

	サライノブキ
<b>氏名</b>	<b>櫻井 伸行</b>
本籍（国籍）	宮城県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第連研 681 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
<b>学位論文題目</b>	<b>ウシ初期胚の組織分化を制御する分子基盤に関する研究（Studies on molecular mechanisms involved in differentiation in bovine preimplantation embryos）</b>
学位審査委員	主査 岩手大学教授 澤井 健 副査 橋爪 力(岩手 教授),手塚 雅文(帯広 教授),木村 直子(山形 教授)

### 論文の内容の要旨

哺乳動物胚では、桑実期から胚盤胞期への発生過程において初めての組織分化が起こる。すなわち、内部細胞塊(ICM)および栄養膜細胞(TE)への分化である。その後、胚盤胞期胚は透明帯から脱出し、さらに ICM は、胚盤葉上層(EPI)および原始内胚葉(PrE)へと分化する。こうした組織分化を制御する分子基盤に関しては、マウス胚において研究が進んでいる一方、ウシ胚では未だ不明な点が多い。本研究では、ウシ初期胚における組織分化を制御する分子基盤の解明を目的に、マウス胚における組織分化制御の重要因子である CDX2、TEAD4 および FGF4 を対象に、ウシ胚において RNA 干渉法を用いた発現抑制実験を行った。

(実験 1)マウス胚において、Cdx2 は TE 分化制御における重要因子として知られ、Tead4 や Gata3 など、他の TE 分化関連因子と協力して、*Eomes* などの発現を促し、TE 分化を促進する。その一方で、Cdx2 は ICM 関連因子である *Oct-4* および *Nanog* の TE での発現を抑制する働きを担う。本研究において、ウシ胚に対する CDX2 の発現抑制を行った結果、胚盤胞期への発生遅延が認められた。さらに、CDX2 発現抑制胚では、*GATA3* 発現量の低下と *NANOG* 発現量の上昇が認められた。CDX2 発現抑制によって認められたこれらの表現型は、ウシ胚の TE 分化制御においても CDX2 が重要な役割を担うことを示唆している。一方、CDX2 発現抑制胚では *OCT-4* 発現量の上昇が認められず、ウシ胚では CDX2 が *OCT-4* 発現を抑制していない可能性が示された。

(実験 2)マウス胚において、*Tead4* は TE 分化における最重要因子の 1 つとして知られ、*Cdx2* や *Gata3* を始めとした多数の TE 分化関連遺伝子の発現を上流から制御している。マウス *Tead4* 遺伝子欠損胚では、TE の形成不全が起こり、胚は胚盤胞期へ発生できずに致死となる。本研究において、ウシ胚に対する TEAD4 の発現抑制を行った結果、胚盤胞期への発生に影響は認められなかった。また、桑実期および胚盤胞期において、遺伝子発現への影響について検討した結果、ICM 分化関連遺伝子である *OCT-4* および *NANOG* 発現だけでなく、TE 分化関連遺伝子である *CDX2* および *GATA3* 発現においても、TEAD4 発現抑制の影響は認められなかった。これらの結果から、TEAD4 がウシ胚の TE 形成および分化における必須因子ではない可能性が示された。

(実験 3)マウス胚では、EPI あるいは PrE への細胞の運命決定において、互いに発現を抑制し合う関係にある転写因子、*Nanog* および *Gata6* の発現バランスが重要である。すなわち、*Nanog* 発現が優位な細胞は EPI へ、*Gata6* 発現が優位な細胞は PrE へと分化する。この *Nanog* および *Gata6* の発現バランスの制御において、重要な役割を担う因子が *Fgf4* である。EPI 前駆細胞内では、*Nanog* が下流に存在する *Fgf4* の発現を促し、細胞外へと *Fgf4* が分泌される。*Fgf4* は隣接する細胞にレセプターを介して作用し、下流の MAPK シグナル経路の活性化を通して *Gata6* 発現を促す。マウス *Fgf4* 遺伝子欠損胚は、胚盤胞期へ発生するものの、ICM における *Nanog* および *Gata6* の発現パターンに異常が生じる。すなわち、ICM 内の全ての細胞において *Nanog* が発現する一方で、*Gata6* 発現は消失する。本研究において、ウシ胚に対する FGF4 の発現抑制を行った結果、胚盤胞期への発生阻害が認められた。さらに、FGF4 発現抑制胚の *NANOG* および *GATA6* 発現量を解析した結果、桑実期において *NANOG* 発現量が上昇し、*GATA6* 発現量が低下する傾向が認められた。これらの結果から、ウシ胚において、FGF4 は初期胚発生に重要な因子であり、マウス胚と同様に *NANOG* および *GATA6* の発現制御において役割を担う可能性が示された。また、胚盤胞期へ発生した FGF4 発現抑制胚において、*NANOG* および *GATA6* の発現量解析を行った結果、FGF4 発現抑制の影響は認められなかった。このことから、ウシ胚では FGF4 だけでなく、その他の因子が *NANOG* および *GATA6* 発現制御に関与している可能性がある。

本研究の結果から、ウシ初期胚の胚発生および組織分化制御における *CDX2*、*TEAD4* および *FGF4* の機能に関して、新たな知見が得られた。哺乳動物胚では、胚盤胞期以降の発生機序や胎盤構造などが動物種間において大きく異なるが、こうした違いはより早い段階から組織分化に関わる分子基盤の違いとして始まる可能性があり、本研究において得られた知見が、今後、ウシ胚独自の発生制御メカニズムのより高度な理解に寄与することが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、ウシ初期胚における組織分化を制御する分子基盤の解明を目的に、マウス胚における組織分化制御の重要因子である CDX2、TEAD4 および FGF4 を対象に、ウシ胚において RNA 干渉法を用いた発現抑制実験を行った。

(実験 1)ウシ胚に対する CDX2 の発現抑制を行った結果、胚盤胞期への発生遅延が認められた。さらに、CDX2 発現抑制胚では、GATA3 発現量の低下と NANOG 発現量の上昇が認められた。CDX2 発現抑制によって認められたこれらの表現型は、ウシ胚の TE 分化制御においても CDX2 が重要な役割を担うことを示唆している。一方、CDX2 発現抑制胚では OCT-4 発現量の上昇が認められず、ウシ胚では CDX2 が OCT-4 発現を抑制していない可能性が示された。

(実験 2)ウシ胚に対する TEAD4 の発現抑制を行った結果、胚盤胞期への発生に影響は認められなかった。また、桑実期および胚盤胞期において、遺伝子発現への影響について検討した結果、ICM 分化関連遺伝子である OCT-4 および NANOG 発現だけでなく、TE 分化関連遺伝子である CDX2 および GATA3 発現においても、TEAD4 発現抑制の影響は認められなかった。これらの結果から、TEAD4 がウシ胚の TE 形成および分化における必須因子ではない可能性が示された。

(実験 3)ウシ胚に対する FGF4 の発現抑制を行った結果、胚盤胞期への発生阻害が認められた。さらに、FGF4 発現抑制胚の NANOG および GATA6 発現量を解析した結果、桑実期において NANOG 発現量が上昇し、GATA6 発現量が低下する傾向が認められた。これらの結果から、ウシ胚において、FGF4 は初期胚発生に重要な因子であり、マウス胚と同様に NANOG および GATA6 の発現制御において役割を担う可能性が示された。また、胚盤胞期へ発生した FGF4 発現抑制胚において、NANOG および GATA6 の発現量解析を行った結果、FGF4 発現抑制の影響は認められなかった。このことから、ウシ胚では FGF4 だけでなく、その他の因子が NANOG および GATA6 発現制御に関与している可能性がある。

本研究の結果から、ウシ初期胚の胚発生および組織分化制御における CDX2、TEAD4 および FGF4 の機能に関して、新たな知見が得られ、これら知見は、ウシ胚独自の発生制御メカニズムのより高度な理解に寄与することが期待される。

以上、本審査委員会は「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. Sakurai, N., Takahashi, K., Emura, N., 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 trophectoderm lineages in bovine embryos. *Cellular Reprogramming*. 18: 309-318.
2. Sakurai, N., Takahashi, K., Emura, N., Hashizume, T. and Sawai, K. (2016). Effects of downregulating TEAD4 transcripts by RNA interference on early development of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development*. in press.

#### 参考論文

1. Sakurai, N., Fujii, T., Hashizume, T. and Sawai, K. (2013). Effects of downregulating Oct-4 transcript by RNA interference on early development of porcine embryos. *Journal of Reproduction and Development*. 59: 353-360.
2. 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. *Journal of Reproduction and Development*. 61: 369-374.
3. Emura, N., Sakurai, N., Takahashi, K., Hashizume, T. and Sawai, K. (2016). OCT-4 expression is essential for the segregation of trophectoderm lineages in porcine preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Development*. 62: 401-408.