

## 様式3

## 群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和6年4月26日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学大学院医学系研究科  
職 名 助教  
研究代表者 佐々木恵亮

下記のとおり令和5年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 23015)

1. 共同研究課題名	高品質な卵の産生を実現するマウス高度体外卵作出系の開発			
2. 共同研究目的	申請者らは試験管内で機能的なマウス成熟卵を作出することに成功したが、体外作出卵は様々な問題点を抱えることがわかっている。本研究では、この問題点をエビジェネティックな観点から検証し、より高品質な卵を安定的に作出可能な培養系を開発することを目的とした。高度化した培養系を他の哺乳動物種に応用できれば、ヒト・家畜をはじめとした医学および農学分野の発展に大きく貢献できると期待される。			
3. 共同研究期間	令和5年4月1日 ~ 令和6年3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 佐々木恵亮	群馬大学大学院医学系 研究科附属生物資源セ ンター	助教	培養系の改変や遺伝子導入に関 する実験・解析の実施	
(分担研究者) 佐藤裕公	群馬大学生体調節研究 所細胞構造分野	准教授	遺伝子導入に関する実験・解析 の実施	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	細胞構造分野	氏 名	佐藤 健 教授

次の6, 7, 8の項目は、枠を自由に変更できます(横幅は変更不可)。6, 7, 8の項目全体では2頁に収めてください。

## 6. 共同研究計画

研究代表者はこれまでに産仔へと至る機能的なマウス卵を試験管内で産生する体外卵作出系を開発し、これによって卵形成過程の全てを体外で再現することが可能となった。しかしながら、この体外作出卵はエピジェネティクスの一部に異常を抱えるとともに、発生能力が低い、いわゆる低品質な卵であるという問題点を抱えている。エピジェネティクスの正常性は卵が個体発生に欠かせない生命現象であるため、この異常は卵の品質低下に強く影響すると考えられる。本共同研究計画では、マウス体外作出卵で起こるエピジェネティックな異常がどのように卵の品質低下を引き起こすのかを明らかにするとともに、この異常を克服した高度な培養系を確立するための基盤整備を目指す。

研究代表者はこれまでに細胞構造分野・佐藤裕公准教授との共同研究として、マイクロマニピュレーションによる培養開始前の卵胞内卵母細胞への遺伝子導入技術の開発を進めてきた。本共同研究では体外作出系と遺伝子導入技術の融合を図る。また、体外作出卵でみられるエピジェネティックな異常等の原因を探るための研究に着手する。はじめにマウス体外作出系の後半部分である卵胞成長培養(in vitro growth; IVG)の培養系見直しを行い、続いて遺伝子導入技術と IVG の融合にとりかかった。これによって、特定のエピジェネティック関連遺伝子(群)が卵の機能に果たす役割の理解を可能にするスクリーニング系を構築する。さらに、研究代表者がこれまでに発見した体外作出卵におけるエピジェネティックな異常がどのような遺伝子領域で発生するかを明らかにするため、次世代シーケンス解析 CUT&Tag による全エピゲノムプロファイリングを実施した。

## 7. 共同研究の成果

本共同研究課題において、生体調節研究所との共同研究が貢献した内容についても具体的に記載してください。

### ①体外卵作出系のシステム改変

エピジェネティクス関連遺伝子の操作以外の方法による IVG の改変に着手した。14 日間におよぶ IVG の前半 4 日間を 20%酸素分圧における浮遊培養で、後半 10 日間を 7%酸素分圧における接着培養で構成させるスイッチング法を開発し、これまでよりも効率的に機能的な卵を産生できるようになった(図 a)。スイッチング法で作出した卵は着床後の発生が従来法と比較して良好となる傾向がみられたが、その品質は体内産生卵と比較して依然低く、体外で培養すること自体が卵の品質を著しく損なわせることが改めて示された。

### ②卵への遺伝子導入と体外卵作出系の融合

10 日齢マウス由来の二次卵胞に対してマイクロマニピュレーターを用いてプラスミド DNA/mRNA/siRNA を遺伝子導入し、①で構築した改変型 IVG によって成熟した遺伝子導入卵を作出した。導入核酸の発現/発現低下は IVG の全過程を通して維持されたこと、遺伝子導入卵は正常に受精・発生したことから、本融合ツールが体外で遺伝子機能をスクリーニングしうるものであることが証明された(図 b)。本項目では、共同研究担当教員・佐藤健教授並びに分担研究者・佐藤裕公准教授によってマイクロマニピュレーターを用いた卵への遺伝子導入技術が向上し、これまでよりも高効率かつ低侵襲な遺伝子導入が可能となった。また、佐藤裕公准教授によって遺伝子導入卵が正常に受精や初期発生をクリアできることが明らかとなった。

### ③体外作出卵のエピジェネティック異常の特定

研究代表者はこれまでに体外作出卵が複数のヒストンメチル化修飾に異常を抱えることを明らかにしてきた。本研究課題では、これらのヒストン修飾の異常が生じる遺伝子座を特定するため次世代シーケンス解析 CUT&Tag を実施し、体外作出卵ではヒストン H3 における 4 番目および 27 番目のリジンのトリメチル化修飾(H3K4me3/H3K27me3)を失う遺伝子領域が存在することを明らかにした(図 cd)。マウス卵において H3K4me3/H3K27me3 はともに転写抑制に寄与するため、体外作出卵では異常な転写脱抑制が生じること

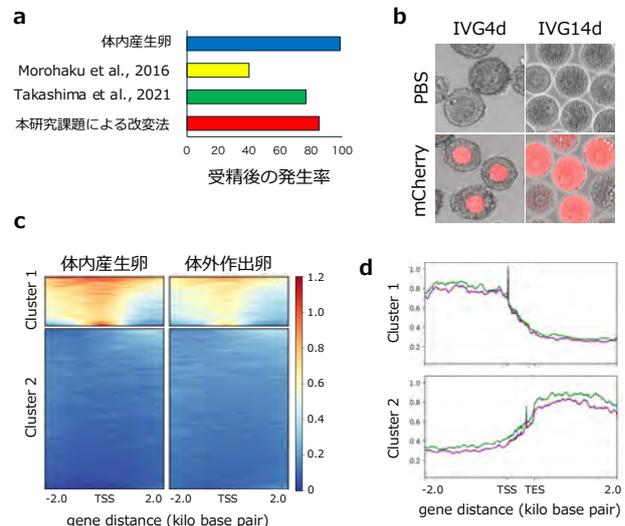


図. (a) 本研究課題で開発した改変法によって生み出された体外作出卵の受精後の発生能、(b) 遺伝子導入卵の作出、マイクロマニピュレーションとIVGの融合によりmCherry発現プラスミドを導入し、体外で成熟卵を作出した。培養4日目 (IVG4d) および培養完了時 (IVG14d) の双方において外来遺伝子の発現が認められた。(c) 体外作出卵におけるH3K4me3-CUT&Tagデータ、転写開始点近傍のH3K4me3修飾強度を示す。体外作出卵ではH3K4me3が失われる遺伝子領域 (Cluster 1) が存在した。(d) 体外作出卵におけるH3K27me3-CUT&Tagデータ、Gene bodyおよび上下流のH3K27me3強度を示す。体外作出卵ではH3K27me3レベルの低い遺伝子クラスターが検出され、転写開始点上流および転写終結点下流に修飾強度の違いがみられた。緑線: 体内産生卵、紫線: 体外作出卵、TSS: 転写開始点、TES: 転写終結点

が示唆された。H3K4me3/H3K27me3 を失う遺伝子を標的とした siRNA を用いたスクリーニングの実施はできなかったが、これを実施することでエピジェネティクスの異常に端を発する体外作出卵の品質低下のメカニズムを明らかにすることができると考えられる。また、CUT&Tag の実施にあたっては、令和 5 年度内分泌・代謝学共同研究拠点講習会(②CUT&Tag サンプル調製コース)の内容を参考に実施した。

#### 8. 共同研究成果に関連する学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等をできる限り

記載してください。なお、論文の場合は、PDFファイルを以下の研究所庶務係のメールアドレスまで報告書と併せてお送りください。) 研究所庶務係 e-mail : kk-msomu4@ml.gunma-u.ac.jp

##### ①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

1. Satouh Y., Suzuki E., Sasaki K., Sato K. Development of an mRNA electroporation method in immature mouse oocytes to visualize protein dynamics during early development. 2023, *bioRxiv*, DOI: <http://doi.org/10.1101.2023.12.07.570343> ※現在 *Biology of Reproduction* 誌にてリバイス中

##### ②この共同研究に基づくとの記載のある論文

なし

##### ③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名, 開催日, 演題)

1. 第 116 回日本繁殖生物学会大会、2023 年 9 月 24～27 日、体外卵成長培養がマウス卵のエピジェネティクスに与える影響

##### ④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

担当教員ならびに分担研究者とは同一キャンパスに研究室があるため、月に 1 回程度の頻度で培養系構築および遺伝子導入法についての経過報告やディスカッションを行っている。