

氏名	江村 菜津子
本籍（国籍）	兵庫県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研 787 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 2 3 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
学位論文題目	ブタ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 porcine preimplantation embryos）
学位審査委員	主査 岩手大学教授 澤井 健 副査 手塚 雅文(帯広 教授),木村 直子(山形 教授),平田 統一(岩手 准教授)

## 論文の内容の要旨

哺乳動物胚は桑実期から胚盤胞(BC)期にかけて、胚の内側細胞は内部細胞塊(ICM)、外側の細胞は栄養膜細胞(TE)へと分化する。この ICM/TE の組織分化は様々な遺伝子の発現とシグナル経路によって制御されており、その制御機構はマウス胚を用いて研究が進んでいる。一方、ブタなど家畜胚においては、ICM/TE 分化を制御する分子基盤に関する研究は進んでおらず、初期胚の効率的な体外生産技術の開発などのために、ICM/TE 分化の制御機構の解明が望まれている。本研究では、マウス胚の ICM/TE 分化に重要な Hippo pathway と細胞極性に着目し、RNA 干渉法による遺伝子の発現抑制と阻害剤を用いて、ブタ胚における Hippo pathway に関わる因子の探索とそれらの機能の解明を行い、ブタ胚における ICM/TE 分化の分子基盤の構築を試みた。

マウス胚の TE 分化には、転写因子 Tead4 による *Cdx2* 発現の促進が必須である。本研究において、ブタ胚に対する *TEAD4* 発現抑制を行った結果、BC 期への発生が顕著に阻害されたものの、*CDX2* mRNA 発現量に変化は認められなかった。この結果から、ブタ胚において、*TEAD4* は BC 期への発生に必須であるが、*CDX2* 発現を介して初期発生に寄与しているのではないことが示唆された。

マウス胚における ICM 形成においては、Hippo pathway が重要である。すなわち、桑実期の内側細胞において、Lats1/2 が共役転写因子 Yap1 をリン酸化することによって Yap1 の核内移行が阻害され、TE への分化が抑制される。本研究では、ブタ胚の ICM/TE 分化における Hippo pathway の役割を明らかにするため、ブタ初期胚における *LATS2* の発現抑制を行った結果、*LATS2* 発現抑制胚では 16-細胞期以上への発生が阻害され、ICM 形成に重要である *OCT4* および *SOX2* mRNA 発現量が減少することが明らかとなった。この結果から、ブタ胚においても Hippo pathway が ICM/TE 分化を制御し、特に *LATS2* が ICM 形成に重要であ

る可能性が示された。一方、マウス胚の TE 分化においては、Tead4-Yap1 複合体による *Cdx2* 発現の促進が重要であることが知られている。本研究において、TEAD4-YAP1 複合体の形成阻害剤である Verteporfin を桑実期胚形成以前(発生前半)に体外発生培地に添加すると、ブタ胚において TEAD4 核内陽性細胞数が増加するとともに、16-細胞期以上への発生が阻害された。一方、桑実期胚形成以降(発生後半)に Verteporfin を添加した場合は、BC 期胚の拡張が阻害され、TE 分化とその維持に重要である *CDX2* および *GATA3* の mRNA 発現量が減少した。これらの結果から、TEAD4-YAP1 複合体はブタ胚の発生に必須であり、特に BC 期以降の胚発生においては、マウスと同様に *CDX2* や *GATA3* の発現制御を介して TE 分化に寄与していることが示唆された。

マウス桑実期胚の外側細胞では Par-aPKC 複合体によって構築される細胞極性が Hippo pathway を抑制することで TE 分化を促進する。本研究では、ブタ胚の細胞極性と ICM/TE 分化の関係を明らかにするため、Par-aPKC 複合体構成因子である *PARD6B* 発現を抑制したブタ胚の初期発生を検討した。その結果、*PARD6B* 発現抑制胚では BC 期への発生が顕著に阻害され、YAP1 核内陽性細胞率の低下が認められた。この結果から、ブタ胚においても細胞極性は発生に必須であり、Hippo pathway を抑制的に制御することで発生に寄与していることが示唆された。また、マウス胚においては、Hippo pathway 関連因子である *Amot* が細胞接着因子と共同することで ICM 形成に寄与する。桑実期の外側細胞では細胞極性が *Amot* 局在を外側細胞膜へ制御するため、*Amot* の細胞接着因子への作用が妨げられ、ICM 形成が生じない。本研究において、ブタ胚の *AMOT* 発現を抑制した結果、OCT-4 および *SOX2* 発現に影響はなかったものの、桑実期への発生が顕著に阻害された。この結果から、ブタ胚において *AMOT* が発生に必須であることが示された。

本研究を通して、ブタ胚において、Hippo pathway が ICM/TE 分化の制御に重要であること、さらに、その上流には Par-aPKC 複合体による細胞極性が重要な役割を担うことが示された。さらに、TEAD4-YAP1 複合体が桑実期形成以前に必須であるなどブタ胚独自の知見も明らかとなった。マウス胚とブタ胚では、初期発生や着床様式、胎盤の形態などが大きく異なるが、これらの違いは発生初期における組織分化を制御する分子基盤の違いによってもたらされるものと考えられる。本研究によって得られた知見は、ブタ胚の発生制御機構の高度な理解にとって重要であり、体外生産胚の効率的生産技術の開発などにも大きく寄与するものである。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、ブタ胚における組織分化を制御する分子基盤の解明を目的とし、マウス胚の組織分化において重要であることが知られている Hippo pathway と細胞極性に着目し、それら関連因子の人為的な発現抑制および体外発生培地への阻害剤添加がブタ初期胚の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、ブタ初期胚の組織分化における Hippo pathway の役割について検討した。*TEAD4* 発現抑制を行うと、BC 期への発生が阻害されたが、*CDX2* 発現に変化は認められなかった。この結果から、ブタ胚において *TEAD4* は BC 期への発生に必須であるが、*CDX2* 発

現を介して機能している可能性は低いことが示された。さらに、*LATS2* 発現抑制を行うと、16細胞期以上への発生が阻害され、ICM 形成に重要である *OCT-4* と *SOX2* 発現量が減少した。この結果から、ブタ胚において、Hippo pathway を介した *LATS2* の機能は ICM 形成に重要である可能性が示された。また、TEAD4-YAP1 複合体形成阻害剤である Verteporfin を桑実期胚形成以前の発生前半に体外発生培地に添加すると、TEAD4 の核内陽性細胞数の増加が生じ、16細胞期以上への発生が阻害された。一方、桑実期胚形成以降の後半に添加した場合、BC 期胚の拡張が阻害され、TE 分化と維持に重要である *CDX2* と *GATA3* 発現量が減少した。この結果から、TEAD4-YAP1 複合体はブタ胚の発生に必須であり、BC 期以降においては、マウスと同様に *CDX2* や *GATA3* の発現制御を介して TE 分化に寄与している可能性が示された。

次に、細胞極性が組織分化を制御する仕組みの解明を試みた。細胞極性関連因子である *PARD6B* 発現抑制を行うと、BC 期への発生が阻害され、YAP1 核内陽性細胞率が減少した。この結果から、ブタ胚において細胞極性は発生に必須であり、Hippo pathway を抑制的に制御することで発生に寄与していることが示唆された。*AMOT* 発現抑制を行うと、*OCT-4* と *SOX2* 発現に変化はなかったが、桑実期への発生が阻害された。この結果から、ブタ胚において *AMOT* が発生に必須であることが示された。

本研究の結果は、ブタ胚の初期発生および組織分化において Hippo pathway および細胞極性が重要な役割を担うことを示すものであり、ブタ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のあるものと認めた。

## 学位論文の基礎となる学術論文

### 主論文

- 1 . Emura, N., Takahashi, K., Saito, Y. and Sawai, K. (2019)  
The necessity of TEAD4 for early development and gene expression involved in differentiation in porcine embryos. *Journal of Reproduction and Development* 65: 361-368.
- 2 . Emura, N., Saito, Y., Miura, R. and Sawai, K. (2020)  
Effect of downregulating the Hippo pathway members YAP1 and LATS2 transcripts on early development and gene expression involved in differentiation in porcine embryos. *Cellular Reprogramming* 22: 62-70.

### 参考論文

- 1 . 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.