

ウシ胚盤胞期における割球の位置と細胞分化制御の関連

生物資源科学専攻 家畜生産生物学講座 家畜改良増殖学分野 郡 七海

【背景と目的】受精卵移植に供される胚盤胞期までの発生の効率化を図ることは人工的な繁殖手段がとられるウシ生産において極めて重要である。そのために、ウシ胚が胚盤胞期に達するまでの発生メカニズムを精査することが必要となる。哺乳類の発生において、栄養外胚葉 (TE) および内部細胞塊 (ICM) への分化は最初に起こる細胞系列の分化イベントである。マウス胚では、割球の位置による TE/ICM への分化が調節されている内外モデルが近年注目されている。これは、卵割の結果として三次元構造を構築した桑実期胚以降の胚において、内側と外側の位置関係がその後の細胞分化を決定するというモデルである。しかし、マウス以外の種では割球の位置関係が細胞分化を制御して胚盤胞形成に関わるという確たる知見が無いのが現状である。本研究では、ウシ胚の割球の位置関係が胚盤胞期における TE 細胞系列の分化に影響するかどうか、そして、確立した細胞分化系列において ICM 特異的発現を示す *CIITA* および *NASP* についてウシ初期胚発生での役割を検証し、割球の位置と細胞分化制御の関連について調べた。

【方法】体外受精および体外培養により作出したウシ胚盤胞期胚を界面活性剤処理して TE 細胞を破壊、除去した単離 ICM を用意し、さらに1日間の体外培養を継続して胞胚腔再形成の有無および形成率について調べた。加えて、培養6.5日目の初期胚盤胞期と8日目の拡張胚盤胞期における再形成率を比較した。再形成胚については、TE 細胞マーカー *CDX2* の免疫染色を行った。次に、初期胚2-4細胞期、8-16細胞期、桑実期、胚盤胞期において、*CIITA* mRNA の発現動態を検証するために定量PCRを行った。さらに、卵母細胞GV期、MII期、初期胚1、2、4、8細胞期、桑実期、胚盤胞期において *CIITA* タンパク質について免疫染色を実施した。最後に、RNA干渉による *NASP* 発現抑制胚の ICM および TE 細胞構成比を二重染色により調べた。

【結果および考察】単離 ICM は、継続培養1日目で胞胚腔の再形成が観察された。その再形成率は、拡張胚盤胞期胚と比べて初期胚盤胞期胚において有意に高かった ($P < 0.01$)。TE 細胞のマーカー *CDX2* は再形成胚で対照区同様に外層の割球核に蛍光シグナルが観察され、ICM から TE が再出現したことが裏付けられた。以上の結果から、ウシ胚でもマウス胚同様に割球の位置関係が TE 細胞分化に関与していることが示唆された。さらに、ウシ胚の ICM で発現を示す *CIITA* は全ステージで発現していることが確認された。また、*CIITA* タンパク質は胚の内層の割球において蛍光シグナルが観察され、mRNA の発現動態と同様であった。加えて、*NASP* 遺伝子発現抑制胚において ICM/TE 細胞構成比を調べたところ、*NASP* 発現抑制により ICM 細胞比が有意に減少しており ($P < 0.05$)、*NASP* 遺伝子発現が ICM 細胞増殖に必要であることが示唆された。

【結論】本研究により、ウシ胚の胚盤胞期までの発生において、割球の位置関係が細胞分化制御に関与していることが示された。