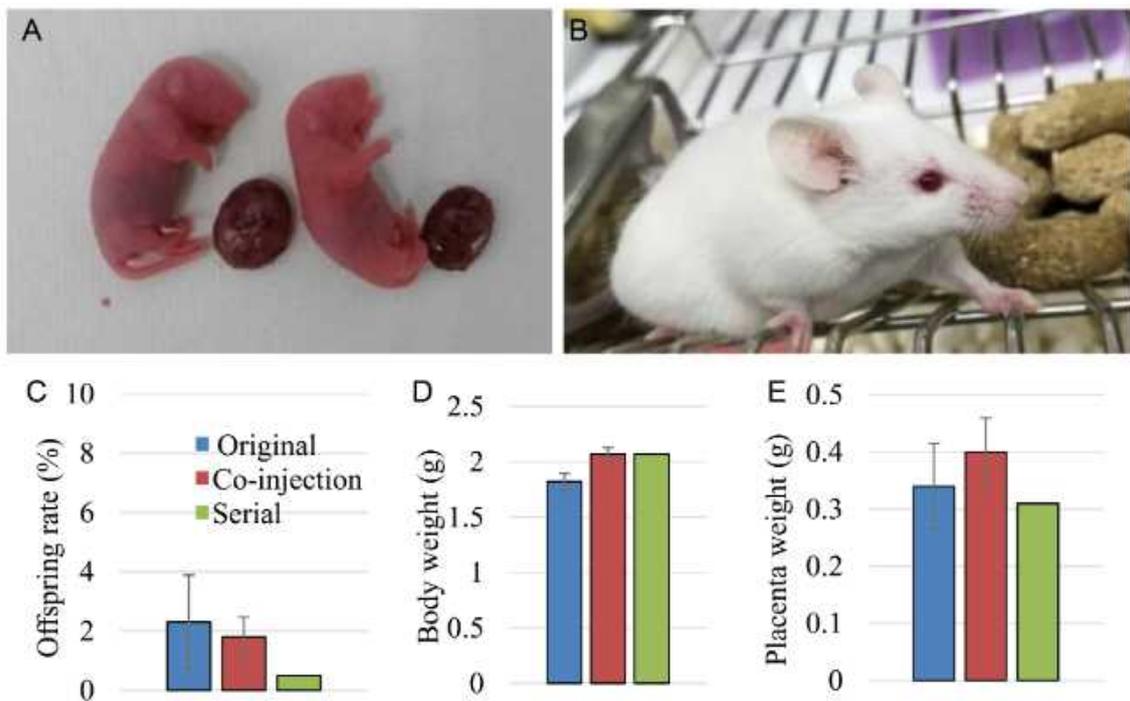


図 3-2 PLC ζ -mRNA と体細胞を同時に注入した際の産仔率および体重と胎盤重量 (A, B) 同時注入により得られたクローンマウスの産仔。(C) 産仔率、(D) 産仔の体重 (E) 胎盤重量。これらを 3 つの異なる活性化方法により比較を行った。

表 3-1 PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を同時に注入した際の産仔および産仔

	Treatment		
	Original	Co-injection	Serial-injection
No. of enucleated oocytes	187	259	505
No. of oocytes surviving after nuclear injection (%)	117 (63)	190 (73)	302 (60)
No. of oocytes surviving after PLC ζ -mRNA injection (%)	-	-	253 (50)
No. of oocytes with PN formed (%)	115 (98)*	179 (94)*	237 (94)
No. of embryos developed to 2 cell stage (%)**	102 (89)	167 (93)	207 (87)
Recipient	6	7	9
No. of offspring (%)***	2 (2.0)	3 (1.8)	1 (0.5)
Body weight (g)	1.82	2.07	2.07
Placental weight (g)	0.34	0.40	0.31

All two-cell embryos were transferred into recipient females.

*Percentage relative to no. of survived oocytes; **Percentage relative to no. of PN formed embryos; ***Percentage relative to no. of transferred embryos.

PN, pronucleus

表 3-2 PLC ζ KO 精子と PLC ζ -mRNA を同時注入した際の体外発生率

Sperm	No. of oocytes	No. of surviving oocytes after ICSI	1PN	2PN	2cell	4-8 cell	Morula	Blast
Intact sperm	12	8	0 (0)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	5 (71.4)	4 (57.1)
Co-jection (PLC ζ KO)	18	10	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

3-4: 考察

PLC ζ -mRNA を用いた活性化において初めてクローンマウスの作出に成功した。体細胞核移植において人為的活性化は必要不可欠であり、活性化方法として PLC ζ -mRNA の検討を行った。本実験で体細胞と円形精子細胞の両方で最適な活性化の濃度は同じであることが明らかとなった。また別実験において精子では同様の濃度と手法を用いた同時注入活性化方法では活性化が観察できなかった(表 3-2)。この点から細胞を注入する際に細胞膜を破る作業を確実にを行うためその細胞膜を破るという作業が mRNA をより細胞に取り込みやすくなる可能性がある。そのため細胞を注入する際に適切な濃度は 20 ng/ μ l であるが、精子やその他の細胞を注入する際には再度濃度検討が必要であると考えられる。

また PLC ζ -mRNA を用いた活性化において再構築胚のエピジェネティクス修飾の異常を改善することはできなかった。円形精子細胞においても H3K9me3 の高メチル化が見られるが、PLC ζ -mRNA による活性化を行った場合でもエピジェネティクス修飾の改善は見られていない。そのためクローン胚と ROSI 胚での低産仔率は活性化によるものではなく、これらのエピジェネティクス修飾の異常が原因である可能性が高いと考えられる^{4,7-9}。今まで、再構築胚の活性化に精子を用いた活性化を行った報告があるが、産仔率の向上は見られなかった。しかしこの実験では卵子への負荷が非常に大きいため、正確に精子による活性化因子が再構築胚に対して有効かどうかの検討はできていなかった¹⁰。しかし本研究では注入の作業が細胞の注入のみであるため、精子がもつ活性化因子を用いて卵子を活性化させた場合でも再構築胚のエピジェネティクス修飾の異常の改善はできないという点が明らかとなった。

PLC ζ -mRNA の濃度が円形精子細胞を注入する際と同等であることから、卵子の活性化で重要な点は細胞の種類により異なるのではなく、種に対して最適な活性化方法を選ぶ必要があることが示された。卵子の活性化では種によって最適な活性化方法があり、再構築胚において多くの活性化方法が施行されてきた。現在マウスの再構築胚での活性化方法では塩化ストロンチウム、TSA および LatA を用いた活性化方法が最も高効率に産仔を作出できることが報告されている^{2,5,9,11}。そして近年 Kdm4d の過剰発現により再構築胚のヒストンのメチル化を妨げ産仔率を向上させる方法が開発された⁴。今回の実験方法と組み合わせることにより卵子の活性化と卵子のメチル化阻害を同時に行うことも可能である。再構築胚作製の実験系では卵子を 10 時間 TSA に暴露する必要があり、実験に要する時間が長期化するが、PLC ζ -mRNA と Kdm4d の同時注入を行った後に CB で二倍高処理を 5 時間行うことで実験系を短縮することができるかもしれない。本方法は今後の繁殖生物学へ応用されることを期待する。

参考文献

1. Tanabe, Y. *et al.* Production of cloned mice using oocytes derived from ICR-outbred strain. *Reproduction* **154**, 859–866 (2017).
2. Kishigami, S. *et al.* Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 183–189 (2006).
3. Inoue, K. *et al.* Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science* **330**, 496–499 (2010).
4. Matoba, S. *et al.* Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell* **159**, 884–895 (2014).
5. Kishikawa, H., Wakayama, T. & Yanagimachi, R. Comparison of oocyte-activating agents for mouse cloning. *Cloning* **1**, 153–159 (1999).
6. Wakayama, T. Production of cloned mice and ES cells from adult somatic cells by nuclear transfer: how to improve cloning efficiency? *J. Reprod. Dev.* **53**, 13–26 (2007).
7. Kishigami, S. *et al.* Epigenetic abnormalities of the mouse paternal zygotic genome associated with microinsemination of round spermatids. *Dev. Biol.* **289**, 195–205 (2006).
8. Xie, B. *et al.* Histone H3 lysine 27 trimethylation acts as an epigenetic barrier in porcine nuclear reprogramming. *Reproduction* **151**, 9–16 (2016).
9. Hörmanseder, E. *et al.* H3K4 Methylation-Dependent Memory of Somatic Cell Identity

Inhibits Reprogramming and Development of Nuclear Transfer Embryos. *Cell Stem Cell*

21, 135-143.e6 (2017).

10. Wakayama, T. & Yanagimachi, R. Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction* **122**, 49–60 (2001).
11. Terashita, Y. *et al.* Latrunculin A can improve the birth rate of cloned mice and simplify the nuclear transfer protocol by gently inhibiting actin polymerization. *Biol. Reprod.* **86**, 180 (2012).

総括

卵子の人為的な活性化は円形精子細胞との受精や、体細胞核移植等の卵子活性化能を持たない細胞に必要とされている。現在、薬品や電気刺激が主に卵子の活性化に使われているが、より自然な方法として、精子頭部に存在するフォスホリパーゼ C ζ (PLC ζ) をコードする mRNA を卵子内へ注入して卵子を活性化させる方法も開発されている。だがこの方法で円形精子細胞からの産仔作出の報告があるものの、作出効率改善は報告されていない。加えて、実験方法も卵子に 2 回の注入作業を要することから卵子への負荷も多く実用化までに問題を抱えている。そこで、哺乳類の中で現在最も高い活性化能力を持つとされているウマ PLC ζ -mRNA を採用し、発生向上を目指した。加えて注入方法の改良により、卵子への負荷と作業効率の改善を図った。結果として、ウマ PLC ζ -mRNA はマウスよりも活性化に要する PLC ζ -mRNA の濃度は 10 倍であり、高い活性化の能力を示した。しかしながら最適な濃度検討を行った結果マウス PLC ζ -mRNA の産仔率を上回ることではなく、種ごとに合わせた PLC ζ -mRNA を使用する必要があることが明らかとなった。

一方で細胞と同時に PLC ζ -mRNA を注入する方法は、円形精子細胞、体細胞ともに機能することが明らかとなった。円形精子細胞では活性化までの時間に遅延が生じることでの悪影響が懸念されていたが、この活性化方法で産仔率の低下などは見られず実用的であることが示された。さらに体細胞クローンマウスにおいては、2 回に分けて注入するよりも同時に注入するほうがクローンの作出効率が改善した。だが、円形精子細胞と体細胞ともにエピジェネティクス修飾の改善は見られず、従来法と比較して産仔率の向上はみられなかった。このことから卵子の活性化はこれらの胚が持つ異常には作用しておらず、そのほかの原因があると示唆された。一方で、本方法はすべての哺乳類に応用できる新しい活性化方法であるため今後の生殖補助技術への応用が期待できる。

論文内容の要旨

論文題目: PLC ζ -mRNA 同時注入による円形精子細胞または 体細胞由来産仔の作出

氏名: 廣瀬 直樹

卵子の人為的な活性化は円形精子細胞との受精や、体細胞核移植等の卵子活性化能を持たない細胞に必要とされている。現在、家畜であるブタやウシ卵子の活性化には薬品や電気刺激が主に卵子の活性化に使われている。しかしこれらの活性化は通常受精よりも発生率や産仔率が低下する。そのため、より自然な方法として、精子頭部に存在するフォスホオリパーゼ C ζ (PLC ζ) をコードする mRNA を卵子内へ注入して卵子を活性化させる方法も開発されている。だがこの方法で円形精子細胞からの産仔作出の報告があるものの、作出効率改善は報告されていない。加えて、実験方法も卵子に 2 回の注入作業を要することから卵子への負荷も多く実用化までに問題を抱えている。そこで、哺乳類の中で現在最も高い活性化能力を持つとされているウマ PLC ζ -mRNA を採用し、発生向上を目指した。さらに注入方法の改良により卵子への負荷と作業効率の改善を図った。

まずマウス PLC ζ -mRNA とウマ PLC ζ -mRNA を卵子に注入する際の最適濃度を定めるための濃度検討を行った。マウス PLC ζ -mRNA の濃度を 0.1、1、10 ng/ μ l、そしてウマ PLC ζ -mRNA を 0.01、0.1、1 ng/ μ l に定め、活性化率とその後の発生率を調査した。結果として、マウス PLC ζ -mRNA において 0.1ng/ μ l 区で 18.5%と低い活性化率を示し、1ng/ μ l、10ng/ μ l では 93.8%、96.0%をそれぞれ示した。一方で、ウマ PLC ζ -mRNA では 0.01ng/ μ l で 21.5%の活性化率を示し、0.1ng/ μ l と 1ng/ μ l において、88.5%と 97.9%と高い活性化率を示した。

その後胚盤胞までの発生率を調べた結果、マウス PLC ζ -mRNA において、0.1 ng/ μ l では全期間において低い発生率を示した。そして 1ng/ μ l と 10ng/ μ l で桑実胚までの発生率に差は見られなかったが、10 ng/ μ l 区では胚盤胞発生率の低下が示された。また、ウマ PLC ζ -mRNA において、0.01 ng/ μ l と 1ng/ μ l の両区において、どの段階においても低い発生率を示した。しかし、0.1ng/ μ l 区において、77.2%の胚が桑実胚へと発生し、52.7%の胚が胚盤胞へと発生した。結果として、マウス PLC ζ -mRNA の最適濃度を 1 ng/ μ l、ウマ PLC ζ -mRNA の最適濃度を 0.1 ng/ μ l として今後の実験を行うことにした。

次に最適な不活性化処理精子の注入タイミングを調べた。マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA を注入後それぞれ 115-160 分後に観察を行った。そしてこれらの胚を

MII、A/TII、PBの3つに分類し活性化開始時間を調べた。その結果極体の放出は120-145分後に行われていることが明らかとなった。したがって、不活性化精子の注入はmRNAの注入後に行うことにした。

そして2細胞期胚をレシピエントマウスに移植を行い産仔率の検討を行った。移植の結果、マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA で活性化された卵子から正常な産仔が得られた。無処理の精子、マウス PLC ζ -mRNA、塩化ストロンチウムの産仔率はそれぞれ46%、37%、40%であったが、ウマ PLC ζ -mRNA の産仔率は24%となり他の区と比較して有意に産仔率が減少した。

次に PLC ζ -mRNA の注入方法の検討を行った。細胞と同時に注入される PVP 溶液は、単独で注入する場合よりもおよそ27分の1であることがフィコエステリンの注入量の計算により明らかとなった。実際にマウス卵子へ2, 20, 100 ng/ μ l の mRNA を注入した後に活性化率と発生率を観察した結果、20, 100 ng/ μ l 区において高い活性化率を示した。その後発生率を観察した結果20 ng/ μ l 区と100 ng/ μ l と比較して20 ng/ μ l の方が高い胚盤胞発生率を示した。20ng/ μ l 区の2細胞期胚は形態的に異常がみられないものが多いが、100 ng/ μ l 区では2細胞期時に発生が停止する胚が観察された。

体細胞核移植時においても最適濃度検討を再度行った結果、円形精子細胞の際と同様20 ng/ μ l の PLC ζ -mRNA が最適濃度であることが明らかとなった。

本実験の活性化法が従来法である塩化ストロンチウムによる活性化と比べてどの程度活性化に遅延が見られるのかを調べるために、円形精子細胞を注入してから経時的に核相を観察した。精子細胞の核相を染色体凝縮、染色体脱凝縮、前核形成の3つに分類した。そして同時注入を行った場合、細胞注入の前後で塩化ストロンチウムによる活性化を行った場合よりも早期染色体凝縮の発生率は低下していた(64%、71%、85%)。このことから同時注入を行った場合、活性化が MII 中期まで進行していることが明らかとなった。活性化の1時間後に観察を行った場合、同時注入された胚の脱凝縮率は、活性化を細胞注入前後で行った場合(50~59%)よりも低下していた(17%)。そのため活性化は遅れており、細胞注入後1時間後に活性化を行った場合と同様であった。(11%)。活性化および注入の4時間後の前核形成率を観察した場合、同時注入法は、1時間後に活性化を行った場合(41%)よりも低下していた(6%)よって同時注入法の活性化プロセスが1時間以上遅れたことを示唆した。

次に卵子の活性化方法の違いによって卵子のエピジェネティクス修飾が変化するかどうかを調べるために、円形精子細胞と正常受精胚と比較してすでに異常があることが知られている H3K9me3 の蛍光強度を調べた。その結果、正常受精胚と PLC ζ -mRNA を比較して塩化ストロンチウムと活性化した場合と同様の高メチル化が観察された。PLC ζ -mRNA を単体で注入して活性化した場合においても同様の結果が得られた。

実際に円形精子細胞と PLC ζ -mRNA を同時に注入した際の胚盤胞発生率および胚盤胞の質を調べた結果、塩化ストロンチウムで活性化した場合と同等の発生率を示した(65-64%)。一方で PLC ζ -mRNA を単体で注入した場合胚盤胞発生率は低下した(55%)。そし

て胚盤胞の ICM および TE の細胞数を比較した結果、PLC ζ -mRNA と円形精子細胞を同時に注入した場合と塩化ストロンチウムにより活性化した場合で差はみられなかった。

円形精子細胞と PLC ζ -mRNA を同時に注入する活性化を繁殖技術に応用することが可能か調べるために、2細胞期の ROSI 胚を偽妊娠雌に移植することで産仔率を調査した。その結果、従来法での生存卵子は 74%、円形精子細胞と PLC ζ -mRNA を同時に注入した区では 77%と有意な差はみられなかった。活性化率においても、2PN の割合が従来法では 49%、同時注入法では 31%と低くなる傾向はみられたが、有意な差はみられなかった。その後 2細胞期に発生する割合は従来法で 62%、同時注入法では 56%であった。その胚を偽妊娠雌に移植した結果、従来法では 30%、同時注入法では 31%と差はみられなかった。そして得られた産仔に異常はみられなかった。

PLC ζ -mRNA を用いて再構築胚を活性化させた場合において、再構築胚に対してエピジェネティクス修飾に変化を及ぼすかどうかを調べた。再構築胚において H3K9me3、H3k4me3、H3K27me3 が体細胞の初期化に大きくかかわると考えられていることからこの 3つの蛍光強度を観察した。その結果、PLC ζ -mRNA と塩化ストロンチウムで活性化させた場合を比較したが、有意な差はみられなかった。

最後に、PLC ζ -mRNA を用いて体細胞核移植を行い、卵丘細胞から正常な産仔を得ることに成功した。この成功率は同時注入による活性化と塩化ストロンチウムによる活性化は同等の産仔率であった(2.3-1.8%)。一方で、PLC ζ -mRNA を単体で注入した場合では他の実験区と比較して産仔率は低下した(0.5%)。また、胎児の重量および胎盤重量に関してすべての区において差は見られなかった。

本研究は新規活性化方法の開発を試みた結果、高い活性化能をもつウマ PLC ζ -mRNA を用いても産仔率を向上させることができなかった。一方で、PLC ζ -mRNA と細胞を同時に注入する方法は作業効率と卵子への負荷の減少に成功した。

SUMMARY OF DISSERTATION

TITLE : Birth of offspring from spermatid or somatic cell by
co-injection of PLC ζ -mRNA

NAME: Naoki Hirose

For assisted reproductive technology or animal reproductive biotechnology, oocytes are often activated artificially before or after injecting defective spermatozoa, round spermatids or somatic cell nuclei. To date, several oocyte activation methods have been reported. For example, strontium chloride (SrCl₂) is one of the most efficient activation methods reported for mouse oocytes electric pulses or calcium (Ca²⁺) ionophores are more efficient for porcine, bovine or human oocytes.

However, artificially activated oocytes usually show poor embryonic development and a lower birth rate compared with natural fertilisation with spermatozoa. The reason is unclear, but this may suggest that, compared with spermatozoa, these artificial activation methods are not suitable for ensuing embryo development.

Here, we used equine PLC ζ (ePLC ζ) mRNA to improve mouse embryo development. And we examined whether manipulated oocytes could be activated by PLC ζ -cRNA co-injection and offspring could be obtained from oocytes fertilised with ROSI or somatic cell nuclear transfer (SCNT).

First, 0.1, 1, and 10 ng/ μ l of mPLC ζ mRNA or 0.01, 0.1, and 1 ng/ μ l of ePLC ζ mRNA were injected into mouse oocytes to examine the optimal concentration of mPLC ζ or ePLC ζ mRNA for mouse oocyte activation. The oocytes were moved into CB containing CZB medium approximately 20 min after mRNA injection to inhibit the second polar body extrusion. The oocyte activation rate was determined based on pronuclear formation 6 h after mRNA injection. Activated oocytes were cultured for 4 days to examine parthenogenetic blastocyst development. Only 18.5% of oocytes were activated when 0.1 ng/ μ l of mPLC ζ mRNA was injected, and 93.8% or 96.0% of oocytes were activated with two pronuclei when 1 or 10 ng/ μ l of mRNA were injected, respectively. On the other hand, only 21.5% of oocytes were activated when 0.01 ng/ μ l of ePLC ζ mRNA was injected into mouse oocytes. 88.5% or 97.9% of oocytes were activated with two pronuclei when 0.1 or 1 ng/ μ l of mRNA were injected, respectively.

Parthenogenetically activated oocytes were cultured for four days to examine the developmental potential in vitro. In the mPLC ζ -mRNA experiment, oocytes activated by 0.1 ng/ μ l mPLC ζ mRNA injection showed lower developmental potential in all stages, and only 22.2% of embryo developed to blastocyst. When oocytes were activated by 1 or 10 ng/ μ l of mPLC ζ mRNA, the zygotes showed a higher developmental rate until the morula stage. However, the blastocyst rate was reduced when 10 ng/ μ l of mRNA was used for activation. In the ePLC ζ mRNA experiment, the oocytes injected with the lowest (0.01 ng/ μ l) or the highest (1 ng/ μ l) concentration showed lower developmental potential at each stage, and only a few or no embryos reached the blastocyst stage (5% and 0%, respectively). However, 77.2% of embryos developed to the morula stage when 0.1 ng/ μ l mRNA was injected, and 52.7% reached the blastocyst stage. Based on these results, 1 ng/ μ l of mPLC ζ mRNA and 0.1 ng/ μ l of ePLC ζ mRNA are the optimal concentrations for both oocyte activation and embryo development in vitro.

Next, we found the optimal timing for inactive sperm injection into the activated oocytes. The windows for fertilization between pre-activated oocytes and spermatozoa are very narrow and strict. The mPLC ζ mRNA or ePLC ζ mRNA injected oocytes were observed from 115 to 135 min or 140 to 160 min after injection, respectively. Those oocytes were classified into MII (not activated), anaphase/telophase II (A/TII: activation started), or polar body extrusion (PB). A/TII is an obvious sign of oocyte activation, and it is easy to observe without staining. A/TII was observed starting at 120 or 145 min after mPLC ζ or ePLC ζ mRNA injection, respectively. Therefore, we injected the inactive spermatozoa at these times after PLC ζ mRNA injection into mouse oocytes.

Finally, some of the embryos that developed to the two-cell stage were transferred into recipient females. Healthy offspring were obtained from activated oocytes using either mPLC ζ or ePLC ζ mRNA injection, the success rate derived from the ePLC ζ activated oocyte was 24%. This was significant lower than the rate derived from any other group (intact sperm: 46%, mPLC ζ activated: 37%, SrCl₂ activated: 40%).

When the injected amount was observed with phycoerythrin, the brightness of the co-injected oocytes was much less than the serial-injected oocytes. When the brightness of the whole oocytes was compared between serial and co-injection method by Image J software, the co-injected oocytes exhibited a brightness that was 27 times lower than the serial-injected oocytes. Based on these results, although our previous study showed that 1 ng/ μ L of PLC ζ -cRNA was the appropriate concentration for oocyte

activation and the same lot of PLC ζ -cRNA was used for both previous and present studies, we decided to use 20 ng/ μ L for the following experiments.

Similar results were obtained when somatic cell nuclei were injected using a relatively large injection pipette (5–6 μ m of inner diameter) with 2, 20 or 100 ng/ μ L of PLC ζ -cRNA into the enucleated oocytes. Although the activation rate was high in all concentrations of PLC ζ -cRNA (82–96%), the rate of blastocyst development was higher when 20 ng/ μ L of PLC ζ -cRNA was used (48%) compared with 2 or 100 ng/ μ L of PLC ζ -cRNA (21–22%).

To compare the rate of activation and pronuclear formation of the co-injection method, ROSI zygotes were activated by Sr activation method before (Pre-activation), immediately after (Post-activation) or 1 h after (Post-late-activation) spermatid injection. Then, those activated zygotes were stained at 30 min, 1 h and 4 h after activation. When the ROSI zygotes were observed 30 min after Sr activation or PLC ζ -cRNA injection, the rate of premature chromosome condensation (PCC) was lower in the oocytes that underwent the co-injection method (64%) than the post- or post-late activation method (71–85%), which suggests that the start of oocyte activation with the PLC ζ -cRNA co-injection was earlier than the other methods and already progressed to the metaphase II stage, which was similar to the pre-activation method. When the ROSI zygotes were observed 1 h after activation, the decondensation rate in co-injected zygotes was lower (17%) than pre- and post-activated zygotes (50–59%), which suggests that the activation process of the oocytes co-injected with PLC ζ -cRNA was delayed and is similar to the post-late activation method (11%). When the pronuclear formation rate was observed at 4 h after activation/injection, the zygotes derived from the co-injection method was lower (6%) than the post-late activated zygotes (41%) (1 h delayed compared with pre-activation method), which suggests that the activation process of the co-injection method was delayed by more than 1 h.

To investigate whether this delay affects the development of embryos, we cultured embryos for 4 days and examined the quality of the zygote and the blastocysts. In this experiment, ROSI zygotes were generated by post-activation using SrCl₂, co-injection of PLC ζ -cRNA with spermatid or PLC ζ -cRNA that was separately injected before spermatid injection (serial-injection). The in vitro developmental rate in all stages was always high in the post-activation and co-injection method compared with the serial-injection method. However, when embryos were cultured for 4 days, the rate of blastocyst development in all groups was similar (55–65%). When the cell number of blastocysts were examined between post-activation and co-injection method, which is an indicator for detecting the quality of the blastocyst, the cell ratio of ICM and TE of

blastocyst were similar irrespective of the activation method used. Then, the two-cell embryos were transplanted into pseudopregnant females, and the birth rates of offspring were examined. Offspring were obtained in all groups with similar success rates (26%, 24% and 24% in post-activation, co-injected and serial-injection method, respectively). In addition, we examined whether the activation methods would affect the epigenetic status of the ROSI zygotes. Thus, the levels of H3K9me3 of ROSI zygotes, which are known to show in ROSI zygotes with specific abnormalities, were compared between ICSI, post-activation using SrCl₂ and serial- and co-injection methods. The level of H3K9 me3 did not differ among all the ROSI zygotes, but largely different compared with the ICSI zygotes.

Finally, we examined whether PLCζ-cRNA co-injection method improved the success rate of mouse cloning. When PLCζ-cRNA was co-injected with cumulus cell nuclei, live and healthy offspring were obtained. The success rate was similar (1.8%) to the original Sr activation method (2.0%), which was similar to a previous report where ICR mouse was used. However, when PLCζ-cRNA was injected separately following SCNT, only one cloned offspring (0.5%) was obtained. The body and placenta weight were not different between all groups. In addition, we examined whether the activation methods will affect the epigenetic status of SCNT embryos. Thus, the levels of H3K4 me3, H3K9 me3 and H3K27 me3 of SCNT zygotes, which are known to show in cloned embryos with specific abnormalities, were compared between the co-injection and original methods. The level of H3K4 me3, H3K9 me3 and H3K27me3 did not differ between both methods.

In this study, the birth rate after embryo transfer was significantly decreased in oocytes activated by ePLCζ mRNA (24%) compared to mPLCζ mRNA (37%) or strontium treatment (40%) activation. On the other hands, the PLCζ-cRNA co-injection method could be simply oocyte activation with less damage, and with accurate activation time in individual oocytes, it can be useful for the basic study of oocyte activation and development.

blastocyst were similar irrespective of the activation method used. Then, the two-cell embryos were transplanted into pseudopregnant females, and the birth rates of offspring were examined. Offspring were obtained in all groups with similar success rates (26%, 24% and 24% in post-activation, co-injected and serial-injection method, respectively). In addition, we examined whether the activation methods would affect the epigenetic status of the ROSI zygotes. Thus, the levels of H3K9me3 of ROSI zygotes, which are known to show in ROSI zygotes with specific abnormalities, were compared between ICSI, post-activation using SrCl₂ and serial- and co-injection methods. The

level of H3K9 me3 did not differ among all the ROSI zygotes, but largely different compared with the ICSI zygotes.

Finally, we examined whether PLC ζ -cRNA co-injection method improved the success rate of mouse cloning. When PLC ζ -cRNA was co-injected with cumulus cell nuclei, live and healthy offspring were obtained. The success rate was similar (1.8%) to the original Sr activation method (2.0%), which was similar to a previous report where ICR mouse was used. However, when PLC ζ -cRNA was injected separately following SCNT, only one cloned offspring (0.5%) was obtained. The body and placenta weight were not different between all groups. In addition, we examined whether the activation methods will affect the epigenetic status of SCNT embryos. Thus, the levels of H3K4 me3, H3K9 me3 and H3K27 me3 of SCNT zygotes, which are known to show in cloned embryos with specific abnormalities, were compared between the co-injection and original methods. The level of H3K4 me3, H3K9 me3 and H3K27me3 did not differ between both methods.

In this study, the birth rate after embryo transfer was significantly decreased in oocytes activated by ePLC ζ mRNA (24%) compared to mPLC ζ mRNA (37%) or strontium treatment (40%) activation. On the other hands, the PLC ζ -cRNA co-injection method could be simply oocyte activation with less damage, and with accurate activation time in individual oocytes, it can be useful for the basic study of oocyte activation and development.

※ 甲第 号	学位申請者氏名	廣瀬直樹
<p>論文目録</p> <p>1 学位論文題目 PLC ζ -mRNA 同時注入による円形精子細胞または体細胞由来産仔の作出</p> <p>2 関係論文</p> <p>Hirose, Naoki, Sayaka Wakayama, Rei Inoue, Junya Ito, Masatoshi Ooga, and Teruhiko Wakayama. 2020. “Birth of Offspring from Spermatid or Somatic Cell by Co-Injection of PLC ζ -CRNA.” <i>Reproduction</i> 160 (2): 319–30.</p> <p>Yamamoto, Yunosuke, Naoki Hirose, Satoshi Kamimura, Sayaka Wakayama, Junya Ito, Masatoshi Ooga, and Teruhiko Wakayama. 2020. “Production of Mouse Offspring from Inactivated Spermatozoa Using Horse PLC ζ MRNA.” <i>The Journal of Reproduction and Development</i> 66 (1): 67–73.</p> <p>Konno, Shunsuke, Sayaka Wakayama, Daiyu Ito, Kousuke Kazama, Naoki Hirose, Masatoshi Ooga, and Teruhiko Wakayama. 2020. “Removal of Remodeling/Reprogramming Factors from Oocytes and the Impact on the Full-Term Development of Cloned Embryos.” <i>Development</i> 147 (15). https://doi.org/10.1242/dev.190777.</p> <p>Wakayama, Sayaka, Daiyu Ito, Yuko Kamada, Toru Shimazu, Tomomi Suzuki, Aiko Nagamatsu, Ryoko Araki, et al. 2021. “Evaluating the Long-Term Effect of Space Radiation on the Reproductive Normality of Mammalian Sperm Preserved on the International Space Station.” <i>Science Advances</i> 7 (24): eabg5554.</p> <p style="text-align: right;">学位申請者 廣瀬 直樹 ㊟</p>		

※印の欄は記入しないこと。

謝辞

本研究の進行、論文作成にあたり、終始ご指導を頂きました山梨大学生命環境学部生命工学科 若山照彦教授に心より感謝申し上げます。

論文の執筆にあたり貴重なご助言を賜りました山梨大学生命環境学部生命工学科 岸上哲士教授、幸田尚教授、黒澤尋教授、若山清香助教、大我政敏助教に厚く御礼申し上げます。

また PLC ζ -mRNA のサンプルを提供していただきました麻布大学 伊藤潤哉教授に感謝申し上げます。

そして本研究を進めるにあたり、多くのご指導、ご援助を賜りました山梨大学発工学研究センターの皆様へ深く感謝申し上げます。