



Title	ウシ初期胚発生における転写共役因子YAP1の細胞内局在に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	齋藤, 隼
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16268号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95085
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SAITO_Shun_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 齋藤 隼

学 位 論 文 題 名

ウシ初期胚発生における転写共役因子 YAP1 の細胞内局在に関する研究

背景と目的

ウシ胚移植による受胎率は低調であり、不受胎による損害は日本国内で年間数 100 億円と大きな問題となっている。不受胎の主要因の一つである初期胚発生中の胚死滅防止が重要となるが、ウシ胚では正常な初期胚発生機構の理解が他の哺乳類よりも遅れている。ウシを含め哺乳類に共通する初期胚発生中の発生イベントとして 3 度の細胞分化が挙げられ、いずれも初期胚発生の完遂に必須となる。第 1 の細胞分化として、全能性を持つ一様な細胞群から将来胎盤を形成する細胞である栄養外胚葉 (Trophectoderm: TE) および内部細胞塊 (Inner Cell Mass: ICM) の二種の細胞系列への分離が生じる。次いで、ICM から胎子本体を形成する胚盤葉上層 (Epiblast: Epi) および原始内胚葉 (Primitive Endoderm: PrE) への分化が生じる。続いて、PrE からは Epi に近位の臓側内胚葉と (Visceral Endoderm: VE) および Epi に遠位の壁側内胚葉 (Parietal Endoderm: PE) に分化する。これら 3 段階の細胞分化を制御する分子機構は、マウス胚を用いて調べられてきた。なかでも、転写活性を高める転写共役因子 Yes-associated protein 1 (YAP1) の細胞内局在が最も重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、ウシ胚における YAP1 の細胞内局在に関する研究は限られている。そこで本研究では、初期胚における YAP1 の細胞内局在をウシおよびマウス間で比較しながら、ウシ胚に特徴的な YAP1 局在制御を明らかにすることでウシ初期胚発生機序に関する理解を深めることを目的とした。

(1) ウシ桑実期胚における転写共役因子 YAP1 の局在様式

マウスでは、第 1 の細胞分化において桑実期胚を構成する細胞に YAP1 の細胞内局在における相違が生まれ、異なる細胞運命への誘導が始まることが知られている。そこでまず、ウシ桑実期胚における YAP1 の細胞内局在を免疫染色により調べた。受精後 5 日 (D5) から D6.5、すなわち総細胞数が 16 細胞から 73 細胞のウシ桑実期胚を対象とした。マウス胚における YAP1 の局在は、8 細胞以前は全ての細胞で核局在を示したのに対し、8 細胞期後半の外側細胞では強い核局在、内側細胞で細胞質局在を示した。一方のウシ胚では、16 細胞期前半は 8 細胞以前のマウス胚と同様に、全ての細胞で YAP1 は核局在を示した。ところが、16 細胞期後半から 32 細胞期では全ての細胞で YAP1 の細胞質局在がみられた。その後 64 細胞期前半に、外側細胞で核局在および内側細胞で細胞質局在を示した。続いて、細胞内成分に偏りが生まれる細胞極性の形成と YAP1 の局在の関係についても両種で比較した。細胞極性の進行は、EZRIN の細胞内局在を調べることで評価した。過去の研究と同様に、マウス胚では細胞極性の形成と共に YAP1 の核局在化が生じた。しかし、ウシ胚では細胞極性の形成が開始する 16 細胞期以降も YAP1 の核局在化がみられなかった。ウシ胚では、64 細胞期になって初めて YAP1 の核局在が亢進した。以上の結果から、ウシ桑実期胚における YAP1 の局在制御は、マウス胚とは明確に異なることが明らかになった。

(2) ウシ桑実期胚における YAP1 細胞内局在に及ぼす透明帯および細胞数の影響

ウシ桑実期胚の YAP1 局在に影響を及ぼす要因を明らかにするために、胚を覆う構造物である透明帯の有無および細胞数に着目し、両者が YAP1 局在に及ぼす影響を調べることにした。その結果、透明帯除去胚では YAP1 の細胞質局在化が抑制され、コントロールとなる Intact 胚より有意に高い割合の細胞で核局在を示した ($p < 0.05$)。また、人為的に細胞を破壊して細胞数を減少さ

せた場合、YAP1 の局在様式において Intact 胚との相違はみられなかった。これらの結果から、前項で観察されたウシ桑実期胚の YAP1 の細胞質局在化には、細胞数の増加よりもむしろ透明帯の存在が重要であることが明らかになった。加えて、透明帯除去胚を胚盤胞期胚まで培養すると、ICM 特異的転写因子 SOX2 が TE において発現するようになった。このことから、YAP1 の細胞質局在化が TE における SOX2 などの多能性因子発現抑制に寄与していることが示唆された。以上より、ウシ桑実期胚における YAP1 の局在は透明帯によって制御され、初期胚分化制御の要となる多能性制御に関与していることが示唆された。

(3) ウシ胚内部細胞塊からの胚盤葉上層および原始内胚葉の派生における YAP1 細胞内局在の意義

次に、前期胚盤胞期胚 ICM からの後期胚盤胞期胚 Epi および PrE の派生、すなわち第 2 の細胞分化において、ウシ胚における YAP1 の局在変化を調べた。マウス胚 ICM では、YAP1 が細胞質局在から Epi および PrE では核局在を示すようになること、並びに Epi における YAP1 核局在化が Epi 形成に重要であることが知られている。一方ウシ胚 Epi では、自身の修士論文研究において YAP1 が常に細胞質に局在していることを確かめていた。そこで本研究では、ウシ胚 Epi における YAP1 核局在化の有無を確かめ、ICM から分化するもう一つの細胞系列である PrE における YAP1 細胞内局在を調べることにした。まず、前期胚盤胞期胚 (D8) および後期胚盤胞期胚 (D10) を用いて Epi マーカー SOX2 を発現する細胞に注目し、核内 YAP1 蛍光シグナルの平均輝度を細胞質内 YAP1 の蛍光シグナルの平均輝度で除した比率 (YAP1 N/C ratio) を分析した。その結果、YAP1 N/C ratio に差はみられなかった。続いて、PrE のマーカー転写因子である SOX17 陽性細胞における YAP1 局在を調べたところ、D10 胚において YAP1 核局在を示すようになった。また、YAP1 N/C ratio についても、D10 SOX17 陽性細胞において D8 SOX17 陽性細胞に比べて有意に高い値を示すことが判明した ($p < 0.05$)。そこで D8 から D10 にかけて、核局在 YAP1 の機能を阻害する Verteporfin (VP) を添加し、D10 における SOX2 および SOX17 陽性細胞の割合を調べることにした。VP 処理胚では、DMSO を添加したコントロールと比較して、SOX2 陽性細胞の割合の変化はみられなかった。しかし、SOX17 陽性細胞の割合は有意に減少した ($p < 0.05$)。これらから、第 2 の細胞分化において、ウシ胚ではマウス胚とは異なり YAP1 の核局在化が Epi では生じず、PrE でのみ生じ、PrE の形成に重要な役割を果たすことが明らかになった。

(4) ウシ胚壁側内胚葉および臓側内胚葉における YAP1 細胞内局在の意義

最後に、ウシ胚 PrE から派生する壁側内胚葉 PE および臓側内胚葉 VE における YAP1 の細胞内局在について調べた。D10 胚中の SOX17 陽性 PrE 細胞の中には、Epi 細胞に近接する VE と Epi に対して遠位部の PE が存在していた。そこで、VE および PE における YAP1 N/C ratio を比較することで、それぞれの細胞系列における YAP1 局在の意義について探ることとした。その結果、VE と異なり PE においては、YAP1 N/C ratio が有意に高く ($p < 0.05$)、YAP1 核局在が亢進していることが明らかになった。これらの VE および PE における YAP1 局在様式は、D11 生体胚でも同様であった。さらに、前項 (3) と同様に YAP1 阻害剤である VP を添加したところ、PE 細胞数が減少した。以上の結果から、ウシ胚 PrE 細胞における YAP1 の核局在化は、PE 形成に重要であることが示唆された。

結論

以上より、マウス胚の研究から哺乳類初期胚の細胞分化機構のモデルと考えられてきた YAP1 細胞内局在およびその制御機構において、ウシ胚では特徴的な局在様式および制御機構を有することが明らかになった。加えて、これまで理解が進んでいなかった原始内胚葉の細胞分化機構においても YAP1 細胞内局在が重要な役割を果たしていることが示された。本研究は、ウシ初期胚発生機構の分子レベルでの理解を深めるものであり、より効率的な体外胚の生産系提案に繋がるだけでなく、これまで主にマウス胚の研究に基づいて考えられてきた哺乳類胚発生機構により深い洞察を与える重要な知見となる。