

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

2021

岩手大学大学院 連合農学研究科
生物生産科学専攻 (岩手大学配属)

江 村 菜 津 子

目次

	頁
第1章 緒論	5
第2章 <i>TEAD4</i> の発現抑制がブタ初期胚の体外発生と組織分化関連因子の発現におよぼす影響	
1. 緒言	12
2. 材料および方法	13
3. 結果	22
4. 考察	30
5. 要約	33
第3章 <i>LATS2</i> の発現抑制がブタ初期胚の体外発生と組織分化関連因子の発現におよぼす影響	
1. 緒言	35
2. 材料および方法	37
3. 結果	40
4. 考察	48
5. 要約	51
第4章 <i>TEAD4</i> – <i>YAP1</i> 複合体形成阻害剤の体外発生培地への添加がブタ初期胚の体外発生と組織関連因子の発現におよぼす影響	
1. 緒言	53

2. 材料および方法	55
3. 結果	58
4. 考察	68
5. 要約	71

第5章 *PAR6B*発現抑制がブタ初期胚の体外発生と Hippo pathway および組織分化関連因子の発現におよぼす影響

1. 緒言	73
2. 材料および方法	75
3. 結果	78
4. 考察	90
5. 要約	94

第6章 *AMOT*発現抑制がブタ初期胚の体外発生と組織分化関連因子の発現におよぼす影響

1. 緒言	96
2. 材料および方法	98
3. 結果	101
4. 考察	110
5. 要約	114

第7章 総括

謝辞	121
----	-----

引用文献 · · · · · 122

第 1 章

緒 論

ブタは、食肉および皮革利用のための畜産分野はもとより、移植用臓器の供給や疾患モデルを目的とした医療分野への応用も期待される動物種である。他の動物種と同様に優良個体の増産や医療用個体の作出のためには、ブタ胚を体外生産する技術は極めて重要である。しかし、ブタにおいて体外受精 (*in vitro fertilization*; IVF) や体細胞核移植といった胚の体外生産技術は、マウスやウシと比較して解決すべき課題が多い。その問題点の一つに、胚の体外発生培養 (*in vitro culture*; IVC) 時の胚盤胞 (Blastocyst; BC) 期への発生率の低さと BC 期胚の質の悪さが挙げられる (Brussow ら 2000)。BC 期胚は、将来胎子となる内部細胞塊 (Inner cell mass; ICM) と胎盤を形成する栄養膜細胞 (Trophectoderm; TE) から構成されており、ブタ胚ではこの ICM/TE の形成異常が IVC 胚において高頻度で発生することが指摘されている (Brussow ら 2000)。したがって、正常な胚発生を支持する IVC 技術を構築するためには、ICM/TE 分化の詳細な分子メカニズムの理解が求められているが、遺伝子改変技術の導入が難しい点などから、ブタ胚におけるそれら機構に関する知見は未だ乏しい。

哺乳動物胚は受精後、数回の卵割を経て、桑実期から BC 期へと発生する。桑実期から BC 期にかけて、それまで全能性を有していた割球細胞が ICM もしくは TE へと分化する (Pedersen ら 1986)。この ICM/TE 分化は哺乳動物胚における最初の組織分化であり、様々な遺伝子発現によって制御されている (Yamanaka ら 2006)。哺乳動物胚における ICM/TE 分化の分子メカニズムに関する研究はマウス胚で最も進んでおり、細胞が ICM と TE のどちらに分化するかは、桑実期における細胞の位置が重要であると考えられている。すなわち、桑実期胚の内側に存在する細胞は POU class 5 transcription factor 1 (Oct-4) や SRY-related HMG-box gene 2 (Sox2) といった細胞の未分化性を維持する因子

を優位に発現し ICM へ (Avilion ら 2003 ; Nichols ら 1998)、外側細胞では TEA domain transcription factor 4 (Tead4) によって Caudal-related homeobox 2 (Cdx2) や GATA binding protein 3 (Gata3) の発現が促進され、TE への分化が誘導される (Home ら 2012 ; Nishioka ら 2008 ; Niwa ら 2005 ; Ralston ら 2010 ; Wu ら 2010 ; Yagi ら 2007)。この細胞の内側/外側間で異なる遺伝子発現は、複数の転写因子やシグナル経路によって制御されており、その主要なものに Hippo pathway がある (Hirate ら 2013 ; Nishioka ら 2009)。Hippo pathway の概略について Fig. 1 に図示した。外側細胞では、Tead4 によって Cdx2 や Gata3 の発現が生じるが、Tead4 は共役転写因子である Yes-associated protein 1 (Yap1) が結合し、核内で両者が複合体を形成することで転写因子として機能する (Menchero ら 2019 ; Nishioka ら 2009 ; Rayon ら 2014)。一方、内側細胞では、Hippo pathway によって Tead4-Yap1 の複合体形成が阻害されることで、Tead4 が機能せず、結果的に ICM が形成される。Hippo pathway 関連因子である Angiomin (Amot) は内側細胞において細胞膜に均一に発現し、細胞接着因子および Large tumor suppressor 1/2 (Lats1/2) キナーゼと相互作用する (Hirate ら 2013 ; Mihajlovic と Bruce 2016 ; Leung と Zernicka-Goetz 2013 ; Shi ら 2017)。この相互作用によって活性化した Lats1/2 は Yap1 をリン酸化することで、Yap1 の核内移行を阻害する (Hirate ら 2013 ; Lorthongpanich ら 2013 ; Nishioka ら 2009)。その結果、Yap1 は核内の Tead4 に結合することができないため、TE 分化に重要な因子群の発現が抑制される。一方、外側細胞において Amot は、他の細胞と接着していない外側の細胞膜に局在するため (Hirate ら 2013 ; Mihajlovic と Bruce 2016 ; Leung と Zernicka-Goetz 2013 ; Shi ら 2017)、細胞接着因子へ作用することができず、Hippo pathway が機能しないため、Yap1 の核内移行と TE 分化を制御する因子の発現が生じる (Hirate ら 2013)。この

外側細胞に特異的な Amot の局在性は細胞極性によって制御されていることが明らかとなっている (Hirate ら 2013)。中でも Par-aPKC 複合体は細胞極性を司る代表的な因子群であり、Par-aPKC 複合体による細胞極性を乱したマウス胚では、外側細胞においても Amot が内側細胞同様の局在性を示し、TE 分化に異常をきたす (Alarcon 2010; Cao ら 2015; Hirate ら 2015; Hirate ら 2013; Plusa ら 2005)。このようにマウス胚では、内側細胞での Hippo pathway 促進と、外側細胞での細胞極性を介した Hippo pathway の抑制が内側/外側細胞間での遺伝子発現の違いを生み出し、ICM/TE 分化が引き起こされる。

ブタ胚においては、SOX2 は ICM 形成、TEAD4 と YAP1 は TE 分化に重要であることがすでに示唆されており (Liu ら 2015; 江村 2018; 三浦 2019)、これらはマウスと類似した知見である。その一方で、ICM/TE 分化においてマウスと異なる分子メカニズムの存在も示唆されている。例えば、Oct-4 はマウス胚では、ICM 形成にのみ必須であることに対し (Nichols ら 1998)、ブタ胚では ICM と TE の両方の形成に重要である (Emura ら 2016; Sakurai ら 2013)。また、マウス胚では分割期から Cdx2 が発現し TE 分化に重要な役割を担うが (Ralston と Rossant 2008; Strumpf ら 2005)、ブタ胚において CDX2 は BC 期以降に機能すると考えられている (Bou ら 2017)。このように、ブタ胚の ICM/TE 分化メカニズムにはマウスとの類似点と相違点の両方が認められることから、ブタ胚には独自の分子基盤が存在すると考えられるが、未だブタ胚における組織分化の分子メカニズムの解明には至っていない。

本研究では、ブタ初期胚の組織分化を制御する分子基盤の構築を目的に、マウス胚の組織分化を制御している因子群を対象に、ブタ胚におけるそれら因子の役割の解明を試みた。第 2 章では *TEAD4*、第 3 章では *LATS2* の発現抑制がブタ胚の発生および組織分化関連因子発現におよぼす影響について検討した。ま

た、第 4 章では TEAD4-YAP1 複合体形成阻害剤の IVC 培地への添加がブタ胚の発生および組織分化関連因子発現におよぼす影響について検討した。さらに、第 5 章および第 6 章では、Par-aPKC 複合体構成因子 *PARD6B* と *AMOT* の発現抑制がブタ胚発生および組織分化関連因子発現におよぼす影響について検討した。

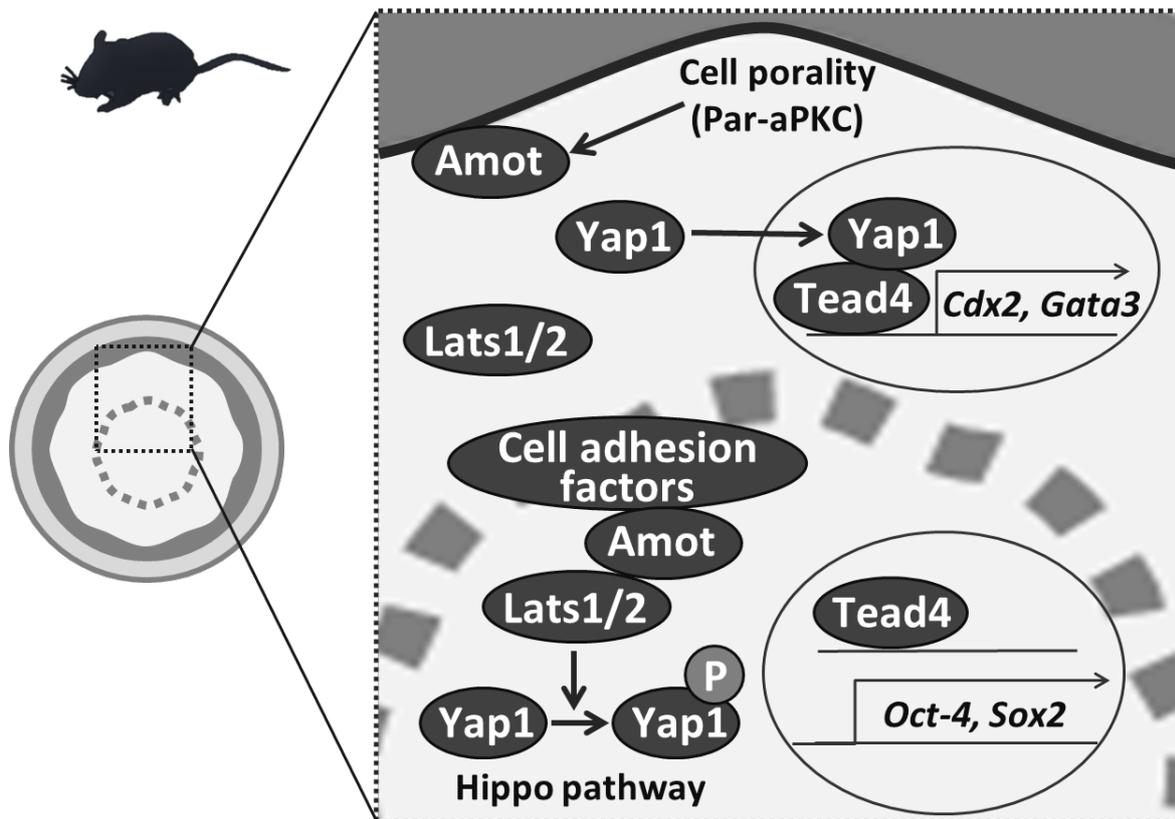


Figure 1. A schematic model of molecular mechanisms for ICM/TE differentiation in murine morula stage embryos.

第2章

*TEAD4*の発現抑制がブタ初期胚の体外発生と
組織分化関連因子の発現におよぼす影響

1. 緒言

Tead ファミリーの一つである Tead4 は転写因子であり、*Tead4* 遺伝子を欠損、もしくは発現抑制したマウス胚では、TE 分化に重要な *Cdx2* が発現しなくなる上、Oct-4 や Sox2、Nanog といった ICM 分化を制御する因子群の発現が増加する (Home ら 2012; Nishioka ら 2008; Wicklow ら 2014; Wu ら 2010; Yagi ら 2007)。このことから、マウス胚において Tead4 は、*Cdx2* 発現の制御を介して TE 分化に寄与していることが知られている。

ブタ胚においても TEAD4 発現が認められており、コンパクションが生じる 16-細胞期から核内での局在が観察される (江村 2018)。また、RNA 干渉法によって *TEAD4* 発現を人為的に抑制すると、BC 期への発生が阻害され、*OCT-4* mRNA 発現量は変化しないものの、*SOX2* mRNA 発現量が増加する (江村 2018)。この実験結果から、ブタ胚においても TEAD4 が TE 分化に重要であることが示唆されたが、TEAD4 と CDX2 との関連性については検討されていない。また、siRNA を用いた発現抑制実験では、オフターゲット効果が懸念されており (Rao ら 2009)、この *TEAD4* 発現抑制実験においても 1 種類のみ siRNA を用いているため、オフターゲット効果によって得られた実験結果である可能性が否定できない。

そこで本研究では、ブタ初期胚における TEAD4 の機能をより詳細に解明するべく、先行研究とは異なる配列の siRNA を追加し、計 2 種類の siRNA を用いて *TEAD4* の発現抑制実験を行い、ブタ胚の発生におよぼす影響について検討した。また、*TEAD4* 発現抑制胚における *CDX2* mRNA 発現量を解析するとともに、OCT-4 および SOX2 のタンパク質レベルでの発現を検討した。

2. 材料および方法

(1) ブタ卵巢の採取および卵子の吸引

実験に供したブタ卵巢は、すべて岩手畜産流通センター食肉処理場に搬入屠殺された春季発動前の雌ブタより採取した。卵巢を採取する各個体の月齢、品種などは考慮せず卵巢疾患が疑われるものは除外した。屠体より採取した卵巢は抗生物質（100 IU/ml ペニシリン G カリウム [明治製菓株式会社, 東京, 日本], 0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン [明治製菓株式会社]) を含む 37°C の生理食塩水 (NaCl [Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA]; 0.9% 水溶液) 中に浸漬して実験室に持ち帰った。持ち帰った卵巢は 37°C の生理食塩水で数回洗浄した後、表面に付着している生理食塩水、血液などをキムタオルで除去した。室温の卵子吸引用培地 (TCM-199 [Sigma-Aldrich], 4.17 mM NaHCO₃ [Sigma-Aldrich], 20 mM HEPES [Sigma-Aldrich], 100 IU/ml ペニシリン G カリウム, 0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン, 10% Fetal bovine serum [FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA]) を 18 G 注射針 (Terumo, 東京, 日本) 付き 10 ml シリンジ (Nipro, 大阪, 日本) に 0.5-1.0 ml 吸引した後、卵巢表面にある直径 2-6 mm の卵胞から卵胞液とともに卵丘細胞-卵子複合体 (Cumulus-Oocyte Complex; COCs) を吸引採取し、50 ml のコニカルチューブ (True Line, DF. CP, Mexico) に移した。卵胞液は吸引後、約 15 分間静置し、チューブ内の上澄み液を除去し、卵子吸引用培地で希釈後、実体顕微鏡下において、卵丘細胞が 3 層以上付着しており卵細胞質が変性していない COCs を選抜した。

(2) 体外成熟培養 (IVM)

卵子の体外成熟培養 (*in vitro* maturation; IVM) には 4 well-dish (Thermo

Fisher Scientific) を用いた。IVM 開始 2 時間以上前に 1 mM dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP ; Sigma-Aldrich)、10 IU/ml Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG ; セロトロピン, あすか製薬株式会社, 東京, 日本)、10 IU/ml human Chorionic Gonadotropin (hCG ; ゲストロン®1500, 共立製薬株式会社, 東京, 日本) を含む 1st IVM 培地 (10% ブタ卵胞液, 5.0 mM Glucose [Sigma-Aldrich], 10.8 mM Sorbitol [Sigma-Aldrich], 0.05 mM β -Mercaptoethanol [Sigma-Aldrich], 0.6 mM L-Cystein [Sigma-Aldrich] を含む NCSU-37 [Petters と Wells 1993] ; 108.8 mM NaCl, 4.8mM KCl [Sigma-Aldrich], 1.7 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Sigma-Aldrich], 1.2 mM KH_2PO_4 [Sigma-Aldrich], 1.2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [Sigma-Aldrich], 0.25 mM L-Glutamine [Sigma-Aldrich], 25 mM NaHCO_3 , 100 IU/ml ペニシリン G カリウム, 0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン) を 4 well-dish の各 well に 500 μl ずつ入れ、流動パラフィン (ナカライテスク, 東京, 日本) で表面を覆った後、 CO_2 インキュベーター内で気相と温度を平衡させた。COCs は 1st IVM 培地で洗浄後、約 50 COCs/well となるように well に入れ、マルチガスインキュベーター内で 20 時間培養した。その後、COCs を 2nd IVM 培地 (1st IVM 培地から dbcAMP、PMSG および hCG を除いたもの) で洗浄した後、同培地中でさらに 24 時間の成熟培養を行った。培養液の気相と温度の平衡は 39°C 、5% CO_2 、in air の CO_2 インキュベーターで行い、COCs の培養は 39°C 、5% CO_2 、5% O_2 、90% N_2 のマルチガスインキュベーター内で行った。

(3) 体外受精 (IVF)

IVF 開始の 2 時間以上前に IVF 培地 (m-PigFM [Kikuchi ら 2002] ; 90 mM NaCl, 12 mM KCl, 8 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mM NaH_2PO_4 [Sigma-Aldrich], 0.5 mM MgSO_4 [Sigma-Aldrich], 2 mM Na-Pyruvate (Sigma-Aldrich), 10 mM Na-

Lactate [Sigma-Aldrich], 10 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, 5 mM Caffeine [Sigma-Aldrich], 5 mg/ml BSA fraction V [Sigma-Aldrich], 100 IU/ml ペニシリン G カリウム, 0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン) で 90 μ l の媒精用ドロップを 35 mm dish (Falcon 1008 [Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA]) に作成し、流動パラフィンで表面を覆った後、CO₂ インキュベーター内で気相と温度を平衡した。IVM 後の COCs は IVF 培地で数回洗浄した後、約 20 個ずつ媒精用ドロップへ移し、CO₂ インキュベーター内に戻した。その後、ストロー凍結法によって作成したブタ凍結精液を 38°C の温水内に 1 分間浸漬することで融解し、精子処理液 (卵子吸引用培地, 4 mM Ca-Lactate [Sigma-Aldrich], 0.9 mM Na-Pyruvate, 3 mM Glucose, pH 7.8) を用いて洗浄・遠心分離 (1800 rpm 3 分間) を 2 回行った。遠心処理後、血球計算盤を用いて精子数を算出し、濃度が 1.0×10^7 /ml となるように、精子処理液で希釈した。希釈後の精子はよく混和した後、10 μ l ずつ媒精用ドロップへ添加することで最終精子濃度が 1.0×10^6 /ml となるようにし、マルチガスインキュベーター内で 6 時間媒精した。媒精後、胚を 10% Calf Serum (CS ; Thermo Fisher Scientific) を添加した修正 PBS (mPBS ; 0.96% ダルベッコ PBS(-) [日水製薬, 東京, 日本], 9 μ M CaCl₂ · 2H₂O, 5 μ M MgCl₂ · 6H₂O [Sigma-Aldrich], 5.6 mM Glucose, 0.3 mM Na-Pyruvate, 100 IU/ml ペニシリン G カリウム, 0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン) に移し、ピペッティングによって卵丘細胞を除去した。培養液の気相と温度の平衡、および精子調整時の COCs のインキュベーターは 39°C、5%CO₂、in air の CO₂ インキュベーター内で行い、媒精は 39°C、5%CO₂、5%O₂、90%N₂ のマルチガスインキュベーター内で行った。

(4) 体外発生培養 (IVC)

IVC 開始 2 時間以上前に IVC 培地 (PZM-5 [Yoshioka ら 2008] ; 108 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.35 mM KH_2PO_4 , 0.4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 mM NaHCO_3 , 0.2 mM Na-Pyruvate, 2 mM $\text{Ca}-(\text{Lactate})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [Sigma-Aldrich], 2 mM L-Glutamine, 5 mM Hypotaurine [Sigma-Aldrich], 20 ml/l BME amino acids [Sigma-Aldrich], 10 ml/l MEM non-essential amino acids [Sigma-Aldrich], 3 mg/ml Polyvinyl alcohol [PVA ; Sigma-Aldrich], 0.01 mg/ml Gentamicin [Sigma-Aldrich]) で 70 μl の発生用ドロップを 35 mm dish に作成し、流動パラフィンで表面を覆った後、 CO_2 インキュベーター内で気相と温度を平衡させておいた。卵丘細胞除去後の IVF 胚を IVC 培地で数回洗浄した後、約 50 個ずつ同培地に移し、マルチガスインキュベーター内で 5 日間発生培養した。IVF 胚の観察は、IVC 開始から約 48 時間後の 2 日目から約 24 時間ごとに 5 日間、実体顕微鏡下で行った。培養液の気相と温度の平衡は 39°C 、5% CO_2 、in air の CO_2 インキュベーター内で行い、培養は 39°C 、5% CO_2 、5% O_2 、90% N_2 のマルチガスインキュベーター内で行った。

(5) short interfering RNA (siRNA) の胚への注入

異なる塩基配列を標的とした 2 種類の *TEAD4* 発現抑制用 siRNA (TEAD4 siRNA-1 および TEAD4 siRNA-2) は、ブタ *TEAD4* 遺伝子の塩基配列 (GenBank accession no. ; NM_001142666.1) をもとに設計した (Table 1)。siRNA の設計に関しては、BLOCK-iT RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) および Enhanced siDirect (<http://design.RNAi.jp/>) を用いた。siRNA 注入開始 2 時間以上前に IVC 培地で 20 μl のインジェクション用ドロップを作成し、流動パラフィンで表面を覆った後、 CO_2 インキュベ

ーター内で気相と温度を平衡させておいた。siRNA の注入を行う際には、一回の処理につき、卵丘細胞を除去した直後の 25-30 個程度の胚をインジェクション培地に移し、TEAD4 siRNA-1 もしくは TEAD4 siRNA-2 (フナコシ株式会社, 東京, 日本) の注入処理を行った。本研究では、TEAD4 siRNA の注入を行う区に加え、Control siRNA (Allstars Negative Control siRNA [Qiagen, Düsseldorf, Germany]) の注入を行う区、いずれの siRNA の注入も行わない区 (Uninjected 区) を対照区として設けた。siRNA の注入にはマイクロマニピュレーター (株式会社ナリシゲ, 東京, 日本)、Femtojet® (Eppendorf, Hamburg, Germany) およびインジェクションピペット (Femtotip ; Eppendorf) を用い、1-細胞期胚の細胞質内に 50 μ M TEAD4 siRNA もしくは 20 μ M Control siRNA を約 10 μ l 注入した。siRNA 注入後、胚を IVC 培地に移し、マルチガスインキュベーター内で 5 日間培養した。培養液の気相と温度の平衡は 39°C、5%CO₂、in air の CO₂ インキュベーター内で行い、培養は 39°C、5%CO₂、5%O₂、90%N₂ のマルチガスインキュベーター内で行った。

(6) mRNA 発現解析に用いたブタ胚のサンプリング

桑実期胚のサンプリングは、IVC 開始 96 時間後に行った。胚を CO₂ インキュベーター内で温度を平衡させておいた 0.5% Protease (Sigma-Aldrich) および 1% Polyvinylpyrrolidone (PVP ; Sigma-Aldrich) を含む 0.4% Dulbecco's PBS (DPBS ; Thermo Fisher Scientific) で約 5 分間処理し、透明体を溶解した後、1% PVP を含む DPBS で数回洗浄した。洗浄後、胚を 5 μ l の Lysis Buffer (0.8% IGEPAL [ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH, USA], 5 mM DTT [Thermo Fisher Scientific], 1 U/ μ l RNasin [Promega, Madison, WI, USA], DEPC 水 [Qiagen]) を分注した 0.5 ml マイクロチューブ (ザルスタット株式会社, 東京, 日本) 内

に移し (5 胚/1 サンプル)、液体窒素による凍結、融解、攪拌を繰り返すことによって細胞を破碎し細胞内の mRNA を抽出した。mRNA サンプルは -80°C のフリーザー内で保存した。

(7) mRNA の逆転写 (RT)

mRNA の逆転写 (Reverse transcription ; RT) 反応は QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) および PCR サーマルサイクラー (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) を用いて行った。5 μl の mRNA サンプルを常温で融解後、8 連チューブ (フナコシ株式会社) に移し、 80°C で 5 分間処理した。次に gDNA Wipeout Buffer を 2 μl 、RNase free 水を 8 μl ずつ添加し、数回ピペッティングした後、 42°C で 2 分間処理した。さらに、Quantiscript Reverse Transcriptase (RT 酵素) を 1 μl 、RT Buffer を 5 μl ずつ添加し、数回ピペッティングした後、 42°C で 30 分間処理することで cDNA を合成した。その後、 95°C で 3 分間処理することで RT 酵素を失活させた。RT 反応後、計 21 μl の cDNA サンプルを 0.5 ml マイクロチューブに移した。これら RT 後のサンプルは -30°C のフリーザー内で保存した。

(8) リアルタイム PCR

リアルタイム PCR には QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) および StepOne Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。各反応は 8 連チューブ (Micro Amp ; Applied Biosystems) に反応液 (2 \times Master Mix 10 μl , Forward および Reverse Primer [Table 1] 各 1 μl , RNase フリー水 6 μl) を 18 μl ずつ入れ、テンプレートとして 2 μl の cDNA サンプルを添加して行った。cDNA サンプルを添加した反応液を 95°C で 15 分間処理す

ることにより Hotstartaq DNA Polymerase を活性化し、続いて 94°C で 15 秒、52-60°C (Table 1) で 30 秒、72°C で 30 秒の反応を 45 サイクル行うことで cDNA の増幅および蛍光度の測定を行った。その後、増幅した PCR 産物の融解曲線を作成することにより、得られた PCR 産物の特異性を確認した。

(9) mRNA 発現量の定量化

mRNA 発現量は、標準曲線との比較により定量化した。通常の PCR によって得た各遺伝子の PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製した後、Nano Drop (ND-1000 [Thermo Fisher Scientific]) を用いて 260 nm の吸光度を測定することで PCR 産物の濃度を測定し、濃度が 10 ng/μl になるように T₁₀E₁ Buffer (1% Tris HCl [Thermo Fisher Scientific], 0.2% EDTA [Thermo Fisher Scientific]) で希釈した。全てのリアルタイム PCR 反応ごとに、上記の 10 ng/μl ストックを T₁₀E₁ Buffer で 10 倍ずつ段階希釈することで標準サンプル (10⁻⁵-10⁻¹² ng/μl) を調整し、cDNA サンプルとともに増幅した。SYBR Green による蛍光度の測定はすべての増幅サイクルで行った。最終的な mRNA 発現量は Step One Real Time PCR system software (Applied Biosystems) を用いて算出した。各遺伝子の mRNA 発現量の比較には同一サンプル内の Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) 発現量で補正した値を用いた。

(10) 蛍光免疫染色

IVC 開始 96 時間後に桑実期まで発生した胚を、0.1% PVA を添加した 4% Paraformaldehyde PBS (和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) を用いて室温で 20 分間処理し、固定処理を行った。その後、0.1% PVA を添加した DPBS で胚を洗

浄した。0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) を含む DPBS (TXPBS) を用いて 10 分間の洗浄処理を 2 回行った後、0.2% Triton X-100 を含む DPBS 内で 30 分間処理することで透過処理を行った。その後、Image-iT FX Signal Enhancer (Thermo Fisher Scientific) で 30 分間処理し、TXPBS を用いて 10 分間の洗浄処理を 2 回行った。続いて、TEAD4 もしくは SOX2 蛍光免疫染色には 0.5% BSA と 1% スキムミルクを含む TXPBS、OCT-4 蛍光免疫染色には 7% goat serum (Thermo Fisher Scientific) を含む TXPBS で 90 分間処理することでブロッキングを行った。TXPBS を用いた 5 分間の洗浄処理の後、各一次抗体 (Mouse monoclonal anti-TEAD4 primary antibody [ab58310 ; Abcam, Cambridge, UK]、Mouse monoclonal anti-SOX2 primary antibody [sc-365823; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA] および Rabbit polyclonal anti-OCT-4 primary antibody [sc-9081 ; Santa Cruz Biotechnology]) を用いて一次抗体反応処理を行った。一次抗体反応処理は、0.5% BSA および 0.05% Triton X-100 を含む DPBS で一次抗体の濃度を TEAD4 は 1:1000 倍希釈に調整し、4°C で 1 時間静置、SOX2 および OCT-4 は 1:50 倍希釈に調整し、4°C で一晩静置することで行った。TXPBS で 15 分間の洗浄処理を 4 回行った後、0.5% BSA および 0.05% Triton X-100 を含む DPBS を用いて 1:400 倍に希釈した二次抗体 (Alexa 488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody [A11029 ; Thermo Fisher Scientific] もしくは Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody [A11034 ; Thermo Fisher Scientific]) を用いて室温で 1 時間の二次抗体反応処理を行った。TXPBS で 20 分間の洗浄処理を 4 回行った後、スライドガラス上に作成した VECTA-SHIELD with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) の微小滴上に胚をのせ、カバーガラスで覆った。カバーガラスの周囲をマニキュアで封入し、蛍光顕微鏡 (ECLIPSE Ti-U ; Nikon, 東京, 日本) を用いて

染色像の観察および撮影を行い、Image J (National Institutes of Health, Bethesda, USA) を用いて細胞数 (DAPI) と各タンパク質の核内陽性細胞数をカウントした。

(11) 統計解析

得られたデータの統計解析は、Statcel 2 (オーエムエムス出版, 埼玉, 日本) および Stat view (Hulinks, 東京, 日本) を用いて行った。mRNA 発現量に関するデータはすべて、平均値に標準誤差をつけて示した。mRNA 発現量は、Bartlett 検定を用いて分散の均一性を確認し、全てにおいて分散が不均一だったため、Kruskal-Wallis 検定を行い、その後 Scheffé 法を用いて多群間の有意差検定を行った。胚発生率およびタンパク質の核内陽性細胞率の検定には Arc-sin 変換を行った数値を用いた。胚発生率において、Arc-sin 変換後の値は、F 検定を用いて分散の均一性を確認した後、分散が均一だった場合はスチューデントの t 検定、分散が不均一だった場合は、マンホイットニの U 検定を行った。タンパク質の核内陽性細胞率は、Arc-sin 変換後の値を Bartlett 検定によって分散の均一性を確認し、分散が均一だった場合は、One-Factor ANOVA を用いて検定を行い、多重比較として Tukey Kramer の検討を行った。分散が不均一だった場合は、Kruskal-Wallis 検定を行い、その後 Scheffé 法を用いて多群間の有意差検定を行った。

3. 結果

(1) siRNA 注入による *TEAD4* mRNA 発現抑制効果の検証

Uninjected 区および Control siRNA、*TEAD4* 発現抑制用の *TEAD4* siRNA-1 もしくは *TEAD4* siRNA-2 を注入した区の桑実期における *TEAD4* mRNA 発現量を Fig. 2 に示した。*TEAD4* mRNA 発現量は、*TEAD4* siRNA-1 注入区および *TEAD4* siRNA-2 注入区において Uninjected 区および Control siRNA 注入区と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

タンパク質レベルでの発現抑制効果についても検討するため、Uninjected 区、Control siRNA 注入区および *TEAD4* siRNA-1 注入区の桑実期胚における *TEAD4* タンパク質の核内での陽性細胞数をカウントし、全細胞数に対する割合を Fig. 3 に示した。*TEAD4* siRNA-1 注入区における *TEAD4* 陽性細胞数は、Uninjected 区および Control siRNA 注入区と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

(2) *TEAD4* siRNA-2 を用いた *TEAD4* 発現抑制がブタ初期胚の発生におよぼす影響

先行研究によって、*TEAD4* siRNA-1 注入による *TEAD4* 発現抑制は、ブタ胚の桑実期への発生に影響をおよぼさないものの、BC 期への発生を顕著に阻害することを示した (江村 2018)。この発生阻害がオフターゲットによるものでないことを検討するため、本研究ではターゲット配列の異なる *TEAD4* siRNA-2 を用いて *TEAD4* 発現の抑制を行い、ブタ初期胚の発生率を調べた。Control siRNA もしくは *TEAD4* siRNA-2 を注入した区における初期胚盤胞 (EBC) 期以上までの発生率を Table 2 に示した。IVC 開始後 2 日目 (Day 2) での 2-細胞期以上

への分割率、3日目 (Day 3) での 8-細胞期への発生率、4日目 (Day 4) での 16-細胞期以上および桑実期への発生率、5日目 (Day 5) での EBC 期以上への発生率を示した。これら分割率および各ステージへの発生率は、培養胚数に対する割合で示した。Control siRNA 注入区および TEAD4 siRNA-2 注入区における分割率 (60.7%および 63.4%)、8-細胞期以上への発生率 (24.6%および 26.3%)、16-細胞期以上 (35.5%および 35.5%) および桑実期 (15.8%および 12.9%) への発生率に両区間で有意な差は認められなかった。EBC 期以上への発生率においては、TEAD4 siRNA-2 注入区 (2.7%) が Control siRNA 注入区 (23.0%) と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

(3) *TEAD4* 発現抑制がブタ初期胚における組織分化関連因子発現におよぼす影響

Uninjected 区、Control siRNA 注入区および TEAD4 siRNA-1 注入区の桑実期胚における *CDX2* 遺伝子の mRNA 発現量を Fig. 4 に示した。桑実期における *CDX2* mRNA 発現量は、各処理区間で有意な差は認められなかった。

また、TEAD4 siRNA-1 注入による *TEAD4* 発現抑制は、*OCT-4* mRNA 発現量に影響はなかったものの、*SOX2* mRNA 発現量を増加させた (江村 修論 2018)。これら遺伝子のタンパク質レベルでの影響も検討するため、Uninjected 区、Control siRNA 注入区および TEAD4 siRNA-1 注入区の桑実期胚における *OCT-4* および *SOX2* タンパク質の核内での陽性細胞数を計測し、全細胞数に対する陽性細胞数の割合を算出し、Fig. 5 に示した。いずれのタンパク質の核内陽性細胞率においても、各処理区間で有意な差は認められなかった。

Table 1. Primers and siRNA sequences

Gene name	Nucleotide sequences (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)	GenBank accession no.
<i>TEAD4</i>	F- TGGTGGAGAAAGTGGAGACC	60	157	NM_001142666.1
	R- AAGTTCTCCAGCACGCTGTT			
<i>CDX2</i>	F- CAGGCCCTCTGAGAAAGTGTC	60	212	NM_001278769.1
	R- GGGGTCTTCTGAGGATTC			
<i>GAPDH</i>	F- TCGGAGTGAAACGGATTG	52	219	AF017079.1
	R- CCTGGAAGATGGTGATGG			
TEAD4 siRNA-1	S- GCCAUUACUCCUACCGCAUTT	N/A	N/A	N/A
	AS- AUGCGGUAGGAGUAAUGGCTT	N/A	N/A	N/A
TEAD4 siRNA-2	S- CUGUGCGUCGCGUAUGUCUUC	N/A	N/A	N/A
	AS- AGACAUACCGCAGCACAGCA	N/A	N/A	N/A

F, forward ; R, reverse ; S, sense strand ; AS, antisense strand.

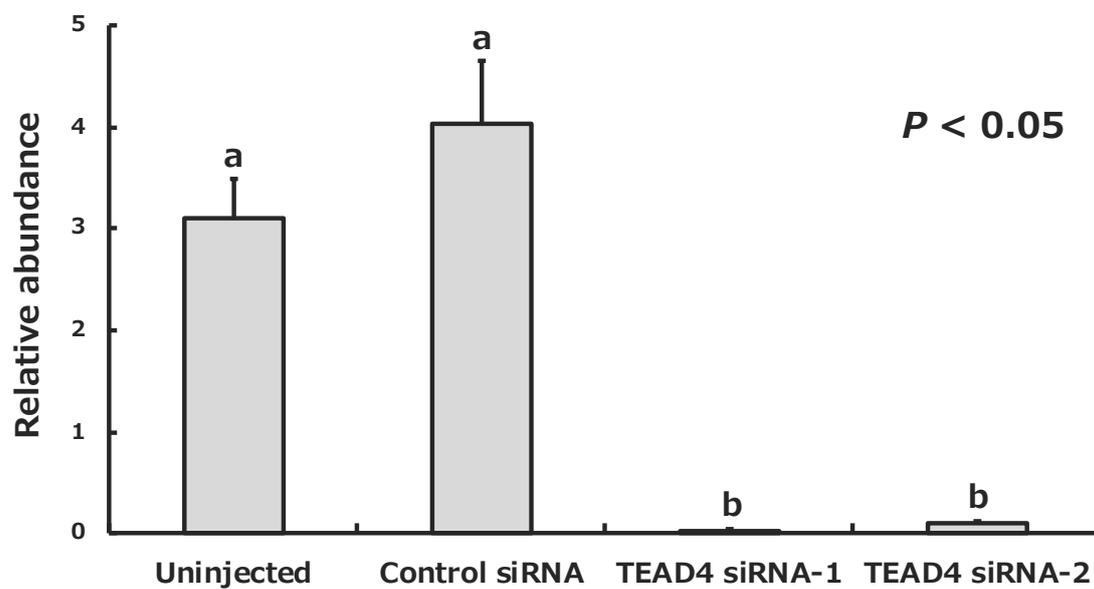


Figure 2. Relative abundance (mean \pm SEM) of *TEAD4* transcripts in porcine morula stage embryos obtained from Uninjected (n = 5), Control siRNA (n = 5) injection, TEAD4 siRNA-1 (n = 5) injection or TEAD4 siRNA-2 (n = 5) injection.

^{a, b} Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

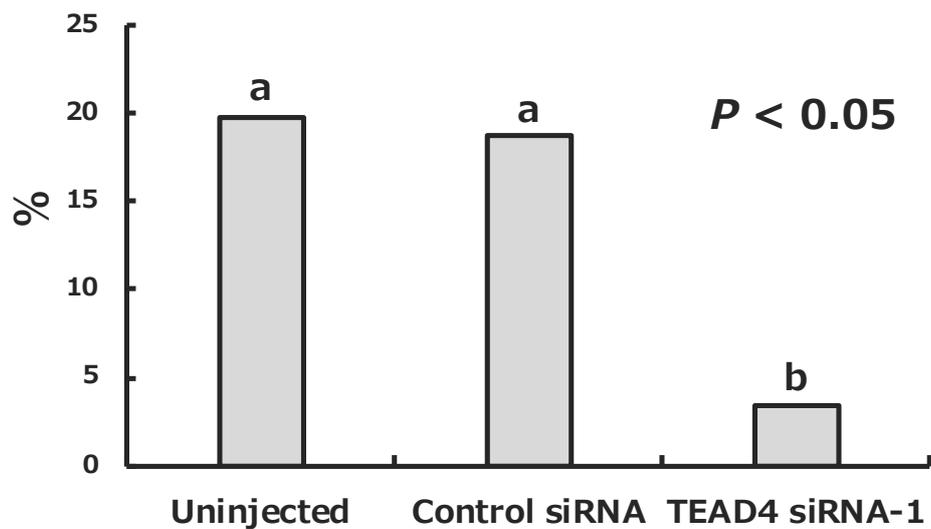
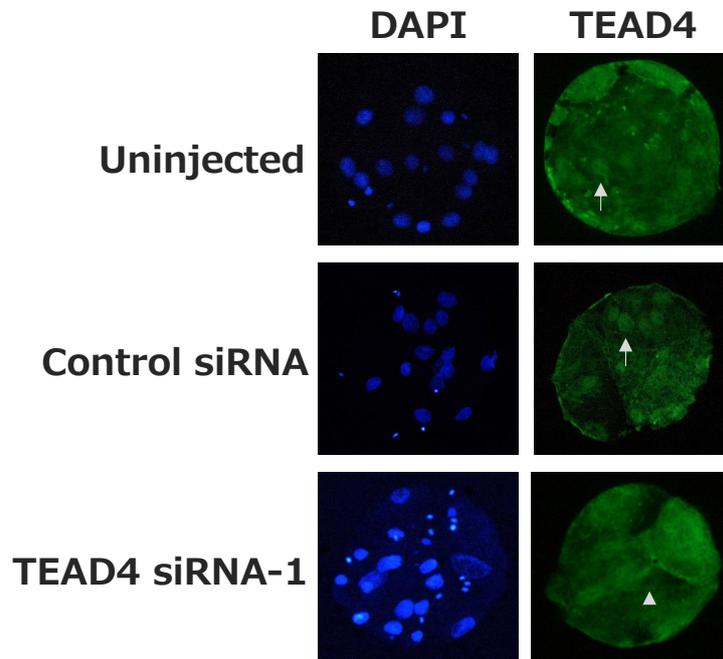


Figure 3. Representative photographs and percentages of positive cell numbers of TEAD4 in porcine morula stage embryos obtained from Uninjected (n = 20), Control siRNA (n = 20) injection or TEAD4 siRNA-1 (n = 20) injection. Nuclear TEAD4 signals (indicated by arrows) were visible in Uninjected and Control siRNA-injected embryos. However, it was difficult to detect such signals in TEAD4 siRNA-1-injected embryos (shown by arrowhead). a, b Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 2. Effect of TEAD4 siRNA injection on *in vitro* development of porcine embryos*

Treatment	Number of embryos cultured	No.(%) [†] of embryos developed to				
		Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	EBC \leq
		2-cell \leq	8-cell	16-cell \leq	Morula	
Control siRNA	183	111 (60.7)	45 (24.6)	65 (35.5)	29 (15.8)	42 (23.0) ^a
TEAD4 siRNA-2	186	118 (63.4)	49 (26.3)	66 (35.5)	24 (12.9)	5 (2.7) ^b

* Experiments were replicated four times.

[†] Percentages of the number of embryos cultured.

^{a, b} Values with different superscripts within each column differ significantly ($P < 0.05$).

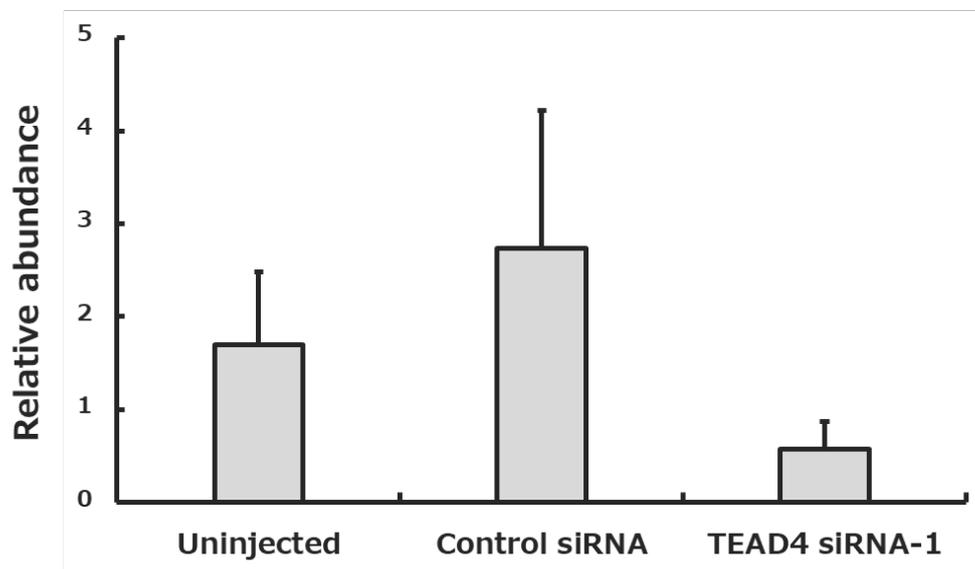


Figure 4. Relative abundance (mean \pm SEM) of *CDX2* transcripts in porcine morula stage embryos obtained from Uninjected (n = 5), Control siRNA (n = 5) injection or TEAD4 siRNA-1 (n = 5) injection.

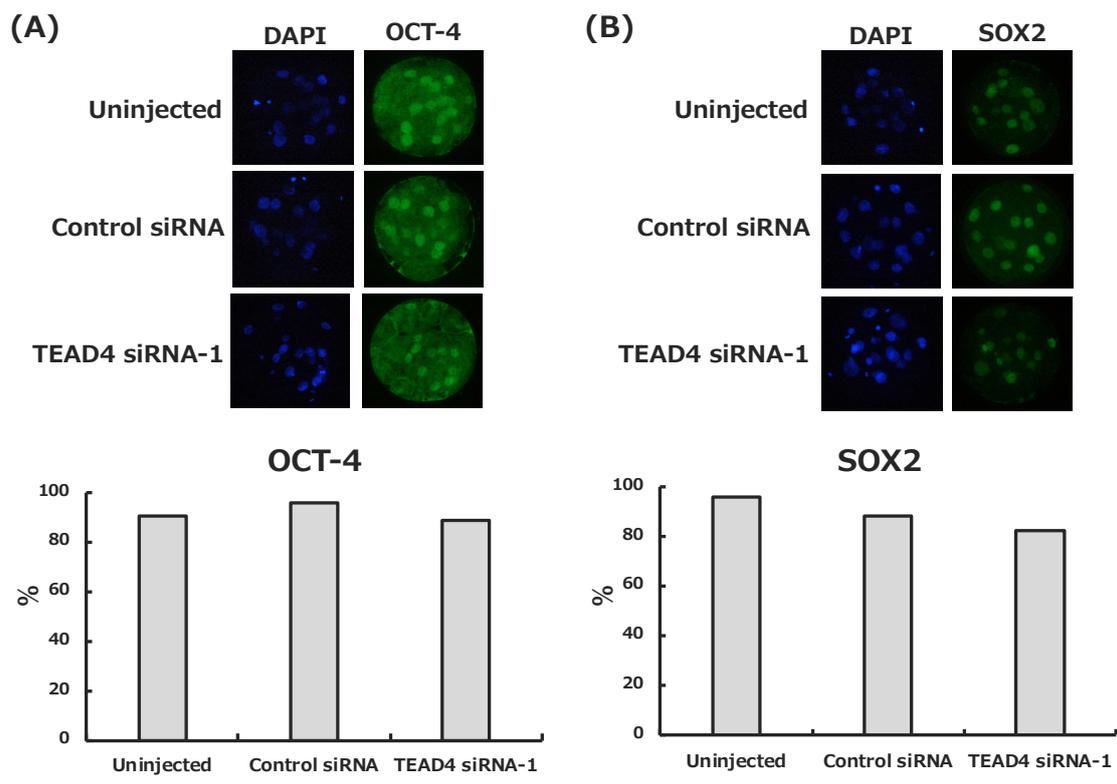


Figure 5. Representative photographs and percentages of positive cell numbers of (A) OCT-4 and (B) SOX2 in porcine morula stage embryos obtained from Uninjected (n = 10), Control siRNA (n = 10) injection or TEAD4 siRNA-1 (n = 10) injection.

4. 考察

マウス胚において *Tead4* は、桑実期で *Cdx2* 発現を促進することで TE 分化に寄与する (Home ら 2012; Nishioka ら 2008; Wu ら 2010; Yagi ら 2007)。ブタ胚では、siRNA を用いて *TEAD4* 発現を抑制すると、桑実期から BC 期への発生が阻害され、ICM 形成に重要である *SOX2* 発現量が増加する (江村 修論 2018)。このことから、マウス胚と同様にブタ胚で *TEAD4* が TE 分化に重要な可能性が考えられる。しかし、ブタ胚においては *TEAD4* 発現抑制が *CDX2* 発現におよぼす影響は未だ不明であり、さらに先の研究では 1 種類の siRNA しか用いていないことから、オフターゲット効果が懸念される。そこで本研究では、先の研究とは異なる塩基配列を標的とした siRNA を用いて *TEAD4* 発現抑制を行い、胚発生率を検討するとともに、*TEAD4* 発現抑制胚の *CDX2* mRNA 発現解析と、OCT-4 および *SOX2* のタンパク質発現解析を行った。

RNA 干渉法は、標的の遺伝子発現を簡単に抑制できることから、遺伝子の機能解析には強力なツールである。しかし、標的遺伝子の mRNA に結合するように設計された siRNA が意図しない遺伝子の mRNA に結合し、その発現を抑制してしまうことがある (Rao ら 2009)。このオフターゲット効果は、誤った結論を導く要因となる。本研究では、siRNA による *TEAD4* 発現抑制によってこれまで得られた結果がオフターゲット効果の影響を受けていないかを確認するため、*TEAD4* mRNA において先の研究とは異なる部位を標的にした siRNA を新たに設計した。その結果、異なる配列を標的とした siRNA を用いて *TEAD4* 発現を抑制したブタ胚においても、桑実期から BC 期への発生が阻害された。このことから、先の研究結果は、オフターゲット効果によるものではなく、*TEAD4* 発現が抑制されたことに起因するものであることが確認された。

本研究結果では、ブタ胚において TEAD4 が BC 期への発生に必須であることが明らかになった一方で、*TEAD4* 発現抑制による *CDX2* mRNA 発現量への影響は認められなかった。したがって、TEAD4 は *CDX2* 以外の因子発現を介して TE 分化に寄与している可能性が考えられる。また、マウス胚における Tead4 の機能は、TE 分化を制御する *Cdx2* の転写促進だけではないことが、近年、明らかになってきている。胚発生を含め、細胞における様々な機能発現やその維持にはエネルギー生成が必須であり、とりわけ桑実期から BC 期にかけての胞胚腔形成には多くのエネルギーを消費する (Houghton 2006 ; Trimarchi ら 2000)。このエネルギー生成に伴って生じる有毒な活性酸素の蓄積を Tead4 が防いでいる可能性がマウス胚において示されている (Kaneko と DePamphilis 2013)。さらに、エネルギーを生成する細胞小器官であるミトコンドリアの DNA に Tead4 が結合し、ミトコンドリア遺伝子の発現を制御することで、Tead4 がエネルギー生成に寄与していることも明らかになっている (Kumar ら 2018)。ブタ胚においても桑実期から BC 期にかけて、エネルギー基質であるグルコースの消費量が増加することが知られており、BC 期への発生に効率的なエネルギー生成が必須である (Gandhi ら 2001 ; Swain ら 2002)。そのため、ブタ胚において TEAD4 は、エネルギー生成にも重要な役割を持ち、*TEAD4* 発現抑制が BC 期への発生阻害を引き起こした可能性がある。

本研究では、*TEAD4* の発現抑制が OCT-4 および SOX2 のタンパク質陽性細胞率に影響を与えなかった。しかしながら、今回示した陽性細胞率は、核内にタンパク質を発現している細胞数を計測したものであり、各タンパク質の発現量を定量的に測定したわけではない。そのため、それぞれのタンパク質の絶対量は変化している可能性があり、TEAD4 がこれら組織分化関連因子の発現動態に関与していないとは言い切れない。特に、*TEAD4* 発現抑制は *SOX2* mRNA 発現

量の増加を導くことから (江村 2018)、今後は SOX2 タンパク質の発現量の定量化が必要となる。

本研究により、ブタ胚の桑実期から BC 期への発生には、マウス胚と同様に TEAD4 が必須であることが明らかとなった。しかし、ブタ胚における TEAD4 の役割は、*CDX2* の転写活性である可能性は低く、マウス胚とは異なることが明らかとなった。

5. 要約

マウス胚において Tead4 は TE 分化の制御因子である *Cdx2* 発現を促進することで TE 形成に寄与する。これまでのブタ胚の研究において、*TEAD4* 発現抑制胚では、BC 期への発生が阻害され、*SOX2* mRNA 発現量が増加することが明らかになっているが、siRNA のオフターゲット効果の可能性が排除できていない。本研究では、先の研究と異なる塩基を標的とした *TEAD4* siRNA を用いて、siRNA のオフターゲット効果の有無を検証するとともに、*TEAD4* 発現抑制胚における組織分化関連因子発現について検討を行い、*TEAD4* の機能解明を試みた。

新たに設計した *TEAD4* siRNA-2 による *TEAD4* 発現抑制においても、先の研究で使用した *TEAD4* siRNA-1 と同様に BC 期への発生が阻害され、siRNA のオフターゲット効果の可能性が排除された。*TEAD4* の発現抑制は、*CDX2* mRNA 発現に影響をおよぼさず、OCT-4 と *SOX2* のタンパク質核内陽性細胞率においても変化は認められなかった。

本研究の結果から、*TEAD4* はブタ BC 期胚の発生に必須の因子であることが明らかとなった。一方、マウス胚とは異なり、ブタ胚における *TEAD4* は *CDX2* 発現を介して初期発生に寄与している可能性は低いことが示された。

第3章

*LATS2*の発現抑制がブタ初期胚の体外発生と
組織分化関連因子の発現におよぼす影響

1. 緒言

Hippo pathway は細胞密度依存的に機能するシグナル経路で、多くの生物種における様々な組織で細胞分裂・増殖の制御に重要な役割を担っている。細胞密度が高い場合、Hippo pathway 関連因子である Lats1/2 キナーゼは共役転写因子である Yap をリン酸化することで、Yap の核内移行を阻害する (Zhao ら 2007)。その結果、Yap は核内に存在する標的の転写因子に結合できず、その下流に位置する遺伝子の発現が抑制される (Zhao ら 2007)。Yap が標的とする転写因子としては Tead ファミリーが知られており、Tead は細胞増殖遺伝子の転写を促進する (Vassilev ら 2001 ; Ota と Sasaki 2008)。このことから、細胞の密度が高い場合、Hippo pathway は Yap の核内移行阻害による Tead の不活化を介して、細胞増殖を抑制していることが明らかとなっている。

哺乳動物胚における Hippo pathway は、マウス胚の先行研究から ICM 形成に重要であることが示されている。すなわち、Hippo pathway を促進する *Lats1/2* の発現を抑制したマウス胚では、リン酸化される Yap1 が減少し、Yap1 の核内移行が増加する (Lorthongpanich ら 2013 ; Nishioka ら 2009)。その結果、*Lats1/2* 発現抑制胚では、ICM の機能に重要な Oct-4 の発現は変わらないものの、Sox2 発現の減少と、TE 分化に必須である *Cdx2* 発現が増加するため、正常な ICM 形成が起こらない (Lorthongpanich ら 2013 ; Nishioka ら 2009)。反対に *Lats 2* を強制発現させたマウス胚では、Yap1 の核内移行が阻害され、ほぼ全ての細胞で Sox2 が発現するようになる (Wicklow ら 2014)。一方で、母性由来の *Yap1* 遺伝子を欠損したマウス胚では、*Cdx2* 発現細胞の減少と ICM に特異的に発現する Oct-4 や Nanog の発現細胞の増加が生じる (Yu ら 2016)。マウス胚において Tead ファミリーの一つである Tead4 は *Cdx2* 発現に必須であり、

Yap1 は Tead4 と核内で結合し、*Cdx2* 転写活性を促していることが明らかとなっている (Home ら 2012 ; Nishioka ら 2008 ; Wicklow ら 2014 ; Wu ら 2010 ; Yagi ら 2007)。これらの研究から、マウス桑実期胚において、細胞密度の高い内側細胞では、Hippo pathway が機能することで、ICM が形成されることが明らかとなった。すなわち、Lats1/2 が Yap1 をリン酸化し、核内移行を阻害することで、Yap1 が核内の Tead4 と結合できず、TE 分化が阻害される。その結果として、内側細胞では Oct-4 や Sox2 が優位に発現し、ICM 形成が促進される。

一方、ブタ胚においては、これまでの研究から、*YAP1* 発現を抑制した胚では BC 期への発生が顕著に阻害され、さらに *OCT-4* および *SOX2* の発現量が増加することが明らかになっている (江村 2018)。したがって、マウスと同様に、ブタ胚においても YAP1 が TE 分化に重要である可能性が考えられるが、YAP1 の機能が Hippo pathway によって制御されているのかは明らかになっておらず、Hippo pathway 関連因子の発現動態も未だ不明である。

本研究では、ブタ初期胚における Hippo pathway の機能解明を目的とし、まず Hippo pathway 関連因子であり、YAP1 のリン酸化に直接関与する *LATS1* および *LATS2* の mRNA の発現動態を解析した。続いて、*LATS2* に着目し、*LATS2* 発現抑制がブタ胚の初期発生におよぼす影響について検討した。また、*LATS2* 発現抑制が *OCT-4* および *SOX2* の発現におよぼす影響について mRNA およびタンパク質レベルでの解析を行った。

2. 材料および方法

(1) ブタ卵巣の採取および卵子の吸引

ブタ卵巣の採取および卵子の吸引は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(2) 体外成熟培養 (IVM)

ブタ卵子の IVM は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(3) 体外受精 (IVF)

ブタ卵子の IVF は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(4) 体外発生培養 (IVC)

IVF 胚の IVC は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(5) siRNA の胚への注入

LATS2 発現抑制用 siRNA (*LATS2* siRNA) は、ブタ *LATS2* 遺伝子の塩基配列 (GenBank accession no. ; NM_001177919.1) をもとに設計した (Table 3)。siRNA の設計に関しては、BLOCK-iT RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) を用いた。本研究では、*LATS2* siRNA の注入を行う区に加え、Control siRNA の注入を行う区、いずれの siRNA の注入も行わない区 (Uninjected 区) を対照区として設けた。siRNA の注入は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(6) mRNA のサンプリング

卵子および胚のサンプリングは IVM 後 (第二減数分裂中期 [M-II 期] 卵子; 10 卵子/1 サンプル)、IVC 開始 12 時間後 (1-細胞期胚 ; 10 胚/1 サンプル)、IVC 開始 48 時間後 (2-から 4-細胞期胚 ; 10 胚/1 サンプル)、IVC 開始 72 時間後 (8-から 16-細胞期胚 ; 10 胚/1 サンプル)、IVC 開始 96 時間後 (桑実期胚 ; 5 胚/1 サンプル) および IVC 開始 120 時間後 (BC 期胚 ; 5 胚/1 サンプル) に行った。16-細胞期胚のみをサンプリングする際は、10 胚/1 サンプルとし、IVC 開始 84 時間後に行った。mRNA のサンプリングは、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(7) mRNA の逆転写 (RT)

mRNA の RT は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(8) リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。リアルタイム PCR に使用したプライマーおよびアニーリング温度については Table 3 に示した。

(9) mRNA 発現量の定量化

mRNA 発現量の定量化は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(10) 蛍光免疫染色

蛍光免疫染色は、IVC 開始 84 時間後 (16-細胞期) の胚を対象に、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(11) 統計解析

得られたデータの統計解析は、Statcel および Stat view を用いて行った。mRNA 発現量に関するデータはすべて、平均値に標準誤差をつけて示した。mRNA 発現量は、Bartlett 検定を用いて分散の均一性を確認し、分散が均一だった場合は、One-Factor ANOVA を用いて検定を行い、その後 Fisher の PLSD 法により、3 群間の有意差検定を行った。分散が不均一だった場合は、Kruskal-Wallis 検定を行い、その後 Scheffé 法を用いて多群間の有意差検定を行った。胚発生率およびタンパク質の核内陽性細胞率の検定には Arc-sin 変換を行った数値を用いた。Arc-sin 変換後の値は、Bartlett 検定を用いて分散の均一性を確認し、分散が均一だった場合は、One-Factor ANOVA を用いて検定を行い、多重比較として Tukey Kramer の検定を行った。分散が不均一だった場合は、Kruskal-Wallis 検定を行い、その後 Scheffé 法を用いて多群間の有意差検定を行った。

3. 結果

(1) ブタ卵子および初期胚における *LATS1* および *LATS2* mRNA 発現動態

ブタ卵子および初期胚における *LATS1* および *LATS2* mRNA の発生ステージ別発現動態を Fig. 6 に示した。*LATS1* mRNA 発現量は M-II 期卵子から 8-~16-細胞期まで高い値を示した後、桑実期から BC 期にかけて有意 ($P < 0.05$) に減少した。*LATS2* mRNA 発現量は M-II 期卵子で最も高い値を示した。受精後、*LATS2* 発現量は胚の発生とともに有意 ($P < 0.05$) に減少し、2-~4-細胞期から BC 期にかけて低い値を示した。

(2) siRNA 注入による *LATS2* mRNA 発現抑制効果の検証

Uninjected 区および Control siRNA もしくは *LATS2* 発現抑制用の *LATS2* siRNA を注入した区の 16-細胞期における *LATS2* mRNA 発現量を Fig. 7 に示した。*LATS2* mRNA 発現量は、*LATS2* siRNA 注入区において Uninjected 区と比較すると低い傾向 ($P = 0.07$) にあり、Control siRNA 注入区と比較すると有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

(3) *LATS2* 発現抑制がブタ初期胚の発生におよぼす影響

Uninjected 区、Control siRNA 注入区および *LATS2* siRNA 注入区における EBC 期以上までの発生率を Table 4 に示した。IVC 開始後 2 日目 (Day 2) での 2-細胞期以上への分割率、3 日目 (Day 3) での 8-細胞期への発生率、4 日目 (Day 4) での 16-細胞期以上および桑実期への発生率、5 日目 (Day 5) での EBC 期以上への発生率を示した。これら分割率および各ステージへの発生率は、培養胚数に対する割合で示した。分割率 (66.7-72.0%) および 8-細胞期への発生率

(33.3-41.0%) に処理区の違いによる有意な差は認められなかった。16-細胞期以上、桑実期および EBC 期以上への発生率においては、LATS2 siRNA 注入区 (16-細胞期以上, 27.8% ; 桑実期, 2.0% ; EBC 期以上, 1.0%) が Uninjected 区 (16-細胞期以上, 54.5% ; 桑実期, 22.3% ; EBC 期以上, 34.6%) および Control siRNA 注入区 (16-細胞期以上, 42.0% ; 桑実期, 17.9% ; EBC 期以上, 24.2%) と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

(4) *LATS2* 発現抑制がブタ初期胚における組織分化関連因子発現におよぼす影響

Uninjected 区、Control siRNA 注入区および LATS2 siRNA 注入区の 16-細胞期胚における *OCT-4* および *SOX2* 遺伝子の mRNA 発現量を Fig. 8 に示した。LATS2 siRNA 注入区における *OCT-4* mRNA 発現量は、Uninjected 区と比較して差は認められなかったものの、Control siRNA 注入区と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。一方、*SOX2* mRNA 発現量は、Uninjected 区および Control siRNA 注入区と比較して、LATS2 siRNA 注入区で有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

また、Uninjected 区、Control siRNA 注入区および LATS2 siRNA 注入区の 16-細胞期胚における *OCT-4* および *SOX2* タンパク質の核内での陽性細胞数をカウントし、全細胞数に対する割合を算出した (Fig. 9)。両タンパク質の核内陽性細胞率において、いずれも処理区間で有意な差は認められなかった。

Table 3. Primers and siRNA sequences

Gene name	Nucleotide sequences (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)	GenBank accession no.
<i>LATS1</i>	F- TGTTCCCTGCTGTGAATC	60	225	XM_005659149
	R- GAAGATGACTGAGGCCAAGC			
<i>LATS2</i>	F- TACCAGAAAAGGAGCCACAC	60	239	NM_001177919.1
	R- AAGAGAATCACGCCGACACT			
<i>OCT4</i>	F- GTTCTCTTTGGGAAGTGTT	55.4	313	NM_001113060.1
	R- ACACGGGACCCACATCCCTTC			
<i>SOX2</i>	F- GCCCTGCAGTACAACCTCCAT	60	216	EU503117.1
	R- GCTGATCATGTCCCCTAGGT			
<i>GAPDH</i>	F- TCGGAGTGAACGGATTTG	52	219	AF017079.1
	R- CCTGGAAGATGGTGATGG			
LATS2 siRNA	S- GGAAGAUCCUUAACCAGAATT	N/A	N/A	N/A
	AS- UUCUGGUAGAGGAUCCUCCCTT	N/A	N/A	N/A

F, forward ; R, reverse ; S, sense strand ; AS, antisense strand.

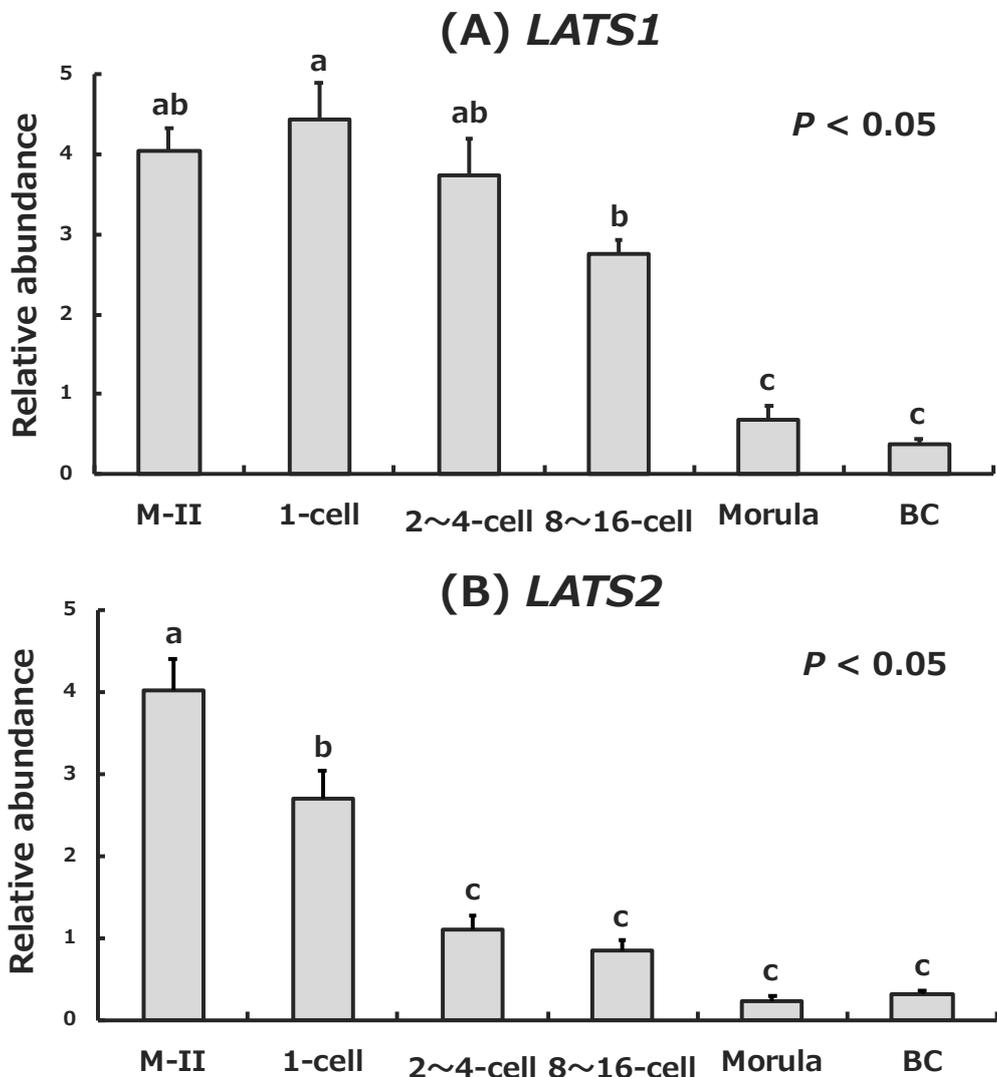


Figure 6. Relative abundance (mean \pm SEM) of (A)*LATS1* and (B)*LATS2* transcripts in porcine matured oocytes (M-II) and 1-cell to blastocyst (BC) stages embryos (n = 5).

a, b, c Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

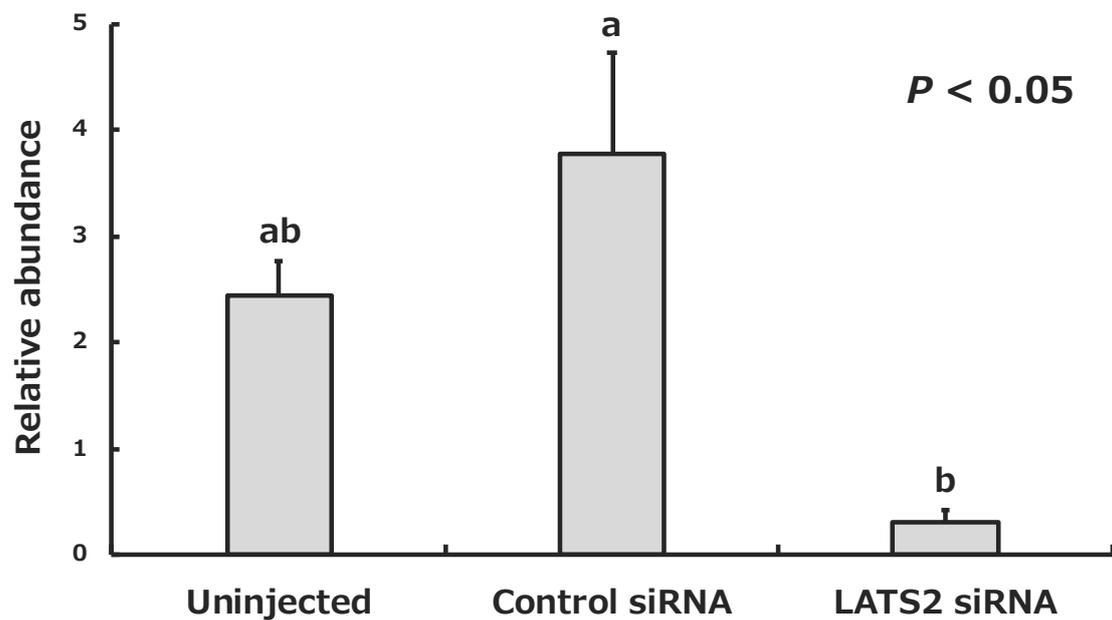


Figure 7. Relative abundance (mean \pm SEM) of *LATS2* transcripts in porcine 16-cell stage embryos obtained from Uninjected (n = 5), Control siRNA (n = 5) injection or LATS2 siRNA (n = 5) injection.

^{a, b} Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 4. Effect of LATS2 siRNA injection on *in vitro* development of porcine embryos*

Treatment	Number of embryos cultured	No.(%) [†] of embryos developed to				
		Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	EBC ≤
		2-cell ≤	8-cell	16-cell ≤	Morula	
Uninjected	211	152 (72.0)	85 (40.3)	115 (54.5) ^a	47 (22.3) ^a	73 (34.6) ^a
Control siRNA	207	138 (66.7)	69 (33.3)	87 (42.0) ^a	37 (17.9) ^a	50 (24.2) ^a
LATS2 siRNA	205	137 (66.8)	84 (41.0)	57 (27.8) ^b	4 (2.0) ^b	2 (1.0) ^b

* Experiments were replicated five times.

† Percentages of the number of embryos cultured.

^{a, b} Values with different superscripts within each column differ significantly ($P < 0.05$).

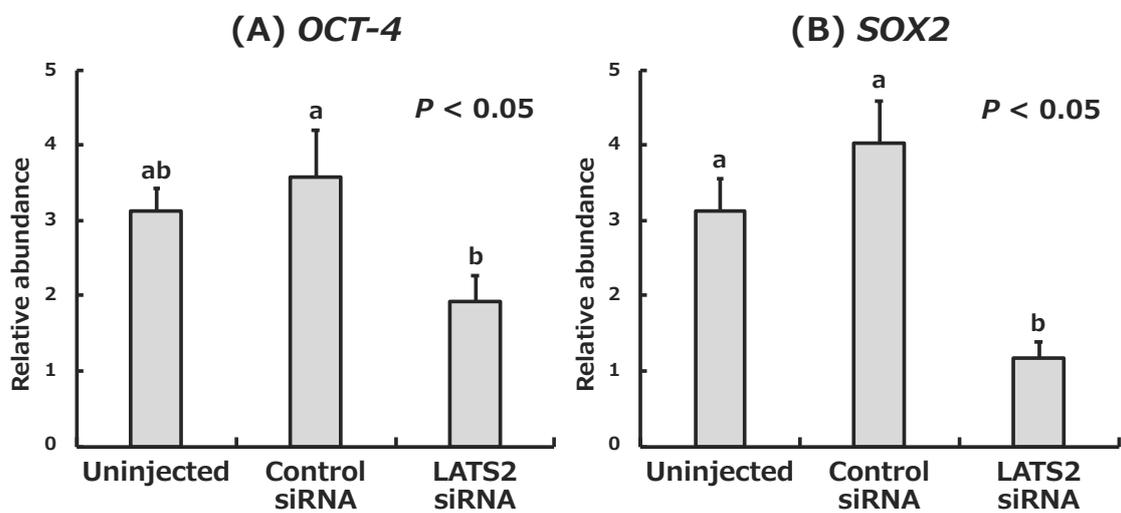


Figure 8. Relative abundance (mean \pm SEM) of (A) *OCT-4* and (B) *SOX2* transcripts in porcine 16-cell stage embryos obtained from Uninjected (n = 5), Control siRNA (n = 5) injection or LATS2 siRNA (n = 5) injection.

^{a, b} Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

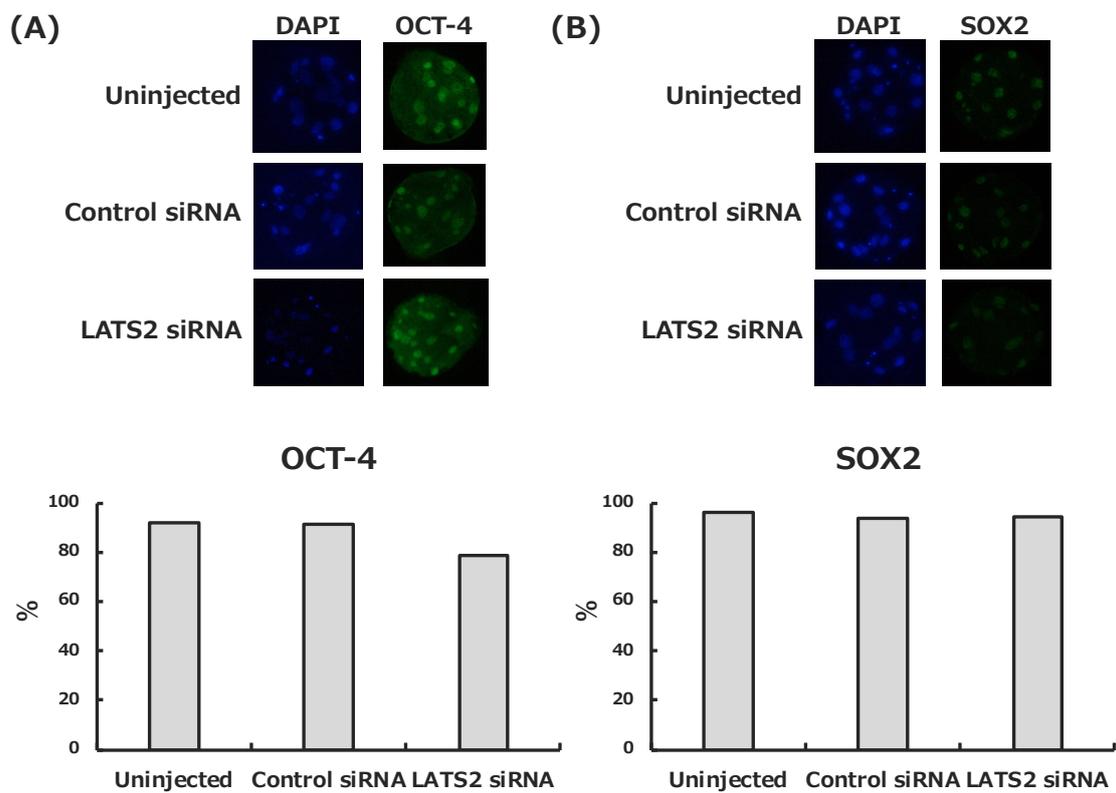


Figure 9. Representative photographs and percentages of positive cell numbers of (A) OCT-4 and (B) SOX2 in porcine 16-cell stage embryos obtained from Uninjected (n = 10), Control siRNA (n = 10) injection or LATS2 siRNA (n = 10) injection.

4. 考察

緒言での述べた様に、マウス桑実期胚において、Hippo pathway が機能している内側細胞では、Yap1 が Lats1/2 によってリン酸化されることで、Yap1 の核内移行が阻害され (Lorthongpanich ら 2013 ; Nishioka ら 2009)、核内の Tead4 と結合できないため、TE 分化に必須な因子群の発現が起こらない (Menchero ら 2019 ; Nishioka ら 2009 ; Rayon ら 2014)。これまでの実験結果から、ブタ胚においては、YAP1 が TE 分化に重要な可能性が示されているが (江村 2018)、マウス胚のように Hippo pathway によってその機能が制御されているのかは不明である。また、LATS1 および LATS2 の機能はおろかそれらの発現の有無も明らかになっていない。そこで本研究では、まずブタ卵子および初期胚における *LATS1* および *LATS2* の発現動態を解析した。続いて、*LATS2* に着目し、初期胚発生および組織分化におけるその機能性について検討した。

マウスにおいて、*Lats1* および *Lats2* の mRNA は卵子から BC 期まで発現が認められるが、卵子や 2-細胞期での発現量は少なく 4-細胞期でピークを示す (Gao ら 2017 ; Lorthongpanich ら 2013 ; Nishioka ら 2009)。本研究結果から、ブタにおいても *LATS1* および *LATS2* mRNA は卵子から BC 期まで発現することが明らかとなった。しかし、マウスにおける発現動態とは異なり、ブタにおいては、*LATS1* は卵子および 8-~16-細胞期までの初期胚、*LATS2* は卵子と 1-細胞期胚で高い値を示した。この卵子および胚発生前半に発現量が高く、後半にかけて減少する遺伝子発現動態は、*YAP1* の発現動態と類似しており (江村 2018)、ブタ胚ではマウス胚と異なり、発生の初期においても *LATS1* および *LATS2* が *YAP1* とともに機能していることが考えられる。

Hippo pathway がブタ胚の初期発生におよぼす影響を検討するため、本研究

では、mRNA の発現動態がより *YAP1* と類似していた *LATS2* に着目し、RNA 干渉法を用いた *LATS2* 発現の人為的な抑制を行った。その結果、*LATS2* 発現抑制胚では、16-細胞期以上への発生が顕著に阻害された。マウス胚では、*Lats1* および *Lats2* 発現を抑制すると、ICM 形成に異常をきたすが、胞胚腔は形成され、BC 期胚の形態を示す (Lorthongpanich ら 2013)。したがって、発現動態も考慮すると、マウス胚における *Lats1* および *Lats2* は胞胚腔形成以後の ICM 分化に重要であると考えられる。一方、ブタ胚では *LATS2* が発生初期に発現していたこともあり、マウス胚と異なり、早い段階で *LATS2* が機能し、16-細胞期胚以上の形成に関与していると考えられる。桑実期で生じる特徴的な現象として胚のコンパクションが知られており (Ducibella と Anderson 1975)、ブタ胚のコンパクションは 16-細胞期に生じ始める。コンパクションは、それまで緩く接していた細胞同士が密に接着する現象であるが、マウス胚のコンパクションには、細胞接着因子である E-cadherin が重要な役割を担うことが示されている (Ducibella 1980 ; Stephenson ら 2010)。ブタ胚でも E-cadherin は桑実期で細胞接着面に局在しており、コンパクションに E-cadherin が重要なことが考えられる (Kwon ら 2020)。大変興味深いことに、Hippo pathway 関連因子の一つである Macrophage stimulating 1 (MST1) は *LATS1* および *LATS2* の上流に位置し、*MST1* 発現を抑制したヒト癌細胞では、*E-cadherin* 発現が減少して細胞間接着が緩くなる (Wang ら 2019)。ブタ胚においても *LATS1* および *LATS2* が E-cadherin の発現を制御する機構が存在する場合には、Hippo pathway が E-cadherin を介して細胞接着制御に関与することで桑実期でのコンパクションに寄与している可能性がある。今後は、ICM や TE などの組織分化に限定せずに、桑実期以前の胚発生における Hippo pathway の役割についても検討していく必要がある。

本研究においては *LATS2* 発現抑制によりブタ胚の *OCT-4* と *SOX2* mRNA 発現量が減少した。マウス胚において *Lats1* および *Lats2* 発現を抑制すると、*Oct-4* 発現に変化はないものの、*Sox2* 発現細胞が減少する (Lorthongpanich ら 2013)。マウス胚と同様にブタ胚においても *OCT-4* および *SOX2* は、ICM への分化およびその機能性に重要な因子であることから (Liu ら 2015 ; Emura ら 2016 ; 三浦 2019)、本研究結果よりブタ胚においても *LATS2* は、ICM 形成に重要であることが示唆された。さらにブタ胚では、マウス胚とは異なる *LATS2* による *OCT-4* 発現の制御メカニズムが存在する可能性が示された。また本研究では、*OCT-4* および *SOX2* のタンパク質核内陽性細胞率に処理区間で差が認められなかったが、第 2 章での考察同様、この結果のみでは *LATS2* の下流に *OCT-4* と *SOX2* が位置しないと断定できない。今後は、これらタンパク質発現の定量分析による検証が必要である。

本研究により、ブタ胚における *LATS1* および *LATS2* の発現動態が初めて明らかになった。また、ブタ胚の初期発生において *LATS2* は 16-細胞期以上への発生に必須の遺伝子であり、*OCT-4* や *SOX2* といった ICM 分化を制御する因子の発現を促進していることが示された。このことから、マウス胚と同様にブタ胚においても Hippo pathway が ICM 形成に重要であり、またブタ胚独自の Hippo pathway の機能が存在する可能性が示された。

5. 要約

マウス胚において Hippo pathway 関連因子である Lats1 および Lats2 は ICM 形成に重要な役割を持つことが明らかになっている。本研究では、ブタ卵子および初期胚における *LATS1* および *LATS2* の遺伝子発現動態と、その役割を明らかにするために、RNA 干渉法を用いた *LATS2* の発現抑制を行った。さらに、*LATS2* 発現抑制胚における組織分化関連因子の遺伝子発現を検討した。

ブタにおいて *LATS1* mRNA は、8-~16-細胞期まで高い値を示し、その後、桑実期にかけて減少した。一方、*LATS2* mRNA は卵子および1-細胞期胚で高い値を示し、その後減少した。ブタ胚における *LATS2* 発現抑制は8-細胞期までの発生率に影響をおよぼさなかったものの、16-細胞期以上への胚発生を有意 ($P < 0.05$) に阻害した。OCT-4 および SOX2 発現に関しては、両因子ともにタンパク質の核内陽性細胞率に変化は認められなかったものの、mRNA 発現量は *LATS2* siRNA 注入区が Control siRNA 注入区と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

本研究の結果から、*LATS2* はブタ胚の初期発生に必須の因子であり、マウスと同様にブタ初期胚の ICM 形成に関与している可能性が示された。

第 4 章

TEAD4-YAP1 複合体形成阻害剤の体外発生培地への添加が
ブタ初期胚の体外発生と組織関連因子の発現におよぼす影響

1. 緒言

これまで述べてきた様に、マウス胚の TE 分化には *Cdx2* や *Gata3* の発現が重要であり、それら因子が下流の TE 関連遺伝子の発現を促進するとともに、ICM への分化を制御する Oct-4 や *Nanog* の発現を抑制することで割球細胞の TE 分化に貢献している (Chen ら 2009 ; Niwa ら 2005 ; Strumpf ら 2005 ; Wu ら 2010)。このように TE 分化に重要な *Cdx2* と *Gata3* は *Tead4* によってその転写が促進される (Home ら 2012 ; Nishioka ら 2008 ; Ralston ら 2010 ; Wicklow ら 2014 ; Wu ら 2010 ; Yagi ら 2007)。しかし、*Tead4* は単独では転写因子として機能できず、*Yap1* と複合体を形成する必要がある (Menchero ら 2019 ; Nishioka ら 2009 ; Rayon ら 2014)、*Tead4* が *Yap1* と結合できるか否かは、桑実期胚における細胞の位置によって決定される。すなわち、桑実期胚の内側細胞では、Hippo pathway によりリン酸化された *Yap1* は核内移行が阻害され (Hirate ら 2013 ; Lorthongpanich ら 2013 ; Nishioka ら 2009)、その結果、*Yap1* は核内の *Tead4* と結合できず、TE 分化が起こらない。一方、桑実期胚の外側細胞では、Hippo pathway が抑制されているため、*Yap1* が核内へ移行し、*Tead4* と複合体となることで下流の因子群の発現を促し、TE 分化が誘導される。

ブタ胚において、*TEAD4* 発現を抑制すると、桑実期から BC 期への発生が阻害され、ICM 分化に重要な *SOX2* mRNA 発現が増加する (江村 2018 ; 本論文第 2 章)。また、*YAP1* の発現抑制においても同様に、BC 期への発生阻害と *SOX2* mRNA 発現の増加が認められる (江村 2018)。このことから、桑実期における *TEAD4* と *YAP1* がそれぞれブタ胚の TE 分化に重要であることが考えられるが、両因子がマウス胚と同様に複合体として機能しているのか否かは明らかではない。また、ブタ胚において *CDX2* は、マウス胚と異なり BC 期からタンパ

ク質が発現し始め、BC 期以降の発生に重要であることが明らかとなっている (Bou ら 2017)。GATA3 に関しては、ブタ胚において mRNA 発現は BC 期に認められ、その後の伸長期において、ICM 由来の胚盤 (ED) と比較して TE において優位な発現が認められる (Fujii ら 2013)。一方、*NANOG* mRNA はブタ伸長期胚において、ED で高い発現量を示す (Fujii ら 2013)。これらの知見から、ブタ胚において TEAD4-YAP1 複合体が BC 期以降の胚で CDX2 や GATA 3、*NANOG* 発現を制御している可能性が考えられる。

本研究では、ブタ胚における TEAD4-YAP1 複合体の機能を明らかにすることを目的に、TEAD4-YAP1 複合体の形成阻害剤として知られている Verteporfin (VP [Liu-Chittenden ら 2012]) の IVC 培地への添加実験を行った。なお、TEAD4-YAP1 複合体が胚発生に影響する時期をより詳細に調べるため、VP の添加は桑実期胚形成時期を境として、その前半添加もしくは後半添加とし、ブタ胚の発生におよぼす影響について検討した。また、VP 添加が組織分化関連因子発現におよぼす影響を明らかにするため、VP 添加により得られた胚の OCT-4、SOX2 および TEAD4 の発現について検討した。さらに、VP の後半添加においては、BC 期以降の発生に重要と考えられている CDX2、GATA3 および *NANOG* 発現についても検討を行った。

2. 材料および方法

(1) ブタ卵巣の採取および卵子の吸引

ブタ卵巣の採取および卵子の吸引は、第2章に記述した方法に準じて行った。

(2) 体外成熟培養 (IVM)

ブタ卵子の IVM は、第2章に記述した方法に準じて行った。

(3) 体外受精 (IVF)

ブタ卵子の IVF は、第2章に記述した方法に準じて行った。

(4) TEAD4-YAP1 複合体形成阻害剤の添加培地を用いた体外発生培養 (IVC)

TEAD4-YAP1 複合体形成阻害剤には、VP (Sigma-Aldrich) を使用した。VP は Dimethyl sulfoxide (DMSO ; Sigma-Aldrich) で 2.5 mM に調整し、0.5 ml マイクロチューブに 500 μ l ずつ分注し、-30°C のフリーザー内で遮光保存した。IVC 培地に添加する VP 濃度は 0、0.5 および 1.25 μ M の 3 区を設け、全ての区において DMSO 濃度が 0.05% になるように調整した。VP の添加は、IVC の前半添加と後半添加の 2 通りを実施した。VP 前半添加は、IVC 開始 0 日目から 3 日目まで VP 添加培地で培養を行い、その後、通常の IVC 培地 (DMSO も無添加) に胚を移し、さらに IVC 開始 5 日目まで培養を継続した。VP 後半添加の場合は、IVC 開始 0 日目から 3 日目まで通常の IVC 培地で培養し、その後、VP 添加培地に胚を移し、さらに IVC 開始 6 日目まで培養を行った。その他の培養条件や胚の発生状況の観察に関しては、第2章に記述した方法に準じて行った。

(5) mRNA のサンプリング

胚のサンプリングは IVC 開始 84 時間後 (16-細胞期 ; 10 胚/1 サンプル) および IVC 開始 120 時間後 (BC 期胚 ; 5 胚/1 サンプル) に行った。mRNA のサンプリングは、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(6) mRNA の逆転写 (RT)

mRNA の RT は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(7) リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。リアルタイム PCR に使用したプライマーおよびアニーリング温度については Table 5 に示した。

(8) mRNA 発現量の定量化

mRNA 発現量の定量化は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(9) 蛍光免疫染色

蛍光免疫染色は、IVC 開始 84 時間後 (16-細胞期) および IVC 開始 120 時間後 (BC 期胚) の胚を対象に行った。CDX2 の蛍光免疫染色は、0.5% BSA と 1% スキムミルクを含む TXPBS でのブロッッキング、1:300 倍に希釈した Mouse monoclonal anti-CDX2 primary antibody (sc-343572 ; Santa Cruz Biotechnology) を用いて 4 °C で一晩静置する一次抗体反応、1:400 倍に希釈した二次抗体 (Alexa 488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody) を用いて室温で 1 時間静置する二次抗体反応の条件下で行った。その他の工程は、第 2 章に記述

した方法に準じて行った。

(10) 統計解析

得られたデータの統計解析は、Statcel 2 および Stat view を用いて行った。mRNA 発現量およびタンパク質の核内陽性細胞数に関するデータはすべて、平均値に標準誤差をつけて示した。ともに F 検定を用いて分散の均一性を確認した後、分散が均一だった場合はスチューデントの t 検定、分散が不均一だった場合は、マンホイットニの U 検定を行った。胚発生率の検定には Arc-sin 変換を行った数値を用いた。Arc-sin 変換後の値は、Bartlett 検定を用いて分散の均一性を確認し、分散が均一だった場合は、One-Factor ANOVA を用いて検定を行い、多重比較として Tukey Kramer の検定を行った。分散が不均一だった場合は、Kruskal-Wallis 検定を行い、その後 Scheffé 法を用いて多群間の有意差検定を行った。

3. 結果

本研究では、TEAD4-YAP1 複合体形成阻害剤として知られている VP を IVC 培地に添加することで、ブタ初期胚における TEAD4 と YAP1 が複合体として機能しているか否かを検討した。なお、VP の添加期間は胚が桑実期に達する Day 4 を境にして、桑実期胚形成前 (Day 0~Day 3) にのみ添加する VP 前半添加区と桑実期胚形成以降 (Day 3~Day 6) に添加する VP 後半添加区の 2 区を設けた。両実験ともに VP 添加濃度は 0、0.5 および 1.25 μM とした。

(1) IVC 培地への VP 前半添加がブタ初期胚の発生におよぼす影響

VP 前半添加における EBC 期以上までの発生率を Table 6 に示した。IVC 開始後 2 日目 (Day 2) での 2-細胞期以上への分割率、3 日目 (Day 3) での 8-細胞期への発生率、4 日目 (Day 4) での 16-細胞期以上および桑実期への発生率および 5 日目 (Day 5) での EBC 期以上への発生率を示した。これら分割率および各ステージへの発生率は、培養胚数に対する割合で示した。VP 0 μM 添加区、VP 0.5 μM 添加区、VP 1.25 μM 添加区における分割率 (78.5-79.1%) および 8-細胞期への発生率 (38.8-40.9%) に有意な差は認められなかった。16-細胞期以上、桑実期および EBC 期以上への発生率において、VP 1.25 μM 添加区 (16-細胞期以上, 36.1%; 桑実期, 1.2%; EBC 期以上, 2.0%) が VP 0 μM 添加区 (16-細胞期以上, 55.4%; 桑実期, 21.5%; EBC 期以上, 21.1%) および VP 0.5 μM 添加区 (16-細胞期以上, 52.5%; 桑実期, 21.1%; EBC 期以上, 21.1%) と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

(2) IVC 培地への VP 前半添加がブタ初期胚における組織分化関連因子発現におよぼす影響

VP 0 μM 添加区および VP 1.25 μM 添加区の 16-細胞期における *OCT-4*、*SOX2* および *TEAD4* の mRNA 発現量を Fig. 10 に示した。これら 3 つの因子全ての mRNA 発現量に処理区間で有意な差は認められなかった。

また、これら因子のタンパク質発現の影響を検討するため、VP 0 μM 添加区および VP 1.25 μM 添加区の 16-細胞期胚における *OCT-4*、*SOX2* および *TEAD4* タンパク質の核内での陽性細胞数をカウントし、その結果を Fig. 11 に示した。*OCT-4* および *SOX2* の核内陽性細胞数においては、いずれも処理区間で有意な差は認められなかった。*TEAD4* の核内陽性細胞数では、VP 1.25 μM 添加区が VP 0 μM 添加区と比較して有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。

(3) IVC 培地への VP 後半添加がブタ初期胚の発生におよぼす影響

VP 後半添加が胚発生におよぼす影響について、拡張胚盤胞 (ExBC) 期以上までの発生率に関して Table 7 に示した。IVC 開始後 4 日目 (Day 4) での 16-細胞期以上および桑実期への発生率、5 日目 (Day 5) での EBC 期以上への発生率および 6 日目 (Day 6) での BC 期と ExBC 期以上への発生率を示した。これら分割率および各ステージへの発生率は、培養胚数に対する割合で示した。VP 0 μM 添加区、VP 0.5 μM 添加区、VP 1.25 μM 添加区における 16-細胞期以上への発生率 (43.8-47.9%)、桑実期への発生率 (14.1-19.6%)、Day 5 における EBC 期以上への発生率 (20.6-21.7%) および Day 6 における BC 期への発生率 (6.2-7.4%) に有意な差は認められなかった。Day 6 での ExBC 期以上への発生率は、VP 0 μM 添加区 (9.4%) に比べ、VP 1.25 μM 添加区 (3.6%) において有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

(4) IVC 培地への VP 後半添加がブタ初期胚における組織分化関連因子発現におよぼす影響

VP 0 μ M 添加区および VP 1.25 μ M 添加区の BC 期における *OCT-4*、*SOX2*、*TEAD4*、*NANOG*、*CDX2* および *GATA3* 遺伝子の mRNA 発現量を Fig. 12 に示した。*OCT-4*、*SOX2*、*TEAD4* および *NANOG* mRNA 発現量に処理区間で有意な差は認められなかった。*CDX2* および *GATA3* mRNA 発現量においては、VP 1.25 μ M 添加区が VP 0 μ M 添加区と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

VP 0 μ M 添加区および VP 1.25 μ M 添加区の BC 期胚における *OCT-4*、*SOX2*、*TEAD4* および *CDX2* タンパク質の核内での陽性細胞数を Fig. 13 に示した。全ての因子の核内陽性細胞数において、処理区間で有意な差は認められなかった。

Table 5. Primers sequences

Gene name	Nucleotide sequences (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)	GenBank accession no.
<i>OCT4</i>	F- GTTCTCTTTGGGAAGGTGTT	55.4	313	NM_001113060.1
	R- ACACGGGGACCACATCCTTC			
<i>SOX2</i>	F- GCCCTGCAGTACAACCTCCAT	60	216	EU503117.1
	R- GCTGATCATGTCCCGTAGGT			
<i>TEAD4</i>	F- TGGTGGAGAAAGTGGAGACC	60	157	NM_001142666.1
	R- AAGTTCCTCCAGCACGCTGTT			
<i>CDX2</i>	F- CAGGCCCTCTGAGAAGTGTC	60	212	NM_001278769.1
	R- GGGGTCTTTCCTGAGGATTC			
<i>GATA3</i>	F- CATGTCCCTCTCTCAGCCACA	60	206	NM_001044567.1
	R- TGCGAAAATGCACGTAGAAG			
<i>NANOG</i>	F- CCTCCATGGATCTGCTTATTC	63	210	NM_001129971.1
	R- CATCTGCTGGAGGCTGAGGT			
<i>GAPDH</i>	F- TCGGAGTGAACGGATTG	52	219	AF017079.1
	R- CCTGGAAGATGGTGATGG			

F, forward ; R, reverse.

Table 6. Effect of verteporfin added in the *in vitro* culture medium from Day 0 to Day 3 on *in vitro* development of porcine embryos*

Concentration of VP (μM)	Number of embryos cultured	No. (%) [†] of embryos developed to				
		Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	EBC \leq
		2-cell \leq	8-cell	16-cell \leq	Morula	
0	242	190 (78.5)	99 (40.9)	134 (55.4) ^a	52 (21.5) ^a	51 (21.1) ^a
0.5	242	190 (78.5)	94 (38.8)	127 (52.5) ^a	51 (21.1) ^a	51 (21.1) ^a
1.25	244	193 (79.1)	95 (38.9)	88 (36.1) ^b	3 (1.2) ^b	5 (2.0) ^b

* Experiments were replicated five times.

[†] Percentages of the number of embryos cultured.

^{a, b} Values with different superscripts within each column differ significantly ($P < 0.05$).

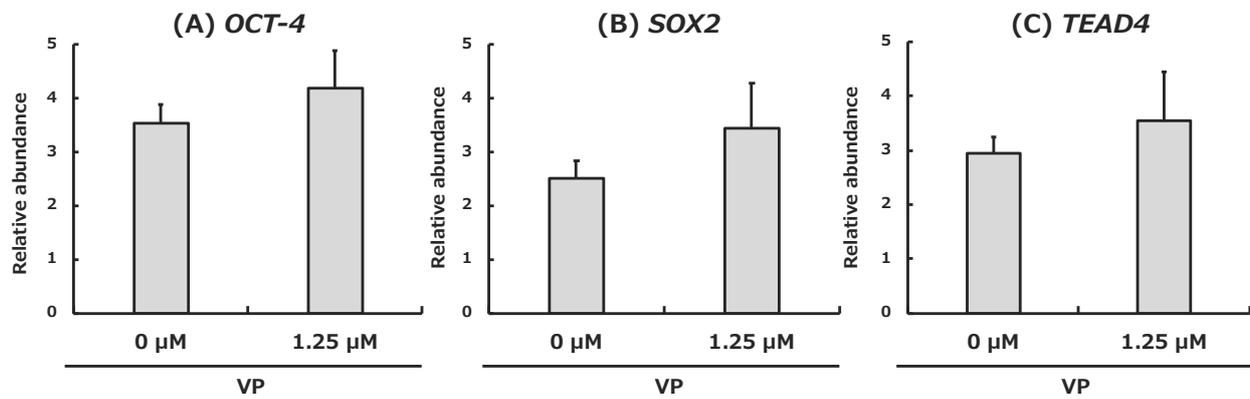


Figure 10. Relative abundance (mean \pm SEM) of (A) *OCT-4*, (B) *SOX2* and (C) *TEAD4* transcripts in porcine 16-cell stage embryos treated with 0 μ M (n = 5) or 1.25 μ M (n = 5) VP during first half of IVC period (Day 0 - Day 3).

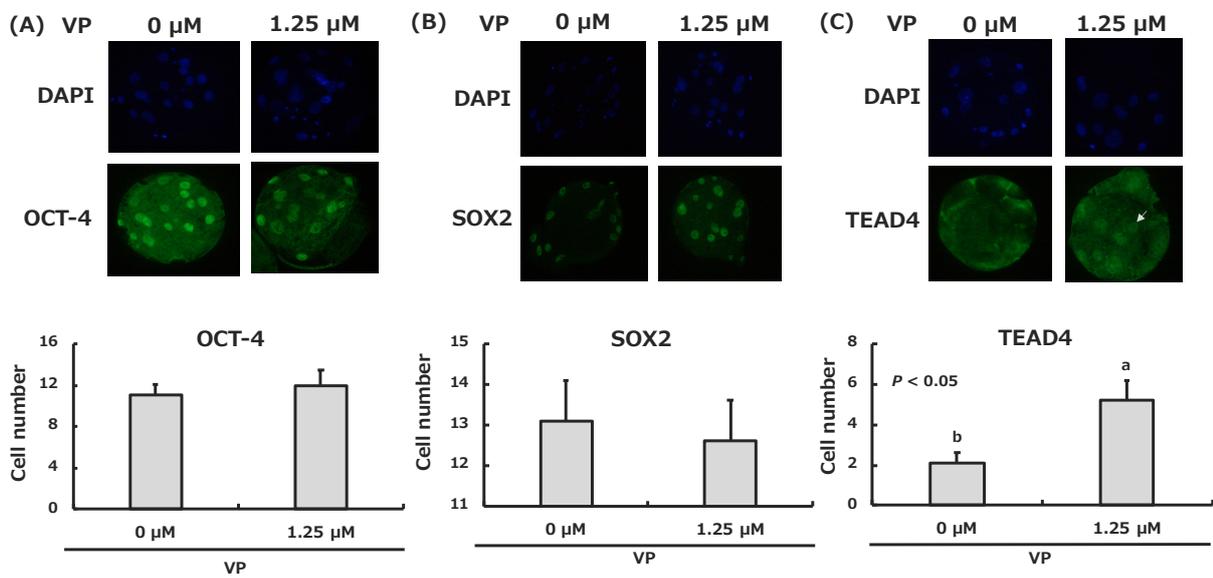


Figure 11. Representative photographs and positive cell numbers of (A) OCT-4, (B) SOX2 and (C) TEAD4 in porcine 16-cell stage embryos treated with 0 μM (n = 10) or 1.25 μM (n = 10) VP during first half of IVC period (Day 0 - Day 3). (C) Nuclear TEAD4 signals (indicated by arrows) were visible in 1.25 μM VP treated embryos. ^{a, b} Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 7. Effect of verteporfin added in the *in vitro* culture medium from Day 3 to Day 6 on *in vitro* development of porcine embryos*

Concentration of VP (μM)	Number of embryos cultured	No.(%) [†] of embryos developed to					
		Day 4		Day 5		Day 6	
		16-cell \leq	Morula	EBC \leq	BC	ExBC \leq	
0	309	148 (47.9)	55 (17.8)	67 (21.7)	23 (7.4)	29 (9.4) ^a	
0.5	306	144 (47.1)	60 (19.6)	66 (21.6)	19 (6.2)	19 (6.2) ^{ab}	
1.25	306	134 (43.8)	43 (14.1)	63 (20.6)	20 (6.5)	11 (3.6) ^b	

* Experiments were replicated six times.

† Percentages of the number of embryos cultured.

^{a, b} Values with different superscripts within each column differ significantly ($P < 0.05$).

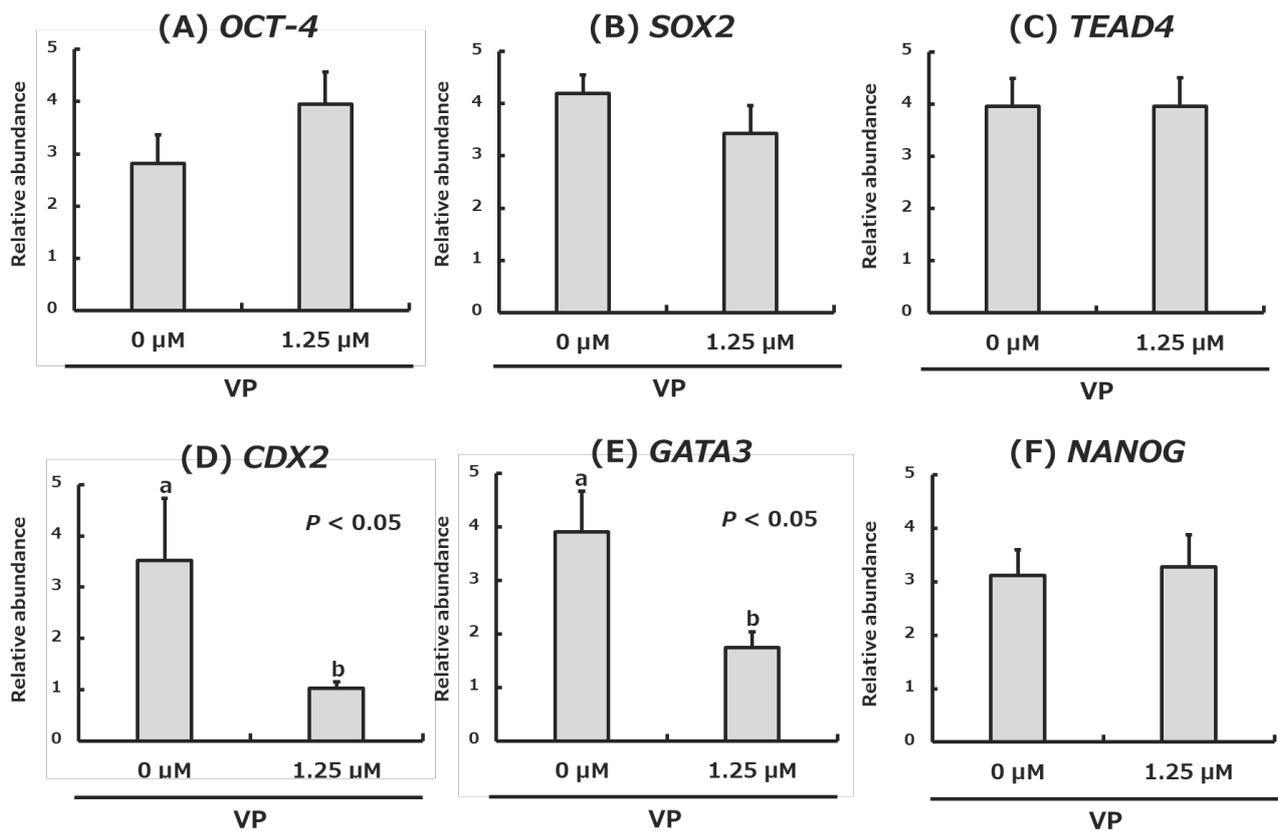


Figure 12. Relative abundance (mean \pm SEM) of (A) *OCT-4*, (B) *SOX2*, (C) *TEAD4*, (D) *CDX2*, (E) *GATA3* and (F) *NANOG* transcripts in porcine blastocyst stage embryos treated with 0 μ M (n = 5) or 1.25 μ M (n = 5) VP during latter half of IVC period (Day 3 - Day 5).

a, b Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

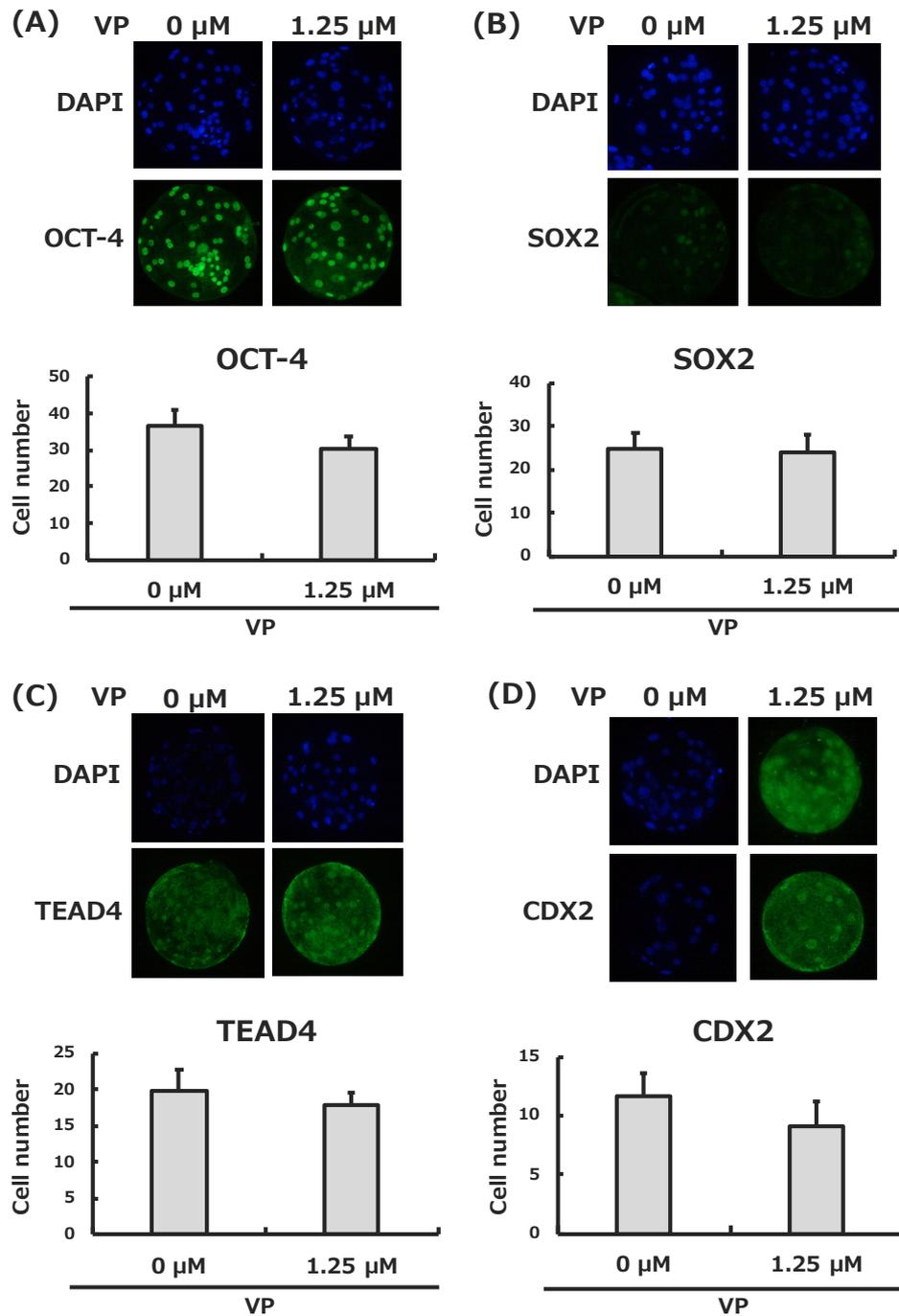


Figure 13. Representative photographs and positive cell numbers of (A) OCT-4, (B) SOX2, (C) TEAD4 and (D) CDX2 in porcine blastocyst stage embryos treated with 0 μM (n = 10) or 1.25 μM (n = 10) VP during latter half of IVC period (Day 3 - Day 5).

4. 考察

マウス胚では、桑実期胚の外側細胞で *Tead4* が *Yap1* と複合体を形成することで、TE の制御因子である *Cdx2* や *Gata3* 発現が促進され、TE の形成が起こる (Home ら 2012 ; Menchero ら 2019 ; Nishioka ら 2009 ; Nishioka ら 2008 ; Ralston ら 2010 ; Rayon ら 2014 ; Wicklow ら 2014 ; Wu ら 2010 ; Yagi ら 2007)。ブタ胚においては、*TEAD4* と *YAP1* 発現をそれぞれ抑制すると、BC 期への発生が阻害され、さらに ICM 分化制御因子である *SOX2* の発現量が増加する (江村 2018)。これらの結果から、ブタ胚において *TEAD4* と *YAP1* はそれぞれ TE 分化に重要であることが考えられるが、マウス胚の様に複合体として機能しているのかは明らかではない。そこで本研究では、*TEAD4*–*YAP1* 複合体形成阻害剤である VP を IVC 培地へ添加することで、*TEAD4*–*YAP1* 複合体の形成を阻害したブタ胚における発生を検討した。

マウスの IVC 培地に 2-細胞期から桑実期にかけて VP を添加すると、*Tead4* 欠損胚と同様に、胞胚腔の形成が起こらず、さらに桑実期から BC 期にかけて *Cdx2* 発現量が減少する (Menchero ら 2019 ; Rayon ら 2014)。本研究では、ブタ胚においては、桑実期以前の IVC 培地に VP を添加すると、桑実期への発生が阻害された。胞胚腔を形成しなかったという点では、マウスの結果と一致するが、マウスでは VP による桑実期への発生について言及している知見はない。このことから、第 3 章で述べた *LATS2* 発現抑制による発生阻害と同様に、ブタ胚では E-cadherin を介したコンパクションなどに *TEAD4*–*YAP1* 複合体が必須である可能性がある。実際に乳癌細胞などを用いた体細胞研究では、*TEAD*–*YAP* 複合体が E-cadherin の発現動態に関与することを示唆する知見がある。すなわち、*TEAD*–*YAP* 複合体は、Thrombospondin 1 (*THBS1*) の転写を介して

Focal adhesion kinase (FAK) の機能に関与し (Nardone ら 2017 ; Shen ら 2018)、 FAK は細胞内で E-cadherin に作用することで、細胞接着を制御する (Mui ら 2016)。したがって、TEAD-YAP 複合体は間接的に E-cadherin に作用していることが考えられ、ブタ胚においてもこのような機構によって TEAD4-YAP1 複合体が桑実期でのコンパクションに関与している可能性がある。

本研究では、*OCT-4*、*SOX2* および *TEAD4* の各 mRNA 発現量において、VP 前半添加の影響は認められなかったが、TEAD4 のタンパク質陽性細胞数は VP 添加によって増加した。本研究結果では、VP 添加が総細胞数におよぼす影響は観察されなかったため、TEAD4 タンパク質の陽性細胞数増加は、総細胞数の変化による影響を受けていない。なぜ TEAD4 陽性細胞数が VP 添加によって増加したのかは不明であるが、本研究では *TEAD4* mRNA 発現量は変わらなかった上、TEAD4 は転写因子であるため、他の遺伝子発現の変化により間接的に TEAD4 陽性細胞数が増加したと考えられる。

ブタ胚発生後半における IVC 培地への VP 添加は、BC 期胚の形成に影響しないものの、その後の胚の拡張が阻害された。また、*OCT-4*、*SOX2* および *TEAD4* の mRNA とそれら因子のタンパク質陽性細胞数に VP 添加の影響は認められないものの、*CDX2* および *GATA3* mRNA 発現量は VP 添加によって減少した。また、マウス胚では、2-細胞期から桑実期の段階ですでに *Cdx2* や *Gata3* といった TE 制御因子が発現しており、この時期の VP 添加によって桑実期以前に *Gata3* 発現量が減少する (Menchero ら 2019)。ブタ胚では、*GATA3* に関する知見は少なく、BC 期以降に *GATA3* が発現することは示されているが (Fujii ら 2013)、桑実期までの発生段階での発現動態に関する報告はない。したがって、ブタ胚においても TEAD4-YAP1 複合体が桑実期以前に *GATA3* 発現を制御し、発生に寄与している可能性が考えられる。さらに、マウス胚では、桑実期から BC

期にかけての VP 添加によって、*Gata3* と *Nanog* 発現量は変わらないが、*Cdx2* の発現量が減少する (Menchero ら 2019)。これらのことから、ブタ胚においてもマウス胚と同様に、TEAD4-YAP1 複合体が *GATA3* や *CDX2* 発現を制御することで TE 分化に貢献している可能性がある。

本研究により、TEAD4-YAP1 複合体がブタ胚の桑実期および BC 期以降の発生に必須であることが明らかになった。また、ブタ BC 期胚では、TEAD4-YAP1 複合体が *CDX2* や *GATA3* といった TE マーカーの発現を制御することで TE 分化に寄与している可能性が示された。

5. 要約

本研究では、ブタ初期胚において TEAD4 と YAP1 が複合体として機能しているかを検討するために、TEAD4-YAP1 複合体形成阻害剤である VP がブタ胚の発生能と組織分化関連因子の遺伝子発現におよぼす影響について調べた。

発生前半 (Day 0~Day 3) での VP 添加は、8-細胞期までの発生率に影響をおよぼさなかったものの、16-細胞期以上への発生率において、1.25 μ M 添加区が 0 μ M 添加区および 0.5 μ M 添加区と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。OCT-4 および SOX2 発現に関しては、mRNA およびタンパク質ともに VP 添加の有無による差は認められなかったが、TEAD4 ではタンパク質の核内陽性細胞数においては、1.25 μ M 添加区が 0 μ M 添加区と比較して有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。

発生後半 (Day 3~Day 6) での VP 添加は、BC 期への発生に影響をおよぼさないものの、その後の胚の拡張において、VP 1.25 μ M 添加区において 0 μ M 添加区と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。また、*OCT-4*、*SOX2*、*TEAD4* および *NANOG* の mRNA 発現量に変化は認められなかったものの、*CDX2* および *GATA3* mRNA 発現量は 1.25 μ M 添加区において 0 μ M 添加区と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。OCT-4、SOX2、TEAD4 および CDX2 のタンパク質を核内で発現している細胞数に処理区間で差は認められなかった。

本研究の結果から、TEAD4-YAP1 複合体はブタ初期胚の発生に必須の因子であり、とりわけ BC 期以降の発生においては、マウスと同様に TEAD4-YAP1 複合体が *CDX2* や *GATA3* の発現制御を介して TE 分化に関与している可能性が示された。

第 5 章

PARD6B 発現抑制がブタ初期胚の体外発生と
Hippo pathway および組織分化関連因子の発現におよぼす影響

1. 緒言

細胞極性は、植物から動物まで幅広い生物における細胞に観察され、それら生物の生存に必須である (Ajduk と Zernicka-Goetz 2016 ; Ohno 2001)。細胞極性を制御する因子群として代表的なものに Par-aPKC 複合体があり、ショウジョウバエからマウスに至るまで幅広い動物種に存在する (Ajduk と Zernicka-Goetz 2016)。Par-aPKC 複合体は Par6、Par3 および aPKC から構成され、これらが細胞内の細胞膜に局在することで、細胞に極性をもたらす (Ajduk と Zernicka-Goetz 2016)。

マウス胚では、8 から 16-細胞期にかけて、非対称分裂が起こり、細胞極性を持つ細胞と持たない細胞が存在するようになる (Johnson と McConnell 2004)。この細胞極性の有無は割球細胞のコンパクションに付随してもたらされる現象で、胚の外側に位置する細胞では、Pard3 (Par3 ホモログ)、Pard6b (Par6 ホモログ) および Prkcz/i (aPKC 因子群) が頂端側、すなわち外側細胞膜に局在することにより、細胞極性が構築される (Pauken と Capco 2000 ; Plusa ら 2005 ; Vinot ら 2005 ; Zhu ら 2017)。一方で、内側細胞では Par-aPKC 複合体の偏りは認められず、細胞は極性を持たない。そして、この内側/外側細胞間での細胞極性の有無がマウス胚の ICM/TE 分化に重要であることが明らかとなっている (Alarcon ら 2010 ; Cao ら 2015 ; Hirate ら 2015 ; Hirate ら 2013 ; Plusa ら 2005)。

Pard3、*Pard6b* もしくは *Prkci* の発現抑制を行うことで、細胞極性を乱したマウス胚では、TE 形成が阻害される (Alarcon 2010 ; Plusa ら 2005)。さらに、*Pard6b* 発現を抑制したマウス胚では、Yap1 のリン酸化が促進されることで、Yap1 の核内局在が減少する (Cao ら 2015 ; Hirate ら 2015)。これらのことか

ら、マウス桑実期胚の外側細胞において、細胞極性は Hippo pathway を抑制的に制御することで、TE 分化に寄与していることが明らかとなっている。

ブタ胚では、前章までの研究から YAP1 および LATS2 が胚発生に必須であり、ICM/TE 分化に重要である可能性が示された。すなわち、マウス胚と同様にブタ胚においても Hippo pathway が組織分化に重要であると考えられるが、Hippo pathway の制御に細胞極性が関与するか否かは明らかでない。そこで本研究では、ブタ初期胚における Hippo pathway の制御機構として細胞極性に着目し、Par-aPKC 複合体構成因子 (*PARD3*、*PARD6B*、*PRKCI* および *PRKCZ*) の遺伝子発現動態を解析した。続いて、マウス胚において最も知見が多い *PARD6B* に着目し、*PARD6B* のタンパク質発現動態を解析するとともに、*PARD6B* 発現抑制がブタ胚の初期発生におよぼす影響について検討した。また、*PARD6B* が Hippo pathway におよぼす影響を検討するため、*PARD6B* 発現抑制胚における *YAP1* および *LATS2* の mRNA 発現解析と YAP1 核内陽性細胞率について解析を行った。さらに、それら胚における組織分化関連因子についても解析を行った。

2. 材料および方法

(1) ブタ卵巣の採取および卵子の吸引

ブタ卵巣の採取および卵子の吸引は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(2) 体外成熟培養 (IVM)

ブタ卵子の IVM は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(3) 体外受精 (IVF)

ブタ卵子の IVF は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(4) 体外発生培養 (IVC)

IVF 胚の IVC は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(5) siRNA の胚への注入

異なる塩基配列を標的とした 2 種類の *PARD6B* 発現抑制用 siRNA (PARD6B siRNA-1 および PARD6B siRNA-2) は、ブタ *PARD6B* 遺伝子 (GenBank accession no. ; NM_001130532.1) の塩基配列をもとに設計した (Table 8)。siRNA の設計に関しては、Enhanced siDirect (<http://design.RNAi.jp/>) および BLOCK-iT RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) を用いた。本研究では、PARD6B siRNA の注入を行う区に加え、Control siRNA の注入を行う区を対照区として設けた。siRNA の注入は、全ての siRNA 濃度を 20 μ M とし、他は第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(6) mRNA のサンプリング

卵子および胚のサンプリングは IVM 後 (M-II 期卵子; 10 卵子/1 サンプル)、IVC 開始 12 時間後 (1-細胞期胚 ; 10 胚/1 サンプル)、IVC 開始 48 時間後 (2-から 4-細胞期胚 ; 10 胚/1 サンプル)、IVC 開始 72 時間後 (8-から 16-細胞期胚 ; 10 胚/1 サンプル)、IVC 開始 96 時間後 (桑実期胚 ; 5 胚/1 サンプル) および IVC 開始 120 時間後 (BC 期胚 ; 5 胚/1 サンプル)に行った。mRNA のサンプリングは、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(7) mRNA の逆転写 (RT)

mRNA の RT は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(8) リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。リアルタイム PCR に使用したプライマーおよびアニーリング温度については Table 8 に示した。

(9) mRNA 発現量の定量化

mRNA 発現量の定量化は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(10) 蛍光免疫染色

蛍光免疫染色は、IVC 開始 84 時間後 (16-細胞期) および IVC 開始 96 時間後 (桑実期) の胚を対象に、第 2 章に記述した方法に準じて行った。PARD6B の蛍光免疫染色は、7% goat serum を含む TXPBS でのブロックングし、1:50 倍に希釈した Mouse monoclonal anti-PARD6B primary antibody (sc-166405 ; Santa

Cruz Biotechnology) を用いて 4 °C で一晩静置して一次抗体反応を行った。YAP1 の蛍光免疫染色は、0.5% BSA と 1% スキムミルクを含む TXPBS でのブロッキングし、1:200 倍に希釈した Mouse monoclonal anti-YAP1 primary antibody (H00010413-MO1 ; Abnova, Taipei, Taiwan) を用いて 4 °C で 1 時間静置して一次抗体を行った。一次抗体反応後は、PAR6B、YAP1 とともに 1:400 倍に希釈した二次抗体 (Alexa 488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody) を用いて室温で 1 時間静置し、二次抗体反応を行った。その他の工程は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(11) 統計解析

得られたデータの統計解析は、Statcel 2 および Stat view を用いて行った。mRNA 発現量に関するデータはすべて、平均値に標準誤差をつけて示した。mRNA 発現量は、Bartlett 検定を用いて分散の均一性を確認し、分散が均一だった場合は、One-Factor ANOVA を用いて検定を行い、多重比較として Tukey Kramer の検定を行った。分散が不均一だった場合は、Kruskal-Wallis 検定を行い、その後 Scheffé 法を用いて多群間の有意差検定を行った。胚発生率およびタンパク質の核内陽性細胞率の検定には Arc-sin 変換を行った数値を用いた。Arc-sin 変換後の値は、Bartlett 検定を用いて分散の均一性を確認し、分散が均一だった場合は、One-Factor ANOVA を用いて検定を行い、多重比較として Tukey Kramer の検定を行った。分散が不均一だった場合は、Kruskal-Wallis 検定を行い、その後 Scheffé 法を用いて多群間の有意差検定を行った。

3. 結果

(1) ブタ卵子および初期胚における Par-aPKC 複合体構成因子の mRNA 発現動態

ブタ卵子および初期胚における Par-aPKC 複合体構成因子 (*PARD3*、*PARD6B*、*PRKCI* および *PRKCZ*) の mRNA 発現動態を Fig. 14 に示した。*PARD3* および *PRKCI* mRNA は受精後 2-~4-細胞期まで高い値を示した後、桑実期にかけて有意 ($P < 0.05$) に減少した。*PARD6B* mRNA は 8-~16-細胞期まで高い値を示した後、桑実期にかけて有意 ($P < 0.05$) に減少した。*PRKCZ* mRNA においては、2-~4-細胞期まで高い発現量を示した後、8-~16-細胞期から桑実期にかけて発現量が減少し、その後 BC 期において有意 ($P < 0.05$) に発現が増加した。

(2) ブタ卵子および初期胚における PARD6B タンパク質発現動態

ブタ卵子および初期胚における PARD6B タンパク質の蛍光免疫染色画像を Fig. 15 に示した。PARD6B タンパク質は、4-細胞期までは細胞質に微弱なシグナルが観察され、8-細胞期からは胚の輪郭、すなわち外側細胞で、かつ細胞が接していない外側の細胞膜で発現が認められた。

(3) siRNA 注入による *PARD6B* mRNA 発現抑制効果の検証

Control siRNA、*PARD6B* 発現抑制用の PARD6B siRNA-1 もしくは PARD6B siRNA-2 を注入した胚の 8-~16-細胞期における *PARD6B* mRNA 発現量を Fig. 16 に示した。*PARD6B* mRNA 発現量は、PARD6B siRNA-1 および PARD6B siRNA-2 注入区において Control siRNA 注入区と比較して有意 ($P < 0.05$) に

低い値を示した。

(4) *PARD6B* 発現抑制がブタ初期胚の発生におよぼす影響

Control siRNA、*PARD6B* siRNA-1 もしくは *PARD6B* siRNA-2 を注入した胚の発生率を Table 9 に示した。IVC 開始後 2 日目 (Day 2) での 2-細胞期以上への分割率、3 日目 (Day 3) での 8-細胞期への発生率、4 日目 (Day 4) での 16-細胞期以上および桑実期への発生率、5 日目 (Day 5) での EBC 期以上への発生率を示した。これら胚の分割率および各ステージへの発生率は、培養胚数に対する割合で示した。胚の分割率 (42.9-59.7%) に処理区間で有意な差は認められなかった。8-細胞期への発生率は、*PARD6B* siRNA-1 注入区 (21.2%) が Control siRNA 注入区 (31.6%) と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。16-細胞期以上 (22.1-35.5%) および桑実期 (7.0-13.9%) への発生率において処理区間で差は認められなかった。EBC 期以上への発生率においては、*PARD6B* siRNA-1 (2.2%) および *PARD6B* siRNA-2 (0.9%) 注入区で Control siRNA 注入区 (17.3%) と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

(5) *PARD6B* 発現抑制がブタ初期胚における Hippo pathway 関連因子発現におよぼす影響

Control siRNA、*PARD6B* siRNA-1 もしくは *PARD6B* siRNA-2 を注入した胚の 8-~16-細胞期における *YAP1* および *LATS2* 遺伝子の mRNA 発現量を Fig. 17 に示した。両遺伝子の mRNA 発現量に処理区間で差は認められなかった。

桑実期胚における Control siRNA、*PARD6B* siRNA-1 もしくは *PARD6B* siRNA-2 を注入した胚の桑実期における YAP1 核内陽性細胞率を Fig. 18 に示した。YAP1 の核内陽性細胞率は、*PARD6B* siRNA-2 注入区 (6.8%) において

Control siRNA 注入区 (25.1%) と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

(6) *PARD6B* 発現抑制がブタ初期胚における組織分化関連因子発現におよぼす影響

Control siRNA、*PARD6B* siRNA-1 もしくは *PARD6B* siRNA-2 を注入したブタ胚の 8-~16-細胞期における *OCT-4*、*SOX2* および *TEAD4* 遺伝子の mRNA 発現量を Fig. 19 に示した。全ての遺伝子の mRNA 発現量に処理区間で差は認められなかった。

また、Control siRNA、*PARD6B* siRNA-1 もしくは *PARD6B* siRNA-2 を注入したブタ胚の 16-細胞期における *OCT-4*、*SOX2* および *TEAD4* タンパク質の核内陽性細胞率を Fig. 20 に示した。全てのタンパク質の核内陽性細胞率において、処理区間で有意な差は認められなかった。

Table 8. Primers and siRNA sequences

Gene name	Nucleotide sequences (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)	GenBank accession no.
<i>PARD3</i>	F- AATGCTGCGCTCAGTAGGAT	60	150	XM_021064231
	R- ATCATCATGGGAGCTGGAAG			
<i>PARD6B</i>	F- GATGAAGACACAGCGATGACGA	60	176	NM_001130532.1
	R- GCTACGGGTGCTAAGCTGAC			
<i>PRKCI</i>	F- CTTTTCAAAGCCAAGCGTTTC	60	207	XM_021069795
	R- CTGAATGCATGGATGACTGG			
<i>PRKCZ</i>	F- CTGCAGACTGCTGGTCCATA	60	207	NM_001204374
	R- TTGAGGTCCTCGGAATCATC			
<i>YAP1</i>	F- ATCAGTCAAAGCGCTCCAGT	60	208	XM_021062706.1
	R- TTGGAGAATTTGCTGTGCTG			
<i>LATS2</i>	F- TACCAGAAAAGGAGCCACAC	60	239	NM_001177919.1
	R- AAGAGAATCACGCCGACACT			
<i>OCT4</i>	F- GTTCTCTTTGGGAAGGTGT	55.4	313	NM_001113060.1
	R- ACACGCGGACCACATCCTTC			
<i>SOX2</i>	F- GCCCTGCAGTACAACACTCCAT	60	216	EU503117.1
	R- GCTGATCATGTCCCGTAGGT			
<i>TEAD4</i>	F- TGGTGGAGAAAAGTGGAGACC	60	157	NM_001142666.1
	R- AAGTTCCTCCAGCACGCTGTT			
<i>GAPDH</i>	F- TCGGAGTGAAACGGATTTG	52	219	AF017079.1
	R- CCTGGAAGATGGTGATGG			
PARD6B siRNA-1	S- GAUCCCGAAGGCUGUUCGUAA	N/A	N/A	N/A
	AS- GUCUAGGGCUUCCGACAAGCA	N/A	N/A	N/A
PARD6B siRNA-2	S- GCAAUUUUGGAGCUGAAUUTT	N/A	N/A	N/A
	AS- AAUUCAGCUCCAAACUUGCTT	N/A	N/A	N/A

F, forward ; R, reverse ; S, sense strand ; AS, antisense strand.

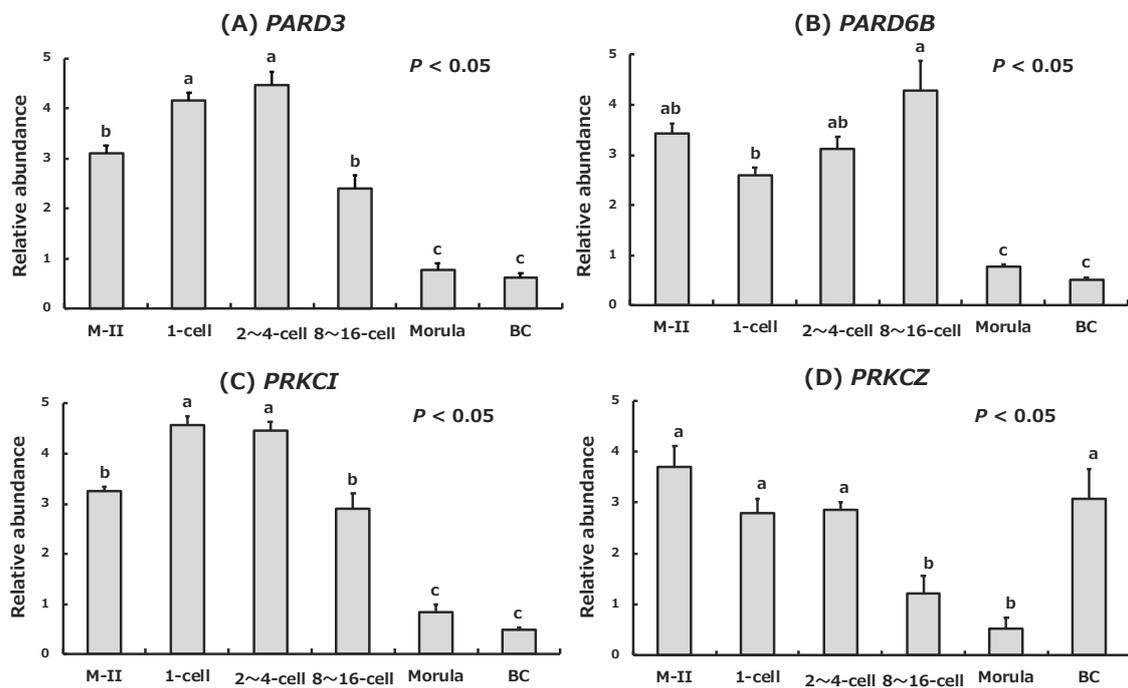


Figure 14. Relative abundance (mean \pm SEM) of (A) *PARD3*, (B) *PARD6B*, (C) *PRKCI* and (D) *PRKCZ* transcripts in porcine matured oocytes (M-II) and 1-cell to blastocyst (BC) stages embryos (n = 5). a, b, c Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

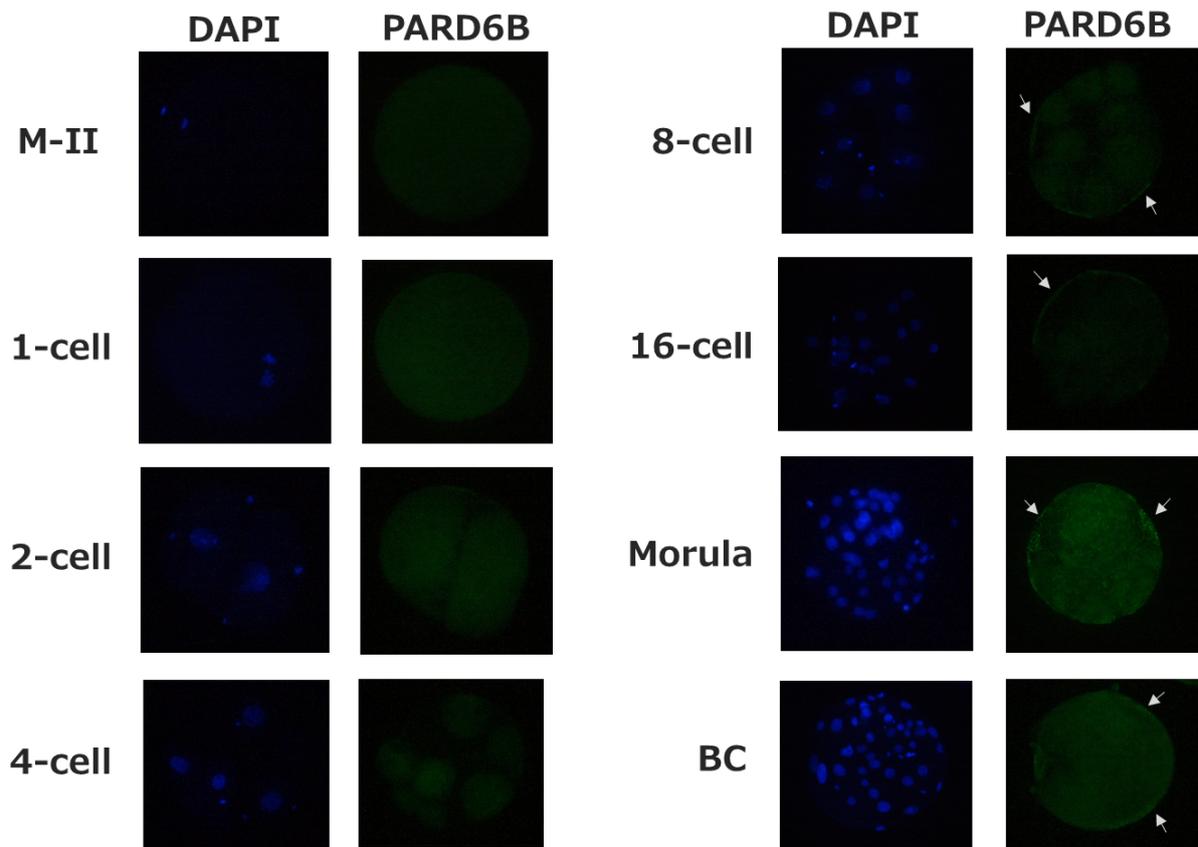


Figure 15. Representative photographs of PAR6B protein expression in porcine matured (MII) and 1-cell to blastocyst (BC) stage embryos. The oocyte and embryos labeled for DAPI (blue) and PAR6B (green). PAR6B localizations at outline of embryos (indicated by arrows) were visible in the 8-cell to BC stage embryos.

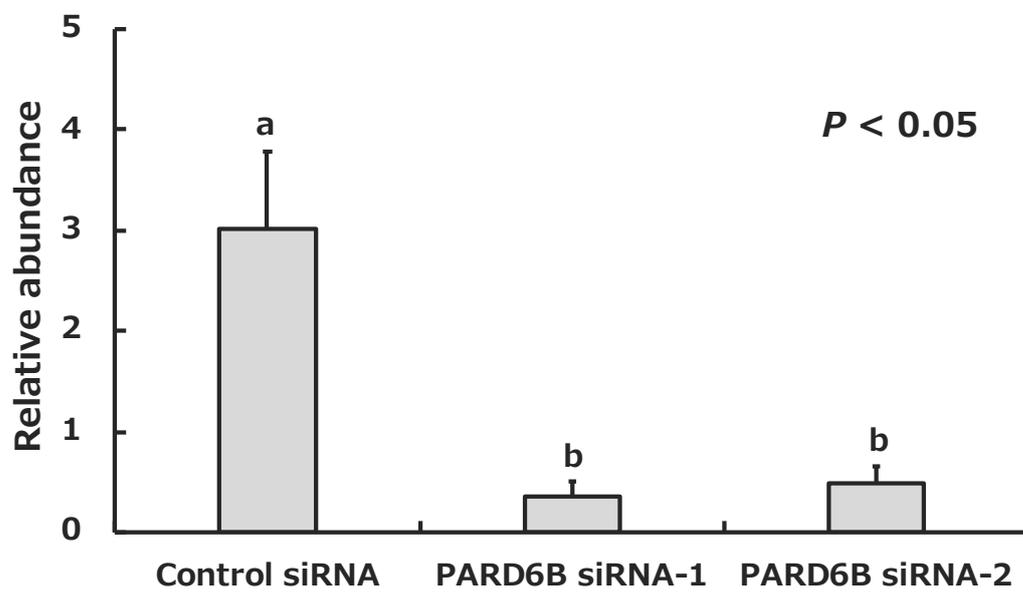


Figure 16. Relative abundance (mean \pm SEM) of *PARD6B* transcripts in porcine 8 to 16-cell stage embryos obtained from Control siRNA (n = 5) injection, PARD6B siRNA-1 (n = 5) injection or PARD6B siRNA-2 (n = 5) injection.

a, b Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 9. Effect of PARD6B siRNA injection on *in vitro* development of porcine embryos*

Treatment	Number of embryos cultured	No. (%) [†] of embryos developed to				
		Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	EBC \leq
		2-cell \leq	8-cell	16-cell \leq	Morula	
Control siRNA	231	138 (59.7)	73 (31.6) ^a	82 (35.5)	32 (13.9)	40 (17.3) ^a
PARD6B siRNA-1	231	99 (42.9)	49 (21.2) ^b	51 (22.1)	17 (7.4)	5 (2.2) ^b
PARD6B siRNA-2	230	125 (54.3)	66 (28.7) ^{ab}	59 (25.7)	16 (7.0)	2 (0.9) ^b

* Experiments were replicated five times.

[†] Percentages of the number of embryos cultured.

^{a, b} Values with different superscripts within each column differ significantly ($P < 0.05$).

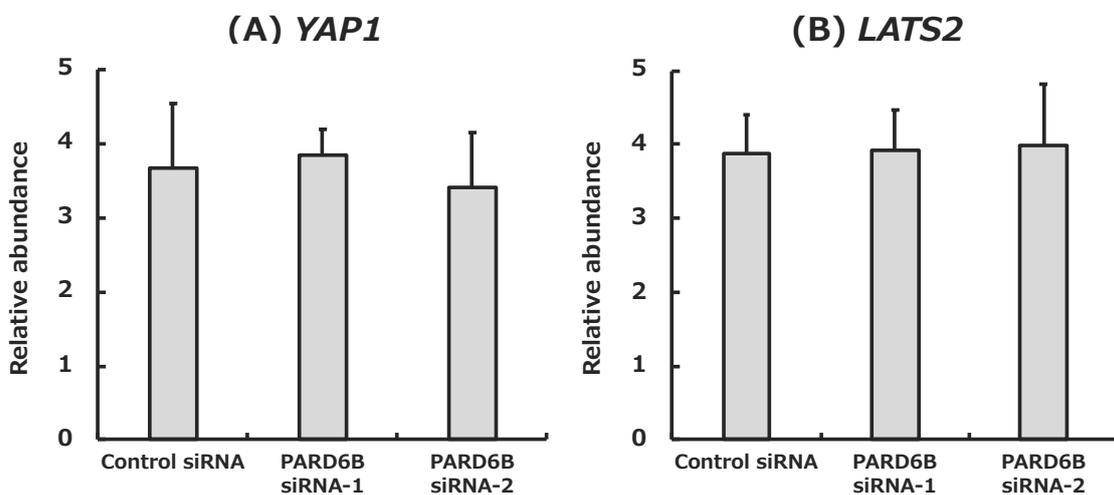


Figure 17. Relative abundance (mean \pm SEM) of (A) *YAP1* and (B) *LATS2* transcripts in porcine 8 to 16-cell stage embryos obtained from Control siRNA (n = 5) injection, PARD6B siRNA-1 (n = 5) injection or PARD6B siRNA-2 (n = 5) injection.

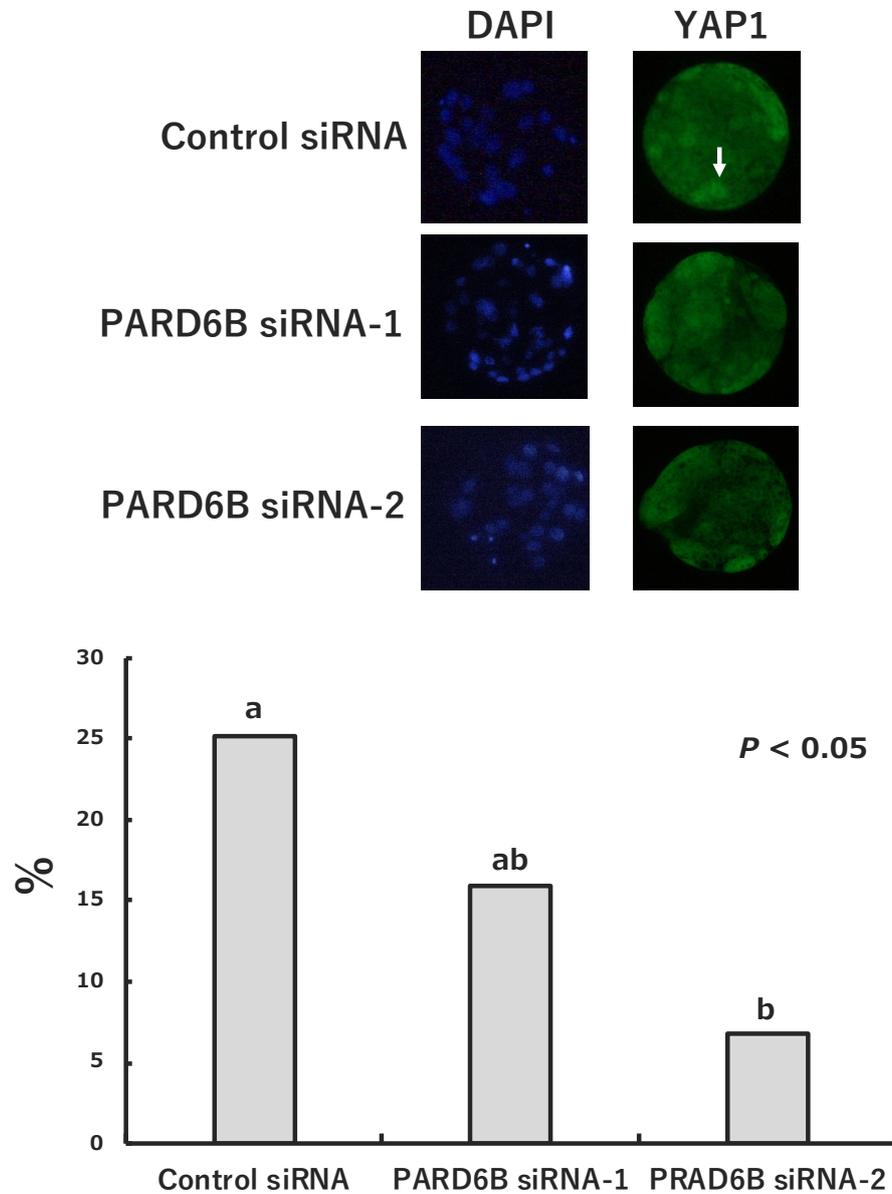


Figure 18. Representative photographs and percentages of positive cell numbers of YAP1 in porcine morula stage embryos obtained from Control siRNA (n = 10), PARD6B siRNA-1 (n = 10) injection or PARD6B siRNA-2 (n = 10) injection. The arrow indicated the nuclear YAP1 signal.

^{a, b} Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

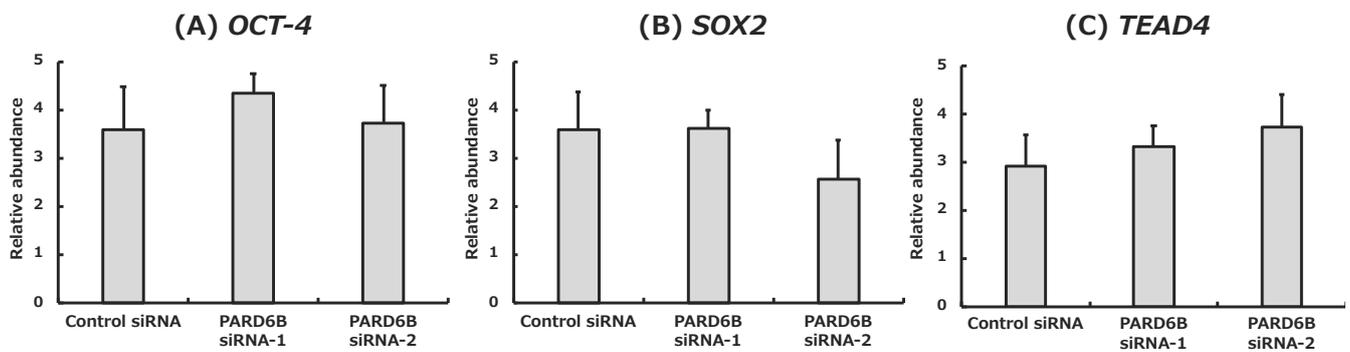


Figure 19. Relative abundance (mean \pm SEM) of (A) *OCT-4*, (B) *SOX2* and (C) *TEAD4* transcripts in porcine 8 to 16-cell stage embryos obtained from Control siRNA (n = 5) injection, PARD6B siRNA-1 (n = 5) injection or PARD6B siRNA-2 (n = 5) injection.

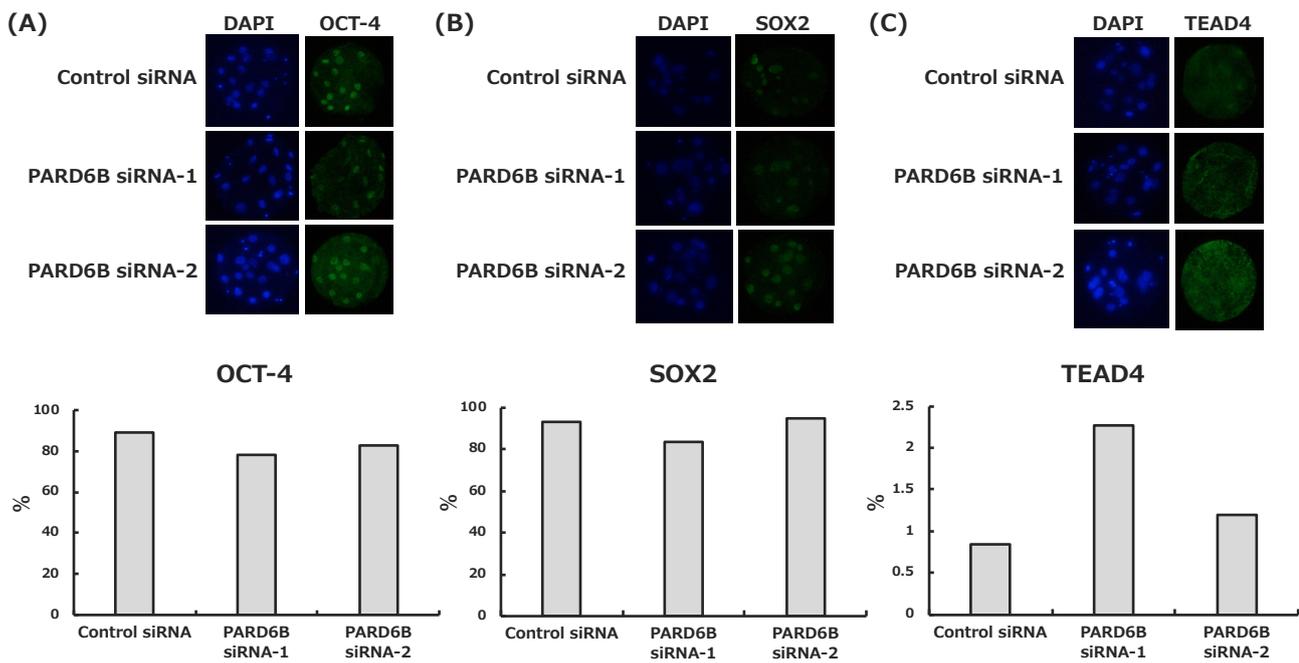


Figure 20. Representative photographs and percentages of positive cell numbers of (A) OCT-4, (B) SOX2 and (C) TEAD4 in porcine 16-cell stage embryos obtained from Control siRNA (n = 10), PARD6B siRNA-1 (n = 10) injection or PARD6B siRNA-2 (n = 10) injection.

4. 考察

マウス桑実期胚において、Par-aPKC 複合体によって制御される細胞極性は、外側細胞にのみ認められ、Hippo pathway を抑制することで TE 分化を促進する (Hirate ら 2015)。これまでの研究から、ブタ胚においてもマウスと同様に Hippo pathway が ICM 形成に重要である可能性が示されたが、TE 分化において Hippo pathway の上流に細胞極性が位置しているのかは不明である。そこで本研究では、まず Par-aPKC 複合体構成因子のブタ卵子および初期胚における発現動態を解析した。続いて、それら複合体構成因子の一つである PARD6B に注目し、ブタ胚の細胞極性と Hippo pathway および組織分化との関連性について検討した。

Par-aPKC 複合体は Par3、Par6 および aPKC から構成され、マウスでは Pard3、Pard6b および Prkcz/i がそれぞれ該当する。マウス胚において、Pard6b と Prkcz/i は、mRNA とタンパク質の両方において 2-細胞期から BC 期まで発現が認められる (Pauken と Capco 2000; Vinot ら 2005)。Pard3 に関しては、mRNA レベルでは BC 期のみが発現しているものの、タンパク質レベルでは 2-細胞期から BC 期まで発現が認められる (Vinot ら 2005)。これら Par-aPKC 複合体構成因子は、8-細胞期からのコンパクションに伴い、外側細胞において頂端側に局在するようになる (Pauken と Capco 2000; Plusa ら 2005; Vinot ら 2005; Zhu ら 2017)。本研究では、ブタにおいても卵子から BC 期胚までの全ての発生ステージで 4 種の Par-aPKC 複合体構成因子の mRNA 発現が認められた。その発現動態は、それぞれ多少の違いはあるものの、比較的類似しており、2-~4-細胞期から 8-~16-細胞期にかけての分割期まで高く、その後、桑実期以降に低下する発現動態を示した。このことから、ブタ胚においても胚の初期発生過程にお

いて細胞極性が重要な役割を担うものと考えられる。PAR6B タンパク質の局在性解析では、4-細胞期までは細胞質にわずかに存在する程度だったが、8-細胞期以降では、胚の輪郭でシグナルが観察された。この結果を mRNA の結果と併せて考察すると、ブタ胚において PAR6B は、8-細胞期で mRNA からタンパク質へ翻訳され、外側細胞頂端側に局在することで、細胞極性の構築に寄与していると考えられる。今後は、Par-aPKC 複合体としての機能を検討するべく、PAR6B 以外の因子群についてもタンパク質レベルで解析し、それら因子の発現の局在性などを検討していく必要がある。

本研究では、細胞極性がブタ胚の初期発生におよぼす影響を検討するため、PAR6B に着目し、その人為的な発現抑制を行い、細胞極性を乱した胚を作出した。マウス胚において、*Pard6b* 発現を抑制すると、BC 期への発生が阻害される (Alarcon 2010)。また、*Pard6b* 発現を抑制したマウス胚では、Yap1 のリン酸化が増加することで、Yap1 の核内陽性細胞が減少し、その結果、Tea4-Yap1 複合体による *Cdx2* 発現が減少する (Cao ら 2015; Hirate ら 2013; Hirate ら 2015)。すなわち、マウス胚において *Pard6b* は Hippo pathway を抑制することで、TE 分化に寄与していることが明らかになっている。本研究の結果、*PAR6B* 発現を抑制したブタ胚では、桑実期までは発生するものの、BC 期への発生が顕著に阻害され、マウス胚と一致する結果となった。また、Hippo pathway 関連因子である *LATS2* および *YAP1* 発現を抑制したブタ胚においても BC 期胚への発生が阻害され (江村 2018; 本論文 第 3 章)、*PAR6B* 発現抑制の結果に類似している。さらに、マウスと同様に、*PAR6B* 発現を抑制したブタ胚では、YAP1 の核内陽性細胞数が減少した。この *PAR6B* 発現抑制胚では、*YAP1* および *LATS2* の mRNA 発現量に変化は認められなかったことから、ブタ胚において PAR6B は YAP1 の核内移行を促進すると考えられる。以上の結果から、ブタ

胚において細胞極性は BC 期への発生に必須であり、細胞極性は Hippo pathway を抑制的に制御することで細胞の TE 分化に寄与する可能性が示された。

第 3 章の研究結果から、Hippo pathway を促進する *LATS2* の発現を抑制したブタ胚では、*OCT-4* および *SOX2* 発現量の減少が認められた。一方、Hippo pathway の標的因子である *YAP1* の発現抑制胚では、*OCT-4* および *SOX2* 発現量が増加することから (江村 2018)、ブタ胚において Hippo pathway は ICM 分化に重要であることが示唆されている。さらに、本研究の結果から、*PARD6B* は *YAP1* の核内移行を促進したため、ブタ胚において細胞極性は Hippo pathway の抑制制御を介して TE 分化に寄与すると考えられる。すなわち、*PARD6B* 発現抑制胚では ICM 制御因子の増加と TE 制御因子の減少が生じることが予想されたが、*PARD6B* 発現の抑制はそれら制御因子群 (*OCT-4*、*SOX2* および *TEAD4*) の発現に影響をおよぼさなかった。その原因は明らかではないが、Par-aPKC 複合体は、細胞に極性をもたらす因子群であり、遺伝子の発現を直接制御しているわけではない。そのため、Par-aPKC 複合体による細胞極性の他にも様々な因子が関与することで最終的な組織分化関連因子の発現が生じており、*PARD6B* 発現を抑制しただけでは、本研究で検討した因子の発現に影響をおよぼすことができなかったことが考えられる。例えば、マウス胚の TE 分化においては、細胞極性の他に Notch signaling が重要であることが示唆されており、Notch signaling は Hippo pathway とは独立して *Yap1* の核内発現に影響されずに、*Cdx2* 発現を制御している (Menchero ら 2019 ; Rayon ら 2014 ; Watanabe ら 2017)。ブタ胚においても Notch signaling など他のシグナル経路が細胞極性よりも TE 分化に重要である可能性が考えられ、他のシグナル経路に関する検討もブタ胚における TE 分化の包括的な理解に必要である。また、*PARD6B* の他に Par-aPKC 複合体は *PARD3* と aPKC から構成されているため、今後は、細

胞極性がブタ胚において TE 分化を制御する重要な機構であるのかを明らかにするため、他の構成因子の検討に加え、複数因子の発現を抑制する実験が必要になる。

本研究により、ブタ胚における細胞極性関連因子 Par-aPKC 複合体の発現動態が初めて明らかになった。また、ブタ胚の初期発生において PARD6B は桑実期から BC 期への発生に必須の遺伝子であることが明らかとなり、細胞極性が Hippo pathway を抑制的に制御している可能性も示された。

5. 要約

マウス胚において細胞極性の制御因子である Par-aPKC 複合体は、Hippo pathway を抑制することで、TE 分化に寄与する。本研究では、ブタ卵子および初期胚における Par-aPKC 複合体構成因子の mRNA 発現動態解析と同複合体の構成因子の一つである PARD6B のタンパク質レベルでの発現動態を明らかにするとともに、*PARD6B* の発現抑制がブタ胚の初期胚発生におよぼす影響について検討した。さらに、*PARD6B* 発現抑制胚における Hippo pathway 関連因子および組織分化関連因子の遺伝子発現を検討した。

PARD3 および *PRKCI* mRNA 発現量は受精後 2-~4-細胞期まで高い値を示した後、その後の発生に伴って減少した。*PARD6B* mRNA 発現は 8-~16-細胞期まで高い値を示した後、急激に減少した。*PRKCCZ* mRNA においては、8-~16-細胞期からその発現量が減少し、BC 期にかけて増加した。*PARD6B* タンパク質は 8-細胞期から胚の輪郭で発現が観察された。*PARD6B* 発現抑制は桑実期までの発生率に影響をおよぼさなかったが、EBC 期以上への発生においては、*PARD6B* siRNA 注入区が Control siRNA 注入区と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。Hippo pathway 関連因子発現において *PARD6B* 発現抑制の有無による *YAP1* と *LATS2* mRNA 発現量に差は認められなかったが、*YAP1* 核内陽性細胞率は *PARD6B* siRNA-2 注入区が Control siRNA 注入区と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。組織分化関連因子 (*OCT-4*、*SOX2* および *TEAD4*) においては mRNA 発現量とそれら因子の核内陽性細胞率ともに処理区間で差は認められなかった。

本研究の結果から、*PARD6B* はブタ初期胚の発生に必須の因子であり、Hippo pathway に対して抑制的に機能している可能性が示された。

第 6 章

AMOT 発現抑制がブタ初期胚の体外発生と
組織分化関連因子の発現におよぼす影響

1. 緒言

これまで述べてきた様に、マウス胚の ICM/TE 分化には、桑実期胚の内側/外側細胞で起こる Hippo pathway のオン/オフが重要な役割を担う。すなわち、Hippo pathway がオンの状態である内側細胞では ICM 形成が起こり、一方で Hippo pathway がオフとなっている外側細胞では TE 分化が誘導される (Hirate ら 2013; Nishioka ら 2009)。この特定細胞における Hippo pathway のオン/オフの切り替えには、Amot ファミリーに属する Amot が重要な役割を果たすことが明らかになっている。すなわち、Amot は Hippo pathway の制御因子の一つであり、内側細胞では、細胞膜に均一に発現する (Hirate ら 2013; Mihajlovic と Bruce 2016; Leung と Zernicka-Goetz 2013; Shi ら 2017)。細胞膜に発現している Amot は細胞接着因子と共に Yap1 のリン酸化酵素である Lats1/2 に作用することで、Hippo pathway を促進する (Hirate ら 2013)。Amot 遺伝子を欠損もしくは発現を抑制したマウス胚では、胞胚腔を形成するものの、ICM において、Yap1 核内移行による Cdx2 発現が生じ、機能的に正常な BC 期胚へ発生しない (Hirate ら 2013; Leung と Zernicka-Goetz 2013)。一方で、外側細胞における Amot は、他の細胞と接していない外側の細胞膜に局在する (Hirate ら 2013; Mihajlovic と Bruce 2016; Leung と Zernicka-Goetz 2013; Shi ら 2017)。この Amot の局在部位は、Par-aPKC 複合体が局在する頂端側にあたり、外側細胞では細胞極性依存的に Amot の局在が制御されている。実際に、Par-aPKC 複合体の構成因子である *Prkci* もしくは *Pard6b* 発現を抑制することで細胞極性を乱したマウス胚では、外側細胞でも内側細胞のように細胞膜全体に Amot が発現するようになり、Yap1 の核内移行が減少する (Hirate ら 2013)。このことから、マウス桑実期胚の外側細胞では、細胞極性が Amot を頂端側に局在させること

で、細胞接着因子への結合を阻害し、Hippo pathway を抑制していると考えられている。したがって、マウス胚の ICM/TE 分化には桑実期における Amot の発現と局在性が重要であり、Hippo pathway および細胞極性との相互作用を通して、組織分化を制御している。

ブタ胚では、これまでの研究結果から、Hippo pathway および細胞極性が胚発生に重要であり、ICM/TE 分化にそれぞれ関与する可能性が示された。特に第 5 章において、細胞極性関連因子である *PARD6B* 発現をブタ胚で抑制すると、YAP1 の核内への移行が減少した。このことから、細胞極性は YAP1 の核内移行を促進しており、マウスと同様に AMOT を介して Hippo pathway を抑制的に制御していることが考えられる。しかし、ブタ胚における AMOT の知見は一切なく、その発現の有無も明らかになっていない。

本研究では、ブタ初期胚における AMOT の機能解明を目的として、まず AMOT 関連因子 (*AMOT*、*AMOTL1* および *AMOTL2*) の mRNA 発現動態を明らかにした。続いて、マウス胚において ICM 形成に重要であることがすでに知られている AMOT に着目して、*AMOT* 発現抑制がブタ胚の発生におよぼす影響について検討した。さらに、*AMOT* 発現抑制が組織分化関連因子である OCT-4 および SOX2 の発現におよぼす影響についても検討を行った。

2. 材料および方法

(1) ブタ卵巣の採取および卵子の吸引

ブタ卵巣の採取および卵子の吸引は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(2) 体外成熟培養 (IVM)

ブタ卵子の IVM は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(3) 体外受精 (IVF)

ブタ卵子の IVF は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(4) 体外発生培養 (IVC)

IVF 胚の IVC は、第 2 章に記述した方法に準じて行い、胚の観察は IVC 開始から 6 日目まで行った。

(5) siRNA の胚への注入

異なる塩基配列を標的とした 2 種類の *AMOT* 発現抑制用 siRNA (AMOT siRNA-1 および AMOT siRNA-2) は、ブタ *AMOT* 遺伝子の塩基配列 (GenBank accession no. ; XM_013986341.2) をもとに設計した (Table 10)。siRNA の設計に関しては、BLOCK-iT RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) を用いた。本研究では、AMOT siRNA の注入を行う区に加え、Control siRNA の注入を行う区を処理区として設けた。siRNA の注入は、全ての siRNA 濃度を 20 μ M とし、他は第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(6) mRNA のサンプリング

卵子および胚のサンプリングは IVM 後 (MII 期卵子; 10 卵子/1 サンプル)、IVC 開始 12 時間後 (1-細胞期胚 ; 10 胚/1 サンプル)、IVC 開始 48 時間後 (2-細胞期胚から 4-細胞期胚 ; 10 胚/1 サンプル)、IVC 開始 72 時間後 (8-細胞期胚から 16-細胞期胚 ; 10 胚/1 サンプル)、IVC 開始 96 時間後 (桑実期胚 ; 5 胚/1 サンプル) および IVC 開始 120 時間後 (BC 期胚 ; 5 胚/1 サンプル)に行った。mRNA のサンプリングは、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(7) mRNA の逆転写 (RT)

mRNA の RT は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(8) リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。リアルタイム PCR に使用したプライマーおよびアニーリング温度については Table 10 に示した。

(9) mRNA 発現量の定量化

mRNA 発現量の定量化は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(10) 蛍光免疫染色

蛍光免疫染色は、IVC 開始 84 時間後 (16-細胞期) の胚を対象に、第 2 章に記述した方法に準じて行った。

(11) 統計解析

得られたデータの統計解析は、Statcel 2 および Stat view を用いて行った。mRNA 発現量に関するデータはすべて、平均値に標準誤差をつけて示した。mRNA 発現量は、Bartlett 検定を用いて分散の均一性を確認し、分散が均一だった場合は、One-Factor ANOVA を用いて検定を行い、多重比較として Tukey Kramer の検定を行った。分散が不均一だった場合は、Kruskal-Wallis 検定を行い、その後 Scheffé 法を用いて多群間の有意差検定を行った。胚発生率およびタンパク質の核内陽性細胞率の検定には Arc-sin 変換を行った数値を用いた。Arc-sin 変換後の値は、Bartlett 検定を用いて分散の均一性を確認し、全ての値において分散が均一だったため、One-Factor ANOVA を用いて検定を行い、多重比較として Tukey Kramer の検定を行った。

3. 結果

(1) ブタ卵子および初期胚における *AMOT* 関連因子の mRNA 発現動態

ブタ卵子および初期胚における *AMOT* 関連因子 (*AMOT*、*AMOTL1* および *AMOTL2*) の mRNA の発生段階別発現動態を Fig. 21 に示した。*AMOT* mRNA は桑実期において M-II 期卵子および 1-細胞期と比較して有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。*AMOTL1* では、8-~16-細胞期から BC 期において、それ以前の発生段階と比較して有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。*AMOTL2* では、桑実期から発現量の増加が認められ、BC 期において M-II 期卵子から 8-~16-細胞期と比較して、有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。

(2) siRNA 注入による *AMOT* mRNA 発現抑制効果の検証

Control siRNA、*AMOT* 発現抑制用の *AMOT* siRNA-1 もしくは *AMOT* siRNA-2 を注入した区の 8-~16-細胞期における *AMOT* mRNA 発現量を Fig. 22 に示した。*AMOT* mRNA 発現量は、*AMOT* siRNA-1 および *AMOT* siRNA-2 注入区において Control siRNA 注入区と比較すると有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

(3) *AMOT* 発現抑制がブタ初期胚の発生におよぼす影響

Control siRNA、*AMOT* siRNA-1 もしくは *AMOT* siRNA-2 を注入した区における EBC 期以上への発生率を Table 11 に示した。IVC 開始後 2 日目 (Day 2)

での2-細胞期以上への分割率、3日目 (Day 3) での8-細胞期への発生率、4日目 (Day 4) での16-細胞期以上および桑実期への発生率、5日目 (Day 5) および6日目 (Day 6) でのEBC期以上への発生率を示した。これら分割率および各ステージへの発生率は、培養胚数に対する割合で示した。Control siRNA 注入区、AMOT siRNA-1 注入区および AMOT siRNA-2 注入区における分割率 (55.8-60.8%) および 16-細胞期以上への発生率 (22.3-30.4%) に有意な差は認められなかった。8-細胞期への発生率は AMOT siRNA-2 注入区 (30.4%) が Control siRNA 注入区 (21.9%) と比較して有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。桑実期への発生率においては、AMOT siRNA-1 注入区 (5.9%) と AMOT siRNA-2 注入区 (3.6%) が Control siRNA 注入区 (12.5%) と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。Day 5 における EBC 期以上への発生率では、AMOT siRNA-1 注入区 (3.6%) が AMOT siRNA-2 注入区 (9.8%) および Control siRNA 注入区 (14.7%) と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。Day 6 の EBC 期以上への発生率においては、AMOT siRNA-1 注入区 (5.0%) および AMOT siRNA-2 注入区 (9.4%) が Control siRNA 注入区 (19.2%) と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。

(4) *AMOT* 発現抑制がブタ初期胚における組織分化関連因子発現におよぼす影響

Control siRNA、AMOT siRNA-1 もしくは AMOT siRNA-2 を注入したブタ胚の8-~16-細胞期における *OCT-4* および *SOX2* 遺伝子の mRNA 発現量を Fig.

23 に示した。どちらの遺伝子においても mRNA 発現量に各処理区間で差は認められなかった。

また、*AMOT* 発現抑制の OCT-4 および SOX2 タンパク質発現への影響を検討するため、Control siRNA、AMOT siRNA-1 もしくは AMOT siRNA-2 を注入したブタ胚の 16-細胞期における OCT-4 および SOX2 タンパク質の核内での陽性細胞数をカウントし、全細胞数に対する割合を Fig. 24 に示した。それらタンパク質の核内陽性細胞率において、各処理区間で有意な差は認められなかった。

Table 10. Primers and siRNA sequences

Gene name	Nucleotide sequences (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)	GenBank accession no.
<i>AMOT</i>	F- TCTAGAGCCAGCAGATGGT	60	225	XM_013986341.2
	R- GTCATGCATCCCTCCGAATCT			
<i>AMOTL1</i>	F- CCAGCCCTGCCAGAATACAAT	60	185	XM_021062681
	R- GATGATCGTGGTGTCCCTCT			
<i>AMOTL2</i>	F- CCAGATGGAGACTGTGCTGA	60	247	XM_021069473
	R- AAGATCCCGGTTGAAGTCCT			
<i>OCT4</i>	F- GTTCTCTTTGGGAAGGTGTT	55.4	313	NM_001113060.1
	R- ACACGGGGACACATCCTTC			
<i>SOX2</i>	F- GCCCTGCAGTACAACTCCAT	60	216	EU503117.1
	R- GCTGATCATGTCCCCTAGGT			
<i>GAPDH</i>	F- TCGGAGTGAACGGATTG	52	219	AF017079.1
	R- CCTGGAAGATGGTGATGG			
AMOT siRNA-1	S- GCAGUCGUCUCUUCGUAUTT	N/A	N/A	N/A
	AS- AUACGAAGCAGACUGCCTT	N/A	N/A	N/A
AMOT siRNA-2	S- GGAGGCAUAUGAGAAUCUUTT	N/A	N/A	N/A
	AS- AAGAUUCUAUAUGCCUCCTT	N/A	N/A	N/A

F, forward ; R, reverse ; S, sense strand ; AS, antisense strand.

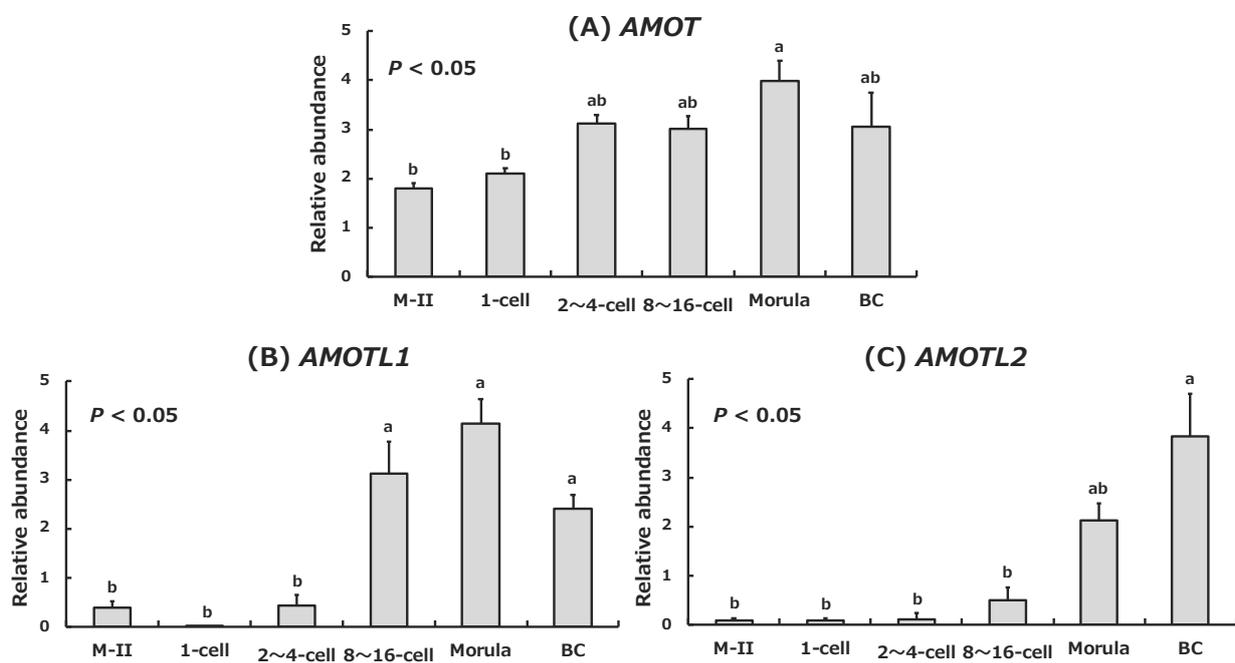


Figure 21. Relative abundance (mean \pm SEM) of (A)*AMOT*, (B)*AMOTL1* and (C)*AMOTL2* transcripts in porcine matured oocytes (M-II) and 1-cell to blastocyst (BC) stages embryos (n = 5). a, b Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

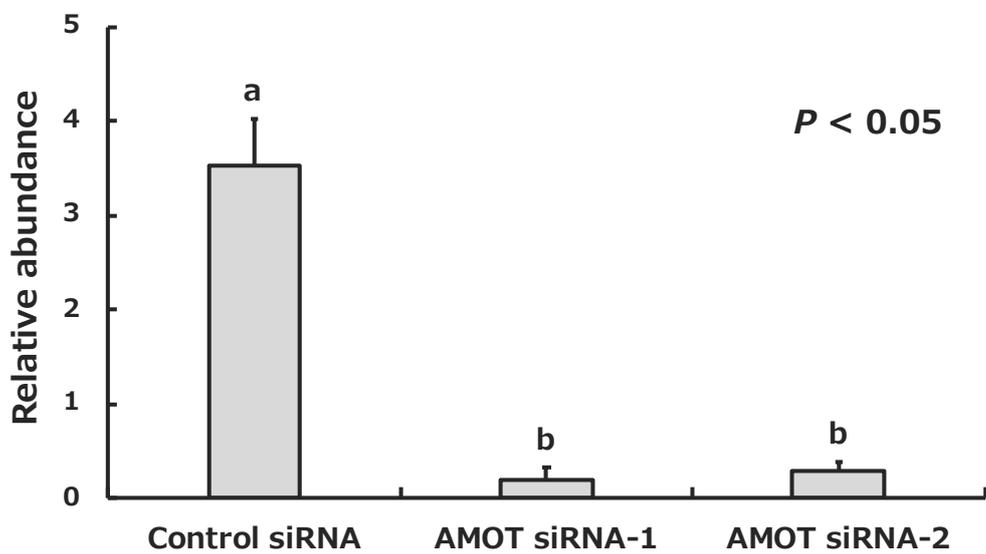


Figure 22. Relative abundance (mean \pm SEM) of *AMOT* transcripts in porcine 8 to 16-cell stage embryos obtained from Control siRNA (n = 5) injection, AMOT siRNA-1 (n = 5) injection or AMOT siRNA-2 (n = 5) injection.

^{a, b} Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 11. Effect of AMOT siRNA injection on *in vitro* development of porcine embryos*

Treatment	Number of embryos cultured	No. (%) [†] of embryos developed to					
		Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	
		2-cell ≤	8-cell	16-cell ≤	Morula	EBC ≤	EBC ≤
Control siRNA	224	131 (58.5)	49 (21.9) ^b	68 (30.4)	28 (12.5) ^a	33 (14.7) ^a	43 (19.2) ^a
AMOT siRNA-1	222	135 (60.8)	54 (24.3) ^{ab}	52 (23.4)	13 (5.9) ^b	8 (3.6) ^b	11 (5.0) ^b
AMOT siRNA-2	224	125 (55.8)	68 (30.4) ^a	50 (22.3)	8 (3.6) ^b	22 (9.8) ^a	21 (9.4) ^b

* Experiments were replicated five times.

† Percentages of the number of embryos cultured.

^{a, b} Values with different superscripts within each column differ significantly ($P < 0.05$).

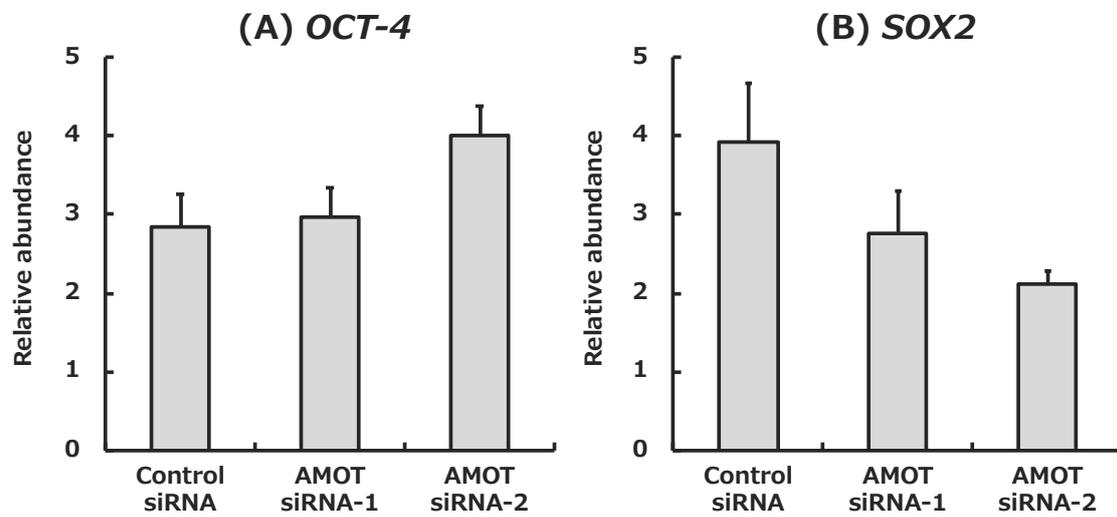


Figure 23. Relative abundance (mean \pm SEM) of (A) *OCT-4* and (B) *SOX2* transcripts in porcine 8 to 16-cell stage embryos obtained from Control siRNA (n = 5) injection, AMOT siRNA-1 (n = 5) injection or AMOT siRNA-2 (n = 5) injection.

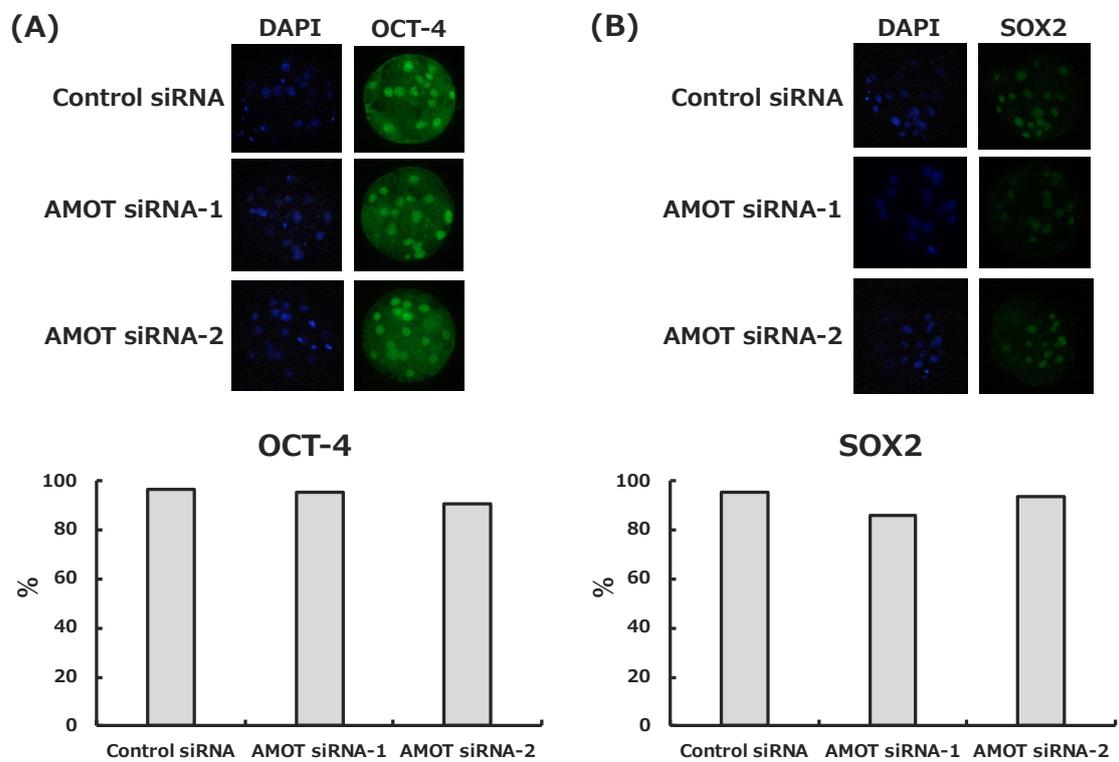


Figure 24. Representative photographs and percentages of positive cell numbers of (A) OCT-4 and (B) SOX2 in porcine 16-cell stage embryos obtained from Control siRNA (n = 10), AMOT siRNA-1 (n = 10) injection or AMOT siRNA-2 (n = 10) injection.

4. 考察

先に述べた様に、マウス胚においては、ICM 形成に重要な Hippo pathway の機能には Amot 関連因子のうち Amot が重要な役割を担う。Amot は桑実期胚の内側細胞において、E-cadherin などの細胞接着因子および Lats1/2 と相互作用することで Yap1 リン酸化を促進し、ICM 形成を誘導する (Hirate ら 2013)。一方、外側細胞では、細胞極性が Amot を頂端側に局在させることで、Amot の細胞接着因子および Lats1/2 への作用を阻害し、Hippo pathway を抑制する (Hirate ら 2013)。したがって、外側細胞における TE 分化には、細胞極性による Amot を介した Hippo pathway の抑制が重要である。ブタ胚では、第 3 章によって Hippo pathway が ICM 形成に重要な可能性が示され、さらに第 5 章で細胞極性による Hippo pathway の抑制制御の存在が示唆された。よって、ブタ胚においても AMOT が細胞極性による制御を受けつつ、Hippo pathway を制御することで組織分化に関与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 *AMOT* 関連因子の発現動態と、初期発生および組織分化における AMOT の機能について検討した。

Amot 関連因子としては、Amot、Amotl1 および Amotl2 が知られているが、マウス胚において Amotl1 はほとんど発現しておらず、Amot と Amotl2 の発現が認められている (Hirate ら 2013; Leung と Zernicka-Goetz 2013)。マウス胚において *Amot*、*Amotl2* ともに mRNA は、4-細胞期頃まではほとんど発現しておらず、8-細胞期から発現量が増加し始め、BC 期で最も高い値を示す (Gao ら 2017; Wang ら 2004)。Amot タンパク質においてもその発現は 8-細胞期から生じ、桑実期になると内側細胞では細胞膜全体、外側細胞では頂端側にあたる外側細胞膜のみで発現する特徴的な分布を示す (Hirate ら 2013; Mihajlovic と

Bruce 2016 ; Leung と Zernicka-Goetz 2013)。一方で、Amotl2 タンパク質は、外側細胞の外側細胞膜にのみ発現する (Hirate ら 2013)。本研究結果ではブタ胚において、*AMOT*mRNA は全発生段階を通じて発現しており、1-細胞期と桑実期の間で差が認められたものの、2-細胞期以降において差は認められなかった。この発現動態は、マウスとは異なり、ブタ胚では *AMOT* が胚発生の初期段階においても機能している可能性がある。一方、*AMOTL2*mRNA においては、BC 期で発現が最も高いマウス胚と類似した動態を示した。このことから、ブタ胚における *AMOTL2* はマウス胚と同様の時期に機能していることが考察される。また、ブタ胚においてはマウス胚と異なり、*AMOTL1* の発現も認められ、*AMOTL1* が何らかの機能を持つ可能性がある。本研究では、*AMOT* 関連因子におけるタンパク質発現について検討していないため、今後はブタ胚における *AMOT* 関連因子のタンパク質の発現動態を明らかにし、マウス胚と比較する必要がある。

本研究では、*AMOT* がブタ胚の初期発生におよぼす影響を検討するため、*AMOT* 遺伝子発現の人為的な発現抑制を行った。その結果、*AMOT* 発現抑制胚では、桑実期以降の発生が顕著に阻害された。*Amot* 遺伝子を欠損もしくは発現抑制したマウス胚では、ICM で *Cdx2* 発現が生じるなど、遺伝子の発現異常が認められるが、胞胚腔を形成する (Hirate ら 2013)。第 3 章の考察でも述べた様に、マウス胚においては *Lats1/2* 発現抑制によっても胞胚腔形成が生じ、ICM 分化に異常をきたす (Lorthongpanich ら 2013)。これらのことから、マウス胚において *Amot* と *Lats1/2* は、同時期に Hippo pathway の制御因子として機能し、ICM 形成に寄与していると考えられている。一方、ブタ胚において *LATS2* 発現を抑制すると *AMOT* 発現を抑制した場合と同様に 16-細胞期以降の発生が阻害される (本論文 第 3 章)。したがって、ブタ胚では、*AMOT* と *LATS2* が

共同して桑実期を形成する時期に Hippo pathway の機能に關与している可能性が考えられる。マウス胚では、桑実期以前における Hippo pathway の機能に關する知見はなく、細胞接着因子 E-cadherin と Hippo pathway の關連性は桑実期以降の組織分化でのみ言及されている (Nishioka ら 2009)。しかし、本研究結果からブタ胚では、桑実期への発生に Hippo pathway が重要な可能性が高いことが示され、第 3 章の考察でも述べたように、LATS2 および AMOT を含む Hippo pathway が E-cadherin などの細胞接着因子に作用し、桑実期へのコンパクションに貢獻していることが考えられる。

マウス胚において、*Amot* 遺伝子を欠損もしくは発現抑制すると、ICM において Yap1 核内移行が増加し、*Cdx2* 発現細胞が増加する (Hirate ら 2013; Leung と Zernicka-Goetz 2013)。これに伴って、ICM の制御因子である *Oct-4* や *Sox2* の発現量が減少し、正常な ICM が形成されない (Leung と Zernicka-Goetz 2013)。しかし、本研究では、*AMOT* 発現を抑制したブタ胚においては、*OCT-4* と *SOX2* の発現に変化は認められなかった。*Amot* はマウス胚において組織分化に重要な役割を担うことが示されているが、一方で *Amotl2* にも *Amot* と同様に Hippo pathway 促進の機能があることが明らかになっている (Hirate ら 2013; Leung と Zernicka-Goetz 2013)。また、*Amotl2* を発現した *Amot* 遺伝子欠損胚と比較して *Amotl2* 発現を抑制した *Amot* 遺伝子欠損胚の方が、Hippo pathway 活性をより効果的に抑制することが示されている (Hirate ら 2013; Leung と Zernicka-Goetz 2013)。本研究において、ブタ胚は *AMOT* だけでなく *AMOTL1* および *AMOTL2* を発現しており、*AMOT* の発現を抑制した場合においても、*AMOT* の機能が *AMOTL1* と *AMOTL2* によって補完されていることが考えられる。今後は、*AMOTL1* および *AMOTL2* の機能解析を行い、それら結果を統合することで、*AMOT* と胚の組織分化との關連性について検討する

必要がある。

本研究により、ブタ胚における *AMOT* 関連因子の発現動態が初めて明らかになった。また、ブタ胚の初期発生において *AMOT* は桑実期以降の発生に必須の遺伝子であることが明らかとなった。しかし、*AMOT* と組織分化の関連性は明らかになっておらず、他の *AMOT* 関連因子の機能解析が今後の課題である。

5. 要約

マウス胚において Hippo pathway 関連因子である Amot は ICM 形成に重要な役割を持つことが明らかになっている。本研究では、ブタ卵子および初期胚における *AMOT* 関連因子の発現動態と、その役割を明らかにするために、RNA 干渉法を用いた *AMOT* の発現抑制を行った。さらに、*AMOT* 発現抑制胚における組織分化関連因子の遺伝子発現を検討した。

ブタにおいて *AMOT* mRNA 発現量は、桑実期において卵子および 1-細胞期と比較して有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。*AMOTL1* mRNA 発現量は、8-~16-細胞期以降において、それ以前の発生段階と比較して、有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。*AMOTL2* mRNA では、BC 期において、卵子から 8-~16-細胞期の発現量と比較して有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。ブタ胚における *AMOT* 発現抑制は 16-細胞期以上までの発生率に影響をおよぼさなかったものの、桑実期への発生率および Day 6 における EBC 期以上への発生率においては、*AMOT* siRNA 注入区が Control siRNA 注入区と比較して有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。OCT-4 および SOX2 発現に関しては、mRNA 発現量およびタンパク質核内陽性細胞率ともに *AMOT* 発現抑制による差は認められなかった。

本研究の結果から *AMOT* はブタ初期胚の発生に必須の因子であることが示された。

第7章

総括

哺乳動物の胚は、その発生過程において、特定の時期に特定の細胞が分化することによって、様々な器官を作り上げる。初期胚の ICM/TE 形成は胚に起こる初めての組織分化であり、器官形成の起点となる重要な現象である。よって ICM/TE 分化の制御機構の解明は哺乳動物における胚発生の高度な理解に大変重要である。マウス胚の ICM 形成には、桑実期における内側細胞での Hippo pathway が重要な役割を果たす。Hippo pathway が機能している内側細胞では、Lats1/2 によって Yap1 がリン酸化され、リン酸化 Yap1 は核内へ移行できなくなる (Hirate ら 2013 ; Lorthongpanich ら 2013 ; Nishioka ら 2009)。そのため Yap1 は、核内に存在する Tead4 に結合できず、Tead4 の活性化が生じないため、下流の TE マーカーである *Cdx2* や *Gata3* の転写が起こらない (Home ら 2012 ; Menchero ら 2009 ; Nishioka ら 2009 ; Nishioka ら 2008 ; Ralston ら 2010 ; Rayon ら 2014 ; Wicklow ら 2014 ; Wu ら 2010 ; Yagi ら 2007)。その結果、細胞の未分化性を維持する Oct-4 や Sox2 といった因子が優位に発現し、ICM 形成が誘導される (Avilion ら 2003 ; Frum ら 2018 ; Lorthongpanich ら 2013 ; Nichols ら 1998 ; Wicklow ら 2014 ; Yu ら 2016)。本研究では、これまで明らかではなかったブタ胚における *LATS2* の発現動態を明らかにし、*LATS2* 発現抑制によって胚の *OCT-4* および *SOX2* 発現量が減少することを明らかにした。このことから、ブタ胚においてもマウスと同様に Hippo pathway が ICM 形成に重要であることを初めて明示した。また一方で、*LATS2* の発現抑制は桑実期への発生を阻害したことから、ブタ胚では、桑実期までの発生においても Hippo pathway が寄与している可能性を示した。

マウス桑実期胚の外側細胞では、Hippo pathway が抑制されており、Yap1 のリン酸化修飾が起こらない (Hirate ら 2013 ; Lorthongpanich ら 2013 ; Nishioka ら 2009)。このため、Yap1 は核内に移行し、Tead4 と複合体を形成す

ることで、*Cdx2* や *Gata3* 発現を促進し、細胞を TE 分化へと導く (Home ら 2012 ; Menchero ら 2009 ; Nishioka ら 2009 ; Nishioka ら 2008 ; Ralston ら 2010 ; Rayon ら 2014 ; Wicklow ら 2014 ; Wu ら 2010 ; Yagi ら 2007)。本研究では、ブタ胚の *TEAD4* 発現抑制が EBC 期以上への発生を阻害することを明確に実証した。さらに、ブタ胚において、TEAD4-YAP1 複合体形成阻害剤を受精後から桑実期胚形成前までの期間 IVC 培地に添加すると、*LATS2* 発現抑制の結果と類似して、桑実期への発生が阻害された。この結果は、ブタ胚では Hippo pathway による TEAD4-YAP1 複合体形成の制御が桑実期胚以前に機能している可能性を示している。一方で、桑実期胚形成以降に阻害剤を添加した場合には、BC 期胚の拡張が阻害され、*CDX2* および *GATA3* 発現量が減少した。この結果は、ブタ胚でも TEAD4-YAP1 複合体が *CDX2* や *GATA3* といった TE 制御因子の発現制御を介して TE 分化に寄与していることを示す。

マウス胚の TE 分化制御には細胞極性が重要である。マウス桑実期胚において将来 TE へ分化する外側細胞は、細胞極性を有する (Johnson と McConnell 2004)。この細胞極性は Par-aPKC 複合体が細胞内の頂端側、すなわち外側細胞膜に局在することでもたらされており、内側細胞ではこのような細胞極性は認められない (Pauken と Capco 2000 ; Plusa ら 2005 ; Vinot ら 2005 ; Zhu ら 2017)。そして外側細胞では、細胞極性によって、Hippo pathway が抑制され、TE 分化が引き起こされる (Alarcon 2010 ; Cao ら 2015 ; Hirate ら 2015 ; Hirate ら 2013 ; Plusa ら 2005)。本研究では、ブタ胚において Par-aPKC 複合体の構成因子である *PARD6B* の発現解析を行い、ブタ胚では細胞極性が 8-細胞期から生じることを示唆した。さらに、*PARD6B* 発現の抑制によってブタ胚においてもマウス胚と同様に細胞極性が BC 期への発生に重要な役割を果たすことを明らかにした。また、*PARD6B* 発現抑制胚では、YAP 1 の核内移行が減

少したことから、細胞極性が Hippo pathway を抑制的に制御することで TE 分化に貢献している可能性を示した。本研究では、細胞極性関連因子として PARD6B のみの機能解析を行ったが、マウスでは Pard6b の他に Pard3 と Prkcz/i が Par-aPKC 複合体構成因子として同定されており、本研究においてブタ胚でもこれら因子の発現が確認された。したがって、ブタ胚でも PARD3 および PRKCZ/I が PARD6B と共同して組織分化を制御している可能性が考えられる。今後の課題として、他の Par-aPKC 複合体構成因子の機能解析を実施し、細胞極性と組織分化の関係性に関する考察の深化を図る必要がある。

マウス胚を用いた研究から、細胞極性と Hippo pathway を介在する因子として Amot が同定された。Amot は Hippo pathway 関連因子の一つであり、細胞接着因子および Lats1/2 などと共同して Hippo pathway を促進する (Hirate ら 2013; Lorthongpanich ら 2013; Nishioka ら 2009)。よって、マウス桑実期胚の内側細胞において Amot は、細胞接着因子に作用するため、細胞膜全体に均一に局在する (Hirate ら 2013; Mihajlovic と Bruce 2016; Leung と Zernicka-Goetz 2013; Shi ら 2017)。その一方で、外側細胞における Amot は、細胞極性による制御の下、頂端側の細胞膜にのみ局在する (Hirate ら 2013; Mihajlovic と Bruce 2016; Leung と Zernicka-Goetz 2013; Shi ら 2017)。外側細胞の頂端側部位は、近隣の細胞との接着がない外側細胞膜の部分にあたり、この部位に Amot が捕捉されることで、細胞接着因子へ作用することができず、外側細胞では Hippo pathway が機能しない (Hirate ら 2013; Leung と Zernicka-Goetz 2013)。本研究によって、ブタ胚においても AMOT 関連因子が発現していることが初めて示された。さらに本研究では、AMOT の発現抑制を行うことで AMOT がブタ胚の BC 期胚形成に必須であることを明らかにした。しかしながら、AMOT の発現抑制は、OCT-4 および SOX2 など組織分化制御因子の発現動

態に影響をおよぼさなかった。この結果は、AMOTL1 や AMOTL2 といった他の AMOT 関連因子が AMOT の機能を補完している可能性を示す。今後、AMOTL1 および AMOTL2 の機能解析を通して、ブタ胚における AMOT と組織分化との関係をより詳細に明らかにすることが必要である。

本研究によって、これまで不明であったブタ胚の組織分化を制御する分子基盤が明らかとなった。その概略を Fig. 25 に示した。これまで哺乳動物初期胚の組織分化を制御する仕組みは主にマウス胚を用いて研究が進められてきた。しかし、マウスとブタでは、着床様式および胎盤の形態が大きく異なり、ICM/TE 分化の制御メカニズムも異なる部分があると考えられていた。本研究を通して得られた結果は、その違いを初めて明確にただけでなく、ブタ胚独自の組織分化の機構にとって極めて有用な知見であり、今後、ブタ胚を含め哺乳動物のさらに詳細な組織分化の分子メカニズムを理解する上で、重要な基盤となる。

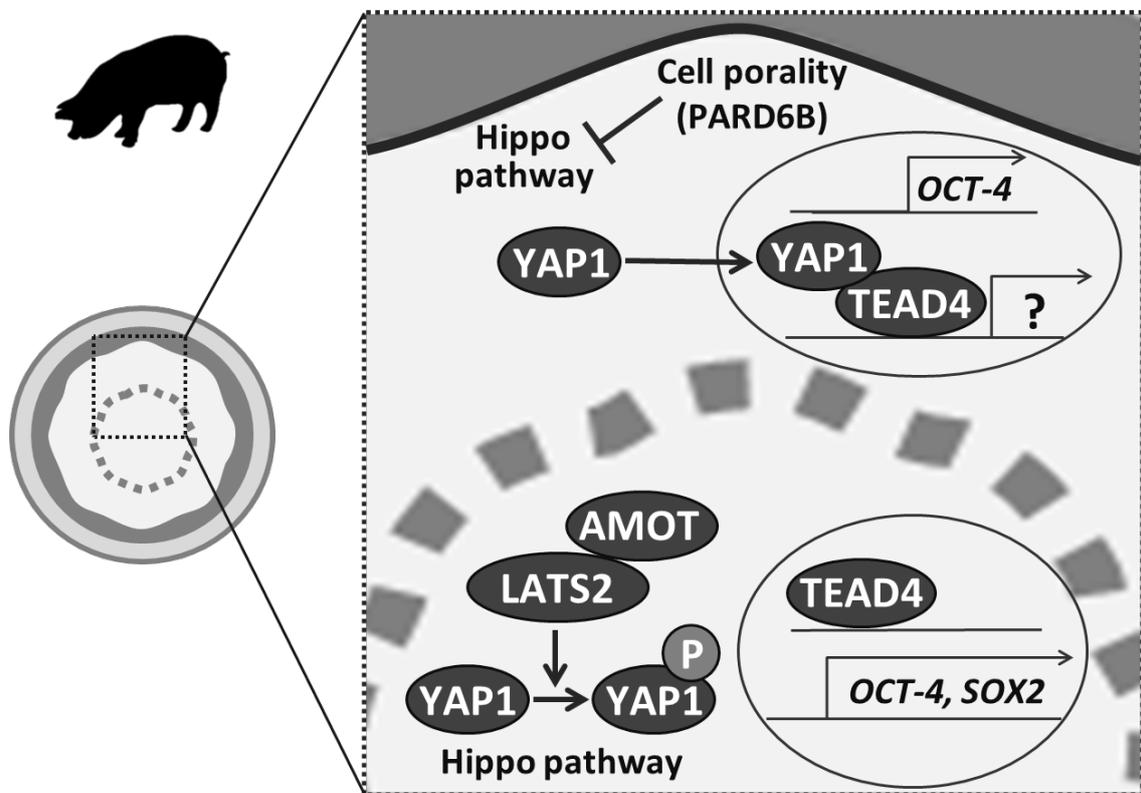


Figure 25. Schematic model of molecular mechanisms for ICM/TE differentiation in porcine preimplantation embryos.

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜った主指導教員の岩手大学農学部 澤井 健 教授に深く感謝致します。また御校閲および御助言を賜った副指導教員の岩手大学農学部 平田 統一 准教授並びに山形大学農学部 木村 直子 教授に深く感謝致します。また、審査委員として貴重な御助言をいただいた帯広畜産大学畜産学部 手塚 雅文 教授に深く感謝致します。

また、本研究を遂行するにあたり種々の御協力を頂いた動物生殖工学研究室の皆様にも深く感謝致します。

本研究は、日本学術振興会特別研究員制度の支援を受けて遂行しました。

引用文献

- Ajduk, A. and Zernicka-Goetz, M. (2016). Polarity and cell division orientation in the cleavage embryo: from worm to human. *Mol Hum Reprod* 22, 691-703.
- Alarcon, V. B. (2010). Cell polarity regulator PARD6B is essential for trophectoderm formation in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 83, 347-358.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N. and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17, 126-140.
- Bou, G., Liu, S., Sun, M., Zhu, J., Xue, B., Guo, J., Zhao, Y., Qu, B., Weng, X., Wei, Y., Lei, L. and Liu, Z. (2017). CDX2 is essential for cell proliferation and polarity in porcine blastocysts. *Development* 144, 1296-1306.
- Brussow, K. P., Torner, H., Kanitz, W. and Ratky, J. (2000). In vitro technologies related to pig embryo transfer. *Reprod Nutr Dev* 40, 469-480.
- Cao, Z., Carey, T. S., Ganguly, A., Wilson, C. A., Paul, S. and Knott, J. G. (2015). Transcription factor AP-2gamma induces early Cdx2 expression and represses HIPPO signaling to specify the trophectoderm lineage. *Development* 142, 1606-1615.
- Chen, L., Yabuuchi, A., Eminli, S., Takeuchi, A., Lu, C. W., Hochedlinger, K. and Daley, G. Q. (2009). Cross-regulation of the Nanog and Cdx2 promoters. *Cell Res* 19, 1052-1061.
- Ducibella, T. (1980). Divalent antibodies to mouse embryonal carcinoma cells inhibit compaction in the mouse embryo. *Dev Biol* 79, 356-366.

- Ducibella, T. and Anderson, E. (1975). Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev Biol* 47, 45-58.
- 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.
- Frum, T., Murphy, T. M. and Ralston, A. (2018). HIPPO signaling resolves embryonic cell fate conflicts during establishment of pluripotency in vivo. *Elife* 7.
- Fujii, T., Sakurai, N., Osaki, T., Iwagami, G., Hirayama, H., Minamihashi, A., Hashizume, T. and Sawai, K. Changes in the expression patterns of the genes involved in the segregation and function of inner cell mass and trophoctoderm lineages during porcine preimplantation development. (2013). *J Reprod Dev* 59, 151-158.
- Gandhi, A. P., Lane, M., Gardner, D. K. and Krisher, R. L. (2001). Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential culture media. *Mol Reprod Dev* 58, 269-275.
- Gao, Y., Liu, X., Tang, B., Li, C., Kou, Z., Li, L., Liu, W., Wu, Y., Kou, X., Li, J., Zhao, Y., Yin, J., Wang, H., Chen, S., Liao, L. and Gao, S. (2017). Protein Expression Landscape of Mouse Embryos during Pre-implantation Development. *Cell Rep* 21, 3957-3969.
- Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K., Kiyonari, H., Niwa, H. and Sasaki, H. (2015). Par-aPKC-dependent and -independent mechanisms cooperatively control cell polarity, Hippo signaling, and cell positioning in 16-cell stage mouse

- embryos. *Dev Growth Differ* 57, 544-556.
- Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K., Suzuki, A., Alarcon, V. B., Akimoto, K., Hirai, T., Hara, T., Adachi, M., Chida, K., Ohno, S., Marikawa, Y., Nakao, K., Shimono, A. and Sasaki, H. (2013). Polarity-dependent distribution of angiotensin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr Biol* 23, 1181-1194.
- Home, P., Saha, B., Ray, S., Dutta, D., Gunewardena, S., Yoo, B., Pal, A., Vivian, J. L., Larson, M., Petroff, M., Gallagher, P. G., Schulz, V. P., White, K. L., Golos, T. G., Behr, B. and Paul, S. (2012). Altered subcellular localization of transcription factor TEAD4 regulates first mammalian cell lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 7362-7367.
- Houghton, F. D. (2006). Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation* 74, 11-18.
- Johnson, M. H. and McConnell, J. M. (2004). Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 15, 583-597.
- Kaneko, K. J. and DePamphilis, M. L. (2013). TEAD4 establishes the energy homeostasis essential for blastocoel formation. *Development* 140, 3680-3690.
- Kikuchi, K., Onishi, A., Kashiwazaki, N., Iwamoto, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Akita, T. and Nagai, T. (2002). Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system. *Biol Reprod* 66, 1033-1041.
- Kumar, R. P., Ray, S., Home, P., Saha, B., Bhattacharya, B., Wilkins, H. M., Chavan, H., Ganguly, A., Milano-Foster, J., Paul, A., Krishnamurthy, P., Swerdlow, R. H. and Paul, S. (2018). Regulation of energy metabolism during early

- mammalian development: TEAD4 controls mitochondrial transcription. *Development* 145.
- Kwon, J., Seong, M. J., Piao, X., Jo, Y. J. and Kim, N. H. (2020). LIMK1/2 is required for actin filament and cell junction assembly in porcine embryos developing in vitro. *Asian-Australas J Anim Sci*, in press.
- Leung, C. Y. and Zernicka-Goetz, M. (2013). Angiotensin prevents pluripotent lineage differentiation in mouse embryos via Hippo pathway-dependent and -independent mechanisms. *Nat Commun* 4, 2251.
- Liu-Chittenden, Y., Huang, B., Shim, J. S., Chen, Q., Lee, S. J., Anders, R. A., Liu, J. O. and Pan, D. (2012). Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev* 26, 1300-1305.
- Liu, S., Bou, G., Sun, R., Guo, S., Xue, B., Wei, R., Cooney, A. J. and Liu, Z. (2015). Sox2 is the faithful marker for pluripotency in pig: evidence from embryonic studies. *Dev Dyn* 244, 619-627.
- Lorthongpanich, C., Messerschmidt, D. M., Chan, S. W., Hong, W., Knowles, B. B. and Solter, D. (2013). Temporal reduction of LATS kinases in the early preimplantation embryo prevents ICM lineage differentiation. *Genes Dev* 27, 1441-1446.
- Menchero, S., Rollan, I., Lopez-Izquierdo, A., Andreu, M. J., Sainz de Aja, J., Kang, M., Adan, J., Benedito, R., Rayon, T., Hadjantonakis, A. K. and Manzanares, M. (2019). Transitions in cell potency during early mouse development are driven by Notch. *Elife* 8.
- Mihajlovic, A. I. and Bruce, A. W. (2016). Rho-associated protein kinase regulates

- subcellular localisation of Angiotensin and Hippo-signalling during preimplantation mouse embryo development. *Reprod Biomed Online* 33, 381-390.
- Mui, K. L., Chen, C. S. and Assoian, R. K. (2016). The mechanical regulation of integrin-cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces. *J Cell Sci* 129, 1093-1100.
- Nardone, G., Oliver-De La Cruz, J., Vrbsky, J., Martini, C., Pribyl, J., Skladal, P., Pesl, M., Caluori, G., Pagliari, S., Martino, F., Maceckova, Z., Hajdich, M., Sanz-Garcia, A., Pugno, N. M., Stokin, G. B. and Forte, G. (2017). YAP regulates cell mechanics by controlling focal adhesion assembly. *Nat Commun* 8, 15321.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H. and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391.
- Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R. O., Ogonuki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-Kensicki, E. M., Nojima, H., Rossant, J., Nakao, K., Niwa, H. and Sasaki, H. (2009). The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell* 16, 398-410.
- Nishioka, N., Yamamoto, S., Kiyonari, H., Sato, H., Sawada, A., Ota, M., Nakao, K. and Sasaki, H. (2008). Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev* 125, 270-283.

- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R. and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation. *Cell* 123, 917-929.
- Ohno, S. (2001). Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 13, 641-648.
- Ota, M. and Sasaki, H. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. (2008). *Development* 135, 4059-4069.
- Pauken, C. M. and Capco, D. G. (2000). The expression and stage-specific localization of protein kinase C isoforms during mouse preimplantation development. *Dev Biol* 223, 411-421.
- Pedersen, R. A., Wu, K. and Balakier, H. (1986). Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection. *Dev Biol* 117, 581-595.
- Petters, R. M. and Wells, K. D. (1993). Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 48, 61-73.
- Plusa, B., Frankenberg, S., Chalmers, A., Hadjantonakis, A. K., Moore, C. A., Papalopulu, N., Papaioannou, V. E., Glover, D. M. and Zernicka-Goetz, M. (2005). Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Sci* 118, 505-515.
- Ralston, A., Cox, B. J., Nishioka, N., Sasaki, H., Chea, E., Rugg-Gunn, P., Guo, G., Robson, P., Draper, J. S. and Rossant, J. Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. (2010).

- Development 137, 395-403.
- Ralston, A. and Rossant, J. (2008). Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev Biol* 313, 614-629.
- Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N. and Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 746-759.
- Rayon, T., Menchero, S., Nieto, A., Xenopoulos, P., Crespo, M., Cockburn, K., Canon, S., Sasaki, H., Hadjantonakis, A. K., de la Pompa, J. L., Rossant, J. and Manzanares, M. (2014). Notch and hippo converge on Cdx2 to specify the trophectoderm lineage in the mouse blastocyst. *Dev Cell* 30, 410-422.
- 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. *J Reprod Dev* 59, 353-360.
- Shen, J., Cao, B., Wang, Y., Ma, C., Zeng, Z., Liu, L., Li, X., Tao, D., Gong, J. and Xie, D. (2018). Hippo component YAP promotes focal adhesion and tumour aggressiveness via transcriptionally activating THBS1/FAK signalling in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 37, 175.
- Shi, X., Yin, Z., Ling, B., Wang, L., Liu, C., Ruan, X., Zhang, W. and Chen, L. (2017). Rho differentially regulates the Hippo pathway by modulating the interaction between Amot and Nf2 in the blastocyst. *Development* 144, 3957-3967.
- Stephenson, R. O., Yamanaka, Y. and Rossant, J. (2010). Disorganized epithelial polarity and excess trophectoderm cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin. *Development* 137, 3383-3391.

- Strumpf, D., Mao, C. A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F. and Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 132, 2093-2102.
- Swain, J. E., Bormann, C. L., Clark, S. G., Walters, E. M., Wheeler, M. B. and Krisher, R. L. (2002). Use of energy substrates by various stage preimplantation pig embryos produced in vivo and in vitro. *Reproduction* 123, 253-260.
- Trimarchi, J. R., Liu, L., Porterfield, D. M., Smith, P. J. and Keefe, D. L. (2000). Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 62, 1866-1874.
- Vassilev, A., Kaneko, K. J., Shu, H., Zhao, Y. and DePamphilis, M. L. (2001). TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev* 15, 1229-1241.
- Vinot, S., Le, T., Ohno, S., Pawson, T., Maro, B. and Louvet-Vallee, S. (2005). Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Dev Biol* 282, 307-319.
- Wang, Q. T., Piotrowska, K., Ciemerych, M. A., Milenkovic, L., Scott, M. P., Davis, R. W. and Zernicka-Goetz, M. (2004). A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Dev Cell* 6, 133-144.
- Wang, Y., Li, J., Gao, Y., Luo, Y., Luo, H., Wang, L., Yi, Y., Yuan, Z. and Jim Xiao,

- Z. X. (2019). Hippo kinases regulate cell junctions to inhibit tumor metastasis in response to oxidative stress. *Redox Biol* 26, 101233.
- Watanabe, Y., Miyasaka, K. Y., Kubo, A., Kida, Y. S., Nakagawa, O., Hirate, Y., Sasaki, H. and Ogura, T. (2017). Notch and Hippo signaling converge on Strawberry Notch 1 (Sbno1) to synergistically activate Cdx2 during specification of the trophectoderm. *Sci Rep* 7, 46135.
- Wicklow, E., Blij, S., Frum, T., Hirate, Y., Lang, R. A., Sasaki, H. and Ralston, A. (2014). HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst. *PLoS Genet* 10, e1004618.
- Wu, G., Gentile, L., Fuchikami, T., Sutter, J., Psathaki, K., Esteves, T. C., Arauzo-Bravo, M. J., Ortmeier, C., Verberk, G., Abe, K. and Scholer, H. R. (2010). Initiation of trophectoderm lineage specification in mouse embryos is independent of Cdx2. *Development* 137, 4159-4169.
- Yagi, R., Kohn, M. J., Karavanova, I., Kaneko, K. J., Vullhorst, D., DePamphilis, M. L. and Buonanno, A. (2007). Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 134, 3827-3836.
- Yamanaka, Y., Ralston, A., Stephenson, R. O. and Rossant, J. (2006). Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* 235, 2301-2314.
- Yoshioka, K., Suzuki, C. and Onishi, A. (2008). Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium. *J Reprod Dev* 54, 208-213.
- Yu, C., Ji, S. Y., Dang, Y. J., Sha, Q. Q., Yuan, Y. F., Zhou, J. J., Yan, L. Y., Qiao, J., Tang, F. and Fan, H. Y. (2016). Oocyte-expressed yes-associated protein is a

- key activator of the early zygotic genome in mouse. *Cell Res* 26, 275-287.
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z. C. and Guan, K. L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 21, 2747-2761.
- Zhu, M., Leung, C. Y., Shahbazi, M. N. and Zernicka-Goetz, M. (2017). Actomyosin polarisation through PLC-PKC triggers symmetry breaking of the mouse embryo. *Nat Commun* 8, 921.
- 江村 菜津子. (2018). ブタ初期胚における TEAD4 および YAP1 の機能に関する研究. 岩手大学大学院農学研究科 修士論文.
- 三浦 瑠璃. (2019). SOX2 がブタ胚の初期発生および組織分化におよぼす影響. 岩手大学農学部 卒業論文.