

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24687028

研究課題名(和文) 胚発生期における母性因子 Smad2 の役割

研究課題名(英文) Role of maternal Smad2 during early mouse embryo development.

研究代表者

高岡 勝吉 (TAKAOKA, Katsuyoshi)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：90551044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,200,000 円

研究成果の概要(和文)：多くの生物の初期発生においては母性因子が大きな役割を果たすことがショウジョウバエでは明らかになっているが、マウス胚においては不明なままである。今回、我々はNodalシグナル構成因子の母性ノックアウトマウスを作成し解析を行った結果、受精後の胚の全能性/多能性が失われていることがわかった。さらにNodalシグナルの標的因子OFT1と2を同定した。以上より、卵巣のNodalシグナルは母性因子OFT1と2を介して、受精後のマウス胚発生において重要な役割を果たすことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Early embryogenesis depends on maternal factors present in oocytes. The roles of such factors in embryonic patterning have been well established in *Drosophila* but remain unclear in mammals. I showed that maternal Nodal signaling is essential for patterning of the mouse pre-implantation embryo. Lack of the Nodal signaling components Foxh1, Smad2, or Nodal in oocytes resulted in loss of toti/pluripotency as well as impaired cell specification before implantation. Genome-wide screening for targets of Nodal signaling in oocytes identified OFT1 and OFT2, the latter of which is implicated in epigenetic regulation. Oocyte-specific deletion of OFT1 or OFT2 recapitulated the defects of the maternal Nodal signaling mutants. My results suggest that epigenetic modification by maternal Nodal signaling regulates toti/pluripotency and cell specification events in the fertilized mouse embryo.

研究分野：発生生物

キーワード：母性因子 着床前胚 初期胚 非対称性 卵子

1. 研究開始当初の背景

多くの卵生動物では卵母細胞由来の母性因子が受精後の胚発生のパターンニングにおいて重要な役割を果たしている。例えば、ショウジョウバエの卵子では母性因子ピコイドの mRNA が胚の前後軸を決めている。これに対し、マウスなどの哺乳類の胚発生では、胚のパターンニングに関係するような母性因子は報告されていないこと、桑実胚期までにほとんどの卵子由来のタンパクや mRNA は分解することから、哺乳類胚発生のパターンニングにおいては母性因子は関係ないと考えられてきた。また、申請者のこれまでの報告より、マウス胚は少なくとも胚盤胞期において、将来の体軸のパターンニングを決める能力を潜在的に備えていることが明らかになっている。

マウス胚は卵割期を経て、モルラ期のそれぞれの割球の位置情報を元に Hippo シグナルが活性化し、胚の内-外のパターンニングが起こる。この内-外のパターンニングに沿って、胚盤胞期の内部細胞塊 (Inner cell mass) と栄養外胚葉 (Troph ectoderm, TE) が細胞分化する。その後、ICM は胚体部分に、TE は胎盤部分に分化し、内-外のパターンニングはその後のマウス胚発生の基盤となる最初の細胞分化に関わる重要なイベントである。

2. 研究の目的

本研究では、予備実験より得られた母性因子 Smad2 が発生初期の ICM-TE のパターンニングに必須であるという結果を進展させ、母性因子 Smad2 がどのように ICM-TE のパターンニング決定しているかという機構を明らかにし、卵生動物だけではなく哺乳類胚においても母性因子が胚発生のパターンニングを制御しているというパラダイムシフトを目指す。特に、ショウジョウバエにお

いては、母性ピコイド mRNA がグラディエントを作り、胚の前後軸を形成するのに対し、哺乳類胚ではどのような機構で ICM-TE のパターンニングが母性因子 Smad2 を介して形成されるか興味深い。

3. 研究の方法

本研究では、マウス胚の初期発生期の ICM-TE のパターンニングにおける母性因子の役割を、Smad2 を糸口にして明らかにする。具体的には、Smad2 マターナルノックアウト胚の解析、Smad2 の下流因子の同定、の2つを中心に行い、「いつ」「どのような」メカニズムで母性因子 Smad2 が ICM-TE のパターンニングを形成しているのか明らかにする。

(1) いつどのように内外のパターンニングが異常になっているか? (変異胚の各種免疫染色)

(2) 表現型と Smad2 の間をつなく、下流因子を同定する。

4. 研究成果

代表者はこれまでに、リン酸化 Smad2 の免疫染色が受精後～モルラ期まで観察されることから、Smad2 が母性因子として発生期に機能しているのではないかという仮説をたてた。この仮説を検証するために、卵子特異的な Smad2 とそのリガンドである Nodal のコンディショナルノックアウトを行った。結果、卵子特異的な ZP3-Cre を用いて Smad2、Nodal をノックアウトしたマウス由来の受精卵では細胞数が変わらないにも関わらず、胚盤胞期で胚発生を停止していた。さらに、モルラ期で Nanog (ICM 標識遺伝子) と Cdx2 (TE 標識遺伝子) で免疫染色を行ったところ、マターナルノックアウト胚では、内-外のパターンニングが異常になっており、全て TE の性格をもった細胞になっていた。交配するが野生型 (M 胚) であっても、Smad2 (or Nodal)-接合子

型(MZ 胚)であっても表現型は同じであった。これらの実験より、母性 Nodal シグナルが、その後のマウス胚発生の基盤となる、モルラ胚の内-外のパターンニングに必須であると結論づけた。

(1)マターナルノックアウト胚の着床前時期において免疫染色を行い、詳細な解析を行った結果、ヒストン修飾が異常になっていることを発見した。また、1 細胞期のマターナルノックアウト胚に H2B::cherry mRNA をインジェクションし、経時観察を行った結果、染色体分配が異常になっていることが明らかになった。

(2)また、卵巣における Nodal シグナル標的因子のスクリーニングを行い、現在までに Nodal シグナルの機能の一部を担う OFT1(Oocyte FoxH1 Targeted gene 1)遺伝子を同定した。 OFT1 のマターナルノックアウト胚は染色体分配の異常を示していることから、卵巣の Nodal シグナルは OFT1 を介して、胎児発生期の染色体分配を制御していることが明らかになった(Takaoka *et al.*, in submission)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Gen Shiratsuchi, Katsuyoshi Takaoka, Tomoko Ashikawa, Hiroshi Hamada and *Daiju Kitagawa
RBM14 prevents assembly of centriolar protein complexes and maintains mitotic spindle integrity. The EMBO Journal, vo.34(1), 97-114, 2015、査読有

Origin of cellular asymmetries in

the pre-implantation mouse embryo: a hypothesis

Katsuyoshi Takaoka and *Hiroshi Hamada
Philosophical Transactions of the Royal Society B, vol.5, 369(1657), 2014、査読有

Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo.*Katsuyoshi Takaoka and *Hiroshi Hamada、Development, vol.139(1):3-14, 2012、査読有

[学会発表](計 9 件)

Katsuyoshi Takaoka,

The role of maternal Nodal signaling during early mouse development、第 38 回日本分子生物学会年会、第 82 回日本生化学大会合同大会、2015 年 12 月 1 日～12 月 4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

高岡勝吉、なぜマウスの左右軸形成に萌えるのか? 萌える生物学の会、2015 年 9 月 21 日、大阪大学吹田キャンパス(大阪府吹田市)

Katsuyoshi Takaoka,

マウス胚における母性 Nodal シグナルの役割、第 67 回細胞生物学会、2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日、タワーホテル船堀(東京都江戸川区)

Katsuyoshi Takaoka,

The role of maternal Nodal signaling in mouse embryos、第 48 回日本発生生物学会、2015 年 6 月 2 日～6 月 5 日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

高岡勝吉、Origin of Anterior-Posterior axis formation in the mouse embryos. 第

37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 25 日、
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

高岡勝吉、Origin of the asymmetry in
mouse embryos. 第 66 回細胞生物学会、2014
年 6 月 14 日、奈良公会堂(奈良県奈良市)

高岡勝吉、Origin of the asymmetry in
mouse embryos. 第 47 回日本発生生物学会、
2014 年 5 月 28 日、ウインクあいち(愛知県名
古屋市)

高岡勝吉、Origin of Anterior-Posterior
axis formation in mouse embryos. 第 36 回
日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日、神戸
国際会議場(兵庫県神戸市)

高岡勝吉、Origin of Anterior-Posterior
axis formation in the mouse embryos. 第
46 回日本発生生物学会、2013 年 5 月 28 日、
くにびきメッセ(島根県松江市)

[図書](計 1 件)

Establishment of
Anterior-Posterior axis in the mouse
embryo *Katsuyoshi Takaoka, New
Principles in Developmental
Processes. P.13-27 Springer Science,
2014

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高岡 勝吉 (TAKAOKA, Katsuyoshi)
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
研究者番号：9 0 5 5 1 0 4 4

(2)研究分担者

なし