

QuantiGene ViewRNA を用いたマウス単一卵子での in situ hybridization 技術手法の確立

西村 愛美¹、近藤 健二¹、木我 敬太²、東 佳澄²、
田部 宏和³、中川 隆生⁴、加藤 博己⁵、細井 美彦^{1,2,5}、
安齋 政幸⁵

要 約

私達は、Branched DNA 技術により微量 mRNA の検出が可能である、QuantiGene ViewRNA を用いた in situ hybridization 技術をマウス単一卵子での実験手法の確立を目的に、組織で検出できる方法を改良することにより卵細胞での評価を行なった。今回用いた卵子の成熟因子に関わる Gdf9 およびハウスキーピング因子 18S を検討したところ、いずれの因子において、卵子での発現を認めた。本 QuantiGene ViewRNA キットを用いた in situ hybridization の手法を確立することが可能となり、今後、未成熟卵子あるいは成熟卵子そして初期胚における単一卵子での遺伝子発現の解析に有効なツールとなることが示された。

緒 言

現在、実験動物学分野において発生工学や遺伝子工学の進歩による様々な疾患モデル動物や遺伝子操作動物が作出され、これらの膨大な系統には性成熟前に死亡する場合や性成熟齢に達しても繁殖障害となる系統が数多く含まれる¹⁾。このような系統から産子を得る方法として、体外受精²⁾のみならず様々な生殖補助技術³⁾ さらに未成熟卵子あるいは精子から受精卵を作出し産子への発生能を検討している⁴⁾。しかしながら、実験動物分野も同様に生殖工学的技術による Taylor Made 対処法が望まれる昨今、卵子あるいは精子の quality あるいは動物種差におけるヒトへの外挿の選択⁵⁾ が多岐に渡るにより困難な状況を認めることも否めない。

私達は、遺伝的に均一な近交系に由来する C57BL/6 系統を用いて、卵巣組織から得られる未成熟卵子を回収し成熟させた後、体外受精および産子への発生を検討したところ、この系統による産子獲得が可能であることを示した⁶⁾。しかし卵巣内卵子の有効利用を目的とした研究において、未成熟卵子を用いた体外成熟後の体外受精などが以前から研究されており、正常な産子が得られているが、受精における様々な形態学的変化さらに卵子または精子からの初期発生機構には様々な特性が存在することが知られている⁷⁾。私達も今まで報告例のない近交系に由来する C57BL/6 系統において、体外成熟由来卵子を用いてレーザー穿孔処理によって得られた初期胚からの正常産子を得ることに成功^{6,8)}しているものの、産子への発生率は交雑系マウスと比較した場合低率であった(佐東、未発表)。これらのマウス系統差においては、①未成熟卵子からの遺伝子発現制御および時間・空間的転写因子の寄与機構あるいは、②成熟時における発生制御機構そして、③受精後以降での転写発現機構の制御等、解決する課題が多い。そこで本実験では、卵細胞質内存在下における種々の発現機構を探求する手段として、免疫組織化学的に検出する非放射性標識プローブを用いた in situ hybridization 技術を用いて、蛍光多重染色法におけるマウス系統差が未成熟

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 株式会社ベリタス 〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14

4. 株式会社紀和実験動物研究所 〒640-1473 和歌山県海草郡紀美野町毛原宮 486

5. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

卵子からの形態学的特性および遺伝子発現制御の検出方法を、マウス単一卵子を用いることにより、その実験手法の確立を検討した。

材料および方法

(1) 供試動物

供試動物として、成熟週齢に達した雌マウスの C57BL/6J (日本クレア (株)) および B6C3F1 [C57BL/6N×C3H/HeN] (日本チャールズ・リバー (株)) を用いた。いずれの系統も、一定期間馴化後 (明期: 7:00 ~ 19:00、暗期 19:00 ~ 7:00) 実験に供した。飼育条件は、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 50% の条件のもと、床敷き (サークルチップ: (株) 紀和実験動物研究所) および飼料 (500N: 日本 SLC (株)) は滅菌済みのものを、飲水は水道水を自由摂取させた。

なお本実験に際して、実験動物の飼養と管理については、近畿大学動物実験規程に準じて行った。

(2) 培地の調整

体外成熟を行う培地としては、TYH と α MEM を 1:1 に混合した TaM 培地を基本成熟培地として、透明帯硬化の抑制を目的に 5% FBS を添加した修正 TaM (以下、mTaM 培地) を調製し濾過滅菌を行ったものを使用した⁶⁾。体外成熟させた各系統の卵子はその後の実験に供した。

(3) 卵巣からの未成熟卵子の回収および体外成熟操作

マウス卵巣からの未成熟卵子の回収および体外成熟操作は、西村らの方法に準じて行なった⁸⁾。すなわち、各系統の雌マウスに、血清性腺刺激ホルモン (以下、PMSG: セロトロピン、あすか製薬 (株)) を 7.5 単位腹腔内投与した。PMSG 投与後、46 ~ 48 時間後に卵巣を摘出した。続いて、0.1% ヒアルロニダーゼを含む CZB-Hepes 培地中⁹⁾にて、26G の注射針を用いて発達した胞状卵胞を細切し、卵巣から GV 期卵子を回収すると共にピペッティングにより卵丘細胞を除去した。次に回収した GV 期卵子を CZB-Hepes 培地にて洗浄し回収し、形態学的に正常な GV 期卵子を、mTaM 培地を用いて 1 ドロップ $50 \mu\text{L}$ 毎に、約 30 個の GV 期卵子を炭酸ガスインキュベーター内 (37°C 、5% CO_2 in air) にて 16 時間培養し、体外成熟を行った。成熟培養後、形態学的に卵核胞崩壊が認められた卵子を M II 期卵子と認め、回収を行なった。

(4) 回収卵子を用いた in situ hybridization 操作

今回、用いた in situ hybridization 手法として、branched DNA という特殊技術により感度を増感させ、低 copy の mRNA を検出することを可能とした、QuantiGene ViewRNA ((株) ベリタス: QV0012) を用いた。また、今回観察する発現因子として卵子の成熟因子として報告¹⁰⁾されている Gdf9 (Accession No: NM_008110, Region covered by Probe Set 182-1280) を用いた。また、ハウスキーピング因子として 18S (Accession No: X03205, Region covered by Probe Set 337-664) のそれぞれのプローブを用いて実験手法を検討した。

QuantiGene ViewRNA を用いた簡易プロトコールについては、Fig 1. に示した。すなわち、各系統から得られた未成熟卵子をそれぞれ、酸性タイロド溶液 (Irvine Scientific: 99252) を用いて透明帯の除去を施した。回収した各卵子は、96 穴マイクロプレート (FALCON: 3077) 上へ単一卵子になるように加え、固定操作を行い 0.1% PVA in PBS (-) にて卵子を洗浄後、界面活性剤による透過処理を行った。次に QuantiGene ViewRNA キットを用いて、Protease 処理をした。10 分間の Protease 処理を行った各試料は、Protease Stop 溶液により平衡処理を行った。続いて、Hybridization A 溶液 (以下、Hyb A) に Probe を

混合して、試料を 1 時間 40 度下にて反応させた。次に試料を洗浄後、Hybridization B 溶液（以下、Hyb B）と PreAmplifier 溶液（以下、PreAmp）を混合し、40 度にて 1 時間反応処理した。洗浄後、Hyb B と Amplifier 溶液（以下、Amp）を混合し、40 度にて 1 時間反応させた。洗浄後、Hybridization C 溶液（以下、Hyb C）と Label Probe（以下、LP）を混合し 40 度にて 1 時間反応処理させた。反応処理させた各卵子は、スライドガラス（MATSUNAMI:S-0317）へ移し DAPI 染色を行なった。

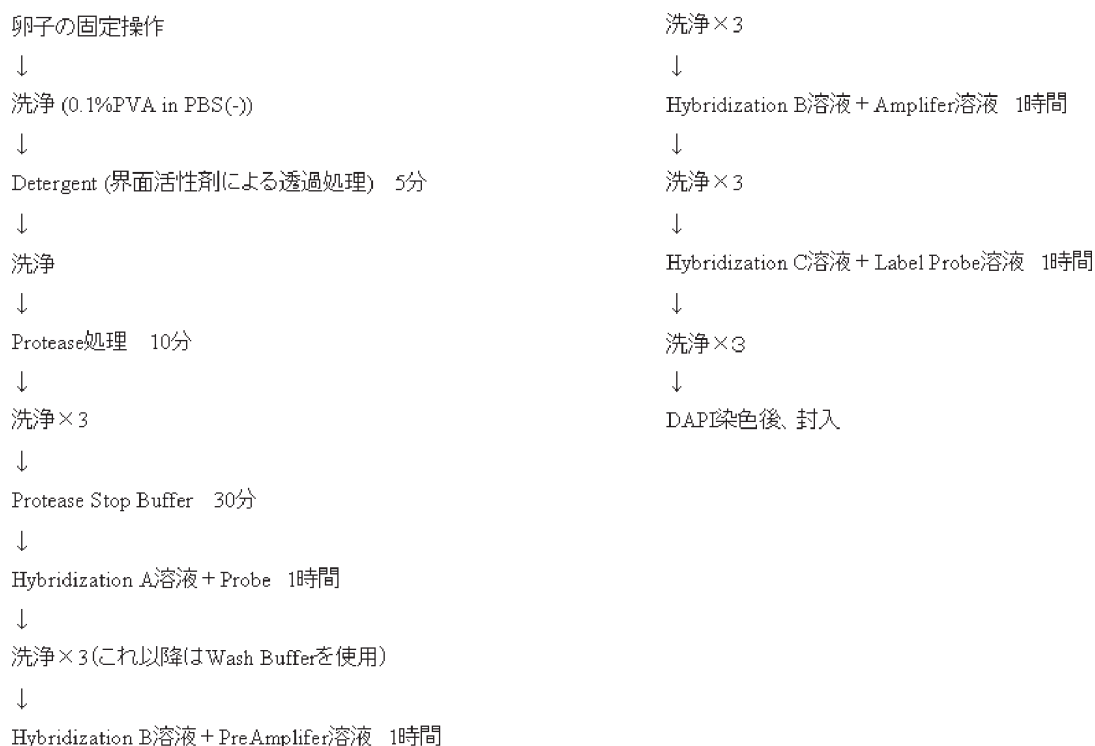


Fig 1. QuantiGene ViewRNA を用いた簡易プロトコール

(5) 形態学的検査および技術手法の確認

in situ hybridization を施した各系統の試料は、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica:DMI6000B) を用いて、蛍光イメージングシステム (Leica:AF6500) による画像観察を行い、卵細胞質内の発現動態を確認することで、本手法の技術確立を評価した。

結 果

各系統におけるマウス卵巣から回収した未成熟卵子は、mTaM 培地下での成熟培養により、C57BL/6J 卵子では 90% (691/765) が、B6C3F1 では、97% (230/238) の卵子が正常に成熟卵子へと発生することを確認した (Table 1.)。

Table 1. 各マウス系統より得られた未成熟卵子の体外成熟成績

系統	供試卵子数	成熟卵子数 (%)
C57BL/6J	765	691(90)
B6C3F1	238	230(97)

これら、各マウス系統の卵子を試料とした QuantiGene ViewRNA による実験操作において、卵子の操作時間は、おおよそ 2 日間であり短時間で処理することができた。またプレート上での卵子の取り扱い手法 (Fig 2.) について、一般に用いられるスライドガラス上では卵子の紛失あるいは卵細胞の崩壊などにより実験に供することが困難になる場合があるが、本プレート上で行なう操作では、効率よく卵子の回収が可能であり、通常の初期胚の操作と同様にキャピラリー操作 (Fig 3.) で取り扱えることから、より簡便であると考えられた。

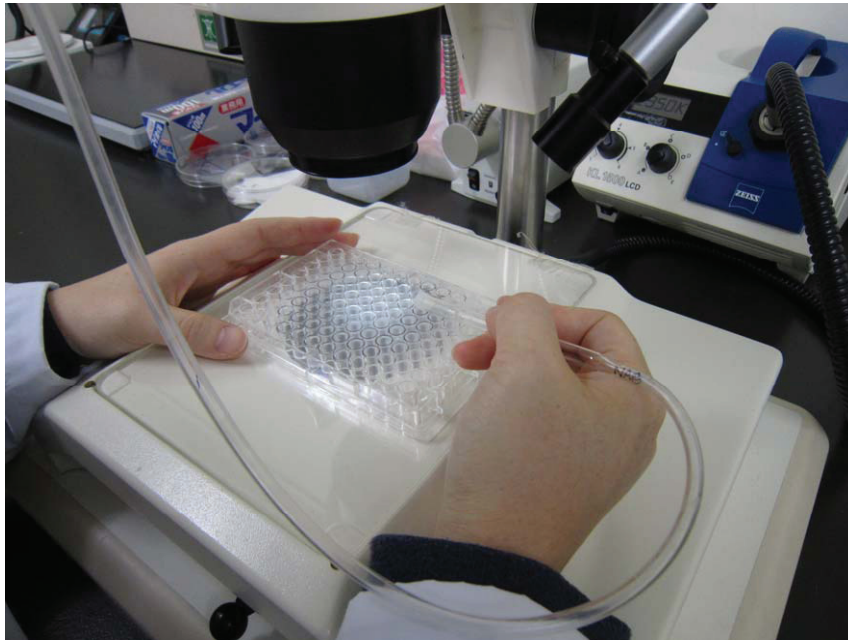


Fig 2. 96 穴プレート上での卵子の取り扱い手法の一例

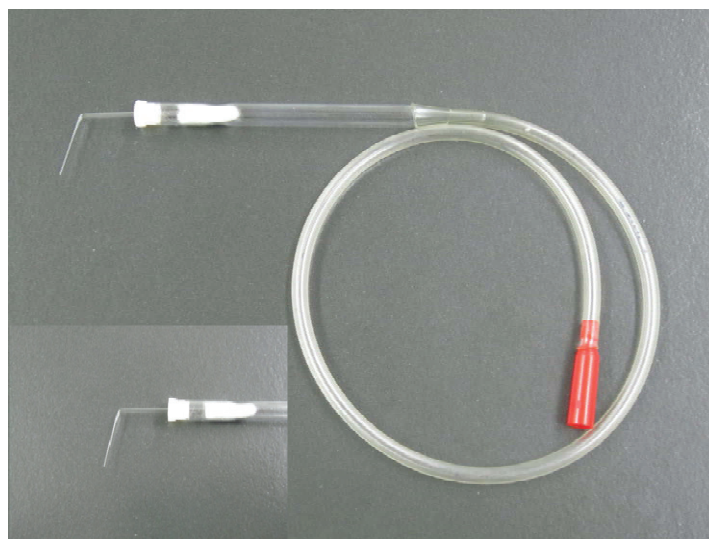


Fig 3. 卵子の操作ツール (採卵用キャピラリー先端を加工したもの)

QuantiGene ViewRNA を用いた in situ hybridization を施した C57BL/6J 未成熟卵子および B6C3F1 未成熟卵子での Gdf9 因子の画像観察結果を Fig 4. および Fig 5. に示す。この各マウス系統での卵子細胞質内に存在する Gdf9 を検出することが確認できた。また、各系統間による検出感度には差異がないことが認められた。全ての処理した試料について、ハウスキーピング因子 18S を用いたところ、いずれの系統間および得られた未成熟卵子における卵細胞質内の発現を確認することにより、本手法の技術習得を確認した。

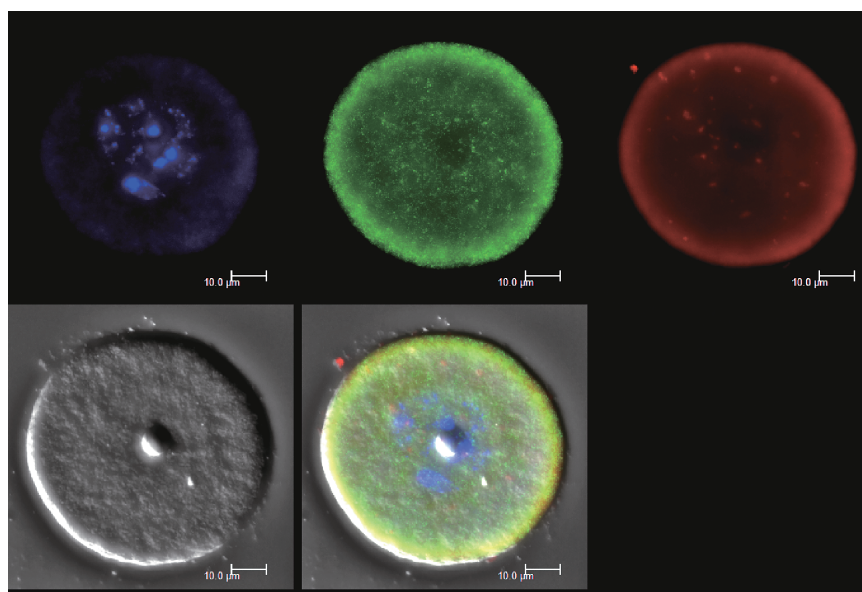


Fig 4. C57BL/6J マウス未成熟卵子を用いた in situ hybridization 法による Gdf9 蛍光像
青色蛍光は DAPI、緑色蛍光は Gdf9、赤色蛍光は 18S の局在を示している。

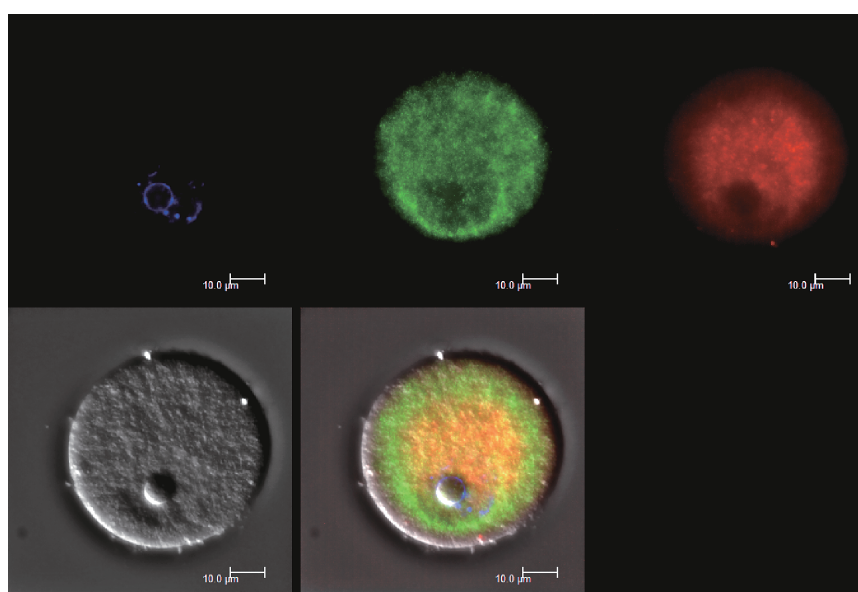


Fig 5. B6C3F1 マウス未成熟卵子を用いた in situ hybridization 法による Gdf9 蛍光像
青色蛍光は DAPI、緑色蛍光は Gdf9、赤色蛍光は 18S の局在を示している。

考 察

マウス単一卵子での in situ hybridization 法における実験手法の確立を目的に、QuantiGene ViewRNA を用いることにより細胞質内遺伝子発現の動態を確認することが可能であり、細胞切片のみならず卵子での適用が可能であると示された。

従来、本法では Target Probe を細胞質内に存在する mRNA に hybridization する場合、その Probe の膜透過性や効率の面から卵細胞質への検出が困難な場合が生じ、実験手法の構築にはプローブの作成から検出感度の再現性の獲得に時間が要する。また、検出感度を高めるために tyramide signal amplification など、ビオチン化チラミドを加えることにより、ペルオキシダーゼによりチラミドがラジカル化され、近傍の組織あるいは細胞と反応して共有結合することにより多数のビオチン分子を局所に固定化する手法も開発¹¹⁾されているが、蛍光検出強度に再現性を必要とし、必ずしも感度の問題が解決されているわけではない。本法では、非常に短い Probe を用いることにより卵子への侵襲性を高め、さらに、Probe が 10 以上連なることでのみ可視化できる蛍光感度を得られることから、高い特異性と効率化が得られたと考えられる (Fig 6)。また、本技術へ卵子への適用は多くの知見がなく、現在、単一卵子での解析報告はない。このことから、非常に短時間で処理が可能な QuantiGene ViewRNA を用いる in situ hybridization 技術は、今後、有効な解析手段の一つとして考えられる。

Monti らは、過剰排卵処理にて作出した B6C3F1 卵子を用いて RT-PCR 手法での遺伝子定量解析および免疫蛍光染色での発現遺伝子の局在を検討している¹²⁾。Gdf9 では、PMSG および hCG 投与における過剰排卵処置で回収された卵子の動態は、時間経過を伴う卵細胞質の形態変化により、その発現量および細胞質内の局在に変化を生じると報告しているが、複数の卵子を用いて定量解析を行っているため、単一卵子における発現量は明確ではないと思われる。私達が本実験によって技術手法を確立した、in situ hybridization 法を適用することは、今後、1 因子に起因する卵子細胞質内の RNA 蓄積量の変化を明確に解析することを可能にし、貴重な情報を得られると考えられる。

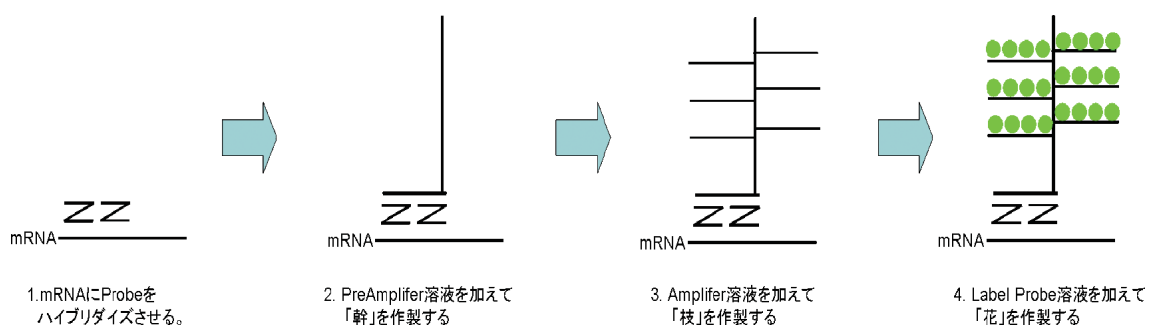


Fig 6. QuantiGene ViewRNA を用いた蛍光検出の原理

Hyb A に Probe (20 オリゴヌクレオチド以上) を混合させた溶液内で特異的遺伝子に Probe を hybridize させる (イメージとしては植木鉢の作製)。その後、Hyb B に PreAmp を加えて、40 度下にてさらに hybridize させることで Probe ペアになっている場所で幹の部分を作製する。Hyb B に Amp を加えて枝の部分を作製し、Hyb C に LP を加えて枝に蛍光色素である「花」を咲かせる。花の咲いた幹が 10 ペア以上並ぶことで初めて可視化できる蛍光となるため特異的な mRNA の検出が可能になっている (QuantiGene ViewRNA User Manual を一部改変)。

謝 辞

本実験に関して、貴重なサンプルの提供をいただきました株式会社池田理化、渡辺克彦氏、川橋裕子氏へ感謝申し上げます。また、株式会社紀和実験動物研究所、東雅志氏には、実験動物の飼養と管理に関してアドバイスを賜りました。ここに感謝申し上げます。

文 献

1. Festing M. F. W. (1980). International index of Laboratory Animals. (4th edition), Medical Research Council Laboratory Animals Centre, Carshalton, Surrey, UK.
2. 豊田裕, 横山峯介, 星冬四朗. (1971). マウス卵子の体外受精に関する研究 I. 精巢上体精子による受精成績. 家畜繁殖誌. 16. 147-151.
3. Yanagimachi R. (2005). Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and application in humans and animals. *Reprod. Biomed. Online*. 10. 247-288.
4. Hiromi M., Narumi O., Kimiko I., Tadashi B and Atsuo O. (2006). Improvement of Cumulus-free Oocyte Maturation In Vitro and Its Application to Microinsemination with Primary Spermatocyte in Mice. *J. Reprod. Dev.* 52. 239-248.
5. Gosden R., Trasler J., Lucifero D. (2003). Rare congenital disorders, imprinted gene, and assisted reproductive technology. *Lancet*. 361. 1975-1977.
6. 佐東春香, 西村愛美, 森田真裕, 古田祐奈, 柳美穂, 安齋政幸 (2009). 近交系 C57BL/6 マウスの未成熟卵子を用いた体外成熟および発生能の検討. *実験動物技術*. 44 (2). 43-48.
7. Reik W., Dean W., Walter J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 293 (5532). 1089-1093.
8. 西村愛美, 大本夏未, 西山有依, 柳美穂, 三谷匡, 細井美彦, 入谷明, 安齋政幸. (2010). C57BL/6 系未成熟卵子を用いた成熟後におけるレーザー穿孔処理・体外受精方法の検討. *近畿大学先端技術総合研究所紀要*. 15. 27-36.
9. Chatot C. L., Lewis J. L., Torres I., Ziomek C. A. (1990). Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Bio. Reprod.* 42. 432-440.
10. Mary J C., Julia E., Martin M. Matzuk and David F. Albertini. (1998). Characterization of Oocytes and Follicle Development in Growth Differentiation Factor-9-Deficient mice. *Dev. Biol.* 204. 373-384.
11. Speel E J., Hopman A H., Komminoth P. (1999). Amplification methods to increase the sensitivity of in situ hybridization: play card (s). *J Histochem Cytochem.* 47. 3. 281-288.
12. Monti M., Redi C. (2009). Oogenesis specific genes (Nobox, Oct4, Bmp15, Gdf9, Oogenesis1 and Oogenesis2) are differentially expressed during natural and gonadotropin-induced mouse follicular development. *Mol. Reprod. Dev.* 76. 10. 994-1003.

英文要旨

Establishment of in situ hybridization technique with
mouse single ovum that uses QuantiGene ViewRNA

Manami Nishimura¹, Kenji Kondo¹, Keita Kiga², Kasumi Higashi², Hirokazu Tabe³,
Takao Nakagawa⁴, Hiromi Kato⁵, Yoshihiko Hosoi^{1, 2, 5}, Masayuki Anzai⁵

Abstract

We evaluated ooplasm using QuantiGene ViewRNA which was able to detect a small amount of mRNA by the Branched DNA technology with a mouse single ovum. This study aimed to establish experimental method. We investigated Gdf9 which is related to oocyte maturation factor and 18S which is housekeeping factor. Hereby, it was recognized that each factor were expressed in oocytes. It was able to establish the technique of in situ hybridization using this QuantiGene ViewRNA kit. These results suggest that an effective tool for the analysis of the gene expression was mouse immature ovum or the early embryo.

-
1. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan
 2. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan
 3. VERITAS Co, Ltd., Tokyo 105-0001, Japan.
 4. Kiwa Laboratory Animal Co, Ltd., Wakayama 640-1473, Japan
 5. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Wakayama 642-0017, Japan