

ウシ着床前期胚の栄養膜細胞における遺伝子発現動態

生物資源科学専攻 家畜生産生物学講座 家畜改良増殖学 定 郁里

1. はじめに

栄養膜細胞 (TE) とは, 胚盤胞期における胚の外側に位置し, 将来主に胎盤組織へと分化する細胞であり, 母体への着床に重要な役割を担う。ウシ等の反芻類における胚には着床前に TE が子宮角に沿って細長く伸びる伸長期という特有の時期が存在する。しかし, この伸長現象に関する詳細な分子機構は未だ解明されていない。過去にウシ伸長期胚における発現解析の研究報告はあるが, 胚全体を対象とした大まかな解析のみであった。そこで本研究では, 着床前期胚における TE の分子機構の解明を目的に, まず TE のみに解析部位を限定した伸長期および胚盤胞期におけるトランスクリプトーム解析を行った。次に, 1つ目の実験結果および当研究室の過去の報告を踏まえウシ胚 TE において重要な機能を有すると考察された *CTGF* について着目し, 初期胚発生における機能および動態について解析した。

2. 方法

1) **RNA-seq による伸長期 TE および胚盤胞期 TE のトランスクリプトーム解析** 人工授精後 14 日目の伸長期胚と体外受精後 7-8 日目の胚盤胞期胚を顕微鏡下でマイクロブレードにて TE のみのサンプルを分取し, RNA 抽出後ライブラリー調製を行い実験に供した。データ解析には CLC genomics workbench (CLC Bio 社) を用いてアノテーション解析を行い, ステージ間での発現パターンを比較し, 伸長期にかけて起こる転写動態の変化を明らかにした。

2) ***CTGF* ノックダウン (KD) による初期胚発生への影響** RNAi を利用した KD 法のなかで継続的に siRNA 合成が見込める shRNA 発現ベクターを用いた KD 法を行った。体外受精 15 時間後の胚に, インサートなしのベクターを導入した区 (空ベクター区), *CTGF*-shRNA 発現ベクターを導入した区 (KD 区) の 2 区を設けた。KD 区の胚盤胞期における *CTGF* の発現レベルを qPCR により解析し, 2 区間の発生率を比較した。

3. 結果と考察

1) 本実験で検出された 19,486 遺伝子の中で胚盤胞期から伸長期にかけて 3 倍以上発現が増加した遺伝子は 453 個, 低下した遺伝子は 1,518 個であった。アノテーション解析の結果, 有意差が認められた生物学的機能カテゴリー (GO term) は 1 項目のみであった ($P < 0.01$)。過去の TE 特異候補因子の一つである *CTGF* が伸長期にかけて発現量が上昇することがわかった。本実験で胚盤胞期から伸長期かけての TE での遺伝子発現動態が明らかになった。

2) KD 区の胚盤胞期胚における *CTGF* の発現レベルは低下した ($P < 0.1$)。空ベクター区と比較して KD 区では胚盤胞期直前の桑実期での発生率が有意に低下した ($P < 0.05$)。本実験で *CTGF* は胚盤胞期までの発生においても重要な役割を担っている可能性が示された。

4. 結論

結合組織成長因子 *CTGF* は胚盤胞期までの初期胚発生において重要な役割を担っていることが示唆された。