HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ウシ胚盤胞期胚の内部細胞塊および栄養外胚葉への二極化に伴う細胞分化機構に関する研究［全文の要約］
Author(s)	長友, 啓明
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11164号
Issue Date	2013-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/54655
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroaki_Nagatomo_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文の要約

博士の専攻分野の名称： 博　士（農学）　　氏名　　長友　啓明

ウシ胚盤胞期胚の内部細胞塊および栄養外胚葉への二極化に伴う細胞分化機構に関する研究

哺乳類の個体発生は，精子および卵子の配偶子の接合による 2 倍体の構築を経て，たった 1 個の細胞が有糸分裂を繰り返し何十兆個もの細胞からなる複雑かつ組織だった生命体に発達する全過程である．発生を経るにしたがって細胞は特定の機能と構造をもつように分化していく．胚盤胞期胚では個体発生史上最初の細胞の分化がみられ，その後の個体発生の起点となる発生生物学的に極めて重要な時期である．哺乳類の胚盤胞期胚における内部細胞塊 (ICM)と栄養外胚葉 (TE)への分化は哺乳類初期胚発生で共通の現象であるにも関わらず，その発生過程に関わる遺伝子は種を超えて普遍的なものではないということが最近の研究で徐々に明らかとなってきている．しかし，ウシでは，胚発生に関与する遺伝子の特定やその発現動態の解明が十分になされておらず，実験動物マウスにおける知見を素地に研究が展開されているのが現状であり，ウシ胚での ICM/TE 二極化制御機構はほとんど理解されていない．そこで本研究では，ウシ胚盤胞期胚の分化制御機構を理解するため，とくに胚盤胞期胚における遺伝子発現パターンを部位別に精査することで ICM および TE において高発現を示す遺伝子を決定し，さらに，検出された遺伝子の機能を探った．

(1) ウシ胚盤胞期胚の ICM および TE の二極化に伴う体内由来，体外由来および体細胞クローン胚
の遺伝子発現比較

受精卵の置かれた環境が，その後の発生や生まれてきた個体の健康に大きく影響を与える．そこで，胚盤胞期胚において，体内由来胚(Vivo)胚，体外由来胚(Vitro)胚，体細胞クローン胚(SCNT 胚)の 3 種の胚を用いて，マイクロマニピュレーションにより胚を機械的に分断し部位毎の網羅的な遺伝子発現パターンをマイクロアレイ解析によって比較し，ICM/TE 二極化という観点から由来ごとの差異を調査した．部位毎の発現パターンの差異を比較すると，Vivo 胚と Vitro 胚では類似したパターンを示すが，SCNT 胚では他の受精胚とは大きく異なった特異な遺伝子発現パターンを示した．この結果から，ICM/TE 二極化という観点では Vivo 胚と Vitro 胚は類似した発生プログラムで分化が制御されているが，SCNT 胚では遺伝子発現に異常をきたしていることが初めて明らかとなった．さらに，Vivo 胚は生体の置かれた環境に大きく依存して胚の遺伝子発現パターンが変動するものの，Vitro 胚ではサンプル間誤差の少ない斉一性のあるデータを示した．以上の結果より，ウシ胚盤胞期にお

ける遺伝子発現解析のためのサンプル作製条件としては，体外受精を介して作製する Vitro 胚が最も適していると考えられた．

(2) ウシ胚盤胞期胚における部位特異的発現を示す遺伝子の探索

前項(1)におけるマイクロマニピュレーションによる機械的な分断操作で作製した細胞サンプルの解析では ICM に接している TE 由来細胞を除去できないという問題があった．そこで本稿では，Vitro 胚を用い，界面活性剤により TE 由来細胞の除去を徹底した ICM 細胞のみからなる細胞サンプルの調整を試み, ICM と TE を対象としたマイクロアレイ解析を実施した．さらに，ICM/TE 細胞サンプル間で発現差がみられた遺伝子を探索し，Whole mount in situ hybridization と定量 PCR により部位特異的発現の検証を徹底した．界面活性剤を用い ICM 細胞の単離を試し，TE 細胞の混入が無い ICM 細胞のみからなる細胞サンプルの調整が可能であることを TE 特異的に発現する既知転写因子 CDX2 の免疫染色法を用いて証明した．解析の結果，胚盤胞期胚における ICM および TE において高発現を示す遺伝子を 30 個決定し，このうち部位特異的発現を示す遺伝子として 21 個を本研究で初めて同定した．このなかで *ID2*，*NASP*，*IFITM1*，*FGF2* の発現パターンはマウス胚とは異なる挙動を示すことが明らかになった．

(3) ウシ初期胚発生における RNA 干渉による ICM 特異的発現を示す遺伝子の機能解析

前項(2)で決定した遺伝子のうち，ICM で高発現を示した 2 遺伝子について着目し，shRNA による発現抑制法によってウシ初期胚発生における役割を調べ，マウス胚において報告されている知見と比較した．2 種の遺伝子のうち一方は，分子シャペロンであり細胞分裂に関わる機能を持つことがマウス胚の研究で明らかになっている．もう一方の遺伝子は，転写アクチベーターの機能が報告されているものの，マウスを含め哺乳類初期胚発生における役割は全くわかっていない．前者の遺伝子のノックダウン(KD)胚では，胚盤胞期形成率はコントロールと比べて有意な低下がみられた($p<0.05$)．さらに，透明帯からの脱出率がコントロールに比べて有意に減少していた($p<0.05$)．また，二重染色により，細胞数が減少していたため，ウシにおいてもこの遺伝子は ICM の細胞増殖に重要な役割を果たすことが示唆された．さらに，ICM 付近の細胞核において，TUNEL 染色陽性のアポトーシスとみられるものが観察された．一方，後者の遺伝子の KD 胚では胚盤胞形成率が前者の遺伝子の転写抑制の場合よりも顕著に減少した($p<0.05$)．このことから，ウシ胚盤胞期胚における ICM/TE の二極化に深く関わっていることが推測された．以上の結果から，本研究で明らかにしたウシ胚盤胞期胚部位特異的発現を示す遺伝子群の中には，ICM/TE の二極化に伴う細胞の分化および増殖に重要な役割を果たす遺伝子が含まれていることが明らかとなった．本研究で未決定の遺伝子群についても機能解析を行っていくことで，ウシ胚固有の分化制御機構の理解を深め，反芻類家畜受精卵の新しい培養系の開発に寄与することが期待される．