

Title	Viable Offspring after Imaging of Ca ²⁺ Oscillations and Visualization of the Cortical Reaction in Mouse Eggs.
Author(s)	野澤, 香織
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61618
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	野澤 香織
論文題名 Title	Viab! Offspring after Imaging of Ca ²⁺ Oscillations and Visualization of the Cortical Reaction in Mouse Eggs. (マウス受精卵におけるCa ²⁺ オシレーションの低侵襲性イメージング解析系の構築および受精表層反応の可視化と解析)
論文内容の要旨	
<p>〔目 的〕</p> <p>ヒトやマウスを含む多くの哺乳類において、排卵直後の卵子は第二減数分裂の中期で停止しており、受精時に持ち込まれる精子由来の活性化因子によって細胞周期が再開し胚発生が開始しなければ産仔を得ることができない。この細胞周期の再開は、卵活性化と呼ばれ、命の誕生への重要な第一歩を担っている。これまで、受精直後のマウス卵内において、卵活性化時の細胞周期の再開や表層顆粒の分泌（表層反応）は、Ca²⁺濃度の急激な上昇（Ca²⁺スパイク）を繰り返すCa²⁺オシレーションによって誘導されることが知られている。さらに、Ca²⁺オシレーションに異常があると、前述のイベントのみならず、その後の胚発生にも影響を及ぼすことが示唆されてきた。また、ヒト不妊患者においても、Ca²⁺オシレーションにおけるCa²⁺スパイクの回数と受精の効率との相関性が報告されている。しかし、これまで同一胚で長期にわたり安定してCa²⁺濃度の変化とその後の胚発生の観察を続けた報告はなく、胚発生に必要なCa²⁺濃度変化の正確な量や頻度は明らかでない。そこで、我々はCa²⁺観察後も胚発生を損なうことなく発生率を評価できる低侵襲性イメージング系および表層反応を可視化できる実験系の構築を目指した。</p> <p>〔方法ならびに成績〕</p> <p>新規のGECI (genetically encoded calcium indicator) である蛋白質性の蛍光Ca²⁺指示薬GECOs (genetically encoded Ca²⁺ indicators for optical imaging) とスピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いる低侵襲性観察システムにより、Ca²⁺オシレーションの質的・量的な変化をライブイメージングし、さらに観察後に発生率を比較できる実験系の構築を試みた。その結果、紫外光で励起するGEM-GECOに加え、それぞれ488nm、561nmの波長で励起するG-GECOおよびR-GECOを用いた観察系において、受精直後のCa²⁺濃度変化を観察することに成功した。また、紫外光に比べより長波長で励起するG-GECOおよびR-GECOを用いて観察した胚は、Ca²⁺濃度を観察しなかった受精卵（対照群）とほぼ変わらない割合で胚盤胞まで発生した（胚盤胞発生率；G-GECO:61.8%、R-GECO:70.0%、対照群:75.0%）。さらにCa²⁺オシレーションを観察した後の2細胞期胚を移植し、産仔を得ることに成功した（産仔率；G-GECO:53.3%、R-GECO:52.0%、対照群:48.7%）。</p> <p>また、表層顆粒成分と結合するレクチンを蛍光標識したLCA-FITC (Lectin from Lens culinaris) を外液に添加することでCa²⁺と同時に表層反応を定量観察する系を構築することができた。その結果、Ca²⁺オシレーションにおけるCa²⁺スパイクに呼応して、段階的に表層反応が起こること、および初めの2~3回のCa²⁺スパイクが、表層反応の完了、およびその下流の現象である透明帯の硬化に十分であることを初めて明らかにした。</p> <p>〔総 括〕</p> <p>本研究で、受精卵のCa²⁺オシレーションとその後の胚発生を低侵襲性に観察し、比較する系を初めて構築できた。また、表層反応を可視化したことでCa²⁺オシレーションとの量的関係性を初めて明らかにした。今後、本手法をこれらの事象と胚の質との相関を詳細に解析する有用な手段として活用したい。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 野澤 香織	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 野澤 香織
	副 査 大阪大学教授 目加田 英輔
	副 査 大阪大学教授 竹田 潤二
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、マウスの卵活性化時における低侵襲性カルシウムイメージングシステムの構築を目指し、さらにCa²⁺濃度変化とその下流の事象との時空間的関連について解析を試みたものである。</p> <p>一、GECO (genetically encoded Ca²⁺ indicators for optical imaging) およびスピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いることで、胚の発生および産仔に影響を与えない受精卵の低侵襲性Ca²⁺イメージングに成功した。</p> <p>二、R-GECOおよび表層顆粒と結合するLCA-FITCを用いて、Ca²⁺濃度変化と表層反応を同時にイメージングすることに成功した。これにより、Ca²⁺スパイクに呼応して段階的に表層反応が起こること、また、表層反応およびそれに続く卵周囲の透明帯の硬化には、2～3回のCa²⁺スパイクで十分であることを初めて示した。</p> <p>以上、本論文は、胚発生に影響を与えない受精卵Ca²⁺イメージングシステムを初めて構築し、またCa²⁺濃度変化と表層反応を同時に可視化することで、両者の関係を定量的に示したものであり、博士(医学)の学位授与に値するものと認める。</p>	