

# 全能性細胞で高発現する Klf17 の機能解析

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・  
アニマルバイオサイエンス学科・エピジェネティック制御学研究室  
中村 肇伸

## 1. 目的

精子と卵子は、次世代に遺伝情報を伝えるために分化した細胞であるが、受精後すぐに「リプログラミング」という過程を経て胚体外組織を含む個体発生に必要な全ての細胞に分化できる「全能性」と呼ばれる能力を獲得する。受精後のリプログラミングの過程では、精子由来クロマチンにおいてプロタミン-ヒストン置換が生じた後、ゲノム全体の脱メチル化、胚性遺伝子の活性化、母性RNA/タンパク質の分解、等が生じることが明らかにされている (Cantone & Fisher, 2013; Zhou & Dean, 2015)。

本研究では、申請者が *in silico* screening により同定し、全能性を有する初期の着床前胚において高発現することを確認した Klf17 (Krüppel-like factor 17) という遺伝子の機能を明らかにすることを目的とする。

## 2. 方法

Klf17 に対する特異的抗体を作製し、蛍光免疫染色法を用いて、着床前胚における Klf17 タンパク質の発現および細胞内局在について検討を行った。また、Klf17 ノックアウトマウスを作製し、妊孕性、着床前胚の胚発生、および 2 細胞期胚における遺伝子発現の網羅的解析、を行った。

## 3. 結果

図 1 に示すように、Klf17 は MII 期卵から 4 細胞期まで発現が認められることが明らかとなった (図 1)。また、MII 期卵において細胞全体に局在する Klf17 は、受精後にはその大部分が核に移行することが明らかとなった (図 1)。

次に、Klf17 の生体内での機能を解析するために、ノックアウトマウスを作製した。その結果、ヘテロマウス同士の交配から、野生型 : ヘテロ : ノックアウトが 1 : 1.74 : 1 の割合で得られることが明らかとなった。このことから、Klf17 はノックアウトマウスの発生には影響を与えないことが示された。また、組織学的解析から、ノックアウトマウスの精巣および卵巣では、それぞれ精子形成と卵子形成が見かけ上正常に起こることが明らかとなった (Data not shown)。

次に、Klf17 ノックアウトマウスの妊孕性を検討した。その結果、オスのノックアウトマウスにおいてはコントロールとほぼ同様の妊孕性が認められたが、メスのノックアウトマウスでは妊孕性が著しく低下することが明らかとなった (図 2)。

Klf17 が初期の着床前胚で特異的に発現することから、メスのノックアウトマウスから得られた受精卵を試験管内で 4 日間培養した。その結果、野生型同士の交配から得られた受精卵では、4 日後には 96% が胚盤胞期まで発生したのに対して、ノックアウト同士の交配から得られた受精卵では、胚盤胞期まで発生する胚の割合が著しく低下することが明らかとなった (図 3)。一方、野生型のオスとノックアウトのメスを交配して得られた受精卵では、正常に発生する胚の割合が 34% まで回復することが明らかとなった (図 3)。精子ゲノム由来の Klf17 遺伝子は 2 細胞期から発現することから (Data not shown)、胚性 Klf17 の発現も正常な発生において必要であることが示唆された。これらの結果から、Klf17 は初期発生において必要な母性効果遺伝子であることが明らかとなった。

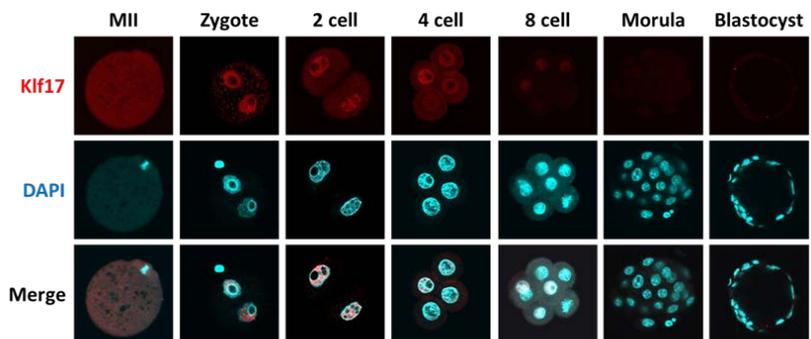


図1. Klf17の発現と細胞内局在

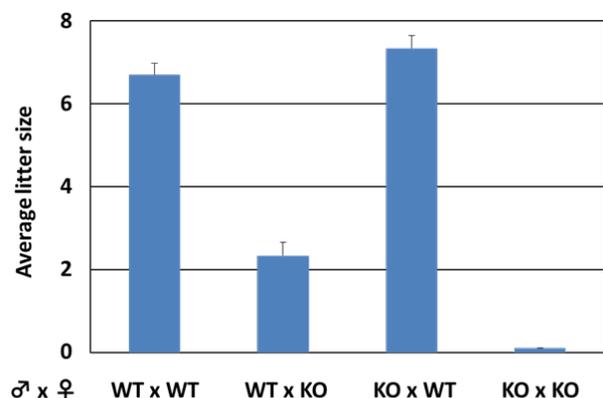


図2. Klf17が妊孕性に及ぼす影響

Klf1 ファミリータンパク質は、N 末端側に転写制御に関与するドメインを有し、C 末端側にはCCHH 型のジンクフィンガーを3 個有することが知られている。また、3 つのジンクフィンガーはKrüppel-link と呼ばれる特定のアミノ酸配列で繋がれており、結合するプロモーターや相互作用するタンパク質より、転写の活性化と抑制の両方に機能することが明らかにされている (Pearson et al, 2008)。また、受精後には2 細胞期において大規模な胚性遺伝子の活性化が生じることが知られている。そこで、Klf17 が受精後の転写に影響を与えるかどうかを検討した。胚性遺伝子の活性化は、2 細胞期の後期に大規模に生じることから、Klf17 ノックアウトの卵子から得られた2 細胞期胚における新生 RNA 量を BrUTP の取り込みを指標に検討した。その結果、Klf17 ノックアウトから得られた2 細胞期胚では BrUTP の取り込みが著しく低下する、すなわち胚性遺伝子の活性化が十分に起こらないことが明らかとなった (図 4A)。さらに、Klf17 ノックアウトマウスの卵子から得られた後期2 細胞期胚における mRNA の発現を網羅的に解析した。その結果、Klf17 を欠損することにより、2214 個の遺伝子の発現量が有意に変化することが明らかとなった。また、Klf17 の影響を受けた遺伝子の大部分は、Klf17 欠損により発現が低下していた (図 4B)。これらのことから、Klf17 は胚性遺伝子の活性化に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

最後に、Klf17 が胚性遺伝子の活性化に直接関与するかどうかを検討した。2 細胞期胚を用いてクロマチン免疫沈降を行うことが困難なため、活性化ドメインまたはジンクフィンガーを欠失する Klf17 変異体を作製し、これらの変異体が胚性遺伝子の活性化に及ぼす影響を検討した。その結果、活性化ドメインを欠失する Klf17- $\Delta$ N 変異体では、転写が著しく抑制されたのに対して、活性化ドメインを欠失する Klf17 Klf17- $\Delta$ C 変異体では、転写活性に影響を与えないことが示された (図 5)。この結果から、Klf17- $\Delta$ N 変異体がドミナントネガティブ体として機能し、内在性の Klf17 の機能を阻害した可能性が考えられた。この可能性を検証するために、3 カ所存在するジンクフィンガーのうち2 カ所に変異を導入することにより、DNA 結合能を消失させた Klf17-ZF-mut を作製した。その結果、Klf17-ZF-mut を発現させた後期2 細胞期胚では、転写が抑制されない、すなわち、Klf17- $\Delta$ N 変異体による胚性遺伝子の活性化の阻害には DNA との結合が重要であることが示唆された (図 5)。

#### 4. 考察

本研究では、*in silico* screening により全能性細胞で高発現する遺伝子として同定された Klf17 の機能解析を行い、(1) 成長期卵から4 細胞期胚の間で特異的に発現し、主に核に局在すること、(2) 着床前胚の発生に必須の母性効果遺伝子であること、(3) 受精後に生じる胚性遺伝子の活性化に重要であることを明らかにした。

Klf17 の生体内での機能を明らかにするために、Klf17 のノックアウトマウスを作製したところ、オスの Klf17 ノックアウトマウスは妊孕性に異常はなかったが (図 2)、メスのノックアウトマウスが不妊になることが明らかとなった。また、メスの Klf17 ノックアウトマウスから得られた受精卵は、着床前の早い段階で発生を停止することが明らかとなった。さらに、ノックアウトの卵子を野生型の精子と受精させたときには、ノックアウトの精子と受精させたときより、胚盤胞への発生率が若干改善されることが明らかとなった (図 3)。これは、精子由来の Klf17 が2 細胞期から発現することによると考えられる。以上の結果から、Klf17 は正常発生に必須の母性効果遺伝子であり、受精後の核内で着床前胚の発生に極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

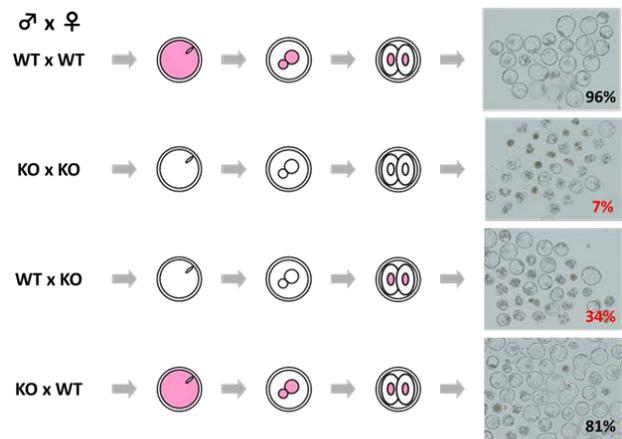


図3. Klf17が着床前胚の発生に及ぼす影響

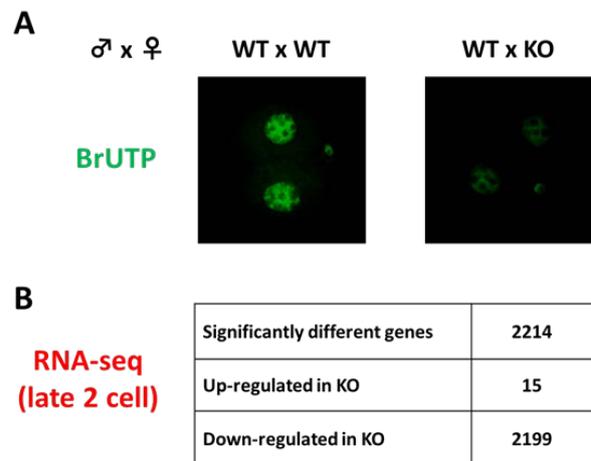


図4. Klf17が胚性遺伝子の活性化に及ぼす影響

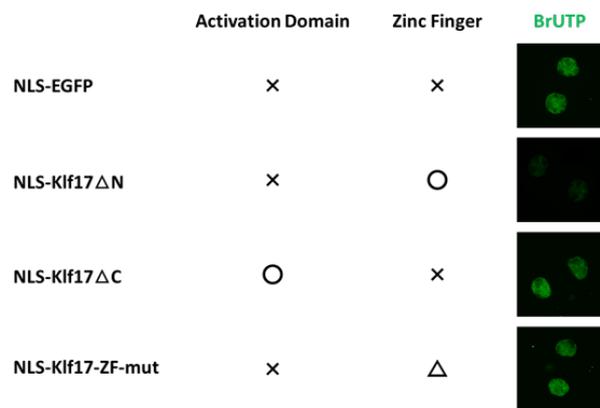


図5. Klf17のDNA結合能と胚性遺伝子の活性化

前述のように、受精後のリプログラミング過程では、(i) DNA の脱メチル化、(ii) 胚性遺伝子の活性化、(iii) 母性 RNA/タンパク質の分解、が重要であることが明らかにされている。これらのイベントの中で、(i) と (ii) は、核内で生じ、(iii) は主に細胞質で生じるため、それぞれ核内に局在するタンパク質と細胞質に局在するタンパク質が機能する可能性が高いと考えられる。Klf17 が受精後の核内で重要な働きをすることから、Klf17 が胚性遺伝子の活性化に影響を与えるかどうかを検討した。これまでの研究から、胚性遺伝子の活性化は、受精卵の雄性前核で始まり、2 細胞期の初期でさらに転写が活性化されて (minor zygotic gene activation)、2 細胞期の後期で大規模な転写の活性化が起こる (major zygotic gene activation) ことが明らかにされている。そこで、Klf17 を欠損する後期の 2 細胞期胚における遺伝子発現を網羅的に検討したところ、Klf17 欠損により非常に多くの遺伝子の発現が有意に低下していることが明らかとなった (図 4)。また、免疫沈降法により、これまでに胚性遺伝子の活性化に関与することが報告されている Mater (Tong et al, 2000)、Zar1 (Wu et al, 2003)、および Brg1 (Bultman et al, 2006) と相互作用する可能性を検証したが、少なくとも培養細胞においてはこれらの分子と結合しないことが明らかとなった (Data not shown)。このことから、Klf17 はこれらの遺伝子とは独立して胚性遺伝子の活性化に機能することが明らかとなった。さらに、Klf17 変異体を用いた実験から、Klf17 による転写活性化には DNA との結合が重要であることが示唆された。

最近、ヒトの Klf17 の発現は 8 細胞期に一過的に生じることが報告された (Blakeley et al, 2015)。ヒトの胚性遺伝子の活性化が 8 細胞期から始まることを鑑みると、Klf17 の機能は種を超えて保存されている可能性が示唆された。現在までに、Klf17 のように直接 DNA に結合して胚性遺伝子の活性化を制御する分子は知られていないことから、今後 RNA-seq のデータを詳細に解析することにより、受精後のリプログラミングの研究に重要な知見を与えることが期待できる。

#### 【謝辞】

本研究は、アステラス病態代謝研究会の助成金のサポートを受けることにより成りました。この場を借りて深く御礼申し上げます。また、ご多忙の中、Klf17 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、そして 2 細胞期胚の遺伝子発現を解析していただきました東京医科歯科大学の幸田尚准教授に心から深く感謝いたします。

#### 5. 参考文献

- Blakeley P, Fogarty NM, del Valle I, Wamaita SE, Hu TX, Elder K, Snell P, Christie L, Robson P, Niakan KK (2015) Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Development* **142**: 3151-3165
- Bultman SJ, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda P, Schultz RM, Magnuson T (2006) Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes & development* **20**: 1744-1754
- Cantone I, Fisher AG (2013) Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nature structural & molecular biology* **20**: 282-289
- Pearson R, Fleetwood J, Eaton S, Crossley M, Bao S (2008) Kruppel-like transcription factors: a functional family. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**: 1996-2001
- Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, Dorward H, Lee E, Bondy CA, Dean J, Nelson LM (2000) Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nature genetics* **26**: 267-268
- Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM (2003) Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nature genetics* **33**: 187-191
- Zhou LQ, Dean J (2015) Reprogramming the genome to totipotency in mouse embryos. *Trends in cell biology* **25**: 82-91