

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14453

研究課題名(和文)ES細胞における減数分裂関連因子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of meiosis-related factors in ES cells

研究代表者

洪 実 (Ko, Minoru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：50631199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Zscan4はマウス着床前胚2細胞期に発現することが知られており、zygotic遺伝子群の活性化と減数分裂関連遺伝子の異所的な発現を特徴とする。本研究では内在性Zscan4c遺伝子座にGFPをノックインしたES細胞およびマウスを作製して、内在性Zscan4の発現パターンの解析を行った。その結果、ES細胞内の内在性Zscan4cは全Zscan4陽性細胞のうち約30%であることが判明した。またmeiotic prophaseの後期に相当するGV oocyteおよびパキテン期の精母細胞でZscan4の発現が見られることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Zscan4 is known to be expressed in the 2 cell stage mouse embryos and is characterized by activation of the zygotic genes and ectopic expression of meiosis-related genes. In this study, ES cells and mice in which GFP was knocked-in at the endogenous Zscan4c locus were prepared, and the expression pattern of endogenous Zscan4 was analyzed. As a result, it was found that the endogenous Zscan4c in ES cells is about 30% of all Zscan4 positive cells. Expression of Zscan4 was observed in GV oocytes corresponding to late stage of meiotic prophase and spermatocytes at Pachytene stage.

研究分野：発生生物学

キーワード：Zscan4 Zygotic genes GV oocytes

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は ES/iPS 細胞における生殖細胞/減数分裂関連因子の機能解析、とりわけゲノム安定化の観点から染色体の構造変換および核内配置の分子機構の解明を目的とする。申請者らは、ES/iPS 細胞が pluripotency を維持しつつも無限に増殖する過程で、一過的に Zscan4+ state と呼ばれる遷移状態を経ることを示した (Falco et al., Development 2007; Zalzman et al, Nature 2010)。Zscan4+ state とは着床前初期胚の 2 cell stage に特異的な染色体構造変換、epigenetic 修飾の変化、さらに 2 cell stage に特異的な初期発生に関連する zygotic 遺伝子群の活性化を特徴とする。Zscan4 は、マウス ES 細胞集団のうち 1-5% 程度の sub population において一過的に発現する (Zalzman et al, Nature 2010)。少なくとも 9 回の継代のうちに一度の割合で、Zscan4 遺伝子座が一過的に発火することにより Zscan4+ state と通常の増殖サイクルとの間を移行している。(Zalzman et al. Nature 2010, Hirata et al. Scientific rep. 2011, Macfarlan et al. Nature 2012, Amano et al., Nat. Comm. 2013)。そもそも pluripotency を持つ ES 細胞が胚盤胞期 (blastocyst) の内部細胞塊に由来することを考えると、あたかも初期発生を一時的に逆行するかの様な現象とも考えられるが、その生理的な意義は十分に理解されていない。興味深いことに、着床前初期胚 2 cell stage や ES 細胞の Zscan4+ state では、テロメア領域での姉妹染色分体間の組換えを行うことにより、telomerase に依存しない方法でテロメア伸長をもたらすことが示唆されている (Liu et al. Nat. Cell. Biol. 2007, Zalzman et al, Nature 2010, Dan et al. Dev. Cell 2014)。このことは、着床前初期胚 2 cell stage や ES 細胞の Zscan4+ state では特殊な染色体構造環境が形成されていること、すなわち通常であればヘテロクロマ

チン化により DNA 組換えに抵抗性を示すはずの DNA 領域が一時的に解放状態にある可能性を示唆している。奇しくも transcriptome 解析から、Zscan4 が高発現状態となる Zscan4+ state の ES 細胞において本来なら生殖細胞の減数分裂期でしか発現されない遺伝子群が一過的に誘導されるということは注目に値する。この Zscan4+ state で発現誘導が示唆される減数分裂関連因子には、減数分裂組換えの制御に働く因子や減数第一分裂前期で見られる特異的な染色体構造およびその核内配置 (Ishiguro et al., Genes&Dev. 2014, Sherthan et al., Chromosoma 2014) に寄与する因子が軒並み多く含まれることは特筆すべき点である。実際、申請者らは、この Zscan4 を一過性に ES 細胞内に過剰発現させると、Zscan4+ state と類似の状況下で減数分裂関連因子が一斉に誘導されること、さらに telomerase に依存することなくテロメア伸長が誘発されることも示している (Zalzman et al, Nature 2010)。逆説的だが Zscan4+ state の ES 細胞は敢えてゲノム DNA の多様化に寄与する減数分裂期の分子機構を巧みに転用して、ES 細胞のゲノム安定化、抗老化、全能性の維持に寄与していることが示唆されるが、その分子機構の本質については手つかずの点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、未だ未解明の問題について

(1) Zscan4 が如何に減数分裂関連因子を誘導するのか？

(2) ES 細胞の Zscan4+ state で減数分裂関連因子が如何なる機構でテロメア伸長に寄与しているのか？

(3) ES 細胞以外に Zscan4 を介在する同等の機構を利用する他の組織/細胞系が存在しないか？

3つの角度から重点的に検討する。

### 3. 研究の方法

一過的に Zscan4 陽性となった Zscan4+ state ES 細胞で誘導される減数分裂関連因子の機能解析を行うため、Sycp3, Dmc1, Spo11 その他関連因子ヘテロの雌雄交配により blastocyst を回収、outgrowth により ES 細胞を樹立してテロメア伸長、染色体動態について検討する。ChIP-seq 法により Zscan4 の直接の標的配列を明らかにして、Zscan4 陽性状態と減数分裂関連因子の発現誘導についての分子機構について検討を行う。Zscan4 遺伝子座にレポーター GFP を挿入したノックインマウスを作製し、個体組織・細胞系譜の追跡を行って、着床前初期胚 2 細胞期あるいは ES 細胞以外に Zscan4 を介在する同等の機構が他の組織/細胞系が存在するか否か、さらに Zscan4+ state ES 細胞と等価の機構を利用した染色体構造変化が見られないかについて重点的に検討する。

### 4. 研究成果

ES 細胞内の内在性 Zscan4c の発現パターンは全 Zscan4 陽性 ES 細胞のうち約 30% であることが判明し、特定の Zscan4 遺伝子座のみが stochastic に活性化されていることが示唆された。in vivo における内在性 Zscan4 の発現の検討の結果、着床前初期胚のみならず、meiotic prophase の後期に相当する GV oocyte およびパキテン期の精母細胞で Zscan4 の発現が見られることが判明した。興味深いことに、GV oocyte のうち NSN と呼ばれる集団では Zscan4 は核内に均一に観察されるのに対して、RNA pol II による転写が不活性化されている SN と呼ばれる集団では dot 状の核内配置を示すことが明らかとなった。これらの結果は Zscan4 が着床前初期胚のみならず生殖細胞においても何らかの機能を持つことを示唆している。さらに Zscan4 の in vivo にお

ける機能を解析するために、Zscan4 遺伝子クラスター領域全体を欠失させた ES 細胞・マウスの作製を試みている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

(1) Ishiguro KI, Nakatake Y, Chikazawa-Nohtomi N, Kimura H, Akiyama T, Oda M, Ko SB, Ko MS. Expression analysis of the endogenous Zscan4 locus and its coding proteins in mouse ES cells and preimplantation embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 査読あり, 2017;53(2):179-190. doi: 10.1007/s11626-016-0097-y.

(2) Ishiguro KI, Monti M, Akiyama T, Kimura H, Chikazawa-Nohtomi N, Sakota M, Sato S, Redi CA, Ko SB, Ko MS. Zscan4 is expressed specifically during late meiotic prophase in both spermatogenesis and oogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 査読あり, 2017;53(2):167-178. doi: 10.1007/s11626-016-0096-z. Epub 2016 Oct 3.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

洪 実 (KO, Minoru)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：5 0 6 3 1 1 9 9

(2)研究分担者

石黒 啓一郎 (ISHIGURO, Keiichiro)  
慶應義塾大学・医学部・特任准教授  
研究者番号：3 0 5 0 8 1 1 4

研究分担者

洪 繁 (KO, Shigeru)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：9 0 4 0 2 5 7 8

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )