

ラマン分光法を用いたマウス受精卵発生過程モニタリングと卵質評価

関西学院大学 ○石垣 美歌, 橋本 剛佑, 尾崎 幸洋, 佐藤 英俊

In vivo monitoring of development of mouse embryo and its quality evaluation by Raman spectroscopy

Kwansei Gakuin University, ○Mika Ishigaki, Kosuke Hashimoto, Yukihiro Ozaki, Hidetoshi Sato

受精卵は分化全能性を持っているが、全てが生存可能なわけではなく、その生存可能性は受精卵の質に依ると言われている。そして養殖業や不妊治療など、受精卵が主体となる分野において、しばしばこの“受精卵の質”が重要な鍵となり、近年卵質に関する研究や受精卵の分子発生メカニズムに関する研究が盛んに行われている。

例えば現在、卵質は卵割の速度と形態によって卵質が評価されている。受精卵培養液から受精卵の代謝活性を間接的に評価する試みも多くなされているが、より直接的に受精卵の代謝活性を評価することができれば、より確実な情報を基に卵質を評価できると考えられる。

そこで、生体分析に適した分析技術であるラマン分光法を応用し、分子レベルでの構造の違いに基づいた分化発生メカニズムの分析や卵質評価の新たな判別手法構築に向けた基礎研究を行っている。マウス初期胚からラマンスペクトルを取得し、発生過程に伴う分子組成の変化や、受精卵の形態学的特徴と分子組成的特徴の関係について分析を行った。

まず受精卵発生過程のモニタリングでは、ICR 系統マウスの未受精卵・前核期・2細胞期・4細胞期・8細胞期の卵からラマンスペクトルを取得した。測定にはCO₂イ

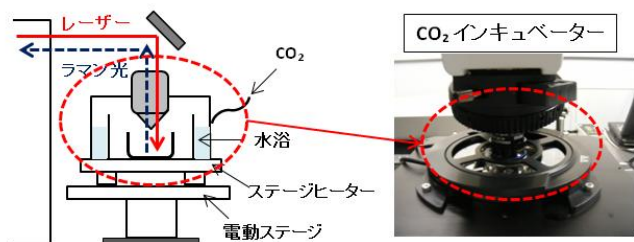


図1：顕微ラマンシステム

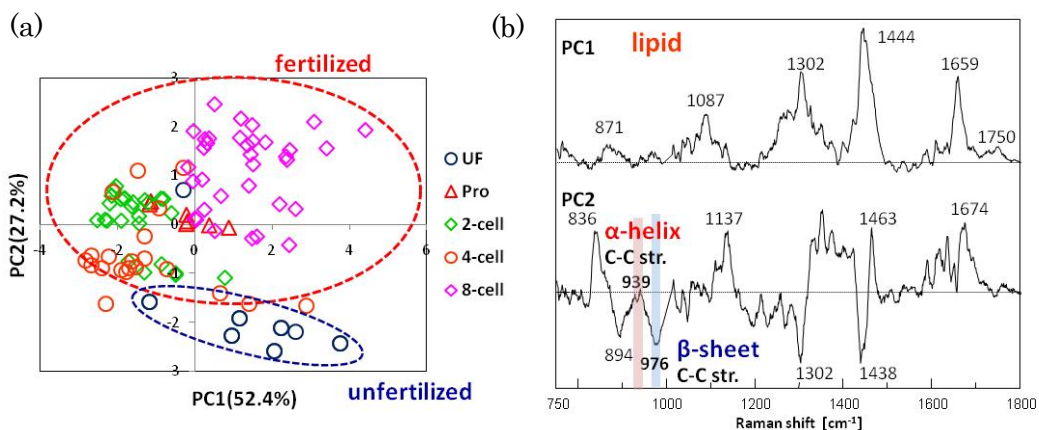


図2：主成分分析 (PCA) の解析結果。(a) スコアプロット, (b) ローディングプロット。

ンキュベータ搭載の顕微ラマンシステム(Nanofinder, 東京インスツルメンツ)を用い、温度 37°C, CO₂ 5% に設定してラマン測定を行った (図 1)。主成分分析(PCA) の結果、発生に伴ってタンパク質に対する脂質成分の相対濃度が周期的に変化し、受精の前後でタンパク質の 2 次構造に変化があることが示唆された(図 2)。

タンパク質の構造変化について詳細な解析を行うため、920-990 cm⁻¹ のスペクトルの 2 次微分を計算し、 α ヘリックスと β シートからくるラマンバンドへの分解とピーク位置の特定を行った (図 3 a)。その結果、受精後 β シートのバンド強度が小さくなり、一方 α ヘリックスのバンド強度が強くなっていることが分かった。つまり、受精卵の発生に伴って α ヘリックス 2 次構造の割合が多くなっていることが示唆された (図 3b)。

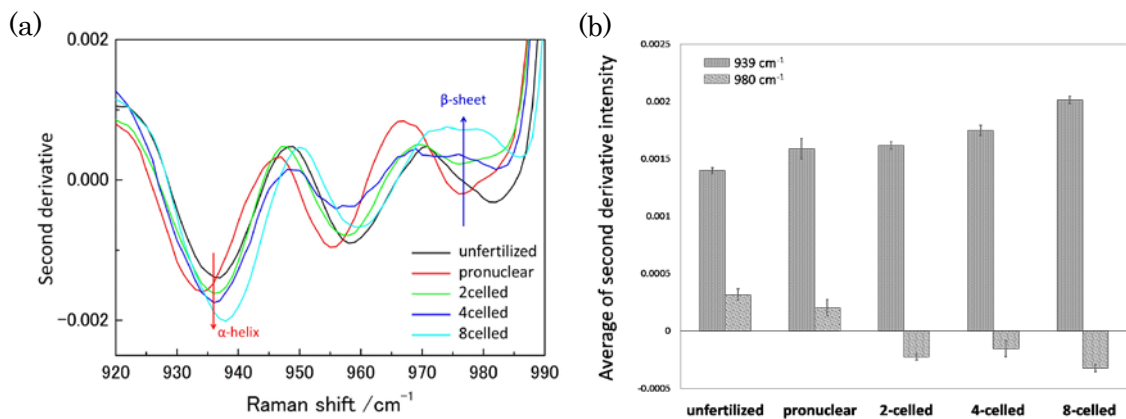


図 3 : (a) 2 次微分スペクトル, (b) 939, 980 cm⁻¹ の 2 次微分バンド強度の絶対値。

さらに、チロシンダブレットの強度比 (855/830 cm⁻¹) を各卵割段階で計算したところ、OH 基が初め強い水素結合をしていたものが、受精後一旦イオン状態を経由し、再び強い水素結合をしていることを示唆する結果が得られた。タンパク質の 2 次構造変化の結果と総合的に判断すると、受精後に開始された生命活動によりタンパク質が生成され、 α ヘリックス構造を持つタンパク質の割合が増加していったと考えられる。

また、形態学的に良質胚・不良胚と判断される卵の成分の違いを分析するため、主成分分析(PCA)を行った。その結果、両者は脂質のバンドをからなる主成分 1(PC 1)によって分けられることが分かり、不良胚で脂質の成分が、良質胚に比べて多くなっていることを示す結果も得られた(図 4, 図 5)。ラマン分光法の卵質評価への応用が期待される。

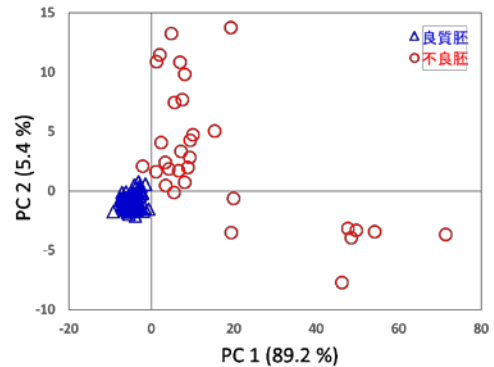


図 4: 良質胚・不良胚に対する PCA スコアプロットの結果。

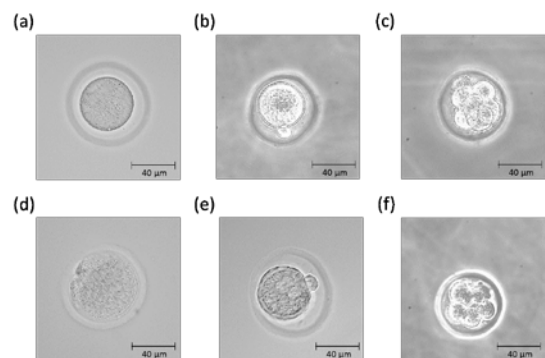


図 5 (a-c) 未受精卵・前核期・8細胞期の良質胚と (d-f) 不良胚の一例。