

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¹⁾。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²⁾やセントロメア領域heterochromatinの集合³⁾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¹⁾。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)⁴⁾。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^{2,3)}との関連について興味深い示唆を与えた⁴⁾。

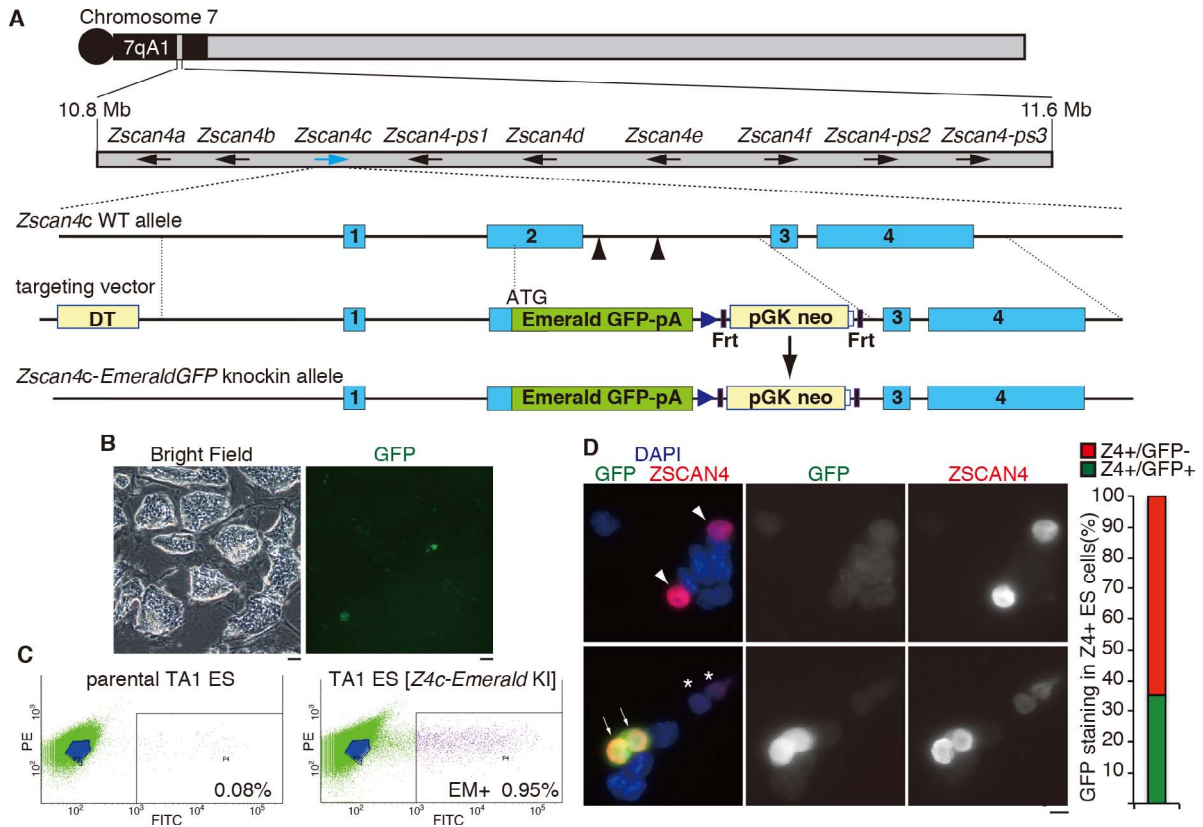


図 1. ES 細胞における内在性 *Zscan4c* 遺伝子座の発火パターン

(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 pseudogenes (*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: 10 μ m. 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。

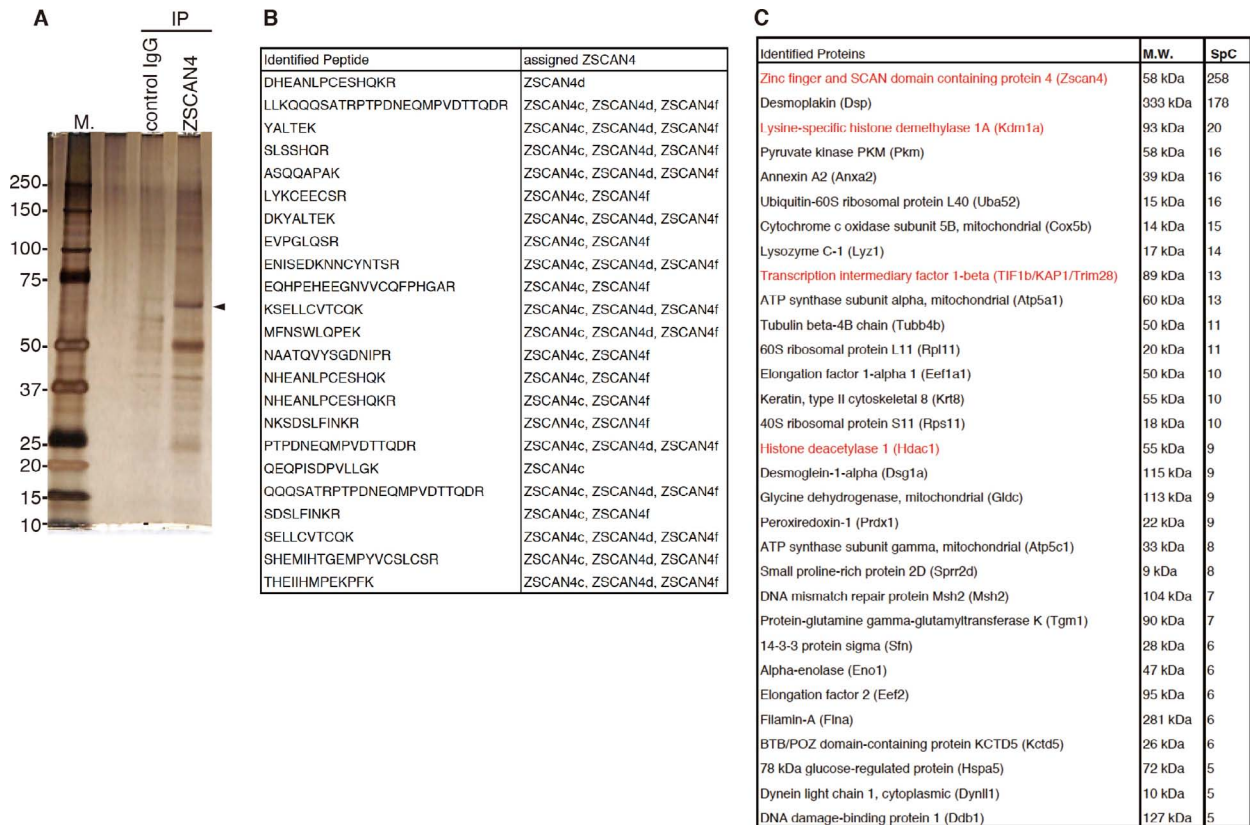


図 2. ES 細胞における内在性 Zscan4 タンパク質の MS 解析

- (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。
- (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。

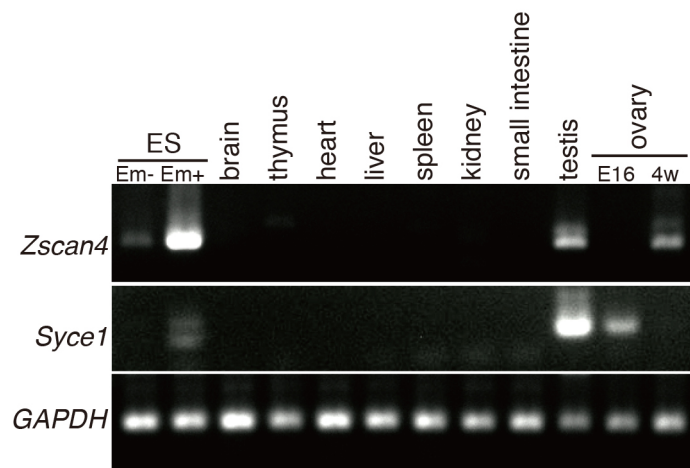


図3. マウス組織における *Zscan4* 遺伝子の発現パターン

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 Emm+ は Emerald GFP 陰性および陽性細胞を示す。*Syce1* は減数分裂のマーカー遺伝子。

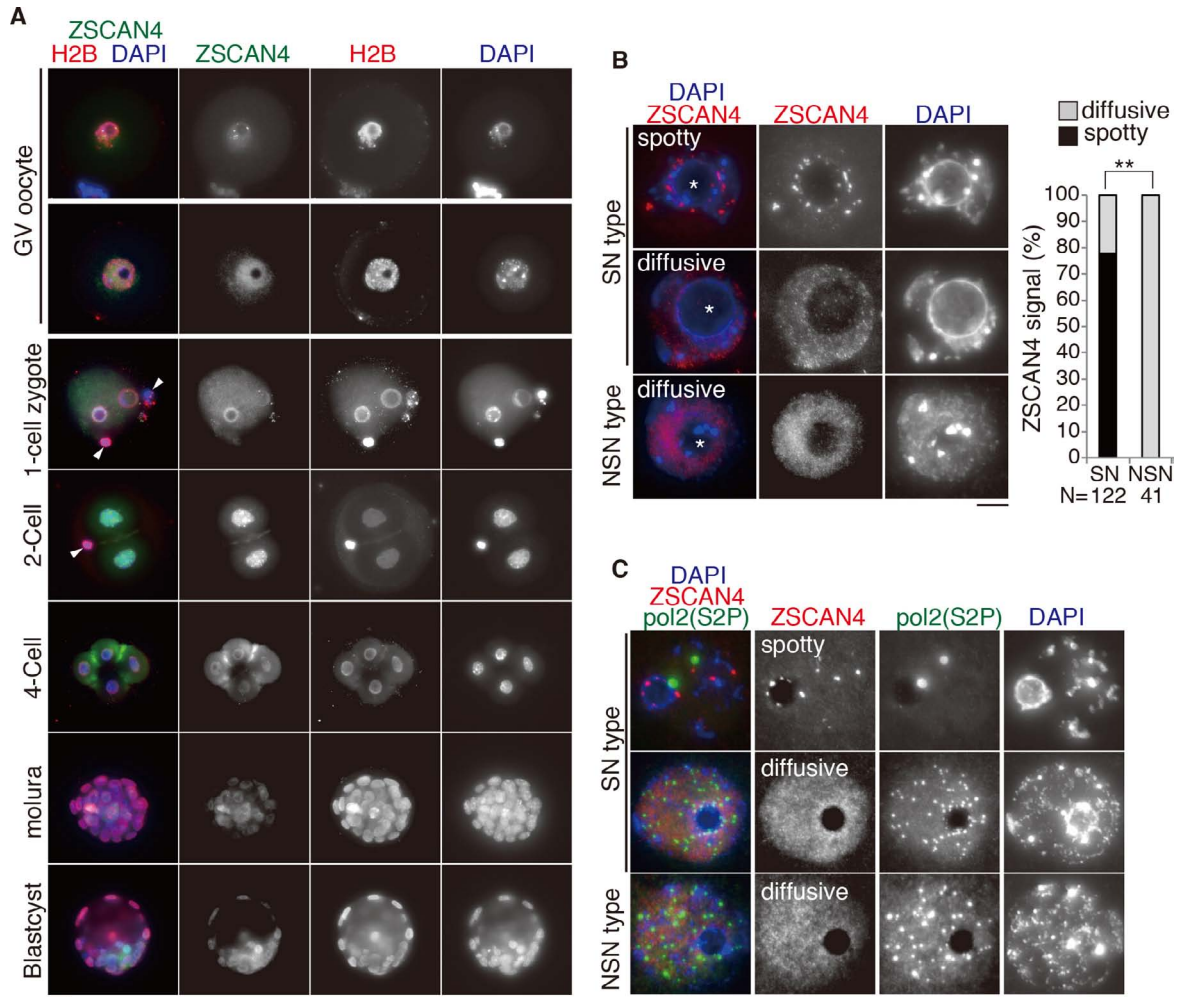


図 4. 卵巣および着床前胚における Zscan4 タンパク質の免疫染色解析

(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.

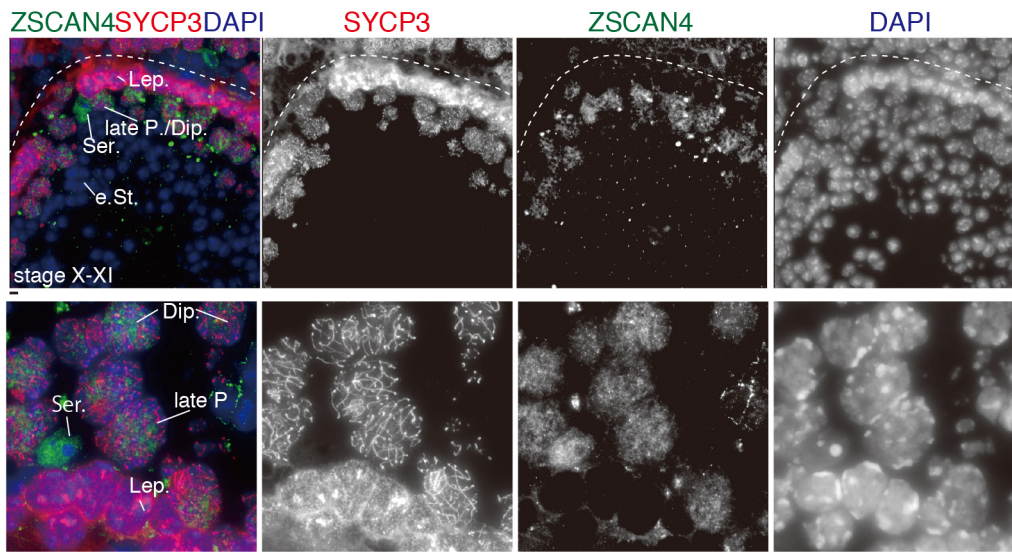


図 5. 精巣における Zscan4 タンパク質の免疫染色解析

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

- 1) 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.