

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292162

研究課題名(和文) 家畜胚の組織分化と伸長を制御する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of differentiation and elongation of preimplantation embryos in domestic species

研究代表者

澤井 健 (Sawai, Ken)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：90390864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、家畜初期胚において組織分化を制御する因子の同定とその機構解明を目的とした。ウシ初期胚においては、CDX2発現抑制により胚発生の遅延が認められること、TEAD4発現抑制による胚発生への影響は認められないことが明らかとなった。また、FGF4発現抑制によって胚盤胞期への発生が著しく阻害されることが明らかとなった。また、ブタ胚においては、2-細胞期胚の片側割球のOCT-4発現を抑制した場合、当該割球に由来する細胞は栄養膜細胞に寄与しなかった。また、TEAD4発現の人為的な抑制により胚盤胞期への発生が阻害されたことから、TEAD4がブタ胚の組織分化の重要因子であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The functions of OCT-4, CDX2, TEAD4 and FGF4 in the differentiation of the inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) have been described in detail. To elucidate their functions during early development in bovine and porcine embryos, we performed OCT-4, CDX2, TEAD4 and FGF4 downregulation using RNA interference. In CDX2-downregulated bovine embryos, blastocoel formation was delayed. In bovine embryos, TEAD4 down regulation did not affect embryonic development until the blastocyst stage. The rate of blastocyst development of FGF4-downregulated bovine embryos was lower compared with control embryos. In porcine embryos, blastomeres derived from a blastomere injected with OCT-4-siRNA were degenerated in almost half the blastocyst. Blastocyst formation of porcine embryos were inhibited by TEAD4-downregulation. Our results suggest that these factors are essential for early development and gene expression involved in differentiation of ICM and TE lineages in bovine and porcine embryos.

研究分野：家畜繁殖学・発生工学

キーワード：胚 組織分化 遺伝子発現 家畜

1. 研究開始当初の背景

ウシやブタなどの家畜においては、優良個体の効率的生産などを目的に体外受精(IVF)技術が広く利用されている。さらに、種畜の能力検定やヒト医療用家畜の生産などへの体細胞クローン技術の利用が期待されている。しかし、家畜胚の体外生産技術には様々な問題が存在し、ウシやブタにおいては、胚盤胞期(胚移植に用いられる発生段階)への発生率や胚移植後の受胎率が低いこと、さらにウシにおいてはIVFや体細胞クローン産子に出生時体重の増加(過大化)が認められることなどが解決すべき課題となっている。体外生産胚は、胚の体外培養やドナー細胞核の初期化不全によってその遺伝子発現が変化し、胚の組織分化や胎盤形成に異常が生じることで上記のような問題が起こると考えられている(Theriogenology, 2005 など)。しかし、家畜においては、マウスやヒトと比較して胚の組織分化や胎盤形成の機構に関して不明な点が多く、体外生産胚に起こる異常原因の解明とその克服のためには、家畜胚におけるそれら機構の解明が重要かつ先決課題となっている。

哺乳動物胚の発生過程における最初の組織分化は、桑実期から胚盤胞期にかけ起こる内部細胞塊(ICM: 将来胎児になる細胞群)と栄養膜細胞(TE: 将来胎盤になる細胞群)の形成であり、ICM/TE形成はその後の胎子および胎盤形成の起点となる重要なプロセスとなっている。ウシ胚は、受精後6-7日目に胚盤胞期胚へと発生した後、TEの急激な増殖が起こり、フィラメント状に伸長する。伸長期胚はICMから分化した胚盤(Embryo Disc, ED)とTEからなる家畜に特異的な発生形態である。受精後16日目に約25cmにまで发育した伸長期胚は、受精後20日前後で子宮内膜に接着し胎盤形成を開始する。このように家畜胚は、胚盤胞期において子宮内膜へ接着し浸潤を行う齧歯類や霊長類の胚とは異なる発生様式を有するため、家畜胚に特異的な組織分化制御機構が存在すると考えられるが、その機構については明らかではない。

マウス胚においては、胚盤胞期におけるICMおよびTEへの分化を転写因子であるOCT-4とCDX2がそれぞれ厳密に制御する。我々はこれまでに、RNA干渉法を用いたOCT-4発現抑制実験により、ウシやブタ胚においてもICM形成にOCT-4が必須であることを明らかにしたが(J. Reprod. Dev. 2013, Society for the Study of

Reproduction [SSR] 46th Annual Meeting, 2013)、TE分化を制御する因子は不明である。

さらに我々は、ウシおよびブタ胚におけるOCT-4およびCDX2発現は伸長期胚のEDもしくはTE組織でその局在性が強まることなどを見いだすとともに(Cell. Reprog. 2010, J. Reprod. Dev.2013)、OCT-4発現を抑制したウシ胚においてはCDX2およびFGF4発現が有意に減少することを明らかにした(SSR 46th Annual Meeting, 2013)。これらの結果は、ウシ胚においては胚盤胞期から伸長期にかけてICM/TE系列組織の分化が確立されるとともに、様々な因子が相互に作用しながらその分化を制御していることを示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究では、上記の背景をもとに、ウシおよびブタ胚の組織分化を制御する因子の同定とそれら因子の発現を制御する分子基盤を明らかにすることを目的とし、家畜の体外生産胚が抱える問題の克服に資する知見を集積する。すでに、我々は、OCT-4発現を抑制したウシおよびブタ胚においては、桑実期までは発生可能であるが、胚盤胞期への発生が阻害されることを見だし、OCT-4が家畜初期胚のICM分化に必須の因子であることを明らかにしている(J. Reprod. Dev. 2013, SSR 46th Annual Meeting, 2013)。本研究では、もう一方の課題であるTE分化を直接制御する因子を明らかにする。

まずはじめに、マウス胚においてTEへの分化を制御するCDX2に着目し、ウシ胚におけるCDX2発現を人為的に抑制することで、ウシ初期胚の発生および組織分化におよぼす影響について明らかにする。また最近、マウス胚ではTEAD4がTE分化関連因子群の上流因子として機能することが明らかとなり、さらに申請者は、家畜胚においてもTEAD4が発現していることを見だしている(Cell. Reprogram. 2010, J. Reprod. Dev. 2013)。これらのことから、家畜胚における桑実期から胚盤胞期にかけてのTE分化を制御する主要因子はTEAD4である可能性が高い。そこで、ウシ胚におけるTEAD4発現抑制がTE分化におよぼす影響を調べる。このことにより、TEAD4がウシ胚における胚盤胞期へのTE分化を制御する決定的因子であるか否かを明らかにする。

一方、ブタ胚においては、マウスやウシ胚と同様に OCT-4 が桑実期から胚盤胞期への発生に必須であることが我々のこれまでの研究から明らかになっているが、OCT-4 が TE への分化に必要であるか否かは明らかになっていない。そこで本研究では、ブタの 2-細胞期胚の片側割球のみの OCT-4 発現を人為的に抑制し当該割球のその後の発生動態からブタ初期胚の組織分化におよぼす OCT-4 の影響について検討した。また我々は、ブタ初期胚においても TEAD4 が発現していることを明らかにしており、TEAD4 がブタ初期胚の組織分化を制御している可能性がある。そこで本研究では、ブタ初期胚における TEAD4 発現を人為的に抑制し、TEAD4 がブタ初期胚の発生および組織分化におよぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 卵子の体外成熟

食肉処理場で採取したウシおよびブタ卵巣から、未成熟卵子を吸引採取した。得られたウシ卵子は、IVMD-101 培地内で 22 時間成熟培養した。一方、ブタ卵子は、修正 NCSU-37 培地内で 44 時間成熟培養を行った。成熟培養は、ウシでは 39^o、5% CO₂、in air の条件下で、ブタでは、39^o、5% CO₂、90% N₂の条件下で行った。

(2) 卵子の体外受精および単為発生処理

ウシおよびブタの体外成熟卵子と凍結融解精子を用いて体外受精を行った。ウシでは、洗浄・遠心分離を 2 度繰り返した凍結融解精子を用いて、IVF-100 培地内で 6 時間煤精した。ブタでは、洗浄・遠心分離を 2 度繰り返した凍結融解精子を用いて、修正 PigFM 培地内で 6-10 時間煤精した。煤精は、ウシでは 39^o、5% CO₂、in air の条件下で、ブタでは、39^o、5% CO₂、90% N₂の条件下で行った。煤精終了後、ピペティングにより卵子周囲に残る卵丘細胞および精子を除去した。

ブタ体外成熟卵子の一部を用いて、単為発生処理を行った。平行電極を用いて 150 V/1 mm、100 μ秒の電気刺激を与えた卵子を 5 μg/ml サイトカラシン B および 10 μg/ml シクロヘキシミドを添加した PZM-5 培地内で 5 時間培養することで単為発生胚を作出した。

(3) 胚への siRNA の注入

ウシ CDX2、ウシ TEAD4、ウシ FGF4 遺伝子およびブタ OCT-4、ブタ TEAD4 遺伝子の翻訳領域の配列をもとに、各遺伝子に特異的に作用する siRNA を設計 (BLOCK-iT™ RNAi Designer; Thermo Fisher Scientific を使用) した。本研究では、各遺伝子発現抑制用の siRNA の他に、いずれの遺伝子の発現抑制効果をもたない Control siRNA の注入を行い、さらに siRNA の注入処理を行わない区を加えた計 3 区で実験を行った。また、ブタ胚への OCT-4 siRNA 注入においては siRNA 注入時に同時に蛍光色素である TRITC-dextran (DX) を注入し siRNA 注入割球およびそれらに由来する割球を識別できるようにした。

ブタ OCT-4 siRNA を除いて、siRNA の注入は体外受精由来の 1-細胞期胚の細胞質へマイクロインジェクター (FemtoJet; Eppendorf) を用いて行った。ブタ OCT-4 siRNA は、単為発生処理由来の 2-細胞期胚の片側割球の細胞質内に注入した。Control siRNA の注入も同様の方法を用いて行った。各遺伝子発現抑制用の siRNA の注入量は、50 μM の siRNA 約 10 pl であり、Control siRNA の注入量は、20 μM の siRNA 約 10 pl とした。

(4) 初期胚の体外培養

siRNA 注入後の胚および siRNA 未注入の胚は、ウシでは修正 TALP 培地、ブタでは PZM-5 培地を用いて体外培養を行った。ウシでは、体外培養 3 日目に 3% 子ウシ血清を添加した修正 TALP 培地に胚を移し培養を継続した。ウシでは、体外培養 8 日目まで、ブタでは体外培養 6 日目まで胚の体外培養を行った。

(5) 遺伝子発現解析

体外培養を行なったウシおよびブタ胚を任意の時期にサンプリングし、mRNA の抽出を行なった。抽出した mRNA を用いて RT を行い cDNA を得た。cDNA を用いてリアルタイム PCR を行うことで、初期胚における各種遺伝子発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) ウシ 1-細胞期胚の細胞質内に CDX2 発現抑制用の siRNA の注入を行なった。siRNA 注入によるウシ胚における CDX2 発現抑制は、桑実期まで

の発生に影響をおよぼさなかったものの、CDX2 発現抑制胚では胚盤胞期への発生遅延が認められた。また、CDX2 発現抑制によって TE 分化関連遺伝子である *GATA3* 遺伝子発現が減少するとともに、ICM 分化関連遺伝子である *NANOG* の遺伝子発現が上昇した。これらの結果から、ウシ胚において、CDX2 は TE 分化関連遺伝子および ICM 分化関連遺伝子の発現を制御することで TE 分化を制御していることが示唆された。しかし、CDX2 発現抑制胚においては、胚盤胞期への発生遅延は認められたものの最終的に Control siRNA 注入区および siRNA 未注入区と同程度の胚盤胞期への発生率を示した。このことは、CDX2 発現が抑制された状態においても TE 形成が起こることを示しており、ウシ胚において CDX2 は TE 分化の必須因子でないことを示唆するものである。

(2)次に、ウシ胚の TE 分化を制御する因子として TEAD4 に着目し、ウシ初期胚における TEAD4 の発現動態と TEAD4 発現抑制胚の発生動態について明らかにし、TEAD4 がウシ胚の発生および組織分化におよぼす影響について検討した。まずはじめに、ウシ初期胚の各発生ステージにおける TEAD4 発現量および発現の局在性について解析した結果、ウシ胚の *TEAD4* mRNA 発現は 8-細胞期までは低いものの 16-細胞期から発現が上昇し、桑実期から胚盤胞期にかけて高い発現レベルを維持した。TEAD4 タンパク質発現に関しては 16-細胞期までは細胞質内に発現が認められ、桑実期以降はほぼ全ての細胞において細胞核での発現が認められた。TEAD4 siRNA を注入したウシ胚においては、siRNA 未注入の胚と同様の発生動態を示した。これらのことから、ウシでは TEAD4 発現抑制胚においても TE 形成が起こり、TEAD4 発現抑制は ICM および TE 分化に影響をおよぼさないことが明らかとなった。

(3)ウシ胚において胚盤葉上層/原始内胚葉の分化を制御する分子基盤の解明を目的に FGF4 siRNA 注入による FGF4 発現の人為的抑制を行い、ウシ初期胚の発生と組織分化における FGF4 の機能解析を試みた。ウシ胚において、*FGF4* mRNA 発現は 16-細胞期までは認められず、桑実期以降の発生ステージにおいてのみ認められた。また、*FGF4* 発現量は桑実期において高い値を示

したが、拡張胚盤胞期において低下し、その後、脱出胚盤胞期にかけて再び桑実期と同等の水準まで上昇した。siRNA 注入による FGF4 発現の人為的抑制胚においては、32-細胞期への発生は阻害しなかったものの胚盤胞期以上への発生を阻害した。桑実期および胚盤胞期において *NANOG* および *GATA6* 発現量を解析した結果、FGF4 siRNA 注入区の *NANOG* 発現量は Control siRNA 注入区と比較して高く、また FGF4 siRNA 注入区の *GATA6* 発現量は siRNA 未注入区と比較して低かった。これらの結果から、ウシ初期胚において FGF4 は胚盤胞期への発生に必須の因子であり、FGF4 が ICM および TE 分化関連因子の発現を制御することでウシ胚の組織分化を制御していることが示唆された。

(4)OCT-4 がブタ初期胚の TE 分化におよぼす影響を明らかにするため、単為発生処理由来のブタ 2-細胞期胚の片側割球に OCT-4 siRNA を注入した。OCT-4 siRNA 注入割球由来の細胞は、Control siRNA 注入割球由来の細胞と比較して死滅する細胞の割合が高く、TE へ分化した細胞の割合も低かった。また、OCT-4 siRNA 注入胚における遺伝子発現では、*SOX2* および *TEAD4* 発現に差は認められなかったが、*CDX2* 発現において Control siRNA 注入胚と比較して高い値を示した。これらの結果から、ブタ初期胚においては OCT-4 が TE 分化に重要な役割を担うことが示唆された。

(5)ブタ初期胚における TEAD4 の発現動態と *TEAD4* 発現の人為的抑制がブタ初期胚の発生におよぼす影響について明らかにし、TEAD4 がブタ胚の発生・組織分化におよぼす影響について検討した。まずはじめに各発生ステージにおける *TEAD4* 発現量および *TEAD4* 発現の局在性を検討した。ブタ胚における *TEAD4* mRNA 発現は、1-細胞期から 8~16-細胞期にかけて上昇した後、BC 期にかけて低下した。TEAD4 タンパク質は 16-細胞期以降において細胞核での発現が認められ、胚盤胞期胚では、少なくとも TE での発現が観察された。*TEAD4* siRNA 注入を行ったブタ胚では、*TEAD4* mRNA 発現の低下が認められた。*TEAD4* 発現を抑制したブタ胚では、桑実期までは発生したものの胚盤胞期への発生率が、siRNA 未注入区および Control siRNA 注入区と比較して

低い値を示した。また、TEAD4 発現抑制による遺伝子発現への影響においては、TEAD4 発現抑制胚における SOX2 mRNA 発現量が siRNA 未注入区および Control siRNA 注入区と比較して高い値を示した。以上の結果から、ブタ胚の桑実期から胚盤胞期への発生においては、TEAD4 が必須であり、TEAD4 がブタ初期胚の組織分化に関与する可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Sakurai, N., Takahashi, K., Emura, N., Hashizume, T. and Sawai, K. (2017) Effects of downregulating TEAD4 transcripts by RNA interference on early development of bovine embryos. *J. Reprod. Dev.* **63**: 135-142. 査読あり

Sakurai, N., Takahashi, K., Emura, N., Fujii, T., Hirayama, H., Kageyama, S., Hashizume, T. and Sawai, K. (2016) The necessity of OCT-4 and CDX2 for early development and gene expression involved in differentiation of inner cell mass and trophoctoderm lineages in bovine embryos. *Cell. Reprogram.* **18**: 309-318. 査読あり

Emura, N., Sakurai, N., Takahashi, K., Hashizume, T. and Sawai, K. (2016) OCT-4 expression is essential for the segregation of trophoctoderm lineages in porcine preimplantation embryos. *J. Reprod. Dev.* **62**: 401-408. 査読あり

Takahashi, K., Sakurai, N., Emura, N., Hashizume, T. and Sawai, K. (2015) Effects of downregulating GLIS1 transcript on preimplantation development and gene expression of bovine embryos. *J. Reprod. Dev.* **61**: 369-374. 査読あり

澤井 健 (2014) ウシ体細胞クローン胚のエピジェネティクス特性とその人為的制御. *日胚移植誌* **36**: 87-93. 査読なし

〔学会発表〕(計10件)

櫻井伸行, 高橋一生, 江村菜津子, 皆川修人, 東間千芽, 橋爪 力, 澤井 健 (2016) FGF4 発現抑制がウシ初期胚の発生および組織分化関連遺伝子発現におよぼす影響. 第109回日本繁殖生物学会, 2016年9月12-14日, 麻布

大学.

江村菜津子, 櫻井伸行, 高橋一生, 東間千芽, 皆川修人, 橋爪 力, 澤井 健 (2016) TEAD4 がブタ初期胚の発生および組織分化関連遺伝子発現におよぼす影響. 第109回日本繁殖生物学会, 2016年9月12-14日, 麻布大学.

Emura, N., Sakurai, N., Takahashi, K., Hashizume, T. and Sawai, K. (2016) The necessity of OCT-4 expression for the segregation of trophoctoderm lineages in porcine preimplantation embryos. 17th AAAP Animal Science Congress, 22-25 August, Fukuoka, Japan.

Takahashi, K., Sakurai, N., Emura, N., Hashizume, T. and Sawai, K. (2016) Effect of downregulating ZSCAN4 transcript on early development and gene expression of bovine embryos. 17th AAAP Animal Science Congress, 22-25 August, Fukuoka, Japan.

Sakurai, N., Takahashi, K., Emura, N., Hashizume, T. and Sawai, K. (2015) Effects of downregulation OCT-4 and CDX2 transcripts on early development and gene expression in bovine embryos. Polish-Japaneses joint seminar cutting-edge reproductive physiology-A path to pregnancy-, 26 September-1 October, Gdansk, Poland.

Sawai K. (2015) Molecular mechanisms involved in segregation of inner cell mass and trophoctoderm lineages in bovine and porcine embryos. Polish-Japaneses joint seminar cutting-edge reproductive physiology-A path to pregnancy-, 26 September-1 October, Gdansk, Poland.

江村菜津子, 櫻井伸行, 高橋一生, 橋爪 力, 澤井 健 (2015) ブタ初期胚の栄養膜細胞形成におけるOCT-4発現の必要性. 第108回日本繁殖生物学会, 2015年9月17-19日, 宮崎大学
櫻井伸行, 高橋一生, 江村菜津子, 橋爪 力, 澤井 健 (2015) TEAD4発現抑制がウシ初期胚の発生および組織分化関連遺伝子発現におよぼす影響. 第108回日本繁殖生物学会, 2015年9月17-19日, 宮崎大学

Sakurai, N., Takahashi, K., Hashizume, T. and Sawai, K. (2014) Effect of

downregulating CDX2 transcript by RNA interference on early development of bovine embryos. 3rd World Congress on Reproductive Biology, 2-4 September, Edinburgh, United Kingdom.

Takahashi, K., Sakurai, N., Hashizume, T. and Sawai, K. (2014) Effect of down regulating GLIS1 transcript on early development and gene expression of bovine embryos. 3rd World Congress on Reproductive Biology, 2-4 September, Edinburgh, United Kingdom.

〔図書〕(計1件)

澤井 健 (2014) 家畜における体外生産胚のエピジェネティクス特性とその人為的制御, 「エピジェネティクスの産業応用」. 畑田出穂, 久保田健夫(監修), シーエムシー出版, 東京, pp.379-387.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

澤井 健 (SAWAI, Ken)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号 : 90390864

(2)研究分担者

木崎 景一郎 (KIZAKI, Keiichiro)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号 : 40337994