

羊膜類の初期発生および  
多能性の分子基盤の解明

京都大学大学院理学研究科生物科学専攻

中能 祥太

## 要旨

### 序論

様々な細胞に分化できる多能性の細胞状態を規定する分子機構は、主に哺乳類の胚をモデルに研究されてきた。ゆえに、哺乳類以外の動物種で同様の機構が働くのか、明らかではない。特に、鳥類や爬虫類では初期発生の様式が哺乳類とは大きく異なっているため、これらの生物種間で多能性を制御する機構を比較し、その分子機構の保存性と多様性を調べることは羊膜類の初期発生を理解する上で重要である。

### 方法

鳥類と爬虫類の胚性細胞を無血清培地で培養し、哺乳類の多能性の制御において重要な役割を持つ Fgf/Erk シグナルを活性化または阻害し、その影響を調べることで、鳥類と爬虫類の胚性細胞における Fgf/Erk シグナルの役割を検証した。また、多能性状態を作り出す転写因子を解析するため、マウスで多能性状態の樹立と維持に関わる Nanog と Pou5f1 のニワトリホモログに対する特異的な抗体を作製し、胚や培養細胞でのこれらのタンパク質の発現を調べた。さらに、ニワトリにおいて多能性状態を支持する候補因子を網羅的な遺伝子発現解析から探索し、それらの機能をニワトリ胚性細胞の培養系を用いて解析した。

### 結果と考察

第1章：Fgf/Erk シグナルを阻害すると、ニワトリ・ウズラ・ヤモリ・スッポンの胚盤葉から、マウスの ES 細胞のコロニーに形態的に類似したドーム状のコロニーが形成された。一方で、原腸陥入時以降の胚からは、このようなコロニーが形成されず、むしろ Fgf/Erk シグナルの阻害下では細胞の生存と増殖が阻害された。このことから、胚体内の多能性を持つ未分化な細胞は、原腸陥入を境に多能性を失い、Fgf/Erk シグナル依存的な増殖に移行することが示唆された。

第2章：遺伝子を導入した 293T 細胞とニワトリ組織の免疫染色によって、作製した抗体がニワトリの Nanog と PouV を高い特異性で認識することを確認した。これらの抗体を用いて、多能性を持つ epiblast の細胞や始原生殖細胞で Nanog が特異的に発現することが明らかになった。また、これまで報告されていた PouV の遺伝子構造を修正し、新規に追加された N 末端のアミノ酸配列にもとづいて PouV 遺伝子の分子進化を考察した。

第3章：第1章の結果から、ニワトリの胚では原腸陥入期以降、多能性が失われることが明らかとなった。そこで、多能性を正に制御する因子が原腸陥入前に機能していると考え、この仮説に合った発現動態を示す遺伝子を探索した。その結果、Jak/Stat シグナルが、ニワトリ胚の細胞の多能性を正に制御している可能性が示され、人為的な活性制御の実験からもその可能性が支持された。

### **結論**

哺乳類で多能性を制御する分子経路を鳥類と爬虫類で検証した結果、哺乳類で多能性を維持するのに重要と言われている転写因子のうち、Nanog の機能は種間で共通しているが、PouV の機能は多様化していることが示唆された。一方、シグナル経路による多能性状態の制御は種を越えてよく保存されていることが示され、Jak/Stat 依存的な多能性の状態から Fgf/Erk 依存的な分化状態への移行が、羊膜類の初期発生に一般的に見られる基本原理であることが考察された。

## 目次

序論	．．．．．01
第1章	．．．．．05
Fgf/Erk シグナルと Gsk3 シグナルによる多能性の負の制御	
結果	．．．．．07
考察	．．．．．21
第2章	．．．．．24
自作抗体による cNanog と cPou5f3 のタンパク質解析	
結果	．．．．．26
考察	．．．．．41
第3章	．．．．．45
Jak1/Stat3 シグナルによる多能性の正の制御	
結果	．．．．．47
考察	．．．．．55
結論	．．．．．58
材料と方法	．．．．．63
謝辞	．．．．．75
参考文献	．．．．．77

## 重要略語一覧

ICM : inner cell mass、内部細胞塊

ESCs : embryonic stem cells、胚性幹細胞

iPSCs : induced pluripotent stem cells、人工多能性幹細胞

TE : trophoblast、栄養外胚葉

Fgf : fibroblast growth factor、線維芽細胞増殖因子

Mek : MAPK/ERK kinase

Erk : extracellular signal-regulated kinase

Gsk3 : glycogen synthase kinase3

PD : PD0325901、Mek1 の選択的な阻害剤

CH : CHIR99021、Gsk3 の選択的な阻害剤

2i : two inhibitors、Mek と Gsk3 の阻害剤を添加した培養条件のこと

st. : stage、ニワトリ胚の発生段階をローマ数字とアラビア数字によって

st.I-XV : 受精から原条形成まで (EG ステージ)

st.2-45 : 原条形成から孵化まで (HH ステージ) と表記する

LIF : leukemia inhibitory factor、白血病抑制因子

IL-6 : interleukin-6

gp130 : glycoprotein 130

Jak : Janus kinase

Stat : signal transducers and activator of transcription

Socs : suppressor of cytokine signaling

Rux : Ruxolitinib、Jak1・Jak2 の選択的な阻害剤

AG : AG490、Jak2・Jak3 の選択的な阻害剤

4HT : 4-hydroxytamoxifen

## 序論

多能性とは、その生物の成体を構成する全種類の細胞に分化できる細胞の性質であり(Smith, 2006)、種々の分化細胞を持つ多細胞生物の初期発生にとって根幹となる性質である(Agata et al., 2006; Funayama, 2010)。多能性の獲得や維持に関わる分子機構は主に哺乳類、特に、マウスの多能性細胞集団である内部細胞塊 (ICM : inner cell mass) から樹立されるマウス胚性幹細胞 (ESCs : embryonic stem cells) を用いて研究されてきた(Fig. INT-1) (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Niwa et al., 2000; Okamoto et al., 1990; Schöler et al., 1990)。

人工多能性幹細胞 (iPSCs : induced pluripotent stem cells) の報告以来、多能性の細胞状態を作り出す転写因子を主眼においた研究が多く行われている (Okita et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007)。しかしながら、哺乳類の発生で最初に起こる細胞系列決定は、ICM と胎盤の前駆組織である栄養外胚葉 (TE : trophoblast) の分岐であり、哺乳類の多能性を制御する分子機構は胎盤を形成するために他の生物種と異なっている可能性がある(Fig. INT-2)(Niwa et al., 2000; 2008; 2005)。胎盤を持たない脊椎動物、例えば鳥類や爬虫類の多能性の制御機構を調べ、哺乳類の機構と比較して保存性や多様性を検証することは、多能性の制御機構をよりよく理解するために重要である(Cañon et al., 2011)。しかし、過去にニワトリ ESCs 樹立の報告がいくつもあるものの(Pain et al., 1996; Petite et al., 2004)、鳥類・爬虫類の多能性状態を維持または脱却させる分子機構はほとんど解明されていない。

これまで理解されてきた哺乳類の多能性を制御する分子経路は 3 つある(Fig.

INT-1)。すなわち、1) 未分化状態のまま細胞を増殖させる Jak/Stat シグナルと 2) その下流で働く転写因子、および 3) 多能性を失わせ分化を誘導する Fgf/Erk と Gsk3 シグナル、である。1)と 2)を合わせて多能性の正の制御、3)を多能性の負の制御と大別することもできる。本研究は 3 つの章に渡って、鳥類・爬虫類におけるこれらの 3 つの分子経路を検証する。

第 1 章は、シグナル伝達による多能性の負の制御機構に注目する。この機構に関わる Fgf、Erk、Gsk3 などの因子は、種を越えて様々な生体反応に関わり、非常に高い配列の保存を持つことから、機能も普遍的であることが予想される。このため、これらの因子の鳥類・爬虫類の多能性への関与を検証することから始めた。鳥類と爬虫類の胚を集めて細胞培養を行うことで、広汎な生物種の機構を検証することを目指した。

哺乳類の Nanog と Pou5f1 は、マウス ESCs の多能性転写因子の中でも中心的な役割を担うが(Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Nichols et al., 1998)、cNanog や cPouV がニワトリの多能性の樹立や維持に機能を持つかは不明瞭であった(Lavial et al., 2007)。第 2 章では、これら 2 つの転写因子のニワトリの相同遺伝子、*cNanog* と *cPouV* をタンパク質レベルで解析した。*cNanog* と *cPouV* に対するポリクローナル抗体を作製し、この抗体を用いた実験結果から新たな知見を得たのでそれについて報告する。

第 3 章は、ニワトリの胚盤葉で働く多能性の正の制御機構を模索する。哺乳類では、サイトカインである LIF やその下流で働く Jak/Stat3 シグナルが多能性転写因子の活性化を含めて多能性の正の制御因子として知られてきたが(Niwa et al., 2009)、LIF は種間でアミノ酸配列の保存性が低く、Jak/Stat3 シグナル

の胚発生における機能も不明瞭であったため(Takeda et al., 1997)、ニワトリで独自に正の制御因子を見つけ出すことを試みた。そこで、第 1 章で得た知見をもとに、細胞運命の決定の時期に発現が変化する遺伝子を網羅的に探索した。また、第 2 章で得た、ニワトリ多能性細胞の分子マーカーを利用して、細胞の分化状態をモニターしながら検証実験を行った。

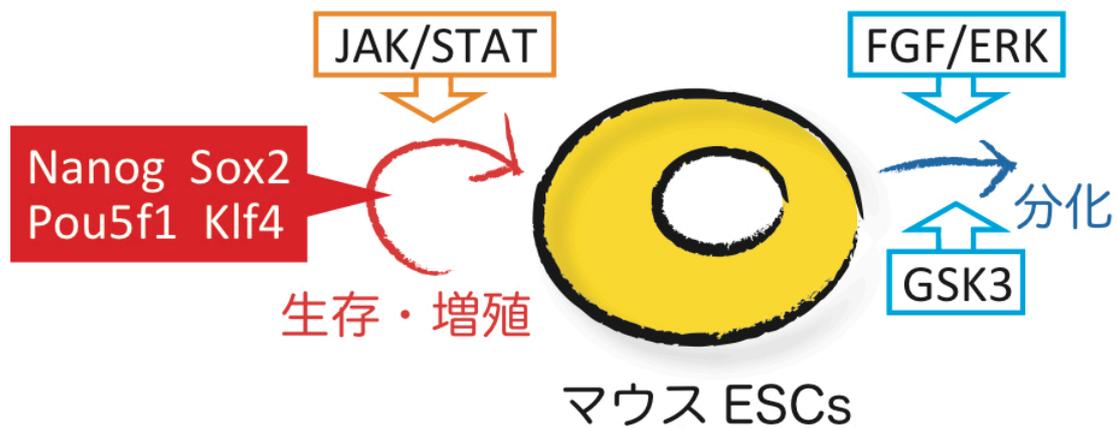


Fig. INT-1 マウス ESCs の研究によって明らかになった、哺乳類の多能性を制御する分子機構。赤い矢印は多能性を維持した状態での生存や増殖を表し、Jak/Stat シグナルとその下流の多能性転写因子 (Nanog や Pou5f1 など) によって支持される (多能性の正の制御)。青い矢印は多能性の状態から分化状態への移行を表し、Fgf/Erk シグナルや Gsk3 シグナルによって誘導される (多能性の負の制御)。

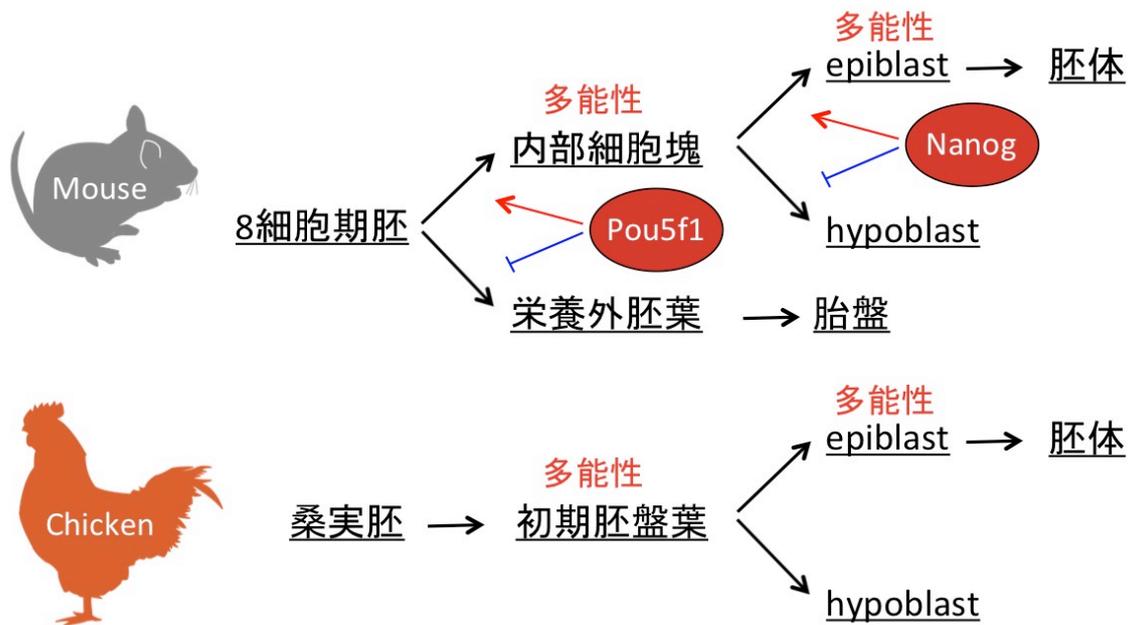


Fig. INT-2 マウスとニワトリの初期発生の比較。マウスでは種特異的な器官である胎盤を形成するために、ニワトリには見られない細胞系譜の分岐（発生初期における内部細胞塊と栄養外胚葉の分岐）が起こる。多能性関連転写因子として有名な Pou5f1 (Oct3/4) はこの段階に関与している。一方、epiblast と hypoblast の分離はマウス・ニワトリに共通に認められ、マウスでは Nanog が関与していることが知られている。このように、多能性転写因子は、種間で共通しない発生イベントに関与することがあり、その機能が種を越えて保存されているのかは検証の必要がある。

## 第 1 章 Fgf/Erk シグナルと Gsk3 シグナルによる多能性の負の制御

MAPK/ERK kinase (Mek) と glycogen synthase kinase3 (Gsk3) を阻害する 2i と呼ばれる条件において、マウス ESCs が多能性を保って増殖し続けることが、近年になって報告された(Ying et al., 2008)。この条件で維持されるマウス ESCs は、密で多層なコロニーを形成する。この特徴的なドーム状の形態は、naive state と呼ばれる多能性状態の 1 つの形態的な指標とされている(Nichols and Smith, 2009)。

線維芽細胞増殖因子 (Fgf : fibroblast growth factor) は、Mek の活性化を通して extracellular signal-regulated kinase (Erk) を活性化する(Thisse and Thisse, 2005)。マウスの初期胚において、Fgf/Erk シグナルは多能性細胞の分化に重要な役割を持つことが明らかになってきた(Lanner and Rossant, 2010)。また、Fgf/Erk シグナルは培養下においてマウス ESCs の分化を誘導する(Kunath et al., 2007)。さらに、Erk シグナルによる分化誘導作用は、扁形動物のプラナリアの多能性細胞にも見られ(Tasaki et al., 2011)、Fgf/Erk の役割は、広い生物種に保存された性質であることが示唆されていた。

本章では、Fgf/Erk シグナルに注目し、鳥類 (ニワトリ、ウズラ) と爬虫類 (ヤモリ、スッポン) の胚を用い、培養細胞をベースとした研究手法を取った。他の因子の影響を排除するため、マウス ESCs の培養に使われている N2B27 という無血清培地を用いた(Nichols and Ying, 2006; Ying and Smith, 2003)。この培地に Mek と Gsk3 の阻害剤を添加することによりマウスやラットの ESCs が未分化状態で維持される(Buehr et al., 2008; Li et al., 2008; Ying et al., 2008)。

この N2B27 培地に特定の細胞外因子を加え、胚性細胞の形態や遺伝子発現への影響を比較した。

## 結果

### ニワトリ胚盤葉の細胞は *Mek1* と *Gsk3* 阻害下でドーム状コロニーを形成する

st.X-XI (EG stage X-XI、略語参照、(Eyal-Giladi and Kochav, 1976)) のニワトリ胚盤葉の細胞を、N2B27 培地 (basic condition) で培養すると、細胞は密集したコロニーを形成したが、コロニーは伸長し細胞間の境界も顕著だった (Fig. 1-1A、矢じり)。 *Mek1* の選択的な阻害剤である PD0325901 (Bain et al., 2007) を添加すると (PD condition)、細胞は密集し、円形型で表面の滑らかなコロニーが現れたが、潰れたコロニーも同時に観察された (Fig. 1-1B)。次に、 $\beta$ -catenin をリン酸化して分解させる *Gsk3* の選択的な阻害剤、CHIR99021 (Murray et al., 2004) を PD0325901 とともに添加した (2i condition) ところ、細胞は密集し、円形で滑らかなコロニー (ドーム状コロニーと呼ぶ) が観察された (Fig. 1-1C、矢印)。ドーム状コロニーは、2i condition で培養されたマウスやラットの naive ESCs に形態的に類似していた (Fig. 1-1C、矢印)。CHIR99021 を単独で添加すると、密なコロニーが形成されたが (Fig. 1-1D、矢印)、周縁部が不明瞭で表面が隆起しているコロニーや、茶色いコロニーも観察された (Fig. 1-1D、矢じり)。(1) 直径が  $50\mu\text{m}$  以上、(2) 長軸が短軸の 2 倍以下、(3) 縁の 2/3 以上が明瞭、(4) 表面が滑らか、かつ (5) 多層なコロニーを、ドーム状コロニーと定義した。各条件におけるドーム状コロニーの数を定量化したところ、basic、PD、CH condition に比べ、2i condition では、ドーム状コロニーの数は増え、サンプルごとの形成されるコロニー数が安定した (Fig. 1-1E)。これらの結果は、2つの阻害剤の組み合わせがドーム状

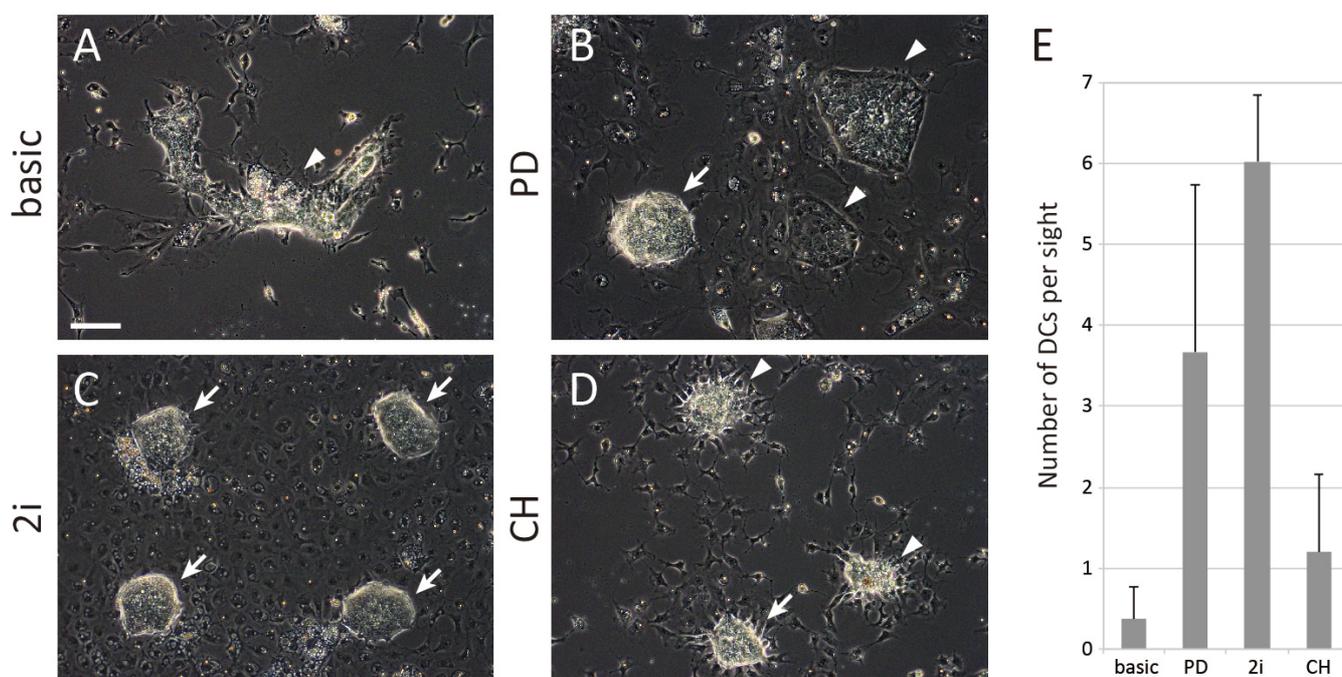


Fig. 1-1 N2B27 をベースとした培地におけるニワトリ胚の細胞培養。ニワトリ胚盤葉の細胞を(A) basic、(B) PD (PD0325901; Mek 阻害剤)、(C) 2i (PD+CH)、(D) CH (CHIR99021; Gsk3 阻害剤) conditions の条件で 2 日間培養した。矢印は、ドーム状コロニーを示している。(B) の矢じりは単層化したコロニーを、(D) の矢じりは表面が滑らかではなく明瞭な縁を持たないコロニーをそれぞれ示している。全ての写真は同じ倍率で撮影した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を表す。(E) 1 視野(約 2.4  $\text{mm}^2$ )あたりのドーム状コロニーの数。平均値と標準偏差 (n=3) を示している。

コロニーの形成を促進することを示している。しかし、ドーム状コロニーのマウス ESCs コロニーに対する形態的な類似にも関わらず、ドーム状コロニー内の細胞同士は互いに強く接着していて完全に分離することができず、マウス ESCs で示されるようなキメラ形成解析による多能性の確認はできなかった。

### **ドーム状コロニーは細胞の分裂と接着によって生じる**

ドーム状コロニーが、分離が不十分だった細胞の集まりではなく、細胞増殖によって形成されることを確認するため、ドーム状コロニーの形成過程をタイムラプスイメージングにより観察した。培養開始から数時間で、培養ディッシュに接着した少数の細胞の集まりが一度広がり (Fig. 1-2A, 8.0h)、その後、再集合した (Fig. 1-2A, 16.0h)。また、密集した細胞塊同士がまとまってより大きな塊を形成することが観察された (Fig. 1-2A, 20.5-21.0h)。一方で、このような細胞塊に接着しない単独の細胞も見られた。核染色を行ったところ、ドーム状コロニー内の細胞は細胞分裂をしていることが明らかになった。(Fig. 2B, 矢印)。抗 E-Cadherin 抗体を用いた免疫蛍光染色の結果、ドーム状のコロニーの細胞は E-Cadherin を発現しているが、コロニーの周辺に拡がる単独の細胞は E-Cadherin を発現していないことが分かった (Fig. 1-2B, C)。これらの結果から、ドーム状コロニーは細胞の増殖と、細胞塊の集合によって成長することが分かった。また、細胞間接着に関して少なくとも 2 種類の細胞集団が存在し、E-Cadherin の有無がこれを分けている可能性が示唆された。

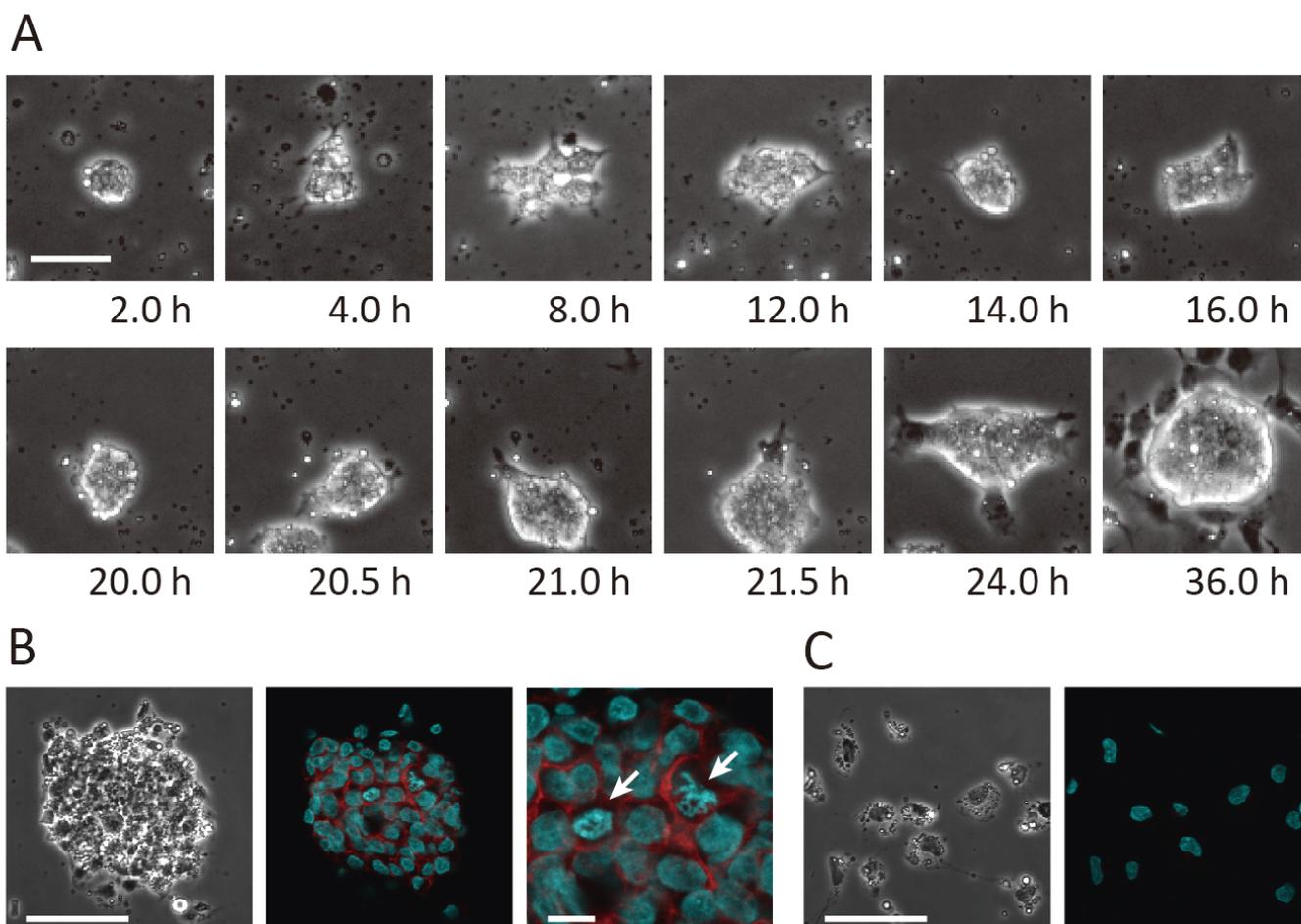


Fig. 1-2 ドーム状コロニーの形成過程の経時写真と免疫染色像。(A) 同じコロニーを時間を追って撮影した。播種してからの経過時間が記されている。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。同じ培養中の(B)ドーム状コロニーと(C)単独細胞のHoechst33342による核染色と抗 E-Cadherin 抗体による免疫蛍光染色像。明視野と蛍光観察 (シアン:核、赤: E-Cadherin) の写真を並列した。矢印は分裂期にある細胞を示す。(B)と(C)の左のパネルのスケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 、(B)の右のパネルのものは 10  $\mu\text{m}$  を表す。

### **ドーム状コロニーは原条伸長前の胚からしか形成されない**

ドーム状コロニーの由来を調べるため、各発生ステージのニワトリ胚から細胞を播種して 2i condition で培養し、形成されたドーム状コロニーの数を計測した。原条形成の初期やそれ以前の胚から形成されるドーム状コロニーの数には、大きな違いは見られなかった(Fig. 1-3)。一方で、原条が伸長している st.3+ (HH stage 3+、略語参照、(Hamburger and Hamilton, 1951)) の胚から細胞を播くと、形成されるドーム状コロニーの数は大きく減少し(Fig. 1-3)、原条の伸長が完了した st.4 より後の発生ステージの胚では、ドーム状コロニーはほとんど形成されなかった。このことから、ドーム状コロニーの形成能に関して、st.4 に明確な境界があることが示唆された。以上の結果から、ドーム状コロニーの起源となる細胞集団は、原条が伸長した後の胚には存在しないことが示された。このことは胚性細胞の分化ポテンシャルを反映しているものと考えられる。

### **密なコロニーは Fgf/Erk シグナルの活性により消散する**

Erk シグナルの活性が培養細胞に与える影響を調べるため、塩基性 Fgf (bFgf) を N2B27 培地に添加した。この FGF condition において、多くの細胞は単層のコロニーを形成し、細胞同士が離れていく傾向が見られた(Fig. 1-4A)。2i condition を培養 2 日目に FGF condition に置換すると、ドーム状コロニーは単層になって広がった(Fig. 1-4B)。

ニワトリの Mek1 と Gsk3 $\beta$  のアミノ酸配列は、ヒトやマウスの相同タンパク質のアミノ酸配列に 90%以上一致することから、PD0325901 と CHIR99021 は、ニワトリの細胞においても哺乳類の細胞と同様の対象分子に作用すること

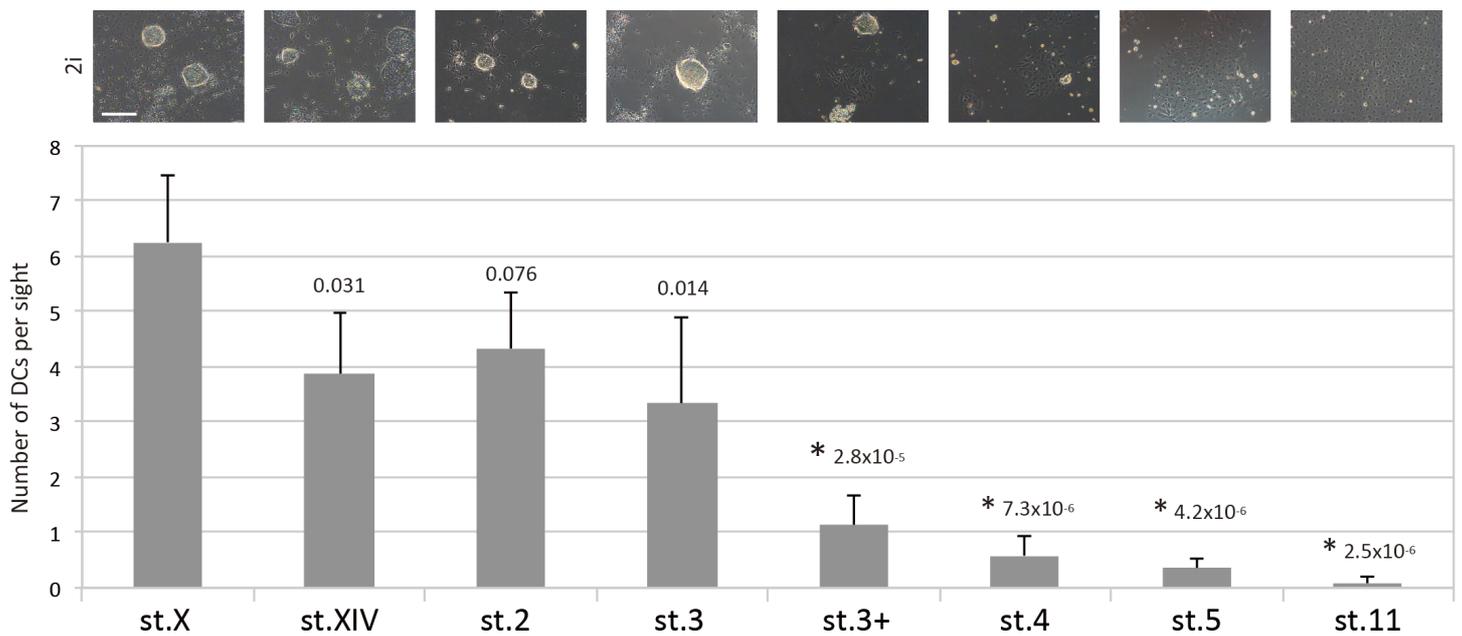


Fig. 1-3 胚発生の経過に伴うドーム状コロニー形成能の変化。上のパネルは各ステージの胚から 2i condition で 2 日間の培養をして形成されたコロニーの例。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。全ての写真は同じ倍率で撮影した。下のパネルはドーム状コロニーの数の定量解析。エラーバーは各ステージごとに 6 つの独立した実験から得られた標準偏差を示している。各バーの上の数値は t 検定によって st.X との間に求められた P 値を表し、アスタリスクは P 値が 0.01 より小さいことを示す。

が示唆される(Fig. 1-4C)。PD0325901 のニワトリ細胞への効果をさらに確かめるため、ウエスタンブロッティングを行ったところ、bFgf の添加で見られたリン酸化 Erk の増加は、bFgf 添加の前に PD0325901 を加えることで抑えられた(Fig. 1-4D)。したがって、PD0325901 は、ニワトリの細胞においても Mek による Erk のリン酸化を妨げることにより Fgf/Erk シグナルを阻害していると考えられた。Fig. 1-1 に示したデータと合わせると、Fgf/Erk シグナルの阻害と活性化が、ドーム状コロニー形成に対して逆の効果を持つことが明らかとなった。

#### **産卵前後の卵のウズラ胚細胞もドーム状コロニーを形成する**

ドーム状コロニーが多能性の細胞に由来するのであれば、より分化ポテンシャルの高い細胞も同様のコロニーを形成することが期待される。この仮説は、産卵前の卵を使って検証できる。そこで、ウズラを飼育し、産卵前と後の卵から胚を回収しその細胞を培養した。初めに、Fgf/Erk と Gsk3 シグナルが、ウズラ胚盤葉の細胞に同様の効果を示すことを確認するため、産卵後のウズラ卵から st.X 胚を回収し細胞を播種した。その結果、ニワトリで観察されたように、2i condition においてドーム状コロニーが観測された(Fig. 1-5B, 矢印)。ウズラのドーム状コロニーは、basic condition では少なく(Fig. 1-5A)、FGF condition では全く見られなかった(Fig. 1-5C)。次に、産卵前の卵から回収した st.V のウズラ胚を培養したところ、basic と 2i condition においてドーム状コロニーが形成された(Fig. 1-5D, E, 矢印)。以上の結果より、ウズラの初期胚も Fgf/Erk シグナル依存的にドーム状コロニーを形成すること、および高い分化ポテンシャルを持つ細胞がドーム状コロニーを形成することが示された。

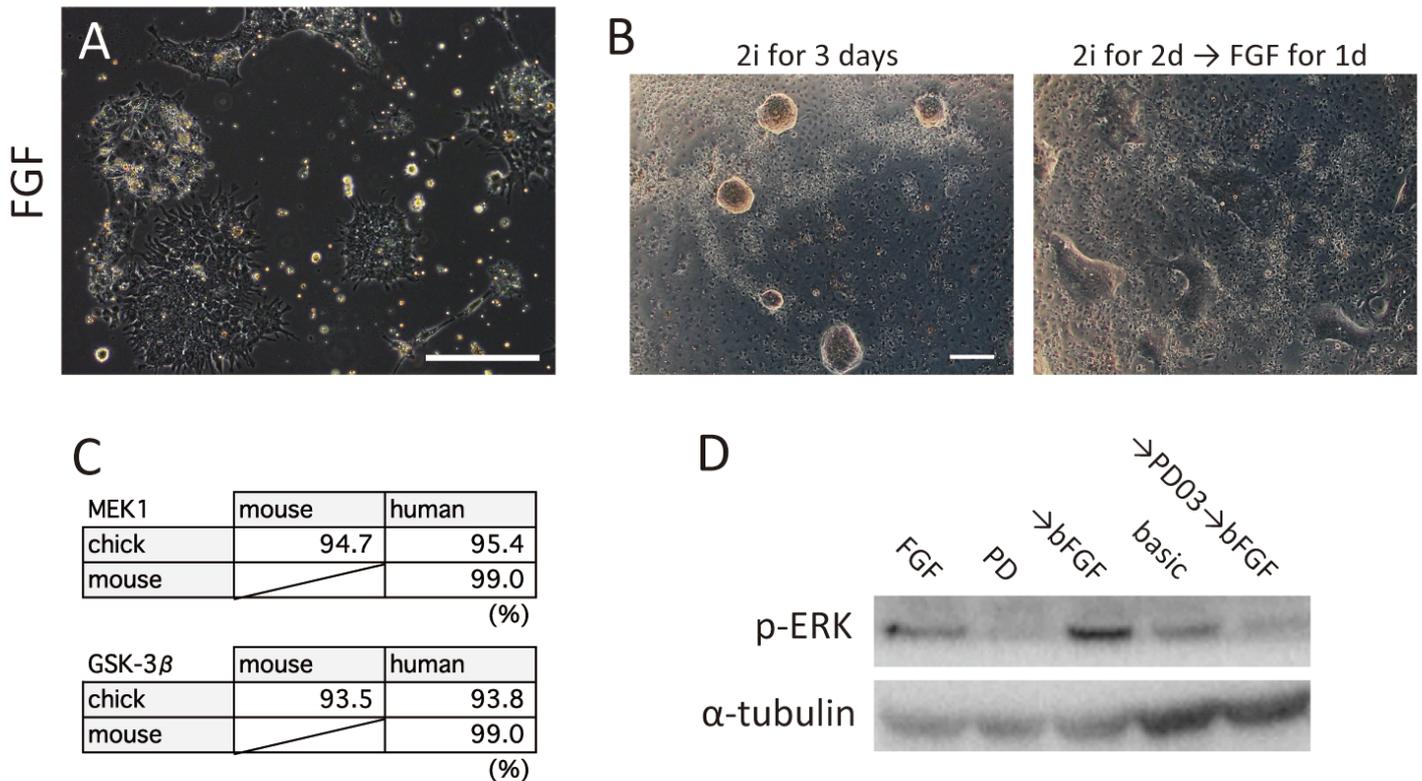


Fig. 1-4 ニワトリ胚性細胞への Fgf/Erk シグナルの影響。(A) bFgf 存在下で培養されたニワトリ胚盤葉の細胞。スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。(B) ドーム状コロニーへの bFgf の影響。培養 2 日目に 2i から FGF condition へと培地を交換した (右)。スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。(C) ニワトリ、マウス、ヒトの間で見た Mek1 と Gsk3 $\beta$  タンパク質のアミノ酸配列の相同性。各数字は、一致するアミノ酸残基の割合を Geneious ソフトウェアによって計算した値を表す。使用した配列のアクセッション番号：NP\_989481.1、XP\_416557.2、NP\_002746.1、NP\_001139628.1、NP\_032953.1、NP\_062801.1。(D) 2 日間培養した細胞の全タンパク質を用いたのウエスタンブロッティング。矢印は、記載されている阻害剤や因子を細胞回収の直前に培地に加えたことを示す。リン酸化された Erk は PD0325901 の添加によって減少した。各レーンに泳動したタンパク質量が揃っていることを確認するために、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体の染色を行った。

### ヤモリ卵割期胚を体外で発生させることで胚盤葉が入手できる

爬虫類初期胚の入手は困難で、初期発生の記述は限られている。ニホンヤモリの場合、産卵前に原条の形成は完了しており、産卵時には体節期まで発生が進行している。そこで、爬虫類の胚盤葉を得るために、卵を持つ野生のヤモリを捕獲し、半透明の腹部を通して卵形成を観察した(Fig. 1-6A)。観察を開始して数日の間に、卵巢中の卵の内 2 つが大きく顕著になった後、その色が黄色から白色に変化した。白色化途中の卵は卵割期の胚を含んでおり、こうして入手したヤモリ胚は母体から取り出しても発生し続けた(Fig. 1-6B)。これらの実験により、ヤモリの卵割期胚を取り出しその発生を体外で観察することで、ヤモリ胚盤葉を入手する方法が見出された。

### ヤモリとスッポンの胚性細胞も *2i condition* でドーム状コロニーを形成する

ドーム状コロニーを形成する性質が爬虫類でも保存されているのか調べるため、上記の方法で得たヤモリの胚からのコロニー形成を検証した。胚盤葉期まで発生したヤモリ胚から細胞を撒くと、*basic condition* 中ではドーム状コロニーは形成されなかった(Fig. 1-7A)が、*2i condition* 中でドーム状コロニーが確認された(Fig. 1-7B, 矢印)。bFgf を添加すると、FGF *condition* 中で見られたニワトリやウズラで見られたように、単層のコロニーが形成された(Fig. 1-7C)。一方で、原腸期の胚から細胞を撒いた場合、ドーム状コロニーは観察されなかった(Fig. 1-7D, E, F)。阻害剤の存在下で、原腸期の細胞の生存率は低下したが(Fig. 1-7E)、bFgf の添加により細胞の増殖が促進された(Fig. 1-7F)。次に、スッポンの胚盤

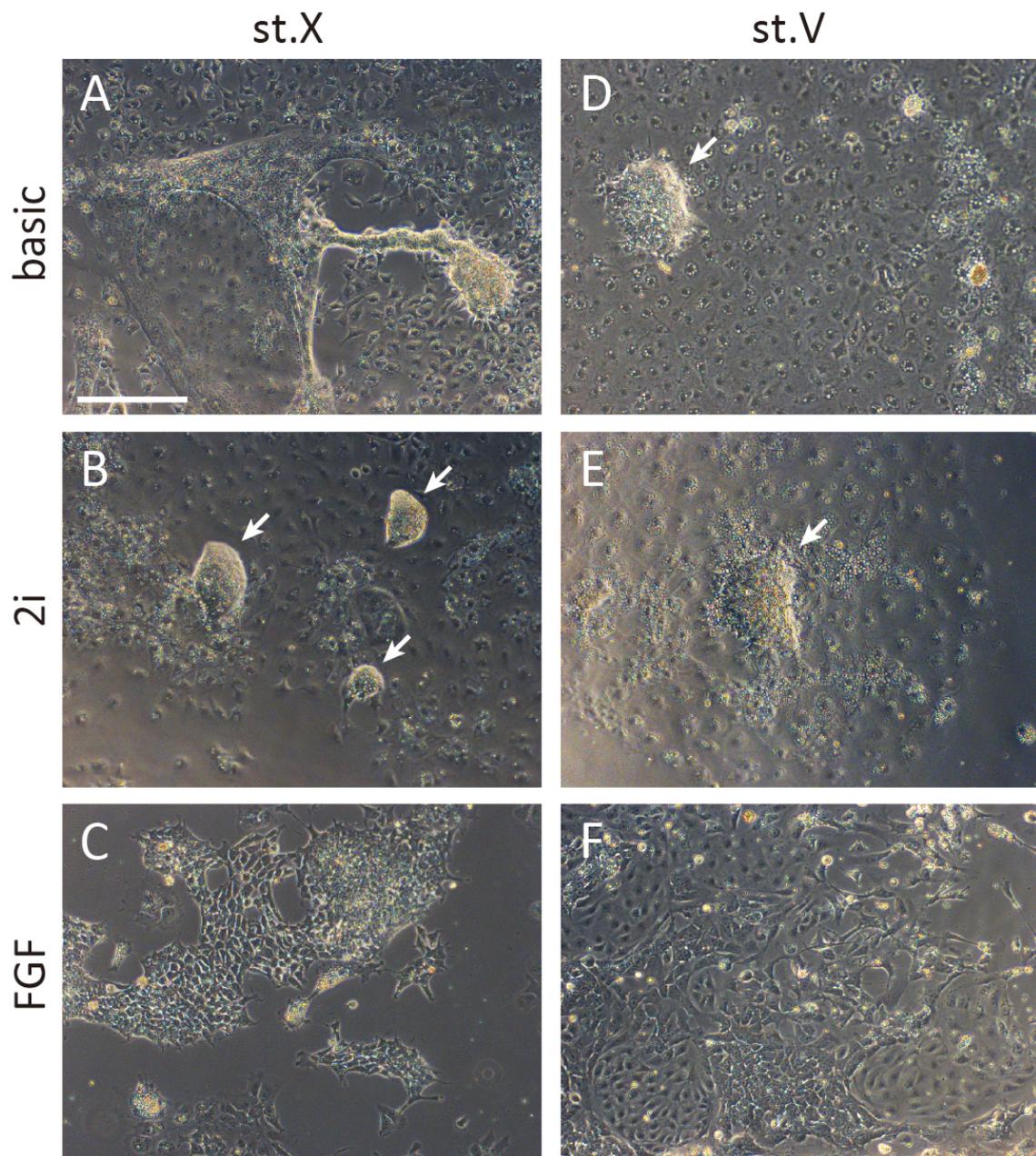


Fig. 1-5 ウズラ胚細胞の細胞。(A) basic、(B) 2i、(C) FGF condition で培養した st.X ウズラ胚 (胚盤葉) の細胞、および(D) basic、(E) 2i、(F) FGF condition で培養した st.V ウズラ胚 (卵割期胚) の細胞。矢印はドーム状コロニーを示す。全ての写真は同じ倍率で撮影し、スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。5つの胚盤葉と 2つの卵割期胚を検証し、全てからドーム状コロニーの形成を確認した。ドーム状コロニーの定義は、ニワトリのものに準ずる。

葉から細胞培養を試みたところ、ヤモリ胚盤葉の細胞と同様に、2i condition においてのみ、ドーム状コロニーを形成した(Fig. 1-7G, H, I, 矢印)。これらの結果から、Fgf/Erk シグナルの阻害によって、ヤモリとスッポンの初期胚からもマウス ESCs 様コロニーの形成が促進されることが示唆された。

### **N2B27 培地系で培養したニワトリ細胞の遺伝子発現**

N2B27 培地をベースとした条件で培養した細胞の状態を分子レベルで調べるため、ニワトリ胚盤葉細胞を basic、2i、FGF condition の 3 条件で培養し、各マーカー遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR によって測定した。まず、ニワトリの生殖細胞関連遺伝子であり、マウスの naive pluripotency マーカーでもある *Nr0b1* および *Dazl* (Kito et al., 2010; Smith et al., 2000; Tesar et al., 2007) の発現量は、2i condition において顕著に上昇し、FGF condition では低下することが明らかになった(Fig. 1-8A)。対照的に、ニワトリ胚の原腸形成に関わる *Lefty*、*Brachyury(T)*、*Fgf8* (Bertocchini, 2004; Sheng et al., 2003; Yang et al., 2002) は、FGF condition で大きく発現量を上げたが、2i condition でその発現は抑えられた(Fig. 1-8B)。一方で、2i condition で発現が維持される哺乳類の多能性マーカーの相同遺伝子(*Nanog*、*PouV*、*Sox2*、*Klf2*、*Klf4*、*Myc*、*Tbx3*) (Hall et al., 2009; Lavial et al., 2007; Niwa et al., 2009) の発現は、2i condition で明確な上昇を示さなかった。*Nanog* は FGF condition で強く抑制され、*PouV* と *Tbx3* の発現レベルは basic と 2i condition 間でほぼ同じだった。2 つの *Klf* ファミリー遺伝子と *Myc* の発現は、2i condition で低かった(Fig. 1-8C)。

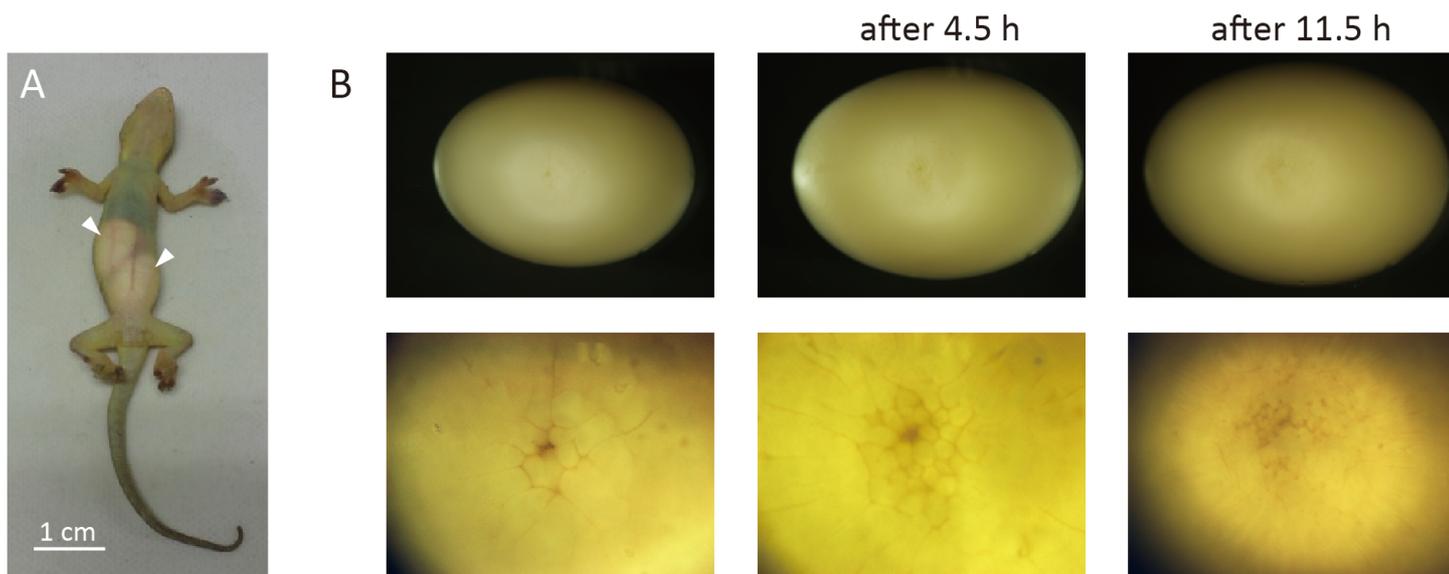


Fig. 1-6 ヤモリの胚と卵培養。(A) メスのヤモリ。矢じりは腹部に透けて見える2つの卵を示す。(B) 経時的に観察したヤモリの卵培養。卵の長軸は1.2 cm。写真ごとに倍率は異なる。

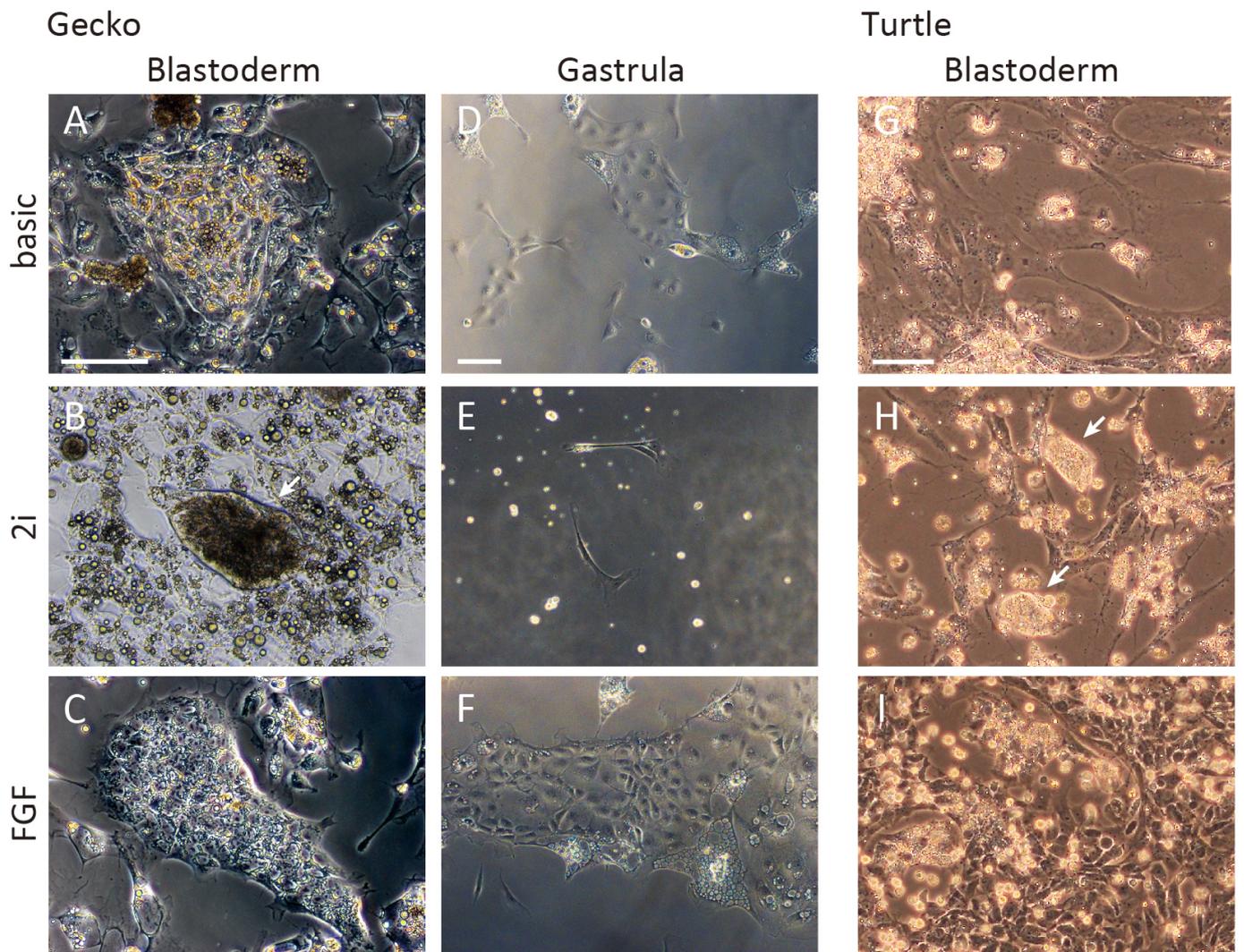


Fig. 1-7 ヤモリとスッポン胚細胞の細胞。(A) basic、(B) 2i、(C) FGF conditionで培養したヤモリ胚盤葉の細胞、および(D) basic、(E) 2i、(F) FGF conditionで培養したヤモリ原腸胚の細胞。(G) basic、(H) 2i、(I) FGF conditionで培養したスッポン胚盤葉の細胞。矢印はドーム状コロニーを示す。各列の写真は同じ倍率で撮影し、スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。5 つのヤモリ胚盤葉の内 2 つからドーム状コロニー形成を確認したが、10 のヤモリ原腸胚・神経胚・体節期胚からはコロニーは形成されなかった。また、3 つのスッポン胚盤葉の内 2 つからドーム状コロニーの形成を確認した。ドーム状コロニーの定義は、ニワトリのものに準ずる。

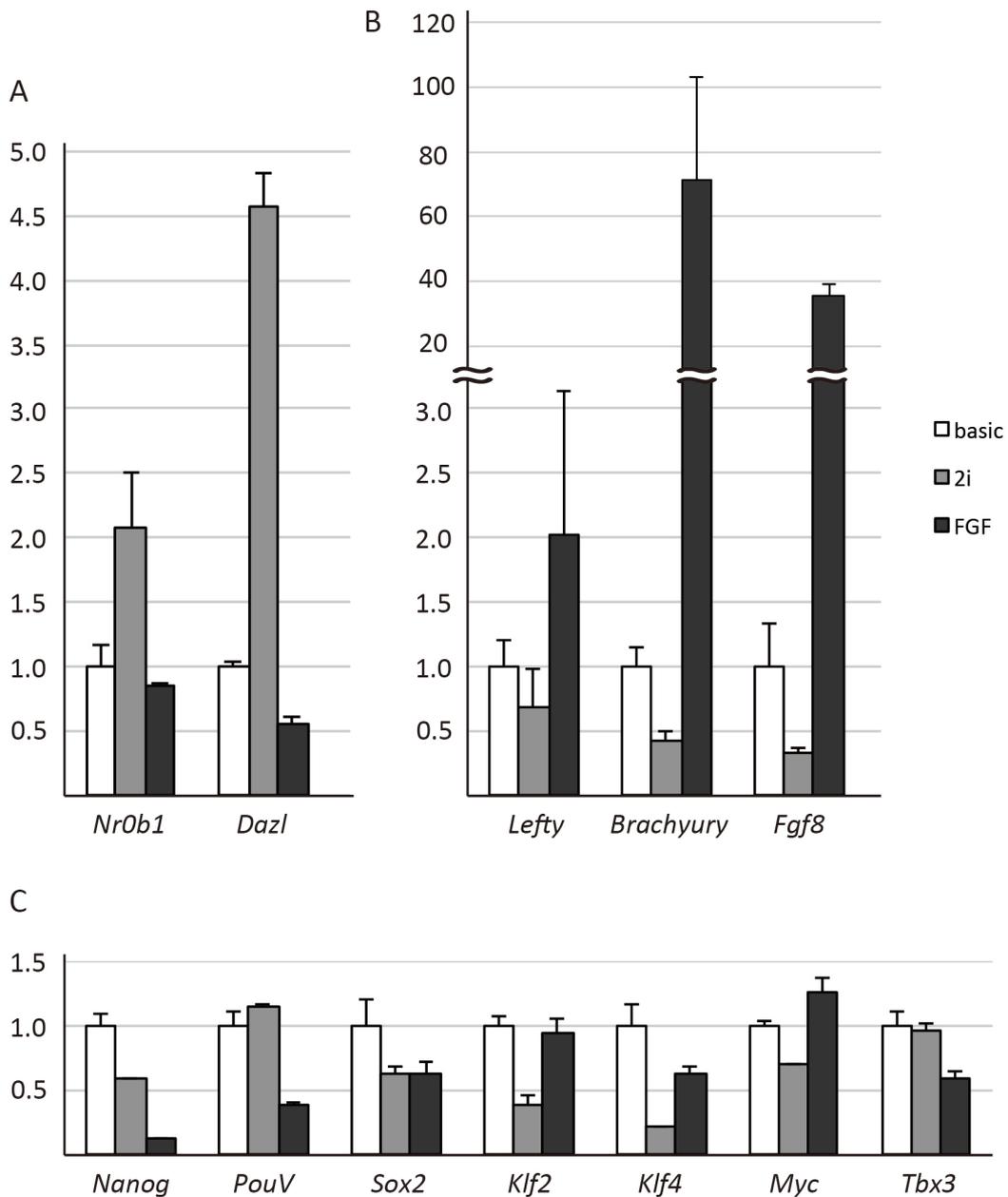


Fig. 1-8 2日間培養したニワトリ胚盤葉の細胞のqPCRによる遺伝子発現解析。縦軸はbasic conditionでの発現量を1.0としたときの相対的な遺伝子発現量を示す。ニワトリの細胞をbasic、2i、FGF conditionで培養し、(A) 生殖細胞関連遺伝子、(B) 原腸形成関連遺伝子、(C) 哺乳類の多能性転写因子の発現量を比較した。エラーバーは3回の実験から得られた標準偏差を示す。

## 考察

### マウス ESCs のコロニーと *2i condition* で形成されるコロニーの形態的類似

*2i condition* で培養されたニワトリ胚盤葉由来のコロニーは、マウスやラットの ESCs に形態的に類似していた(Fig. 1-1C)。マウスとラットの ESCs が示す特徴的なドーム状のコロニーの形態は、多能性を持つ細胞の特徴の 1 つとして用いられている(Greber et al., 2010; Hanna et al., 2010; Najm et al., 2011)。コロニーの形態は、細胞の接着分子を反映しており(Nakagawa and Takeichi, 1998)、細胞間接着因子である E-Cadherin が、マウス ICM やマウス ESCs の分化ポテンシャルに重要な役割を果たすことを考えると(Lyashenko et al., 2011; Shirayoshi et al., 1983)、げっ歯類の ESCs のコロニーと今回観察されたドーム状コロニーの形態的な類似は、分化ポテンシャルを含めた細胞の性質の類似性を表しているのかもしれない。

### 分化能、ドーム状コロニー形成能、および *Fgf* 依存性に同時に起こる変化

本研究により、ニワトリ胚の st.3 と st.4 の間に、明確なドーム状コロニー形成能の違いがあることが明らかになった(Fig. 1-3)。原条完成前のニワトリ胚が高い分化能を持つことは、多くの先行研究が示している(Abercrombie and Bellairs, 1954; Abercrombie and Waddington, 1937; Gallera and Nicolet, 1974)。st.4 以前のニワトリ胚は、細胞運命が決まっていない細胞によって構成され、両生類のシュペーマンオーガナイザーに相当するヘンゼン結節も再生できるが(Psychoyos and Stern, 1996)、st.4 以降の胚では再生できない。胚における細胞の運命決定が起こるステージと、培養下でドーム状コロニーを形成で

きなくなるステージが一致することから、ドーム状コロニーが多能性を持つ細胞から形成されるという考えが支持される。さらに、Fgf/Erk シグナルがヤモリの胚盤葉と原腸胚の細胞の増殖に逆の影響を与える(Fig. 1-7B, C, E, F)ことを合わせて考えると、胚発生において Fgf/Erk 非依存的な増殖から Fgf/Erk 依存的な増殖への移行があり、そのタイミングは多能性の喪失と一致することが示唆される。

### **多能性細胞を分化させる Fgf/Erk の機能が進化的に保存されている可能性**

ニワトリの発生において、Fgf ファミリータンパク質は原腸形成に重要な役割を担っており(Sheng et al., 2003; Yang et al., 2002)、Fgf シグナルを阻害すると原腸形成の場である原条が形成されなくなる(Bertocchini, 2004)。今回行った遺伝子発現解析から、細胞培養においても bFgf が原腸形成に関連する遺伝子の発現を誘導することが認められた(Fig. 8B)。一方で、2i condition においては、生殖細胞関連遺伝子が高く発現し、原腸形成マーカー遺伝子は抑制された(Fig. 8A, B)ことから、Fgf/Erk シグナルが阻害されると、胚性細胞は分化せず高い分化能を保つことが示唆された。例えば Brachyury が発現すると上皮間充織転換を起こすために細胞は形態を変化させる(Wilson et al., 1995)。このように、各培養条件に特徴的な遺伝子の発現は、それぞれの特徴的なコロニーの形態に反映されているのかもしれない。ウズラ、ヤモリ、スッポンの原腸未形成胚が Fgf に対応して類似のコロニー形態を示した(Fig. 1-5, 7)ことを合わせて考えると、これらの結果は、未分化状態から分化状態への移行を誘導する Fgf/Erk シグナルの役割が、少なくとも哺乳類・鳥類・爬虫類の共通祖先に由来していること

を示唆している。

一方、PD condition より 2i condition の方がドーム状コロニー形成の効率と安定性を上げたものの(Fig. 1-1E)、Gsk3 阻害の役割は不明瞭である。マウス ESCs では、分化を誘導する転写因子、T-cell factor 3(Tcf3)の活性が、 $\beta$ -catenin が蓄積することで阻害されるということが示されている(Wray et al., 2011; Yi et al., 2011)。しかしながら、Gsk3 や  $\beta$ -catenin の機能は多岐に渡る(Frame and Cohen, 2001; Lyashenko et al., 2011)ために状況は複雑で、Gsk3 の阻害がどのように効果を発揮するのか知るためには更なる実験が必要と思われる。

#### **多能性幹細胞の培養に向けて**

2i condition で培養したニワトリ、ウズラ、ヤモリ、スッポンの細胞は、形態的にマウス ESCs に類似していたにも関わらず、継代によって長期間培養することはできなかった。このことは、鳥類・爬虫類の多能性を正に制御する因子があり、Fgf/Erk および Gsk3 シグナルを阻害するだけではこれらが活性化されなかったことを表しているのかもしれない。マウスやラットの ESCs 作製においても、2i condition 単独では維持できないことがあり(Buehr et al., 2008; Li et al., 2008; Wray et al., 2010)、Fgf/Erk および Gsk3 シグナルの阻害と協調して独立に働き、多能性を維持する機構が存在することが示唆された。

## 第 2 章 自作抗体による cNanog と cPou5f3 のタンパク質解析

第 1 章において、多能性の細胞の分化を開始させる Fgf/Erk シグナルの役割が種を越えて保存されている可能性を示したが、キメラ形成解析などによって培養細胞の多能性が確認できていないため、ニワトリ細胞のコロニーの多能性を特異的な分子マーカーを用いて調べる必要がある。また、多能性を持つ細胞を標識する分子マーカーがあれば、より良い培養条件を模索するためにも役立つ。

哺乳類において、Nanog と Pou5f1 (Oct3/4) は、多能性の維持に中心的な役割を果たすことが知られており、多能性の分子マーカーとして用いられている(Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Nichols et al., 1998)。これらの遺伝子のニワトリ相同遺伝子である *chicken Nanog* (*cNanog*) と *chicken PouV* (*cPouV*) も、同様にニワトリの多能性と初期発生に重要であると考えられているが(Lavial et al., 2007)、ニワトリの初期胚に対しては遺伝学的手法が限られているために、生体内での機能は不明瞭なままであった。*cNanog* の mRNA は epiblast に限局しており、hypoblast や胚盤葉期以降のステージでは発現していないこと、および *cPouV* は広汎な細胞で発現していることが *in situ* hybridization によって示されていた(Lavial et al., 2007)。しかしながら、これらの因子に対する特異的な抗体が入手不可能であったために、免疫共沈降法を用いたタンパク質レベルでの解析は行われておらず、タンパク質間およびゲノム領域との相互作用についての情報が欠如していた。

そこで本章では、これらの転写因子の機能をよりよく理解するために、*cNanog* と *cPouV* タンパク質に対する抗体を作製した。抗体の特異性と力価を

ウエスタンブロッティングと免疫蛍光染色によって確かめた後、cNanog と cPouV が多能性を持つ細胞に特異的に発現するのかを検証した。

## 結果

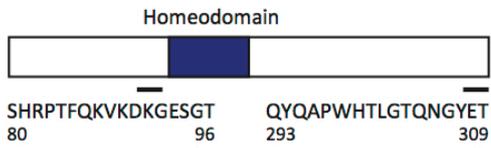
### ヒト胎児由来細胞株 293T 細胞を用いた抗体の特異性評価

cNanog と cPouV に対する抗体を作製するため、Fig. 2-1A に示す配列の合成ペプチドを抗原に用いて 6 回免疫したウサギから抗血清を回収した(Medical & Biological Laboratories、伊那市)。抗血清を評価するコントロールを用意するため、ヒト胎児由来細胞株である 293T 細胞に外来遺伝子である *cNanog* と *cPouV* を発現させた。*cNanog* (NM\_001146142, 930 bp) または *cPouV* (NM\_001110178, 888 bp) のコーディング領域全長を、双方向性発現ベクターのマルチクローニングサイトに挿入し、EGFP を等量発現させることで遺伝子発現を判定できるようにした。*cNanog*、*cPouV*、および空のマルチクローニングサイトを含むベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、順に cNanog 293T、cPouV 293T、MOCK 293T と名付けた。

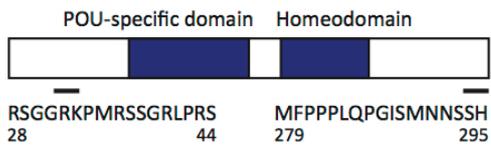
これらの 293T 細胞を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、抗 cNanog 抗血清で、明確なバンドが cNanog 293T の抽出液に検出された(Fig. 2-1B, 左)。このバンドは MOCK 293T の抽出液には見られなかったことから、導入した遺伝子から発現した cNanog タンパク質に由来することが示された。cNanog 293T の抽出液には、40 kDa と 50 kDa のマーカーの間いくつかのバンドが認められ、cNanog がアミノ酸配列から予想される 34 kDa よりも大きい分子量を持つことが示唆された。このことから、cNanog タンパク質が 293T 細胞中で翻訳後修飾を受けた可能性が考えられる。一方で、抗 cPouV 抗血清では、cPouV のアミノ酸配列から計算される分子量である 32 kDa ほどの単一バンドが見られた(Fig. 2-1B, 右)。MOCK 293T の抽出液にこのバンドは見られ

(A)

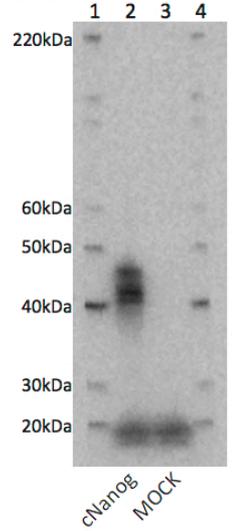
cNanog 309 a.a.



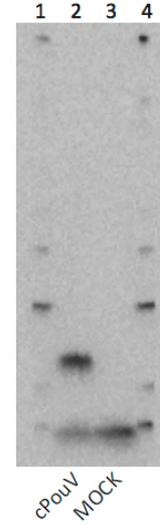
cPouV 295 a.a.



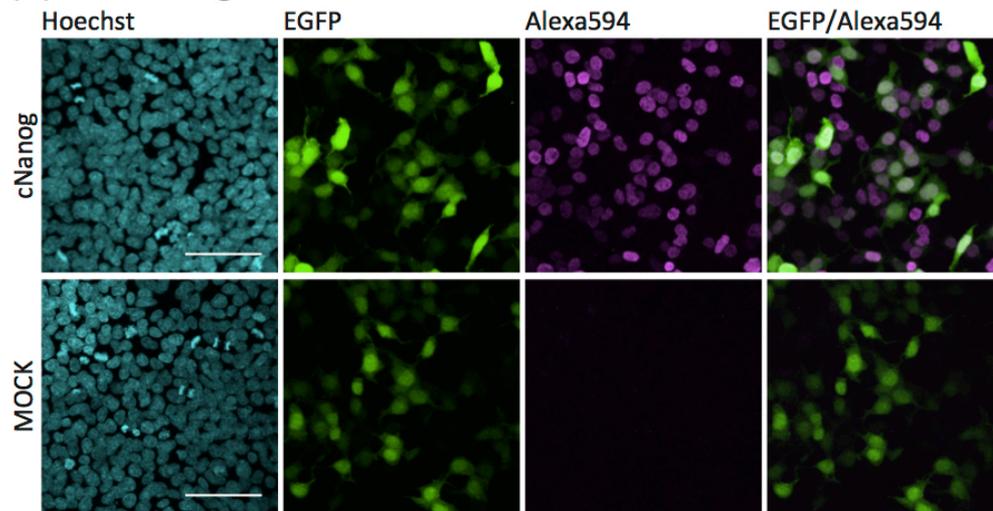
(B) anti-cNanog



anti-cPouV



(C) anti-cNanog



(D) anti-cPouV

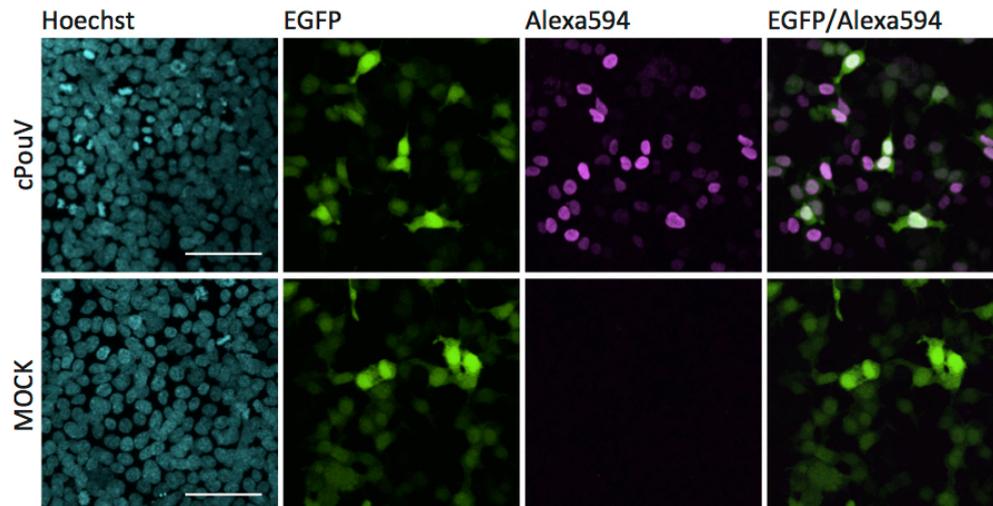


Fig. 2-1 293T 細胞株を用いた抗体の特異性アッセイ。(A) 発現ベクターに挿入された cDNA がコードする cNanog と cPouV タンパク質の構造の模式的な図。青い四角は機能ドメインを示す。アミノ酸配列は、ウサギに免疫するために使用したペプチド抗原(2種類のペプチドのカクテルを1羽のウサギに注射)の配列を示す。ペプチド抗原は折りたたまれたタンパク質の外側に露出すると予想される位置(傍線部、数字)にある。(B) 遺伝子を導入した293T細胞から抽出したタンパク質を電気泳動しウエスタンブロッティングを行った。抗血清はそれぞれの対象タンパク質を高い特異性を持って認識した。各1番目と4番目のレーンはサイズマーカー。(C, D) 抗 cNanog 抗血清と抗 cPouV 抗血清を使った293T細胞培養の免疫染色。外来ベクターから発現しているそれぞれの対象タンパク質が核に局在していることが抗血清によって明らかになった(マゼンタ)。外来ベクターは同時にEGFPも発現している(緑)。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。

なかったことから、抗血清が cPouV タンパク質を特異的に認識することが示された。

さらに抗体の評価を進めるために、293T 細胞の免疫蛍光染色を行った。EGFP の発現によって、いくつかの細胞がモザイク状に発現ベクターを保持していることが確かめられた(Fig. 2-1C, D)。抗 cNanog 抗血清で染色すると、いくつかの cNanog 293T 細胞の核に強いシグナルが観察されたが、MOCK 293T には全く観察されなかった(Fig. 2-1C)。同様に、抗 cPouV 抗血清では、いくつかの cPouV 293T 細胞の核にシグナルが見られたが、MOCK 293T 細胞では全く見られなかった(Fig. 2-1D)。これらを合わせると、cNanog または cPouV を発現する 293T 細胞を用いたウエスタンブロッティングと免疫細胞染色において、新規作製した抗体がそれぞれの対象タンパク質に対する十分な特異性と感度を有することが示された。

### **ニワトリ胚を用いた抗体の特異性評価**

ニワトリ胚において発現する内在性のタンパク質の解析に、作製した抗血清が使用可能なのかを調べるため、st.XI 前後、および、st.5-8 の胚から抽出液を調整しウエスタンブロッティングを行った。293T を用いた実験の結果と同様に、抗 cNanog 抗血清を用いると、st.XI サンプルでは 40 kDa 付近に複数のバンドが観察された(Fig. 2-2, 左)。これらのバンドは st.5-8 サンプルに見られず、過去の文献で示された初期胚特異的な cNanog mRNA と抗血清が認識したタンパク質の発現の時期が合致した。分子量の異なる複数のバンドが見られた(Fig. 2-2, 矢印)ことから、内在性の cNanog タンパク質も翻訳後修飾を受けることが支持

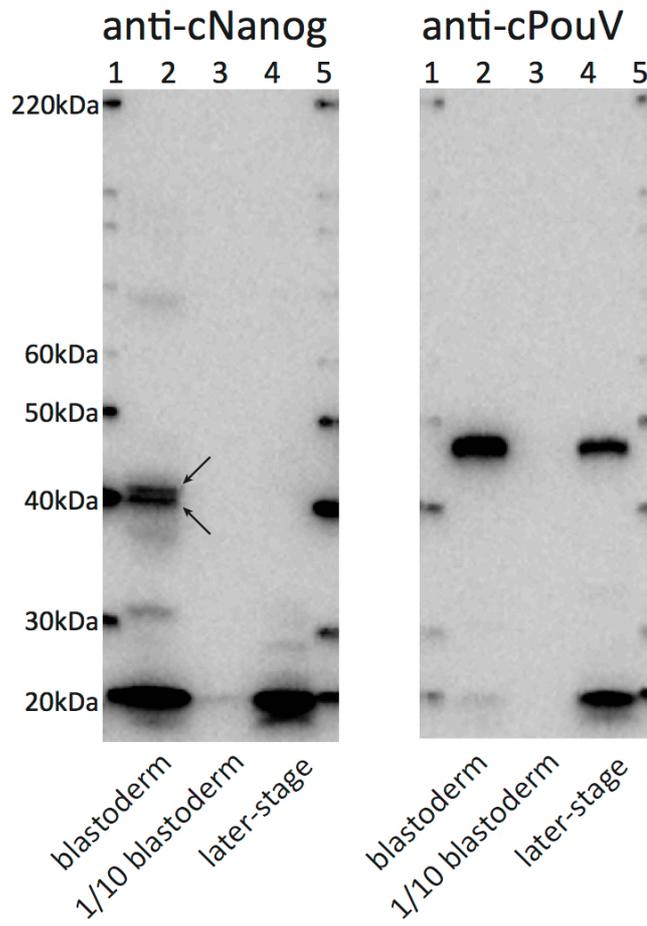


Fig. 2-2 ニワトリ胚のウェスタンブロッティングアッセイ。レーン 1 と 5：サイズマーカー。レーン 2：胚盤葉の全タンパク質。レーン 3：10 倍に希釈した胚盤葉の全タンパク質。レーン 4：st.5-8 の全タンパク質。抗 cNanog 抗血清によって blastoderm sample の 40 kDa 付近に 2 本のバンドが検出された(矢印)。20 kDa 付近のバンドは二次抗体に由来する非特異的バンド。

された。対照的に、抗 cPouV 抗血清は、単一のバンドを st.XI サンプルと st.5-8 サンプルの両方で検出した(Fig. 2-2, 右)。原腸期前後の様々な発生ステージに cPouV mRNA の発現があると過去に報告されており、抗 cPouV 抗血清の認識したタンパク質の発現と時期的に一致した。しかしながら、cPouV 293T に由来するバンドと、ニワトリ胚に由来するバンドでは、移動度に大きな違いが見られた。このことから、ニワトリ胚で発現している内在性 cPouV タンパク質は、全長 cDNA から発現している cPouV タンパク質よりも約 10 kDa 大きいことが示唆された(Fig. 2-1B と 2-2 の右のパネル同士を比較のこと)。この違いについては、後に検証する。

次に、抗血清を用いてニワトリ胚の cNanog と cPouV タンパク質の局在を可視化できるかを評価するため、胚盤葉期と神経胚期のニワトリ胚の免疫組織切片染色を行った (Fig. 2-3A)。抗 cNanog 抗血清を用いると、st.XIII 胚の epiblast の核にシグナルが観察されたが、hypoblast にシグナルは見られなかった(Fig. 2-3B)。シグナルは、後期の分化した細胞においても認められなかった(Fig. 2-3C)。対照的に、抗 cPouV 抗血清を用いると、広い発生ステージに渡りほぼ全ての核からシグナルが検出された (Fig. 2-3D, E)。cNanog とは対照的に、抗 cPouV 染色では st.XIII の hypoblast 層と st.7 の外胚葉にも非常に強い核シグナルが見られた(Fig. 2-3D, E)。また、抗 cPouV 染色は中-内胚葉の細胞で低かった (Fig. 2-3E)。これらの結果から、新規作製した抗体は、胚の抽出液中の対象タンパク質に対しても高い特異性を持ち、対象タンパク質の胚での局在を可視化するために十分な感度を有すること示された。また、cNanog は epiblast 特異的なマーカーとして有用だが、cPouV は epiblast 細胞のマーカーには不適切であるこ

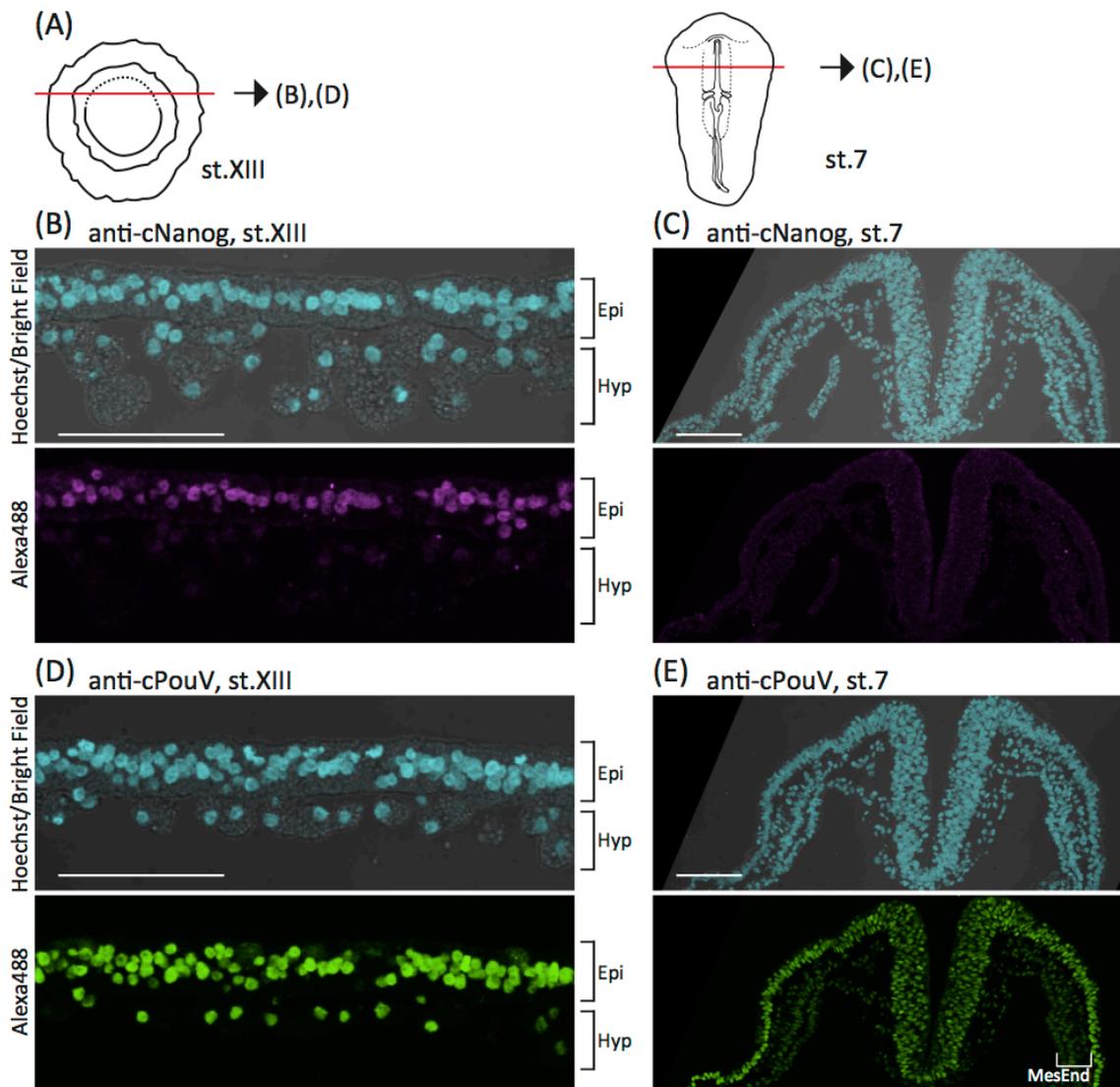


Fig. 2-3 凍結切片の抗体染色像。(A) 切片の部位を示す模式図。赤い線がセクションの位置を示す。(B)から(E) st.XIII と 7 の胚の切片を各抗血清で染色したもの。(B)と(C)は抗 cNanog 抗血清で、(D)と(F)は抗 cPouV 抗血清で染色したもの。Epi : epiblast。Hyp : hypoblast。MesEnd : 内胚葉および中胚葉。マゼンタと緑は、それぞれ抗 cNanog 抗血清と抗 cPouV 抗血清によって見えた Alexa 488 のシグナル。各スケールバーは 100  $\mu$ m。

とが明らかになった。

### **ニワトリ胚性細胞培養の発現解析**

次に、作製した抗血清を用いて、第 1 章で報告した細胞培養における cNanog と cPouV の局在を調べた。抗 cNanog 抗血清は、密なコロニーを形成している細胞のみにシグナルを呈した (Fig. 2-4A)が、抗 cPouV 抗血清を用いると、コロニーの細胞と周囲に広がる単層の細胞の両方の核が染色された(Fig. 2-4B)。抗 cPouV 血清によって、大部分の細胞が染色されていたものの、大きな核を持つ細胞は cPouV 陰性である傾向が見られた(Fig. 2-4B, 矢印)。これらの結果は、ニワトリ胚内の cNanog 陽性な細胞が、培養中で密なコロニーを形成することを示唆している。そこで、培養中のコロニーと胚における epiblast の細胞の関係を調べるため、epiblast と hypoblast の細胞を別々にして播種すると、epiblast の細胞だけが密なコロニーを形成した(Fig. 2-4C, 左)。hypoblast の細胞はそのようなコロニーを作らず、代わりに単層の薄い細胞が観察された(Fig. 2-4C, 右)。これらの結果は、マウス ESCs に似たニワトリの密なコロニーが、epiblast の cNanog 陽性な細胞に由来すること、および cNanog が多能性を持つ細胞のマーカーとして相応しいことを示している。

### **cPouV コーディング領域の塩基配列解析**

ウエスタンブロッティングにおいて、cDNA 由来の cPouV タンパク質と胚由来の cPouV タンパク質のサイズに、およそ 10 kDa と大きな相違があることを見出した(Fig. 2-1B と 2-2 の右のパネルを比較のこと)。そこで、現行の遺伝子モ

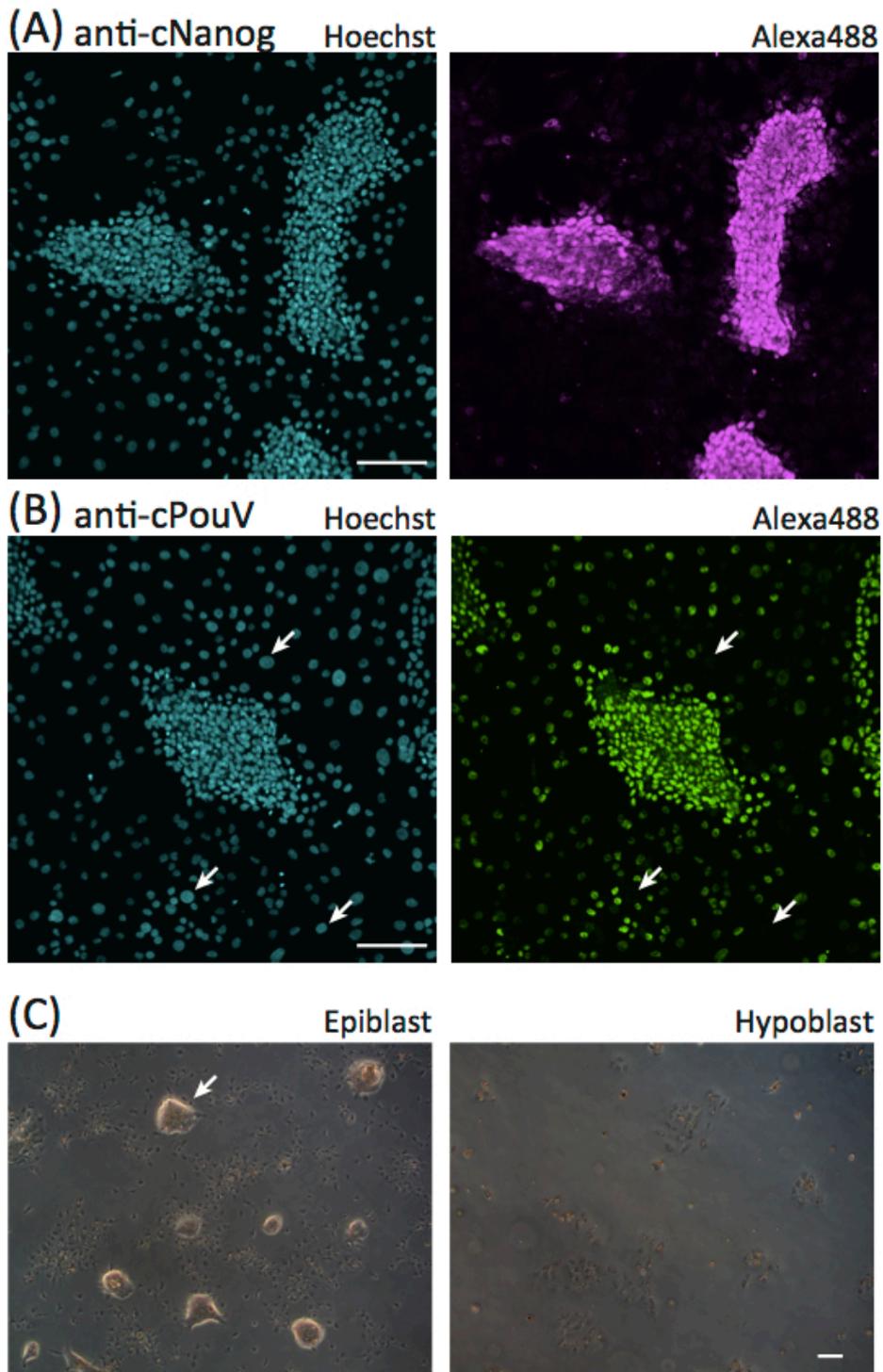


Fig. 2-4 胚盤葉の細胞培養。(A、B) 細胞培養の免疫蛍光染色。矢印は cPouV 陰性な大きな細胞核。マゼンタと緑は、それぞれ抗 cNanog 抗血清と抗 cPouV 抗血清によって検出された Alexa 488 のシグナル。(C) epiblast と hypoblast の細胞を物理的に分離し、別々に播種した。epiblast から形成されたマウス ESCs 様のコロニーの 1 つを矢印は示している。このような密なコロニーは hypoblast の細胞培養では見られなかった。各スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

デルでは見落とされている、さらに上流の開始コドンが存在するのではないかと考え、NCBI ゲノムデータベースの *cPouV* のゲノム領域(Gallus-gallus-4.0 (GCF\_000002315.3))を調べたところ、登録されているコーディング領域と、RNAシーケンスの提示するエクソン領域が一致していないことが分かった(Fig. 2-5A, 緑の四角と青いヒストグラム、Gallus gallus annotation Release 102 より引用)。転写産物の定量データから、報告されているエクソン 1 の 5'側約 2/3 はイントロンであり、このイントロンの上流にもう 1 つのエクソンがあることが示唆された。このエクソンをエクソン 0 と呼ぶ。このエクソン 0 の中に開始コドンは見つからなかったが、その 5'側にはシーケンスされていないゲノム領域があり、この未読領域の中に真の開始コドンが存在するのではないかと考えられた(Fig. 2-5A, 青いヒストグラム)。この未読領域の周囲は GC 含有率の高い配列であることから、この領域は二次構造を形成するために大規模シーケンスでは解読できなかった可能性がある。そこで、シーケンス条件を最適化することで、この領域の配列を読むことに成功した(DDBJ に新たに登録した配列: LC016616) (Fig. 2-5C, 大文字表記の部分)。新たにシーケンスされた領域の中に、6 つの ATG が見つかったが、最後のものだけが Kozak 配列を持ち、エクソン 0 の既知部分、短くなった exon1(Fig. 2-5B)、および exon2 以降までつながるオープンリーディングフレームを与えることが分かり、この ATG が真の開始コドンであると期待された(Fig. 2-5C, 初めの赤い四角)。

次に、これらのエクソンが単一の mRNA に存在するのかを検証するため、RT-PCR を行った。この ATG の 32 塩基上流の位置とエクソン 2 の中に設計し

たプライマー(Fig. 2-5C, 矢印)を用いて PCR を行うと、約 600 bp 長の単一増幅産物が得られた(Fig. 2-5D)。この PCR 産物をシーケンスしたところ、エキソン 0 のコーディングシーケンスが短くなったエキソン 1 とエキソン 2 に接続している配列が得られた (DDBJ に新たに登録した配列: LC016620)。さらに、ニワトリ始原生殖細胞由来の EST ライブラリに、エキソン 0 の既知部分と短くなったエキソン 1、およびエキソン 2、3、4 に一致する配列(DR410403)が見つかった。これらの結果は、新たに見出されたコーディング配列(Fig. 2-5B, 赤い四角)が連続して転写されていることを表しており、*cPouV* の遺伝子モデルが修正されるべきであることを示している。

#### **新たに予想された *cPouV* のアミノ酸配列解析**

上で示された *cPouV* のコーディング配列(DDBJ に新たに登録した配列: BR001258)は、1170 bp の塩基配列で、約 41 kDa のタンパク質をコードする。これは、ニワトリ胚のサンプルを用いたウエスタンブロッティングによって示唆される分子量により良く一致する(Fig. 2-2, 右)。このアミノ酸配列は、従来の *cPouV* タンパク質と異なる N 末端を持つが、C 末端の POU ドメインは共通である(Fig. 2-6A)。BLAST 検索によって、新たに予想された *cPouV* タンパク質に類似するタンパク質を探したところ、N 末端を含むタンパク質全域に高い相同性を示す 2 つのタンパク質が見つかった。チベット台地に生息するシジュウカラ(*Parus humilis*)の POU タンパク質(XP\_005527364)が、新しい *cPouV* の N 末端ドメインに非常に高い一致(170 中 127 アミノ残基)を示すことが分かった(Fig. 2-6B)。また、アメリカワニの POU タンパク質(XP\_006264903)も新たに



Fig. 2-5 *cPouV* の遺伝子構造。(A) NCBI データベースより引用したゲノムの構造。緑の四角：報告されていたコーディング配列 (NM\_00110178)。左端には、別の遺伝子 (NPDC1) のエキソンが薄緑の四角によって示されている。青いヒストグラム：各場所における転写産物の量。エキソンからの転写産物は豊富にあるので、イントロンに比べてエキソンは高い台地として見られる。"Previously Unsequenced Region" はこれまで未読であった領域で、リファレンスの配列がなかったために転写産物が全くマッピングされていない。上部の目盛りはニワトリ 17 番染色体上の位置を示している。(B) 赤い四角で示した、新たに予測された *cPouV* コーディング配列のゲノム構造。(C) *cPouV* 遺伝子の 5' 側の詳細な配列。100 塩基の既知配列に続いて、新しく分かった "Previously Unsequenced Region" の配列がアルファベットの大文字でプリントしてある。最も上流にある赤い四角が exon 0 内に見つかったコーディング領域を示す。この四角の初めにある ATG の直前に Kozak 配列 (GCCACC) がある。緑の四角はこれまで報告されていた、intron 0 の中にある開始コドンを示しており、ここにコザック配列は認められない。黒い矢印は、RT-PCR に使用したプライマーを示す。(D) アガロースゲルに電気泳動された RT-PCR 産物。逆転写酵素の添加で得られた RT 産物を鋳型としたもの、無添加のコントロールをそれぞれ RT+、RT- と記載。G：ゲノムを鋳型とした PCR 産物。M：サイズマーカー。

予想された cPouV の N 末端に対して高い一致 (121 中 49 アミノ残基)を示した。これらの配列を、従来のクラス V POU タンパク質のアライメント(Frankenberg and Renfree, 2013)に加えて比較したところ、新しい cPouV の N 末端によく保存された [Q/P]XFF[P/A]F という配列モチーフが見つかった(Fig. 2-6B, 青い四角)。このモチーフは、既知の Pou2 タンパク質で共通しているが、Pou5f1 タンパク質では保存が低く、哺乳類 Pou5f1 では欠落していた。これらの結果は、今回提示した新しい cPouV の遺伝子モデルが、ニワトリ胚において機能をもつ真の cPouV タンパク質をコードしている可能性を示唆している。



## 考察

### 多能性を持つ細胞に特異的な *cNanog* の発現

本研究は、主要な哺乳類多能性転写因子のニワトリホモログ、*cNanog* と *cPouV* をタンパク質レベルで解析した初めての報告である。まず、*cDNA* およびニワトリの細胞によって作られる *cNanog* タンパク質に対して、十分な特異性と検出感度を持つ抗血清が作製できた(Fig. 2-1, 2, 3)。ウエスタンブロッティングによって、いくつか分子量の異なる *cNanog* タンパク質が存在することが明らかとなり(Fig. 2-1B, 2)、*cNanog* が翻訳後修飾を受けている可能性が示された。マウス ESCs において、*Nanog* タンパク質の多リン酸化が安定性に影響するという報告(Moretto-Zita et al., 2010)があり、この制御機構が種を越えて保存されている可能性がある。

*cNanog* タンパク質は *epiblast* 層に特異的に局在し、*hypoblast* やより後期の分化細胞からは消失していた(Fig. 2-3B, C)。また、今回作製した抗血清は始原生殖細胞の *cNanog* タンパク質も検出することができた(Fig. 2-7)ことから、*cNanog* は多能性を持つ細胞系列と生殖細胞系列に特異的な分子マーカーとして有用であることが示唆された。また、*cNanog* 陽性細胞と *epiblast*、および密なコロニーを形成する細胞は同じ細胞集団であることが示された(Fig. 2-4B, D)。自作抗体を用いた *cNanog* の染色により、ニワトリの多能性細胞を維持するためのより良い培養方法の開発が進むことが期待される。

### 抗血清を用いた今後の研究

*cPouV* タンパク質を特異的かつ高感度で検出できる抗血清も作製でき、これに

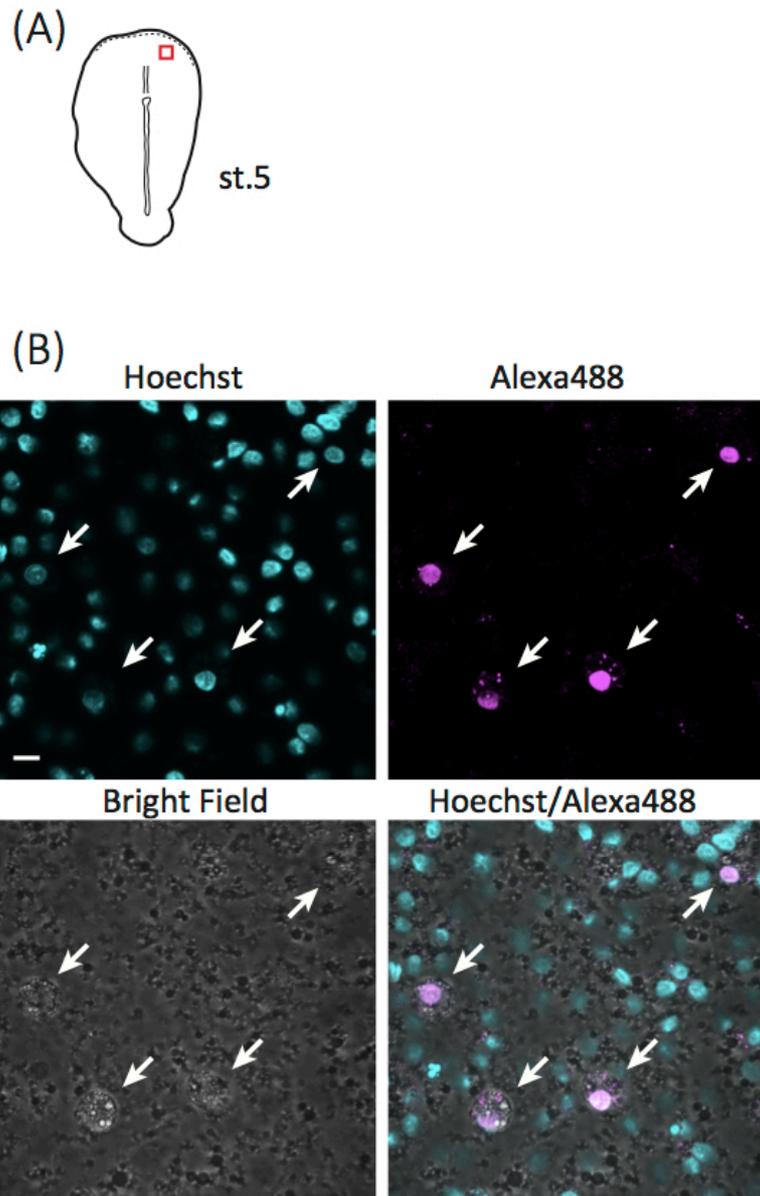


Fig. 2-7 抗 cNanog 抗血清で染まった始原生殖細胞。(A) st.5 ニワトリ胚の模式図。赤く囲んだ領域が(B)に示した部分である。この頭部側の領域は生殖三日月環と呼ばれ、血流によって生殖巣に到着する前のニワトリの始原生殖細胞が豊富に観察される胚体外領域である。いくつかの細胞の核が強く染色されている (矢印)。これらの細胞は、油滴を含んだ細胞質を持ち、周囲の表皮細胞とはことなる球状の形態をしている。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

よって cPouV の発現が様々な発生ステージを通して胚全体で発現していることが確認された(Fig. 2-1, 2, 3)。これは、培養胚盤葉細胞で見られた広範囲の発現とも合致する(Fig. 2-4C)。ゆえに、cPouV の発現は多能性の細胞や生殖系列の細胞には限定されず、これらの細胞を見分けるためのマーカーとしては使用できないことが明らかとなった。しかし、高品質な抗 cPouV 抗血清は依然有用である。cPouV の細胞ごとの役割を明らかにするために、免疫共沈降によって cPouV と相互作用をするタンパク質を調べることは意義深い。加えて、クロマチン免疫共沈降と大規模シーケンシングを組み合わせた解析 (ChIP-seq) を cNanog と cPouV について行えば、下流のターゲット遺伝子群を明らかにし、哺乳類の相同因子との機能をゲノムレベルで比較することも可能になる。本研究で報告した抗体は、このようなタンパク質レベルでの研究に利用価値が高い。

### **新しく予想された cPouV コーディング配列の構造**

本研究によって、登録されている cPouV の遺伝子構造を修正する必要があることが示された(Fig. 2-5, 6)。今回新たに予想されたコーディング配列(Fig. 2-5B)は、ウエスタンブロッティングから推察される内在性のタンパク質のサイズ(Fig. 2-2)および、RNA シーケンスが示唆するエクソン構造 (Fig. 2-5A, 青いヒストグラム)を考えると、より妥当性が高いと言える。さらに、他のクラス V POU 遺伝子に一般的に見られる、5つのエクソン構造(Frankenberget al., 2010)は、報告されていた4つのエクソンを含む構造(Fig. 2-5A, 緑の四角)より、本研究が示した5つのエクソンを含む遺伝子構造(Fig. 2-5B)を支持している。

クラス V POU ファミリー遺伝子は、複雑な進化的な背景を持つ。2つのパラ

ログ遺伝子、つまり *Pou5f1* と *Pou5f3* (*Pou2* とも呼ばれてきた (Frankenberg et al., 2014)) があることは、丹羽らのグループによって初めて認識された (Niwa et al., 2008)。これらのパラログ遺伝子は、少なくとも硬骨魚と軟骨魚が分岐する前に遺伝子重複によって生じ、それ以来、一方のパラログを失うということが生物種系統ごとに独立に起きたと考えられている (Frankenberg and Renfree, 2013)。ニワトリゲノムに唯一存在するクラス V POU 遺伝子である *cPouV* は、近隣遺伝子の保存度を調べるシntenニー解析の結果、*Pou5f3* 型に属すると判断された (Frankenberg et al., 2010; Niwa et al., 2008)。しかしながら、報告されていた *cPouV* の N 末端領域は短く、他の *Pou5f3* タンパク質とは大きく異なっていたことから、この結論には疑問が残っていた。本研究によって、他の *Pou5f3* タンパク質によく似た十分な長さの N 末端が見つかったことで、ニワトリ *PouV* を *Pou5f3* に分類することに対する最後の矛盾が取り除かれた。サカナやカエルのホモログが *Pou5f3* に改名されたことに倣い、ニワトリのホモログも従来の *PouV*、*Pou5f1*、*Oct4* といった名前ではなく、*Pou5f3* という名前に統一されるべきであろう。

### 第 3 章 Jak1/Stat3 シグナルによる多能性の正の制御

第 1 章では、未分化の細胞を分化させる多能性の負の制御に注目したが、ニワトリの未分化細胞が多能性を維持したまま増殖するために必要な正の制御機構については未知のままである。ニワトリ胚では st.4 を境に、マウス ESCs 様のコロニー形成能が失われ(Nakanoh et al., 2013)、分化が始まり予定運命が変更できなくなる(Chapman et al., 2007; Psychoyos and Stern, 1996)。また、この前後で、Fgf 受容体の発現や活性型 Erk が増加する(Lunn et al., 2007)ことから、st.4 は多能性の負の制御因子である Fgf/Erk シグナルの影響が顕在化する時期でもある。合わせると、ニワトリの多能性の正の制御因子があるのなら、st.4 以前に働き、それ以降機能を失うだろうと考察された。

一般に、Leukemia inhibitory factor (LIF) が属する Interleukin-6 (IL-6) サイトカインファミリーは、リガンド特異的な受容体タンパク質と、ファミリーに共通の受容体タンパク質である glycoprotein 130 (gp130) に結合し、受容体をヘテロ二量体化させる(Auernhammer and Melmed, 2000)。これにより細胞質内ドメインに結合している Janus kinase (Jak) が自らと受容体のチロシン残基をリン酸化する。Jak は次に、受容体のリン酸化チロシンに接着した signal transducers and activator of transcription (Stat) をリン酸化することで二量体化させる。この活性型 Stat 二量体は核内に移行して下流遺伝子の転写を制御する(Darnell, 1997)。下流遺伝子の 1 つ suppressor of cytokine signaling 3 (Socs3) は、Stat3 により転写され、Stat3 の活性を抑える負のフィードバック機構として働く(Herrmann et al., 2007)。マウス ESCs は初め、LIF によって

自己複製を維持できることが発見され(Smith et al., 1988; Williams et al., 1988)、後にそれは Jak1/Stat3 シグナルを介していることが明らかとなった(Matsuda et al., 1999; Niwa et al., 1998)。しかしながら、LIF、LIF 受容体、gp130、および Stat3 をノックアウトしたマウスでも少なくとも原条期までは初期発生が進行する(Nichols et al., 2001; Takeda et al., 1997)ため、培養下で見られる LIF/Stat3 の効果が、発生においてどのような意味を持つのかは理解されていなかった(Brook and Gardner, 1997; Zwaka, 2005)。

本章では、ニワトリ初期胚の細胞を分化させることなく増殖させる機構を明らかにするため、網羅的な遺伝子発現解析を用いて、原条伸長の前の発生ステージで機能を持つ因子を探索した。その結果、Jak1/Stat3 シグナルがニワトリの初期胚に特異的に活性を持つことを発見し、第 2 章で整備した遺伝子発現解析ツールを用いて Jak1/Stat3 シグナルの多能性状態への関与を検証した。

## 結果

### 遺伝子発現解析から示唆された初期胚特異的な *Jak1/Stat* シグナル活性

ニワトリの多能性を正に制御する因子の候補を探すため、公共のマイクロアレイデータ(Irie and Kuratani, 2011)とRのプログラムを用いてニワトリ胚の発生ステージごとの網羅的な遺伝子発現解析を行った。細胞の分化と運命決定が不可逆的になる st.4 の前後で発現が低下する遺伝子を、その発現差の大きい順に並べたところ、上位 10 位の中に IL-6 と *Socs3* が含まれていた。IL-6 は *Jak/Stat* シグナルのリガンドであり、*Socs3* は *Jak/Stat* シグナルの下流遺伝子であることから、st.4 以前で特異的に *Jak/Stat* シグナルが活性を持ち、それ以降で急速に活性が下がることが示唆された。ランキング上位には、血球系の細胞において IL-6 の発現を上昇させる役割を持つ IL-1 $\beta$  (Tosato and Jones, 1990) および、*Socs3* 同様に IL-6 に誘導されて発現が上昇する *Socs1* (Alexander, 2002) も見つかったことから、IL6 に始まるシグナル経路が活性化していることがさらに支持された。

網羅的解析の結果を確認するために、これらの遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR にて定量化した(Fig. 3-1A)。IL-6 と *Socs3* の発現量は st.XIII と st.2 で最大値を示した後、st.4 以降では st.X に比べ 1/100 のオーダーまで低下した。IL-1 $\beta$  も同様の発現動態を示した。また、*Socs1* およびニワトリの多能性マーカー *Nanog* の発現量は、st.X をピークに単調な減少を見せた。対象的に、原腸形成のマーカーである *Brachyury* の発現量は、原条の伸長が起こる st.4 の前後で大きく増加した。以上の結果から、*Jak/Stat* シグナルの関連因子は、st.4 以前で高く発現し、st.4 を境に発現量を下げることが確かめられた。

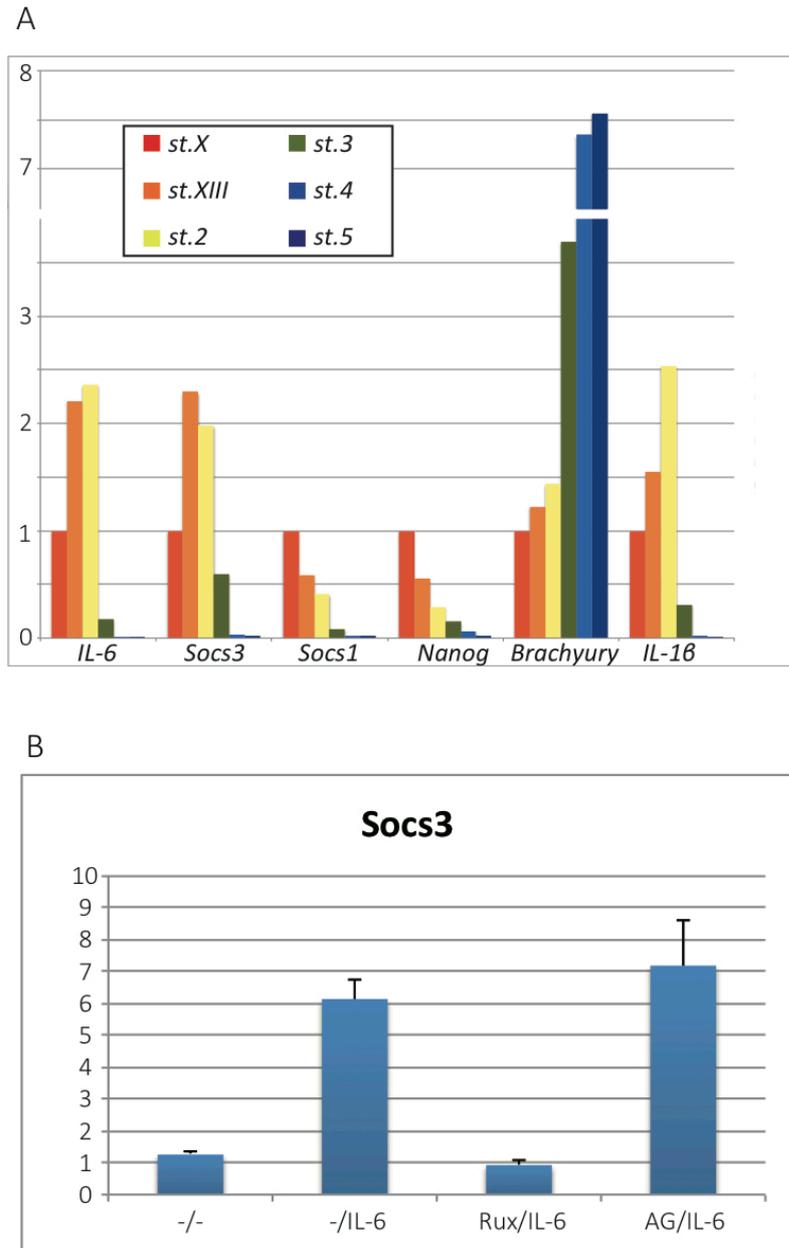


Fig. 3-1 遺伝子発現から見る Jak/Stat シグナルの活性動態。いずれも縦軸は qPCR によって求め、*Gapdh* で標準化した各遺伝子の相対的な発現量。(A) st.X~5 のニワトリの胚に見られる遺伝子発現動態。Jak/Stat 関連因子の発現量は st.4 以前で高く以降大きく下がる。(B) 複数のニワトリ胚盤葉から細胞の懸濁液を作り、N2B27 メディウム内で 2 時間培養し、阻害剤を添加して更に 1 時間し、IL-6 を添加してから 1 時間後に RNA を回収した。エラーバーは 3 つの実験から求めた標準誤差。

免疫系の分野では、IL-6 と Socs3 が Jak/Stat シグナルに関与していることが広く認められている(Yasukawa et al., 2003)。ニワトリ初期胚において IL-6 と Socs3 が関連していることを確かめるため、ニワトリの胚盤葉の細胞を短時間培養し、IL-6 添加時の Socs3 の発現量を調べた。サイトカインのアミノ酸配列は種間の保存が低く、ニワトリの IL-6 はマウスやヒトの IL-6 と 40%以下しかアミノ酸配列が一致しないため、大腸菌で合成したりコンビナントのニワトリ IL-6 を精製し使用した。IL-6 の添加 1 時間後、未添加のコントロールに比べ Socs3 の発現はおよそ 6 倍高くなったが、Jak1 と Jak2 の阻害剤である Ruxolitinib (Rux) (Do et al., 2013)を IL-6 添加の 1 時間前に添加しておく、この上昇が抑えられた(Fig. 3-1B)。一方、Rux の代わりに、Jak2 と Jak3 の阻害剤である AG490 (AG) (Do et al., 2013)を添加しても、IL-6 の効果は抑えられなかった。以上の結果から、ニワトリ胚盤葉において、IL-6 は Socs3 の発現を上昇させること、そしてそれは Jak1 に仲介されていることが明らかとなった。

**タンパク質レベルで確認された初期胚特異的な Jak1/Stat3 シグナル活性**

Stat ファミリーにはいくつかのタンパク質があるが、IL-6、Jak1、Socs3 と相互作用をするものとして Stat3 がよく知られており、マウス ESCs でも Stat3 が機能している (上述)。そこで、関連因子の遺伝子発現動態から示唆された初期胚特異的な Jak1/Stat シグナルの活性を直接的に確かめるため、Stat3 タンパク質の動態を抗体染色によって観察した。Stat3 の活性を示すチロシンのリン酸基を認識する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、st.X の胚では核が染色された(Fig. 3-2A)が、st.4 の胚ではシグナルは検出されなかった(Fig. 3-2B)。次に、

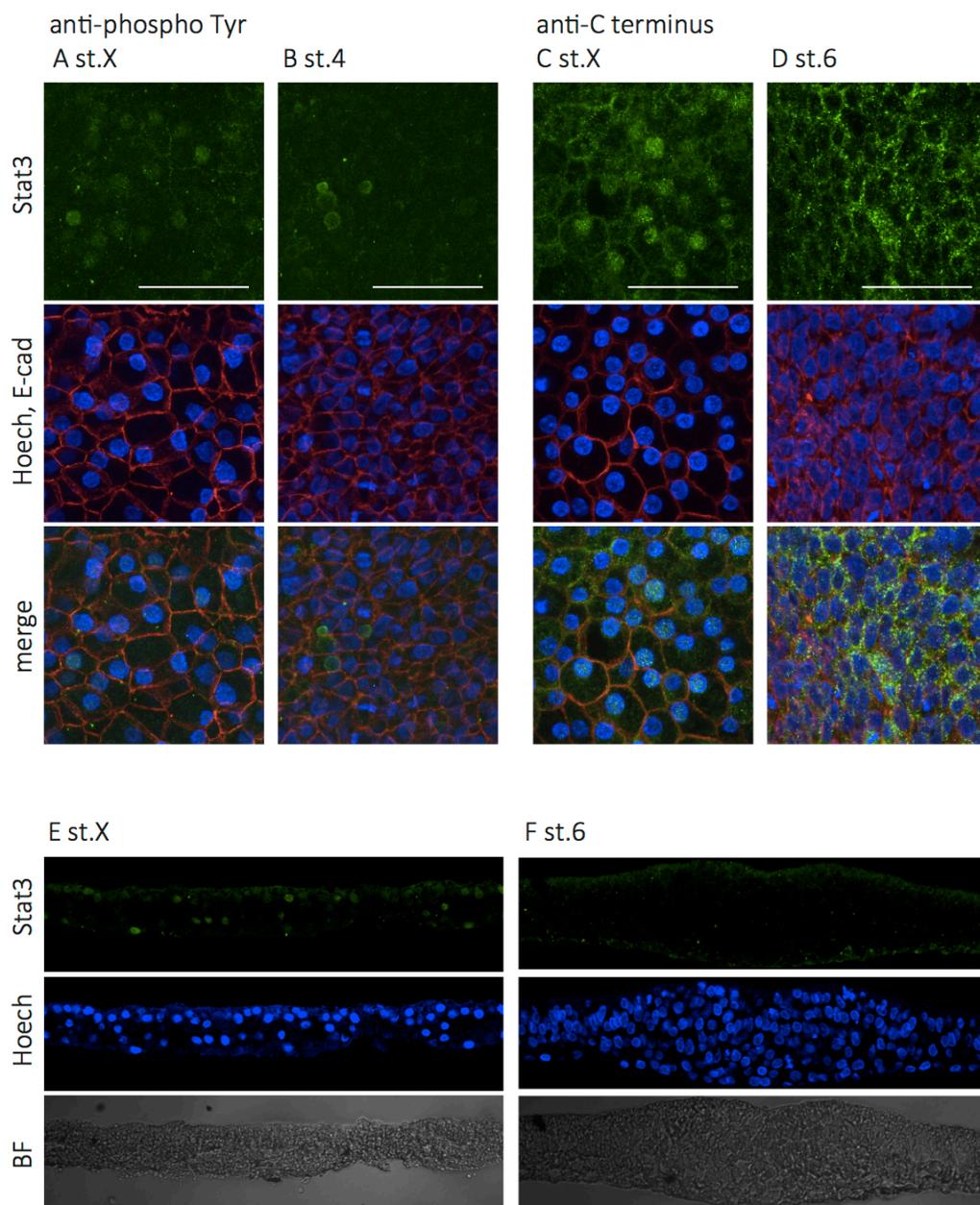


Fig. 3-2 初期胚特異的な Jak1/Stat3 シグナルの活性。(A, B) Stat3 のリン酸化部位を認識する抗体での染色。(C-F) Stat3 の C 末端を認識する抗体での染色。(A-D) ホールマウント染色を背側から撮影した。st.X では Stat3 の活性を示すリン酸化や核局在が観察されたが、st.4 や 6 の胚では見られなかった。撮影時(C)より(D)の露光が高かったため、(D)では細胞質にある不活性化 Stat3 が検出されている。(E, F) ホールマウント染色した胚の切片。スケールバーは 50  $\mu$ m。

Stat3 の C 末端を認識する抗体で染色を行ったところ、やはり st.X では Stat3 の核への局在が認められた(Fig. 3-2C)。一方で、st.6 の胚では、Stat3 は核よりも細胞質に多く局在していることが示された(Fig. 3-2D)。次に、抗 Stat3 C 末端抗体によって免疫染色を行った胚の切片を観察すると、st.X ではモザイク状に核に局在する Stat3 のシグナルが見られた(Fig. 3-2E)が、st.6 では核局在は認められなかった(Fig. 3-2F)。これらの結果は、st.4 以前の胚で Stat3 が活性化しており、st.4 以降不活性になることを示唆している。

#### **培養細胞における *Jak1/Stat3* シグナルの機能解析**

ニワトリ胚盤葉の細胞において *Jak1/Stat3* シグナルが機能を持つのかを検証するため、*Jak1/Stat3* シグナル関連因子を添加した N2B27 培地中で細胞を培養し、*Nanog* の発現をアフィニティ精製した抗血清を用いた免疫染色により観察した。無添加の basic condition では、epiblast に由来する密なコロニーが観察され *Nanog* 陽性であった(Fig. 3-3A)。IL-6 を添加するとコロニーはより高密になり、コロニーの数が増え、*Nanog* の発現も強くなった(Fig. 3-3B)。一方で、Rux を添加すると、密なコロニーは失われ、*Nanog* の発現も消失した (Fig. 3-3C)。AG ではこのような効果は観察されず、basic condition と同様の結果が見られた(Fig. 3-3D)。また、IL-6 と Rux を同時に添加すると、IL-6 の効果は打ち消され、Rux 単独添加時と同様の結果となった(Fig. 3-3E)。これらの結果から、IL-6 により活性化される *Jak1* シグナルは、ニワトリ胚盤葉の細胞において *Nanog* の発現を維持するために必要であることが示唆された。

次に、この *Jak1* シグナルが *Stat3* を介しているのかを確かめるため、人為的

に活性を調節できる Stat3 を用いて培養を行った。*mStat3ER* は、マウスの Stat3 とエストロゲン受容体の人工キメラタンパク質をコードする(Matsuda et al., 1999)。エストロゲン受容体は 4-hydroxytamoxifen (4HT) によって二量体化して核に移行するため、*mStat3ER* は 4HT の添加により活性型 Stat3 と同様の機能を持つ。*mStat3ER* を恒常発現 CAGGS プロモーターの発現ベクターに挿入した。このベクターはレポーターとして *mStat3ER* と等量の EGFP を発現する。まず、得られた発現ベクターをニワトリ繊維芽細胞由来の DF-1 細胞株にトランスフェクトすることで、このベクターがニワトリ細胞中でも機能することを確認した(Fig. 3-4)。次に、電圧ポレーション法により、胚盤葉の細胞に発現ベクターをトランスフェクトし、4HT および Rux の存在下で培養した。発現ベクターを導入した細胞は、EGFP を発現し、通常の細胞と同様に basic condition で密なコロニーを形成した(Fig. 3-3F)。4HT を添加した培養でも Nanog 陽性のコロニーが観察され、その形態は、4HT 無添加時に比べてより円形で高密度である傾向が見られた(Fig. 3-3G)。一方、Rux を単独で添加すると予想通りコロニーは失われ、Nanog の発現も消失した(Fig. 3-3H)。しかし、Rux とともに 4HT を添加すると、Rux の効果が救済され、Nanog 陽性のコロニーが観察された(Fig. 3-3I)。また、この条件下では、EGFP 陽性の細胞は、コロニーに集中して存在する傾向が観察された(Fig. 3-3I, EGFP)。すなわち、Jak1 の機能が阻害されても、*mStat3ER* の活性化によってコロニーや Nanog の発現が維持できることが明らかとなった。これらの結果から、epiblast 由来のコロニーが Nanog の発現を維持するために、Jak1 の下流で Stat3 が機能することが示唆された。

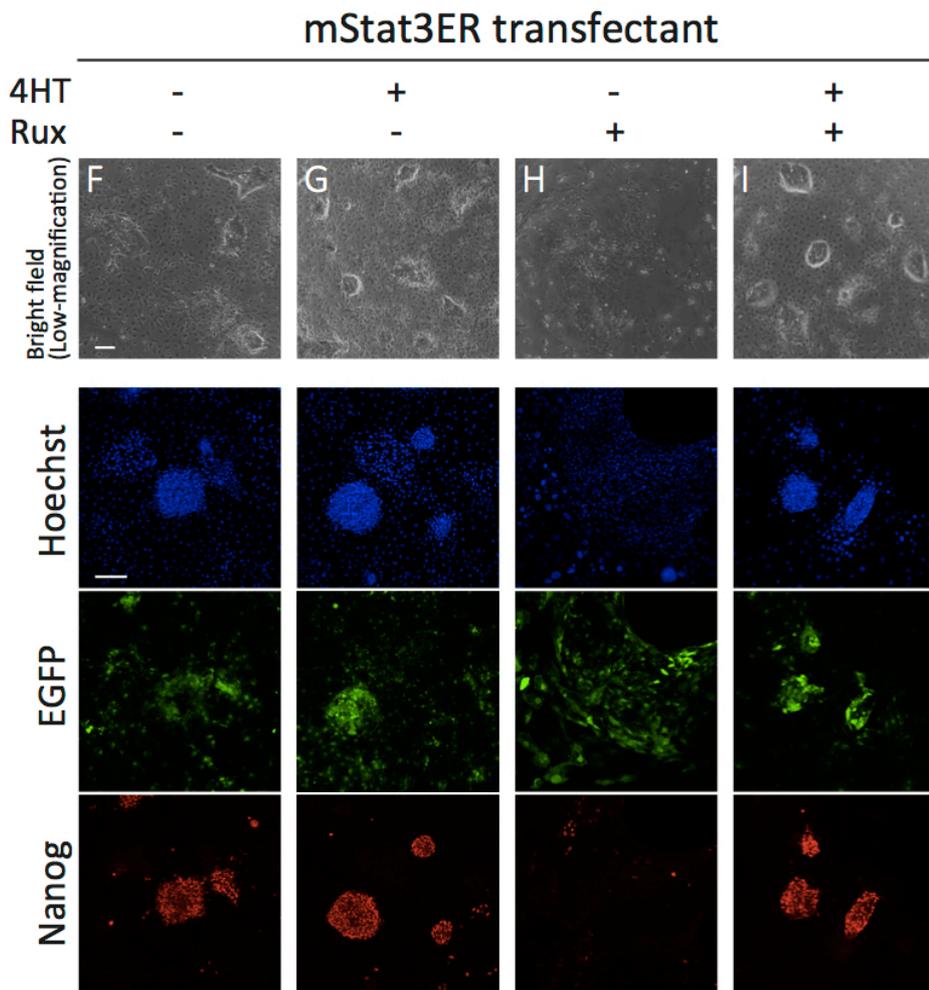
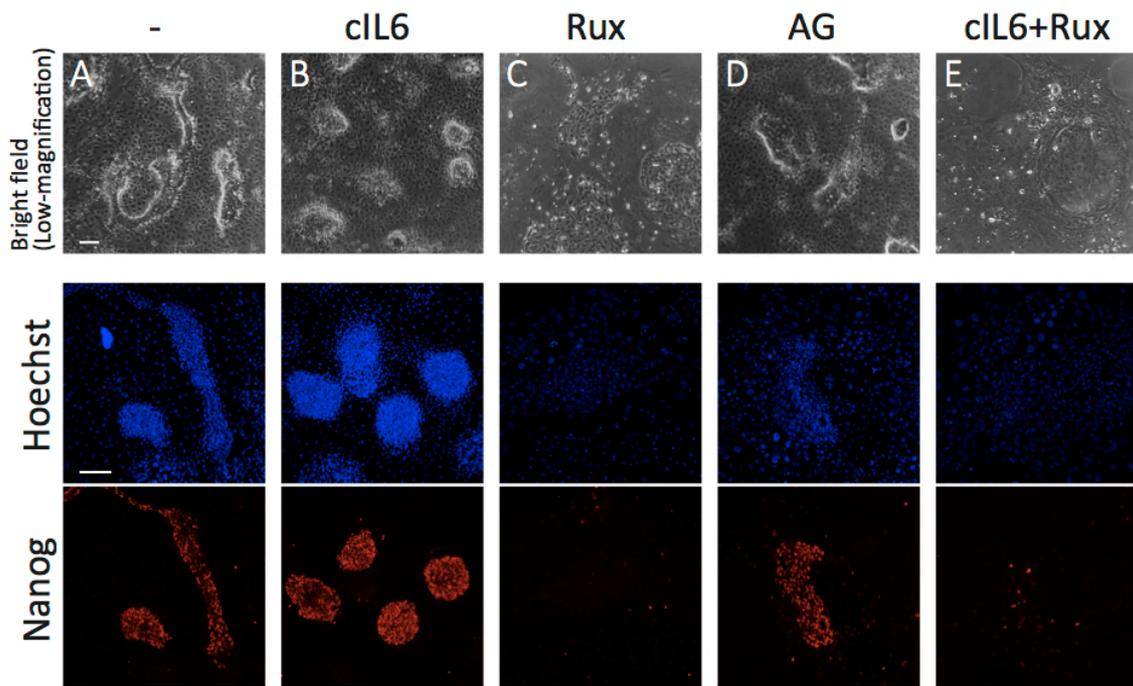


Fig. 3-3 ニワトリ胚盤葉の細胞培養を用いて行った Jak1/Stat3 の機能解析。(A-E) 各添加物の存在下での密なコロニーの形成。無添加の N2B27 の中に見られる形状の崩れた密なコロニー(A)は IL-6 の添加によってドーム型になった(B)が、Rux の添加により消失した(C)。(F-I) エレクトロポレーションによって pCAGGS-EGFP-P2A-mStat3ER をトランスフェクトしたニワトリ胚盤葉の細胞。Rux の存在下でも 4HT により mStat3ER が活性化になれば、密なコロニーは Nanog の発現を保てることが示された。スケールバーはいずれも 100  $\mu$ m を示す。一番上の明視野のパネルは蛍光写真に比べて倍率が低い。

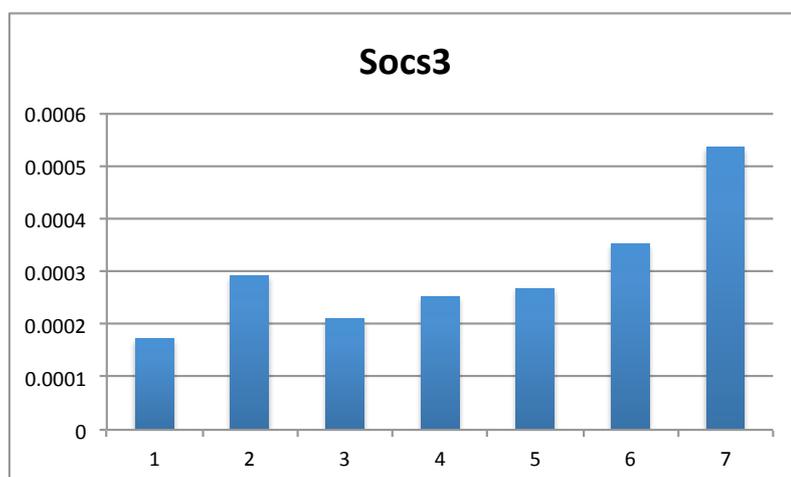


Fig. 3-4 mStat3ER のニワトリの細胞での機能。ニワトリ線維芽細胞由来の細胞株 DF-1 において、mStat3ER 発現ベクターをトランスフェクトして活性化因子である 4HT を添加し、qPCR によって Socs3 の発現量を調べた。縦軸は Gapdh で標準化した Socs3 の相対的な発現量。サンプルは下の通り：

1. MOCK トランスフェクタント
2. MOCK トランスフェクタント + [3  $\mu$ M] 4HT
3. mStat3ER トランスフェクタント
4. mStat3ER トランスフェクタント + [1/9  $\mu$ M] 4HT
5. mStat3ER トランスフェクタント + [1  $\mu$ M] 4HT
6. mStat3ER トランスフェクタント + [3  $\mu$ M] 4HT
7. mStat3ER トランスフェクタント + [9  $\mu$ M] 4HT

mStat3ER をトランスフェクトした細胞では、4HT の濃度依存的に Socs3 の発現量が上昇する。Stat3 の活性が 4HT 依存的に誘導されたと考えられる。

## 考察

### 初期胚特異的な *Jak1/Stat3* シグナル活性

本研究は、網羅的な発現解析を足掛かりに、ニワトリの多能性を正に制御する因子を探索した初めての試みである。その結果として、*Jak1/Stat3* シグナルの上流および下流の因子、*IL-6* と *Socs3* の発現量の変化(Fig. 3-1A)から、st.4 以前で *Jak1/Stat3* シグナルが活性を持ち、st.4 以降でその活性が失われることが予想された。このことは、抗体染色によって *Stat3* タンパク質の動態を観察することで確かめられた(Fig. 3-2)。抗体染色で見られた *Stat3* の不均一な活性パターン(Fig. 3-2E)は、一部の細胞が活性を持つことを示すのか、全ての細胞が一時的に活性を持つことを示すのか、検証が必要である。*IL-6* や *Socs3* を発現する細胞の分布を調べることで、この問題にアプローチできるかもしれない。また、st.4 以降の *Jak1/Stat3* シグナルの活性低下がどのようなメカニズムで起こるのかも、重要な点であるが明らかでないため、今後の究明が望まれる。

最近になって、マウスの ICM が多能性の細胞を維持するために LIF や *IL-6* による *Stat3* の活性化を必要とすることが報告された(Do et al., 2013)。これまで、胚発生において分化や軸形成を担うシグナル経路は多く知られてきたが、初期発生における *IL-6* や *IL-1β* などのサイトカイン系の機能は不明な点が多い。主に免疫学における重要な因子として認識されてきたシグナル経路(Hirano et al., 1990)が、初期発生にも重要な役割を持つならば、これまで周知されていなかった生物学的な背景を反映しているのかもしれない。

### 初期発生における *Jak1/Stat3* シグナルの機能

阻害剤の実験により、epiblast の細胞が培養下でマウス ESCs 様の密なコロニーと Nanog の発現を保持するために、*Jak1/Stat3* シグナルが必要であることが示唆された(Fig. 3-3)。逆に、IL-6 や mStat3ER によってこのシグナル経路を活性化することで、コロニーが密になり Nanog の発現が強まる傾向が見られた(Fig. 3-3B,G,I)。したがって、発生中の胚における *Jak1/Stat3* シグナルは、epiblast の細胞がその性質を保つために重要な役割を果たすと考えられる。しかしながら、抗体染色では epiblast だけでなく hypoblast にも Stat3 の活性が見られた(Fig. 3-2E)ことから、*Jak1/Stat3* シグナルの機能は epiblast の維持だけではないことも示唆される。胚体そのものにはならない胚盤葉外縁の細胞でも Stat3 の核局在がよく観察された(data not shown)ことも合わせると、*Jak1/Stat3* シグナルは増殖が活発な細胞で活性化している可能性もある。これらの細胞の分化ポテンシャルに *Jak1/Stat3* シグナルがどのように関与するのかは興味深い。

マウス ESCs において、Stat3 は Nanog の発現を間接的に制御しているという報告がある(Martello et al., 2012; Niwa et al., 2009)が、ニワトリ初期胚の Stat3 が直接的に Nanog の発現を調節しているのか、他の遺伝子を介して間接的に影響を与えるのかは不明である。Nanog の自己調節(Marson et al., 2008)および、Stat3 との協調(Stuart et al., 2014)を考えると、*Jak1/Stat3* シグナルの阻害は、自らの発現維持を含めた Nanog の機能の低下を引き起こすのかもしれない。

### *Jak1/Stat3* シグナルの応用とニワトリ多能性幹細胞株の樹立

本研究によって、*Jak1/Stat3* シグナルがニワトリの多能性の維持に必要である可能性が示唆されたが、多能性の正の制御機構として、*Jak1/Stat3* シグナルが未分化細胞の増殖を支持するのかは依然不明瞭である。これを検証するために、*Jak1/Stat3* シグナル依存的に、ニワトリ多能性細胞の培養を維持することが望まれる。実際、IL-6 や LIF、mStat3ER によって、ニワトリ胚盤葉からのコロニーの形成が促進されており、このような培養条件において 1 回の継代ならコロニーが維持できることを確認している。しかし、複数回の継代に耐える細胞培養には成功しておらず、長期の増殖を支えるためにさらなる工夫が必要である。

## 結論

### *Nanog* とクラス V POU ファミリー遺伝子の初期胚における役割

マウスの発生で起こる最初の細胞系列決定において、*Pou5f1* は細胞を胚体外組織の TE ではなく多能性を持つ ICM に誘導する役割がある (Niwa et al., 2005)。ICM の細胞が epiblast と hypoblast に分かれるのが、第二の運命決定であり、ここで *Nanog* が多能性を持つ epiblast への分化に機能する (Frankenberg et al., 2011)。鳥類は胎盤の組織が無いいため、クラス V POU 遺伝子は鳥類と哺乳類で異なる役割を持っているのではないだろうか。一方で、羊膜類は epiblast と hypoblast を形成し、そこには *Nanog* が関与していると考えられるため、*Nanog* の役割は少なくとも羊膜類の中で保存されていると考えられる。この仮説は、*Pou5f1* を欠損したマウス ESCs の増殖や、*Nanog* を欠損した体細胞のリプログラミングにおいて、他の動物種の相同遺伝子による機能補完の実験によっても支持されている (Niwa et al., 2008; Theunissen et al., 2011)。さらに本研究によって、ニワトリのクラス V POU 遺伝子は、*Pou5f1* とは別のグループ (*Pou5f3*) に属することが明らかになった。これらのことを踏まえると、*Pou5f1* よりも *Nanog* の方が、進化的に保存された多能性制御因子であることが示唆される (Fig. DIS-1)。

### 原腸形成を境にした *Jak/Stat* 依存状態から *Fgf/Erk* 依存状態への転換

第 1 章の結果から、鳥類や爬虫類の原腸形成以前の細胞は、*Fgf/Erk* シグナルが不活性でも盛んに増殖できるが、原腸形成後の細胞は *Mek* の阻害で大きく生存を下げることが示された。また、第 3 章の実験から、ニワトリの st.4 以前の細

胞は Jak/Stat シグナル依存的かつ Fgf/Erk シグナル非依存的な状態にあることが示唆された。Jak1 阻害剤存在下においても Brachyury 陽性細胞が増殖することを示す結果を得ており (data not shown)、このことは原腸形成によって三胚葉へと分化した細胞は Jak/Stat 非依存的な状態になることを示唆している。今後、細胞増殖の詳細な解析から、シグナル経路と細胞増殖の関係を明らかにする必要がある。

ノックアウトマウスを用いた実験から、母性と胚性の Stat3 を完全に欠損する条件では原腸形成前の胚で発生異常が起こること、Erk 欠損の条件では原腸形成前の胚は正常だが、原腸形成が進行しないことが分かっている (Do et al., 2013; Saba-El-Leil et al., 2003; Yao et al., 2003)。以上をまとめると、少なくとも哺乳類・鳥類・爬虫類の発生において、原腸形成前に見られる Jak/Stat 依存的・Fgf/Erk 非依存的な増殖から、原腸形成後に見られる Jak/Stat 非依存的・Fgf/Erk 依存的な増殖へとシグナル系の転換が起こることが示唆される (Fig. DIS-2)。この仮説は、これまで認識されてこなかった羊膜類の初期発生と多能性の機構を体系的に理解する基本原理になるかもしれない。活性型 Erk が直接に Stat3 の活性を抑えるという報告もあるが (Chung et al., 1997; Sengupta et al., 1998)、これら 2 つのシグナル経路が切り替わっていく機構はマウスにおいても未知であるため、今後検証する価値がある。

### **シグナル経路の転換と細胞周期・卵割型/体細胞型分裂の関連**

多くの体細胞において Erk の活性は G1/S 期の移行に必要であり、原腸形成前の胚の細胞が Fgf/Erk シグナル非依存的に増殖することは特殊な例であるよう

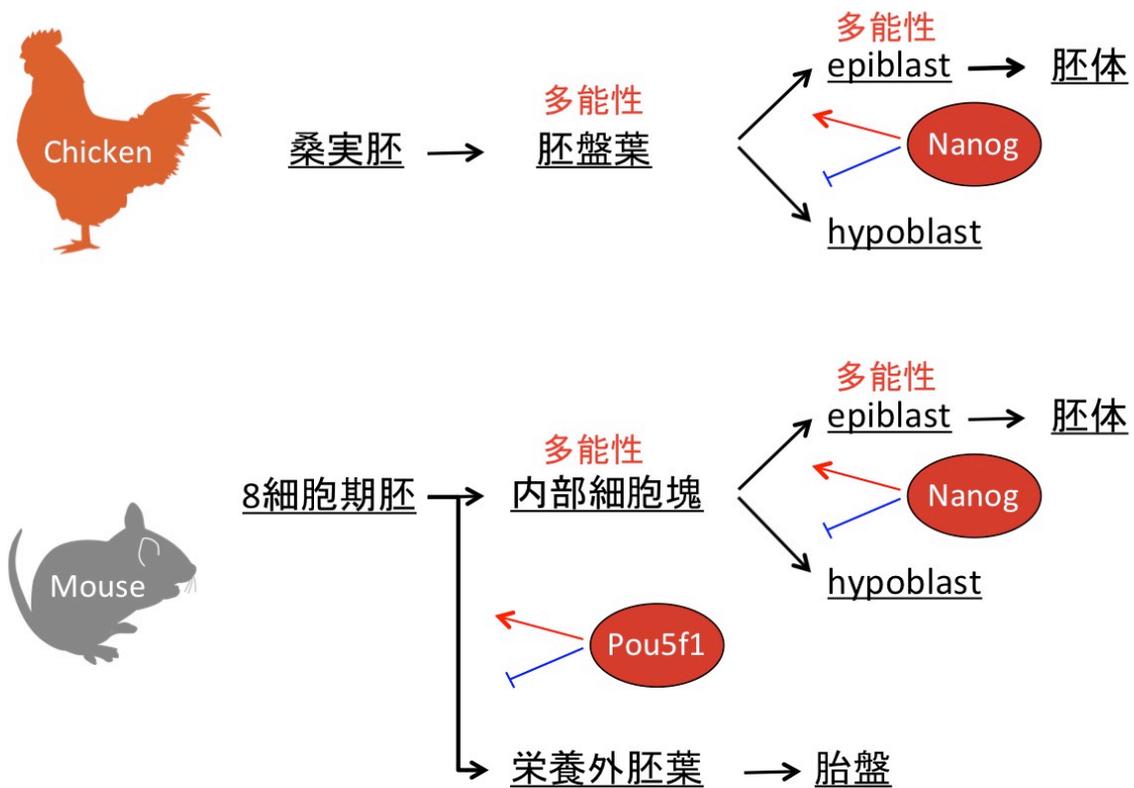


Fig. DIS-1 羊膜類の初期発生と多能性転写因子の機能の変化。Nanog による epiblast と hypoblast の分岐がデフォルトのイベントとしてあり、哺乳類では、Pou5f1 によって多能性の細胞を確保しながら胎盤の細胞系譜を分化させるイベントを付け加えたと見ることができる。こう考えると、Nanog は種を越えて保存された役割を持つのに対し、Pou 遺伝子の機能が哺乳類に特異的であることが理解しやすい。

だ(Burdon et al., 1999)。興味深いことに、マウス ESCs は G1 期が極端に短い特殊な細胞周期を持ち、一般の体細胞が必要とする機構が無くても増殖できる(Savatier et al., 1994)が、分化に伴って G1 期が伸長して一般的な細胞周期へと移行していくことが示唆されている(Savatier et al., 1996)。この分化に伴う細胞周期の変化は、胚発生において原腸形成時にも見られる(Wianny et al., 1998)。G1 期は分裂後の細胞が成長する期間である。ニワトリ胚の細胞は胚盤葉ステージでは小さくなり続けており(Eyal-Giladi and Kochav, 1976)、ニワトリ初期胚の Stat3 依存的な細胞も短い G1 期を持つことが示唆される。これらを合わせると、羊膜類の原腸形成以前の胚では、G1 期が短く成長を伴わない「卵割的な細胞分裂」が保たれていると見ることができる(Fig. DIS-2)。G1 期が短い細胞周期と Jak/Stat シグナルの関連を示すことができれば、古典的な「卵割」という概念を、シグナル経路と関連付けて捉え直すことが可能になるかもしれない。

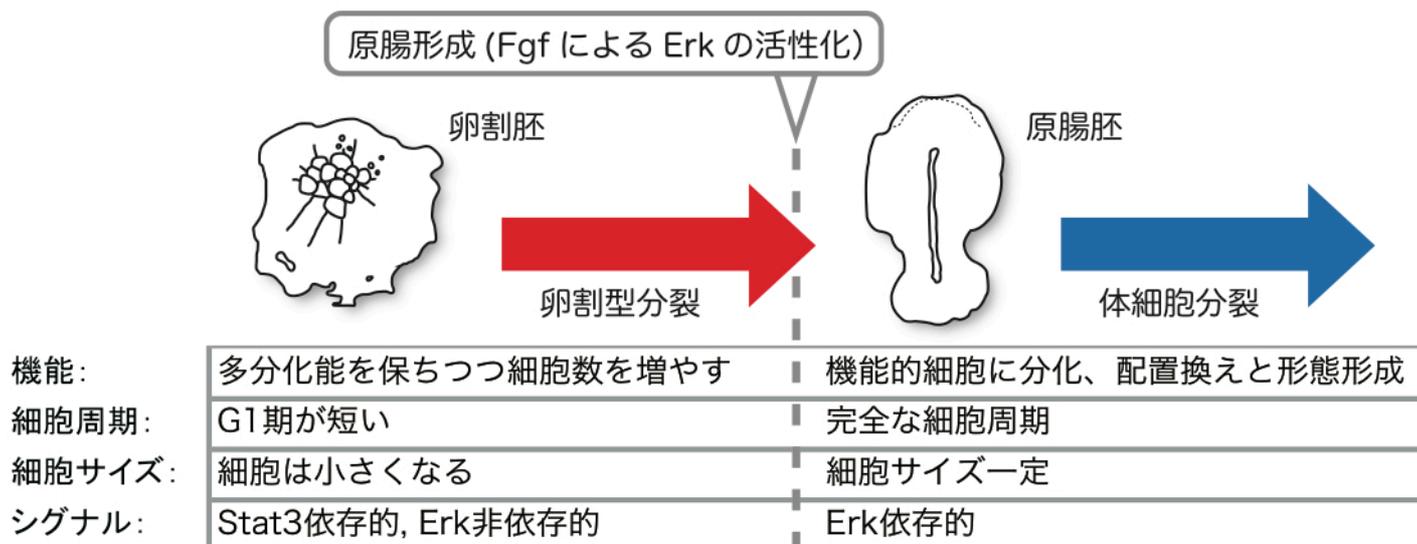


Fig. DIS-2 原腸形成の前後で変化する細胞分裂の特徴の比較。多能性に関連する転写因子に比べ、シグナル経路の役割は種間でよく保存されているように見える。今後、これらの性質を詳細に調べ、本研究で見出したシグナル系の転換との因果関係を検証していきたいと考えている。

## 材料と方法

### 実験動物と動物の管理

ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) の卵は、ヤマギシ養鶏場 (和歌山県) より購入した。ウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) は小野珠乙教授 (信州大学) から提供いただき、京都大学植物園にて飼育した。ニホンヤモリ (*Gecko japonicus*) は京都大学の周辺、主に北白川や吉田地区で捕獲し飼育した。スッポン (*Pelodiscus sinensis*) は、大和養殖場 (佐賀県) より購入した。全ての収集や飼育は認証済みの実験動物取り扱い規則に従って行った。

### ニワトリ胚の回収

st.X 前後のニワトリ胚盤葉を回収するためには、0~2 時間孵卵した卵を割卵し、白味を除いた後、ろ紙で作ったリングを置いて周囲の卵黄膜を切った。リングに張り付いた胚を PBS(-) 中に移し、水流によって卵黄を落として胚を卵黄膜から剥がして 1.5ml チューブに集めた。st.2 から 11 の胚も孵卵時間を調節して同様の方法で回収したが、胚体外領域はピンセットによって取り除いた。

### 細胞の培養条件

N2B27 基礎培地は以下を混合して作製した：100 ml DMEM/F-12 (Wako), 100 ml Neurobasal (GIBCO), 1 ml 20 mM 2-mercaptoethanol (SIGMA) [0.1 mM], 1 ml 200 mM L-Alanyl-L-Glutamine (Nacalai Tesque) [1 mM], 1 ml N2 supplement (GIBCO), 2 ml B27 supplement (GIBCO), 200  $\mu$ l 1000x penicillin & streptomycin (Meiji)。各種添加物は特記無き場合、以下の終濃度

で使用した：PD0325901 (Wako) [1  $\mu$ M]、CHIR99021 (Wako) [3  $\mu$ M]、bFGF (human recombinant, Wako) [20 ng/ml] (ニワトリ細胞) [40 ng/ml] (ウズラ、ヤモリ、スッポン細胞)、Ruxolitinib (Funakoshi) [0.5  $\mu$ M] (短期培養) [0.6  $\mu$ M] (通常の培養) [0.12 mM] (エレクトロポレーション後の培養)、AG-490 (Funakoshi) [0.5  $\mu$ M] (短期培養) [0.6  $\mu$ M] (通常の培養)、4HT (SIGMA) [1  $\mu$ M]。基本的にコラーゲンコートディッシュとプレート (IWAKI)を使用した。ニワトリとウズラの細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターで培養した。

#### **ニワトリ胚盤葉の細胞培養とコロニー数の測定**

ニワトリの胚盤葉の細胞をピペッティングで物理的に解離させて播種した。コロニー形成の比較 (Fig. 1-1)のために、 $2.8 \times 10^4$  細胞を 35mm ディッシュに播種し、basic、PD、CH、2i および FGF condition で 2 日間培養し、約 2.4mm<sup>2</sup> の視野を 10 箇所無作為に撮影し、コロニーの数を数えた。統計的解析は、二標本 t 検定を利用した。

epiblast と hypoblast を分離する (Fig. 2-4) ために、0.104 mm 直径のナイロン釣り糸 (TORAY) でループを作ってパスツールピペットの先に固定し、st.XIII 前後の胚の腹側表面の hypoblast を掻き取った。

#### **タイムラプス画像の撮影**

分離した st.X ニワトリ胚を 35 mm ディッシュの 2i condition に播種し、播種後 2 から 36 時間の間、1 分毎に撮影した。

### 発生過程の胚からのコロニーの数え上げ

回収したニワトリ胚を TripLE Express (GIBCO) で室温 10 分間処理した後、等量の N2B27 培地を加えて中和した。各胚から  $2.8 \times 10^4$  細胞を 35 mm ディッシュの 2i condition に播種し 2 日間培養した。約  $2.4 \text{mm}^2$  の視野を 10 箇所無作為に撮影してコロニーの数を数えた。st.X と各発生ステージとの間に、統計的に有意な差があるのか明らかにするため、二標本 t 検定を行った。

### ウズラの胚性細胞培養

st.X のウズラ胚を得るために、産卵後の卵を孵卵せずに使用した。st.V のウズラ胚を得るためには、最後の産卵より 12 時間経過したメスのウズラから卵を摘出した。胚の回収方法はニワトリ胚の回収方法と同様である。集めたウズラ胚はピペッティングで物理的に解離させ、24-well プレーートの各培養条件に 1/3 胚ずつ播種した。

### ヤモリとスッポンの胚性細胞培養

ヤモリの卵割中の受精卵はメス個体から摘出し PBS(-) で洗った後、 $10 \times \text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2$  および  $1000 \times$  ペニシリンストレプトマイシンを添加した PBS(-) の中に置き、数 1000 細胞 (胚盤葉) になるまで、室温 (およそ  $27^\circ\text{C}$ ) で培養した。胚盤葉はピペッティングで物理的に解離させ、24-well プレーートの各培養条件に 1/4 胚ずつ播種した。原腸胚は摘出して PBS(-) で洗った後、胚体外組織を除き、TripLE Express 室温約 10 分間処理した後、ファイブロネクチン (SIGMA) でコートした 24-well プレート (Grainer) の各培養条件に播種した。 $29^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$

で5日間培養し、写真を撮影した。スッポンの場合、受精卵を摘出し、1000細胞程で原条を持たない胚 ((Tokita and Kuratani, 2001)の stage 5 より早いステージ) を胚盤葉として使用した。ピペッティングで細胞を分離し、24-wellプレートにて28°C、5%CO<sub>2</sub>で8日間培養し写真を撮影した。使用した各実験器具は火炎滅菌し、卵は75% EtOHで消毒した。

### リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析

ニワトリ胚の培養細胞の遺伝子発現解析(Fig. 1-8)のために、同じニワトリ胚に由来する細胞を各条件で2日間培養した後、ISOGEN-LS(Wako)を使って total RNA の抽出を行った。total RNA から QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN)によって逆転写をおこない、QuantiTect SYBR GREEN PCR Kit (QIAGEN)と ABI 7900 リアルタイム PCR マシン(Applied Biosystems)によってリアルタイム PCR を行った。同じ cDNA を用いて3回定量 PCR を行い、Gapdh の発現量を internal control として他の遺伝子の相対的な発現量を求めた。各培養条件の各遺伝子の発現量を basic condition におけるその遺伝子の発現量の平均値で割り、その条件の平均値を求めた。

発生ステージの異なるニワトリ胚の発現解析(Fig. 3-1)のために、回収したニワトリ胚から同様の方法でリアルタイム PCR を行った。ただし、各ステージの胚3つから total RNA を抽出して1つのサンプルとし、独立したサンプルから少なくとも2回、同様の発現量変化が見られることを確認した。

DF-1 細胞の発現解析(Fig. 3-4)も同上の方法でリアルタイム PCR を行った。

各ニワトリ遺伝子のアクセッション番号と使用したプライマーの配列は以下

の通りである : Gapdh (NM\_204305) : CTGGCAAAGTCCAAGTGGTGGCCA、  
 TTGATGTTGCTGGGGTCACGCTCC 、 Nr0b1 (NM\_204593) :  
 AGGGCTTCCTGGCTAAGTGCTGGAG 、  
 AGATCCGGGTGAAGAGCACCGTCC 、 Dazl (NM\_204218) :  
 ATGTGCTGTCCCAGAGCCCACA 、 ATGCGCCCTCCTCTCCCTGAAGTA 、  
 Lefty (NM\_204764) : AGGTTGCCAAGTCCGTGCGCTT 、  
 TGCACTCCATCCTTGCAGTCCCCA : Brachyury (NM\_204940) :  
 AGCACTGGCACAGCTACCAGCT 、 CCGTTGGACATCCCGCTTGACTGA 、  
 Fgf8 (NM\_001012767) : TGTGCACGCCAAGCTCATCGTC 、  
 CGCAGTCCTTGCCTTTGCCGTT 、 Nanog (NM\_001146142) :  
 TGCCAGAAAGAGAGTCAGTGGGTGG、 TGGTGTGCACTGGTCCACAGCCT :  
 PouV (NM\_001110178) : TCTGGGCACGCTCTATGGGAAGATG 、  
 TTTCTCTTCCGGGCTTGGGCCA 、 Sox2 (NM\_205188) :  
 GTCTCATTCGAGGGCTCCTTGCCA、 TCTGCTTGGGGCAGCTGGTTCT、 Klf2  
 (XM\_418264) : AGCGATAACCATCCTGCCCTCCTTCG 、  
 TGCTCGCACTTCCACCTTTCGTGG 、 Klf4 (XM\_001233583) :  
 TGCAGTACCAAGAGCTGATGCCGC 、 TTTTCGAGGCCATGACCGCCGT 、  
 Myc (NM\_001030952) : AAATGCTCCAGTCCCCGCACGT 、  
 AGCTCATTCCTTCGCTGGCGCT 、 Tbx3 (XM\_001234534) :  
 TTCCCGGTGGATGGTAGCCGGCAAA 、  
 AGCGGGGCTGGTACTTGTGCATGGA 、 IL-6 (NM\_204628) :  
 AATGCCTGACGAAGCTCTCCAGCG、 GGCCGAGTCTGGGATGACCACTTCA、

Socs3 (NM\_204600) : GCACCAAGAACCTGCGCATCCAGT 、  
TGCACCAGCTTCAGCACGCAGT 、 SoCs1 (NM\_001137648) :  
TGGTAGCGCACAGCAAGGTGTCAG、AAGGTTCGGAAGTGCGTGCTGCT、  
IL-1  $\beta$  (NM\_204524) : GCCATGACCAAACCTGCTGCGGA 、  
ACTGTGAGCGGGTGTAGCGGAA。

### 293T ヒト細胞株と DF-1 ニワトリ細胞株への発現ベクターの導入

293T 細胞に導入する(Fig. 2-1, 2) ために、tetON bidirectional promoter system (Clonetech)にもとづいて発現ベクターを設計した。FUGENE-HD (ROCHE)を用いて、発現ベクターと tetON のトランスアクチベーターを発現するプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクトした。10%ウシ胎児血清と [1 $\mu$ g/ml]の終濃度でドキシサイクリンを添加した DMEM/F-12(Wako)で培養し、遺伝子導入から 1 日後に EGFP の発現が確認された。

DF-1 細胞に導入する(Fig. 3-4)ために、CAGGS ユビキタスプロモーター下に、EGFP-P2A 配列およびマルチクローニングサイトまたは mStat3ER を持つ発現ベクターを用意した。P2A は、*porcine teschovirus-1* に由来する配列で、細胞内のプロテアーゼによって翻訳後自律的に切断される(Kim et al., 2011)。P2A の上流と下流にコドンの読み枠を揃えて配列を挿入すれば、これらの配列がコードするタンパク質を等量発現させることができる。今回は mStat3ER が発現している細胞をラベルするために EGFP レポーターを共発現させた。Lipofectamine LTR Reagent with PLUS Reagent (Invitrogen)を使って DF-1 にベクターを導入した。DF-1 細胞は 10%ウシ胎児血清および各濃度の 4HT を

添加した DMEM/F-12 培地で培養した。

### ウエスタンブロッティング

ニワトリ胚盤葉の培養細胞のウエスタンブロッティング(Fig. 1-3)のために、各条件で胚盤葉の細胞を 2 日間培養した。“→PD03→bFGF”と“→bFGF”については basic condition で培養し、細胞を溶解する 3 時間前に PD0325901 を、30 分前に bFGF を添加した。細胞を回収してサンプルバッファー中で 98°C、5 分加熱し、全タンパク質を 10%のポリアクリルアミドゲルで泳動した後、PVDF メンブレン(BIO-RAD)にタンパク質をトランスファーした。メンブレンを Blocking One-P(Nacalai Tesque)でブロッキングし、Blocking One-P で希釈した抗リン酸化 ERK モノクローナル抗体(1:500、M8159、SIGMA)で一晩 4°C で一晩インキュベートした後、Stabilized Goat Anti-Mouse HRP-conjugated (1:1000、PIERCE)で室温、1 時間それぞれインキュベートした。洗浄には 0.1% Triton X-100 (Nacalai Tesque) / PBS を使用した。シグナルの検出は Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo SCIENTIFIC) と LAS-1000 lumino image analyzer (FUJIFILM)を用いて行った。シグナルを検出した後、再びメンブレンを抗  $\alpha$ -tubulin モノクローナル抗体(1:500、T9026、SIGMA)で室温、1 時間インキュベートし、同様の方法でシグナル検出を行った。

293T 細胞のウエスタンブロッティング(Fig. 2-1)のために、加熱しておいたサンプルバッファーを直接加え、293T 細胞をディッシュ上で溶解した。溶解液をさらに 98°C で 5 分加熱し、MagicMark™ XP (Life Technologies)と共に 7.5% ポリアクリルアミドゲル(Wako)で泳動した。以降の手順は基本的に上記と同じ

だが、一次抗体にペプチド抗原で免疫したウサギの抗血清 [1:1000]、二次抗体には anti-rabbit-IgG goat antibody coupled with horseradish peroxidase (1:2000、BETHYL)を使用した。希釈には staining solution (0.1% Triton X-100 と 5% Blocking One-P を添加した PBS)を用いた。

ニワトリ胚のウエスタンブロッティング(Fig. 2-2)のために、blastoderm sample として st.XI 前後の胚と later-stage sample として st.5~8 の胚を回収し、サンプルバッファーで 98°C、5 分間加熱した。以降は 293T 細胞と同様の手順で行った。

### **抗体蛍光染色**

ドーム状コロニーの分析(Fig. 1-2)のために、st.X ニワトリ胚をカバーガラス (Matsunami)上に播種し 24 時間培養した。細胞を 4% PFA/PBS で室温 10 分間固定し、0.5% Triton X-100 を添加した PBS で室温 20 分間透過処理を行った後、Blocking One-P でブロッキングした。Blocking One-P で希釈した、anti-human-E-cadherin mouse antibody(1:50、610181、BD Transduction Laboratory)と anti-mouse-IgG goat antibody coupled with Alexa 594 (1:500, Invitrogen)でインキュベートした。核は[1µg/ml] Hoechst 33342 で染色し、FV10i confocal microscope (OLYMPUS)によって観察した。

抗 cNanog、cPouV 抗血清による 293T 細胞の染色(Fig. 2-1)のために、293T 細胞を、上記の方法で固定、透過処理、ブロッキングした。一次抗体として抗血清[1:1000]、二次抗体として anti-rabbit-IgG goat antibody coupled with Alexa 594 [1:1000]を使用した。抗体の希釈には staining solution (0.1% Triton

X-100 と 5% Blocking One-P を添加した PBS)を用いた。上記の方法で核を染色し、A1 confocal microscope (NIKON)によって観察した。

抗 cNanog、cPouV 抗血清によるニワトリ胚の染色(Fig. 2-3)のために、孵卵した卵から回収したニワトリ胚を 4% PFA で一晩 4°Cで固定した。凍結切片用には、固定後の胚を 4°Cの 10%と 20%のスクロースで平衡化し、OTC コンパウンド(Funakoshi)で包埋した。-30°Cで OTC のブロックを凍結させ、transverse 切片を作成してスライドガラスに接着させた。ブロッキング以降は 293T 細胞のときと同様の手順で行った。ただし、二次抗体には anti-rabbit-IgG goat antibody coupled with Alexa 488 (1:500、Invitrogen)を使用した。ホールマウント染色は、切片の染色と同じ手順を行った。

抗 cNanog、cPouV 抗血清によるニワトリ胚盤葉の培養細胞の染色(Fig. 2-4)のために、ニワトリ胚盤葉をカバーガラスチャンバー (IWAKI)に播種し、basic condition で 2 日間培養した後、ドーム状コロニーの染色と同様の方法で細胞を固定、透過処理、ブロッキングした。染色および観察は、293T 細胞のときと同様の手順で行ったが、二次抗体には Alexa 488 が付加したものを使用した。この染色方法で、Jak/Stat の機能解析 (Fig. 3-3)も行った。ただし、一次抗体としてアフィニティ精製した抗血清を用いた。

抗 Stat3 リン酸化チロシン抗体によるニワトリ胚の染色(Fig. 3-2)のために、孵卵した卵から回収したニワトリ胚を 4% PFA で氷上、2 時間固定し、-20°Cの MeOH で 5 分間透過処理をした後、抗血清によるニワトリ胚の染色と同様のブロッキングと染色の手順を行った。ただし、基本的に使用する溶液には PhosSTOP (ROCHE)を添加し、一次抗体として anti-phospho-Stat3 (Tyr705)

monoclonal rabbit antibody (1:50、 #9131、 Cell Signaling Technology)と anti-human-E-cadherin mouse antibody、二次抗体として anti-rabbit-IgG goat antibody coupled with Alexa 488 と anti-mouse-IgG goat antibody coupled with Alexa 594 を使用した。観察には FV10i confocal microscope を用いた。

抗 Stat3 C 末端抗体によるニワトリ胚の染色(Fig. 3-2)も抗 Stat3 リン酸化チロシン抗体による染色と同様の手順を行った。ただし、MeOH 処理と PhosSTOP の添加は行わず、ブロッキング時には 0.1%の Triton X-100 を加えた。また、一次抗体として、抗 Stat3 リン酸化チロシン抗体の代わりに、C-20 Stat3 抗体 (1:50、 sc-482、 Santa Cruz)を使用した。切片を作成するために、抗血清によるニワトリ胚の染色と同様に固定とブロッキングを行い、同上の方法で染色した後、パラフィンに包埋し、切片を作製、観察した。

### *cPouV* の exon 0 の 5'側にある未知領域のシーケンス

KOD-FX NEO (TOYOBO)と Chicken Male Genomic DNA (GC-120M、YYAGEN)を使って PCR 反応を行い、PCR 産物を TOPO TA cloning vector (Invitrogen)によってクローニングした。未読領域に隣接した部分に設計した以下の 2つのプライマーセットを使用した：①CTTCCGCCGCTGGGATGCGA、GGAACGGGGCCGAGCGAAGG ② CTATATGACCGCCAATACAAGGGGCAGTTTCACTC、GGCATTTCGCAATCCTTTAAGCCATTTACACATTCG。これら 2つのプライマーセットを使って 4つの独立した PCR 反応を行い、その産物から得られた 6 クローンをシーケンスすることで、未読領域のコンセンサス配列を得た。シーケ

ンス反応は Applied Biosystems の提示している方法に従ったが、終濃度[5%]になるように dimethyl sulfoxide (DMSO)を添加し、DNA 鎖変性の温度を上げて時間を伸ばすという改変を行った。以下の4つのシーケンス用プライマーは、未読領域の全域を少なくとも 2 回シーケンスできるように設計した：GACAGCTGCACTGTGC 、 AGGGGAAGAAGAGCTGCTGC, CGGGGCACAGCGCGTGGC、CACCTCGTCTCCGCTGTTCGC。転写産物を調べるために、st.5 のニワトリ胚から抽出した total RNA と SuperScriptIII (Life Technologies)を用いて逆転写反応を行った。GC-rich PCR system (ROCHE)を用いた RT-PCR の PCR 産物を、ゲルから抽出しクローニングベクターに挿入した。複数のクローンの配列をシーケンスしたところ、全てがゲノムの PCR 産物から得られた配列とほぼ一致する配列が得られた (exon 1 内に 1 塩基の同義置換がある以外は完全一致)。

### **ニワトリ IL-6 リコンビナントタンパク質の精製**

コールドショック発現プラスミド(pCold、TaKaRa)にもとづいて、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) のタグが付いたニワトリ IL-6 を発現するコンストラクトを作り、タンパク質合成用に市販されている大腸菌 Rosetta 2 competent cell (Millipore)に導入してリコンビナントタンパク質を合成した。大腸菌を溶菌し、GST タグとグルタチオンの親和性を利用してリコンビナントタンパク質を GSTrap HP カラム(GE Healthcare)に結合させた。非特異的なタンパク質を洗い流した後、PreScission Protease (GE Healthcare)によって GST タグとリコンビナントニワトリ IL-6 を切り離して溶出した。使用濃度は、

[3:1000] (短期培養)、[1.2:10000] (通常の培養)。

### エレクトロポレーションによって遺伝子を導入したニワトリ胚盤葉細胞の培養

複数のニワトリ胚盤葉から細胞を回収し、播種する前に Neon Transfection System (Invitrogen)によって遺伝子導入を行った。方法は Invitrogen のマニュアルに準ずる (optimization protocol #2 の条件)。導入した発現ベクターは DF-1 細胞に導入したのと同じ CAGGS-EGFP-P2A-mStat3ER プラスミドである。エレクトロポレーション後の細胞を 4 つの well に分注し、Rux または 4HT を添加した N2B27 培地 (ペニシリンストレプトマイシン不含) に播種した。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院理学研究科分子発生学講座教授・阿形清和博士ならびに理化学研究所発生・再生研究センター形態形成シグナル研究チーム研究員・布施直之博士に深く感謝いたします。

ウズラの提供および鳥類胚実験手技のご指導をいただきました信州大学農学部食料生産科学科教授・小野珠乙博士ならびに同学科教授・鏡味裕博士、ウズラの飼育部屋を使用させていただきました京都大学大学院理学研究科動物学教室准教授・佐藤ゆたか博士、スッポン胚を提供いただきました理化学研究所発生・再生研究センターボディプラン研究グループグループディレクター・相澤慎一博士、ニワトリ胚染色のご指導をいただきました理化学研究所発生・再生研究センター初期発生研究室チームリーダー・Guojun Sheng 博士ならびに同研究室研究員・仲矢由紀子博士、爬虫両棲類学に関するご指導いただきました京都大学大学院理学研究科動物学教室准教授・森哲博士ならびに同教室研究員・竹内寛彦博士、タイムラプス顕微鏡を使用させていただきました名古屋大学大学院創薬科学研究科特任教授・藤吉好則博士、凍結切片とゲノム PCR のご指導をいただきました東北大学学際科学フロンティア研究所助教・齋藤大介博士、ご助言をいただいた理化学研究所発生・再生研究センター分子配列比較解析ユニット技術職員・西村理さん、分子生物学および細胞生物学に関するご指導をいただきました岡崎賢二博士、ニワトリ IL-6 配列を提供いただきました広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学研究室教授・堀内浩幸博士、mStat3ER 配列を

提供いただきました理化学研究所発生・再生研究センター多能性幹細胞研究チームチームリーダー・丹羽仁史博士、論文投稿にあたり英文校正をして下さいました京都大学大学院理学研究科分子発生学講座研究員・中島エリザベス博士に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり多大なご助力をいただきました京都大学大学院理学研究科分子発生学講座のみなさま、京都大学大学院理学研究科動物発生学研究室教授・高橋淑子博士ならびに同研究室のみなさまに深く感謝いたします。

## 参考文献

Abercrombie, M., and Bellairs, R. (1954). The Effects in Chick Blastoderms of Replacing the Primitive Node by a Graft of Posterior Primitive Streak. *J Embryol Exp Morph* *2*, 55–72.

Abercrombie, M., and Waddington, C. (1937). The behaviour of grafts of primitive streak beneath the primitive streak of the chick. *Journal of Experimental Biology* *14*, 319–334.

Agata, K., Nakajima, E., Funayama, N., Shibata, N., Saito, Y., and Umesono, Y. (2006). Two different evolutionary origins of stem cell systems and their molecular basis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *17*, 503–509.

Alexander, W.S. (2002). Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* *2*, 410–416.

Auernhammer, C.J., and Melmed, S. (2000). Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocr. Rev.* *21*, 313–345.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., Mclauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S.C., Alessi, D.R., and Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* *408*, 297–315.

Bertocchini, F. (2004). Determination of embryonic polarity in a regulative system: evidence for endogenous inhibitors acting sequentially during primitive streak formation in the chick embryo. *Development* *131*, 3381–3390.

Brook, F.A., and Gardner, R.L. (1997). The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 5709–5712.

Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q.-L., and Smith, A. (2008). Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* *135*, 1287–1298.

Burdon, T., Chambers, I., Stracey, C., Niwa, H., and Smith, A. (1999). Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* *165*, 131–143.

Cañon, S., Fernandez-Tresguerres, B., and Manzanares, M. (2011). Pluripotency and lineages in the mammalian blastocyst: An evolutionary view. *Cell Cycle* *10*, 1731–1738.

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* *113*, 643–655.

Chapman, S.C., Matsumoto, K., Cai, Q., and Schoenwolf, G.C. (2007). Specification of germ layer identity in the chick gastrula. *BMC Dev Biol* *7*, 91.

Chung, J., Uchida, E., Grammer, T.C., and Blenis, J. (1997). STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* *17*, 6508–6516.

Darnell, J.E. (1997). STATs and gene regulation. *Science* *277*, 1630–1635.

Do, D.V., Ueda, J., Messerschmidt, D.M., Lorthongpanich, C., Zhou, Y., Feng, B., Guo, G., Lin, P.J., Hossain, M.Z., Zhang, W., et al. (2013). A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes & Development* *27*, 1378–1390.

Eyal-Giladi, H., and Kochav, S. (1976). From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages

of the development of the chick. I. General morphology. *Developmental Biology* *49*, 321–337.

Frame, S., and Cohen, P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* *359*, 1–16.

Frankenberg, S.R., Frank, D., Harland, R., Johnson, A.D., Nichols, J., Niwa, H., Schöler, H.R., Tanaka, E., Wylie, C., and Brickman, J.M. (2014). The POU-er of gene nomenclature. *Development* *141*, 2921–2923.

Frankenberg, S., and Renfree, M.B. (2013). On the origin of POU5F1. *BMC biology* *11*, 1–1.

Frankenberg, S., Gerbe, F., Bessonard, S., Belville, C., Pouchin, P., Bardot, O., and Chazaud, C. (2011). Primitive Endoderm Differentiates via a Three-Step Mechanism Involving Nanog and RTK Signaling. *Developmental Cell* *21*, 1005–1013.

Frankenberg, S., Pask, A., and Renfree, M.B. (2010). The evolution of class V POU domain transcription factors in vertebrates and their characterisation in a marsupial. *Developmental Biology* *337*, 162–170.

Funayama, N. (2010). The stem cell system in demosponges: Insights into the origin of somatic stem cells. *Development, Growth & Differentiation* *52*, 1–14.

Gallera, J., and Nicolet, G. (1974). Regulation in nodeless chick blasoderms. *Cell. Mol. Life Sci.* *30*, 183–185.

Greber, B., Wu, G., Bernemann, C., Joo, J.Y., Han, D.W., Ko, K., Tapia, N., Sabour, D., Sternecker, J., Tesar, P., et al. (2010). Conserved and Divergent Roles of FGF Signaling in Mouse Epiblast Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* *6*, 215–226.

Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., Morfopoulou, S., Humphreys, P., Mansfield, W., Walker, R., et al. (2009). Oct4 and

LIF/Stat3 Additively Induce KrUppel Factors to Sustain Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell* 5, 597–609.

Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1951). A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. *J. Morphol.* 88, 49–92.

Hanna, J.H., Saha, K., and Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and Cellular Reprogramming: Facts, Hypotheses, Unresolved Issues. *Cell* 143, 508–525.

Herrmann, A., Vogt, M., Mönnigmann, M., Clahsen, T., Sommer, U., Haan, S., Poli, V., Heinrich, P.C., and Müller-Newen, G. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of persistently activated STAT3. *J. Cell. Sci.* 120, 3249–3261.

Hirano, T., Akira, S., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990). Biological and Clinical Aspects of Interleukin-6. *Immunology Today* 11, 443–449.

Irie, N., and Kuratani, S. (2011). Comparative transcriptome analysis reveals vertebrate phylotypic period during organogenesis. *Nature Communications* 2, 248–6.

Kim, J.H., Lee, S.-R., Li, L.-H., Park, H.-J., Park, J.-H., Lee, K.Y., Kim, M.-K., Shin, B.A., and Choi, S.-Y. (2011). High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. *PLoS ONE* 6, e18556.

Kito, G., Aramaki, S., Tanaka, K., Soh, T., Yamauchi, N., and Hattori, M.-A. (2010). Temporal and spatial differential expression of chicken germline-specific proteins cDAZL, CDH and CVH during gametogenesis. *J. Reprod. Dev.* 56, 341–346.

Kunath, T., Saba-El-Leil, M.K., Almousaillekh, M., Wray, J., Meloche, S., and Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* 134, 2895–2902.

- Lanner, F., and Rossant, J. (2010). The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* *137*, 3351–3360.
- Lavial, F., Acloque, H., Bertocchini, F., MacLeod, D.J., Boast, S., Bachelard, E., Montillet, G., Thenot, S., Sang, H.M., Stern, C.D., et al. (2007). The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells. *Development* *134*, 3549–3563.
- Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R.E., Schulze, E.N., Song, H., Hsieh, C.-L., et al. (2008). Germline Competent Embryonic Stem Cells Derived from Rat Blastocysts. *Cell* *135*, 1299–1310.
- Lunn, J.S., Fishwick, K.J., Halley, P.A., and Storey, K.G. (2007). A spatial and temporal map of FGF/Erk1/2 activity and response repertoires in the early chick embryo. *Developmental & Comparative Immunology* *302*, 536–552.
- Lyashenko, N., Winter, M., Migliorini, D., Biechele, T., Moon, R.T., and Hartmann, C. (2011). Differential requirement for the dual functions of  $\beta$ -catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation. *Nat. Cell Biol.* *13*, 753–761.
- Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., et al. (2008). Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells. *Cell* *134*, 521–533.
- Martello, G., Sugimoto, T., Diamanti, E., Joshi, A., and Hannah, R. (2012). Esrrb is a pivotal target of the gsk3/tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* *11*, 491–504.
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., and Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J.* *18*, 4261–4269.

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* *113*, 631–642.

Moretto-Zita, M., Jin, H., Shen, Z., Zhao, T., Briggs, S.P., and Xu, Y. (2010). Phosphorylation stabilizes Nanog by promoting its interaction with Pin1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 13312–13317.

Murray, J., Campbell, D., Morrice, N., Auld, G., Shpiro, N., Marquez, R., Peggie, M., Bain, J., Bloomberg, G., Grahammer, F., et al. (2004). Exploitation of KESTREL to identify NDRG family members as physiological substrates for SGK1 and GSK3. *Biochem. J.* *384*, 477–488.

Najm, F.J., Chenoweth, J.G., Anderson, P.D., Nadeau, J.H., Redline, R.W., McKay, R.D.G., and Tesar, P.J. (2011). Isolation of Epiblast Stem Cells from Preimplantation Mouse Embryos. *Cell Stem Cell* *8*, 318–325.

Nakagawa, S., and Takeichi, M. (1998). Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development* *125*, 2963–2971.

Nakanoh, S., Okazaki, K., and Agata, K. (2013). Inhibition of MEK and GSK3 Supports ES Cell-like Domed Colony Formation from Avian and Reptile Embryos. *Zoological Science* *30*, 543–552.

Nichols, J., Chambers, I., Taga, T., and Smith, A. (2001). Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development* *128*, 2333–2339.

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.

Nichols, J., and Smith, A. (2009). Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell* *4*, 487–492.

Nichols, J., and Ying, Q.-L. (2006). Derivation and propagation of embryonic stem cells in serum- and feeder-free culture. *Methods Mol. Biol.* *329*, 91–98.

Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & Development* *12*, 2048–2060.

Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* *24*, 372–376.

Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., and Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* *460*, 118–122.

Niwa, H., Sekita, Y., Tsend-Ayush, E., and Grützner, F. (2008). Platypus Pou5f1 reveals the first steps in the evolution of trophoctoderm differentiation and pluripotency in mammals. *Evol. Dev.* *10*, 671–682.

Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophoctoderm Differentiation. *Cell* *123*, 917–929.

Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., and Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* *60*, 461–472.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* *448*, 313–317.

Pain, B., Clark, M.E., Shen, M., Nakazawa, H., Sakurai, M., Samarut, J., and Etches, R.J. (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian

embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* *122*, 2339–2348.

Petitte, J.N., Liu, G., and Yang, Z. (2004). Avian pluripotent stem cells. *Mechanisms of Development* *121*, 1159–1168.

Psychoyos, D., and Stern, C.D. (1996). Restoration of the organizer after radical ablation of Hensen's node and the anterior primitive streak in the chick embryo. *Development* *122*, 3263–3273.

Saba-El-Leil, M.K., Vella, F.D.J., Vernay, B., Voisin, L., Chen, L., Labrecque, N., Ang, S.-L., and Meloche, S. (2003). An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* *4*, 964–968.

Savatier, P., Huang, S., Szekely, L., Wiman, K.G., and Samarut, J. (1994). Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts. *Oncogene* *9*, 809–818.

Savatier, P., Lapillonne, H., van Grunsven, L.A., Rudkin, B.B., and Samarut, J. (1996). Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* *12*, 309–322.

Schöler, H.R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* *344*, 435–439.

Sengupta, T.K., Talbot, E.S., Scherle, P.A., and Ivashkiv, L.B. (1998). Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 11107–11112.

Sheng, G., Reis, dos, M., and Stern, C. (2003). Churchill, a zinc finger transcriptional activator, regulates the transition between gastrulation and neurulation. *Cell* *115*, 603–613.

Shirayoshi, Y., Okada, T., and Takeichi, M. (1983). The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* 35, 631–638.

Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688–690.

Smith, A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature* 441, 1060–1060.

Smith, C.A., Clifford, V., Western, P.S., Wilcox, S.A., Bell, K.S., and Sinclair, A.H. (2000). Cloning and expression of a DAX1 homologue in the chicken embryo. *J. Mol. Endocrinol.* 24, 23–32.

Stuart, H.T., van Oosten, A.L., Radzsheuskaya, A., Martello, G., Miller, A., Dietmann, S., Nichols, J., and Silva, J.C.R. (2014). NANOG Amplifies STAT3 Activation and They Synergistically Induce the Naive Pluripotent Program. *Current Biology* 24, 340–346.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.

Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 3801–3804.

Tasaki, J., Shibata, N., Nishimura, O., Itomi, K., Tabata, Y., Son, F., Suzuki, N., Araki, R., Abe, M., Agata, K., et al. (2011). ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. *Development* 138, 2417–2427.

Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D.G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* *448*, 196–199.

Theunissen, T.W., Costa, Y., Radziszewska, A., van Oosten, A.L., Laval, F., Pain, B., Castro, L.F.C., and Silva, J.C.R. (2011). Reprogramming capacity of Nanog is functionally conserved in vertebrates and resides in a unique homeodomain. *Development* *138*, 4853–4865.

Thisse, B., and Thisse, C. (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Developmental Biology* *287*, 390–402.

Tokita, M., and Kuratani, S. (2001). Normal embryonic stages of the Chinese softshelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). *Zoological Science* *18*, 705–715.

Tosato, G., and Jones, K.D. (1990). Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. *Blood* *75*, 1305–1310.

Wianny, F., Real, F.X., Mummery, C.L., Van Rooijen, M., Lahti, J., Samarut, J., and Savatier, P. (1998). G1-phase regulators, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3: up-regulation at gastrulation and dynamic expression during neurulation. *Dev. Dyn.* *212*, 49–62.

Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* *336*, 684–687.

Wilson, V., Manson, L., Skarnes, W.C., and Beddington, R.S. (1995). The *T* gene is necessary for normal mesodermal morphogenetic cell movements during gastrulation. *Development* *121*, 877–886.

Wray, J., Kalkan, T., and Smith, A.G. (2010). The ground state of pluripotency. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 1027–1032.

Wray, J., Kalkan, T., Gomez-Lopez, S., Eckardt, D., Cook, A., Kemler, R., and Smith, A. (2011). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat. Cell Biol.* *13*, 838–845.

Yang, X., Dormann, D., Munsterberg, A., and Weijer, C. (2002). Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by chemotaxis mediated by positive and negative FGF4 and FGF8. *Developmental Cell* *3*, 425–437.

Yao, Y., Li, W., Wu, J., Germann, U.A., Su, M.S.S., Kuida, K., and Boucher, D.M. (2003). Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 12759.

Yasukawa, H., Ohishi, M., Mori, H., Murakami, M., Chinen, T., Aki, D., Hanada, T., Takeda, K., Akira, S., Hoshijima, M., et al. (2003). IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat. Immunol.* *4*, 551–556.

Yi, F., Pereira, L., Hoffman, J.A., Shy, B.R., Yuen, C.M., Liu, D.R., and Merrill, B.J. (2011). Opposing effects of Tcf3 and Tcf1 control Wnt stimulation of embryonic stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* *13*, 762–770.

Ying, Q.L., and Smith, A.G. (2003). Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods in Enzymology* *365*, 327–341.

Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* *453*, 519–523.

Zwaka, T.P. (2005). A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development* *132*, 227–233.