

Glis3 の着床前胚の発生における役割

Role of Glis3 in preimplantation embryo development

齋藤 優之介¹・眞野 友裕¹・中村 肇伸^{1,2,3}

¹長浜バイオ大学大学院バイオサイエンス研究科

²長浜バイオ大学アニマルバイオサイエンス学科

³長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

Yunosuke Saito¹, Tomohiro Mano¹, Toshinobu Nakamura^{1,2,3}

¹ Graduate School of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

²Department of Animal Bio-Science, Faculty of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

³Genome Editing Research Institute, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

要旨

転写因子である Glis ファミリー遺伝子は 3 種類が存在し、Glis1 と Glis3 は未受精卵から 2 細胞期の間、Glis2 は 2 細胞期以降に高発現している。現在までに、Glis1 と Glis3 は iPS 細胞誘導時に生じるリプログラミングを促進し、Glis2 は抑制することが明らかになっている。しかし、Glis ファミリー遺伝子が受精後に生じるリプログラミングに関与するかどうかは不明である。そこで、本研究では、受精後に生じるリプログラミングに Glis ファミリー遺伝子が及ぼす影響を検討した。

The Glis transcription factors, Glis1 and Glis3 are highly expressed in the unfertilized egg and 2-cell stage, while Glis2 is highly expressed after the 2-cell stage. Previous study revealed that Glis1 and Glis3 promote reprogramming that occurs during iPS cell induction, while Glis2 suppresses it. However, it is unclear whether Glis family genes are involved in the reprogramming that occurs after fertilization. In this study, we examined the effects of Glis family genes on reprogramming that occurs after fertilization.

1. 着床前胚における Glis ファミリー遺伝子の発現パターンとノックアウトマウスの表現型

着床前胚の遺伝子発現データベースから、Glis1 と Glis3 は未受精卵から 2 細胞期の間、Glis2 は 2 細胞期以降に高発現することが明らかとなっている (図 1)¹⁾。また、Glis1 と Glis3 は iPS 細胞誘導時に生じるリプログラミングを促進し、Glis2 は抑制することが明らかになっている^{2,4)}。現在までに、全ての Glis ファミリー遺伝子のノックアウトマウスが作製されており、Glis1 は発生には不要であるが Glis3 と発現が重複するため Glis3 が Glis1 の機能を補完している可能性が考えられる⁵⁾。一方で、Glis2 ノックアウトマウスは正常に個体が発生することから、受精後のリプログラミングには関与しないことが示唆されている⁶⁾。さらに、Glis3 ノックアウトマウスは生後 10 日目までにほぼすべての個体が死亡してしまうため、Glis3 が受精後のリプログラミングに必要なかどうかは不明のままである⁷⁾。これらのことから、

本研究では、Glis3 に着目し、Glis3 が着床前胚においてもリプログラミングに関与するかどうかを検討した。

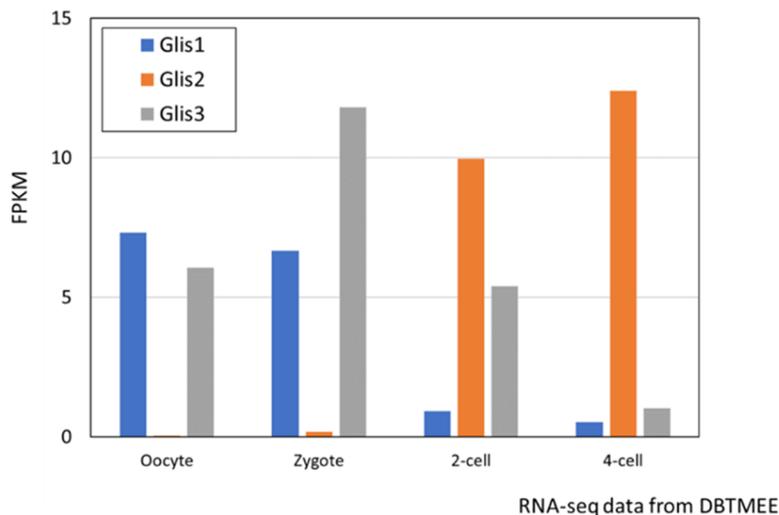


図 1. 着床前胚における Glis ファミリー遺伝子の発現パターン

着床前胚における Glis family 遺伝子の発現パターンは、Glis1 が未受精卵と受精卵、Glis2 が 2 細胞期以降、Glis3 が未受精卵から 2 細胞期胚で高発現する。

2. 着床前胚における Glis3 タンパク質の発現と細胞内局在

Glis3 のタンパク質の発現と細胞内局在を検討するために、着床前胚における Glis3 タンパク質の発現を Glis3 に対する特異的抗体を用いた蛍光免疫染色法により検討した。その結果、Glis3 タンパク質は、受精卵から胚盤胞期までの核内に発現が認められることが明らかとなった (図 2)。

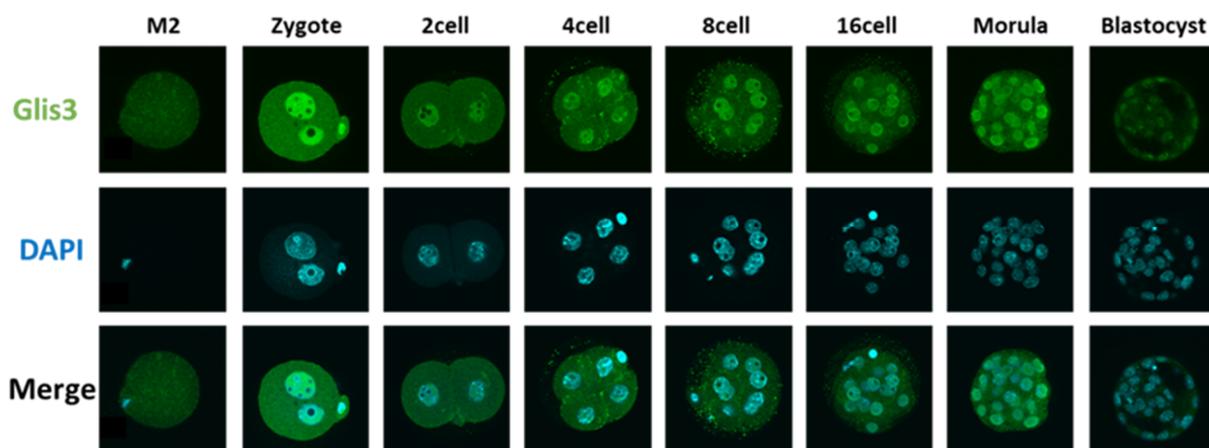


図 2. 着床前胚における Glis3 タンパク質の発現と細胞内局在

M2 期卵、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 Glis3 タンパク質の発現パターンと細胞内局在を Glis3 に対する特異的抗体を用いて検討した。緑 : Glis3 ; 青 : DAPI

3. Glis1 および Glis3 の着床前胚における役割

3. 1 Glis1 および Glis3 ドミナントネガティブ変異体が着床前胚の発生に及ぼす影響

本研究では、Glis1、または Glis3 のジンクフィンガー、SV40 の NLS、および EGFP を融合した Glis1 または Glis3 ドミナントネガティブ変異体（それぞれ Glis1-DN または Glis3-DN）を作製し、内在性の Glis1 または Glis3 の機能を阻害することを試みた（図 3）。

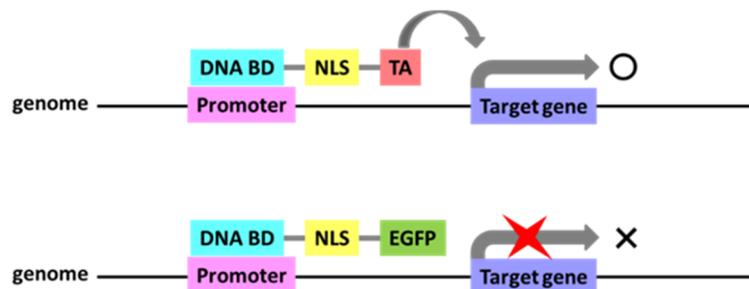


図 3. ドミナントネガティブ法

野生型の転写因子は、DNA 結合ドメインを介してプロモーターに結合し、転写活性化ドメインを介して下流の遺伝子の発現を誘導する（上図）。ドミナントネガティブ変異体では、野生型と同じように DNA 結合ドメインを介して、プロモーターの上流に結合するが、転写活性化ドメインを欠くために転写を活性化することができないことが予想される（下図）。

Glis1、および Glis3 が着床前胚に及ぼす影響を調べるため、Glis1-DN、または Glis3-DN を前核期の受精卵にマイクロインジェクションし、試験管内で 4 日間培養した。Glis3-DN を発現させた場合は、全ての胚が 2 細胞期で胚発生を停止することが明らかになった（図 4）。マウスでは RNA ポリメラーゼ II の阻害剤を添加することにより、胚性遺伝子の活性化を阻害した場合には、2 細胞期で胚発生が停止することが知られている⁸⁾。したがって、Glis3 は受精後に生じる胚性遺伝子の活性化に参与する可能性が示唆された。

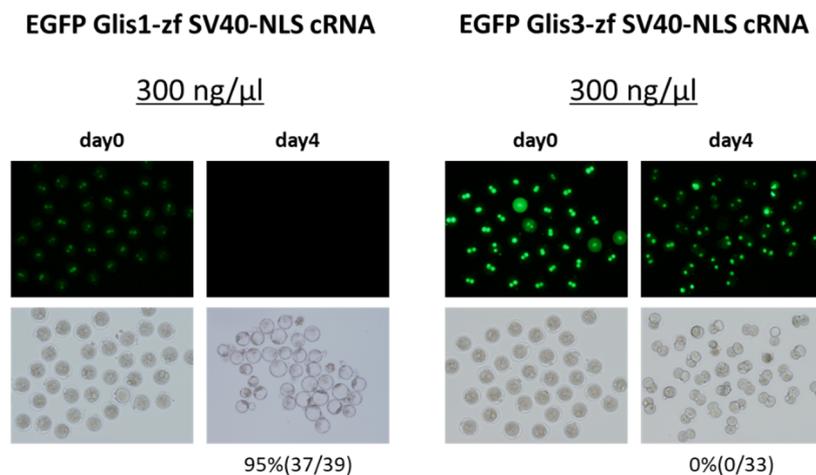


図 4. Glis1 および Glis3 変異体が着床前胚の発生に及ぼす影響

前核期の受精卵に Glis1-DN、または Glis3-DN cRNA をマイクロインジェクションし、試験管内で 4 日間培養した。

3. 2 Glis3-DN のジンクフィンガー変異体が着床前胚の発生に及ぼす影響

Glis3 タンパク質は CCHH 型のジンクフィンガーを 5 個有している。そこで、Glis3-DN がジンクフィンガーを介して内在性の Glis3 の機能を阻害しているかどうかを検討するために、Glis3-DN の 5 つのジンクフィンガーそれぞれの最初のシステインをアラニンに置換した Glis3-DN-Mut1-5 変異体を作製した。Glis3-DN-Mut1-5 の cRNA を前核期の受精卵にマイクロインジェクションし、試験管内で 4 日間培養した。その結果、Glis3-DN-Mut1-5 を発現させた場合に、全ての胚が胚盤胞期まで発生することが明らかとなった (図 5)。次に、5 つのジンクフィンガーの様々な部位に変異を入れた Glis3-DN-Mut を受精卵に発現させ、試験管内で 4 日間培養することにより、どのジンクフィンガーが DNA との結合に重要かを検討した。その結果、どの組み合わせの Glis3-DN-Mut を発現させても、着床前胚の発生には影響がなかった。以上のことから、Glis3 に含まれる全てのジンクフィンガーが DNA 結合に重要であることが明らかになった (Data not shown)。

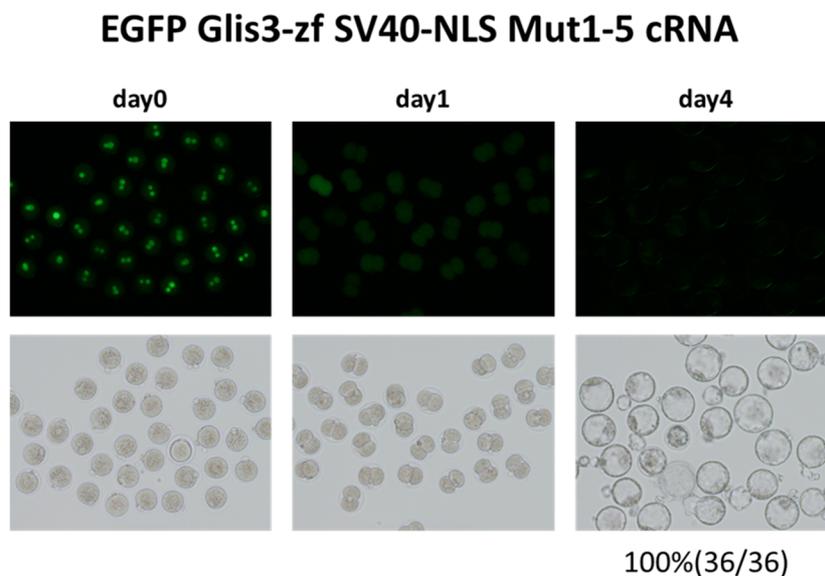


図 5. Glis3-DN のジンクフィンガー変異体が着床前胚の発生に及ぼす影響

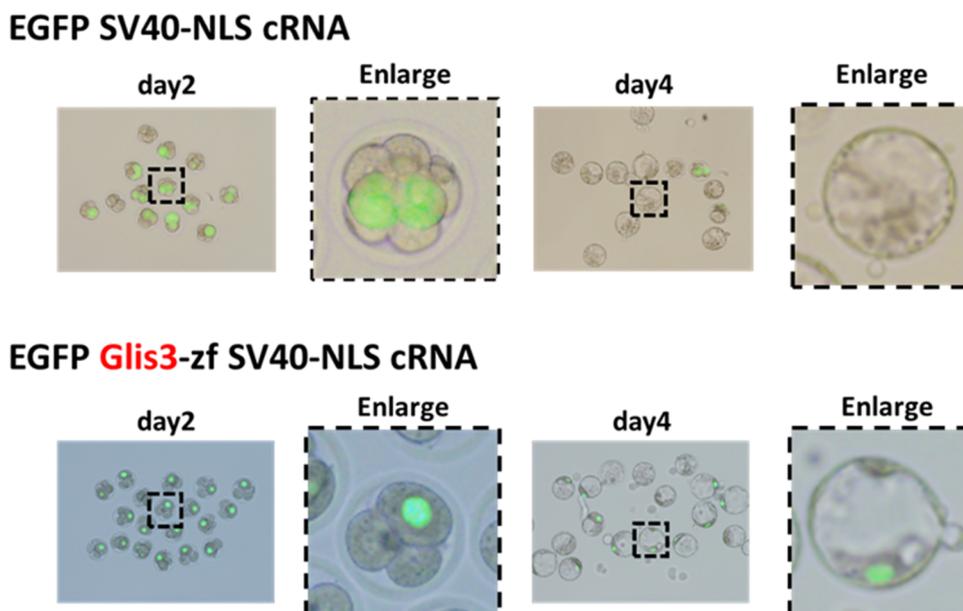
前核期の受精卵に Glis3 の 5 つのジンクフィンガーに変異を入れた Glis3-DN-Mut1-5 cRNA をマイクロインジェクションし、試験管内で 4 日間培養した。

3. 3 Glis3 ドミナントネガティブ変異体が胚性遺伝子の活性化に及ぼす影響

受精後最初の遺伝子発現は、胚性遺伝子の活性化 (zygotic gene activation: ZGA) と呼ばれ、正常な発生に必須であると考えられている。マウス初期胚においては、ZGA は受精卵の後期に小規模に生じ、2 細胞期後期には大規模な転写が生じることが明らかにされており、それぞれ minor ZGA、および major ZGA と呼ばれている。Glis3 が minor ZGA および major ZGA に及ぼす影響を検討するために、前期 2 細胞期胚の片側の割球に EGFP SV40-NLS または Glis3-DN cRNA をマイクロインジェクションした。その結果、EGFP SV40-NLS を発現させた割球は、EGFP SV40-NLS を発現させていない割球と同じように卵割を続け、胚盤胞期まで発生することが明らかとなった。一方、Glis3-DN を発現させた割球では卵割が起らず発生が停止し、Glis3-DN を発現させていない割球の方だけが卵割を続け、胚盤胞期まで発生することが明らかとなった (図 6)。これらのことから、Glis3-DN は、少なくとも 2 細胞期後期に生じる

major ZGA を阻害する可能性が考えられた。

図 6. Glis3-DN が major ZGA に及ぼす影響



EGFP SV40-NLS または Glis3-DN を前期 2 細胞期胚の片側の割球に発現させ、試験管内で 4 日間培養した。

次に、野生型の後期 2 細胞期胚、および、EGFP SV40-NLS cRNA、または Glis3-DN cRNA をマイクロインジェクションした後期 2 細胞期胚をそれぞれ 20 個ずつ回収し、RNA-seq 解析を行った。その結果、野生型胚 (control) と EGFP SV40-NLS 発現胚 (EGFP) を比較すると遺伝子発現に大きな影響はなかったのに対し、control 胚と Glis3-DN 発現胚 (Glis3-DN) や EGFP 発現胚と Glis3-DN 発現胚を比較すると、2 細胞期後期での転写に異常が生じていることが明らかになった (図 7)。

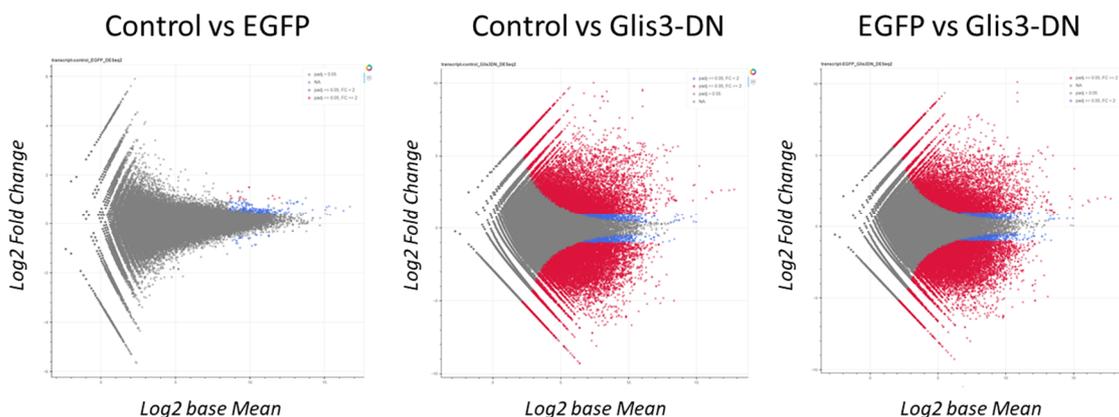


図 7. Glis3 変異体が胚性遺伝子の活性化に及ぼす影響

野生型後期 2 細胞期胚、受精卵に EGFP SV40-NLS、または Glis3-DN を発現させた後期 2 細胞期胚を回収し、RNA-seq 解析を行った。

受精卵から 2 細胞期胚の間は、母性 RNA の分解が生じると同時に胚性遺伝子の活性化が生じるため、minor ZGA、または major ZGA で発現が上昇する遺伝子に絞り、control 胚と Glis3-DN 胚の遺伝子発現を比較した。まず、minor ZGA で活性化される遺伝子の中で、発現量が多い上位 100 個の遺伝子について検討した。その結果、Glis3-DN 発現胚において、10 個の遺伝子の発現には変化がなく、23 個の遺伝子の発現が低下し、67 個の遺伝子の発現が上昇していた (Data not shown)。次に、major ZGA で活性化される遺伝子の中で、発現量が多い上位 100 個の遺伝子について検討した。その結果、Glis3-DN 発現胚において、14 個の遺伝子の発現には変化がなく、77 個の遺伝子の発現が低下し、9 個の遺伝子の発現が上昇していた (Data not shown)。現在までに、minor ZGA で活性化される遺伝子と major ZGA で活性化される遺伝子として、それぞれ 2,470 個の遺伝子と 2,439 個の遺伝子が同定されている。そこで、これらの遺伝子について MA plot を作成したところ、minor ZGA では、遺伝子全体を解析した結果と大きな差がなかったのに対して、major ZGA では Glis3-DN 胚においてコントロールと比較して発現が低下する遺伝子が多数存在することが明らかとなった (図 8, 9)。

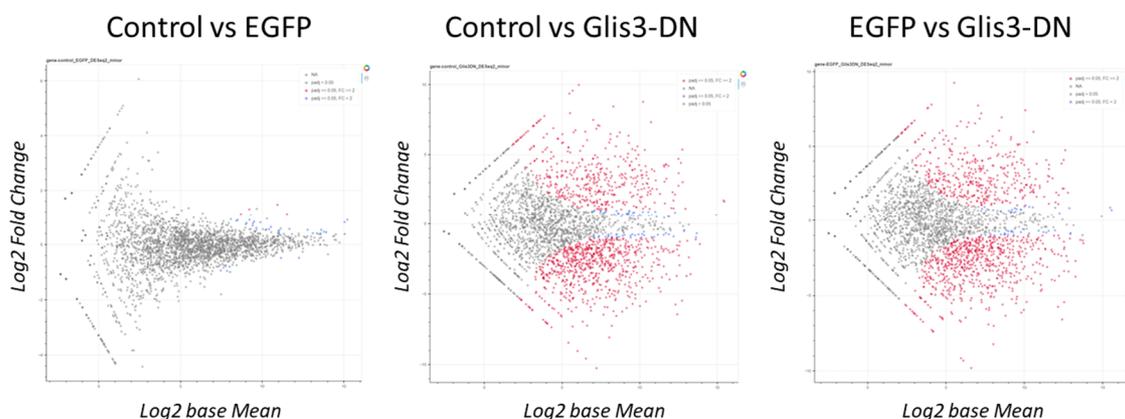


図 8. Glis3 変異体が minor ZGA により発現する遺伝子に及ぼす影響

受精卵に EGFP SV40-NLS、または Glis3-DN を発現させた後期 2 細胞期胚を回収し、RNA-seq 解析を行った。minor ZGA で活性化される 2,470 個の遺伝子について MA plot を作成した。

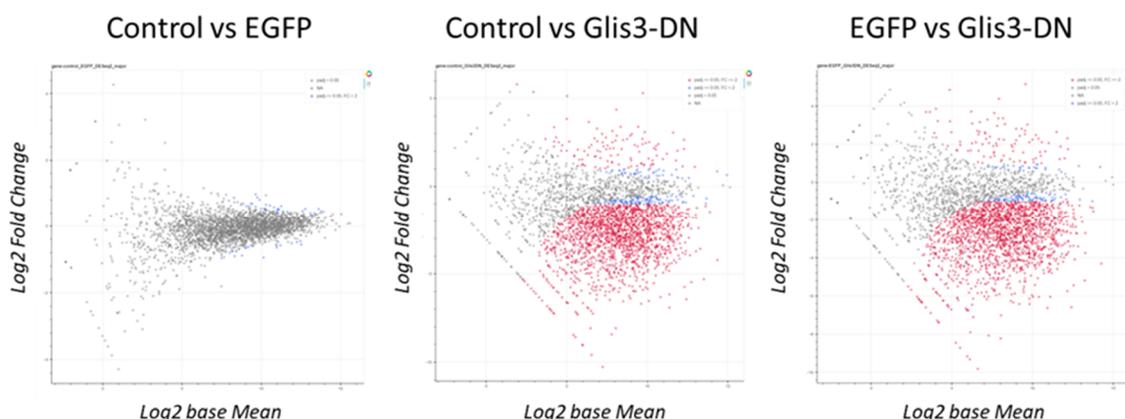


図 9. Glis3 変異体が major ZGA により発現する遺伝子に及ぼす影響

受精卵に EGFP SV40-NLS または Glis3-DN を発現させた後期 2 細胞期胚を回収し、RNA-seq 解析を行った。major ZGA で活性化される 2,439 個の遺伝子について MA plot を作成した。

本研究では、Glis3 が受精後に生じる主要な胚性遺伝子の活性化に重要である可能性を示した一方で、Glis3-DN が本来の Glis3 の標的遺伝子以外の発現に影響を及ぼしている可能性は排除できない。この点については、コンディショナルノックアウトマウスを用いることにより、Glis3 が実際に胚性遺伝子の活性化に関与するかどうかを検討する必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Park, S. J., Shirahige, K., Ohsugi, M, Nakai, K., DBTMEE: a database of transcriptome in mouse early embryos., **Nucleic Acids Res.** 43, D771-776, (2015).
- 2) Lee, S. Y., Noh, H. B., Kim, H. T., Lee, K. I., Hwang, D. Y., Glis family proteins are differentially implicated in the cellular reprogramming of human somatic cells., **Oncotarget** 8, 77041-77049, (2017).
- 3) Maekawa, M. et al., Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1., **Nature** 474, 225-229, (2011).
- 4) Li, L. et al., Glis1 facilitates induction of pluripotency via an epigenome-metabolome-epigenome signaling cascade. **Nat Metab.**, 2, 882-892, (2020).
- 5) Nakashima, M. et al., A novel gene, GliH1, with homology to the Gli zinc finger domain not required for mouse development., **Mech Dev.**, 119, 21-34, (2002).
- 6) Kim, Y. S. et al., Kruppel-like zinc finger protein Glis2 is essential for the maintenance of normal renal functions., **Mol Cell Biol.**, 28, 2358-2367, (2008).
- 7) Kang, H. S., Beak, J. Y., Kim, Y. S., Herbert, R., Jetten, A. M., Glis3 is associated with primary cilia and Wwtr1/TAZ and implicated in polycystic kidney disease., **Mol Cell Biol.**, 29, 2556-2569, (2009).
- 8) Abe, K. I. et al., Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 115, E6780-E6788, (2018).