23. 胚性幹細胞・着床前初期胚・生殖細胞の染色体研究

石黒 啓一郎

*慶應義塾大学 医学部 坂口記念システム医学講座

Key words:着床前胚,生殖細胞,胚性幹細胞,染色体,GV oocyte

緒言

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<u>1</u>)。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 ²)。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 telomerase 非依存のテロメア伸長<u>2</u>)やセントロメア領域 heterochromatin の集合<u>3</u>)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 細胞の培養条件下で検討されたもので、*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 pseude 遺伝子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る。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。

そこで本研究では、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った。さらに新規に 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 ついて検討した^{4,5)}。

方法、結果および考察

Zscan4 遺伝子座は高度に重複した複数のパラログ遺伝子と pseude 遺伝子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 細胞を得ることは容易ではなかった<u>1</u>)。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 びマウスを作製して *in vivo* における発現パターンの解析を行った(図 1A)<u>4</u>)。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(図 1B, C)。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 に発火していることが示唆された(図 1D)。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(図 2A)。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(図 2C)。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(図 2B)。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 <u>2-3</u>) との関連について興味深 い示唆を与えた<u>4</u>)。



図1. ES細胞における内在性 Zscan4c 遺伝子座の発火パターン

(A)内在性 Zscan4 遺伝子クラスター領域内の Zscan4c 遺伝子座に Emerald GFPをノック インしたレポーター ES 細胞(Z4c-Emerald-KI)の作製。マウス7番染色体 7qA1の1Mb 領域に渡って6つのパラログ(Zscan4a-f)と pseudegenes(Zscan4-ps1-3)が存在する。
(B) ES 細胞コロニー中に観察される GFP 陽性の細胞。Scale bars: 50 µ m.

(C) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) 解析による Emerald GFP 陽性 (EM+) ES 細胞の割合。親株 TA1 ES cells (左側、negative control)、TA1 Z4c-Emerald-KI ES 細胞 (右側)。

(D) GFP および Zscan4 抗体を用いた Z4c-Emerald-KI ES 細胞の免疫染色解析。矢印はGFP+/Zscan4+ 細胞、矢頭はGFP-/Zscan4+細胞、*はGFP weakly+/Zscan4 weakly+細胞を示す。Scale bar: 10µm. 全 Zscan4 陽性細胞のうち 35.3%がGFP+であった。なおGFP+/Zscan4-細胞は見られなかった。

Α			IP		
	M.	control IgG	ZSCAN4		
250- 150 -					
100- 75 -					
50-		H	-	•	
37-	-				
25- 20-					
15- 10-	-				

В				
Identified Peptide	assigned ZSCAN4			
DHEANLPCESHQKR	ZSCAN4d			
LLKQQQSATRPTPDNEQMPVDTTQDR	ZSCAN4c, ZSCAN4d, ZSCAN4f			
YALTEK	ZSCAN4c, ZSCAN4d, ZSCAN4f			
SLSSHOR	ZSCAN4c, ZSCAN4d, ZSCAN4f			
ASQQAPAK	ZSCAN4c, ZSCAN4d, ZSCAN4f			
LYKCEECSR	ZSCAN4c, ZSCAN4f			
DKYALTEK	ZSCAN4c, ZSCAN4d, ZSCAN4f			
EVPGLQSR	ZSCAN4c, ZSCAN4f			
ENISEDKNNCYNTSR	ZSCAN4c, ZSCAN4d, ZSCAN4f			
EQHPEHEEGNVVCQFPHGAR	ZSCAN4c, ZSCAN4f			
KSELLCVTCQK	ZSCAN4c, ZSCAN4d, ZSCAN4f			
MFNSWLQPEK	ZSCAN4c, ZSCAN4d, ZSCAN4f			
NAATQVYSGDNIPR	ZSCAN4c, ZSCAN4f			
NHEANLPCESHQK	ZSCAN4c, ZSCAN4f			
NHEANLPCESHQKR	ZSCAN4c, ZSCAN4f			
NKSDSLFINKR	ZSCAN4c, ZSCAN4f			
PTPDNEQMPVDTTQDR	ZSCAN4c, ZSCAN4d, ZSCAN4f			
QEQPISDPVLLGK	ZSCAN4c			
QQQSATRPTPDNEQMPVDTTQDR	ZSCAN4c, ZSCAN4d, ZSCAN4f			
SDSLFINKR	ZSCAN4c, ZSCAN4f			
SELLCVTCQK	ZSCAN4c, ZSCAN4d, ZSCAN4f			
SHEMIHTGEMPYVCSLCSR	ZSCAN4c, ZSCAN4d, ZSCAN4f			
THEIIHMPEKPFK	ZSCAN4c, ZSCAN4d, ZSCAN4f			

Identified Proteins M.W. SpC inc finger and SCAN domain containing protein 4 (Zscan4) 58 kDa 58 178 Desmoplakin (Dsp) 333 kDa vsine-specific histone demethylase 1A (Kdm1a) 93 kDa 20 Pyruvate kinase PKM (Pkm) 58 kDa 16 39 kDa Annexin A2 (Anxa2) 16 15 kDa 16 Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 (Uba52) Cvtochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial (Cox5b) 14 kDa 15 17 kDa 14 ysozyme C-1 (Lyz1) ranscription intermediary factor 1-beta (TIF1b/KAP1/Trim28) 89 kDa 13 60 kDa 13 ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (Atp5a1) Tubulin beta-4B chain (Tubb4b) 50 kDa 11 60S ribosomal protein L11 (Rpl11) 20 kDa 11 Elongation factor 1-alpha 1 (Eef1a1) 50 kDa 10 Keratin, type II cytoskeletal 8 (Krt8) 55 kDa 10 18 kDa 40S ribosomal protein S11 (Rps11) 10 Histone deacetylase 1 (Hdac1) 55 kDa 115 kDa Desmoglein-1-alpha (Dsg1a) Glycine dehydrogenase, mitochondrial (Gldc) 113 kDa Peroxiredoxin-1 (Prdx1) 22 kDa 33 kDa ATP synthase subunit gamma, mitochondrial (Atp5c1) Small proline-rich protein 2D (Sprr2d) 9 kDa 104 kDa DNA mismatch repair protein Msh2 (Msh2) 90 kDa Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K (Tgm1) 14-3-3 protein sigma (Sfn) 28 kDa Alpha-enolase (Eno1) 47 kDa Elongation factor 2 (Eef2) 95 kDa Filamin-A (Fina) 281 kDa BTB/POZ domain-containing protein KCTD5 (Kctd5) 26 kDa 78 kDa glucose-regulated protein (Hspa5) 72 kDa Dynein light chain 1, cytoplasmic (Dynll1) 10 kDa DNA damage-binding protein 1 (Ddb1) 127 kDa

図2. ES 細胞における内在性 Zscan4 タンパク質の MS 解析

(A) GFP 陽性 Z4c-Emerald-KI ES 細胞のクロマチン画分より Zscan4 を免疫沈降した後、 SDS-PAGE で分離し銀染色を行った。矢印は Zscan4 を示す。

C

(B) 免疫沈降物中に含まれる Zscan4 タンパク質由来ペプチド配列の LC-MS/MS のスペク トル解析から、Zscan4 パラログのうち内在性の Zscan4c、Zscan4d、Zscan4f が検出され

た。

(C) LC-MS/MS 解析によって同定された内在性 Zscan4 の会合タンパク質のリスト。

次にマウス in vivo における Zscan4 の発現について検討した⁵⁾。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(図3)。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 (図 4A)。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(図 4B)。さらに、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(図4C)。 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5)。ここで得られた知見と解析ツールの開発は、将来的には内在 性 Zscan4遺伝子クラスター領域全体を欠失させたノックアウトマウスの in vivoの機能解析に向けて大いに前進を与 えた。



図 3. マウス組織における Zscan4 遺伝子の発現パターン Zscan4 mRNA の発現組織特異性についての RT-PCR 解析。 E16: 胎児期 16 日、4w: 4 週 齢、 Emm – and Em+ は Emerald GFP 陰性および陽性細胞を示す。Sycel は減数分裂の マーカー遺伝子。



図 4. 卵巣および着床前胚における Zscan4 タンパク質の免疫染色解析

(A) Zscan4 タンパク質は着床前胚のみならず GV oocytes においても検出される。矢頭は polar body を示す。Scale bar: 20 µ m.

(B) SN 型および NSN 型の GV oocytes における Zscan4 タンパク質の局在。Zscan4 タンパク質は SN 型では核小体(*) 周辺においてドット状の局在を示す。一方、Zscan4 タンパク質は NSN 型では核全体に渡って拡散している。定量結果を右のグラフに示す。**P < 0.001 (Pearson's Chi-square test). Scale bar: 10 µ m.

(C) SN 型および NSN 型の GV oocytes における RNA polymerase II CTD repeat phospholylated Ser2 [Pol2(S2P)] 抗体と Zscan4 抗体を用いた免疫染色解析。Pol2(S2P) は RNA polymerase II の転写伸長の active マーカーとして用いた。Zscan4 のドット状の局 在パターンは弱い Pol2(S2P) 染色性と、Zscan4 の diffusive な局在パターンは強い Pol2(S2P) 染色性と相関がある。Scale bar: 10 µ m.



図 5. 精巣における Zscan4 タンパク質の免疫染色解析 精細管切片における免疫染色解析から、late pachytene 精母細胞および Sertoli 細胞に Zscan4 タンパク質が検出された。Lep: Leptotene, late P:: late pachytene, Dip: Diplotene, e St.: elongated spermatid, Ser.: Sertoli cell をそれぞれ示す。Scale bars: 5 µ m.

共同研究者

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学医学部坂口記念システム医学講座の洪実教授およびイタリア Research Center for Regenerative Medicine, Fondazione IRCCS の Manuela Monti 博士である。

文 献

- Falco G, Lee SL, Stanghellini I, Bassey UC, Hamatani T, Ko MS. Zscan4: a novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells. Dev Biol. 2007 Jul 15;307(2):539-50. PubMed PMID: 17553482; PubMed Central PMCID:PMC1994725.
- 2) Zalzman M, Falco G, Sharova LV, Nishiyama A, Thomas M, Lee SL, Stagg CA, Hoang HG, Yang HT, Indig FE, Wersto RP, Ko MS. Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells. Nature. 2010 Apr 8;464(7290):858-63. doi:10.1038/nature08882. PubMed PMID: 20336070; PubMed Central PMCID: PMC2851843.
- 3) Akiyama T, Xin L, Oda M, Sharov AA, Amano M, Piao Y, Cadet JS, Dudekula DB, Qian Y, Wang W, Ko SB, Ko MS. Transient bursts of Zscan4 expression are accompanied by the rapid derepression of heterochromatin in mouse embryonic stem cells. DNA Res. 2015 Oct;22(5):307-18. doi: 10.1093/dnares/dsv013. PubMed PMID:26324425; PubMed Central PMCID: PMC4596397.
- 4) 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. 2017 Feb;53(2):179-190. doi: 10.1007/s11626-016-0097-y. PubMed PMID:27699651.
- 5) 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. 2017Feb;53(2):167-178. doi: 10.1007/s11626-016-0096-z. PubMed PMID: 27699653.