

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440003

研究課題名(和文)生殖細胞における染色体構築様式とその制御に関する研究

研究課題名(英文) Study on chromosome architecture and regulation in germ cell

研究代表者

石黒 啓一郎(Kei-ichiro, Ishiguro)

熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号：30508114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では核内因子Zscan4のin vivoの分子機能の解析を行った。内在性Zscan4を検出する抗体を用いたin vivoにおける発現の検討の結果、着床前初期胚のみならず、生殖細胞でZscan4の発現が見られることが判明した。興味深いことに、卵子のうち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。

研究成果の概要(英文)：ZSCAN4 is expressed specifically in preimplantation embryos in vivo and ES cells in vitro. However, expression patterns of mouse ZSCAN4 in vivo have been largely elusive. We showed that ZSCAN4 proteins are expressed not only in preimplantation embryo but also in adult ovaries and testes. In ovaries, ZSCAN4 proteins were detected in germinal vesicle stage oocytes, indicating that Zscan4 loci are activated during the late stage in meiotic prophase I. Remarkably, ZSCAN4 showed different spatial localization patterns between two distinct GV oocytes, which can be distinguished by global chromatin organization. These spatiotemporal difference in ZSCAN4 localizations correlated with the transition of RNA polymerase II-mediated transcriptional status during GV oocytes maturation. In testes, ZSCAN4 proteins were detected in spermatocytes at late pachytene/diplotene stages and in Sertoli cells. These results suggest that ZSCAN4 may play critical roles during late meiotic prophase in germ cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：生殖細胞 減数分裂 胚性幹細胞 着床前胚 染色体

1. 研究開始当初の背景

Zscan4 はマウス着床前胚 2 細胞期と ES 細胞で特異的に発現することが知られている。マウス ES 細胞は、少なくとも 9 回の継代のうちに一度の割合でコロニー中モザイク状の " Zscan4 陽性の遷移状態 " を経ることが示されている。この状態は、あたかも着床前初期胚を模倣する epigenetic 修飾の変化や胚発生に関連する zygotic 遺伝子群の活性化を特徴とする。とりわけ、減数分裂に関連する遺伝子群の ectopic な発現やセントロメア領域 heterochromatin の集合、telomerase 非依存のテロメア伸長が観察されるなど、通常の体細胞では稀な染色体動態が起きており、生殖細胞における挙動ともある種の類似が見られる。これらの先行研究はすべてマウス ES 細胞の培養条件下において Transgene の過剰発現や RNAi 法によって検討されたもので、in vivo の発生過程でも同様の現象が起きているのかについては全く検討がされていなかった。その大きな理由の一つとして、Zscan4 遺伝子座は高度に重複した複数のパラログ遺伝子と pseudogene で構成されるクラスターを形成しているため、通常の gene targeting 法で組換え ES 細胞を容易に得ることが出来ないことが解析を難しくしていた。よってマウス ES 細胞でその機能の重要性が示唆されながらも、本来の生体内での Zscan4 の機能解析に攻め倦んでいる状況であった。

2. 研究の目的

本研究はマウス着床前胚 2 細胞期と ES 細胞で特異的に発現する Zscan4 の分子機能の解明を目的とする。とりわけ内在性 Zscan4 遺伝子および内在性 Zscan4 タンパク質の発現について、以下の目的の通り in vivo の解析に焦点を当てた。

(1) Zscan4 遺伝子クラスター領域内の 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 in vivo における発現パターンの解析を行う。(2) 新規に

Zscan4 に対する特異的抗体を作製して、胚性幹細胞・着床前胚、生殖細胞における内在性 Zscan4 タンパク質の発現パターンおよび染色体上の局在について検討する。

(3) Zscan4 パラログのタンパク質レベルでの発現について検討する。

(4) Zscan4 遺伝子クラスター領域内の全ての Zscan4 遺伝子座を conditional に KO できるマウス系統を樹立して表現型の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) Zscan4 遺伝子座は高度に重複した複数のパラログ遺伝子と pseudogene で構成されるクラスターを形成しているため、通常の gene targeting 法で組換え ES 細胞を得ること容易ではなかった。そこで内在性 Zscan4 遺伝子クラスター領域内の Zscan4c 遺伝子座に特異的な Crispr gRNA を用いて GFP をノックインしたレポーター ES 細胞およびマウスを作製した。これを用いて内在性 Zscan4 遺伝子クラスター領域内の Zscan4c 遺伝子座の発現解析を行った。

(2) 新規にマウス Zscan4 に対する特異的抗体を作製して、胚性幹細胞・着床前胚、生殖細胞における内在性 Zscan4 タンパク質の発現パターンおよび染色体上の局在について検討を行った。

(3) Zscan4 に対する特異的抗体を用いた affinity 精製と MS 解析により、内在性 Zscan4 パラログのタンパク質レベルでの発現について検討を行った。

(4) Crispr gRNA/CAS9 を用いて Zscan4a 遺伝子座 5' 上流と Zscan4-ps2 遺伝子座 3' 下流に loxP 配列を挿入して、Cre リコンビナーゼの発現誘導により 1Mb に及ぶ Zscan4 遺伝子クラスター領域を欠失する KO ES/マウス系統を樹立することを試みた。

4. 研究成果

内在性 Zscan4 遺伝子クラスター領域内の

Zscan4c 遺伝子座に GFP をノックインした ES 細胞の発現パターンの解析を行った。その結果、全 ES 細胞集団のうちおよそ 0.9% の頻度で GFP 陽性を示すものが観察された。興味深いことに、内在性 Zscan4c の発現を示す GFP 陽性細胞は Zscan4 抗体で検出される全 Zscan4 陽性 ES 細胞のうち約 1/3 であることが判明し、Zscan4 遺伝子クラスターのうち特定の Zscan4 遺伝子座のみが stochastic に発現していることが示唆された。

次に GFP 陽性細胞を FACS で回収後、そのクロマチン画分を用いて免疫沈降法と MS 解析により内在性 Zscan4 タンパク質について検討した。その結果、Zscan4 タンパク質は遺伝子発現の抑制に関連する KAP1, LSD1, HDAC1 を含む複合体を形成していることが示された。さらに、Zscan4 タンパク質に由来するペプチド配列の MS スペクトル解析から、Zscan4 パラログのうち Zscan4c, Zscan4d, Zscan4f が主にタンパク質として発現していることが示された。このように Zscan4c 遺伝子座に GFP をノックインしたレポーター ES 細胞で得られた知見は、ES 細胞における内在性 Zscan4 タンパク質の発現様式と "Z4 イベント" とよばれる特殊なクロマチン状態との関連について興味深い示唆を与えた。

マウス in vivo における Zscan4 の発現について検討した。RT-PCR による解析では、Zscan4 遺伝子は ES 細胞以外に adult 精巣、卵巣においても弱いながら発現していることが示唆された。次いで減数第一分裂期の卵子および着床前初期胚を単離して、Zscan4 タンパク質に対する抗体を用いた免疫染色により検討を行った。その結果、Zscan4 タンパク質は先行研究で示唆されていた 2-cell stage のみならず、GV oocyte において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(Non-surrounding nucleolus)と呼ばれるクラスでは Zscan4 は核内に均一に観察されるのに対して、大部分

の SN(Surrounding nucleolus)と呼ばれるクラスでは核小体周辺部のヘテロクロマチン上において dot 状の核内配置を示すことが明らかとなった。興味深いことに、この Zscan4 タンパク質の核内配置パターンは RNA pol II による転写の活性化・不活性化状態とよく相関していることが判明した。さらに adult 精巣における免疫染色解析では、パキテン期の精母細胞と Sertoli 細胞で Zscan4 の発現が見られることが判明した。これらの結果はマウス in vivo の発生段階で、Zscan4 が着床前初期胚のみならず生殖細胞の meiotic prophase I の後期においても何らかの機能を持つことを示唆している。

なお、本研究の最大の目的としていた Zscan4 遺伝子クラスター領域を欠失する KO ES/マウス系統を樹立には現時点で成功していない。高度な反復配列の構造のためか、Zscan4 偽遺伝子の残骸とも言える配列やフェロモン受容体や Zinc finger タンパク質の偽遺伝子がこのゲノム領域に多数散在しており偽陽性の挿入クローンが多数得られるなど困難を極めた。今後は、Crispr gRNA 標的配列の位置を Zscan4 遺伝子クラスター領域から大幅に遠ざけるなどの工夫を加えた上で体制を立て直す必要があると思われるが、将来 Zscan4 遺伝子クラスター領域のコンディショナル KO の解析がなされれば Zscan4 の in vivo の機能解明に大きな展望をもたらすことが期待される。

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)

Ishiguro K., Nakatake Y.,
Chikazawa-Nohtomi N., Kimura H.,
Akiyama T., Oda M., Ko SBH., Ko MSH. :
Expression analysis of the endogenous
Zscan4 locus and its coding proteins in

mouse ES cells and preimplantation
embryos: **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Anim.**
53, 179-190 (2017) DOI:
10.1007/s11626-016-0097-y

Ishiguro K., Monti M., Akiyama T.,
Kimura H., Chikazawa-Nohtomi N.,
Sakota M., Sato S., Redi CA., Ko SBH.,
Ko MSH. : Zscan4 is expressed
specifically during late meiotic prophase
in both spermatogenesis and oogenesis :
In Vitro Cell.Dev.Biol.-Anim. 53, 167-178
(2017) DOI: 10.1007/s11626-016-0096-z

〔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

熊本大学発生医学研究所染色体制御分野
分野紹介

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/chromosome-biology/seika/

慶應義塾大学医学部 システム医学講座
<http://systemsmedicine.jp/about/>

6 . 研究組織
(1)研究代表者
石黒 啓一郎 (Ishiguro, Kei-ichiro)
熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号 : 30508114

(2)研究分担者
()

研究者番号 :

(3)連携研究者
()

研究者番号 :

(4)研究協力者
()