

ウシ胚の初期発生における ZSCAN4 の機能に関する研究

2019

岩手大学大学院 連合農学研究科  
生物生産科学専攻 (岩手大学配属)

高橋 一生

## 目 次

	頁
第1章 緒 論	4
第2章 ウシ卵子および初期胚における <i>ZSCAN4</i> の発現解析	
1. 緒 言	8
2. 材料および方法	11
3. 結 果	17
4. 考 察	21
5. 要 約	24
第3章 <i>ZSCAN4</i> 発現抑制がウシ初期胚の発生と ZGA、細胞周期、およびテロ メア長におよぼす影響	
1. 緒 言	26
2. 材料および方法	28
3. 結 果	35
4. 考 察	45
5. 要 約	49
第4章 <i>ZSCAN4</i> 発現抑制がウシ初期胚におけるエピゲノム制御因子、iPS 細胞 関連遺伝子、および内在性レトロウイルスの発現におよぼす影響	
1. 緒 言	51
2. 材料および方法	53
3. 結 果	55

4. 考 察	63
5. 要 約	67
第5章 総 括	68
謝 辞	72
参考文献	73

## 第 1 章

### 緒 論

ウシやブタなどの家畜においては、体外受精 (IVF) や体細胞核移植 (SCNT) などの発生工学技術を用いた育種改良や優良個体の増産、さらに近年ではそれら技術を用いたヒトの医療用薬剤や疾患モデル個体の生産が期待されている。しかしながら、IVF や SCNT に由来する体外生産胚においては低い受胎率や死産および産後直死の発生など、数多くの課題が存在する (Willadsen *et al.*, 1991; Behboodi *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1995; Kruip *et al.*, 1997; Wilmut *et al.*, 2002)。これら異常の原因として、IVF 後の配偶子核や SCNT 胚におけるドナー細胞核の不完全な遺伝子発現の初期化 (リプログラミング) による初期胚の遺伝子発現制御機構 (エピゲノム) の異常が考えられている (Dean *et al.*, 2001; Wrenzycki *et al.*, 2005; Sawai *et al.*, 2005, 2011)。しかしながら、家畜卵子内における配偶子核および体細胞核のリプログラミングに関しては、その制御因子や制御機構など不明な点が多い。

近年、SCNT 技術の改善や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立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研究が著しく進展している。マウスやヒトの iPS 細胞においては、体細胞核が多能性を再獲得するために必要とされている 4 因子 (POU class 5 homeobox 1: *Oct-4* SRY-related HMG-box gene 2: *Sox2* Kruppel-like factor 4: *Klf4* Myelocytomatosis oncogene: *Myc*) の他に Zinc finger and SCAN domain containing 4 (*Zscan4*) を細胞内に導入することで、その樹立効率が劇的に向上することが明らかとなった (Hirata *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013)。こうした新たなリプログラミング因子の発見は、体細胞核のリプログラミングにおける 4 因子以外の因子の重要性を示唆している。しかし、個々の新規リプログラミング関連因子の生理的な働きに着目した研究は十分に行われていない。

*Zscan4* はマウスにおいて 2-細胞期に特異的な発現を示す遺伝子として Falco

ら (2007) により同定された因子であり、*Zscan4a*、*Zscan4b*、*Zscan4c*、*Zscan4d*、*Zscan4e* および *Zscan4f* の 6 遺伝子と、3 つの偽遺伝子を含む 0.85 Mb のクラスターを形成し chromosome 7 上に存在している (Falco *et al.*, 2007)。*Zscan4* 遺伝子は哺乳動物のゲノム上に共通して存在し、ヒトやウシではシングルコピーとして存在する (Falco *et al.*, 2007)。マウス胚における *Zscan4* の発現抑制、および強制発現はともに胚発生に異常をもたらすことから、*Zscan4* はマウスの初期胚発生において 2-細胞期に特異的に高発現することで発生に必須の機能を持つと考えられる (Falco *et al.*, 2007)。哺乳動物胚においては、1-細胞期から 2-細胞期にかけて精子核の急速かつ大規模な DNA 脱メチル化が起こることで配偶子に特異的なエピゲノムの消去と胚発生のために必要なエピゲノムが確立される (Monk *et al.*, 1987; Howlett *et al.*, 1991; Oswald *et al.*, 2000)。これらのことから、*Zscan4* は卵子内における配偶子核のリプログラミングに重要な役割を担うことが考えられるが、*ZSCAN4* の家畜胚での発現動態や機能は不明である。

本研究では、ウシ胚の初期発生における *ZSCAN4* の機能を明らかにすることを目的とした。第 2 章において、ウシ卵子および初期胚における *ZSCAN4* 遺伝子の mRNA 発現動態について検討し、第 3 章においては、*ZSCAN4* 発現抑制がウシ IVF 胚の初期発生、胚性遺伝子の活性化、細胞周期およびテロメア長におよぼす影響について検討した。さらに第 4 章においては、*ZSCAN4* 発現抑制がウシ胚のエピゲノム制御関連遺伝子、iPS 細胞関連遺伝子、および内在性レトロウイルスの発現におよぼす影響を検討した。

## 第2章

ウシ卵子および初期胚における *ZSCAN4* の発現解析

## 1. 緒 言

近年、ウシやブタなどの家畜において、IVF や SCNT を用いた胚の体外生産技術の開発が進んでいるが、それら技術を用いて生産された胚の移植後の受胎率や産子生産率は未だ低い (Heyman *et al.*, 2002; Watanabe and Nagai, 2011; Ferraz *et al.*, 2016; Eliab *et al.*, 2019)。さらに IVF や SCNT により得られた産仔は生後直死や過大化などの異常が報告されている (Willadsen *et al.*, 1991; Behboodi *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1995; Kruij *et al.*, 1997)。IVF 胚や SCNT 胚におけるこれら異常の原因について詳細は明らかとなっていないが、IVF 胚や SCNT 胚におけるエピゲノムの異常がその要因として示唆されている (Dean *et al.*, 2001; Wrenzycki *et al.*, 2005; Sawai *et al.*, 2005, 2011)。

哺乳動物の初期胚発生においては、受精後に DNA 脱メチル化などのエピゲノムの大規模な変化が起こる (Monk *et al.*, 1987)。この過程で、卵子や精子といった配偶子に特異的なエピゲノムの消去と受精後の胚発生に必要なエピゲノムが確立される (Monk *et al.*, 1987; Howlett *et al.*, 1991; Oswald *et al.*, 2000)。また、SCNT 胚においても、レシピエント卵子の細胞質内へ移植されたドナー細胞核は体細胞型のエピゲノムから初期胚に特異的なエピゲノムへとリプログラミングされる (Mann *et al.*, 2003)。これら IVF 胚や SCNT 胚におけるゲノムリプログラミング機構の解明は、IVF 胚や SCNT 胚のエピゲノム異常の克服において重要な課題である。

受精後の精子核および SCNT 後のドナー細胞核のリプログラミングは卵子内の細胞質で起こる。すなわち、精子核およびドナー細胞核は卵子内において胚発生に必要なエピゲノムを獲得することから (Surani *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010; Jullien *et al.*, 2011)、卵子内には細胞核のリプログラミングを制御する因

子が存在することが考えられる。しかしながら、卵子内における細胞核のリプログラミング因子は明らかとなっておらず、卵子内での核リプログラミングに関する詳細な機構も明らかではない。

一方、近年の iPS 細胞樹立に関する研究により、体細胞核のリプログラミングに関する研究が急速に進展している (Ebrahimi 2015; Takahashi and Yamanaka, 2016)。2006 年、Takahashi と Yamanaka は、ES 細胞で高発現する 4 因子 (*Oct-4*, *Sox2*, *Klf4*, *Myc*: OSKM) をマウス線維芽細胞に導入することにより体細胞型の核がリプログラミングされ ES 細胞様の多能性幹細胞、iPS 細胞が樹立されることを世界で初めて報告した (Takahashi and Yamanaka, 2006)。また同グループは翌年、ヒト線維芽細胞においても同様に OSKM を用いることで iPS 細胞の樹立が可能であることを実証した (Takahashi *et al.*, 2007)。それ以来、OSKM による体細胞核リプログラミング効率を向上させる、もしくは OSKM の代替となる新たな因子の探索が盛んに行われてきた (Zhao *et al.*, 2008; Tsubooka *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2010)。

上記の様な背景のもと、転写因子である *Zscan4* は OSKM とともに体細胞に導入することにより、マウスにおける iPS 細胞の作出効率を高めることが報告された (Hirata *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013)。さらに、*Zscan4* 発現を人為的に誘導して作出されたマウス iPS 細胞においては、通常の iPS 細胞とは異なり初期胚特有の遺伝子発現パターンを示す (Hirata *et al.*, 2012)。以上のことから、*Zscan4* は iPS 細胞を樹立する際の体細胞核のリプログラミングに重要な役割を担うことが考えられる。iPS 細胞と同様に多能性を有するマウス ES 細胞においては、通常 1-5%の細胞が *Zscan4* 陽性を示し、*Zscan4* 陽性と *Zscan4* 陰性の状態を繰り返す発現動態を示す (Zalzman *et al.*, 2010; Amano *et al.*, 2013)。また、マウスにおける *Zscan4* 発現 ES 細胞では、*Tctst1/3*、*Eif1a*、*Gm428* などのマウス 2-細

胞期胚に特異的な発現を示す遺伝子が発現する (Amano *et al.*, 2013)。興味深いことにマウス胚において、*Zscan4* は 2-細胞期で、ヒト胚においては 4 から 8-細胞期で発現が高まることが報告されている (Falco *et al.*, 2007; Vassena *et al.*, 2011; Shaw *et al.*, 2012)。このことは *Zscan4* が体細胞核のリプログラミングのみならず受精後の配偶子核のリプログラミングにも何らかの役割を持つことを示唆するものである。一方、ウシなどの家畜卵子および初期胚においては *ZSCAN4* の機能はおろか、その発現動態に関しても明らかになっていない。そこで本章では、卵子および初期胚における *ZSCAN4* の発現動態を検討した。

## 2. 材料および方法

### 1) 試薬

特に記載がない場合、試薬は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入して使用した。

### 2) ウシ卵巣の採取および卵子の吸引採取

実験に供したウシ卵巣は、すべて食肉処理場に搬入屠殺された雌ウシより採取した。卵巣を採取した各個体の月齢、品種などは考慮せず卵巣疾患が疑われるものは除外した。採取した卵巣は 38°C の生理食塩水 [0.9% (v/w) NaCl 水溶液] 中に浸漬して実験室に持ち帰った。卵子の採取には 18 G 注射針および 10 ml シリンジを使用し、直径 2-8 mm の卵胞から卵胞液とともに卵丘細胞-卵子複合体 (Cumulus-Oocyte Complex; COCs) を吸引採取した。その後、実体顕微鏡下において、卵丘細胞が 3 層以上付着しており卵細胞質が変性していない COCs を選抜し、2% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 添加 COCs 洗浄用培地 {M199 培地 (M7653) を 6 に対し、SOF-Hepes (Holm *et al.*, 1999) [107.7 mM NaCl, 7.16 mM KCl, 1.19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 5.3 mM Na-Lactate, 1.71 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.5 mM Fluctose, 21 mM HEPES, 2% (v/v) BME amino acids, 1% (v/v) MEM non-essential amino acids, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.33 mM Na-Pyruvate, 1 mM GlutaMAX™ (Gibco™; Thermo Fisher Scientific), 0.1% (w/v) BSA, 5 µg/ml Gentamicin] が 4 の割合で混和した培地} を用いて 3 回洗浄した。

### 3) 体外成熟培養 (IVM)

選抜・洗浄後の COCs の体外成熟には 0.1 mM ALA-glutamine、0.2 mM Na-Pyruvate、5 mg/ml Gentamicin、50 ng/ml EGF、50 ng/ml oFSH (National Hormone and Peptide Program, St. Torrance, CA, USA)、3 µg/ml bLH (National Hormone and Peptide Program)、0.1 mM Cysteamine、および 10% (v/v) FBS (Hyclone, South Logan, UT, USA) を含む修正 M199 培地 (M2154) を用いた。修正 M199 培地を 500 µl 分注した 4-well dish 内に COCs を 1-well あたり 50 個程度移し、38.5°C、5% CO<sub>2</sub>、in air 条件下の CO<sub>2</sub> インキュベーターにおいて 22 時間の成熟培養を行った。

#### 4) 体外受精 (IVF)

体外成熟後の COCs は、SOF-IVF 培地 (Lazzari *et al.*, 2002) [107.7 mM NaCl、7.16 mM KCl、1.19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.49 mM MgCl<sub>2</sub>、1.17 mM CaCl<sub>2</sub>、5.3 mM Na-Lactate、25.07 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.20 mM Na-Pyruvate、0.5 mM Fructose、1X non-essential fatty acid、5 µg/ml Gentamicin、10 µg/ml Heparin、0.6% (w/v) BSA] を用いて 3 回洗浄した。洗浄した COCs を、ミネラルオイルで覆った SOF-IVF 培地のドロップ (50 µl) 内に 1 ドロップあたり 25 個程度移した。IVF に用いる凍結融解精液は、90%および 45%を重層したパーコールを用いて室温で遠心分離 (700 rcf、15 分) を行い、遠心後に精子ペレットを TALP-Sperm (Parrish *et al.*, 1986, 1988) (100 mM NaCl、3.1 mM KCl、2.1 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.4 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、25 mM NaHCO<sub>3</sub>、2.14 mM Na-Lactate、10 mM HEPES、6 mg/ml BSA、0.11mg/ml Na-Pyruvate、0.025 µg/ml Gentamicin) を用いて再度遠心分離 (300 rcf、5 分) を行うことで洗浄した。遠心分離・洗浄後の精子ペレットを TALP-Sperm で希釈した後、10 µl を SOF-IVF 培地のドロップに添加することで最終精子濃度 1.0×10<sup>6</sup>精子/ml になるように調整した。媒精は 38.5°C、

5% CO<sub>2</sub>、in air 条件下の CO<sub>2</sub> インキュベーターにおいて 16 時間行った。媒精終了後、SOF-Hepes 中で 4 分間ボルテックスすることにより受精卵の周囲に残る卵丘細胞および精子を除去し、細胞質が変性していないもののみをその後の実験に用いた。

#### 5) 体外発生培養 (IVC)

IVF 処理後の受精卵は 4 mg/ml BSA を添加した修正 KSOMaa Evolve Bovine media (ZEBV-100; Zenith Biotech, Guilford, CT, USA) を用い、39°C、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub> 条件下で体外発生培養 (IVC) を行った。培養 3 日目に 5% (v/v) になるよう stem cell qualified FBS (Gemini Bio Products, West Sacramento, CA, USA) を各ドロップに添加し、計 8 日間培養した。一部の受精卵は 50 µg/ml の  $\alpha$ -amanitin を添加した修正 KSOMaa Evolve Bovine media 中で培養を行った。

#### 6) RNA のサンプリング

卵子および胚のサンプリングには PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus, Mountain View, CA, USA) を用い、卵核胞期 (IVM 前) 卵子、第二減数分裂中期 (IVM 後) 卵子、媒精 16 時間後 (1-細胞期胚)、IVC 開始後 10-14 時間 (2-細胞期胚)、IVC 開始後 28 時間 (4-細胞期胚)、IVC 開始後 40 時間 (8-細胞期胚)、IVC 開始後 56 時間 (16-細胞期胚)、IVC 開始後 96 時間 [桑実期胚 (Morula)]、および IVC 開始後 144 時間 [胚盤胞期胚 (Blastocyst)] に行った。すべてのサンプルは 10 卵子/胚を 1 サンプルとし、あらかじめ 38°C に温めておいた 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidone (PVP) を含む Dullbecco's phosphate buffer saline [DPBS (Thermo Fisher Scientific); 1% PVP-PBS] で 3 回洗浄した。RNA 精製に先立ち、すべてのサンプルに 8 µl の HcRed1 cRNA (250 fg/µl) を添加した。添加した

cRNA は pHcRed1-Nuc Vector (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて Bettegowda ら (2006) の方法に準じて作成されたものを用いた。また、すべてのサンプルは RNase-free DNase I (Qiagen, Valencia, CA, USA) 処理により、ゲノム DNA を除去した。処理後のサンプルは $-80^{\circ}\text{C}$ のフリーザー内で保存した。

#### 7) 逆転写 (RT)

RNA サンプルの RT 反応は、PCR サーマルサイクラー (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。また、RT 反応は SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) のメーカープロトコルに準じ、Random Hexamers (Thermo Fisher Scientific) もしくは Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。各 RNA サンプルに 100 ng Random Hexamers もしくは Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 1  $\mu\text{l}$  ずつ、さらに dNTP Mix (10 mM each, Thermo Fisher Scientific) を 1  $\mu\text{l}$  ずつ添加し、 $65^{\circ}\text{C}$ で 5 分間処理した。その後、各サンプルに 5X First-Strand Buffer を 4  $\mu\text{l}$ 、0.1 M DTT (Thermo Fisher Scientific) を 2  $\mu\text{l}$ 、RNaseOUT (40 units/ $\mu\text{l}$ , Thermo Fisher Scientific) を 1  $\mu\text{l}$  それぞれ添加し、Random Hexamers を使用したサンプルは  $25^{\circ}\text{C}$ で 2 分間、Oligo(dT)<sub>12-18</sub>を使用したサンプルは  $42^{\circ}\text{C}$ で 2 分間処理した。その後、各サンプルに SuperScript™ II Reverse Transcriptase を 1  $\mu\text{l}$  ずつ添加し、 $42^{\circ}\text{C}$ で 50 分間処理することで cDNA を合成した。最後に  $70^{\circ}\text{C}$ で 15 分間処理することで RT 酵素を失活させた。RT 反応後、各 cDNA サンプルを $-30^{\circ}\text{C}$ のフリーザー内で保存した。

#### 8) リアルタイム-PCR

リアルタイム-PCRはQuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用い、PCR 産物の検出は Fast SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) により行った。18  $\mu$ l の反応液 [2X Master mix 10  $\mu$ l、10  $\mu$ M に調整した Forward および Reverse Primer (Table 1) 各 0.5  $\mu$ l、RNase free water 7.5  $\mu$ l] に各 cDNA サンプル 2  $\mu$ l を添加し、95°Cで 20 秒間処理することにより HotStarTaq DNA Polymerase を活性化した。その後、95°Cで 1 秒、60°Cで 20 秒の反応を 45 サイクル行うことで cDNA の増幅および蛍光度の測定を行った。その後、増幅した PCR 産物の融解曲線を作成することにより、得られた PCR 産物の特異性を確認した。

mRNA 発現量は、標準曲線との比較により定量化した。各遺伝子の PCR 産物を MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製し、NanoDrop (2000c; Thermo Fisher Scientific) を用いて 260 nm の吸光度を測定すること各精製物の濃度を測定した後、濃度が 10 ng/ $\mu$ l になるように T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> Buffer [1% (w/v) Tris HCl (Thermo Fisher Scientific)、0.2% (v/v) Ethylenediaminetetraacetic acid (Thermo Fisher Scientific)] で希釈した。調整した各精製物を T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> Buffer で 10 倍ずつ段階希釈することで標準サンプル (10<sup>-5</sup>-10<sup>-12</sup> ng/ $\mu$ l) を作製した。標準サンプルはリアルタイム PCR を行う際に、その都度作製し、cDNA サンプルと共に増幅した。SYBR Green の蛍光度の測定はすべての増幅サイクルで行った。mRNA 発現量の定量化は、QuantStudio Design and Analysis Software (Thermo Fisher Scientific) を用いて行い、*ZSCAN4* の mRNA 発現量の比較には同一サンプルの *HcRed1* 発現量で補正した値を用いた。

## 9) 統計解析

得られたデータの統計解析は、Statcel2 (オーエムエムス出版、埼玉、日本) お

よび Stat view (HULINKS、東京、日本) を用いて行った。mRNA 発現量については、Bartlett 検定を用いて分散の均一性を確認した。卵子および初期胚における *ZSCAN4* の mRNA 発現量については、Kruskal-Wallis 検定を行い、その後 Scheffé 法を用いて多群間の有意差検定を行った。α-amanitin 処理胚における *ZSCAN4* mRNA 発現量の比較については、F 検定を用いて分散の均一性を確認した後、Mann-Whitney 検定を行い、2 群間の差の検定を行った。

### 3. 結 果

#### 1) ウシ卵子および初期胚における *ZSCAN4* 発現動態

ウシ卵子および初期胚における *ZSCAN4* 発現動態について、Fig. 1 に示した。Random Hexamers を用いて cDNA 合成を行なった場合 (Fig. 1A) と、Oligo(dT) を用いて行なった場合 (Fig. 1B) のどちらにおいても、*ZSCAN4* の mRNA 発現量は卵子から 4-細胞期まで低い値を示したが、8-細胞期で有意 ( $P < 0.05$ ) な上昇を示した。さらに 8-細胞期と比較して、胚盤胞期胚において有意 ( $P < 0.05$ ) に低い値を示した。Random Hexamers を用いて RT を行った場合、16-細胞期における *ZSCAN4* 発現量は 8-細胞期以外の発生段階と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に高い値を示した (Fig. 1A)。その後、*ZSCAN4* 発現量は発生段階の進行とともに減少した (Fig. 1A, B)。以後、第 2 章における遺伝子発現解析に用いた mRNA サンプルは Random Hexamers を用いて cDNA 合成を行った。

#### 2) IVC 培地への $\alpha$ -amanitin 添加が *ZSCAN4* 発現におよぼす影響

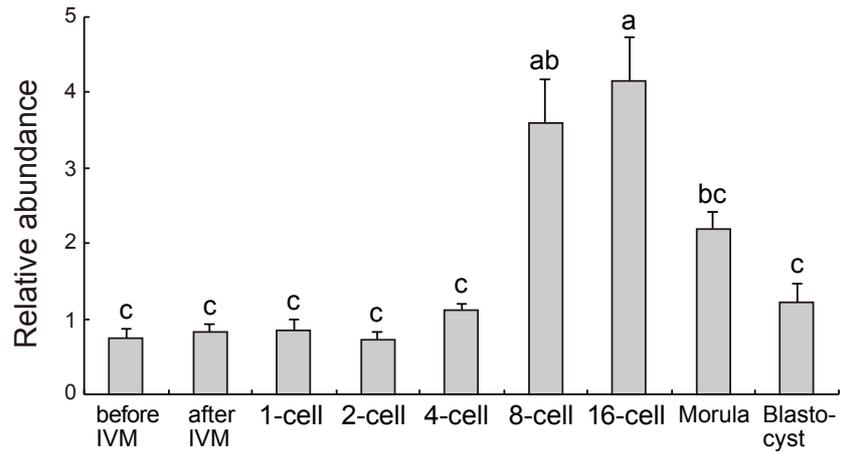
$\alpha$ -amanitin 添加または未添加の IVC 培地において、4-細胞期または 8-細胞期に発生した胚における *ZSCAN4* mRNA 発現量について、Fig. 2 に示した。4-細胞期胚における *ZSCAN4* 発現量は  $\alpha$ -amanitin の添加の有無に関わらず低い値を示した (Fig. 2A)。一方、8-細胞期胚における *ZSCAN4* 発現量は、 $\alpha$ -amanitin 無添加区において添加区と比較し有意 ( $P < 0.05$ ) に高い値を示した (Fig. 2B)。

Table 1. Primers sequences

Name	Nucleotide sequences (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)	Genbank accession no.
<i>ZSCAN4</i>	F- GTCCC'TGGAAACAGGACAAA R- TTCTGGAGTTCCGTGGATTTC	60	179	XM_005195522.1
<i>HcRed1</i>	F- GCCCGGCTCCCACTTCA R- GGCCTCGTACAGCTCGAAGTA	60	79	N/A

F, forward; R, reverse; S, sense; AS, antisense strand.

(A) RT with Random Hexamers



(B) RT with Oligo (dT)

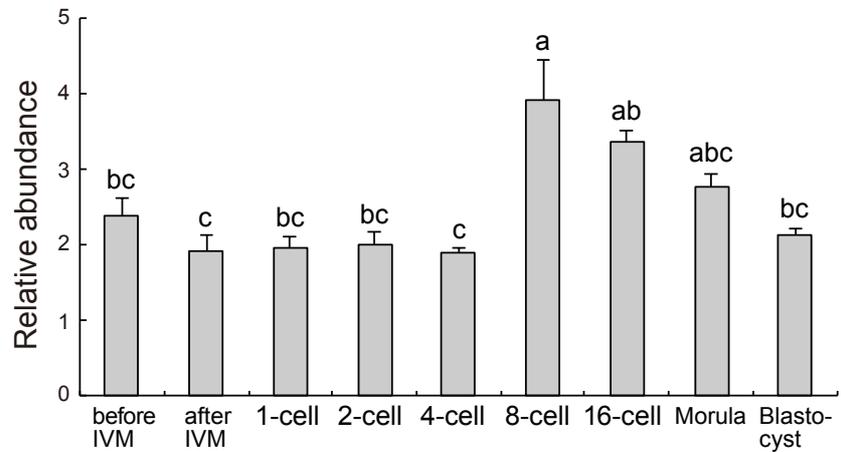


Fig. 1. Transcript abundance (mean ± SEM) of *ZSCAN4* genes in bovine oocytes and preimplantation embryos (n = 4). Data were normalized to abundance of exogenous control (*HcRed1*) RNA. <sup>a, b, c</sup> Values with different superscripts within each column differ significantly (P < 0.05).

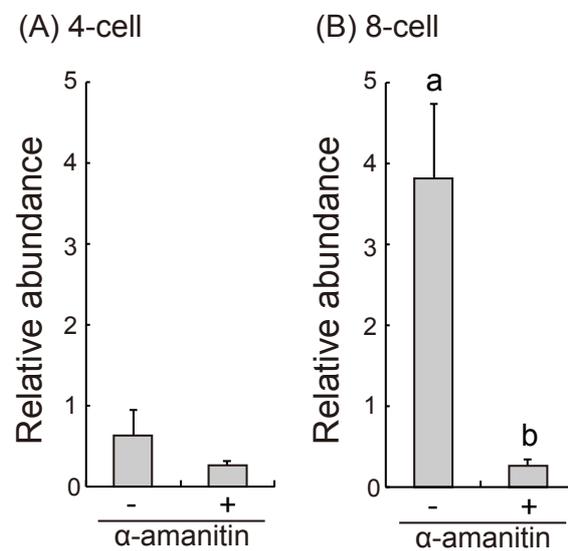


Fig. 2. Transcript abundance (mean  $\pm$  SEM) of *ZSCAN4* genes in bovine 4-cell embryos and 8-cell embryos (n = 4). Data were normalized to abundance of exogenous control (*HcRed1*) RNA. <sup>a, b</sup> Values with different superscripts within each column differ significantly (P < 0.05).

#### 4. 考 察

マウスやウシにおいては、受精前後で poly(A) 鎖の長さが変化する母性 mRNA が多数存在することが知られている (Clegg and Piko, 1982; Worrad *et al.*, 1994; Temeles and Schultz, 1997; Worrad and Schultz, 1997; Brevini-Gandolfi *et al.*, 1999)。さらに、poly(A) 鎖の長さが Oligo(dT) による cDNA 合成に影響をおよぼすことが報告されており (Moore *et al.*, 1996)、受精直後に母性 mRNA の poly(A) 鎖が伸長することで、実際には mRNA 量が増加していないにもかかわらず 1-細胞期胚において遺伝子発現が上昇したかのような結果が得られる可能性がある。そこで本研究では、mRNA からの cDNA 合成において mRNA にランダムに結合する Random Hexamers を用いる区と、poly(A) を認識して結合する Oligo(dT) を用いる区の 2 区を設けた。それぞれ調製したサンプルを用いて *ZSCAN4* mRNA の発現動態を検討した結果、Oligo(dT) を用いて cDNA 合成を行なった区においても Random Hexamers を用いた場合と同様に 1-細胞期において *ZSCAN4* の発現上昇は見られなかった。このことから、卵子中に存在する *ZSCAN4* mRNA は、卵子から受精後の 4-細胞期に至るまで低い値で推移した後、8-細胞期で急激に上昇することが示された。この傾向は 2 つの異なる方法により合成された cDNA を用いた結果で共通していた。また、*ZSCAN4* 発現量は 8 から 16-細胞期以降、胚盤胞期にかけて減少することも明らかとなった。

哺乳動物においては、受精後しばらくの間、発生の進行は母性 mRNA により制御された後、胚由来の転写産物による制御へと切り替わることが知られている (Schultz *et al.*, 1999; Minami *et al.*, 2007)。この現象は胚性遺伝子の活性化 (Zygotic gene activation; ZGA) と呼ばれ、マウス胚においては 2-細胞期に、ヒトとブタ胚においては 4 から 8-細胞期に、ウシ胚においては 8 から 16-細胞期にかけて ZGA

が起こる (Kidder *et al.*, 1985; Camous *et al.*, 1986; Braude *et al.*, 1988; Frei *et al.*, 1989; Hyttel *et al.*, 2000)。ヒト胚においては ZGA が起こる時期である 4 から 8-細胞期にかけて *ZSCAN4* 発現が急激に上昇することが報告されている (Vassena *et al.*, 2011; Shaw *et al.*, 2012)。またマウス胚において、*Zscan4* mRNA は 2-細胞期に一過的な高発現を示すこと (Falco *et al.*, 2007)、培地へ RNA polymerase II の不可逆的阻害剤である  $\alpha$ -amanitin を添加することにより *Zscan4* の一過的な高発現が抑制されること (Hamatani *et al.*, 2004) が明らかとなっており、*Zscan4* 発現量の増加は *de novo* な転写によるものであることが示されている。本研究においても、 $\alpha$ -amanitin 添加培地で発生したウシ 4-細胞期および 8-細胞期胚における *ZSCAN4* mRNA 発現量を検討した結果、8-細胞期における急激な *ZSCAN4* mRNA 発現の上昇は胚性ゲノムからの *de novo* な転写によることが示された。

先述のように、マウス胚では 2-細胞期、ヒトおよびウシ胚では 8-細胞期に ZGA が起こり、多くの遺伝子の発現が活性化される (Kidder *et al.*, 1985; Braude *et al.*, 1988; Frei *et al.*, 1989)。ZGA は哺乳動物胚に共通して発生に必須の現象である一方、バイオインフォマティクスを用いた解析により、ZGA で活性化する遺伝子は動物種により多様であることが明らかとなっている (Xie *et al.*, 2010)。この報告によれば、ヒトの ZGA において活性化する遺伝子のうちマウスの ZGA で活性化する遺伝子は 40%にとどまり、さらにウシの ZGA でも活性化する遺伝子は、わずか 8.5%に過ぎない (Xie *et al.*, 2010)。本研究結果から、*ZSCAN4* はウシ胚においても ZGA の時期に特異的に高まる発現動態を示すことが明らかとなった。このことは、ZGA という哺乳動物胚の初期発生に極めて重要な現象に *ZSCAN4* が関与している可能性を示すものであり、*ZSCAN4* がウシ胚の発生にどのような役割を持つかが明らかにする必要がある。そこで、次章において *ZSCAN4* の発現

抑制がウシ胚発生に及ぼす影響について検討した。

本研究において、*ZSCAN4* 発現動態の解析は mRNA 発現量解析にとどまり、タンパク質レベルでの解析は行っていない。HomoloGene (NCBI Resource Coordinators, 2016) を用いた解析の結果、*ZSCAN4* タンパク質はマウスとウシ間で 35.3-42.1%、ヒトとウシ間では 56.5%とアミノ酸配列の相同性が低く、本研究においても抗マウスおよび抗ヒト *ZSCAN4* 抗体を用いたウシ胚の蛍光免疫染色を試みたが、明瞭な染色像を得ることができなかった。今後、ウシ胚における *ZSCAN4* タンパク質発現とその局在を明らかにするためには、ウシ *ZSCAN4* に特異的な抗体の作出と、それを用いたタンパク質レベルの発現動態を検討する必要がある。

## 5. 要 約

本章では、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。

ウシ卵子および IVF 胚から mRNA をサンプリングし、Random Hexamers および Oligo(dT) を用いて cDNA 合成を行い、リアルタイム PCR により *ZSCAN4* 発現量を解析した。cDNA 合成法の違いにかかわらず、*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。

本研究の結果から、ウシにおいて *ZSCAN4* mRNA 発現は胚性遺伝子からの新たな転写により ZGA の時期に急激に高まることが明らかとなった。

## 第3章

*ZSCAN4* 発現抑制がウシ初期胚の発生と

胚性遺伝子の活性化、細胞周期、およびテロメア長におよぼす影響

## 1. 緒 言

第 2 章でも述べたように、*Zscan4* をリプログラミング因子として用いて樹立されたマウス iPS 細胞では初期胚に特異的な遺伝子群の発現が活性化される (Hirata *et al.*, 2012)。マウス ES 細胞においては、通常 1-5%の細胞が *Zscan4* 陽性を示し、*Zscan4* 陽性と *Zscan4* 陰性の状態を繰り返すことで、*Zscan4* はアポトーシスの抑制およびテロメア長の維持など、ES 細胞の多能性および自己複製能を維持する働きを持つことが明らかになっている (Zalzman *et al.*, 2010; Amano *et al.*, 2013)。さらに、*Zscan4* 発現マウス ES 細胞ではマウスにおける ZGA の時期である 2-細胞期に特有の遺伝子が高い発現を示す (Amano *et al.*, 2013)。本研究においても第 2 章の結果より、ウシ胚においてマウス胚やヒト胚と同様に ZGA の時期に *ZSCAN4* の発現が高まることが明らかとなった。Falco ら (2007) はマウス胚において short interfering RNA (siRNA) を用いた *Zscan4* の発現抑制を行い、2 から 4-細胞期における発生遅延および胚盤胞期胚における胚の拡張不全や、胚移植後の着床不全など、*Zscan4* 発現抑制胚における発生異常を見出した (Falco *et al.*, 2007)。さらに、同様の発生異常は *Zscan4* を 1-細胞期から強制発現させた胚においても観察されたことから、マウス胚において ZGA に特異的な *Zscan4* の発現が初期発生に必須の役割を果たすことが考えられる (Falco *et al.*, 2007)。以上のことから、*Zscan4* は細胞の機能性維持や ZGA における遺伝子発現などを制御することで胚発生に関与していることが考えられるが、ウシ胚における *ZSCAN4* の機能は不明である。

そこで本研究では、ウシ初期胚における *ZSCAN4* の機能解明を目的として、siRNA を用いた RNA 干渉法による *ZSCAN4* 発現抑制がウシ初期胚の発生におよぼす影響を検討した。さらに、*ZSCAN4* 発現抑制がウシ初期胚の ZGA 関連遺

伝子の発現、細胞周期、およびテロメア長におよぼす影響を検討した。

## 2. 材料および方法

### 1) 試薬

実験に用いた試薬は、第 2 章に準じた。

### 2) ウシ卵巢の採取および卵子の吸引採取

実験に供したウシ卵巢は、すべて食肉処理場に搬入屠殺された雌ウシより採取した。卵巢を採取した各個体の月齢、品種などは考慮せず卵巢疾患が疑われるものは除外した。採取した卵巢は抗生物質 [100 IU/ml ペニシリン G カリウム (明治製菓株式会社、東京、日本)、0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン (明治製菓株式会社)] を含む室温のリン酸緩衝生理食塩水 [0.96% ダルベッコ PBS (-) 粉末 (日水製薬株式会社、東京、日本) 水溶液] 中に浸漬して実験室に持ち帰った。卵子の採取には 18 G 注射針および 10 ml シリンジを使用し、室温の新生子牛血清 (CS; Thermo Fisher Scientific) 添加 mPBS [0.96% ダルベッコ PBS (-) 粉末、9  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、5  $\mu$ M  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、5.6 mM Glucose、0.3 mM Na-Pyruvate、100 IU/ml ペニシリン G カリウム、0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン] を 0.5–1.0 ml 吸引し、直径 2–8 mm の卵胞から卵胞液とともに COCs を吸引採取した。その後、実体顕微鏡下において、卵丘細胞が 3 層以上付着しており卵細胞質が変性していない COCs を選抜した。

### 3) IVM

選抜後の COCs の IVM にはウシ卵子用体外成熟培地 IVMD-101 (機能性ペプチド研究所、山形、日本) を用いた。ミネラルオイルで覆った IVMD-101 培地のドロップ (100  $\mu$ l) 内に COCs を 1 ドロップあたり 10 から 15 個入れ、39°C、5%

CO<sub>2</sub>、in air 条件下の CO<sub>2</sub> インキュベーターにおいて 22 時間の成熟培養を行った。

#### 4) IVF

IVF 用培地として IVF-100 (機能性ペプチド研究所) を用いた。IVF 培地を用いて遠心分離 (1,800 rpm、5 分) を 2 度繰り返した凍結融解精液の懸濁液を、あらかじめ作製した IVF-100 のドロップに添加し、計 100  $\mu$ l 媒精用ドロップを作製した。最終精子濃度は、 $5.0 \times 10^6$  精子/ml になるように調整した。IVM 後の COCs を媒精用ドロップに 1 ドロップあたり 15 個程度入れ、39°C、5% CO<sub>2</sub>、in air 条件下で 6 時間媒精を行った。媒精終了後、1% (v/v) CS 添加 mPBS 中で、ピペッティングにより受精卵の周囲に残る卵丘細胞および精子を除去し、細胞質が変性していないもののみをその後の実験に用いた。

#### 5) siRNA の注入および IVC

IVF 処理後の受精卵を IVC 培地である 0.1% (w/v) BSA を含む修正 TALP (mTALP) 培地 (Bavister *et al.*, 1983) [0.1 M NaCl, 4.02 mM KCl, 0.38 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.04 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 mM Na-Pyruvate, 1.11 mM Glucose, 2.14 mM Na-Lactate, 2% (v/v) BME amino acids, 1% (v/v) MEM non-essential amino acids, 100 IU/ml ペニシリン G カリウム, 0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン] に移した。siRNA の注入に先立ち、ウシ *ZSCAN4* 遺伝子の翻訳領域の配列をもとに *ZSCAN4* mRNA に特異的に作用する siRNA (*ZSCAN4*-siRNA) を設計した (Table 2)。*ZSCAN4*-siRNA の設計には、BLOCK-iT RNAi Designer (Thermo Fisher Scientific) を用いた。本研究では、*ZSCAN4* 発現抑制用の *ZSCAN4*-siRNA の注入を行う区

(ZSCAN4-siRNA 区)、いずれの遺伝子の発現抑制効果もない Control-siRNA [Allstars Negative Control siRNA (Qiagen, Düsseldorf, Germany)] の注入を行う区 (Control-siRNA 区)、さらに注入処理を行わない区 (Uninjected 区) を加えた計 3 区で実験を行った。以上 Control-siRNA 区および Uninjected 区を ZSCAN4-siRNA 区に対する対照区とした。siRNA の注入にはマイクロインジェクター (Femtojet®; Eppendorf, Hamburg, Germany) およびインジェクションピペット (Femtotip; Eppendorf) を用い、50  $\mu$ M の ZSCAN4-siRNA を約 10  $\mu$ l 細胞質に注入した。また、20  $\mu$ M の Control-siRNA 約 10  $\mu$ l も同様の方法で注入した。またこれら siRNA は注入直前に 10% (v/v) の 50  $\mu$ M Dextran-TRITC (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と混和して注入に用いた。siRNA の注入後、0.1% (w/v) BSA を含む mTALP 培地に胚を移し、39°C、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub> 条件下で 2 日間培養を行った。その後、蛍光顕微鏡下で TRITC シグナルを有する胚のみを選抜した (Fig. 3)。選抜した胚を 3% (v/v) CS を含む mTALP 培地に移し、さらに 5 日間培養を行った。なお、IVF を行った日を培養 0 日目 (Day 0) とし、Day 2、Day 3、Day 4、Day 5、Day 7 において胚の発生状況を実体顕微鏡下で観察した。

#### 6) RNA のサンプリング

Day 3 における 8 から 16-細胞期胚の透明帯を 1% PVP-PBS に 0.5% (w/v) Protease を添加した溶液で溶解・除去し、その後 1% PVP-PBS で胚の洗浄を行った。8 から 16-細胞期胚は 5 胚を 1 サンプルとして、5  $\mu$ l の溶解液 [0.8% (v/v) IGEPAL (MP Biomedicals, LCC, Santa Ana, CA, USA)、5 mM Dithiothreitol (Thermo Fisher Scientific)、1 U/ $\mu$ l RNasin (Promega Corp., Madison, WI, USA)、RNase free water (Qiagen)] が入ったチューブ内に移し、液体窒素を用

いて凍結、融解、攪拌を 4-5 回繰り返すことで細胞を粉砕し、RNA を抽出した。処理後のサンプルは、 $-80^{\circ}\text{C}$  のフリーザー内で保存した。

#### 7) RT

RNA サンプルの RT 反応は、PCR サーマルサイクラー (タカラバイオ株式会社、大津、日本) を用いて行った。また、RT 反応には QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を使用した。各 RNA サンプルを  $80^{\circ}\text{C}$  で 5 分間処理した後、gDNA wipeout buffer を  $2\ \mu\text{l}$ 、RNase free water を  $8\ \mu\text{l}$  ずつ添加し、 $42^{\circ}\text{C}$  で 2 分間処理した。その後、各サンプルに RT 酵素を  $1\ \mu\text{l}$ 、RT buffer を  $5\ \mu\text{l}$  ずつ添加し、 $42^{\circ}\text{C}$  で 30 分間処理することで cDNA を合成した。最後に  $95^{\circ}\text{C}$  で 3 分間処理することで RT 酵素を失活させた。RT 反応後、各 cDNA サンプルは解析に用いるまで  $-30^{\circ}\text{C}$  のフリーザー内で保存した。

#### 8) リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は StepOne™ Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用い、PCR 産物の検出は SYBR Green PCR Master Mix Kit (Qiagen) により行った。 $18\ \mu\text{l}$  の反応液 [2X Master mix  $10\ \mu\text{l}$ 、Forward および Reverse Primer (Table 1, 2) 各  $1\ \mu\text{l}$ 、RNase free water  $6\ \mu\text{l}$ ] に各 cDNA サンプル  $2\ \mu\text{l}$  を添加し、 $95^{\circ}\text{C}$  で 15 分間処理することにより HotStarTaq DNA Polymerase を活性化した。その後、 $94^{\circ}\text{C}$  で 15 秒、 $58-60^{\circ}\text{C}$  (Table 1, 2) で 30 秒、 $72^{\circ}\text{C}$  30 秒の反応を 45 サイクル行うことで cDNA の増幅および蛍光度の測定を行った。その後、増幅した PCR 産物の融解曲線を作成することにより、得られた PCR 産物の特異性を確認した。

mRNA 発現量は、標準曲線との比較により定量化した。各遺伝子の PCR 産物

を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製し、NanoDrop (ND-1000; Thermo Fisher Scientific) を用いて 260 nm の吸光度を測定すること各精製物の濃度を測定した後、濃度が 10 ng/μl になるように T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> Buffer で希釈した。調整した各精製物を T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> Buffer で 10 倍ずつ段階希釈することで標準サンプル (10<sup>-5</sup>–10<sup>-12</sup> ng/μl) を作製した。標準サンプルはリアルタイム PCR を行う際に、その都度作製し、cDNA サンプルと共に増幅した。SYBR Green の蛍光度の測定はすべての増幅サイクルで行った。mRNA 発現量の定量化は、StepOne™ quantification software (Thermo Fisher Scientific) を用いて行い、各遺伝子の mRNA 発現量の比較には同一サンプルの *Histone H2A* 発現量で補正した値を用いた。

## 9) 細胞周期の解析

Day 4 において 8-細胞期以上に発生した胚を 1% PVP-PBS に 0.5% (w/v) Protease を添加した溶液に移して透明帯を溶解・除去し、その後 1% PVP-PBS で胚の洗浄を行った。洗浄後の胚をピペッティング操作により、すべての割球を分離した。分離した割球をスライドガラス上に作成した 1 μl の VECTASHILD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) の微小滴上に移し、5×5 mm カバーガラスで覆った。スライド作成後、蛍光顕微鏡を用いて UV 励起による DAPI の蛍光を撮影し、得られた画像は画像解析ソフトウェア ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) を用いて以下の画像処理を行った。すべての画像は 8 bit 変換したのち、Threshold (閾値) を設定した。その後、Analyze Particles (粒子解析) により、DAPI による核の染色強度の平均値を数値化した。得られた値のうち最小値を 1、最大値を 1024 となるよう変換し DAPI intensity を算出した。階級ごとの DAPI intensity の出現頻度 (Frequency) をもとにヒス

トグラムを作成した。本研究では、階級値 0 以上 400 未満を G0/G1 期、400 以上 800 未満を S 期、そして 800 以上を G2/M 期と規定した。実験は 3 回繰り返して、計 64 胚 (Uninjected 区)、67 胚 (Control-siRNA 区)、63 胚 (ZSCAN4-siRNA 区) を解析に供した。

#### 10) テロメア長の解析

テロメア長の解析は、Cawthon ら (2009) に従って行った。Day 3 における 8 から 16-細胞期胚 (Day 3) を 1% PVP-PBS で洗浄し、10 胚 1 サンプルとしてチューブ内に移した。その後、液体窒素を用いて瞬間凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$  のフリーザー内で保存した。凍結保存したサンプルは DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA サンプルは NanoDrop を用いて 260 nm の吸光度を測定すること各抽出物の濃度を測定した後、濃度が  $2\text{ ng}/\mu\text{l}$  になるように  $\text{T}_{10}\text{E}_1$  Buffer で希釈した。希釈後の各サンプルは  $90^{\circ}\text{C}$  で 5 分間処理したのち  $-30^{\circ}\text{C}$  のフリーザー内で保存した。

リアルタイム PCR は StepOne™ Real-Time PCR を用い、PCR 産物の検出は SYBR Green PCR Master Mix Kit により行った。テロメア特異的プライマーもしくはシングルコピー遺伝子 *ZAR1* 特異的プライマーを用い、 $12\ \mu\text{l}$  の反応液 [2X Master mix  $10\ \mu\text{l}$ 、Forward および Reverse Primer 各  $1\ \mu\text{l}$ ] に各 DNA サンプル  $8\ \mu\text{l}$  を添加し、増幅および特異性の確認を行った。反応後、各サンプルのテロメア配列および *ZAR1* 遺伝子における Ct 値を StepOne™ quantification software を用いて算出した。各サンプルにおけるテロメア長は、同一サンプルのテロメア配列の増幅における Ct 値 (T) を *ZAR1* 遺伝子の増幅における Ct 値 (S) で補正することにより、T/S 割合として算出した。

## 11) 統計解析

得られたデータの統計解析は、Statcel2 および StatView を用いて行った。胚発生率に関しては Arc-sin 変換を行った数値を用いて検定を行った。胚発生率および mRNA 発現量については、Bartlett 検定を用いて分散の均一性を確認した。Uninjected 区、Control-siRNA 区、および ZSCAN4-siRNA 区における mRNA 発現量、およびテロメア長の比較については、Kruskal-Wallis 検定を行い、その後 Scheffé 法を用いて多群間の有意差検定を行った。胚発生率は Fisher の PLSD 法により 3 群間の有意差検定を行った。

### 3. 結 果

#### 1) siRNA 注入による *ZSCAN4* mRNA 発現抑制効果の検証

Uninjected 区、Control-siRNA 区および *ZSCAN4*-siRNA 区における 8 から 16-細胞期胚 (Day 3) の *ZSCAN4* mRNA 発現量を Fig. 4 に示した。*ZSCAN4*-siRNA 区における *ZSCAN4* mRNA 発現量は、Uninjected 区および Control-siRNA 区と比較して有意 ( $P < 0.01$ ) に低い値を示した。

#### 2) *ZSCAN4* 発現抑制がウシ胚の発生におよぼす影響

*ZSCAN4* の発現抑制を行ったウシ IVF 胚の分割率 (Day 2)、8 および 16-細胞期以上 (Day 3)、16 および 32-細胞期以上 (Day 4)、桑実期以上 (Day 5)、および胚盤胞期 (Day 7) への発生率を Table 3 に示した。これら分割率および発生率は、培養胚数に対する割合で示した。また、Day 4、5 および 7 の各処理区における胚発生の様子を Fig. 5 に示した。Uninjected 区、Control-siRNA 区、*ZSCAN4*-siRNA 区における分割率 (80.1–82.4%) および Day 3 における 8-細胞期以上への発生率 (72.3–77.5%) は、異なる処理区間に有意な差は認められなかった。Day 3 における 16-細胞期以上への発生率は、Uninjected 区 (34.6%) と比較して *ZSCAN4*-siRNA 区 (13.5%) において有意 ( $P < 0.05$ ) に低い値を示した。Day 4 における 16 および 32-細胞期以上、Day 5 における桑実期以上、さらに Day 7 における胚盤胞期への発生率は、Uninjected 区 (64.4%、52.9%、40.3% および 45.0%) および Control-siRNA 区 (59.7%、45.5%、36.9% および 46.0%) と比較して *ZSCAN4*-siRNA 区 (40.5%、2.0%、3.4% および 2.7%) で有意 ( $P < 0.05$ ) に低い値を示した。

### 3) *ZSCAN4* 発現抑制が ZGA 関連遺伝子発現におよぼす影響

Uninjected 区、Control-siRNA 区および *ZSCAN4*-siRNA 区における 8 から 16-細胞期での *Eukaryotic translation initiation factor 1a (EIF1AX)* 遺伝子の mRNA 発現量を Fig. 6 に示した。*EIF1AX* の mRNA 発現量において、異なる処理区間に有意な差は認められなかった。

### 4) *ZSCAN4* 発現抑制が細胞周期におよぼす影響

Uninjected 区、Control-siRNA 区および *ZSCAN4*-siRNA 区における 8-細胞期以上に発生した胚 (Day 4) での細胞周期を解析した結果を Fig. 7 に示した。G0/G1 期の割合、S 期の割合および G2/M 期の割合は Uninjected 区において 17.8%、55.0%および 27.2%、Control-siRNA 区において 16.1%、55.7%および 28.2%、*ZSCAN4*-siRNA 区において 9.6%、59.6%および 30.8%であった。S 期および G2/M 期の割合に各処理区間での差は認められなかったが、G0/G1 期の割合は *ZSCAN4*-siRNA 区において低い値を示した。

### 5) *ZSCAN4* 発現抑制がテロメア長におよぼす影響

Uninjected 区、Control-siRNA 区および *ZSCAN4*-siRNA 区における 8 から 16-細胞期胚 (Day 3) でのテロメア長を Fig. 8 に示した。テロメア長 (T/S) に関して、異なる処理区間で有意な差は認められなかった。

Table 2. Primers and siRNA sequences

Name	Nucleotide sequences (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)	Genbank accession no.
<i>EIF1AX</i>	F- TTCAAAAGAGGATGGGCAGGAGTATG	53	287	NM_001412.1
	R- GGACCACAAAATGTATCAGTTTCATTGA			
<i>Telomere</i>	F-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTG	62	N/A	N/A
	GGTTAGTGT			
<i>ZARI</i>	R-TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCT	60	108	NM_001076203.1
	ATCCCTAACA			
<i>Histone H2A</i>	F- AAGTGCCTATGTGTGGTGTG	60	208	NM_174809
	R- CAGGTGATATCCTCCACTCG			
ZSCAN4-siRNA	F- AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG	N/A	N/A	N/A
	R- CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG			
	S- GCAUGUAUCCUGGCCAUUTT	N/A	N/A	N/A
	AS- AUGGAGCCAGGAUACAUGCTT			

F, forward; R, reverse; S, sense; AS, antisense strand.

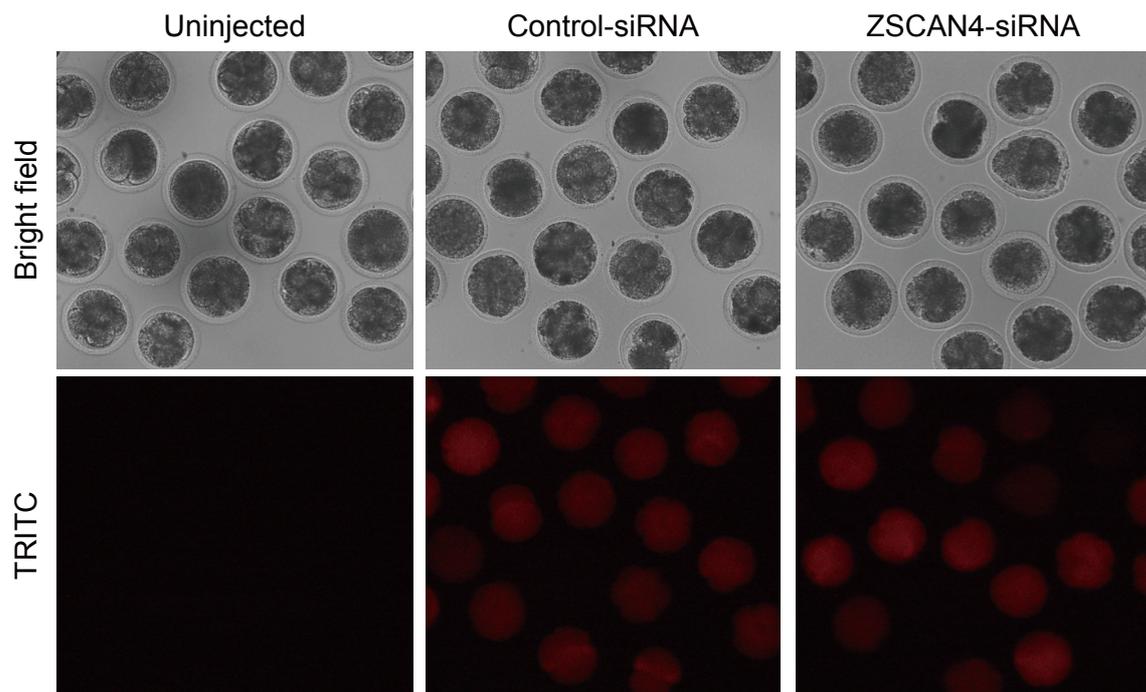


Fig. 3. Representative photographs of siRNA and Dextran-TRITC co-injected bovine embryos. Only the embryos which have TRITC signals were collected on Day 2 and used for following experiments.

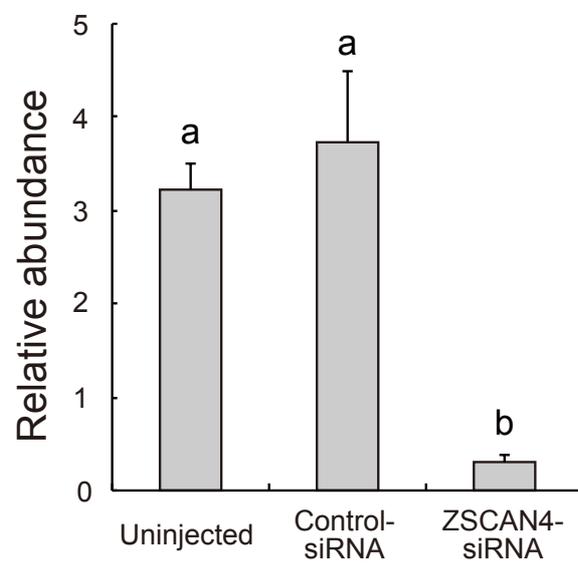


Fig. 4. Transcript abundance (mean  $\pm$  SEM) of *ZSCAN4* genes in bovine 8~16-cell stage embryos obtained from Uninjected, Control-siRNA or ZSCAN4-siRNA injection (n = 6). Data were normalized to abundance of *Histone H2A* mRNA. <sup>a, b</sup> Values with different superscripts within each column differ significantly (P < 0.01).

Table 3. Effect of ZSCAN4-siRNA injection on *in vitro* development of bovine embryos\*

Treatment	Number of embryos cultured	No. (%) <sup>†</sup> of embryos develop to						
		Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 7		
		2-cell ≤	8-cell ≤	16-cell ≤	32-cell ≤	Morula ≤	Blastocyst	
Uninjected	191	153 (80.1)	148 (77.5)	66 (34.6) <sup>a</sup>	123 (64.4) <sup>a</sup>	101 (52.9) <sup>a</sup>	77 (40.3) <sup>a</sup>	86 (45.0) <sup>a</sup>
Control-siRNA	176	142 (80.7)	129 (73.3)	55 (31.3) <sup>ab</sup>	105 (59.7) <sup>a</sup>	80 (45.5) <sup>a</sup>	65 (36.9) <sup>a</sup>	81 (46.0) <sup>a</sup>
ZSCAN4-siRNA	148	122 (82.4)	107 (72.3)	20 (13.5) <sup>b</sup>	60 (40.5) <sup>b</sup>	3 (2.0) <sup>b</sup>	5 (3.4) <sup>b</sup>	4 (2.7) <sup>b</sup>

\* Experiments were replicated five times.

<sup>†</sup> Percentages of the number of embryos cultured.

<sup>a, b</sup> Values with different superscripts within each column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

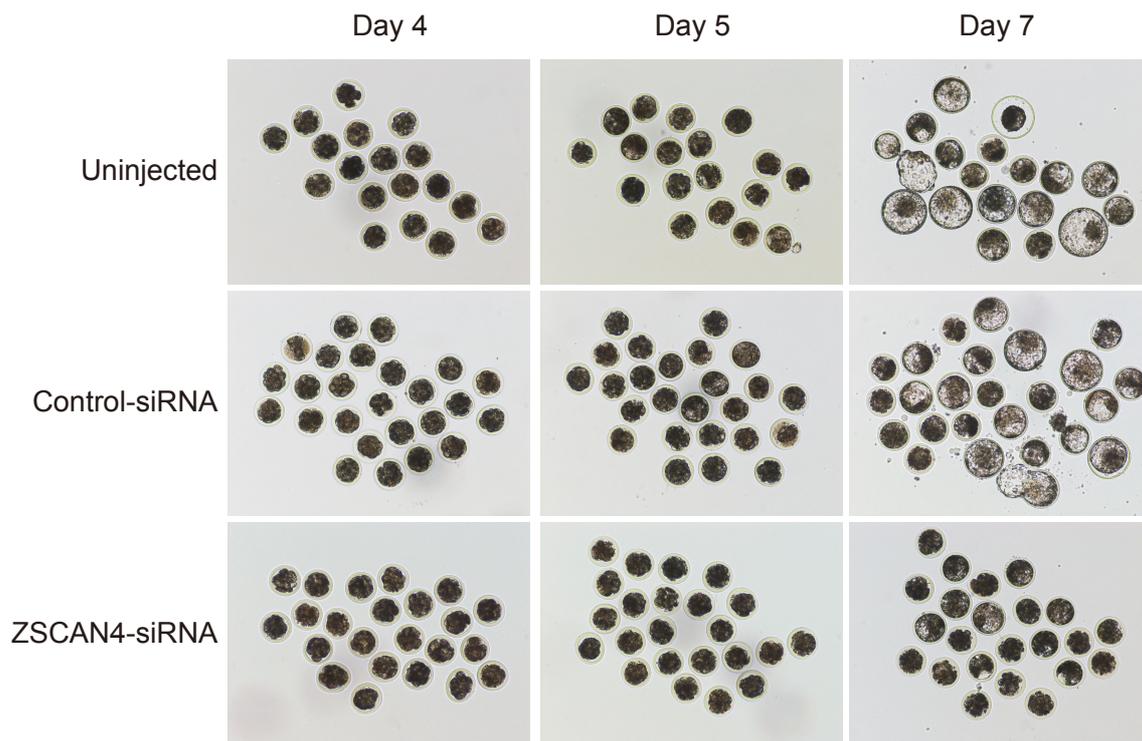


Fig. 5. Representative photographs showing the developmental morphology of bovine embryos obtained from Uninjected, Control-siRNA or ZSCAN4-siRNA injection.

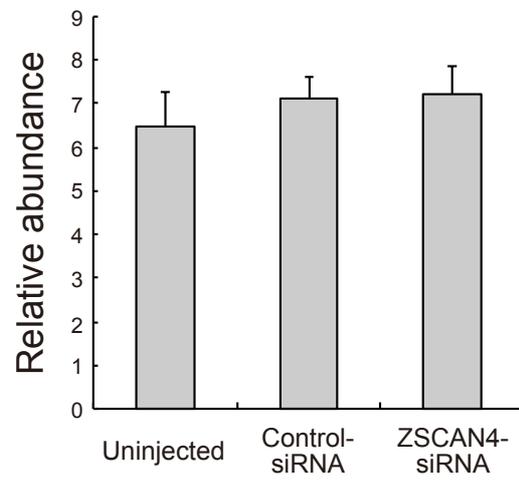


Fig. 6. Relative abundance (mean  $\pm$  SEM) of *EIF1AX* transcripts in bovine 8~16-cell stage embryos obtained from Uninjected, Control-siRNA or ZSCAN4-siRNA injection (n = 6). Data were normalized to abundance of *Histone H2A* mRNA.

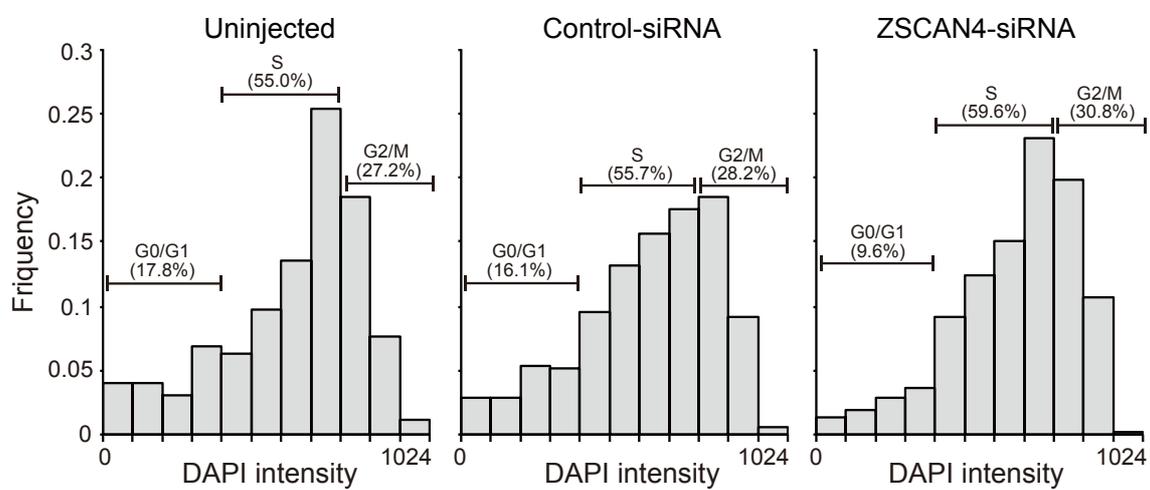


Fig. 7. Cell cycle stage analysis on bovine embryos obtained from Uninjected, Control-siRNA or ZSCAN4-siRNA injection. Experiments were replicated three times.

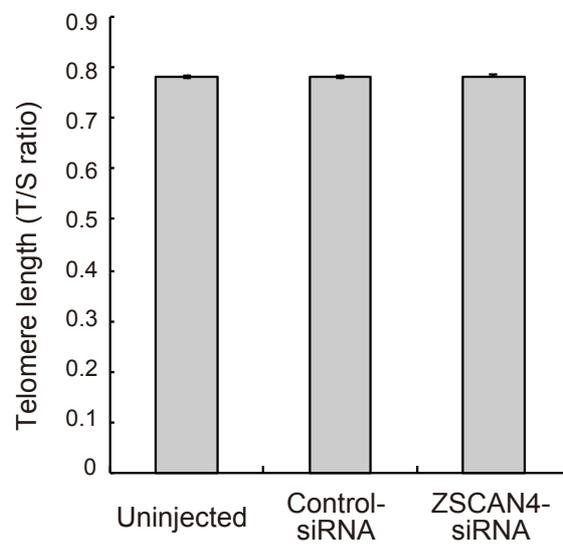


Fig. 8. Telomere length (T/S ratio) in bovine 8~16-cell stage embryos obtained from Uninjected, Control-siRNA or ZSCAN4-siRNA injection (n = 5). Experiments were replicated three times.

#### 4. 考 察

本章ではウシ胚の初期発生における *ZSCAN4* の機能を検討するため、RNA 干渉法を用いた *ZSCAN4* 発現の抑制を行った。本研究では、*ZSCAN4*-siRNA の注入を行った胚においては 8 から 16-細胞期での *ZSCAN4* mRNA 発現量が対象区と比較して有意に減少しており、siRNA 注入による *ZSCAN4* 発現が抑制されていることが示された。本研究において、*ZSCAN4* 発現を抑制したウシ胚では Uninjected 区および Control-siRNA 区と同等の 8-細胞期への発生率が認められた。しかしながら、*ZSCAN4*-siRNA 区においては、Day 4 の 16-細胞期以降への発生が阻害され、Day 7 の胚盤胞期への発生率は極めて低い値を示した。マウスでは、siRNA を用いて *Zscan4* 発現抑制を行った胚においても胚盤胞期への発生を示すが、それら胚盤胞期胚は拡張や着床の不全を起こす (Falco *et al.*, 2007)。ウシ *ZSCAN4* 発現抑制胚において、マウス胚とは異なり胚盤胞期への発生が認められない要因は明らかではないが、マウスと同様にウシ胚においても *ZSCAN4* の発現抑制により胚発生の阻害が認められたことから、*ZSCAN4* は幅広い動物種において初期胚発生に重要な機能をもつ可能性が示された。

第 2 章の結果より、*ZSCAN4* はウシ胚において ZGA の時期に発現上昇を示すことから、*ZSCAN4* 発現抑制胚における 16-細胞期以降への発生阻害は、ZGA の異常に起因する可能性がある。そこで本研究では *ZSCAN4* 発現抑制胚において ZGA が正常に起こっているかどうかの検討を試みた。*EIF1AX* はマウスとウシ胚において ZGA 後に発現が高まることが報告されている (De Sousa *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 1996)。また、*Eif1a* は *Zscan4* が発現しているマウス ES 細胞において高い発現を示す (Amano *et al.*, 2013)。さらに、*Eif1a* は *Zscan4* を用いて作出されたマウス iPS 細胞においても、通常の方法を用いて作出された iPS 細胞と

比較して極めて高い発現を示す (Hirata *et al.*, 2012)。そこで本研究では、ウシにおいて *ZSCAN4* 発現抑制胚での *EIF1AX* の発現を調べ、*ZSCAN4* が *ZGA* を制御する可能性を検討した。その結果、*ZSCAN4* の発現抑制を行なったウシ胚における *EIF1AX* 発現量は対象区との間に差が認められなかった。このことから、*ZSCAN4* 発現を抑制したウシ胚においても *ZGA* が正常に起こっていることが示唆される。しかし、本研究では *EIF1AX* のみを *ZGA* マーカーとして用いていることから、今後さらに RNA-seq などによる網羅的な遺伝子発現解析を行うなどの方法により *ZSCAN4* と *ZGA* の関連性をさらに検討することが必要である。また、ウシ胚においては *ZSCAN4* 発現量が低い胚においても *EIF1AX* 発現量が低下しなかったことから、マウスの幹細胞とウシ胚では *ZSCAN4* 発現と *EIF1AX* 発現の関係が異なることも示された。

マウス ES 細胞では、short hairpin RNA (shRNA) を用いて *Zscan4* の発現を抑制すると細胞分裂の停止が起こり、アポトーシスによる細胞死が起こることが明らかにされている (Zalzman *et al.*, 2010)。また、*Zscan4* の発現を示したマウス ES 細胞では細胞周期の短縮およびテロメア長の伸長が認められる (Zalzman *et al.*, 2010; Nakai-Futatsugi and Niwa, 2016)。そこで本研究では、*ZSCAN4* がウシ胚の細胞周期制御に関わるかを明らかにするため、*ZSCAN4* 発現抑制胚の細胞周期を調べた。通常、体細胞や ES 細胞における細胞周期の解析にはフローサイトメーターが用いられているが、フローサイトメーターを用いた解析には  $10^5$ - $10^6$  細胞を必要とするため、初期胚を対象として行うことは困難である。そこで本研究では、DAPI による核染色と蛍光顕微鏡での撮影を組み合わせた簡便な方法を開発し、細胞数の少ない初期胚での細胞周期の解析を行った。その結果、S 期、G2/M の割合は各処理区間で同程度の割合が認められたが、*ZSCAN4* 発現抑制胚においては G0/G1 期と判定した細胞数が対象区と比較して

低い割合を示した。Nakai-Futatsugi ら (2016) は、Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) を導入したマウス ES 細胞を作出し、それら細胞の細胞周期に応じて発する蛍光をライブイメージングにより観察することで単一細胞レベルでの *Zscan4* 発現と細胞周期の関連を検証している。その結果、G2/M 期の延長が見られる細胞周期の長い細胞において *Zscan4* が発現し、その次の周期が短くなることが明らかとなった。細胞周期における G2 期は DNA 修復が行われる時期であり、このことからマウス ES 細胞では *Zscan4* が DNA 修復に関与している可能性がある (Nakai-Futatsugi and Niwa, 2016)。実際にマウス ES 細胞においては、*Zscan4* 発現がヘテロクロマチンの凝集を誘導し、DNA 修復が促進されることが報告されている (Akiyama *et al.*, 2015)。本研究においてはウシ *ZSCAN4* 発現抑制胚における G2/M 期の細胞数に変化は見られなかった。しかしながら、本研究で用いた細胞周期の解析方法は我々が新規に開発したものであり、当該方法の妥当性を含めて他の方法を用いた結果の再現性の確認が求められる。今後 *ZSCAN4* 発現抑制胚において細胞増殖マーカー Ki67 染色を用いた染色や BrdU もしくは EdU を用いて細胞周期を詳細に検討することで *ZSCAN4* と細胞周期、および DNA 修復との関連性が明らかになると期待される。

マウス ES 細胞において *Zscan4* はテロメラーゼ非依存的なテロメアの伸長を促進する (Zalzman *et al.*, 2010)。マウス初期胚では 2-細胞期にテロメア姉妹染色分体交換により急速なテロメアの伸長が起こる (Liu *et al.*, 2007)。またヒト胚およびウシ胚では 8-細胞期から胚盤胞期にかけてテロメアの伸長が起こる (Turner *et al.*, 2010; Gilchrist *et al.*, 2015)。これらの時期は *Zscan4* 発現の時期と重なることから、本研究ではウシ胚におけるテロメア伸長と *ZSCAN4* の関係を明らかにするため、*ZSCAN4* 発現抑制胚におけるテロメア長を検討した。しかしながら、*ZSCAN4* 発現の有無によるテロメア長に差は認められなかったことか

ら、*ZSCAN4* はウシ胚においてテロメアの伸長に関与しない可能性が示された。一方、本研究ではテロメア長の解析はリアルタイム PCR を用いた解析にとどまっている。今後、Q-FISH (quantitative fluorescent in situ hybridization) などを用いた細胞個々のテロメア長の測定などさらなる解析が必要である。

本研究結果から、ウシ胚において *ZSCAN4* は ZGA 後の発生に必須の因子であることが明らかとなった。さらに、*ZSCAN4* の発現がウシ胚発生における細胞周期に影響をおよぼす可能性が示された。しかしながら、ウシ初期胚において *ZSCAN4* は ZGA の制御に関与しているかなど、*ZSCAN4* の機能について明らかにすることができなかった。そこで次章ではウシ初期胚における *ZSCAN4* の役割を明らかにするため、初期胚の発生に重要な要因となるエピゲノム制御因子に着目して検討を行った。

## 5. 要 約

マウス胚では、*Zscan4* 発現を抑制することで 2 から 4-細胞期での胚発生の遅延と胚盤胞期での機能不全が起こる (Falco *et al.*, 2007)。本研究では、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 注入の成否は siRNA と同時に注入した Dextran-TRITC の蛍光をもとに評価した。siRNA による ZSCAN4 の発現抑制効果は、8 から 16-細胞期 (Day 3) 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および Day 3 の 8 から 16-細胞期胚における *EIF1AX* 発現、Day 4 の 8-細胞期以上の胚の細胞周期、および Day 3 の 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 (Day 3) 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 (Day 4)、桑実期以上 (Day 5)、さらに胚盤胞期 (Day 7) 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。

本研究の結果から、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。

## 第 4 章

*ZSCAN4* 発現抑制がウシ初期胚におけるエピゲノム制御因子および  
iPS 細胞関連遺伝子の発現におよぼす影響

## 1. 緒 言

第 1 章でも述べたように、多くの動物種において SCNT 胚の発生率は低く、SCNT 胚移植後の産子生産率も依然として低い。マウス SCNT 胚では、2-細胞期における遺伝子発現が異常を示すことから、SCNT 胚では ZGA が正常に起こっていない可能性がある (Suzuki *et al.*, 2006)。SCNT で作出されたウシ胚盤胞期胚においては、*Histone Deacetylase 1 (HDAC1)* の異常な高発現が報告されており (Ma *et al.*, 2015)、SCNT 胚においてはヒストン脱アセチル化割合が高い (Sawai *et al.*, 2012)。一方、ウシにおいては SCNT 胚をヒストン脱アセチル化阻害剤である Trichostatin A (TSA) で処理することにより、胚発生率が向上することが明らかになっている (Sawai *et al.*, 2012)。また、ブタ SCNT 胚においても 2-細胞期において *HDAC1* の異常な高発現が見られるが、ヒストン脱アセチル化阻害剤である Sodium Butyrate (NaB) を用いることで、IVF 胚と同程度まで改善され、胚発生率が向上する (Liu *et al.*, 2012)。このように、TSA や NaB は SCNT 胚においてエピゲノムの正常化および発生率の向上に寄与するが、SCNT 胚におけるドナー細胞核のリプログラミングを制御する因子やその機構は未だ明らかとなっていない。また、SCNT 胚の作出と同様に大規模なエピゲノムの変化を伴う現象として、iPS 細胞の樹立の際の体細胞核のリプログラミングが挙げられる。ヒト iPS 細胞の作出においては、NaB を用いることで iPS 細胞の作出効率が向上することが報告されており (Zhang and Wu, 2013)、SCNT 胚の作出および iPS 細胞の樹立における体細胞核のリプログラミングには共通の機構が存在する可能性がある。

*Oct-4*, *Sox2*, *Myc* および *Klf4* を用いた通常の iPS 細胞の樹立においては 8-10 日間継続して、これら 4 つの因子の発現が必要となる (Wernig *et al.*, 2008;

Sridharan *et al.*, 2009)。一方、*Myc*の代わりに *Zscan4*を培養最初の数日に発現させることにより iPS 細胞の樹立効率が高まる (Hirata *et al.*, 2012)。このことは、*Zscan4* が体細胞核のリプログラミングを制御する因子である可能性を示すが、その機序については明らかではない。上記したように、体細胞核のリプログラミングにはヒストン脱アセチル化などエピゲノム制御機構が密接に関与していることが考えられ、*ZSCAN4* もそれら機構を介して細胞核のリプログラミングに関与している可能性がある。また、*Zscan4* の導入により樹立されたマウス iPS 細胞では、*Dppa2* および *Piwil2* 遺伝子発現が上昇する (Hirata *et al.*, 2012)。このことから、*ZSCAN4* はエピゲノム制御因子の他にこれら iPS 細胞の樹立に関連する因子を介して細胞核のリプログラミングに作用している可能性がある。

マウス ES 細胞において、*Hdac1* と Lysine-specific Demethylase 1a (*Lsd1/Kdm1a*) は複合体を形成し、エピゲノムの制御および多能性の維持にはたらく (Yin *et al.*, 2014)。また、*Zscan4* は *Dnmt1* の分解を制御することで、マウス ES 細胞における DNA を低メチル化状態に保つ働きを持つことが知られている (Eckersley-Maslin *et al.*, 2016; Dan *et al.*, 2015)。

以上の背景から、*ZSCAN4* は *HDAC1* や *KDM1A*、さらに *DNMT1* といったエピゲノム制御因子、さらには *DPPA2* や *PIWIL2* など iPS 細胞樹立に関連する因子との相互作用によって細胞核のリプログラミングを制御している可能性がある。そこで本章では、*ZSCAN4* 発現を抑制したウシ胚におけるエピゲノム関連因子の遺伝子発現および iPS 細胞の樹立に関連する遺伝子の発現を検討することで、ウシ初期胚における *ZSCAN4* の機能解明を試みた。

## 2. 材料および方法

### 1) 試薬

実験に用いた試薬は、第 2 章に準じた。

### 2) ウシ卵巢の採取および卵子の吸引採取

ウシ卵巢の採取および卵子の吸引採取は、第 3 章に記述した方法に準じて行なった。

### 3) IVM

ウシ卵子の IVM は、第 3 章に記述した方法に準じて行なった。

### 4) IVF

ウシ卵子の IVF は、第 3 章に記述した方法に準じて行なった。

### 5) siRNA の注入および IVC

siRNA の注入および IVC は、第 3 章に記述した方法に準じて行なった。

### 6) RNA のサンプリング

RNA のサンプリングは、第 3 章に記述した方法に準じて行なった。

### 7) RT

RNA サンプルの RT 反応は、第 3 章に記述した方法に準じて行なった。

#### 8) リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は、第 3 章に記述した方法に準じて行なった。各遺伝子のプライマー配列は Table 4 に記した。

#### 9) 統計解析

統計解析は、第 3 章に記述した方法に準じて行なった。

### 3. 結 果

#### 1) *ZSCAN4* 発現抑制がヒストン脱アセチル化関連遺伝子発現におよぼす影響

Uninjected 区、Control-siRNA 区および *ZSCAN4*-siRNA 区における 2-細胞期胚、4-細胞期胚、8-細胞期胚および 16-細胞期胚でのヒストン脱アセチル化酵素 *HDAC1* 遺伝子の mRNA 発現量を Fig. 9 に示した。*HDAC1* mRNA 発現量は 2-細胞期胚において、Uninjected 区と比較して *ZSCAN4*-siRNA 区において高い傾向 ( $P = 0.0713$ ) が認められ、さらに 4-細胞期では Uninjected 区と比較して *ZSCAN4*-siRNA 区において有意 ( $P < 0.05$ ) に高い発現を示した (Fig. 9A, B)。8-細胞期および 16-細胞期における *HDAC1* 発現量は、いずれにおいても異なる処理区間に有意な差は認められなかった (Fig. 9C, D)。

#### 2) *ZSCAN4* 発現抑制がヒストン脱メチル化関連遺伝子発現におよぼす影響

Uninjected 区、Control-siRNA 区および *ZSCAN4*-siRNA 区における 2-細胞期胚、4-細胞期胚、8-細胞期胚および 16-細胞期胚でのヒストン脱メチル化酵素 *KDM1A* 遺伝子の mRNA 発現量を Fig. 10 に示した。*KDM1A* 発現量は 2、4、8、16-細胞期のすべての発生段階において異なる処理区間に有意な差は認められなかった (Fig. 10)。

#### 3) *ZSCAN4* 発現抑制が DNA メチル化関連遺伝子発現におよぼす影響

Uninjected 区、Control-siRNA 区および *ZSCAN4*-siRNA 区における 8 から 16-細胞期 (Day 3) での DNA メチル基転移酵素 *DNMT1* 遺伝子の mRNA 発現量を Fig. 11 に示した。*DNMT1* 発現量は、*ZSCAN4*-siRNA 区において Control-siRNA 区と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に低い値を示したが、

ZSCAN4-siRNA 区と Uninjected 区との間に有意な差は認められなかった (Fig. 11)。

#### 4) ZSCAN4 発現抑制が iPS 細胞関連遺伝子発現におよぼす影響

Uninjected 区、Control-siRNA 区および ZSCAN4-siRNA 区における 8 から 16-細胞期 (Day 3) での iPS 細胞関連遺伝子 *DPPA2* および *PIWIL2* の mRNA 発現量を Fig. 12 に示した。*DPPA2* 発現量においては、異なる処理区間に有意な差は認められなかった (Fig. 12A)。*PIWIL2* 発現は、ZSCAN4-siRNA 区において Uninjected 区および Control-siRNA 区と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に低い値を示し、Control-siRNA 区においても Uninjected 区と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に低い値を示した (Fig. 12B)。

#### 5) ZSCAN4 発現抑制がウシ内在性レトロトランスポゾン関連遺伝子発現におよぼす影響

Uninjected 区、Control-siRNA 区および ZSCAN4-siRNA 区における 8 から 16-細胞期 (Day 3) でのウシ内在性レトロトランスポゾン関連遺伝子 Bovine endogenous retrovirus k1 (*BERVK1*) および *BERVK2* の mRNA 発現量を Fig. 13 に示した。*BERVK1* 発現量は ZSCAN4-siRNA 区において Uninjected 区と比較して有意に ( $P < 0.05$ ) に低い値を示した (Fig. 13A)。一方、*BERVK2* 発現は Control-siRNA 区において Uninjected 区と比較して有意に ( $P < 0.05$ ) に高い値を示したが、ZSCAN4-siRNA 区においては他の処理区との間に有意な差は認められなかった (Fig. 13B)。

Table 4. Primers sequences

Name	Nucleotide sequences (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)	Genbank accession no.
<i>HDAC1</i>	F- ACTATTACGACGGGATGTTG	58	439	NM_001037444.2
	R- GCCAAGACGATATCATTTGACG			
<i>KDMI1A</i>	F- ACATTGCAGTTGTGGTTGGA	60	216	XM_005203319.1
	R- GACCCCCAGAGCCTATGATGA			
<i>DNMT1</i>	F- TGACTCCACCTACGAAAGACC	60	127	NM_182651.2
	R- TCTCTACTTGCTCCACCACG			
<i>DPPA2</i>	F- CAGACCACTCTTGGCAGACA	60	163	NM_001206470.1
	R- GCATTCAGGGCATAACAGGT			
<i>PIWIL2</i>	F- AGGCCAAGTGAGAGACAGAA	60	235	XM_010798716.1
	R- CCCAACGGTGTTCAGTTCAATTG			
<i>BERVK1</i>	F- GGAAATCACCCGGATGTCCT	60	185	AB587259
	R- GGAGAGGAGGGCCTTACCTG			
<i>BERVK2</i>	F- AAAGGAGGTCAGGCCGCCTG	60	186	AB587260
	R- TGGGGAGGAGGCCGCTTACCT			

F, forward; R, reverse strand.

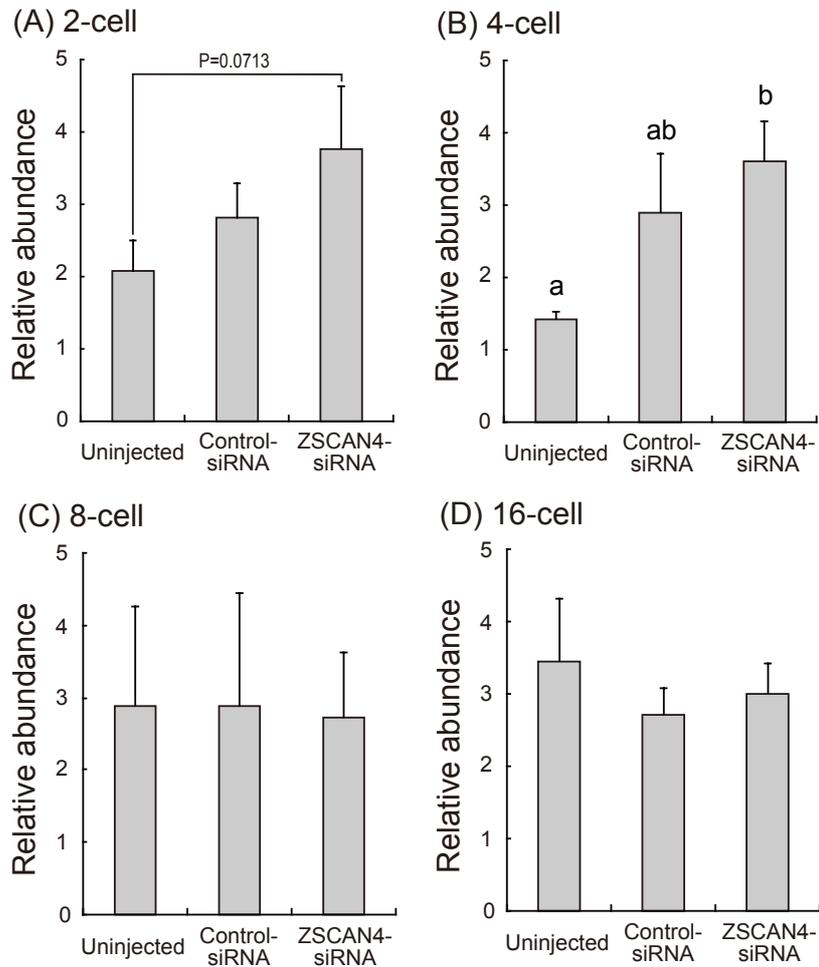


Fig. 9. Relative abundance (mean  $\pm$  SEM) of *HDAC1* transcripts in bovine (A) 2-cell, (B) 4-cell, (C) 8-cell, and (D) 16-cell stage embryos obtained from Uninjected, Control-siRNA or ZSCAN4-siRNA injection (n = 6). The relative abundance represents the normalized quantity compared to the *Histone H2A*. <sup>a, b</sup> Values with different superscripts within each column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

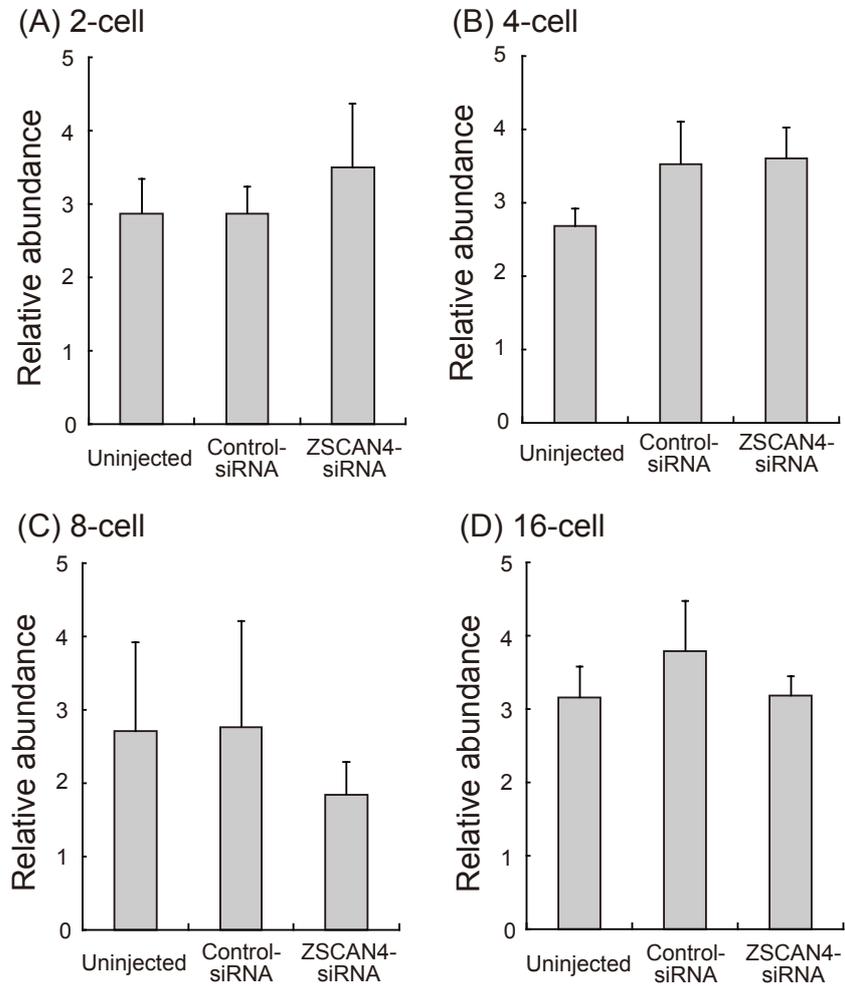


Fig. 10. Relative abundance (mean  $\pm$  SEM) of *KDM1A* transcripts in bovine (A) 2-cell, (B) 4-cell, (C) 8-cell, and (D) 16-cell stage embryos obtained from Uninjected, Control-siRNA or ZSCAN4-siRNA injection (n = 6). The relative abundance represents the normalized quantity compared to the *Histone H2A*.

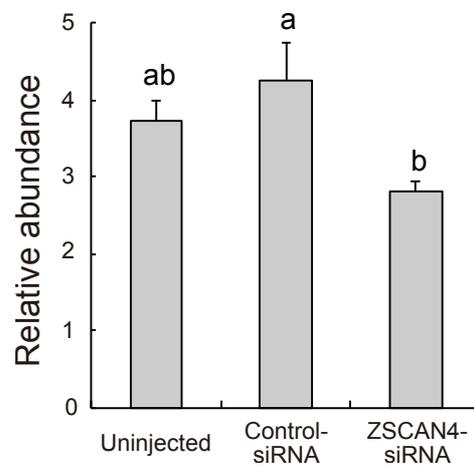


Fig. 11. Relative abundance (mean  $\pm$  SEM) of *DNMT1* transcripts in bovine 8~16-cell stage embryos obtained from Uninjected, Control-siRNA or ZSCAN4-siRNA injection (n = 6). Data were normalized to abundance of *Histone H2A* mRNA. <sup>a, b</sup> Values with different superscripts within each column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

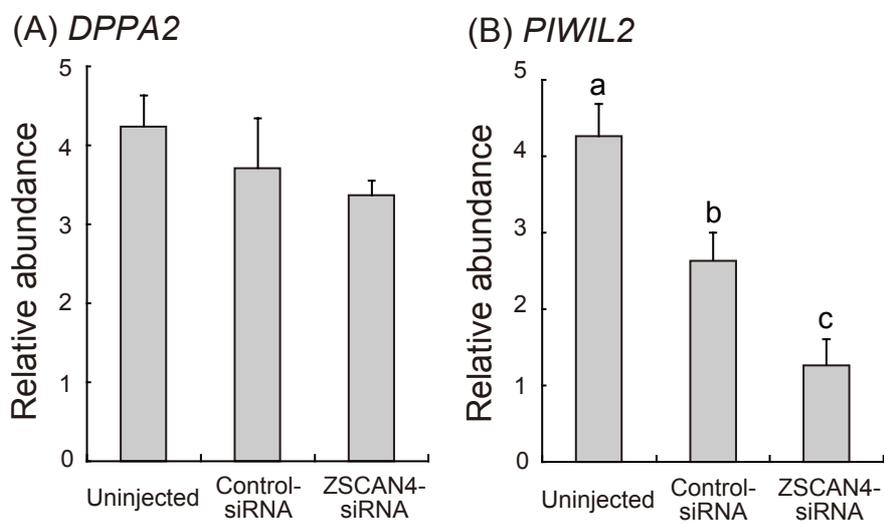


Fig. 12. Relative abundance (mean  $\pm$  SEM) of (A) *DPPA2* and (B) *PIWIL2* transcripts in bovine 16-cell stage embryos obtained from Uninjected, Control-siRNA or ZSCAN4-siRNA injection (n = 6). The relative abundance represents the normalized quantity compared to the *Histone H2A*. <sup>a, b, c</sup> Values with different superscripts within each column differ significantly (P < 0.05).

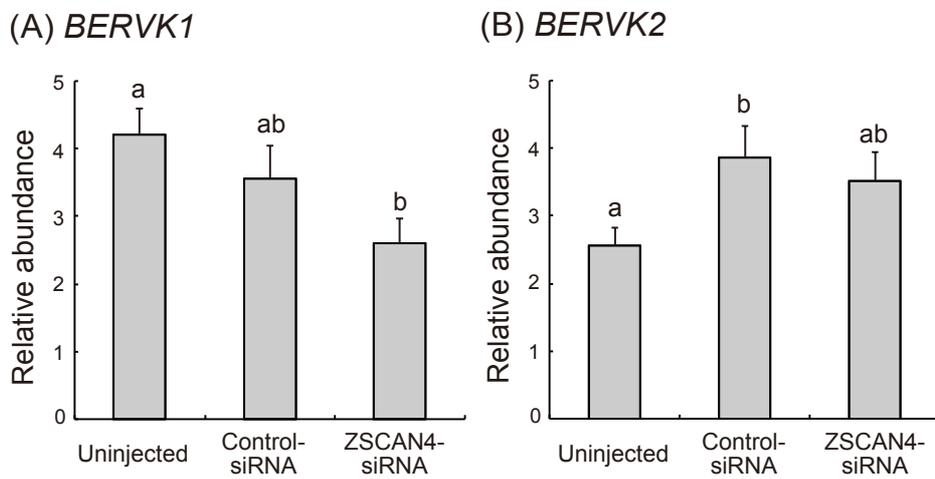


Fig. 13. Relative abundance (mean  $\pm$  SEM) of (A) *BERVK1* and (B) *BERVK2* transcripts in bovine 8~16-cell stage embryos obtained from Uninjected, Control-siRNA or ZSCAN4-siRNA injection (n = 6). The relative abundance represents the normalized quantity compared to the *Histone H2A*. <sup>a, b</sup> Values with different superscripts within each column differ significantly (P < 0.05).

#### 4. 考 察

本章では第 3 章に引き続き、ウシ胚の初期発生における *ZSCAN4* の機能を検討するため、RNA 干渉法を用いて *ZSCAN4* 発現を抑制したウシ胚のエピゲノム制御に関わる因子およびマウス iPS 細胞に関わる因子に着目して解析を行った。

マウスにおいて *Hdac1* 遺伝子を欠損した胚は着床時期に致死となる (Lagger *et al.*, 2002)。また、ウシ胚においては、*HDAC1* は卵子から 8 細胞期まで低い発現を示し、胚盤胞期で高い発現が認められるが (McGraw *et al.*, 2003)、ウシ PA 胚の *HDAC1* の発現を siRNA により抑制すると、胚盤胞期への発生率が低下し、胚盤胞期胚の細胞数が減少する (Wang *et al.*, 2011)。以上のことから、ウシおよびマウスの胚発生においては、HDAC1 を介したヒストンの脱アセチル化が発生に重要であることが考えられる。一方、マウスおよびウシの SCNT 胚では HDAC 阻害剤である TSA の処理により初期胚の発生率が向上することが知られており (Kishigami *et al.*, 2006; Iager *et al.*, 2008)、SCNT 胚ではヒストンの脱アセチル化が胚発生に負の影響をもたらす可能性がある。本研究において *ZSCAN4* の発現抑制により、2 から 4-細胞期にかけて *HDAC1* の高発現が認められ、*ZSCAN4* 発現抑制胚での発生阻害は HDAC1 高発現によるヒストン脱アセチル化が関与している可能性がある。このことは、*ZSCAN4* は HDAC1 を介して胚の脱アセチル化を制御している可能性を示すものである。また、こうした HDAC1 の制御には卵子中にわずかながら存在している母性 *ZSCAN4* が役割を果たしている可能性を示唆する。一方、*Kdm1a* はマウス ES 細胞において *Hdac1* と共同してエピゲノムを制御するが (Yin *et al.*, 2014)、本研究においてウシ *ZSCAN4* 発現抑制胚における *KDM1A* の発現動態に変化は認められなかった。マウス胚においては、母性 *Kdm1a* が 2-細胞期以降の発生および ZGA に必須の因子であることが明ら

かとなっているが (Ancelin *et al.*, 2016)、本研究においては *EIF1AX* 発現から *ZSCAN4* 発現抑制胚の ZGA は正常である可能性が示されている。これらのことから、*ZSCAN4* はウシ胚における *KDM1A* を介したエピゲノム制御には関与しないことが示唆される。

本研究では、*ZSCAN4* を発現抑制したウシ胚において、*DNMT1* 発現が Control-siRNA 注入区と比較して有意に低い値を示した。*Dnmt1* は DNA メチル基転移酵素であり、DNA のメチル化維持に重要な役割を持つエピゲノム制御因子である (Leonhardt *et al.*, 1992)。マウスにおいて *Dnmt1* 欠損胚は胚性致死となり (Li *et al.*, 1992)、ウシ IVF 胚においても *DNMT1* を標的とした siRNA の注入により 8 から 16-細胞期において発生の阻害が起こる (Golding *et al.*, 2011)。このことから、*DNMT1* はウシ胚発生に必須の因子であり、*ZSCAN4* 発現抑制胚の発生阻害に *DNMT1* 発現の低下が関わっている可能性がある。これらの結果はウシ初期胚において *ZSCAN4* が *DNMT1* の制御に関与する可能性を示すものであるが、マウス ES 細胞においては *Zscan4* が *Dnmt1* の分解に働くとする先行研究があり (Dan *et al.*, 2017)、本研究の結果と矛盾する。*ZSCAN4* と *DNMT1* の関連性については、今後タンパク質レベルでの相互作用など詳細な解析を行う必要がある。

マウス iPS 細胞の樹立に際して、*Zscan4* を導入することにより、*DPPA2* および *PIWIL2* を含む初期胚に特異的な遺伝子群の発現が活性化される (Hirata *et al.*, 2012)。この遺伝子群は *ZSCAN4* の発現制御を受けている可能性があることから、本研究では *ZSCAN4* 発現を抑制したウシ胚における *DPPA2* および *PIWIL2* 発現量を解析した。その結果、*ZSCAN4* 発現抑制胚の *DPPA2* 遺伝子発現量は、対象区と比較して差は認められなかった。*Dppa2* はマウス ES 細胞の増殖に役割を持ち (Du *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2011)、細胞の自己複製能と

多能性の維持にはたらく (Watabe, 2012)。最近、マウス ES 細胞において、*Dppa2* と *Dppa4* が *Dux* を介して *Zscan4* を含む ZGA 特異的な遺伝子群を活性化することが明らかとなった (Eckersley-Maslin *et al.*, 2019)。さらに、*Dppa2* および *Dppa4* 非存在下での *Zscan4* 強制発現は ZGA 特異的な遺伝子を活性化しなかったことから (Eckersley-Maslin *et al.*, 2019)、*Zscan4* が *Dppa2* の発現を制御するのではなく、むしろ *Zscan4* が *Dppa2* および *Dppa4* の制御下にあると考えられる。一方、Hirata ら (2012) の報告においては、*Zscan4* を用いて作出されたマウス iPS 細胞において、*Dppa2* 発現の上昇が認められているが、その発現制御メカニズムは明らかとなっていない。以上のように、*Zscan4* に関連する遺伝子発現ネットワークは ES 細胞および iPS 細胞を対象とした解析が多く、初期胚における *ZSCAN4* に関する遺伝子発現調節メカニズムについては今後より詳細に解析していく必要がある。

本研究において *ZSCAN4* 発現抑制胚の *PIWIL2* 遺伝子発現量は、対象区と比較して有意に低い値を示した。*Piwi* タンパク質と、small RNA である *Piwi*-interacting RNA (piRNA) は後生動物の生殖細胞分化の過程でトランスポゾンの発現を抑制することが知られている (Siomi *et al.*, 2011)。マウス生殖細胞における *Piwi2* のノックアウトにより LTR レトロトランスポゾンの発現が高まる (Frost *et al.*, 2010)。マウス初期胚においては、多くの内在性レトロウイルスが ZGA の時期に活発に転写されることから (Peaston *et al.*, 2004)、内在性レトロウイルスを含むレトロトランスポゾンが胚発生に重要な役割を担う可能性がある。ウシ胚においても piRNA 様配列を持つ piRNA-like RNA と内在性レトロウイルスの発現が報告されている (Russell *et al.*, 2017; Khazaei *et al.*, 2018; Cuthbert *et al.*, 2019)。さらに、最近の *in silico* 解析により、piRNA-like RNA はウシ 8-細胞期において卵子と比較して急激に発現が低下することが明らかと

なっている (Cuthbert *et al.*, 2019)。このことから、哺乳類の初期胚におけるレトロトランスポゾン発現は正常な ZGA の発現に関与している可能性がある (Cuthbert *et al.*, 2019)。また、piRNA は生殖細胞の減数分裂第一分裂パキテン期において、特定の mRNA の分解にはたらく (Gou *et al.*, 2014)。興味深いことに、マウス精子分化においてはパキテン期およびディプロテン期における Zscan4 タンパク質の発現が認められる (Ishiguro *et al.*, 2017)。そこで本研究においては、ZSCAN4 発現抑制胚における PIWIL2 の発現量の低下が、レトロトランスポゾンの発現に関与するか否かを検討するため、ウシ胚において発現が報告されている内在性レトロウイルス *BERVK1* および *BERVK2* の発現を検討した。その結果、ZSCAN4 発現抑制胚において *BERVK1* の発現に異常が認められたことから、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している可能性が示された。

本研究では、ZSCAN4 のウシ初期胚における機能を明らかにするため、iPS 細胞や ES 細胞における知見に着目し解析を行った。その結果、*HDAC1*、*DNMT1* および *PIWIL2* の発現制御に ZSCAN4 が関与している可能性が示唆された。今後、ZSCAN4 によるこれら因子の制御機構を分子レベルで解明するためには、ウシ ZSCAN4 に特異的な抗体を用いたタンパク質相互作用の解析が必要である。

## 5. 要 約

マウス ES 細胞における研究から、ZSCAN4 は HDAC1 や KDM1A、DNMT1 などのエピゲノム制御因子を介して機能することが考えられる。また、*Zscan4* を用いて樹立した iPS 細胞の研究結果から、ZSCAN4 は *DPPA2* および *PIWIL2* の発現を制御している可能性がある。そこで本章では、ウシ胚の初期発生における ZSCAN4 の役割を明らかにするために、*ZSCAN4* の発現抑制がエピゲノム制御因子および iPS 細胞関連遺伝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 *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群のうち *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。

## 第5章

### 総括

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。一方、1996 年、哺乳動物では世界初となる体細胞クローン羊のドリーが誕生して以来、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 (Wilmut *et al.*, 1997; Matoba *et al.*, 2018)。しかしながら、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 (Ogura *et al.*, 2013; Loi *et al.*, 2016)。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不明な点も多い。しかし、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と考えられている *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。

第 2 章では、これまで報告のないウシ卵子および初期胚における *ZSCAN4* の発現動態を詳細に解析した。さらに、 $\alpha$ -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、ウシ胚における *ZSCAN4* はマウスやヒト初期胚と同様に ZGA の時期に、一過性の発現上昇を示すことが明らかになった。このことは *ZSCAN4* が動物種に共通して ZGA の制御に関わる可能性を示すものであり、ZGA における遺伝子発現調節機構の高度な理解に寄与するものと考えられる。

第 3 章では、ウシ胚の初期発生における *ZSCAN4* の機能を明らかにするため、siRNA を用いた *ZSCAN4* の発現抑制を行った。ウシ初期胚における *ZSCAN4*

発現抑制により、16-細胞期以降への胚発生が阻害された。このことは、ウシ胚において *ZSCAN4* が初期発生に極めて重要な役割を担うことを示唆する。さらに本章では、*ZSCAN4* の発現抑制がウシ胚の初期胚発生を阻害する機序を明らかにすることを目的として、ES 細胞や iPS 細胞における知見に基づき、*ZSCAN4* 発現を抑制したウシ胚における ZGA 遺伝子の発現、テロメア長、および細胞周期に着目してそれぞれ解析を行った。その結果、*ZSCAN4* の発現抑制胚においては細胞周期に変化が起こっている可能性が示された。今後はこれら解析結果に加え、同様のパラメーターについて他の解析手法を用いるなどした検証を行うことで、ウシ胚における *ZSCAN4* の機能の詳細が明らかになることが期待される。

第 4 章では、第 3 章に引き続きウシ胚の初期発生における *ZSCAN4* の機能を明らかにするため、*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。その結果、*ZSCAN4* の発現抑制が 2-細胞期および 4-細胞期の *HDAC1* 発現への影響をおよぼすことが明らかとなった。このことは、ウシ胚においては胚性の *ZSCAN4* のみならず母性 *ZSCAN4* も発生に役割をもつ可能性を示唆するものである。また、*ZSCAN4* 発現抑制により DNMT1 発現の低下が認められた。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、iPS 細胞の樹立における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制御機構やリプログラミング機構を介して初期胚発生に機能を持つ可能性が示された。本研究より得られた知見は、ウシ胚の発生制御機構をより深く理解するための基盤となり、さらに SCNT 胚や iPS 細胞における細胞核のリプログラミング機構の高度な理解に寄与

するものである。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った主指導教員の岩手大学農学部教授 澤井 健博士に深く感謝いたします。また御校閲および御助言を賜った副指導教員の帯広畜産大学畜産学部教授 手塚 雅文博士、岩手大学農学部准教授 平田 統一博士並びに審査員として貴重な御助言を頂いた山形大学農学部教授 木村 直子博士に深く感謝致します。

また、本研究を遂行するに当たり、多大なる御協力、御助言を頂いた岩手大学農学部名誉教授 橋爪 力博士および、University of California, Davis, Pablo J. Ross 博士に深く感謝いたします。

本研究は、日本学術振興会特別研究員 (DC1) 制度の支援を受けて遂行しました。

## 参考文献

- 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; 22: 307-318.
- Amano T, Hirata T, Falco G, Monti M, Sharova LV, Amano M, Sheer S, Hoang HG, Piao Y, Stagg CA, Yamamizu K, Akiyama T, Ko MS. Zscan4 restores the developmental potency of embryonic stem cells. *Nat Commun* 2013; 4: 1966.
- Ancelin K, Syx L, Borensztein M, Ranisavljevic N, Vassilev I, Briseno-Roa L, Liu T, Metzger E, Servant N, Barillot E, Chen CJ, Schule R, Heard E. Maternal LSD1/KDM1A is an essential regulator of chromatin and transcription landscapes during zygotic genome activation. *Elife* 2016; 5.
- Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod* 1983; 28: 235-247.
- Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH, Cargill SL, Kreuzer BR, Medrano JF, Murray JD. Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 1995; 44: 227-232.
- Bettegowda A, Patel OV, Ireland JJ, Smith GW. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 267-278.
- Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and

- eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332: 459-461.
- Brevini-Gandolfi TA, Favetta LA, Mauri L, Luciano AM, Cillo F, Gandolfi F. Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev* 1999; 52: 427-433.
- Camous S, Kopecny V, Flechon JE. Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo. *Biol Cell* 1986; 58: 195-200.
- Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(3): e21.
- Clegg KB, Piko L. RNA synthesis and cytoplasmic polyadenylation in the one-cell mouse embryo. *Nature* 1982; 295: 343-344.
- Cuthbert JM, Russell SJ, White KL, Benninghoff AD. The maternal-to-zygotic transition in bovine in vitro-fertilized embryos is associated with marked changes in small non-coding RNAs. *Biol Reprod* 2019; 100: 331-350.
- Dan J, Yang J, Liu Y, Xiao A, Liu L. Roles for Histone Acetylation in Regulation of Telomere Elongation and Two-cell State in Mouse ES Cells. *J Cell Physiol* 2015; 230: 2337-2344.
- Dan J, Rousseau P, Hardikar S, Veland N, Wong J, Autexier C, Chen T. Zscan4 Inhibits Maintenance DNA Methylation to Facilitate Telomere Elongation in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Rep* 2017; 20: 1936-1949.
- Davis W, Jr., De Sousa PA, Schultz RM. Transient expression of translation initiation factor eIF-4C during the 2-cell stage of the preimplantation mouse embryo: identification by mRNA differential display and the role of DNA replication in zygotic gene activation. *Dev Biol* 1996; 174: 190-201.

- De Sousa PA, Watson AJ, Schultz RM. Transient expression of a translation initiation factor is conservatively associated with embryonic gene activation in murine and bovine embryos. *Biol Reprod* 1998; 59: 969-977.
- Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 24: 13734–13738.
- Du J, Chen T, Zou X, Xiong B, Lu G. Dppa2 knockdown-induced differentiation and repressed proliferation of mouse embryonic stem cells. *J Biochem* 2010; 147: 265-271.
- Ebrahimi B. Reprogramming barriers and enhancers: strategies to enhance the efficiency and kinetics of induced pluripotency. *Cell Regen (Lond)* 2015; 4: 10.
- Eckersley-Maslin MA, Svensson V, Krueger C, Stubbs TM, Giehr P, Krueger F, Miragaia RJ, Kyriakopoulos C, Berrens RV, Milagre I, Walter J, Teichmann SA, Reik W. MERVL/Zscan4 Network Activation Results in Transient Genome-wide DNA Demethylation of mESCs. *Cell Rep* 2016; 17: 179-192.
- Eckersley-Maslin M, Alda-Catalinas C, Blotenburg M, Kreibich E, Krueger C, Reik W. Dppa2 and Dppa4 directly regulate the Dux-driven zygotic transcriptional program. *Genes Dev* 2019; 33: 194-208.
- Eliab E, William GO, Ricardo CC, Elizabeth AJ, James IM, Fernanda CC, Adriana MZ, Charles RS, Peter JH. Embryo and cow factors affecting pregnancy per embryo transfer for multiple-service, lactating Holstein recipients. *Transl Anim Sci* 2019; 3: 60-65.
- 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; 307: 539-550.

Ferraz PA, Burnley C, Karanja J, Viera-Neto A, Santos JE, Chebel RC, Galvão KN.

Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenology* 2016; 15; 86(7): 1834-1841.

Frei RE, Schultz GA, Church RB. Qualitative and quantitative changes in protein

synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fertil* 1989; 86: 637-641.

Frost RJ, Hamra FK, Richardson JA, Qi X, Bassel-Duby R, Olson EN. MOV10L1 is

necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 11847-11852.

Gilchrist GC, Kurjanowicz P, Mereilles FV, King WA, LaMarre J. Telomere length and

telomerase activity in bovine pre-implantation embryos in vitro. *Reprod Domest Anim.* 2015 Feb; 50(1): 58-67.

Gou LT, Dai P, Yang JH, Xue Y, Hu YP, Zhou Y, Kang JY, Wang X, Li H, Hua MM, Zhao

S, Hu SD, Wu LG, Shi HJ, Li Y, Fu XD, Qu LH, Wang ED, Liu MF. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis. *Cell Res* 2014; 24: 680-700.

Golding MC, Williamson GL, Stroud TK, Westhusin ME, Long CR. Examination of

DNA methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. *Mol Reprod Dev* 2011; 78(5): 306-317.

Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. Dynamics of global gene expression

changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell* 2004; 6: 117-131.

Han J, Yuan P, Yang H, Zhang J, Soh BS, Li P, Lim SL, Cao S, Tay J, Orlov YL, Lufkin T,

- Ng HH, Tam WL, Lim B. Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010; 25; 463(7284): 1096-1100.
- Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 2002; 66(1): 6-13.
- Hirata T, Amano T, Nakatake Y, Amano M, Piao Y, Hoang HG, Ko MS. Zscan4 transiently reactivates early embryonic genes during the generation of induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2012; 2: 208.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 1999; 52: 683-700.
- Howlett SK, Reik W. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development* 1991; 113: 119-127.
- Hyttel P, Laurincik J, Viuff D, Fair T, Zakhartchenko V, Rosenkranz C, Avery B, Rath D, Niemann H, Thomsen PD, Schellander K, Callesen H, Wolf E, Ochs RL, Greve T. Activation of ribosomal RNA genes in preimplantation cattle and swine embryos. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 49-60.
- Iager AE, Ragina NP, Ross PJ, Beyhan Z, Cunniff K, Rodriguez RM, Cibelli JB. Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning Stem Cells* 2008; 10: 371-379.
- 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* 2017;

53: 167-178.

Jiang J, Lv W, Ye X, Wang L, Zhang M, Yang H, Okuka M, Zhou C, Zhang X, Liu L, Li J.

Zscan4 promotes genomic stability during reprogramming and dramatically improves the quality of iPS cells as demonstrated by tetraploid complementation. *Cell Res* 2013; 23: 92-106.

Jullien J, Pasque V, Halley-Stott RP, Miyamoto K, Gurdon JB. Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 453-459.

Khazaei E, Farzaneh N, Mirshokraei P, Tabatabaeizadeh SE, Dehghani H. Expression of endogenous retroviruses in pre-implantation stages of bovine embryo. *Reprod Domest Anim* 2018; 53: 1405-1414.

Kidder GM, McLachlin JR. Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenesis in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 1985; 112: 265-275.

Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010; 467: 285-290.

Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340: 183-189.

Kruip AM and den Daas JHG. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*; 1997; 55:1447-1455.

- Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, Schuettengruber B, Hauser C, Brunmeir R, Jenuwein T, Seiser C. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J* 2002; 21: 2672-2681.
- Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruip T, Niemann H, Galli C. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod* 2002; 67: 767-775.
- Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 1992; 71(5): 865-873.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; 69(6): 915-926.
- Liu L, Bailey SM, Okuka M, Munoz P, Li C, Zhou L, Wu C, Czerwiec E, Sandler L, Seyfang A, Blasco MA, Keefe DL. Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1436-1441.
- Liu L, Liu Y, Gao F, Song G, Wen J, Guan J, Yin Y, Ma X, Tang B, Li Z. Embryonic development and gene expression of porcine SCNT embryos treated with sodium butyrate. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2012; 318: 224-234.
- Loi P, Iuso D, Czernik M, Ogura A. A New, Dynamic Era for Somatic Cell Nuclear Transfer? *Trends Biotechnol* 2016; 34: 791-797.
- Ma P, Zhang H, Li R, Wang Y, Zhang Y, Hua S. P53-Mediated Repression of the Reprogramming in Cloned Bovine Embryos Through Direct Interaction with HDAC1 and Indirect Interaction with DNMT3A. *Reprod Domest Anim* 2015; 50: 400-409.

- Mann MR, Chung YG, Nolen LD, Verona RI, Latham KE, Bartolomei MS. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod* 2003; 69: 902-914.
- Matoba S, Zhang Y. Somatic Cell Nuclear Transfer Reprogramming: Mechanisms and Applications. *Cell Stem Cell* 2018; 23: 471-485.
- McGraw S, Robert C, Massicotte L, Sirard MA. Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol Reprod* 2003; 68: 383-389.
- Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J Reprod Dev* 2007; 53: 707-715.
- Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 1987; 99: 371-382.
- Moore GD, Ayabe T, Kopf GS, Schultz RM. Temporal patterns of gene expression of G1-S cyclins and cdks during the first and second mitotic cell cycles in mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 264-275.
- Nakai-Futatsugi Y, Niwa H. Zscan4 Is Activated after Telomere Shortening in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports* 2016; 6: 1-13.
- Nakamura T, Nakagawa M, Ichisaka T, Shiota A, Yamanaka S. Essential roles of ECAT15-2/Dppa2 in functional lung development. *Mol Cell Biol* 2011; 31: 4366-4378.
- NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: D7-19.
- Ogura A, Inoue K, Wakayama T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear

- transfer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013; 368: 20110329.
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 2000; 10: 475-478.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25: 591-600.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38: 1171-1180.
- Peaston AE, Evsikov AV, Graber JH, de Vries WN, Holbrook AE, Solter D, Knowles BB. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell* 2004; 7: 597-606.
- Russell S, Patel M, Gilchrist G, Stalker L, Gillis D, Rosenkranz D, LaMarre J. Bovine piRNA-like RNAs are associated with both transposable elements and mRNAs. *Reproduction* 2017; 153: 305-318.
- Sawai K, Kageyama S, Moriyasu S, Hirayama H, Minamihashi A, Onoe S. Analysis of mRNA transcripts for insulin-like growth factor receptors and binding proteins in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 2005; 7: 189-198.
- Sawai K, Takahashi M, Fujii T, Moriyasu S, Hirayama H, Minamihashi A, Hashizume T, Onoe S. DNA methylation status of bovine blastocyst embryos obtained from various procedures. *J Reprod Dev* 2011; 57: 236-241.
- Sawai K, Fujii T, Hirayama H, Hashizume T, Minamihashi A. Epigenetic status and full-term development of bovine cloned embryos treated with trichostatin A. *J*

- Reprod Dev* 2012; 58(3): 302-309.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9: 671-675.
- Schultz RM, Davis W, Jr., Stein P, Svoboda P. Reprogramming of gene expression during preimplantation development. *J Exp Zool* 1999; 285: 276-282.
- Shaw L, Sneddon SF, Brison DR, Kimber SJ. Comparison of gene expression in fresh and frozen-thawed human preimplantation embryos. *Reproduction* 2012; 144: 569-582.
- Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 246-258.
- Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, Yachechko R, Kuoy E, Horvath S, Zhou Q, Plath K. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 2009; 136: 364-377.
- Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 2007; 128: 747-762.
- Suzuki T, Minami N, Kono T, Imai H. Zygotically activated genes are suppressed in mouse nuclear transferred embryos. *Cloning Stem Cells* 2006; 8: 295-304.
- Takahashi K and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-872.
- Takahashi K and Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17(3):183-193.
- Temeles GL, Schultz RM. Transient polyadenylation of a maternal mRNA following

- fertilization of mouse eggs. *J Reprod Fertil* 1997; 109: 223-228.
- Tsubooka N, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Yamanaka S. Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells*; 2009; 14(6): 683-694.
- Turner S, Wong HP, Rai J, Hartshorne GM. Telomere lengths in human oocytes, cleavage stage embryos and blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 685-694.
- Vassena R, Boue S, Gonzalez-Roca E, Aran B, Auer H, Veiga A, Izpisua Belmonte JC. Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development* 2011; 138: 3699-3709.
- Wang Z, Zhao T, Zhang P, Zhang S, Guan J, Ma X, Yin Y, Zhang J, Tang B, Li Z. Histone deacetylase 1 down-regulation on developmental capability and histone acetylation in bovine oocytes and parthenogenetic embryos. *Reprod Domest Anim* 2011; 46: 1022-1028.
- Watabe T. Roles of Dppa2 in the regulation of the present status and future of pluripotent stem cells. *J Biochem* 2012; 152: 1-3.
- Watanabe S and Nagai T. Survival of embryos and calves derived from somatic cell nuclear transfer in cattle: a nationwide survey in Japan. *Anim Sci J* 2011; 82(2): 360-365.
- Wernig M, Lengner CJ, Hanna J, Lodato MA, Steine E, Foreman R, Staerk J, Markoulaki S, Jaenisch R. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 916-924.
- Willadsen SM JR, McAlister RJ, Shea BF, Hamilton G. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 1991; 35.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived

- from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-813.
- Wilmot I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ. Somaticcell nuclear transfer. *Nature* 2002; 419: 583–586.
- Wilson JM WJ, Bondioli KR, Looney CR, Westhudin ME, McCalla DF. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Animal Reproduction Science* 1995; 38: 73–83.
- Worrall DM, Ram PT, Schultz RM. Regulation of gene expression in the mouse oocyte and early preimplantation embryo: developmental changes in Sp1 and TATA box-binding protein, TBP. *Development* 1994; 120: 2347-2357.
- Worrall DM, Schultz RM. Regulation of gene expression in the preimplantation mouse embryo: temporal and spatial patterns of expression of the transcription factor Sp1. *Mol Reprod Dev* 1997; 46: 268-277.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 23-35.
- Xie D, Chen CC, Ptaszek LM, Xiao S, Cao X, Fang F, Ng HH, Lewin HA, Cowan C, Zhong S. Rewirable gene regulatory networks in the preimplantation embryonic development of three mammalian species. *Genome Res* 2010; 20(6): 804-815.
- Yin F, Lan R, Zhang X, Zhu L, Chen F, Xu Z, Liu Y, Ye T, Sun H, Lu F, Zhang H. LSD1 regulates pluripotency of embryonic stem/carcinoma cells through histone deacetylase 1-mediated deacetylation of histone H4 at lysine 16. *Mol Cell Biol* 2014; 34: 158-179.

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; 464: 858-863.

Zhang Z and Wu WS. Sodium butyrate promotes generation of human induced pluripotent stem cells through induction of the miR302/367 cluster. *Stem Cells Dev* 2013; 22: 2268-2277.

Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W, Zhang Q, Xiang C, Hou P, Song Z, Liu Y, Yong J, Zhang P, Cai J, Liu M, Li H, Li Y, Qu X, Cui K, Zhang W, Xiang T, Wu Y, Zhao Y, Liu C, Yu C, Yuan K, Lou J, Ding M, Deng H. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell* 2008; 6; 3(5): 475-479.