

氏 名	高橋 一生
本籍（国籍）	宮城県
学 位 の 種 類	博士（農学）
学 位 記 番 号	連研第 758 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
学 位 論 文 題 目	ウシ胚の初期発生における ZSCAN4 の機能に関する研究（Studies on function of ZSCAN4 in early development of bovine embryos）
学位審査委員	主査 岩手大学教授 澤井 健 副査 平田 統一(岩手 准教授), 手塚 雅文(帯広 教授), 木村 直子(山形 教授)

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

哺乳動物胚では受精後、精子核の急速かつ大規模な DNA 脱メチル化が起こり、配偶子に特異的なエピゲノムの消去と胚発生に必要なエピゲノムの確立が起こる。しかし、この受精後に起こるエピゲノムのリプログラミングに関する機構の詳細は明らかではない。また、これまで様々な動物種において体細胞クローン個体が作出されてきたが、体細胞核移植（SCNT）による産子の作出効率は依然として低く、作出された個体においても多くの異常が報告されている。SCNT による産子の作出効率や正常性は、ドナー細胞核のリプログラミングの成否にかかっていると考えられるが、体細胞核のリプログラミング機構についても不明な点が多い。一方、近年の iPS 細胞に関する研究により、体細胞核のリプログラミング制御に関する知見が数多く得られている。本研究では、iPS 細胞の樹立の際に体細胞核のリプログラミングに関与することが示唆されている *Zscan4* に着目し、ウシ胚の初期発生における *ZSCAN4* の機能解析を行うことで、受精後に起こるリプログラミング機構の一端を明らかにすることを試みた。

ウシ卵子および初期胚における *ZSCAN4* の発現動態を解析した。さらに、RNA polymerase II の不可逆的阻害剤である  $\alpha$ -amanitin を添加した培地でウシ胚を培養することにより、*ZSCAN4* の発現上昇が胚性遺伝子の発現によるものかを検証した。その結果、*ZSCAN4* 発現は卵子から 4-細胞期にかけて低い発現を示した後、8-細胞期で急激に上昇した。また、 $\alpha$ -amanitin の培地への添加は、4-細胞期における *ZSCAN4* 発現量に影響を及ぼさなかったものの、8-細胞期における *ZSCAN4* 発現量は  $\alpha$ -amanitin 無添加区に比べ添加区において有意 ( $P < 0.05$ ) に低い値を示した。これらの結果から、ウシ胚において *ZSCAN4* は胚性遺伝子から転写・翻訳されることで発現し、その発現は胚性遺伝子活性化(ZGA)の時期に急激に高まることが明らかとなった。

ウシ初期胚の発生における *ZSCAN4* の役割を明らかにするために、RNA 干渉法を用いた *ZSCAN4* の発現抑制が、初期胚発生、ZGA 遺伝子の発現、細胞周期、さらにテロメア長にお

よぼす影響について検討した。ウシ 1-細胞期胚の細胞質に *ZSCAN4*-siRNA の注入を行い、siRNA による *ZSCAN4* の発現抑制効果を 8 から 16-細胞期における mRNA 発現量により確認した。*ZSCAN4* 発現抑制胚の各発生段階への発生率、8 から 16-細胞期胚における *EIF1AX* 発現、8-細胞期以上の胚の細胞周期および 8 から 16-細胞期胚のテロメア長を検討した。ウシ胚における *ZSCAN4* 発現抑制は 8-細胞期までの発生率に影響をおよぼさなかったが、16-細胞期以上、桑実期以上、さらに胚盤胞期への発生率を有意 ( $P < 0.05$ ) に低下させた。*ZSCAN4* の発現抑制による *EIF1AX* 発現およびテロメア長への影響は認められなかった。*ZSCAN4* 発現抑制胚において、G0 もしくは G1 期の細胞数が対象区と比較して低い割合を示した。これらの結果から、*ZSCAN4* はウシ胚の 16-細胞期以降の発生に必須の因子であることが明らかとなり、ウシ初期胚における細胞周期の制御に関わっている可能性が示された。

次に、*ZSCAN4* の発現抑制胚におけるエピゲノム制御因子および iPS 細胞関連因子の発現におよぼす影響を解析した。*HDAC1* mRNA 発現量は *ZSCAN4* 発現を抑制した 2-細胞期胚において、Uninjected 区と比較して高い傾向 ( $P = 0.0713$ ) が認められ、4-細胞期においては Uninjected 区と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に高い発現を示した。一方、*KDM1A* 発現においては、*ZSCAN4* 発現抑制による影響は認められなかったが、*ZSCAN4* 発現抑制胚の *DNMT1* 発現は Control-siRNA 区と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に低い値を示した。*ZSCAN4* 発現抑制胚の *DPPA2* 発現は対象区と差は認められなかったが、*ZSCAN4* 発現抑制胚の *PIWIL2* 発現は対象区と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に低い値を示した。このことからマウス iPS 細胞の作出において *Zscan4* の導入により発現が誘起される遺伝子の一つである *PIWIL2* は、ウシ胚においても *ZSCAN4* により発現制御を受ける可能性を示唆した。また、Piwi タンパクと piRNA が共同して発現制御を行う内在性レトロウイルスの *BERVK1* 発現量は *ZSCAN4* 発現抑制により低い値を示した。以上の結果から、ウシ胚において、*ZSCAN4* は *PIWIL2* を介して内在性レトロウイルスの発現制御に関与する可能性が示された。さらに、*PIWIL2* の発現に関しては、iPS 細胞およびウシ胚において共通した *ZSCAN4* による制御機構の存在が認められたことから、体細胞核のリプログラミングと、受精後に起こる配偶子核のリプログラミングの間には *ZSCAN4* を介した共通の機構が存在することが示唆される。

本研究の結果から *ZSCAN4* はウシ胚のエピゲノム機構やリプログラミング機構を介して初期胚発生を制御していることが示された。本研究より得られた知見は、ウシ初期胚の発生機構の高度な理解のための基盤となり、さらに SCNT 胚や iPS 細胞における体細胞核のリプログラミング機構の解明に寄与するものである。

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、iPS 細胞の樹立の際に体細胞核のリプログラミングに関与することが示唆されている *Zscan4* に着目し、ウシ胚の初期発生における *ZSCAN4* の機能解析を行うことで、受精後に起こるリプログラミング機構の一端を明らかにすることを試みた。

ウシ卵子および初期胚における *ZSCAN4* の発現動態を解析した結果、*ZSCAN4* 発

現は卵子から 4-細胞期にかけて低い発現を示した後、8-細胞期で急激に上昇すること、また、*ZSCAN4* は胚性遺伝子から転写・翻訳されることで発現し、その発現は胚性遺伝子活性化(ZGA)の時期に急激に高まることが明らかとなった。

ウシ初期胚の発生における *ZSCAN4* の役割を明らかにするために、RNA 干渉法を用いた *ZSCAN4* の発現抑制が、初期胚発生、ZGA 遺伝子の発現、細胞周期、さらにテロメア長におよぼす影響について検討した。ウシ胚における *ZSCAN4* 発現抑制は 16-細胞期以上へ発生する胚の割合を低下させた。*ZSCAN4* の発現抑制による *EIF1AX* 発現およびテロメア長への影響は認められなかった。*ZSCAN4* 発現抑制胚において、G0 もしくは G1 期の細胞数が対象区と比較して低い割合を示した。これらの結果から、*ZSCAN4* はウシ胚の 16-細胞期以降の発生に必須の因子であることが明らかとなり、ウシ初期胚における細胞周期の制御に関わっている可能性が示された。

次に、*ZSCAN4* の発現抑制胚におけるエピゲノム制御因子および iPS 細胞関連因子の発現におよぼす影響を解析した。*HDAC1* mRNA 発現量は *ZSCAN4* 発現を抑制した 4-細胞期胚において Uninjected 区と比較して高い発現を示した。*ZSCAN4* 発現抑制胚の *DNMT1* 発現は Control-siRNA 区と比較して低い値を示した。また、*ZSCAN4* 発現抑制胚の *PIWIL2* 発現は対象区と比較して低い値を示した。このことから *PIWIL2* は、ウシ胚においても *ZSCAN4* により発現制御を受ける可能性を示唆した。また、内在性レトロウイルスの *BERVK1* 発現量は *ZSCAN4* 発現抑制により低い値を示した。以上の結果から、ウシ胚において、*ZSCAN4* は *PIWIL2* を介して内在性レトロウイルスの発現制御に関与する可能性が示された。

本研究の結果から *ZSCAN4* はウシ胚のエピゲノム機構やリプログラミング機構を介して初期胚発生を制御していることが示された。本研究より得られた知見は、ウシ初期胚の発生機構の高度な理解のための基盤となり、さらに体細胞クローン胚や iPS 細胞における体細胞核のリプログラミング機構の解明に寄与するものである。

以上、本審査委員会は「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

#### 主論文

1. Takahashi, K., Ross, P. J. and Sawai, K. (2019)

The necessity of *ZSCAN4* for preimplantation development and gene expression of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development* 65: 319-326.

#### 参考論文

1. Takahashi, K., Sakurai, N., Emura, N., Hashizume, T. and Sawai, K. (2015)

Effects of downregulating *GLIS1* transcript on preimplantation development and gene expression of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development* 61: 369-374.