

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791862

研究課題名(和文) 胚性ゲノム活性化と分化全能性獲得における着床前期特異的新規SCAN遺伝子の役割

研究課題名(英文) A novel preimplantation-specific gene Zfp371 is dispensable for early embryonic development

研究代表者

小川 誠司 (OGAWA, SEIJI)

独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：10573371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：着床前期で特異的に発現していると考えられた新規遺伝子Zfp371に着目し、初期胚発生及びES細胞における役割を明らかにすることを目的としたRT-PCR、免疫染色において2細胞期から胚盤胞期の着床前期胚およびES細胞にのみ発現を認めた。KOマウスは成獣まで発生し、生殖能も維持されていた。着床前期胚発生や産仔数にも異常は認められず、KOマウスから得られたES細胞(KO ES)は未分化性、多分化能性も維持されていた。しかし、核型解析を行ったところ、KOマウスでは高頻度にchromosomal gapが認められ、本遺伝子が何らかのゲノムや染色体の安定性に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have identified a novel mouse gene Zfp371 that likely encodes a SCAN zinc finger domain and is expressed specifically in preimplantation embryos and embryonic stem (ES) cells. The aim of this study was to perform a detailed analysis of its expression pattern and investigate its function in early development. This study showed that Zfp371 is expressed exclusively in preimplantation embryos and ES cells. Zfp371 knockout mice and ES cells from Zfp371 knockout blastocysts were phenotypically normal, but demonstrated numerous random chromosomal deletions. These results indicate that Zfp371 may play a role in genome stability. Our current results suggest that it may be worthwhile investigating the potential role of the human ortholog of mouse ZFP371 in the generation of embryonic chromosomal aberrations.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：着床前期胚 ノックアウトマウス 胚性幹細胞 胚性ゲノム活性化 Zfp371 転写因子 新規遺伝子

1. 研究開始当初の背景

着床前期胚発生は、受精、胚性ゲノム活性化、コンパクション、胚盤胞腔の形成、内細胞塊と栄養外胚葉への分化および分化全能性の獲得などといった一連の過程をとり、再生医学および生殖医学において極めて重要な事象を含む。しかし、これらを制御する分子生物学的機構については未だ不明な点が多い。着床前期胚の遺伝子発現プロファイルリングにより、ZGA(Zygotic Genome Activation)とそれに引き続き、多くの遺伝子がステージ特異的な発現を示すことが明らかとなっている。なかでも、着床前期胚から特異的に発現する転写因子は、胚性ゲノムの活性化と分化全能性の獲得に重要な役割を果たしていると考えられる。これまでの報告で、Zscan4(Falco G, [Hamatani T, et al Dev Bio. 2007](#))、Hmgn(Yamada M, [Hamatani T, et al Hum Mol Genet. 2010](#))、Zfp206(Zhang W, et al *Nucleic Acid Res.* 2006)といった胚性ゲノムの活性化の初期から特異的に発現している遺伝子が、その後の転写増幅に重要な役割を果たしていることが示されており、これらの遺伝子を研究することは胚発生のみならず、分化全能性のメカニズム解明につながると考えられる。

2. 研究の目的

着床前期胚発生の分子機構を解明することは、体外受精における胚の質的向上に寄与するのみならず、着床前期胚から樹立される胚性幹(ES)細胞の分化多能性に寄与する分子機構の解明にも繋がる。そこで*in silico*解析により着床前期で特異的に発現していると考えられた新規遺伝子*Zfp371*に着目し、初期胚発生及びES細胞における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Zfp371 の完全長 cDNA をクローニングし、塩基配列を解読して、ドメイン解析を加え

た。また、RT-PCR および免疫組織化学染色により着床前期各ステージ胚およびマウス多組織における発現解析を行った。さらに転写阻害剤 α アマニチンを受精卵の培養液に添加して 2 細胞期後期まで培養し、*Zfp371* の mRNA 発現量を定量 RT-PCR により観察した。機能解析のため、本遺伝子の第 2 および第 3 エクソンを欠失させたノックアウト(KO)マウスを作成し、表現型を解析した。さらに胚盤胞からノックアウト ES 細胞を樹立し、遺伝子発現についてマイクロアレイを用いて野生型 ES 細胞と比較検討した。また、ノックアウトマウスの脾臓細胞よりマウス個体の核型解析を行った。

4. 研究成果

ドメイン解析の結果、*Zfp371* は Zinc finger ドメインを有し、転写因子として機能すると予測された。RT-PCR では 2 細胞期胚から胚盤胞の着床前期胚及び胚性幹細胞にのみ発現を認めた。免疫組織化学染色においても ZFP371 タンパクは mRNA レベルと同様の発現パターンを示し、さらに 8 細胞期胚でのみ細胞質から核への移行を認めた。また胚性幹細胞でも核への局在が確認された。 α アマニチン添加により着床前期胚での発現が消失したことから、*Zfp371* が卵性ではなく胚性に発現する遺伝子であることが明らかとなった。また免疫組織化学染色において ES 細胞でも核への局在が確認された。エクソン 2、3 のノックアウトしたターゲティングベクターを作成し、ノックアウトマウス(KOマウス)を樹立することができた。KOマウスはいづれも成獣まで発生し、生殖能も維持されていた。着床前期胚発生や産仔数にも異常は認められず、KOマウスの胚盤胞からES細胞(KO ES)を樹立可能で自己複製能、未分化性、多分化能性にも異常は認められなかった。しかし、核型解析を行ったところ、KOマウスでは高頻度に chromosomal gap が認められることが明らか

となり、KO ES細胞と野生型ES細胞では有意に発現レベルの異なる遺伝子が抽出された(887 transcripts)。したがって、KOMマウスの表現型に明らかな異常は認められなかったが、体細胞の染色体に構造異常(凝縮不全)をもつことから、本遺伝子はゲノムや染色体の安定性に寄与している可能性が示唆された。

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0件)

[学会発表](計6件)

#2012年 第64回日本産科婦人科学会
着床前期胚発生に関わる新規遺伝子 *Zfp1*
の発現解析

小川誠司 浜谷敏生 阿久津英憲 山田満
稔 奥村典子 菅原かな 井上治 福永朝
子 梅澤明弘 久慈直昭 青木大輔 吉村
泰典

#2012年 第57回日本生殖医学会
着床前期胚発生に関わる新規遺伝子 *Zfp1*
の発現および機能解析

小川誠司 浜谷敏生 山田満稔 阿久津英
憲 奥村典子 菅原かな 井上治 福永朝
子 久慈直昭 吉村泰典

#2013年 第65回日本産科婦人科学会
着床前期胚において特異的に発現する新規
SCAN-zinc finger遺伝子 *Zfp371* の解析

小川誠司 浜谷敏生 阿久津英憲 山田満
稔 奥村典子 菅原かな 井上治 山田朝
子 梅澤明弘 久慈直昭 青木大輔 吉村
泰典

#2013年 第58回日本生殖医学会
着床前期胚において特異的に発現する新規
SCAN-zinc finger遺伝子 *Zfp371* の解析

小川誠司 浜谷敏生 阿久津英憲 山田満
稔 奥村典子 菅原かな 井上治 山田朝

子 上條慎太郎 梅澤明弘 久慈直昭 青
木大輔 吉村泰典

#2014年 第66回日本産科婦人科学会
着床前期胚において特異的に発現する新規
SCAN-zinc finger遺伝子 *Zfp371* のノックアウ
トマウスおよびノックアウト胚性幹細胞にお
ける機能解析

小川誠司 浜谷敏生 阿久津英憲 山田満
稔 菅原かな 井上治 戸田里実 若松修平
梅澤明弘 久慈直昭 青木大輔 吉村泰典

#2014年 ESHRE annual meeting (ミュン
ヘン)

Analysis of a novel preimplantation-specific
gene *Zfp371* in early embryonic development

[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
特になし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
小川誠司(おがわせいじ)
研究者番号: 10573371

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：