

# 博士論文

全能性細胞で特異的に発現する **Zbed3** の機能解析

2022年9月

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科

バイオサイエンス専攻

バイオ科学技術研究領域

眞野 友裕

# 目次

序論	1
材料と方法	5
第1章 Zbed3 タンパク質が着床前初期発生に及ぼす影響	11
緒言	
結果	
考察	
第2章 Zbed3 の Sub-Cortical Maternal Complex (SCMC) への関与	29
緒言	
結果	
考察	
第3章 Zbed3 の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルへの関与	36
緒言	
結果	
考察	
結論	49
総合考察	50
参考文献	52
謝辞	54

## 序論

マウスにおいて精子と卵子は次世代に遺伝情報を伝達するために最終分化した細胞であり、受精後に初期化と呼ばれる過程を経て胎盤を含む個体発生に必要なすべての細胞へと分化することのできる「全能性」と呼ばれる能力を再獲得する。これまでの研究において、初期化の過程において DNA の脱メチル化、母性 RNA の分解、胚性遺伝子の活性化などが重要であることが報告されている (図 1) <sup>1-5</sup>。DNA の脱メチル化の制御には Tet3<sup>6,7</sup> と PGC7 (Stella, Dppa3)<sup>8,9</sup>、母性 RNA の分解には Zfp3612<sup>10</sup>、胚性遺伝子の活性化には Mater (Maternal antigen that embryos require)<sup>11</sup>、母性タンパク質の分解にはオートファジー<sup>12</sup> が関与することが明らかにされている。しかし、全能性の再獲得に必須の過程である初期化を制御する分子については、その重要性にも関わらず不明な点が多く残されている。

初期発生過程において、精子と卵子の受精により生じた受精卵は卵割を経て、将来胚胎となる内部細胞塊と胎盤を含む胚胎外組織となる栄養外胚葉から構成する胚盤胞となる。この胚盤胞における内部細胞塊と栄養外胚葉への分化は受精後に生じる最初の分化だと考えられている。

そこで全能性の再獲得に機能する遺伝子は、最初の分化が生じている胚盤胞期を除く受精卵から桑実胚期までの間で高発現している可能性が高いことから、先行研究において *in silico screening* により初期の着床前胚に特異的に高発現する機能未知の遺伝子として Zbed3 (Zinc finger, BED domain containing 3) が同定された。qRT-PCR 法を用いて成体マウスの主要な組織および着床前胚における Zbed3 mRNA の発現が検討され、Zbed3 は成体マウスの主要な臓器ではほとんど発現していないことが明らかにされている (図 2、2017 年、宮木杏菜、修士論文)。一方で、Zbed3 mRNA は卵子形成過程である GV 期卵から 2 細胞期胚の間で発現し、受精卵で最も高く発現することが明らかにされている (図 2、2017 年、宮木杏菜、修士論文)。Zbed3 は、9 種類の遺伝子から構成される Zbed ファミリーに属しており、C7ORF29 を除き N 末端側に BED 型ジンクフィンガーを 1 から 4 個有している。Zbed2 および Zbed3 を除き C 末端側には hAT dimerization region が存在している (図 3)。また、Zbed3 は N 末端側に zinc finger, BED ドメインが存在し、その近傍に存在する PPPSPT モチーフを介して、Axin と相互作用し、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを正に制御することが報告されている <sup>13</sup>。しかし、

これらの結果は全て培養細胞を用いた実験に基づいており、Zbed3 が生体内でどのように機能するのかについては全く分かっていない。

本研究では、Zbed3 の生体内での機能を明らかにすることを目的として研究を行った。第 1 章では、着床前胚における Zbed3 の発現と局在パターンを検討するとともに Zbed3 ノックアウトマウスを作製し、ノックアウト胚における発生異常から Zbed3 の生体内における機能を考察した。第 2 章では、初期の着床前胚における Zbed3 タンパク質の局在が卵子の形成過程で必須の Sub-Cortical Maternal Complex (SCMC)<sup>14</sup> の構成タンパク質と類似の細胞内局在を示すことから、Zbed3 の SCMC への関与について考察した。第 3 章では、培養細胞において Zbed3 は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを正に制御することが報告されていることから<sup>13</sup>、Zbed3 は着床前胚においてもこのシグナルに関与するのかを考察した。

最後に、これらの結果を統合して、Zbed3 の生体内における機能を考察し、Zbed3 は全能性の獲得には直接関係はなく、受精後の対称分裂や着床前胚における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの制御に関与する正常な発生に重要な遺伝子であると結論した。

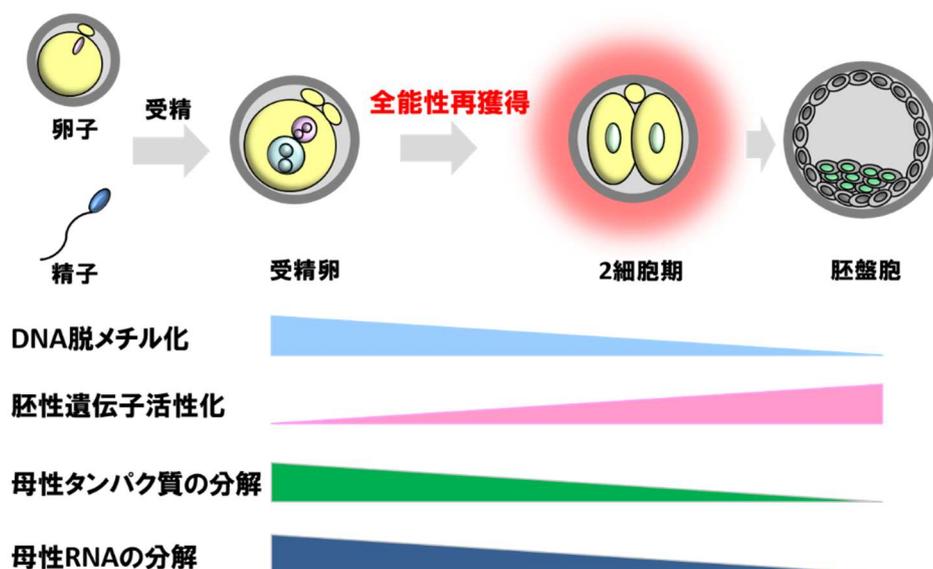


図 1. 受精後の全能性再獲得の分子機構

受精後には、精子と卵子がそれぞれの発生、分化、および成熟過程で獲得したエピゲノム情報がリプログラミングという過程を経て受精卵型に書き換えられ、受精卵は全能性を再獲得する。この過程には、DNA の脱メチル化、胚性遺伝子の活性化、母性タンパク質の分解、母性 RNA の分解が重要な役割を果たす。

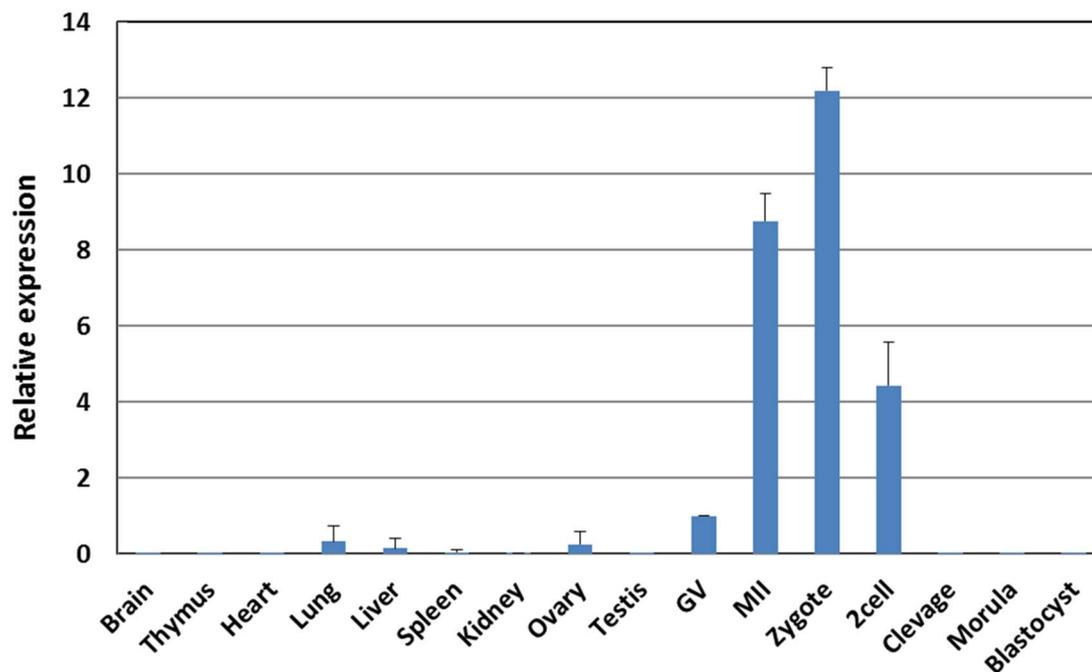


図 2. 成体マウスの主要な臓器および着床前胚における Zbed3 mRNA の発現  
成体マウスの主要な臓器および着床前胚における Zbed3 mRNA の発現を qRT-PCR 法を用いて定量した。Zbed3 の発現量は  $\beta$ -actin の発現量を用いて補正した。Miyaki A et al., *Master's thesis*. 2016。

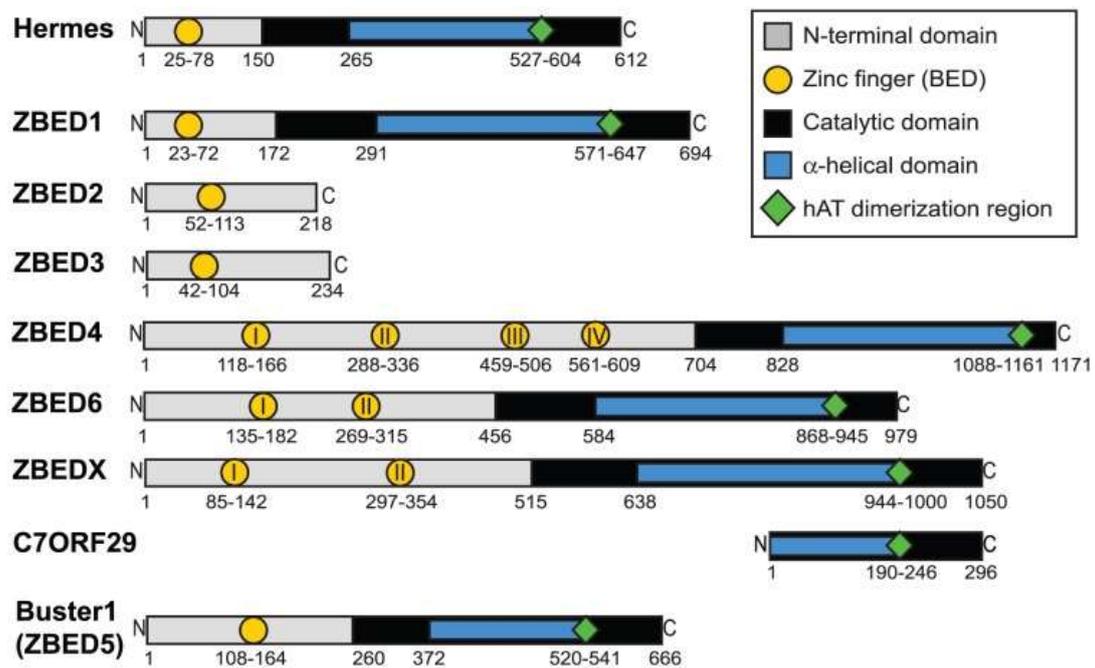


図 3. Zbed ファミリータンパク質の構造

Zbed ファミリータンパク質は C7ORF29 を除き N 末端側に BED 型ジンクフィンガーが 1 から 4 個存在している。また、Zbed2/3 を除き C 末端側には hAT dimerization region が存在している。Hayward A. et al., Plos One. 2013 より改変。

## 材料と方法

### 1. 動物実験

動物実験は、全て長浜バイオ大学実験附属施設運営委員会の承認を受けた動物実験計画書（031）に従って行った。

### 2. 細胞培養

HEK293T 細胞の培養には、10% FCS (fetal calf serum)、25 µg/mL Streptomycin (Sigma: S1277)、37.5 µg/mL Penicillin G (Sigma: P7794) を含む DMED (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Nacalai tesque: 08458-16) を用いた。ES 細胞 (E14Tg2a) は、10%FCS を含む GMEM (Sigma; G6148) に 1mM Sodium Pyruvate (Nacalai tesque; 06977-34) 、1xNEAA (Non-essential amino acid, Nakalai tesque; 06977-34) 、0.1mM 2-ME (2-Mercaptoethanol, Nacalai tesque; 21438-82) 、及び LIF を加えた培地を用いて培養した。

### 3. トランスフェクション (HEK293T 細胞)

トランスフェクションの前日に HEK293T 細胞を 6 well plate に  $8 \times 10^5$  cells / well で播種した。120 µL の Opti-MEM I Reduced Serum Medium (ThermoFisher Scientific, 31985070) に 1mg / mL PEI (Polyethylenimine, Sigma-Aldrich: 408727) を 9 µL 加え、さらにプラスミド DNA を 3 µg 加えた後、15 分間静置し、細胞に添加した。免疫染色には、トランスフェクション翌日の細胞を 1:10 で 24 x 24mm のカバーガラスを敷いた 6well plate に播種し、翌日解析に用いた。免疫沈降に用いる場合には、翌日に培地を交換し、トランスフェクション 2 日後の細胞を回収した。

### 4. 免疫染色 (HEK293T 細胞)

細胞を PBS で洗浄した後、4% PFA / PBS を加え、室温で 20 分静置した。PBS で 3 回洗浄（室温で 5 分間静置）した後、0.5% TritonX-100 / PBS 中、室温で 20 分間静置した。PBS で 3 回洗浄した後、5% NGS (Normal goat serum, Sigma; G9023) / PBS を加え、室温で 1 時間静置した。その後、rabbit anti-Zbed3 lot#2 (Lab made, 1:15,000) / ANTI-FLAG M2 Monoclonal Antibody (Sigma, F3165, 4 mg/mL, 1:1,000) / 5% NGS / PBS を加え 4°C で一晩静置した。翌日に、カバーガラスを PBS で 3 回

洗浄し、goat anti-rabbit IgG Alexa568 (Molecular Probe, A11036, 1:500) / goat anti-mouse IgG Alexa488 (Molecular Probe, A11029, 1:500) / DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Dojindo; 340-07971, 1 µg/mL) / 5% NGS / PBS を加え、遮光下、室温で 1 時間静置した。PBS で 3 回洗浄し、蛍光退色防止剤 (PermaFluor Aqueous Mounting Medium, ThermoScientific, TA-006-FM) を用いてスライドガラスに封入し、共焦点走査型レーザー顕微鏡 (FV10i, Olympus) を用いて観察した。

## 5. 着床前胚の培養

8 週齢を過ぎた BDF1 マウスに PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin, Asuka Pharmaceutical) を 7.5 IU 投与し、48 時間後 hCG (Human chorionic gonadotropin, Asuka Pharmaceutical) を 7.5 IU 投与して排卵を誘導した。hCG 投与後 14~16 時間後、輸卵管を摘出し、M2 medium (Sigma: M7167) 内で卵塊を摘出後、350 U の Hyaluronidase (Sigma, H4272) を用いて卵丘細胞を遊離させ、M2 medium を用いて 3 回以上洗浄した。その後、培地を KSOM (Potassium simplex optimization medium, Millipore, MR-020P) に換え、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

## 6. 免疫染色 (着床前胚)

96 well plate の蓋の裏に作った PBS のドロップで洗浄した後、4% PFA / PBS に浸し、室温で 15 分間静置することにより胚を固定した。固定した胚を PBS-T (0.05% Tween 20 / PBS) で 3 回洗浄した後、0.5% Triton-X 100 / PBS を加え、室温で 15 分間静置した。その後、PBS-T で 3 回洗浄し、5% NGS / PBS-T に浸し、室温で 1 時間静置した。PBS-T で 3 回洗浄した後、rabbit  $\alpha$ -Zbed3 lot#2 (Lab made, 1:15,000) / 5% NGS / PBS-T に浸し、4 °C で一晩静置した。翌日、PBS-T で 3 回 (室温で 5 分静置) 洗浄後、goat  $\alpha$ -rabbit IgG Alexa 488 (Molecular probe, A11034, 1:500) / DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Dojindo; 340-07971, 1 µg/mL) / 5% NGS / PBS-T に浸し、遮光下、室温で 1 時間静置した。PBS-T (室温で 5 分静置) で 5 回洗浄した。退色防止剤 (Fluoro-Keeper antifade reagent, non-hardening type; Nacalai tesque, 12593-64) を用いて封入した後、共焦点走査型レーザー顕微鏡 (FV10i, Olympus) を用いて観察した。Tubulin と Tom70 と Floped と  $\beta$ -catenin、活性化型  $\beta$ -catenin と Axin の染色には、1 次抗体として mouse  $\alpha$ -Tubulin (Cell Signaling Technology 1:4,000) 、 mouse  $\alpha$ -Tom70 (Santa cruz, A-8 sc-390545, 1:20)、

rabbit  $\alpha$ -Flopod (1:20000, 大阪大学大学院医学系研究科、宮崎純一教授より分与)、mouse  $\alpha$ -total  $\beta$ -catenin (BD, 250  $\mu$ g/mL Transduction Laboratories 1: 2000)、mouse  $\alpha$ -active  $\beta$ -catenin (Millipore, clone 8E7 1 mg/mL, 1: 1000) および mouse  $\alpha$ -Axin (Santa cruz, 2B11 sc-293190 10 $\mu$ g/100 $\mu$ l, 1:50) を用い、F-actin の染色には Phalloidin iFluor 594 (Cayman, 20553, 1:1,000) を用いた。

#### 7. ウェスタンブロッティング (着床前胚)

1.5ml チューブ内の細胞に、4x Laemmli Sample Buffer (BIO RAD, #161-0747) を加え、98 °C で 5 分静置後、氷上で 30 分静置した。これを 10/20 SDS-PAGE (SuperSep Ace, 10-20%, WAKO, 191-15031) で電気泳動した後、PVDF (Polyvinylidene Fluoride, Millipore, Immobilon-P, IPVH00010) メンブレン転写し、5% skim milk / TBS-T (50 mM Tris-HCl at pH7.5, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% Tween 20) 中、4 °C で 1 晩振とうすることによりブロッキングを行った。翌日、rabbit anti-Zbed3 lot#2 (Lab made, 1:15,000) / 5% skim milk 中に、室温で 1 時間静置した。TBS-T で洗浄 (5 分間、3 回) した後、anti-rabbit-HRP (GE Healthcare, NA9340, 1:1,000) / 5% skim milk 中に、室温で 1 時間静置した。TBS-T で洗浄 (5 分間、3 回) した後、Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer, NEL105001EA) と CCD イメージャー (ChemiDoc XRS Plus, BIO-RAD) を用いてシグナルを検出した。Tubulin と  $\beta$ -actin、 $\beta$ -catenin、活性化型  $\beta$ -catenin の染色には、1 次抗体として mouse  $\alpha$ -Tubulin (Cell Signaling Technology 1:4,000)、mouse  $\alpha$ - $\beta$ -actin (Sigma, AC-15 1.1mg/ml, 1:10000)、mouse  $\alpha$ -total  $\beta$ -catenin (BD, 250  $\mu$ g/mL Transduction Laboratories 1: 1000) および mouse  $\alpha$ -active  $\beta$ -catenin (Millipore, clone 8E7 1 mg/mL, 1: 1000) を用い、2 次抗体として goat  $\alpha$ -mouse-IgG-HRP (GE Healthcare, NA9310, 1:1,000) を用いた。

#### 8. Zbed3 ノックアウトマウスの作製

Zbed3 の生体内での機能を調べるために、CRISPR/Cas9 システムを用いて Zbed3 のノックアウトマウスを作製した。研究室の先行研究において、Zbed3 の第 1 エクソン内に存在する PAM 配列 (NGG) の上流 20 塩基を gRNA として 3 か所設計し、gRNA と Cas9 を発現させることが可能な pX330 に導入された (図 9)。伊川らが開発した pCAG-EGxxFP を利用し、ベクターの切断効率を検討され

た<sup>15</sup>。その結果、全ての配列が効率良く切断を誘導できることが明らかとなった（2017年、宮木杏菜、修士論文）。また、蛍光の強さから、pX330-Zbed3#1が一番効率良く標的領域を切断できることが明らかとなった（2017年、宮木杏菜、修士論文）。本研究では、pX330-Zbed3#1とpX330-Zbed3#3の2種類のベクターを受精卵の雄性前核にインジェクションし、偽妊娠マウスに移植することにより、産仔を得た（図10）。

#### 9. Zbed3 ノックアウトマウスのジェノタイプピング

生後10日のマウスの尻尾を2-5 mm カットし、エッペンチューブに回収した。180  $\mu$ L の 50 mM NaOH を添加し、激しくボルテックスを行い、95°C で5分間静置した。20  $\mu$ L の 1M Tris-HCl (pH8.0) を加え、激しくボルテックスを行い、遠心（12,000 rpm, 1min, RT）の上清1  $\mu$ L をPCRに用いた。PCRの反応液の組成、および条件はそれぞれ表1と2に示した。また、11塩基欠失、および13塩基欠失の検出には、欠失部位を含む領域を表3に示したプライマーを用いてPCRを行った。PCR産物の一部を2.5% アガロースゲルで電気泳動することにより解析した。

#### 10. 免疫沈降

トランスフェクション48時間後に回収した細胞のペレットに、500  $\mu$ L の TNE buffer (10 mM Tris-HCl at pH 7.5, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) を加えてボルテックスし、氷上で30分間静置した。15,000 rpm, 4°C, 15分遠心後に、上清を回収し細胞抽出液とした。細胞抽出液に抗FLAG抗体 (anti-FLAG M2 monoclonal antibody, Sigma, F3165)、または抗Myc抗体 (anti-c-Myc monoclonal (9E10) antibody, Santa Cruz Biotechnology, sc-40) を1.5  $\mu$ g 加え、4°Cで一晩ローテートした。翌日、Dynabeads Protein G (ThermoFisher Scientific, 10004D) を30  $\mu$ L 加え、4°Cで1時間ローテートした。TNE buffer で5回洗浄し、これに4x Laemmli Sample Buffer (BIO RAD, #161-0747) を加え、98°Cで5分静置後、氷上で30分静置した後、上清を回収し、サンプルとした。

#### 11. ウェスタンブロッティング (HEK293T細胞)

細胞のペレットに、TNE buffer を加えてボルテックスし、氷上で30分間静置

した。15,000 rpm, 4°C, 15 分遠心後に、上清を回収し細胞抽出液とした。細胞抽出液に 4x Laemmli Sample Buffer (BIO RAD, #161-0747) を加え、98°C で 5 分静置後、氷上で 30 分静置した。これを 10/20 SDS-PAGE (SuperSep Ace, 10-20%, WAKO, 191-15031) で電気泳動した後、PVDF (Polyvinylidene Fluoride, Millipore, Immobilon-P, IPVH00010) メンブレン転写し、5% skim milk / TBS-T 中、4°C で 1 晩振とうすることによりブロッキングを行った。翌日、mouse anti-FLAG-HRP (Sigma, A8592, 1:1,000) / 5% skim milk または mouse  $\alpha$ -c-Myc-HRP (anti-c-Myc monoclonal (9E10) antibody, Santa Cruz Biotechnology, sc-40HRP, 1:500) / 5% skim milk / TBS-T 中に、室温で 1 時間静置した。TBS-T で洗浄 (5 分間、3 回) した後、Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer, NEL105001EA) と CCD イメージャー (ChemiDoc XRS Plus, BIO-RAD) を用いてシグナルを検出した。

## 12.2 細胞期胚割球の単離

2 細胞期胚を 0.18% EDTA / KSOM で 1 時間培養することにより、割球を単離した。割球が分離したことを確認した後、さらに 2 時間培養し、Zbed3 の細胞内局在を免疫染色により解析した。

## 13. 免疫染色 (ES 細胞)

細胞を PBS で洗浄した後、4% PFA / PBS を加え、室温で 20 分静置した。PBS で 3 回洗浄 (室温で 5 分間静置) した後、0.5% TritonX-100 / PBS 中、室温で 20 分間静置した。PBS で 3 回洗浄した後、5% NGS (Normal goat serum, Sigma; G9023) / PBS を加え、室温で 1 時間静置した。その後、rabbit  $\alpha$ -Zbed3 lot#2 (Lab made, 1:15,000) / mouse  $\alpha$ -FLAG M2 Monoclonal Antibody (Sigma, F3165, 4 mg/mL, 1:1,000) / 5% NGS / PBS を加え 4°C で一晩静置した。翌日に、カバーガラスを PBS で 3 回洗浄し、goat  $\alpha$ -rabbit IgG Alexa568 (Molecular Probe, A11036, 1:500) / goat anti-mouse IgG Alexa488 (Molecular Probe, A11029, 1:500) / DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Dojindo; 340-07971, 1  $\mu$ g/mL) / 5% NGS / PBS を加え、遮光下、室温で 1 時間静置した。PBS で 3 回洗浄し、蛍光退色防止剤 (PermaFluor Aqueous Mounting Medium, ThermoScientific, TA-006-FM) を用いてスライドガラスに封入し、共焦点走査型レーザー顕微鏡 (FV10i, Olympus) を用いて観察した。 $\beta$ -catenin、活性化型  $\beta$ -catenin、Axin と GSK の染色には、1 次抗体として mouse  $\alpha$ -total  $\beta$ -

catenin (BD, 250 µg/mL Transduction Laboratories 1: 2000) 、 mouse  $\alpha$ -active  $\beta$ -catenin (Millipore, clone 8E7 1 mg/mL, 1: 1000)、 mouse  $\alpha$ -Axin (Santa cruz, 2B11 sc-293190 10µg/100µl, 1:50) および mouse  $\alpha$ -GSK 3 $\alpha$ / $\beta$  (Santa cruz, 001-A sc-7291, 1:200) を用いた。

#### 14. Zbed3 タンパク質の脱リン酸化処理 (着床前胚)

1.5 mL チューブ内の細胞に 40 µL の TNE buffer を加えてボルテックスし、氷上で 30 分間静置した。その後、5 µL の 10 x NEBuffer for Protein Metallo Phosphatase (BioLabs)、5 µL の 10x MnCl<sub>2</sub>(BioLabs) および 1µL の Lambda Protein Phosphatase (BioLabs) を加え、30 °C で 30 分静置した。

表 1 PCR 反応液の組成

Genome	1 µL
*GoTaq Green Master Mix	6.25 µL
10 µM primer	0.125 µL
10 µM primer	0.125 µL
D. W.	5 µL
Total	12.5 µL

\* GoTaq Green Master Mix (Promega, M7123)

表 2 PCR 条件

95°C	3 min	-
95°C	10 sec	40 cycles
55°C	10 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	-
12°C	∞	-

表 3 プライマー配列

Primer name	Sequence (5' to 3')
Zbed3_genomic_FWD	GGCAATGACATTTAATGCTGAG
Zbed3_genotyping_REV1	GTAGCCCCAGGCCTCGGAGTATGAT

## 第1章 Zbed3 タンパク質が着床前初期発生に及ぼす影響

### 緒言

マウスにおいて精子と卵子は受精することにより、胎盤を含むすべての細胞へと分化することのできる「全能性」と呼ばれる能力を再獲得する。この過程は初期化（リプログラミング）と呼ばれ、DNA の脱メチル化、母性 RNA の分解、胚性遺伝子の活性化などが重要であることが報告されている (図 1)<sup>1-5</sup>。しかし、全能性の再獲得に必須の過程であるリプログラミングを制御する分子については、その重要性にも関わらず不明な点が多く残されている。先行研究において、全能性細胞で特異的に高発現する遺伝子は全能性の再獲得に重要な役割を担っている可能性が高いと予想されることから、*in silico screening* により初期の着床前胚に特異的に高発現する遺伝子として Zbed3 (Zinc finger, BED domain containing 3) が同定された (図 2、2017 年、宮木杏菜、修士論文)。Zbed3 は培養細胞において、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの制御因子である Axin と相互作用する遺伝子として同定され、この相互作用により Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを正に制御することが報告されている<sup>13</sup>。しかしながら、Zbed3 はマウスの着床前胚で特異的に高発現するにも関わらず生体内における機能は明らかにされていない。

本研究では、着床前胚における Zbed3 の発現と局在パターンを検討するとともに、Zbed3 ノックアウトマウスを作製し、ノックアウト胚に生じる発生異常から Zbed3 の生体内における機能を考察した。

## 結果

### 1-1. Zbed3 mRNA の発現解析

研究室の先行研究において、成体マウスの主要な臓器および着床前胚における Zbed3 mRNA の発現が検討され、Zbed3 は成体マウスの主要な臓器ではほとんど発現が認められず、卵子形成過程である GV 期卵から 2 細胞期胚の間で発現し、受精卵で最も高く発現することが明らかにされている (図 2、2017 年、宮木杏菜、修士論文)。また、NCBI の Gene expression profile により Zbed3 mRNA の発現を解析したところ、卵巢、MII 期卵、受精卵および卵割期卵で発現が認められ、桑実胚、胚盤胞、脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および精巣ではほとんど発現していないことが明らかとなった (図 4)。卵巢における Zbed3 mRNA の発現は、卵巢中に含まれる MII 期卵に由来していることが予想される。また、着床前初期胚の RNA-seq のデータベース (DBTMEE: Database of Transcriptome in Mouse Early Embryos)<sup>16</sup> を解析したところ、Zbed ファミリーの中で Zbed3 だけが初期の着床前胚で高発現していた (図 5)。

### 1-2. HEK293T 細胞を用いた抗 Zbed3 抗体の特異性の評価

先行研究で作製された抗 Zbed3 抗体の特異性を検討するために、FLAG タグを付加した Zbed3 を HEK293T 細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体と抗 Zbed3 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、抗 FLAG 抗体のシグナルと抗 Zbed3 抗体のシグナルが完全に一致したことから、先行研究で作製された抗 Zbed3 抗体は Zbed3 を特異的に認識することが示された (図 6)。

### 1-3. 着床前胚における Zbed3 タンパク質の発現と細胞内局在

着床前胚における Zbed3 タンパク質の細胞内局在を抗 Zbed3 抗体を用いた蛍光免疫染色法により検討した。その際、核の染色には DAPI を用いた。その結果、Zbed3 タンパク質は、受精卵から胚盤胞期まで発現が認められた (図 7)。また、受精卵から 4 細胞期までは細胞皮質下に局在し、8 細胞期以降では、細胞質にも局在が広がることが示された (図 7)。タンパク質の発現は、抗 Zbed3 抗体を用いたウエスタンブロッティングによっても確認できた (図 8)。

#### 1-4. Zbed3 ノックアウトマウスの作製

研究室の先行研究により CRISPR/Cas9 システムを用いて Zbed3 ノックアウトマウスが作製された。Zbed3 の第 1 エクソン内に存在する PAM 配列 (NGG) の上流 20 塩基を gRNA として 3 か所設計した (図 9)。これらの配列を gRNA と Cas9 を発現させることが可能な pX330<sup>24</sup> に導入して、切断効率の最も高かった CRISPR\_Zbed3#1 の配列を挿入した pX330 を受精卵の雄性前核にマイクロインジェクションし、7 匹の産仔が得られた。シークエンスの結果、3 匹で Zbed3 ゲノムの改変が確認できたが、ライン化することができなかった。そこで、本研究では、pX330-Zbed3#1 と pX330-Zbed3#3 の 2 種類の gRNA を挿入した pX330 を受精卵の雄性前核にインジェクションし、偽妊娠マウスに移植することにより、30 匹の産仔を得た。そのうち、22 匹で Zbed3 ゲノムの改変が確認でき、欠失によりエクソン 1 に新たなストップコドンができる 11 塩基欠失と 13 塩基欠失のノックアウトマウスをライン化し、実験に用いた (図 10、11)。また、野生型同士、Zbed3 ノックアウトのオスと Zbed3 ヘテロのメス、Zbed3 ノックアウト同士の交配により得た胚を、抗 Zbed3 抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。その結果、ノックアウト同士を交配することにより完全に Zbed3 を欠失させた胚において Zbed3 タンパク質が消失していることが確認できた (図 12)。

#### 1-5. Zbed3 タンパク質の欠失が着床前胚の胚発生に及ぼす影響

Zbed3 の生体内での機能を調べるために Zbed3 ノックアウトマウスを用いて着床前発生への影響を検討した。野生型同士を交配して得た受精卵を試験管内で 4 日間培養したところ、胚盤胞期までの発生率が 93.5%であったのに対し、野生型のオスとノックアウトのメスを交配して得た受精卵では、胚盤胞期への発生率が 12.3%に低下した (図 13 上段、中段)。また、ノックアウト同士を交配して完全に Zbed3 を欠失する受精卵では、正常に発生する胚が全く認められなかった (図 13 下段)。これらのことから、Zbed3 は正常発生に必須の遺伝子であることが明らかとなった。また、ノックアウト同士から得られた受精卵では、ほとんどが最初の卵割前後に発生が停止し、不均等な割球を持つ胚や片側の割球が退縮した胚が観察された (図 14)。これらのことから、Zbed3 は受精卵から 2 細胞期への移行に重要であることが明らかになった。

#### 1-6. Zbed3 タンパク質の欠失が細胞骨格と紡錘体形成に及ぼす影響

Zbed3 を欠失する受精卵が高頻度で 2 細胞期への移行が阻害されることから、Zbed3 が細胞分裂に重要な細胞骨格タンパク質である F-actin と紡錘体形成に関与する  $\alpha$ -tubulin に及ぼす影響を抗 F-actin 抗体と抗  $\alpha$ -tubulin 抗体を用いた蛍光免疫染色法により検討した。その際、コントロールとして Zbed3 遺伝子をヘテロに欠失した胚を Zbed3 ヘテロ胚とし、ホモに欠失した胚を Zbed3 ノックアウト胚とした。その結果、Zbed3 ヘテロおよびノックアウト受精卵において、F-actin と  $\alpha$ -tubulin は細胞皮質下に限局しているのに対し、ノックアウト胚では細胞質側へ拡散することが示された (図 15A)。また、細胞分裂中期の受精卵において、ヘテロ胚と比較してノックアウト胚で  $\alpha$ -tubulin 局在から紡錘体が膨張し、染色体の幅が広がっていた (図 15B)。さらに、2 細胞期胚においても受精卵と同様に、ヘテロ胚と比較してノックアウト胚で F-actin と  $\alpha$ -tubulin は細胞質へ拡散していた (図 15C)。さらに、野生型およびノックアウト 2 細胞期胚をサンプルとして、抗 Zbed3 抗体および抗  $\alpha$ -tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、 $\alpha$ -tubulin タンパク質量に差は認められなかった (図 16)。これらの結果から、Zbed3 タンパク質の欠失により、F-actin と  $\alpha$ -tubulin の局在に異常が生じているが、Zbed3 ノックアウト胚における  $\alpha$ -tubulin 量に差は認められなかったことから、Zbed3 は F-actin と  $\alpha$ -tubulin を介した細胞骨格制御により正常な細胞分裂に重要な役割を担う可能性が示唆された。

#### 1-7. Zbed3 タンパク質の欠失が細胞小器官局在に及ぼす影響

Zbed3 ノックアウト胚において F-actin と  $\alpha$ -tubulin を介した細胞骨格制御に異常が生じたことから、細胞小器官局在に及ぼす影響をミトコンドリア局在により検討した。ノックアウトのオスとヘテロのメスおよびノックアウト同士を交配させ得た胚を抗 Tom70 抗体を用いた蛍光免疫染色法により検討したところ、ヘテロの受精卵と 2 細胞期胚ではミトコンドリアは核周辺部に限局して局在していた (図 17A)。一方でノックアウトの受精卵ではその局在が細胞質全体に拡散しており、2 細胞期胚ではより顕著に細胞膜近傍にまで拡散していた (図 17A)。また、電子顕微鏡を用いてミトコンドリアの局在を検討したところ、同様にノックアウトの受精卵においてミトコンドリアが核周辺部から細胞質側へと拡散していることが明らかとなった (図 17B)。これらの結果から、Zbed3 は細胞骨格

制御を介して細胞小器官であるミトコンドリアの局在を制御している可能性が示唆された。

#### 1-8. Zbed3 mRNA の転写・翻訳時期の検討

Zbed3 mRNA は MII 期卵から卵割期胚で発現しており (図 4)、ウェスタンブロットングにより Zbed3 タンパク質は MII 期卵から存在することを明らかとした (図 8)。Zbed3 が受精後も転写・翻訳されるかどうかを検討するために、野生型のオスと Zbed3 ノックアウトのメスを交配させることにより得た胚を試験管内で培養し、各発生段階の胚を回収し、野生型胚をコントロールとしてウェスタンブロットングを行った。その結果、受精卵から胚盤胞までの胚では精子由来の野生型ゲノムと卵子由来の Zbed3 を欠失したゲノムを持つことから遺伝子型としてはヘテロとなるが、Zbed3 タンパク質は全ての発生ステージの胚において検出されなかった (図 18)。これらのことから、Zbed3 は受精前に翻訳されたタンパク質が受精後の胚に持ち越され、受精後には新たに転写されないことが明らかとなった。

#### 1-9. Zbed3 タンパク質における化学修飾

着床前胚における Zbed3 タンパク質の発現をウェスタンブロットングにより検討したところ、MII 期卵から 2 細胞期胚にかけて分子量が低下していた (図 8)。MII 期卵における Zbed3 タンパク質に何らかの化学修飾が付加されている可能性が示唆されたため、MII 期卵に脱リン酸化処理を行い、ウェスタンブロットングにより、Zbed3 タンパク質にリン酸修飾が付加されているのかを検討した (図 19A)。その結果、脱リン酸化未処理胚と比較し、処理胚で Zbed3 タンパク質の分子量が低下していた。この結果から、MII 期卵において Zbed3 タンパク質はリン酸修飾されていることを明らかにした。さらに、GV 期卵から胚盤胞までの各ステージの胚においても同様に検討を行ったところ、Zbed3 タンパク質は GV 期卵から MII 期卵にかけてリン酸修飾を施され、受精後の 2 細胞期までに脱リン酸化されていた (図 19B)。また、2 細胞期から胚盤胞期においても、脱リン酸化未処理胚と比較し、処理胚で分子量が低下していることから、Zbed3 タンパク質は受精後の 2 細胞期までに脱リン酸化されるが、完全には脱リン酸化されず、胚盤胞期までリン酸修飾が一部付加され続けていることを明らかにした。

## 考察

第 1 章では、Zbed3 mRNA の発現から Zbed3 は全能性細胞特異的遺伝子であり、Zbed3 ノックアウトマウスを用いた研究から細胞骨格制御に関与する着床前胚の発生に必須の母性効果遺伝子であることを明らかにした。

先行研究において、Zbed3 mRNA は成体マウスの主要な臓器および着床前胚において MII 期卵から卵割期胚で発現が認められ、受精卵で最も高く発現していること (図 4)、また Zbed ファミリーの内 Zbed3 のみが全能性を有する着床前胚で特異的に高発現していることを明らかにした (図 5)。本研究において、着床前胚において Zbed3 タンパク質は受精卵から胚盤胞期まで発現しており、4 細胞期までは細胞間接着部位を除く細胞皮質下に局在しており、8 細胞期以降はその局在を細胞質へと大規模に変化させることを明らかにした (図 7)。この大規模な局在変化が生じる 8 細胞期は細胞間接着が強化されるコンパクションと呼ばれる現象が生じることや割球が胚の内外に分かれて細胞の極性が変化することが知られている。Zbed3 タンパク質の局在変化は、細胞間接着や細胞極性の変化する時期と一致することから、Zbed3 は、細胞間接着に関与する E-cadherin や細胞極性を引き起こす aPKC により細胞内局在が制御されている可能性が考えられる。

Zbed3 ノックアウトマウスを用いた研究からノックアウト同士を交配させ得た胚を試験管内で 4 日間培養したところ、全く胚盤胞期まで発生できないことを明らかにした (図 13)。この胚の大部分は最初の卵割前後に発生が停止し、不均等な割球を持つ胚や片側の割球が退縮した胚が観察された (図 14)。最初の卵割に異常が生じることから細胞骨格タンパク質である F-actin と  $\alpha$ -Tubulin 動態を蛍光免疫染色法により検討したところ、ノックアウト受精卵および 2 細胞期胚において F-actin と  $\alpha$ -Tubulin の細胞膜近傍の局在が細胞質へと拡散していることが明らかになった (図 15A、C)。また、受精卵の紡錘体形成時期においてノックアウト胚で紡錘体が収束せずに幅が広がっており、染色体の配列に乱れが生じていることを明らかにした (図 15B)。この結果から、Zbed3 ノックアウト胚における発生異常は細胞骨格制御の異常によることが明らかとなった。さらに細胞骨格制御の異常によりノックアウト胚でミトコンドリアの局在が大規模に変化しており (図 17)、他の細胞小器官の局在にも影響を及ぼしていることが予想される。そのため、ノックアウト胚における発生異常は細胞小器官の局在変

化による機能不全も発生異常の原因となる可能性も示唆された。これらの結果より、Zbed3 は細胞骨格制御を介して卵割や細胞小器官の局在制御に重要な役割を有することが明らかとなった。また、Zbed3 タンパク質は卵子形成過程で発現し、受精後には新たに翻訳されないことが明らかとなった (図 18)。このことから、Zbed3 タンパク質は卵子で翻訳されたタンパク質が、少なくとも胚盤胞期まで安定的に存在する半減期の長いタンパク質であることが明らかとなった。

着床前胚を用いたウェスタンブロッティングにおいて、Zbed3 タンパク質は受精前の MII 期卵でリン酸化されており、受精後に脱リン酸化されることを明らかにした (図 19)。このリン酸修飾有無により、Zbed3 は受精前後で異なる役割を担っていることが予想される。MII 期卵は多くの遺伝子の転写と翻訳が休止しており、受精すると全能性を獲得するために DNA の脱メチル化、母性 RNA の分解、胚性遺伝子の活性化などの初期化が生じる。Zbed3 タンパク質の脱リン酸化により、Zbed3 はこれらの現象に関わっている可能性が示唆された。

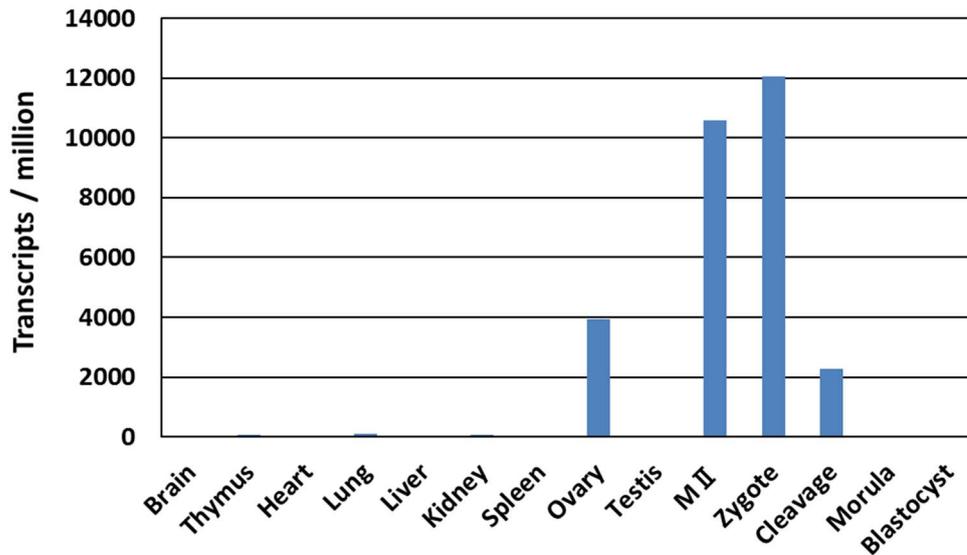


図 4. Gene expression profile による Zbed3 の発現

NCBI の Gene expression profile による成体マウスの主要な臓器および着床前胚における Zbed3 mRNA の発現量。

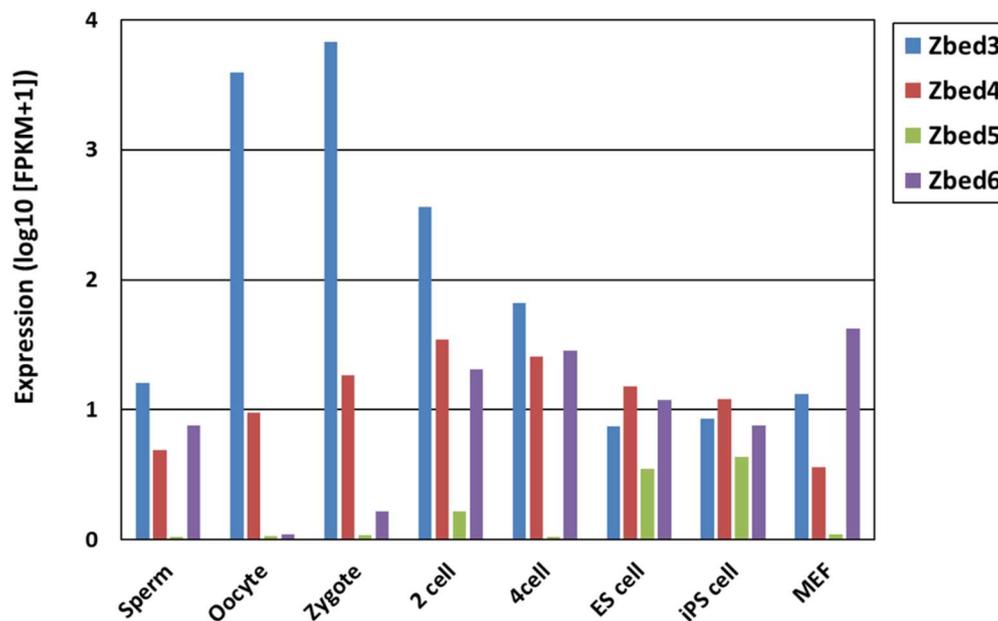


図 5. 着床前胚における Zbed ファミリー遺伝子の発現

DBTMEE (Database of Transcriptome in Mouse Early Embryos) による精子、卵子、受精卵、2 細胞期、4 細胞期、ES 細胞、iPS 細胞、および MEF における Zbed3、4、5、および 6 の発現量。

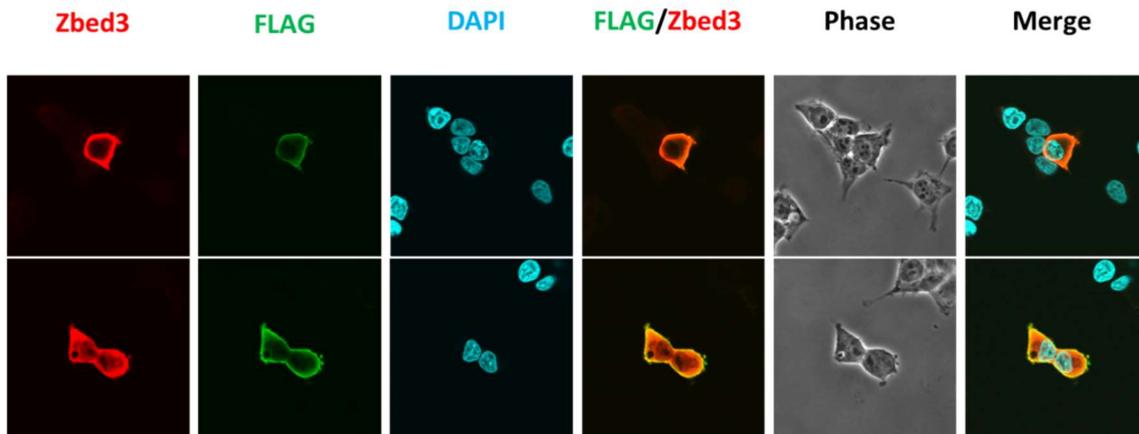


図 6. HEK293T を用いた抗 Zbed3 抗体の評価

HEK293T 細胞に FLAG-Zbed3 を発現させ、抗 Zbed3 抗体および抗 FLAG 抗体で免疫染色を行った。赤：Zbed3；緑：FLAG；青：DAPI。

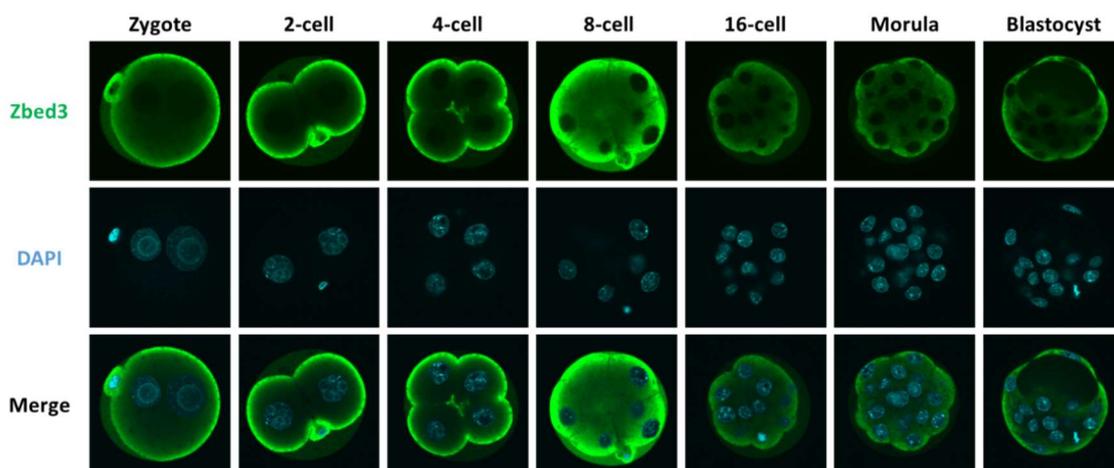


図 7. 着床前胚における Zbed3 タンパク質の発現と細胞内局在

受精卵、2 細胞期、4 細胞期、8 細胞期、16 細胞期、桑実胚、および、胚盤胞における Zbed3 タンパク質の発現パターンと細胞内局在を抗 Zbed3 抗体を用いて蛍光免疫染色法により検討した。緑：Zbed3；青：DAPI。

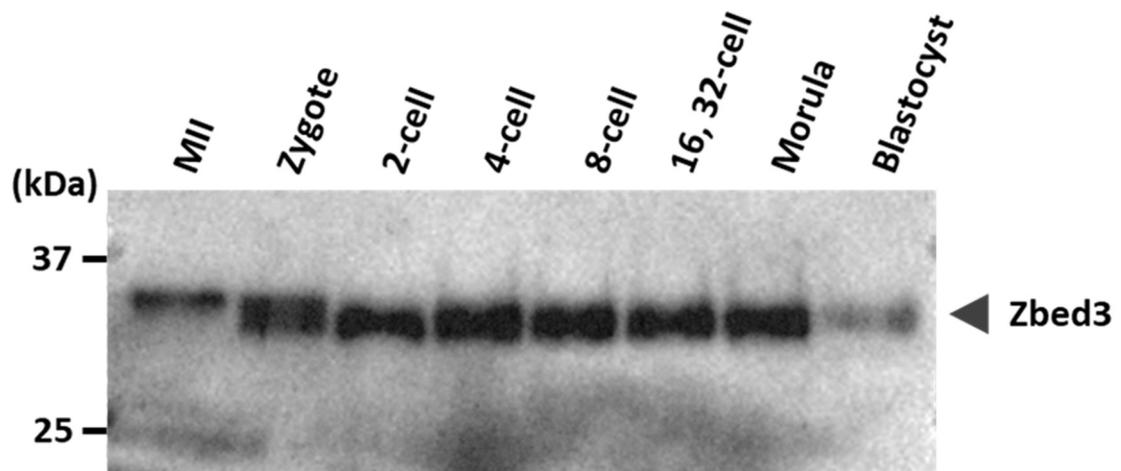
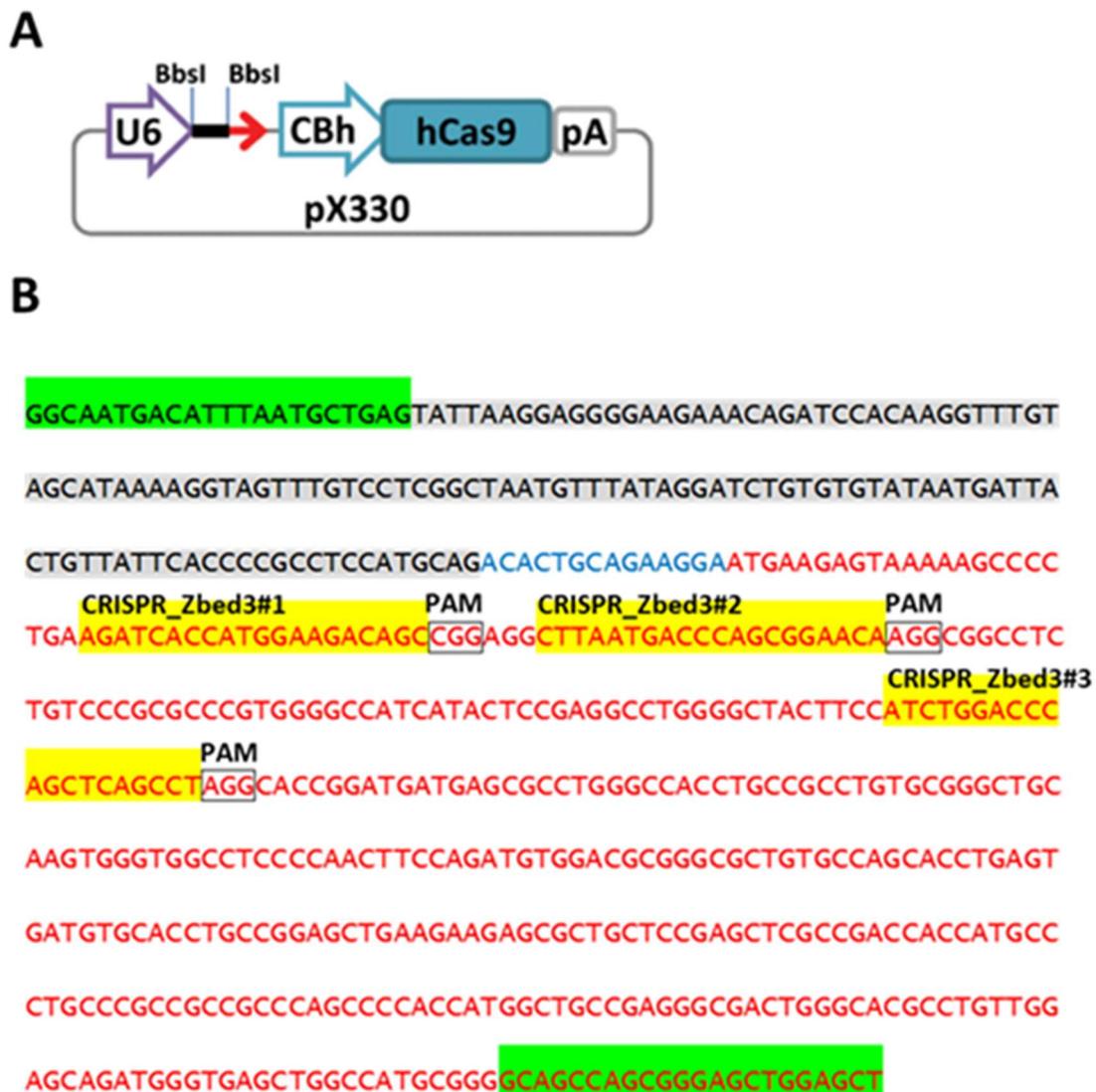


図 8. 着床前胚における Zbed3 タンパク質の発現解析

MII 期卵、受精卵、2 細胞期、4 細胞期、8 細胞期、16-32 細胞期、桑実胚、および胚盤胞における Zbed3 タンパク質の発現をウエスタンブロッティングにより解析した。各レーン 30 個の胚を用いた。



### 図 9. guide RNA の設計

(A) pX330 plasmid map. U6 プロモーター制御下で guide RNA (gRNA) と tracrRNA を、アクチンプロモーターの制御下で Cas9 を発現する。(B) Zbed3 遺伝子の第 1 エクソンの配列。灰色掛け、青字、赤字、および黄色掛けは、それぞれイントロン、非翻訳領域、翻訳領域、および設計した gRNA 領域を示す。緑の領域のプライマーを用いて、マウスゲノムから増幅した PCR 断片を pCAG-EGxxFP に挿入した。(A)は Masiko D, et al: Sci. Rep, 2013 より改変。

Line no.	Sequence	Types of mutation
WT	TGA AGATCACCATGGAAGACAGC CGGAGG	-
1	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
2	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
	TGA AGATC <b>A</b> T <b>C</b> ATGG ----- --- AGG	Deletion and SNP (+/-)
3	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
4	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
5	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
	TGA AGATCACCATGGAAGACAGC <b>CG</b> AAGG	SNP (+/-)
6	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
7	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
	TGA AGATCACCATGGAAGA --- <b>C</b> CGGAGG	Deletion (+/-)
8	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
9	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
	TGA AGATCACCATGGAAGA --- <b>C</b> CGGAGG	Deletion (+/-)
	TGA AGATCACCATGGAAGACAGC <b>CG</b> AAGG	SNP (+/-)
10	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
11	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
	TGA AGATCACCATGGAAGA -----	Deletion (+/-)
	TGA AGATCACCATGGAAGA --- <b>C</b> CGGAGG	Deletion (+/-)
13	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
14	TGA AGATCACCATGGAAGA ----- --- GG	Deletion (+/-)
16	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
	TGA AGATCACCATGGAAGA -----	Deletion (+/-)
	TGA AGATCACCATGGAAGA ----- --- GG	Deletion (+/-)
	TGA AGATCACCATGGAAGA --- <b>C</b> CGGAGG	Deletion (+/-)
17	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
18	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
21	TGA AGATCACCATGGAA ----- --- GG	Deletion (+/-)
23	TGA AGATCACCATGG ----- CGGAGG	Deletion (+/-)
25	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
26	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
	TGA <b>A</b> AGATCACCATGGAAGACAGC CGGAGG	Insertion (+/-)
28	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
30	TGA AGATCACCATGG ----- --- AGG	Deletion (+/-)
	TGA AGATCACCATGG <b>A</b> T ----- <b>AGC</b> CGGAGG	Deletion and SNP (+/-)

図 10. Zbed3 ノックアウトマウスの作製

CRISPR\_Zbed3#1 と CRISPR\_Zbed3#3 の gRNA、tracerRNA、および Cas9 を発現する vector を受精卵の雄性前核にインジェクションした後、偽妊娠マウスに移植した。30 匹の産仔が得られ、シーケンスの結果、22 匹で Zbed3 のゲノムが改変されていることが明らかとなった。

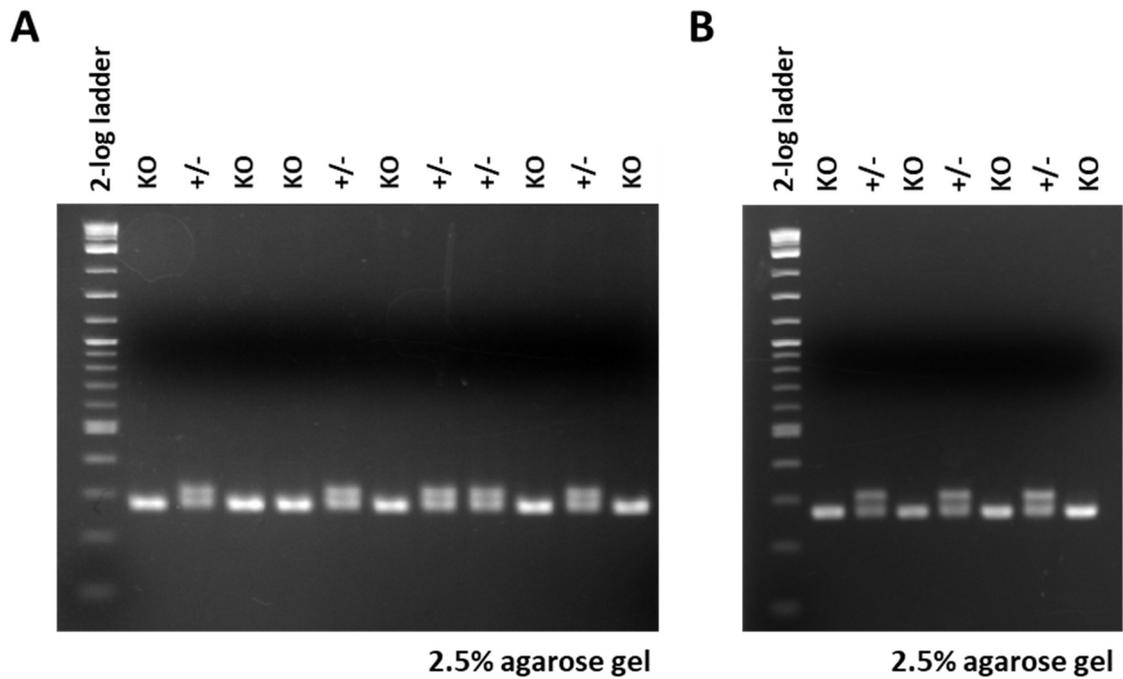


図 11. *Zbed3* ノックアウトマウスのジェノタイプング

オスの *Zbed3* ノックアウトマウスとメスの *Zbed3* ヘテロマウスの交配から得られた産仔の尻尾からゲノムを抽出し、欠失部位を含む領域を増幅するプライマーを用いて PCR を行った。(A) 11 塩基欠失、(B) 13 塩基欠失。

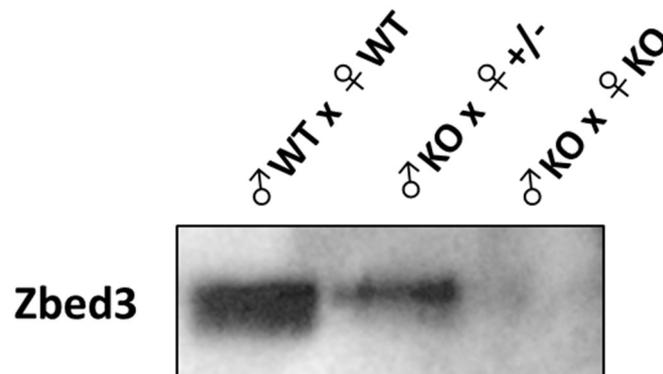


図 12. *Zbed3* ノックアウト胚における *Zbed3* タンパク質の消失

野生型同士、*Zbed3* ノックアウト (13 塩基欠失) のオスと *Zbed3* ヘテロのメス、*Zbed3* ノックアウト同士の交配により得た受精卵を、抗 *Zbed3* 抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。各レーン 40 個の胚を使用した。

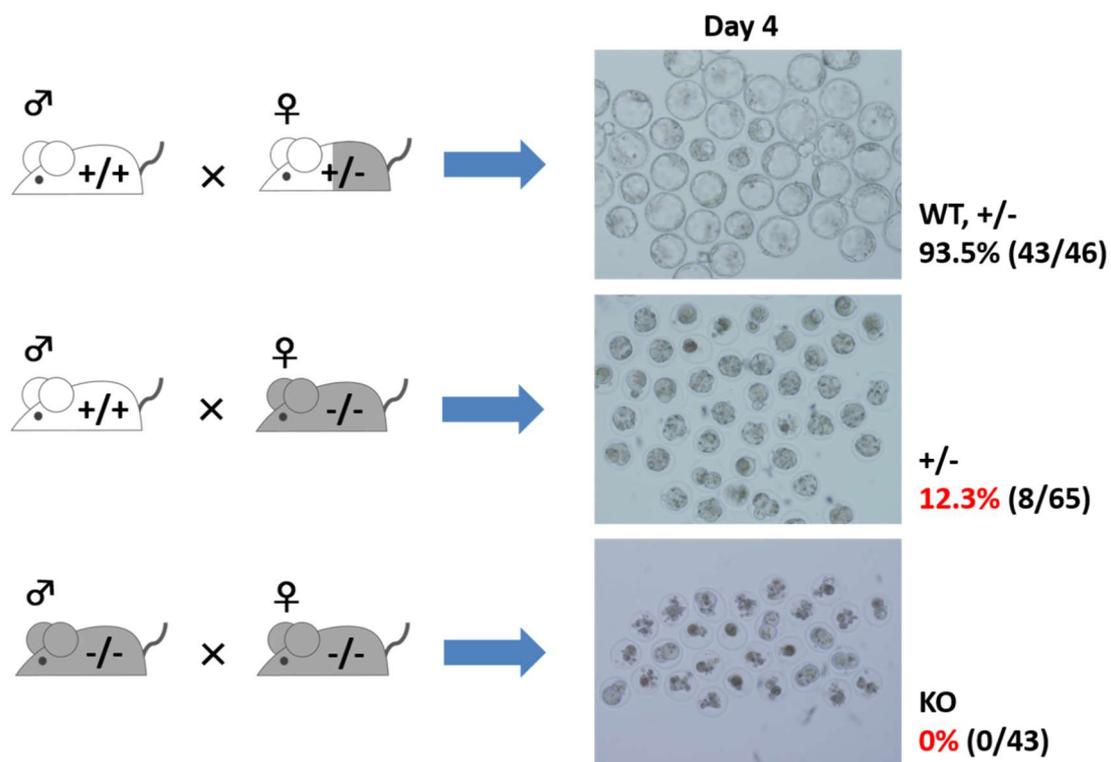


図 13. Zbed3 が着床前胚の胚発生に及ぼす影響

野生型のオスと Zbed3 ヘテロのメス、野生型のオスと Zbed3 ノックアウトのメス、または Zbed3 ノックアウト同士の交配により得た受精卵を試験管内で 4 日間培養した。

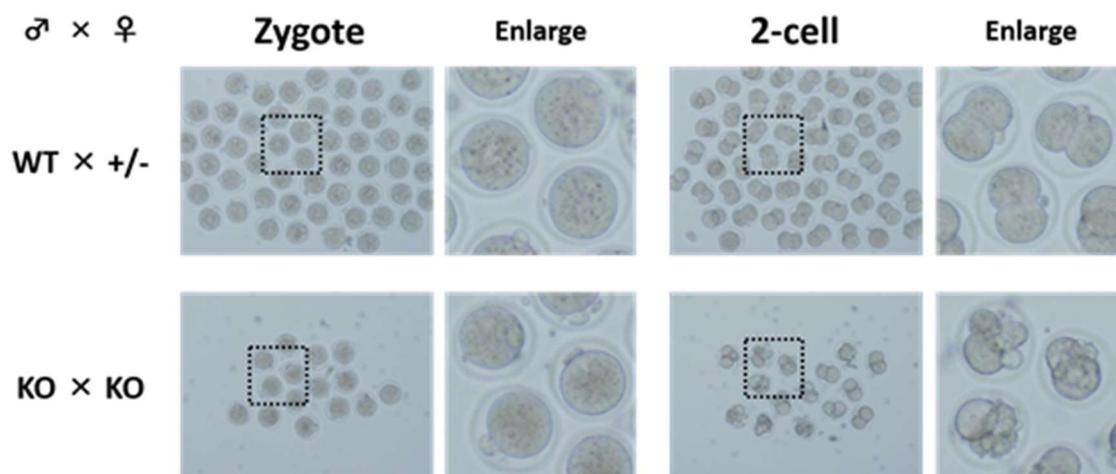


図 14. Zbed3 が最初の卵割に及ぼす影響

野生型のオスと Zbed3 ヘテロのメス、または Zbed3 ノックアウト同士の交配により得た受精卵を培養し、最初の卵割に及ぼす影響を検討した。

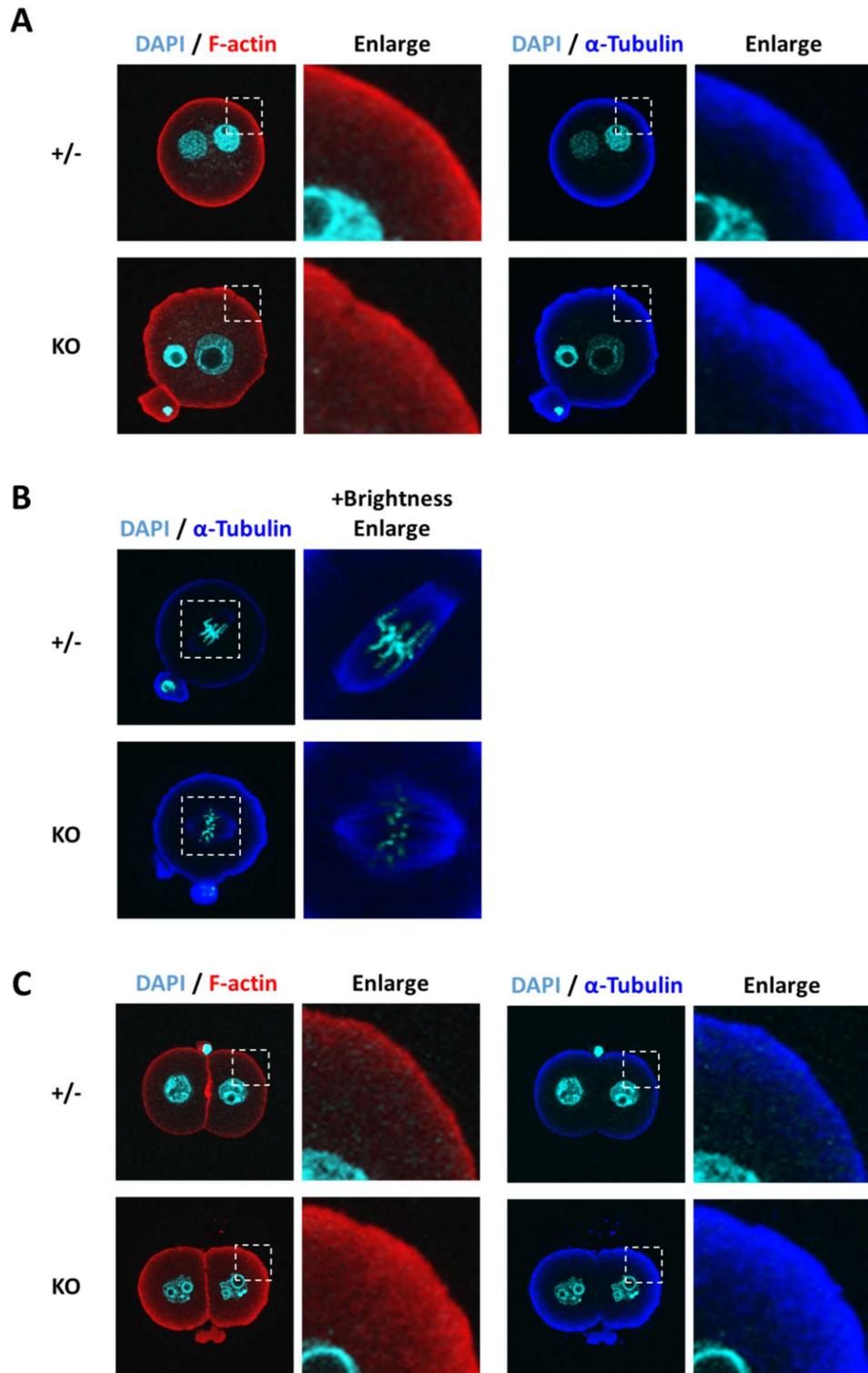


図 15. Zbed3 が細胞骨格と紡錘体形成に及ぼす影響

Zbed3 ノックアウトのオスとヘテロのメスまたは Zbed3 ノックアウト同士を交配して得た受精卵 (A、B)、および 2 細胞期胚 (C) を F-actin と結合する Phalloidin と抗  $\alpha$ -tubulin 抗体を用いて染色した。

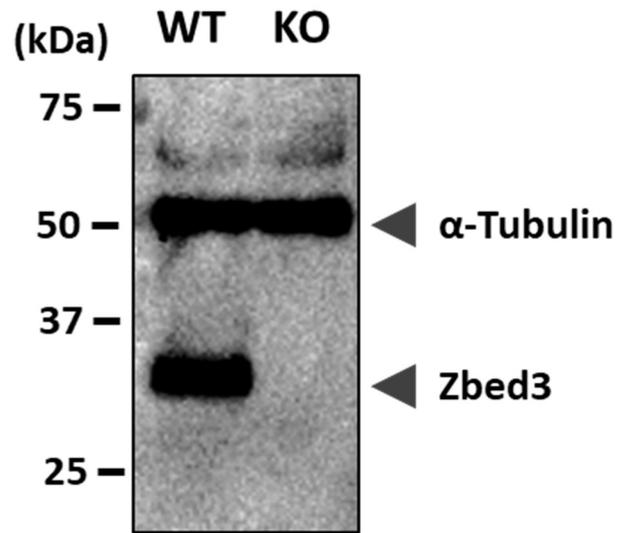
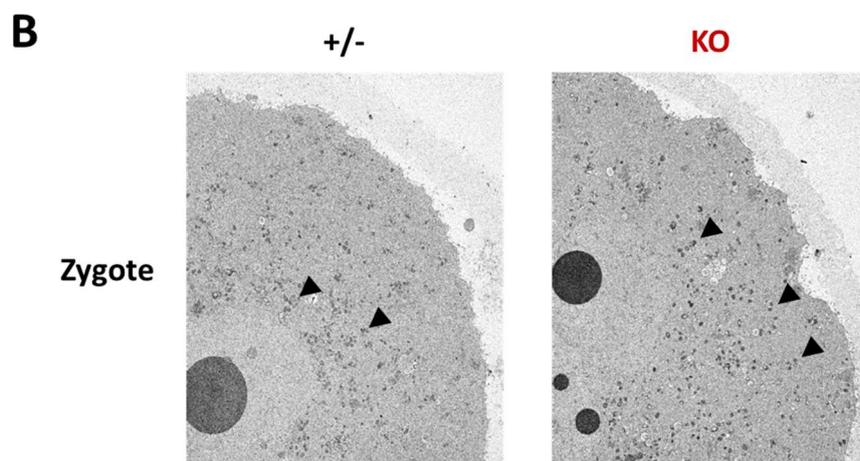
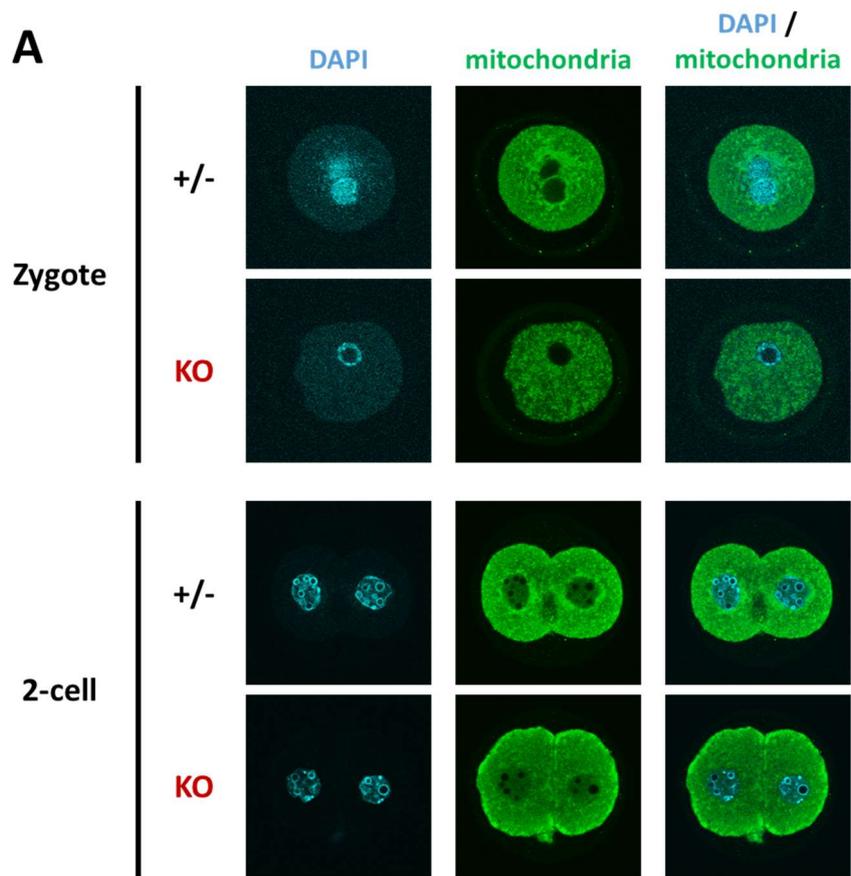


図 16. Zbed3 が  $\alpha$ -tubulin タンパク質の安定性に及ぼす影響

野生型同士または Zbed3 ノックアウト同士を交配して得た 2 細胞期胚 (11 塩基欠失) を抗 Zbed3 抗体と抗  $\alpha$ -tubulin 抗体を用いて染色した。各レーン 30 個の胚を使用した。



**図 17. Zbed3 ノックアウト胚におけるミトコンドリア局在**

(A) Zbed3 ノックアウトのオスとヘテロのメスおよびノックアウト同士を交配させ得た胚を抗 Tom70 抗体を用いて染色した。青 : DAPI ; 緑 : ミトコンドリア。(B) Zbed3 ノックアウトのオスとヘテロのメスおよびノックアウト同士を交配させ得た受精卵におけるミトコンドリア局在を電子顕微鏡を用いて検討した。矢印はミトコンドリアを示す。

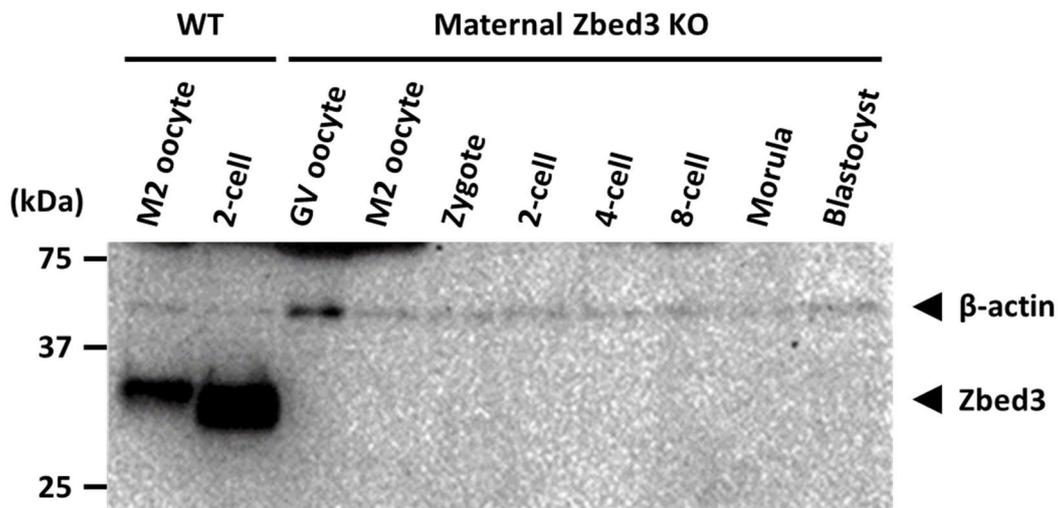


図 18. 母性 Zbed3 タンパク質を欠失した胚における受精後の Zbed3 タンパク質の発現  
 野生型のオスと Zbed3 ノックアウトのメスを交配させて得られた胚を試験管内で培養して受精卵から胚盤胞期までの胚を回収し、ウエスタンブロッティングにより Zbed3 タンパク質の発現を検討した。ポジティブコントロールとして、野生型の胚を用い。ローディングコントロールとして  $\beta$ -actin の検出も行った。

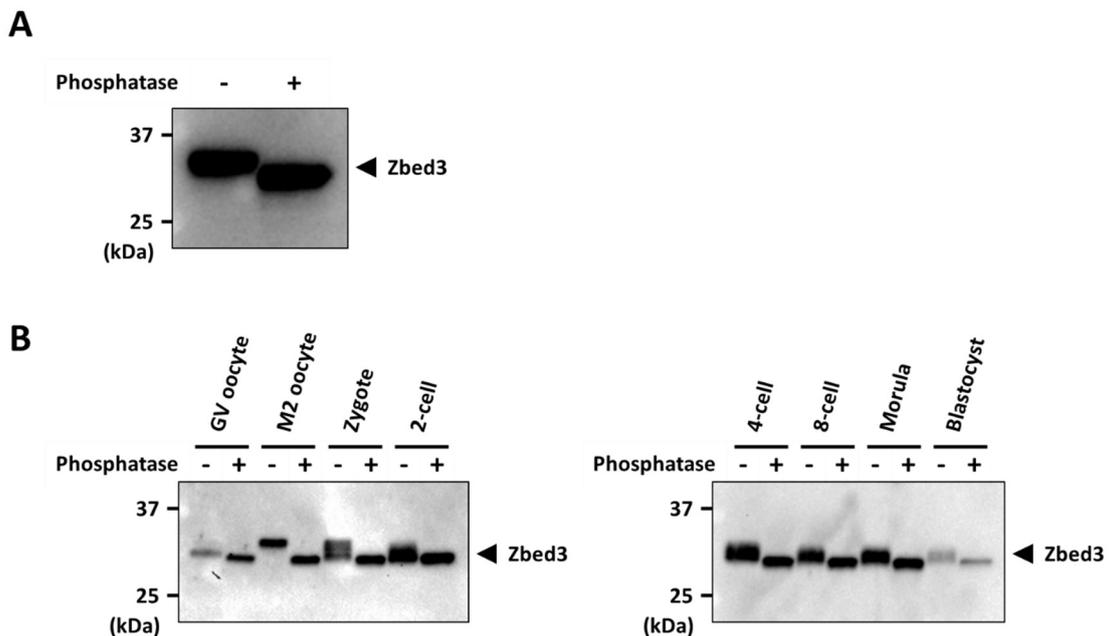


図 19. Zbed3 タンパク質へのリン酸修飾  
 着床前胚に脱リン酸化処理を施し、ウエスタンブロッティングにより Zbed3 タンパク質の分子量を定量した。(A) MII期卵各 80 個に脱リン酸化処理を行った。(B) GV 期卵、MII期卵、受精卵、2 細胞期胚、4 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚および胚盤胞各 30 個に脱リン酸化処理を行った。

## 第2章 Zbed3 の Sub-Cortical Maternal Complex (SCMC) への関与

### 緒言

着床前胚における Zbed3 タンパク質の発現パターンと細胞内局在を抗 Zbed3 抗体を用いた蛍光免疫染色法により検討したところ、受精卵から 4 細胞期胚において Zbed3 は細胞間接着部位を除く細胞皮質下に局在していることが明らかになった (図 7)。この特徴的な局在は卵子の形成過程で必須のタンパク質複合体である Sub-Cortical Maternal Complex (SCMC)<sup>14,19,20,21</sup> を構成する Floped (Factor located in oocytes permitting embryonic development)<sup>17,18</sup>、Mater<sup>19,20</sup>、Tle6 (a putative transcriptional co-repressor)<sup>21,22</sup>、Filia (KH domain containing 3, subcortical maternal complex member; official name Khdc3)<sup>23,19</sup> の細胞内局在と類似している (図 20)。また、この SCMC の構成タンパク質は欠失することで最初の卵割前後に発生が停止し、不均等な割球を持つ胚や片側の割球が退縮した胚が観察されることが報告されている<sup>20</sup>。

Zbed3 タンパク質と SCMC 構成タンパク質の局在が類似していること、また Zbed3 ノックアウト胚において SCMC 構成タンパク質を欠失した胚と同様の表現型を示すことから、第2章では Zbed3 が SCMC に関与するかどうかを明らかにすることを目的に研究を行った。

## 結果

### 2-1. Zbed3 と SCMC との相互作用

Zbed3 タンパク質の細胞内局在は、初期の着床前胚において SCMC<sup>14,19,20,21</sup> を構成する Floped (Factor located in oocytes permitting embryonic development)<sup>17,18</sup>、Mater<sup>19,20</sup>、Tle6 (a putative transcriptional co-repressor)<sup>21,22</sup>、Filia (KH domain containing 3, subcortical maternal complex member ; official name Khdc3)<sup>23,19</sup> の細胞内局在と類似していた (図 20)。そこで、Zbed3 と SCMC の構成タンパク質である Floped、Mater、Tle6、および Filia が相互作用するかどうかを免疫沈降法により検討した。その結果、Floped、Tle6、および Filia については Zbed3 との結合が認められなかった (図 21B、C、D)。一方、Mater の共沈物の中に Zbed3 が含まれることが示された (図 21A)。しかし、Zbed3 の共沈物の中に Mater が存在するかどうかは明確な結果が得られなかった。Mater の共沈物の中に Zbed3 が存在することから、Zbed3 は Mater と相互作用する可能性が示唆された。

### 2-2. 2 細胞期単離割球における Zbed3 局在変化

SCMC の構成タンパク質である Filia と Mater は、Ca<sup>2+</sup>を除去した培地で 2 細胞期胚を培養することにより割球を単離し、細胞間接着部位を消失させた場合には、細胞が接着していた部分にも再び局在することが報告されている (図 22A、B)<sup>19</sup>。そこで、Zbed3 についても同様の実験を行ったところ、2 細胞から単離した割球では、細胞が接着していた部分にも Zbed3 が局在することが明らかとなった (図 22C)。

### 2-3. Zbed3 ノックアウト胚における SCMC 構成タンパク質の局在変化

SCMC の構成タンパク質である Mater、Floped または Tle6 を欠失した胚では SCMC 複合体形成を行えず、他の構成タンパク質の局在を細胞皮質下から細胞質側に拡散させることが報告されている (図 23A)<sup>14</sup>。Zbed3 が SCMC の新規の構成タンパク質であることが示唆されたため、SCMC 構成タンパク質の局在に Zbed3 が影響を与えるかどうかを、Zbed3 ノックアウト胚を抗 Floped 抗体を用いて蛍光免疫染色法により検討した。その結果、Zbed3 ノックアウトのオスとヘテロのメスを交配させ得た 2 細胞期胚において Floped は Zbed3 と同様に細胞間接着部位を除く細胞皮質下に局在していた (図 23B)。一方でノックアウト同士

を交配させ得た胚ではその局在が細胞質側に拡散していた (図 23B)。Zbed3 ノックアウト胚における Floped の細胞質側への拡散の程度は、これまでに報告されている Mater および Tle6 を欠失した胚で認められた Floped 局在変化と比べた場合には小さかった。

## 考察

着床前胚において Zbed3 タンパク質は受精卵から胚盤胞期まで細胞間接着部位を除く細胞皮質下に局在しているが、8 細胞期以降はその局在が細胞質へと大規模に変化する (図 7)。初期の着床前胚で認められるこの特徴的な局在から類似の細胞内局在を示す SCMC の構成タンパク質との関係が示唆され、SCMC の構成タンパク質である Mater と Zbed3 が相互作用することを明らかにした (図 21A)。さらに 2 細胞期胚から単離した割球において Zbed3 の局在が変化すること (図 22C)、また Zbed3 ノックアウト胚において SCMC 構成タンパク質の局在が変化することから (図 23B)、Zbed3 は SCMC の新規の構成タンパク質であり、SCMC と協調して働く可能性が考えられた。また、Zbed3 のノックアウト胚では、他の Mater や Tle6 のノックアウト胚で観察された SCMC 複合体の形成不全が生じないことから、Zbed3 は SCMC の構成成分ではあるが、SCMC 複合体の形成には必須でない可能性が考えられた。実際に、SCMC の構成成分として知られている Filia は SCMC の構成成分ではあるが SCMC 複合体の形成には必須でないことが報告されている<sup>14</sup>。

Zbed3 は細胞内局在を 8 細胞期を境に大規模に変化させるが、SCMC 構成タンパク質は受精卵から胚盤胞期まで細胞間接着部位を除く細胞皮質下に局在し続ける (図 20)<sup>20</sup>。このことから、Zbed3 は局在が変化する 8 細胞期以降は SCMC から乖離して、異なる機能を担う可能性が示唆された。

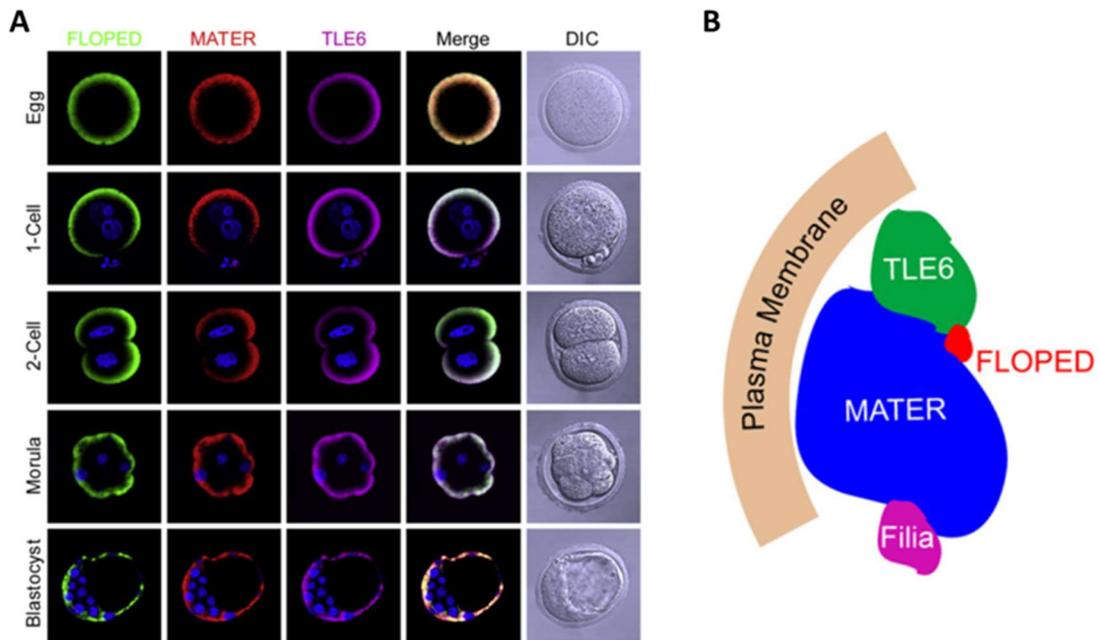


図 20. 着床前胚における FLOPED, MATER, TLE6 の細胞内局在

(A) Sub-cortical maternal complex (SCMC) を構成する FLOPED, MATER, TLE6 の着床前胚における細胞内局在。緑：FLOPED；赤：MATER；紫：TLE6。(B) 卵形成の間に形成された SCMC のモデル。Li L. et al., *Developmental cell*, 2008 より改変。

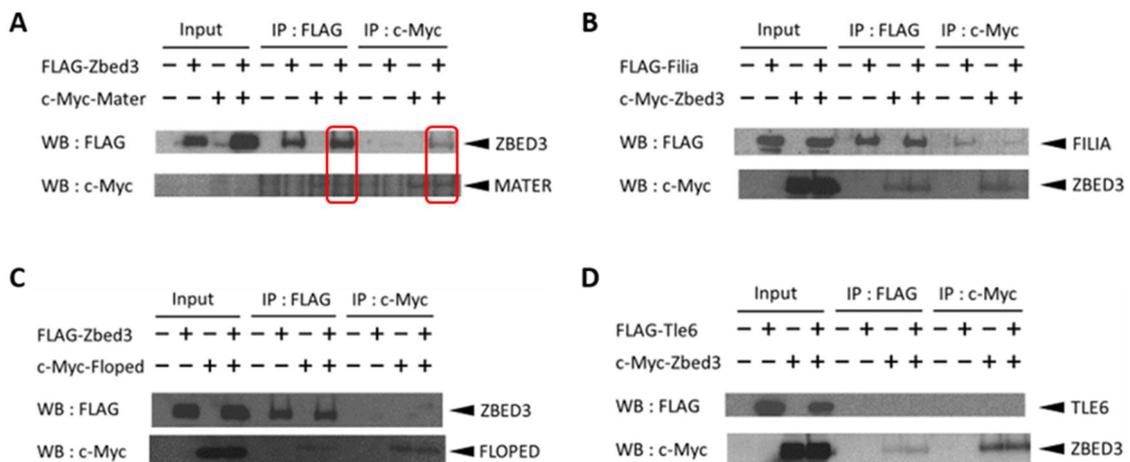


図 21. Zbed3 と SCMC 構成タンパク質の相互作用の検討

HEK293T 細胞に FLAG または Myc タグを付加した Zbed3 と Mater (A)、Filia (B)、Floped (C)、または Tle6 (D) を発現させ、抗 FLAG 抗体および抗 Myc 抗体で免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングを行った。

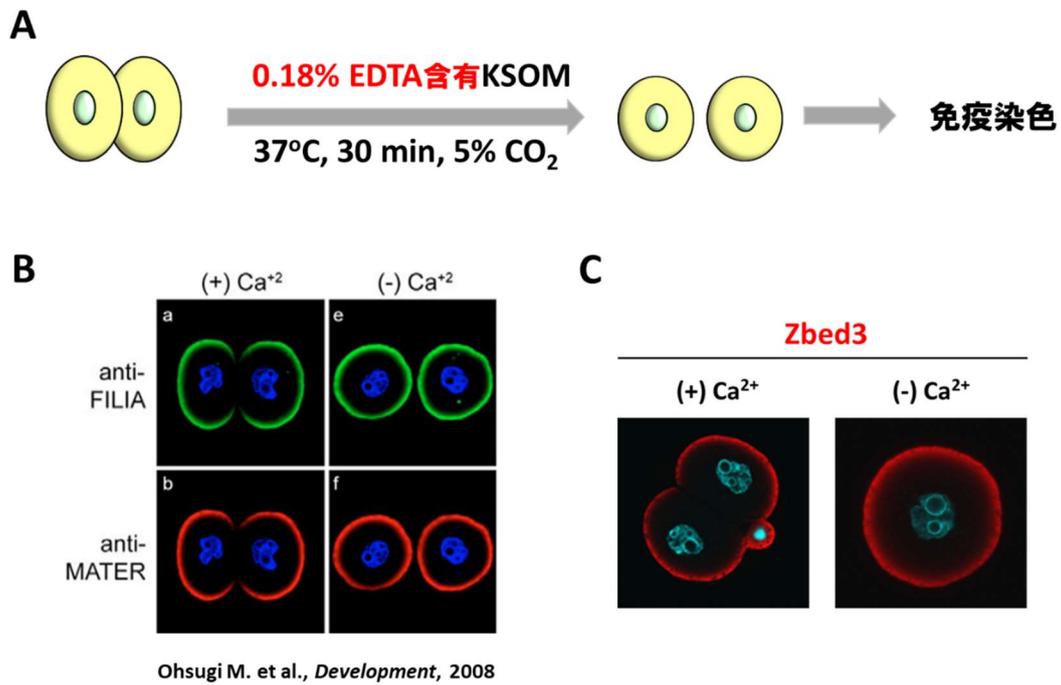
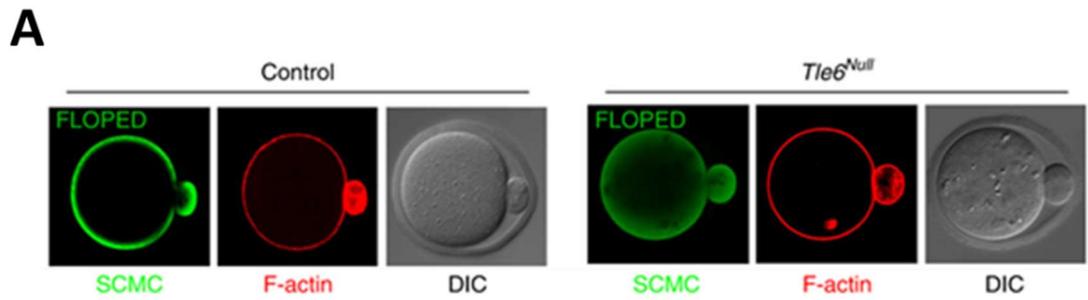


図 22.2 細胞期から単離した割球における Zbed3 の細胞内局在

(A) 2 細胞期胚を 0.18% EDTA 含有 KSOM 培地で培養することにより割球を単離した。  
 (B) SCMC 構成成分である Filia と Mater は単離割球において局在が変化することが報告されている。(C) 単離した割球を、抗 Zbed3 特異的抗体を用いて免疫染色を行った。  
 赤：Zbed3；青：DAPI。



Yu X et al., *Nature Communications*, 2014

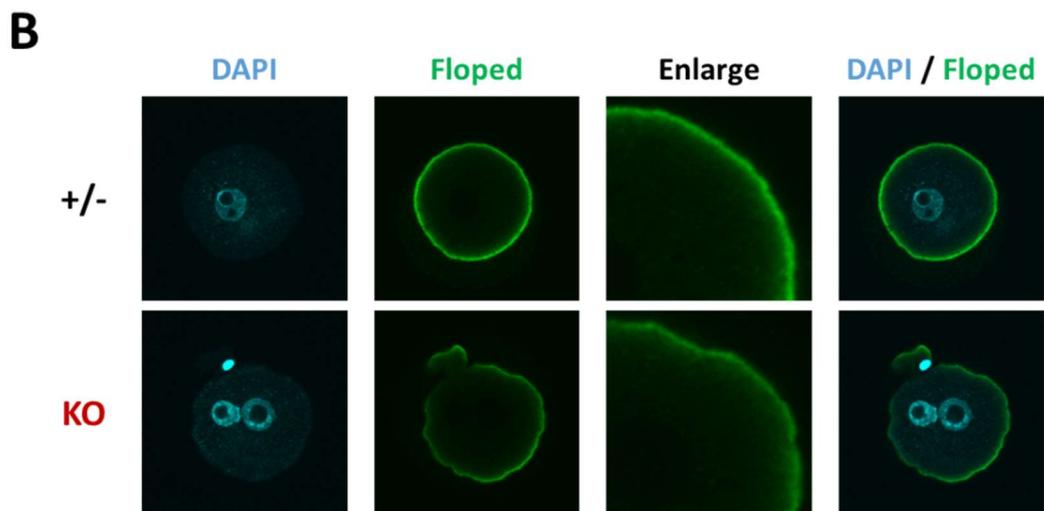


図 23. *Zbed3* ノックアウト受精卵における FLOPED 局在

(A) *Tle6* を欠失した受精卵における Floped の局在変化。緑：Floped；赤：F-actin。  
 Yu X et al., *Nature Communications*, 2014 より改変。(B) *Zbed3* を欠失した受精卵における  
 Floped の局在変化。青：DAPI；緑：Floped。

### 第3章 Zbed3 の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルへの関与

#### 緒言

Zbed3 は培養細胞において Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの制御因子である Axin と相互作用し、このシグナルを正に制御する遺伝子として同定された<sup>13</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは分泌性タンパク質である Wnt が細胞膜上に存在する受容体である Frizzled に結合することにより活性化するシグナル伝達経路であり、細胞運命、増殖および遊走などの多岐にわたる細胞プロセスに関与することが知られている。

Wnt 非存在下 (Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル不活性化状態) において、細胞質中の  $\beta$ -catenin はキナーゼである GSK3 およびアダプタータンパク質である Axin と APC からなる  $\beta$ -catenin 分解複合体を形成し、キナーゼである CK1 とともに常にリン酸化を受ける。その後、 $\beta$ -TrCP/Skp 経路を介してユビキチン化され、プロテアソーム系により分解される。そのため、Wnt 非存在下において細胞質中の  $\beta$ -catenin 量は低く保たれている。一方で Wnt 存在下 (Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル活性化状態) において、細胞外の Wnt は細胞膜上の受容体である Frizzled に結合すると同じく細胞膜上の LRP5/6 と Wnt 複合体を形成する。これにより Dishevelled は連続的にリン酸化、ポリユビキチン化、重合を生じ活性化する。また、 $\beta$ -catenin 分解複合体は細胞膜近傍に移行し、Axin の分解と GSK3 の離脱が生じる。そのため  $\beta$ -catenin がリン酸化されなくなり、 $\beta$ -catenin は分解されず、細胞質中で蓄積していく。細胞質で飽和した  $\beta$ -catenin は核内へと移行して LEF/TCF 転写因子と結合することで標的遺伝子の発現を制御する。しかしながら、このシグナルの複雑さからこれらのカスケードの詳細については未だ不明な点が多い。

Axin は LRP5/6 のアミノ酸配列に存在する PPP(S/T)PX(T/S)モチーフを介して相互作用することが知られており、Axin と相互作用する新規のタンパク質として PPPSPT モチーフを有する Zbed3 が同定された<sup>13</sup>。培養細胞における免疫沈降法により Zbed3 は Axin と相互作用し、GSK3 との共発現によりこの相互作用は強化されること、また Zbed3 の強制発現により Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化されることが報告された<sup>13</sup>。しかし、発生過程における Zbed3 の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルへの機能については解析されていない。そこで、第3章では生体内における Zbed3 の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルへの関与を明らかにすることを目的に研究を行った。

## 結果

### 3-1. 着床前胚における $\beta$ -catenin の発現と細胞内局在および Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化状態

着床前胚における  $\beta$ -catenin (Total  $\beta$ -catenin) の細胞内局在を検討するために抗  $\beta$ -catenin 抗体を用いた蛍光免疫染色法により検討した。その結果、 $\beta$ -catenin は受精卵から胚盤胞期で発現が認められ、大部分が細胞膜近傍に局在することが明らかとなった (図 24)。さらに、受精卵では核と細胞質に局在が認められ、2 細胞期以降はその局在が顕著に減少していることが明らかとなった (図 24)。また、非リン酸化状態で核に移行する活性化型  $\beta$ -catenin (Active  $\beta$ -catenin) を特異的に認識する抗体を用いて着床前胚における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化状態を検討した。その結果、受精卵から胚盤胞期の細胞膜近傍の局在が認められ、また 4 細胞期までは活性化型  $\beta$ -catenin の核への蓄積が観察された。このことから、初期の着床前胚では Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは活性化状態にあることが明らかとなった (図 25)。

次に培養細胞において Zbed3 との相互作用が報告された Axin についても抗 Axin 抗体を用いた蛍光免疫染色法により発現と局在を検討したところ、受精卵から胚盤胞期まで発現しており、Zbed3 と同様に 4 細胞期胚までは細胞間接着部位を除く細胞膜近傍に局在しており、8 細胞期以降は細胞質へと局在が変化していた (図 26)。Zbed3 と Axin は 4 細胞期を境に大規模に局在を変化させ (図 27 上段、中段)、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化状態も 4 細胞期を境に不活性化することから (図 27 下段)、Zbed3 は着床前胚においても Axin と細胞膜近傍で相互作用することにより、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化に関与している可能性が示唆された。

### 3-2. Zbed3 ノックアウト胚における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化状態

着床前胚においても Zbed3 は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化に関与している可能性が示唆されたことから、Zbed3 ノックアウト 2 細胞期胚における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化状態を蛍光免疫染色法により検討した。その結果、Zbed3 ノックアウトのオスとヘテロのメスおよびノックアウト同士を交配させ得た 2 細胞期胚を抗  $\beta$ -catenin 抗体を用いて検討したところ、 $\beta$ -catenin の核内への蓄積がノックアウト胚で顕著に減少していた (図 28A)。また、この結果を詳細に検

討するために  $\beta$ -catenin の蛍光強度を細胞内の矢印 (図 28A) に沿って定量化したところ、核内の  $\beta$ -catenin 量がノックアウト胚ではヘテロ胚と比較して顕著に低下していた (図 28B)。また、活性化型  $\beta$ -catenin に対する抗体を用いた場合にも、核内の活性化型  $\beta$ -catenin 量がノックアウト胚ではヘテロ胚と比較して低下していた (図 28C)。活性化型  $\beta$ -catenin の蛍光強度を細胞内の矢印 (図 28D) に沿って定量化したところ、核内の活性化型  $\beta$ -catenin 量がノックアウト胚ではヘテロ胚と比較して低下していた (図 28D)。さらに、Zbed3 ノックアウト 2 細胞期胚における、 $\beta$ -catenin 量と活性化型  $\beta$ -catenin 量をウエスタンブロッティングにより検討した。その結果、 $\beta$ -catenin 量は減少していたが、活性化型  $\beta$ -catenin 量は変化していなかった (図 29B)。これらの結果から、着床前胚において Zbed3 は初期の着床前胚において  $\beta$ -catenin の量は制御するが、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化状態には大きな影響を与えない可能性が示唆された。

### 3-3. Zbed3 ノックアウト胚における Axin 局在

Zbed3 は培養細胞において Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルにおける制御因子である Axin と相互作用することにより、このシグナルを活性化することが報告されている<sup>13</sup>。そこで、着床前胚においても Zbed3 は Axin と関与しているのかを検討するために Zbed3 ノックアウトのオスとヘテロのメスおよびノックアウト同士を交配させ得た 2 細胞期胚における Axin の発現と細胞内局在を抗 Axin 抗体を用いた蛍光免疫染色法により検討した (図 30)。その結果、ノックアウト胚において Axin は細胞質側に顕著に拡散していることが示された (図 30A)。Axin の蛍光強度を矢印 (図 30B) に沿って定量化したところ、ノックアウト胚において Axin は細胞質側に顕著に拡散していることが明らかとなった (図 30B)。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化状態にある細胞では、 $\beta$ -catenin 分解複合体は細胞膜近傍に局在する (図 31 左)。一方で、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが不活性化状態にある細胞では、細胞質中の  $\beta$ -catenin は Axin を含む  $\beta$ -catenin 分解複合体によりリン酸化され、プロテアソームを介して分解される (図 31 右)。Zbed3 ノックアウト胚において Axin の局在が細胞膜近傍から細胞質へと移行することから、Zbed3 を欠失した胚では Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは不活性化状態であることが考えられる。これらの結果から、Zbed3 は着床前胚においても Axin との相互作用を介して、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性制御に関与していることが示唆された。

#### 3-4. Zbed3 発現 ES 細胞における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルへの影響

Zbed3 は培養細胞において Axin と相互作用することにより Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを活性化することが報告されている<sup>13</sup>。この培養細胞は体細胞由来の HEK293T 細胞と NIH3T3 細胞を用いて行われていることから、胚盤胞の内部細胞塊から樹立され着床前胚に近い性質を有する ES 細胞を用いて Zbed3 が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルに及ぼす影響を検討した。その際、先行研究により作製された Dox 依存的に Venus と Zbed3 を共発現する ES 細胞を用いて検討した (図 32、2018 年、服部留奈、卒業論文)。その結果、抗  $\beta$ -catenin 抗体を用いて蛍光免疫染色法により検討したところ、Zbed3 発現 ES 細胞において  $\beta$ -catenin のシグナルが細胞質および核において顕著に増加していた (図 33A)。また、活性型  $\beta$ -catenin においても Zbed3 発現 ES 細胞において活性型  $\beta$ -catenin のシグナルが細胞間接着部位、細胞質および核において顕著に増加していた (図 33B)。また、Axin と GSK3 の発現と局在についても特異的抗体を用いて検討したところ、Zbed3 発現 ES 細胞において Axin の発現と局在に差は認められなかったが (図 34A)、GSK3 においては顕著にシグナルが低下していることが明らかになった (図 34B)。前述したように、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化状態にある細胞では、GSK3 は  $\beta$ -catenin 分解複合体として細胞膜近傍に移行し、細胞質に存在する  $\beta$ -catenin をリン酸化できないことが知られている。これらのことから、Zbed3 の発現により  $\beta$ -catenin 分解複合体が不安定化し、GSK3 が分解される可能性が示唆された。以上のことから、Zbed3 発現 ES 細胞において  $\beta$ -catenin と活性型  $\beta$ -catenin の細胞質での蓄積と核への移行、また GSK3 の消失が認められたことから、Zbed3 は ES 細胞においても Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化に関与していることが明らかとなった。

## 考察

Zbed3 は培養細胞において、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの制御因子である Axin と相互作用する新規のタンパク質として同定され、Zbed3 を強制発現させた培養細胞においてこのシグナルを活性化することが報告された<sup>13</sup>。本研究では、全能性で特異的に高発現する遺伝子である Zbed3 が着床前胚においても Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルに関与するのかを明らかにすることを目的に研究を行った。

着床前胚における  $\beta$ -catenin および Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化状態を蛍光免疫染色法により検討したところ、受精卵から 4 細胞期において Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは活性化状態であり、8 細胞期を境に不活性化していることを明らかにした (図 24、25)。また、培養細胞において Zbed3 と相互作用することが報告されている Axin の着床前胚における発現と局在を検討したところ、Zbed3 と同様に受精卵から胚盤胞期まで発現しており、4 細胞期までは細胞間接着部位を除く細胞膜近傍に局在し、8 細胞期以降はその局在が細胞質へと大規模に変化していた (図 26)。Zbed3 の局在が Axin の局在と類似していること、また Zbed3 の局在が変化する 8 細胞期に Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは不活性化することから、着床前胚においても Zbed3 は細胞膜近傍で Axin と相互作用することにより Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを活性化している可能性が示唆された (図 27)。

着床前胚において Zbed3 が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化に関与している可能性が示唆されたことから、Zbed3 ノックアウト胚における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化状態をこのシグナルが活性化状態である 2 細胞期胚を用いて検討した。その結果、Zbed3 ノックアウト胚において  $\beta$ -catenin と活性型  $\beta$ -catenin の核内におけるシグナルが低下していた (図 28A、B)。また、ウエスタンブロッティングにより  $\beta$ -catenin 量を検討した場合において、ノックアウト胚で  $\beta$ -catenin 量は低下していたが、活性型  $\beta$ -catenin 量に差は認められなかった (図 29)。これらのことから、初期の着床前胚において Zbed3 の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの制御は限定的である可能性が考えられた。さらに Zbed3 ノックアウト胚における Axin 局在を蛍光免疫染色により検討したところ、ノックアウト胚で細胞膜近傍の局在が細胞質へと拡散していることが明らかになった (図 30)。Axin を構成タンパク質とする  $\beta$ -catenin 分解複合体は細胞質に存在する  $\beta$ -catenin へのリン酸化を介してプロテアソームにより分解する (図 31)。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化状態である受精卵から 4 細胞期において Axin は細胞膜近傍に局在しており、 $\beta$ -

catenin 分解複合体は細胞膜近傍で  $\beta$ -catenin のリン酸化を抑制されていることが予想される。Zbed3 ノックアウト胚において Axin の局在が細胞質へと拡散することは  $\beta$ -catenin 分解複合体が細胞質で  $\beta$ -catenin にリン酸化を行っていると考えられる。その結果、ノックアウト胚では Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは不活性化されたことが考えられる。しかし、蛍光免疫染色およびウエスタンブロッティングの結果から Zbed3 ノックアウト胚における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの低下は限定的であったため、今後  $\beta$ -catenin target 遺伝子の発現に影響を及ぼすかどうかを qRT-PCR や RNA-seq 解析により明らかにするとともに、Zbed3 ノックアウト胚における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの制御因子の発現と局在について解析する必要があると考えられる。

次に培養細胞において Zbed3 の強制発現により Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化が生じることが報告されているが、より着床前胚に近い性質を有する ES 細胞においてもこのシグナルを活性化するのかを検討した。その結果、Zbed3 発現 ES 細胞において  $\beta$ -catenin と活性型  $\beta$ -catenin の細胞膜近傍、細胞質および核へのシグナルが顕著に増加していることが明らかになった (図 33)。また、 $\beta$ -catenin 分解複合体の構成タンパク質である Axin とキナーゼである GSK3 の発現と局在を蛍光免疫染色法により検討したところ、Zbed3 発現細胞において Axin の発現と局在に Zbed3 非発現細胞との差は認められないが (図 34A)、GSK3 のシグナルが消失していることが明らかになった (図 34B)。これらの結果から、ES 細胞において Zbed3 は  $\beta$ -catenin にリン酸化して分解させる GSK3 の不安定化を引き起こすことで、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化制御に重要な役割を担うことを明らかにした。

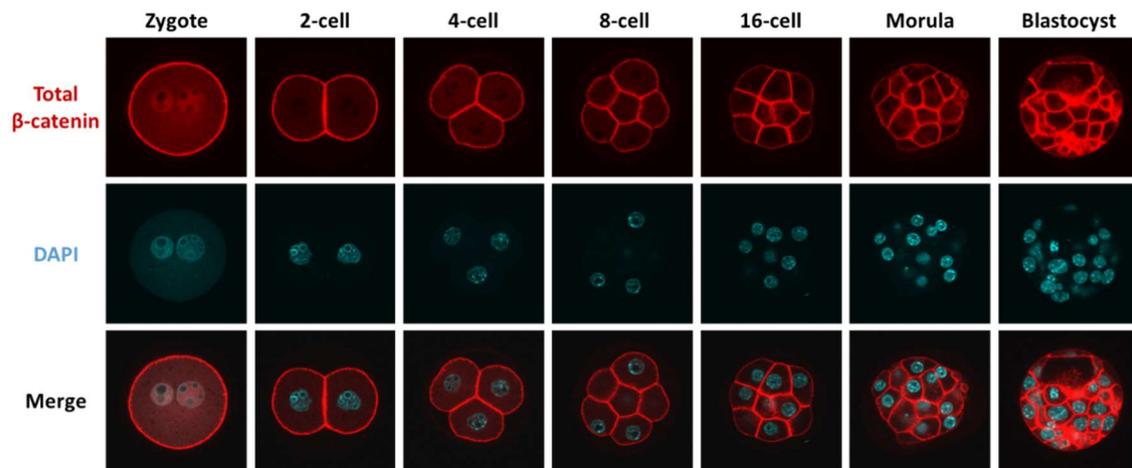


図 24. 着床前胚における  $\beta$ -catenin の発現と細胞内局在

受精卵から胚盤胞期までの  $\beta$ -catenin の発現と細胞内局在を抗  $\beta$ -catenin 抗体を用いて検討した。赤：Total  $\beta$ -catenin；青：DAPI。

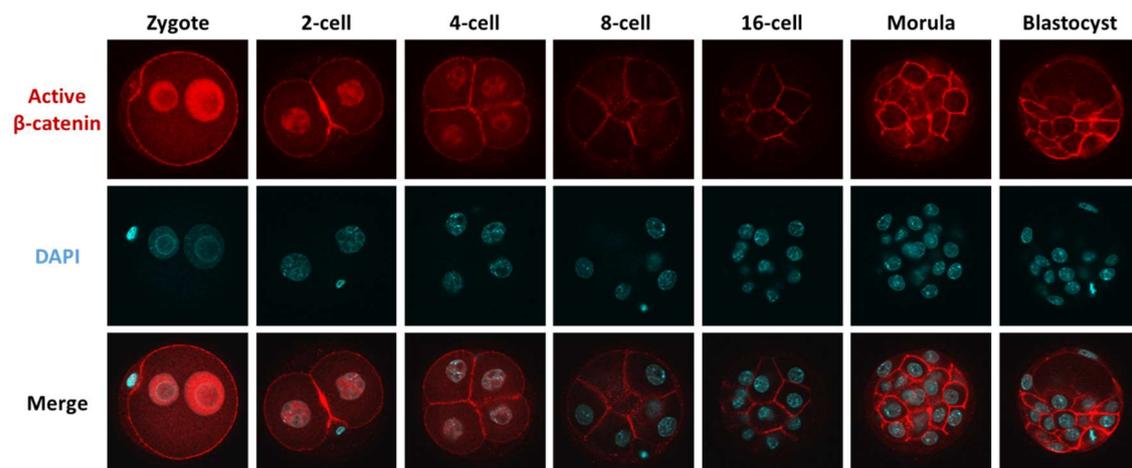


図 25. 着床前胚における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化状態

受精卵から胚盤胞期までの Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化状態を活性化型  $\beta$ -catenin に対する特異的抗体を用いて検討した。赤：Active  $\beta$ -catenin；青：DAPI。

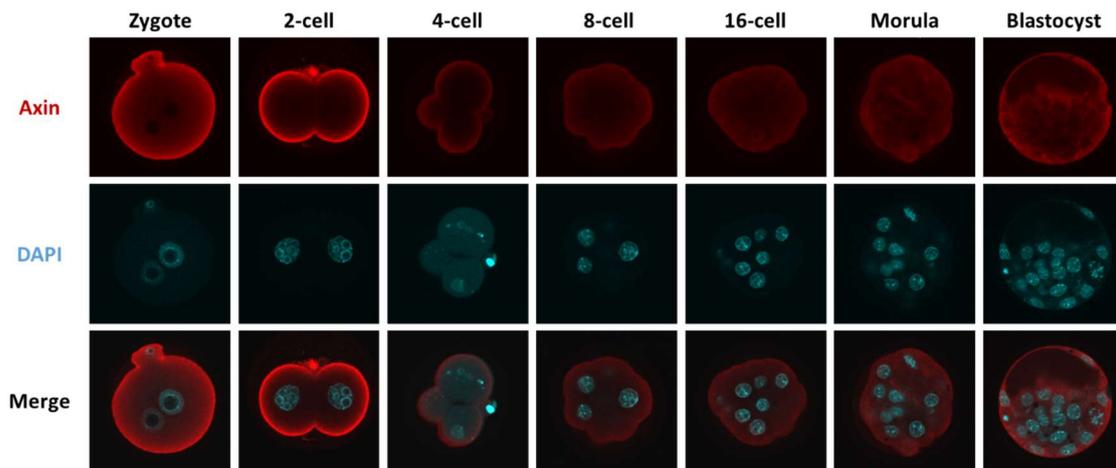


図 26. 着床前胚における Axin の発現と細胞内局在

受精卵から胚盤胞期までの Axin の発現と細胞内局在を Axin に対する特異的抗体を用いて検討した。赤：Axin；青：DAPI。

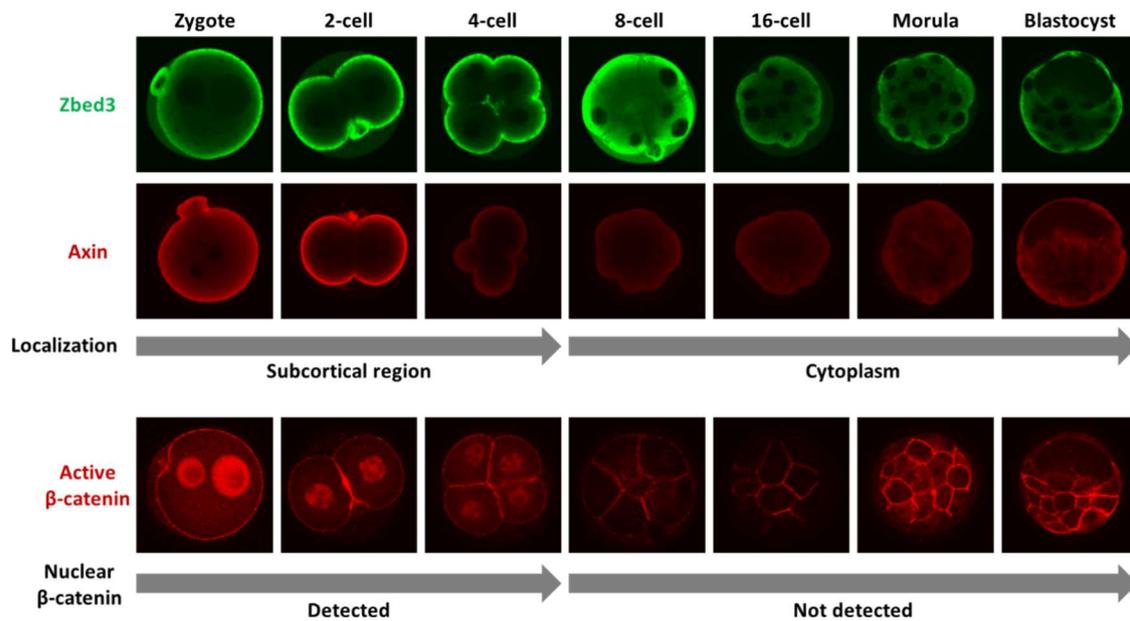


図 27. 着床前胚における Zbed3 と Axin 局在および Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの関係

着床前胚における Zbed3 と Axin の局在および Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化状態。

(上段) 緑：Zbed3。(中段) 赤：Axin。(下段) 赤：Active  $\beta$ -catenin。



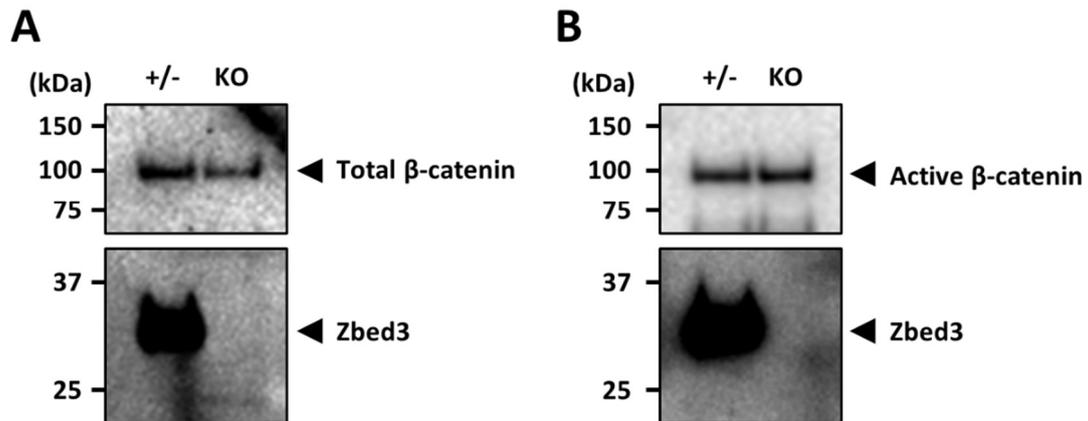


図 29. Zbed3 が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性状態に及ぼす影響

Zbed3 ノックアウトのオスとヘテロのメスまたはノックアウト同士を交配させて得た 2 細胞期胚を用いてウエスタンブロッティングにより解析した。各レーン 40 個の胚を用いた。

(A) 抗  $\beta$ -catenin 抗体と抗 Zbed3 抗体。(B) 抗 active- $\beta$ -catenin 抗体と抗 Zbed3 抗体。

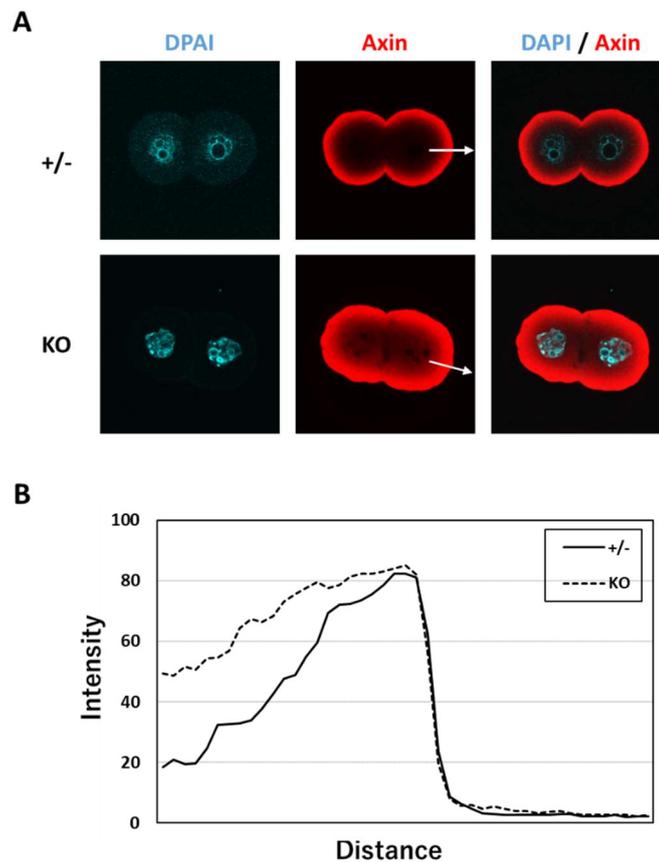


図 30. Zbed3 ノックアウト胚における Axin の局在

(A) Zbed3 ヘテロおよびノックアウト 2 細胞期胚を抗 Axin 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。青 : DAPI ; 赤 : Axin。(B) Axin の蛍光強度を矢印に沿って定量化した。

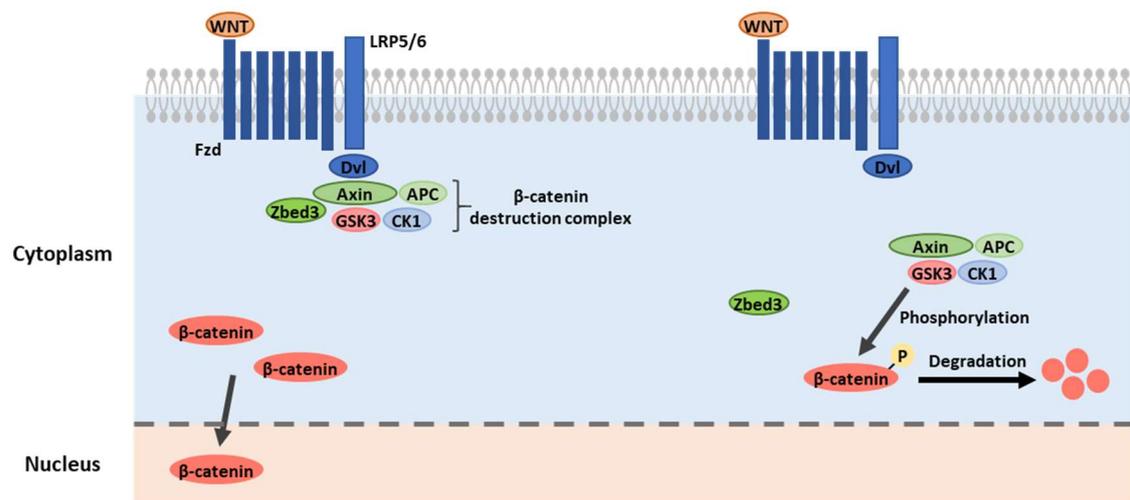


図 31. Wnt/β-catenin シグナルにおける Zbed3 の役割

Wnt/β-catenin シグナルにおいて Zbed3 が担うと予想される役割の概略図。

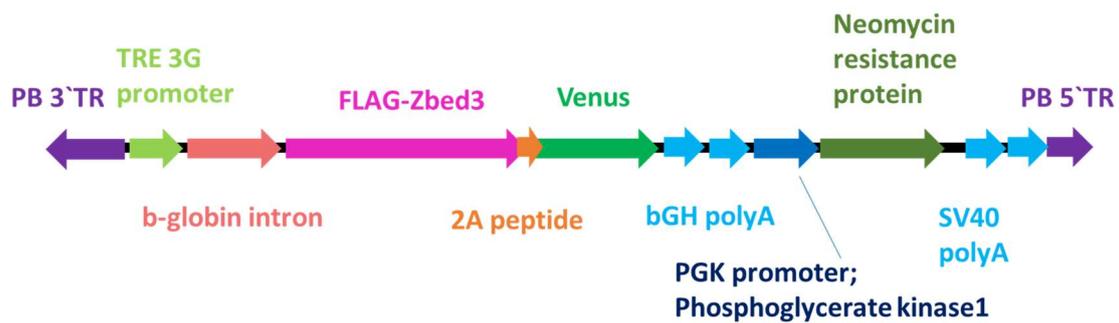


図 32. Dox 依存的に Zbed3 と Venus を共発現できるベクター

PB-TRE3G-cHApA (AscI) を骨格として、A5n-P2A-Venus-pA\_PGK-neo-pA から P2A-Venus-pA\_PGK-neo-pA、pcDNA4 FLAG-Zbed3 から FLAG-Zbed3 を PCR で増幅した断片を組み込んだベクターを構築した。このベクターと PB-CAG-Tet3G を ES 細胞にコトランスフェクションし、G418 を含む培地で 14 日間培養することによりゲノムに取り込ませた。

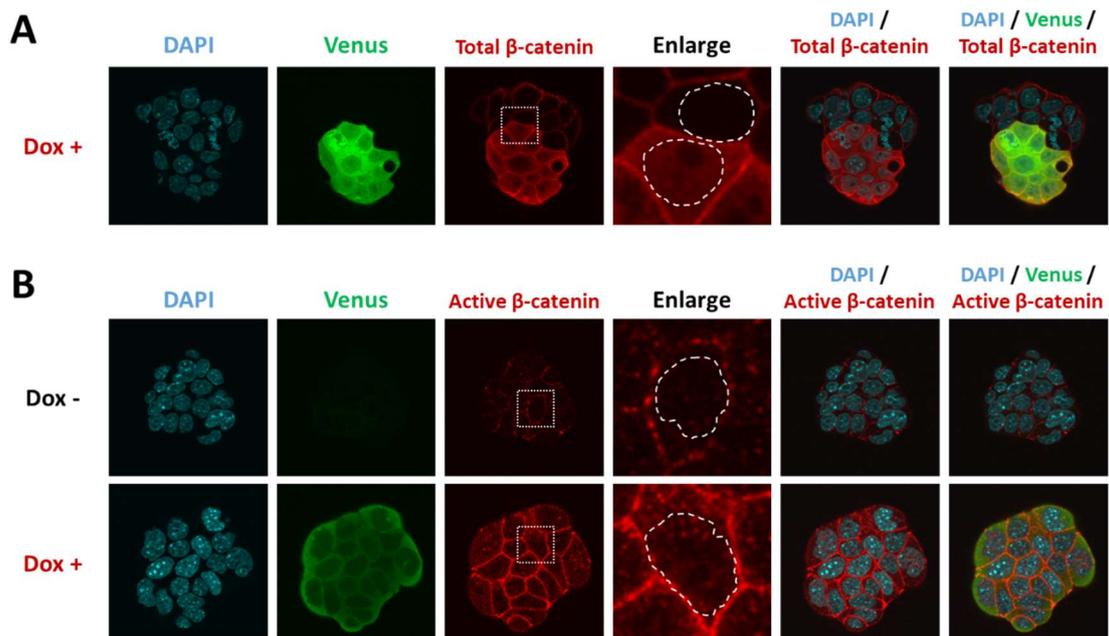


図 33. Zbed3 発現 ES 細胞における Wnt/β-catenin シグナル活性化状態

Dox 依存的に Zbed3 と Venus を共発現する ES 細胞を用いて、Dox を添加することで Venus の発現を Zbed3 発現のモニターとした。(A) 抗 β-catenin 抗体を用いて蛍光免疫染色法により検討した。青：DAPI；緑：Venus；赤：Total β-catenin。(B) 活性型 β-catenin に対する特異的抗体を用いて蛍光免疫染色法により検討した。青：DAPI；緑：Venus；赤：Active β-catenin。

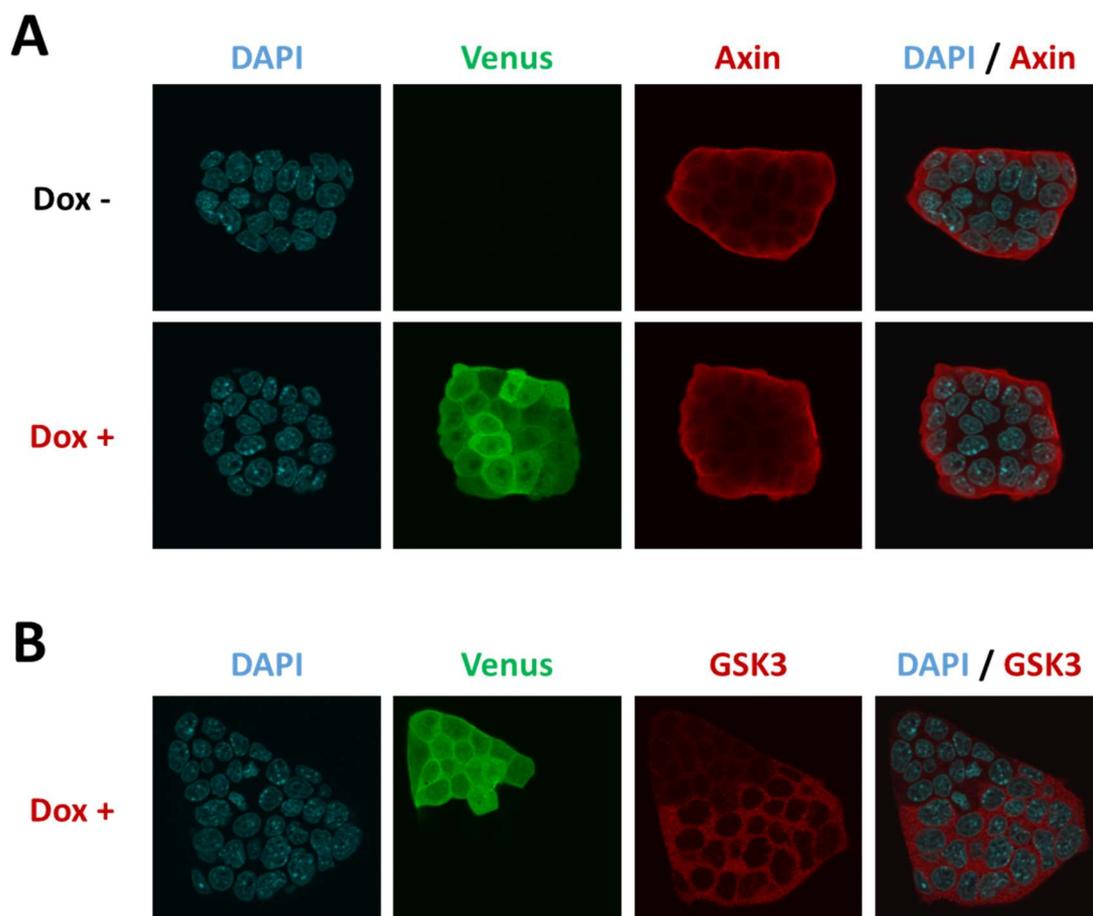


図 34. Zbed3 発現 ES 細胞における Axin と GSK3 の発現

Dox 依存的に Zbed3 と Venus を共発現する ES 細胞を用いて、Dox を添加することで Venus の発現を Zbed3 発現のモニターとした。(A) Axin に対する特異的抗体を用いて免疫染色した。青：DAPI；緑：Venus；赤：Axin。(B) GSK3 に対する特異的抗体を用いて免疫染色した。青：DAPI；緑：Venus；赤：GSK3。

## 結論

本研究では、全能性細胞特異的遺伝子である Zbed3 の生体内における機能を明らかにした。着床前胚において Zbed3 は卵子の形成過程で必須の SCMC の新規の構成タンパク質であり (図 21)、細胞骨格制御を介した最初の卵割や細胞小器官の局在決定に重要な遺伝子であることを明らかにした。また着床前胚と ES 細胞においても、Zbed3 は Axin に関連して Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化に関与することを明らかにした。

## 総合考察

本研究では、全能性細胞で特異的に発現する遺伝子として *Zbed3* を同定し、ノックアウトマウス等を用いて機能を解析してきた。その結果、*Zbed3* は全能性を有する初期の着床前胚で、遺伝子発現の大規模な変化を引き起こすような全能性の獲得には直接関係していなかったが、初期の着床前胚の発生に必須であることを明らかにした。

初期の着床前胚において *Zbed3* は細胞間接着部位を除く細胞皮質下に局在しており、この局在は卵子の形成過程で必須の SCMC の構成タンパク質の新規の構成タンパク質であること、また Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルにおいて  $\beta$ -catenin 分解複合体を皮質下に留めることでこのシグナルの活性化に関与するという 2 つの役割を担うためであることを明らかにした。現在までに SCMC の機能は完全には解明されておらず、また着床前胚における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルについても未だ報告は少ない。着床前胚において SCMC の構成タンパク質の欠失は最初の卵割前後に発生が停止する重篤な胚発生異常を呈することからその機能は着床前胚発生において非常に重要な機能を有することが予想される。一方で Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは多くの細胞種で細胞運命、増殖および遊走などの多岐にわたる機能を有しており、着床前胚発生においても重要な役割を担っていることが予想される。本研究において着床前胚における SCMC の機能および Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの役割を明らかにできる可能性が示唆された。

*Zbed3* ノックアウト胚において最初の卵割前後に発生が停止することが明らかになり、この表現型は細胞骨格制御の異常により生じることを明らかにしたが、これは SCMC 構成タンパク質を欠失した胚における共通の表現型であることから、*Zbed3* は SCMC と協調して細胞骨格制御に重要な役割を担うことが示唆される。一方で *Zbed3* は 8 細胞期以降に局在を細胞質へと移行させるが他の SCMC 構成タンパク質の局在は変化しないことから、*Zbed3* は SCMC から乖離して他の機能を担うことが予想される。この機能の 1 つに Wnt/ $\beta$ -catenin の不活性化が予想される。*Zbed3* が細胞質へと移行することで  $\beta$ -catenin 分解複合体を細胞膜近傍から細胞質へと放出し、細胞質に存在する  $\beta$ -catenin を分解させることで Wnt/ $\beta$ -catenin の不活性化を引き起こしていることが示唆される。*Zbed3* タンパク質の局在変化が生じる機構はわかっていないが局在変化が生じる 8 細胞期には細胞間接着が強化されるコンパクションと呼ばれる現象が生じることか

ら、細胞接着状態の変化により局在を変化させる可能性が示唆された。Zbed3 を局在変化させる機構を明らかにできると 8 細胞期以降も細胞皮質下に Zbed3 を局在させ続けることで、着床前胚における Zbed3 の Wnt/ $\beta$ -catenin への機能を明らかにするとともに着床前胚における Wnt/ $\beta$ -catenin の役割を明らかにできることが予想される。

## 参考文献

- 1 Cantone, I. & Fisher, A. G. Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nature structural & molecular biology* **20**, 282-289,(2013).
- 2 Li, L., Zheng, P. & Dean, J. Maternal control of early mouse development. *Development* **137**, 859-870,(2010).
- 3 Seisenberger, S., Peat, J. R. & Reik, W. Conceptual links between DNA methylation reprogramming in the early embryo and primordial germ cells. *Current opinion in cell biology* **25**, 281-288,(2013).
- 4 Bagci, H. & Fisher, A. G. DNA demethylation in pluripotency and reprogramming: the role of tet proteins and cell division. *Cell stem cell* **13**, 265-269,(2013).
- 5 Zhou, L. Q. & Dean, J. Reprogramming the genome to totipotency in mouse embryos. *Trends in cell biology* **25**, 82-91,(2015).
- 6 Gu, T. P. *et al.* The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* **477**, 606-610,(2011).
- 7 Wossidlo, M. *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nature communications* **2**, 241,(2011).
- 8 Nakamura, T. *et al.* PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nature cell biology* **9**, 64-71,(2007).
- 9 Nakamura, T. *et al.* PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature* **486**, 415-419,(2012).
- 10 Ramos, S. B. *et al.* The CCCH tandem zinc-finger protein Zfp3612 is crucial for female fertility and early embryonic development. *Development* **131**, 4883-4893,(2004).
- 11 Tong, Z. B. *et al.* Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nature genetics* **26**, 267-268,(2000).
- 12 Tsukamoto, S. *et al.* Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* **321**, 117-120,(2008).
- 13 Chen, T. *et al.* Identification of zinc-finger BED domain-containing 3 (Zbed3) as a novel Axin-interacting protein that activates Wnt/beta-catenin signaling. *The Journal of biological chemistry* **284**, 6683-6689,(2009).
- 14 Yu, X. J. *et al.* The subcortical maternal complex controls symmetric division of mouse zygotes by regulating F-actin dynamics. *Nature communications* **5**, 4887,(2014).
- 15 Mashiko, D. *et al.* Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Scientific reports* **3**,

- 3355,(2013).
- 16 Park, S. J., Shirahige, K., Ohsugi, M. & Nakai, K. DBTMEE: a database of transcriptome in mouse early embryos. *Nucleic acids research* **43**, D771-776,(2015).
  - 17 Tashiro, F. *et al.* Maternal-effect gene *Ces5/Ooep/Moep19/Floped* is essential for oocyte cytoplasmic lattice formation and embryonic development at the maternal-zygotic stage transition. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **15**, 813-828,(2010).
  - 18 Zhao, B., Cun, Y. X., He, X. C. & Zheng, P. Maternal-effect *Floped* gene is essential for the derivation of embryonic stem cells in mice. *Dong wu xue yan jiu = Zoological research* **34**, E82-86,(2013).
  - 19 Ohsugi, M., Zheng, P., Baibakov, B., Li, L. & Dean, J. Maternally derived FILIA-MATER complex localizes asymmetrically in cleavage-stage mouse embryos. *Development* **135**, 259-269,(2008).
  - 20 Li, L., Baibakov, B. & Dean, J. A subcortical maternal complex essential for preimplantation mouse embryogenesis. *Developmental cell* **15**, 416-425,(2008).
  - 21 Duncan, F. E. *et al.* Transducin-like enhancer of split-6 (TLE6) is a substrate of protein kinase A activity during mouse oocyte maturation. *Biology of reproduction* **90**, 63,(2014).
  - 22 Alazami, A. M. *et al.* TLE6 mutation causes the earliest known human embryonic lethality. *Genome biology* **16**, 240,(2015).
  - 23 Zheng, P. & Dean, J. Role of *Filia*, a maternal effect gene, in maintaining euploidy during cleavage-stage mouse embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 7473-7478,(2009).
  - 24 Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819-823,(2013).
  - 25 Hayward, A., Ghazal, A., Andersson, G., Andersson, L. & Jern, P. ZBED evolution: repeated utilization of DNA transposons as regulators of diverse host functions. *PLoS one* **8**, e59940,(2013).
  - 26 Saghizadeh, M., Griбанова, Y., Akhmedov, N. B. & Farber, D. B. ZBED4, a cone and Muller cell protein in human retina, has a different cellular expression in mouse. *Molecular vision* **17**, 2011-2018,(2011).
  - 27 Markljung, E. *et al.* ZBED6, a novel transcription factor derived from a domesticated DNA transposon regulates IGF2 expression and muscle growth. *PLoS biology* **7**, e1000256,(2009).

## 謝辞

本研究を行うにあたり、直接ご指導を賜りました中村肇伸教授に心から深く感謝いたします。ご多忙の中、副指導員として貴重なご意見を賜りました齊藤修教授、向由起夫教授に心から深く感謝いたします。また、本研究を行うにあたり貴重な生命を提供してくれた実験動物に深く感謝すると共に、哀悼の意を表します。さらに、Zbed3 キメラマウス作製にご協力いただきました大阪大学微生物病研究所の伊川正人教授、岡部勝名誉教授に心から深く感謝いたします。