

博士學位論文

エピゲノム編集と超解像イメージングによるマウス生殖
細胞染色体ペリセントロメア／セントロメア領域の機能
および動態解析

2022年1月20日

近畿大学大学院

生物理工学研究科生物工学専攻

波多野 裕

目次

第1章 序論	1
第2章 エピゲノム編集によるマウス生殖系列細胞特異的なペリセントロメア およびセントロメアの低 DNA メチル化状態の意義の解明	
第1節 ペリセントロメアにおける人為的な DNA メチル化導入が発生に 与える影響.....	8
第2節 セントロメアにおける人為的な DNA メチル化導入が発生に 与える影響.....	22
第3節 セントロメアにおける人為的な DNA メチル化導入胚の発生率低下の メカニズム解析.....	32
第4節 小括	47
第3章 超解像イメージングによるマウス受精卵の第一卵割における 染色体ペリセントロメア/セントロメアの動態解析	
第1節 超解像顕微鏡を用いたマウス受精卵の ライブセルイメージング法の 確立.....	48
第2節 低侵襲超解像ライブセルイメージングを用いたマウス受精卵の 染色体カウント方法の確立.....	65
第3節 小括	80
第4章 総括	81
参考文献	84

謝辞

第1章 序論

DNA メチル化とは、CpG 配列におけるシトシンの 5 位の炭素に DNMT などのメチル基転移酵素によってメチル基が付加される現象である。ゲノム中にあるメチル化シトシンは methyl-CpG-binding domain (MBD) を初めとする種々のメチル化 DNA 結合タンパク質によって認識され、さらにそれを介して様々なタンパク質修飾やタンパク質複合体の集積が起こる。その後、高次の凝集した染色体構造であるヘテロクロマチンが形成され、周辺の遺伝子の発現が抑制されると考えられている (*Bird et al., 2002; Clouaire et al., 2008*)。哺乳動物では、生殖細胞形成時や胚発生過程の着床前胚において DNA のメチル化状態がグローバルに変化することが報告されている (*Reik et al., 2001; Reik et al., 2007; Seki et al., 2005; Wu et al., 2010*)。加えて、DNA メチル化状態は細胞間だけでなく、染色体領域内でも大きく異なることが明らかにされている (*Reik et al., 2007; Seki et al., 2005; Yamaji et al., 2013; Rakyan et al., 2008*)。

マウス染色体に存在するペリセントロメア (*Fig. 1-1A*) およびセントロメア (*Fig. 1-1A*) は 1 ユニット約 230 bp の Major satellite (*Fig. 1-1A*)、1 ユニット約 120 bp の Minor satellite (*Fig. 1-1A*) の反復配列からそれぞれ構成され、ゲノムの数%を占める広大な領域である。Major satellite には 1 ユニット中に約 8 個の CpG サイトがあり、Minor satellite には 1 ユニット中に約 2 個の CpG サイトが存在する。一般的にペリセントロメアは凝集したクロマチン (ヘテロクロマチン) 構造を取っており、構成的ヘテロクロマチンの代表例にあげられ、分裂期の姉妹染色分体の接着を安定化させていることが知られている (*Probst et al., 2009; Lehnertz et al., 2013*)。一方、セントロメアは細胞分裂の際にキネトコアを介して微小管が接着

する足場となる領域であり、分裂の起点になることが知られている (**Amor et al., 2004; Probst et al., 2010**)。Yamagata らは以前に、ペリセントロメアおよびセントロメアの DNA メチル化状態が体細胞 (80-90%) と比べて生殖系列細胞では低い (20-50%) ことを報告した (**Yamagata et al., 2007; Fig. 1-1A, B, C**)。生殖細胞におけるこの領域の低 DNA メチル化状態が減数分裂や発生能など生殖細胞特異的な機能に関与する可能性があるが、ペリセントロメア/セントロメアの低 DNA メチル化状態の意義を調べるためには、染色体領域特異的なエピゲノム操作技術が必要である。

2013 年に Major satellite を認識する TALE (Transcription Activator-Like Effector) に蛍光タンパク質を付加した融合タンパク質が開発され、哺乳類細胞で生きたままペリセントロメアを可視化することができるようになった (**Miyanari et al., 2013**)。Yamazaki らはこの Major satellite を認識する TALE (Transcription Activator-Like Effector) に細菌由来のメチル基転移酵素 Sssl を付加した融合遺伝子 (TALMaj-Sssl) (**Fig. 1-2**) を作製し、これをコードした mRNA をマウス受精卵に注入することで受精卵におけるペリセントロメアの DNA メチル化レベルを生きたまま人為的に上昇させるエピゲノム編集に成功した (**Yamazaki et al., 2017; Yamazaki et al., 2020**)。本研究ではこのエピゲノム編集ツールを用いて Major satellite 配列および Minor satellite 配列に DNA のメチル化を導入し、胚発生に及ぼす影響を観察することで、これらの配列の生殖細胞特異的な低 DNA メチル化状態の意義を明らかにすることを目的とした。第 2 章、第 1 節ではマウス受精卵のペリセントロメアにおける人為的な DNA メチル化の導入が胚発生に与える影響を述べる。

第 2 章、第 2 節ではマウス受精卵のセントロメアへの人為的な DNA メチル化の導入が胚発生に与える影響を述べる。第 2 章、第 3 節では、セントロメアにおける人為的な DNA メチル化の導入による胚発生低下の詳細なメカニズムについて検討した結果を述べる。

受精卵の染色体を観察するためにライブセルイメージング技術は重要な手法となりつつある。光毒性をできる限り抑えた観察条件のもとでは発生過程で起こった現象とその後の個体までの発生能を直接、単一胚で評価することができる。特に、DNA メチル化導入胚の染色体やセントロメアの構造、核内におけるクロマチン状態を詳細に調べるためには、生きたまま長時間観察可能な超解像システムの構築が必要である。近年、様々な原理に基づく超解像顕微鏡 (stimulated emission depletion microscopy (STED) : *Hell et al., 1994; Hell et al., 1995*; photoactivated localization microscopy (PALM) : *Betzig et al., 2006*; fluorescence photoactivation localization microscopy (FPALM) : *Hess et al., 2006*; stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) : *Rust et al., 2006*; structured illumination microscopy (SIM) : *Gustafsson et al., 2000*; and Airyscan: *Huff, 2015*) が提案され、より細部まで細胞を観察できるようになった。一方で、超解像顕微鏡を使用した観察は細胞に対して侵襲的であることが知られている。特に、着床前初期胚の観察では、3次元画像の取得およびタイムラプス観察をするためにレーザーの繰り返し照射が必要になり、胚の損傷を引き起こす。胚発生率や産仔率を担保したままの条件下で観察することは、観察された現象が死にゆく細胞によって引き起

こされたアーチファクトでないことを保証するために重要である。*Yamagata* らは以前に、ディスク式共焦点顕微鏡を使用してマウス受精卵における長期間の生細胞イメージングが可能な条件を特定し、予後を予測することを試みた (*Yamagata et al., 2009a*)。一般的に、スキャニング式共焦点顕微鏡は単一平面でサンプルをスキャンするため、画像取得に時間がかかる。さらに、高強度のレーザーを照射すると、サンプルの退色や光毒性が生じる可能性がある。一方で、ディスク式共焦点顕微鏡はディスクの回転によって複数のポイントをスキャンすることで、スキャニング式共焦点顕微鏡の制限を克服しており、着床前初期胚の生細胞イメージングに適している。さらに、マイクロレンズを使用してピンホールに投影される焦点面の光を減じることにより、optical photon reassignment (OPRA) -type microscopy (super-resolution via optical re-assignment (SoRa)) が実現された (*Azuma and Kei, 2015*)。第3章、第1節では OPRA-type の超解像顕微鏡を用いて長時間生きてままマウス受精卵を観察できる条件を探索した結果を述べる。第3章、第2節では、第1節で確立した手法を用いて、着床前初期胚で染色体を数える技術を開発した結果を述べる。

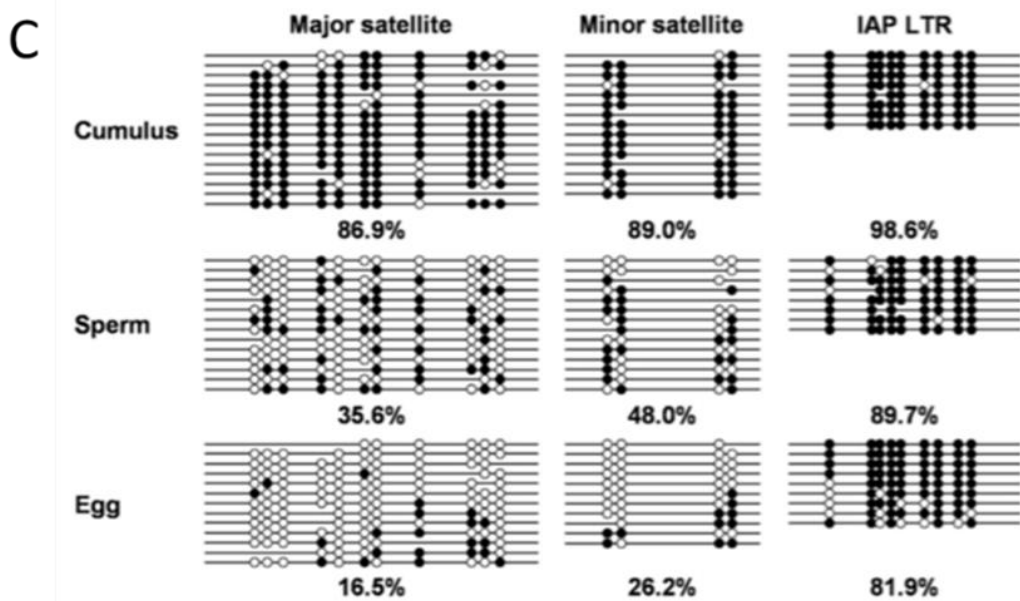
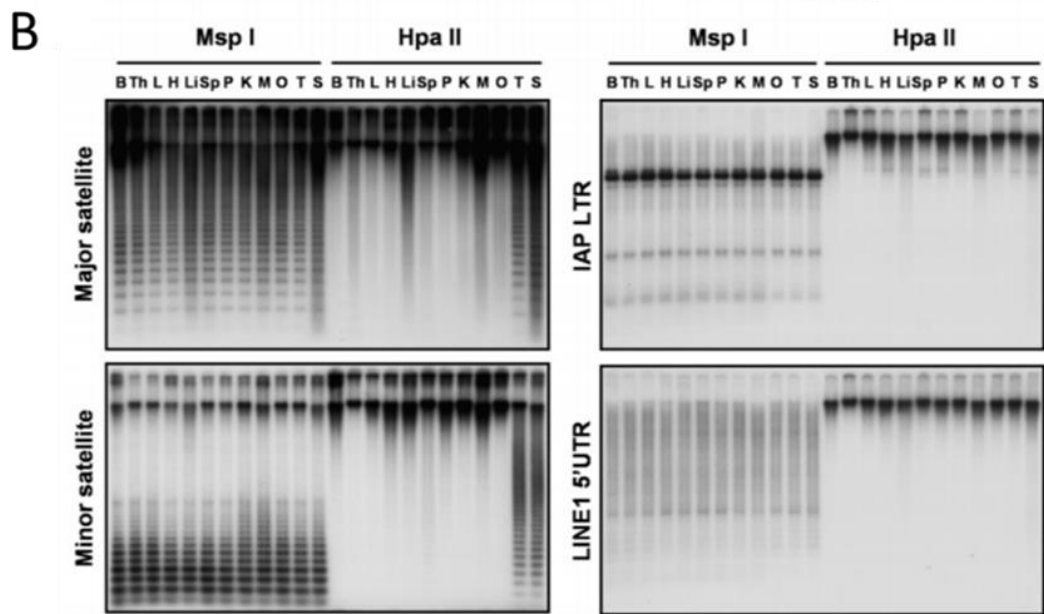
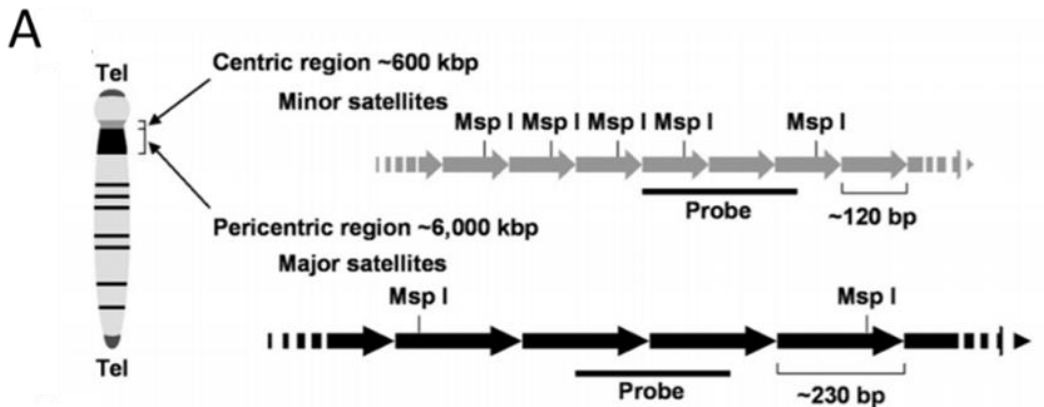


Fig. 1-1 マウス組織における Major satellite/Minor satellite 配列の DNA メチル化状態 (Yamagata et al., 2007 から抜粋)

(A) マウス染色体上の Major satellite 配列および Minor satellite 配列を示した模式図。Minor satellite から構成されるセントロメア領域は 1 ユニット約 120 bp の配列を 500 回程度繰り返す。Major satellite 配列から構成されるペリセントロメア領域は 1 ユニット約 230 bp の配列を 30000 回程度繰り返す。(B) DNA メチル化感受性酵素を用いた DNA ゲノムサザンブロット解析。DNA メチル化感受性 (HpaII) または非感受性 (MspI) 制限酵素を用いて、各組織より抽出した DNA を消化し、Major satellite 配列、Minor satellite 配列、IAP (LTR) および LINE1 (5' UTR) の DNA 断片とハイブリダイズした。B: 脳、Th: 胸腺、L: 肺、H: 心臓、Li: 肝臓、Sp: 脾臓、P: 膵臓、K: 腎臓、M: 筋肉、O: 卵巣、T: 精巣、S: 精子。(C) 卵丘細胞、精子、卵子におけるバイサルファイトシーケンス解析。マウス卵丘細胞、精巣上体精子、M II 期卵子の Major satellite 配列、Minor satellite 配列、IAP (LTR)、LINE1 (5' UTR) の DNA メチル化レベルを調べた。黒丸および白丸はそれぞれメチル化 CpG、非メチル化シトシン CpG 部位を示す。データは全 CpG あたりのメチル化 CpG の割合として表される。

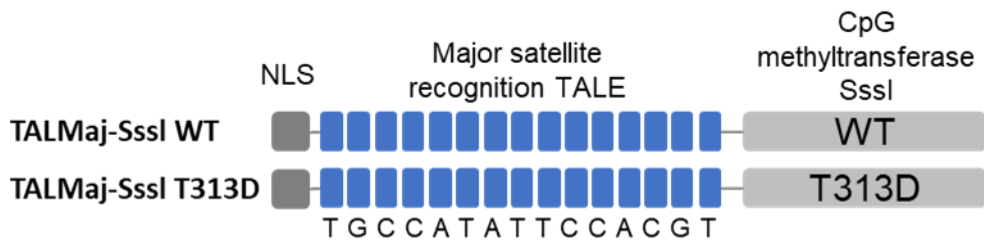


Fig. 1-2 TALMaj-Sssl タンパク質の構造 (Yamazaki et al., 2017 から抜粋)

Major satellite 配列を認識する TALE にバクテリア由来のメチル基転移酵素 Sssl を付加した融合遺伝子 (TALMaj-Sssl WT) を作製した (上)。ネガティブコントロールとしてメチル基転移酵素 Sssl の酵素活性部位を 313 番目のスレオニン をアスパラギン酸に置換することにより、酵素活性を失活させた融合遺伝子 (TALMaj-Sssl T313D) を作製した (下)。

第2章 エピゲノム編集によるマウス生殖系列細胞特異的なペリセントロメア およびセントロメアの低 DNA メチル化状態の意義の解明

第1節 ペリセントロメアにおける人為的な DNA メチル化導入が発生に 与える影響

第1項 緒言

マウスの染色体のセントロメア近傍にはペリセントロメアと呼ばれるゲノムの数%を占める広大な領域が存在する。この領域は Major satellite と呼ばれる 1 ユニット約 230 bp の配列が約 30,000 回繰り返して構成される (**Fig. 1-1**)。一般的にペリセントロメアは凝集したクロマチン (ヘテロクロマチン) 構造を取っており、構成的ヘテロクロマチンの代表例にあげられる。その機能として姉妹染色分体の接着を安定化させていることなどが知られている (**Probst et al., 2009; Lehnertz et al., 2013**)。生殖系列細胞でのペリセントロメアの低 DNA メチル化状態の意義を調べるために、エピゲノム編集により受精卵のペリセントロメアに DNA のメチル化を人為的に導入し、発生への影響を検討した。

第2項 材料と方法

動物

実験には BDF1 マウス (C57BL/6×DBA/2) または ICR マウス (Japan SLC, Inc. Shizuoka, Japan) を用いた。マウス室内条件は、温度を 23°C、湿度を 50%に維持し、12:12 時間の明/暗サイクルで飼育した。マウスは水と市販の餌を自由に摂取させた。本研究は実験動物の管理と使用のための指針に従って行った。すべての動物実験は、近畿大学動物実験倫理委員会の承認を受けた (承認番号: KABT-31-016)。

精子および卵子の採取

BDF1 または ICR 雌マウス (8-12 週齢) に 10 IU の 妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) (ASKA Animal Health Co., Ltd., Tokyo, Japan) と 10 IU のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) (ASKA Animal Health) を 48 時間の間隔で腹腔内投与し、過排卵させた。卵子卵丘細胞複合体は hCG 投与の 13-15 時間後に採取した。精子は BDF1 または ICR 雄マウス (>12 週齢) の精巣上体尾部より採取し、0.2 mL の TYH (*Toyoda et al., 1971*) メディアムのドロップ内で 2 時間培養 (37°C、5% CO₂ in air) することで受精能を獲得させた。

体外受精 (IVF)

採取した卵子卵丘細胞複合体は 0.2 mL の TYH メディアムに入れ、受精能獲得させた精子 (100 sperm/μL) を用いて媒精した。37°C、6% CO₂ in air で 2 時間培養

した後、hyaluronidase (Type I-S, 120–300 units/mL; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) で短時間処理し、卵丘細胞を取り除いた。

プラスミド

Yamazaki らによって作製された、Major satellite 配列を認識する TALE

(Transcription Activator-Like Effector) にメチル基転移酵素 Sssl を付加した融合遺伝子 (TALMaj-Sssl WT) を用いた (**Fig. 1-2**) (*Yamazaki et al., 2017*)。ネガティブコントロールとして、Sssl の 313 番目のスレオニンをアスパラギン酸に置換することにより、メチル基転移酵素の活性を失わせた融合遺伝子 (TALMaj-Sssl T313D) (**Fig. 1-2**) を用いた。染色体の観察には HistoneH2B に EGFP を付加した融合遺伝子 (Histone H2B-EGFP) を使用した。DNA メチル化の可視化にはメチル CpG 結合ドメインタンパク質である human MBD1 より単離された、メチル CpG 結合ドメイン (Methyl-CpG-binding domain: MBD) に mCherry を付加した融合遺伝子 (mCherry-MBD-NLS) を用いた (*Ueda et al., 2014*)。これらの融合遺伝子は mRNA 合成用プラスミド pcDNA3.1 polyA (83) (*Yamagata et al., 2005*) のマルチクローニングサイト中に挿入された。すべての遺伝子組み換え実験は、近畿大学動倫理委員会の承認を受けた (承認番号: KDBT-28-004)。

mRNA の *in vitro* 合成

mRNA は RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems-T7 (Promega, Madison, WI, USA) で合成した。直鎖化した pcDNA3.1-polyA83 (*Yamagata et al., 2005*) の

プラスミドをテンプレートに用いた。直鎖化には XhoI (Histone H2B-EGFP, mCherry-MBD-NLS) と ApaI (TALMaj-Sssl WT, TALMaj-Sssl T313D) の制限酵素を使用した。受精卵において融合タンパクを効率的に翻訳させるために、それぞれの mRNA の 5'末端に Ribo m7G Cap Analog (Promega) を用いてキャップを付加した。テンプレートゲノムが受精卵に混入することを防ぐために、RQ-1 RNase-free DNase I (Promega) を *in vitro* 合成した mRNA の反応液に加えた。合成した mRNA はフェノール-クロロホルムで処理し、タンパク質成分を除去した。さらに、未反応の基質を除去するために、MicroSpin™ S-200 HR columns (Cytiva, Tokyo, Japan) を用いてろ過精製した。合成した mRNA は使用するまで、-80°Cで保存した。

受精卵への mRNA のマイクロインジェクション

合成した mRNA をそれぞれ超純水 (Thermo Fisher Scientific Barnstead Smart2Pure; Waltham, MA, USA) で、Histone H2B-EGFP は 5 ng/μL に、mCherry-MBD-NLS (**Ueda et al., 2014**) は 1 ng/μL に、TALMaj-Sssl WT および TALMaj-Sssl T313D は 2 ng/μL、10 ng/μL、50 ng/μL にそれぞれ希釈し、マイクロマニピュレーター用ディッシュ上に 0.5 μL の drop として乗せた。受精後約 2-4 時間の胚を同ディッシュ上の HEPES 緩衝 Chatot-Ziomek-Bavister (CZB; **Chatot et al., 1989**) メディウムに移し、ピエゾマイクロマニピュレーターを用いて mRNA を受精卵に注入した。

バイサルファイトシーケンス

バイサルファイト反応は EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research Co., CA, USA) のプロトコールに従って行った。TALMaj-Sssl WT または TALMaj-Sssl T313D、mCherry-MBD-NLS、Histone H2B-EGFP をコードする mRNA を注入した胚を 72 時間培養し、HEPES 緩衝 Chatot-Ziomek-Bavister (CZB) メディウムを 5 μ L 加えた PCR チューブに回収した (20 個/チューブ)。胚を回収した PCR チューブにバイサルファイト反応液を加え、50°C で 20 分間インキュベートした。バイサルファイト反応後、溶出した DNA を以下のプライマーセットを用いて PCR により増幅した。

Major satellite 配列の増幅には

5' -GGAATATGGTAAGAAAATTGAAAATTATGG-3'

5' -CCATATTCCAAATCCTTCAATATACATTTTC-3'

Minor satellite 配列の増幅には

5' -TAGAATATATTAGATGAGTGAGTTATATTG-3'

5' -ATTATAACTCATTAAATATACACTATTCTAC-3'

LINE1 配列の増幅には

5' -AACCTACTTGGTCAGGATGGATG-3'

5' -AGTGCAGAGTTCTATCAGACCTTC-3'

IAP 配列の増幅には

5' -CCCCGTCCTTTTTTAGGAG-3'

5' -CTCCATGTGCTCTGCCTTCC-3'

をそれぞれ用いた。

Major satellite 配列および Minor satellite 配列を増幅させる PCR 反応は、95°Cで 30 秒、60°Cで 60 秒、68°Cで 20 秒を 40 サイクル行った。増幅した DNA 断片を pGEM-T Easy vector (Promega) にサブクローニングし、10-20 クローンをそれぞれシーケンスした。DNA メチル化部位の解析はウェブベースの DNA メチル化解析ツール「QUMA」 (<http://quma.cdb.riken.jp/>) (*Kumaki et al., 2008*) を用いた。統計解析には「QUMA」の Mann-Whitney の U 検定を用いた。

ライブセルイメージング

ガラスボトムディッシュ (Matsunami Glass Industries, Ltd., Osaka, Japan) 上に 5 μ L の 0.00025% PVA (P8136-250G; Sigma-Aldrich) を含む KSOMaa 培地のドロップを作製し、培地内に胚を移した。観察には、高感度 EM-CCD カメラ (ixon3 OMSJ-DU897E-CSO-#BV-Y, Andor Technology, Belfast, Northern Ireland; ImagEM, Hamamatsu Photonics K.K., Shizuoka, Japan) を搭載したスピニングディスク式共焦点レーザー顕微鏡 (CSU-W1, CV1000, Yokogawa Electric, Tokyo, Japan) を用いた。観察には 20X 油浸対物レンズ (UPLSAPO20X: numerical aperture (NA) : 0.8) または 30X、40X、100X シリコン浸対物レンズを用いた (UPLSAPO30XS: NA 1.05; UPLSAPO40XS: NA 1.25; UPLSAPO100XS: NA 1.35; Olympus, Tokyo,

Japan)。観察前に、光パワーメーター (TB200; Yokogawa Electric) を用いて対物レンズ直上のレーザーパワーを測定し、励起光の出力を調整した (488 nm; 0.05 または 0.1 mW, 561 nm; 0.1 mW)。その後、顕微鏡ステージ上のインキュベーターで培養 (37.0°C、6%CO₂、5%O₂) しながら連続観察を行った。3次元的な画像取得のために Z-axis motor (Mac5000; Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA または CV1000; Yokogawa Electric) を用いて、2 μm または 1 μm ごとに 46 枚のスライスを撮影した。連続撮影は 10 分間隔で 1-5 日間行った。CSU-W1 の制御には MetaMorph ver 7.7.10 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) または μ-Manager microscopy software (<https://micro-manager.org>) を使用し、CV1000 の制御には CV1000 Software Ver. 1.06 (Yokogawa Electric) を使用した。

画像解析

ライブセルイメージングにより得られた画像は MetaMorph ver 7.7.10 (Molecular Devices) または CV1000 Software Ver. 1.06 (Yokogawa Electric)、ImageJ/Fiji image analysis platform (<https://imagej.net/Fiji>) を用いて解析した。

胚移植

TALMaj-Sssl WT または TALMaj-SsslT313D、mCherry-MBD-NLS、Histone H2B-EGFP をコードする mRNA を注入した胚を 2 細胞期まで培養し、偽妊娠 0.5 日目のマウスの卵管に移植した。移植の 18 日後に安楽死させ、帝王切開を行った。

第3項 結果

バイサルファイトシーケンスによる DNA メチル化解析

TALMaj-Sssl を用いてマウス受精卵のペリセントロメアに DNA メチル化が人為的に導入可能か検討した。対照区として Mock ならびに酵素活性部位に点変異を導入した TALMaj-Sssl T313D を用いた。人為的な DNA メチル化の濃度依存性を調べるために、2 ng/μL、10 ng/μL、50 ng/μL の mRNA 濃度で前核期胚にインジェクションを行い、バイサルファイトシーケンス法を用いて TALMaj-Sssl のターゲットである Major satellite 配列の DNA メチル化レベルを解析した。その結果、Major satellite 配列の DNA メチル化レベルは、TALMaj-Sssl WT の区において mRNA 濃度依存的に上昇し、コントロール区である Mock (19.0%) と比べて全ての群で有意に高かった。(2 ng/μL: 40.5%、10 ng/μL: 59.3%、50 ng/μL: 77.9%、Mann-Whitney の U 検定、 $P < 0.05$) (**Fig. 2-1A**)。一方で、TALMaj-Sssl T313D の区において 2 ng/μL の mRNA 濃度でのみ Mock と比較して有意に DNA メチル化の上昇がみられたが濃度依存性はなかった(2 ng/μL: 35.6%、10 ng/μL: 30.4%、50 ng/μL: 30.6%) (**Fig. 2-1A**)。次に、TALMaj-Sssl をインジェクションした際に Major satellite 配列の近傍に位置する Minor satellite 配列への DNA メチル化の導入があるかを検討した。コントロール区である Mock (30.3%) と比べて TALMaj-Sssl WT の区において 50 ng/μL の mRNA 濃度でのみ有意に上昇したが他の濃度では差は見られなかった(2 ng/μL: 44.2%、10 ng/μL: 40.7%、50 ng/μL: 55.5%) (**Fig. 2-1B**)。TALMaj-Sssl T313D の区では、どの mRNA 濃度でも有意な

差はみられなかった (2 ng/ μ L: 41.9%、10 ng/ μ L: 41.1%、50 ng/ μ L: 35.8%) (**Fig. 2-1B**)。

TALMaj-Sssl 導入による標的外への反復配列への DNA メチル化導入の有無を調べるため、染色体に一樣に分布する LINE1 および IAP の DNA メチル化レベルを解析した。その結果、TALMaj-Sssl WT の導入区では Mock と比較して DNA メチル化の上昇は観察されなかった (**Fig. 2-1C**)。TALMaj-Sssl T313D の区では Mock と比べて有意な差が見られた (**Fig. 2-1C**)。

ライブセルイメージングによる DNA メチル化解析

DNA メチル化導入による DNA メチル化状態の変化について、生きた受精卵で観察するために、TALMaj-Sssl WT または TALMaj-Sssl T313D と mCherry-MBD-NLS、Histone H2B-EGFP をコードする mRNA を前核期胚に注入し、ライブセルイメージングを行った。mCherry および EGFP の蛍光シグナルを前核期胚から桑実期/胚盤胞期胚まで観察したところ、TALMaj-Sssl WT を注入した胚の第一卵割の分裂期において mCherry-MBD-NLS のシグナルが染色体の赤道面に局在した (**Fig. 2-2**)。2 細胞期の核内にもこのシグナルは観察された (**Fig. 2-2**)。以上より、TALMaj-Sssl により DNA のメチル化が第一卵割の分裂期以降でペリセントロメアに導入されることが示唆された。

ペリセントロメアへの DNA メチル化導入による発生への影響

次に、TALMaj-Sssl mRNA を 10 ng/ μ L の濃度で注入した胚の、前核期胚から桑実胚期/胚盤胞期までの発生率を調べた。その結果、Mock では 33/39 (84.6%)、TALMaj-Sssl WT では 27/36 (75.0%)、TALMaj-Sssl T313D では 12/12 (100%) であり、Mock と TALMaj-Sssl WT の間に有意な差は見られなかった (**Fig. 2-3A**; カイ二乗検定, $P > 0.05$)。さらに、TALMaj-Sssl mRNA を注入した胚を 2 細胞期で偽妊娠マウスの卵管に移植し、産仔数を調べた。その結果、Mock では 38/144 (26.3%)、TALMaj-Sssl WT の区では 23/100 (23%) であり、それぞれの間には差は見られなかった (**Fig. 2-3B, C**; カイ二乗検定, $P > 0.05$)。

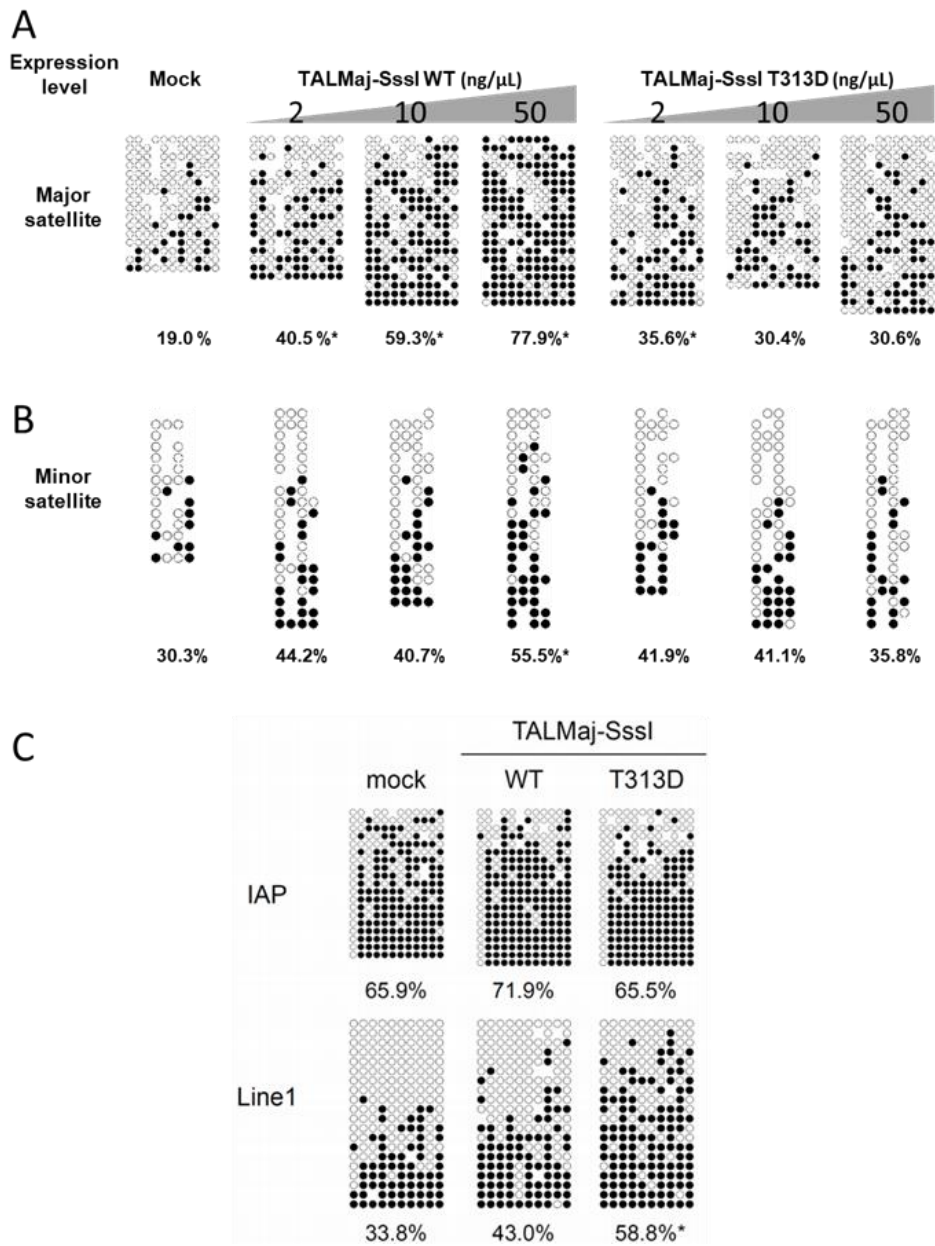


Fig. 2-1 TALMaj-Sssl 発現胚のバイサルファイトシーケンス解析

(A) TALMaj-Sssl 発現胚の Major satellite 配列の DNA メチル化レベル。左から Mock, TALMaj-Sssl WT: 2 ng/μL, 10 ng/μL, 50 ng/μL, TALMaj-Sssl T313D: 2 ng/μL, 10 ng/μL, 50 ng/μL の区を示す (* Mann-Whitney の U 検定、 $P < 0.05$)。 (B) TALMaj-Sssl 発現胚の Minor satellite 配列の DNA メチル化レベル。左から Mock, TALMaj-Sssl WT: 2 ng/μL, 10 ng/μL, 50 ng/μL, TALMaj-Sssl T313D: 2 ng/μL, 10 ng/μL, 50 ng/μL の区を示す (* Mann-Whitney の U 検定、 $P < 0.05$)。 (C) TALMaj-Sssl 発現胚の LINE1、IAP 配列の DNA メチル化レベル。左から Mock, TALMaj-Sssl WT 10 ng/μL, TALMaj-Sssl T313D 10 ng/μL の区を示す (* Mann-Whitney の U 検定、 $P < 0.05$)。

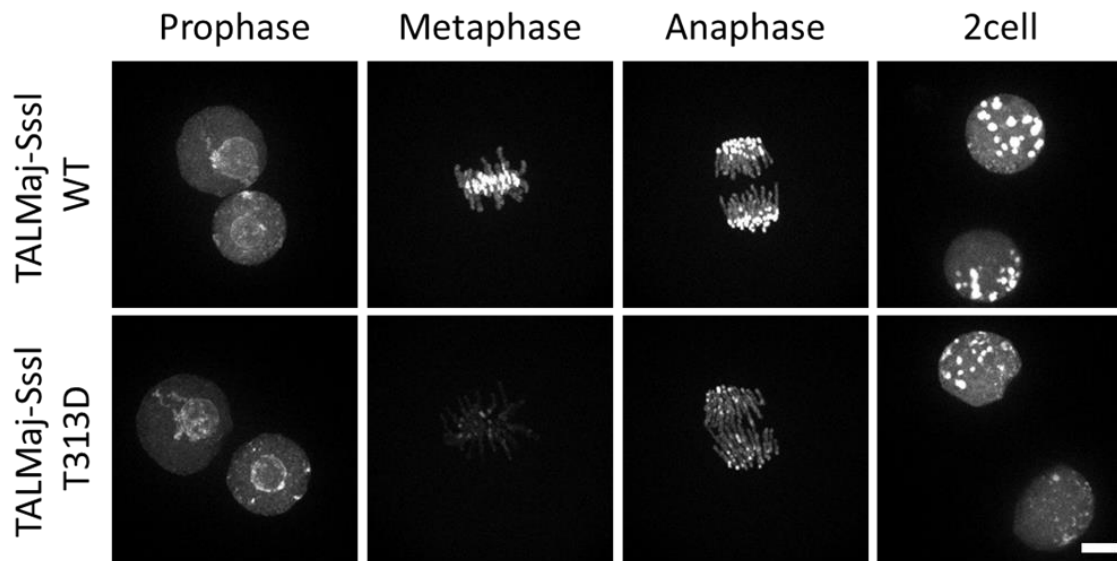


Fig. 2-2 TALMaj-Sssl 発現胚の前核期から 2 細胞期までのライブセルイメージング

TALMaj-Sssl を注入した胚と Mock の前核期から 2 細胞期までの DNA メチル化状態を mCherry-MBD-NLS を用いて約 24 時間観察した。左から前核期、分裂中期、分裂後期、2 細胞期を示す。スケールバー=10 μm 。

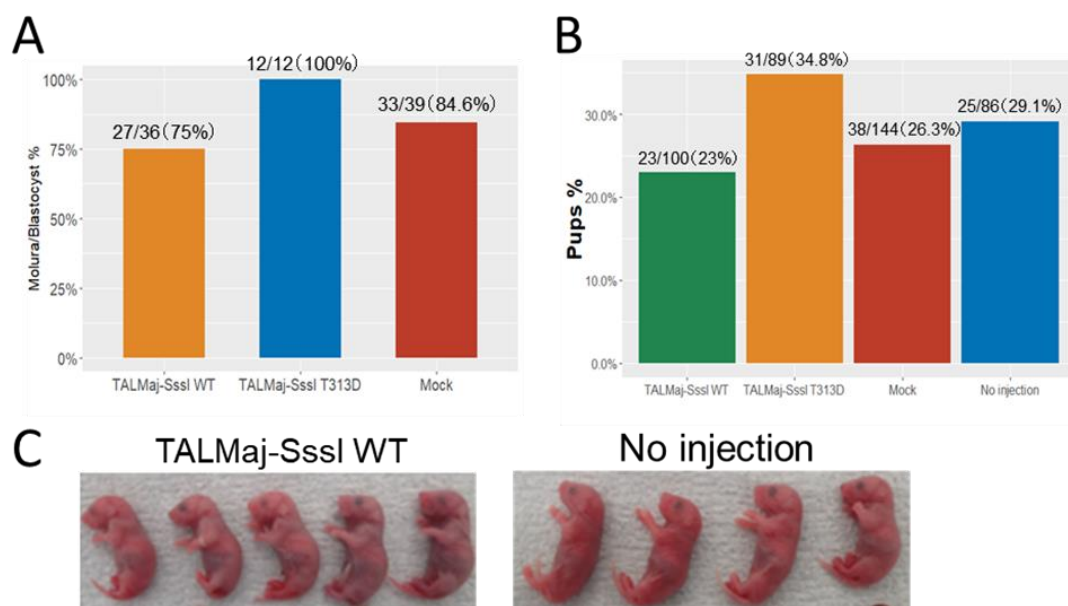


Fig. 2-3 TALMaj-Sssl 発現胚の桑実胚/胚盤胞期までの発生率および産仔率
 (A) 桑実胚/胚盤胞期までの発生率。左から TALMaj-Sssl WT、TALMaj-Sssl T313D、Mock の区を示す。(B) 各区における産仔率。(C) 移植によって生まれた産仔の写真。左: TALMaj-Sssl WT の区、右: No injection の区。

第4項 考察

バイサルファイトシーケンスと DNA メチル化状態のライブセルイメージングにより、ペリセントロメアへの特異的な DNA メチル化導入を確認した。そのうえで、発生への影響を検討したところ、桑実胚期/胚盤胞期までの胚発生率に Mock との差はみられず、産仔率も変化がなかった。このことから、ペリセントロメアの低 DNA メチル化状態は初期胚発生に必須でないことが示唆される。ペリセントロメアではノンコーディング RNA が転写されており、受精卵においてこの領域の転写産物を阻害すると 2 細胞期で発生が停止する報告がされている (*Santenard et al., 2010*)。しかし、ペリセントロメアが高い DNA メチル化状態である体細胞においてもこの領域の転写は報告されている (*Santenard et al., 2010; Zhu et al., 2011; Kishi et al., 2012*) ため、今回の DNA メチル化導入は転写を抑制しなかったと考えられる。初期胚における転写制御は H3K9me3 や H3K27me3 や H3K27ac などのヒストン修飾が関与していることが知られている (*Adenot et al., 1997; van der Heijden et al., 2005*)。これの修飾と DNA メチル化の関係を調べることで、初期胚におけるペリセントロメアの転写制御機構が明らかになると考えられる。

第 2 節 セントロメアにおける人為的な DNA メチル化導入が発生に 与える影響

第 1 項 緒言

マウス染色体のセントロメアは細胞分裂の際にキネトコアを介して微小管が接着する足場となる領域である (*Amor et al., 2004; Probst et al., 2010*)。この領域は Minor satellite と呼ばれる 1 ユニット約 120 bp の配列が約 500 回繰り返して構成される (*Fig. 1-1*)。生殖系列細胞でのセントロメアの低 DNA メチル化状態の意義を調べるために、第 2 章同様、エピゲノム編集により受精卵のセントロメアに DNA メチル化導入を行い、発生への影響を検討した。

第 2 項 材料方法

動物

第 2 章・第 1 節・第 2 項を参照。

精子および卵子の採取

第 2 章・第 1 節・第 2 項を参照。

体外受精 (IVF)

第 2 章・第 1 節・第 2 項を参照。

プラスミド

Minor satellite 配列を認識する TALE (Transcription Activator-Like Effector) にメチル基転移酵素 SssI を付加した融合遺伝子 (TALMin-SssI WT) (**Fig. 2-4**) を作製した。ネガティブコントロールとして、SssI の 313 番目のスレオニンをアスパラギン酸に置換することにより、メチル基転移酵素の活性を失わせた融合遺伝子 (TALMin-SssI T313D) (**Fig. 2-4**) を作製した。これらの融合遺伝子は mRNA 合成用プラスミド pcDNA3.1 polyA (83) (**Yamagata et al., 2005**) のマルチクローニングサイト中に EcoRI、NotI を用いて挿入された。m-Cherry-MBD-NLS、Histone H2B-EGFP は第 2 章・第 1 節・第 2 項と第 2 章・第 2 節・第 2 項を参照。

mRNA の *in vitro* 合成

第 2 章・第 1 節・第 2 項参照。

バイサルファイトシーケンス

第 2 章・第 2 節・バイサルファイトシーケンスに記載した通りに行った。

TALMin-Sssl WT または TALMin-Sssl T313D、mCherry-MBD-NLS、Histone H2B-EGFP をコードする mRNA を注入した胚を 72 時間培養し、HEPES 緩衝 Chatot-Ziomek-Bavister (CZB) メディウムを 5 μ L 加えた PCR チューブに回収した (20 個/チューブ)。

ライブセルイメージング

第 2 章・第 1 節・第 2 項を参照。

統計検定

R の `chisq.test` 関数を使用してカイ 2 乗検定を実行した。

第3項 結果

バイサルファイトシーケンスによる DNA メチル化解析

TALMin-Sssl がマウス受精卵のセントロメアに DNA のメチル化を導入可能か検討した。DNA メチル化の濃度依存性を調べるために、2 ng/ μ L、10 ng/ μ L、50 ng/ μ L の mRNA 濃度で前核期胚にインジェクションを行った。バイサルファイトシーケンス法を用いて TALMin-Sssl のターゲットである Minor satellite 配列の DNA メチル化レベルを解析した。その結果、TALMin-Sssl WT の区において mRNA 濃度依存的に上昇した (2 ng/ μ L: 41.9%、10 ng/ μ L: 50.6%) (**Fig. 2-5**)。次に、Minor satellite 配列の近傍に位置する Major satellite 配列の DNA メチル化レベルを解析した。TALMin-Sssl WT の区において 50 ng/ μ L の mRNA 濃度でのみ有意に上昇した (2 ng/ μ L: 32.7%、10 ng/ μ L: 33.3%、50 ng/ μ L: 43.1%、Mann-Whitney の U 検定、 $P < 0.05$) (**Fig. 2-5**)。

ライブセルイメージングによる DNA メチル化解析

DNA メチル化導入による DNA メチル化状態の変化について、生きた受精卵で観察するために、TALMin-Sssl WT または TALMin-Sssl T313D と mCherry-MBD-NLS、Histone H2B-EGFP をコードする mRNA を前核期胚に注入し、ライブセルイメージングを行った。mCherry および EGFP の蛍光シグナルを前核期胚から桑実期/胚盤胞期胚まで観察したところ、TALMin-Sssl WT を注入した胚の第一卵割の分裂期において mCherry-MBD-NLS のシグナルが染色体の赤道面に局在した (**Fig. 2-6**)。このシグナルはペリセントロメアよりも末端に限局していた。2

細胞期の核内にもこのシグナルは観察された (**Fig. 2-6**)。以上より、TALMin-Ssslにより DNA のメチル化が第一卵割の分裂期以降でセントロメアに導入されることが示唆された。

セントロメアへの DNA メチル化導入による発生への影響

TALMin-Sssl mRNA を 10 ng/ μ L の濃度で注入した胚の、前核期胚から桑実胚期/胚盤胞期までの発生率を調べた。その結果、発生率は Mock では 33/39

(84.6%)、TALMin-Sssl WT 10 ng/ μ L では 5/42 (11.9%)、TALMin-Sssl T313D では 21/27 (77.8%) であり、Mock と TALMin-Sssl WT の間に有意な差が見られた (**Fig. 2-7A, B**; カイ二乗検定, $P < 0.05$)。さらに、受精から 72 時間後の胚の発生ステージを調べたところ、TALMin-Sssl WT を発現させた胚のほとんどが 2 細胞期から 8 細胞期にかけて停止した。 (**Fig. 2-7C**)。

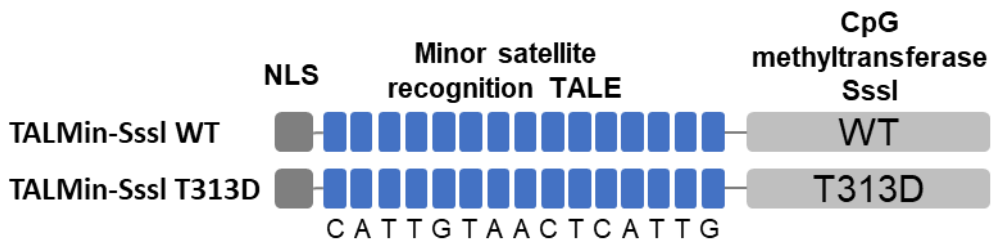


Fig. 2-4 TALMin-Sssl タンパク質の構造

Minor satellite 配列を認識する TALE にバクテリア由来のメチル基転移酵素 Sssl を付加した融合遺伝子 (TALMin-Sssl WT) を作製した (上)。対象区としてメチル基転移酵素 Sssl の酵素活性部位を 313 番目のスレオニンをアスパラギン酸に置換することにより、失活させた融合遺伝子 (TALMin-Sssl T313D) を作製した (下)。

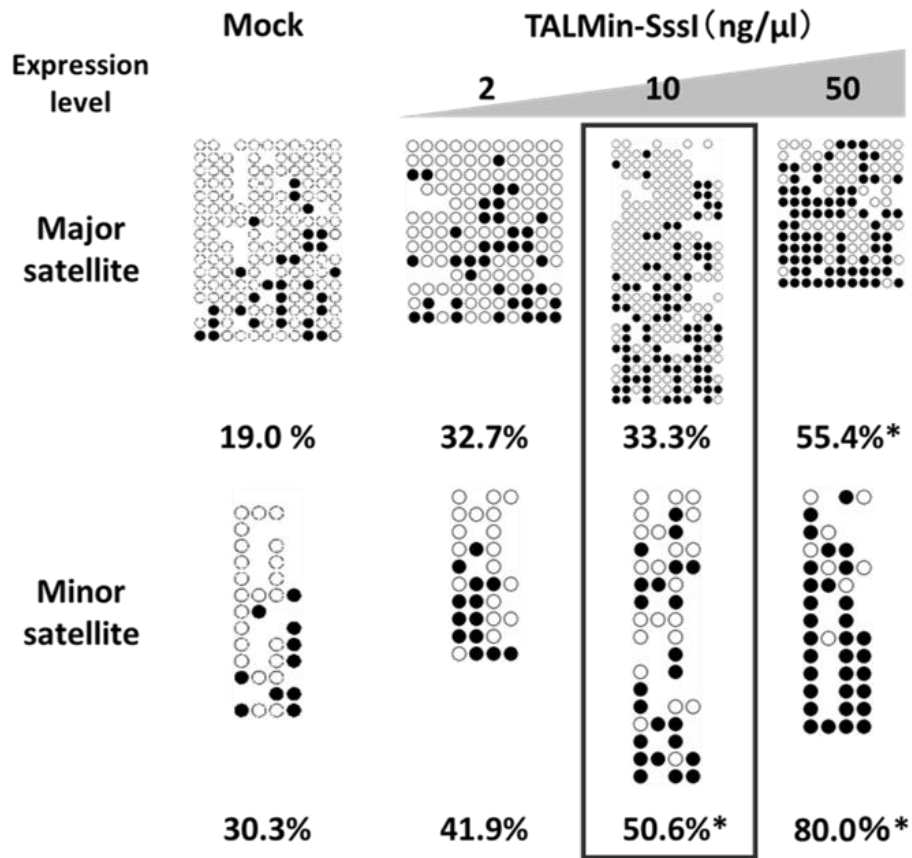


Fig. 2-5 TALMin-Sssl 発現胚のバイサルファイトシーケンス解析

(A) TALMaj-Sssl 発現胚の Major satellite 配列の DNA メチル化レベル。左から Mock, TALMaj-Sssl WT: 2 ng/ μ L, 10 ng/ μ L, 50 ng/ μ L の区を示す (* Mann-Whitney の U 検定、 $P < 0.05$)。 (B) TALMin-Sssl 発現胚の Minor satellite 配列の DNA メチル化レベル。左から Mock, TALMaj-Sssl WT: 2 ng/ μ L, 10 ng/ μ L, 50 ng/ μ L の区を示す (* Mann-Whitney の U 検定、 $P < 0.05$)。

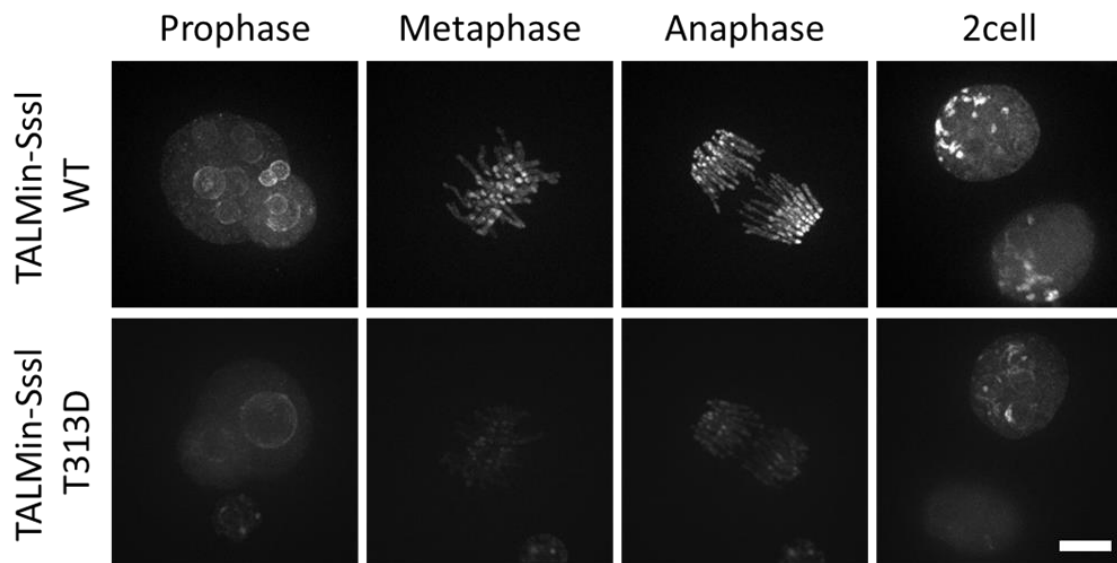


Fig. 2-6 TALMin-Sssl 発現胚の前核期から 2 細胞期までのライブセルイメージング

TALMin-Sssl を注入した胚と Mock の前核期から 2 細胞期までの DNA メチル化状態を mCherry-MBD-NLS を用いて約 24 時間観察した。左から前核期、分裂中期、分裂後期、2 細胞期を示す。スケールバー=10 μm 。

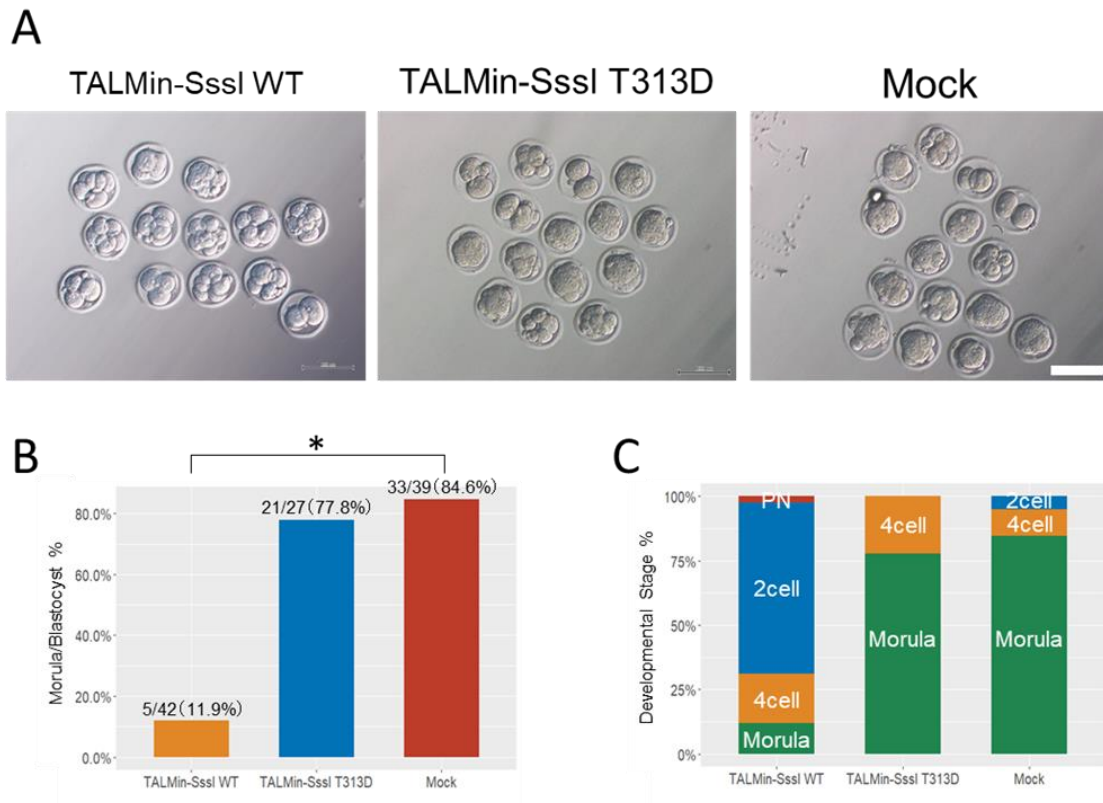


Fig. 2-7 TALMin-Sssl を発現させた胚の桑実胚/胚盤胞期率および産仔率

(A) 受精後 72 時間 (72 hpi) の明視野画像。左から TALMin-Sssl WT、TALMin-Sssl T313D、Mock。スケールバー=100 μ m。(B) 桑実胚/胚盤胞期までの発生率。左から TALMin-Sssl WT、TALMin-Sssl T313D、Mock。(*カイ 2 乗検定、 $P < 0.05$)

(C) 受精後 72 時間 (72 hpi) の発生ステージ。赤: 前核期, 青: 2 細胞期, 黄: 4 細胞期, 緑: 8 細胞期から桑実期を示す。

第4項 考察

バイサルファイトシーケンスにより濃度依存的な DNA メチル化の上昇の確認を確認した。さらに、DNA メチル化状態のライブセルイメージングにより、セントロメアへの DNA メチル化導入を確認した。そのうえで、発生への影響を検討したところ、桑実胚期/胚盤胞期までの胚発生率が **Mock**、**TALMin-Sssl** **T313D** の区と比較し有意に低下した。これより、セントロメアの低 DNA メチル化状態は初期胚発生に重要であることが示めされた。さらに、セントロメアが高 DNA メチル化状態である体細胞では細胞分裂と増殖が正常に遂行されることから、初期胚特異的な分裂メカニズムの存在が示唆された。セントロメアは細胞分裂時にキネトコア複合体を介して微小管が接着することが知られている (**Amor et al., 2010; Probst et al., 2010; Cheeseman et al., 2008**)。キネトコア形成に異常がある場合、有糸分裂に影響があることが報告されている (**Kalitsis et al., 1998; Howman et al., 2000**)。ライブセルイメージングにより、発生速度や染色分配の正常性を調べることで、胚発生停止のメカニズムの詳細が明らかになると考えられる。

第3節 セントロメアにおける人為的な DNA メチル化導入胚の発生率低下のメカニズム解析

第1項 緒言

第2節ではセントロメアの人為的な DNA メチル化導入は盤胞までの胚発生率を低下させることが分かった。しかし、胚発生停止のメカニズムの詳細は分かっていない。そこで、胚発生停止の機序を調べるために、セントロメアへの DNA メチル化導入を行った胚のライブセルイメージングを行い、胚の発生異常、発生停止のタイミング、発生速度、細胞周期への影響、DNA 損傷、染色体分配異常を検討した。

第 2 項 材料および方法

動物

第 2 章・第 1 節・第 2 項を参照。

精子および卵子の採取

第 2 章・第 1 節・第 2 項を参照。

体外受精 (IVF)

第 2 章・第 1 節・第 2 項を参照。

プラスミド

複製期の観察には mRNA 合成用プラスミド pcDNA3.1 polyA (83) (*Yamagata et al., 2005*) のマルチクローニングサイト中に挿入された、PCNA に EGFP を付加した融合遺伝子 (PCNA-EGFP) を使用した。TALMin-Sssl と m-Cherry-MBD-NLS、Histone H2B-EGFP は第 2 章・第 1 節・第 2 項と第 2 章・第 2 節・第 2 項を参照。

Chk1 の阻害

Chk1 の阻害には PF-477736 (PZ0186-5MG; Merck, Kenilworth, NJ, USA) を終濃度が 5 nM になるように KSOMaa に添加した培地を用いた。ディッシュ上に 5 nM

の PF-477736 を含む KSOMaa 培地で 20 μ L の drop を作製し、前核期胚を移し、37°C、6% CO₂ の条件で約 96 時間培養した。

mRNA、 γ H2A.X モノクローナル抗体の受精卵へのマイクロインジェクション
受精卵への mRNA のマイクロインジェクションは第 2 章・第 1 節・第 2 項に準じて行った。抗体は γ H2A.X モノクローナル抗体の抗原結合断片 (*Kimura et al., 2008; Hayashi-Takanaka et al., 2011; Hayashi-Takanaka et al., 2009; Yamagata et al., 2019*) を用いた。超純水 (Thermo Fisher Scientific Barnstead Smart2Pure; Waltham, MA, USA) で終濃度 0.1 mg/mL に希釈し、ピエゾマイクロマニピュレーターを用いて受精卵に注入した。

ライブセルイメージング

第 2 章・第 1 節・第 2 項を参照。

画像解析

第 2 章・第 1 節・第 2 項を参照。

γ H2A.X の輝度測定

前核期から 2 細胞期までの、個々の胚における各割球の γ H2A.X 輝度を測定した。ImageJ/Fiji image analysis platform (<https://imagej.net/Fiji>) を用いて、輝度解析を行った。anti- γ H2A.X Fab を導入した胚のバックグラウンド蛍光を除くため

に、胚の細胞質に任意の領域を指定し、Kaiser の検出限界に従い、バックグラウンドの平均輝度+3SD 以上を γ H2A.X のシグナルとした。各割球の γ H2A.X 輝度は、 γ H2A.X 輝度の合算値を細胞核の面積で割った値とした。

統計検定

R の `prop.test` 関数を使用して片側 t 検定を、`chisq.test` 関数を使用してカイ 2 乗検定を、`fisher.test` 関数を使用してフィッシャーの正確確率検定を実行した。

第3項 結果

セントロメアへの DNA メチル化導入は間期での胚発生停止を引き起こす

TALMin-Sssl mRNA を 10 ng/ μ L の濃度で注入した胚の発生異常、発生停止のタイミング、発生速度を観察するために、TALMin-Sssl をコードする mRNA、DNA メチル基結合ドメインと赤色蛍光タンパクの融合タンパク mCherry-MBD-NLS (Ueda et al., 2014) をコードする mRNA および、Histone H2B-EGFP をコードする mRNA を前核期胚に注入し、96 時間ライブセルイメージングを行った (Fig. 2-8A)。TALMin-Sssl WT mRNA を注入した区で胚発生が遅延または停止しており、発生が停止した胚のすべての細胞において間期で停止していることが分かった (Fig. 2-8B)。また、TALMin-Sssl mRNA を注入した胚の、媒精 96 時間後までの発生率及び発生ステージを調べた。その結果、コントロール区の mock の胚発生率は、4 細胞期で 98/101 (97%)、桑実胚期で 93/101 (92%)、胚盤胞期で 85/101 (84%) であった。TALMin-Sssl mRNA を注入した区において 4 細胞期で 62/89 (70%)、桑実胚期で 19/89 (21%)、胚盤胞期で 3/89 (3%) であった。TALMin-Sssl mRNA を注入した区では mock と比較し、有意な差が見られた。(Fig. 2-8C: カイ 2 乗検定、***P < 0.0005)。

セントロメアへの DNA メチル化導入は細胞周期に影響を与える

胚発生遅延の程度を調べるために、ライブセルイメージングを行った胚の第 2 卵割及び第 3 卵割期、2, 4 細胞期における間期の長さを計測した。その結果、各分裂期及び間期それぞれにおいて mock と比較して TALMin-Sssl WT mRNA

を注入した区で胚発生の有意な遅延が確認された (**Fig. 2-8D**: Student t test *P <0.05)。

胚発生停止の時期を調べるために、細胞周期それぞれの長さを測定した。DNA 複製、修復や細胞周期の調節にかかわるタンパク質で、S 期にローディングされる PCNA と緑色蛍光タンパクの融合タンパクを融合させたタンパク質 (PCNA-EGFP) をコードする mRNA と TALMin-Sssl WT、mCherry-MBD-NLS をコードする mRNA を前核期胚に注入し、媒精後約 48 時間までライブセルイメージングを行った (**Fig. 2-9A**)。PCNA タンパク質は間期では核内に局在し、DNA 合成期 (S 期) になると核内に foci を形成する。foci が見られる時期を S 期と定義し、計測した間期及び S 期の長さから 2 細胞期胚における G1 期、S 期、G2 期の各細胞周期の長さを測定した (**Fig. 2-9A, B**)。その結果、mock と比較して TALMin-Sssl WT mRNA を注入した区において G1 期、G2 期で差はみられなかったが、G2 期で有意な遅延が確認された (**Fig. 2-9B**: 片側 t 検定 *P <0.05)。

セントロメアへの DNA メチル化導入は Chk1 依存性チェックポイントの活性化をもたらす

TALMin-Sssl WT mRNA を注入すると胚発生は G2 期で停止したことから、G2 期の細胞周期チェックポイントが活性化している可能性がある。G2 期の細胞周期停止に至るチェックポイント機構において、ATM (ataxia telangiectasia mutated) と ATR (ATM-and Rad3-related) の二つの蛋白質リン酸化酵素が重要な役割を担っている。活性化した ATM, ATR は、チェックポイントキナーゼ 1

(Chk1) をリン酸化することでチェックポイントを活性化することが知られている (*Liu et al., 2000; Myers et al., 2009*)。そこで、胚発生停止が細胞周期チェックポイントによるものかを調べるために、S/G2 期のチェックポイントキナーゼである Chk1 阻害剤を添加し、約 96 時間ライブセルイメージングを行いその後の発生を調べた。その結果、TALMin-Sssl WT mRNA を注入した区のうち Chk1 を阻害した区では阻害しなかった区に比べ 4 細胞期以降、有意に発生率が上昇し (**Fig. 2-9D**; Fisher. test *** $P < 0.0005$)、TALMin-Sssl WT mRNA を注入した区のうち Chk1 を阻害した区では mock と同様な発生率まで回復した (**Fig. 2-9C,D**)。また、TALMin-Sssl WT mRNA を注入した区のうち Chk1 を阻害した区において、間期の長さが mock と同様の長さまで回復することが分かった (**Fig. 2-9E**; Fisher. test *** $P < 0.0005$)。

セントロメアへの DNA メチル化導入は DNA 損傷と染色体分配異常に影響しない

セントロメアへの DNA メチル化導入は Chk1 チェックポイントに影響することが分かった。G2 期での Chk1 チェックポイントの主な原因として DNA の損傷が知られている (*Sidi et al., 2008; Jirmanova et al., 2005*)。また、DNA 損傷部位に集積するヒストンタンパク質である γ H2A.X は、H2A のヒストンバリエントである H2A.X の 139 番目のセリンがリン酸化された状態であり、DNA 損傷が起こることにより、 γ H2A.X が増加することが知られている (*Tsumura et al., 2006*)。

γ H2A.X は、DNA 損傷部位での修復や損傷シグナル伝達因子をリクルートする役

割を果たしている (*Miyanari et al., 2013; Yamagata et al., 2005; Yamazaki et al., 2007*) ほか、1 箇所の二本鎖切断に対し、その周辺、数 Mbp を巻き取る H2A.X にリン酸化が起こるため、シグナルの検出が容易である。さらに、近年、生細胞でタンパク質のリン酸化やメチル化を可視化するために、蛍光色素で標識した抗原結合断片を導入する技術 (Fab-based live endogenous modification labelin: FabLEM) が開発された (*Kimura et al., 2008; Hayashi-Takanaka et al., 2011; Hayashi-Takanaka et al., 2009*)。この技術を用いて、生きたまま受精卵の γ H2A.X を観察した報告がある (*Yamagata et al., 2019*)。そこで、G2 期チェックポイントが DNA 損傷によって引き起こされているかを調べるために、前核期から 2 細胞期にかけて γ H2A.X 輝度を測定した。その結果、mock と比較して TALMin-Sssl WT mRNA を注入した区においてすべてのタイムポイントで γ H2A.X 輝度の有意な差はみられなかった (**Fig. 2-10A**)。また、第一卵割期から第三卵割期までの染色体分配異常率を調べた。その結果、第一卵割期から第三卵割期までの各割合は対象区の mock で 0/40 (0%)、3/40 (8%)、3/40 (8%)、TALMin-Sssl mRNA を注入した区では 3/64 (5%)、9/64 (14%)、8/64 (13%) とすべての区において有意差はみられなかった (**Fig. 2-10B**: カイ 2 乗検定)。以上からセントロメアへの DNA メチル化導入は DNA 損傷と染色体分配異常に影響しないことが示唆された。

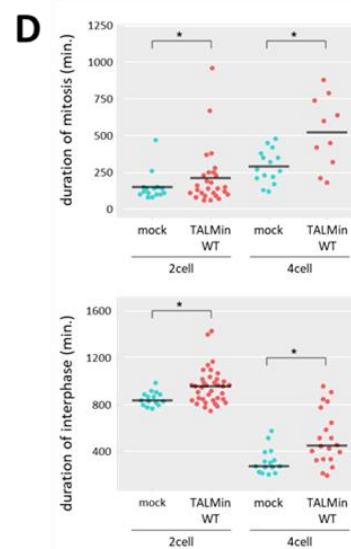
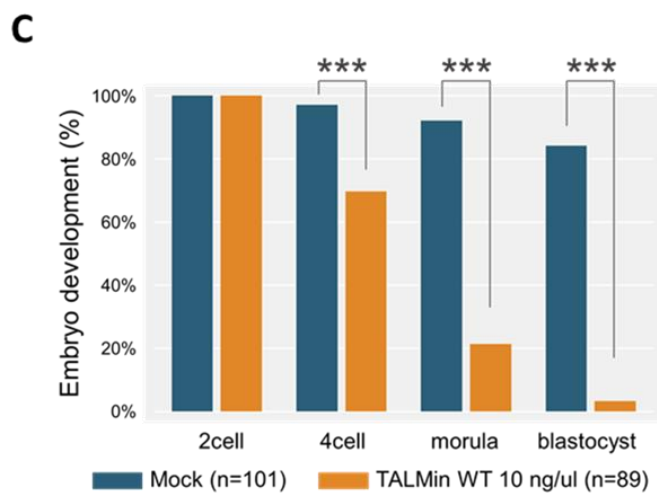
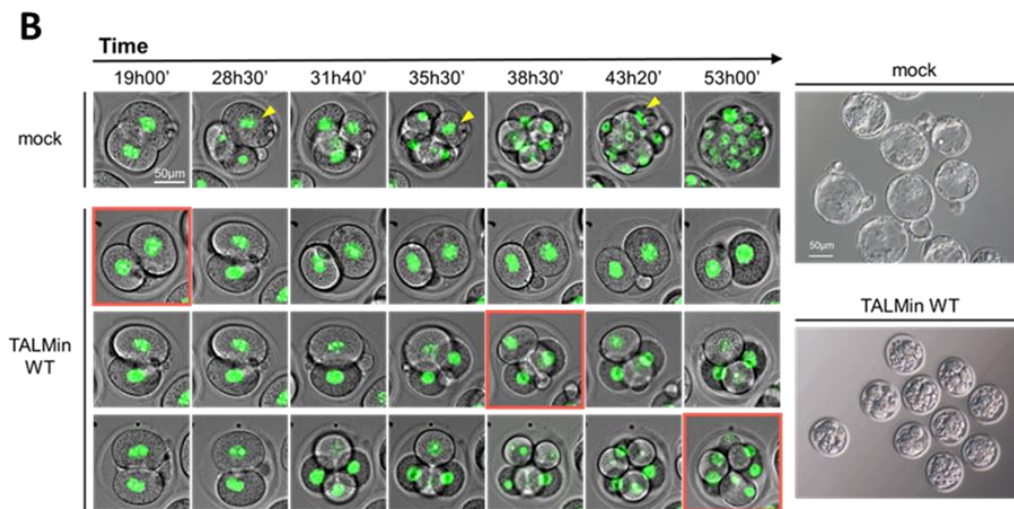
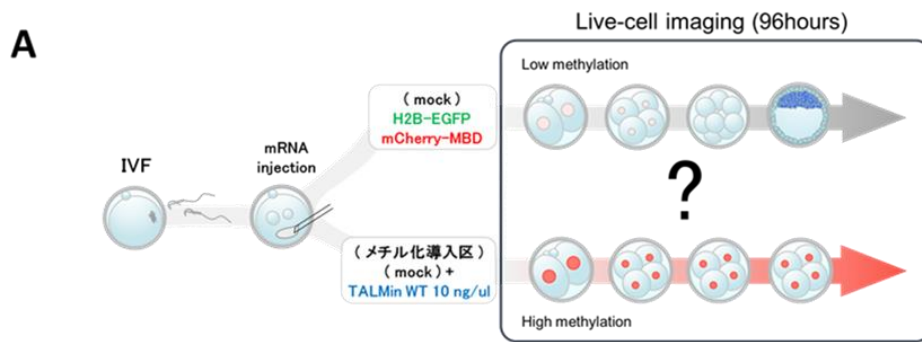


Fig. 2-8 ライブセルイメージングによる TALMin-Sssl WT 注入胚の発生率及び発生遅延の測定

(A) 実験スキーム。(B) 図左: 媒精後 19 時間から 53 時間までの各時間帯での代表的な snapshot を示す。上段: Mock、下 3 段: TALMin-Sssl WT を注入した胚、黄矢頭: 分裂期の割球、赤枠: 胚発生が停止した細胞期の画像を示す。図右: 媒精 96 時間時点の各区の胚の明視野画像。スケールバー=50 μm 。(C) ライブセルイメージングを行った胚の発生率。左から 2-cell、4-cell、morula、blastocyst に到達した胚の割合を示す。青: mock (n=101)、オレンジ: TALMin WT 10 ng/ μL (n=89) (カイ 2 乗検定、*** $P < 0.0005$) (D) 上段: 第 2 卵割期、第 3 卵割期における各胚の分裂期の長さを示す。縦軸は分裂期に要した時間、横軸は各区及び細胞期を示す。下段: 2 細胞期、4 細胞期における各胚の間期の長さを示す。縦軸は分裂期に要した時間、横軸は各区及び細胞期を示す。

(*Student t test * $P < 0.05$)

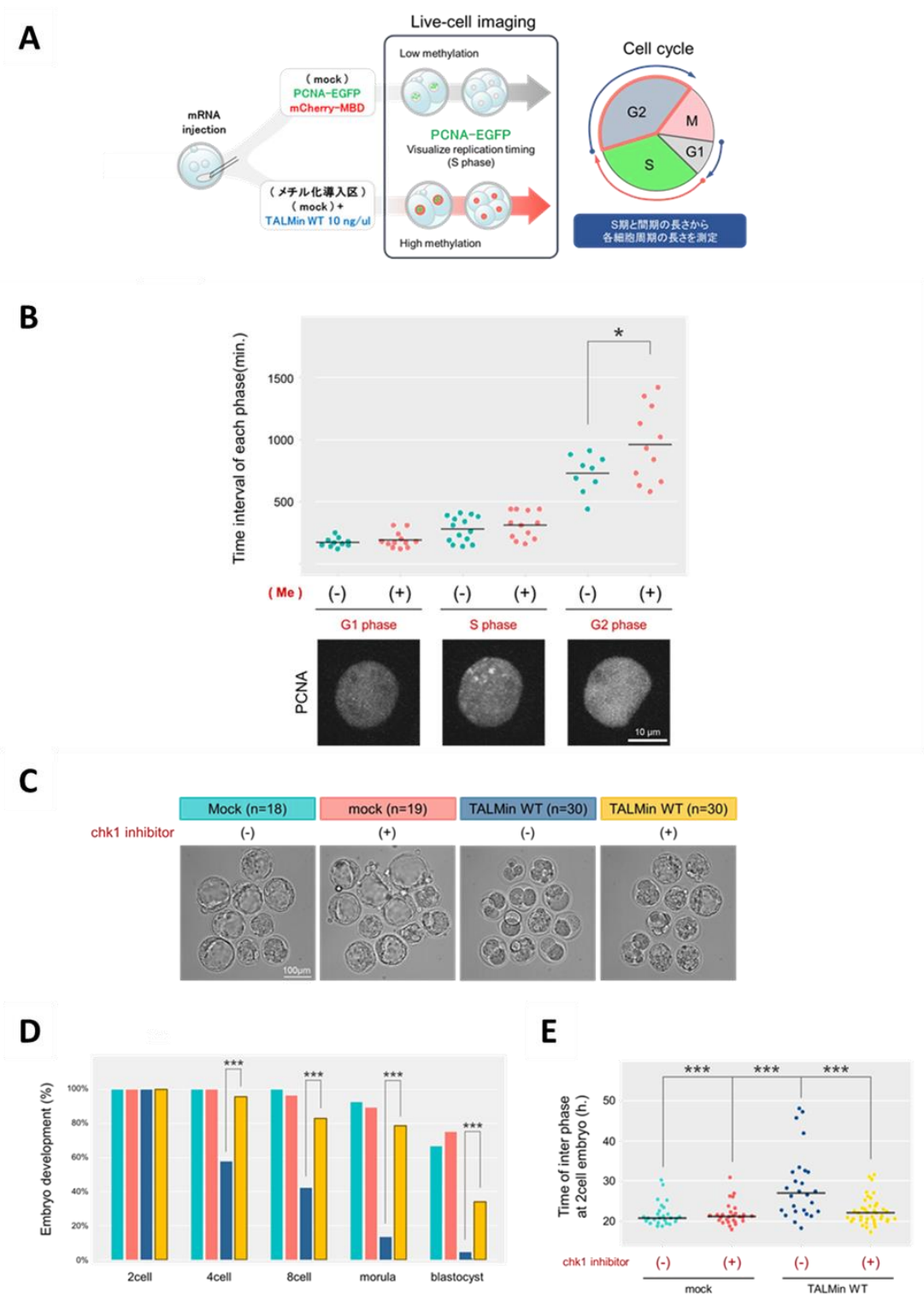


Fig. 2-9 セントロメアへの DNA メチル化導入が細胞周期に与える影響

(A) 実験スキーム。(B) 2 細胞間期における各細胞周期に要した時間を示す。縦軸は各細胞周期に要した時間を示し、横軸は各区及び各細胞周期を示す。青: mock、赤: TALMin-Sssl WT。画像は各細胞周期における代表的な核内の PCNA のシグナルパターンを示す。スケールバー=10 μm 。(t test * $P < 0.05$)

(C) ライブセルイメージングを行った胚の媒精後 96 時間の明視野画像。左から mock-Chk1 (-)、mock-Chk1 (+)、TALMin-Sssl WT-Chk1 (-)、TALMin-Sssl WT-Chk1 (+) を示す。スケールバー=100 μm 。(D) ライブセルイメージングを行った胚の発生ステージ。水色: mock/Chk1 inhibitor (-)、赤: mock/Chk1 inhibitor (+)、青: TALMin-Sssl WT/Chk1 inhibitor (-)、黄: TALMin-Sssl WT/Chk1 inhibitor (+) を示す。左から 2-cell、4-cell、8-cell、morula、blastocyst。(カイ 2 乗検定、*** $P < 0.0005$) (E) 2 細胞期における間期に要した時間を示す。水色: mock-Chk1 (-)、赤: mock-Chk1 (+)、青: TALMin-Sssl WT-Chk1 (-)、黄: TALMin-Sssl WT-Chk1 (+) を示す。(カイ 2 乗検定、*** $P < 0.0005$)

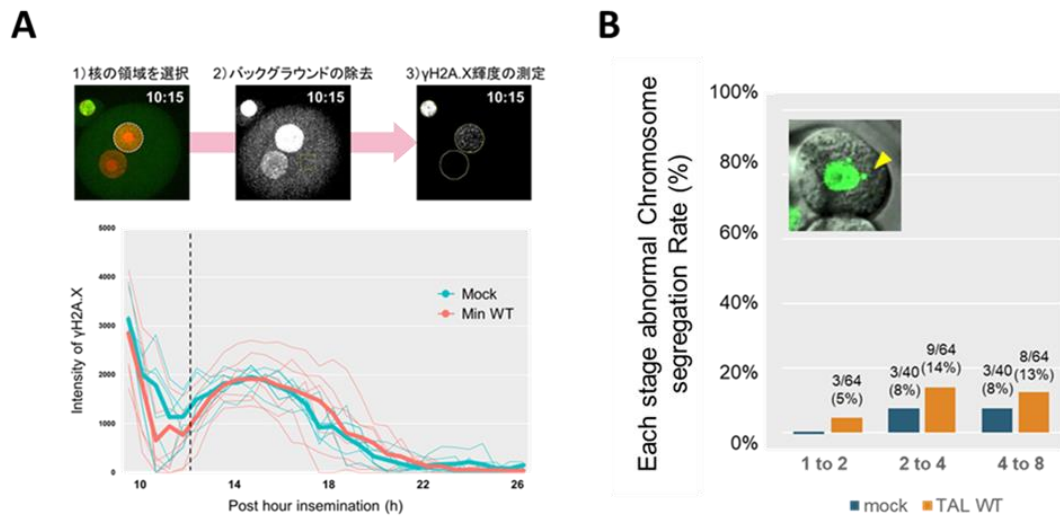


Fig. 2-10 セントロメアへの DNA メチル化導入胚の DNA 損傷と染色体分配異常

(A) 上段: γ H2A.X 輝度の測定方法の概略図。赤: Histone H2B-mCherry、緑: anti- γ H2A.X Fab を示す。右上には媒精後の経過時間 [h:min] を示す。下段: 第一卵割期から 2 細胞期における核内の γ H2A.X 輝度の推移を示す。縦軸が γ H2A.X 輝度、横軸が媒精後の時間を示す。青線: mock、赤線: TALMin-Sssl WT を示す。1つの線が、1つの胚を示す。青太線: mock、赤太線: TALMin-Sssl WT の γ H2A.X 輝度の平均値を示す。(B) 第一卵割期から第三卵割期までの染色体分配異常率。画像は染色体分配異常を起こした割球を示す。黄矢頭: 染色体分配異常後に形成した微小核を示す。

第4項 考察

胚発生停止のメカニズムの詳細をライブセルイメージングにより調べたところ、TALMin-Sssl WT を注入した胚では発生が遅延または停止しており、胚発生を停止したすべての細胞において間期で停止していることが分かった (**Fig. 2-8**)。また、PCNA-EGFP による S 期のライブセルイメージングの結果から、TALMin-Sssl WT を注入した胚において G2 期で胚発生の有意な遅延が確認された (**Fig. 2-9A, B**)。G2 チェックポイントとして知られている Chk1 を阻害すると、胚発生停止をレスキューできたことから、発生停止は Chk1 による G2 チェックポイントによって引き起こされたことが明らかとなった (**Fig. 2-9C, D, E**)。このチェックポイントの主な原因として DNA 損傷が知られている (25, 26) が、第一卵割期から 2 細胞期間期にかけての各割球内の γ H2A.X 輝度の平均値の推移と、第一卵割期から第三卵割期までの染色体分配異常率を調べた結果、セントロメアへの DNA メチル化導入は DNA 損傷と染色体分配異常に影響しないことが示唆された (**Fig. 2-10**)。この結果から、Chk1 チェックポイントが DNA 損傷ではなく、他の要因により引き起こされている可能性がある。例えば、DNA メチル化レベルの上昇に伴い、ヘテロクロマチンがしたことによる、複製エラーまたは複製ストレスにより、細胞周期が停止した可能性が考えられる。

セントロメアは細胞分裂時にキネトコア複合体を介して微小管が接着することが知られている (**Amor et al., 2004; Probst et al., 2010; Cheeseman et al., 2008**)。また、キネトコア形成に異常がある場合、有糸分裂に影響があること

が報告されている (*Kalitsis et al., 1998; Howman et al., 2000*) が、セントロメアへ DNA メチル化を導入した受精卵において染色体分配異常に差がないことから、キネトコアの形成に異常が生じた可能性は低いと考えられる。

第4節 小括

本研究では、ペリセントロメアとセントロメアの生殖細胞特異的な低 DNA メチル化状態の意義を明らかにするために、エピゲノム編集を用いて Major satellite と Minor satellite に人為的に DNA のメチル化を導入した。ペリセントロメアへの DNA メチル化導入は発生へ影響を及ぼさなかった。ペリセントロメアではノンコーディング RNA が転写されており、受精卵においてこの領域の転写産物を阻害すると 2 細胞期で発生が停止する報告がされている (*Santenard et al., 2010*)。しかし、ペリセントロメアが高い DNA メチル化状態である体細胞においてもこの領域の転写は報告されている (*Santenard et al., 2010; Zhu et al., 2011; Kishi et al., 2012*) ため、今回の DNA メチル化導入は転写を抑制しなかったと考えられる。

一方で、セントロメアへの DNA メチル化導入は初期胚発生が停止することから、初期胚のセントロメアの低 DNA メチル化状態は、胚発生に重要であることが示唆された。さらに、胚発生停止のメカニズムを調べたところ、G2 期のチェックポイントで停止することを発見した。このことから、セントロメアの低 DNA メチル化状態は G2 期のチェックポイントを通過するのに重要であることが示唆された。

第3章 超解像イメージングによるマウス受精卵の第一卵割における 染色体ペリセントロメア/セントロメアの動態解析

第1節 超解像顕微鏡を用いたマウス受精卵のライブセルイメージング法の 確立

第1項 緒言

近年、受精卵の染色体を観察するためにライブセルイメージング技術は重要な手法となりつつある。特に光毒性をできる限り抑えた観察条件のもとでは発生過程で起こった現象とその後の個体までの発生能を直接、単一胚で評価することができる。しかし、時空間分解能よく観察すればするほど、光毒性は上がるという問題があり、超解像顕微鏡ではその解像度ゆえに高い侵襲性を持つことが知られている。そこで、本節ではディスクコンフォーカルタイプの超解像顕微鏡を用いて、長時間の染色体動態の超解像ライブセルイメージングの後、そこから産仔を得ることができる条件を探索した。

第 2 項 材料及び方法

動物

実験には ICR マウス（日本 SLC）を用いた。マウス室内条件は、温度を 23℃、湿度を 50%に維持し、12: 12 時間の明/暗サイクルで飼育した。マウスは水と市販の餌を自由に摂取させた。本研究は実験動物の管理と使用のための指針に従って行った。すべての動物実験は、近畿大学動物実験倫理委員会（KABT-31-016）の承認を受けた。

精子および卵子の採取

ICR 雌マウス（7-12 週齢）に 10 IU の 妊馬血清性腺刺激ホルモン（PMSG）と 10 IU のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）（アスカアニマルヘルス）を 48 時間の間隔で腹腔内投与し、過排卵させた。卵子卵丘細胞複合体は hCG 投与の 13-15 時間後に採取した。精子は ICR 雄マウス（12 週齢）の精巣上体尾部より採取し、0.2 mL の TYH メディウムのドロップ内で 2 時間培養（37℃、5% CO₂ in air）することで受精能を獲得させた。

体外受精（IVF）

第 2 章・第 1 節・第 2 項を参照。

プラスミド

第 2 章・第 1 節・第 2 項を参照。

mRNA の *in vitro* 合成

第 2 章・第 1 節・第 2 項を参照。

mRNA または dcas9/gRNA 複合体のマイクロインジェクション

受精卵へのマイクロインジェクションは以前の報告に記載されている通りに行った。mRNA を超純水 (Thermo Fisher Scientific Barnstead Smart2Pure; Waltham, MA, USA) で 10 ng/μL に希釈し、一定量をマイクロマニピュレーション用のディッシュに置いた。受精後約 4-6 時間の受精卵をディッシュ内の HEPES 入りの CZB (*Chatot et al., 1989*) 培地に移し、直径約 1 μm のガラスピペットを付けたピエゾマイクロマニピュレーターを使用して mRNA を注入した。ガラスピペットに mRNA 溶液を充填し、ピエゾの振動を利用し、受精卵の透明帯と細胞膜を破った。数ピコリットルの溶液を受精卵に注入し、ピペットを静かに取り出した。mRNA を注入した受精卵はタンパク質が発現するまで、37°C6%CO₂、の条件で最低 2 時間インキュベートした。これらの手順の後に受精卵を凍結した。

イメージング

ガラスボトムディッシュに 5 μL の 0.00025% の polyvinyl alcohol (P8136-250G; Sigma-Aldrich) と 100 mM の EDTA を含む KSOMaa 培地を滴下し、流動パラフィンで培地を覆った (8012-95-1; NACALAI TESQUE, INC., Kyoto, Japan)。受精卵をガ

ラスボトムディッシュ上の培地に移し。37°C に設定された顕微鏡ステージ上のインキュベーションチャンバーに入れた (Tokai Hit, Shizuoka, Japan)。インキュベーションチャンバー中には 5% O₂ と 6% CO₂、89% N₂ の混合ガスを流入した。観察には倒立顕微鏡 (IX73; Olympus) にニポウディスク式共焦点ユニット (CSU-W1 SoRa; Yokogawa Electric) と scientific complementary metal oxide semiconductor (sCMOS) カメラ (Pime95B; Teledyne Photometrics, Tuscon, AZ, USA)、z モーター (Mac5000; Ludl)、電動 x-y ステージ (Sigma Koki, Tokyo, Japan) を搭載したシステムを用いた。電動 x-y ステージにより複数の胚を同時に観察することができる。さらに、SoRa システムはピンホールにマイクロレンズがない従来のニポウディスク (CSU-W1 モード) に切り替えることができるため、同一サンプルの比較観察が可能である。イメージングシステムの温度を安定させるために、室温を 30°C に維持した。イメージングシステムの機器制御には μ -Manager microscopy software (<https://micro-manager.org>) を使用した。受精卵の Z 軸方向の観察には、赤道面から上下に 25 μ m (合計 50 μ m) の範囲を 0.5 μ m の間隔で 101 枚の条件で画像取得した。観察した胚はその後、発生能を調べるために 37°C、5% O₂ と 6% CO₂、89% N₂ のインキュベーターに移した。観察には 40X または 100X シリコーン浸対物レンズを用いた (UPLSAPO40XS: NA 1.25; UPLSAPO100XS: NA 1.35; Olympus)。対物レンズの先端から放射されるレーザーのパワーは、光パワーメーター (TB200; Yokogawa Electric) で測定した。

画像解析

ライブセルイメージングにより得られた画像は、MetaMorph software ver. 7.7.10 (Molecular Devices)、 μ -Manager microscopy software、ImageJ/Fiji image analysis platform (<https://imagej.net/Fiji>) を用いて解析した。輝度測定は ImageJ/Fiji image analysis platform (<https://imagej.net/Fiji>) を使用した。SoRa システムの時定数は Histone H2B-mCherry が 38.6% (指数関数的減衰の時定数の定義とネーピア数の逆数から導出) に減衰するまでの時間を算出した。W1 システム時定数は指数曲線をフィッティングした後、H2B-mCherry が 36.8% に減衰するまでの時間から算出した。セントロメアのセグメントは W1 および SoRa システムから得られた画像を yen-method で二値化し、Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org/>) を用いて median-filter と region of interest (ROI) を検出した。

胚移植

胚移植については *Yamagata* らの報告 (*Yamagata et al., 2009b*) に従って行った。2 細胞期のマウス胚を 0.5 日目の偽妊娠マウスの卵管に移植した。移植後の 18 日目に帝王切開を行った。

統計検定

R の `prop.test` 関数を使用して片側 t 検定を実行した。超解像ライブセルイメージングシステムの場合、1 度に観察できる胚の数が少ないため、独立の反復統計は行っていない。

第 3 項 結果

超解像ライブセルイメージングシステム (SoRa システム) の構築およびイメージング条件の検討

ディスクコンフォーカルタイプの超解像顕微鏡を用いて、生きたまま受精卵を観察するためのシステムを開発した (**Fig. 3-1**)。当システムは超解像観察用のディスクと共焦点観察用のディスクを機械的に切り替えることが可能であり、同じサンプルを 2 つのモードで観察することができる。超解像画像を得るために、広い視野を持つ sCMOS センサーを使用し、ノイズを軽減するためにデノイズフィルターを適応した (**Boulangier et al., 2009**)。受精卵の第一卵割過程 (前核期から 2 細胞期までの約 17 時間) を培養しながら観察するために、電動ステージ上にインキュベーターとガスチャンバーを設置した。さらに、受精卵が外気の影響を受けないために、室温を 30°C に維持した。

構築した超解像イメージングシステムの光毒性を評価するために、励起光照射による Histone H2B-mCherry の蛍光退色を指標とした。Histone H2B-mCherry をコードする mRNA をマウス前核期胚にインジェクションし、2 細胞期胚まで発生させた。2 細胞期胚の核の 1 平面をストリーミングモードで 100 秒間連続観察した。その結果、励起するレーザーの出力や露光時間、カメラの感度を同じ条件下で観察したにもかかわらず、従来の共焦点顕微鏡システム (W1 システム) と比べて超解像イメージングシステム (SoRa システム) では蛍光退色が早かった (**Fig. 3-2A, B**)。時定数を計算すると、それぞれ 82.41 ms と 137 ms であった (**Fig. 3-2B**)。この結果から、SoRa システムが従来の W1 システムよりも光密度 (単位

面積あたりのレーザー光量)が高いことが考えられた。

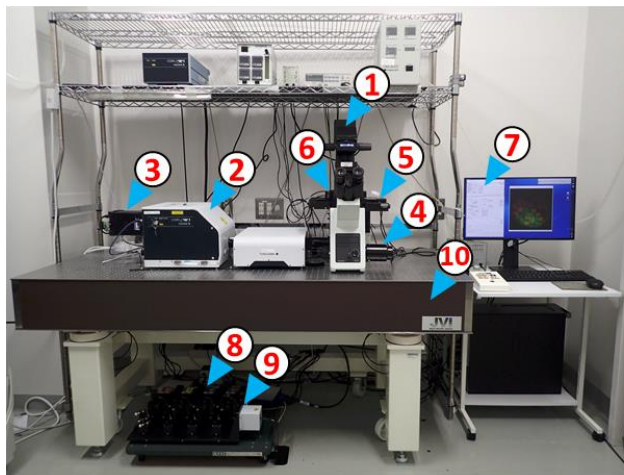
次に、超解像観察が後の胚発生に影響を与えない条件を探索した (**Table. 3-1**)。励起波長 561 nm、レーザー出力 (対物レンズ出射時の強度) 0.1 mW、5 分間隔の条件で 2 細胞期に到達した胚の数は 19/20 (95%) で、胚盤胞期に到達した胚の数は 14/20 (70%) であった。励起波長 561 nm、レーザー出力 (対物レンズ出射時の強度) 0.1 mW、10 分間隔の条件で 2 細胞期に到達した胚の数は 18/20 (90%) で、胚盤胞期に到達した胚の数は 16/20 (80%) であった。これらの胚盤胞到達率は観察していない区と比べ有意な差はなかった (52/65 (80%), $P = 0.89$, $P = 1$, prop-test)。0.2 mW のレーザー出力は 0.1 mW と比較し、胚盤胞までの発生率を低下させることが分かった (0.2 mW, 5 min: 0/10 (0%); 0.2 mW, 10 min: 3/19 (15.8%), prop-test $P = 0.016, 0.013$)。これらの結果は、561 nm の励起波長では 0.1 mW の出力が適していると示唆された。一方、488 nm の励起波長では 0.1 mW の出力において、時間間隔に関係なく胚盤胞に到達した胚はなく、488 nm の毒性が高いことを示した。以降は超解像観察後も胚盤胞期まで到達する 561 nm の波長を使用した条件で実験を行った。

超解像観察ライブセルイメージング後の胚が産仔まで発生するかどうかを調べるために、励起波長 561 nm、レーザー出力 0.1 mW、5 分または 10 分間隔で観察した 2 細胞期胚を偽妊娠マウスの卵管に移植した。産仔は両方に時間間隔の区で得られた (5 min (1/10) : $P = 0.57$, 10 min (7/15) : $P = 0.66$, respectively vs. imaging (-) prop-test) (**Table3-2; Fig. 3-3**)。以上より、観察の条件を 10 分間隔に決定した。

産仔が得られる条件下で前核期から 2 細胞期までの卵割過程を 17 時間の連続観察を行った (**Fig. 3-4**)。

SoRa システムを用いたマウス受精卵の分裂期染色体の観察

SoRa システムの分解能を調べるために、W1 システムと SoRa システムで同じ胚の分裂期染色体を観察して比較を行った。SoRa システムで観察した染色体は姉妹染色分体の溝を認識できたが、従来の W1 システムでは認識できなかった。さらに、SoRa システムで取得した画像に対してデコンボリューション処理を行うことで、より明確に姉妹染色分体の溝を認識することができた (**peak-to-peak length: 618.7 ± 137.5 nm**) (**Fig. 3-5A**)。間期の核を観察したところ、従来の W1 システムと比べ、SoRa システムではより詳細に核内のクロマチンを観察することができた (**Fig. 3-5B**)。



No.	Devices	Manufacturer	Model
1	Inverted microscope	Olympus	IX-73
2	Nipkow disk Confocal unit	Yokogawa electric	CSU-W1 SoRa
3	sCMOS camera	Photometrics	Prime 95B
4	Z motor	Ludl	Mac5000
5	XY auto stage	Sigmakoki	BIOS-206T
6	CO ₂ incubator	Tokai hit	MI-IBC
7	Software	https://micro-manager.org	Micro-Manager
8	Lasers	Coherent	405 nm 488 nm 561 nm 640 nm
9	Laser combiner	Sigmakoki	-
10	Vibration isolation table	Nippon boushin industry	SK-AS-1875T

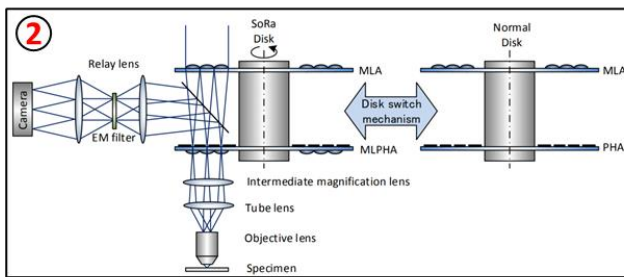


Fig. 3-1 超解像ライブセルイメージングシステムの概要

(A) 超解像ライブセルイメージングシステム。1: 倒立顕微鏡, 2: ニポウディスク式共焦点ユニット, 3: sCMOS カメラ, 4: Z 軸モーター, 5: XY 自動ステージ, 6: CO₂ インキュベーター, 7: Software, 8: レーザー光源, 9: レーザーコンバイナー、10: 除振台。詳細は右表に記載。(B) ディスクコンフォーカルタイプ超解像顕微鏡の機構。ピンホールにマイクロレンズを付けることで、ピンホール径を小さくしたものと同等効果を得ている。本超解像システムは、超解像用のディスクと通常の共焦点用のディスクとの切り替えが可能である。

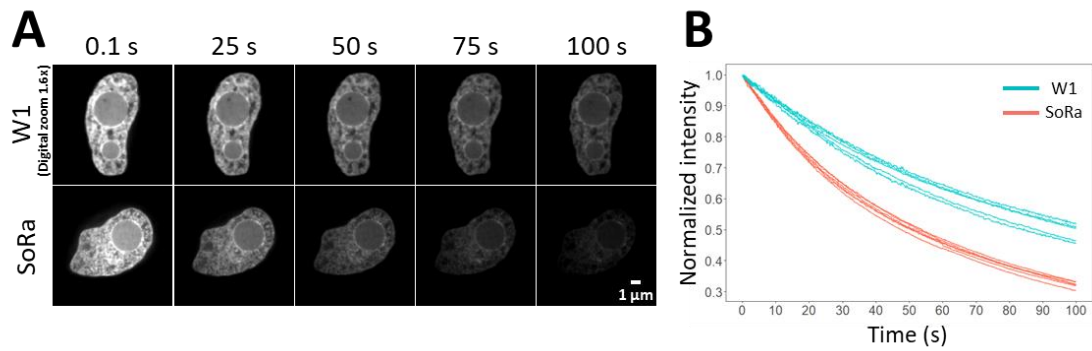


Fig. 3-2 超解像イメージングの光毒性の評価

(A) W1 システム (上図) および SoRa システム (下図) で観察した 2 細胞期胚の核の画像。(B) 輝度変化のグラフ。

Table. 3-1 超解像ライブセルイメージング後の胚発生率

Injected mRNA	Optical wavelength (nm)	Optical intensity (mW)	Time intervals (min)	Imaging period (hour)	No. of embryos examined	No. (%) of 2-cell embryos	No. (%) of blastocyst
Histone H2B-mCherry	-	-	-	-	65	63 (96.9)	52 (80)
	561	0.1	5	17	20	19 (95)	14 (70)
	561	0.1	10	17	20	18 (90)	16 (80)
	561	0.2	5	17	10	4 (40)	0 (0)
	561	0.2	10	17	19	15 (78.9)	3 (15.8)
Histone H2B-EGFP	-	-	-	-	7	7 (100)	7 (100)
	488	0.1	5	17	5	1 (20)	0 (0)
	488	0.1	10	17	5	5 (100)	0 (0)

Table. 3-2 超解像ライブセルイメージング後の胚の産仔率

Injected mRNA	Optical wavelength (nm)	Optical intensity (mW)	Time intervals (min)	Imaging period (hour)	No. of embryos examined	No. (%) of 2-cell embryos	No. of recipients	No. (%) of Pups
Histone H2B-mCherry	-	-	-	-	27	26 (96.3)	6	8 (29.6)
	561	0.1	5	17	13	10 (76.9)	3	1 (7.7)
	561	0.1	10	17	15	15 (100)	3	7 (46.7)

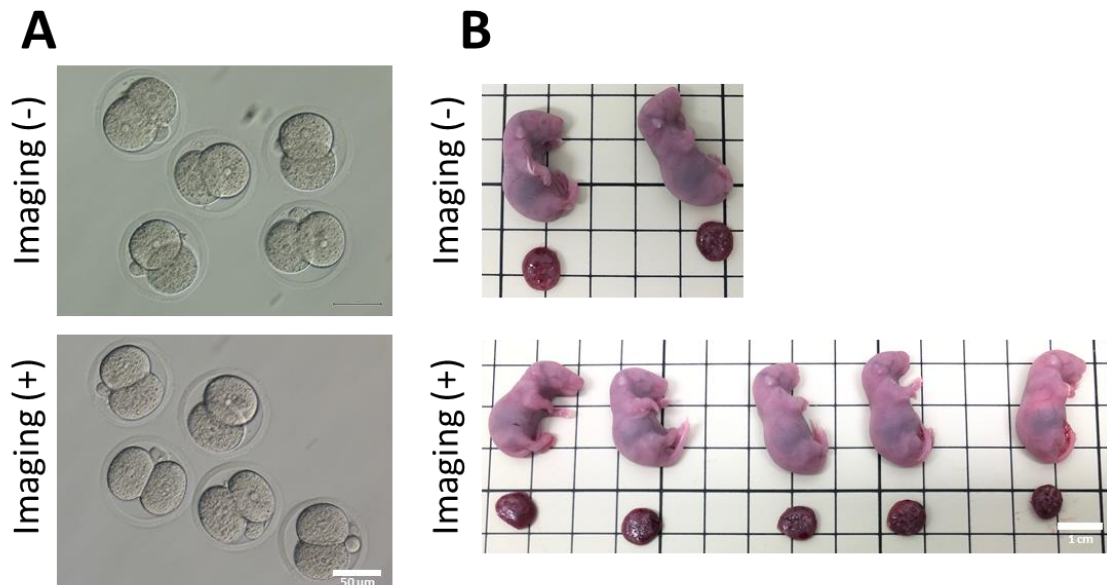


Fig. 3-3 移植前の2細胞期胚と移植後に得られた産仔の写真。

(A) 移植した2細胞期胚の代表的な写真。上はイメージングを行っていない2細胞期胚 (imaging (-))、下は561 nmの励起レーザー、0.1 mWのレーザー出力、時間間隔10分で観察した後の2細胞期胚 (imaging (+)) (B) 超解像イメージング後に得られた産仔の代表的な写真。上はimaging (-)から得られた産仔の写真、下はimaging (+)から得られた産仔の写真。

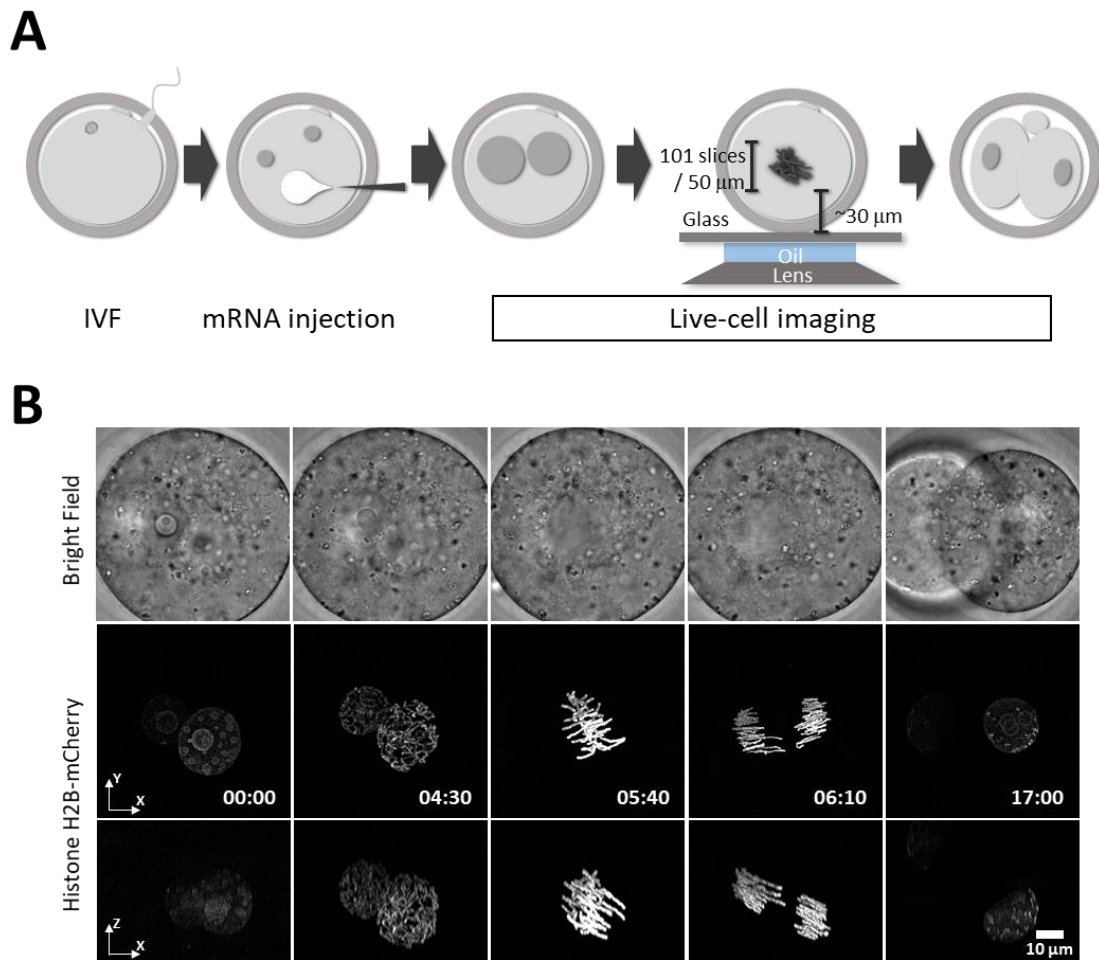


Fig. 3-4 超解像顕微鏡を用いたマウス受精卵の第 1 卵割過程のライブセルイメージングの例

(A) 本実験の流れ。体外受精 (IVF) により得たマウス前核期受精卵に、 $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ の Histone H2B-mCherry mRNA をマイクロインジェクションした。前核がガラス面に対し平行になるように受精卵を設置し、赤道面から上下に $25 \mu\text{m}$ の幅で $0.5 \mu\text{m}$ 間隔に 101 枚撮影した。(B) マウス受精卵の第 1 卵割過程の超解像ライブセルイメージング画像。10 分間隔で 17 時間のタイムラプス観察を行った。左から前期、前中期、中期、後期、終期を示す。

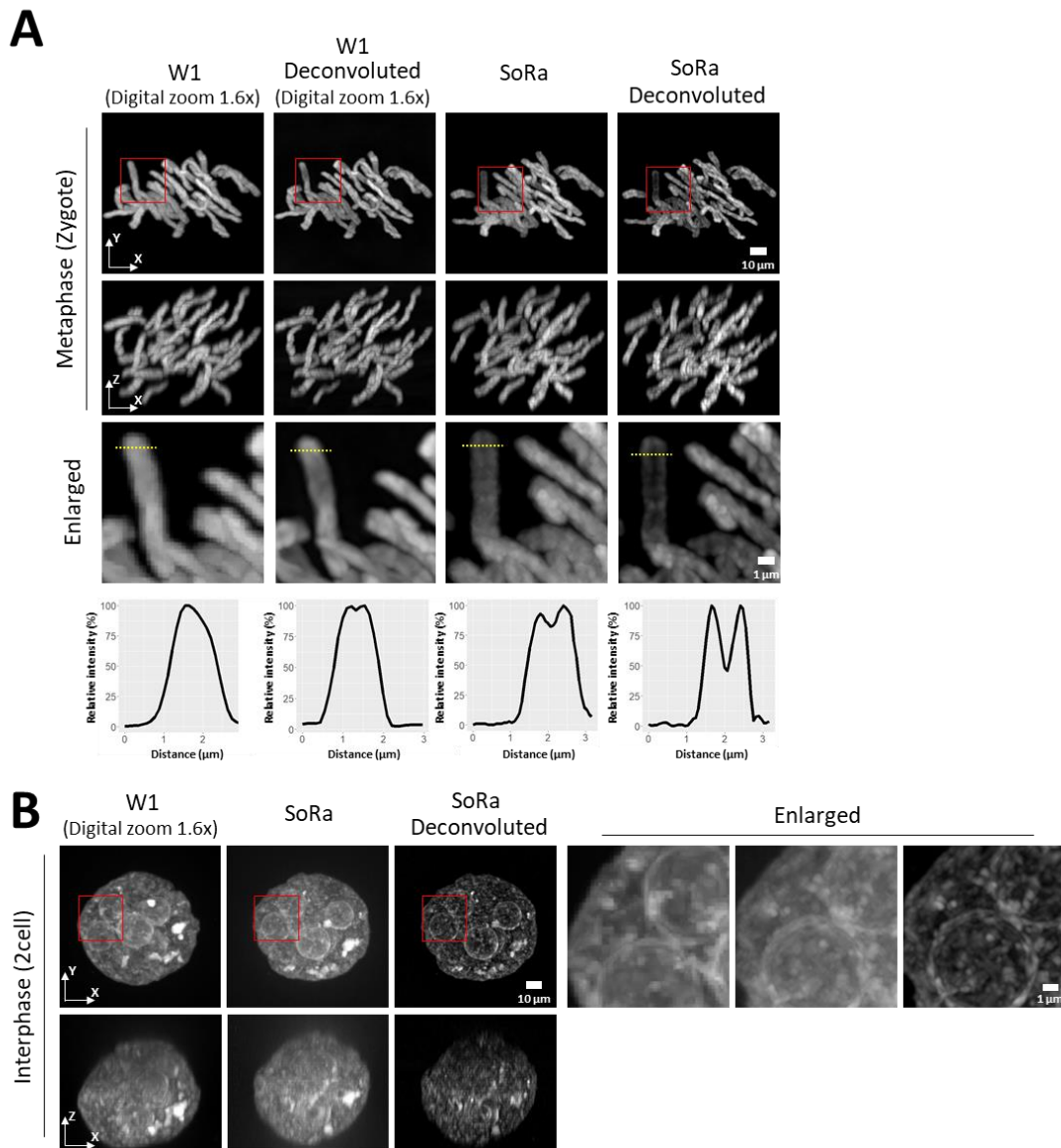


Fig. 3-5 従来の共焦点顕微鏡観察との分解能の比較

(A) 同じ前核期胚の分裂期染色体を各顕微鏡システムで観察した図。左から W1 の x-y と x-z の画像、 W1 の x-y と x-z の画像をデコンボリューションした画像、 SoRa の x-y と x-z の画像、 SoRa の x-y と x-z の画像をデコンボリューションした画像。上から分裂期染色体の x-y 画像、 分裂期染色体の x-z 画像、 x-y 画像の拡大図、 拡大図中の輝度を示したラインプロット。(B) 同じ 2 細胞期胚の核を各顕微鏡システムで観察した図。左から W1 の x-y と x-z の画像、 SoRa の x-y と x-z の画像、 SoRa の x-y と x-z の画像をデコンボリューションした画像。上から分裂期染色体の x-y 画像。

第4項 考察

OPRA式ディスク共焦点超解像顕微鏡を用いてマウス受精卵の最初の卵割を継続的に観察し、満期胚が得られる観察条件を特定した。

光毒性と胚発生

卵母細胞などの厚いサンプルを観察すると、体細胞などの薄いサンプルよりも画像が暗くなり、Z方向の解像度が低くなる。この課題は、レーザー強度またはZ軸方向に取得する画像の数を減らすことで克服できるが、一方で、これらの対策は胚の生存率を低下させる傾向がある。これまでにSTEDやPALM、Airyscan、SIMなどの超解像システムを用いてマウス着床前胚を観察した例はある（*Zielinska et al., 2019*）が、生存率に関する報告はされていない。本研究では、SoRaシステムを用いた観察において、従来の共焦点システム（W1システム）よりもHistone H2B-mCherryの退色が速くなり、高い光毒性を示したため（**Fig. 3-2**）、胚の予後に影響を与えない観察条件を探した。*Squirrell*らは1999年に2光子励起顕微鏡を使用して観察されたハムスター胚を仮親に移植し、産仔率を確認することにより、胚への光毒性を評価できると報告した（*Squirrell et al. 1999*）。この方法は観察された現象が光毒性によるアーチファクトでないことを確認できる。同様に、*Yamagata*らはwide-fieldとディスク共焦点顕微鏡を用いたマウス胚の観察における光毒性を評価した（*Yamagata et al., 2005; Yamagata et al., 2009a*）。これらの研究ではEGFP- α -tubulinとHistone H2B-mRFP1をマウス受精卵に注入し、2色（励起波長：488 nm/561 nm）で観察した。対照的に、本研究では超解像顕微鏡を使用して励起波長488 nmで観察した結果、すべての胚が2細胞

胞期までに停止することが分かった (**Table. 3-1**)。一方で、561 nm の励起波長で観察した胚は、励起していない区と同程度に胚盤胞まで到達し、産仔も得られた (**Table. 3-2; Fig. 3-3**)。これらの結果は 561 nm の励起波長で観察された現象が光毒性で死にゆく細胞の異常な振る舞いを反映していないことを示唆している。さらに、超解像観察後の胚から産仔が得られる条件を特定したことから、今後の実験では SoRa システムで観察された現象を胚発生の予後や子孫獲得を関連付けて解析することができるだろう。

第一卵割中の染色体およびクロマチンの超解像ライブセルイメージング

本研究ではマウス胚の第一卵割過程を観察した (**Fig. 3-4**)。第一卵割における染色体分配の失敗は胚発生にとって重要な因子である (**Yamagata et al., 2009b, Mashiko et al., 2020**)。したがって、超解像ライブセルイメージングを使用して第一卵割中の染色体分配を詳細に観察することによって、胚発生の予後予測が可能になる。**Mashiko** らは以前に低倍率のライブセルイメージングと次世代シーケンスを組み合わせ、異数性を引き起こす染色体の分裂パターンを特定した (**Mashiko et al., 2020**)。超解像観察と次世代シーケンス法によるゲノム検査を繰り返し、関連付けることで、染色体異常を引き起こしやすい染色体の振る舞いを明らかにできるかもしれない。

第2節 低侵襲超解像ライブセルイメージングを用いたマウス受精卵の 染色体カウント方法の確立

第1項 緒言

着床前初期胚の染色体数は生殖補助医療 (assisted reproductive technology; ART) および家畜繁殖における妊娠率と相関している (*Magli et al., 2000; Sandalinas et al., 2001; Rubio et al., 2007; Mantikou., 2012; Yao et al., 2018*)。さらに、異常な染色体をもつ胚が胎児まで成長したとしても、重度の遺伝子疾患 (例; ヒトの染色体 21 番トリソミー) を示す可能性がある (*Lejeune et al., 1959*)。したがって、胚移植前に染色体数を評価することは、遺伝子疾患のリスクを軽減するために重要である。マイクロアレイや次世代シーケンスを使用した従来の染色体検査法は遺伝病のリスクを減らすことができる (*Mastenbroek et al., 2007*) が、一方でこれらの検査法は正常な胚からの細胞の回収が必要であり、細胞採取の結果として妊娠率が低下するというリスクが報告されている (*Antonarakis et al., 1991, Freeman et al., 2007*)。21 番トリソミーの原因の約 90%は減数分裂に由来するため、受精直後の染色体数を決定することで、遺伝的疾患のリスクのある胚を移植することを低減することができる可能性がある。それにもかかわらず、従来法では十分な数の細胞を含む胚盤胞を使用して実行されているため、これらの手法を使用して評価することはできない。したがって、着床前の胚の細胞数を減らすことなく、受精直後の染色体をリアルタイムに検査する技術の開発は、

ART に新しい洞察をもたらす画期的なものとなることが予測される。

Yamagata らはマウスをモデルに受精卵の細胞内を生きのまま観察する技術を構築した (*Yamagata et al., 2009a*)。蛍光顕微鏡やディスク式共焦点顕微鏡を用いたマウス着床前初期胚の低侵襲長時間ライブセルイメージングにおいて、初期の染色体数分配異常がその後の個体発生に影響を与えることを示した (*Yamagata et al., 2009a; Yamagata et al., 2009b; Mashiko et al., 2020*)。しかし、微小核の形成につながる明らかな異常は検出できたものの、解像度が限られていたため、染色体を数えるまでは至っていない (*Mashiko et al., 2020*)。そこで、本研究では細胞数や妊娠率を低下させない染色体カウントの新しい方法として、超解像ライブセルイメージングを用いたマウス胚の染色体カウントを行った。

第 2 項 材料および方法

動物

第 2 章、第 1 節、第 2 項を参照。

体外受精

第 2 章、第 1 節、第 2 項を参照。

プラスミド

Major satellite 配列を認識する TALE (Transcription Activator-Like Effector) に緑色蛍光色素 (mClover3) を付加した融合遺伝子 (pTALYM3; *Miyanari et al., 2013*) を使用した。これらの融合遺伝子は mRNA 合成用プラスミド pcDNA3.1 polyA (83) (*Yamagata et al., 2005*) のマルチクローニングサイト中に挿入された。

mRNA の *in vitro* 合成

mRNA は第 2 章、第 1 節、第 2 項の通りに合成した。pTALYM3 の直鎖化には Apa I の制限酵素を使用した。

dCas9/gRNA 複合体の調整

crRNA (Integrated DNA Technologies, Redwood City, CA, USA または Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Upper Austria, Austria) と tracrRNA-ATTO550/ATTO647N (Integrated DNA Technologies) を混合し、T100 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules,

CA, USA) (94 °C: 5 min, 60 °C: 5 min) で反応させ、gRNA を作製した。マウス Minor satellite の標的配列は 5'-ACACTGAAAAACACATTCGT-3' (*Anton et al., 2014*) を用いた。gRNA と dCas9 タンパク質 (Integrated DNA Technologies) を混合し、室温で 15 分インキュベートした。gRNA と dCas9 タンパク質はそれぞれ終濃度 20 ng/μL と 200 ng/μL に調整した。

mRNA または dCas9/gRNA 複合体のマイクロインジェクション

受精卵へのマイクロインジェクションは第 2 章・第 1 節・第 2 項の通りに行った。mRNA を超純水 (Thermo Fisher Scientific Barnstead Smart2Pure; Waltham, MA, USA) で 10 ng/μL に希釈し、一定量をマイクロマニピュレーション用のディッシュに置いた。受精後約 4-6 時間の受精卵をディッシュ内の HEPES 入りの CZB (*Chatot et al., 1989*) 培地に移し、直径約 1 μm のガラスピペットを付けたピエゾマイクロマニピュレーターを使用して mRNA を注入した。ガラスピペットに mRNA 溶液を充填し、ピエゾの振動を利用し、受精卵の透明帯と細胞膜を破った。数ピコリットルの溶液を受精卵に注入し、ピペットを静かに取り出した。mRNA を注入した受精卵はタンパク質が発現するまで、37°C、6%CO₂、の条件下で 2 時間インキュベートした。これらの手順の後に受精卵を凍結した。

イメージング

第 3 章・第 1 節・第 2 項を参照。

染色体のカウントおよびセントロメア (Minor satellite) の点状シグナルのカウント

画像処理には ImageJ/FIJI (*Schindelin et al., 2012*) を使用した。画像のデコンボリューションには DeconvolutionLab2 のプラグイン (*Sage et al., 2017*) の Tikhonov 正則化アルゴリズムを使用した。理論的な点分布関数 (point spread function; PSF) は Diffraction PSF 3D のプラグインを使用して算出した。その後、ノイズ除去のために、デコンボリューション処理した画像に MorphoLibJ プラグイン (*Legland et al., 2016*) の Top Hat filter を適応し、Otsu のアルゴリズムで二値化した。画像内の近接したオブジェクトは MorphoLibJ プラグインの Transform Watershed 3D アルゴリズムを用いて分離した。セントロメア (Minor satellite) の点状シグナルは ImageJ/FIJI と FluoRender (*Wan et al., 2012*; <https://www.sci.utah.edu/software>) を使用してカウントした。

第 3 項 結果

染色体の分離と自動カウント

染色体の本数をカウントするために、ライブセルイメージングで得たマウスの分裂期染色体の画像のセグメンテーションを行った。デコンボリューション処理は Tikhonov の regularization algorithm (*Sage et al., 2017*)、ノイズ処理は Top Hat filter (*Legland et al., 2016*)、二値化処理は Otsu's method (*Otsu., 1979*) を用いた。二値化したオブジェクトを自動的にカウントした結果、40 個のオブジェクトを観察することができた (*Fig. 3-6A, B*)。しかしながら、検出されたオブジェクトの数は胚やタイムポイントで異なり、染色体の距離が近いときに 2 つのオブジェクトを 1 つとして誤認識するリスクがあることが分かった (*Fig. 3-6C*)。従来の W1 システムで観察した分裂期染色体の自動カウントの結果と比較して SoRa システムでは明確に染色体の分離ができていたが、個々の胚の染色体カウントに一貫性がないことは、この手法の限界を示していると考えられた (*Fig. 3-7*)。

生細胞蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (Live-FISH) 法を用いたセントロメアのカウント

重なった染色体部位の誤カウントの問題を解決するために、すべての染色体の末端部に存在するセントロメアを可視化した (*Fig. 3-8A*)。そのために、生細胞で任意の DNA 配列を標識できる CRISPR/dCas9 と gRNA のシステムを用いた (*Wang et al., 2019*) (*Fig. 3-8B*)。ES 細胞で以前報告されたセントロメア配列

に基づいて crRNA を設計した (**Anton et al., 2014**)。対比染色としてセントロメアよりも大きく、内側に存在する Major satellite と呼ばれる反復配列からなる領域であるペリセントロメアを TALE システムを用いて蛍光標識した (pTALYM3: **Miyanari et al., 2013**) (**Fig. 3-8A**)。その結果、分裂中期、後期で Minor satellite と Major satellite の両方のシグナルが観察された (**Fig. 3-8C**)。Major satellite と比較すると Minor satellite の点状のシグナルは、より外側に位置し、シグナルの重なりはなかった (**Fig. 3-8C**)。マウス受精卵のセントロメアの点の数を数えたところ、40 個の点を数えることができた。 (**Fig. 3-9A, B**)。特に、カウントした点状のシグナルの数は解析した 3 つの胚では 40 個あり、時間とともに変化しなかった (**Fig. 3-9; Fig. 3-10**)。一方で、従来の共焦点顕微鏡では、点状のシグナルを検出することができなかった (**Fig. 3-11**)。最後に、Histone H2B-mCherry と Minor satellite 配列を標的とした Live-FISH プローブを用いて多色の超解像ライブセルイメージングを行った。その結果、第一卵割過程の染色体とセントロメアを観察することができ、その後の胚は胚盤胞に到達することが分かった (3/6, **Fig. 3-12**)。

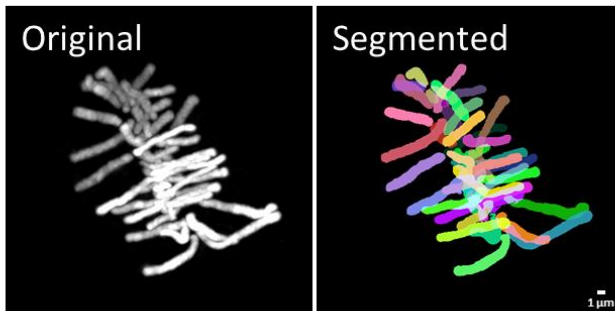
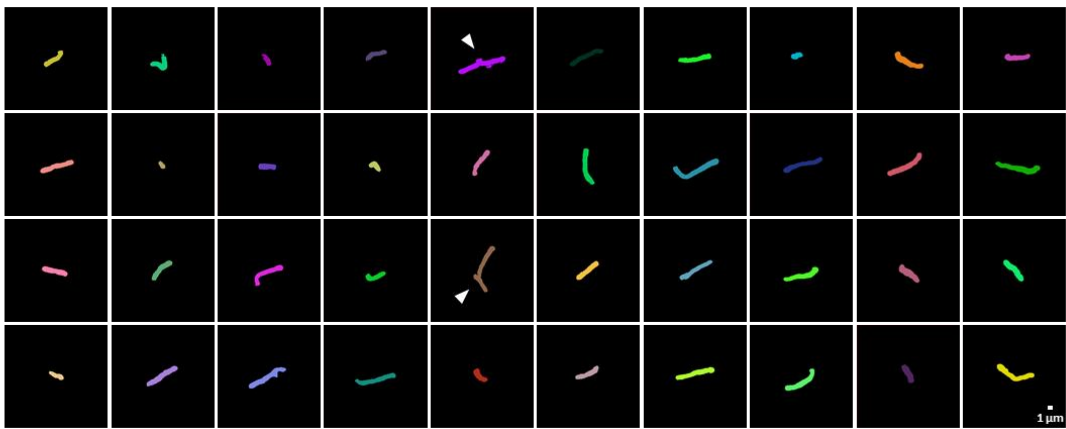
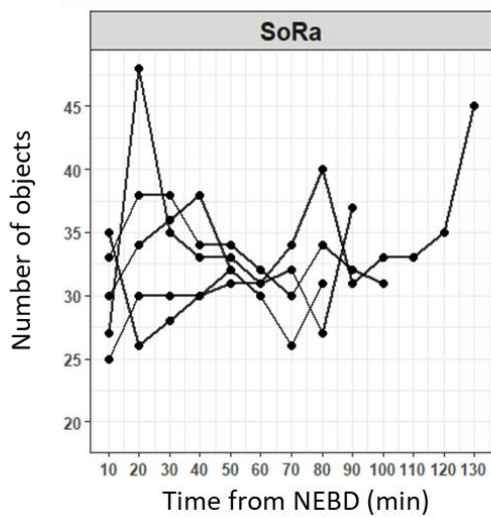
A**B****C**

Fig. 3-6 Histone H2B-mCherry を用いた染色体のカウント

(A) イメージングで得た多次元データから分裂期染色体を抽出して、セグメント処理した図。左は元画像、右がセグメント処理後の画像。(B) セグメント処理した画像からオブジェクトを抽出した図。矢頭は結合したオブジェクトを示す。(C) 染色体の本数を胚ごとに時間経過を追ってカウントした図。

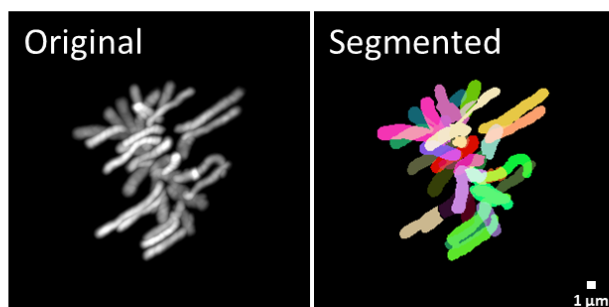
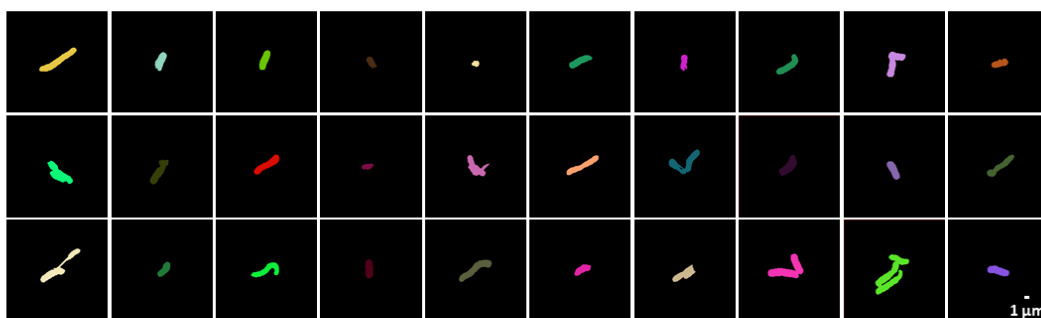
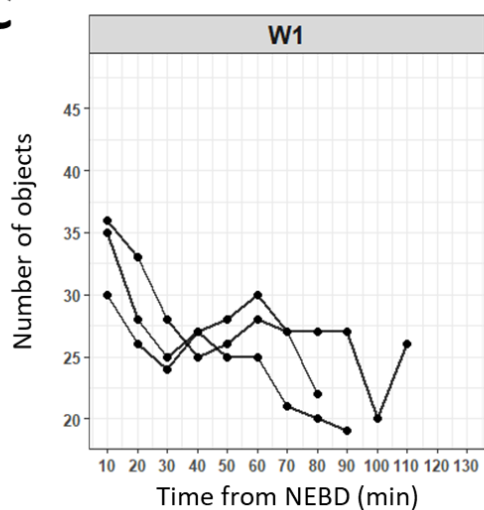
A**B****C**

Fig. 3-7 従来の W1 システムを用いた染色体のカウント

(A) イメージングで得た多次元データから分裂期染色体を抽出して、セグメント処理した図。左は元画像、右がセグメント処理後の画像。(B) セグメント処理した画像からオブジェクトを抽出した図。(C) 染色体の本数を胚ごとに時間経過を追ってカウントした図。

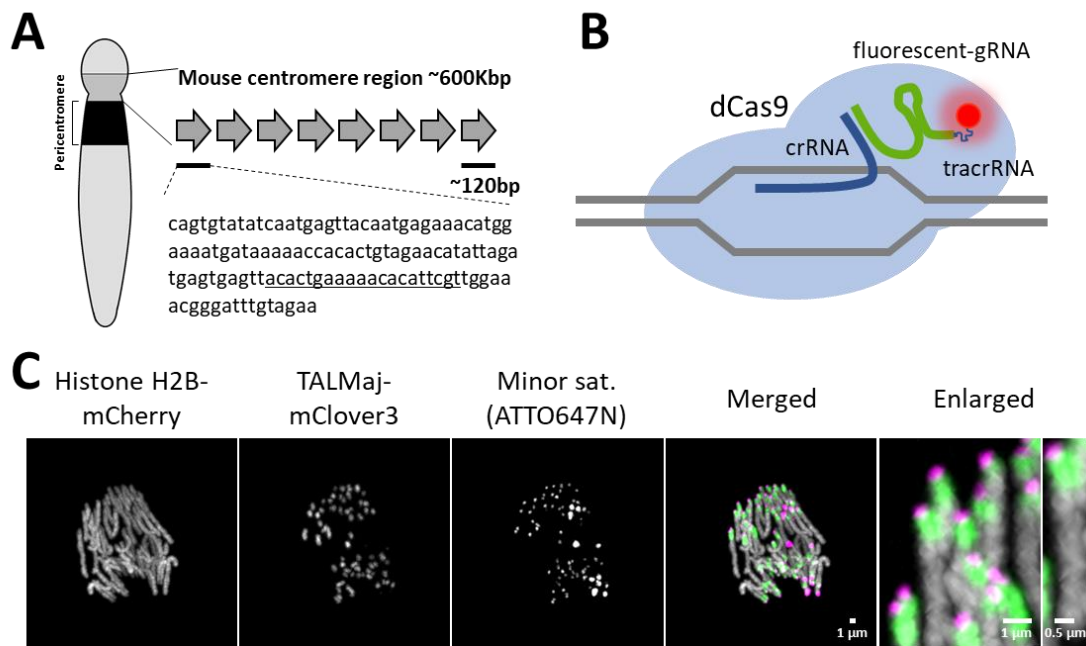


Fig. 3-8 CRISPR/dCas9 システムを用いたセントロメアの可視化

(A) マウス Minor satellite 配列とセントロメアの模式図。下線は gRNA の標的配列を示す。(B) CRISPR/dCas9 と gRNA のシステムの模式図。本研究では Minor satellite 配列を標的とした crRNA と蛍光標識した tracrRNA を使用した。

(C) SoRa システムで観察した Histone H2B-mCherry、TALMaj-mClover3、Minor satellite を標的とした dCas9/gRNA 複合体のスナップショット。

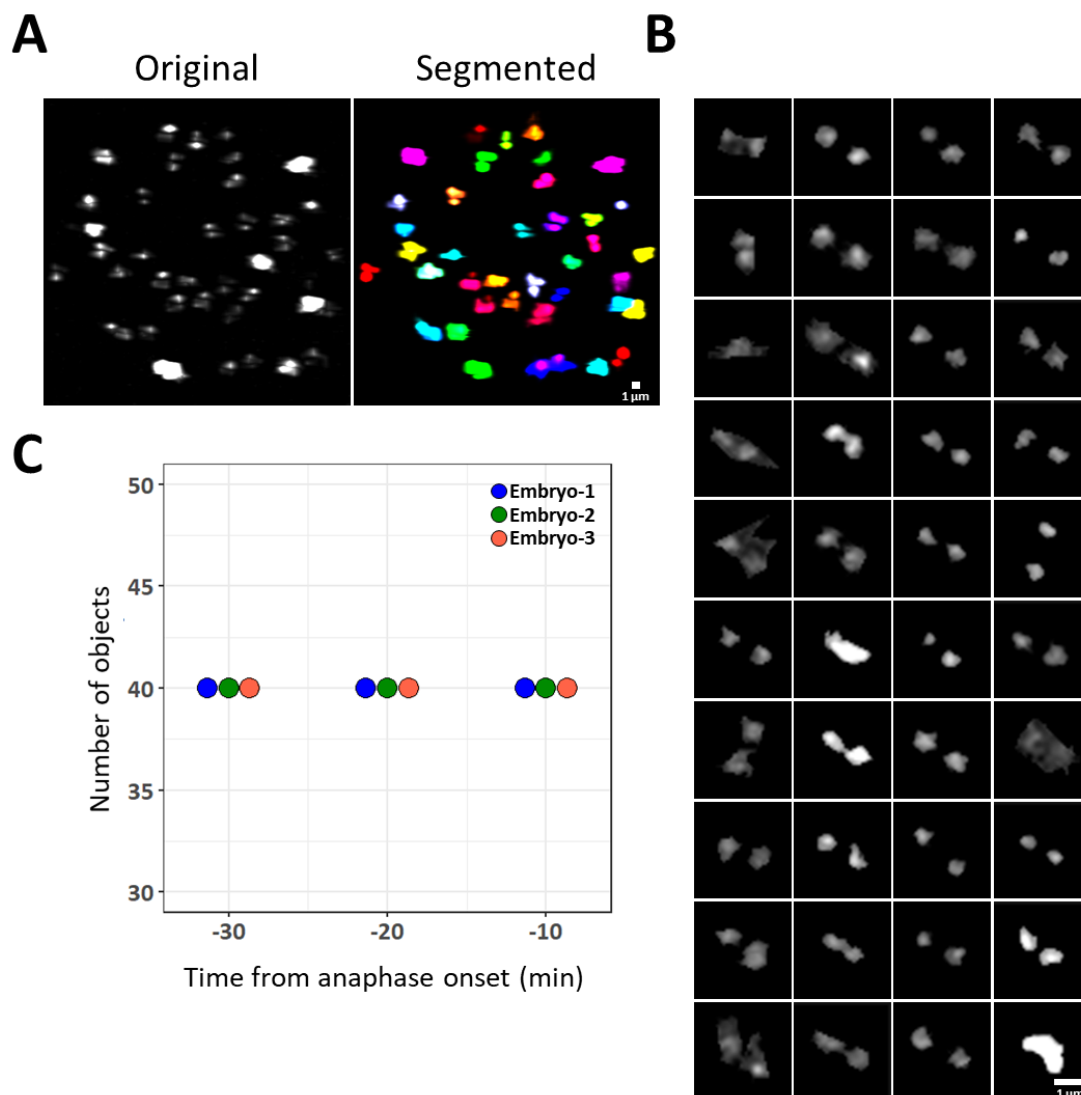


Fig. 3-9 CRISPR/dCas9 システムを用いたセントロメアのカウント

(A) イメージングで得た多次元データから分裂期のセントロメア信号を抽出して、セグメント処理した図。左は元画像、右がセグメント処理後の画像。(B) セグメント処理した画像からセントロメアの信号を1セットずつ抽出した図。(C) セントロメアの信号を後期開始前の3つのポイントで測定した図。後期開始点を $t=0$ とした。

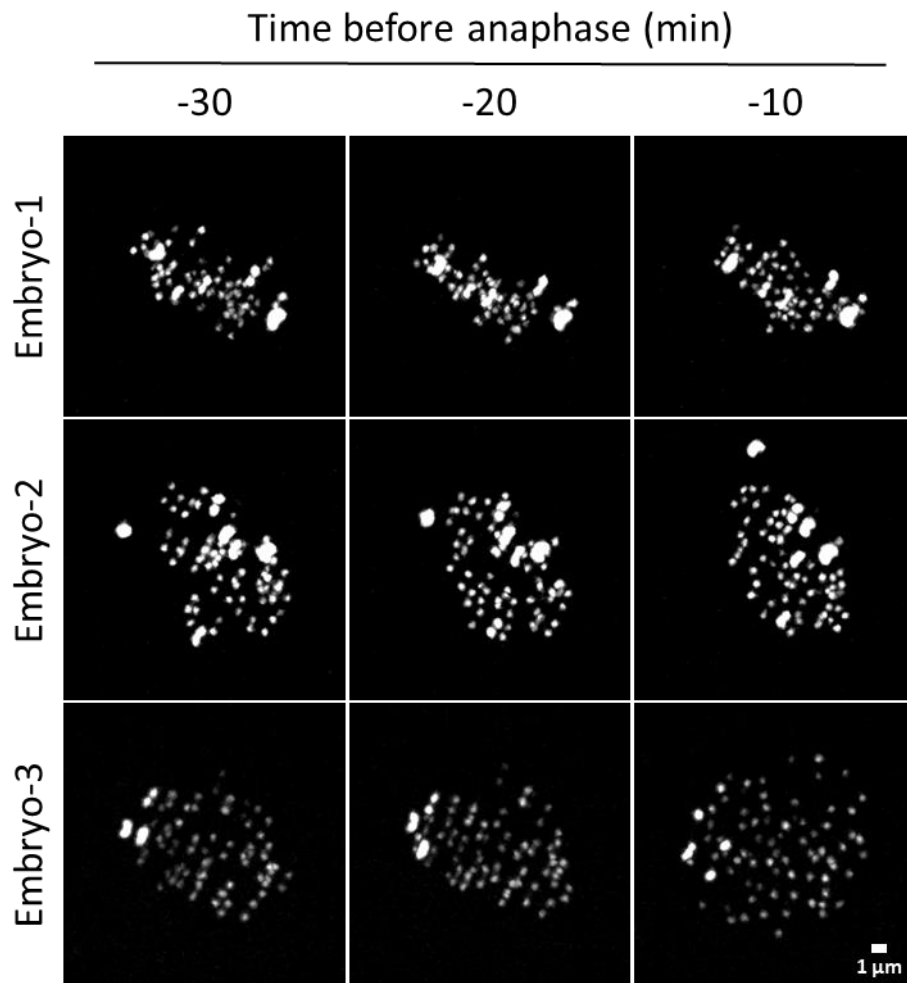


Fig. 3-10 CRISPR を応用した Minor satellite のライブセルイメージング
後期開始前 3 ポイントの Minor satellite の画像。カウントに用いた 3 つ胚を示した。

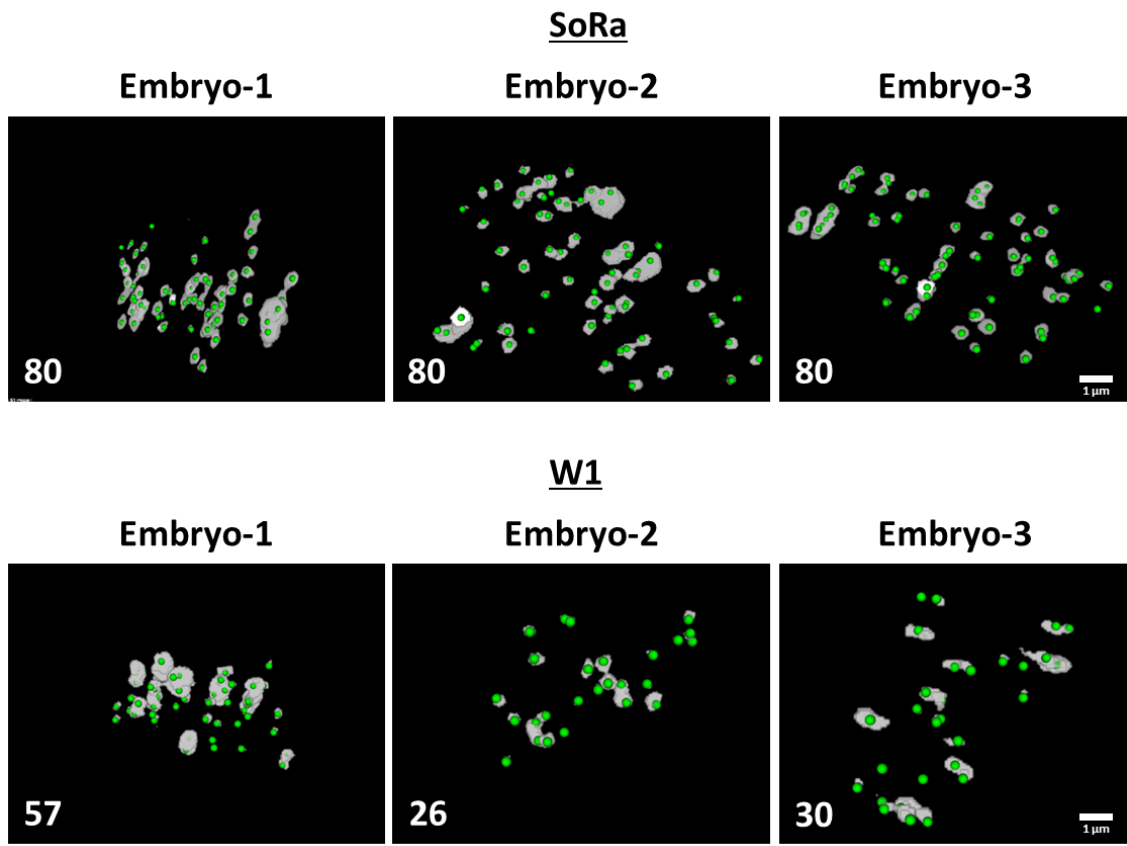


Fig. 3-11 SoRa システムと W1 システムで観察したセントロメアのカウント
 上は SoRa システムで観察した Minor satellite のシグナルを白、検出した点の
 数を緑で示した。下は W1 システムで観察した Minor satellite のシグナルを
 白、検出した点の数を緑で示した。

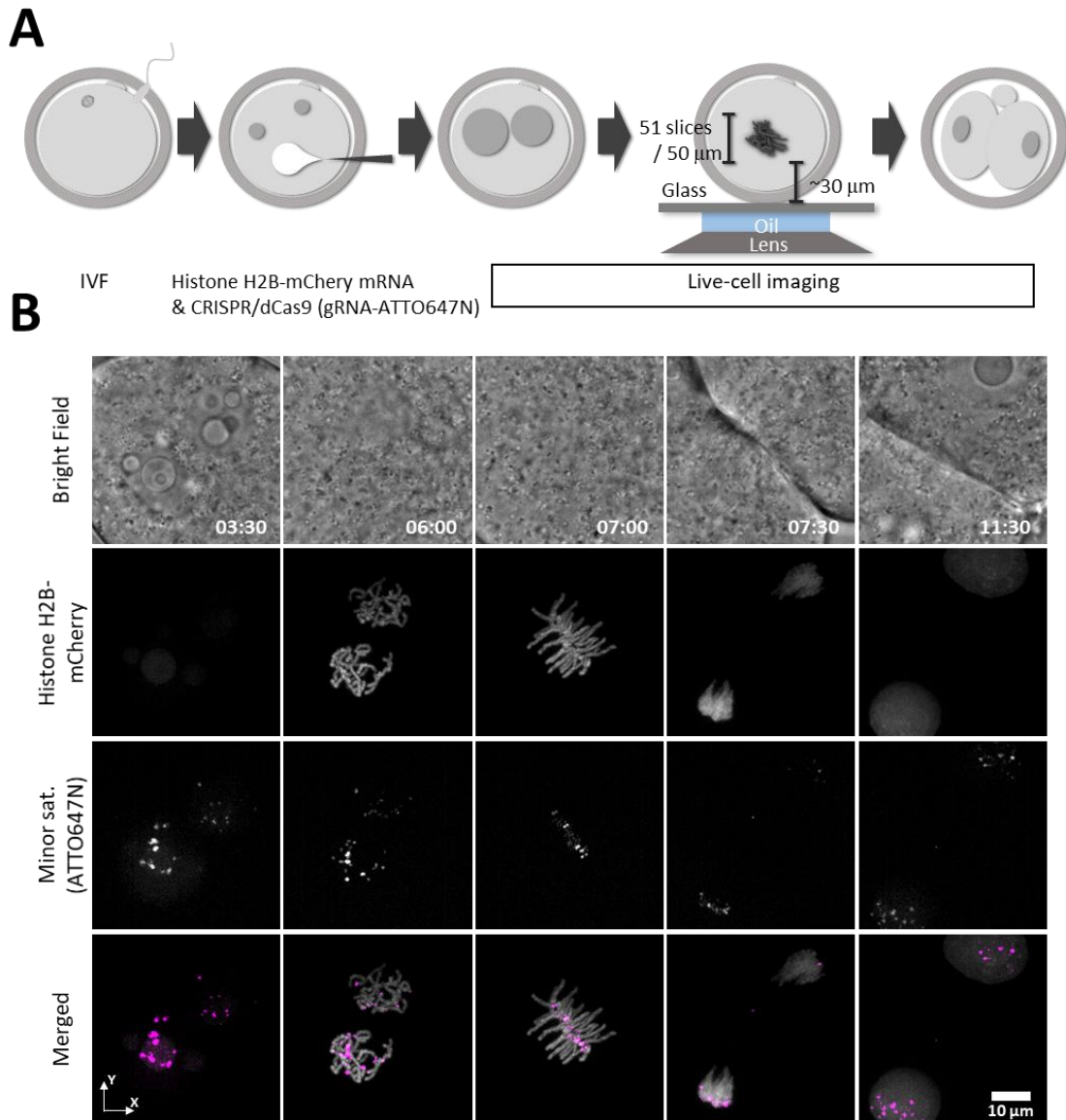


Fig. 3-12 染色体と Minor satellite の超解像ライブセルマルチカラーイメージングシステム

(A) 超解像ライブセルマルチカラーイメージングの概略図。(B) マウス受精卵の第一卵割過程における超解像ライブセルマルチカラーイメージング。上から明視野、Histone H2B-mchery の x-y 画像、Minor satellite の x-y 画像、マージ画像。

第4項 考察

本研究では産仔獲得が可能な条件で分裂期染色体のカウントに成功した。さらに、CRISPR を介した Minor satellite の生細胞イメージングにより、染色体カウントの精度が劇的に向上することを示した。

染色体カウントの畜産分野および ART への適用

得られた超解像画像データ (**Fig. 3-6A, B**) から 40 本のマウス染色体を数えることに成功した。しかし、Histone H2B-mCherry を用いた染色体カウントには隣接する染色体を同じオブジェクトと誤認識するリスクがあった (**Fig. 3-6C**)。超解像顕微鏡を使用して染色体数を数えることは以前に U2OS 細胞を使用して検討されている (**Gao et al., 2012**)。しかし、細胞の生存率や染色体の誤カウントについては議論されていない。本研究では、CRISPR を応用した Live-FISH 法と超解像システム (**Fig. 3-8**) を組み合わせることにより、測定誤差なく 40 ペアの点状のシグナルを検出することができた (**Fig. 3-9**)。

この結果は、畜産分野やヒト受精卵の染色体をマウス胚と同じようにセグメントして染色体数を測定することができれば、異常な倍数性胚を移植するリスクを減らすことができることを示唆する。核膜崩壊 (NEBD) のタイミングは胚ごとに異なるため、ライブセルイメージングはそのタイミングを簡単に見つけることに役立つ。さらに、複数の時点でカウントすることで、染色体の数の見落としや過大評価することを防止することができる。

第1節 小括

本研究では超解像顕微鏡を用いて生きたまま受精卵を長時間観察し、産仔獲得可能な条件を決めた。さらに、Histone H2B-mCherry を用いて分裂期染色体の数を数えることに成功した。一方、隣接した染色体を 1 つのオブジェクトとして認識するリスクがあった。セントロメアを可視化することでより正確な染色体数のカウントに成功した。特に、本研究で得られた画像データの解析により、SoRa システムは 2 細胞期のクロマチン密度を観察するのに十分な解像度があることが明らかになった。低侵襲な超解像観察法を確立したことで、従来のクロマチン検査法と組み合わせて画像とクロマチン情報を結びつけることが可能となった。例えば、chromosome conformation capture (3C) /Hi-C (Ke et al., 2017) とライブセルイメージングによる転写の観察 (Bertrand et al., 1998; Park et al., 2014) の組み合わせにより、胚発生に影響を与えないクロマチンダイナミクスの詳細な観察が可能になり、クロマチン研究を加速させることが期待される。

第4章 総括

第2章においてペリセントロメアへのDNAメチル化導入は発生へ影響を及ぼさなかった。ペリセントロメアではノンコーディングRNAが転写されており、受精卵においてこの領域の転写産物を阻害すると2細胞期で発生が停止する報告がされている (**Probst et al., 2010**)。しかし、ペリセントロメアが高DNAメチル化状態である体細胞においてもこの領域の転写は報告されている (**Santenard et al., 2010; Zhu et al., 2011; Kishi et al., 2012**) ため、今回のDNAメチル化導入は転写を抑制しなかったと考えられる。

セントロメアへのDNAメチル化導入は初期胚発生へ影響を及ぼした。セントロメアは細胞分裂時にキネトコア複合体を介して微小管が接着することが知られている (**Amor et al., 2010; Probst et al., 2010; Cheeseman et al., 2008**)。キネトコア形成に異常がある場合、有糸分裂に影響があることが報告されている (**Kalitsis et al., 1998; Howman et al., 2000**)。このことから、受精卵のセントロメアへDNAメチル化を導入したことによりキネトコアの形成に異常が生じた可能性が考えられる。この仮説を実証するためには、代表的なキネトコア形成タンパクとしてあげられる、セントロメア特異的なヒストンH3のCENP-A (**Amor et al., 2010; Earnshaw et al., 1985; Sullivan et al., 1994**)、CENP-Aに結合しさらに外層の因子をリクルートするCENP-C (**Amor et al., 2010; Earnshaw et al., 1985, Sugimoto et al., 1994**) やCENP-T (**Gascoigne et al., 2011; Nishino et al., 2003**)、CENP-CおよびCENP-Tに結合し微小管と接着するKNL1複合体 (**Desai et al., 2003**)、NDC80複合体 (**Wigge et al., 2001; McClelland et al., 2003**)、Mis12複合体 (**Goshima et al.,**

2003) などの局在を調べることによってキネトコア形成に異常がないか解析する必要があるだろう。

バイサルファイトシーケンスによる目的領域への DNA メチル化導入を確認したが、標的外への DNA メチル化導入の危険性が残っている。標的外の DNA メチル化解析として TALMaj-Sssl を導入した胚でレトロトランスポゾン由来のリピート配列である LINE1 および IAP の DNA メチル化レベルをバイサルファイトシーケンスにより解析したところ、TALMaj-Sssl WT の区において Mock と比較し LINE1 および IAP の DNA メチル化量に変化はみられなかった。しかし、それ以外の領域に関しても DNA メチル化量の変化が起こっていないかを確認する必要がある。全ゲノムバイサルファイトシーケンスや MeDIP-seq によって標的外の DNA メチル化レベルを調べることができるだろう。また、異なる TALE を用いたときに同じ現象が確認されるか調べることによって、今回確認された現象がオフターゲット効果によるものでないことが示唆できるだろう。

本研究によって初期胚のセントロメアの低 DNA メチル化状態は、胚発生に重要であることが示唆された。これまでセントロメアの役割はセントロメアに存在するタンパク質のノックアウトやセントロメアの DNA 配列を操作することにより、一時的に細胞周期を停止させる紡錘体形成チェックポイント (SAC) (*Minshull et al., 1994; Rudner et al., 1994*) の存在やキネトコアがセントロメア外の領域 (ネオセントロメア) に形成される現象 (*du Sart et al., 1997; Depinet et al., 1997*) などが明らかとなっている。今後、セントロメアのエピゲノム編集によって、ゲノムのエピジェネティックな状態とこれらの現象との関連が解明される

だろう。

第 3 章では超解像顕微鏡を用いて細胞数を減らさずに胚へのダメージを抑えて長期間イメージングする実験系を確立した。さらに、超解像観察したマウス受精卵の染色体の本数を数えることに成功した。

これまでに、セントロメアやキネトコアを観察することで、染色体をカウントする試みがなされているが (**Chiang and Lampson, 2013**)、生細胞における染色体数のカウントは報告されていない。特に、ヒトでは α サテライトの配列中にマウスと共通な配列 (CENP-B box) (**Masumoto et al., 1989; Masumoto et al., 1993; Kipling et al., 1995; Iwahara et al., 1998**) が存在し、ウシにおいてはセントロメアに satDNA (**Macaya et al., 1978; Modi et al., 1993; Modi et al., 1996**) と呼ばれるリピート配列が存在することが知られている。ヒトとウシにおいては gRNA をそれぞれの配列に設計することで、染色体の本数を数えることができると考えられる。以上のことから発生に影響しない超解像ライブセルイメージングシステムと Live-FISH 法の組み合わせは多くの動物種で使用できる可能性があり、今後はヒトの生殖補助医療や畜産学の分野に応用されることが期待される。

参考文献

- Adenot P G**, Mercier Y, Renard J P, & Thompson E M. 1997. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development*, 124(22), 4615-4625.
- Amor D. J**, Kalitsis P, Sumer H, Choo K. A. 2004. Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends in cell biology*, 14 (7) , 359-368.
- Anton T**, Bultman S, Leonhardt H, Markaki Y. 2014. Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system. *Nucleus* 5:163–172.
- Antonarakis SE**. 1991. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group. *New England Journal of Medicine* 324:872–876.
- Azuma T**, Kei T. 2015. Super-resolution spinning-disk confocal microscopy using optical photon reassignment. *Optics Express* 23:15003–15011.
- Bertrand E**, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM. 1998. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Molecular Cell* 2:437–445.
- Betzig E**, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313:1642–1645.
- Bird D**, Gu M. 2002. Compact two-photon fluorescence microscope based on a single-

- mode fiber coupler. *Optics letters*, 27 (12) , 1031-1033.
- Boulanger J**, Kervrann C, Bouthemy P, Elbau P, Sibarita J B, Salamero J. 2009. Patch-based nonlocal functional for denoising fluorescence microscopy image sequences. *IEEE transactions on medical imaging*, 29 (2) , 442-454.
- Chatot CL**, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 86:679–688.
- Cheeseman I. M**, Desai A. 2008. Molecular architecture of the kinetochore–microtubule interface. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9 (1) , 33-46.
- Chiang T**, Lampson MA. 2013. Counting chromosomes in intact eggs. *Methods in Molecular Biology* 957:249–253.
- Clouaire T**, Stancheva I. 2008. Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (10) , 1509-1522.
- Freeman SB**, Allen EG, Oxford-Wright CL, Tinker SW, Druschel C, Hobbs CA, O’Leary LA, Romitti PA, Royle MJ, Torfs CP, Sherman SL. 2007. The National Down Syndrome Project: design and implementation. *Public Health Reports* 122:62–72.
- Gao L**, Shao L, Higgins CD, Poulton JS, Peifer M, Davidson MW, Wu X, Goldstein B, Betzig E. 2012. Noninvasive imaging beyond the diffraction limit of 3D dynamics in thickly fluorescent specimens. *Cell* 151:1370–1385.
- Gustafsson MG**. 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using

structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy* 198:82–87.

Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Nozaki N, Kimura H. 2009. Visualizing histone modifications in living cells: spatiotemporal dynamics of H3 phosphorylation during interphase. *Journal of Cell Biology*, 187 (6) , 781-790.

Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Wakayama T, Stasevich T. J, Kainuma T, Tsurimoto T, ... & Kimura H. 2011. Tracking epigenetic histone modifications in single cells using Fab-based live endogenous modification labeling. *Nucleic acids research*, 39 (15) , 6475-6488.

Hell SW, Wichmann J. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters* 19:780–782.

Hell SW, Kroug M. 1995. Ground-state-depletion fluorescence microscopy: A concept for breaking the diffraction resolution limit. *Applied Physics B* 60:495–497.

Hens K, Dondorp W, Handyside A H, Harper J, Newson A J, Pennings G, ... & de Wert G. 2013. Dynamics and ethics of comprehensive preimplantation genetic testing: a review of the challenges. *Human Reproduction Update*, 19 (4) , 366-375.

Hess ST, Girirajan TP, Mason MD. 2006. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal* 91:4258–4272.

Howman E. V, Fowler K. J, Newson A. J, Redward S, MacDonald A C, Kalitsis P, Choo K. A. 2000. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (3) ,

1148-1153.

Huff J. 2015. The Airyscan detector from ZEISS: confocal imaging with improved signal-to-noise ratio and super-resolution. *Nature Methods* 12: i–ii.

Iwahara J, Kigawa T, Kitagawa K, Masumoto H, Okazaki T, Yokoyama S. 1998. A 573 helix–turn–helix structure unit in human centromere protein B (CENP-B). *The EMBO journal*, 17(3), 827-837.

Kalitsis P, Fowler K. J, Earle E, Hill J, Choo K. A. 1998. Targeted disruption of mouse centromere protein C gene leads to mitotic disarray and early embryo death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (3) , 1136-1141.

Ke Y, Xu Y, Chen X, Feng S, Liu Z, Sun Y, Yao X, Li F, Zhu W, Gao L, Chen H, Du Z, Xie W, Xu X, Huang X, Jiang L. 2017. 3D chromatin structures of mature gametes and structural reprogramming during mammalian embryogenesis. *Cell* 170:367–381.

Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Goto Y, Takizawa N, Nozaki N. 2008. The organization of histone H3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell structure and function*, 33 (1) , 61-73.

Kipling D, Mitchell A. R, Masumoto H, Wilson H. E, Nicol L, Cooke H. J. 1995. CENP-B binds a novel centromeric sequence in the Asian mouse *Mus caroli*. *Molecular and cellular biology*, 15(8), 4009-4020.

Kishi Y, Kondo S, Gotoh Y. 2012. Transcriptional activation of mouse major satellite regions during neuronal differentiation. *Cell structure and function*, 37 (2) , 101-110.

Kumaki Y, Oda M, Okano M. 2008. QUMA: quantification tool for methylation

- analysis. *Nucleic acids research*, 36 (suppl_2) , W170-W175.
- Legland D**, Arganda-Carreras I, Andrey P. 2016. MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics* 32:3532–3534.
- Lehnertz B**, Ueda Y, Derijck A. A, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, ... & Peters A. H. 2003. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Current Biology*, 13 (14) , 1192-1200.
- Lejeune J**, Gauthier M, Turpin R. 1959. [Human chromosomes in tissue culture]. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 248:602–603.
- Liu, Q**, Guntuku S, Cui X. S, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, ... & Elledge S. J. 2000. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes & development*, 14 (12) , 1448-1459.
- Jirmanova L**, Bulavin D. V, Fornace Jr A. J. 2005. Inhibition of the ATR/Chk1 pathway induces a p38-dependent s-phase delay in mouse ES cells. *Cell Cycle*, 4 (10) , 1428-1434.
- Macaya G**, Cortadas J, Bernardi G. 1978. An analysis of the bovine genome by density-gradient centrifugation. Preparation of the dG+dC-rich DNA components. *European Journal of Biochemistry* 84:179–188.
- Magli MC**, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Dorman I, Trounson AO. 2000. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Human Reproduction* 15:1781–1786.

- Mantikou E**, Wong KM, Repping S, Mastenbroek S. 2012. Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos. *Biochimica Biophysica Acta* 1822:1921–1930.
- Mashiko D**, Ikeda Z, Yao T, Tokoro M, Fukunaga N, Asada Y, Yamagata K. 2020. Chromosome segregation error during early cleavage in mouse pre-implantation embryo does not necessarily cause developmental failure after blastocyst stage. *Scientific Reports* 10:854.
- Mastenbroek S**, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NEA, Arts EGJM, de Vries JWA, Bossuyt PM, Buys CHCM, Henieman MJ, Repping S, van der Veen F. 2007. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *New England Journal of Medicine* 357:9–17.
- Masumoto H**, Masukata H, Muro Y, Nozaki N, Okazaki T. 1989. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *The Journal of cell biology*, 109(5), 1963-1973.
- Masumoto H**, Yoda K, Ikeno M, Kitagawa K, Muro Y, Okazaki, T. 1993. Properties of CENP-B and its target sequence in a satellite DNA. In *Chromosome segregation and aneuploidy* (pp. 31-43). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Miyanari Y**, Ziegler-Birling C, Torres-Padilla ME. 2013. Live visualization of chromatin dynamics with fluorescent TALEs. *Nature Structural & Molecular Biology* 20:1321–1324.
- Modi WS**, Gallagher DS, Womack JE. 1993. Molecular organization and chromosomal

- localization of six highly repeated DNA families in the bovine genome. *Animal Biotechnology* 4:143–161.
- Modi WS**, Gallagher DS, Womack JE. 1996. Evolutionary histories of highly repeated DNA families among the Artiodactyla (Mammalia). *Journal of Molecular Evolution* 42:337–349.
- Myers K**, Gagou M. E, Zuazua-Villar P, Rodriguez R, Meuth M. 2009. ATR and Chk1 suppress a caspase-3–dependent apoptotic response following DNA replication stress. *PLoS genetics*, 5 (1) , e1000324.
- Otsu N**, 1979. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. in *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9:62–66.
- Park HY**, Lim H, Yoon YJ, Follenzi A, Nwokafor C, Lopez-Jones M, Meng X, Singer RH. 2014. Visualization of dynamics of single endogenous mRNA labeled in live mouse. *Science* 343:422–424.
- Probst A. V**, Dunleavy E, Almouzni G. 2009. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10 (3) , 192-206.
- Probst A. V**, Okamoto I, Casanova M, El Marjou F, Le Baccon P, Almouzni G. 2010. A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Developmental cell*, 19 (4) , 625-638.
- Rakyan V. K**, Down T. A, Thorne N. P, Flicek P, Kulesha E, Gräf S, ... & Beck S. 2008. An integrated resource for genome-wide identification and analysis of human tissue-

- specific differentially methylated regions (tDMRs) . *Genome research*, 18 (9) , 1518-1529.
- Reik W**, Dean W, Walter J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293 (5532) , 1089-1093.
- Reik W**. 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 447 (7143) , 425-432.
- Rubio C**, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Buendía P, Pehlivan T, Vitoria T, De los Santos, MJ, Simón C, Remohí J, Pellicer A. 2007. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenatal Diagnosis* 27:748–756.
- Rust MJ**, Bates M, Zhuang X. 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) . *Nature Methods* 3:793–795.
- Sage D**, Donati L, Soulez F, Fortun D, Schmit G, Seitz A, Guet R, Vonesch C, Unser M. 2017. DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods* 115:28–41.
- Sandalinas M**, Sadowy S, Akikani M, Calderon G, Cohen Munné S. 2001. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Human Reproduction* 16:1954–1958.
- Santenard A**, Ziegler-Birling C, Koch M, Tora L, Bannister A. J, Torres-Padilla M. E. 2010. Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3. 3. *Nature cell biology*, 12 (9) , 853-862.
- Schindelin J**, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietsch T, Preibisch S,

- Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9:676–82.
- Seki Y**, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, Saitou M, Matsui Y. 2005. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Developmental biology*, 278 (2) , 440-458.
- Sidi S**, Sanda T, Kennedy R. D, Hagen A. T, Jette C. A, Hoffmans R, ... & Look A. T. 2008. Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2, and caspase-3. *Cell*, 133 (5) , 864-877.
- Squirrell JM**, Wokosin DL, White JG, Bavister BD. 1999. Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability. *Nature Biotechnology* 17:763–767.
- Toyoda Y**, Yokoyama M, Hoshi T. 1971. Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. *Japanese Journal of Animal Reproduction* 16, 147–151.
- Tsumura A**, Hayakawa T, Kumaki Y, Takebayashi S. I, Sakaue M, Matsuoka C, ... & Okano M. 2006. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes to Cells*, 11 (7) , 805-814.
- Ueda J**, Maehara K, Mashiko D, Ichinose T, Yao T, Hori M, ... & Yamagata K. 2014. Heterochromatin dynamics during the differentiation process revealed by the DNA

- methylation reporter mouse, MethylRO. *Stem Cell Reports*, 2 (6) , 910-924.
- van der Heijden G W**, Dieker J W, Derijck A A, Muller S, Berden J H, Braat D D, ... & de Boer P. 2005. Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mechanisms of development*, 122(9), 1008-1022.
- Wan Y**, Otsuna H, Chien CB, Hansen C. 2012. FluoRender: an application of 2D image space methods for 3D and 4D confocal microscopy data visualization in neurobiology research. In *2012 IEEE Pacific Visualization Symposium* (pp. 201–208) . IEEE, New York.
- Wang H**, Nakamura M, Abbott TR, Zhao D, Luo K, Yu C, Nguyen CM, Lo A, Daley TP, La Russa M, Liu Y, Qi LS. 2019. CRISPR-mediated live imaging of genome editing and transcription. *Science* 365.6459:1301–1305.
- Willard HF**. 1985. Chromosome-specific organization of human alpha satellite DNA. *American Journal of Human Genetics* 37:524–532
- Wu S. C**, Zhang Y. 2010. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11 (9) , 607-620.
- Yamagata K**, Yamazaki T, Miki H, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Baba T. 2007. Centromeric DNA hypomethylation as an epigenetic signature discriminates between germ and somatic cell lineages. *Developmental biology*, 312 (1) , 419-426.
- Yamagata K**, Suetsugu R, Wakayama T. 2009a. Long-term, six-dimensional live-cell imaging for the mouse preimplantation embryo that does not affect full-term

development. *Journal of Reproduction and Development* 55:343–350.

Yamagata K, Suetsugu R, & Wakayama T. 2009b. Assessment of chromosomal integrity using a novel live-cell imaging technique in mouse embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction*, 24 (10) , 2490-2499.

Yamagata K, Yamazaki T, Yamashita M, Hara Y, Ogonuki N, Ogura A. 2005. Noninvasive visualization of molecular events in the mammalian zygote. *Genesis* 43:71–79.

Yamagata K, Nagai K, Miyamoto H, Anzai M, Kato H, Miyamoto K, ... & Iritani A. 2019. Signs of biological activities of 28,000-year-old mammoth nuclei in mouse oocytes visualized by live-cell imaging. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.

Yamaji M, Ueda J, Hayashi K, Ohta H, Yabuta Y, Kurimoto K, ... & Saitou M. 2013. PRDM14 ensures naive pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell stem cell*, 12 (3) , 368-382.

Yamazaki T, Hatano Y, Handa T, Kato S, Hoida K, Yamamura R, ... & Yamagata K. 2017. Targeted DNA methylation in pericentromeres with genome editing-based artificial DNA methyltransferase. *PLoS One*, 12 (5) , e0177764.

Yamazaki T, Hatano Y, Taniguchi R, Kobayashi N, Yamagata K. 2020. Editing DNA methylation in mammalian embryos. *International journal of molecular sciences*, 21 (2) , 637.

Yao T, Suzuki R, Furuta N, Suzuki Y, Kabe K, Tokoro M, Sugawara A, Yajima A, Nagasawa T, Matoba S, Yamagata K, Sugimura S. 2018. Live-cell imaging of nuclear–chromosomal dynamics in bovine in vitro fertilised embryos. *Scientific Reports*

8:7460.

Zhu Q, Pao G. M, Huynh A. M, Suh H, Tonnu N, Nederlof P. M, ... & Verma I. M. 2011.

BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature*, 477 (7363) , 179-184.

Zielinska AP, Bellou E, Sharma N, Frombach AS, Seres KB, Gruhn JR, Blayner M, Eckel H,

Moltrecht r, Elder K, Hoffman ER, Schuh M. 2019. Meiotic kinetochores fragment into multiple lobes upon cohesin loss in aging eggs. *Current Biology* 29:3749–3765.e7.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始丁寧なご指導と適切なお教示をいただきました、近畿大学生物理工学部教授、山縣一夫博士に深く感謝申し上げます。

終始適切なお助言、ご討論を賜りました、北里大学メディカルセンター研究部門、山崎大賀博士、扶桑薬品工業株式会社研究開発センター、八尾竜馬様、医療法人浅田レディースクリニック浅田生殖医療研究所、野老美紀子博士、近畿大学生物理工学部研究員、増子大輔博士に深く感謝致します。

本論文を審査していただきました、近畿大学生物理工学部教授、三谷匡博士、大和勝幸博士に深く感謝致します。

本研究を通して、多大なるご支援及びご指導を頂きました、発生遺伝子工学研究室事務員、和田友里様、井出友美様、山崎緩奈様、発生遺伝子工学研究室の学生の皆様に心より深く感謝致します。

最後に、長期の学生生活に経済面、精神面から支えてくださった家族に深く感謝申し上げます。