



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ウシ胚盤胞期胚から単離した内部細胞塊の栄養外胚葉再生誘導系を用いた細胞分化モデルの証明
Author(s)	郡, 七海
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13926号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13926
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94552
Type	doctoral thesis
File Information	Nanami_kori.pdf



ウシ胚盤胞期胚から単離した内部細胞塊の
栄養外胚葉再生誘導系を用いた細胞分化モデルの証明

北海道大学 大学院農学院

生物資源科学専攻 博士後期課程

郡 七海

目次

第一章 序論.....	1
第二章 ウシ ICM 単離に伴う Hippo シグナル構成因子の発現動態の解析	
緒言.....	5
材料および方法.....	7
結果.....	17
考察.....	21
第三章 RHO-ROCK シグナルがウシ胚盤胞期胚の分化に与える影響	
緒言.....	32
材料および方法.....	34
結果.....	37
考察.....	40
第四章 ウシ単離 ICM に由来する腔再形成胚における網羅的遺伝子発現解析	
緒言.....	56
材料および方法.....	58
結果.....	60
考察.....	62

第五章 単離 ICM に由来するマウスおよびウシ腔再形成胚における個体発生能
の検証

緒言.....74

材料および方法.....76

結果.....83

考察.....88

第六章 総括.....112

謝辞.....117

参考文献.....119

付図.....129

付表.....130

第一章：序論

ウシの遺伝的改良および胚移植技術

ウシの遺伝的改良において、受精卵移植は極めて重要な繁殖技術である。これまでの研究技術の発展により、食肉検査場由来の卵巢から採取して卵母細胞を用いる体外受精により体内受精卵と比べ多くの胚生産が可能となったが、受精卵移植後の体内受精卵の受胎率は約 50% であるのに対して体外受精卵では約 40% と低率である（平成 27 年度 牛受精卵移植実施状況 農林水産省）。こうした背景から、高受胎性を有した体外受精卵の作出技術の開発が望まれており、それに寄与するためのウシ初期胚発生メカニズムを詳しく知る必要がある。

哺乳類の初期胚発生

哺乳類の初期胚発生は精子と卵子が融合した 1 つの細胞からなる受精卵から始まり、卵割を繰り返して進んでいく。そして、受精卵が個体発生を完了させるためには、体の各部位を形成するために各々の細胞が異なる特徴を獲得および維持する必要があり、この特徴を獲得する過程を分化と呼ぶ。哺乳類初期胚発生における最初の分化は、胚盤胞期という発生ステージで起こることが知られている。胚盤胞期胚は、胚内の腔所である胞胚腔が認められ、将来胎子を形成する内部細胞塊 (inner cell mass; ICM) および将来胎盤を形成する栄養外胚葉 (trophectoderm; TE) に分化する [1, 2]。ウシにおける胚盤胞期胚は受精卵移植に供される重要な発生ステージであることから、分化機構の解明が特に望まれる。哺乳動物胚における ICM および TE への分化がどのように制御されているかについては古くより議論がなされており、その中で「内外モデル」という仮説が提唱された [3]。卵割を繰り返した初期胚の割球がある一定数に達すると、胚における三次元的な立体構造が構築され、内側および外側といった各割球間の位

置関係の違いが認められるようになる。すなわち、内側に位置する割球は他の割球に取り囲まれているが、外側に位置する割球は割球表面のうち胚外環境と接している部位が認められる。内外モデルでは、内側に位置する割球が ICM に、外側に位置する割球が TE にそれぞれ分化すると説明されている。

内外モデルの検証

内外モデルを証明するためのひとつの方法として、割球の位置関係の人為的な改変が分化の方向性に及ぼす影響の検証が挙げられる。具体的には、胚盤胞期胚における ICM の単離、その後の継続培養による TE 再形成を観察する実験系である [4–6]。もし、ICM および TE への分化が胚における位置関係により制御されているならば、胚盤胞期胚における ICM は胞胚腔形成前において内側に位置していたと予想される。ここで、胚盤胞期胚から ICM を単離することで、胞胚腔もしくは TE に接していた ICM の割球が胚外環境に接することになり、相対位置を内側から外側へと変化させることができる。外側に再配置された割球が ICM から TE への変換を示すのであれば、内外モデルを実験的に補強することができる。ICM から TE への変換が可能であるかどうかは、マウス胚盤胞期胚における ICM の単離を用いて古くより検証がなされてきた [4–6]。これまでに形態学的観点から行われた数多くの研究により、単離後の ICM (単離 ICM) を培養すると TE 形成を示唆する胞胚腔の再形成が起こることが知られている [4–6]。近年、胚盤胞期胚において、TE 特異的なマーカータンパク質として知られる CDX2 が、TE 特異的な遺伝子発現パターンを誘導することが明らかになった [7]。また最近では、マウスにおける単離および培養された ICM は CDX2 を再発現することが判明した [8]。以上のことから、内外モデルを検証する方法として ICM の単離は妥当であるといえる。

マウスおよびウシにおける ICM および TE 分化制御機構の違い

マウス胚盤胞期胚において、OCT4 は ICM 特異的な遺伝子発現パターンを誘導するマスター制御因子であり、TE においては CDX2 によりその発現が抑制されている [9]。しかしながら、ウシ胚盤胞期胚において OCT4 は TE および ICM の両方で同程度の発現を示すことが知られており、マウス胚とは異なる機構で TE 分化が制御されている [10]。マウスと比較してウシ *OCT4* 遺伝子の制御領域は、CDX2 が *OCT4* の発現を抑制するための CR4 領域を有しておらず、これがマウスとの TE 分化機構の違いにつながっていると考えられている。このように、ウシとマウスで遺伝子の発現様式が異なっており、マウスで得られた知見をそのままウシに適用することはできないため、家畜であるウシの初期胚発生を調べるためにはウシ初期胚を用いる必要がある。

郡 (修士論文、2015) は、マウス胚盤胞期の実験を模してウシ胚盤胞期胚由来の単離 ICM を培養する実験を行った。その結果、培養された単離 ICM は胞胚腔を再形成し (腔再形成胚)、CDX2 陽性細胞が再出現することを明らかにした。ウシ単離 ICM から作出した腔再形成胚は CDX2 を発現していたことから、人為的な割球の位置関係の再配置が ICM および TE への分化に影響している可能性が示された。

本研究の目的

郡 (2015) の研究では、腔再形成胚における CDX2 の発現がどのような分子적メカニズムにより制御されているかについては明らかにされておらず、通常の初期胚発生と同様のメカニズムが腔再形成胚形成過程でも関与しているかどうかを検討する必要がある。さらに、通常の初期胚発生において出現する ICM および TE 細胞はそれぞれ胎子形成能および胎盤形成能を備えており、全体として

個体発生を全うすることができる。つまり、内外モデルの妥当性を完全に示すためには、腔再形成胚が個体発生を完了することの確認が不可欠である。内外モデルを証明するに当たって以上の課題を解決するために、本研究では腔再形成胚における TE への分化関連因子の発現動態、および個体発生能の検討を行うことを目的とした。まず第二章では、ウシ腔再形成胚において通常の初期胚発生と同様の CDX2 発現制御メカニズムが働いているかどうかを調べるために、ウシ ICM 単離に伴う Hippo シグナル構成因子の発現動態の解析を行った。続いて第三章では、マウス初期胚発生において Hippo シグナル構成因子である転写共役因子 YAP1 の細胞内局在を制御されている RHO-ROCK シグナルが、ウシ胚盤胞期胚の分化にも影響しているかどうかを検討した。さらに第四章では、ウシ腔再形成胚が TE 特有の遺伝子発現パターンを獲得していることを示すために、網羅的遺伝子発現解析を行った。最後に第五章では、腔再形成胚で出現した TE 様の割球が、個体発生を支持する機能を保持した胎盤を形成できるかどうかを調査した。また、マウス胚でさえ腔再形成胚が妊娠満期まで個体発生が可能であるかどうか不明であるため、単離 ICM に由来するマウスおよびウシ腔再形成胚における個体発生能の検証を行った。

第二章: ウシ ICM 単離に伴う Hippo シグナル構成因子の発現動態の解析

緒言

胚の立体構造において、内側および外側それぞれに位置する割球の違いとして、細胞間接着の状態、およびそれに伴う細胞極性の有無が挙げられる。細胞間接着は、多細胞生物において細胞間のコミュニケーションにより体の各部位を形成および維持するために必要である。哺乳動物胚の内側に位置する割球は周りを他の割球が取り囲んでおり、割球間では接着結合が認められる [11]。一方、外側に位置する割球は割球間の接着結合のみならず、外部環境に接する部位と接着結合部位との境界において、密着結合と呼ばれるより強い結合が認められる [11]。このように外側に位置する割球は、他の割球との細胞間接着が認められる基底側、および割球表面が露出している頂端側という方向性を有しており、これを細胞極性と呼ぶ [12]。細胞極性は、初期胚が複雑な組織構造を有する個体へと発生するために重要な性質である。さらに、頂端側では細胞骨格が形成されて割球表面の上皮化が生じる [11]。この現象により、頂端側の割球表面には物質取り込みの役割を担う微絨毛が発生する [13]。効率的に物質を取り込むために、割球間の接着を密にすることで頂端側の割球表面における平滑化が起こり、この現象をコンパクションと呼ぶ [11]。細胞極性を獲得した割球は胚内の恒常性を維持することができ、胞胚腔内液の胚外への流出を阻害している。このような過程を経て胚盤胞期胚は形成され、内外モデルを裏付けるモデルとして、細胞極性の有無が TE および ICM への分化に関与するという極性モデルが提唱されている [13]。このモデルでは、外側に位置することで細胞極性を持つに至った割球が TE に、内側の細胞極性を持たない割球が ICM に分化すると説明されている。

細胞の位置関係に伴う細胞間接着の状態および細胞極性の違いをリン酸化カスケードに変換する Hippo シグナルという分子経路が知られている [14]。このシグナルは下流の遺伝子発現を調節することで、器官の大きさ、組織恒常性、細胞増殖などを制御している [14] ことが知られていたが、内外および極性モデルを裏付ける分子的メカニズムとして、マウス初期胚において着目された [15, 16]。すなわち、細胞極性を持った外側に位置する割球ではシグナルが発動せず、細胞質内の YAP1 と呼ばれる転写共役因子が核内移行し、TEAD4 と相互作用して CDX2 の発現を促進する。一方、細胞極性を持たない内側に位置する割球では Hippo シグナルが発動し、結果として LATS1/2 と呼ばれるキナーゼにより YAP1 がリン酸化を受けて細胞質に留まることで、TEAD4 との相互作用が起きずに CDX2 の発現が促進されない。このように研究が進められているマウスと比べて、ウシの初期胚発生における Hippo シグナルの検証はほとんどなされていないのが現状である。そこで本章では特に、Hippo シグナルの下流因子である YAP1 および TEAD4 に着目し、胚の立体構造において内側に位置していた割球を ICM の単離により外側に配置させることにより、YAP1 が核内移行して TEAD4 と相互作用し、CDX2 を再発現させるかどうかを調べることを目的とした。

材料および方法

1. ウシ初期胚の作出

a. 卵母細胞の体外成熟培養

食肉検査場由来のウシ卵巣を発泡スチロール容器で保温し、研究室に輸送した。食肉検査場から研究室までの輸送の平均所要時間は約 1 時間半であった。余剰組織を解剖バサミを用いて除去し、卵巣を室温の 0.85% (w/v) 生理食塩水で数回洗浄した後、18G 注射針 (Terumo, Tokyo, Japan) を付けた 10 mL 注射筒 (Terumo) で直径約 2-8 mm の卵胞から卵丘細胞-卵母細胞複合体 (Cumulus-Oocyte Complexes; COCs) を卵胞液と共に吸引採取した。あらかじめウォーターバスで 38.5°C で温めた PB1 (付表) を 10 mL 遠沈管 (Greiner Bio-One, Monroe, USA) に 1 mL 入れた。吸引した COCs および卵胞液をその遠沈管に入れて室温で約 10 分間静置し、COCs を含んだ卵胞液約 1 mL をパストールピペット (Iwaki, Chiba, Japan) を用いて 100 mm ディッシュ (Eiken chemical CO., LTD, Tokyo, Japan) に移した。そこに PB1 を 1 mL 加えてディッシュの端に液が付かないように薄く広げた。実体顕微鏡下で COCs を拾い、35 mm ディッシュ (351008, Becton dickinson labware, New Jersey, USA) に 2 mL 入れておいた PB1 で 2 回洗浄した。卵母細胞の取り扱いはずべてマウスピースを連結した操作用ガラスピペット (Hirschmann laborgeräte, Eberstadt, Germany) で行った。体外成熟培養に使用するための TCM199 培地 (付表) は、60 mm ディッシュ (351007, Becton dickinson labware) に洗浄用として 1 mL の扇形の培地 (付図) を 3 つおよび培養用として 100 μ L の微小滴を 9 つ作り、流動パラフィン (Nacalai tesque, inc., Kyoto, Japan) で覆って 3 時間以上インキュベーター (Sanyo, Tokyo, Japan) で 5% CO₂、38.5°C、湿度 100% の条件で平衡化したものを使用した。卵丘細胞が 3 層以上で密着して卵細胞質が均一な COCs を選別し、TCM199 培地で 3 回洗浄した後、1

つの微小滴につき 20 個まで入れて 22 時間体外成熟 (*In vitro* maturation; IVM) に供した。実験には、採卵直後における卵核胞期の卵母細胞、および IVM 後に第一極体を確認できた第二減数分裂中期 (MII) の卵母細胞を供試した。

b. 体外受精

体外受精 (*In vitro* fertilization; IVF) に供するための媒精培地である 2.5×10^{-6} M テオフィリン (Wako, Osaka, Japan) を添加した Brackett & Oliphant working solution (B.O. working; 付表) [17]、およびこの培地に $7.5 \mu\text{g/mL}$ (w/v) ヘパリンナトリウム (Nacalai tesque) および 6 mg/mL (w/v) ウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin; BSA, Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加した BSA 添加 B.O. working を 10 mL 遠沈管に分注して 3 時間以上体外成熟培地と同様の条件下で平衡化した。ホルスタインの凍結精液ストロー 0.2 mL 1 本を約 38°C の温水に約 30 秒間浸漬して融解した。ストロー端を切断して B.O. working に精液を取り出して $1,800 \text{ rpm}$ ($600 \times g$)、7 分間で遠心洗浄した。上清を除去し、B.O. working を再度加えて $210 \mu\text{L}$ にした。精子数測定のため $10 \mu\text{L}$ 取り、 $990 \mu\text{L}$ の 3% (w/v) 食塩水に入れて転倒混和して精子を不活化し、血球計算盤 (Kayagaki, Tokyo, Japan) で精子数を測定し、精子濃度を 5.0×10^6 個/mL となるように B.O. working で希釈した。BSA 添加 B.O. working で 60 mm ディッシュに $50 \mu\text{L}$ の微小滴を作り、洗浄用の場合には B.O. working $50 \mu\text{L}$ 、媒精用の場合には濃度調整した精子懸濁 B.O. working $50 \mu\text{L}$ を加えた。洗浄用の B.O. working で 1 回洗浄した後、1 つの微小滴につき IVM 後の COCs を 20 個までと規定して媒精に供した。

c. 体外発生培養

発生用培地である修正合成ウサギ卵管液 (mSOFai; 付表) [18] を 1 微小滴 100 μL として作製し、5% CO_2 、5% O_2 、38.5°C、湿度 100% で一晩平衡化した。媒精開始 16-17 時間後、キャピラリーの内径を小さくしていきながらピペッティングすることによって卵丘細胞を剥離した。その後、mSOFai で 9 回洗浄した後 1 つの微小滴につき胚を 20 個まで入れて体外発生培養 (*In vitro* culture; IVC) に供した。なお、IVC を媒精開始 18 時間後までに開始できるように操作を行った。媒精開始直後を 0 時間 (D0) とした。実験には、D1.0、1.5、2.0、5.0、5.5 においてそれぞれ接合体、2 細胞期、4-8 細胞期、コンパクションが認められない初期桑実期、およびコンパクションが認められる後期桑実期の胚を、D6.0 および D6.5 において腔がわずかに認められる初期胚盤胞期胚を、D7.0 において透明帯が薄くなるまで腔が発達し始めた中期胚盤胞期胚を、D7.5 および D8.0 において孵化直前まで腔が発達した拡張胚盤胞期胚をそれぞれ供試した。

2. YAP1/TEAD4/CDX2 免疫染色

卵丘細胞および透明帯を除去した卵母細胞および胚を用いて免疫染色を行った。卵核胞期の卵母細胞の卵丘細胞をガラスピペットにより物理的に除去した。MII 期の卵母細胞の卵丘細胞についてはヒアルロニダーゼを用いて除去した。その準備として、0.087% (w/v) ヒアルロニダーゼ (Sigma-aldrich) 添加 PB1 溶液 (付表) を 37°C で加温した。卵母細胞を PB1 で 1 回洗浄した後、5 分程度ヒアルロニダーゼ添加 PB1 溶液に浸漬し、ピペッティングすることでわずかに卵丘細胞の剥離が認められた後、直ちに PB1 に移してさらに卵丘細胞を除去した。透明帯除去を行うために、0.05% (w/v) プロナーゼ (Sigma-aldrich) 添加 PB1 溶液 (付表) を 37°C で加温した。卵母細胞もしくは胚を PB1 で 1 回洗浄した後、プ

ロナーゼ PB1 溶液に透明帯が変形し扁平になるまで浸漬し、PB1 でピペティングすることにより洗浄しながら透明帯を除去した。卵母細胞もしくは胚を 4% (w/v) パラホルムアルデヒド (PFA; Wako, 付表) で 20-22°C で 60 分間固定した後、0.2% (v/v) TritonX-100 (Wako, 付表) で 20-22°C、60 分間の透過処理を行った。洗浄液 (0.1% (v/v) TritonX-100, 0.3% (w/v) BSA 添加 PBS; 付表) で 10 分間洗浄し、この過程を 3 回繰り返した。固定処理もしくは透過処理した胚は 0.2% (w/v) Polyvinylalcohol (PVA) 添加 PBS (PBS+PVA; 付表) に入れて 4°C で保存し、1 週間以内に使用した。その後、0.01% (v/v) Tween 20 (Wako) 添加 PBS (0.01% PBST; 付表) で 5 倍希釈したブロッキングワン (Nacalai tesque) で 20-22°C で 45 分間のブロッキング処理を行った。PBST で 20 倍希釈したブロッキングワンを以下の抗体希釈液として使用した。一次抗体として、anti-CDX2 (ab76541, rabbit monoclonal, 1:300; Abcam, Cambridge, UK)、2 種類の anti-YAP1 (H00010413-M01, mouse monoclonal, 1:100; Novus biologicals, Littleton, CO, USA または 4912S, rabbit polyclonal, 1:100; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、および anti-TEAD4 (ab58310, mouse monoclonal, 1:1500; Abcam) を使用した。同一の動物種による交差反応を防ぐために 2 種類の anti-YAP1 を使い分けた。反応温度および時間は anti-CDX2、anti-YAP1、および anti-TEAD4 においてそれぞれ、37°C で一晩、20-22°C で一晩、および 20-22°C で 2 時間とした。一次抗体反応の後、洗浄液による 10 分間の洗浄を 5 回繰り返した。二次抗体として、Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (A21206, polyclonal, 1:400; Invitrogen, Tokyo, Japan)、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (A11001, polyclonal, 1:400; Invitrogen)、および Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (A21428, polyclonal, 1:400; Invitrogen) を使用し、20-22°C で 30 分間反応させた。二次抗体反応の後、洗浄液による 10 分間の洗浄を 5 回繰り返した。その後、25 µg/mL Hoechst 33342 (Sigma-aldrich, 付表) 添加

PBS+PVA により 20-22°C において 5 分間で DNA を染色した。蛍光染色用封入剤である VECTASHIELD (Funakoshi corporation, Tokyo, Japan) に卵母細胞および胚をマウントして封入し、観察まで 4°C で保存した。蛍光の検出には TCS SP5 共焦点レーザー顕微鏡 (Leica, Tokyo, Japan) もしくは LAS X with DMI8 蛍光顕微鏡 (Leica) を用いた。いずれの標的タンパク質も転写因子であったため、発現陽性細胞数を計測するに当たり、細胞質と比べて核内に強いシグナルが認められた細胞を陽性細胞とした。各陽性細胞を手動により計測し、各胚の総細胞数に対する各タンパク質陽性細胞数の割合を算出した。

3. ウシ胎子由来線維芽細胞の培養

a. 凍結細胞の融解

ウシ胎子由来線維芽細胞は、食肉検査場由来のウシ妊娠子宮より回収した胎子から採取し、使用時まで液体窒素中に 1.0×10^6 個/mL で保存していたものを供試した。約 38°C の温水で凍結細胞浮遊液の表面を融解させ、直ちに DMEM-FBS (附表) とともにピペティングしながら完全に融解し、DMEM-FBS 9 mL に細胞浮遊液 1 mL を混ぜた。この合計 10 mL の細胞浮遊液を 1,200 rpm (144×g)、5 分間で遠心洗浄し、上清を除去してよくタッピングにより混和した後、2 mL の DMEM-FBS を添加して穏やかにピペティングすることで細胞を再浮遊させた。その細胞を接着細胞培養用 35 mm ディッシュ (353001, Becton dickinson labware) に播種した。その後インキュベーターにおいて、5% CO₂、38.5°C、湿度 100% の条件で培養した。培地交換は 2 日に 1 回行った。

b. 継代

細胞がディッシュの底面積に対して 8 割程度まで増殖した際に継代を行った。培養に使用していた DMEM-FBS を除去し、PBS でディッシュ底面を洗浄した。トリプシン-EDTA (附表) を添加して細胞面全体を洗浄した後直ちに除去し、ディッシュ底面が細胞剥離により曇るまで 5% CO₂、38.5°C、湿度 100% の条件で 1 分程度静置した。その後、DMEM-FBS を添加することでトリプシンによる反応を停止し、ディッシュ 1 枚につき 1 mL で 2 回細胞を回収した。その後、1,200 rpm (144×g)、5 分間で遠心洗浄し、播種する予定であるディッシュ 1 枚につき 5 mL の DMEM-FBS で細胞を再浮遊させた。その細胞を接着細胞培養用 60 mm ディッシュ (Iwaki) に播種した。凍結細胞の融解と同様の条件で細胞を培養した。さらに、細胞が 60 mm ディッシュの底面積に対して 8 割程度まで増殖した後、162 cm² フラスコディッシュ (Nippon genetics, Tokyo, Japan) に継代した。トリプシン処理後、ディッシュ 1 枚につき 2.5 mL で 2 回細胞を回収した。その後、1,200 rpm (144×g)、5 分間で遠心洗浄し、播種する予定であるフラスコディッシュ 1 個につき 15 mL の DMEM-FBS で細胞を再懸濁させた。フラスコディッシュに播種後、タンパク質抽出を行うまで細胞を培養した。

4. タンパク質抽出

細胞がディッシュの底面積に対して 8 割程度まで増殖した際にタンパク質抽出を行った。トリプシン処理後、フラスコディッシュ 1 個につき 15 mL の DMEM-FBS で 2 回細胞を回収した。その後、1,200 rpm (144×g)、5 分間で遠心洗浄し、さらに 10 mL の PBS に細胞を懸濁させて同様の条件で遠心洗浄した。空の遠心チューブを風袋引きに用いて細胞の重量を測定した。細胞 50 mg に対して 500 µL の IP Lysis/Wash Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA)

を添加してできる限り激しくピペティングし、定期的に混合しながら氷上で 5 分間静置した。その後、 $13,000\times g$ で 10 分間遠心分離を行い、タンパク質が溶解している上清を回収することで細胞片を除去した。回収したタンパク質のサンプルは使用するまで -80°C で保存した。

5. YAP1/TEAD4 共免疫沈降

免疫沈降は標的タンパク質を特異的な抗体により回収するための手法である。免疫沈降には Pierce Co-Immunoprecipitation Kit (26149; Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い、以下に概要を示すこととし、詳細はキット推奨プロトコールに従った。本キットによる実験にはスピнкаラムを使用した。プロトコール上で特に指定がない限り、遠心条件を $3,000\times g$ の 1 分間とした。まず、アミン樹脂および抗体を反応させて抗体固定化樹脂を作製した。スピнкаラムに樹脂を添加して Coupling Buffer (キット付属品) で遠心洗浄した後、樹脂および抗体を $20-22^{\circ}\text{C}$ で 1.5 時間ローテーター (Biocraft, Tokyo, Japan) により回転させながら反応させた。使用した抗体は、 $10\text{ }\mu\text{g}$ の anti-YAP1 (H00010413-M01) および $7\text{ }\mu\text{g}$ の anti-TEAD4 (ab58310) であった。さらに遠心洗浄後、樹脂と抗体との結合反応を持続させるために、Quenching Buffer (キット付属品) をスピнкаラムに添加し、 $20-22^{\circ}\text{C}$ で 15 分間回転させながら反応させた。その後、Coupling Buffer で 2 回、続いて Wash Solution (キット付属品) で 6 回遠心洗浄した。樹脂と結合した抗体が入ったカラムは、最終濃度が 0.02% (w/v) となるようアジ化ナトリウム (附表; Kanto chemical, Tokyo, Japan) を Coupling Buffer に添加して 4°C で保存した。非特異的な樹脂への結合を防ぐために、アガロース樹脂とサンプルとしたタンパク質とを結合させるプレクリア処理を行い、処理したサンプルをプレクリア溶解物とした。プレクリア溶解物を $45-50\text{ mg}$ 供試し、IP Lysis/Wash Buffer で 2 回

遠心洗浄した。その後、抗体固定化樹脂が入ったスピンカラムにプレクリア溶解物を添加し、37°C で 2 時間静置、続いて 20-22°C で一晩回転させながら反応させた。抗体反応後、IP Lysis/Wash Buffer による洗浄を 7 回行い、さらに Conditioning Buffer (キット付属品) で洗浄した。免疫沈降後のタンパク質の抽出にはサンプルバッファー (付表) を用い、抽出後 70°C のヒートブロックを用いて 15 分間加熱した後、-80°C で保存した。免疫沈降を行う前のプレクリア溶解物をインプットコントロールとして使用した。

6. ウェスタンブロッティング

ゲル調製および SDS 電気泳動はゲル電気泳動ガイド (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) に従って行った。アクリルアミドが 8% の分離ゲルを作製し、ゲルを保存するときはキムワイプ (Crecia, Tokyo, Japan) でガラス板ごと包み、MilliQ 水で濡らしてサランラップに包んで 4°C 保存とした。ゲルを泳動槽にセットし、泳動バッファーで満たした。その際に生じた泡は泳動の障害となるため除去した。スマイリング防止のために両端のレーンを使用せず、分子量マーカーには BlueStar (Nippon genetics) を用いた。サンプルは各 6 μ L ずつ、使用しないレーンにもサンプルバッファーを各 6 μ L ずつアプライした。電気泳動は 10 mA で 30 分程度、各サンプルが濃縮ゲルを脱出して一直線になったら電流を 20 mA に変えて 20 分程度行った。泳動を開始したら PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜を 5 分程度メタノール (Wako) で振盪し、その後泳動中転写バッファーで振盪し続けた。電流を変えた後、ろ紙を転写バッファー (付表) に浸漬しておき、スポンジを RO 水および MilliQ 水で濡らした。泳動終了後、バットに入れておいた転写バッファーにゲルをガラス板ごと浸漬し、ガラス板からゲルを取り出した。このときゲルが乾燥しないように注意し、転写後に表裏が分かるようにゲルの

右上端を切り取って目印とした。気泡が入らないようにゲルと PVDF 膜を重ね合わせ、それをろ紙、スポンジの順で挟んでカセットにセットした。発泡スチロールの容器に冷却材および氷を転写タンクと共に入れ、カセットをタンクに入れて転写バッファーで満たした。転写は定電圧にて 50 V、100 分の条件で行った。転写終了後、ブロッキングバッファー（付表）を用いて 20-22°C で 1 時間ブロッキング処理した。続いて、Can get signaling solution 1 (Toyobo, Osaka, Japan) で希釈した anti-YAP1 (H00010413-M01, 1:500) および anti-TEAD4 (ab58310, 1:500) を用いて反応させた。反応温度は anti-YAP1 は 20-22°C、anti-TEAD4 は 4°C であり、反応時間を 2 日間とした。一次抗体反応後、0.1% PBST を用いた数回の振盪による洗浄を 3 回繰り返した後、10 分間の振盪による洗浄を 4 回繰り返した。Can get signaling solution 2 (Toyobo) で希釈した horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG (NA934, monoclonal, 1:5,000; GE Healthcare, England, UK) および horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG (NA931, monoclonal, 1:5,000; GE Healthcare) で二次抗体反応を行った。二次抗体反応後、0.1% PBST を用いた数回の振盪による洗浄を 3 回繰り返した後、10 分間の振盪による洗浄を 4 回繰り返した。発光試薬として、0.1% PBST で 3 倍希釈した Immobilon Forte Western HRP Substrate (Millipore, Darmstadt, Germany) を反応させ、Bio-Rad ChemiDoc™ EQ densitometer (Bio-Rad) を用いてバンドを検出した。

7. ウシ ICM 単離および腔再形成胚の作出

透明帯を除去した D6.5 における初期胚盤胞期胚（全体胚）を 0.2% TritonX-100 に 5-10 秒間、わずかに TE が収縮するまで実体顕微鏡下で注意深く観察し、直ちに PB1 に移して 37°C で 15 分間洗浄した。洗浄後、ピペッティングすること

により TE を除去して ICM を単離した (単離 ICM)。平衡化した mSOFai で 3 回洗淨した後、1 つの 20 μ L 微小滴につき単離 ICM を 1 個入れて 24 時間培養し、胞胚腔様の腔形成を調べた。腔形成が認められたものを腔再形成胚とした。

結果

ウシ初期胚発生における YAP1、TEAD4、および CDX2 の発現動態

まず、ウシ初期胚発生各ステージにおける YAP1、TEAD4、および CDX2 の発現動態および細胞内局在を免疫染色により観察した。YAP1 は卵核胞期から接合体において核内および細胞質内で均一なシグナルとして検出されたが、2 細胞期から 8 細胞期において細胞質よりも核内で強いシグナルが認められた (図 1)。D5.0 の初期桑実期において、外側に位置する割球で YAP1 の核特異的なシグナルが認められ始め、D5.5 の後期桑実期胚以降では外側に位置するほとんどの割球において核特異的なシグナルを示した (図 2)。卵核胞期における TEAD4 のシグナルは細胞質特異的に認められ、MII 期においてそのシグナルは細胞内で均一になった。接合体から 8 細胞期において再び細胞質特異的なシグナルとなった (図 3)、D5.0 の初期桑実期から TEAD4 の局在は核特異的となり、D5.5 の後期桑実期以降ではほとんどの割球で同様のシグナルが認められた (図 4)。CDX2 は卵核胞期から D6.5 初期胚盤胞期各発生ステージにおいて核特異的な局在を示した (図 3 および 4)。しかしながら、4 細胞期から後期桑実期における CDX2 のシグナルは他のステージと比べて検出限界に近い弱さであった。そして、D6.0 初期胚盤胞期以降では外側に位置する割球で強いシグナルが認められた。以上の結果より、ウシ初期胚発生において、マウス胚同様、外側に位置する割球で YAP1 および TEAD4 の双方のタンパク質が先行して核内に局在し、後に CDX2 が発現することが示された。

ウシにおける YAP1 および TEAD4 相互作用の検出

次に、ウシにおいて YAP1 と TEAD4 の相互作用を証明した報告例が無いため、免疫沈降およびウエスタンブロッティングによりその実証を試みた (図 5)。初期

胚におけるタンパク質の検出は大量の胚数を必要とし、実験の実施が非常に困難である。マウス皮膚由来線維芽細胞である NIH3T3 細胞において、YAP1 および TEAD2 の相互作用検出例があるため [19]、ウシ胎子由来線維芽細胞をタンパク質抽出に用いた。まず、インプットコントロールで YAP1 および TEAD4 について目的の分子量でバンドが検出されたことから (図 5)、ウシ胎子由来線維芽細胞においてこれらのタンパク質が含まれていることが確認された。次に、YAP1 抗体および TEAD4 抗体による免疫沈降を行ったサンプルについても、これらの抗体を用いたウエスタンブロッティングにより全てのサンプルで同様にバンドが検出された (図 5)。この結果は、ウシにおける YAP1 と TEAD4 の相互作用の存在を示した。

ウシ腔再形成胚における YAP1 および TEAD4 の局在パターン

続いて、内側割球の外側への再配置が、YAP1 と TEAD4 の局在に及ぼす影響を免疫染色により検証した。通常の全体胚について外側に位置する割球において、YAP1 および TEAD4 は核内で共局在していた (図 6)。一方、単離 ICM において YAP1 の核内における強いシグナルは認められなかったが、TEAD4 については核内でシグナルが認められた。しかし、腔再形成胚は全体胚と同様に YAP1 および TEAD4 の共局在が観察された。これらの結果から、人為的に外側に再配置された割球においても全体胚の外側割球と同様に YAP1 は核内移行し、TEAD4 と共局在することが示された。

ウシ腔再形成胚形成過程における YAP1 および CDX2 の発現動態

通常の初期胚発生において、割球の内外位置関係の確立するタイミングを厳密に規定することは非常に困難である。これにより、外側に位置する割球が自

身の位置関係を認識して YAP1 が核内移行し始める時間を特定することを難しくさせている。蛍光ライブイメージングを用いて YAP1 の局在を経時的に観察する手法も考えられるが、蛍光タンパク質と標的タンパク質では局在パターンに違いが認められる場合がある [20]。例えば、細胞内において本来核特異的な局在を示す転写因子 CDX2 の発現を蛍光タンパク質により検出すると、核および細胞質において均一なシグナルが認められる [20]。単離 ICM を用いた実験系において、単離直後は割球の位置関係を変化させて時間が経過していない状態であり、割球の位置関係の認識から YAP1 の核内移行までにかかる時間を特定することができる。そして、もし YAP1 が CDX2 の発現を促進しているのであれば、その発現に先行して YAP1 が核内移行すると予想される。そこで、各々の割球が位置関係を認識して YAP1 が核内移行し、CDX2 が発現するまでにかかる時間を検証することとした。そのために、腔再形成胚形成過程における経時的な YAP1 および CDX2 陽性細胞の観察を行った (図 7)。

単離直後の ICM において、YAP1 および CDX2 のシグナルが細胞質と比べて核内に強く認められた細胞はみられなかった (図 7)。培養 0.5 時間後の単離 ICM において YAP1 の核内移行が認められ、培養 6 時間後において初めて外側の割球で CDX2 陽性細胞が認められた (図 7)。YAP1 陽性細胞数、CDX2 陽性細胞数、および総細胞数を計測したところ、単離 ICM の培養を通して YAP1 陽性細胞数は CDX2 陽性細胞の数よりも多い状態を保って推移した (図 8)。培養 0.5 から 1 時間にかけて総細胞数が減少しているにも関わらず YAP1 陽性細胞および CDX2 陽性細胞の数が増加していたことから、細胞増殖とは独立して YAP1 陰性細胞および CDX2 陰性細胞が各陽性細胞へと変換されていることを強く示していた。割球の相対的位置関係を明確にするために、共焦点レーザー顕微鏡を用いた断面像の観察により、外側に位置する割球で YAP1 が核内移行し、同じ割球で CDX2

が発現していることを示した (図 9)。以上の結果より、人為的に外側に再配置された割球において、YAP1 は CDX2 の発現に先行して核内移行していることが示された。

考察

ウシ初期胚発生における YAP1、TEAD4、および CDX2 の発現動態については免疫染色を用いた研究が過去に報告されている [21, 22]。それらの結果においても、YAP1 の各発生ステージにおける局在パターンは本章における結果と一致していた。特に、割球の位置関係が構築され始める桑実期以降において、マウス胚同様 YAP1 は胚内における相対位置に応じて細胞内局在を変化させていること [15] が確認された。加えて、桑実期以降で TEAD4 のシグナルが核内で強く検出されたことは過去の知見 [22] と本章の結果で一致した。TEAD4 mRNA を発現抑制したウシ胚盤胞期胚における CDX2 mRNA の発現は減少することから [23]、マウスと同様に、ウシにおいても TEAD4 と CDX2 の発現には相関関係が存在することが示唆された。一方、本章で行われた免疫染色により、卵細胞期から 8 細胞期では TEAD4 が細胞質特異的な局在を示したにもかかわらず、CDX2 の核内における強いシグナルが検出された (図 3)。ウシにおいては、胚のゲノム DNA からの転写が開始する胚ゲノム活性化 (Zygotic genome activation: ZGA) が 8-16 細胞期に起こる [24]。これ以前のステージでは、卵母細胞形成時に蓄積された mRNA やタンパク質が胚発生における主要な役割を担う。このことから、8 細胞期までの発生ステージにおいて検出された TEAD4 および CDX2 は母性タンパク質である可能性が高く、卵母細胞形成時における CDX2 発現制御が TEAD4 以外の因子により行われているか、あるいは、既に合成されていたものが検出されたと考えられた。

免疫沈降およびウエスタンブロッティングによる直接的な YAP1 および TEAD4 の相互作用の検出例は、ヒトの HEK293 細胞を用いた報告があるのみであり [25]、この相互作用の検証は哺乳類全体を通して意義深いことである。マウスやウシなど他の哺乳類細胞における検証の報告はないものの、ウシ初期胚

において、YAP1 および TEAD4 の相互作用を阻害する薬剤である verteporfin を培養培地に添加する実験が行われ、CDX2 陽性細胞数が減少することが報告されている [21]。本章およびこの知見から、ウシ YAP1 および TEAD4 が相互作用することを初めて直接的に示し、これらタンパク質の相互作用がウシ細胞においても CDX2 の発現制御に関与している可能性を示唆した。今後は、YAP1 および TEAD4 における相互作用の検出を、ウシを含め哺乳類初期胚において証明することが課題となる。

マウスにおける単離 ICM を用いた実験により、培養 24 時間後における割球において、YAP1 の核内移行および CDX2 の再発現が報告されているが [8]、それらのタイミングまでは明らかにされていない。本研究によって、腔再形成胚形成過程において、CDX2 の発現に先行して YAP1 が速やかに核内移行している様子が観察された。過去の研究により、ウシ *YAP1* mRNA 発現抑制胚において CDX2 陽性細胞数が減少することが分かっている [21]。人為的操作により外側に再配置された割球において YAP1 および TEAD4 は共局在していることと併せると、割球の位置関係が YAP1 および TEAD4 による CDX2 の発現制御に影響を及ぼすことが示唆された。

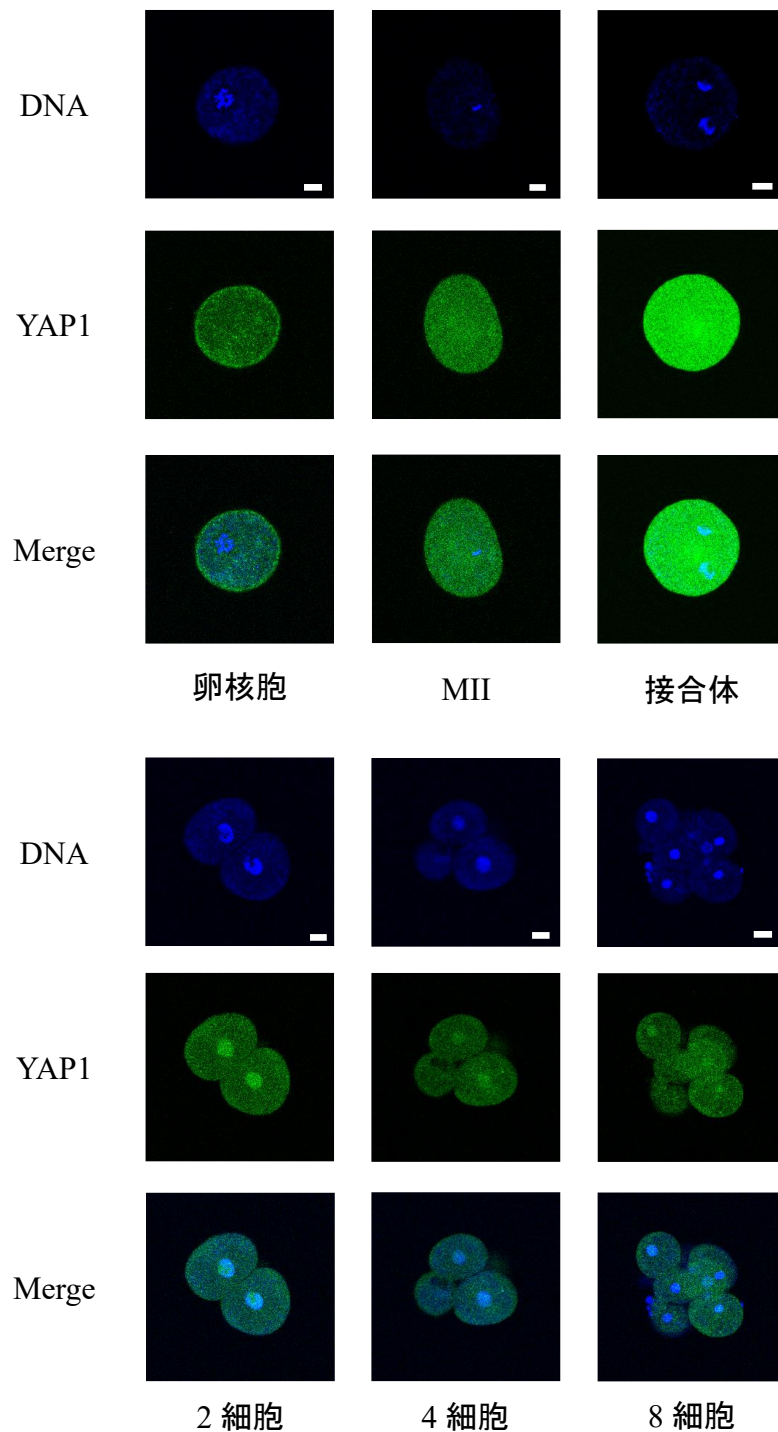


図 1: 卵核胞から 8 細胞における YAP1 発現動態.

青: DNA、緑: YAP1

Bar = 25 μ m

顕微鏡: 共焦点レーザー顕微鏡

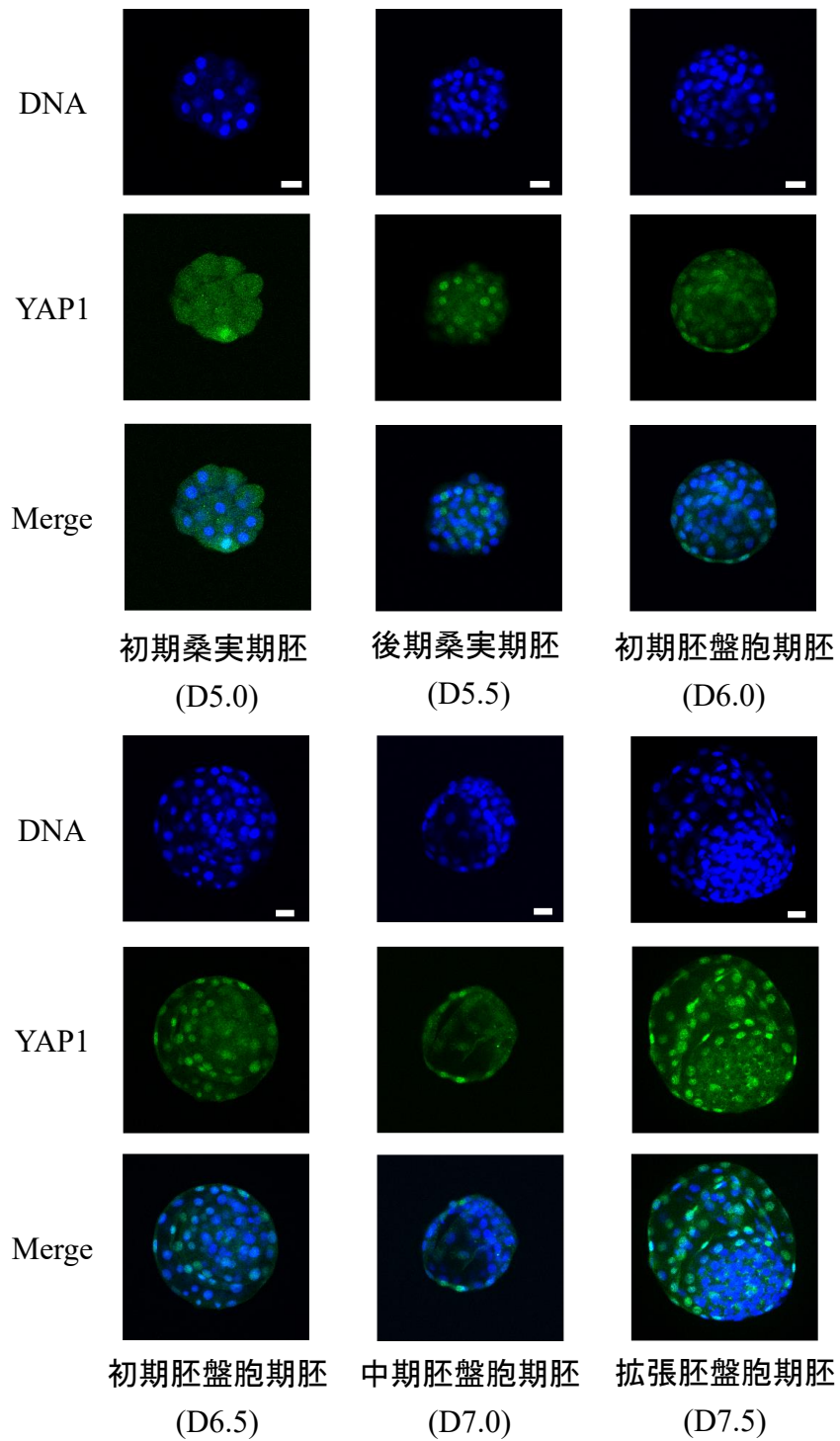


図 2: 初期桑実期胚から拡張胚盤胞期胚における YAP1 発現動態.

青: DNA、緑: YAP1

Bar = 25 μ m

顕微鏡: 共焦点レーザー顕微鏡

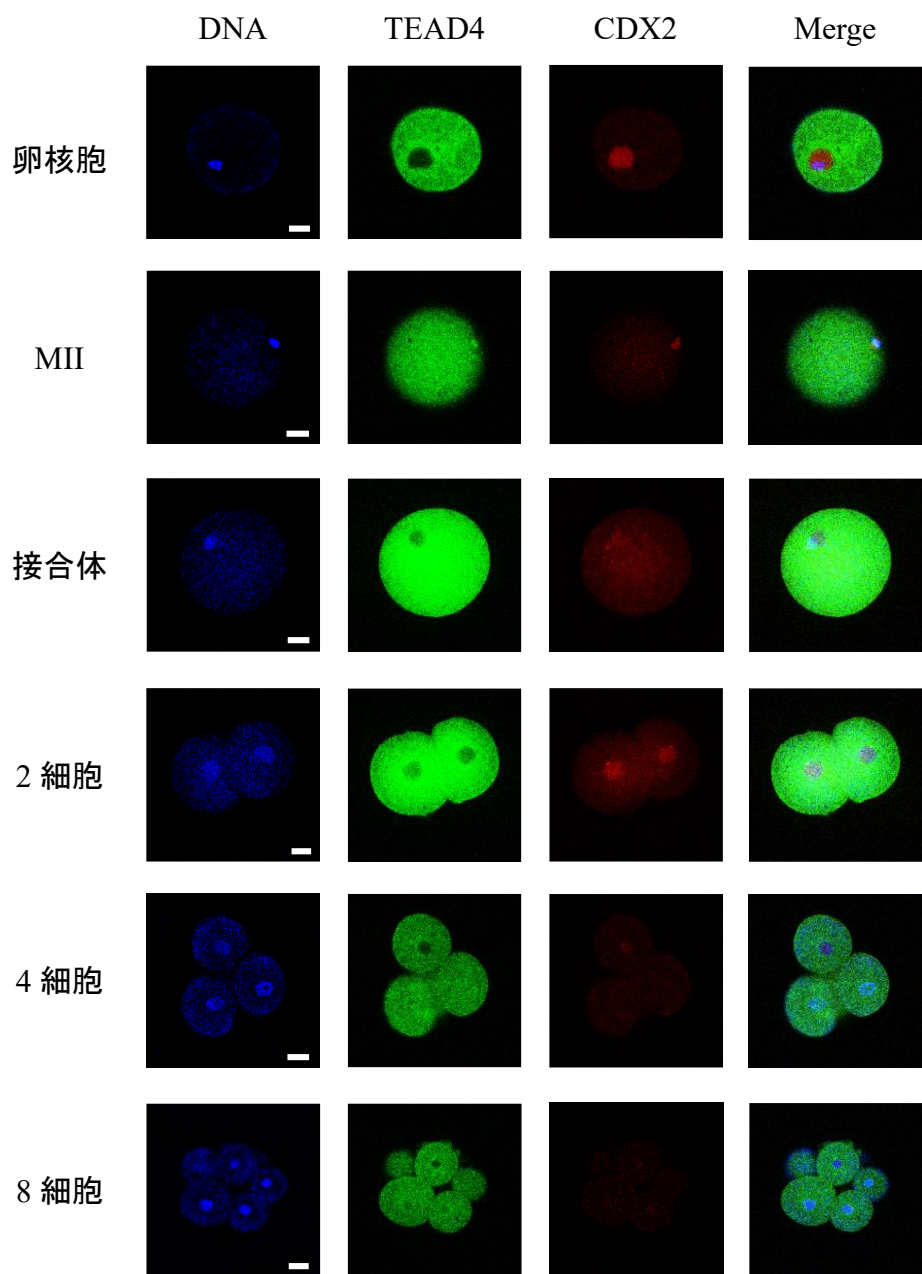


図 3: 卵核胞から 8 細胞における TEAD4 および CDX2 の
発現動態.

青: DNA、緑: TEAD4、赤: CDX2

Bar = 25 μ m

顕微鏡: 共焦点レーザー顕微鏡

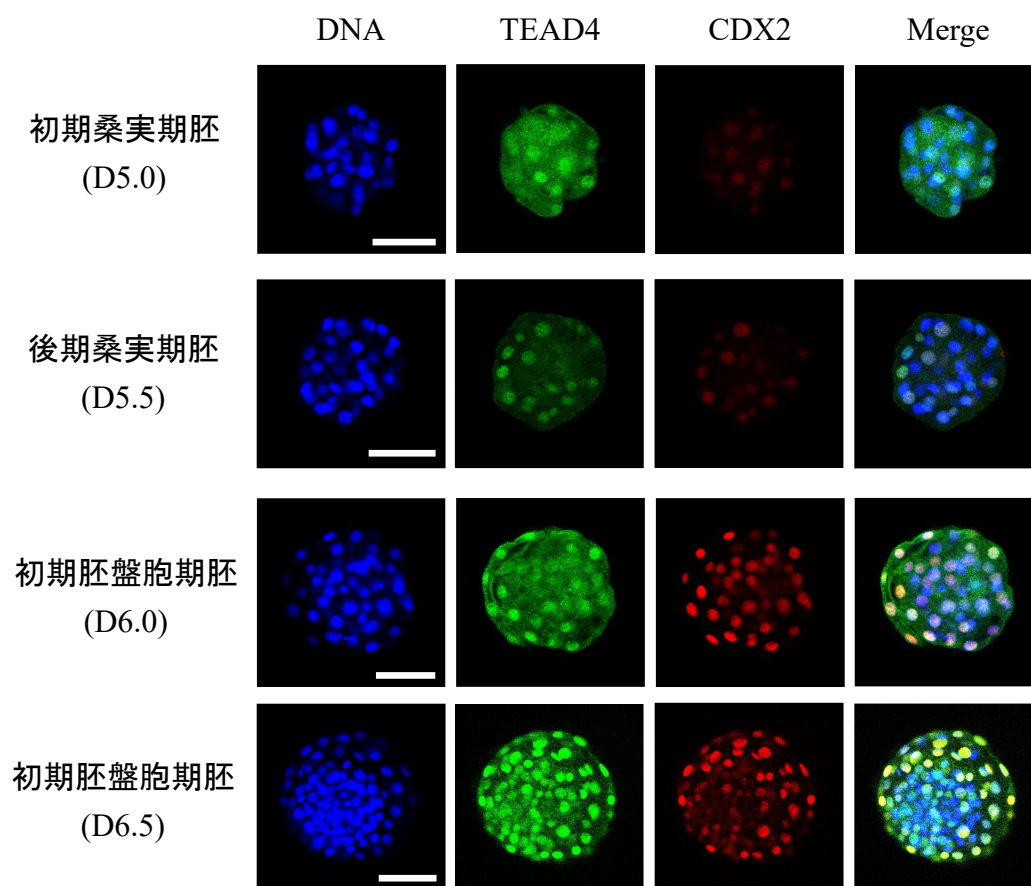


図 4: 初期桑実期胚から初期胚盤胞期胚における TEAD4 および CDX2 の発現動態

青: DNA、緑: TEAD4、赤: CDX2

Bar = 75 μ m

顕微鏡: 共焦点レーザー顕微鏡

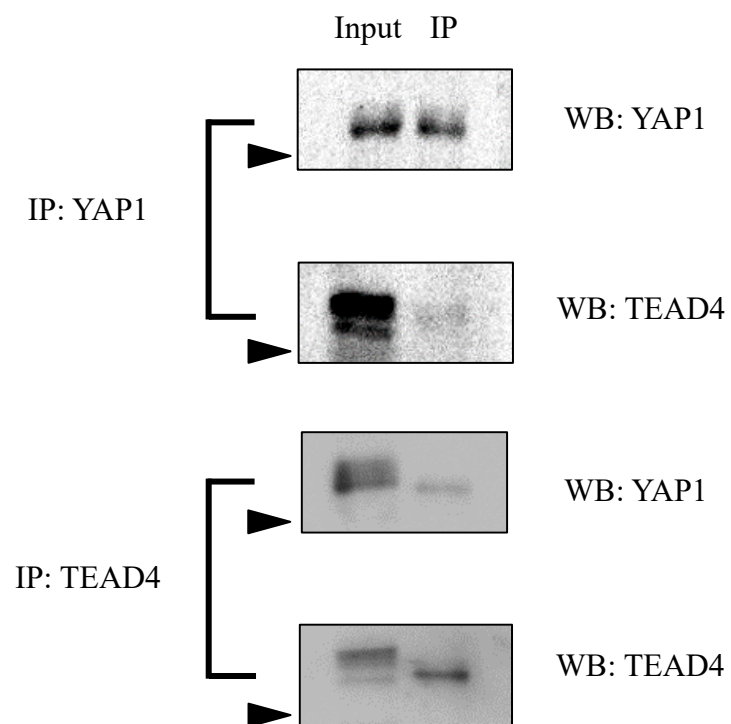


図 5: ウシ YAP1 および TEAD4 における相互作用の検出.

矢尻: 48 kDa 分子量マーカー

Input: インプットコントロール、IP: 免疫沈降、

WB: ウェスタンブロッティング

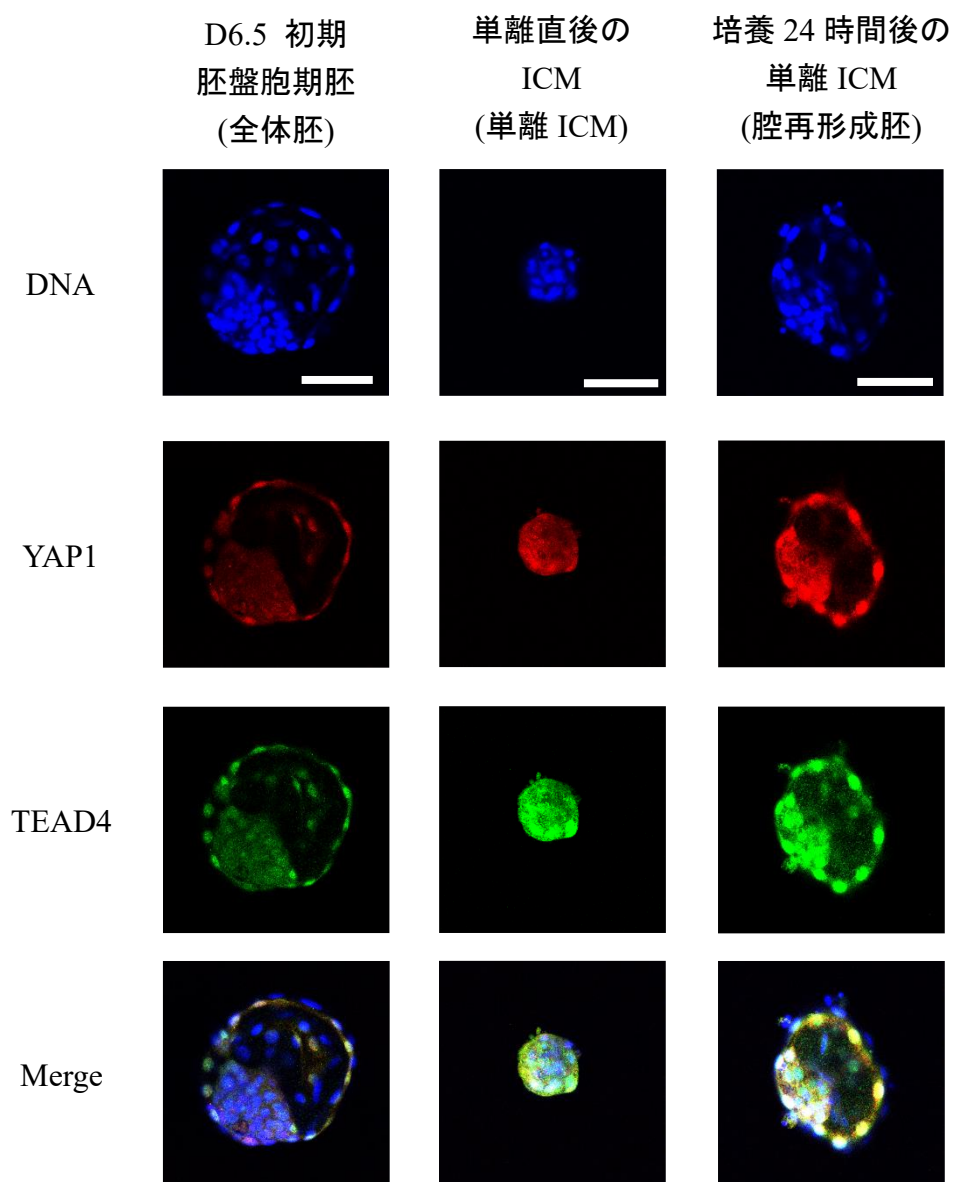


図 6: 腔再形成胚形成過程における YAP1 および TEAD4 の
発現動態.

青: DNA、赤: YAP1、緑: TEAD4

Bar = 75 μ m

顕微鏡: 共焦点レーザー顕微鏡

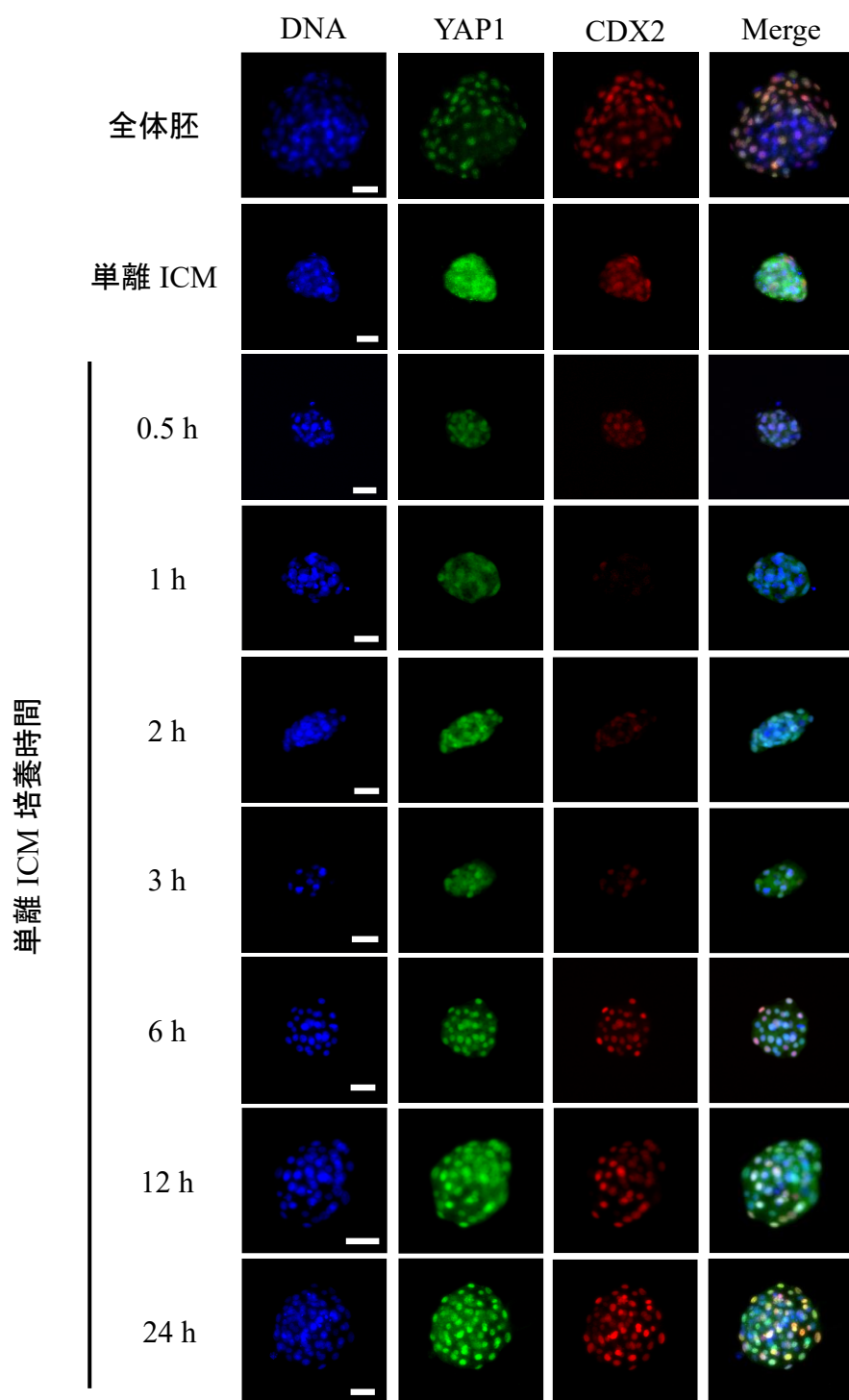


図 7: 腔再形成胚形成過程における YAP1 および CDX2 の発現動態.

青: DNA、緑: YAP1、赤: CDX2

Bar = 50 μ m

顕微鏡: 蛍光顕微鏡

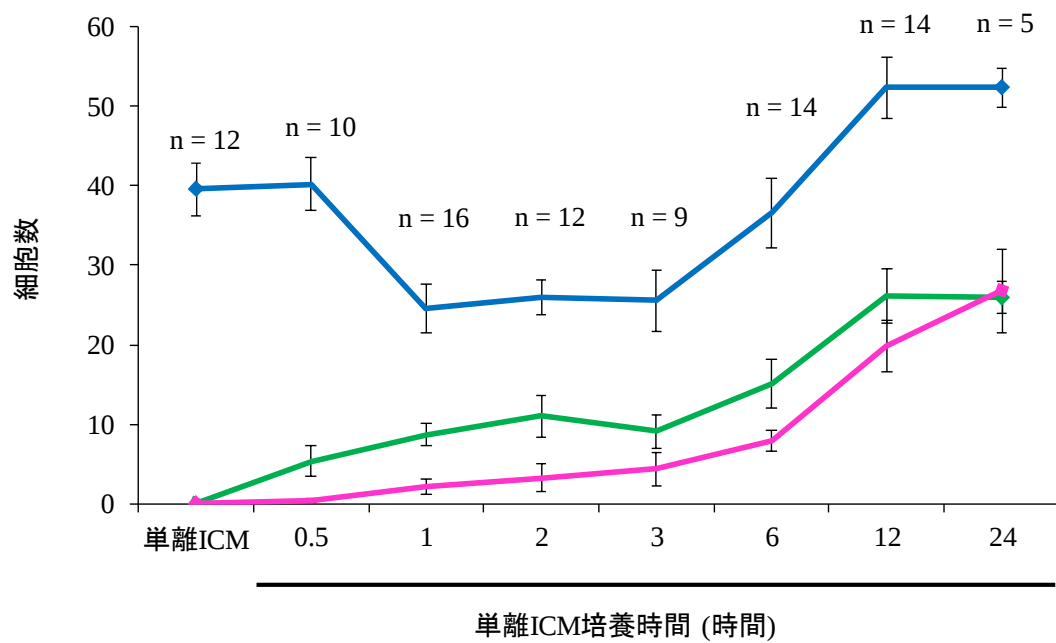


図 8: 腔再形成胚形成過程における YAP1 および CDX2 陽性細胞数の推移.

青: 総細胞数、緑: YAP1 陽性細胞数、赤: CDX2 陽性細胞数
エラーバーは標準誤差を示す。

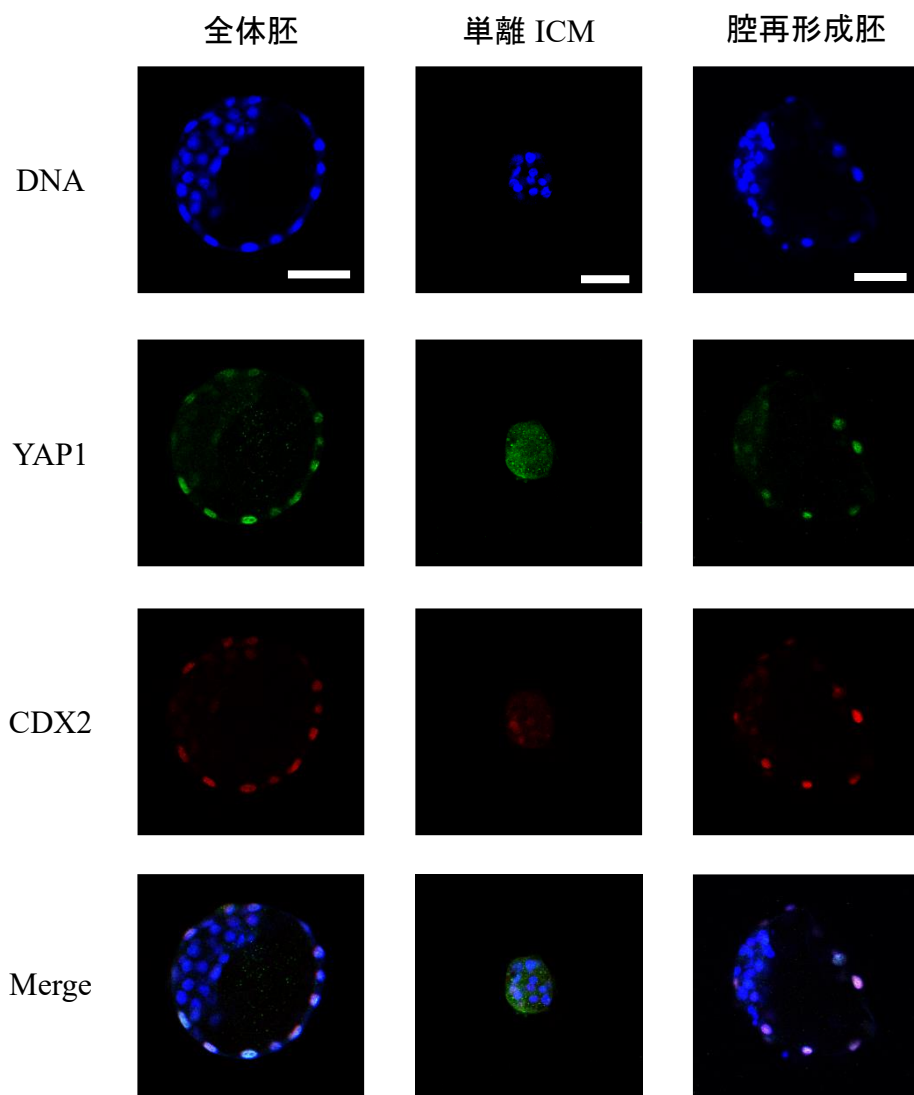


図 9: 腔再形成胚形成過程における割球の位置関係と YAP1 および CDX2 の発現.

青: DNA、緑: YAP1、赤: CDX2

Bar = 60 μ m

顕微鏡: 共焦点レーザー顕微鏡

第三章: RHO-ROCK シグナルがウシ胚盤胞期胚の分化に与える影響

緒言

初期胚発生において、YAP1 の局在変化に細胞間接着の状態および細胞極性が深く関与していることが知られ、マウス胚では盛んに研究されている。なかでも、YAP1 の細胞質への局在は細胞間接着の構成因子である AMOT および NF2 による制御モデルが有力視されている [16, 26]。内側に位置する割球において、細胞接着部位に局在している AMOT が NF2 と相互作用することが LATS1/2 リン酸化に必要で、YAP1 はその LATS1/2 によりリン酸化修飾を受けて細胞質に局在する。一方、外側に位置する割球において、AMOT は頂端側に局在し、細胞接着部位に局在する NF2 との相互作用が起こらない。AMOT が細胞接着部位に局在するか否かを制御する因子として RHO が挙げられる。RHO はリガンドが結合した G タンパク質共役受容体により活性化され、細胞骨格の再編成、細胞の運動性、細胞極性、および細胞周期など様々な細胞生理現象に関与する [27]。マウス初期胚の外側に位置する割球において、AMOT は RHO との相互作用を強め、細胞接着部位の AMOT が減少し、AMOT-NF2 の相互作用が弱まって、YAP1 を標的とした LATS1/2 によるリン酸化カスケードが活性化されずに YAP1 は核内移行する [28]。

一方で、RHO の下流に位置するエフェクター因子として ROCK キナーゼが知られている [29]。マウス初期胚における細胞極性因子として、割球の頂端側で PARD6B および PRKCZ、また、基底側で SCRIB および LLGL1 がそれぞれ局在しているが、ROCK はこれらの局在を制御しているといわれている [30]。さらに、外側に位置する割球において頂端側に局在する AMOT は、ROCK 阻害により基底側にも局在するようになる [31]。いずれにせよ、RHO および ROCK の阻

害により YAP1 の核内移行および TE への分化が抑制されることから、RHO-ROCK シグナルは極性分子の局在を制御することで Hippo シグナルの発動を抑制すると考えられている [28]。

このように RHO および ROCK はマウス初期胚発生における ICM および TE への分化に必要であると考えられるが、ウシ初期胚発生におけるこれら因子について調べた研究報告は少ない [32, 33]。第二章では割球の人為的な位置関係の再配置により YAP1 の局在が変化することを明らかにしたが、この変化の上流でどのような分子が関わっているかは不明なままである。そこで本章では、腔再形成胚形成過程における RHO および ROCK の阻害が YAP1 の局在および CDX2 の発現に及ぼす影響を調べた。

材料および方法

1. ウシ初期胚培養培地中への RHO および ROCK の阻害剤添加

第二章の方法に従ってウシ初期胚の作出を行った。RHO および ROCK に対する阻害剤はそれぞれ C3 transferase (Cytoskeleton, Colorado, USA) および Y-27632 (Enzo life sciences, Farmingdale, USA) を用いた。阻害剤の処理開始胚を D5.0 胚もしくは単離 ICM とした。各阻害剤のストックを 0.1 mg/mL C3 transferase および 20 mM Y-27632 の濃度で MilliQ 水に溶解することで準備し、使用まで -20°C で保存した。まず、C3 transferase の濃度検討を行うために、0.01、0.02、および 0.1 $\mu\text{g/mL}$ の各濃度で D5.0 胚を処理してその胚発生率および YAP1 陽性細胞数を計測した。第二章の実験により、D5.5 胚において YAP1 が核内に局在する割球が数多く観察されたため (図 2)、D5.0 胚における C3 transferase の処理時間は D5.5 までの 12 時間とした。濃度検討により決定した濃度で以降の C3 transferase で添加実験を行った。次に、RHO 阻害がウシ初期胚発生における YAP1 および CDX2 の発現に及ぼす影響を調べた。第二章の実験により、D6.0 胚において CDX2 の発現が認められ始めたため (図 4)、D5.0 から D5.5 の 12 時間 C3 transferase でウシ胚を処理した後、D6.0 まで阻害剤を添加していない mSOFai 中で培養した。もし、D5.0 から D5.5 のウシ胚に対する C3 transferase の処理により、マウス胚同様 YAP1 が細胞質に留まるようになれば、その後の D5.5 から D6.0 における CDX2 の発現が促進されないと予測される。Y-27632 の濃度検討を行うために、10、20、および 100 μM の各濃度で D5.0 胚を処理して、その胚発生率および YAP1/CDX2 陽性細胞数を計測した。過去に報告されている、ウシ初期胚発生における Y-27632 処理実験の結果から [33]、Y-27632 の処理によりウシ初期胚の YAP1 および CDX2 陽性細胞数が増加すると予想される。第二章の実験により、ウシ初期胚発生において D5.0 から D5.5 にかけて YAP1 が核内に局在する割球の

増加が観察されたため (図 2)、Y-27632 で胚を D5.0 から D5.5 の 12 時間で処理した際に、YAP1 および CDX2 陽性細胞数が増加するかどうかを確かめた。各阻害剤のストックを最終濃度に合わせて添加した mSOFai で 1 つにつき 100 μ L の微小滴を作製して胚を培養した。阻害剤を溶解していない MilliQ 水を mSOFai に添加して培養した区を Vehicle コントロールとした。培養する胚を、培地 1 微小滴につき 20 個までと規定した。単離 ICM における C3 transferase の処理条件は、胚を D5.0 から D5.5 の 12 時間処理した濃度検討の結果から決定した。単離 ICM における Y-27632 処理の濃度については、濃度検討の結果から決定した。腔再形成胚形成過程には、ICM から TE への変換過程が含まれるため、TE 細胞数の増加には時間を要する。このことから、単離 ICM の培養により作出した腔再形成胚を用いてより詳細な解析を進めるためには、TE 細胞数を効率よく増加できることが望ましい。また、ウシガラス化胚盤胞期胚の回復培養培地に Y-27632 を添加すると、回復培養 24 時間後における胚の生存率が増加することが報告されている [32]。よって、単離 ICM における Y-27632 処理時間は 24 時間とした。各阻害剤のストックを最終濃度に合わせて添加した mSOFai で 1 つにつき 20 μ L の微小滴を作製して、1 微小滴につき 1 個の単離 ICM を培養した。

2. YAP1 および CDX2 免疫染色

各阻害剤処理直後の胚を用いて YAP1 および CDX2 免疫染色を行った。D5.0 から 12 時間阻害剤処理した胚において、割球が分離しやすくなっていたため透明帯を除去せずに固定した。その後、第二章の方法に準じて免疫染色を行い、各タンパク質の陽性細胞数を計測した。

3. 統計解析

統計的な有意差の検定はスチューデント t 検定により行い、 $P < 0.05$ で有意差が認められると判定した。データにおける数値は平均値 $\pm$ SEM で表した。パーセンテージ表示の数値データは、Excel (Microsoft, Washington, USA) を用いたアークサイン変換後解析に用いた。統計解析には R ソフトウェア (Comprehensive R Archive Network, <https://cran.r-project.org/>) を用いた。

結果

ウシ初期胚発生における RHO の活性阻害が YAP1 の局在および CDX2 の発現に及ぼす影響

ウシ初期胚発生において RHO の阻害が YAP1 の局在および CDX2 の発現に及ぼす影響を調べるために、培養培地中に RHO の阻害剤である C3 transferase を添加して YAP1 および CDX2 の免疫染色を行った。まず、D5.0 から 12 時間 C3 transferase 処理した際の胚発生を調べたところ、D5.5 における後期桑実期胚への発生率に有意な差は認められなかった (表 1)。一方、0.02 および 0.1 $\mu\text{g/mL}$ C3 transferase 添加区において、腔形成した胚は認められなかった。次に、D5.0 から D5.5 までの 12 時間 C3 transferase 処理した胚について YAP1 陽性細胞数を計測した。C3 transferase 各区について Vehicle コントロールと比べて、総細胞数に対する YAP1 陽性細胞の割合に有意な差が認められ、その数は減少した (図 10 および 11)。以上の結果より、胚発生に影響がなく、YAP1 陽性細胞数に有意な差が認められ、かつ濃度が最も低い 0.01 $\mu\text{g/mL}$ を C3 transferase の添加濃度として以降の実験に適用した。RHO の活性阻害による YAP1 の核内移行抑制が CDX2 の発現に影響を及ぼすことを検証するために、D5.0 から D5.5 までの 12 時間 C3 transferase 処理した後、D6.0 まで阻害剤を添加していない培地で胚を培養し、YAP1 陽性細胞および CDX2 陽性細胞の数を計測した。その結果、Vehicle コントロールと比べて、総細胞数に対する YAP1 陽性細胞および CDX2 陽性細胞の割合に有意な差が認められ、その数は減少した (図 12 および 13)。

ウシ腔再形成胚形成過程における RHO の活性阻害が YAP1 の局在および CDX2 の発現に及ぼす影響

割球の人為的な位置関係の変化による YAP1 陽性細胞および CDX2 陽性細胞の数の変化が RHO を介して起こっているかどうかを検証するために、ICM 単離後 C3 transferase で 12 時間処理した胚について YAP1 および CDX2 の免疫染色を行った。C3 transferase 処理後の胚について YAP1 陽性細胞および CDX2 陽性細胞の数を計測した。両タンパク質陽性細胞の割合は、C3 transferase 添加により Vehicle コントロールと比べて有意な差が認められ、その割合が減少した (図 14 および 15)。この結果から、人為的に外側に再配置された割球における CDX2 発現には、RHO を介した YAP1 の核内移行が関与していることが示唆された。

ウシ初期胚発生における ROCK の活性阻害が YAP1 の局在および CDX2 の発現に及ぼす影響

続いて、ウシ初期胚発生において ROCK の阻害が YAP1 の局在および CDX2 の発現に影響を及ぼすかどうかを調べるために、培養培地中に ROCK の阻害剤である Y-27632 を添加して D5.0 から 12 時間培養し、YAP1 および CDX2 の免疫染色を行った。Y-27632 処理による胚発生への影響を調べたところ、D5.5 における後期桑実期胚への発生率および腔形成率に有意な差は認められなかった (表 2)。次に、Y-27632 処理後の胚について YAP1 陽性細胞および CDX2 陽性細胞の数を計測した。その結果、20 および 100 μ M Y-27632 添加区において、Vehicle コントロールと比べて総細胞数に対する YAP1 陽性細胞の割合に有意な差が認められ、その数は増加した (図 16 および 17)。そして、100 μ M Y-27632 添加区において、CDX2 陽性細胞の割合に有意な差が認められ、その数は増加した (図 16 および 17)。このことから、Y-27632 により YAP1 が核内移行し、その結果

CDX2 の発現が促進されることが示唆された。

ウシ腔再形成胚形成過程における ROCK の活性阻害が YAP1 の局在および CDX2 の発現に及ぼす影響

最後に、割球の人為的な位置関係の変化による YAP1 陽性細胞および CDX2 陽性細胞の数の変化について ROCK の関与を検証するために、ICM 単離後 Y-27632 で処理した胚について YAP1 および CDX2 の免疫染色を行った。ウシ D5.0 を用いた Y-27632 の処理実験から、培地に添加する濃度を 100 μ M とした。ウシ初期胚発生中の Y-27632 処理により YAP1 陽性細胞および CDX2 陽性細胞の数が增加することが分かったため (図 16 および 17)、単離 ICM 培養後 24 時間における腔再形成胚の TE 細胞数増加を期待し、ICM 単離後 Y-27632 で 24 時間処理して YAP1 陽性細胞および CDX2 陽性細胞の数を計測した。その結果、期待に反して総細胞数に対する YAP1 および CDX2 両陽性細胞の割合に有意な差は認められなかった (図 18 および 19)。

考察

ウシ初期胚発生において、C3 transferase を添加して YAP1 の局在変化および CDX2 の発現を調べた例は本研究が初めてである。マウス初期胚発生において、C3 transferase の培養培地への添加により YAP1 の核内移行が抑制されるという研究報告があり [28]、本章の結果と一致する。このことから、ウシ初期胚発生においてマウス同様 RHO が YAP1 の局在制御に関与していると考えられた。RHO 活性阻害による YAP1 の核内移行抑制に伴い、CDX2 の発現は減少した。ウシ初期胚における *YAP1* mRNA 発現抑制により、CDX2 陽性細胞数が減少することが報告されている [21]。本章の結果と併せて考えると、ウシ初期胚発生において、RHO の活性化が YAP1 の核内移行を促進して CDX2 の発現を促進していることが示唆される。各々の割球の相対的位置関係の違いが、CDX2 の発現制御軸に影響を及ぼしていることを明確に示した研究報告はない。本章での腔再形成胚形成過程における C3 transferase の添加実験の結果から、人為的な割球の位置関係の再配置に伴う CDX2 の再発現に RHO が関与していると考えられた。

ROCK は RHO の下流で細胞極性に関与することが知られているが、ROCK の阻害剤である Y-27632 を培地に添加したとき、YAP1 の局在にウシ胚とマウス胚で異なる影響が現れることが報告されている [33]。つまり、初期胚発生中に RHO もしくは ROCK の活性を阻害すると、マウス胚における YAP1 の核内移行は阻害されるが [30]、ウシ胚における YAP1 の核内移行が促進される。まずそのことを確認するために、本章では Y-27632 の添加によるウシ初期胚への影響を検討した。通常のウシ初期胚発生において、Y-27632 の添加により YAP1 核内移行の促進が認められ、この結果はウシ初期胚を用いた過去の研究報告 [31] と一致した。ウシ初期胚において、ROCK による YAP1 の局在制御がどのようなメカニズムにもとづいているのかは明らかになっていない。YAP1 は LATS1/2 によるリ

ン酸化を受けて細胞質内に留まる [15]。もし、YAP1 が過剰に発現して LATS1/2 によるリン酸化が追い付かなくなった場合、リン酸化されなかった YAP1 は核内移行する可能性が考えられる。体細胞において YAP1 は、CREB という転写因子によりその発現が制御されており、CREB の転写活性はリン酸化した p38 (p-p38) により制御されている [34]。マウスでは p-p38 が CREB による標的遺伝子の転写を促進するが [35]、ヒトでは抑制する [34]。さらに、ウシ体細胞において Y-27632 を添加すると、p38 のリン酸化が抑制されることが報告されている [36]。ウシおよびヒトで Y-27632 による p38 への影響が共通していると仮定すれば、ウシ胚では Y-27632 添加により YAP1 の発現量が増加した結果、リン酸化 YAP1 の相対的割合が減少して核内移行した YAP1 が増加したのかもしれない (図 14 および 15)。今後は、Y-27632 で処理したウシおよびマウス初期胚の *YAP1* mRNA 発現レベルを明らかにすることで、これら動物種間における違いを探る手掛かりとなるかもしれない。

マウス初期胚において、RHO により AMOT の局在が制御されていることが報告されているが [28]、AMOT に関してはウシ初期胚における研究も報告されている [21]。この研究によると、RNA 干渉による *AMOT* 発現抑制が行われた結果、ウシ初期胚における YAP1 陽性細胞数および CDX2 陽性細胞数の総細胞数に対する割合が減少する。マウス初期胚の内側に位置する割球における AMOT は、NF2 と相互作用して LATS1/2 のリン酸化を介して YAP1 を細胞質に留めていると考えられている [28]。しかしながら、ウシ初期胚による *AMOT* 発現抑制の結果から、ウシ AMOT は割球の位置関係は詳しく調べられていないが、YAP1 の核内移行の促進に関与していると考えられ、ICM および TE への分化における役割がマウスと異なると推測される。一方マウス初期胚発生において Y-27632 を添加した場合に、外側に位置する割球で頂端側のみに局在する AMOT が細胞接

着部位にまで局在するようになることが報告されている [31]。このことから、ROCK は AMOT の局在制御に関与していると考えられ、ウシ初期胚発生においても AMOT の発現抑制および Y-27632 添加により YAP1 の局在変化が起こることから、AMOT が ROCK による YAP1 の局在制御に関与している可能性がある。

腔再形成胚形成過程における Y-27632 添加で、全体胚と異なり総細胞数に対する YAP1 陽性細胞および CDX2 陽性細胞の割合にコントロールとの間で有意な差は認められなかった。このことから、ROCK は割球の位置関係の違いによって生じる TE 再生に伴う細胞分化には関与しておらず、他のエフェクター分子が主動していると考えられた。RHO のエフェクター分子は ROCK の他にも多数知られている [37]。ウシ腔再形成胚形成過程における RHO の活性阻害により、YAP1 および CDX2 の陽性細胞数が減少した結果と併せて考えると、ROCK 以外の RHO エフェクター分子が TE 再生に関わったのかもしれない。しかし、ウシ初期胚発生における ROCK 以外の RHO エフェクター分子の解析は報告されていない。そこで今後の展望として、まずウシ初期胚発生における RHO エフェクター分子群の発現動態を解析することで、ウシ胚盤胞期胚における分化制御への関連が予想される候補分子を選択する。次に、候補エフェクター分子について、発現抑制もしくは阻害剤による活性阻害を腔再形成胚に対して実施する。これら一連の実験により、腔再形成過程において重要な RHO エフェクター分子探索の重要な手掛かりが得られるものと考えられる。

まず、本章で得られたウシ胚を用いた解析の結果から、RHO による YAP1 の局在制御はマウス胚とウシ胚で共通して行われていると考えられた。一方、ウシ胚において ROCK が YAP1 の局在を制御しているものの、シグナル末端における制御メカニズムがマウス胚と異なることが示唆された。さらに、ウシ腔再形成胚形成過程において、ROCK の活性阻害による YAP1 の局在変化は見られず、

割球の位置関係の違いが ROCK による YAP1 の局在制御に影響していない可能性が示された。今後、マウス単離 ICM を用いた同様の実験が必要ではあるものの、割球の位置関係の違いが ROCK による YAP1 の局在制御に関与しているか否かといった点が、マウス胚およびウシ胚の間で違いがあるかもしれない。

表1: C3 transferase添加によるウシ初期胚発生への影響

C3 transferase [$\mu\text{g/mL}$]	供試胚数	後期桑実期胚数 (% $\pm$ SEM)	腔形成胚数 (% $\pm$ SEM)
Vehicle	35	11 (31.1 $\pm$ 11.1)	14 (39.7 $\pm$ 12.4)
0.01	36	14 (37.4 $\pm$ 15.9)	2 (5.1 $\pm$ 5.1)
0.02	35	7 (19.9 $\pm$ 1.9)	0 (0)
0.1	35	1 (3.3 $\pm$ 3.3)	0 (0)

統計処理の結果、Vehicle コントロールと C3 transferase 処理区の間で後期桑実期胚数に有意な差は認められなかった。

C3 transferase を 0.02 および 0.1 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で処理した区において、腔形成胚が認められなかった。

実験は 3 回繰り返した。

表2: Y-27632添加によるウシ初期胚発生への影響

Y-27632 [μ M]	供試胚数	後期桑実期胚数 (% $\pm$ SEM)	腔形成胚数 (% $\pm$ SEM)
Vehicle	38	18 (46.9 $\pm$ 11.3)	12 (29.6 $\pm$ 13.0)
10	36	12 (32.5 $\pm$ 8.1)	7 (17.9 $\pm$ 17.9)
20	37	11 (29.3 $\pm$ 8.8)	7 (17.9 $\pm$ 17.9)
100	38	6 (18.2 $\pm$ 14.2)	7 (17.9 $\pm$ 17.9)

統計処理の結果、Y-27632 添加各区と Vehicle コントロールとの間で有意な差は認められなかった。
実験は3回繰り返した。

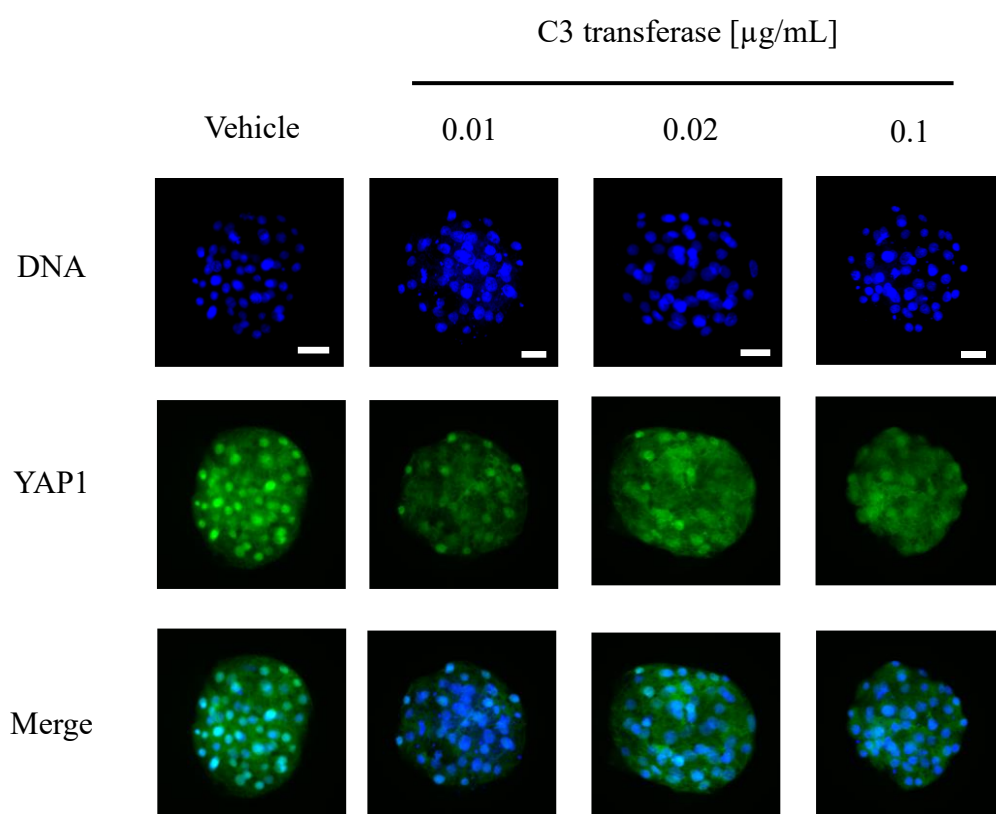


図 10: RHO の阻害がウシ初期胚発生における YAP1 の局在に及ぼす影響.

青: DNA、緑: YAP1

Bar = 50 μm

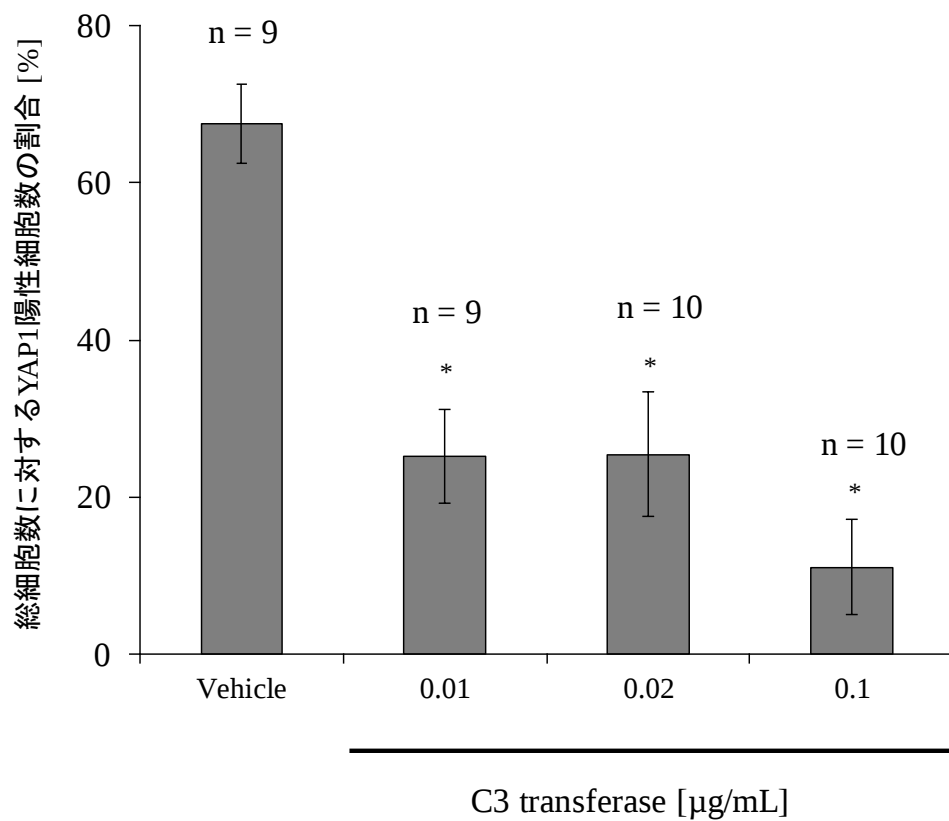


図 11: RHO の阻害がウシ初期胚発生における YAP1 陽性細胞数に及ぼす影響.

エラーバーは標準誤差を示す。

n は供試胚数を示す。

*: $P < 0.05$

統計処理の結果は C3 transferase 各区を Vehicle コントロールと比べた結果を示す。

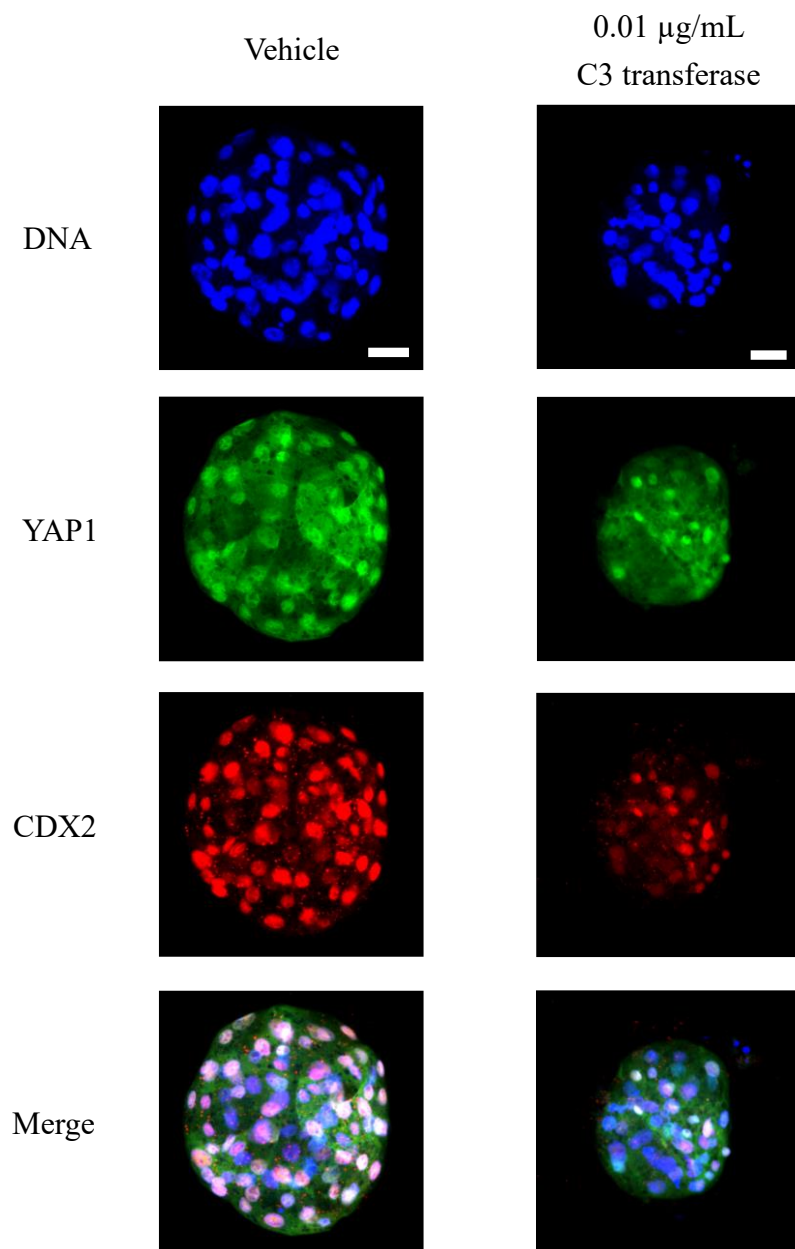


図 12: RHO の阻害がウシ初期胚発生における YAP1 の局在
および CDX2 の発現に及ぼす影響.

青: DNA、緑: YAP1、赤: CDX2

Bar = 50 μm

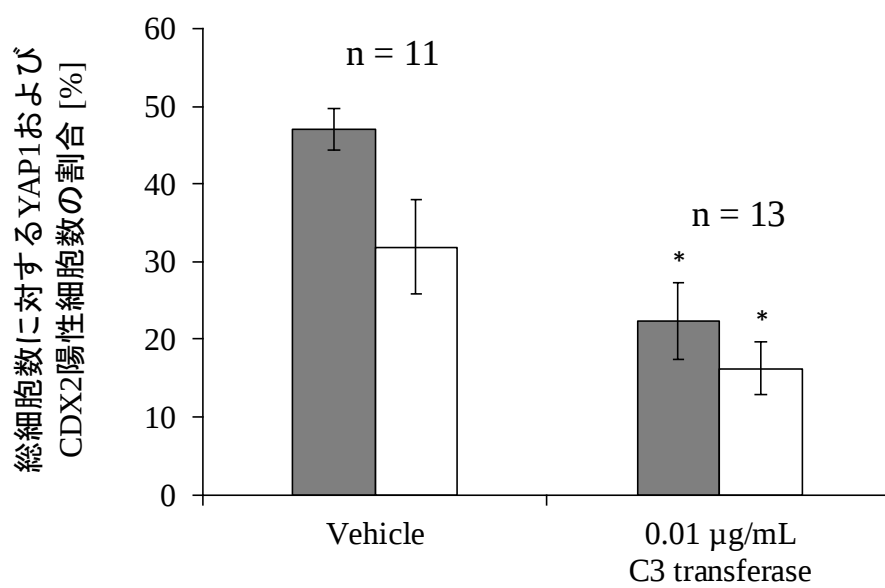


図 13: RHO の阻害がウシ初期胚発生における YAP1 および CDX2 陽性細胞数に及ぼす影響.

グレー: YAP1、白: CDX2

エラーバーは標準誤差を示す。

n は供試胚数を示す。

*: $P < 0.05$

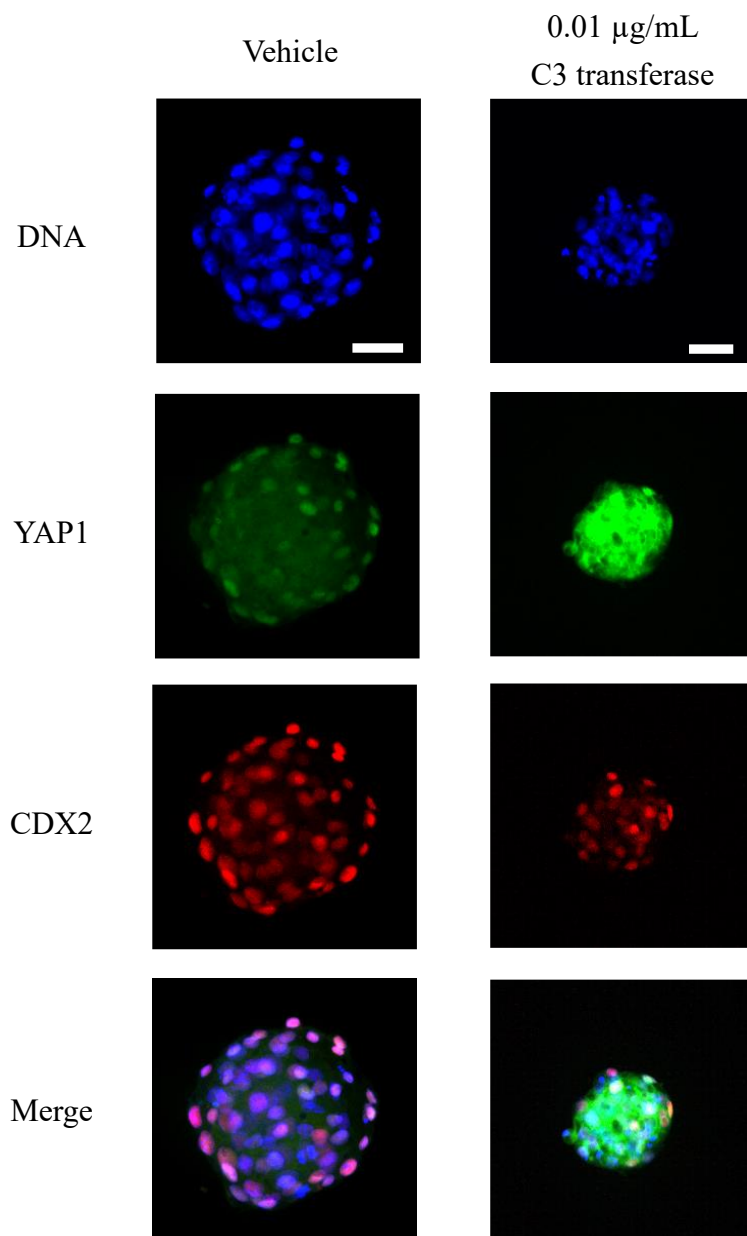


図 14: 腔再形成胚形成過程において RHO の阻害が YAP1 の局在および CDX2 の発現に及ぼす影響.

青: DNA、緑: YAP1、赤: CDX2

Bar = 50 μm

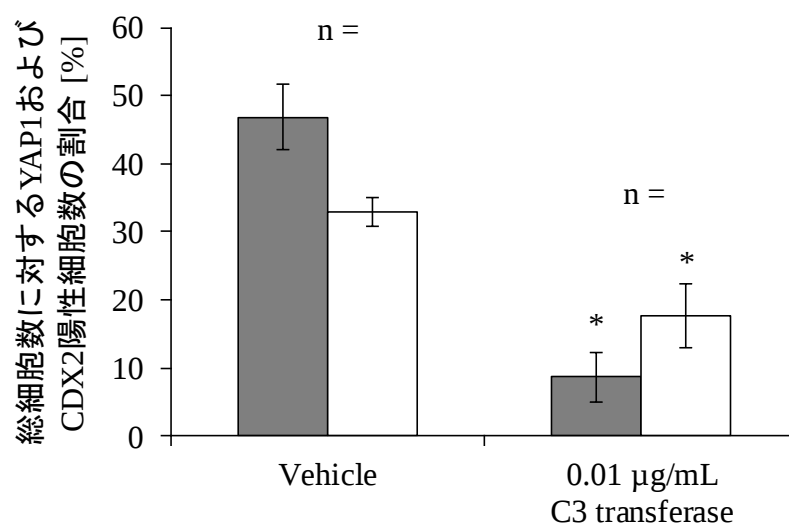


図 15: 腔再形成胚形成過程において RHO の阻害が YAP1 および CDX2 陽性細胞数に及ぼす影響.

グレー: YAP1、白: CDX2

エラーバーは標準誤差を示す。

n は供試胚数を示す。

*: $P < 0.05$

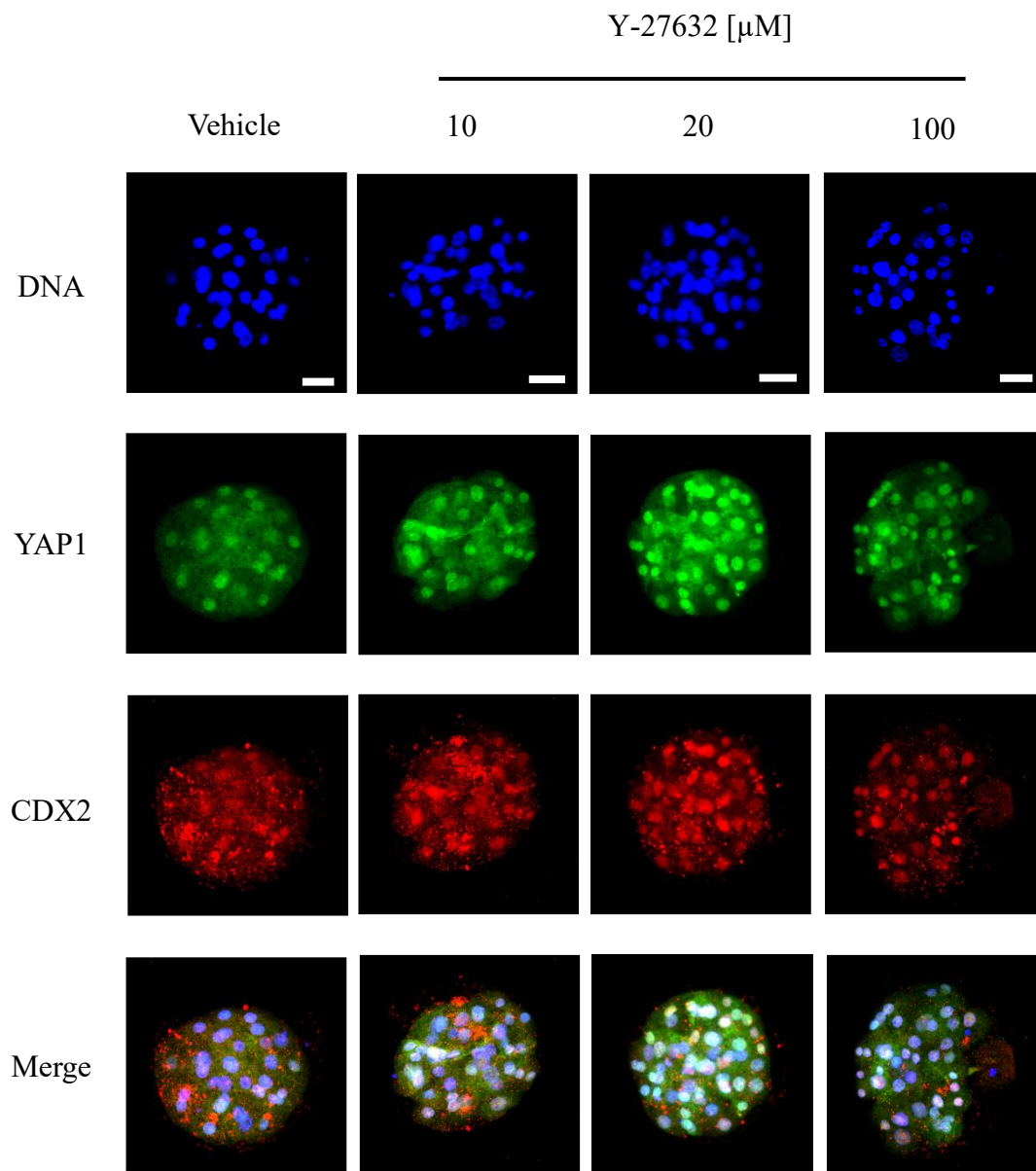


図 16: ROCK の阻害がウシ初期胚発生における YAP1 の局在
および CDX2 の発現に及ぼす影響.

青: DNA、緑: YAP1、赤: CDX2

Bar = 50 μ m

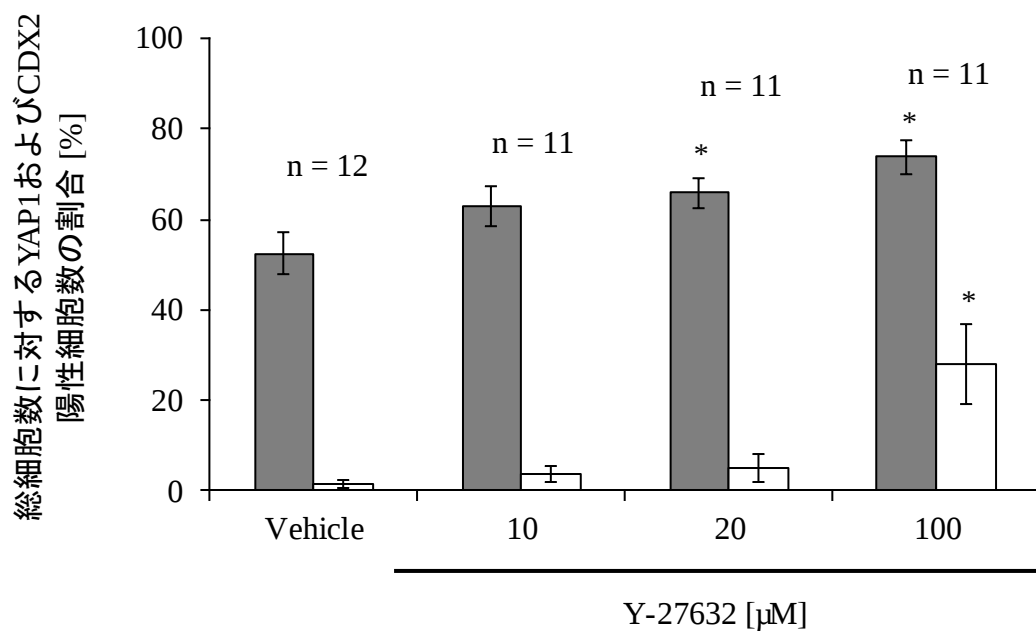


図 17: ROCK の阻害がウシ初期胚発生における YAP1 および CDX2 陽性細胞数に及ぼす影響.

グレー: YAP1、白: CDX2

エラーバーは標準誤差を示す。

n は供試胚数を示す。

*: $P < 0.05$

統計処理の結果は Y-27632 各区を Vehicle コントロールと比べた結果を示す。

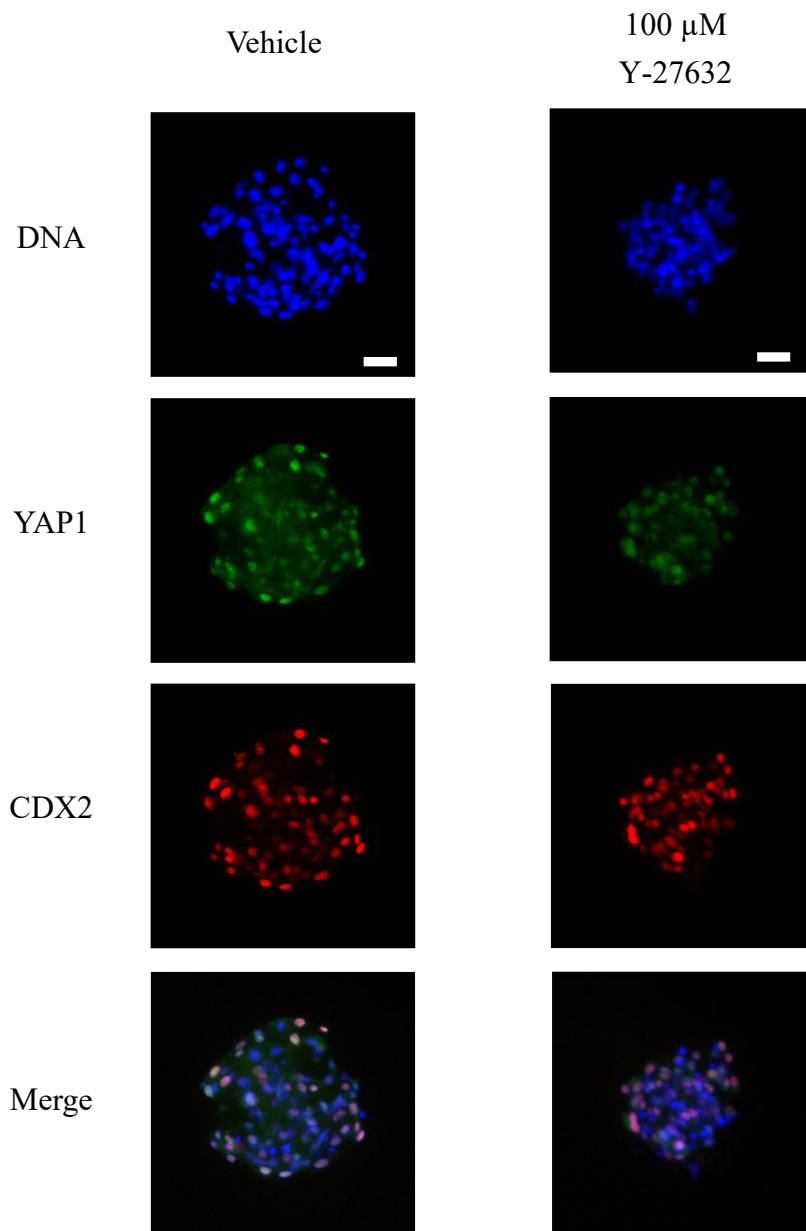


図 18: 腔再形成胚形成過程において ROCK の阻害が YAP1 の局在および CDX2 の発現に及ぼす影響.

青: DNA、緑: YAP1、赤: CDX2

Bar = 50 μ m

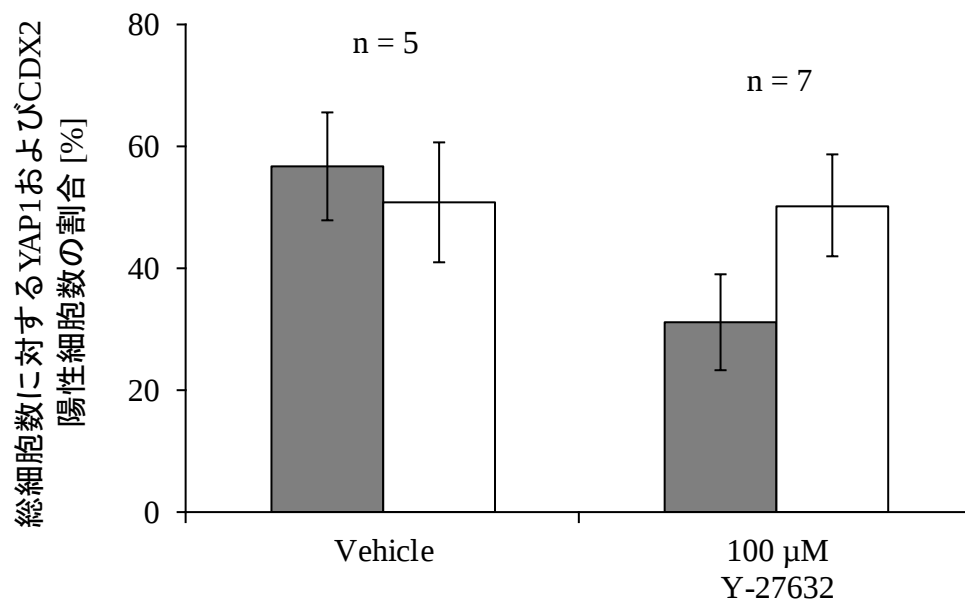


図 19: 腔再形成胚形成過程において ROCK の阻害が YAP1 および CDX2 陽性細胞数に及ぼす影響.

グレー: YAP1、白: CDX2

エラーバーは標準誤差を示す。

n は供試胚数を示す。

統計処理の結果、Y-27632 各区と Vehicle コントロールとの間で有意な差は認められなかった。

第四章: ウシ単離 ICM に由来する腔再形成胚における網羅的遺伝子発現解析

緒言

通常の初期胚発生において、胚盤胞期に分化した各細胞系列である ICM および TE は、将来胎子および胎盤を含む胚体外組織を形成し、個体発生を完了させる。この過程において各組織および器官を形成するためには、場所ごとに異なる特有の遺伝子発現パターンが成り立たなければならない。もし単離 ICM の培養により作出した腔再形成胚が内外モデルに従って細胞分化を正常に進めているのであれば、外側に再配置された割球は培養に伴い TE に特有な遺伝子発現パターンを獲得し、胚全体のグローバルな転写プロファイルが正常な胚盤胞期胚に近づくと予測される。

単離 ICM を培養すると、腔を再形成してその形態的特徴は胚盤胞期胚に近くなる。しかしながら、その観点のみでは腔再形成胚が TE 特異的な遺伝子発現パターンを獲得していると判断できない。例えば、マウスにおける *Cdx2* 欠損胚は胞胚腔を形成し、見かけ上における胚盤胞期胚まで発生が可能である [7]。しかしながら、その胚は形成された腔を維持することができず、他の TE マーカー遺伝子群の発現が減少している [7]。

腔再形成胚において CDX2 の再発現が認められたが、一部の TE マーカー遺伝子の発現を確認するのみでは、その TE 様の割球が特有の遺伝子発現パターンを獲得しているかどうかは明らかにならない。マウスにおける TE 分化関連遺伝子である *Elf5* を欠損させた胚は、着床前のステージにおいて通常胚と同様に腔形成および *Cdx2* の発現が認められるが、着床後の TE の維持に必要な遺伝子発現が維持されないため致死となる [38]。

このように、腔再形成胚において CDX2 陽性細胞が再出現したことを示すの

みでは内外モデルの証明には不十分であり、網羅的な遺伝子発現パターンを評価する必要がある。そこで本章では、RNA-seq を用いて腔再形成胚と全体胚のトランスクリプトームを比較し、両者の類似点および相違点を明らかにすることとした。

材料および方法

1. 腔再形成胚における RNA 抽出およびシーケンス

透明帯を除去した全体胚および腔再形成胚について、各 3 サンプルずつ total RNA を抽出した。供試した胚数は 1 サンプルにつき 15 個とし、ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega, Madison, USA) をキット推奨プロトコールに従って RNA 抽出に用いた。抽出した RNA 由来の cDNA 合成および増幅には SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing (Takara Bio, Shiga, Japan) を、精製には Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter, Kraemer Blvd, USA) を用いてキット推奨プロトコールに従って行った。cDNA 増幅のための PCR 反応は 10 サイクルで行った。抽出した RNA の質を Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Tokyo, Japan) により確認した。ライブラリーの構築を Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina, Tokyo, Japan) により、キット推奨プロトコールに従って行った。シーケンスを Illumina HiSeq 2500 system (Illumina) を用いて 150 bp ペアエンド法により行った。

2. RNA シーケンスデータの統計解析

検出された配列は TopHat2 ソフトウェア (Johns Hopkins University, Baltimore, MD) を用いて、July 2018 assembly of the bovine genome (UMD3.1) (https://asia.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index) にマッピングされた。以降の統計解析に用いるために、各遺伝子の発現量を Fragments per kilobase of exon per million reads mapped (FPKM) 値で表した。さらに、結果を図で表すために FPKM 値を対数変換した。差次的発現遺伝子 (Differentially expressed gene, DEG) 解析は、Trimmed mean of M (TMM) により値を正規化し、R ソフトウェアの DEseq パッケージを用いて行った。階層型クラスタリング解析は各サンプル間の類似性を

示すユークリッド距離により行われ、各クラスター間における距離をワード法により算出した。遺伝子を機能的に分類する Gene ontology (GO) 解析は R ソフトウェアの Goseq パッケージを用いて行った。遺伝子が分類された各機能の名前である GO term において、全体胚および腔再形成胚で発現差が認められる遺伝子をどの程度含むか、すなわち GO term の濃縮度を超幾何分布解析により検証した (エンリッチメント解析)。エンリッチメント解析には P 値が用いられ、background はいずれかの GO term に含まれる全遺伝子の数を示す値とした。遺伝子が分類される各パスウェイの名前を用いたエンリッチメント解析には、KEGG パスウェイデータベース (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) を用いた。

結果

腔再形成胚における網羅的遺伝子発現解析

腔再形成胚および全体胚の網羅的な遺伝子発現パターンを調べるために、RNA シーケンスを行った。各サンプル間における遺伝子発現パターンの類似性を調べるために、FPKM > 0 で検出された 9,509 個の遺伝子について階層型クラスタリング解析を行い、各遺伝子の発現量をヒートマップにより示した (図 20)。ヒートマップの分布パターンから、腔再形成胚 3 サンプルの遺伝子発現パターンの類似性が高かった。また、全体胚 2 サンプル (全体胚 2 および 3) と比べると、腔再形成胚 3 サンプルと近い発現パターンを示した。全体胚 3 サンプルのうち、全体胚 1 の遺伝子発現パターンが他のサンプルと異なっていたが、これは産業動物であるウシにおいて想定される、胚毎の遺伝子発現パターンのばらつきを反映していると考えられる。さらに、各 FPKM 値を示す遺伝子数の密度を示したバイオリンプロットでは、全体胚および腔再形成胚で類似した密度分布を示した (図 21)。各サンプル間の遺伝子発現パターンにおける相関係数を算出し、0.92 以上の値を示した際に相関があると判定した結果、全てのサンプル間において相関が認められた (図 22)。

腔再形成胚における TE 優勢発現遺伝子の発現解析

次に、腔再形成胚において TE 優勢に発現する遺伝子に着目して発現パターンを比較した。当研究室が過去に報告した、ウシ ICM および TE から抽出した mRNA によるマイクロアレイのデータより、158 個のウシ TE 優勢発現遺伝子を今回検出された遺伝子群より抽出し、階層型クラスタリング解析を行い、各遺伝子の発現量をヒートマップにより示した (図 23)。その結果、発現遺伝子を全て比較した場合と同様に腔再形成胚 2 および 3 の遺伝子発現パターンが全体胚

の 3 サンプルと類似していた (図 23)。そして、特にウシ胚で重要な TE 優勢発現遺伝子である 12 個の遺伝子 (*CDX2*、*GATA3*、*ZFX*、*GATA2*、*ELF3*、*CCN2*、*SCUBE2*、*PDGFB*、*ATF3*、*DLX4*、*TFAP2A*、および *IFNT*) について、FPKM 値の高低をサンプルごとにヒートマップで示した (図 24)。その結果、腔再形成胚 2 サンプルの *CDX2*、*GATA3*、*ELF3*、*CCN2*、*SCUBE2*、*PDGFB*、*DLX4*、*TFAP2A*、および *IFNT* といった 12 遺伝子中 9 の TE 優勢発現遺伝子における FPKM 値は、最も全体胚のサンプルの発現パターンに近くなっていた。また、他のサンプルにおいては、腔再形成胚 1 について *ATF3*、腔再形成胚 3 について *ZFX* および *GATA2* の FPKM 値が最も全体胚のサンプルに近くなっていた。これらの結果から、発現量にバラつきは認められるものの、全体胚に類似した TE 優勢発現遺伝子の発現パターンを示す割球を再出現させている腔再形成胚が存在することが明らかとなった。

腔再形成胚における全体胚との差次的発現を示す遺伝子群の探索

さらに、腔再形成胚および全体胚において発現差が認められる遺伝子群について検討した。DEG の数を調べたところ、腔再形成胚で発現が上昇していた遺伝子が 99 個、および低下していた遺伝子が 123 個認められた (図 25)。GO によるエンリッチメント解析の結果、DEG においては small-molecule metabolic process、small-molecule biosynthetic process、single-organism metabolic process、organic acid metabolic process、および phosphorus metabolic process regulation など代謝関連の GO term が検出された (図 26 および 27)。さらに、KEGG データベースを用いたエンリッチメント解析の結果からも、DEG で metabolic pathways、glycine, serine and threonine metabolism、および carbon metabolism など代謝関連のパスウェイが検出された (図 28)。

考察

これまで報告されてきたマウス単離 ICM の培養技術を用いた研究において、培養後 CDX2 陽性細胞の出現が認められている [8]。しかしながら、単離 ICM から作出した腔再形成胚が通常の胚盤胞期胚とどの程度類似しているかは精査されていなかった。内外モデルを ICM の単離により証明するためには、腔再形成胚と通常の胚盤胞期胚とでトランスクリプトームを比較検討し、人為操作により外側に配置された ICM 割球が TE 特有の遺伝子発現パターンを獲得したことを示さなければならない。そこで本章では、RNA シーケンスにより全体胚および腔再形成胚の網羅的遺伝子発現パターン、および TE 優勢遺伝子の発現パターンを比較した。まず、胚全体で発現が認められたトランスクリプトーム解析により、腔再形成胚における網羅的な遺伝子発現パターンは全体胚と類似していることが示された。その中でも、TE 分化における重要遺伝子である *GATA2/3* の発現が腔再形成胚において検出された。マウス初期胚において、*Gata2* および *Gata3* をダブルノックアウトすると TE 特異的遺伝子の発現レベルが減少する [39]。一方ウシにおいても、栄養膜細胞から樹立された CT-1 細胞を用いた実験により、*GATA2* および *GATA3* が TE 細胞系列への特異化に重要であることが示されている [40]。これらのことから、腔再形成胚において発現した *GATA2* および *GATA3* は、TE 特異的な遺伝子発現パターンの誘導に関与した可能性を示唆した。今後は、*GATA2* および *GATA3* の発現を抑制したウシ初期胚の発生を調べ、胚盤胞期胚を作出し、単離した ICM を培養後、TE 優勢発現遺伝子の発現解析を行うことが必要である。

反芻動物特異的妊娠認識物質である *IFNT* [41] について、腔再形成胚 3 サンプルのうち、腔再形成胚 2 のみで FPKM 値が正の値を示した (図 24)。近年、*IFNT* の発現が YAP1、TEAD2、および TEAD4 により制御されていることが報告され

ている [42]。第二章において YAP1 の核内移行が認められたことから、腔再形成胚 TE でも *IFNT* の発現は同様の機構により促進されうると考えられる。しかしながら、*IFNT* の FPKM 値は全体胚においてさえ、今回着目した 12 個のウシ TE 特異的遺伝子群中で最も低く、胚盤胞期では十分な発現量に達していないと示唆された。そのような状況においても、TE 特異的遺伝子群の発現パターンが全体胚に最も近かった腔再形成胚 2 では、*IFNT* の FPKM 値も全体胚と遜色ないものであり、YAP1 を介する発現促進が迅速に行われたのかもしれない。また、腔再形成胚 2 では、ウシ胚において *IFNT* の発現に重要と考えられている *CDX2* [43, 44]、*GATA2* [40]、および *GATA3* [40] といった遺伝子の発現が総じて全体胚に近い傾向にあった (図 24)。*IFNT* の発現にはこのような複数の因子による制御が必要であると推測され、腔再形成胚 2 では他の腔再形成胚サンプル 1、3 と比べて、各因子が協調して *IFNT* を発現させたと考えられた。

全体胚および腔再形成胚では概ね遺伝子発現パターンは類似していたが、DEG についても検出された。それらの多くは代謝関連遺伝子であることが判明した (図 26 および 27)。哺乳類初期胚における胚盤胞期には、グルコースをエネルギー源とした解糖系によりピルビン酸を産生することができるようになっており、体細胞と同様ミトコンドリア内で電子伝達系と共役した酸化的リン酸化により ATP が合成されており、マウス胚盤胞期胚においては ICM と比べ TE で合成活性が高い [45]。その理由は、胞胚腔形成に必要な Na^+/K^+ ATPase を用いたナトリウムポンプの駆動を積極的に行うための、TE における高い ATP 要求量を満たすためだと考えられている。電子伝達系構成因子はミトコンドリア DNA および核 DNA にコードされているが [46]、マウス胚盤胞期胚においてミトコンドリア由来因子の発現を間接的に制御するのが TEAD4 である [47]。したがって、TEAD4 の活性は TE 特異的遺伝子の誘導のみならず胚盤胞期における ATP 合成

にも必要であるといえる。ウシ初期胚においても *TEAD4* は *CDX2* をはじめとする TE 特異的遺伝子の発現レベルと相関がある [23]。以上のことから、ウシ胚盤胞期胚においても、代謝関連遺伝子のいくつかは、*TEAD4* などのコア TE 遺伝子の制御下において ICM と比べ TE で高く発現していると考えられ、それが DEG において代謝関連遺伝子が多く検出された結果に結び付いた可能性がある。当研究室では、ウシ *TEAD4* 発現抑制 (KD) 胚が胚盤胞期まで発生することを明らかにしている [23]。そこで今後の研究として、*TEAD4* KD 胚盤胞期胚の ICM を単離および培養して、TE 特異的遺伝子および代謝関連遺伝子の発現量に相関が認められるかどうか調べる実験の実施が考えられる。

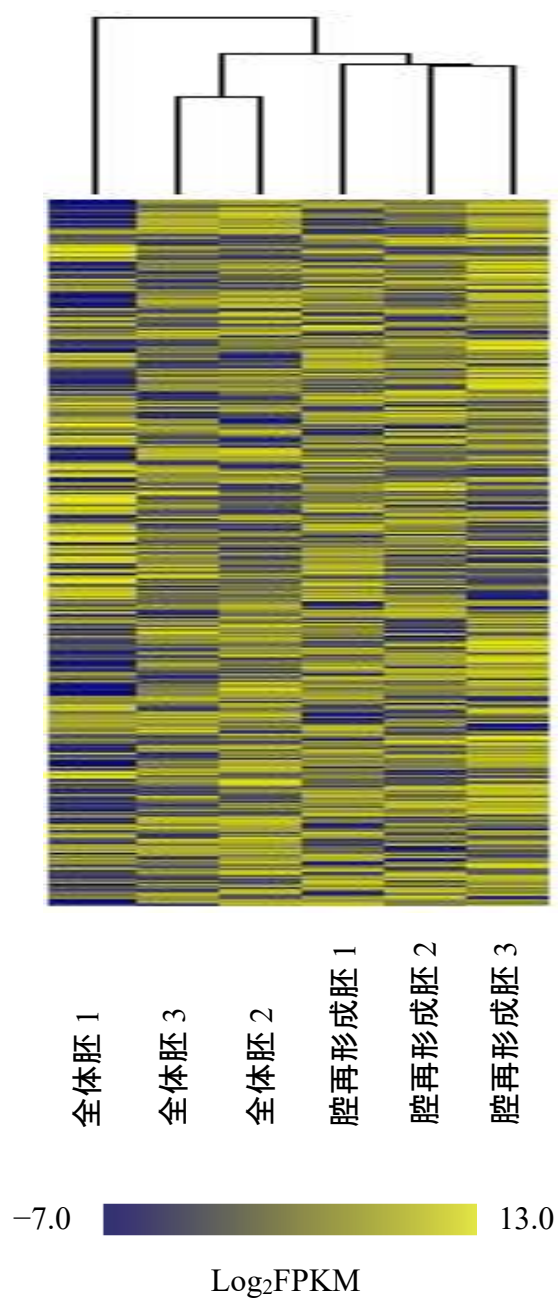


図 20: 階層型クラスタリングによる全体胚および腔再形成胚の網羅的遺伝子発現パターンの類似性.

クラスタリングは距離が近いほどサンプル間における遺伝子発現パターンに類似性が認められることを示す。

FPKM を底 2 で対数変換した値を用い、青が濃いほど発現量が低く、黄色が濃いほど発現量が高いことを示す。

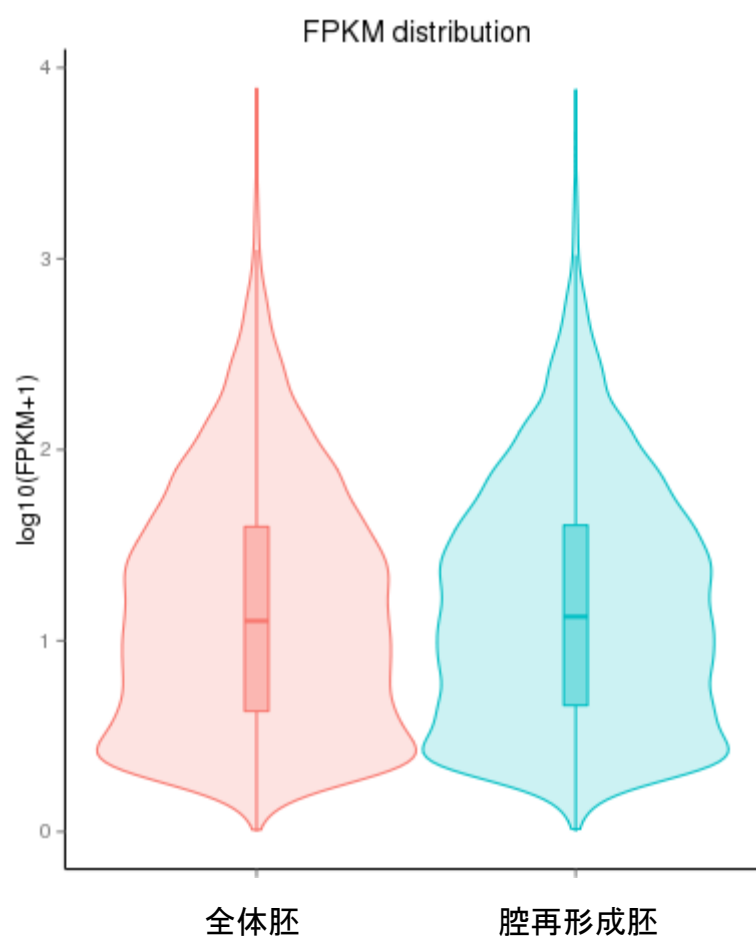


図 21: バイオリンプロットによる全体胚および腔再形成胚の遺伝子発現パターンの類似性.
各発現量における遺伝子数の密度を表しており、中央線は各 3 サンプルの平均値を示している。
FPKM+1 を底 10 で対数変換した値を用いた。

腔再形成胚3	0.955	0.975	0.974	0.98	0.981	1
腔再形成胚2	0.973	0.978	0.978	0.982	1	0.981
腔再形成胚1	0.969	0.975	0.978	1	0.982	0.98
全体胚3	0.973	0.989	1	0.978	0.978	0.974
全体胚2	0.966	1	0.989	0.975	0.978	0.975
全体胚1	1	0.966	0.973	0.969	0.973	0.955
	全体胚1	全体胚2	全体胚3	腔再形成胚1	腔再形成胚2	腔再形成胚3

0.92  1.00

相関係数

図 22: 全体胚および腔再形成胚各サンプル間における遺伝子発現量の相関.

表中の値は FPKM+1 を底 2 で対数変換した値のピアソン相関係数 (R^2) を示す。

$R^2 > 0.92$ で比較したサンプル間の各遺伝子発現量に相関が認められると判定した。

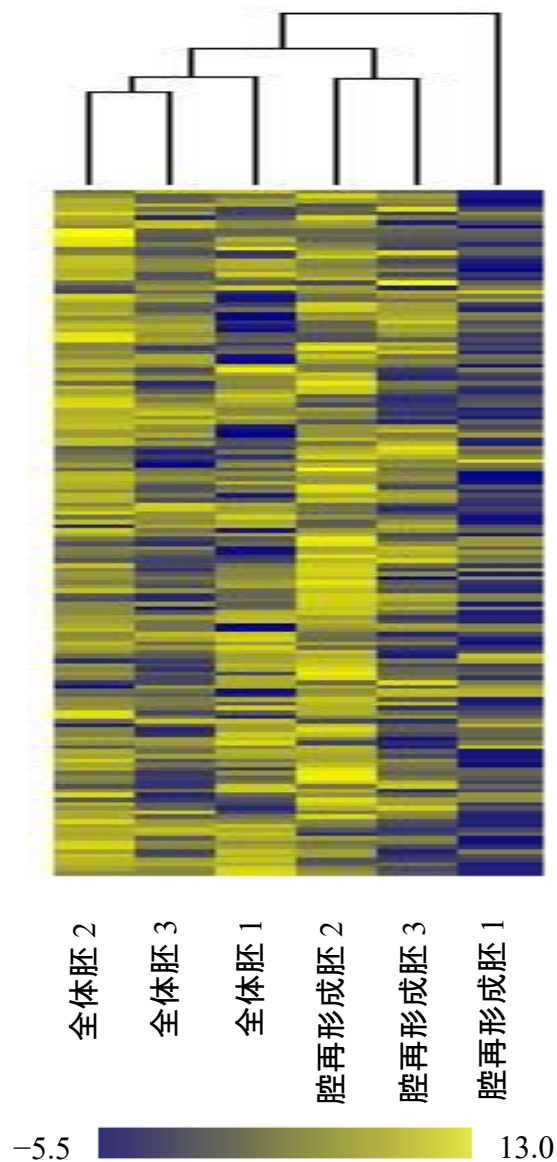


図 23: 階層型クラスタリングによる全体胚および腔再形成胚の TE 特異的遺伝子発現パターンの類似性.

当研究室が過去に報告している 158 個の TE 特異的遺伝子を解析のために選んだ。

クラスタリングは距離が近いほどサンプル間における遺伝子発現パターンに類似性が認められることを示す。

FPKM を底 2 で対数変換した値を用い、青が濃いほど発現量が低く、黄色が濃いほど発現量が高いことを示す。

遺伝子	全体胚 1	全体胚 2	全体胚 3	腔再形成胚 1	腔再形成胚 2	腔再形成胚 3
<i>CDX2</i>	16.99	18.30	17.15	10.54	19.54	16.83
<i>GATA3</i>	55.93	79.34	55.48	49.04	62.82	34.20
<i>ZFX</i>	7.55	9.99	8.99	7.08	7.52	10.82
<i>GATA2</i>	26.45	83.02	44.73	38.85	50.95	54.82
<i>ELF3</i>	18.67	24.20	16.85	9.59	13.45	10.78
<i>CCN2</i>	30.92	28.82	34.55	14.49	25.78	21.45
<i>SCUBE2</i>	13.53	19.65	15.38	4.20	8.22	5.98
<i>PDGFB</i>	1.77	1.84	1.95	1.12	2.16	1.48
<i>ATF3</i>	0.76	2.22	1.86	1.90	1.33	1.35
<i>DLX4</i>	13.03	13.82	10.35	6.10	12.19	7.94
<i>TFAP2A</i>	0.77	1.89	1.04	0.73	3.02	1.90
<i>IFNT</i>	0.19	0.30	0.09	0.00	0.10	0.00

0

85

図 24: 全体胚および腔再形成胚におけるウシ TE 特異的遺伝子の発現量比較.

当研究室が過去に報告している 12 個の TE 特異的遺伝子を解析のために選んだ。

赤い色が濃いほど遺伝子発現量が高いことを示す。

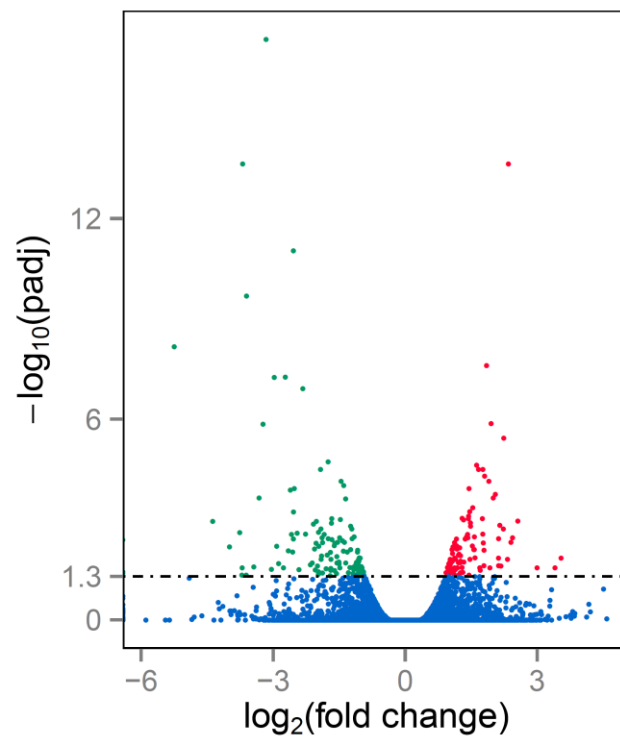


図 25: 全体胚に対する腔再形成胚における DEG の検出.

横軸: 全体胚に対する腔再形成胚の発現量の差

縦軸: P 値を多重比較補正した値 (padj)

赤: 全体胚に対する腔再形成胚の発現量が高い遺伝子群

緑: 全体胚に対する腔再形成胚の発現量が低い遺伝子群

青: 全体胚に対する腔再形成胚の発現量に有意な差が認められない
遺伝子群

破線: $-\log_{10}(\text{padj}) > 1.3$ で有意な差が認められると判定した。

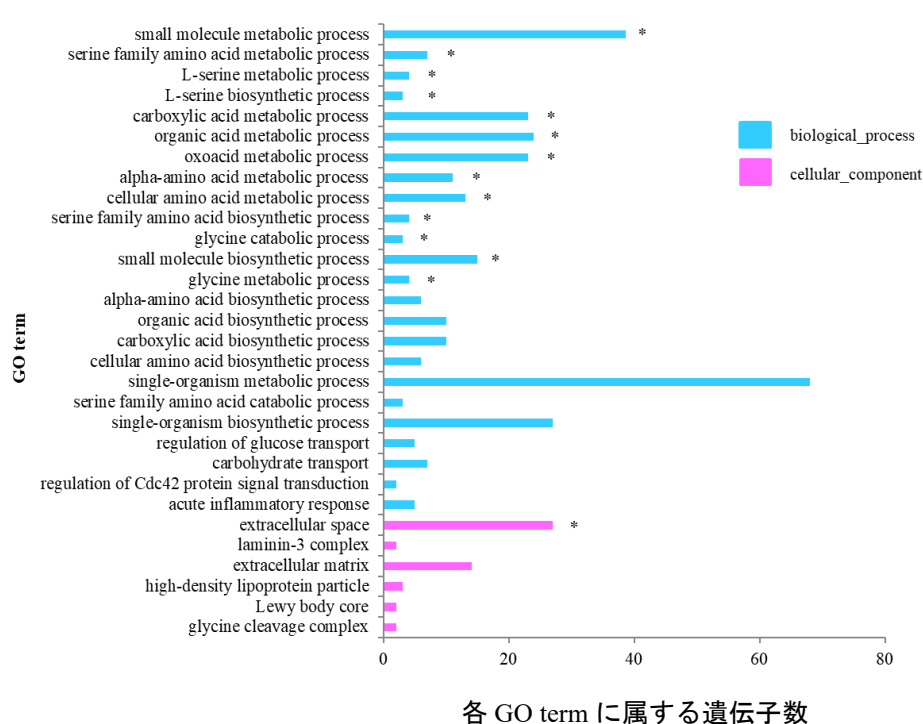


図 26: 腔再形成胚における DEG の機能的分類.

横軸: 各 GO term に属する遺伝子数

縦軸: 各 GO term

青: biological process における GO term に属する遺伝子数

赤: cellular component における GO term に属する遺伝子数

*: GO エンリッチメント解析において属する DEG 数が有意に多いと判定された GO term ($P < 0.05$)

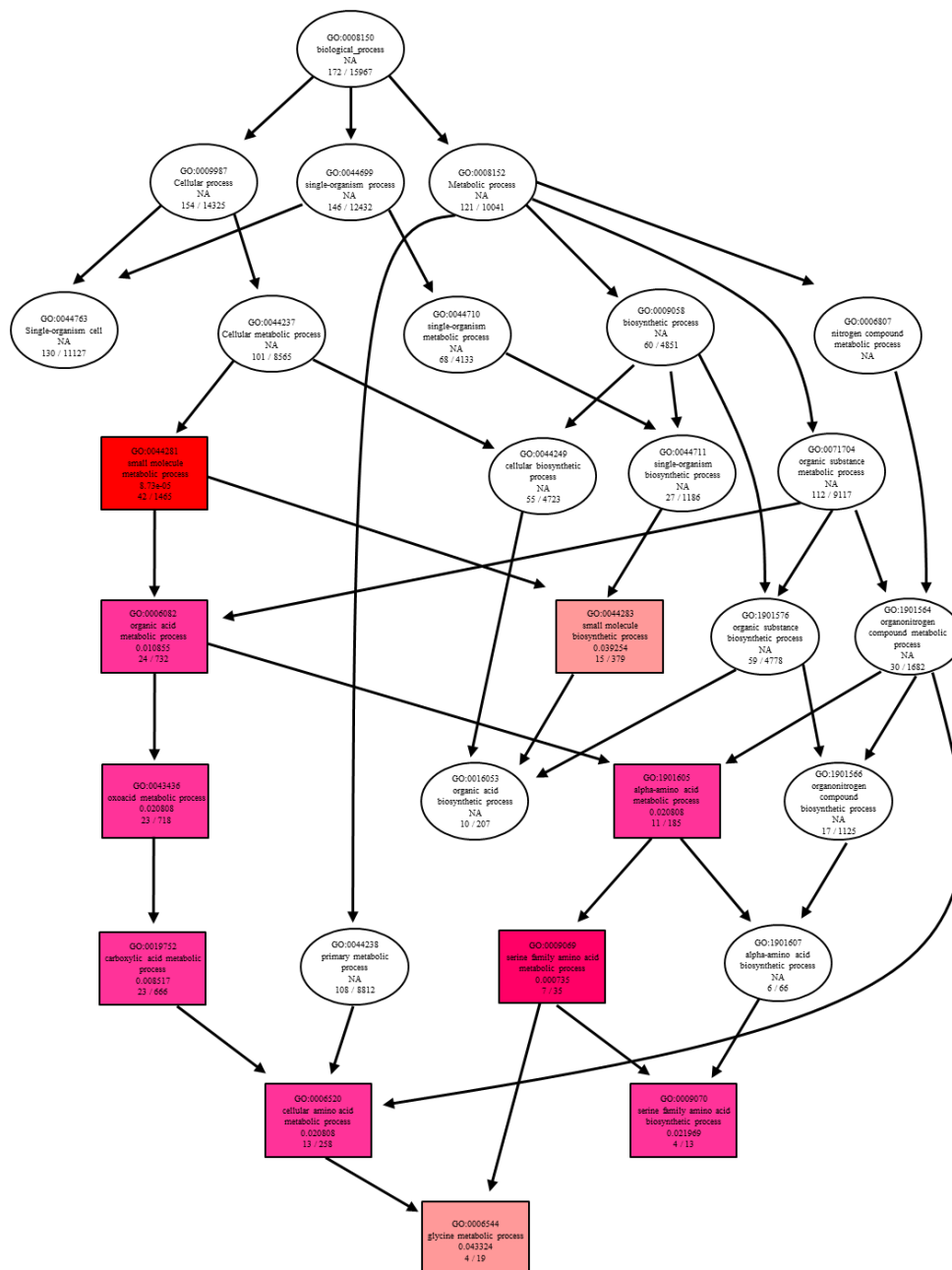


図 27: 腔再形成胚における DEG が属する GO term.

上位に位置する GO term ほど広範囲の生物学的機能を意味する。

P 値が小さい GO term ほど色が濃い赤のノードで示されている。

ノード内の表記について、上から GO accession number、GO term の名前、 P 値、および background 遺伝子に対する DEG の数を表す。

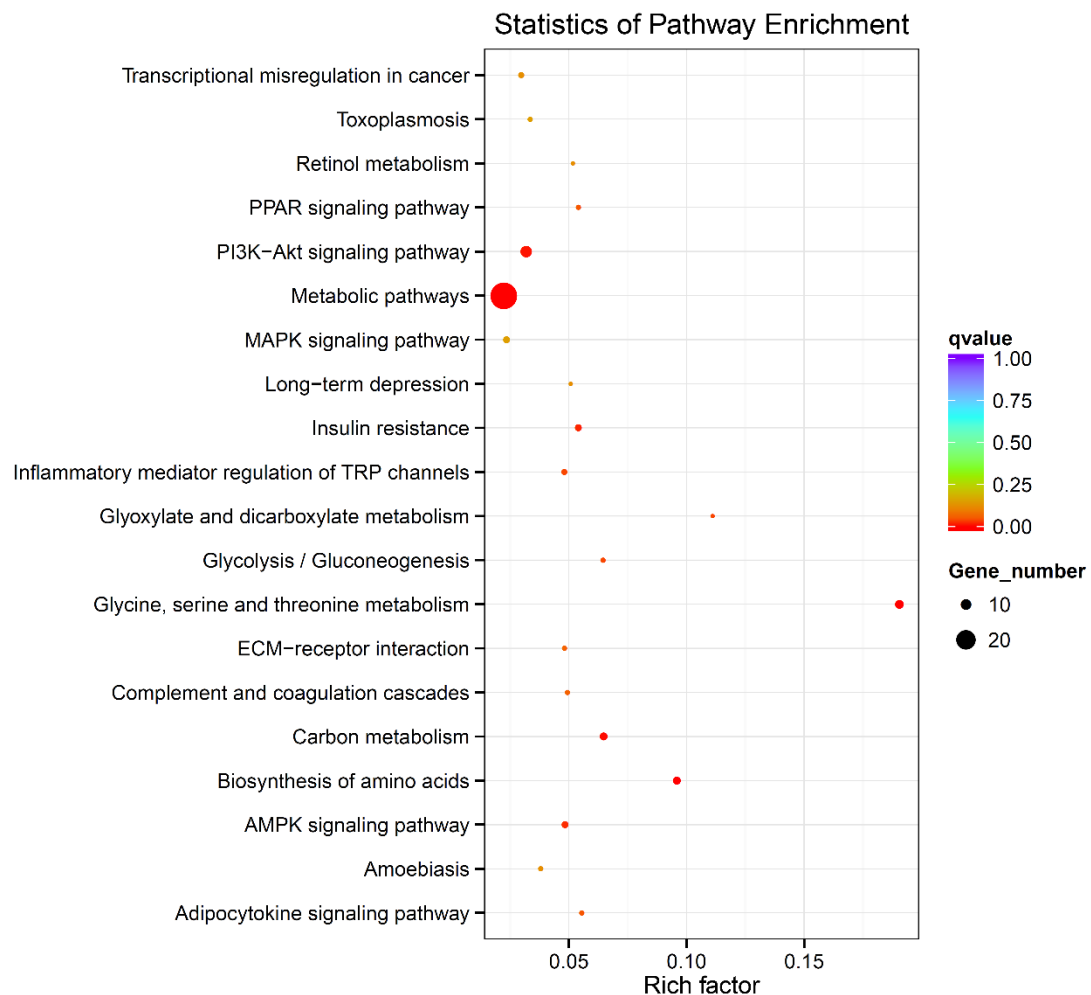


図 28: 腔再形成胚における DEG が属する生物学的経路.

横軸: 検出された全遺伝子数に対する DEG 数の割合

縦軸: DEG が属する各生物学的経路名

各プロットの大きさは属する遺伝子数を表す。

各プロットの色が赤いほど q 値が小さく、青いほど q 値が大きい。

q 値が小さいほど各経路における DEG の濃縮度が高い。

第五章：単離 ICM に由来するマウスおよびウシ腔再形成胚における個体発生能の検証

緒言

第四章までの結果により、一部の腔再形成胚における TE 特異的遺伝子発現パターンは全体胚と類似していることが明らかになった。さらに、腔再形成胚における網羅的な遺伝子発現パターンはすべてのサンプルにおいて全体胚との類似性を示した。これらの結果は、個体発生を完了させるために必要な転写プロファイルが腔再形成胚が全体胚と同様に保持している可能性を示した。そこで本章では、腔再形成胚の個体までの発生能について調べることにした。

マウスにおける胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ESCs) および栄養膜幹細胞 (trophoblast stem cells; TSCs) を凝集させて培養することでブラストイドと呼ばれる胚様体を作出した研究が報告されている [48]。ブラストイドは通常の胚盤胞期胚に類似した TE 特異的遺伝子発現パターンを示すにも関わらず、個体作出に成功していない。第四章の結果から、腔再形成胚において TE 特異的遺伝子発現パターンを獲得していると考えられたが、レシピエントへの受精卵移植によりその個体発生能を検証しない限り、ブラストイドのように出生個体を得られない可能性は排除できないため、腔再形成胚の正常性は証明できない。しかしながら、ICM の単離を用いた研究がウシよりも進んでいるマウスでさえ妊娠満期までの個体発生能を示した研究報告が無い。

また、ICM 単離時の ICM の分化状態について詳しく調べる必要がある。ICM は胚盤胞期後期に、将来卵黄嚢を形成する原子内胚葉 (primitive endoderm; PrE) および胎子本体を形成するエピブラストに分化する [1, 2]。この分化モデルとして「salt and pepper (塩-コショウ)」モデルが提唱されている [49, 50]。PrE および

エピブラストへの分化が予定された各々の割球は、ICM においてランダムな位置関係で配置されている。その後、PrE は胞胚腔に接した ICM の表面に、エピブラストは ICM の内側に位置するようになる。

ウシ胚とマウス胚では、ICM から PrE およびエピブラストへの分化メカニズムが異なると考えられている [51]。単離 ICM において PrE およびエピブラストの分化の状態がウシとマウスで異なり、これが単離 ICM から個体発生を支持する機能的な TE の再出現能力に影響を及ぼすのであれば、ウシおよびマウスそれぞれの単離 ICM で PrE およびエピブラストの分化について比較検討を行う必要がある。そこで本章では、マウスおよびウシそれぞれの腔再形成胚における ICM から PrE への分化状態を比較検討することとした。

材料および方法

1. マウス初期胚の作出

a. 供試動物

本章では特に断りが無い限り、8 から 12 週齢の ICR マウス (Sankyo, Tokyo, Japan) を実験に供した。これらのマウスの飼育環境は $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に設定された動物飼育室で行い、マウスの排卵周期が光周期に影響されることから照明時間は 7:00 から 19:00 とした。すべての実験動物の飼育管理および実験への供試法は「北海道大学における動物実験に関する指針」に従って行った。

b. 過排卵処理

性成熟しており発情兆候が見られない ICR 雌マウスに 150 μL (7.5 IU) の Equine chorionic gonadotropin (eCG) を腹腔内注射し、その 48 時間後に 150 μL (7.5 IU) の Human chorionic gonadotropin (hCG) を同様に投与した。hCG の投与から 16 時間後に採卵を行った。

c. マウス精子前培養 IVC 用微小滴の作製

ペトリディッシュ (35 mm) に Human Tubal Fluid; HTF (付表) [52] の 200 μL 微小滴を作り、流動パラフィンで覆った。IVF の前日から 37°C 、5% CO_2 、湿度 100% の条件下で一晩平衡化した。

d. 卵子採取・媒精用微小滴の作製

ペトリディッシュ (35 mm) に HTF の 100 μL 微小滴を作り、流動パラフィンで覆った。その後、 37°C 、5% CO_2 、湿度 100% の条件下で一晩平衡化した。

e. IVC 用微小滴の作製

ペトリディッシュ (35 mm) に M16 (附表) [53] の 20 μ L 微小滴を作り、流動パラフィンで覆った。その後、37°C、5% CO₂、湿度 100% の条件下で一晩平衡化した。

f. 精子の前培養

頸椎脱臼した 8 から 12 週齢の ICR 雄マウスをキムタオルの上に仰向けに寝かせ、腹部に消毒用アルコールを吹きかけた。外科用ピンセットで腹部の皮膚を持ち上げ、外科用ハサミで切り込みを入れ、切り込み上下の皮膚を両手でつかみ、上下に引き裂いて腹膜を大きく露出させた。外科用ハサミで腹膜に切り込みを入れ、横方向に大きく切り開いた。精巣上体尾部を切り出し、精子前培養用のディッシュに移した。極力空気に触れさせないようにオイル中で 27G の注射針で切り込みを入れ、精液を絞り出して 200 μ L の HTF 微小滴へと誘導し、37°C、5% CO₂、湿度 100% の条件下で 1.5 時間、精子の前培養を行った。

g. 卵子の採取および媒精

hCG の投与から 16 時間後に、頸椎脱臼した ICR 雌マウスをキムタオルの上に仰向けに寝かせ、腹部に消毒用アルコールを吹きかけた。外科用ピンセットで腹部の皮膚を持ち上げ、外科用ハサミで切り込みを入れ、切り込み上下の皮膚を両手でつかみ、上下に引き裂いて腹膜を大きく露出させた。外科用ハサミで腹膜に切り込みを入れ、横方向に大きく切り開いた。卵管を切り出して媒精用ディッシュに移し、オイル中で 18G の注射針 (Terumo) を用いて卵管膨大部を引き裂き COCs を放出させ 100 μ L の HTF 微小滴へと誘導した。次に、COCs が入った HTF 微小滴 1 つあたりの精子数が 2,000 細胞になるように前培養後の精

子を加え、37°C、5% CO₂、湿度 100% の条件下で 6 時間培養した。媒精終了後の卵子を M2 培地 (附表) [54] に移し、100 μ L ガラスキャピラリーをアルコールランプで引き伸ばしたものを用いてピペッティングを行うことで、不要な卵丘細胞や精子などから裸化した。その過程で第二極体を放出しており雌雄の前核が確認できるものを受精卵とし、M16 培地の微小滴内で 37°C、5% CO₂、湿度 100% の条件下で体外培養に供した。

2. マウス ICM 単離および腔再形成胚の作出

酸性タイロド (pH 2.5, 附表) を用いて透明帯を除去した Embryonic day 3.75 (E3.75) における胚盤胞期胚を 0.125% TritonX-100 に 5-10 秒間、わずかに TE が収縮するまで実体顕微鏡下で注意深く観察し、直ちに M2 培地に移して 37°C で 30 分間洗浄した。さらに、ピペッティングすることにより TE を除去して ICM を単離した。平衡化した M16 培地で 3 回洗浄した後、1 つの 10 μ L 微小滴につき単離 ICM を 1 個入れて 24 時間培養し、胞胚腔様の腔形成を調べた。腔形成が認められたものを腔再形成胚とした。

3. マウス単離 ICM 凝集胚の作出

ICM 1 個を培養した場合と比べて、細胞数が多く形態的に大きいマウス腔再形成胚を作出するために、単離 ICM の凝集を行った。PHA 溶液 (附表) に単離 ICM 2 もしくは 3 個を近づけてピペッティングすることにより凝集胚を作出した。その後、マウス腔再形成胚の作出に準じて単離 ICM 凝集胚を培養した。腔形成が認められたものを凝集腔再形成胚とした。

4. マウス YAP1 および CDX2 免疫染色

マウス胚における透明帯を除去した全体胚、単離 ICM、および腔再形成胚を用いて YAP1 および CDX2 の免疫染色を行った。第二章の免疫染色の方法に準じて胚を固定および透過処理した。ブロッキングを 2% BSA 添加 PBS (附表) により 20-22°C で 10 分間行った。また、0.2% BSA 添加 PBS を以下の抗体希釈液として使用した。一次抗体として、anti-YAP1 (H00010413-M01, 1:100) および anti-CDX2 (ab76541, 1:300) を使用した。反応温度は anti-YAP1 および anti-CDX2 でそれぞれ 4°C および 37°C とし、一晩で反応させた。一次抗体反応の後、0.2% BSA 添加 PBS で 2 分間の洗浄を 3 回繰り返した。二次抗体として、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (A11001, 1:400)、および Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (A21428, 1:400) を使用し、20-22°C で 30 分間反応させた。二次抗体反応の後、0.2% BSA 添加 PBS で 2 分間の洗浄を 3 回繰り返した。その後、第二章の免疫染色の方法に準じて核染色、胚のスライドグラスへのマウント、観察、および細胞数の計測を行った。

5. 偽妊娠雌マウスへの腔再形成胚の移植

a. 偽妊娠マウスの用意

マウスの IVF を行った 2 日後の午後 6 時以降に、陰部の腫脹が確認できる交尾適期の ICR 雌マウスを精管結紮した ICR 雄マウスと一晩同居させ交配させた。翌朝、陰部に膣栓がついていた雌マウスを偽妊娠マウスとして別のケージで胚移植を行うまで通常通り飼育した。

b. 胚移植

腔再形成胚を作出できる単離 ICM 培養 24 時間に合わせて、交配後 2.5 日となる偽妊娠雌マウスを使用した。偽妊娠雌マウスを保定し、0.85% 食塩水で 13 倍希釈し 5.0 mg/mL に調製したソムノペンチル麻酔薬 (Schering-Plough, New Jersey, USA) を 450 μ L 腹腔内注射した。その後、マウスの意識混濁を確認してから胚移植手術に供した。胚盤胞期胚をあらかじめ 37°C に温めておいた M2 培地に移した。麻酔のかかった偽妊娠雌マウスをキムタオル上にうつぶせに寝かせ、背中をアルコールで簡易的に除菌して体毛を刈り、背中 of 皮膚を外科用ピンセットで摘み、外科用ハサミで約 1 cm 切開した。切開部から外科用ハサミを入れ、腹膜と皮膚を剥がした。外科用ピンセットにより片側の卵巣付近の腹膜を持ち上げ、外科用ハサミで腹膜を約 5 mm 切開した。続いて、外科用ピンセットを切開部から挿入し、脂肪塊を摘み、脂肪塊、卵巣、子宮を露出させ、脂肪塊をクレンメ (AS ONE, Osaka, Japan) で挟み体内に戻らないように固定した。キャピラリー内に M2 培地と気泡を交互に 9 つ吸引してから胚盤胞期胚を M2 培地とともに吸引し、最後に気泡を 1 つ吸引した。実体顕微鏡下において、外科用ピンセットで子宮を持ち上げ、18G の注射針で血管の少ない部分の片側子宮壁を貫通させた。貫通させた穴からキャピラリーを差し込み、子宮内に 3 から 4 つの気泡とともに腔再形成胚を移植した後、脂肪塊、卵巣、子宮を体内の元の位置に戻した。反対側の子宮にも同様に腔再形成胚を移植し、体内に戻した。胚移植完了後に切開した部分の皮膚を 9 mm オートクリップ (Becton Dickson, USA) で留め動物用イソジン (Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan) で切開部周辺を消毒し、麻酔が切れるまで 37°C のホットプレートで温め、十分に覚醒した後にケージに戻し、妊娠満期である E19.5 まで通常通り飼育した。凝集腔再形成胚については、着床の有無が明確に判断できる E9.5 まで飼育した。

6. 受胎牛への腔再形成胚の移植

第二章のウシ腔再形成胚作出の方法に準じて、単離 ICM を 24 時間培養した腔再形成胚を作出し、受精卵移植に供試した。北海道大学で飼養されている雌ウシに対して腔内プロジェステロン放出装置 (intravaginal progesterone releasing device ; CIDR, InterAg, Hamilton, NZ) で 7 日間処理し、CIDR の装着および取り外しの際に、2 mg 安息香酸エストラジオール、および 25 mg ジノプロストで処理した。CIDR を取り外した後、排卵を超音波装置 (5 MHz, HS101V, Honda Electronics, Tokyo, Japan) により確認した。排卵 6 日目の受胎牛に対して 1 個もしくは 2 個の腔再形成胚の移植を行った。移植後に CIDR を 2 週間装着し、排卵約 30 日後に妊娠診断を行った。

7. SOX17 および CDX2 免疫染色

本章では PrE マーカータンパク質として SOX17 [55] に着目した。マウスおよびウシにおける初期胚および腔再形成胚を第二章および本章の方法に準じて作出した。マウス初期胚発生における SOX17 の発現動態を観察する際に着目した発生ステージは、E3.0 の桑実期、E3.75 および E4.5 の胚盤胞期であった。ウシ初期胚発生における SOX17 の発現動態を観察する際に着目した発生ステージは、D5.5 の桑実期、D6.5 および D8.0 の胚盤胞期であった。一次抗体および二次抗体としてそれぞれ、anti-SOX17 (AF1924, goat polyclonal, 1:1,500; R&D Systems, Minneapolis, USA)、anti-CDX2 (ab76541, 1:300)、Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG (ab150129, polyclonal, 1:400; Abcam)、および Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (A21428, 1:400) を使用した。anti-SOX17 は 4°C で一晩反応させた。他の材料および方法については第二章の免疫染色の方法に準じた。

8. マウス腔再形成胚を用いた定量 PCR

a. RNA 抽出

マウス全体胚および腔再形成胚において、マウス TE 分化関連遺伝子の発現を比較するために、定量 PCR を行った。透明帯を除去した全体胚もしくは腔再形成胚 1 個を 1 サンプルとし、各 5 サンプルずつ total RNA を抽出した。Arcturus® PicoPure® RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) をキット推奨プロトコールに従って RNA 抽出に用いた。

b. cDNA 合成

抽出した RNA サンプル 16 μ L を、高次構造を解除するために 65°C、5 分間加熱し直後に急冷した。ここに 4 μ L の ReverTraAce qPCR RT MasterMix (TOYOBO) を加え、全体の液量を 20 μ L に調整したのち、37°C で 15 分間、50°C で 5 分間、98°C で 5 分間インキュベートすることにより逆転写反応を行った。逆転写反応により得られた cDNA 溶液は、使用時まで-20°C で保存した。

c. 定量 PCR

氷上で、THUNDERBIRDTMSYBR®qPCR MIX (TOYOBO) を 5 μ L、フォワードプライマーおよびリバースプライマー (付表) (5.0 μ M) 各 1.0 μ L、cDNA 溶液を 1.0 μ L、滅菌水 2.0 μ L を混合し、96 ウェルプレート (Roche Diagnostics、Indianapolis、IN、USA) にアプライした。卓上遠心機 (Mini plate spinner centrifuge、Labnet、Edison、NJ、USA) で反応液をスピンドウンし、Light Cycler®1.2 (Roche、Basel、Switzerland) にプレートを挿入し反応を開始した。反応条件は、95°C 30 秒を 1 サイクル、95°C 10 秒、60°C 15 秒、72°C 30 秒を 60 サイクルで行い、最

後に 95°C 10 秒で一度変性させてから 65°C 15 秒の後、95°C まで毎秒 0.19°C ずつ加熱することにより融解曲線を作成し、増幅産物の特異性を確認した。各遺伝子について 3 回繰り返し実験を行い、得られた Ct 値から $\Delta\Delta Ct$ 法による相対発現レベルの比較を行った。内部標準には *Gapdh* を用いた [56]。

結果

マウスおよびウシにおける腔再形成胚の特徴比較

マウス胚における単離 ICM を 24 時間培養したところ、腔の再形成は認められたが、ウシ胚と比べると胚が小さかった (図 29)。腔の再形成率をマウス胚およびウシ胚で比較したところ、その値はそれぞれ 57.1 および 97.2% であり有意な差が認められた (図 30、 $P < 0.01$)。これまで、ウシ胚における腔再形成胚の総細胞数を示した研究報告が無いため、腔再形成胚形成過程における総細胞数の推移を示し、マウス胚と比較することとした。マウス胚における総細胞数は、全体胚、単離 ICM、および腔再形成胚でそれぞれ 43、14、および 7 個と減少していた (図 31)。一方ウシ胚において、全体胚および単離 ICM の総細胞数はそれぞれ 87 および 36 個であったが、腔再形成胚で 57 個と全体胚より少ないものの ICM 単離直後に比べると総細胞数が増加していた (図 32)。マウス腔再形成胚における TE マーカーである CDX2 および YAP1 の発現を免疫染色により観察した。その結果、CDX2 陽性細胞の出現および YAP1 の核内移行が認められ、これは過去の知見 [8] と一致していた (図 33)。

マウス腔再形成胚における個体発生能の検討

次に、マウス腔再形成胚を用いて偽妊娠雌マウスへの胚移植を行うことで、腔再形成胚の個体発生能を検証した。まず、ICR マウス卵母細胞から作出した合

計 59 個の腔再形成胚を移植したが、妊娠満期の E19.5 で剖検したところ、着床痕が認められなかった (表 3)。さらに、マウスの系統間による個体発生能の違いによる影響を調べるために、C57BL6 および DBA/2 の交雑種である B6D2F1 マウスの卵母細胞を用いて腔形成胚を 61 個作出した。受精卵移植に供試したが、同様に着床痕は認められなかった。そこで、細胞数が多く形態的に大きな腔再形成胚を用いた場合、その個体発生能に差が認められるか検証するために、2 もしくは 3 個の単離 ICM を凝集して作出した凝集腔再形成胚を受精卵移植に供試した。凝集腔再形成胚は、1 個の単離 ICM から作出した腔再形成胚と比べて大きな胚となった (図 34)。その胚を受精卵移植に供試したところ、E9.5 において着床痕が認められたが、生存胎子は認められなかった (表 4)。これらの結果から、マウス腔再形成胚は個体発生能を保持していない可能性が高いと考えられた。

ウシ腔再形成胚における個体発生能の検討

次に、受胎牛 3 頭に対してウシ腔再形成胚を 4 個移植したところ (2017 年 9 月 15 日)、1 頭に 2 胚移植した受胎牛で妊娠 282 日 (2018 年 6 月 24 日) において雌牛 1 頭の産子が得られた (図 35)。得られた子牛の体重は 46 kg であった。得られた後産の形態は正常であり、胎盤小葉の数が 92 個であった (図 36)。これら結果から、一部のウシ腔再形成胚は個体発生能を有することが示された。

マウス初期胚発生における SOX17 発現動態の解析

ウシの比較対象であるマウスの初期胚発生における SOX17 発現動態を調べるために、E3.0 の桑実期から E4.5 の胚盤胞期各発生ステージにおける SOX17 免疫染色を行った (図 37)。その結果、桑実期における SOX17 のシグナルは認められなかった。E3.75 の胚盤胞期から ICM の核内でそのシグナルは認められ、各

SOX17 陽性の割球が ICM でランダムに配置されていた。さらに E4.5 胚盤胞期において、胞胚腔に接している ICM の表面に位置する割球の核内でそのシグナルが認められた。これらの結果から、マウス初期胚発生において、SOX17 が胚盤胞期から検出され、そのシグナルは ICM 特異的であることが示された。

ウシ初期胚発生における SOX17 発現動態の解析

ウシ初期胚発生における SOX17 タンパク質の発現動態はほとんど調べられていないため、D5.5 の桑実期から D8.0 の胚盤胞期各発生ステージにおける SOX17 免疫染色を行った (図 38)。その結果、D5.5 の桑実期および D6.5 の胚盤胞期において SOX17 のシグナルは胚内での相対位置にかかわらず、ほとんどの割球の核内で検出された。しかしながら、D8.0 の胚盤胞期においてそのシグナルは ICM 特異的となった。

ウシおよびマウス腔再形成胚における SOX17 および CDX2 の局在比較

ウシおよびマウス腔再形成胚における分化状態を比較検討するために、全体胚、単離 ICM、および腔再形成胚について SOX17 および CDX2 の二重免疫染色を行った (図 39 および 40)。マウスの全体胚において SOX17 および CDX2 のシグナルはそれぞれ ICM および TE の核内で検出され、単離 ICM において SOX17 のシグナルのみが検出された。マウス腔再形成胚において SOX17 および CDX2 は検出されたが、これらのタンパク質の共局在が顕著に認められた (図 39)。ウシの全体胚において、SOX17 について ICM および TE 両方、CDX2 について TE の核内でそれぞれシグナルが認められ、TE において SOX17 および CDX2 は多くの割球で共局在を示した。単離 ICM におけるシグナルは SOX17 のみ認められた。ウシ腔再形成胚においては、全体胚と同様に SOX17 および CDX2 が共局在を示している割球が認められた (図 40)。

ウシおよびマウス腔再形成胚における SOX17 および CDX2 陽性細胞数の比較

SOX17 および CDX2 の共局在が認められる割球数を比較するために SOX17 陽性細胞数および CDX2 陽性細胞数の総細胞数に対する細胞構成比を算出した (表 5、図 41)。マウスにおける SOX17 陽性かつ CDX2 陽性の細胞の割合は全体胚で 0.8% とほとんど認められなかったが、腔再形成胚で 12.7% と多く認められた。この結果から、マウス腔再形成胚における TE および PrE の分化マーカーの局在パターンは全体胚と大きく異なり、異所性の局在を示していると言える。一方、ウシにおける SOX17 陽性かつ CDX2 陽性の細胞の割合は全体胚で 30.6% と多く、腔再形成胚においても 6.9% 認められた。ウシ腔再形成胚におけるこれらタンパク質の局在パターンは、通常の胚盤胞期胚である全体胚にも認められるため正常であると考えられた。

マウス腔再形成胚における TE 分化関連遺伝子の発現

マウス腔再形成胚を偽妊娠雌マウスへの胚移植に供試した結果、出生個体が得られなかった (表 3)。この結果から、マウス腔再形成胚における TE 特有の遺伝子発現パターンが誘導されていない可能性が考えられたため、マウス胚において TE 分化関連遺伝子として知られる *Cdx2* [7]、*Gata2* [39]、*Gata3* [39,57]、*Eomes* [58]、*Tfap2c* [59]、*Fgfr1* [60]、*Esrra* [61]、*Pard6b* [62]、*Krt8* [63]、および *Id2* [63] の発現量をマウス全体胚および腔再形成胚で比較した。その結果、*Cdx2*、*Gata3*、*Eomes*、*Krt8*、および *Id2* の発現がマウス全体胚および腔再形成胚で検出された (図 42)。一方、マウス全体胚において発現が認められた *Gata2*、*Tfap2c*、*Fgfr1*、*Erssa*、および *Pard6* について、マウス腔再形成胚における発現が検出されなかった (図 43)。さらに、第二章におけるウシ全体胚および腔再形成胚サンプルを

用いた RNA シーケンスにより検出した遺伝子群から、マウス腔再形成胚において発現が見られなかった *Gata2*、*Tfap2c*、*Fgfr1*、*Erssa*、および *Pard6* を選択し、ウシ胚における FPKM 値を示した (図 44)。その結果、ウシ全体胚および腔再形成胚でこれら遺伝子の発現が検出された (図 44)。以上の結果から、ウシ胚と異なり、マウス腔再形成胚は TE 特有の遺伝子発現パターンを獲得していない可能性が示唆された。

考察

マウス単離 ICM における、TE 再出現の検証は古くより行われてきた [4–6]。単離 ICM の培養の結果、腔の形成が認められ、TE マーカーである CDX2 発現も確認されている [4–6]。しかしながら、腔の形成と CDX2 発現の確認のみでは外側に位置する割球が TE である証明としては不完全である。なぜなら、TE 様の割球が個体発生をサポートするための機能を有するかは不明であるからである。個体発生能について、マウス体細胞クローン胚では TE および ICM の分化マーカーが発現しているにも関わらず [64–67]、個体までの発生効率が低いことが分かっている [64,65]。さらに、胚盤胞期胚様の構造物であるブラストイドもマーカータンパク質の発現は確認されているが、個体発生はできない [48]。本研究でも、CDX2 発現を確認したマウス腔再形成胚の偽妊娠雌マウスへの移植の結果、生存胎子が得られなかった。本章の結果から、マウス腔再形成胚は個体までの発生能を保持していなかったことから、マウス単離 ICM から再生した TE 様の細胞は機能的に完全な TE の性質を獲得していないと考えられた。

一方、ウシ腔再形成胚を受胎雌牛に移植すると産子が得られたが、移植した 4 個の腔再形成胚のうち 1 個しか個体発生を完了することができなかった。これは第四章における網羅的遺伝子発現解析の結果から説明できるかもしれない。ウシ腔再形成胚における TE 特異的遺伝子の発現量はサンプル間でバラつきが高く、全体胚と比べて似ている胚が一部認められた。さらに、DEG 解析により代謝関連遺伝子の多くが全体胚と腔再形成胚との間で差があることが判明し、これは TE 特異的遺伝子の発現量が全体胚と比べて低い腔再形成胚のサンプルによる結果を反映している可能性がある。つまり、最も網羅的遺伝子発現パターンが全体胚と類似している腔再形成胚が個体発生を完了させる能力を有していたと推測される。得られた出生個体が雌ウシであった原因として、ウシ初期

胚における代謝の違いや IFNT 産生量の違いが挙げられる。ウシ初期胚発生において雄胚のグルコース代謝が雌胚と比べて 2 倍と高い [68]。第四章において、ウシ腔再形成胚と全体胚との差次的発現遺伝子を機能ごとに分類したところ、代謝関連遺伝子が検出された (図 26-28)。これらのことから、雄胚と比べてグルコース代謝が活発ではない雌胚において、代謝関連遺伝子発現異常の個体発生への影響が少なかったと推測される。そして、反芻動物特異的妊娠認識物質である IFNT の産生量は雄胚と比べて雌胚で 2 倍である [69]。第四章において、ウシ腔再形成胚サンプルの中で腔再形成胚 2 の IFNT の発現レベルが全体胚のレベルに近づいており、このサンプル中に雌胚が多く含まれていたと考えられた。

マウスとウシの腔再形成胚において個体発生能に明確な差がみられた。この原因を探るために、ICM における PrE 細胞分化マーカーである SOX17 の発現動態に着目した。SOX17 は sex-determining region Y-related high-mobility group box (SOX) ファミリーに属する転写因子であり、造血幹細胞の維持 [70]、腸内胚葉の形成 [71]、および心血管の発生 [72] など様々な発生の過程に関与している。さらに、マウス ES 細胞において *Sox17* を欠損させると胚体外内胚葉細胞の樹立はできないことが報告されている [73]。

まず、マウス初期胚発生における SOX17 発現動態について整理した。SOX17 は E3.5 から ICM 特異的に発現し始め、E4.5 において層状に配置された PrE 特異的な発現を示すことが報告されている [55]。この研究報告は本章の結果と一致した。次に、マウス腔再形成胚における SOX17 の局在について調べると、TE マーカーである CDX2 との共局在が認められた。これは通常の初期胚発生ではほとんど認められない。マウスにおける単離 ICM を用いた研究報告によると、同じ PrE のマーカータンパク質である GATA4 が単離および培養された ICM において外側に位置する割球の核内で発現することが知られている [8]。単離後培

養した ICM において、ICM の外側に位置していた SOX17 陽性細胞が CDX2 も発現したことで、細胞の運命が TE か PrE かで定まらずに腔再形成胚は個体発生を支持する機能的な TE を形成できなかったと考えられた。

ウシ初期胚発生における SOX17 の局在パターンは最近報告されたばかりであり、32-64 細胞においてほとんどの割球で核内にそのシグナルが認められる [74]。本研究ではさらに、発生ステージとして桑実期および胚盤胞期に分けて SOX17 の発現動態を観察したが、少なくとも D6.5 の胚盤胞期まではほとんどの割球で核内にシグナルが認められたことから過去の知見と矛盾しない。さらに発生が進行したウシ D8.0 における胚盤胞期胚では、SOX17 が ICM 特異的な発現を示すことを突き止めた。胚盤胞期胚形成直後の時期から SOX17 が ICM 特異的な発現を示すマウス胚と比べて、ウシ胚では、ICM から PrE およびエピブラストへの分化が緩やかに進んでいると考えられる。そして、同じ PrE マーカーである GATA6 は D5.0 から D7.0 までほとんどの割球の核内に局在している [51]。また、GATA4 は D8.0 においてほとんどの割球の核内に局在している [51]。そして、ウシ腔再形成胚では、SOX17 および CDX2 は同じ割球に共局在しており、通常のウシ胚盤胞期胚と同様であった。従って、腔再形成胚の作出に使用した D6.5 におけるウシ胚盤胞期胚において、ICM から PrE およびエピブラストへの分化はマウス胚程進行しておらず、外側に位置する割球が TE としての機能を獲得したと推測された。

以上の考察から本研究で使用した E3.75 のマウス ICM よりも発生ステージが早い時期におけるマウス ICM を使用すれば、ウシ胚同様に機能的 TE を再生できる可能性は排除できない。しかし、E3.75 以前の胚盤胞期胚から ICM を単離することは極めて困難であり、本研究でも試みたが単離することができなかった。将来的には、E3.75 以前のマウス胚盤胞期胚より ICM を単離して培養する

方法を構築することで、マウスとウシ間における初期胚分化決定時期の相違を明確にできると考えられる。

あるいは、マウスおよびウシの繁殖戦略の違いが ICM の TE 再生能力に関わっているかもしれない。マウスは多胎かつ胚発生が速い動物であり、種として維持するためのマウス一匹当たりの生死の重みが低い。仮に、少数のマウス胚盤胞期胚における ICM および TE への分化が失敗して胎性致死になったとしても、他の多数の胚が妊娠満期まで個体発生することができれば種の存続に大きな影響はないと考えられる。一方、ウシは単胎かつ胚発生がマウスと比べて遅い動物である。ウシ胚盤胞期胚における ICM および TE への分化が失敗して胎性致死となれば、死滅した胚の代わりとなるウシ胚は母体中において基本的に存在しない上、受精から胚盤胞期までの発生速度がマウスと比べて長いこと [75]、種の存続に大きな影響を与えることになる。よって、マウスと比べて胚の生死が種の維持を大きく左右するウシの胚盤胞期胚では、ICM および TE への分化に失敗しても、一方の細胞系列からもう片方の細胞系列を生み出すことで胚の生存確率を上げているのではないかと考えられる。

さらに、マウス腔再形成胚において、TE 分化関連遺伝子の中でも *Gata2*、*Tfap2c*、*Fgfr1*、*Erssa*、および *Pard6* の発現が検出されなかった (図 43)。その中でも、*PARD6B* は細胞極性マーカーであり、第三章で述べたように、細胞極性は ICM/TE 分化制御に関与している [62]。さらにマウス胚において、*TFAP2C* は細胞極性の有無および *ROCK* シグナルの ON/OFF を制御することで ICM/TE 分化に関与していると考えられている [59]。そして、*GATA2* はマウス TE が個体発生を支える機能を発揮するために重要な因子であると考えられている [76]。このように、個体発生支持能を有する TE への分化確立に重要な遺伝子が全体胚と比べて発現していないために、マウス腔再形成胚は妊娠満期までの個体発生を完了で

きなかったと考えられた。

表3: 腔再形成胚における偽妊娠マウスへの移植成績

ドナー卵子の マウス系統	移植胚数	レシピエント 雌マウス数	着床数 (%)	出生個体数 (%)
ICR	59	7	0 (0)	0 (0)
B6D2F1	61	3	0 (0)	0 (0)

表4: 凝集腔再形成胚における偽妊娠マウスへの移植成績

移植胚数	レシピエント 雌マウス数	着床数 (% $\pm$ SEM)	生存胎子数 (%)
39	5	5 (12.8 $\pm$ 12.7)	0 (0)

表5: 総細胞数に対するSOX17/CDX2陽性細胞構成比

各タンパク質陽性 (+) および 陰性 (-) 細胞構成比 (%)	全体胚		単離ICM		腔再形成胚	
	マウス	ウシ	マウス	ウシ	マウス	ウシ
SOX17 ⁻ /CDX2 ⁻	17.1	33.1	83.7	65.2	32.1	53.2
SOX17 ⁺ /CDX2 ⁻	2.9	12.8	16.3	34.8	6.1	7.6
SOX17 ⁺ /CDX2 ⁺	0.8	30.6	0.0	0.0	12.7	6.8
SOX17 ⁻ /CDX2 ⁺	79.2	23.5	0.0	0.0	49.0	32.4

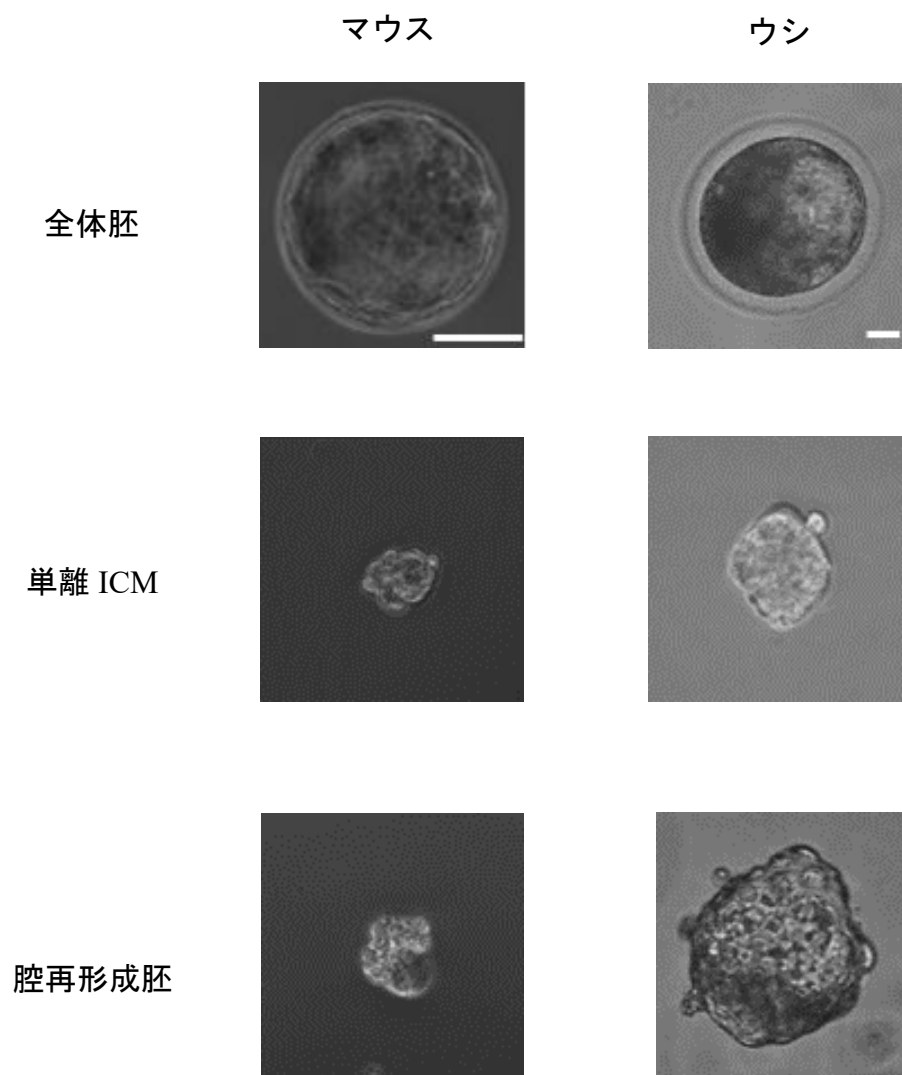


図 29: マウスおよびウシにおける腔再形成胚の比較.
Bar = 50 μ m

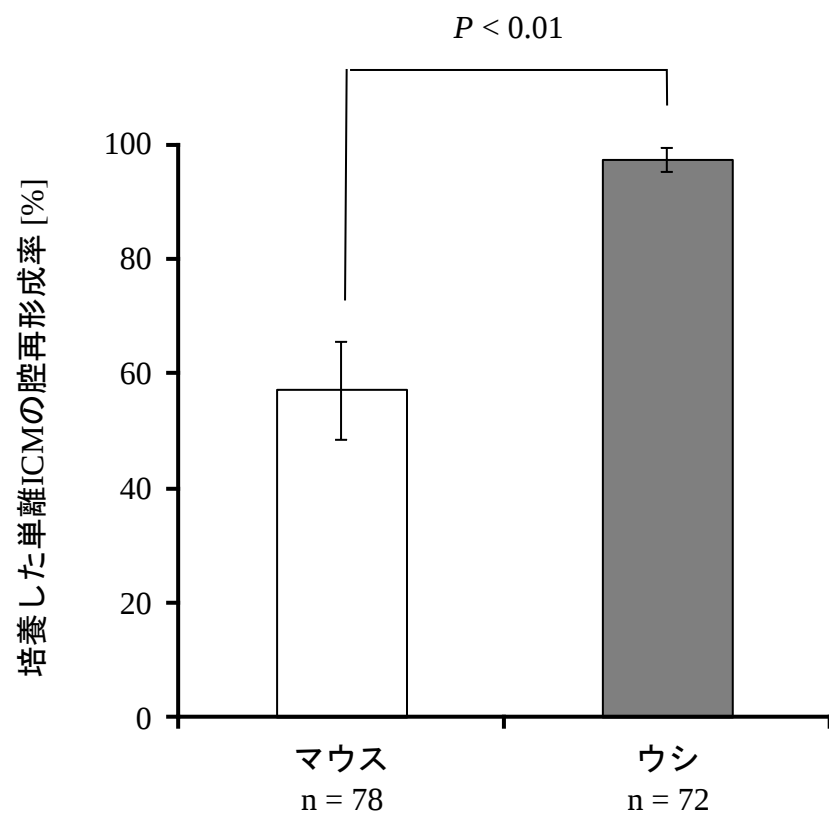


図 30: マウスおよびウシにおける培養した単離 ICM の腔再形成率の比較.

白: マウス、グレー: ウシ

n は供試胚数を示す。

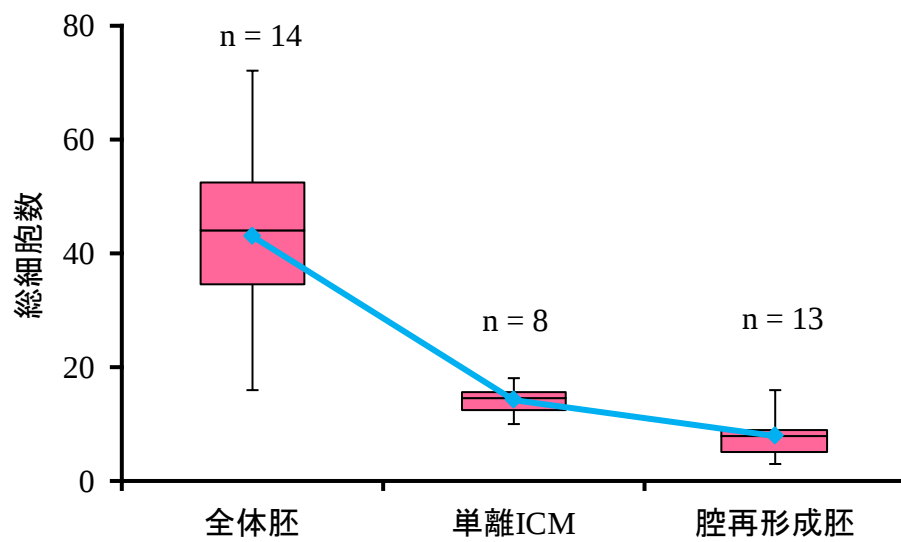


図 31: マウス腔再形成胚形成過程における総細胞数の推移.
 各総細胞数を箱ひげ図で表し、最小値から最大値までの 4 分位数を示している。
 青い線は各総細胞数の平均値およびその推移を示す。
 n は供試胚数を示す。

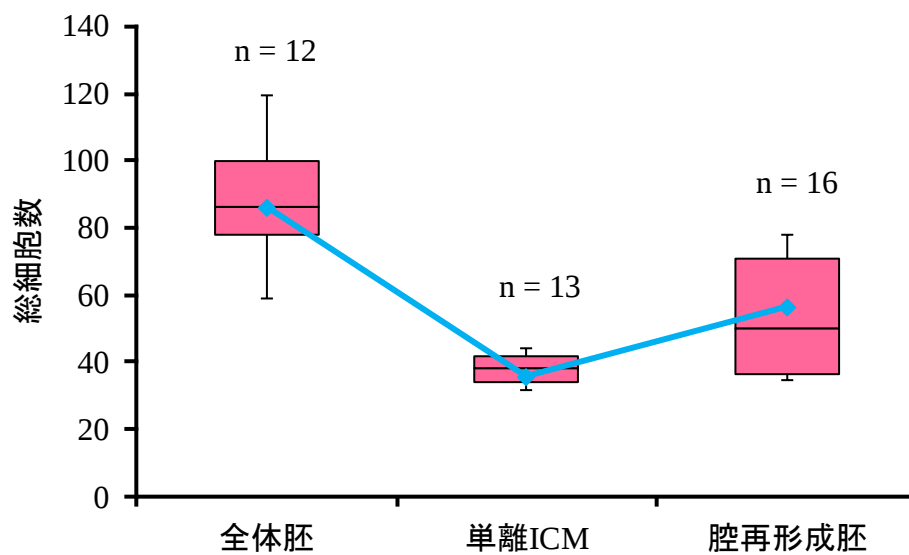


図 32: ウシ腔再形成胚形成過程における総細胞数の推移.
 各総細胞数を箱ひげ図で表し、最小値から最大値までの 4 分位数を示している。
 青い線は各総細胞数の平均値およびその推移を示す。
 n は供試胚数を示す。

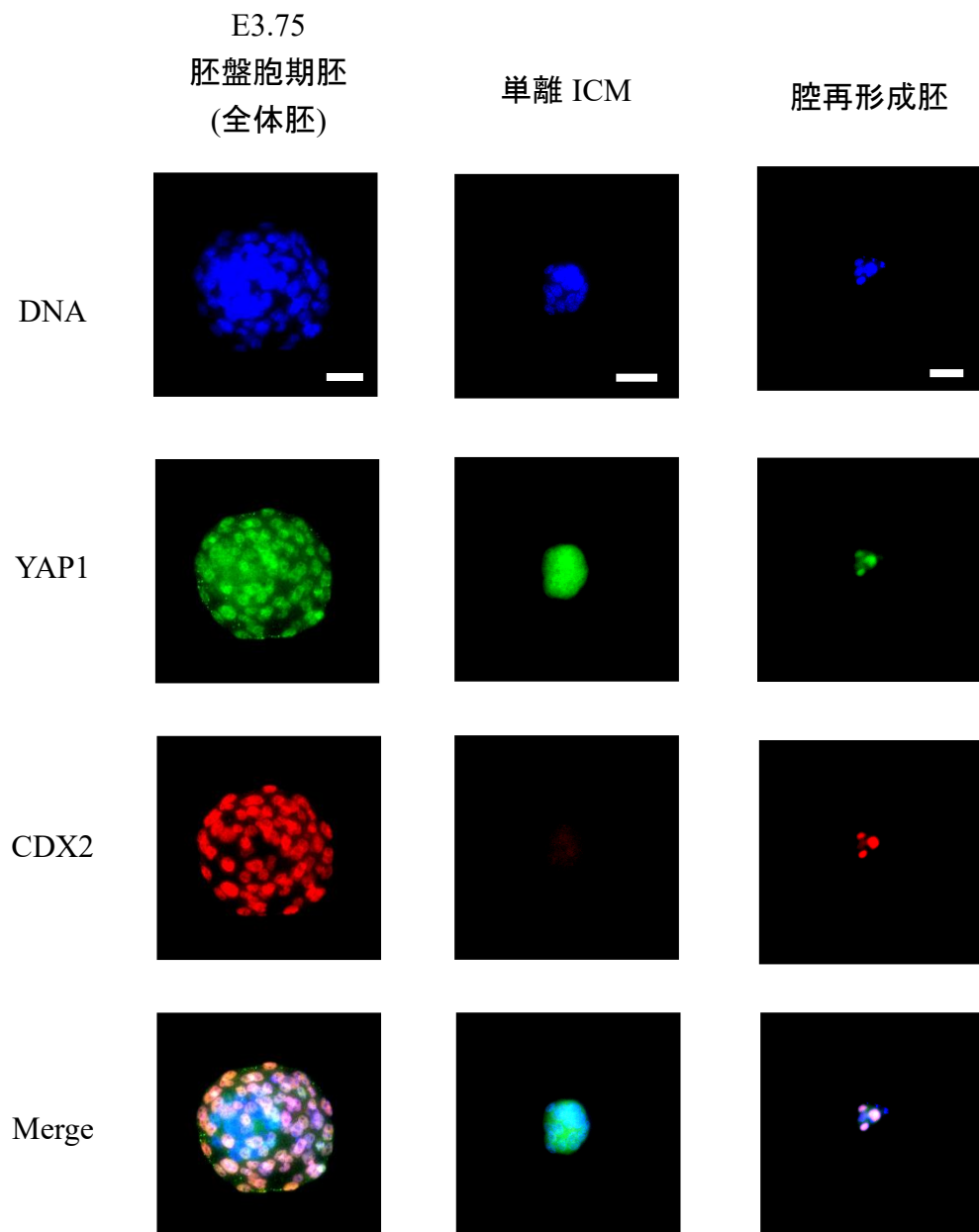


図 33: マウス腔再形成胚形成過程における YAP1 および CDX2 の発現動態.

青: DNA、緑: YAP1、赤: CDX2

Bar = 50 μ m

顕微鏡: 蛍光顕微鏡

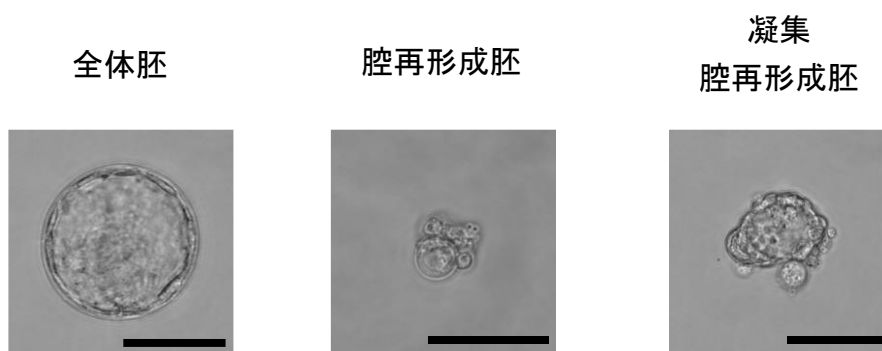


図 34: マウス単離 ICM の凝集により作出した腔再形成胚.
Bar = 75 μ m



図 35: 出生後 1 か月のウシ腔再形成胚由来雌牛.



図 36: 腔再形成胚由来個体出生後に得られた受胚牛の後産.
胎盤小葉の数は 92 個であった。

Bar = 30 cm

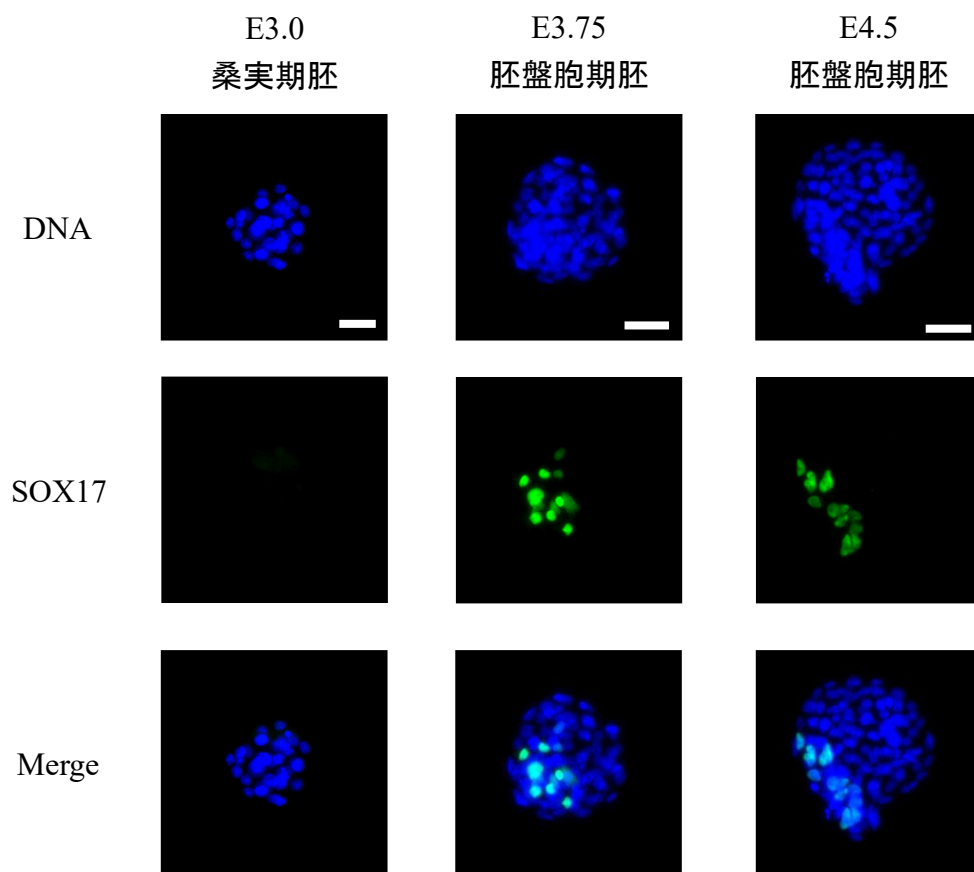


図 37: マウス初期胚発生における SOX17 発現動態.

青: DNA、緑: SOX17

Bar = 50 μ m

顕微鏡: 蛍光顕微鏡

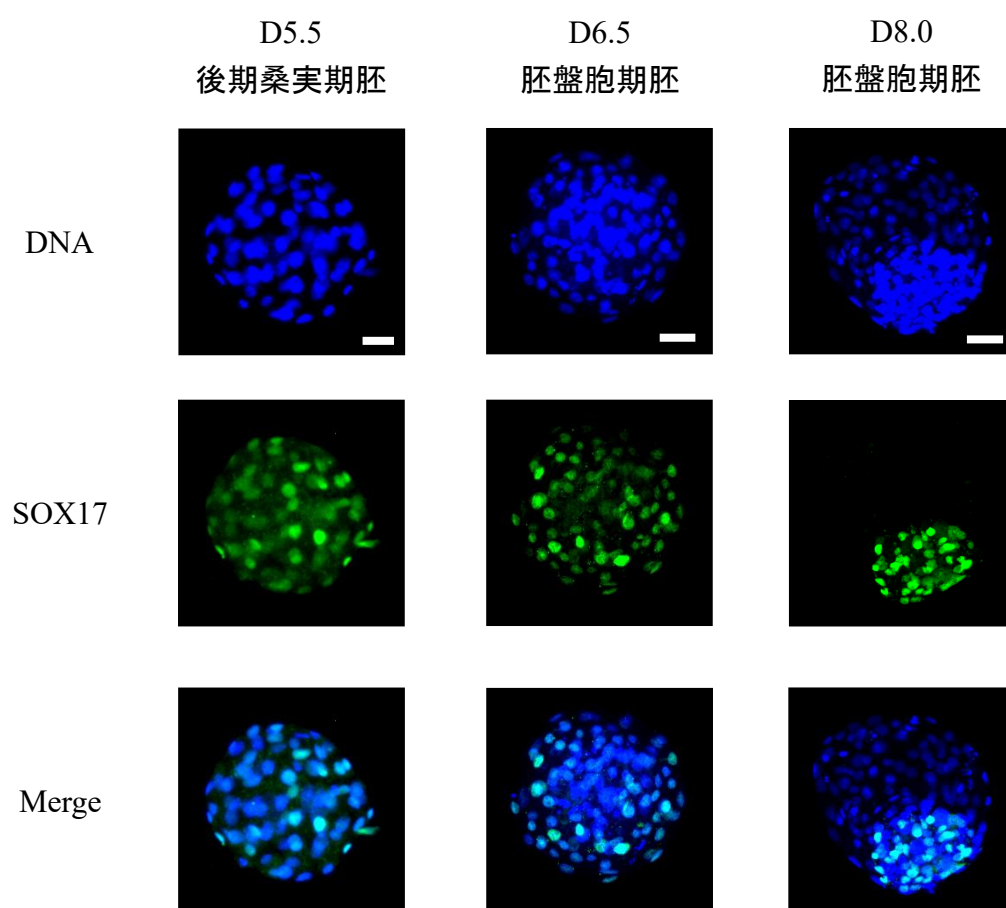


図 38: ウシ初期胚発生における SOX17 発現動態.

青: DNA、緑: SOX17

Bar = 50 μ m

顕微鏡: 蛍光顕微鏡

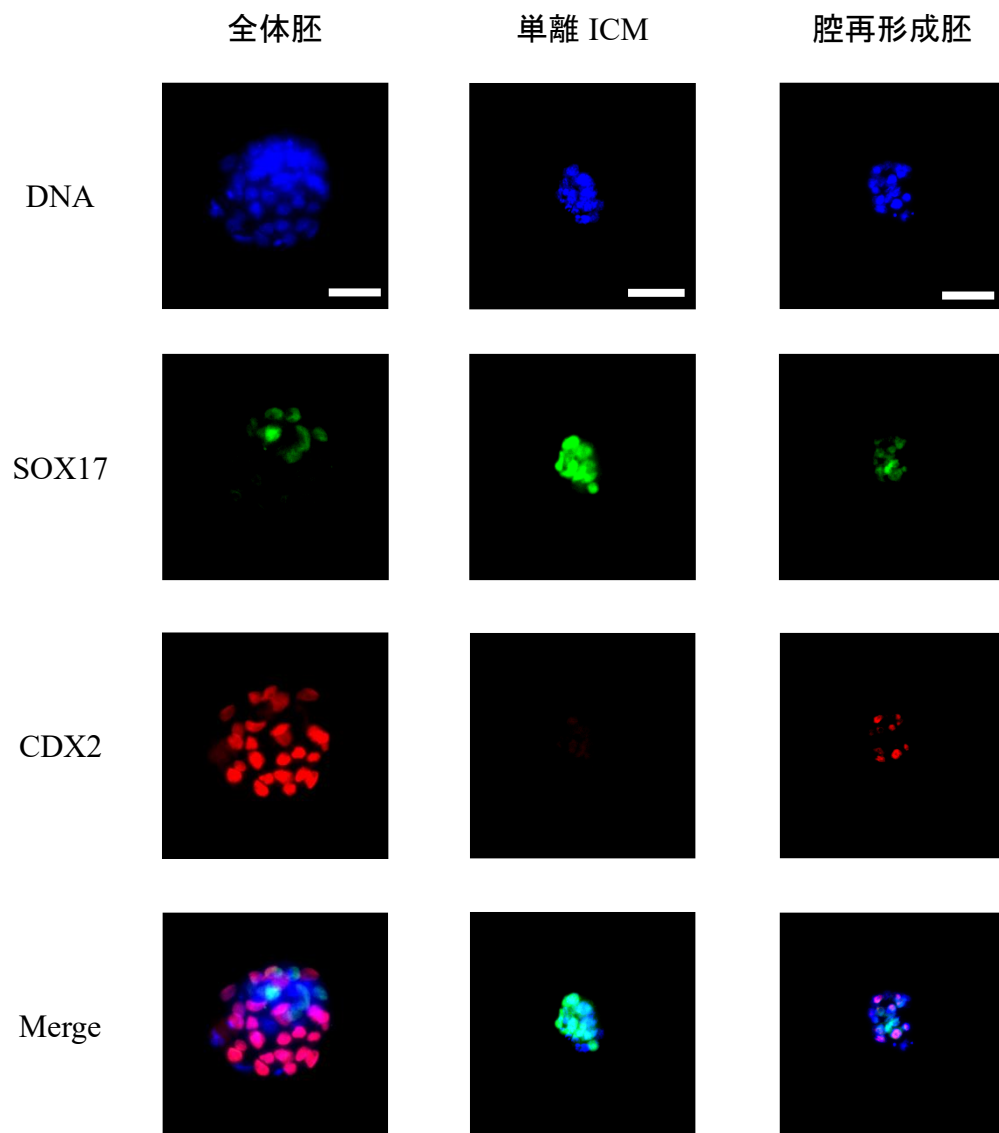


図 39: マウス腔再形成胚形成過程における SOX17 および CDX2 の発現動態.

青: DNA、緑: SOX17、赤: CDX2

Bar = 50 μ m

顕微鏡: 蛍光顕微鏡

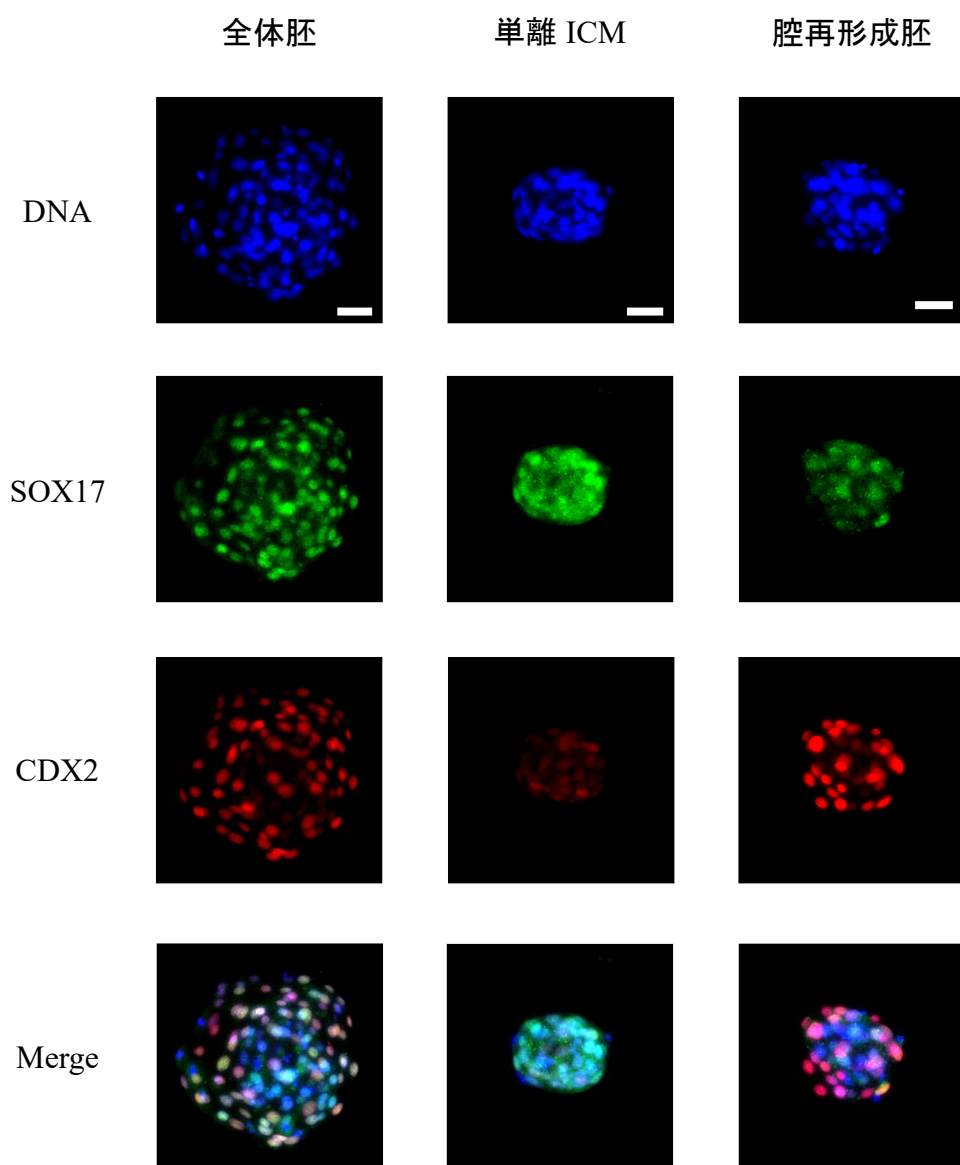
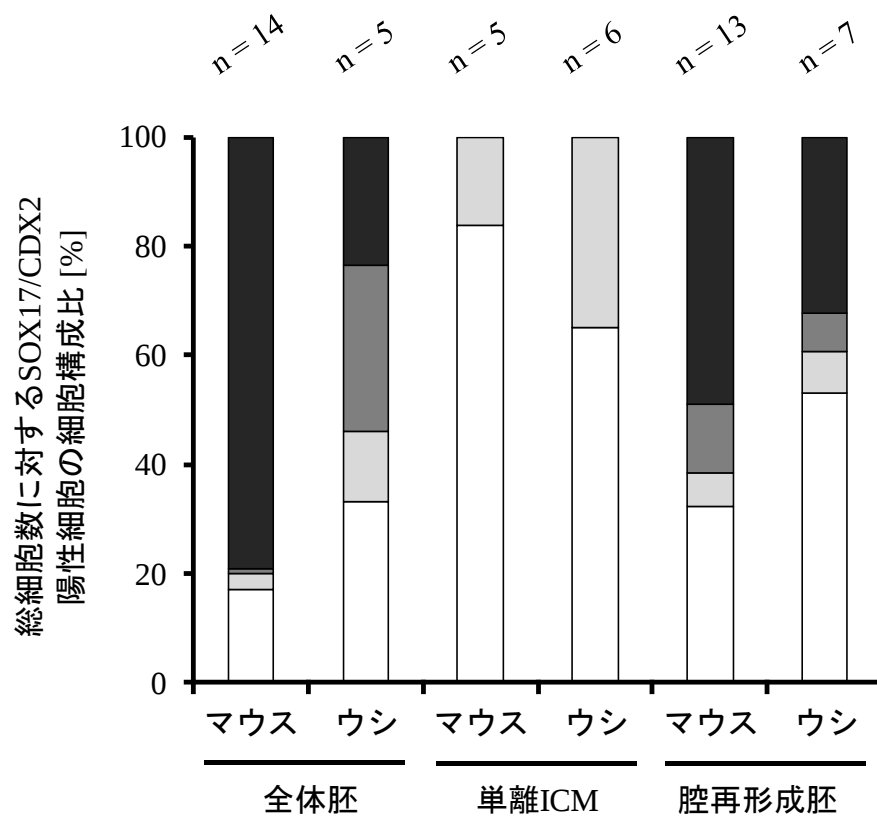


図 40: ウシ腔再形成胚形成過程における SOX17 および CDX2 の
発現動態.

青: DNA、緑: SOX17、赤: CDX2

Bar = 50 μ m

顕微鏡: 蛍光顕微鏡



	SOX17	/	CDX2		SOX17	/	CDX2
	-	/	-		+	/	+
	+	/	-		-	/	+

図 41: マウスおよびウシの腔再形成胚形成過程における SOX17/CDX2 陽性細胞構成比の比較.

+: 標的タンパク質陽性細胞、-: 標的タンパク質陰性細胞

白: SOX17⁻/CDX2⁻、ライトグレー: SOX17⁺/CDX2⁻、ミドルグレー: SOX17⁺/CDX2⁺、ダークグレー: SOX17⁻/CDX2⁺

n は供試胚数を示す。

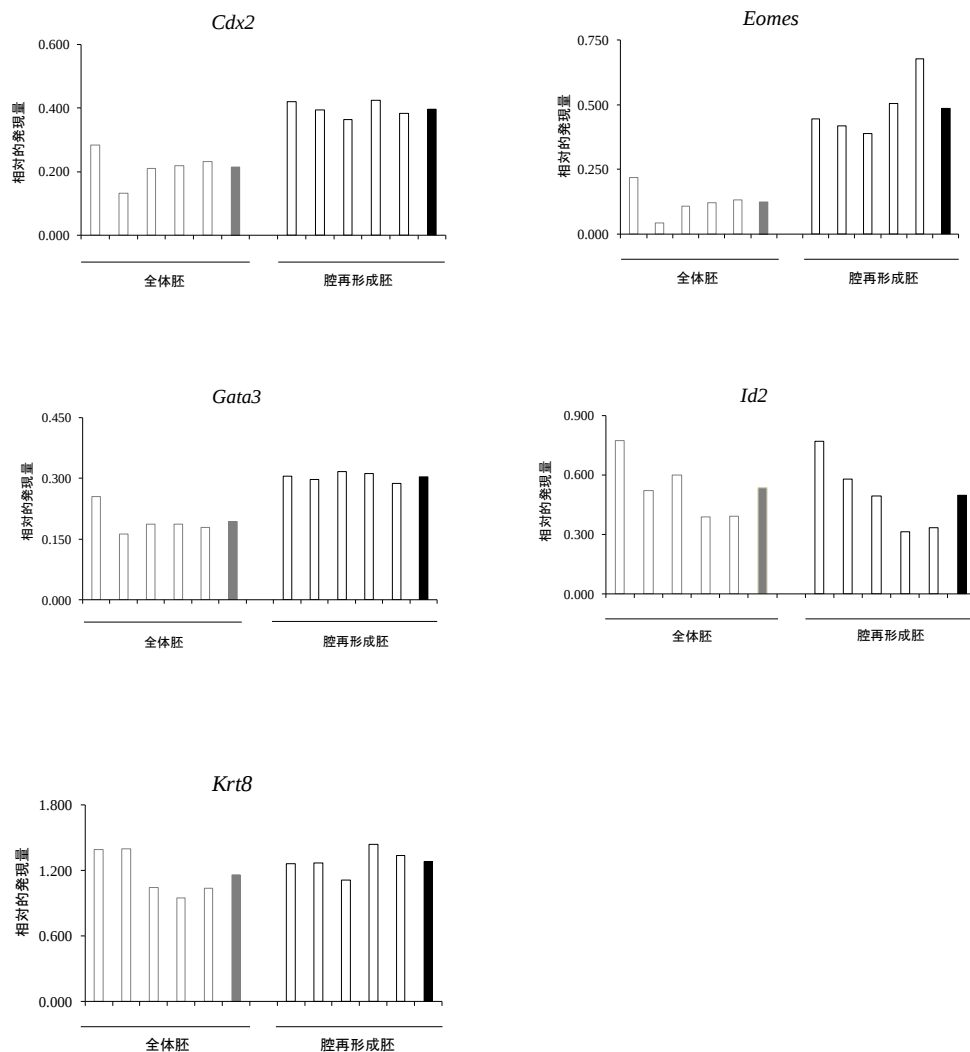


図 42: マウス腔再形成胚において発現が検出された TE 分化関連遺伝子. 枠線の色がグレーおよび黒のバーはそれぞれ全体胚および腔再形成胚を示す。

白のバー: サンプル毎の各遺伝子発現量

グレーのバー: 各遺伝子発現量の全体胚 5 サンプルにおける平均値

黒のバー: 各遺伝子発現量の腔再形成胚 5 サンプルにおける平均値

縦軸は定量 PCR による相対発現量を示す。

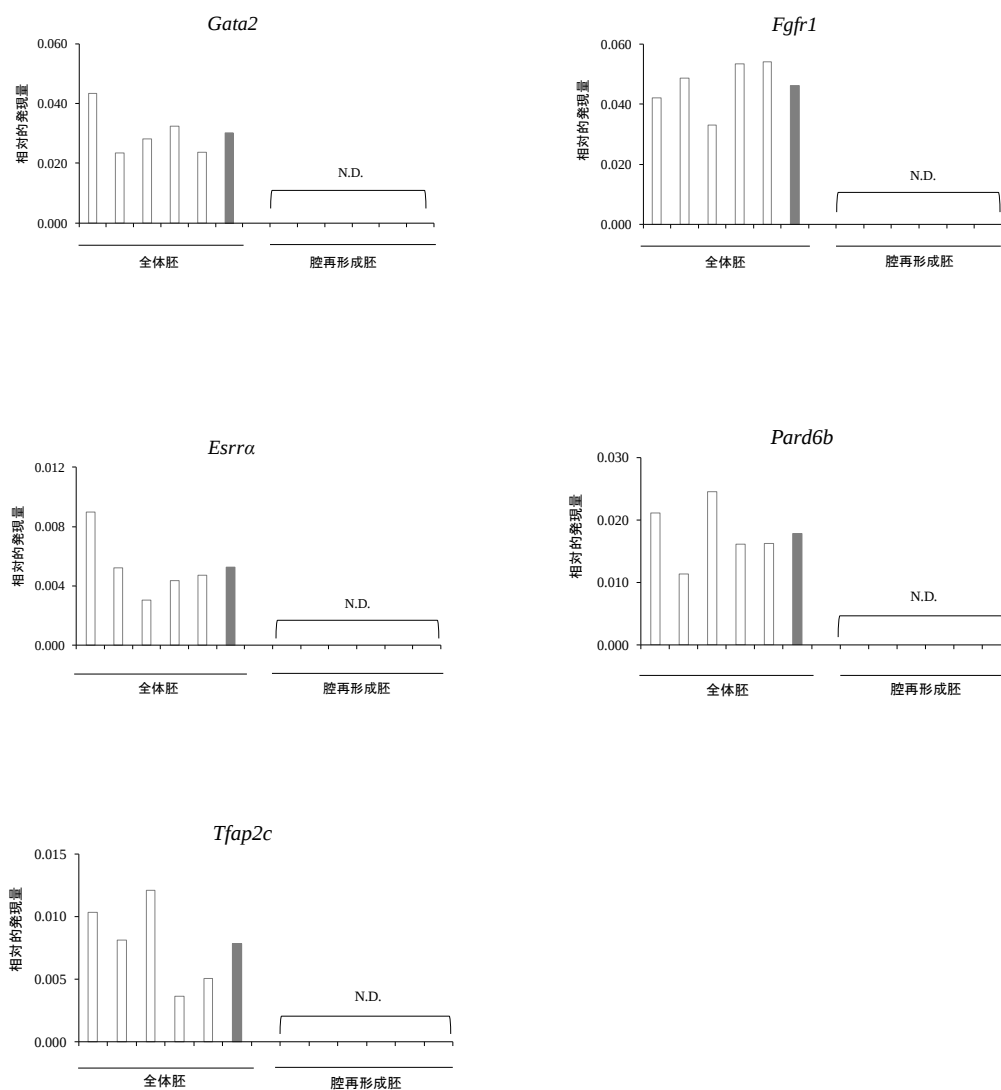


図 43: マウス腔再形成胚において発現が検出されなかった TE 分化関連遺伝子.

白のバー: サンプル毎の各遺伝子発現量

グレーのバー: 各遺伝子発現量の全体胚 5 サンプルにおける平均値

N.D.: マウス腔再形成胚における各遺伝子の発現が未検出

縦軸は定量 PCR による相対的発現量を示す。

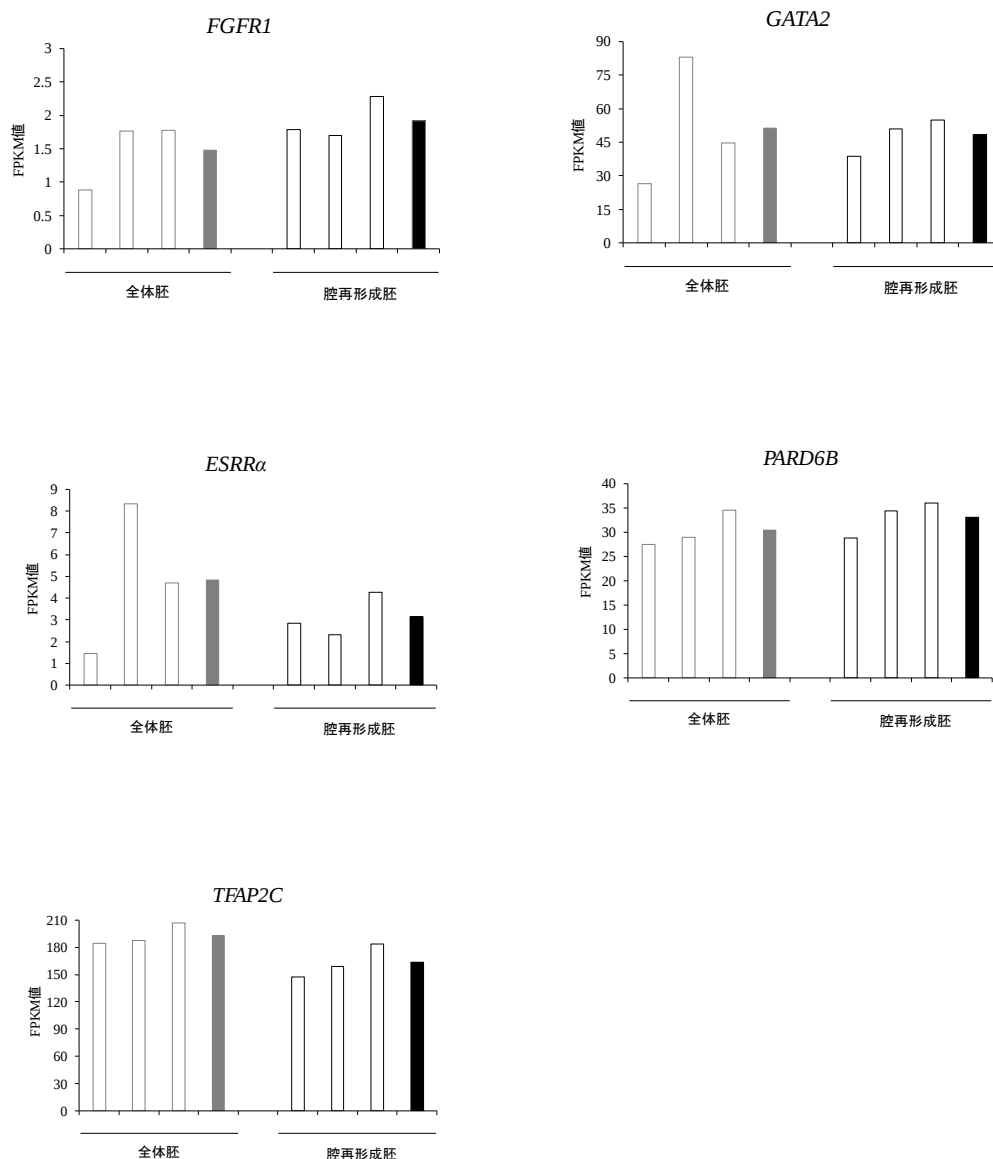


図 44: マウス腔再形成胚において検出されなかった TE 分化関連遺伝子のウシ腔再形成胚における発現.

枠線の色がグレーおよび黒のバーはそれぞれ全体胚および腔再形成胚を示す。

白のバー: サンプル毎の各遺伝子発現量

グレーのバー: 各遺伝子発現量の全体胚 3 サンプルにおける平均値

黒のバー: 各遺伝子発現量の腔再形成胚 3 サンプルにおける平均値

縦軸は RNA シーケンスによる FPKM 値を示す。

第六章：総括

胚盤胞期胚はウシの受精卵移植に用いられる発生ステージであり、その分化メカニズムを解明することは効率的な動物生産を実現する繁殖技術の向上にとって非常に重要である。古典的な分化モデルとして内外モデルが提唱されており、胚の立体構造において外側に位置する割球が栄養外胚葉 (TE) に、内側に位置する割球が内部細胞塊 (ICM) に分化すると説明されている。しかしながら、ICM および TE への分化制御機構について、現在も主にマウス胚を用いた研究が進められており、議論されている途中である。内外モデルの検証にマウス胚盤胞期胚における ICM の単離が用いられている。この手法により割球の位置関係を人為的に変化させ、培養した ICM から TE が再出現するかどうか調べられているが、その検証は TE マーカータンパク質の発現解析に留まっており、外側に再配置された割球が機能的に正常な胎盤を形成して個体発生を完了させられるかどうかは明らかになっていない。さらに、ウシではこの手法を用いた内外モデルの検証例が全く報告されていない。近年の研究でウシおよびマウスで胚盤胞期胚における分化のメカニズムが異なることが分かっていることからウシ初期胚を用いた検証は必要不可欠である。そこで本研究では、ウシ腔再形成胚の TE 分化関連因子の発現動態および個体発生能を検証することを目的とした。

第二章：ウシ ICM 単離に伴う Hippo シグナル構成因子の発現動態の解析

目的

内外モデルを裏付ける分子的メカニズムとして Hippo シグナルが着目されている。このシグナルを対象とした研究は主にマウス胚で行われており、ウシ胚

を用いた知見は少ない。そこで、内外モデルを検証するための手法のひとつである ICM の単離を用いて、ウシ腔再形成胚における Hippo シグナルの構成因子である YAP1 および TEAD4 の発現動態をマウス腔再形成胚と比較して考察することとした。

結果

ウシ胚盤胞期胚において YAP1 および TEAD4 の相互作用が下流の TE マーカータンパク質である CDX2 の発現に重要であることおよびウシにおける YAP1 と TEAD4 の相互作用を体細胞を用いて初めて証明した。単離した ICM を培養すると、外側に位置する割球において YAP1 の局在変化および TEAD4 との共局在が認められたことから、マウスと同様に割球の位置関係の違いが YAP1 の局在に関与している可能性が示された。

第三章: RHO-ROCK シグナルがウシ胚盤胞期胚の分化に与える影響

目的

ウシ初期胚発生における YAP1 および TEAD4 分子の上流因子については明らかとなっていない。そこで、マウス初期胚発生において ICM/TE 分化に関与することが判明している、RHO-ROCK シグナルに着目し、ウシ単離 ICM を用いて割球の位置関係、RHO および ROCK の活性、さらに YAP1 局在変化の関係性を調べた。

結果

ウシ初期胚発生中およびウシ単離 ICM の培養中、RHO の活性を C3 transferase により抑制すると、外側に位置する割球において YAP1 が核内に移行する割合がコントロールと比べ有意に減少した。ウシ初期胚発生中 ROCK の活性を Y-27632 により阻害すると、外側に位置する割球における YAP1 の核局在化が促進され、これはマウス胚と逆の結果となった。これらのことから、ウシ胚でもマウス胚同様に RHO および ROCK の活性の変化は YAP1 局在に影響するが、YAP1 局在制御への影響はマウス胚とは異なっていることが明らかとなった。さらに、ウシ単離 ICM の培養中 Y-27632 を添加すると、YAP1 陽性および CDX2 陽性の細胞数には変化がなかった。以上の結果から、割球の位置関係は RHO を介して細胞分化を制御しているが、ROCK とは別のエフェクター分子が関与していると考えられた。

第四章: ウシ単離 ICM に由来する腔再形成胚における網羅的遺伝子発現解析

目的

TE が機能的な胎盤を形成するためには、TE 特有の強固な転写ネットワークが形成される必要がある。本章では、人為的な位置改変により外側に配置された ICM の割球が TE 特異的な遺伝子発現パターンを獲得するかどうかを調べるため、ウシ単離 ICM に由来する胚（腔再形成胚）と全体胚について RNA-seq によりトランスクリプトームを比較した。

結果

RNA-seq の結果をもとにした統計的解析から、腔再形成胚におけるグローバルな遺伝子発現パターンは、全体胚と類似していることが判明した。続いて、ウシ TE 特異的な遺伝子群の発現パターンを両者で比較したところ、全体胚と似た発現パターンを示す腔再形成胚が認められた。また、ジーンオントロジー解析による機能的分類の結果、差次的発現遺伝子には代謝関連機能の遺伝子が有意に多く含まれることが分かった。これらの結果から、一部の腔再形成胚では通常の胚盤胞期胚に近い遺伝子発現パターンを示すことが判明した。

第五章: 単離 ICM に由来するマウスおよびウシ腔再形成胚における個体発生能の検証

目的

腔再形成胚における TE 様の遺伝子発現パターンを示す割球が、個体発生を完了させるための機能を備えているか否かを、胚移植により確かめた。そして、ICM は後期胚盤胞期において原始内胚葉 (PrE) およびエピブラストへと分化するが、種間でこの分化制御機構が異なると考えられており、それが腔再形成胚の個体発生能に影響する可能性がある。そこで、単離 ICM の個体発生能および腔再形成胚における ICM の分化状態をウシ胚およびマウス胚で比較した。

結果

偽妊娠マウスに 120 個のマウス腔再形成胚を移植したところ、その生存胎子が認められなかった。一方、4 個のウシ腔再形成胚を受胎牛に移植したところ、そのうち 1 個の胚から出生個体の作出に成功した。PrE マーカーである SOX17

について、マウス腔再形成胚で異所性の発現が認められ、これが種間における個体作出能の違いにつながっていると考えられた。さらに、いくつかの TE 分化関連遺伝子について、マウス腔再形成胚における発現が認められなかった。これらの結果から、腔再形成胚において出現した TE の個体発生支持能の保持について種間差が認められ、その原因として単離時の ICM の分化状態の違いが予測された。

結論

本研究では、ウシ胚盤胞期胚から単離した ICM は個体発生をサポートする TE を再出現させる能力を保持していることを示した。さらに、マウス ICM から生存胎子が得られなかったことから、ICM の TE 再生能力はマウスと比べてウシでより高いことが示され、それは ICM から PrE への分化メカニズムの違いによるものと考えられた。本研究で得られた成果の農学的意義として、ウシ単離 ICM から個体作出が可能であることは、育種技術への応用につながると考えられる。つまり、除去した TE 由来の DNA を検査に用いることで、胚の段階で個体の遺伝的能力を正確に判定した後に単離 ICM 由来の個体を得ることができるかもしれない。ICM の単離により、相対的位置関係を内側から外側へと変化させた割球が出現する。ウシ ICM は TE 特有の遺伝子発現パターンを獲得し、個体発生を支持する機能的な胎盤を形成する能力を保持していることが判明した。本研究の結論として、ウシ胚盤胞期胚から単離した ICM を用いて TE を再出現させることで、内外モデルを証明した。

謝辞

本研究を行うにあたり、熱心な指導をしていただいた遺伝繁殖学研究室准教授 川原 学 博士、同研究室教授 高橋 昌志 博士、そして、同研究室助教 唄 花子 博士に心より感謝いたします。本論文を校閲していただいた、本学名誉教授 中村 富美男 博士、畜牧体系学研究室教授 上田 宏一郎 博士に心よりお礼申し上げます。実験材料の提供をしていただいた獣医学部繁殖学教室の皆様にも心よりお礼申し上げます。実験材料の採取にあたりご協力いただいた、株式会社 北海道畜産公社 道央営業所 早来工場早来食肉流通センターの方々に心よりお礼申し上げます。ウシの受精卵移植を実施してくださった北里大学教授 永野 昌志 博士、獣医学研究科助教 柳川 洋二郎 博士に心よりお礼申し上げます。ウシの受精卵移植を実施するにあたり、受胎牛を準備してくださった北方生物圏フィールド科学センター助教 三谷 朋弘 博士に心よりお礼申し上げます。免疫沈降を実施するにあたり貴重なアドバイスをくださった細胞組織学研究室准教授 小林 謙 博士に心よりお礼申し上げます。受精卵移植により作出したウシ個体の飼養管理をしてくださっている北方生物圏フィールド科学センター准教授 河合 正人 博士に心よりお礼申し上げます。

研究面および私生活面でさまざまな場面で力を貸していただいた研究室同期の秋沢宏紀君をはじめ、貴重なアドバイスをしていただいた先輩方や、困ったときには実験を手伝っていただいた後輩方に深く感謝いたします。マウスの受精卵移植に関して、遺伝繁殖学研究室 OB の椎名浩己君、詫間光君、後輩の小松雅也君、横井芙実さん、そして ICM 単離に関して後輩の飯阪早希絵さんに助けていただいたことに対して深く感謝いたします。彼ら彼女らの協力なしにマウ

スのデータを満足に得ることはできませんでした。最後に、今まで勉学を続けることを支えてくださった両親に深くお礼申し上げます。

参考文献

- [1] Dietrich JE, Hiiragi T. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development* 2007; 134:4219–4231.
- [2] Plusa B, Piliszek A, Frankenberg S, Artus J, Hadjantonakis AK. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* 2008; 135:3081–3091.
- [3] Tarkowski AK, Wróblewska J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol* 1967; 18:155–180.
- [4] Rossant J, Lis WT. Potential of isolated mouse inner cell masses to form trophoctoderm derivatives in vivo. *Dev Biol* 1979; 70:255–261.
- [5] Pierce GB, Arechaga J, Muro C, Wells RS. Differentiation of ICM cells into trophoctoderm. *Am J Pathol* 1988; 132:356–364.
- [6] Handyside AH. Time of commitment of inside cells isolated from preimplantation mouse embryos. *J Embryol Exp Morph* 1978; 45:37–53.
- [7] Strumpf D. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoctoderm in the mouse blastocyst. *Development* 2005; 132:2093–2102.
- [8] Wigger M, Kisielewska K, Filimonow K, Plusa B, Maleszewski M, Suwińska A. Plasticity of the inner cell mass in mouse blastocyst is restricted by the activity of FGF/MAPK pathway. *Sci Rep* 2017; 7:15136.
- [9] Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoctoderm differentiation. *Cell* 2005; 123:917–929.
- [10] Berg DK, Smith CS, Pearton DJ, Wells DN, Broadhurst R, Donnison M, Pfeffer PL. Trophoctoderm lineage determination in cattle. *Dev Cell* 2011; 20:244–255.

- [11] Sozen B, Can A, Demir N. Cell fate regulation during preimplantation development: A view of adhesion-linked molecular interactions. *Dev Biol* 2014; 395:73–83.
- [12] Sasaki H. Roles and regulations of Hippo signaling during preimplantation mouse development. *Dev Growth Differ* 2017; 59:12–20.
- [13] Johnson MH, Ziomek CA. Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability. *J Cell Biol* 1981; 95:211–218.
- [14] Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer. *Cell* 2015; 163:811–828.
- [15] Nishioka N, Inoue K, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, Yabuta N, Hirahara S, Stephenson RO, Ogonuki N, Makita R, Kurihara H, et al. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell* 2009; 16:398–410.
- [16] Hirate Y, Hirahara S, Inoue KI, Suzuki A, Alarcon VB, Akimoto K, Hirai T, Hara T, Adachi M, Chida K, Ohno S, Marikawa Y, et al. Polarity-dependent distribution of angiomin localizes hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr Biol* 2013; 23:1181–1194.
- [17] Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 2005; 12:260–274.
- [18] Aono A, Nagatomo H, Takuma T, Nonaka R, Ono Y, Wada Y, Abe Y, Takahashi M, Watanabe T, Kawahara M. Dynamics of intracellular phospholipid membrane organization during oocyte maturation and successful vitrification of immature oocytes retrieved by ovum pick-up in cattle. *Theriogenology* 2013; 79:1146–1152.

- [19] Ota M, Sasaki H. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development* 2008; 135:4059–4069.
- [20] Toyooka Y, Oka S, Fujimori T. Early preimplantation cells expressing Cdx2 exhibit plasticity of specification to TE and ICM lineages through positional changes. *Dev Biol* 2016; 411:50–60.
- [21] Negrón-Pérez VM, Hansen PJ. Role of yes-associated protein 1, angiomin, and mitogen-activated kinase kinase 1/2 in development of the bovine blastocyst. *Biol Reprod* 2018; 98:170–183.
- [22] Sakurai N, Takahashi K, Emura N, Hashizume T, Sawai K. Effects of downregulating tead4 transcripts by rna interference on early development of bovine embryos. *J Reprod Dev* 2017; 63:135–142.
- [23] Akizawa H, Kobayashi K, Bai H, Takahashi M, Kagawa S, Nagatomo H, Kawahara M. Reciprocal regulation of TEAD4 and CCN2 for the trophectoderm development of the bovine blastocyst. *Reproduction* 2018; 155:563–571.
- [24] Memili E, Dominko T, First NL. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51:36–41.
- [25] Jang JW, Kim MK, Lee YS, Lee JW, Kim DM, Song SH, Lee JY, Choi BY, Min B, Chi XZ, Bae SC. RAC-LATS1/2 signaling regulates YAP activity by switching between the YAP-binding partners TEAD4 and RUNX3. *Oncogene* 2017; 36:999–1011.
- [26] Cockburn K, Biechele S, Garner J, Rossant J. The hippo pathway member Nf2 is required for inner cell mass specification. *Curr Biol* 2013; 23:1195–1201.
- [27] Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: New insights into their

- functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:690–701.
- [28] Shi X, Yin Z, Ling B, Wang L, Liu C, Ruan X, Zhang W, Chen L. Rho differentially regulates the hippo pathway by modulating the interaction between amot and Nf2 in the blastocyst. *Dev* 2017; 144:3957–3967.
 - [29] Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK), structure, regulation, and functions. *Small GTPases* 2014; 5:e29846.
 - [30] Kono K, Tamashiro DAA, Alarcon VB. Inhibition of RHO-ROCK signaling enhances ICM and suppresses TE characteristics through activation of Hippo signaling in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 2014; 394:142–155.
 - [31] Mihajlović AI, Bruce AW. Rho-associated protein kinase regulates subcellular localisation of Angiomotin and Hippo-signalling during preimplantation mouse embryo development. *Reprod Biomed Online* 2016; 33:381–390.
 - [32] Hochi S, Abdalla H, Hara H, Shimoda M, Morita H, Kuwayama M, Hirabayashi M. Stimulatory effect of Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) inhibitor on revivability of in vitro-produced bovine blastocysts after vitrification. *Theriogenology* 2010; 73:1139–1145.
 - [33] Negrón-Pérez VM, Rodrigues LT, Mingoti GZ, Hansen PJ. Role of ROCK signaling in formation of the trophectoderm of the bovine preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev* 2018; 85:374–375.
 - [34] Muranen T, Selfors LM, Hwang J, Gallegos LL, Coloff JL, Thoreen CC, Kang SA, Sabatini DM, Mills GB, Brugge JS. ERK and p38 MAPK activities determine sensitivity to PI3K/mTOR inhibition via regulation of MYC and YAP. *Cancer Res* 2016; 76:7168–7180.
 - [35] Saha B, Singh SK, Sarkar C, Bera R, Ratha J, Tobin DJ, Bhadra R. Activation of

- the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB. *Pigment Cell Res* 2006; 19:595–605.
- [36] Nakagawa K, Teramura T, Takehara T, Onodera Y, Hamanishi C, Akagi M, Fukuda K. Cyclic compression-induced p38 activation and subsequent MMP13 expression requires Rho/ROCK activity in bovine cartilage explants. *Inflamm Res* 2012; 61:1093–1100.
- [37] Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000; 348:241–255.
- [38] Donnison M, Beaton A, Davey HW, Broadhurst R, L’Huillier P, Pfeffer PL. Loss of the extraembryonic ectoderm in Elf5 mutants leads to defects in embryonic patterning. *Development* 2005; 132:2299–2308.
- [39] Home P, Kumar RP, Ganguly A, Saha B, Milano-Foster J, Bhattacharya B, Ray S, Gunewardena S, Paul A, Camper SA, Fields PE, Paul S. Genetic redundancy of GATA factors in the extraembryonic trophoblast lineage ensures the progression of preimplantation and postimplantation mammalian development. *Development* 2017; 144:876–888.
- [40] Bai H, Sakurai T, Someya Y, Konno T, Ideta A, Aoyagi Y, Imakawa K. Regulation of trophoblast-specific factors by GATA2 and GATA3 in bovine trophoblast CT-1 cells. *J Reprod Dev* 2011; 57:518–525.
- [41] Kim MS, Min KS, Seong HH, Kim CL, Jeon IS, Kim SW, Imakawa K. Regulation of conceptus interferon-tau gene subtypes expressed in the uterus during the peri-implantation period of cattle. *Anim Reprod Sci* 2018; 190:39–46.
- [42] Kusama K, Bai R, Sakurai T, Bai H, Ideta A, Aoyagi Y, Imakawa K. A transcriptional cofactor YAP regulates IFNT expression via transcription factor

- TEAD in bovine conceptuses. *Domest Anim Endocrinol* 2016; 57:21–30.
- [43] Sakurai T, Sakamoto A, Muroi Y, Bai H, Nagaoka K, Tamura K, Takahashi T, Hashizume K, Sakatani M, Takahashi M, Godkin JD, Imakawa K. Induction of endogenous Interferon Tau gene transcription by CDX2 and high acetylation in bovine nontrophoblast cells. *Biol Reprod* 2009; 80:1223–1231.
- [44] Schiffmacher AT, Keefer CL. CDX2 regulates multiple trophoblast genes in bovine trophectoderm CT-1 cells. *Mol Reprod Dev* 2013; 80:826–839.
- [45] Houghton FD. Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation* 2006; 74:11–18.
- [46] Gustafsson CM, Falkenberg M, Larsson N-G. Maintenance and expression of mammalian mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 2016; 85:133–160.
- [47] Gaspari M, Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM. The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *EMBO J* 2004; 23:4606–4614.
- [48] Rivron NC, Frias-Aldeguer J, Vrij EJ, Boisset JC, Korving J, Vivié J, Truckenmüller RK, Van Oudenaarden A, Van Blitterswijk CA, Geijsen N. Blastocyst-like structures generated solely from stem cells. *Nature* 2018; 557:106–111.
- [49] Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T, Rossant J. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Dev Cell* 2006; 10:615–624.
- [50] Gerbe F, Cox B, Rossant J, Chazaud C. Dynamic expression of Lrp2 pathway members reveals progressive epithelial differentiation of primitive endoderm in mouse blastocyst. *Dev Biol* 2008; 313:594–602.

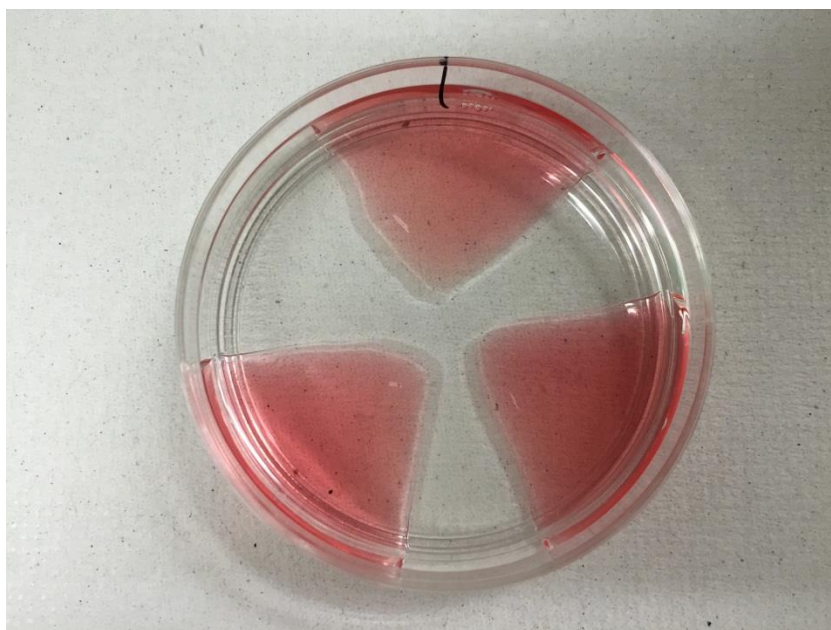
- [51] Kuijk EW, Du Puy L, Van Tol HTA, Oei CHY, Haagsman HP, Colenbrander B, Roelen BAJ. Differences in early lineage segregation between mammals. *Dev Dyn* 2008; 237:918–927.
- [52] Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985; 44:493–498.
- [53] Whitten WK. Culture of tubal mouse ova. *Nature* 1956; 12:260–274.
- [54] Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Reproduction* 2004; 66:161–168.
- [55] Artus J, Piliszek A, Hadjantonakis AK. The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Dev Biol* 2011; 350:393–404.
- [56] Yamazaki W, Amano T, Bai H, Takahashi M, Kawahara M. The influence of polyploidy and genome composition on genomic imprinting in mice. *J Biol Chem* 2016; 291:20924–20931.
- [57] Ralston A, Cox BJ, Nishioka N, Sasaki H, Chea E, Rugg-Gunn P, Guo G, Robson P, Draper JS, Rossant J. Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development* 2010; 137:395–403.
- [58] Russ AP, Wattler S, Colledge WH, Aparicio SAJR, Carlton MBL, Pearce JJ, Barton SC, Azim Surani M, Ryan K, Nehls MC, Wilsons V, Evans MJ. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* 2000; 404:95–99.
- [59] Cao Z, Carey TS, Ganguly A, Wilson CA, Paul S, Knott JG. Transcription factor AP-2 γ induces early Cdx2 expression and represses HIPPO signaling to specify

- the trophectoderm lineage. *Dev* 2015; 142:1606–1615.
- [60] Kurowski A, Molotkov A, Soriano P. FGFR1 regulates trophectoderm development and facilitates blastocyst implantation. *Dev Biol* 2019; 446:94–101.
 - [61] Cheng X, Xu S, Song C, He L, Lian X, Liu Y, Wei J, Pang L, Wang S. Roles of ER α during mouse trophectoderm lineage differentiation: Revealed by antagonist and agonist of ER α . *Dev Growth Differ* 2016; 58:327–338.
 - [62] Alarcon VB. Cell polarity regulator PARD6B is essential for trophectoderm formation in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 2010; 83:347–358.
 - [63] Guo G, Huss M, Tong GQ, Wang C, Li Sun L, Clarke ND, Robson P. Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev Cell* 2010; 18:675–685.
 - [64] Mallol A, Santaló J, Ibáñez E. Improved development of somatic cell cloned mouse embryos by vitamin C and latrunculin A. *PLoS One* 2015; 10:e0120033.
 - [65] Isaji Y, Murata M, Takaguchi N, Mukai T, Tajima Y, Imai H, Yamada M. Valproic acid treatment from the 4-cell stage improves Oct4 expression and nuclear distribution of histone H3K27me3 in mouse cloned blastocysts. *J Reprod Dev* 2013; 59:196–204.
 - [66] Kishigami S, Hikichi T, Van Thuan N, Ohta H, Wakayama S, Bui HT, Mizutani E, Wakayama T. Normal specification of the extraembryonic lineage after somatic nuclear transfer. *FEBS Lett* 2006; 580:1801–1806.
 - [67] Balbach ST, Esteves TC, Brink T, Gentile L, McLaughlin KJ, Adjaye JA, Boiani M. Governing cell lineage formation in cloned mouse embryos. *Dev Biol* 2010; 343:71–83.
 - [68] Tiffin GJ, Rieger D, Betteridge KJ, Yadav BR, King WA. Glucose and glutamine

- metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *J Reprod Fertil* 1991; 93:125–132.
- [69] Larson MA, Kimura K, Kubisch HM, Roberts RM. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN- τ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9677–9682.
- [70] Jang YY, Sharkis SJ. Fetal to adult stem cell transition: knocking sox17 off. *Cell* 2007; 130:403–404.
- [71] Viotti M, Nowotschin S, Hadjantonakis AK. SOX17 links gut endoderm morphogenesis and germ layer segregation. *Nat Cell Biol* 2014; 16:1146–1156.
- [72] Lilly AJ, Lacaud G, Kouskoff V. SOXF transcription factors in cardiovascular development. *Semin Cell Dev Biol* 2017; 63:50–57.
- [73] Niakan KK, Ji H, Maehr R, Vokes SA, Rodolfa KT, Sherwood RI, Yamaki M, Dimos JT, Chen AE, Melton DA, McMahon AP, Eggan K. Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. *Genes Dev* 2010; 24:312–326.
- [74] Canizo JR, Ynsaurrealde Rivolta AE, Vazquez Echegaray C, Suvá M, Alberio V, Aller JF, Guberman AS, Salamone DF, Alberio RH, Alberio R. A dose-dependent response to MEK inhibition determines hypoblast fate in bovine embryos. *BMC Dev Biol* 2019; 19:13.
- [75] Madeja ZE, Pawlak P, Piliszek A. Beyond the mouse: non-rodent animal models for study of early mammalian development and biomedical research. *Int J Dev Biol* 2019; 63:187–201.

- [76] Ma GT, Roth ME, Groskopf JC, Tsai FY, Orkin SH, Grosveld F, Engel JD, Linzer DIH. GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo. *Development* 1997; 124:907–914.

付図



TCM199 洗淨培地

付表

10×PBS	(g/500 mL)
NaCl (Wako)	40
KCl (Wako)	1
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O (Wako)	14.405
KH ₂ PO ₄ (Wako)	1

オートクレーブ後、室温下で保存。

×1000 CaCl ₂ · 2H ₂ O	(g/10 mL)
CaCl ₂ · 2H ₂ O (Kanto chemical)	1.057

4°C 保存。

×1000 MgCl ₂ · 6H ₂ O	(g/10 mL)
MgCl ₂ · 6H ₂ O (Kanto chemical)	3.303

4°C 保存。

Antibiotic	1.5 mL
Penicillin (Nacalai tesque)	150000 U
Streptomycin (Nacalai tesque)	0.15 g

Penicillin: 1533 U/mg→約 0.09784 g

50 μL ずつ 0.5 mL チューブに分注し、-20°C で保存。

FSH Stock	1 mL
FSH (Kyoritsu medicine manufacture pharmacy, Tokyo, Japan)	20 AU
1x PBS	1 mL

10 μ L ずつ分注し、 -20°C で遮光保存。

PB1	100 mL
10 $\times$ PBS	10 mL
Glucose (Wako)	0.1 g
Sodium Pyruvate (Wako)	0.0036 g
$\times 1000 \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40.0 μ L
$\times 1000 \text{ MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	94.6 μ L
Antibiotic	50 μ L
BSA	0.4 g

濾過滅菌後、 4°C 保存。

使用期限は 1 か月。

TCM199	(g/10 mL)
199 (Gibco)	0.098
HEPES (Sigma-aldrich)	0.0298
NaHCO ₃ (Wako)	0.022
Cysteamine (Sigma-aldrich)	1 µL
Antibiotic	5 µL
FSH Stock	10 µL
FCS (PAA the cell culture company, Pasching, Austria)	500 µL

使用前に濾過滅菌。

4°C 保存。

使用期限は 1 週間。

B.O. Stock	(g/100 mL)
NaCl	3.27265
KCl	0.14985
NaH ₂ O ₄ · 2H ₂ O	0.05725
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.05285
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.16515
Glucose	1.25905
phenol red (Sigma-aldrich)	50 µL

4°C 保存。

使用期限は 3 か月。

B.O. working	(g/100 mL)
NaHCO ₃	0.3108
Na-pyruvate	0.0138
Theophyllin (Wako)	0.045
Stock	10 mL
Antibiotic	50 µL

調製後、pH7.65 に調整。

使用前に濾過滅菌し、残りは 4°C で保存。

使用期限は 1 週間。

ヘパリンナトリウムストック	(g/mL)
ヘパリンナトリウム	0.0015
MilliQ 水	1 mL

4°C 保存。

使用期限は 1 週間。

BSA 添加 B.O. working	(g/10mL)
B.O. working	10 mL
ヘパリンナトリウムストック	100 µL
BSA	0.06

使用前に濾過滅菌。

使用期限は 1 週間。

mSOFai Stock A	(g/100 mL)
NaCl	6.294
KCl	0.534
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.2513
KH ₂ PO ₄	0.1619
Gentamycin sulfate (Sigma-aldrich)	0.025
phenol red	100 μL

4°C 保存。

使用期限は 3 か月。

mSOFai Stock B	(g/100 mL)
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.0996
Gentamycin sulfate	0.025

4°C 保存。

使用期限は 3 か月。

Insulin Stock	1 mL
ウシ Insulin (Sigma-aldrich)	0.01 g
酢酸 ((Kanto chemical)	10 μL
滅菌水	1 mL

4°C 保存。

使用期限は 1 か月。

10% PVA	50 mL
---------	-------

PVA (Sigma-aldrich)	5 g
---------------------	-----

PVA 粉末を入れてオートクレーブ。

4°C 保存。

mSOFai working solution	(g/100 mL)
-------------------------	------------

NaHCO ₃	0.2106
--------------------	--------

Na-pyruvate	0.00363
-------------	---------

Glutamine (Wako)	0.0146
------------------	--------

Glycin (Kanto chemical)	0.0375
-------------------------	--------

Taurin (Wako)	0.025
---------------	-------

Na-lactate (Sigma-aldrich)	50 µL
----------------------------	-------

10% PVA	1.0 mL
---------	--------

MEM NEAA (Sigma-aldrich)	1.0 mL
--------------------------	--------

BME AA (Sigma-aldrich)	2.0 mL
------------------------	--------

Stock A	10 mL
---------	-------

Stock B	10 mL
---------	-------

4°C 保存。

使用期限は 1 か月。

mSOFai	10 mL
mSOFai working solution	10 mL
Insulin stock	10 μ L
BSA	0.03 g

使用前に濾過滅菌。

4°C 保存。

使用期限は 1 週間。

StockA	(g/100mL)
NaCl	5.534
KCl	0.356
KH ₂ PO ₄	0.162
MgSO ₄ · 7H ₂ O (Wako)	0.293
Na-lactate	2.610
グルコース	1.000
Penicillin	0.060
Streptomycin	0.050

4°C 保存。

使用期限は 3 か月。

StockA'	(g/100mL)
NaCl	5.9375
KCl	0.3496
KH ₂ PO ₄	0.0504
MgSO ₄ · 7H ₂ O (Wako)	0.0492
Na-lactate	3.42 mL
グルコース	0.50
Penicillin	0.075
Streptomycin	0.050

4°C 保存。

使用期限は 3 か月。

StockB	(g/100mL)
NaHCO ₃	2.101
phenol red	0.010

−20°C 保存。

使用期限は 1 週間。

StockC	(g/100mL)
Na-pyruvate	0.036

−20°C 保存。

使用期限は 1 週間。

StockD	(g/100mL)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.3

4°C 保存。

使用期限は 3 か月。

StockE	(g/100mL)
HEPES	5.958
phenol red	0.020

4°C 保存。

使用期限は 3 か月。

Stock EDTA	(g/10 mL)
2Na (EDTA · 2Na) (Dojindo, Kumamoto, Japan)	0.03722

4°C で保存し、使用期限は調製から 1 週間。

10 N NaOH	(g/50 mL)
NaOH (Wako)	20.0

パラフィルムで密閉し、常温で保存。

M2	(mL/L)
StockA	100.0
StockB	16.0
StockC	10.0
StockD	10.0
StockE	84.0
BSA	4.0 g

濾過滅菌後、4°C 保存。

使用期限は 6 か月。

HTF	100 mL
StockA'	10.0 mL
StockB	10.0 mL
StockC	1.0 mL
StockD	1.19 mL
BSA	0.40 g

濾過滅菌後、4°C 保存。

使用期限は 3 か月、開封後は 1 か月。

M16	100 mL
StockA	10.0 mL
StockB	10.0 mL
StockC	1.0 mL
StockD	1.0 mL
Stock EDTA	1.0 mL
BSA	0.40 g

濾過滅菌後、4°C 保存。

使用期限は 3 か月、開封後は 1 か月。

1.3% ヒアルロニダーゼ	(g/10 mL)
ヒアルロニダーゼ	0.13 g
M2	10 mL

−20°C 保存。

適切な濃度に希釈して使用。

0.5% プロテイナーゼ	(g/5 mL)
Proteinase K	0.025 g
PB1	5 mL

−20°C 保存。

適切な濃度に希釈して使用。

20% PFA	2 mL
Paraformaldehyde	0.4 g
1x PBS	2 mL

60°C 以上で加温および転倒混和して溶解。

4°C 保存。

使用期限は 1 週間。

使用時に 1x PBS で適切な濃度に希釈。

PBS+PVA	50 mL
10% PVA	1 mL
1x PBS	50 mL

4°C 保存

1% TritonX-100	4 mL
TritonX-100	40 μ L
PBS+PVA	4 mL

4°C 保存。

使用期限は 1 週間。

使用時に PBS + PVA で適切な濃度に希釈。

洗浄液	40 mL
TritonX-100	40 μ L
BSA	120 mg
1x PBS	40 mL

4°C 保存。

0.01% PBST	10 mL
Tween 20	10 μ L
1x PBS	10 mL

4°C 保存。

用時調製。

Hoechst 33342 stock	(2.5 mg/mL)
Hoechst 33342	2.5 mg
MilliQ 水	1 mL

−20°C で遮光保存。

使用時は実験系に合わせたバッファーおよび濃度で希釈。

DMEM-FBS	500 mL
DMEM high glucose (043-30085; Wako)	475 mL
Penicillin	0.0285 g
Streptomycin	0.0475 g
FBS	25 mL

調整後濾過滅菌して 4°C 保存。

色がピンク色になったら新しいものを使用。

トリプシン-EDTA	(g/50 mL)
10x PBS	5 mL
2Na (EDTA・2Na)	0.025
グルコース	0.05
トリスアミノメタン (Wako)	0.15
phenol red	40 µL
トリプシン (Nakarai Tesque)	0.0625

MilliQ 水約 25 mL に phenol red まで添加して攪拌。その後、45 mL までメスアップし、pH7.6 に調整。トリプシンを添加してさらに攪拌し、50 mL までメスアップしてフィルター滅菌後 4°C 保存。

2% アジ化ナトリウム	1 mL
アジ化ナトリウム	0.02 g
MilliQ 水	1 mL

4°C 保存。

1.0 M Tris-HCl	50 mL
----------------	-------

トリスアミノメタン	6.05 g
-----------	--------

約 30 mL の MilliQ 水にトリスアミノメタンを添加して攪拌後、pH 6.8 に調整してメスアップ。

4°C 保存。

5x サンプルバッファー	20 mL
--------------	-------

1.0 M Tris-HCl	3.125 mL
----------------	----------

グリセロール (Kanto chemical)	10 mL
-------------------------	-------

2-メルカプトエタノール (Sigma-aldrich)	5 mL
------------------------------	------

SDS (Wako)	0.15
------------	------

BPB (Sigma-aldrich)	40 μ L
---------------------	------------

-20°C 保存。

転写バッファー	1 L
---------	-----

トリスアミノメタン	3 g
-----------	-----

グリシン (Wako)	14.4 g
-------------	--------

メタノール	200 mL
-------	--------

4°C 保存。

冷やした状態で使用。

0.1% PBST	500 mL
Tween 20	500 μ L
1x PBS	500 mL

4°C 保存。

用時調製。

ブロッキングバッファー	100 mL
スキムミルク (Nacalai tesque)	500 μ L
1x PBS	500 mL

4°C 保存。

使用期限は 1 週間。

酸性タイロード (pH2.5)	(g/100 mL)
NaCl	0.800
KCl	0.020
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.024
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.010
グルコース	0.100
Poly (vinylpyrrolidone) (Sigma-aldrich)	0.400

HCl で pH を 2.5 に調整。

濾過滅菌して分注し、-20°C で保存。

PHA 溶液	1 mL
PHA (Sigma-aldrich)	1 mg
M2	1 mL

−20°C で保存。

2% BSA 添加 PBS	1 mL
BSA	0.02 g
1x PBS	1 mL

4°C 保存。

0.2% BSA 添加 PBS は 2% BSA 添加 PBS を 1x PBS で 10 倍希釈して調製。

定量PCRで使用したプライマーの配列

名称	Accession number	配列 (5'-3')	産物長 (bp)
<i>Cdx2</i>	NM_007673.3	AGGCTGAGCCATGAGGAGTA GAGGTCCATAATTCCACTCA	123
<i>Gata2</i>	NM_008090.5	GGCAACCCTTACTACGCCAA GCCCCTGGGTAAACAGACAG	266
<i>Gata3</i>	NM_008091.3	GGGTTCGGATGTAAGTCGAG CCACAGTGGGGTAGAGGTTG	90
<i>Eomes</i>	NM_010136.3	CCACTGGATGAGGCAGGCAGGAGATTTCC AGTCTTGGAAGGTTCAATCAAGTCC	178
<i>Tfap2c</i>	NM_009335.2	GGAGGGTTGTTGAACGAGGG GAGTCGTGGCGATCCTGAG	173
<i>Fgfr1</i>	NM_010206.3	TGGACCGCATTGTGGCCTTGAC TCAGCGCCGTTTGAGTCCACTG	209
<i>Esrra</i>	NM_007956.5	CCAGAGGTGGACCCTTTGCCTTTC CACCAGCAGATGCGACACCAGAG	114
<i>Pard6b</i>	NM_021409.2	ATGATGACAACTACCACAAGGCGG GGACGAGCCGAGATATGAAGATGC	375
<i>Krt8</i>	NM_031170.2	CGGCTACTCAGGAGGACTGA CAGCTTCCCATCTCGGGTTT	172
<i>Id2</i>	NM_010496.3	GGACTCGCATCCCACTATCG GGGAATTCAGATGCCTGCAA	126
<i>Gapdh</i>	NM_008084	GTCGTGGAGTCTACTGGTGTC GAGCCCTTCCACAATGCCAAA	240