



Zscan10 is dispensable for maintenance of pluripotency in mouse embryonic stem cells

Yamane, Mariko

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2016-01-20

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3296号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003296>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(論文博士関係)

学位論文の内容要旨

Zscan10 is dispensable for maintenance of pluripotency in mouse embryonic stem cells

*Zscan10*はマウスES細胞の多能性の維持には不要である

(指導教員: 神戸大学大学院 医学系研究科 発生再生医学講座 客員教授 丹羽仁史)

山根 万里子

胚性多能性幹 (ES) 細胞は、着床前の胚より樹立された多能性および自己複製能を保持する細胞である。ES 細胞のこれらの特性は、シグナル伝達機構、およびその下流に存在する多能性幹細胞特異的転写因子ネットワークにより、成り立っている。Zinc finger and SCAN domain-containing 10 (*Zscan10*, または *Zfp206*)は、6つのエクソンからなる 782 のアミノ酸で構成されており、これまでに多能性幹細胞特異的転写因子ネットワークの一員として働くことが報告されている転写因子である。*Zscan10* は、他の組織や細胞種と比較し ES 細胞において特に発現が高い。また、その発現量は分化に伴って減少することや、多能性幹細胞の維持に必須の転写因子である *Oct3/4* および *Sox2* によって直接制御を受けていることが報告されている。また、最近の 1 細胞遺伝子発現解析によって、*Oct3/4* の発現のフィードバック制御に関わりうる因子であるともいわれている。これらのことから、*Zscan10* は、ES 細胞の多能性幹細胞特異的転写因子ネットワークの構成因子の一つとして、これまで考えられてきた。また、shRNA を用いて *Zscan10* をノックダウンすると ES 細胞の自発分化が亢進すること、その時に *Zscan10* を過剰に発現させると、自己複製を安定化させ、分化を抑制することが報告されており、更にはマイクロアレイを用いた解析により、*Zscan10* ノックダウン ES 細胞では多能性幹細胞特異的転写因子の発現量が減少していることが報告されていることから、未分化性および多分化能の維持に重要な役割を果たしているとも想定されていた。しかし、一方で近年になり *Zscan10* のノックアウトマウスの作成が報告された。そのマウスは、目の障害や体重の減少といった障害はあったが、成体まで成長することが可能であった。このことから、*Zscan10* は初期の発生過程においては不要であるか、または母親由来の因子によりその機能を補うことが可能であると考えられた。また、過去の報告での *Zscan10* の機能喪失実験は、shRNA を利用したノックダウンにより行われており、10-20%の *Zscan10* が発現している細胞での機能の検討であった。従って、これまでの結果では、ES 細胞における *Zscan10* の機能解析としては不十分であり、その完全な機能喪失が ES 細胞の多分化能および自己複製能にどのような影響を与えるのかを検証する必要がある。そこで、今回我々は、Cre-loxP システムを利用した *Zscan10* の誘導性ノックアウト ES 細胞を作成し、*Zscan10* の ES 細胞における機能の解析を行った。

Cre-loxP システムを用いて *Zscan10* の DNA 結合ドメインをコードする第 6 エクソンを除去した ES 細胞は、*Zscan10* の mRNA およびタンパクの発現が

恒常的に失われていた。しかし、形態的には野生型の ES 細胞と差がなく、自己複製を継続して行っており、*Zscan10* の機能を失った状態での長期的な細胞株としての維持が可能であった。定量 PCR を用いた mRNA 発現量の定量的結果、ES 細胞の多能性の維持に必要である *Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog* などの多能性幹細胞特異的遺伝子の発現量は、野生型と *Zscan10* ノックアウト細胞間で有意な差はなかった。過去の報告で shRNA を用いた *Zscan10* のノックダウンにより発現量の減少が報告されている 2 細胞期特異的マーカーの *Zscan4* および *Tcstv1* は、定量 PCR を用いた解析の結果、*Zscan10* ノックアウト細胞での発現量の減少は見られなかった。また、RNA-seq により網羅的遺伝子発現解析を行った結果、*Zscan10* ノックアウト ES 細胞では、野生型 ES 細胞と比較して、53 遺伝子の発現が上昇、27 遺伝子の発現が減少していたが、*Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog*, *Esrrb*, *Rex1*, *Klf4*, *Tbx3* などの多能性関連遺伝子ネットワークの構成因子として機能する転写因子群の発現量は、野生型 ES 細胞と *Zscan10* ノックアウト ES 細胞間で有意な差がなかった。同様に、2 細胞期特異的マーカーの発現量も、定量 PCR の結果と同じく、*Zscan10* ノックアウト ES 細胞での発現量の減少は確認されなかった。この *Zscan10* ノックアウト ES 細胞に EGFP 発現遺伝子を導入した後ドナーの受精卵にインジェクションし、得られた胎生 13.5 日の胚を観察した結果、全身に EGFP 陽性細胞が寄与したキメラ胚が確認できたことから、*Zscan10* ノックアウト細胞は、多能性を維持していることが明らかになった。以上の結果から、*Zscan10* のノックアウトは ES 細胞の多能性および自己複製に影響を与えておらず、*Zscan10* の機能は ES 細胞において多能性幹細胞関連遺伝子ネットワークには不要であると結論付けた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 2148 号	氏 名	山根 万里子
論文題目 Title of Dissertation	<p>Zscan10 is dispensable for maintenance of pluripotency in mouse embryonic stem cells</p> <p>Zscan10 はマウス ES 細胞の多能性の維持には 不要である</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 櫻本 秀樹 Chief Examiner</p> <p>副 査 南 康博 Vice-examiner</p> <p>副 査 匂坂 敏朗 Vice-examiner</p>		

(要旨は1, 000字~2, 000字程度)

胚性多能性幹 (ES) 細胞は、着床前の胚より樹立された多能性および自己複製能を保持する細胞である。ES 細胞のこれらの特性は、シグナル伝達機構、およびその下流に存在する多能性幹細胞特異的転写因子ネットワークにより、成り立っている。Zinc finger and SCAN domain-containing 10 (*Zscan10*, または *Zfp206*) は、6つのエクソンからなる 782 のアミノ酸で構成されており、これまでに多能性幹細胞特異的転写因子ネットワークの一員として働くことが報告されている転写因子である。*Zscan10* は、他の組織や細胞種と比較し ES 細胞において特に発現が高い。また、その発現量が分化に伴って減少することや、多能性幹細胞の維持に必須の転写因子である *Oct3/4* および *Sox2* によって直接制御を受けていることが報告されている。また、最近の 1 細胞遺伝子発現解析によっても、*Oct3/4* の発現のフィードバック制御に関わりうる因子であるともいわれている。これらのことから *Zscan10* は ES 細胞の多能性幹細胞特異的転写因子ネットワークの構成因子の一つとして考えられてきた。更に、shRNA を用いて *Zscan10* をノックダウンすると ES 細胞の自発分化が亢進すること、その時に *Zscan10* を過剰に発現させると自己複製を安定化させ、分化を抑制することが報告されている。更にはマイクロアレイを用いた解析により、*Zscan10* ノックダウン ES 細胞では多能性幹細胞特異的転写因子の発現量が減少していることが報告されていることから、未分化性および多分化能の維持に重要な役割を果たしているとも想定されていた。しかし、一方で近年になり *Zscan10* のノックアウトマウスの作成が報告された。そのマウスは目の障害などが見られたが、成体まで成長することが可能であった。このことから、*Zscan10* は初期の発生過程においては不要であるか、または母親由来の因子によりその機能を補うことが可能であると考えられた。過去の報告での *Zscan10* の機能喪失実験は、shRNA を利用したノックダウンにより行われており、10-20%の *Zscan10* が発現している細胞での機能の検討であった。従って、これまでの結果では ES 細胞における *Zscan10* の機能解析としては不十分であり、その完全な機能喪失が ES 細胞の多分化能および自己複製能にどのような影響を与えるのかを検証する必要がある。そこで今回我々は、Cre-loxP システムを利用した *Zscan10* の誘導性ノックアウト ES 細胞を作成し、*Zscan10* の ES 細胞における機能の解析を行った。

Cre-loxP システムを用いて *Zscan10* の DNA 結合ドメインをコードする第 6 エクソンを除去した ES 細胞は、*Zscan10* の mRNA およびタンパクの発現が恒常的に失われていた。しかし、形態的には野生型の ES 細胞と差がなく、自己複製を継続して行っており、*Zscan10* の機能を失った状態での長期的な細胞株としての維持が可能であった。定量 PCR を用いた mRNA 発現量の定量的結果、ES 細胞の多能性の維持に必要な *Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog* などの多能性幹細胞特異的遺伝子の発現量は、野生型と *Zscan10* ノックアウト細胞間で有意な差はなかった。過去の報告で shRNA を用いた *Zscan10* のノックダウン

により発現量の減少が報告されている 2 細胞期特異的マーカーの *Zscan4* および *Tcstv1* は、定量 PCR を用いた解析の結果、*Zscan10* ノックアウト細胞での発現量の減少は見られなかった。また、RNA-seq により網羅的遺伝子発現解析を行った結果、*Zscan10* ノックアウト ES 細胞では、野生型 ES 細胞と比較して、53 遺伝子の発現が上昇、27 遺伝子の発現が減少していたが、*Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog*, *Esrrb*, *Rex1*, *Klf4*, *Tbx3* などの多能性関連遺伝子ネットワークの構成因子として機能する転写因子群の発現量は、野生型 ES 細胞と *Zscan10* ノックアウト ES 細胞間で有意な差がなかった。同様に、2 細胞期特異的マーカーの発現量も、*Zscan10* ノックアウト ES 細胞で減少していなかった。この *Zscan10* ノックアウト ES 細胞に EGFP 発現遺伝子を導入した後ドナーの受精卵にインジェクションし、得られた胎生 13.5 日の胚を観察した結果、全身に EGFP 陽性細胞が寄与したキメラ胚が確認できたことから、*Zscan10* ノックアウト細胞は多能性を維持していることが明らかになった。以上の結果から、*Zscan10* のノックアウトは ES 細胞の多能性および自己複製に影響を与えておらず、*Zscan10* の機能は ES 細胞において多能性幹細胞関連遺伝子ネットワークには不要であると結論付けた。

本研究は、マウス ES 細胞の多能性維持に重要と考えられた *Zscan10* の機能を遺伝子ターゲティング法により検証した研究で、価値ある業績であると認める。よって本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。