



Title	マウス着床前胚のエピブラスト形成過程において胞胚腔の拡大とAMOTの分解は協調してYAPの核局在化を促進する
Author(s)	前田, 日向子
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/98699
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

マウス着床前胚のエピブラスト形成過程において
胞胚腔の拡大と AMOT の分解は協調して YAP の核局在化を促進する

Blastocoel expansion and AMOT degradation cooperatively promote YAP
nuclear localization during epiblast formation
in preimplantation embryos

前田 日向子

大阪大学大学院 生命機能研究科 生命機能専攻
個体機能学講座 初期胚発生研究室（佐々木洋研究室）

2024 年(令和 6 年) 9 月修了

Abstract

Epiblast is a pluripotent cell population that generates all somatic and germ cells and is produced in the late blastocyst stage of preimplantation embryos. Epiblast is formed through two steps of cell differentiation. The blastomeres first differentiate into trophectoderm and inner cell mass (ICM), forming an early blastocyst. Then, ICM cells differentiate into epiblast and primitive endoderm by the late blastocyst stage. Hippo signaling and its downstream coactivator protein YAP play pivotal roles in both differentiation processes. In the first differentiation, cytoplasmic localization of YAP promotes ICM fate, while in the second differentiation, nuclear localization of YAP supports epiblast formation. The mechanisms which alter YAP localization in the ICM during the formation of the epiblast remain unknown. Here, we revealed the involvement of two mechanisms. Blastocoel expansion correlates with the increase of nuclear YAP signals, and manipulation of blastocoel size altered nuclear YAP levels. Expansion of blastocoel reduced YAP phosphorylation through the increase of cytoplasmic F-actin. In parallel with this mechanism, YAP is also regulated by cell differentiation. Expression of a junctional Hippo component, AMOT, is gradually reduced during epiblast formation via a trankylase-mediated mechanism. SOX2 expression in the early ICM is required for downregulation of AMOT and YAP phosphorylation. Upregulation of AMOT levels increased YAP phosphorylation and reduced nuclear YAP. Taken together, the two mechanisms of blastocoel–F-actin and SOX2–AMOT axes cooperatively suppress the phosphorylation of YAP to promote YAP nuclear localization during epiblast formation. The cooperation of the two different mechanisms likely contributes to the robustness of epiblast cell differentiation.

要旨

エピブラストは、すべての体細胞と生殖細胞に分化する多能性細胞の集団であり、着床直前の後期胚盤胞で観察される。エピブラストは二段階の細胞分化を経て形成される。胚はまず、栄養外胚葉と内部細胞塊に分化し、初期胚盤胞を形成する。その後、内部細胞塊の細胞が後期胚盤胞までにエピブラストと原始内胚葉に分化する。Hippo シグナル伝達経路とその下流にある転写共役因子の YAP は、それぞれの分化過程で重要な役割を果たす。一段階目の細胞分化では YAP の細胞質局在が内部細胞塊の運命を促進し、二段階目の細胞分化では YAP の核局在がエピブラストの形成に寄与する。エピブラスト形成過程において、内部細胞塊における YAP の局在が変化するメカニズムは不明である。本研究では、2 つのメカニズムが関与していることを明らかにした。胞胚腔の拡大は核 YAP シグナルの増加と相関しており、胞胚腔のサイズを操作すると核 YAP レベルが変化した。胞胚腔の拡大は細胞質の F-アクチンの増加を介して YAP リン酸化を減少させた。このメカニズムと並行して、YAP は細胞の分化によっても制御される。細胞接着部位に存在し、Hippo シグナル伝達経路の構成要素である AMOT の発現は、タンキラーゼを介してエピブラスト形成過程で徐々に減少する。内部細胞塊における SOX2 の発現は、AMOT の発現抑制と YAP のリン酸化の減少に必要である。AMOT の発現を上昇させると YAP リン酸化は増加し、核 YAP シグナルが減少した。以上のことから、胞胚腔-細胞質 F-アクチンと SOX2-AMOT の 2 つのメカニズムが協調して YAP のリン酸化を抑制し、エピブラスト形成過程に YAP の核局在を促進する。この 2 つの異なるメカニズムの協調が、頑強なエピブラストへの細胞分化に寄与している可能性が高いと考えられる。

目次

Abstract	1
要旨	2
第 1 章 序論	6
1.1: エピブラスト	7
1.2: Hippo シグナル伝達経路	9
1.3: 一段階目の細胞分化と Hippo シグナル伝達経路	11
1.3.1: Inside-outside モデル	11
1.3.2: 細胞極性モデル	11
1.4: 二段階目の細胞分化と Hippo シグナル伝達経路	14
1.5: Mechanotransducer としての YAP	15
1.7: 本研究の目的と概略	15
第 2 章 材料と方法	17
2.1: マウス	17
2.2: 胚の採取と培養	17
2.3: sgRNA の設計と合成	17
2.4: エレクトロポレーション法によるマウス受精卵への遺伝子導入	18
2.5: 胞胚腔へのフロリナートインジェクション	18
2.6: 胞胚腔の縮小	19
2.7: 免疫蛍光染色と共焦点顕微鏡撮影	19
2.8: p-YAP 染色胚の固定	20
2.9: 画像解析	21
2.10: 細胞数の計測	21
2.11: 免疫蛍光染色画像からのシグナル強度の取得	21
2.12: 免疫蛍光染色画像からの球形度(Sphericity)の計算	24
2.13: 胞胚腔の体積の解析	24
2.14: XAV939 添加	24

2.15: 統計解析	25
第3章 結果	26
3.1: 胚盤胞期における YAP の細胞内局在とそれを基にしたステージ区分	26
3.2: 胞胚腔の拡大は内部細胞塊での YAP の核移行を促進する	29
3.2.1: 発生に伴う胞胚腔の拡大は核 YAP シグナルの増加と相関する	29
3.2.2: 胞胚腔を実験的に拡大させると核 YAP シグナルが増加する	31
3.2.3: 胞胚腔を実験的に縮小させると核 YAP シグナルが減少する	34
3.3: 核形態の扁平化は YAP の核移行への関与が低い	36
3.4: YAP の核移行には細胞質の F-アクチンが必要である	38
3.4.1: 中期胚盤胞において細胞質の F-アクチンシグナルは核 YAP シグナルの増加と相関する	38
3.4.2: 中期胚盤胞の細胞質の F-アクチンは繊維状の構造をとる	41
3.4.3: 胞胚腔を拡大すると細胞質の F-アクチンが増加する	43
3.5: 細胞質の F-アクチンを減少させると YAP の核移行が抑制される	44
3.5.1: <i>Lmna</i> KO 胚の作成	44
3.5.2: <i>Lmna</i> KO 胚はマウス着床前胚発生に影響がない	46
3.5.3: <i>Lmna</i> KO による細胞質 F-アクチンの減少は核 YAP シグナルを減少させる	48
3.6: タンキラーゼ依存的な AMOT の分解は YAP の核局在化を促進する	50
3.6.1: 胚盤胞期では p-YAP シグナルが次第に減少する	50
3.6.2: 胚盤胞期では AMOT の発現が次第に減少する	52
3.6.3: 中期胚盤胞における AMOT の分解抑制は YAP の核移行を阻害する	54
3.7: YAP の核移行には内部細胞塊における SOX2 の発現が必要である	57
3.7.1: <i>Sox2</i> KO 胚の作製	57
3.7.2: <i>Sox</i> KO 胚では AMOT の発現が維持され YAP の核移行が阻害される	59
3.8: 胞胚腔の拡大は AMOT を介した Hippo シグナル伝達経路とは無関係に YAP の局在制御に関与する	61
第4章 考察	64
4.1: 中期胚盤胞の YAP の核移行は2つの機構により促進される	64
4.2: 胚盤胞期のステージ区分の比較	66
4.3: 細胞質 F-アクチンと YAP 局在制御との関係性	66
4.4: 中期胚盤胞(後期)から細胞質 F-アクチンが減少するメカニズム	67

4.5: 中期胚盤胞での AMOT の減少は分解によるものである	67
4.6: 内部細胞塊での YAP 核移行レベルのばらつきを制御するメカニズム	67
4.7: 発生過程における力学的刺激の重要性	68
4.8: 本研究の意義	69
参考文献	70
業績	80
謝辞	81

第 1 章 序論

細胞分化は、個々の細胞が特定の機能を獲得する過程であり、生物の発生において極めて重要な現象である。その制御機構の解明は、生物学における主要な課題の一つである。これまでの研究により、細胞分化の制御に関わる転写制御因子やシグナル伝達経路が同定されてきた。しかし、これらの因子や経路が発生の複数の場面で繰り返し使用されるにもかかわらず、その詳細な制御メカニズムは未だ完全には解明されていない。例えば、Hippo シグナル伝達経路は、哺乳類の発生過程において胚盤胞形成(Nishioka et al. 2009)、エピブラストへの分化(Hashimoto and Sasaki. 2019)、肺の分枝形成(Lin et al. 2017)、尿細管形成(Reginensi et al. 2013)、上皮細胞の分化(Totaro et al. 2017)などに関与しており、各プロセスにおいて異なる役割を果たしている。それぞれの発生過程特異的な制御メカニズムについては、まだ十分に解明されていない。

細胞分化においては、分化を制御するシグナルが、正しいタイミングで、正しい強さで働くことが重要と考えられるが、各細胞分化において、シグナルの作用するタイミングや強さがどのように制御されているのかについては未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、着床前胚のエピブラスト形成過程において、それまで細胞質にあった Hippo シグナル伝達経路の因子である YAP が次第に核移行することが多能性因子の強い発現に必須であるという点に注目した。この YAP の核移行の仕組みを明らかにすることで、発生における細胞分化のシグナル伝達経路の制御機構の一端を解明できると考えた。

1.1: エピブラスト

エピブラストは、着床直前の後期胚盤胞に存在する多能性の組織である。後期胚盤胞は囊胞状の形態を示し、エピブラスト(epiblast: Epi)、原始内胚葉(primitive endoderm: PrE)、栄養外胚葉(trophectoderm: TE)の 3 種類の細胞から構成されており、胞胚腔(blastocoel)と呼ばれる内腔を持つ。エピブラストは多能性を有し、のちにすべての体細胞および生殖細胞へと分化する。一方、栄養外胚葉は胎盤に、原始内胚葉は卵黄嚢という胚体外組織を形成する。

エピブラストは二段階の細胞分化を経て形成される(Cockburn and Rossant, 2010; Rossant and Tam, 2009)。一段階目の分化は桑実胚から初期胚盤胞への分化段階であり、全能性を持つ割球のうち内側にある細胞が内部細胞塊(inner cell mass: ICM)へ、外側にある細胞が栄養外胚葉へと分化する。二段階目の分化では、初期胚盤胞から後期胚盤胞への分化段階で内部細胞塊が原始内胚葉とエピブラストへと分化する(図 1)(Reviews; Rossant and Tam, 2009 Marikawa and Alarcon, 2009; Sasaki, 2010; Chazaud and Yamanaka, 2016; Sutherland, 2016; Mihajlović and Bruce, 2017)。それぞれの細胞分化では Hippo シグナル伝達経路が関与する(Hashimoto and Sasaki, 2019; Nishioka et al. 2009)。

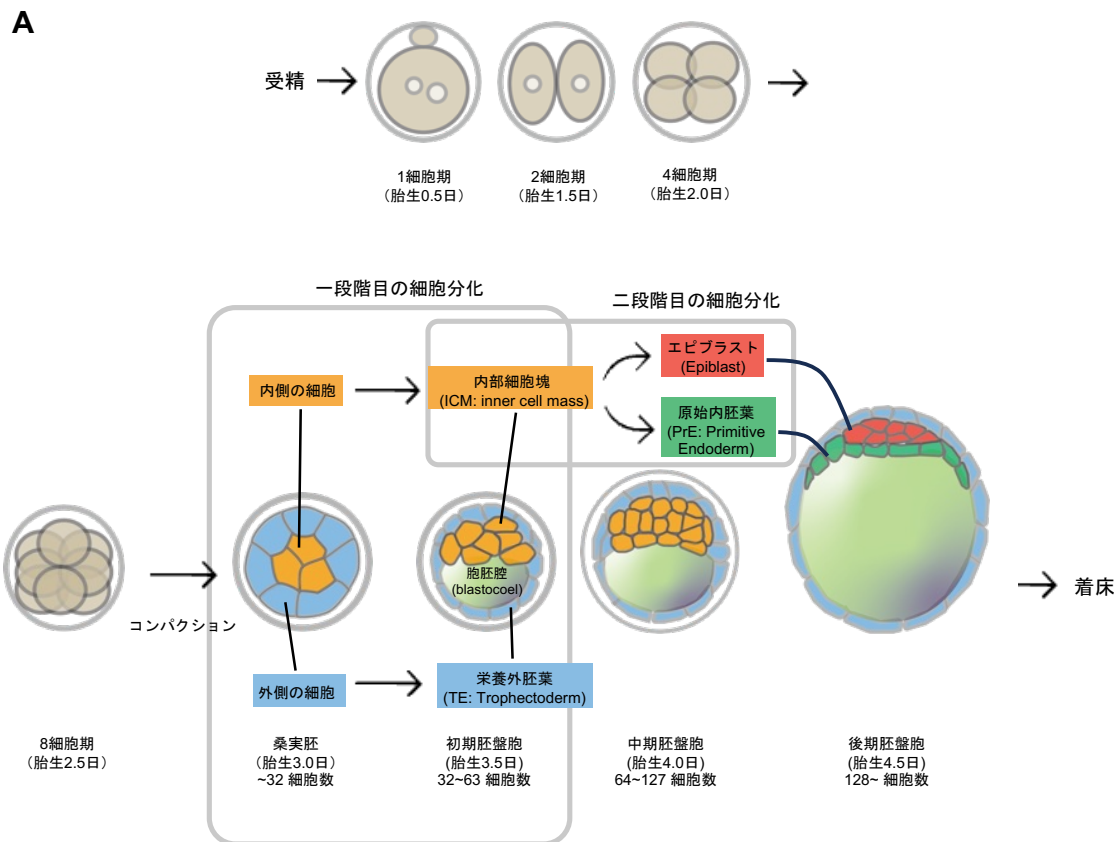


図 1 : マウス着床前胚発生のエピブラスト形成過程概要

(A) 卵管内で精子と卵子が受精してから子宮に着床する直前までの発生期間をマウス着床前胚発生と呼ぶ。胚の発生は受精後の経過時間によって表記され、このときの受精卵を胎生(Embryonic day: E) 0 日とする(Wang and Dey, 2006)。受精卵は分裂を繰り返し、2 細胞期胚(胎生 1.5 日)、4 細胞期胚(胎生 2.0 日)、8 細胞期胚(胎生 2.5 日)の段階を経る。コンパクションを起こした 8 細胞期胚は、さらに細胞分裂して桑実胚となる。桑実胚の内側の細胞は内部細胞塊に、外側の細胞は栄養外胚葉に分化する。このような着床前胚における最初の細胞分化を、一段階目の細胞分化と呼ぶ。栄養外胚葉と内部細胞塊への分化後、栄養外胚葉の細胞は胚の外側の環境から胚の内側に水を流入させ(Barcroft et al. 2003)、胞胚腔と呼ばれる内腔を形成する。このような胞胚腔を有した胚が胚盤胞であり、32 細胞期(胎生 3.5 日)から 128 細胞期(胎生 4.5 日)がこの段階に該当する。胚盤胞期において、内部細胞塊はエピブラストと原始内胚葉に分化する。これを二段階目の細胞分化と呼ぶ。これらの細胞分化の状態に応じて、胎生 3.5 日から胎生 4.5 日までの胚盤胞は初期、中期、後期に分けられる。初期胚盤胞(胎生 3.5 日)は 32~64 細胞数であり、内部細胞塊と栄養外胚葉から構成される。中期胚盤胞(胎生 4.0 日)は二段階目の細胞分化の過程であり、64~127 細胞数を持つ。後期胚盤胞(胎生 4.5 日)は二段階目の細胞分化が完了した段階で、エピブラスト、原始内胚葉、栄養外胚葉から成り、128 細胞以上を有す。

1.2: Hippo シグナル伝達経路

Hippo シグナル伝達経路は、ショウジョウバエの成長を制御する遺伝子の分離を目的としたモザイク解析による遺伝子スクリーニング(Justice et al. 1995; Xu et al. 1995)によって、2003年に発見された(Harvey et al. 2003; Pantalacci et al. 2003; Udan et al. 2003; Wu et al. 2003; Jia et al. 2003)。Hippo シグナル伝達経路の中心には、タンパク質キナーゼの Hippo と Warts がある。Hippo シグナル伝達経路が活性化されると、Hippo は下流のターゲットである Warts をリン酸化し、Warts はさらに転写共役因子の Yorkie をリン酸化する。リン酸化された Yorkie は核内への移行が阻害され、細胞質に留まり、下流の遺伝子発現は誘導されない。Hippo シグナル伝達経路が不活性化されると、Yorkie は核内に移行し、転写因子 Scalloped と結合し、下流の遺伝子発現を誘導する(図 2 A)。

2007 年にはショウジョウバエで特定された Hippo シグナル伝達経路のメカニズムが、哺乳類にも保存されていることが発見された(Dong et al. 2007; Zhao et al. 2007)(図 2 B)。哺乳類では、Hippo は MST1/2(以降、MST と記載する)、Warts は LATS1/2(以降、LATS と記載する)、Yorkie は YAP1(Yes associated protein1)/WWTR1(TAZ)(以降、YAP と記載する)に対応する。ショウジョウバエと同様に Hippo シグナル伝達経路が活性化されると、MST は LATS をリン酸化し、LATS は転写共役因子 YAP をリン酸化し、これらを細胞質に留める。Hippo シグナル伝達経路が不活性化されると、YAP は核内に移行し、転写因子 TEA ドメイン 1/2/3/4(以降、TEAD と記載する)を活性化し(Zhao et al. 2008; Zhao et al. 2007; Ota and Sasaki, 2008)、下流の遺伝子発現を開始する。このような LATS を介したシグナル伝達経路はカノニカルな Hippo シグナル伝達経路として知られている。Hippo シグナル伝達経路は、細胞間接着、細胞基質接着、細胞極性、GPCR シグナル、細胞骨格を調節する機械的力など、分子シグナルや機械物理的状态などのさまざまな上流シグナルによって調節される(Reviews; Ma et al. 2019; Zheng and Pan, 2019)。機械的なシグナルによる Hippo シグナル伝達経路はノンカノニカルな Hippo シグナル伝達経路とも呼ばれる(Driscoll et al. 2015; Dupont et al. 2011; Elosegui-Artola et al. 2017) (後述;1.6: Mechanotransducer としての YAP)。

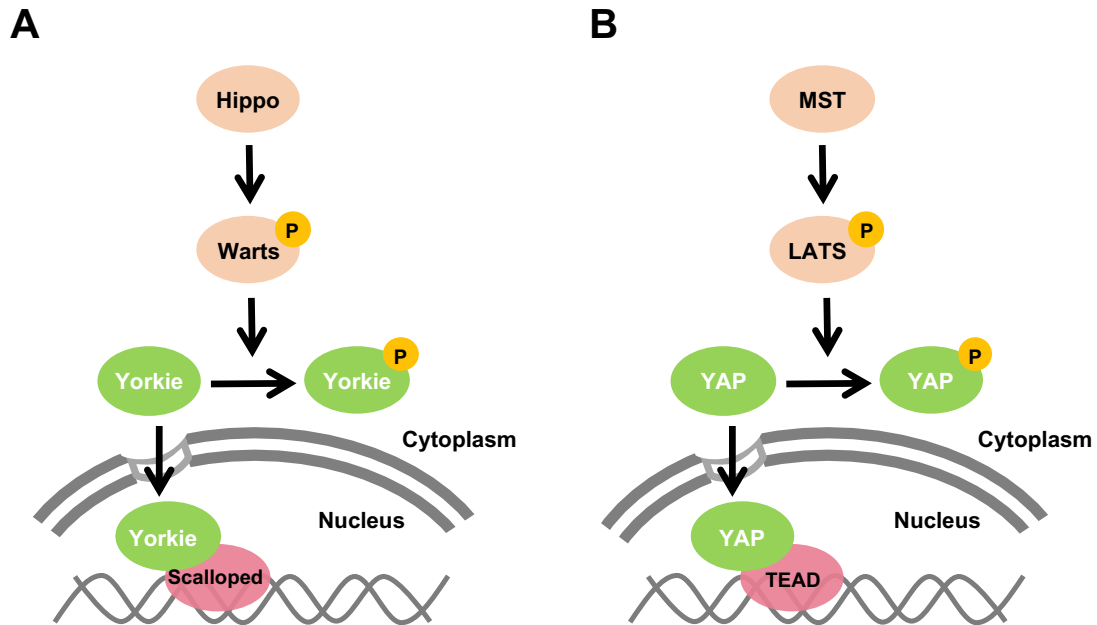


図 2 : Hippo シグナル伝達経路模式図

- (A) ショウジョウバエの Hippo シグナル伝達経路の模式図。Hippo と Warts はどちらもキナーゼ。Hippo を起点とし、Warts を活性化し Yorkie をリン酸化する。リン酸化された Yorkie は細胞質に留まる。Hippo シグナル伝達経路が不活性化すると Yorkie は核内に移動し、転写因子 Scalloped と結合し、遺伝子発現を介して細胞応答をおこなう。
- (B) 哺乳類の Hippo シグナル伝達経路の模式図。MST と LATS はどちらもキナーゼ。MST を起点とし、LATS を活性化し YAP をリン酸化する。リン酸化された YAP は細胞質に留まる。Hippo シグナル伝達経路が不活性化すると YAP は核内に移動し、転写因子 TEAD と結合し、遺伝子発現を介して細胞応答をおこなう。

1.3: 一段階目の細胞分化と Hippo シグナル伝達経路

一段階目の細胞分化を制御するメカニズムは、2つの異なるモデルが提唱されている: Inside-outside モデル、細胞極性モデル(Reviews; Chazaud and Yamanaka, 2016; Yildirim et al. 2021 Lorthongpanich and Issaragrisil, 2015)。それぞれのモデルで Hippo シグナル伝達経路の関与が指摘されている。

1.3.1: Inside-outside モデル

一段階目の細胞分化では、外側の細胞が栄養外胚葉に分化し、内側の細胞は内部細胞塊に分化する(Tarkowski and Wroblewska, 1967)。当研究室では、位置依存的な栄養外胚葉と内部細胞塊への分化において、桑実胚の外側の細胞で Hippo シグナル伝達経路を不活性化し、内側の細胞で活性化する必要があることを見出した(Nishioka et al. 2009)。Hippo シグナル伝達経路内のキナーゼである LATS は、YAP の局在を決定する上で重要な役割を果たす。内側の細胞では LATS が活性化され、YAP がリン酸化されて細胞質に留まり、転写因子 TEAD が活性化されることなく、これらの細胞が内部細胞塊として特徴付けられる。逆に、外側の細胞では LATS が不活性化され、YAP が核に移行し、TEAD と結合して下流遺伝子を活性化することで、栄養外胚葉への分化が特徴付けられる。TEAD4 の活性化は栄養外胚葉特異的な転写因子である CDX2 の発現を誘導し、細胞を栄養外胚葉に分化させる(Nishioka et al. 2009)。さらに、LATS を欠損すると細胞運命は栄養外胚葉への分化に偏る(Nishioka et al. 2009; Lorthongpanich et al. 2013)。

1.3.2: 細胞極性モデル

細胞極性モデルの概念は 1981 年に Johnson と Ziomek により提唱され(Johnson and Ziomek, 1981a, b)、その後数十年にわたる研究によって精緻化されてきた(reviews: Yamanaka et al. 2006; Sasaki, 2017)。当研究室では、Hippo シグナル伝達経路が一段階目の細胞分化で重要な役割を果たすことを明らかにした(Hirate et al. 2013)。桑実胚の外側の細胞は極性化し、内側の細胞は極性化しないことが、栄養外胚葉、内部細胞塊への分化に必要である。外側の細胞は他の細胞と接着しない頂端面を持ち(図 3A の外側の細胞の赤い領域で示されている)、これにより細胞が極性化され Hippo シグナル伝達経路が不活性化され YAP は核に局在する。対照的に、内側の細胞はすべての面で細胞と接着しているために極性化されず、Hippo シグナル伝達経路が活性化され YAP が細胞質に局在する。

このときの接着と極性化による Hippo シグナル伝達経路の活性制御のメカニズムとして、当研究室では Angiomotin(以降、AMOT と記載する)の関与を発見した(Hirate et al. 2013)。AMOT は Hippo シグナル伝達経路のメンバーであり(Zhao et al. 2011)、その局在が細胞の極性化状態に応じて変化することで、Hippo シグナル伝達経路の活性を制御している。内側の

非極性化細胞では、AMOT は全ての細胞間接着部位(アドヘレンスジャンクション)に局在する。ここで AMOT は、E-カドヘリンや Nf2 などの接着分子複合体と相互作用し、LATS キナーゼによってリン酸化される。この AMOT のリン酸化は、Hippo シグナル伝達経路を活性化し、YAP をリン酸化して細胞質へと局在させる。

一方、外側の極性化細胞では、Par-aPKC システムにより AMOT は基底側のアドヘレンスジャンクションから排除され、頂端部に局在する。頂端部に局在した AMOT はリン酸化されず、代わりに F-アクチンと結合する。これにより、アドヘレンスジャンクションにおける Hippo シグナル伝達経路の活性化が抑制され、外側の細胞では YAP が核へと局在し、転写因子 TEAD と結合し、下流の CDX2 の発現を誘導して栄養外胚葉へと分化する(Hirate et al. 2013)。AMOT および AMOTL2(AMOT-like-2)を欠損した胚では、Hippo シグナル伝達経路が活性化されず、すべての細胞が栄養外胚葉へと分化する(Leung and Zernicka-Goetz, 2013)。

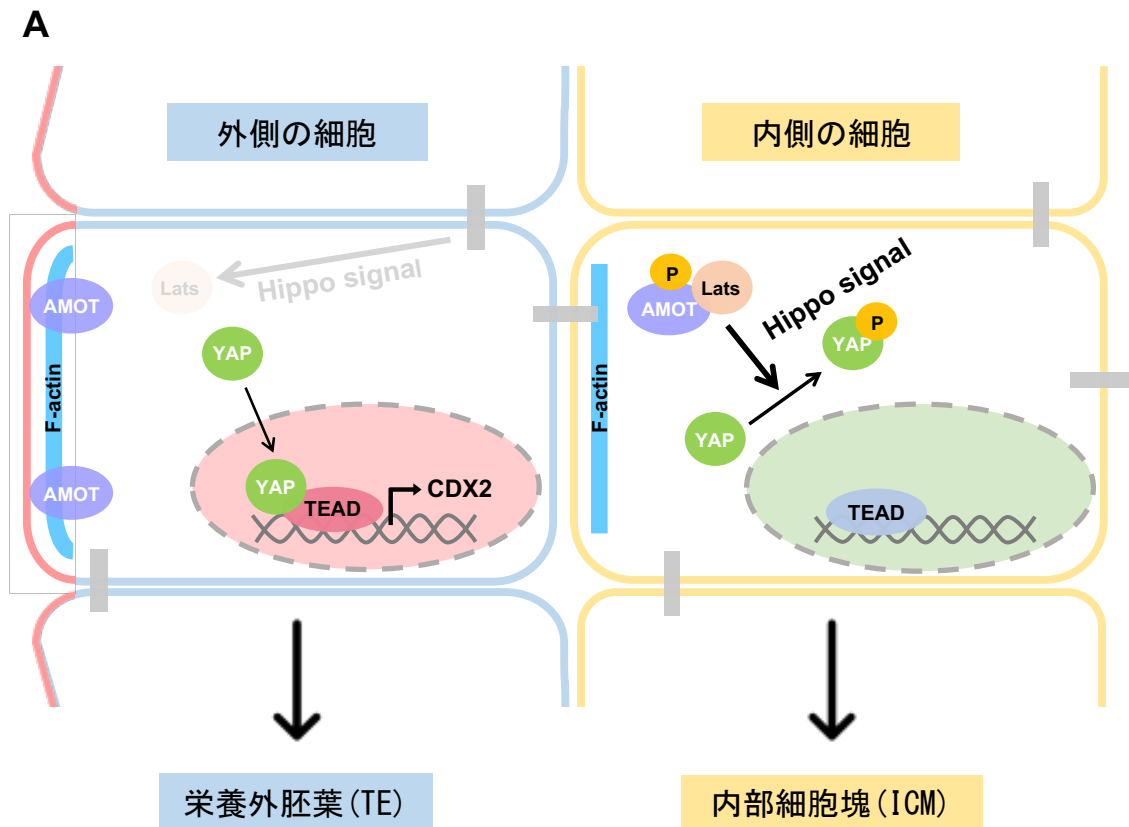


図 3 : 一段階目の細胞分化と Hippo シグナル伝達経路の模式図

(A) 桑実胚において内側の細胞では細胞接着因子に AMOT が結合し、LATS を活性化すると Hippo シグナル伝達経路が活性化し、YAP はリン酸化されて細胞質に留まり、核内の TEAD は不活性化して内部細胞塊に分化する。外側の細胞では細胞が極性化され AMOT は接着因子と結合せず、LATS は不活性化しているため、YAP は細胞質から核に移行し、核内の転写因子 TEAD を活性化し、下流の CDX2 を発現し、栄養外胚葉に分化する。

1.4: 二段階目の細胞分化と Hippo シグナル伝達経路

二段階目の分化では、初期胚盤胞から後期胚盤胞への分化段階で内部細胞塊が原始内胚葉とエピブラストへと分化する。Hippo シグナル伝達経路がこれらの分化において果たす役割は、近年の研究によってより明確になってきた。

当研究室では胚盤胞期における Hippo シグナル伝達経路について、以下のことを明らかにした。初期胚盤胞の内部細胞塊では Hippo シグナル伝達経路が活性化されるが、後期胚盤胞のエピブラストでは Hippo シグナル伝達経路が徐々に不活性化される。YAP は初期胚盤胞の内部細胞塊では細胞質に存在するが、後期胚盤胞のエピブラストでは核に強く局在する。さらに、初期胚盤胞の内部細胞塊で発現する多能性因子、SRY ボックス 2 転写因子 (SOX2)(Guo et al. 2010; Wicklow et al. 2014)は、発生が進むにつれて発現が上昇する。SOX2 の発現レベルは、核内 YAP シグナルと TEAD 活性のレベルと相関している。したがって、初期胚盤胞で活性化されていた Hippo シグナル伝達経路は、二段階目の細胞分化が進行するにつれて内部細胞塊で不活性化され、細胞質に存在していた YAP も後期胚盤胞で核に移行する(Hashimoto and Sasaki, 2019)。

一段階目の細胞分化では、外側の細胞で Hippo シグナル伝達経路が不活性化し、YAP が核に移動することが栄養外胚葉の分化に必要である。一方、内側の細胞では AMOT を介して Hippo シグナル伝達経路が活性化し、YAP がリン酸化され細胞質に留まることが内部細胞塊の分化に必要である。しかし、二段階目の細胞分化では、内部細胞塊からエピブラストへと分化する過程で YAP の局在が細胞質から核へと変化する。エピブラスト形成過程での YAP の核移行は、多能性因子 SOX2 の発現上昇と強い相関関係にあり、エピブラストが多能性を獲得するために必要であると考えられている(Hashimoto and Sasaki, 2019)。これらの知見から、エピブラスト形成過程での YAP の核移行はその後の発生に重要であることが示唆されるが、このときに YAP 局在を変化させる仕組みは不明である。

1.5: Mechanotransducer としての YAP

YAP の細胞内局在を制御するメカニズムとして、機械的な刺激による制御が知られている。機械的な刺激を感知すると YAP は核へと移行し、TEAD を活性化させる。このように細胞が外部からの機械的な刺激を感知し、それを生化学的なシグナルに変換する過程を示す概念を Mechanotransduction といい(Reviews: Vogel and Sheetz, 2006; Jaalouk and Lammerding, 2009, Wozniak and Chen, 2009; Hahn and Schwartz, 2009)、機械的な刺激に反応する YAP は Mechanotransducer としての性質を持つことが知られている(Low et al. 2014)。

40 年前に培養細胞が基質(ECM)へと接着する際の細胞形態の変化が、細胞のふるまいに影響することが発見された(Folkman and Moscona, 1978; Spiegelman and Ginty, 1983)。その後、現在に至るまで、力学的な力がどのように Mechanotransduction によって変換され、そして Mechanotransduction がどのように細胞機能に影響を与えるのかが明らかにされてきた。

2011 年に佐々木研の和田と Dupont はそれぞれ、Hippo シグナル伝達経路の転写共役因子である YAP/TAZ は細胞の形態により細胞内局在が変化することを発見した(Wada et al. 2011; Dupont et al. 2011)。細胞は硬い ECM 上で培養すると伸長した形態になり、柔らかい ECM 上で培養すると球状の形態になる。YAP/TAZ は伸長した形態の細胞では核に局在し転写活性能を示すが、球状の形態の細胞では核から排除され、機能的に抑制される。このとき YAP/TAZ は細胞の形態に依存して核局在が変化しているとされ、細胞が伸長すると形態が扁平になるために核へと移行する。

加えて、核形態の扁平化が YAP の核局在を促進することが知られている(Elosegui-Artola et al. 2017)。細胞を硬い ECM 上で培養すると、細胞と核との間に新たに F-アクチンが形成され、細胞接着を介した力が核に伝わるようになる。力の伝達は核形態の扁平化を引き起こし、それを受けて核膜の表面にある核膜孔が伸展する。核膜孔の形態変化は、分子輸送に対する機械的な抵抗を減少させるため、YAP の核移行が促進される。

1.7: 本研究の目的と概略

着床前胚の胚盤胞期で内部細胞塊がエピブラストへ分化する過程で、Hippo シグナル伝達経路が不活性化され、YAP が細胞質から核に移動するメカニズムは明らかでない。本研究では、多能性を持つエピブラスト細胞を形成する過程での YAP の核移行を制御するメカニズムを解明する。

本研究では YAP の核移行に 2 つのメカニズムが関与していることを見出した。胞胚腔の拡大による機械的なシグナルは YAP の核移行を促進する。これは細胞質 F-アクチンの増加と

YAP リン酸化の減少によって媒介される。また YAP の局在は細胞の分化によっても制御される。内部細胞塊における多能性因子 SOX2 の発現は、タンキラーゼを介する機構を介して AMOT の発現を徐々に抑制する。胞胚腔-F-アクチンと SOX2-AMOT の 2 つの機構は、協調して YAP のリン酸化を抑制し、エピブラスト形成時に YAP の核への局在化を促進する。この 2 つの異なるメカニズムの協調が、エピブラスト細胞への分化の頑健性に寄与している可能性が高い。

第2章 材料と方法

2.1: マウス

B6D2F1/Slc(以下、BDF1)マウスは、日本 SLC(日本、浜松)から購入したもの、または佐々木研究室で繁殖させたものを使用した。マウスは大阪大学大学院生命機能研究科附属動物実験施設の環境制御された部屋で飼育された。マウスおよび組換え DNA を用いた実験はすべて、大阪大学大学院生命機能研究科動物実験委員会および大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て行った。

2.2: 胚の採取と培養

着床前胚の採取は、標準プロトコールに若干の修正を加えて行った(Behringer et al.2014)。B6D2F1/Slc 雌マウスに 10 IU のヒト絨毛性ゴナドトロピン(PMSG; ASKA Animal Health; Gonatropin)およびセロトロピン(hCG; ASKA Animal Health; Serotropin)を 46~48 時間間隔で腹腔内注射して過排卵させ、B6D2F1/Slc 雄マウスと交配して野生型胚を得た。1 細胞期の受精卵は胎生 0.5 日目(E0.5)に卵管膨大部から M2 培地(Sigma-Aldrich; M7167)中にて回収し、ヒアルロニダーゼ(Sigma-Aldrich; H4272)で処理して卵丘細胞を除去した。2 細胞期胚は E1.5 に卵管から M2 培地フラッシュで集めた。すべての胚は、Nunc Delta Surface 付き 72 well plate Nunc MiniTrays(Nunc 136528)の各 well に 10 μ L の KSOM (ARK-Resource; I0BAIK200)を滴下し、5 μ L のミネラルオイルで覆い、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。

2.3: sgRNA の設計と合成

Sox2 の sgRNA は手動、*Lmna* の sgRNA は CHOPCHOP(Labun et al. 2019)を用いて設計した。各標的配列は、70 nucleotides の forward primer の 21~40 nucleotide とした(下記に詳細を記載)。70 nucleotide の forward primer(Eurofins Genomics)は、T7 プロモーター、sgRNA 特異的配列および共通配列から構成され、26 nucleotide の Common gRNA Reverse primer を使用した。これらを用いて、pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9(Addgene, 42230)(Cong et al. 2013)から PCR 産物を増幅し、KOD Fx neo DNA ポリメラーゼ(東洋紡、大阪、日本)を用いて PCR 反応を行った。サーマルサイクラーのプログラムは、96°Cで1分の後、96°Cで10秒、63°Cで10秒、68°Cで30秒を40サイクル、その後68°Cで1分間、最後は4°Cに設定した。PCR 産物はエタノール沈殿で精製し、70%エタノールで洗浄した。sgRNA は MEGAshortscript T7 Transcription Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて、製造元のプロトコールに従って、精製した PCR 産物を鋳型として用いて合成した。

DsRed gRNA Forward-1

TTAATACGACTCACTATAGGGGGCCACGA GTTCGAGATCGAGTTTTAGAGCTAGAAA

Lmna gRNA Forward-1

TTAATACGACTCACTATAGGCGAGCTCCATGACCTGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA
AGTTAAAAT

Lmna gRNA Forward-2

TTAATACGACTCACTATAGGGGGGACTTGTTGGCTGCGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA
AGTTAAAAT

Sox2 gRNA Forward-1

TTAATACGACTCACTATAGGGCCCCGCAGCAAGCTTCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA
AGTTAAAAT

Sox2 gRNA Forward-2

TTAATACGACTCACTATAGGGCCTCAACGCTCACGGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA
AGTTAAAAT

Sox2 gRNA Forward-3

TTAATACGACTCACTATAGGGCTCTGTGGTCAAGTCCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA
AGTTAAAAT

Common gRNA Reverse

AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTT

2.4: エレクトロポレーション法によるマウス受精卵への遺伝子導入

1 細胞期の発生段階で遺伝子をノックアウトするために、以前の研究で開発された CRISPR/Cas9 システム法を用いて、受精卵のエレクトロポレーション法による遺伝子導入を行った(Hashimoto et al. 2016)。Opti-MEM(サーモフィッシュャーサイエンティフィック ; 31985062)中に 100 ng/μL の Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3(Integrated DNA Technologies, 1081058) と 100 ng/μL の sgRNA を調製した。この溶液 10 μL を満たした LF501PT1-10 電極(BEX, 東京, 日本)の 1 mm の隙間に受精卵を整列させた。電気条件は、CUY21 EDIT II エレクトロポレーター(BEX, 東京, 日本)を用いて、15 V で 3 ms のパルス 5 回を 1 セットとして 2 セット行い、セット間で極性を反転させた。

2.5: 胞胚腔へのフロリナートインジェクション

フロリナートは細胞毒性のない疎水性物質であり、水より比重が高いため通常の油よりも胞胚腔への注入に使いやすい。中期胚盤胞(前期)まで発生した胚を M2 培地に移し、手動式マイクロインジェクション(OM デジタルソリューションズ株式会社)を用いて胚を固定し、マイクロフォージ(NARISHIGE)を用いて先端 5 mm を曲げたインジェクションキャピラリー

ーで胞胚腔内にフロリナート FC-40(Sigma, F9755-100ML)を注入した。栄養外胚葉や透明帯が破壊しない程度までフロリナートを注入し、内部細胞塊に圧力がかかったことを確認したのち、インジェクションキャピラリーを抜いた。インジェクションを行った胚は KSOM 培地にて 15 分間培養し、その後 4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液(phosphate-buffered saline: PBS)に入れ、室温にて 15 分間インキュベートし、固定処理を行った。フロリナートが入った状態で免疫蛍光染色を行うと、蛍光が二重のシグナルに見えてしまうために、固定処理後の胚から以下の手順で胞胚腔からフロリナートを完全に除去した。胚を再度マイクロインジェクションシステムにセッティングし、内部細胞塊がない側の栄養外胚葉と透明帯の一部をピエゾにより小さな穴を開け、その穴とは別の栄養外胚葉の位置にインジェクションキャピラリーを突き刺した。そのままゆっくりとフロリナートを注入すると、固定後に開けた穴からフロリナートの一部が抜けだすので、そのフロリナートが胚の 1/4 程度まで大きくなったらインジェクションキャピラリーを栄養外胚葉から抜き、外に抜けたフロリナートに差し替えた。この状態でもう一度フロリナートをゆっくりと注入すると、胚の外側のフロリナートが次第に大きくなるが、胚の内側のフロリナートは縮小する。最終的にはすべてのフロリナートを胚の内側から完全に抜くことができる。この方法で胞胚腔からフロリナートを除去した。

2.6: 胞胚腔の縮小

中期胚盤胞(後期)まで発生した胚を M2 培地に移し、手動式マイクロインジェクションシステムを用いて固定した。マイクロインジェクションで用いるインジェクションキャピラリーは、マイクロフォーgerを用いてキャピラリーの先を約 5 μm になるように調節した。直径がこれより大きいと栄養外胚葉が破れやすくなり、これより小さいと抜いている間に細胞や透明帯の一部を吸引してしまい、胞胚腔液を抜く効率が悪くなる。胚の内部細胞塊側をホールディングキャピラリーに固定し、反対側からインジェクションキャピラリーを栄養外胚葉に刺して胞胚腔の大きさに合わせキャピラリーの位置を調節しながら胞胚腔内の液を抜く。胞胚腔を抜き終わったらインジェクションキャピラリーに加わっている圧力をニュートラルにし、吸入を停止する。これをひとつの胚の胞胚腔の大きさに合わせながらすべての胚において行った。吸入後 KSOM に培地交換し、5% CO_2 37°C条件下にて 15 分間培養をしたのち、4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液(phosphate-buffered saline: PBS)に入れ、室温にて 15 分間インキュベートし、固定処理を行った。

2.7: 免疫蛍光染色と共焦点顕微鏡撮影

実験操作は 72 well プレートで行った。マウス胚を 4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液(phosphate-buffered saline: PBS)に入れ、室温にて 15 分インキュベートし、固定処理を行った。固定した胚は、0.1% TritonX-100/PBS にて、室温で 1 分洗浄処理を行った後、2% goat

serum/0.1% TritonX-100/PBS ないしは 2% donkey serum/0.1% TritonX-100/PBS にて、室温で 5 分ブロッキングを施した。一次抗体反応は室温にて一晩インキュベートした。今回用いた一次抗体は以下の通りである。rabbit monoclonal anti-Yap1 antibody(1:200)(Cell Signaling Technology, D8H1X), rabbit monoclonal anti-Sox2 antibody(1:200) (Cell Signaling, D9B8N), rabbit polyclonal anti-Amot antibody(Amot-C, 1:200)(Hirate et. al.2013), rabbit polyclonal anti-p-Yap(Ser127) antibody(1:200)(Cell Signaling, 4911), rat monoclonal anti-E-cadherin antibody(ECCD-2)(1:200)(Takara; Cat# M108), mouse monoclonal anti-Yap1 antibody(MO1)(1:200)(Abnova; H00010413-M01), mouse monoclonal anti-Lamin A/C antibody(1:100)(BD Transduction Laboratories, 612162), goat polyclonal anti-Sox2 (R&D, AF2018)。一次抗体反応後、0.1% TritonX-100/PBS にて、室温で 1 分洗浄を 2 回繰り返した。その後、二次抗体(1:1000)反応を常温にて 1 時間インキュベートした。今回用いた二次抗体は以下の通りである。donkey anti-mouse IgG 488/555(Invitrogen A32766/A32773), donkey anti-Rabbit IgG 488/555/647(Invitrogen A32790/A32794/A21245), donkey anti-goat IgG 488/647 (Invitrogen A-11055/A21447), donkey anti-rat IgG 488(Invitrogen A21208), Alexa Flour 647 phalloidin(1:50)(Molecular Probes, A22287)。細胞の核を Hoechst33258 (10 µg/mL, 1:1000)(同仁科学)を用い、洗浄を 2 回繰り返した後、1 回 PBS にて洗浄を行い、胚をガラスボトムデッシュの PBS ドロップに移し、共焦点顕微鏡(Nikon A1; 株式会社ニコンソリューションズ)にて撮影し、NIS-elements AR 5.21.00 64-bit (株式会社ニコンソリューションズ) で観察をした。超解像画像は、Airyscan1 を付属した LSM900(ZEISS)で撮影し、ZEN lite(ZEISS)で観察した。

2.8: p-YAP 染色胚の固定

p-YAP の免疫蛍光染色に関しては上述した方法で行ったが、固定方法のみ他の染色胚と異なる方法を採用した。その理由として、p-YAP 染色胚を他の染色胚と同様に 4% PFA で固定すると栄養外胚葉や細胞接着部位での p-YAP シグナルが強くなる。リン酸化 YAP は内部細胞塊の細胞質で最も強固なパターンを持つと考えられるが、4% PFA 固定では胚全体で均一なシグナルが得られ、文献に沿うような結果は得られなかった。所属研究室の以前の研究で、桑実胚の p-YAP を染色する際には、4% PFA で O/N 後に固定をしていた(Hirate et al. 2013)。この方法を用いると、内部細胞塊の細胞質でのみ p-YAP シグナルを得ることができる。しかし、この方法では胚全体でのシグナルが大きく減少してしまうので、中期胚盤胞以降の発生段階の分厚い胚では詳細な観察ができない(図 4A)。そこで、PFA ではなくメタノールを用いて固定した。−20℃で保管したメタノールを用い、氷上で 20 分固定した。固定後は上述した操作と同様だが、リン酸化部位特異的抗体であるため、固定後の洗浄から一次抗体反応までは Phosphatase Inhibitor Cocktail(Nacalai, code no. 07574-61)を 100 倍希釈で加えて行った。

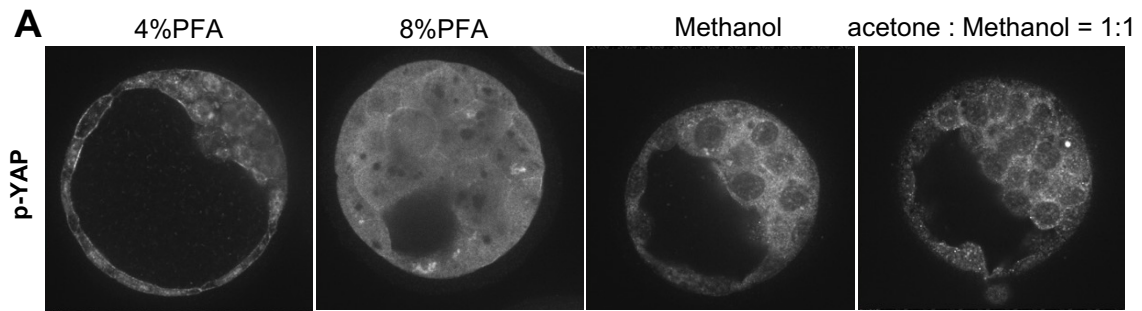


図 4： 中期胚盤胞(初期)における 4 種類の固定方法による p-YAP 染色

(A) 4%PFA 固定 15 分(左)、8%PFA 固定 15 分(中央左)、メタノール固定 15 分(中央右)、アセトン：メタノール=1:1 固定 15 分(右)それぞれの固定方法における p-YAP の免疫傾向染色結果。メタノールのみの固定が最もノイズが少なく細胞質のシグナルが強い。

2.9: 画像解析

共焦点画像は、NIS-Elements AR analysis (Nikon Solutions, Tokyo, Japan)または Imaris (Bitplane, Belfast, UK)ソフトウェアを用いて解析した。

2.10: 細胞数の計測

細胞数は Imaris を用いて計測をした。胚を免疫蛍光染色し、共焦点顕微鏡で Z 軸方向に 1～3 μm ずつ撮影した 2 次元のスライス画像を取得し、これを Imaris にて 3 次元画像に構築した。ここからオブジェクトツールのスポット機能を用いて、胚のすべての核を染色した Hoechst シグナル陽性の核の数を数えることにより、胚全体の細胞数を計測した。このとき分裂中の細胞は 1 細胞として数え、アポトーシスが起きている可能性のあるような異常な細胞は除いた。

2.11: 免疫蛍光染色画像からのシグナル強度の取得

Imaris $\times 64$ 10.0.0 ソフトウェアを用いて、Z 間隔 1～3 μm の stack 共焦点画像を解析した。シグナル強度はオブジェクトツールのサーフェイス機能を用いて、対象の関心領域(Region of interests: ROIs)を手動でセグメンテーションした。これを 3 次元構築し、蛍光強度の平均値を取得した。取得するシグナルに基づき 4 種類の異なるセグメンテーションを行った。

1. YAP などの核シグナルは SOX2 陽性の内部細胞塊/エピブラストの細胞における核シグナルから取得した(図 5A)。
2. F-アクチンの細胞質シグナルは、SOX2 陽性の内部細胞塊/エピブラストの細胞において、F-アクチンシグナルの強いジャンクションの内側と Hoechst で染色した核シグナルとの間から取得した(図 5B)。
3. p-YAP シグナルは SOX2 陽性の内部細胞塊/エピブラストの細胞における E-カドヘリンシグナルの内側から内部細胞塊全体のシグナルを取得した(図 5C、E)。
4. AMOT シグナルは、SOX2 陽性の内部細胞塊/エピブラストの細胞における E-カドヘリンシグナル上から内部細胞塊全体のシグナルを取得した(図 5D、E)。

上記の方法で得たシグナル蛍光強度は全て Hoechst で染色された核シグナルで割ることで標準化した。

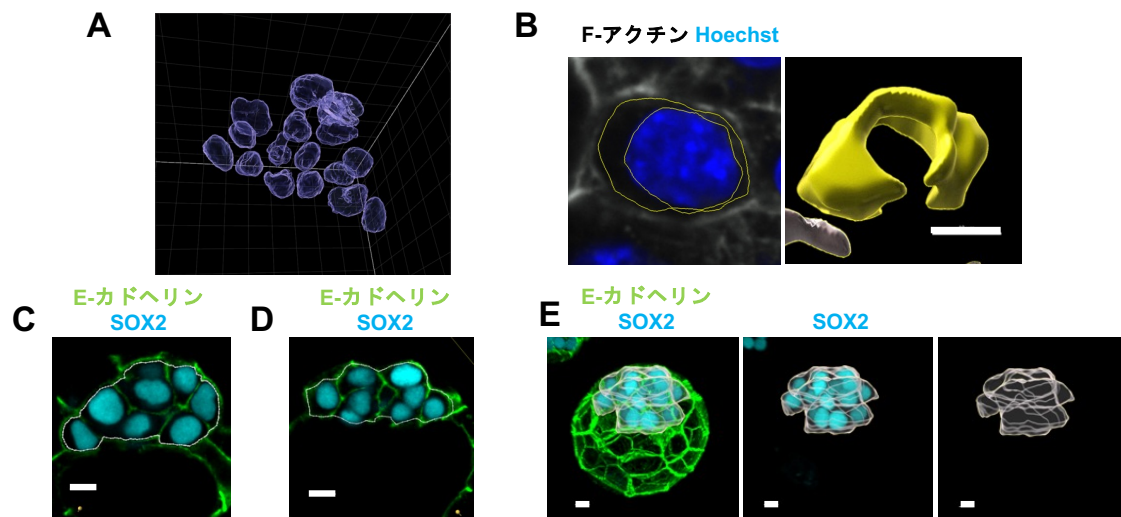


図 5. シグナル強度取得のためサーフェイス構造

- (A) 核シグナルの解析方法。SOX2 陽性の内部細胞塊/エピプラストの細胞における全ての Hoechst シグナルからサーフェイス構造を取得。
- (B) 細胞質のシグナルの解析方法。F-アクチン(phalloidin)の細胞間シグナルと Hoechst の核シグナルとの間隔の ROI を設定し(左パネルの黄色い線)、右パネルで示す立体構造を作成した。スケールバーは 10 μm 。
- (C) 内部細胞塊/エピプラストの全体の p-YAP シグナルの解析方法。SOX2 陽性の内部細胞塊/エピプラストの細胞における E-カドヘリンで示す細胞間のシグナルの内側の ROI(白線)を設定した。スケールバーは 10 μm 。
- (D) 内部細胞塊/エピプラストの全体の AMOT シグナルの解析方法。SOX2 陽性の内部細胞塊/エピプラストの細胞における E-カドヘリンで示す細胞間のシグナル上の ROI(白線)を設定した。スケールバーは 10 μm 。
- (E) (C)(D)で作成した ROI を立体構築したサーフェイス画像。スケールバーは 10 μm 。

2.12: 免疫蛍光染色画像からの球形度(Sphericity)の計算

Imaris ×64 10.0.0 ソフトウェアを用いて、Z 間隔 1~3 μm の stack 共焦点画像を解析した。Sphericity(球形度:Ψ)とは、物体がどの程度球形であることを示す尺度である。粒子の球形度の表面積に対する球の表面積の比である(Wadell, 1932)。Sphericity は Sox2 陽性核を参考にした核の Surface 構造(図 5A)から Sphericity 値を出力し取得した。Sphericity の計算式は以下の通り。核形態は球に近いほど 1 となる。

$$\Psi = \frac{\pi^{1/3}(6V_p)^{2/3}}{A_p}$$

V_p = 体積

A_p = 表面積

2.13: 胞胚腔の体積の解析

胞胚腔の体積の計測には、Imaris を用いた。免疫蛍光染色した胚を Imaris に入力し、細胞膜を標識する E-カドヘリンの蛍光シグナルから、オブジェクトツールのサーフェイスレンダリングを用いて、まず E-カドヘリンの蛍光シグナルすべてをマークした。これにより、胞胚腔を除いた胚のすべてのシグナルがある場所にサーフェイスレンダリングが適応される。蛍光強度の低いシグナルにおいてもすべてマークされているかどうかを目視で確認した後、このマークされている部分をシグナル強度 0、そうでない部分をシグナル強度 100 と認識するために、サーフェイス結果から Edit > Mask all > Mask all channel を選択し、Mask setting から E-カドヘリンの channel を選択する。この状態で construct inside/outside を選択し、outside の voxel を 100.000、inside の voxel を 0.000 に設定する。これでマスク処理を行うと、胚がある部分のシグナル強度は 0、ない部分すべてがシグナル強度 100 の新しい channel を作ることができる。あらためてオブジェクトツールのサーフェイスレンダリングを用いて、この新しい channel を適応すると、3 次元データの中で胚が存在しない部分のみをマークすることができる。胚の外側のサーフェイスレンダリングは無視し、胚の内側のサーフェイスレンダリングの容量を計測した。Imaris は Voxel に応じた立法 μm の数値を自動で計算できるので、この数値を胞胚腔の体積とした。以上の方法で算出した胞胚腔の体積と、その胚の内部細胞塊の核形態における扁平度の平均値を GraphPad Prism に出力し、XY グラフを作成した。

2.14: XAV939 添加

AMOT を分解するタンキラーゼの活性を阻害するために、10 μM の XAV939(Sigma-Aldrich, X3004)を含む KSOM 培地で中期胚盤胞(前期)を、12 時間培養した。薬剤はジメチルスルホ

キシド(DMSO)で希釈しているため、コントロール胚の培養では同じ量の DMSO を KSOM 培地に添加した。

2.15: 統計解析

すべての統計解析には GraphPad Prism 9(GraphPad Software)を用いた。分析された細胞の数(n)、胚の数(N)、p 値は各図または図の凡例に記載している。有意水準は 5%未満とした。各群の平均値の比較には、対応のない *t* 検定を用いた。また測定データの比較には一元配置分散分析(one-way ANOVA)、ダンの多重比較検定(Dunn's multiple comparison test)を用いた。測定データの変数間の相関係数は、ピアソンの積率相関係数を用いて解析した。

第3章 結果

3.1: 胚盤胞期における YAP の細胞内局在とそれを基にしたステージ区分

胚盤胞期は細胞数や分化状態に応じて初期、中期、後期と3つのステージに区分される (Hashimoto and Sasaki, 2019; Le Bin et al. 2014; Czechanski et al. 2014; Yanagida et al. 2022)。内部細胞塊での YAP の局在に着目してこれらのステージを観察すると、初期胚盤胞では核局在が見られないが、中期胚盤胞では核局在、細胞質局在、核/細胞質両方に局在する細胞がランダムに存在し、後期胚盤胞では全ての細胞で核局在が見られる。以上のことから中期胚盤胞で YAP の局在が大きく変化すると考えられるが、詳細な核局在が始まるタイミングは不明である。そこで、YAP の局在を変化させるメカニズムを調べる本研究では、YAP 局在に基づく新たな胚盤胞期のステージを用いることにした。まず、胚盤胞期における YAP 局在を詳細に調べた。その結果、胚盤胞期の YAP の局在状態は、以下の3つの状態に分類できることがわかった(図 6A)。

1. 細胞質局在：YAP シグナルが主に細胞質に局在しており、細胞質の YAP シグナルのみで核形態が観察できる。
2. 均一：YAP シグナルが細胞質と核の両方にあり、YAP シグナルのみでは核形態が観察できない。
3. 核局在：YAP シグナルが核に局在しており、YAP シグナルのみで核形態が観察できる。

胚盤胞期を通じて上記3つの状態を観察し、内部細胞塊/エピブラスト細胞内におけるそれぞれの状態の割合を調べた(図 6B、C)。33 細胞から 68 細胞までの胚では、細胞の 80%以上が細胞質局在を示した。72 細胞から 97 細胞の間では、YAP 局在は多様なパターンを示し、細胞質局在の比率は徐々に減少し、核局在の比率は細胞数の増加とともに増加した。102 細胞を超えると、細胞質局在は観察されなかった。これらの結果から、この論文では、内部細胞塊/エピブラスト細胞内における YAP の細胞内局在に基づいて、胚盤胞期を以下のように定義した(図 6B、C)。：

- ・ 初期胚盤胞：69 細胞以下-80%以上が細胞質局在。
- ・ 中期胚盤胞：70～99 細胞-局在は多様なパターンを示す。
 - ・ 中期胚盤胞(前期)：70～84 細胞-細胞質局在が多い。
 - ・ 中期胚盤胞(後期)：85～99 細胞-核局在が多い。
- ・ 後期胚盤胞：100 細胞以上-細胞質局在が観察されない。

次に、YAP 核局在の蓄積量の変化を調べるために、内部細胞塊/エピブラスト細胞の核における YAP シグナルのレベルを定量した。シグナルレベルは核全体をマニュアルでセグメンテーションし、核のシグナルを 3 次的に検出した(図 5A)。その結果、核局在の YAP シグナルは発生が進むにつれて徐々に増加した(図 6D、E)。新たに作製したステージ区分では、YAP の核局在のシグナルはステージに応じて増加した。YAP の核移行を制御するメカニズムの探索は、YAP の核移行が開始される中期胚盤胞を中心に調べることにした。

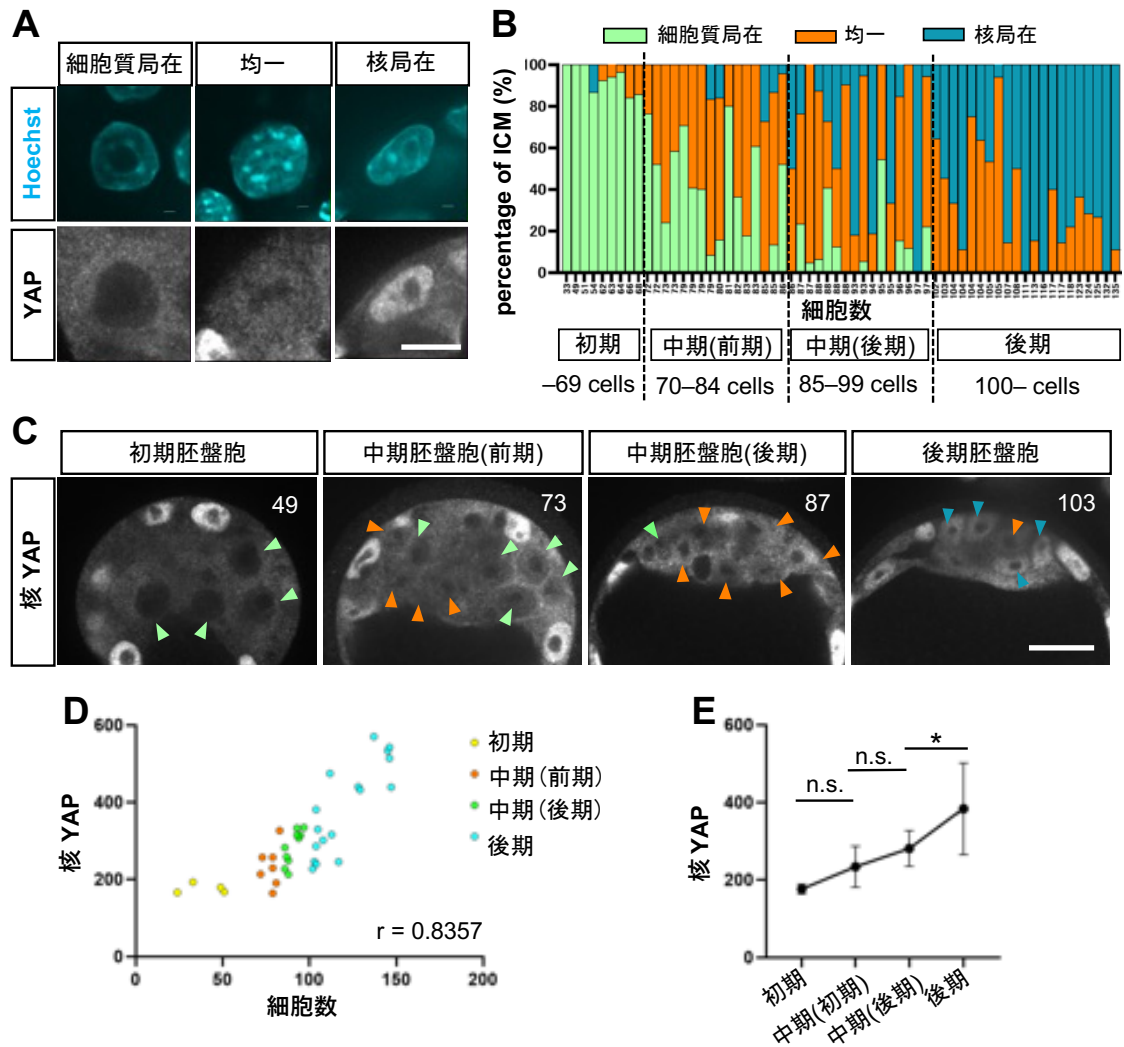


図 6: 内部細胞塊/エピブラストの細胞における詳細な YAP 局在の観察

- (A) YAP の異なる局在を示す典型的な免疫蛍光画像。SOX2 陽性の ICM/epiblast の細胞では、YAP の細胞内局在に基づき以下 3 つのカテゴリーに分類した：細胞質局在(左)、均一(中央)、核局在(右)。スケールバーは 10 μm 。
- (B) ICM/epiblast における YAP 局在の発生に伴う変化。緑、オレンジ、青はそれぞれ細胞質局在、均一局在、核局在の割合を示す。
- (C) 異なる発生段階における ICM/epiblast における YAP 局在の代表的な免疫蛍光画像。緑、オレンジ、青の矢頭は、それぞれ YAP が細胞質局在、均一、核局在に分布した細胞を示す。右上の数字は細胞数。スケールバーは 20 μm 。
- (D) ICM/epiblast における総細胞数と核 YAP シグナルの蛍光強度との相関を示すドットプロット。
- (E) 胚盤胞期における核 YAP シグナルの蛍光強度の変化を示す折れ線グラフ。p 値は一元配置分散分析(one-way ANOVA)、ダンの多重比較検定(Dunn's multiple comparison test)により決定。* $p < 0.05$, n.s.: 有意でない。各ステージの解析サンプル数：初期胚盤胞($N = 4$, $n = 59$)、中期胚盤胞(前期)($N = 7$, $n = 142$)、中期胚盤胞(後期)($N = 9$, $n = 174$)、後期胚盤胞($N = 17$, $n = 278$)。

3.2: 胞胚腔の拡大は内部細胞塊での YAP の核移行を促進する

3.2.1: 発生に伴う胞胚腔の拡大は核 YAP シグナルの増加と相関する

胚盤胞期の内部細胞塊で YAP の核移行を促進するメカニズムを明らかにするため、まず胚盤胞期における胞胚腔の拡大に注目した。YAP は機械的なシグナルにより細胞内局在が制御されることが知られている(Wada et al. 2011; Dupont et al. 2011)。胞胚腔の拡大は栄養外胚葉の細胞の張力を増加させるため(Chan et al. 2019)、同様に内部細胞塊の細胞にもなんらかの機械的な力が加わり、YAP の核局在を促進するという仮説を立てた。

胞胚腔の体積を測定したところ、発生の進行に伴い胞胚腔の体積が増加していた(図 7A-C)。これは、発生の進行に伴う核 YAP シグナルの増加と並行して起こった。そこで、中期胚盤胞における胞胚腔の拡大が、YAP の核移行に関与するかどうかを検証することにした。

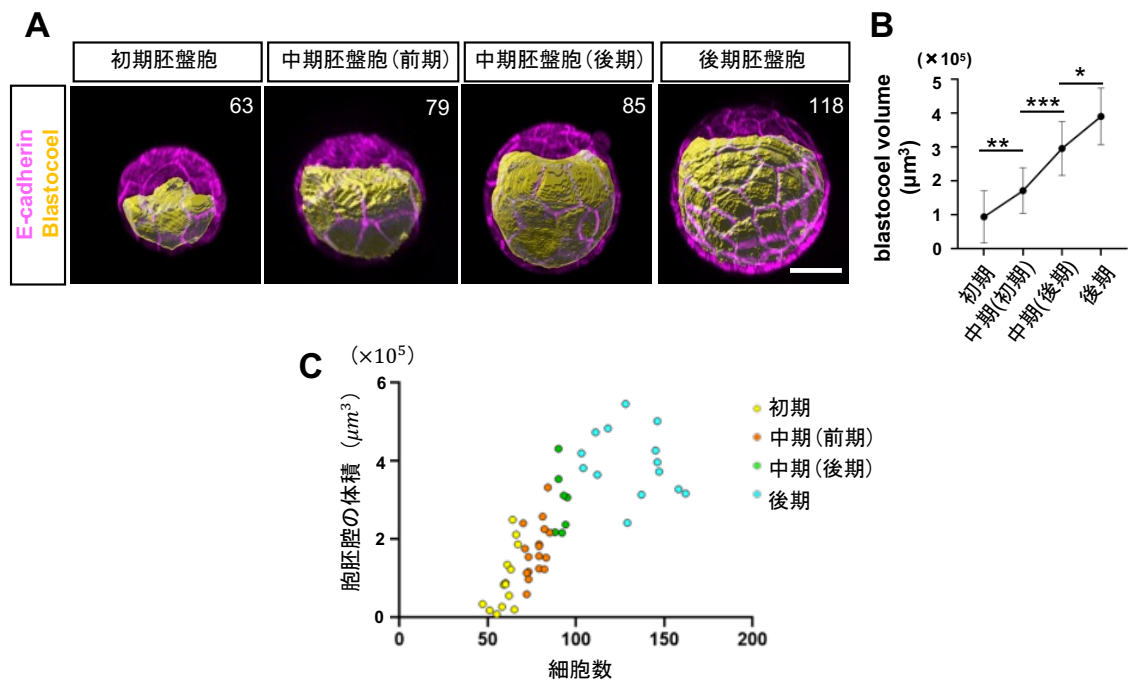


図 7. 胚盤胞期における胞胚腔の体積の変化

- (A) 胚盤胞期のステージ毎における胞胚腔の表面レンダリング結果の典型的な画像。イエローとマゼンタはそれぞれ胞胚腔の体積と E-カドヘリンのシグナルを表す。スケールバーは 20 μm 。
- (B) 胚盤胞期のステージ毎における胞胚腔の体積の変化を示す折れ線グラフ。p 値は一元配置分散分析(one-way ANOVA)、ダンの多重比較検定(Dunn's multiple comparison test)により決定。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。各ステージの分析サンプル数：初期胚盤胞($N = 14$)、中期胚盤胞(前期)($N = 17$)、中期胚盤胞(後期)($N = 7$)、後期胚盤胞($N = 14$)。
- (C) 内部細胞塊/エピブラストにおける細胞数と胞胚腔の体積との相関を示すドットプロット。

3.2.2: 胞胚腔を実験的に拡大させると核 YAP シグナルが増加する

胞胚腔の拡大と YAP の核局在との関係を明らかにするために、胞胚腔の大きさを実験的に操作した。YAP の核移行が開始される中期胚盤胞のうち、核 YAP シグナルが比較的低い中期胚盤胞(前期)の胞胚腔にフロリナートを注入し、胞胚腔の体積を増加させた(図 8A-C)。注入から 15 分後に回収し、内部細胞塊の YAP 局在を調べた。

内部細胞塊の細胞における核 YAP シグナルは、フロリナートを注入していないコントロール胚と比較して有意に増加した(図 8D、E)。さらに、YAP シグナルの核/細胞質比(N/C ratio)も解析し、核/細胞質比の増加が確認された。胞胚腔の拡大が細胞質から核への YAP の局在変化を促進することが示唆された(図 8F、G)。

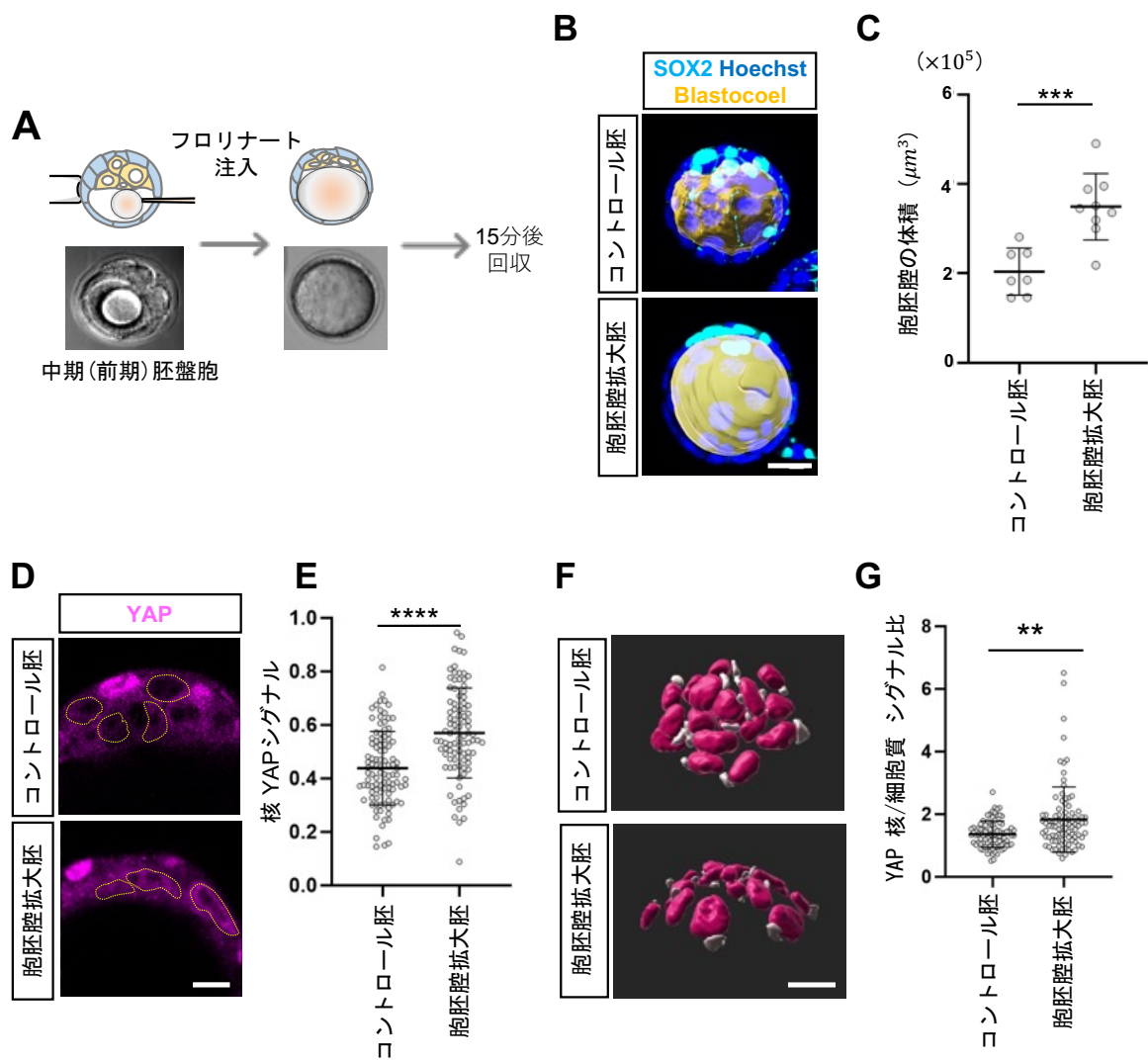


図 8. 胞胚腔を拡大すると核 YAP レベルが上昇する

- (A) 胞胚腔へのフロリナート注入実験方法模式図。
- (B) フロリナート注入による胞胚腔拡大実験における胞胚腔の典型的な画像。マゼンタ、シアン、ブルーはそれぞれ Blastocoel (胞胚腔)、SOX2、Hoechst シグナルを表す。スケールバーは 20 μm 。
- (C) 胞胚腔拡大による胞胚腔の体積の変化を示す。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。*** $p < 0.001$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚(N = 7)、胞胚腔拡大胚(N = 9)。
- (D) 胞胚腔拡大実験における核 YAP シグナルの代表的な免疫蛍光画像。点線は内部細胞塊の核を表す。スケールバーは 10 μm 。
- (E) 胞胚腔拡大による核 YAP シグナルの蛍光強度を示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。**** $p < 0.0001$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚(N = 8, n = 100)、胞胚腔拡大胚(N = 12, n = 92)。
- (F) YAP 核/細胞質 シグナル比の定量に用いた内部細胞塊の核と細胞質のセグメンテーションの代表画像。赤は核、白は細胞質を表す。この解析では各細胞について細胞質の一部のみを分割した。スケールバーは 20 μm 。
- (G) 胞胚腔拡大による YAP 核/細胞質シグナル比を示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。** $p < 0.01$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚(N = 8, n = 88)、胞胚腔拡大胚(N = 12, n = 93)。
-

3.2.3: 胞胚腔を実験的に縮小させると核 YAP シグナルが減少する

フロリナートを用いた胞胚腔の拡大は、人工的な拡大であるため本来の胚盤胞での YAP 局在変化を観察できていないことが懸念される。そこで、逆に中期胚盤胞(後期)の胞胚腔から内部の液体を吸引し、胞胚腔の体積を減少させた(図 9A-C)。中期胚盤胞(後期)は中期胚盤胞(前期)よりも YAP の核移行が促進されている段階である。胞胚腔の吸引から 15 分後に回収し、内部細胞塊の YAP の核局在を調べた。

吸引した胚の核 YAP シグナルはコントロール胚よりも有意に減少した(図 9D、E)。この結果から、胞胚腔の体積の減少は内部細胞塊の YAP を核内から排除することがわかった。

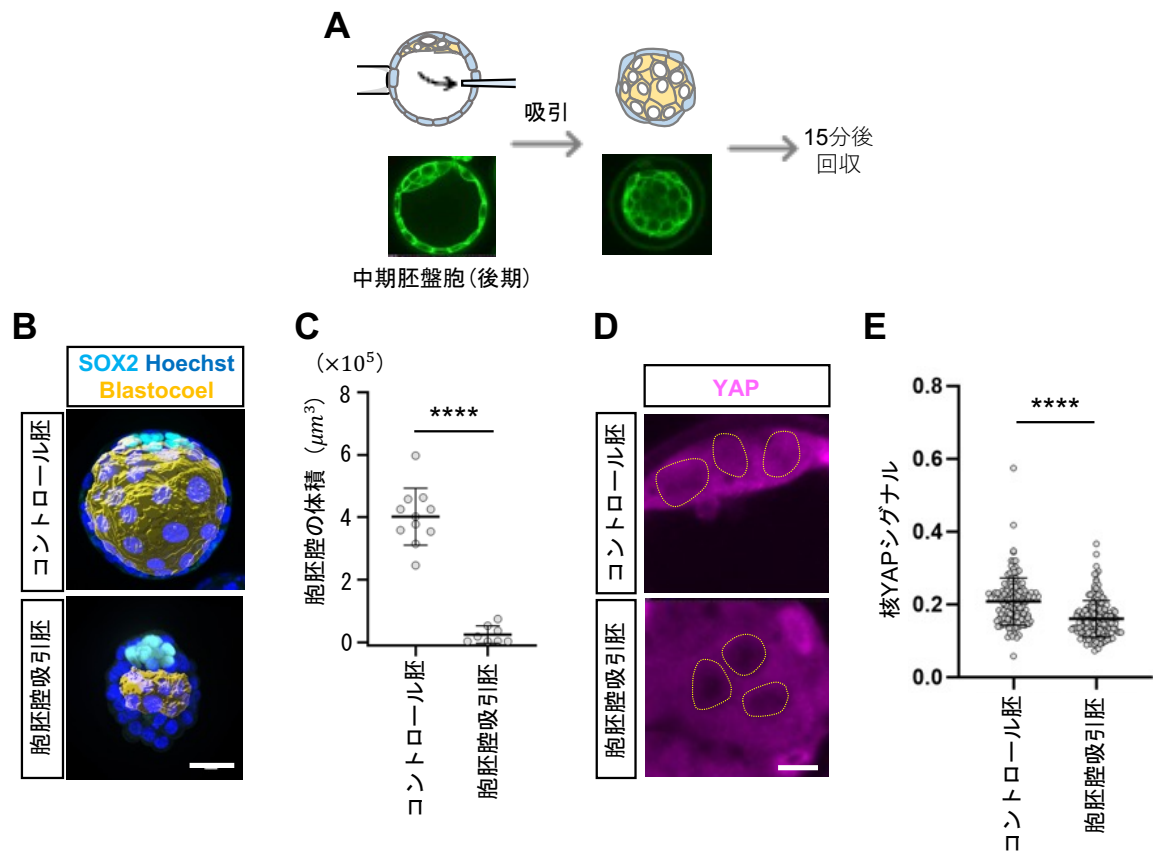


図 9. 胞胚腔を縮小させると核 YAP レベルが減少する

- (A) 胞胚腔吸引実験方法の模式図。
- (B) 胞胚腔吸引実験における胞胚腔の代表的な画像。シアン、ブルー、イエローはそれぞれ SOX2、Hoechst、Blastocoel(胞胚腔)シグナルを示す。スケールバーは 20 μm 。
- (C) 胞胚腔吸引による胞胚腔の体積の変化を示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。**** $p < 0.0001$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚(N=11)、胞胚腔吸引胚(N=8)。
- (D) 胞胚腔吸引実験における核 YAP シグナルの代表的な免疫蛍光画像。点線は内部細胞塊の核を表す。スケールバーは 10 μm 。
- (E) 胞胚腔吸引実験に伴う核 YAP シグナル強度を示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。**** $p < 0.0001$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚(n = 142)、胞胚腔吸引胚(n = 165)。

3.3: 核形態の扁平化は YAP の核移行への関与が低い

培養細胞では、核形態の扁平化が YAP の核局在を促進することが知られている(Elosegui-Artola et al. 2017)。そこで、内部細胞塊での YAP 局在制御における核形態の扁平化の関係を明らかにするために、核形態の扁平度を示す特徴量として核の球形度(Sphericity)を解析した。球形度は 1 であれば球体であり、それより低ければ扁平な形態を示す。核をマニュアルでセグメンテーションして、3 次元での球形度を測定した(図 10A)。

内部細胞塊の核の球形度は、発生が進むにつれて減少する傾向があった(図 10A-C)。しかし、内部細胞塊内における球形度のばらつきの幅が大きく、統計的に有意な差が得られたステージは中期胚盤胞(後期)から後期胚盤胞にかけてのステージのみであった。これらの球形度のばらつきが核 YAP シグナルレベルと相関していると仮定し、中期胚盤胞における核 YAP シグナルと球形度との細胞毎の相関関係を調べた。中期胚盤胞(前期)(図 10D)では核 YAP シグナルと球形度の相関係数は-0.1375 であり、相関関係が見られなかった。中期胚盤胞(後期)(図 10E)の核 YAP シグナルと球形度の相関係数は-0.2211 と、弱い負の相関関係が見られた。これらの結果から、中期胚盤胞で観察される YAP の核移行のばらつきと核形態の球形度は関与が低いと考えられた。

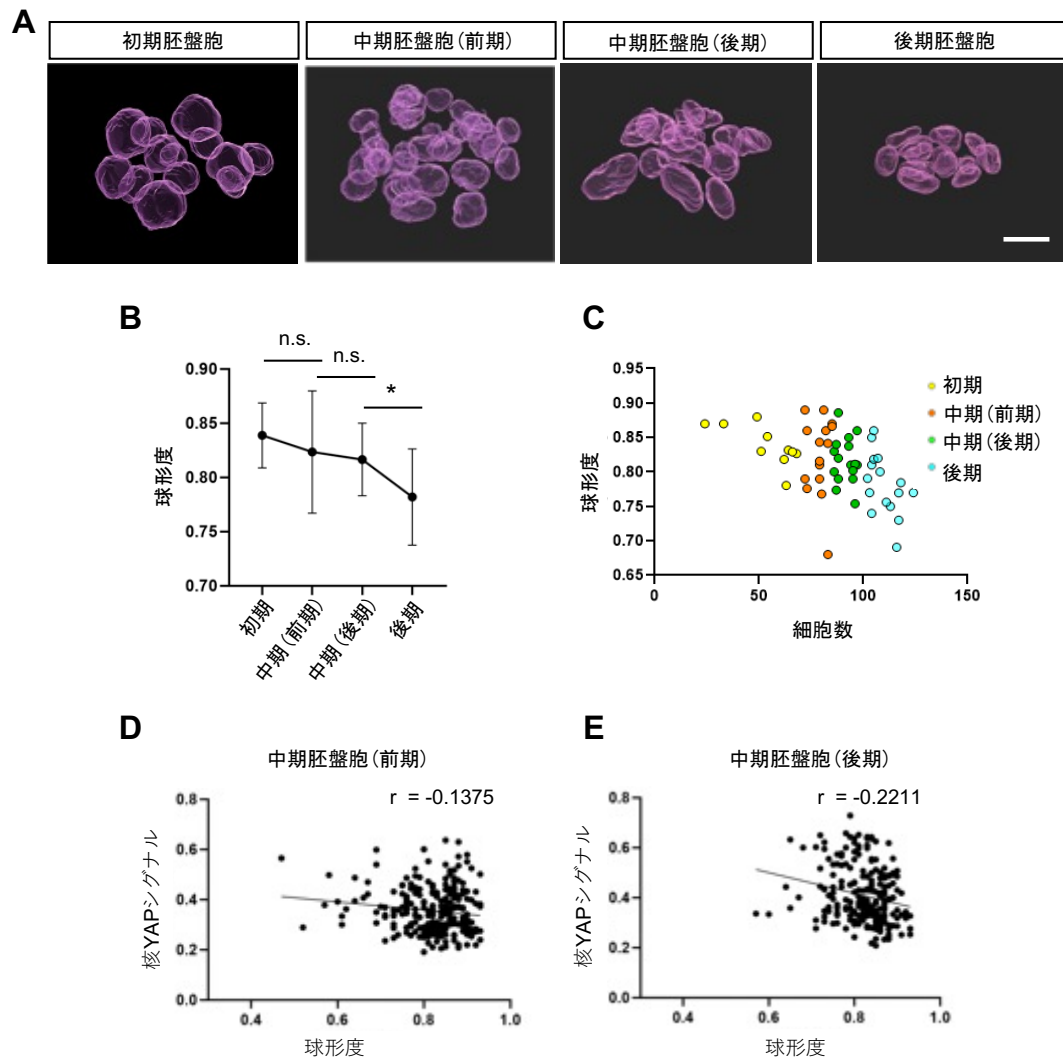


図 10. 核形態の扁平化は YAP の核移行に強く関与していない

- (A) 胚盤胞期における核形態の変化を示す代表的な解析画像。ピンクの構造それぞれが核を示す。スケールバーは 15 μm 。
- (B) 胚盤胞期における核形態の球形度の変化を示す折れ線グラフ。p 値は一元配置分散分析、ダンの多重比較検定により決定。* $p < 0.05$ 、n.s. : 有意でない。各ステージの解析サンプル数：初期胚盤胞(N = 10)、中期胚盤胞(前期)(N = 15)、中期胚盤胞(後期)(N = 16)、後期胚盤胞(N = 16)。
- (C) 内部細胞塊/エピブラストにおける総細胞数と球形度との逆相関を示すドットプロット。
- (D) 中期胚盤胞(前期)の内部細胞塊における核の球形度と核 YAP シグナルの相関を示すドットプロット(n = 263)。
- (E) 中期胚盤胞(後期)の内部細胞塊における核の球形度と核 YAP シグナルの相関を示すドットプロット(n = 216)。

3.4: YAP の核移行には細胞質の F-アクチンが必要である

3.4.1: 中期胚盤胞において細胞質の F-アクチンシグナルは核 YAP シグナルの増加と相関する

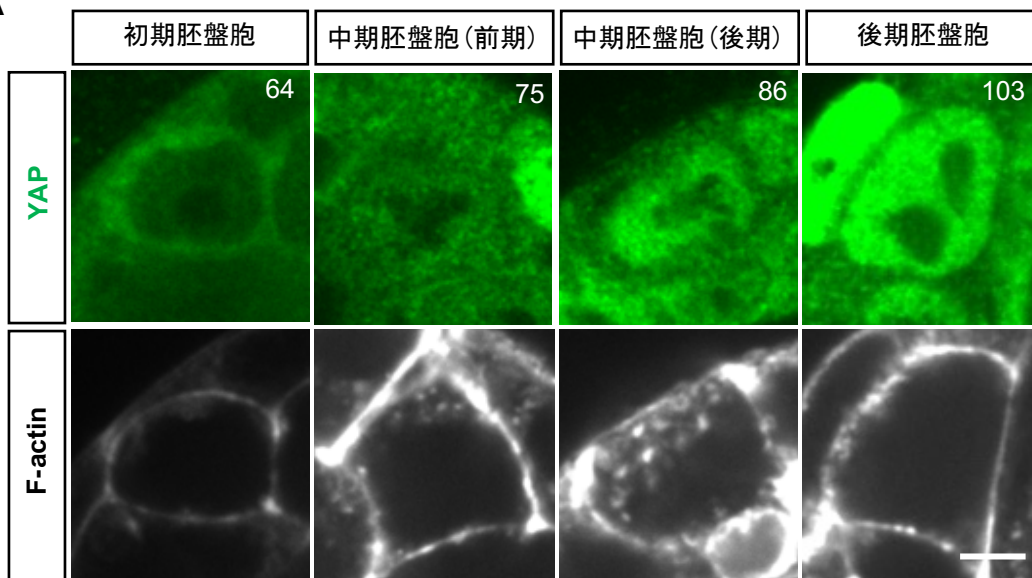
培養細胞では、力学的制御において細胞質の F-アクチンが YAP 局在の制御に重要な役割を果たすことが知られている(Zhao et al. 2011; Wada et al. 2011; Dupont et al. 2011; Aragona et al. 2013)。そこで、YAP の核移行が始まる中期胚盤胞においても、細胞質の F-アクチンが YAP 局在を制御するという仮説を立てた。この仮説を検証するために、胚盤胞期の内部細胞塊/エピブラスト細胞での細胞質の F-アクチンシグナルの変化を調べた(図 11A-C)。

細胞質の F-アクチンシグナルは初期胚盤胞では観察されないが、初期胚盤胞から中期胚盤胞(後期)にかけて徐々に増加した。特に中期胚盤胞(前期)ではドット状の F-アクチンシグナルが見られ、中期胚盤胞(後期)になるとこれらドット状の F-アクチンシグナルが明瞭に確認できるようになった。このような細胞質の F-アクチンシグナルが上昇する時期は、YAP が核局在へ移行する時期と一致している(図 11B、C)。

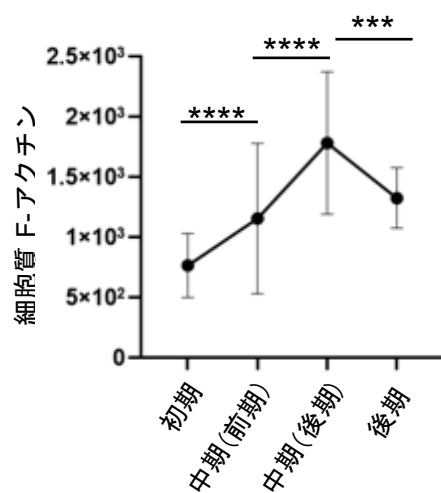
中期胚盤胞における核 YAP シグナルと細胞質 F-アクチンシグナルとの相関関係を調べた。中期胚盤胞(前期)(図 11D)においては相関係数が 0.3063 と弱い正の相関が見られるが、中期胚盤胞(後期)(図 11E)においては相関係数が 0.6306 と強い正の相関がみられた。中期胚盤胞(後期)から後期胚盤胞にかけては、細胞質 F-アクチンシグナルが顕著に減少したため、核 YAP レベルとの相関関係は見られなかった(図 11A-C)。

以上の結果から、初期胚盤胞から中期胚盤胞において、細胞質の F-アクチンの増加が観察され、特に中期胚盤胞では細胞質の F-アクチンの増加と核 YAP シグナルの上昇に正の相関関係があることがわかった。

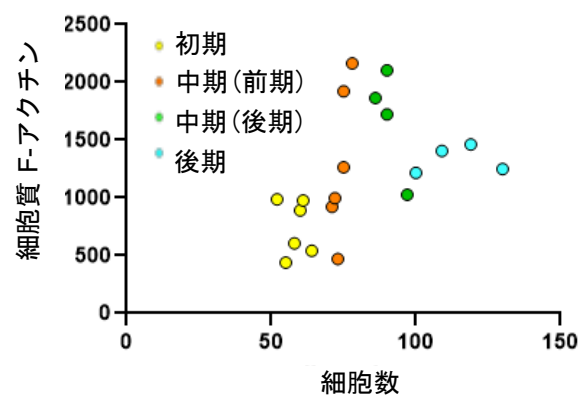
A



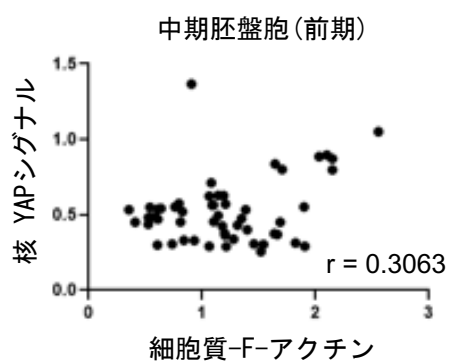
B



C



D



E

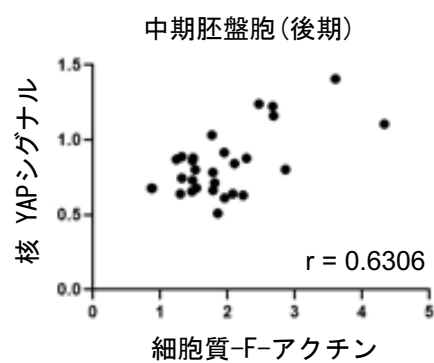


図 11. 胚盤胞期において細胞質の F-アクチンと核 YAP シグナルの増加は相関関係にある

- (A) 胚盤胞期における YAP 局在と細胞質 F-アクチン(phalloidin)の変化を示す代表的な免疫蛍光画像。スケールバーは 5 μm 。右上の数字は細胞数。
- (B) 胚盤胞期における細胞質 F-アクチン(phalloidin)シグナル蛍光強度の変化を示す折れ線グラフ。p 値は一元配置分散分析、ダンの多重比較検定により決定。*** $p < 0.001$ 、*** $p < 0.0001$ 。各ステージの解析サンプル数：初期胚盤胞($n = 84$)、中期胚盤胞(前期)($n = 75$)、中期胚盤胞(後期)($n = 37$)、後期胚盤胞($n = 32$)。
- (C) 内部細胞塊/エピブラストにおける総細胞数と細胞質 F-アクチンとの相関を示すドットプロット。
- (D) 中期胚盤胞(前期) の内部細胞塊における細胞質 F-アクチン(phalloidin)と核 YAP シグナルの相関を示すドットプロット($n = 56$)。
- (E) 中期胚盤胞(後期) の内部細胞塊における細胞質 F-アクチン(phalloidin)と核 YAP シグナルの相関を示すドットプロット($n = 29$)。
-

3.4.2: 中期胚盤胞の細胞質の F-アクチンは繊維状の構造をとる

中期胚盤胞における細胞質の F-アクチンは、ドット状の形態として観察された(図 11A)。アクチンは細胞内で様々な形態で観察される。培養細胞では、細胞質の F-アクチンは基質と接着する力を受容し、基質と核とを繋ぐストレスファイバー構造と呼ばれる形態となる(Wada et al. 2011; Elosegui-Artola et al. 2017)。マウスの桑実胚における細胞質の F-アクチンは、メッシュワークと呼ばれる、細胞質に一律に網をはったような構造を作り、細胞外からの力を核へと伝達させることが知られている(Skory et al. 2023)。そこで、内部細胞塊の細胞質の F-アクチンの構造をより詳細に確認するために、YAP の核局在シグナルと細胞質 F-アクチンシグナルとの強い相関関係(図 11E)のある中期胚盤胞(後期)を免疫蛍光染色し、超解像レーザー顕微鏡で F-アクチンを観察した。

十分に YAP が核に局在する(図 13BC の赤い YAP 染色により確認した)内部細胞塊の細胞を、3 次元画像に構築して観察した。内部細胞塊の一部を広い視野で観察すると、SOX2 陽性の細胞では F-アクチンの白いシグナルで細胞の形態が確認できるほど、強いシグナル輝度が観察された(図 12A)。内部細胞塊の細胞の一つを 3 次元に構築した画像(図 12B)2 次元の生データ写真(図 12C)どちらにおいても、細胞質 F-アクチンの微細な繊維状の形態が観察された(図 12B、C の黄色い矢頭の部分)。以上のことから、中期胚盤胞の細胞質で観察されたドット状の F-アクチンは、短い繊維状の構造をしていることが観察された。

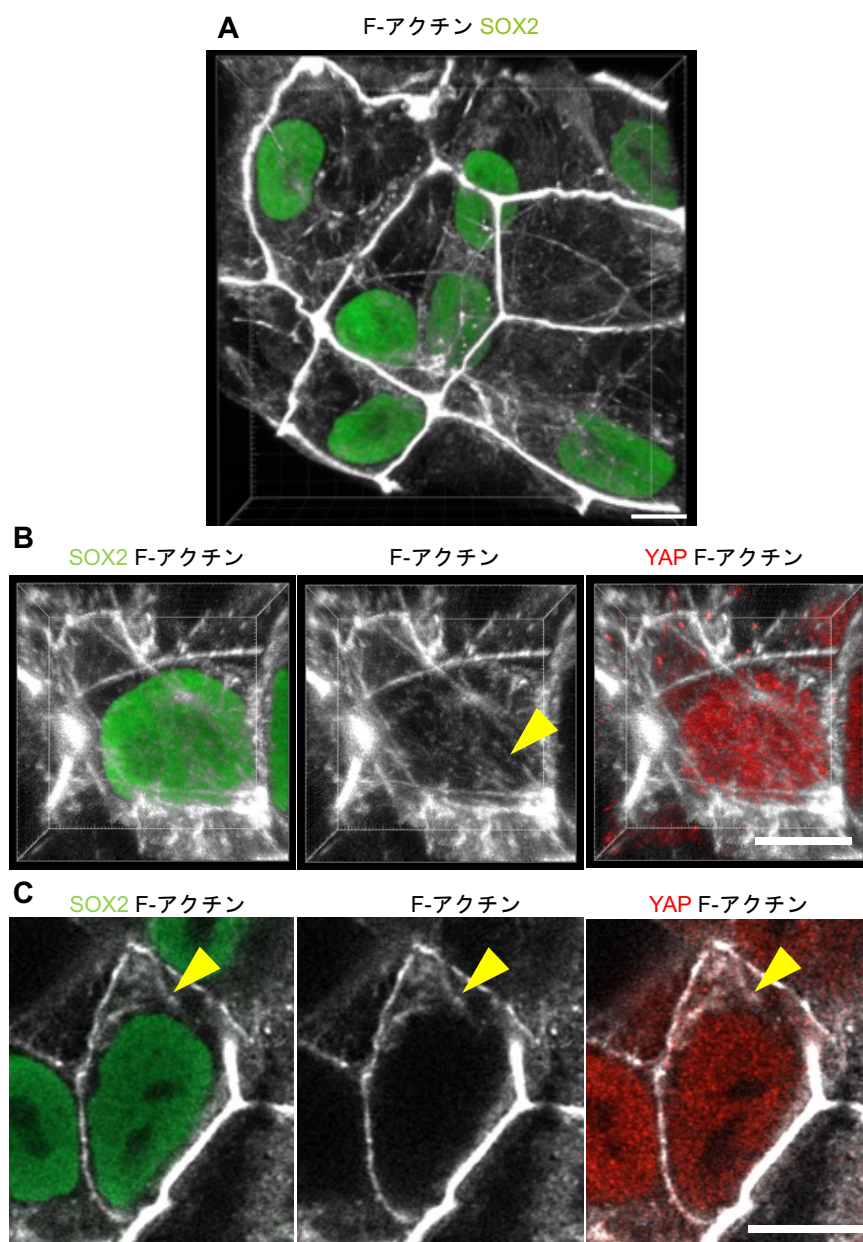


図 12. F-アクチンの超解像撮影写真

- (A) 中期胚盤胞(後期)の内部細胞塊の一部を 3 次元に構築した蛍光染色画像。スケールバーは 10 μm 。
- (B) 中期胚盤胞(後期)の内部細胞塊の細胞一つを 3 次元に構築した蛍光染色画像。(左)SOX2 と F-アクチン(phalloidin)、(中央) F-アクチン(phalloidin)、(右)YAP と F-アクチン(phalloidin)を染色。黄色の矢頭は細胞質の繊維状 F-アクチンシグナルの一つを示す。スケールバーは 10 μm 。
- (C) 中期胚盤胞(後期)の内部細胞塊の細胞一つの超解像撮影画像。(左)SOX2 と F-アクチン(phalloidin)、(中央) F-アクチン(phalloidin)、(右)YAP と F-アクチン(phalloidin)を染色。黄色い矢頭は細胞質の繊維状のアクチンシグナルを示す。スケールバーは 10 μm 。

3.4.3: 胞胚腔を拡大すると細胞質の F-アクチンが増加する

発生の進行に伴う F-アクチンの増加が胞胚腔の拡大によるものかを調べるために、胞胚腔を拡大/縮小した胚における内部細胞塊の細胞質 F-アクチンの変化を観察した。中期胚盤胞(前期)に胞胚腔を拡大した胚では、細胞質の F-アクチンシグナルが有意に上昇した(図 13A、B)。また、中期胚盤胞(後期)に胞胚腔を縮小した胚では細胞質の F-アクチンシグナルが有意に減少した(図 13C、D)。以上の結果から、発生に伴う胞胚腔の拡大によって、細胞質 F-アクチンの増加に関与することが示唆された。

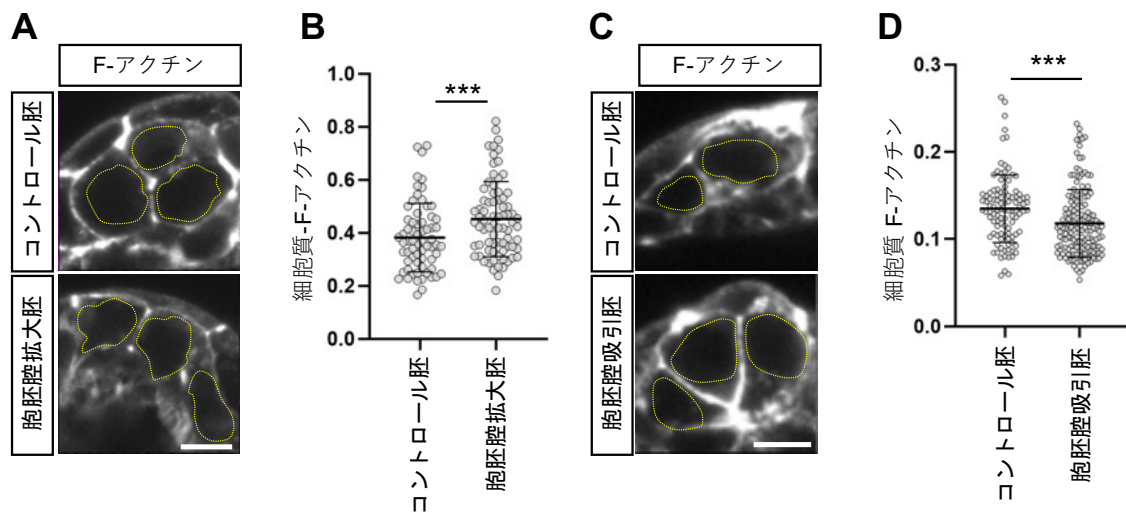


図 13. 胞胚腔の拡大は細胞質の F-アクチンを増加させる

- (A) 胞胚腔拡大胚の内部細胞塊における細胞質 F-アクチン(phalloidin)の代表的な免疫蛍光画像。スケールバーは 10 μm 。点線は内部細胞塊の核を示す。
- (B) 胞胚腔拡大胚における細胞質 F-アクチン(phalloidin)のシグナルを示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの t 検定により決定。***p < 0.001。各群の解析サンプル数：コントロール胚(n = 66)、胞胚腔拡大胚(n = 76)。
- (C) 胞胚腔吸引胚の内部細胞塊における細胞質 F-アクチン(phalloidin)の代表的な免疫蛍光画像。スケールバーは 10 μm 。点線は内部細胞塊の核を示す。
- (D) 胞胚腔吸引胚における細胞質 F-アクチン(phalloidin)のシグナルを示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの t 検定により決定。***p < 0.001。各群の解析サンプル数：コントロール胚(n = 105)、胞胚腔吸引胚(n = 162)。

3.5: 細胞質の F-アクチンを減少させると YAP の核移行が抑制される

3.5.1: *Lmna* KO 胚の作成

細胞質の F-アクチンと YAP の核移行との因果関係を証明する別のアプローチとして、核ラミナの役割に着目した。発生に伴い胞胚腔が拡大すると、細胞膜には機械的な力が加わることで細胞の形状を変化させる。細胞膜の機械的な力は細胞質の F-アクチンを介して核に伝達される。細胞質の F-アクチンは、LINK 複合体との相互作用を介して核ラミナに力を伝える。核ラミナは核膜を裏打ちするタンパク質であり、LAMIN A/C と LAMIN B からなり、F-アクチンと LAMIN A/C の量は細胞の張力に依存する。強い張力を受ける細胞ほど、細胞質の F-アクチンと核膜の LAMIN A/C が増加する(Kim et al. 2017; Coutinho et al. 2009; Turgay et al. 2017)。そこで、細胞質 F-アクチンを減少させるために、ゲノム編集で LAMIN A をエンコードする *Lmna* 遺伝子を破壊した。1 細胞期胚に CRISPR/Cas9 と 2 種類の *Lmna* sgRNA をエレクトロポレーションで導入した。*Lmna* KO の効率は 55%(N=15/27)であった(図 14A-C)。 *Lmna* KO の確認は LAMIN A/C 抗体で行い、LAMIN A/C の染色がされない *Lmna* KO 胚のみを以降の解析に用いた(図 14D、E)。

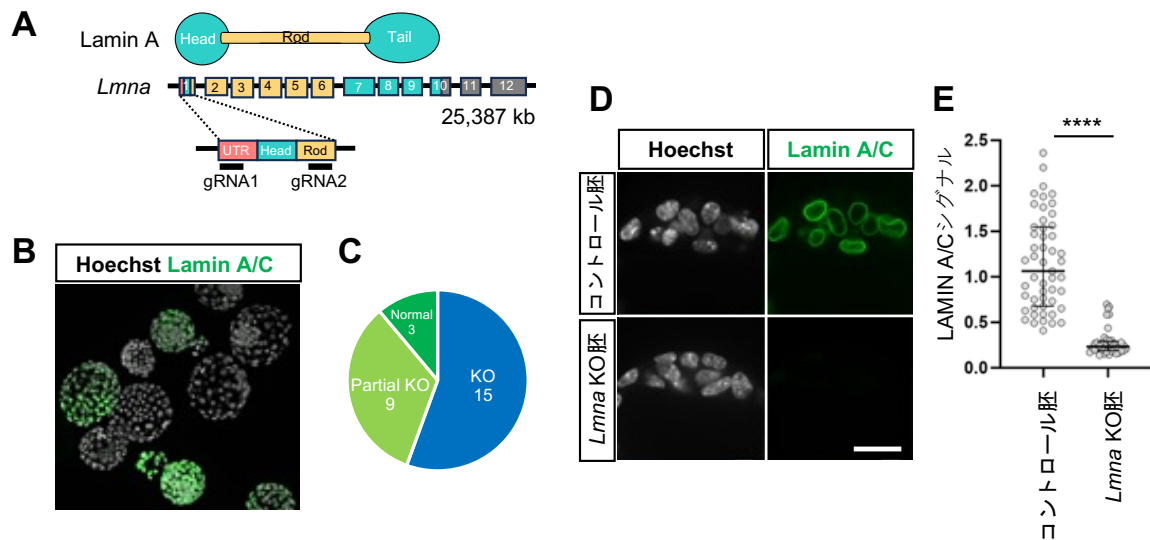


図 14. *Lmna* KO 胚の作成

- (A) *Lmna* 遺伝子の gRNA の位置を模式的に示す。上；LAMINA タンパク質のドメイン構造、中；遺伝子構造、下；エクソン 1 の拡大。エキソンはタンパク質ドメインで色分けされている。
- (B) ゲノム編集胚における LAMIN A/C 発現の減少を示す代表的な免疫蛍光画像。緑は LAMIN A/C、白は Hoechst シグナルを示す。
- (C) ゲノム編集による *Lmna* 遺伝子のノックアウト(KO)効率を示す円グラフ。KO は LAMIN A/C シグナルを持たない胚を表す。KO 胚のみを解析に用いた。
- (D) *Lmna* KO 胚における LAMIN A/C の不在を示す代表的な免疫蛍光画像。スケールバーは 25 μ m。
- (E) *Lmna* KO 胚における LAMIN A/C シグナルの減少を示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。**** $p < 0.0001$ 。各グループの解析サンプル数：コントロール胚($n=51$)、*Lmna* KO 胚($n=40$)。

3.5.2: *Lmna* KO 胚はマウス着床前胚発生に影響がない

核膜の裏打ちタンパクである Lamin A/C は細胞質の F-アクチンと核内のクロマチンとを繋ぐコンポーネントの一つであり、核の構造安定化やクロマチンの組織化、転写などの核内活性に影響することが知られている(Coutinho et al. 2009; Turgay et al. 2017)。Lamin A/C を欠如したマウスは出産されるが正常マウスの半分程度の大きさで、早期に進行性拡張型の心筋症になる(Nikolova et al. 2004)。以上の知見から、*Lmna* の欠如はマウス着床前胚発生に影響が出る可能性は低いと考え、*Lmna* 欠如胚を後期胚盤胞まで培養し、胞胚腔の拡大とエピブラストと原始内胚葉への分化が正常に観察されるかを確認した。*Lmna* KO 胚を後期胚盤胞まで培養し胞胚腔の大きさは、コントロール胚とほぼ変化がないことが確認された(図 15A)。SOX2 の染色によりエピブラスト形成を確認したところ、コントロール胚とほぼ変化がないことが確認された(図 15B)。原始内胚葉の特異的マーカーである SOX17 の発現では、*Lmna* KO 胚はコントロール胚と変わらない単層構造の原始内胚葉が観察された(図 15C)。

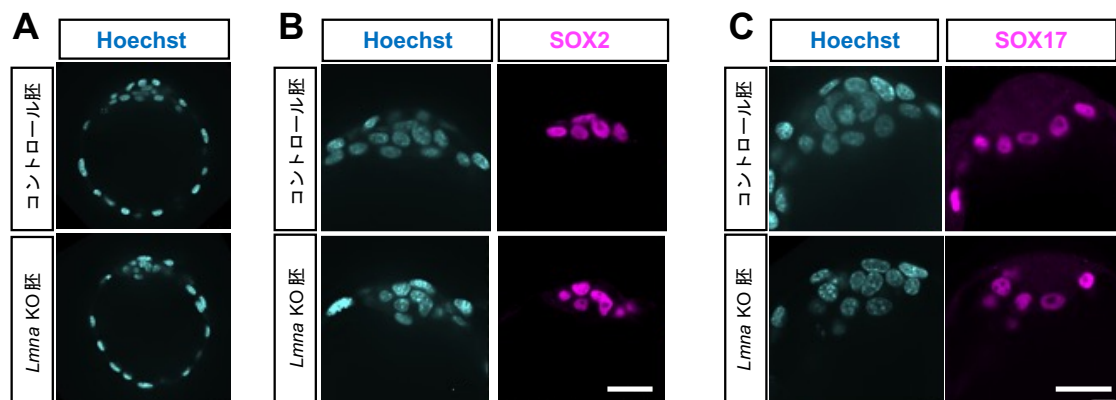


図 15. *Lmna* KO 胚は発生には影響がない

- (A) *Lmna* KO 胚は胞胚腔の形態に影響がないことを示す代表的な免疫蛍光画像。
- (B) *Lmna* KO 胚はエピプラスト形成に影響がないことを示す代表的な免疫蛍光画像。スケールバーは 25 μm 。
- (C) *Lmna* KO 胚は原始内胚葉形成に影響がないことを示す代表的な免疫蛍光画像。SOX17 は原始内胚葉特異的のマーカである。スケールバーは 25 μm 。

3.5.3: *Lmna* KO による細胞質 F-アクチンの減少は核 YAP シグナルを減少させる

Lmna KO により LaminA/C/と LINC complex を介した細胞質 F-アクチンとの結合が阻害されているかを確かめるために、*Lmna* KO 胚の中期胚盤胞(後期)の内部細胞塊における細胞質の F-アクチンを調べた。*Lmna* KO 胚の細胞質の F-アクチンシグナルは、コントロール胚と比較して有意に減少した(図 16A、B)。このことから、LAMIN A/C はマウス着床前胚においても LINC complex を介して細胞質のアクチンと結合しており、*Lmna* KO 胚で細胞質 F-アクチンが減少したと考えられる。*Lmna* KO 胚で細胞質の F-アクチンが減少したことから、*Lmna* KO 胚における YAP の核局在シグナルを調べた。*Lmna* KO 胚の中期胚盤胞(後期)では、内部細胞塊の核 YAP シグナルは有意に減少した(図 16C、D)。このことから、YAP の核局在には細胞質の F-アクチンの増加が必要である。しかし、LAMIN A/C は核の構造を安定化させる役割があるため、*Lmna* KO により核形態が不安定になり、胞胚腔の拡大による核形態に影響が出ている可能性がある。内部細胞塊での核形態の扁平化と YAP の核移行には弱い相関関係があるため、球形度の上昇による核 YAP シグナル減少の可能性を検証する。*Lmna* KO 胚の内部細胞塊の核の球形度を解析した。コントロール胚と *Lmna* KO 胚の有意差はなく(図 16E、F)、核形態の扁平度の低下による核 YAP シグナルの減少が誘導された可能性は低いと考えられる。以上の結果は、*Lmna* KO による細胞質の F-アクチンの減少は、核形態の球形度を変化させることなく、核 YAP シグナルを減少させたことを示唆している。

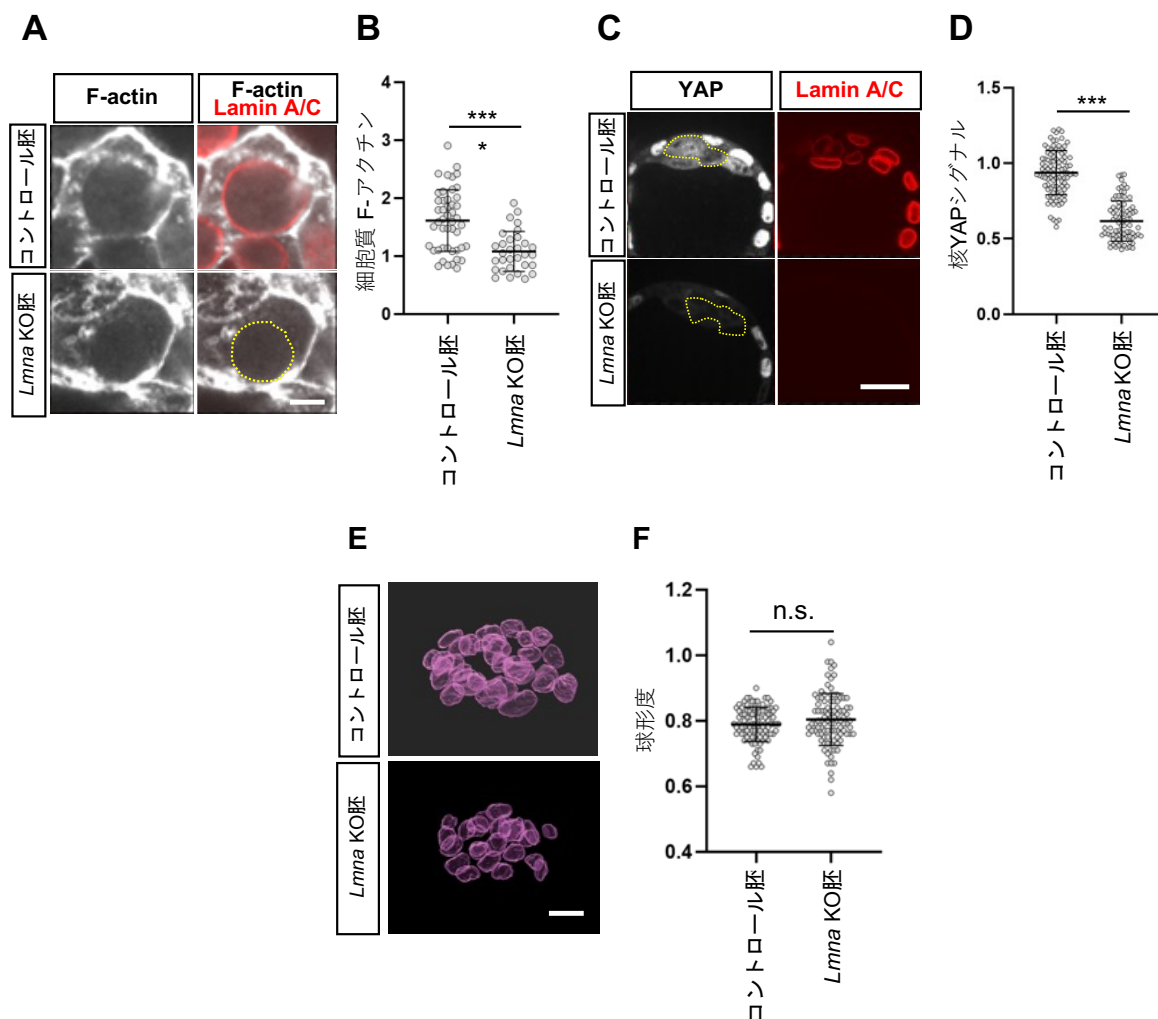


図 16. *Lmna* KO による細胞質の F-アクチンの減少は球形度を変化させず YAP の核移行を抑制する

- (A) *Lmna* KO 胚における細胞質 F-アクチン(phalloidin)の代表的な免疫蛍光画像。 *Lmna* KO 胚パネルにある点線は核の位置を示す。スケールバーは 5 μ m。
- (B) *Lmna* KO 胚における細胞質 F-アクチン(phalloidin)のシグナル蛍光強度を示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。*** $p < 0.0001$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚 ($n = 47$)、*Lmna* KO 胚($n = 31$)。
- (C) *Lmna* KO 胚における YAP の代表的な免疫蛍光画像。点線は内部細胞塊を示す。スケールバーは 25 μ m。
- (D) *Lmna* KO 胚における核 YAP シグナルの減少を示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。*** $p < 0.001$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚($n = 99$)、*Lmna* KO 胚($n = 84$)
- (E) *Lmna* KO 胚における核形態の代表的な解析画像。スケールバーは 15 μ m。
- (F) *Lmna* KO 胚における球形度を示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。 n.s. : 有意でない。各群の解析サンプル数：コントロール胚($n = 99$)、*Lmna* KO 胚($n = 100$)。

3.6: タンキラーゼ依存的な AMOT の分解は YAP の核局在化を促進する

3.6.1: 胚盤胞期では p-YAP シグナルが次第に減少する

Hippo シグナル伝達経路は YAP の局在制御に重要な役割を果たしている。Hippo シグナル伝達経路が活性化されると、LATS1/2 によるセリン残基 112(S112)を含む YAP のリン酸化が促進される(Zhao et al. 2007)。胚盤胞期における Hippo シグナル伝達経路の活性変化を調べるために、S112 のリン酸化 YAP(p-YAP)の内部細胞塊でのシグナル蛍光強度の変化を調べた。p-YAP シグナルは発生が進むにともなって減少する傾向があり、中期胚盤胞(後期)から後期胚盤胞にかけて有意に減少した(図 17A-C)。当研究室でのこれまでの結果と一致し、p-YAP シグナルは後期胚盤胞の内部細胞塊では観察されなかった(Hashimoto and Sasaki, 2019)。以上の結果から、内部細胞塊における Hippo シグナル伝達経路の活性は胚盤胞期で徐々に低下し、後期胚盤胞ではほとんど観察されないことが明らかになった。

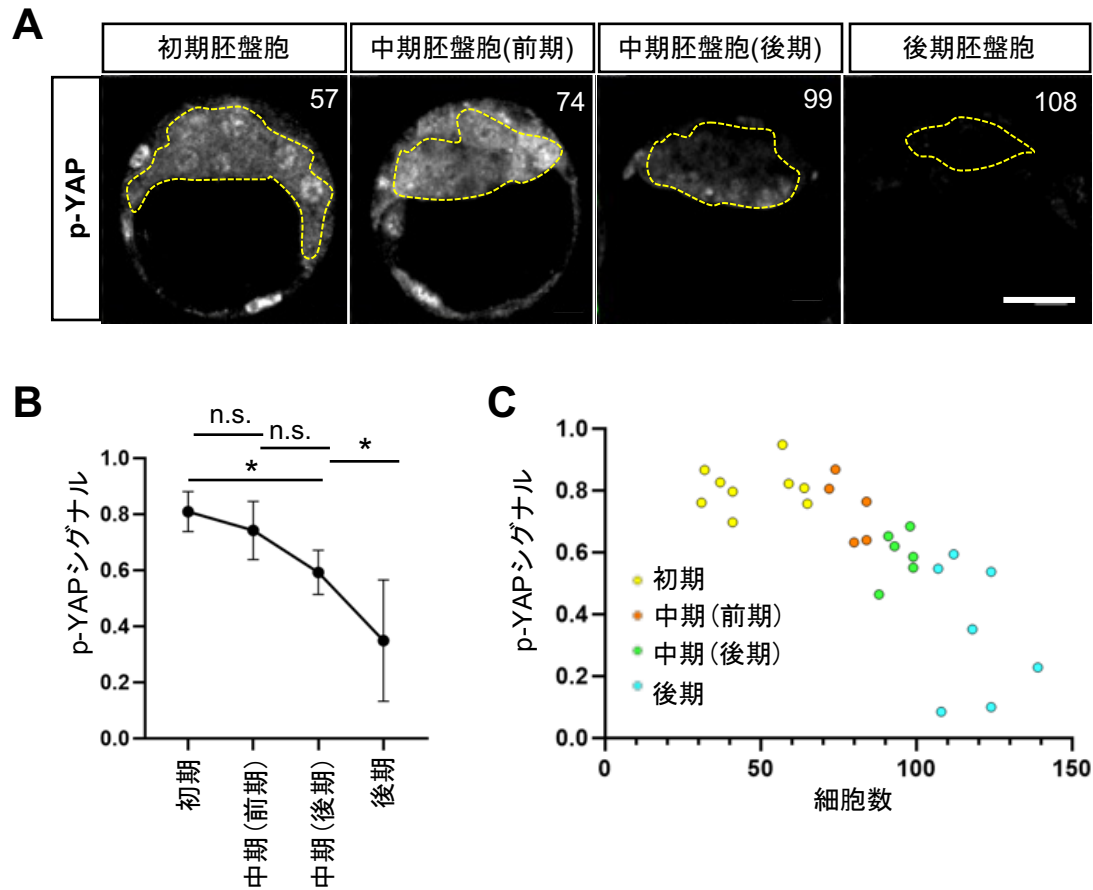


図 17. 胚盤胞期では p-YAP が次第に減少する

- (A) 胚盤胞期における p-YAP シグナルの代表的な免疫蛍光画像。点線は内部細胞塊/エピブラストを表す。スケールバーは 25 μm 。点線は内部細胞塊を示す。右上の数字は細胞数を示す。
- (B) 胚盤胞期における p-YAP シグナルの変化を示す折れ線グラフ。p 値は一元配置分散分析(one-way ANOVA)、ダンの多重比較検定(Dunn's multiple comparison test)により決定。* $p < 0.05$ 、n.s. ; 有意でない。各ステージで解析したサンプル数: 初期胚盤胞(N = 9)、中期胚盤胞(前期)(N = 5)、中期胚盤胞(後期)(N = 6)、後期胚盤胞(N = 7)。
- (C) 内部細胞塊/エピブラストにおける細胞数と p-YAP との逆相関を示すドットプロット。

3.6.2: 胚盤胞期では AMOT の発現が次第に減少する

初期胚盤胞の内部細胞塊では、Hippo シグナル伝達経路は細胞接着によって活性化されることが知られている。このときの活性化には Hippo シグナル伝達経路の一員である、AMOT タンパク質の細胞接着部位への結合が必要である(Hirate et al. 2013)。マウス着床前胚の内部細胞塊においても Hippo シグナル伝達経路の不活性化の上流に、細胞接着部位に局在する AMOT が関与しているという仮説を立てた。まずは免疫蛍光染色により、胚盤胞期の内部細胞塊における AMOT タンパク質の発現変化を調べた。初期胚盤胞ではすべての細胞接着部位で強い AMOT シグナルが観察された。AMOT シグナルは初期胚盤胞から中期胚盤胞にかけて顕著に減少し、中期胚盤胞(後期)では一部の細胞の接着部位でのみ観察された。後期胚盤胞では、エピブラストの細胞で AMOT のシグナルがほとんど観察されなかった(図 18A-C)。これらの結果は、当研究室の以前の結果で初期胚盤胞と後期胚盤胞のみで提示した AMOT 活性パターンの変化をより詳細に記述するものである(Hashimoto and Sasaki, 2019)。このように、胚盤胞期の内部細胞塊における AMOT シグナルは発生の過程で徐々に減少し、特に胚盤胞期の前半でその減少が顕著に観察された。以上の結果から、マウス着床前胚の内部細胞塊においても、Hippo シグナル伝達経路が不活性化する上流機構として、細胞接着部位の AMOT が関与する可能性がある。

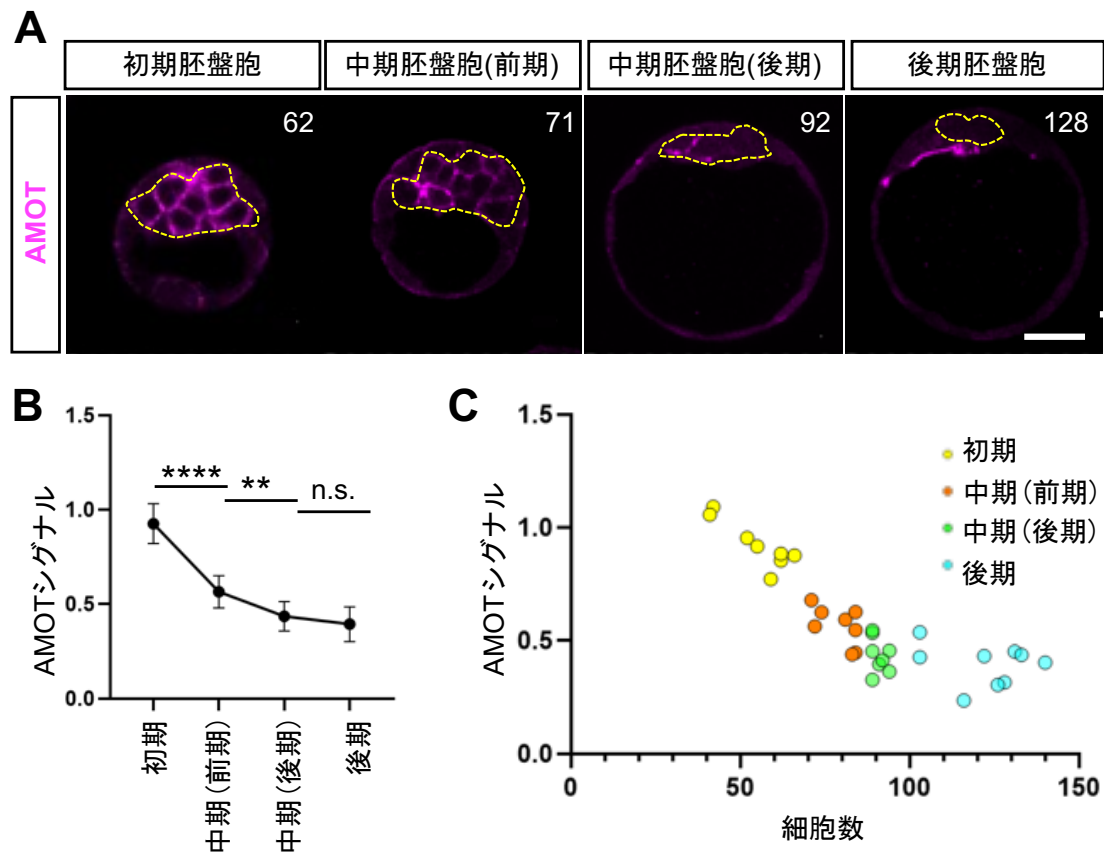


図 18. 胚盤胞期では AMOT が次第に減少する

- (A) 胚盤胞期における AMOT シグナルの代表的な免疫蛍光画像。点線は内部細胞塊/エピブラストを表す。スケールバーは 25 μm 。点線は内部細胞塊を示す。右上の数字は細胞数を示す。
- (B) 胚盤胞期における AMOT シグナル蛍光強度の変化を示す折れ線グラフ。p 値は一元配置分散分析、ダンの多重比較検定により決定。**** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.01$ 、n.s. ; 有意でない。各ステージで分析したサンプル数; 初期胚盤胞(N = 8)、中期胚盤胞(前期) (N = 8)、中期胚盤胞(後期) (N = 9)、後期胚盤胞(N = 9)。
- (C) 内部細胞塊/エピブラストにおける細胞数と AMOT のドットプロット。

3.6.3: 中期胚盤胞における AMOT の分解抑制は YAP の核移行を阻害する

中期胚盤胞における AMOT の減少が p-YAP の脱リン酸化を介して YAP の局在を制御している可能性を検証するために、胚盤胞期の AMOT の減少を抑制する実験を行った。AMOT ファミリーのタンパク質は、タンキラーゼ(TNKS1 および TNKS2)によるポリ ADP リボシル化、RNF146 E3 リガーゼによるユビキチン化を経て、ユビキチン依存的に分解される。培養細胞では、タンキラーゼの阻害剤である XAV939 で処理すると、AMOT の分解が抑制されることが知られている(Wang et al. 2015)。そこで、胚盤胞期での AMOT の急激な減少がタンキラーゼを介した AMOT の分解によるかを検証するために、中期胚盤胞(前期)の胚に XAV939 を添加し、中期胚盤胞(後期)までの 12 時間処理した。XAV939 で処理した胚の細胞数はコントロール胚と有意差がなく、この薬剤処理は発生に大きな影響を及ぼさなかった(図 19A)。XAV939 処理胚の中期胚盤胞(後期)の内部細胞塊では、AMOT シグナルが有意に増加した(図 19B、C)。この結果から、マウス着床前胚の内部細胞塊で観察される AMOT の減少は、タンキラーゼを介した分解機構により制御されることが示唆された。中期胚盤胞(後期)で AMOT が YAP のリン酸化に関与するかを確認するため、XAV939 添加胚で YAP と p-YAP の免疫蛍光染色を行った。XAV939 添加胚では、p-YAP シグナルは有意に増加して細胞質特異的な染色パターンが確認された(図 19F、G)。それと反比例して、YAP の核局在シグナルが有意に減少した(図 19D、E)。この結果は、分解が抑制されて増加した AMOT によって YAP がリン酸化され、細胞質に留まり、核への移行が阻害されたと考えられる。以上の結果から、中期胚盤胞で見られる AMOT タンパク質の減少には、タンキラーゼを介した分解が関与していることと、中期胚盤胞での YAP の核移行は AMOT が分解されて減少したことによる YAP へのリン酸化の減少により制御されていることが示唆された。

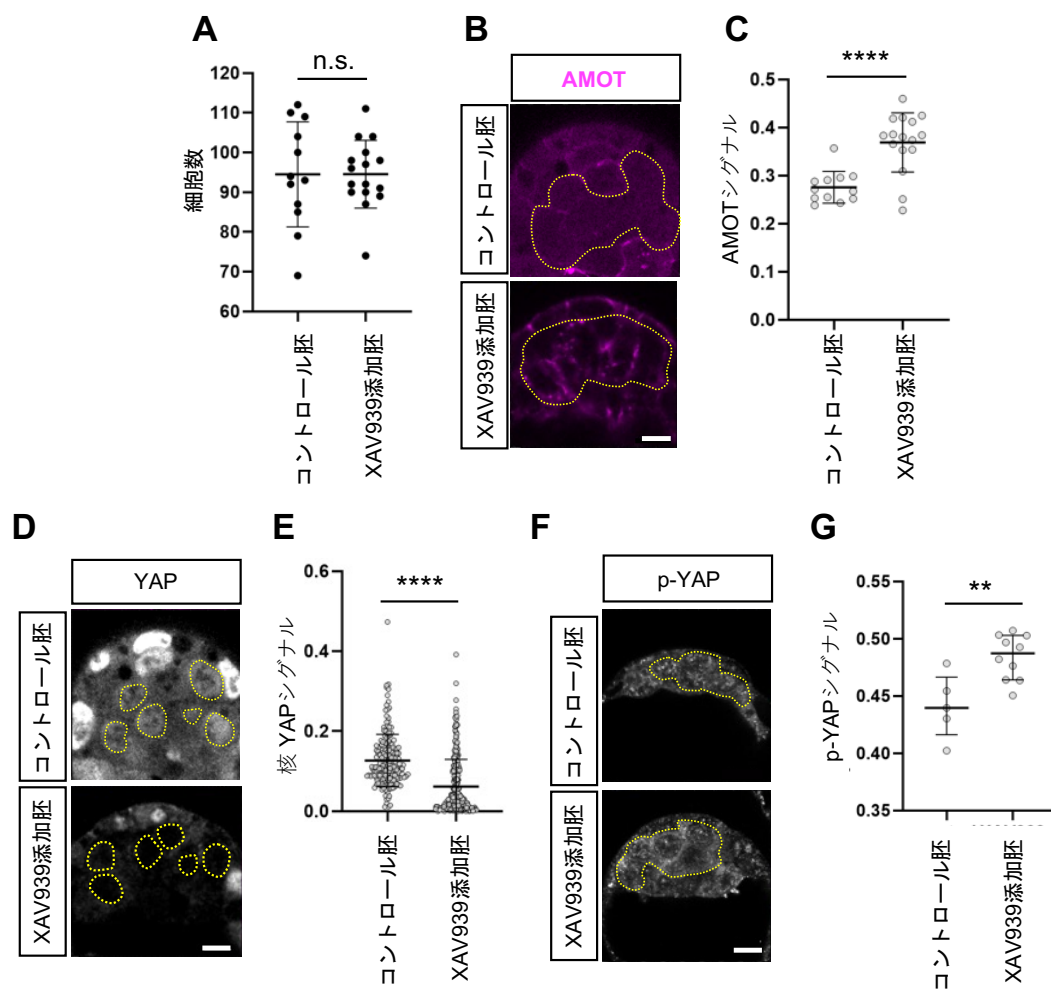


図 19. タンキラーゼを介した AMOT の分解の抑制は YAP の核移行を抑制する

- (A) XAV939 添加胚における細胞数を示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの t 検定により決定。n.s.; 有意でない。各群の解析サンプル数：コントロール胚(N = 12)、XAV939 添加胚(N = 16)。
- (B) XAV939 処理胚における AMOT シグナルの代表的な免疫蛍光画像。スケールバーは 10 μm 。点線は内部細胞塊を示す。
- (C) XAV939 処理胚における AMOT シグナルを示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの t 検定により決定。**** $p < 0.0001$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚(N = 12)、XAV939 添加胚(N = 16)。
- (D) XAV939 処理胚における YAP シグナルの代表的な免疫蛍光画像。スケールバーは 10 μm 。点線は内部細胞塊の核を示す。
- (E) XAV939 処理胚における核 YAP シグナル蛍光強度を示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの t 検定により決定。**** $p < 0.0001$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚(n = 186)、XAV939 添加胚(n = 278)。
- (F) XAV939 処理胚における p-YAP シグナルの代表的な免疫蛍光画像。スケールバーは 10 μm 。点線は内部細胞塊を示す。
- (G) XAV939 処理胚における p-YAP シグナル蛍光強度を示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの t 検定により決定。** $p < 0.01$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚(N = 5)、XAV939 添加胚(N = 10)。
-

3.7: YAP の核移行には内部細胞塊における SOX2 の発現が必要である

3.7.1: *Sox2* KO 胚の作製

中期胚盤胞では Hippo シグナル伝達経路が活性状態から不活性状態へと遷移し、YAP の核局在は徐々に上昇する。この Hippo シグナル伝達経路の経時的な変化が内部細胞塊からエピブラストへの分化過程により制御されているという仮説を立てた。これを検証するため、転写因子の SOX2 に注目した。SOX2 は多能性因子としても知られ、内部細胞塊とエピブラスト細胞のマーカーとして胚盤胞の全ての細胞で観察され、内部細胞塊の細胞分化の制御に関与する(Guo et al. 2010; Wicklow et al. 2014)。SOX2 を欠如したマウス胚では内部細胞塊は形成されるが、エピブラストの形成が不完全となり E7.5 に胚性致死となる(Avilion et al. 2003)。以上のことから、内部細胞塊への分化を抑制するツールとして *Sox2* KO 胚を作製することにした。SOX2 は YAP の局在が大きく変化する中期胚盤胞(前期)から後期胚盤胞にかけて顕著に上昇する(図 20A、B)。この結果から、当研究室の以前の結果と合わせて核 YAP シグナルと SOX2 シグナルは相関関係にあることがわかった。*Sox2* KO 胚は 3 種類の gRNA を設計し、エレクトロポレーション法により作製した(図 20C)。*Sox2* KO 胚を SOX2 の免疫蛍光染色で確認したところ、KO 効率は 100%であった(N = 50/50 胚)(図 20D)。

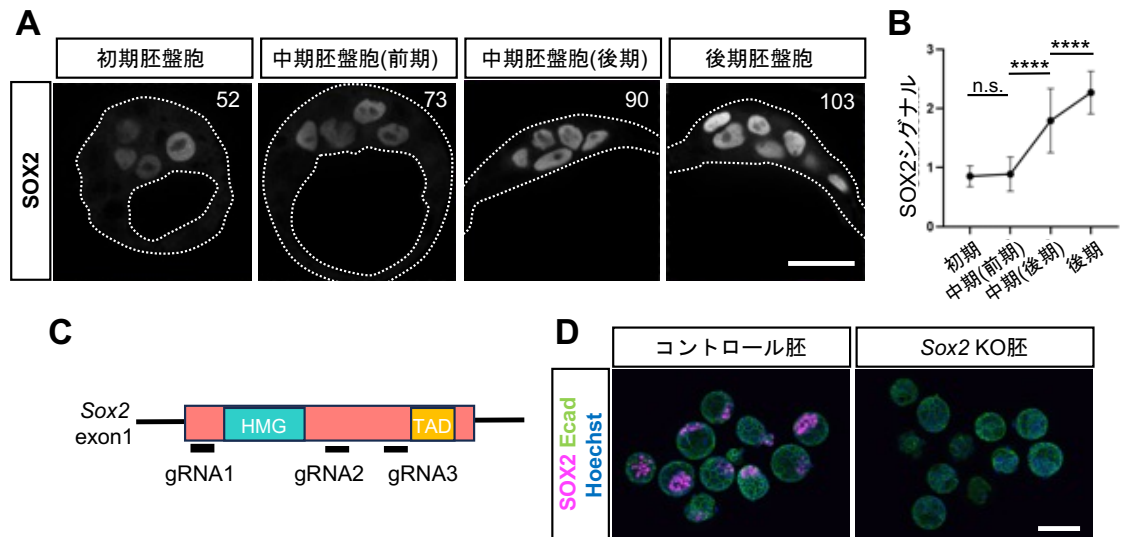


図 20. 胚盤胞期での SOX2 の発現と *Sox2* KO 胚の作製

- (A) 胚盤胞期における SOX2 発現の代表的な免疫蛍光画像。点線は胚と胞胚腔を示す。スケールバーは 25 μm 。右上の数字は細胞数を示す。
- (B) 胚盤胞期における SOX2 シグナルの変化を示す折れ線グラフ。p 値は一元配置分散分析(one-way ANOVA)、ダンの多重比較検定(Dunn's multiple comparison test)により決定。**** $p < 0.0001$ 、n.s. ;有意でない。各ステージの解析サンプル数：初期胚盤胞($n = 109$)、中期胚盤胞(前期) ($n = 70$)、中期胚盤胞(後期) ($n = 67$)、後期胚盤胞($n = 118$)。
- (C) Sox2 とその gRNA の模式図。
- (D) *Sox2* KO 胚における SOX2 発現の欠如を示す代表的な免疫蛍光画像。スケールバーは 100 μm 。

3.7.2: Sox KO 胚では AMOT の発現が維持され YAP の核移行が阻害される

Sox2 KO によりエピブラストの細胞分化を抑制した中期胚盤胞で核 YAP シグナルを確認した。Sox2 KO 胚の中期胚盤胞(前期)の内部細胞塊では核 YAP シグナルが全く見られなかった(図 21A、B)。Sox2 KO 胚では、エピブラストへの細胞分化による Hippo シグナル伝達経路の不活性化が阻害されている可能性がある。Hippo シグナル伝達経路の上流の AMOT の発現を調べた。中期胚盤胞(後期)では AMOT シグナルがほとんど観察されなくなる時期だが、Sox2 KO 胚の AMOT の発現は有意に上昇していた(図 21C、D)。このことから、Sox2 KO 胚では AMOT が分解されず、YAP の核移行が抑制されたと考えられる。実際に、p-YAP を染色したところ、p-YAP のシグナルは有意に上昇し、細胞質特異的な局在が観察された(図 21E、F)。

以上の結果から、Sox2 KO 胚では AMOT の活性化、Hippo シグナル伝達経路の活性化によって YAP はリン酸化され、細胞質に留まり、核への移行が阻害された。内部細胞塊がエピブラストへと分化する過程で、AMOT の分解を介して Hippo シグナル伝達経路を不活性化させ、YAP へのリン酸化をなくすことで、YAP の核への移行を促進するメカニズムが示唆される。

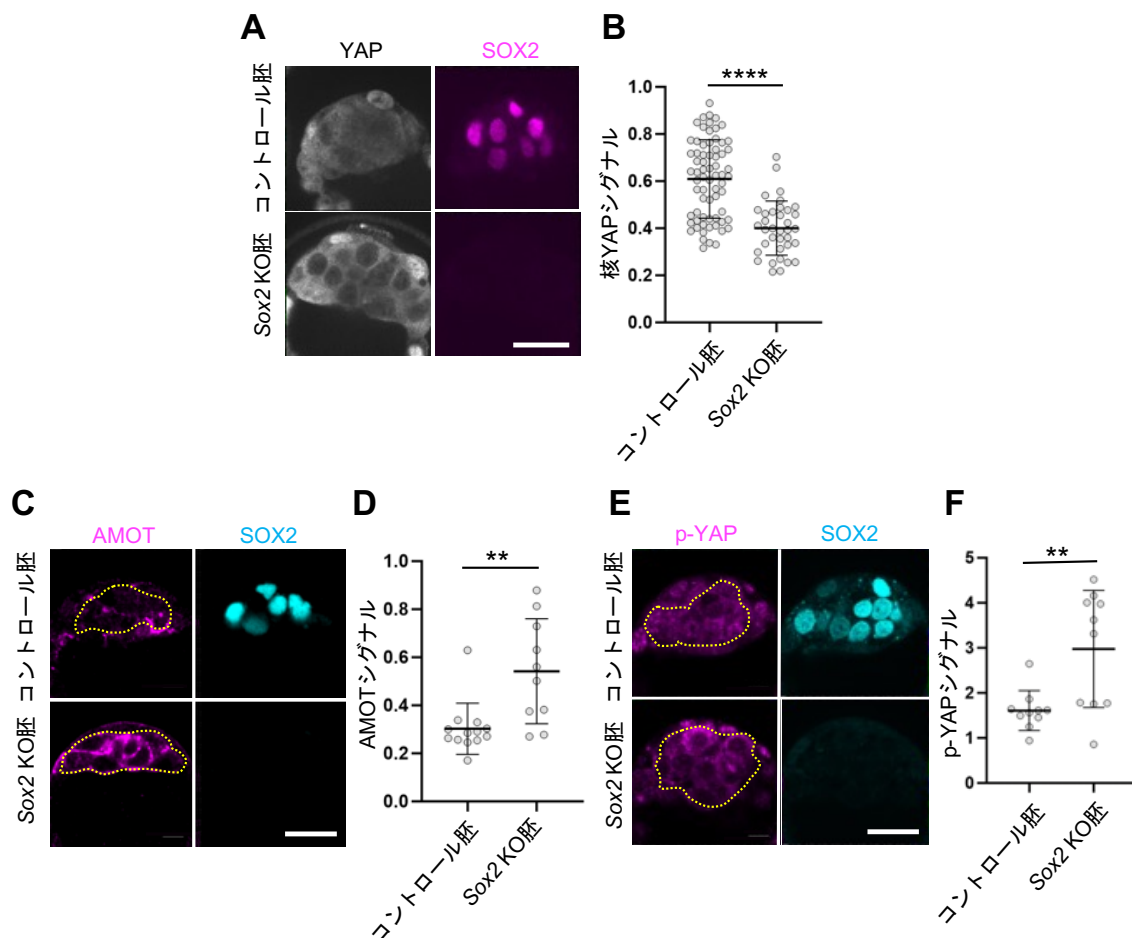


図 21. *Sox2* KO は AMOT を介して YAP の核移行を抑制する

- (A) *Sox2* KO 胚における YAP と SOX2 の発現の典型的な免疫蛍光画像。スケールバーは 25 μm 。
- (B) *Sox2* KO 胚における核 YAP シグナルの減少を示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。**** $p < 0.0001$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚($n = 69$)、*Sox2* KO 胚($n = 36$)。
- (C) *Sox2* KO 胚における AMOT と SOX2 シグナルの代表的な免疫蛍光画像。点線は内部細胞塊を示す。スケールバーは 25 μm 。
- (D) *Sox2* KO 胚における AMOT シグナルを示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。** $p < 0.01$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚($N = 10$)、*Sox2* KO 胚 ($N = 10$)。
- (E) *Sox2* KO 胚における p-YAP および SOX2 発現の代表的な免疫蛍光画像。点線は内部細胞塊を表す。スケールバーは 25 μm 。
- (F) *Sox2* KO 胚における p-YAP シグナルを示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。** $p < 0.01$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚($N = 13$)、*Sox2* KO 胚($N = 10$)。

3.8: 胞胚腔の拡大は AMOT を介した Hippo シグナル伝達経路とは無関係に YAP の局在制御に關与する

これまでに、中期胚盤胞の内部細胞塊での YAP の核移行を促進するメカニズムとして、胞胚腔の拡大によるメカニズムと、AMOT が分化過程で分解されることによる Hippo シグナル伝達経路の不活性化によるメカニズムの 2 種類を示した。AMOT を介したメカニズムでは YAP は AMOT の不活性化による脱リン酸化により核移行するが、胞胚腔拡大によるメカニズムではどのように YAP が核に移行するかを示していない。そこで、胞胚腔のサイズ操作を行った胚における YAP の局在変化が、AMOT の活性を介して YAP のリン酸化/脱リン酸化を介すメカニズムであるかを調べた。

まず、胞胚腔拡大胚において p-YAP シグナルを観察した。胞胚腔拡大胚の内部細胞塊では、中期胚盤胞(前期)のコントロール胚で見られた p-YAP シグナルの細胞質特異的な局在が見られず、p-YAP シグナルが有意に減少した(図 22A、B)。この結果から胞胚腔拡大による YAP の核移行では、YAP のリン酸化が抑制されることが示唆された。胞胚腔吸引胚では中期胚盤胞(後期)では細胞質特異的な p-YAP シグナルの局在がかなり弱い、胞胚腔吸引胚においては p-YAP シグナルの細胞質局在が復活することが観察され、p-YAP シグナル蛍光強度の解析においても有意に上昇することがわかった(図 22C、D)。

次に、胞胚腔拡大胚で AMOT を観察した。胞胚腔拡大胚では AMOT のシグナルには有意な差が見られなかった(図 22E、F)。胞胚腔拡大によるリン酸化 YAP の減少による YAP 核移行の過程には AMOT を介した Hippo シグナル伝達経路の制御は関わっていないことが示唆された。胞胚腔吸引胚においても、AMOT の発現には有意な差が見られなかった(図 22G,H)。以上の結果から、胞胚腔拡大による YAP の核移行は p-YAP の脱リン酸化を介するが、その Hippo シグナル伝達経路の不活性化には AMOT が関与しないことが示唆された。

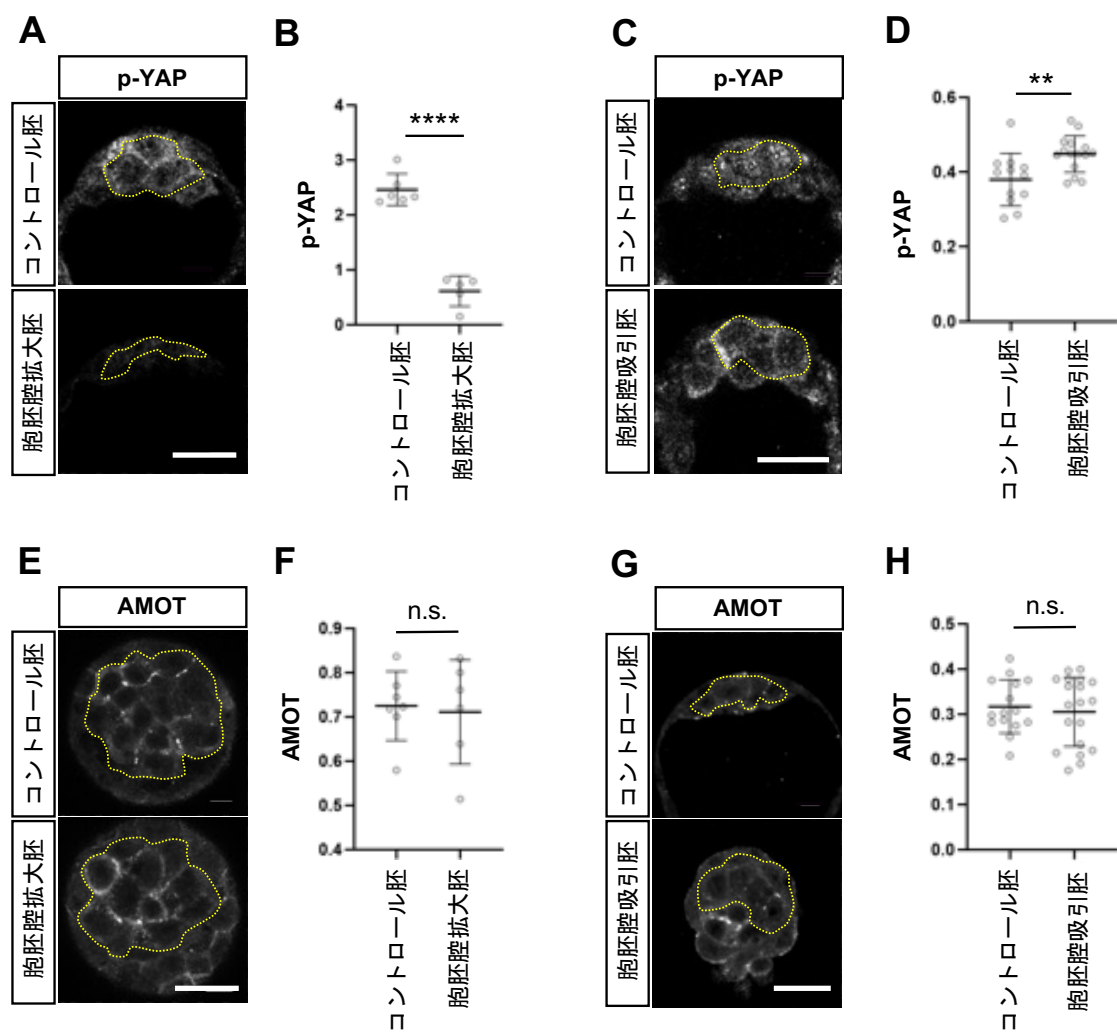


図 22. 胞胚腔の大きさを操作すると AMOT に影響を与えることなく Hippo シグナル伝達経路が変化する

- (A) 胞胚腔拡大胚における p-YAP シグナルの代表的な免疫蛍光画像。点線は内部細胞塊を示す。スケールバーは 25 μm 。
- (B) 胞胚腔拡大胚における p-YAP シグナルを示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。**** $p < 0.0001$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚(N = 6)、胞胚腔拡大胚(N = 5)。
- (C) 胞胚腔縮小胚における p-YAP シグナルの代表的な免疫蛍光画像。点線は内部細胞塊を示す。スケールバーは 25 μm 。
- (D) 胞胚腔縮小胚における p-YAP シグナルの増加を示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。** $p < 0.01$ 。各群の解析サンプル数：コントロール胚(N = 12)、胞胚腔吸引胚(N = 15)。
- (E) 胞胚腔拡大胚における AMOT シグナルの代表的な免疫蛍光画像。点線は内部細胞塊を示す。スケールバーは 25 μm 。
- (F) 胞胚腔拡大胚では AMOT 発現に影響がないことを示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。n.s.; 有意でない。各群の解析胚サンプル数：コントロール胚(N = 7)、胞胚腔拡大胚(N = 6)。
- (G) 胞胚腔縮小胚における AMOT シグナルの代表的な免疫蛍光画像。点線は内部細胞塊を示す。スケールバーは 25 μm 。
- (H) 胞胚腔縮小胚に AMOT 発現に影響がないことを示すドットプロット。横線は平均値と標準誤差を表す。p 値はスチューデントの *t* 検定により決定。n.s.; 有意でない。各群の解析サンプル数：コントロール胚(N = 15)、胞胚腔吸引胚(N = 19)。
-

第4章 考察

4.1: 中期胚盤胞の YAP の核移行は 2 つの機構により促進される

本論文では、胚盤胞期の内部細胞塊からエピブラストへの分化過程における YAP 局在の細胞質から核への促進メカニズムを検証した。その結果、胞胚腔の拡大に伴う細胞質 F-アクチン量の増加による AMOT を介さない機構と、細胞分化に伴う SOX2 の発現上昇によるタンキラーゼを介した AMOT の分解による機構の 2 つが、YAP の脱リン酸化を介して YAP 局在を核へと促進することを示し(図 23A)、これらが発生過程で協調してはたらくことがエピブラストへの分化の頑強性に貢献していると考察した。

桑実胚から初期胚盤胞へと分化する過程で胞胚腔と呼ばれる内腔が出現する。胞胚腔は拡大と縮小を繰り返しながら後期胚盤胞にかけて徐々に拡大していく。中期胚盤胞では、胞胚腔の拡大により栄養外胚葉に拡大する力が加わり、栄養外胚葉の細胞の張力が増加する(Chan et al. 2019)。同様の張力が内部細胞塊にも加わると考えられる。物理的な力を受けた内部細胞塊の細胞は、その力に応じて細胞質の F-アクチンを増加させる(図 13A-D)。この力を受けて細胞質に局在する p-YAP は脱リン酸化し、核への局在が促進される。このとき Hippo シグナル伝達経路の上流に位置する AMOT は介さない。

初期胚盤胞では、AMOT は細胞接着部位に存在し、Hippo シグナル伝達経路を活性化する。Hippo シグナル伝達経路の活性化は YAP をリン酸化し、細胞質へと局在させる。中期胚盤胞へと分化が進むと、細胞接着部位の AMOT は徐々に減少する。この減少は、多能性因子 SOX2 による内部細胞塊からエピブラストへの細胞分化によって促進される。SOX2 は桑実胚の内側の細胞と初期胚盤胞の内部細胞塊で特異的に発現する最初の転写因子である。Sox2 は内部細胞塊の前駆多能性状態の獲得に必要である。SOX2 が存在しないと AMOT の発現は減少せずに維持され、YAP のリン酸化と細胞質局在が促進される。AMOT の分解に必要なタンキラーゼやユビキチン依存的な分解機構は、SOX2 依存的に制御される。

A

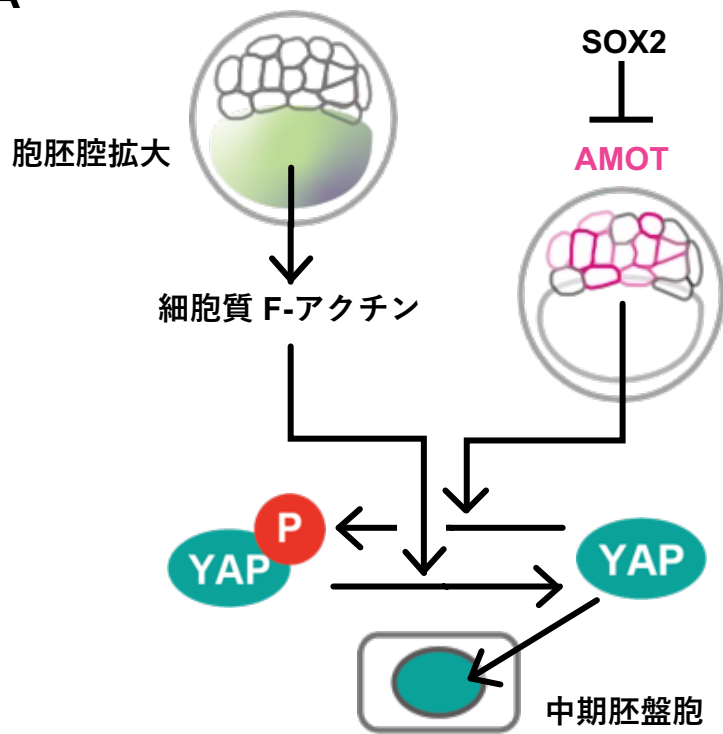


図 23. 中期胚盤胞の内部細胞塊における 2 つの YAP 局在制御モデル

(A) 中期胚盤胞での YAP 局在を制御する 2 種類の機構をまとめた模式図。中期胚盤胞での YAP の核移行には 2 種類のメカニズムがはたらく。胞胚腔拡大による細胞質 F-アクチン量の増加は、細胞質に局在するリン酸化 YAP を脱リン酸化させ、YAP が核に移行する。細胞分化による SOX2 の上昇はタンキラーゼを介して AMOT を分解する。AMOT は YAP をリン酸化し細胞質局在を誘導するが、分解に伴い YAP の脱リン酸化が減少し、YAP は核に移行する。

4.2: 胚盤胞期のステージ区分の比較

本論文では YAP の局在を基準とした胚盤胞期のステージを定義した(図 6)。以前の研究では、胚盤胞期を細胞数や分化状態に応じて初期胚盤胞(32-64 細胞数)、中期胚盤胞(64-127 細胞数)、後期胚盤胞(128 細胞数以上)と 3 つのステージに区分していた(Hashimoto and Sasaki, 2019)。本論文で私が区分したステージは YAP の局在に基づいて初期胚盤胞(32-69 細胞数)、中期胚盤胞(70-99 細胞数)、後期胚盤胞(100 細胞数以上)とした。この二つのステージ区分は、初期胚盤胞までの細胞数は 64 細胞数と 69 細胞数とではほぼ同じだが、中期胚盤胞と後期胚盤胞との境界が大きく異なっている。細胞分化に基づいたステージ区分では本論文で定義した後期胚盤胞を含む 127 細胞数までが中期胚盤胞だが、YAP の核移行は 100 細胞数までには内部細胞塊の全ての細胞で完結している。以上の違いから、YAP の核移行は細胞分化に先んじて進む可能性がある。YAP の核移行と細胞分化の状態はおよそ 64-69 細胞数程度までの初期胚盤胞までは、同じような機構によって制御される。しかし、内部細胞塊が原始内胚葉とエピブラストに完全に分化する 128 細胞数以上の胚よりも先んじて、100 細胞数以上の胚の段階で YAP の核移行が終了する。YAP の核移行はエピブラストでの SOX2 の発現を上昇させるメカニズムとして重要だと考えられている(Hashimoto and Sasaki, 2019)。今回のステージ区分の比較から、内部細胞塊からエピブラストへの形成過程で YAP 核移行が徐々に進むというよりは、エピブラスト形成に先んじて YAP の核移行が完了することが多可能性を持つエピブラストを形成するために重要である可能性がある。

4.3: 細胞質 F-アクチンと YAP 局在制御との関係性

本研究では細胞質 F-アクチンの増加が YAP の脱リン酸化を誘導し、YAP の核移行を促進することを示したが、細胞質 F-アクチンの増加が何を介して脱リン酸化を誘導するかは不明である。培養細胞では、活性型 AMOT はセリン 175 部位を介して F-アクチンフィラメントに局在する。AMOT のアクチンへの局在は Hippo シグナル伝達経路を活性化させず、YAP を核へと移行させるが、F-アクチンの破壊による AMOT の放出は YAP のリン酸化を介して細胞質に局在させる(Chan et al. 2013; Dai et al. 2013; Mana-Capelli et al. 2014)。このように、細胞質 F-アクチンと AMOT の共局在が胚盤胞期の内部細胞塊での YAP 核制御に関わると考えていた。しかし、発生過程において細胞質 F-アクチンが強くなる中期胚盤胞(後期)と AMOT の発現が特に強い初期胚盤胞の時期は一致しなかった。加えて、胞胚腔の拡大と縮小実験において AMOT シグナルに顕著な変化は見られなかった(図 22E-H)。以上の結果から、細胞質 F-アクチンの下流の YAP 局在制御は、AMOT 以下の Hippo シグナル伝達経路にある YAP のキナーゼの LATS1/2などを介している可能性がある。F-アクチンを含む細胞骨格による YAP 局在制御では、LATS 依存的(Meng et al. 2018; Rauskolb et al. 2014; Wada et al. 2011; Zhao et al. 2012)および非依存的メカニズム(Aragona et al. 2013; Chang et al. 2018; Dupont et al. 2011; Elosegui-Artola et al. 2017)の両方がある。LATS の非依存的メカニズムでは細胞に

力が加わることで核形態が扁平化し、核膜孔の抵抗が減少し YAP が核に入りやすくなるメカニズムである。しかし、核形態の扁平化は YAP の核移行との関与が低かった(図 10A-E)。加えて、胞胚腔を人工的に操作した胚では、p-YAP シグナルは統計的に有意な変化が観察された(図 22A-D)。これらの結果から、主に LATS を介したメカニズムが細胞質 F-アクチンを介して YAP 局在を制御すると考えられる。

4.4: 中期胚盤胞(後期)から細胞質 F-アクチンが減少するメカニズム

初期胚盤胞から中期胚盤胞(後期)までは、胞胚腔拡大による細胞質 F-アクチンの増加が YAP の核移行を促進すること示した。しかし、中期胚盤胞(後期)から後期胚盤胞では細胞質 F-アクチンの減少が観察され、胞胚腔の拡大と YAP の核移行との関与が低くなる(図 11A-C)。後期胚盤胞での F-アクチンと YAP の関係性は中期胚盤胞と比べて変化しているようである。例えば、YAP の核移行による TEAD の活性化がアクチンの動態を変化させている可能性が考えられる。RPE1(hTRET-immortalized human retinal pigment epithelial-1)細胞では、YAP を KD すると Rho GTPase 活性化タンパク質である ARHGAP18 のタンパク質レベルが減少し、アクチンの重合が阻害される(Porazinski et al. 2015)。YAP-TEAD 依存的な転写の不活性化は、ヒト多能性幹細胞のメソダームへの分化過程で皮質のアクチンからストレスファイバーのアクチンへと変化する細胞骨格のアクチン再構成に関与している(Pagliari et al. 2021)。MDCK 細胞では YAP が ARHGAP18 の細胞内局在を制御しており、YAP を KO すると ARHGAP18 が細胞の端に集積し、アクチンの動態を変化させる(Zhang et al. 2023)。マウス着床前胚の内部細胞塊においても、中期胚盤胞で YAP の核移行がある閾値を超えると、ARHGAP18 のタンパク質レベルの増加を介して細胞質の F-アクチン動態が変化するため、胞胚腔拡大による影響を受けていない可能性がある。

4.5: 中期胚盤胞での AMOT の減少は分解によるものである

初期胚盤胞から中期胚盤胞(後期)にかけて AMOT シグナルは顕著に減少する(図 18A-C)。しかしこの時期では Amot mRNA の発現は有意に減少していない(M.Hashimoto and H.Sasaki, unpublished observation)。本研究では中期胚盤胞での AMOT がタンキラーゼおよびユビキチン依存的メカニズムによる分解(Wang et al., 2015)を介して減少していることが示された(図 19B,C)。また、AMOT タンパクの分解に関わる Nedd4 mRNA の発現は上昇している(M.Hashimoto and H.Sasaki, unpublished observation)。以上のことから、中期胚盤胞での AMOT は主に翻訳後の分解を介して減少していると考えている。

4.6: 内部細胞塊での YAP 核移行レベルのばらつきを制御するメカニズム

当研究室の研究から、中期胚盤胞の内部細胞塊の細胞間の核 YAP レベルのばらつきが、細胞競合を誘導することが示された(Hashimoto and Sasaki, 2019)。しかし、そのばらつきを生

じさせる原因は不明であった。その原因として細胞や核の扁平度のばらつきが核 YAP シグナルのばらつきに関与すると考えられるが、本研究で核の球形度と核 YAP シグナルには弱い相関関係があり(図 10D,E)、細胞質 F-アクチンと核 YAP シグナルには強い相関関係が見られた(図 11D,E)。この結果は、細胞が受ける機械的な力の変化は核の形状を著しく変化させるほど強くはないが、F-アクチンレベルに影響を与えるのには充分であることを示す。また、本研究では機械的な制御以外に細胞分化による制御が YAP 局在に関与することを示しており、このような細胞分化機構が YAP 局在のばらつきに寄与している可能性も考えられる。実際にエピブラスト発生過程における細胞分化マーカーと YAP 局在の詳細な観察から、YAP 核局在の開始には細胞の運命決定が重要であることが明らかになった(N. Hirono, M.Hashimoto., H.Maeda., H. Shimojo, H.Sasaki, unpublished observation)。またエピブラストへの運命が特定されるタイミングは内部細胞塊の細胞間で異なる(Saiz et al. 2016)。以上のことから、細胞分化の変化が YAP 核移行レベルのばらつきを誘導している可能性がある。

4.7: 発生過程における力学的刺激の重要性

本研究は、エピブラスト形成過程における胞胚腔を起点とする機械的シグナルが、YAP の細胞内局在を制御し、細胞の運命決定に影響を与えることが示唆された。この観察結果は、力学的刺激が細胞内シグナル伝達経路に直接影響を与えることを実証している。この発見は、細胞が物理的な力をどのように感知し、生化学的シグナルに変換するかという重要な問いに新たな手がかりを提供する。今後の課題として、この過程に関与する具体的な膜受容体や関連するタンパク質の特定が挙げられる。近年細胞が機械的シグナルを感知する仕組みとして、細胞膜上に存在する受容体が解明されつつある(Reviews; Martino et al. 2018; Hamill et al. 2001; Humphrey et al. 2014; Murthy et al. 2017; Rosa et al. 2021)。内部細胞塊におけるこれらの解明は、物理的な力が細胞分化に影響を与える機構の全容解明に繋がるだろう。本研究で明らかにした機械的シグナルと YAP を介した制御機構は、他の発生段階においても重要な役割を果たす。例えば、器官形成過程における上皮-間充織転(EMT)では、YAP の活性化が重要な役割を果たすことが報告されている(Zhang et al. 2014)。また、ゼブラフィッシュの心臓発生過程では、機械的刺激が AMOT を介した YAP の局在制御を介して心筋細胞の分化を制御する(Nakajima et al. 2017)。骨格筋の発生と再生においても、YAP が筋芽細胞の増殖と分化を制御する(Judson et al. 2012)。これらの知見は、本研究で見出された機械的シグナルと YAP を介した制御機構が、エピブラスト形成に限らず、様々な組織や器官の発生過程において普遍的に機能している可能性がある。さらに、ヒト胚の内部細胞塊で YAP が核に局在していることが観察されており、ヒトの多能性幹細胞において YAP の核移行とそれに伴う核内活性の増加が、ナイーブ状態の多能性を獲得するメカニズムの一つであることが示唆されている(Qin et al. 2016)。これらの知見は、本研究で明らかにしたエピブラスト形成過程の制御機構が進化的に保存されていることを示唆する。

4.8: 本研究の意義

本研究において、エピブラストの形成過程では、胞胚腔の拡大によって内部細胞塊の細胞が受ける物理的な力による YAP 局在制御に加えて、桑実胚の内側の細胞が内部細胞塊へと分化することによる細胞の状態変化もシグナルそのものを変化させていることを明らかにした。このように、細胞分化のシグナルの制御機構を理解するためには、細胞が受ける外的要因だけではなく、発生の進行に伴う細胞の状態変化も併せて考える必要があることが明らかとなった。これまでの先行研究のほとんどは外的要因のみに注目しており、発生という動的な現象を正しく理解するためには、発生の進行に伴う細胞の状態変化の解析が重要であることを示した点が本研究の新しい知見である。

参考文献

- Aragona M, Panciera T, Manfrin A, Giulitti S, Michielin F, Elvassore N, Dupont S and Piccolo S. “A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors” *Cell* 154, 1047-1059, 2013
- Artus J, Piliszek A, Hadjantonakis AK. The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Dev Biol.* 2011 Feb 15;350(2):393-404. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.12.007. Epub 2010 Dec 10. PMID: 21146513; PMCID: PMC3461954.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003 Jan 1;17(1):126-40. doi: 10.1101/gad.224503. PMID: 12514105; PMCID: PMC195970.
- Barcroft LC, Offenberg H, Thomsen P and Watson AJ., “Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation” *Dev Biol.* 256, 342-454, 2003
- Behringer Richard “Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Fourth Edition” Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2014
- Bessonard S, De Mot L, Gonze D, Barriol M, Dennis C, Goldbeter A, Dupont G, Chazaud C. Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network. *Development.* 2014 Oct;141(19):3637-48. doi: 10.1242/dev.109678. Epub 2014 Sep 10. PMID: 25209243.
- Chan C J, Costanzo M, Ruiz-Herreo T, Mönke G, J. Petrie R, Bergert M, Diz-Muñoz A, Mahadevan L. and Hiiragi T. “Hydraulic control of mammalian embryo size and cell fate” *Nature* 571, 112-116, 2019
- Chan SW, Lim CJ, Guo F, Tan I, Leung T, Hong W. Actin-binding and cell proliferation activities of angiomin family members are regulated by Hippo pathway-mediated phosphorylation. *J Biol Chem.* 2013 Dec 27;288(52):37296-307. doi: 10.1074/jbc.M113.527598. Epub 2013 Nov 13. PMID: 24225952; PMCID: PMC3873582.
- Chang L, Azzolin L, Di Biagio D, Zanconato F, Battilana G, Lucon Xiccato R, Aragona M, Giulitti S, Panciera T, Gandin A, Sigismondo G, Krijgsveld J, Fassan M, Brusatin G, Cordenonsi M, Piccolo S. The SWI/SNF complex is a mechanoregulated inhibitor of YAP and TAZ. *Nature.* 2018 Nov;563(7730):265-269. doi: 10.1038/s41586-018-0658-1. Epub 2018 Oct 31. PMID: 30401838; PMCID: PMC7612964.
- Chazaud C, Yamanaka Y. Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development.* 2016 Apr 1;143(7):1063-74. doi: 10.1242/dev.128314. PMID: 27048685.

- Cockburn K, Rossant J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J Clin Invest*. 2010 Apr;120(4):995-1003. doi: 10.1172/JCI41229. Epub 2010 Apr 1. PMID: 20364097; PMCID: PMC2846056.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):819-23. doi: 10.1126/science.1231143. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23287718; PMCID: PMC3795411.
- Coutinho, H.D.M., Falcão-Silva, V.S., Gonçalves, G.F. et al. Molecular ageing in progeroid syndromes: Hutchinson-Gilford progeria syndrome as a model. *Immun Ageing* 6, 4 (2009).
- Czechanski A, Byers C, Greenstein I, Schrode N, Donahue LR, Hadjantonakis AK, Reinholdt LG. Derivation and characterization of mouse embryonic stem cells from permissive and nonpermissive strains. *Nat Protoc*. 2014 Mar;9(3):559-74. doi: 10.1038/nprot.2014.030. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24504480; PMCID: PMC4112089.
- Dai X, She P, Chi F, Feng Y, Liu H, Jin D, Zhao Y, Guo X, Jiang D, Guan KL, Zhong TP, Zhao B. Phosphorylation of angiotensin by Lats1/2 kinases inhibits F-actin binding, cell migration, and angiogenesis. *J Biol Chem*. 2013 Nov 22;288(47):34041-34051. doi: 10.1074/jbc.M113.518019. Epub 2013 Oct 8. PMID: 24106267; PMCID: PMC3837143.
- Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, Gayyed MF, Anders RA, Maitra A, Pan D. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell*. 2007 Sep 21;130(6):1120-33. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.019. PMID: 17889654; PMCID: PMC2666353.
- Driscoll TP, Cosgrove BD, Heo SJ, Shurden ZE, Mauck RL. Cytoskeletal to Nuclear Strain Transfer Regulates YAP Signaling in Mesenchymal Stem Cells. *Biophys J*. 2015 Jun 16;108(12):2783-93. doi: 10.1016/j.bpj.2015.05.010. PMID: 26083918; PMCID: PMC4472080.
- Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, L Digabel J, Gorcato M, Biciato S, Elvassore N, and Piccolo S. “Role of YAP/TAZ in mechanotransduction” *Nature* 474, 179-183, 2011
- Elosegui-Artola A, Andreu I, E.M. Beedle A, Lezamiz A, Uroz M, J. Kosmalska A, Oria R, Z. Kechagia J, Rico-Lastres P, Le Roux A, M. Shanahan C, Trepas X, Navajas D, Garcia-Manes S, and Roca-Cusachs P. “Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores” *Cell* 171, 1397-1401, 2017
- Folkman J, Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature*. 1978 Jun 1;273(5661):345-9. doi: 10.1038/273345a0. PMID: 661946.
- Frankenberg S, Gerbe F, Bessonard S, Belville C, Pouchin P, Bardot O, Chazaud C. Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. *Dev Cell*. 2011 Dec 13;21(6):1005-13. doi: 10.1016/j.devcel.2011.10.019. PMID: 22172669.

- Guo G, Huss M, Tong GQ, Wang C, Li Sun L, Clarke ND, Robson P. Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev Cell*. 2010 Apr 20;18(4):675-85. doi: 10.1016/j.devcel.2010.02.012. PMID: 20412781.
- Hahn C, Schwartz MA. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Jan;10(1):53-62. doi: 10.1038/nrm2596. PMID: 19197332; PMCID: PMC2719300.
- Hamill OP, Martinac B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):685-740. doi: 10.1152/physrev.2001.81.2.685. PMID: 11274342.
- Harvey KF, Pflieger CM, Hariharan IK. The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell*. 2003 Aug 22;114(4):457-67. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00557-9. PMID: 12941274.
- Hashimoto M and Sasaki H. “Epiblast formation by TEAD-YAP-Dependent Expression of Pluripotency Factors and Competitive Elimination of Unspecified Cells” *Developmental Cell* 50, 139-154, 2019
- Hashimoto M, Yamashita Y, Takemoto T. Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Dev Biol*. 2016 Oct 1;418(1):1-9. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.07.017. Epub 2016 Jul 26. PMID: 27474397.
- Hirate Y, Hirahara S, Inoue K-I, Suzuki A, Alarcon VB, Akimoto K, Hirai T, Hara T, Adachi M, Chida K, Ohno S, Marikawa Y, Nakao K, Shimono A, Sasaki H.” Polarity-dependent distribution of angiomin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos” *Curr. Biol*. 23, 1184–1194, 2013
- Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A, Cong F. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*. 2009 Oct 1;461(7264):614-20. doi: 10.1038/nature08356. Epub 2009 Sep 16. PMID: 19759537.
- Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Dec;15(12):802-12. doi: 10.1038/nrm3896. Epub 2014 Oct 22. PMID: 25355505; PMCID: PMC4513363.
- Jaalouk, D., Lammerding, J. Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 63–73 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrm2597>
- Jia J, Zhang W, Wang B, Trinko R, Jiang J. The *Drosophila* Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes Dev*. 2003 Oct 15;17(20):2514-9. doi: 10.1101/gad.1134003. PMID: 14561774; PMCID: PMC218145.

- Johnson MH, Ziomek CA. Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability. *J Cell Biol.* 1981a Oct;91(1):303-8. doi: 10.1083/jcb.91.1.303. PMID: 7298724; PMCID: PMC2111944.
- Johnson MH, Ziomek CA. The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell.* 1981b Apr;24(1):71-80. doi: 10.1016/0092-8674(81)90502-x. PMID: 7237545.
- Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev.* 1995 Mar 1;9(5):534-46. doi: 10.1101/gad.9.5.534. PMID: 7698644.
- Kim JK, Louhghalam A, Lee G, Schafer BW, Wirtz D, Kim DH. Nuclear lamin A/C harnesses the perinuclear apical actin cables to protect nuclear morphology. *Nat Commun.* 2017 Dec 14;8(1):2123. doi: 10.1038/s41467-017-02217-5. Erratum in: *Nat Commun.* 2018 Mar 13;9(1):1115. PMID: 29242553; PMCID: PMC5730574.
- Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, Beddington R, Grosveld F. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development.* 1999 May;126(9):723-32. doi: 10.1242/dev.126.9.723. PMID: 10383242.
- Kurimoto, K., Yamaji, M., Seki, Y. and *Saitou, M. Specification of the germ cell lineage in mice: a process orchestrated by the PR-domain proteins, *Blimp1* and *Prdm14*. *Cell Cycle*, 7, 3514-3518. 2008
- Labun K, Montague TG, Krause M, Torres Cleuren YN, Tjeldnes H, Valen E. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jul 2;47(W1):W171-W174. doi: 10.1093/nar/gkz365. PMID: 31106371; PMCID: PMC6602426.
- Le Bin GC, Muñoz-Descalzo S, Kurowski A, Leitch H, Lou X, Mansfield W, Etienne-Dumeau C, Grabole N, Mulas C, Niwa H, Hadjantonakis AK, Nichols J. Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst. *Development.* 2014 Mar;141(5):1001-10. doi: 10.1242/dev.096875. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24504341; PMCID: PMC3929414.
- Leung CY, Zernicka-Goetz M. Angiomotin prevents pluripotent lineage differentiation in mouse embryos via Hippo pathway-dependent and -independent mechanisms. *Nat Commun.* 2013;4:2251. doi: 10.1038/ncomms3251. PMID: 23903990; PMCID: PMC3741640.
- Lin C, Yao E, Zhang K, Jiang X, Croll S, Thompson-Peer K, Chuang PT. YAP is essential for mechanical force production and epithelial cell proliferation during lung branching morphogenesis. *Elife.* 2017 Mar 21;6:e21130. doi: 10.7554/eLife.21130. PMID: 28323616; PMCID: PMC5360446.
- Lorthongpanich C, Issaragrisil S. Emerging Role of the Hippo Signaling Pathway in Position Sensing and Lineage Specification in Mammalian Preimplantation Embryos. *Biol Reprod.* 2015 Jun;92(6):143. doi: 10.1095/biolreprod.114.127803. Epub 2015 May 6. PMID: 25947059.

- Lorthongpanich C, Messerschmidt DM, Chan SW, Hong W, Knowles BB, Solter D. Temporal reduction of LATS kinases in the early preimplantation embryo prevents ICM lineage differentiation. *Genes Dev.* 2013 Jul 1;27(13):1441-6. doi: 10.1101/gad.219618.113. PMID: 23824537; PMCID: PMC3713425.
- Low BC, Pan CQ, Shivashankar GV, Bershadsky A, Sudol M, Sheetz M. YAP/TAZ as mechanosensors and mechanotransducers in regulating organ size and tumor growth. *FEBS Lett.* 2014 Aug 19;588(16):2663-70. doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.012. Epub 2014 Apr 18. PMID: 24747426.
- Ma S, Meng Z, Chen R, Guan KL. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annu Rev Biochem.* 2019 Jun 20;88:577-604. doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111829. Epub 2019 Dec 19. PMID: 30566373.
- Mana-Capelli S, Paramasivam M, Dutta S, McCollum D. Angiomotins link F-actin architecture to Hippo pathway signaling. *Mol Biol Cell.* 2014 May;25(10):1676-85. doi: 10.1091/mbc.E13-11-0701. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24648494; PMCID: PMC4019498.
- Marikawa Y, Alarcón VB. Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev.* 2009 Nov;76(11):1019-32. doi: 10.1002/mrd.21057. PMID: 19479991; PMCID: PMC2874917.
- Martino F, Perestrelo AR, Vinarský V, Pagliari S, Forte G. Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Front Physiol.* 2018 Jul 5;9:824. doi: 10.3389/fphys.2018.00824. PMID: 30026699; PMCID: PMC6041413.
- Meng Z, Qiu Y, Lin KC, Kumar A, Placone JK, Fang C, Wang KC, Lu S, Pan M, Hong AW, Moroishi T, Luo M, Plouffe SW, Diao Y, Ye Z, Park HW, Wang X, Yu FX, Chien S, Wang CY, Ren B, Engler AJ, Guan KL. RAP2 mediates mechanoresponses of the Hippo pathway. *Nature.* 2018 Aug;560(7720):655-660. doi: 10.1038/s41586-018-0444-0. Epub 2018 Aug 22. PMID: 30135582; PMCID: PMC6128698.
- Mihajlović AI, Bruce AW. The first cell-fate decision of mouse preimplantation embryo development: integrating cell position and polarity. *Open Biol.* 2017 Nov;7(11):170210. doi: 10.1098/rsob.170210. PMID: 29167310; PMCID: PMC5717349.
- Moya IM, Halder G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Apr;20(4):211-226. doi: 10.1038/s41580-018-0086-y. PMID: 30546055.
- Morin-Kensicki EM, Boone BN, Howell M, Stonebraker JR, Teed J, Alb JG, Magnuson TR, O'Neal W, Milgram SL. Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of Yap65. *Mol Cell Biol.* 2006 Jan;26(1):77-87. doi: 10.1128/MCB.26.1.77-87.2006. PMID: 16354681; PMCID: PMC1317614.

- Morrissey EE, Tang Z, Sigrist K, Lu MM, Jiang F, Ip HS, Parmacek MS. GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* 1998 Nov 15;12(22):3579-90. doi: 10.1101/gad.12.22.3579. PMID: 9832509; PMCID: PMC317242.
- Murthy SE, Dubin AE, Patapoutian A. Piezos thrive under pressure: mechanically activated ion channels in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Dec;18(12):771-783. doi: 10.1038/nrm.2017.92. Epub 2017 Oct 4. PMID: 28974772.
- Nakamura T, Yabuta Y, Okamoto I, Aramaki S, Yokobayashi S, Kurimoto K, Sekiguchi K, Nakagawa M, Yamamoto T, Saitou M. SC3-seq: a method for highly parallel and quantitative measurement of single-cell gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2015 May 19;43(9):e60. doi: 10.1093/nar/gkv134. Epub 2015 Feb 26. PMID: 25722368; PMCID: PMC4482058.
- Nakajima H, Yamamoto K, Agarwala S, Terai K, Fukui H, Fukuhara S, Ando K, Miyazaki T, Yokota Y, Schmelzer E, Belting HG, Affolter M, Lecaudey V, Mochizuki N. Flow-Dependent Endothelial YAP Regulation Contributes to Vessel Maintenance. *Dev Cell.* 2017 Mar 27;40(6):523-536.e6. doi: 10.1016/j.devcel.2017.02.019. PMID: 28350986.
- Nikolova V, Leimena C, McMahon AC, Tan JC, Chandar S, Jogia D, Kesteven SH, Michalick J, Otway R, Verheyen F, Rainer S, Stewart CL, Martin D, Feneley MP, Fatkin D. Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *J Clin Invest.* 2004 Feb;113(3):357-69. doi: 10.1172/JCI19448. PMID: 14755333; PMCID: PMC324538.
- Nishioka N, Inoue K, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, Yabuta N, Hirahara S, R O. Stephenson, Ogonuki N, Makita R, Kurihara H, E M. Morin-Kensicki, Nojima H, Rossant J, Nakao K, Niwa H, and Sasaki H. "The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass" *Developmental Cell* 16, 398–410, 2009
- Ota M, Sasaki H. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development.* 2008 Dec;135(24):4059-69. doi: 10.1242/dev.027151. Epub 2008 Nov 12. PMID: 19004856.
- Pagliari S, Vinarsky V, Martino F, Perestrelo AR, Oliver De La Cruz J, Caluori G, Vrbsky J, Mozetic P, Pompeiano A, Zanca A, Ranjani SG, Skladal P, Kytir D, Zdráhal Z, Grassi G, Sampaolesi M, Rainer A, Forte G. YAP-TEAD1 control of cytoskeleton dynamics and intracellular tension guides human pluripotent stem cell mesoderm specification. *Cell Death Differ.* 2021 Apr;28(4):1193-1207. doi: 10.1038/s41418-020-00643-5. Epub 2020 Oct 28. PMID: 33116297; PMCID: PMC8027678.
- Pantalacci S, Tapon N, Léopold P. The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*. *Nat Cell Biol.* 2003 Oct;5(10):921-7. doi: 10.1038/ncb1051. Epub 2003 Sep 21. PMID: 14502295.

- Porazinski S, Wang H, Asaoka Y, Behrndt M, Miyamoto T, Morita H, Hata S, Sasaki T, Krens SFG, Osada Y, Asaka S, Momoi A, Linton S, Miesfeld JB, Link BA, Senga T, Shimizu N, Nagase H, Matsuura S, Bagby S, Kondoh H, Nishina H, Heisenberg CP, Furutani-Seiki M. YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. *Nature*. 2015 May 14;521(7551):217-221. doi: 10.1038/nature14215. Epub 2015 Mar 16. PMID: 25778702; PMCID: PMC4720436.
- Qin H, Hejna M, Liu Y, Percharde M, Wossidlo M, Blouin L, Durruthy-Durruthy J, Wong P, Qi Z, Yu J, Qi LS, Sebastiano V, Song JS, Ramalho-Santos M. YAP Induces Human Naive Pluripotency. *Cell Rep*. 2016 Mar 15;14(10):2301-12. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.036. Epub 2016 Mar 3. PMID: 26947063; PMCID: PMC4807727.
- Rauskolb C, Sun S, Sun G, Pan Y, Irvine KD. Cytoskeletal tension inhibits Hippo signaling through an Ajuba-Warts complex. *Cell*. 2014 Jul 3;158(1):143-156. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.035. PMID: 24995985; PMCID: PMC4082802.
- Reginensi A, Scott RP, Gregorieff A, Bagherie-Lachidan M, Chung C, Lim DS, Pawson T, Wrana J, McNeill H. Yap- and Cdc42-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development. *PLoS Genet*. 2013 Mar;9(3):e1003380. doi: 10.1371/journal.pgen.1003380. Epub 2013 Mar 21. PMID: 23555292; PMCID: PMC3605093.
- Rosa M, Noel T, Harris M, Ladds G. Emerging roles of adhesion G protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans*. 2021 Aug 27;49(4):1695-1709. doi: 10.1042/BST20201144. PMID: 34282836; PMCID: PMC8421042.
- Rossant J and Tam P P.L. "Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse" *Development* 136, 701-713, 2009
- Saiz N, Williams KM, Seshan VE, Hadjantonakis AK. Asynchronous fate decisions by single cells collectively ensure consistent lineage composition in the mouse blastocyst. *Nat Commun*. 2016 Nov 18;7:13463. doi: 10.1038/ncomms13463. PMID: 27857135; PMCID: PMC5120222.
- Sasaki H. Roles and regulations of Hippo signaling during preimplantation mouse development. *Dev Growth Differ*. 2017 Jan;59(1):12-20. doi: 10.1111/dgd.12335. Epub 2016 Dec 30. PMID: 28035666.
- Sasaki, H. (2010), Mechanisms of trophectoderm fate specification in preimplantation mouse development. *Development, Growth & Differentiation*, 52: 263-273. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01158.x>
- Schrode N, Saiz N, Di Talia S, Hadjantonakis AK. GATA6 levels modulate primitive endoderm cell fate choice and timing in the mouse blastocyst. *Dev Cell*. 2014 May 27;29(4):454-67. doi: 10.1016/j.devcel.2014.04.011. Epub 2014 May 15. PMID: 24835466; PMCID: PMC4103658.
- Skory, R.M., Moverley, A.A., Ardestani, G. et al. The nuclear lamina couples mechanical forces to cell fate in the preimplantation embryo via actin organization. *Nat Commun* 14, 3101 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38770-5>

- Spiegelman BM, Ginty CA. Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3-adipocytes. *Cell*. 1983 Dec;35(3 Pt 2):657-66. doi: 10.1016/0092-8674(83)90098-3. PMID: 6686086.
- Stirparo GG, Kurowski A, Yanagida A, Bates LE, Strawbridge SE, Hladkou S, Stuart HT, Boroviak TE, Silva JCR, Nichols J. OCT4 induces embryonic pluripotency via STAT3 signaling and metabolic mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jan 19;118(3):e2008890118. doi: 10.1073/pnas.2008890118. PMID: 33452132; PMCID: PMC7826362.
- Sutherland AE. Tissue morphodynamics shaping the early mouse embryo. *Semin Cell Dev Biol*. 2016 Jul;55:89-98. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.01.033. Epub 2016 Jan 25. PMID: 26820524.
- Swift J, Discher DE. The nuclear lamina is mechano-responsive to ECM elasticity in mature tissue. *J Cell Sci*. 2014 Jul 15;127(Pt 14):3005-15. doi: 10.1242/jcs.149203. Epub 2014 Jun 24. PMID: 24963133; PMCID: PMC4095853.
- Tarkowski AK, Wróblewska J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol*. 1967 Aug;18(1):155-80. PMID: 6048976.
- Totaro A, Castellan M, Battilana G, Zanconato F, Azzolin L, Giulitti S, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ link cell mechanics to Notch signalling to control epidermal stem cell fate. *Nat Commun*. 2017 May 17;8:15206. doi: 10.1038/ncomms15206. PMID: 28513598; PMCID: PMC5442321.
- Turgay, Y., Eibauer, M., Goldman, A. et al. The molecular architecture of lamins in somatic cells. *Nature* 543, 261–264 (2017). <https://doi.org/10.1038/nature21382>
- Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Halder G. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat Cell Biol*. 2003 Oct;5(10):914-20. doi: 10.1038/ncb1050. Epub 2003 Sep 21. PMID: 14502294.
- Vogel V, Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Apr;7(4):265-75. doi: 10.1038/nrm1890. PMID: 16607289.
- Wada K, Itoga K, Okano T, Yonemura S, and Sasaki H. “Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers” *Development* 138, 3907-3914, 2011
- Wadell, H. 1932. Volume, shape, and roundness of rock particles. *The Journal of Geology* 40: 443–451.
- Wang W, Li N, Li X, Tran MK, Han X, Chen J. Tankyrase Inhibitors Target YAP by Stabilizing Angiomotin Family Proteins. *Cell Rep*. 2015 Oct 20;13(3):524-532. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.014. Epub 2015 Oct 8. PMID: 26456820; PMCID: PMC4618173.
- Wang, H., Dey, S. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 7, 185–199 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrg1808>
- Wicklow E, Blij S, Frum T, Hirate Y, Lang RA, Sasaki H, Ralston A. HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst.

PLoS Genet. 2014 Oct 23;10(10):e1004618. doi: 10.1371/journal.pgen.1004618. PMID: 25340657; PMCID: PMC4207610.

- Wozniak MA, Chen CS. Mechanotransduction in development: a growing role for contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Jan;10(1):34-43. doi: 10.1038/nrm2592. PMID: 19197330; PMCID: PMC2952188.
- Wu S, Huang J, Dong J, Pan D. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell.* 2003 Aug 22;114(4):445-56. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00549-x. PMID: 12941273.
- Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* lats gene encodes a putative protein kinase. *Development.* 1995 Apr;121(4):1053-63. doi: 10.1242/dev.121.4.1053. PMID: 7743921.
- Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* lats gene encodes a putative protein kinase. *Development.* 1995 Apr;121(4):1053-63. doi: 10.1242/dev.121.4.1053. PMID: 7743921.
- Yamanaka Y, Lanner F, Rossant J. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development.* 2010 Mar;137(5):715-24. doi: 10.1242/dev.043471. PMID: 20147376.
- Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn.* 2006 Sep;235(9):2301-14. doi: 10.1002/dvdy.20844. PMID: 16773657.
- Yanagida A, Corujo-Simon E, Revell CK, Sahu P, Stirparo GG, Aspalter IM, Winkel AK, Peters R, De Belly H, Cassani DAD, Achouri S, Blumenfeld R, Franze K, Hannezo E, Paluch EK, Nichols J, Chalut KJ. Cell surface fluctuations regulate early embryonic lineage sorting. *Cell.* 2022 Mar 3;185(5):777-793.e20. doi: 10.1016/j.cell.2022.01.022. Epub 2022 Feb 22. Erratum in: *Cell.* 2022 Mar 31;185(7):1258. doi: 10.1016/j.cell.2022.03.015. PMID: 35196500; PMCID: PMC8896887.
- Yildirim E, Bora G, Onel T, Talas N, Yaba A. Cell fate determination and Hippo signaling pathway in preimplantation mouse embryo. *Cell Tissue Res.* 2021 Dec;386(3):423-444. doi: 10.1007/s00441-021-03530-8. Epub 2021 Sep 29. PMID: 34586506.
- Zhang Y, Kitagawa T, Furutani-Seiki M, Yoshimura SH. Yes-associated protein regulates cortical actin architecture and dynamics through intracellular translocation of Rho GTPase-activating protein 18. *FASEB J.* 2023 Sep;37(9):e23161. doi: 10.1096/fj.202201992R. PMID: 37638562.
- Zhao B, Lei QY, Guan KL. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Dec;20(6):638-46. doi: 10.1016/j.ceb.2008.10.001. Epub 2008 Nov 18. PMID: 18955139; PMCID: PMC3296452.
- Zhao B, Li L, Lu Q, Wang LH, Liu CY, Lei Q, Guan KL. Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev.* 2011 Jan 1;25(1):51-63. doi: 10.1101/gad.2000111. PMID: 21205866; PMCID: PMC3012936.

- Zhao B, Li L, Wang L, Wang CY, Yu J, Guan KL. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* 2012 Jan 1;26(1):54-68. doi: 10.1101/gad.173435.111. PMID: 22215811; PMCID: PMC3258966.
- Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, Zheng P, Ye K, Chinnaiyan A, Halder G, Lai ZC, Guan KL. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 2007 Nov 1;21(21):2747-61. doi: 10.1101/gad.1602907. PMID: 17974916; PMCID: PMC2045129.
- Zheng Y, Pan D. The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease. *Dev Cell.* 2019 Aug 5;50(3):264-282. doi: 10.1016/j.devcel.2019.06.003. PMID: 31386861; PMCID: PMC6748048.
- Zhong Z, Jiao Z, Yu FX. The Hippo signaling pathway in development and regeneration. *Cell Rep.* 2024 Mar 26;43(3):113926. doi: 10.1016/j.celrep.2024.113926. Epub 2024 Mar 7. PMID: 38457338.

業績

Hinako Maeda, Masakazu Hashimoto, Hiroshi Sasaki. “Blastocoel expansion triggers nuclear translocation of YAP in inner cell mass of preimplantation mouse embryos” JSDB Online Trial Meeting 2020, Sep 24-25 2020 (ポスター発表)

前田日向子「マウス着床前胚のエピブラスト形成過程における YAP 制御機構の解明」大阪大学女性大学院生と企業の交流会 2021 年 11 月 4 日 オンライン (口頭発表) 大阪大学女子大学院生優秀発表賞

前田日向子、橋本昌和、佐々木洋「マウス着床前胚のエピブラスト形成過程における YAP 制御機構の解析」第 44 回日本分子生物学会、2021 年 12 月 3 日、横浜 (ポスター発表)

前田日向子「マウス着床前胚のエピブラスト形成過程における YAP 制御機構の解明」大阪大学生命機能研究科コロキウム オンライン (口頭発表) 2021 年 12 月 9 日

前田日向子、橋本昌和、佐々木洋「マウス着床前胚のエピブラスト形成過程における YAP 制御機構の解明」学術変革領域 (A) 第 1 回領域班会議&第 9 回細胞競合コロキウム 2021 年 3 月 14 日 淡路島夢舞台 (口頭発表) ベストプレゼンテーション賞

前田日向子、橋本昌和、佐々木洋「マウス着床前胚の発生過程における YAP 制御機構の解明」第 11 回細胞競合コロキウム 2024 年 3 月 5 日 ホテルボストンプラザ草津 (口頭発表)

Hinako Maeda, Masakazu Hashimoto, Hiroshi Sasaki. “Blastocoel expansion and AMOT degradation cooperatively promote YAP nuclear localization during epiblast formation in preimplantation embryos” JSDB Annual Meeting 2024, June 19-22 2024 (ポスター発表)

Naoki Hirono, Masakazu Hashimoto, Hinako Maeda, Hiromi Shimojo, Hiroshi Sasaki. “Fate specification triggers a positive feedback loop of TEAD-YAP and NANOG to promote epiblast formation in preimplantation embryos” 投稿中 (2024/5/24-)

Hinako Maeda and Hiroshi Sasaki. “Blastocoel expansion and AMOT degradation cooperatively promote YAP nuclear localization during epiblast formation” 投稿中 (2024/7/4-)

謝辞

本論文の完成にあたり、多くの方々のご支援とご指導を賜りましたことに深く感謝申し上げます。

指導教員である佐々木洋博士には、研究の構想から投稿論文の完成に至るまで、多大なるご指導をいただきました。

予備審査委員を引き受けていただいた立花誠博士、甲斐歳恵博士、堀江健生博士、深川竜郎博士には、研究へのアドバイスのみならず、精神的なケアをもいただきました。ありがとうございました。特に立花誠博士は修士号取得以前からおおよそ六年間副査として大変お世話になりました。

大阪大学大学院 生命機能研究科 個体機能学講座 初期胚発生研究室スタッフの内川昌則博士、橋本昌和博士、下條博美博士、田辺仁紀子氏、そして後輩の増井大介氏、由良南々帆氏、柴田留衣氏、廣野尚暉氏、今野花梨氏、大塚知亮氏、荒井貫太氏、横島萌氏、今西美月氏、久住和希氏は、日々の研究活動において多くの有益な意見と大学院生活への活力をいただきました。

深川研究室の竹之下憂祐博士からはいつも温かい励ましを頂きました。

画像解析の一環でお世話になった ZEISS の佐藤さんには Imaris を用いた解析方法の検討や LSM900、ZEN の使用に関して有益なアドバイスをいただきました。

理化学研究所、大浪修一博士のチームの東裕介博士には核形態の解析方法の検討に関して有益な助言をいただきました。

JST 次世代、株式会社アイポアからは研究を進めるための研究費や日々の生活への経済的支援をいただけたことにも感謝申し上げます。

長い間研究に専念することに多大なる理解と精神的な支えをいただいた家族や友人、松井将也氏、そして千里剣心会のみなさま、ありがとうございました。

博士課程で関わったすべてのヒトと本研究で使用したマウスに深い感謝の意を表します。