

マウス胚発生における
転写因子 CIBZ の機能解析

西尾 美紀
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 機能ゲノム医学研究室
(石田 靖雅 准教授)

令和2年2月14日提出

| | | | |
|---|-----------------------------------|-----------|----------------------|
| <p>所属 (主指導教 員)</p> | <p>機能ゲノム医学研究室 (石田 靖雅 准教授)</p> | | |
| <p>氏名</p> | <p>西尾 美紀</p> | <p>提出</p> | <p>令和 元年 12月 12日</p> |
| <p>題目</p> | <p>マウス胚発生における 転写因子 CIBZ の機能解析</p> | | |
| <p>要旨</p> <p>エピジェネティックな機構の一つである DNA メチル化は、遺伝子の発現調節を介して、哺乳類の胚発生などに、重要な役割を担っている。DNA メチル化の実行役として、DNA メチル化酵素とメチル化 DNA 結合タンパク質 (MBP) が挙げられる。これまでに、DNA メチル化酵素のノックアウト (KO) マウスが胎齢 9.5 日目 (E9.5) 前後で、胎生致死となることが報告されているため、マウスの初期胚発生において、DNA メチル化は必須であると考えられる。MBP も胚発生に重要であることが予想されたが、既知の MBP をコードする遺伝子の KO マウスが胚発生に顕著な異常をきたすという報告は無いため、新規 MBP の同定及び解析が必要である。当研究室で同定された新規 MBP である CIBZ は、ジンクフィンガー型の転写因子であり、マウスの各組織と胚性幹 (ES) 細胞などの細胞に発現していることが明らかになっている。これまでに本研究室において、細胞レベルにおける CIBZ の機能として、細胞増殖の促進や細胞分化及び細胞死の抑制が明らかにされたが、生体内における CIBZ の機能は分かっていない。先行研究により、通常の相同組み換え法による CIBZ ヘテロ接合体マウスの出生が確認されなかったため、CIBZ のヘテロ接合体マウスが胎生致死である可能性が考えられた。本研究では、Cre-loxP システムを用いて、CIBZ 遺伝子のコンディショナルなヘテロ欠損マウスの作製及び解析により、CIBZ が初期胚の発生に与える影響を明らかにすることを目的とする。</p> <p>コンディショナルな CIBZ のヘテロ欠損 ($\Delta fl/+$) マウスを作製するために、CIBZ の $fl-neo/+$ マウスと Flp を全身で発現するトランスジェニックマウスを交配させることで、neo カセットを除去した CIBZ の $fl/+$ マウスを作製した。野生型 (+/+) マウスと比較して、作製した CIBZ の $fl/+$ マウスは、長期的な飼育において、形態や行動の異常は確認されなかった。次に、CIBZ の $\Delta fl/+$ マウスを作製するために、CIBZ の $fl/+$ マウスと Cre を全身に発現する CAG-Cre マウスを交配させた。生まれたマウスの遺伝型を genomic PCR を用いて調べたところ、CIBZ の $\Delta fl/+$ マウスは存在しなかった。この結果から、CIBZ のヘテロ欠損マウスが胎生致死であることが強く示唆された。</p> | | | |

CIBZ の $\Delta fl/+$ 胎仔が胎生致死になる時期と表現型を調べるために、E6.5～E11.5 の胎仔を摘出し、顕微鏡による観察及び genomic PCR による遺伝型の同定を行った。その結果、E6.5 において CIBZ の $\Delta fl/+$ 胎仔は、同腹子の $+/+$ と比較して、縮小し始めており、E9.5 死に至ることが判明した。以上のことから、CIBZ は初期胚の発生に必須であることが示された。また、CIBZ のヘテロ欠損は、E6.5 よりも前の胚発生に影響を与えることが示唆された。

CIBZ のヘテロ欠損が、E6.5 よりも前の胚発生に与える影響を調べた。マウス胚の着床 (E4.5 から E5.5 の解析は、胚の大きさが原因で、技術的に困難である。そのため、マウスの胚の着床時期を模倣する方法として用いられる、胚盤胞 (E3.5) の *in vitro* での培養を行った。その結果、培養 3～5 日目において、CIBZ の $\Delta fl/+$ は、同腹子の $+/+$ のマウスと比較して、胎仔の形成に重要な内部細胞塊由来の部分の面積が有意に小さくなることが確認された。この結果から、CIBZ の $\Delta fl/+$ マウスは、E4.5～E5.5 間において、すでになんらかの異常をきたすことが示唆された。また、CIBZ のヘテロ欠損により、胚盤胞の *in vitro* での培養で、内部細胞塊由来の部分が縮小することから、胎盤ではなく胎仔の成長に異常がきたすことが示唆された。

CIBZ のヘテロ欠損が胚盤胞 (E3.5) の発生や分化に与える影響をさらに詳細に調べるために、ES 細胞の樹立を試みた。CIBZ の $fl/+$ マウスと Cre マウスの交配により採取した胚盤胞からそれぞれの ES 細胞 ($+/+$ 、 $fl/+$ 、 $\Delta fl/+$) 株を樹立した。 $+/+$ と $fl/+$ と $\Delta fl/+$ の ES 細胞株において、顕微鏡により、ES 細胞の特有のコロニー (形態や大きさ) が観察でき、表現型に大きな違いは認められなかった。また、ES 細胞の特徴であるアルカリフォスファターゼの活性にも差異は見られなかったことから、CIBZ の発現は、ES 細胞の未分化性に必須でないことが示唆された。qRT-PCR 及び Western blotting を用いて解析した結果、 $+/+$ と $fl/+$ の ES 細胞と比較して、CIBZ の $\Delta fl/+$ ES 細胞において、CIBZ の発現量 (mRNA 及びタンパク質) が約 1/2 に減少していることが確認できた。

今後は、胚盤胞の *in vitro* の培養において、CIBZ のヘテロ欠損による内部細胞塊の異常の原因を探るために、経時的に、細胞増殖マーカー (BrdU や Ki67) と細胞死マーカー (TUNEL 法や caspase3 の活性) を調べる。さらに、胚盤胞の内部細胞塊由来の ES 細胞の三胚葉 (内胚葉、外胚葉、中胚葉) への分化に与える影響を調べるために、各遺伝型の ES 細胞株の胚葉体の形成 (三胚葉への分化) 実験を行い、経時的な形態変化を観察、これらのサンプルを回収し、三胚葉などのマーカー遺伝子や細胞死、細胞増殖のマーカー遺伝子の発現を qRT-PCR を用いて調べる予定である。

目次

| | |
|---------------|----|
| 1. 序論..... | 5 |
| 2. 材料と方法..... | 10 |
| 3. 結果..... | 17 |
| 4. 考察..... | 22 |
| 5. 図表..... | 26 |
| 6. 謝辞..... | 42 |
| 7. 参考文献..... | 43 |

1. 序論

胚発生における DNA メチル化酵素の役割

哺乳類の細胞において、個々の遺伝子の適切な時期的・空間的な発現が、発生や増殖・分化といった様々な生命現象を制御している。遺伝子の発現調節は、DNA メチル化及びヒストン修飾といった塩基配列の変化に伴わないエピジェネティックな機構が中心的な役割を担っている。DNA メチル化は、ゲノム DNA 中の CpG 配列のシトシンにメチル基が付加する機構(図 1A)である。DNA のメチル化の機能としては、X 染色体の不活化 (Cheng et al., 2004) やゲノムインプリンティング (Inoue et al., 2017)、遺伝子の発現の抑制 (Klose and Bird et al., 2006) などが挙げられる。DNA のメチル化による遺伝子発現制御は、胚発生 (Eden et al., 2003)、細胞のガン化 (Ushijima et al., 2005) などにも深く関わっていることが報告されている。DNA のメチル化による遺伝子発現制御において、DNA メチル化酵素とメチル化 DNA 結合タンパク質 (MBP) が、その担い手として知られている (図 1B)。遺伝子のプロモーターの CpG 配列がメチル化されることによる遺伝子発現の抑制様式は主に 2 パターンが知られており、1 つは遺伝子のプロモーター上の転写活性因子が結合するコンセンサス配列に存在する CpG 配列のシトシンがメチル化されると、転写活性因子の遺伝子のプロモーターへの結合の阻害によって転写活性を失う。もう 1 つはメチル化された遺伝子のプロモーターに MBP が結合することにより、MBP が直接的あるいは間接的に遺伝子の発現を抑制するものである (図 1B)。DNA メチル化酵素の Dnmt3a と Dnmt3b は、メチル基を新たに付加する機能を有する (Okano et al., 1998)。メチル化された DNA は複製の際、鋳型鎖のみがメチル化された状態になる。Dnmt1 は、メチル化された鋳型鎖の CpG を認識して、対となる娘鎖の CpG 配列のシトシンをメチル化することでメチル化パターンを維持する機能を有する (Chuang et al., 1997) (図 1A)。マウスの初期胚発生において、受精卵から胚盤胞にかけて、ゲノムワイドに DNA が急激に脱メチル化された後、胚盤胞から胎齢 (E) 6.5 にかけて急速なゲノム DNA の再メチル化が行われること (Chavatte-Palmer P et al., 2016) (図 2)から、DNA のメチル化が胚発生に重要であることが推測された。DNA メチル化酵素をコードする遺伝子のノックアウトマウス (KO) マウスの解析が行われた結果、Dnmt3a/3b のダブル KO マウスは、Dnmt1 の KO マウスと同様に E 9.5 日前後で胎生致死となること (Okano et al., 1999 ; Li et al., 1992) が明らかになった。これらのことから、DNA メチル化は初期胚の発生に必須であると考えられる。

メチル化 DNA 結合タンパク質

メチル化 DNA 結合タンパク質 (MBP)は、ドメイン構造の違いにより methyl-CpG binding domain (MBD)型のタンパク質と zinc finger (ZF)型のタンパク質の 2 つに大別される (図 3)。MBD 型タンパク質として MeCP2 (Lewis et al., 1992)、MBD1 (Cross et al., 1997)、MBD2 と MBD4 (Hendrich and Bird et al., 1998)などが同定されており、共通の特徴として N 末端領域にメチル化 DNA 結合ドメインである MBD、C 末端領域に転写抑制ドメインを有している (Meehan and Bird, 1993 ; Nan, et al, 1998)。MBD 型の MBP は、脊椎動物で高度に保存されており、発生や癌化などへの関与が報告されている(Clouaire and Stancheva, 2008)。その一方で、メチル化 DNA に結合する 3 つの C₂H₂ 型の ZF ドメインを有する MBP として Kaiso が報告されており、特徴として転写抑制ドメインである BTB を有する(Clouaire and Stancheva, 2008)。Dnmts と同様に DNA のメチル化の実行役である MBP も、初期胚の発生において重要であると推測された。しかし、上述した MeCP2、MBD1、MBD2、MBD4 と Kaiso をコードする遺伝子のそれぞれのシングル KO マウスの解析結果から、胚発生に顕著な異常はなかった(Chen et al., 2001 ; Guy et al.,2001 ; Zhao et al., 2003 ; Hendrich et al., 2001 ; Millar et al., 2002 ; Prokhortchouk et al., 2006)。また、それぞれの MBP の冗長性による胚発生への影響が考えられるために、MeCP2 と MBD2 のダブル KO マウスや MeCP2、MBD2 と Kaiso のトリプル KO マウスの作製及び解析もされたが、いずれの KO マウスでも発生に顕著な異常を示すものはなかった (Martín et al., 2009)。以上のことから、胚発生に MBP が必要であるという仮説はこれまでに証明されていない。そのため胚発生に関わる新規 MBP の同定及び KO マウスの作製による解析が重要である。

CIBZ の特徴

CIBZ (CtBP interacting BTB-zinc finger protein)は、BTB ドメインを有する新規 MBP として当研究室で同定された (Sasai et al., 2005) (図 4A)。ほぼ同時期に、CIBZ のヒトオーソログとして ZBTB38 がフランスの Defossez 博士のグループにより同定された (Filion et al.,2006)。CIBZ の N 末端側に BTB ドメインと repression domain2 (RD2)、中央部と C 末端側には 2 つの ZF クラスタ (ZF1-5 と ZF6-10) を有している。レポーターアッセイの結果から、BTB ドメインと RD2 はそれぞれ独立した転写抑制活性を持つものに対して、二つの ZF ドメインの間に存在する spacer 領域は転写促進活性を持つことが明らかになっている (Sasai et al., 2005)。また、

CIBZ 中央部の ZF3-5 は、Kaiso の ZF1-3 のアミノ酸配列と 65% の高い相同性があり、メチル化された CpG 配列と結合できることも解明されている (Oikawa et al., 2011)。CIBZ は様々な機能ドメインを有し、かつマウスの ES などの細胞や成体マウスの各組織にユビキタスに発現していること (Matsuda et al., 2004) から、この遺伝子の発現は細胞や生体で何らかの機能を有する可能性が示唆された。これまでに細胞レベルにおいて CIBZ は、①CIBZ の発現を低下させることにより内因性の細胞死促進マーカーである Caspase 9 と Caspase 3 の活性が上昇し、細胞死が亢進すること (Oikawa et al., 2008)、②ES 細胞において、Nanog の発現を正に制御することで ES 細胞の増殖を促進すること (Nishii et al., 2012)、③ES 細胞において、中胚葉のマーカーである Brachyury と心筋分化マーカーである Mesp1 を抑制することで心筋細胞への分化を抑制すること (Kotoku et al., 2016)、④筋分化のマーカーである Myogenin の発現を DNA メチル化依存的に負に制御することによって、筋芽細胞の骨格筋への分化を抑制すること (Oikawa et al., 2011) が明らかにされている。培養細胞における CIBZ の発現低下による細胞死の亢進と細胞増殖の阻害を引き起こすこと (図 4B) から、CIBZ の発現は胚発生にも重要ではないかと予想された。この可能性を検証するために、先行研究によって CIBZ の KO マウスの作製が試みられた。

胚発生に重要な遺伝子の解析手法

マウスの胚発生において、受精卵は卵割を繰り返し、2 細胞期、4 細胞期を経て、胚盤胞 (E3.5) を形成する (図 2)。胚盤胞は、栄養膜と内部細胞塊 (inner cell mass: ICM) から構成されており、胚発生のステージが進むにつれ、それぞれ胎盤と胎仔に分化していく (図 2)。初期胚発生において胚盤胞は E4.5~E5.5 で子宮に着床し、E6.5 から原腸陥入が始まり、E7.5 から胚体組織と胚体外組織の存在や始原生殖細胞もこの頃に確認できるようになる (図 5A、5B)。E8.5 から体節や神経板の形成が始まり、E9.5 において神経管の閉鎖や自発的な拍動する心臓といった生理的な特徴が見られようになる。E8.5~E12.5 において、体節の数は各時期で徐々に増えていく。後期の胚発生 (E12.5~) では、様々な組織や臓器、四肢の形成等が行われ、20 日前後で新生仔として出生する (図 5A)。胚の発生は、細胞の増殖や分化、細胞の移動、アポトーシスによる細胞の入れ替えなどの結果である。初期胚発生において細胞増殖と細胞死のバランスが胎仔の正常な発生に重要である。

遺伝子の生体内での生理機能を調べるために、哺乳類のモデル動物として主にマウスが用いられる。マウスは、1 世代あたり約 9 週間と哺乳類の中でも短く、全ゲノム

配列の解読 (Mouse Genome Sequencing Consortium. et al., 2002) や遺伝子改変技術も確立されている。特定の遺伝子を欠失させる KO マウスを作製することで、生体内でのその遺伝子の機能解析が行われ、解明された結果次第では疾患モデルとして用いられる場合もある (Guy et al.,2001)。Gene targeting 法は、コンベンショナルな KO マウス作製の代表的な手法として知られており、標的遺伝子のゲノムとターゲティングベクターの配列を含むゲノムとの相同組み換え反応により、遺伝子の機能を欠失させる方法である。しかし、この方法は遺伝子の KO により胎生致死を引き起こした場合、生体内でのその遺伝子の機能の解析は困難である。胎生致死を回避するため、時期及び組織特異的な遺伝子の欠失が可能となる Cre-loxP システムを用いたコンディショナル KO (cKO) マウスを作製する。Cre-loxP システム(Hoess R et al., 1984)とは、標的遺伝子をコードする領域を loxP 配列で挟んだマウス(flox/+マウス)と DNA 組み換え酵素である Cre を発現するマウスを交配させることで、cKO マウスの作製する手法である。

遺伝子が生体内で担う機能の分子メカニズムを調べるために、特に初期胚発生においては、サンプルの取得や調整が難しいため、*in vitro* での解析方法が開発されている。近年では、分化多能性を有する ES 細胞の樹立 (Evans et al.,1981) や皮膚細胞に Oct3/4 や Sox2 などの遺伝子の導入により iPS 細胞の樹立 (マウス : Takahashi et al., 2006、ヒト : Takahashi et al., 2007) が成された。これらの多能性幹細胞を用いた三胚葉への分化法を用いた研究結果より、細胞レベルでの哺乳類の発生の分子メカニズムが次々に解明され、再生医療への応用可能となってきた。特に、遺伝子の KO マウスが初期胚発生において胎生致死となる場合、*in vitro* の手法による解析と KO マウスの解析を併用することで、より詳細にこの遺伝子の初期胚発生におけるメカニズムを解明することが期待される。

CIBZ の KO マウスの解析

先行研究において、CIBZ の生体内での機能を調べるために、gene targeting 法による CIBZ のヘテロ欠損 (CIBZ^{+/-}) マウスの作製が試みられたが、CIBZ^{+/-} マウスは同定されなかった。フランスの Defossez 博士の研究グループも CIBZ^{+/-} マウスの作製に成功していない (未発表データ)。これらのことから、CIBZ のヘテロ欠損マウスは胎生致死となることが示唆された。先行研究により、胎生致死を回避するため、EUCOMM より入手した、Cre-loxP システムを利用した flox-neo/+ (fl-neo/+) ベクターを用いて CIBZ の fl-neo/+ ES 細胞株を樹立し、この ES 細胞による CIBZ の fl-neo/+ マウスが作製された。European Conditional Mouse Mutagenesis Program

(EUCOMM) は、国際ノックアウトマウスコンソーシアムの主なメンバーであり、*Cre-loxP* システムを用いたベクター、変異マウス ES 細胞株や変異マウスを大規模に作製しており、これらの KO マウスの作製と解析が数多く行われているという実績がある。*fl-neo/+* による遺伝子欠損マウスの作製方法には、2 パターンある。1 つ目は、目的遺伝子の *fl-neo/+* マウスと *Cre* 発現マウスを交配することによって、その遺伝子を欠損させる方法である (図 6①)。この場合、短時間で遺伝子欠損マウスの作製が可能であるが、*neo* などのカセットが周囲の遺伝子の発現に影響を及ぼすという報告がある (Alexopoulou et al.,1998) ため、一般的に次に紹介する方法が用いられる。この 2 つ目の方法は、*fl-neo/+* マウスと *Flp* 発現マウスとの交配で、*LacZ* や *neo* カセットを除去した *fl/+* マウスを作製した後、*fl/+* マウスと *Cre* 発現マウスとの交配によって、目的遺伝子を欠損させる方法である (図 6②)。先行研究において、1 つ目の方法を用いて CIBZ の *fl-neo/+* マウスと全身で *Cre* を発現する CAG *Cre* マウスとの交配により、CIBZ の Δ *fl-neo/+* マウスの作製と解析が行われた。その結果、CIBZ の Δ *fl-neo/+* 胎仔は、E9.5 前後で胎生致死となることが明らかになった (図 7)。

本研究の目的

先行研究において、CIBZ のヘテロ欠損によって胎生致死になることが強く示唆された。本研究では、CIBZ の Δ *fl/+* マウスの作製と解析を行うことによって、CIBZ のヘテロ欠損による胎生致死の再確認と表現型をより詳細に解析するとともに、その分子的なメカニズムの *in vitro* で解明を目指す。

2. 材料と方法

CIBZ の flox/+ マウスの作製

先行研究により作製された CIBZ flox-neo/+ マウスと Rosa-Flp (Flp) マウスを交配し生まれた仔マウスのジェノタイピングを行った。出生した仔マウスは CIBZ の flox/+; Flp と Flp/+ マウスが予想される。ジェノタイピングにより同定された CIBZ の flox/+; Flp マウスと 野生型 (C57BL/6) マウスと交配させて、生まれた仔マウスをジェノタイピングすることで、CIBZ の flox/+ マウスを同定する。

ジェノタイピング

• Genomic DNA 抽出

Purgene Core Kit A (QIAGEN) を使用して抽出を行った。生後一ヶ月以降のマウスから、0.2mm 程度のマウスのイヤープンチによる耳二枚を採取し、エッペンドルフチューブに入れた。次に、Cell Lysis Solution を100 μ L 加え、Proteinase K Solution (10mg/mL)1 μ L とRNase A (10mg/ml) 0.5 μ lを加え、25 回転倒混和し、65 $^{\circ}$ Cで2 時間インキュベートした。上清のみを新しいエッペンドルフチューブに移し、Protein Precipitation Solution を33 μ L 添加し、20 秒間ボルテックスにより、混合させた。そして、4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm 、5 分間遠心し、上清を新しいエッペンドルフチューブに移した。上製に isopropanol を100 μ L 加え、50 回程度転倒混和し、4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm で5 分間遠心した。上清を取り除き、70%エタノールを100 μ L 加え、4 $^{\circ}$ C、5,000 rpm で1 分間遠心した。上清を慎重に取り除き、5分間、室温で乾燥させ、TE buffer 50 μ l を添加し、65 $^{\circ}$ C、一時間インキュベーションを行った。その際に、20分ごとにボルテックスを行うことで、溶解させた。サンプルは4 $^{\circ}$ Cで保存した。

• Genomic PCR 法

Genomic PCRは、抽出したgenome DNAを鋳型として以下の組成と条件でPCR反応させた。PCR産物は、2%アガロースゲルで電気泳動し、gel red染色を用いて確認した。PCR反応は、①96 $^{\circ}$ C2 分間、②94 $^{\circ}$ C20秒間、58 $^{\circ}$ C30秒間、68 $^{\circ}$ C1分間、③68 $^{\circ}$ C5 分間の条件で32 cycle、PCR反応を行った。

[Genomic PCR反応液の組成]

| | |
|---------------------------|-------------|
| Template DNA | 1 μ l |
| 2 \times KOD FX buffer | 5 μ l |
| 2mM dNTPs | 2 μ l |
| 10 μ M primer Forward | 0.3 μ l |
| 10 μ M primer Reverse | 0.3 μ l |
| KOD FX neo | 0.1 μ l |
| DDW | 1.3 μ l |

[使用したプライマー]

CIBZ^{+/+}, CIBZ^{flox/+}

Primer A : 5'-TGCTTGGAGATACAGAAACTTGCCCTAC-3' (Forward)

Primer B : 5'-TTTGAGAAGTTGCGGTCACTAAGGTC-3' (Reverse)

Flp

FLPe-F : 5'- CACTGATATTGTAAGTAGTTTGC-3' (Forward)

FLPe-R : 5'- CTAGTGCGAAGTAGTGATCAGG-3' (Reverse)

Cre

Cre-F2 : 5'- TGTCCAATTTACTGACCGTACACC-3' (Forward)

Cre-R704 : 5'- CTCTGGTGTAGCTGATGATCCGAA-3' (Reverse)

Δ flox

GF89352 : 5'-ACACCCTTTCTGCTTGGAGATAC' (Forward)

R85056 : 5'- CTTTCTCACGAGCACTAATGAGG-3' (Reverse)

胚盤胞の取得

CIBZ fl/+ マウスと CAG-Cre マウスを交配させ、妊娠マウスから子宮を取り出し、M2 培地に入れる。子宮膜や子宮の周りの脂肪組織をハサミやピンセットで取り除いた後、新しい M2 培地に移し替え、子宮と卵管の間および子宮頸部をハサミで切る。(以降の操作は、実体顕微鏡下で行う。)注射針を子宮頸部に挿入し、培地を流して灌流をする。子宮をディッシュからとりだし、培地の中からマウスピペットを使って M2 培地のメディアドロップへ移す。取得した胚盤胞を数回 M2 培地のメディアドロップへ移し替えることで、洗浄を行う。これらの操作で使う培地においては、培地やメディアドロップ上に液体パラフィンを重ねた。また、免疫染色用の胚盤胞を回収する場合は、10 μM BrdU を M2 メディアドロップ中で 1 時間取り込ませた後、4% パラフォルムアルデヒドを 30 分間処理することで固定し、PBSB 中、4°C で保存した。なお、培養及び BrdU の取り込みは、5% CO₂ 存在下、37°C の条件の下で行った。

胚盤胞 outgrowth アッセイ

CIBZ fl/+ マウスと CAG-Cre マウスを交配により取得した胚盤胞の透明体を取り除くために、マウスピペットを用いて、酸性タイロド (AT) 処理を行った。AT 処理は、マウスピペットのキャピラリー中で AT と胚盤胞を約 30 秒間上下させることで行った。AT 処理後、マウスピペットを使って胚盤胞を M2 培地のメディアドロップへ数回移し替えることで、洗浄を行う。胚盤胞を 3i (CHIR 99021、PD0325901、SB431542) を除去した ES 培地のメディアドロップに数回移し替えた

後、0.1%ゼラチンコーティングした12mmカバーガラス(Matsunami)上の3iを除去したES培地のメディアドロップ中に移した。これらの胚盤胞は、day0~day5の間、毎日倒立顕微鏡で観察を行い、写真を撮影した。さらに、免疫染色を行うために、day3とday5のサンプルを取得した。免疫染色用のサンプルを回収する場合は、10 μ M BrdUをM2培地のメディアドロップ中で1時間取り込ませた後、4%パラフォルムアルデヒドを30分間処理して固定して、0.1%BSA/PBS中、4°Cで保存した。これらの操作で使う培地においては、培地やメディアドロップ上に液体パラフィンを重ねた。なお、培養及びBrdUの取り込みは、5%CO₂存在下、37°Cの条件の下で行った。

免疫組織染色

CIBZ flox/+マウスとCAG-Creマウスを交配により取得した胚盤胞と胚盤胞の*in vitro*培養において、0.25%TritonX-100/PBSを室温で20分振とうさせ、0.1%Tween20/PBS(TPBS)で5分で3回洗浄する。その後、2%BSAを室温で3時間処理することでblockingした。その後、TPBSを用いて10分で3回洗浄した。1次抗体として抗cleaved-caspase 3(2%BSAで1/200希釈)を室温で2時間処理し、TPBSを用いて10分で3回洗浄した。2次抗体として抗Rabbit-Texas Red(2%BSAで1/500希釈)を室温で45分間処理し、TPBSを用いて10分間洗浄した後、DAPIでカウンター染色を室温で5分間行った。そのあと、TPBSを用いて10分間2回洗浄した。最後に、slowfade Gold(Thermo Fisher)を用いてサンプルを封入した。

ES細胞の樹立と培養

CIBZ flox/+マウスとCAG-Creマウスを交配により取得した胚盤胞の透明体を取り除き、M2培地のメディアドロップで洗浄する。次に、ES培地のメディアドロップに数回移し替えた後、M-STO細胞を播種しておいたメディアドロップに胚盤胞を移し替える。5~7日後、ES細胞様のコロニーが一つ形成されたら、それをAccutase(Nacalai Tesque)で乖離させ、M-STO細胞を播種しておいた24wellディッシュに播種する。これらの操作で使うメディアドロップにおいては、上に液体パラフィンを重ねた。なお、培養は全て、5%CO₂存在下、37°Cの条件の下で行った。M-STO細胞は、STO細胞(SNL細胞マウス胎児繊維芽細胞由来の株化細胞に、ネオマイシン耐性遺伝子とLIF遺伝子発現ベクターを組み込んだ細胞)を10 μ g/mlのマイトマイシンC(協和発酵キリン)を含む培地で2時間30分処理することで、細胞増殖を不活性化した細胞である。SNL細胞の培養には、あらかじめディッシュを0.1%ゼラチン, from porcine skin(Sigma)溶液でコーティングしたものをを用いた。

樹立したES細胞の継代維持は、Accutaseで細胞を剥離し、少量の培地を入れ、細胞がシングルになるようにピペッティングした後、0.1%gelatin coating dishに播種

し、15% KSR/DMEM medium で培養を行った。

上記の培養は全て、5% CO₂、37°Cの条件の下で行った。

[15% KSR/DMEM medium 組成]

| | |
|---|-------------|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (Nacalai tesque) | 最終濃度 |
| KnockOut serum (gibco) | 15% |
| Penicillin-Streptomycin (Nacalai tesque) | 50 units/ml |
| 100x MEM Nonessential amino acids solution (Nacalai tesque) | 1x |
| L-Glutamine stock solution (Nacalai tesque) | 2 mM |
| 2-mercaptoethanol (Nacalai tesque) | 100 M |
| Recombinant Mouse LIF (Nacalai USA) | 1000U/ml |
| CHIR 99021(selleckchem) | 3 μ M |
| PD0325901(selleckchem) | 1 μ M |
| SB431542(selleckchem) | 10 μ M |

[SNL 細胞の培地組成]

| | |
|---|-------------|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (Nacalai tesque) | |
| Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich) | 10% |
| Penicillin-Streptomycin (Nacalai tesque) | 50 units/ml |
| L-Glutamine stock solution (Nacalai tesque) | 2 mM |

アルカリフォスファターゼ染色による未分化性状態の確認

ES 細胞を 20x10⁴ cells/ml で播種し、3 日間培養した後、StemAb Alkaline Phosphatase Staining Kit II (Stemgent) を用いて、アルカリフォスファターゼ染色を行った。染色方法は、キットのプロトコールに従った。

胚様体 (EB) 形成

胚葉体 (EB: Embryoid Body) 形成アッセイでは、hanging drop 法を用いて、1つの drop の中に 1000 個の細胞が入るように播種し、5% CO₂ 存在下、37°Cの条件の下で 4 日間浮遊培養させることで、シングルの EB 形成を行った。EB 形成アッセイで用いた培地は 2-mercaptoethanol と 3i を除いた ES 細胞培地を用いた。

半定量 RT-PCR とリアルタイム PCR (qRT-PCR) による mRNA の発現解析

・ サンプルの回収

任意のディッシュまたは plate で培養した細胞を 1×PBS(-)で 1 回洗浄し、Accutase で処理した後、少量の培地を入れ、細胞がシングルになるようにピペッティングし、1.5mL のエッペンドルフチューブに入れ、4°C、1500rpm、5 分間遠心分離した。上清を取り除き、ペレットを軽くタッピングした後 1×PBS 1000μl を加え

4°C、1500rpm、5 分間遠心分離した。上清を捨てペレットとしたものを-80°Cで保存した。

• RNA 回収、cDNA 合成、PCR 反応

Total RNA の抽出はセパゾール RNA I super (Nacalai Tesque) を用いて抽出した。まず、セパゾール RNA I super を 0.5ml 入れ、細胞または組織が溶解するまでボルテックスを行い、室温で 5 分間静置した。そして、chloroform 100μl を入れボルテックスし、室温で 3 分間静置後、4°C、1500rpm で 15 分間遠心した。遠心後、上清を取り出し、2-propanol を 600μl 加えてボルテックスを行い、室温で 5 分間静置した後、4°C、1500rpm で 15 分間遠心した。上清を取り除き、70% ethanol を 1ml 加え、4°C、1500rpm で 10 分間遠心した。次に、上清を捨て、5 分間乾燥させ、DEPE 処理水を 12μl 加え、-80°Cで保存した。cDNA の合成は ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA remover (Toyobo) を使用した。qRT-PCR のサンプル調整は Thunderbird qPCR Mix (Toyobo) を用いて行った。これらすべての手順は付属のプロトコールに従った。

qRT-PCR は LightCycler 96 System (Roche) を使用し、反応条件は (i) 95°C, 60 sec、(ii) 40× (95°C, 15 sec; 58°C, 30 sec; 72°C, 30 sec) で行った。内在性コントロールとして GAPDH を用い、標的遺伝子の転写レベルの補正を行った。

[使用したプライマー]

CIBZ

5'-CCAAAGCACAGAAGCTAACTCCGTC -3' (Forward)

5'-CTTGAGGCGGCCAGGACATTG -3' (Reverse)

GAPDH

5'-CAATGTGTCCGTCGTGGATCT-3' (Forward)

5'-GTCCTCAGTGTAGCCCAAGATG-3' (Reverse)

Oct3/4

5'-TCACTCACATCGCCAATCAG-3' (Forward)

5'-CCTGTAGCCTCATACTCTTCTC-3' (Reverse)

Sox2

5'-CTACAGCATGTCCTACTCGC-3' (Forward)

5'-CCTCCCAATTCCCTTGATCTC-3' (Reverse)

Nanog

5'-TTCAGAAATCCCTTCCCTCG-3' (Forward)

5'-AGTAGCAGACCCTTGTAAGC-3' (Reverse)

Western blotting

・培養細胞からタンパク質抽出用 cell lysate の調整

任意のディッシュまたは plate で培養した細胞を 1×PBS(-)で 1 回洗浄し、0.25%Trypsin/EDTA で処理した後、1.5mL のエッペンドルフチューブに入れ、4℃、1500rpm、5 分間遠心分離した。上清を取り除き、ペレットを軽くタッピングした後 1×PBS 1000μl を加え 4℃、1500rpm、5 分間遠心分離した。上清を捨てペレットとしたものを-80℃で保存した。

・ SDS-PAGE

回収した細胞に ELB buffer と PI (protease inhibitor cocktail, Roche)の混合液 80 μl を加え、sonication による細胞破碎の後、氷上に 20 分間静置した。15000 rpm、4℃、20 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に 5×SDS Loading buffer を加え、99℃、5 分間加熱して泳動サンプルを調製した。SDS-PAGE 用ゲルをセットした泳動装置に SDS electrophoresis buffer を注ぎ、サンプルを注入して 20 mA で 90 分間泳動した。

[ELB buffer 50ml]

| | |
|--------------------------------------|-------|
| 1M Hepes (pH 7.5) | 2.5ml |
| 5M NaCl | 2.5ml |
| 0.5M EDTA | 0.1ml |
| 10% Nonidet P-40 | 0.5ml |
| 1M DTT | 50μl |
| 100mM phenylmethanesulfonyl fluoride | 0.5ml |
| 2 mg/ml leupeptin | 50μl |
| 2 mg/ml aprotinin | 50μl |

以上を DDW で 50ml にメスアップ、混和した後使用した。

SDS-PAGE 用ゲルを以下の組成で作製した。

[8% running gel 1 枚分]

| | |
|-------------------------|--------|
| DDW | 3450μl |
| 30% acrylamide mix | 2000μl |
| 1.5M Tris(pH8.8) | 1900μl |
| 10% SDS | 75μl |
| 10% ammonium persulfate | 75μl |
| TEMED | 3μl |

[5% stacking gel 1枚分]

| | |
|-------------------------|--------------|
| DDW | 2100 μ l |
| 30% acrylamide mix | 500 μ l |
| 1.5M Tris(pH8.8) | 380 μ l |
| 10% SDS | 30 μ l |
| 10% ammonium persulfate | 30 μ l |
| TEMED | 3 μ l |

• Blotting

PDVF membrane (PALL corporation) を 100%メタノールに浸し、DDW で洗浄した後、SDS-PAGE 後のゲルと PVDF membrane を transfer buffer (25 mM Tris、192 mM Glycine) にそれぞれ浸し、15 分間振盪した。また、振盪処理が終わる 3 分前にろ紙 6 枚を transfer buffer に浸した。次に陰極側からろ紙 3 枚、PDVF membrane、ゲル、ろ紙 3 枚の順に重ね、blotting 装置にセットし、12V で 60 分間 blotting した。その後、PDVF membrane を 5% スキムミルク-TPBS 溶液に室温で 1 時間振盪または 4°C で一晩振盪して Blocking 処理を行った。その後 TPBS に浸して 5 分間振盪を 3 回行い洗浄した。

• 抗体処理

一次抗体が最適な濃度になるように Can Get Signal solution (TOYOBO) と混合し、PDVF membrane 全体を覆うように注ぎ、室温で 60 分間反応させた。一次抗体反応後、TPBS で 5 分間振盪を 3 回行い洗浄した。その後、二次抗体を can get signal solution と混合し、PDVF membrane 全体を覆うように注ぎ、室温で 60 分間反応させた。二次抗体反応後、TPBS で 5 分間振盪を 3 回行い洗浄し、発光試薬 ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-sciences) もしくは、Chemi-Lumi One Ultra (nacalai tesque) を用いて検出を行った。

[一次抗体]

| | |
|------------------------------------|------------|
| CIBZ rabbit 抗体 (本研究室で精製) | 1/5000 希釈 |
| Oct3/4 抗体(R&D Systems) | 1/2000 希釈 |
| Sox2 抗体(Sigma) | 1/2000 希釈 |
| Nanog 抗体(Millipore) | 1/2000 希釈 |
| α -tubulin mouse 抗体 (Sigma) | 1/10000 希釈 |

[二次抗体]

| | |
|--|------------|
| α -Mouse IgG-HRP 抗体 (Cell signaling) | 1/10000 希釈 |
| α -Rabbit IgG-HRP 抗体 (Cell signaling) | 1/5000 希釈 |

3. 結果

3-1. CIBZ のヘテロ欠損マウスの作製及び表現型の解析

先行研究において、CIBZ の $\Delta fl-neo/+$ 胎仔が E9.5 前後で胎生致死になることが示された。本研究では、CIBZ の $\Delta fl-neo/+$ のゲノムに残存する LacZ 配列による周辺遺伝子の発現への影響を回避するために、 $\Delta fl/+$ マウスの作製を試みる。そのためにまず、CIBZ の $fl-neo/+$ マウスと Rosa Flp マウスとの交配により、CIBZ の $fl/+$ マウスの作製を行った。この交配により生まれた仔マウスのジェノタイプピングを行った(図 8)。ジェノタイプピングに用いたプライマーは、野生型のアレルと変異型アレルを区別できるように、長さの異なる 2 つの PCR 産物を得るために設計した(図 8)。Genomic PCR (gPCR) の結果より、生まれたマウスの中にモザイク ($fl/+; Flp$) マウスを同定した。CIBZ の $fl/+; Flp$ マウスと野生型 (C57BL/6J : $+/+$) マウスとの交配により、CIBZ の $fl/+$ マウスを作製した(図 8)。一年以上の飼育において、CIBZ の $fl/+$ マウスは、野生型のマウスと比較して、形態(身長や体重)や行動、生殖能力において顕著な差は確認されなかった。

次に、CIBZ の $\Delta fl/+$ マウスを作製するために、CIBZ の $fl/+$ マウスと CAG Cre マウスとの交配を行った(図 8)。この交配により生まれてくる仔マウスはメンデルの法則に従って、4 つの遺伝型 [$+/+$ 、Cre、 $fl/+$ 、 $fl/+; Cre (\Delta fl/+)$] が同じ割合で存在することが予想される。CIBZ の Δfl マウスの同定において、Cre、 $fl/+$ 、 $\Delta fl/+$ がそれぞれ異なるサイズのバンドが確認できる gPCR を行った。その結果、生まれた仔マウス 23 匹の中に、 $\Delta fl/+$ の存在は確認できなかったが、 $\Delta fl/+$ 以外の遺伝型は、およそメンデルの法則に従って存在することが確認された(図 9A)。以上の結果より、CIBZ の $\Delta fl/+$ マウスは胎生致死になることが強く示唆された。

3-2. CIBZ のヘテロ欠損による胎生致死となる時期の検証と表現型の解析

3-2-1. CIBZ の $\Delta fl/+$ の胎仔が胎生致死となる時期の検証

CIBZ の $\Delta fl/+$ 胎仔が胎生致死になる時期を調べるために、CIBZ の $fl/+$ マウスと CAG Cre マウスとの交配により得られた E11.5 胎仔の遺伝型の同定と形態観察を行った。複数の妊娠したマウスより、30 個の胎仔を取り出して、遺伝型の解析を行った結果、 $\Delta fl/+$ 以外の遺伝型はメンデルの法則に従って存在したが、 $\Delta fl/+$ の遺伝型は確認できなかった(図 9A)。顕微鏡による解析において 30 個の胚の胎仔は全て E11.5 時期の正常な形態(目や心臓、四肢の形成など)を示した。これらの 30 個の胚以外

に、胎仔が見つからない胚も数個存在しており、これらが $\Delta fl/+$ である可能性が考えられた。以上のことから、 $\Delta fl/+$ 胎仔の死亡時期は E11.5 より早いと考えられる。

続いて、CIBZ の $fl/+$ マウスと CAG Cre マウスとの交配により得られた 65 個の E9.5 の胎仔の解析を行った。その結果、E9.5 時期の正常な形態（神経管の閉鎖や心臓の拍動など）を示す全ての胎仔は $\Delta fl/+$ 以外の遺伝型であり、それらはメンデルの法則に従って存在することが確認できた。一方で、それ以外に胎仔がほとんど吸収された胚も 4 つ見つかった。これらの遺伝型を調べたところ、全てが $\Delta fl/+$ の遺伝型であった（図 9A）。以上のことから、CIBZ の $\Delta fl/+$ 胎仔の死亡時期は E9.5 前後であることが確かめられた。

3-2-2. CIBZ の $\Delta fl/+$ マウスの表現型解析

CIBZ のヘテロ欠損がマウスの胚発生に影響を与える時期を調べるために、CIBZ の $fl/+$ マウスと CAG Cre マウスとの交配により得られた E6.5~E8.5 胎仔（E6.5 : 34 個、E7.5 : 50 個、E8.5 : 62 個）の遺伝型の同定と形態観察を行った。その結果、E6.5~E8.5 の胎仔は、メンデルの法則に従って、全ての遺伝型がほぼ同等の割合で確認できた（図 9A）。E6.5 の $+/+$ 、Cre と CIBZ の $fl/+$ の全ての胎仔は正常に発生した形態を示したのに対して、CIBZ の $\Delta fl/+$ 胎仔 9 匹のうち 5 匹（55%）が、同腹子の $fl/+$ 胎仔と比較して、約 2/3 程度の矮小な表現型を示した（図 9B）。E7.5 の $+/+$ 、Cre と CIBZ の $fl/+$ のすべての胎仔は正常に発生した形態が示され、胚体組織（個体を形成する部分）と胚体外組織（胎盤となる部分）が顕微鏡下で判別できた。しかし、この時期の同腹の CIBZ の $\Delta fl/+$ 胎仔はその他の遺伝型の胎仔と類似の胚体組織と胚体外組織の形成が示されたが、同腹の $fl/+$ 胎仔と比較して、両方の組織が約 1/2 以下に小さくなることが観察された（図 9B）。E8.5 では $+/+$ 、Cre と CIBZ の $fl/+$ の全ての胎仔は神経板や体節などが形成されており、正常に成長した胎仔の形態を示した。一方で、同腹の CIBZ の $\Delta fl/+$ 胎仔は、そのような組織が見られず、体積が 1/10 以下に縮小していることや胎仔組織の出血といった顕著な形態異常が観察された（図 9B）。以上の結果より、CIBZ のヘテロ欠損は何らかの原因で E6.5 から胎仔の形態に異常をきたし始め、E7.5~E8.5 では、その表現型の異常が進行することによって、E9.5 では胎仔の存在が確認されないことが分かった。これらのことから、CIBZ のヘテロ欠損は、E6.5 より前の発生段階にも影響を与えることが示唆された。

3-3. In vitro での CIBZ のヘテロ欠損が胚盤胞の発生に与える影響の解析

胚盤胞 (E3.5) から着床時期 (E4.5 前後) の胎仔の *in vivo* での解析は技術的に困難であるため、以下の 2 つの方法を用いる。①胚盤胞を ES 細胞用培地で 4~5 日間培養することにより、着床時期のマウスの胚発生を模倣する方法である (Voss et al.,2000)。②胚盤胞の ICM から樹立される ES 細胞を浮遊培養法することで、三胚葉 (内胚葉、中胚葉と外胚葉) へ分化を模倣する胚葉体 (embryoid body:EB) を形成する方法 (Kurosawa., 2007) である。

3-3-1. 胚盤胞の *in vitro* の培養による CIBZ ヘテロ欠損が胚盤胞の発生に与える影響の検証

CIBZ のヘテロ欠損が着床時期 (E4.5~E5.5) の胚発生に与える影響を調べるために、CIBZ の *fl/+* マウスと CAG Cre マウスとの交配により摘出した胚盤胞を *in vitro* で培養した (図 10A)。この培養では、胚盤胞を 3i (ES 細胞の分化を抑制する MEK 阻害剤 PD0325901、GSK3 β の阻害剤 CHIR99021 と TGF β 受容体の阻害剤 SB431542) を除去した ES 細胞用培地で培養することにより、後に胎仔となる ICM と、後に胎盤になる栄養膜 (trophoblast) の発生や分化に与える影響を *in vitro* で模倣できる。4 日間培養した後、ICM と栄養膜はそれぞれ、ICM 由来の細胞と栄養芽層巨大細胞 (TG : trophoblast giant cell) に分化し、顕微鏡で観察できる。まず、CIBZ の $\Delta fl/+$ の胚盤胞に異常がないかを調べるために、摘出した 58 個の胚盤胞について遺伝型の同定と顕微鏡による表現型の解析を行った。その結果、4 種類の遺伝型 (+/+, Cre、*fl/+*、 $\Delta fl/+$) の胚盤胞の数は、メンデルの法則に従って確認された。培養前の胚盤胞及び培養 1 日目の胚盤胞は、遺伝型の違いによる顕著な表現型 (大きさや形態) の差は観察されなかった (図 10B~10D)。このことから、CIBZ のヘテロ欠損は胚盤胞までの発生に影響を与えないことが示唆された。胚盤胞を 4 日間培養したサンプルを顕微鏡で観察した写真を解析した結果、CIBZ の $\Delta fl/+$ は *fl/+* と比べて、ICM 由来の細胞塊の部分の面積がおよそ 1/3 に縮小したのに対して、TG の面積に顕著な差は示されなかった (図 10D)。これらのことから、CIBZ のヘテロ欠損は、胚盤胞の ICM の由来の細胞の細胞死の亢進或いは増殖阻害により胎仔の発生を抑制することが示唆された。

次に、CIBZ のヘテロ欠損が胚盤胞の細胞死に与える影響を分子レベルで明らかにするために、*in vitro* での培養前後の胚盤胞を細胞死のマーカーである抗 cleaved-caspase 3 抗体を用いて免疫組織染色を行なった。その結果、胚盤胞において

cleaved-caspase 3 の発現を示す陽性細胞は、CIBZ の fl/+ と Δ fl/+ との間に顕著な差は示されなかった(図 11A)。しかし、胚盤胞を *in vitro* で 4 日間培養したサンプルの ICM 由来の細胞塊において cleaved-caspase 3 の発現を示す陽性細胞は、CIBZ の Δ fl/+ は fl/+ より顕著な上昇が確認された (図 11B)。これらのことから、CIBZ のヘテロ欠損は胚盤胞までの胚発生において、細胞死に影響を与えないが、ICM の分化に伴って細胞死を亢進させることが強く示唆された。

3-3-2-1. CIBZ の fl/+ と Δ flox/+ ES 細胞株の樹立

CIBZ のヘテロ欠損が ICM 由来の ES 細胞の分化に与える影響を EB 形成法を用いて調べるために、まず、3 種類の ES 細胞株 [野生型 (+/+), CIBZ の flox/+ と Δ flox/+] の樹立を試みた。CIBZ の fl/+ マウスと CAG Cre マウスの交配により取得した胚盤胞を ES 細胞用培地を用いて feeder 細胞上で数回継代培養を行うことによって、高い効率 (80% 以上) で ES 細胞株を樹立した (図 12A)。樹立した複数の ES 細胞株のジェノタイピングを行った結果、+/+、CIBZ の fl/+ と Δ fl/+ の遺伝型をそれぞれ同定した。

3-3-2-2. CIBZ の fl/+ と Δ flox/+ ES 細胞株における CIBZ の発現解析

これまでに CIBZ の Δ fl/+ 胎仔において、CIBZ の発現が 1/2 に減少していることが確認出来ておらず、技術的にも胎仔において CIBZ の発現を定量することは困難である。そこで、樹立した 3 種類の ES 細胞株 (+/+, CIBZ の flox/+ と Δ flox/+) において、CIBZ の mRNA 及びタンパク質の発現を qRT-PCR と western blotting を用いて解析した。その結果、CIBZ の Δ fl/+ ES 細胞での mRNA 及びタンパク質の発現量が +/+ 或いは CIBZ の fl/+ ES 細胞と比較して約 1/2 に低下していることが確認できた (図 12B、12C)。これらのことから、少なくとも胚盤胞の ICM において CIBZ の Δ fl/+ で CIBZ の発現が 1/2 に減少していることが示唆された。

3-3-2-3. CIBZ の fl/+ と Δ flox/+ ES 細胞株における未分化性の検証

樹立した 3 種類の ES 細胞株 (+/+, CIBZ の flox/+ と Δ flox/+) において、CIBZ のヘテロ欠損が未分化性に与える影響を検証するために、①コロニーの形態観察、②アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色、③未分化マーカーの発現解析を行った。まず、顕微鏡下で形態観察を行った結果、樹立した 3 種類の遺伝型の ES 細胞のコロニーは数代にわたり継代培養をしても、未分化な ES 細胞の特徴である

境界が明瞭な丸い輪郭が観察され、顕著な分化傾向像は観察されなかった（図 12A）。次に、ES 細胞の未分化性を評価する ALP 染色を行った結果、3 種類の遺伝型の ES 細胞株で ALP 陽性の ES 細胞に顕著な差がなかった（図 13）。ES 細胞の未分化状態の維持に重要な Oct3/4、Nanog と Sox2 の mRNA の発現を qRT-PCR で解析した結果、3 種類の ES 細胞における Oct3/4 の mRNA の発現量に顕著な差が見られなかったが、Nanog と Sox2 の mRNA の発現量は、CIBZ の $\Delta fl/+$ ES 細胞では半分以上低下していた（図 14A）。さらにこれらの未分化マーカーのタンパク質の発現量を Western blotting で解析した結果、Oct3/4 の発現量には顕著な差が見られなかったが、Nanog 及び Sox2 の発現量はおよそ 1/3 と 1/2 に低下することが明らかになった（図 14B）。以上のことから、今回樹立した 3 種類の ES 細胞株は、未分化性を維持しているが、CIBZ の $\Delta fl/+$ ES 細胞は分化に傾きやすいことが推測される。

現在、これらの ES 細胞株を用いて三胚葉への分化モデルである hanging drop 法により、EB 形成を行っている。EB 形成の培養（4 日間）における、EB に特徴的な形態（球形と大きさ）に、CIBZ の $fl/+$ と $\Delta fl/+$ の遺伝型の違いによる顕著な差は無かった。

4. 考察

CIBZ ヘテロ欠損によるマウスの胎生致死の原因と意義の検証

先行研究より、CIBZ の *fl-neo/+* マウスと CAG Cre マウスとの交配によって、CIBZ の Δ *fl-neo/+* マウスの作製と解析が行われた結果、CIBZ のヘテロ欠損マウスが E9.5 で胎生致死であることが示された。しかし、*fl-neo/+* と Δ *fl-neo/+* マウスには、ゲノム上に標的遺伝子や隣接する他の遺伝子の発現に影響をおよぼす可能性がある *neo* や *LacZ* の配列が残存しており、これらのカセットを除去した CIBZ の *fl/+* マウスを作製する必要があった。今回作製した CIBZ の *fl/+* マウスはゲノム上に *neo* や *LacZ* などの配列が存在しないため、このカセットによる表現型への影響の排除が予想される。CIBZ の *fl/+* マウスと CAG Cre マウスとの交配により得られた CIBZ の Δ *fl/+* 胎仔は、CIBZ の Δ *fl-neo/+* 胎仔と同様に E9.5 前後に胎生致死となることが示されたため、既知の MBP で初めて CIBZ はマウスの初期胚の発生に必須であることが証明された。興味深いことに CIBZ の Δ *flox/+* 胎仔が胎生致死となる時期である E9.5 は、*Dnmt3a/3b* のダブル KO マウスや *Dnmt1* の KO マウスにおける胎生致死と同時期である。このことから、ゲノム DNA のメチル化パターン形成と維持と同様に、MBP である CIBZ による遺伝子の発現調節も初期胚の発生に重要であることが強く示唆された。

CIBZ の Δ *flox/+* マウスが胎生致死となる原因が胎盤の形成不全による可能性も検証する必要がある。胎盤は、胚発生に必要な栄養源や酸素を母体から供給すると同時に、胎仔の代謝産物を母体に排出することで胎仔の発生に重要な器官であり、E8.5 の胚体外中胚葉から形成される。E9.5~E14.5 の遺伝子の欠損による胎生致死の多くの場合は胎盤の形成不全による胎仔の脳、心臓と血管などの発生異常と強く関連していることが明らかにされている (Perez-Garcia et al., 2018)。CIBZ のヘテロ欠損による胎生致死は E9.5 であることと、E6.5~E8.5 の CIBZ の Δ *fl/+*胎仔は発生遅延を示したが、胎盤には顕著な異常が見られなかった。これらのことから、CIBZ のヘテロ欠損による胎生致死の原因は、胎仔の源である ICM の発生や分化の異常によることが強く示唆された。

計 58 個の胚盤胞の解析を行った結果、CIBZ の Δ *fl/+* の胚盤胞は他の遺伝型の胚盤胞と比較して異常を示さなかったため、CIBZ のヘテロ欠損による胎仔の異常は、胚盤胞の着床時期 (E3.5~E5.5) に起こることが示唆された。この時期を模倣するモデルとして、胚盤胞の *in vitro* の培養を行った結果、CIBZ の Δ *fl/+*の胚盤胞は *fl/+*

より ICM 由来の細胞の面積が減少したが、TG 細胞の面積に顕著な差は無かった。また、免疫組織染色の結果より、CIBZ の $\Delta fl/+$ は $fl/+$ より、ICM 由来の細胞塊において、cleaved-caspase 3 陽性細胞は顕著な上昇が示されたが、TG では差がなかった。このことから、CIBZ の $\Delta fl/+$ の ICM 由来の細胞塊の縮小は、細胞死の亢進によることが強く示唆された。また、パラフィン切片を用いた免疫組織染色によって細胞増殖マーカー (BrdU と Ki67) と細胞死マーカー (cleaved-caspase 3 と TUNEL 法) の検出が行われた結果、E6.5~E8.5 における CIBZ の $\Delta fl/+$ 胎仔において細胞増殖の抑制と細胞死の亢進が確認された (松浦 修士論文)。今後、胚盤胞及び胚盤胞の *in vitro* の培養において、上述した細胞増殖マーカーと細胞死マーカー、ICM マーカー (Oct4 など) や TG 細胞マーカー (Cdx2) の発現を、免疫組織染色を用いた解析により検証する必要がある。

本研究で樹立した C57BL/6 マウス由来の $+/+$ および CIBZ の $fl/+$ と $\Delta fl/+$ の ES 細胞株は、形態観察と ALP 染色の結果、未分化マーカーの発現量解析の結果から、どの遺伝型においても未分化性を維持しているが、 $\Delta fl/+$ の ES 細胞株でのみ Nanog と Sox2 の発現が減少していることが明らかになった。先行研究では、129 系統のマウス由来の RF8 ES 細胞が用いられており、このラインの $+/+$ ES 細胞と $+/-$ ES 細胞においても、本研究で用いた ES 細胞と同様にどちらの遺伝型の ES 細胞でも形態観察や ALP 染色の結果、未分化マーカーの発現量解析の結果からどの遺伝型においても未分化性を維持しており、本研究で用いた ES 細胞とおおよそ同様の傾向が確認されている (Nishii et al., 2012)。CIBZ の発現が ICM の増殖や分化に与える影響を調べるために、現在、ES 細胞の EB 形成アッセイを行っている。今後、EB 形成アッセイを用いて CIBZ のヘテロ欠損が三胚葉への分化時に細胞増殖や細胞死、各胚葉の分化マーカー遺伝子の発現解析を qRT-PCR と Western blotting を用いて行う。また、分化誘導前の ES 細胞においても CIBZ のヘテロ欠損が細胞増殖や細胞死に影響を BrdU の取り込みや経時的な細胞数のカウント、細胞死マーカーの発現解析 (Western blotting) を用いて検証する必要がある。これらの *in vitro* での解析を通して、CIBZ のヘテロ欠損による着床時期の胚発生に与える影響を分子レベルで明らかにする。

KO マウスの現状とヘテロ欠損による胎生致死の位置づけ

国際マウス表現型解析コンソーシアム(IMPC)において、現在までに 5327 遺伝子のホモ及びヘテロ欠損マウスの表現型解析の結果がまとめられている。実際に、ヘテロ欠損によって胎生致死となる遺伝子はこれまでに、血管内皮増殖因子 (VEGF)

と Notch リガンドの1つである Dll4、父性発現インプリンティング遺伝子である Peg10 の3つしか報告されていない。

胎生中期 (E9.5) から後期にかけての胚発生において、心血管、造血組織そして胎盤が形成される。VEGF と Dll4 のヘテロ欠損マウスはそれぞれ、E11.5 と E10.5 に血管形成の異常により胎生致死であるため、これらの遺伝子は血管新生に必須の遺伝子であることが報告されている (Napoleone et al.,1996、Gale et al.,2004)。また、Peg10 のヘテロ欠損マウスは E10.5 に胎盤形成の異常により胎生致死であるため、胎盤の形成に必須の遺伝子であることが報告されている (Ono et al.,2006)。CIBZ のヘテロ欠損による E9.5 での胎生致死の結果は、上述した3つの遺伝子のヘテロ欠損による胎生致死の時期の中で一番早い報告である。

CIBZ が胚発生において MBP として機能するかの検証

マウスやヒトの胚発生において、DNA のメチル化によるゲノムインプリンティングの制御に重要であることが知られている。ほとんどの遺伝子は、卵子 (雌) と精子 (雄) 由来の染色体から等しく発現するのに対して、雌あるいは雄のどちらかに由来する特異的な発現を示す遺伝子があり、これらの遺伝子発現がゲノムインプリンティングにより制御されている (Delaval et al.,2004、Mann et al.,2002)。本研究では、CIBZ の $\Delta fl+$ マウスの作製するための交配において、雌雄両方の CIBZ の $fl+$ マウスを使用しており、いずれの場合においても、CIBZ のヘテロ欠損胎仔は E9.5 で胎生致死となることが示された。このことから、CIBZ のヘテロ欠損による胎生致死はゲノムインプリンティングが直接的な原因ではないことが示唆された。

胚発生において、胚盤胞から E6.5 にかけて DNA のメチル化レベルは上昇することが知られている (図2)。胚盤胞期と比較して E6.5 において CIBZ は mRNA の発現量が上昇することが示唆された (太田 修士論文)。今後、CIBZ が MBP として機能するかどうかを検証するために、メチル化結合部位に変異を入れた CIBZ の変異体 (CIBZ E499A) を導入したノックインマウスを作製し、このマウスを用いて CIBZ E499A が初期胚発生に与える影響を調べる必要がある。

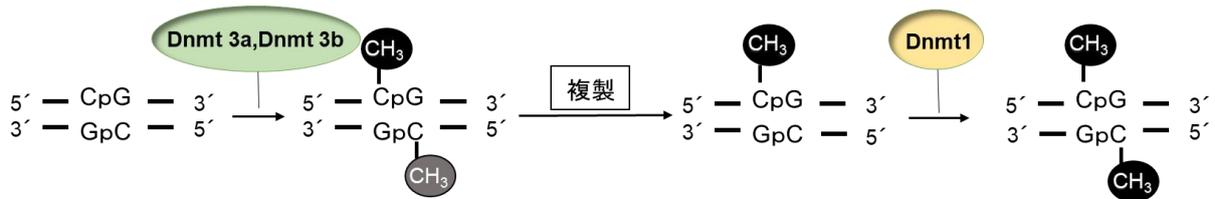
生体内における CIBZ の生理機能の解析

これまでに CIBZ を KO した ES 細胞は心筋細胞への分化を促進すること (Kotoku et al.,2016) が明らかになっている。また、CIBZ のラットオーソログである ZENON は中後期の胚発生において神経系の細胞で発現していること (Kiefer et al.,2005) や、CIBZ を KO した ES 細胞は神経細胞への分化阻害が示唆されている (西尾 修士論文)。また、CIBZ の mRNA の発現が E6.5~E9.5 にかけて一過性に低下し、その後、出生 (E20.5 前後) にかけて上昇することが示唆された (太田 修士論文)。これらのことから、初期胚のみならず、中後期の胚発生においても CIBZ

が重要な役割を担っている可能性が考えられる。今後、CIBZ の fl/+ マウスと心血管系や神経系などの組織特異的に Cre を発現するマウス、またはタモキシフェン誘導による時期特異的に Cre の発現を誘導するマウスを交配させることで、CIBZ の欠損が心血管や神経系の発生に与える影響を調べることも興味深い課題の一つである。

5. 図表

A



B

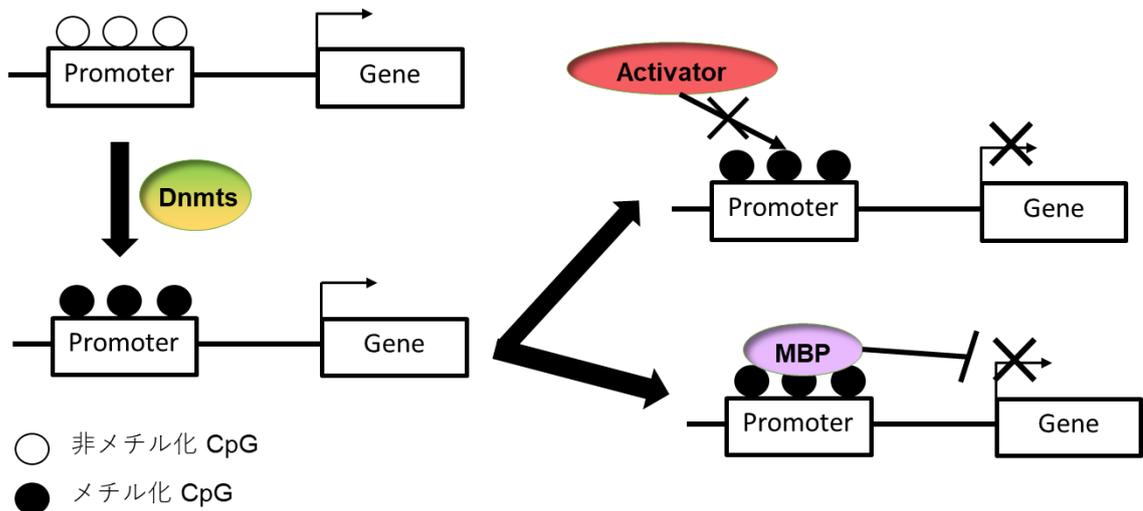


図1 DNAメチル化のメカニズムと遺伝子発現抑制のモデル

(A) DNAのメチル化の機構を表した。*De novo*メチル化酵素であるDnmt 3aや3bがDNAに存在するCpG配列のシトシンに作用することによってそのCpGがメチル化される。メチル化されたDNAは複製後、ヘミメチル化になるが、維持メチル化酵素であるDnmt1が、メチル化されていないCpG配列をメチル化することにより、メチル化を維持している。

(B) DNAメチル化酵素及びメチル化DNA結合タンパク質による遺伝子発現抑制モデルを示した。Dnmtsが遺伝子のプロモーターに存在するCpGをメチル化することで、この配列に転写活性化因子が結合できなくなり、遺伝子の発現を抑制するモデルと、プロモーター領域のメチル化されたCpGサイトにMBPが結合することにより遺伝子の発現を抑制するモデルを示す。

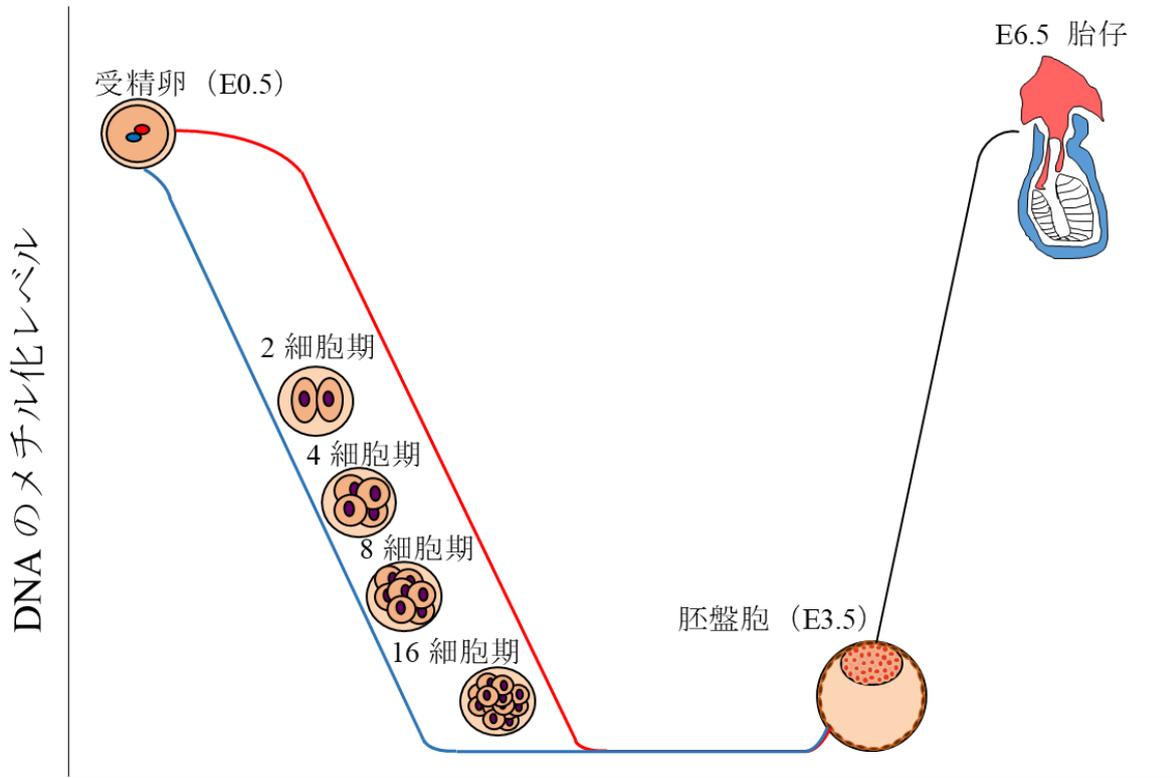
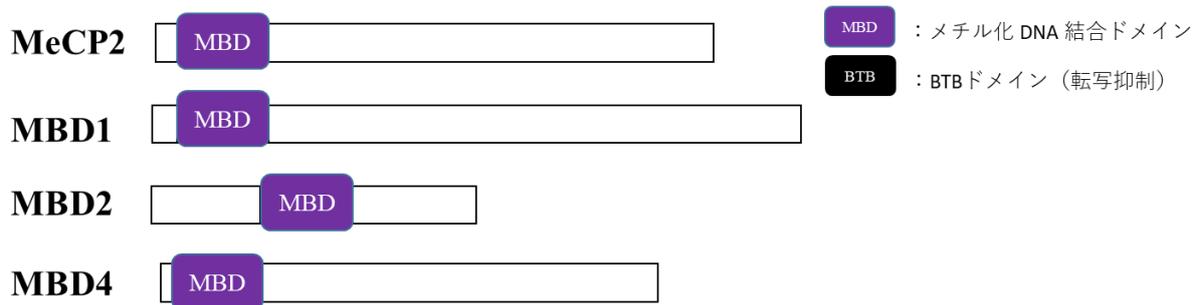


図2 初期胚の発生における DNA のメチル化の変動

マウスの受精卵から胚盤胞を経て、E6.5 の胎仔となる際のゲノムワイドな DNA のメチル化レベルを表した図を示す。赤色が母方由来、青色が父方由来の DNA のメチル化の量を表している (Chavatte-Palmer P et al., 2016 改変)。

MBD 型



ZF 型

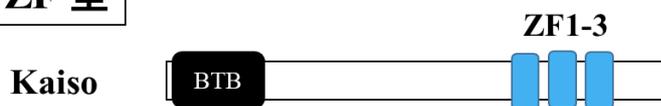
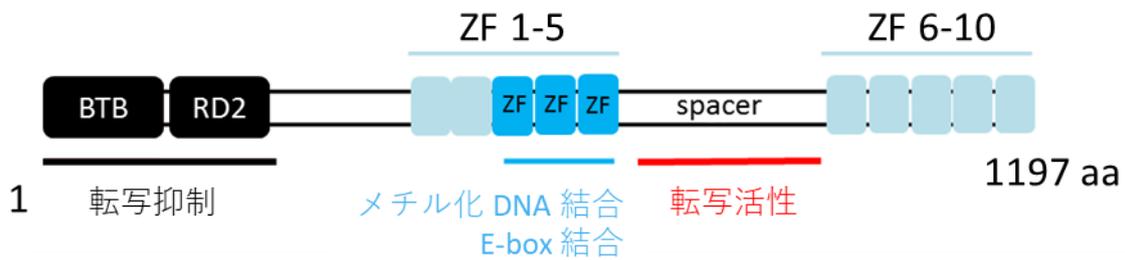


図3 メチル化結合タンパク質

代表的な MBD 型 (MeCP2、MBD1、MBD2 と MBD4) と ZF 型 (Kaiso) の MBD の構造を示す。

A



B

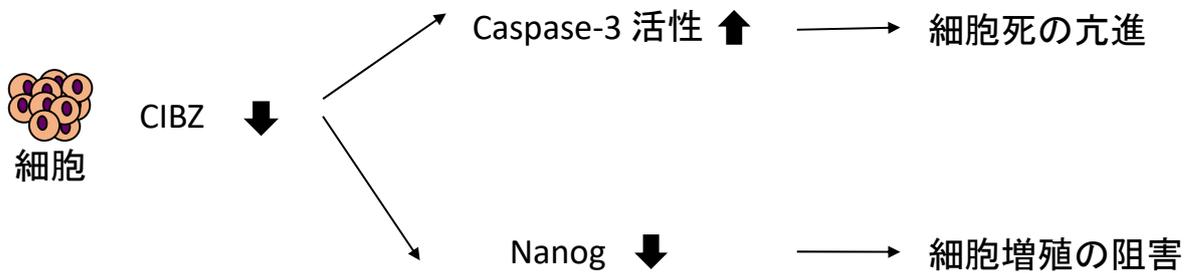
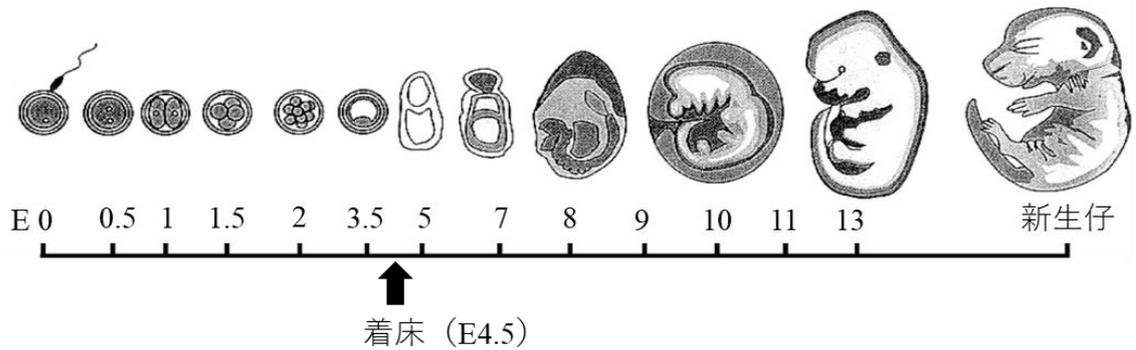


図 4 CIBZ の構造と機能

(A) CIBZ の N 末端側には BTB ドメインと RD2 (repression domain2) があ
り、中央と C 末端側に C₂H₂ 型のジンクフィンガー (ZF) ドメインがそれぞれ 5
個ずつ (ZF1-5、ZF6-10) 存在する。BTB ドメインと RD2 はそれぞれ独立した
転写抑制活性、Spacer 領域は転写促進活性を持つ。ZF3-5 は、メチル化 CpG と
非メチル化配列である E-box を認識して結合する。

(B) CIBZ の代表的な機能を 2 つ 示した。細胞レベルで、CIBZ が欠損すると
内因性の細胞死 (Apoptosis) が亢進される。また、ES 細胞で CIBZ が欠損する
と、Nanog を介して、細胞周期が負に抑制される。

A



B

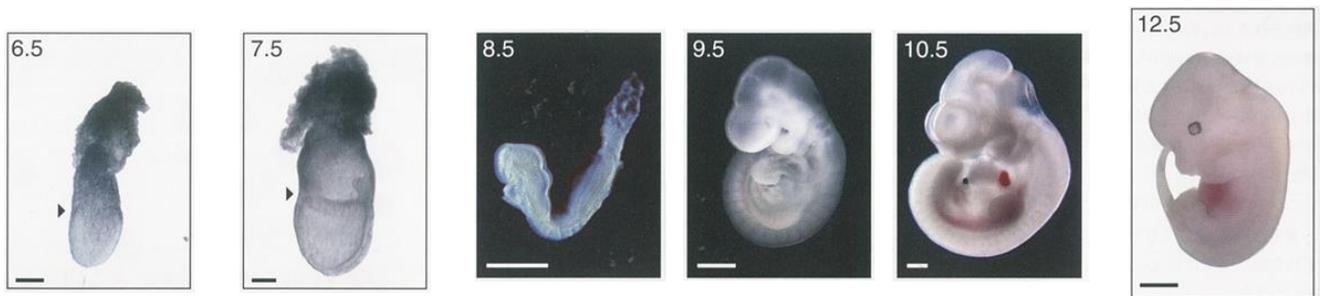


図5 マウスの胚発生

(A) 経時的なマウスの胚発生のモデル図を示す (Anna et al., 2005 改変)。マウスの胚発生は、受精卵から 2 細胞期、4 細胞期と順に卵割を繰り返し、3.5 に胚盤胞を形成する。E4.5 前後の時期に着床し、E6.5 以降胎仔組織や胎盤が次第に形成されていく。20 日前後で、新生児として出生する。

(B) E6.5~E12.5 のマウスの胚発生における胎仔の形態を示す写真を示す (Virginia et al., 2005 改変)。

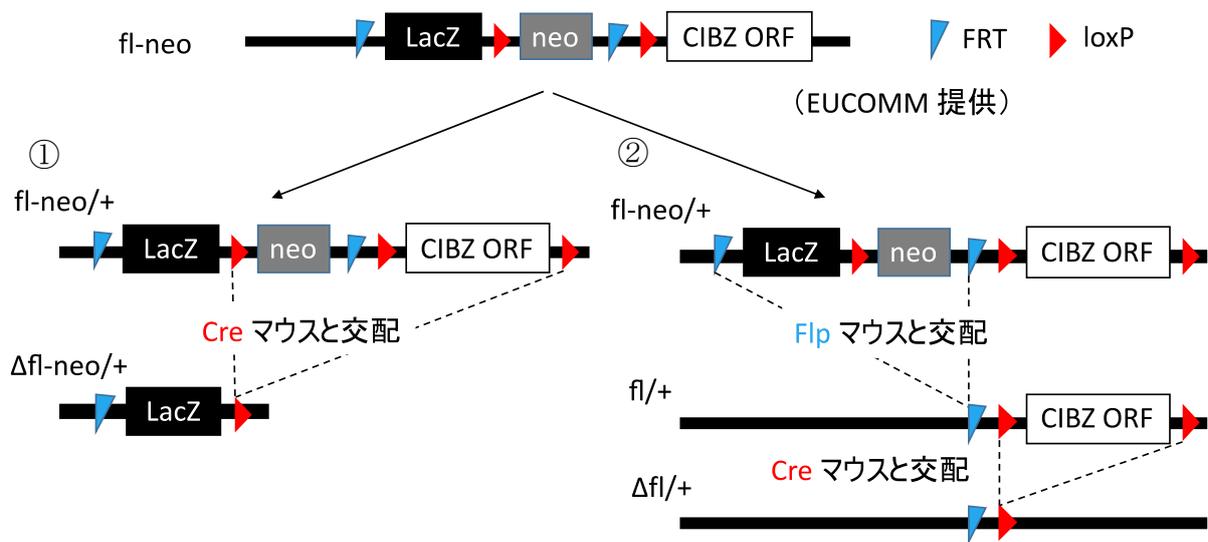


図 6 CIBZ ヘテロ欠損マウスの作製方法

EUCOMM から入手した flox-neo/+ (fl-neo/+) ベクターを用いた CIBZ ヘテロ KO マウスの作製方法を示す。①CIBZ の fl-neo/+ マウスと Cre を発現するマウスとの交配により、fl-neo/+ の loxP サイトで挟まれた領域を欠失した Δfl-neo/+ マウスの作製方法を示す。②CIBZ の fl-neo/+ マウスと Flp を発現するマウスを交配させることにより、fl-neo/+ の LacZ や neo などの配列を除去した CIBZ の fl/+ マウスを作製する。次に、CIBZ の fl/+ マウスに Cre を発現させることによって、Δfl/+ マウスを作製する方法である。

| 時期 | 遺伝型 | | | | | 合計 |
|-------|-----|-----|----------|--------------------------------------|---------------|----|
| | +/+ | Cre | fl-neo/+ | Δ fl-neo/+ [fl-neo/+; Cre] | 胎仔が 吸収された胚 | |
| 新生仔 | 37 | 29 | 30 | 0 | - | 96 |
| E10.5 | 12 | 11 | 12 | 0 | 1 | 36 |
| E9.5 | 6 | 7 | 14 | 0 | 3 | 30 |
| E8.5 | 9 | 10 | 4 | 7 (7) | - | 30 |

() 内は形態異常が観察された胎仔の数を示す

図 7 CIBZ の Δ fl-neo/+ 胎仔の遺伝型と表現型の解析

CIBZ の fl-neo/+ マウスと CAG Cre マウスとの交配により、妊娠したマウスの各時期の胎仔及び新生仔の遺伝型を示す図である。遺伝型は、メンデルの法則に従い、+/+、Cre、fl/+、 Δ flox/+は、同等の割合で存在することが予想される（向出修士論文引用）。

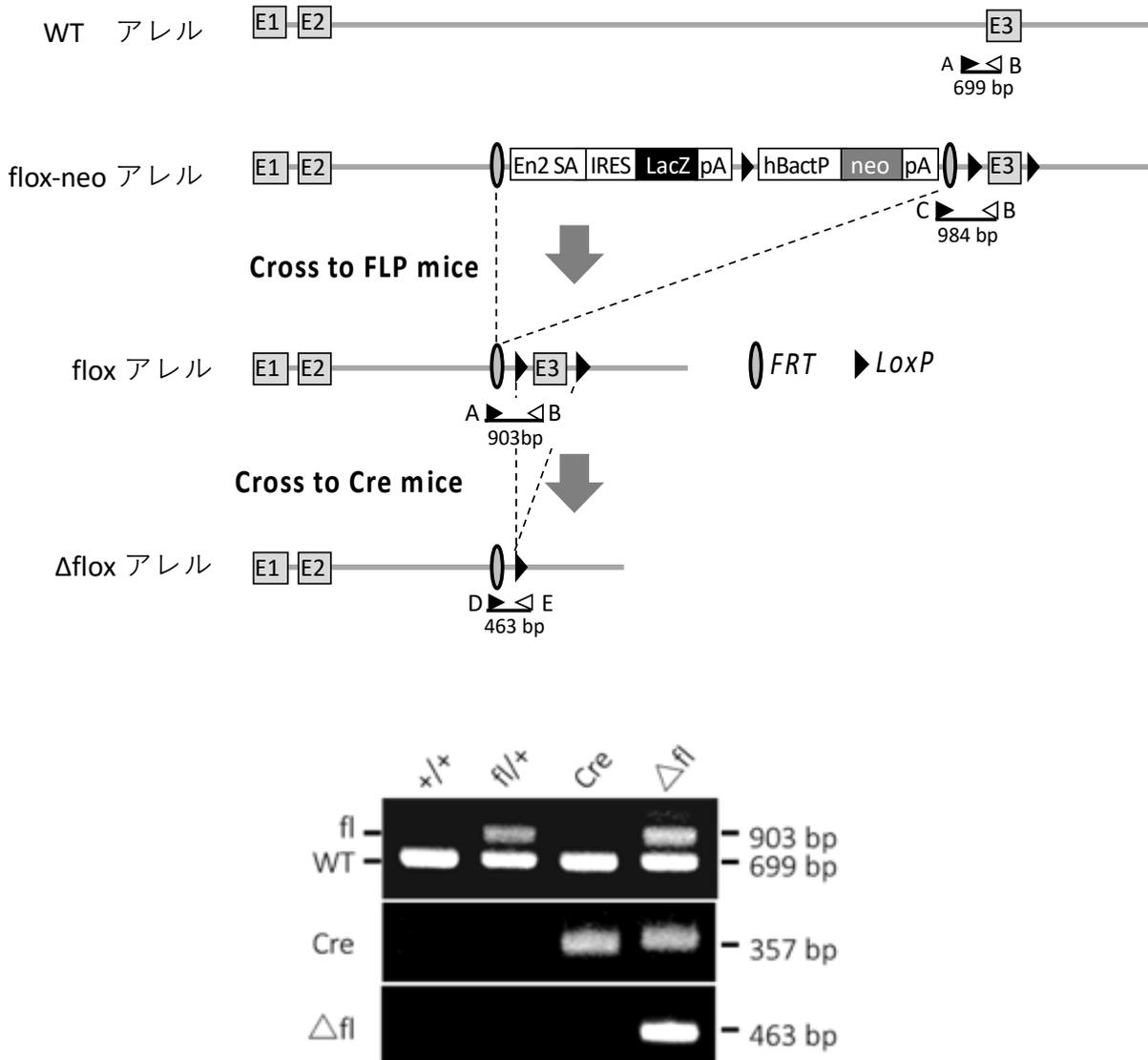


図 8 CIBZ Δ flox/+ マウスの作製手順と genomic PCR

CIBZ Δ flox/+ マウスの作製は、CIBZ の fl-neo/+ マウスと Rosa Flp マウスとの交配、CIBZ の flox/+ マウスと CAG Cre マウスの交配を順に行う。genomic PCR による CIBZ の fl/+ マウスの遺伝型の検証は、primer A/B により 699 bp のバンド（野生型）と 903 bp のバンド（fl）が検出される。 Δ flox/+ は、primer D/E により 463 bp のバンドが検出される。Cre の検出は、Cre 用の primer により 357 bp のバンドを検出される。プライマーの増幅領域（上図）、genomic PCR の結果（下図）を示した。

A

| 時期 | 遺伝型 | | | | 胎仔が 吸収された胚 | 合計 |
|-------|-----|-----|------|------------------------------|---------------|----|
| | +/+ | Cre | fl/+ | Δ fl/+ (fl/+; Cre) | | |
| 新生仔 | 7 | 5 | 11 | 0 | - | 23 |
| E11.5 | 9 | 8 | 13 | 0 | - | 30 |
| E9.5 | 18 | 20 | 23 | 0 | 4 | 65 |
| E8.5 | 15 | 16 | 19 | 12 (12) | - | 62 |
| E7.5 | 8 | 12 | 16 | 14 (14) | - | 50 |
| E6.5 | 7 | 11 | 17 | 9 (5) | - | 34 |

() 内は形態異常が観察された胎仔の数を示す

B

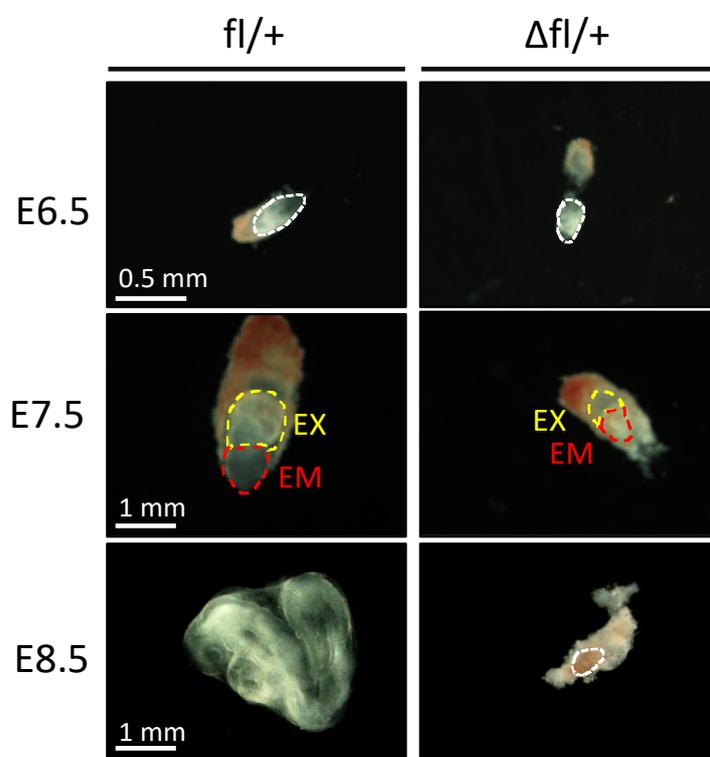
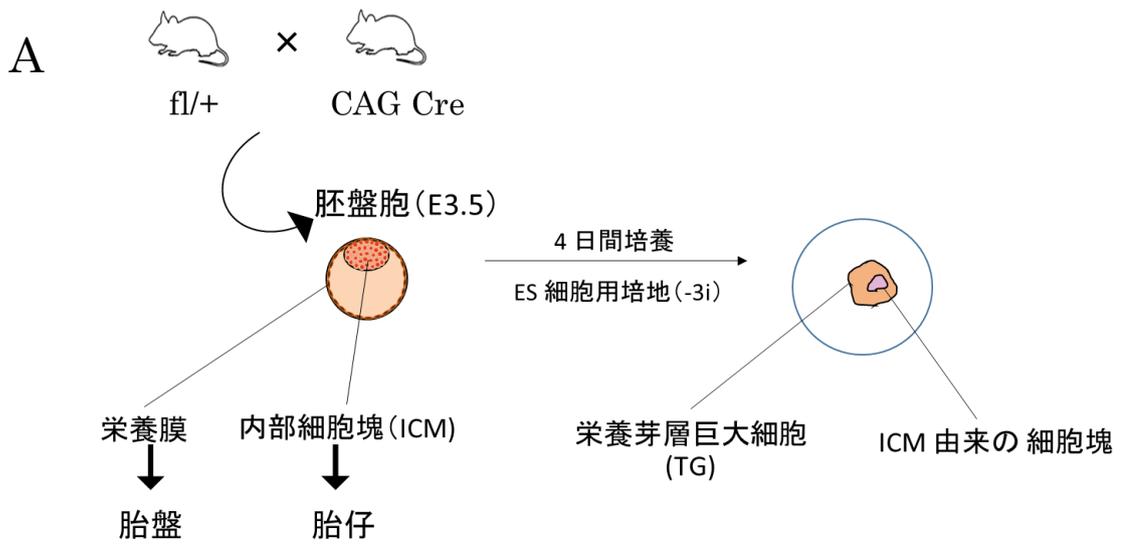


図9 CIBZ の Δ fl/+ 胎仔の遺伝型と表現型の解析

(A) CIBZ の fl/+ マウスと CAG Cre マウスとの交配により、妊娠したマウスの各時期 (E6.5~E11.5) の胎仔及び新生仔の遺伝型を決定した。この交配により得られる胎仔及び新生仔の数は、メンデルの法則に従い +/+、Cre、fl/+、 Δ flox/+が同等の割合であることが予想される。

(B) CIBZ の fl/+ マウスと CAG Cre マウスとの交配により得られた、E6.5~E7.5 の fl/+ 胎仔と Δ fl/+ 胎仔の実体顕微鏡下の写真。破線は、胎仔を示す。黄色い破線は胚体外組織 (extraembryonic tissue : EX)、赤い破線は胚体組織 (embryo : EM) を示す。



B

| 時期 | 遺伝型 | | | | 合計 |
|------|-----|-----|------|---------------|----|
| | +/+ | Cre | fl/+ | Δ fl/+ | |
| E3.5 | 9 | 14 | 13 | 11 | 58 |

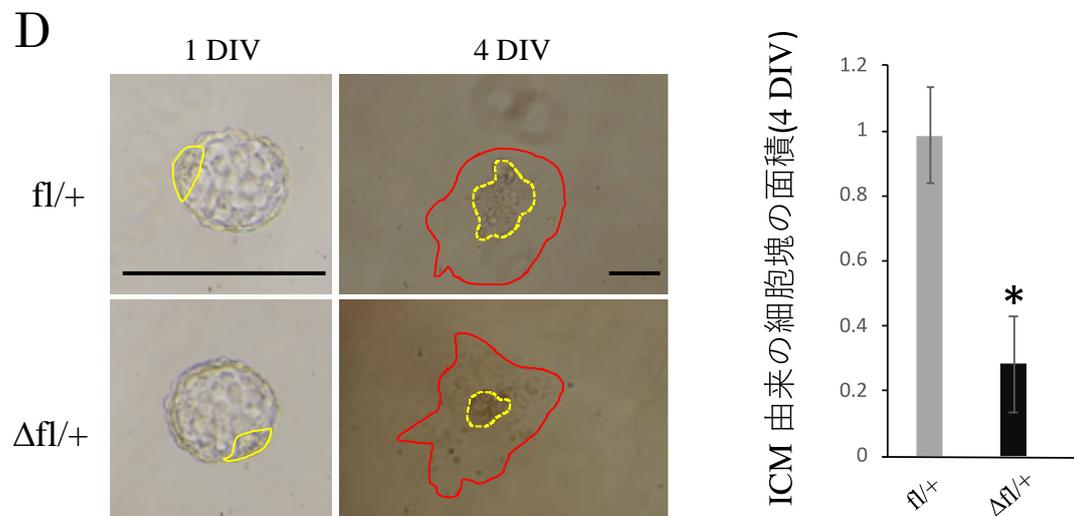
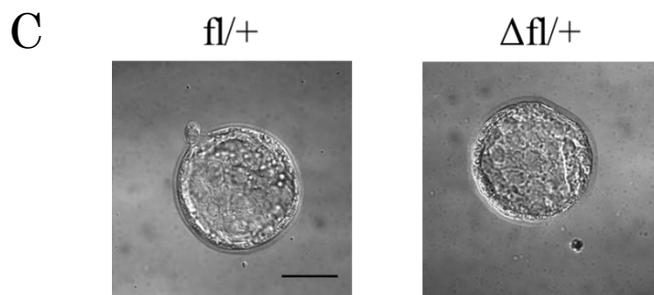


図 10 胚盤胞 の *in vitro* での培養

図 10 胚盤胞の *in vitro* での培養

(A) 胚盤胞の *in vitro* の培養方法を模式図に示した。CIBZ の fl/+ マウスと CAG Cre マウスを交配し、得られた胚盤胞を 0.1% ゼラチンコーティングしたスライドガラス上に移し、ES 細胞用培地で 4 日間培養した。

(B) CIBZ の fl/+ マウスと CAG Cre マウスの交配により得られた胚盤胞の遺伝型の結果を示した。

(C) CIBZ の fl/+ と CIBZ の Δ fl/+ の胚盤胞を顕微鏡で観察した結果を示した。スケールバーは、5 μ m を示す。

(D) 左図は、胚盤胞を *in vitro* で 4 日間培養して、1 日目と 4 日目を実体顕微鏡で観察した写真である。ICM を黄色点線、TG を赤い実線で囲まれた部分を示した。1 DIV の倍率は 10 倍、4 DIV の倍率は 4 倍で撮影した。スケールバーは、25 μ m を示す。右図は、培養 4 日目の ICM 由来の細胞塊の面積を image J で計測し、CIBZ の fl/+ の ICM の面積を 1 として CIBZ の Δ fl/+ の面積の割合を示した。グラフは、flox/+ : n=4、 Δ flox/+ : n=5

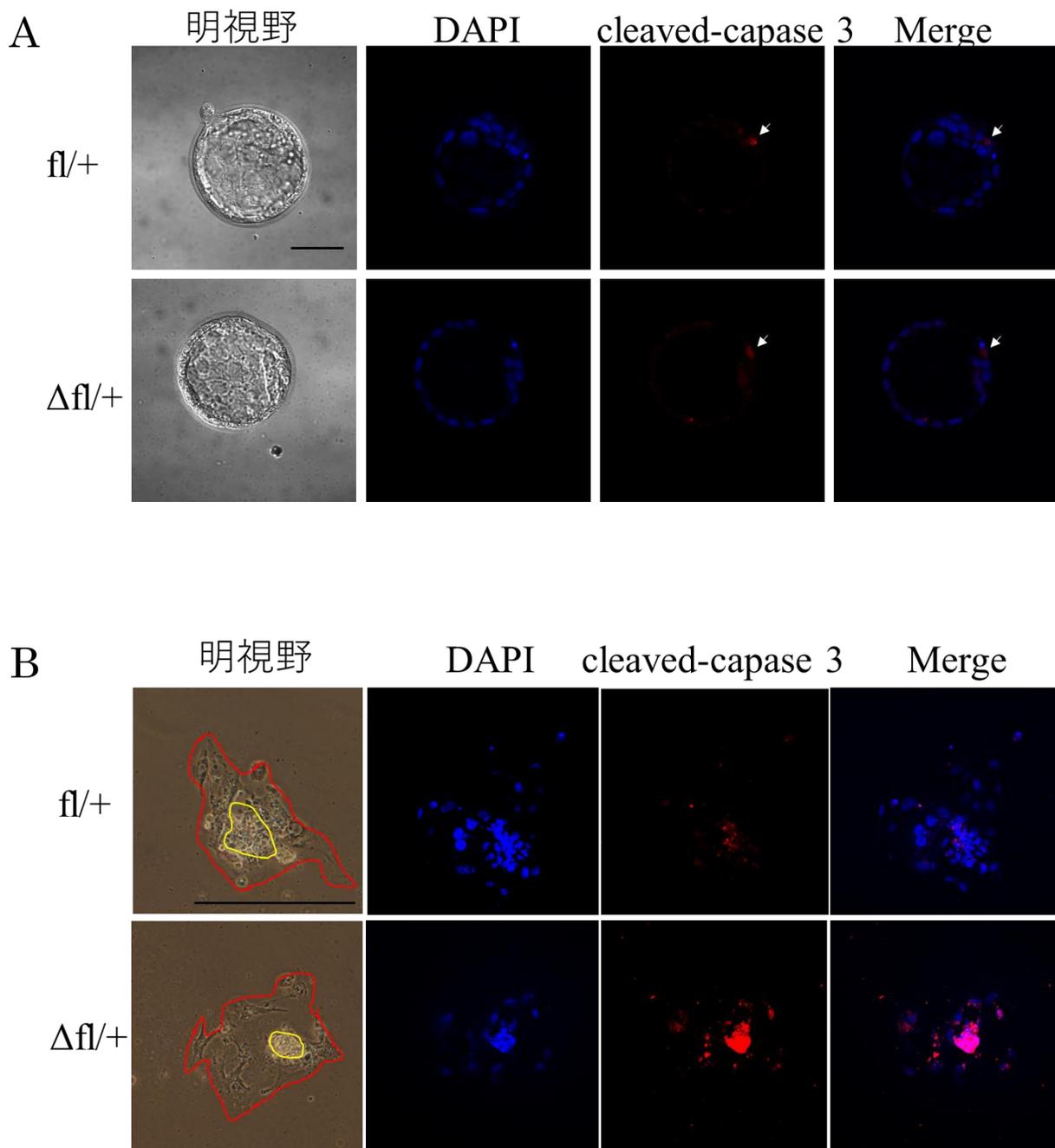
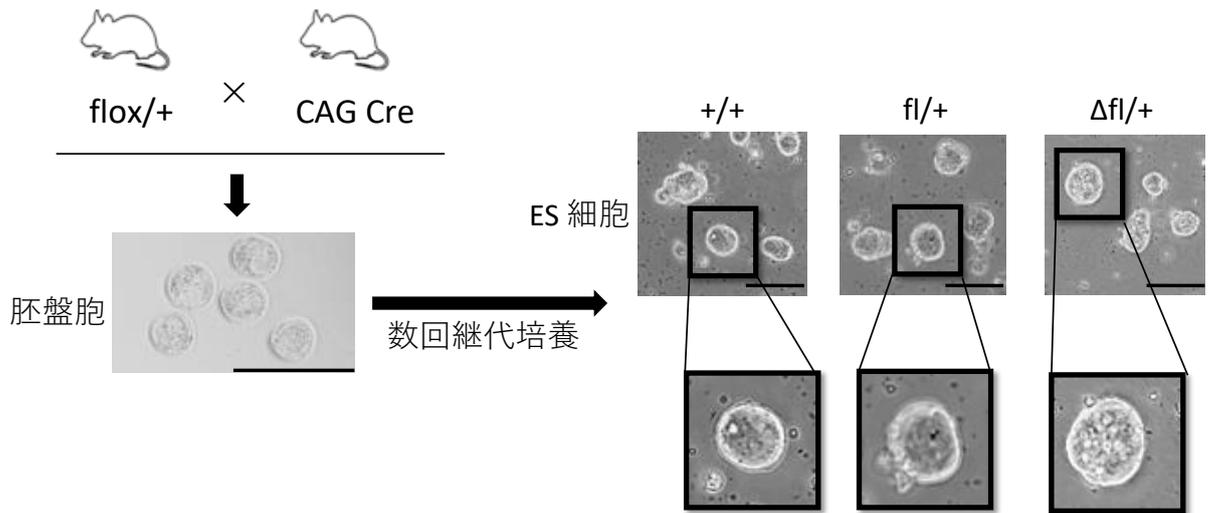


図 11 胚盤胞及び *in vitro* 培養後の分化した胚盤胞の cleaved-caspase 3 の免疫染色

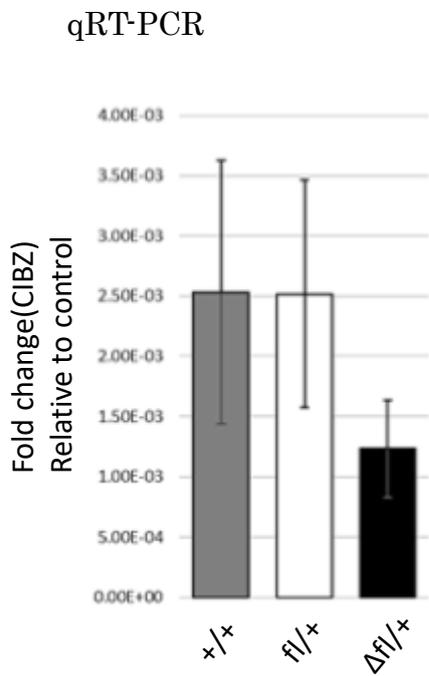
(A) flox/+ マウスと CAG Cre マウスとの交配により得られた CIBZ の fl/+ と Δ fl/+ の胚盤胞において抗 cleaved-caspase 3 抗体による免疫染色を行なった。核は DAPI で染色した。白矢印は cleaved-caspase 3 の陽性細胞を示す。スケールバーは、5 μ m を示す。

(B) CIBZ の fl/+ と Δ fl/+ の胚盤胞を 4 日間、ES 細胞用培地で培養したサンプルにおいて抗 cleaved-caspase 3 抗体による免疫染色法を行なった。核は DAPI で染色した。黄色い線で囲まれた部分は ICM 由来の細胞塊、赤色の線と黄色の線の間の部分は TG 細胞を示した。スケールバーは、50 μ m を示す。

A



B



C

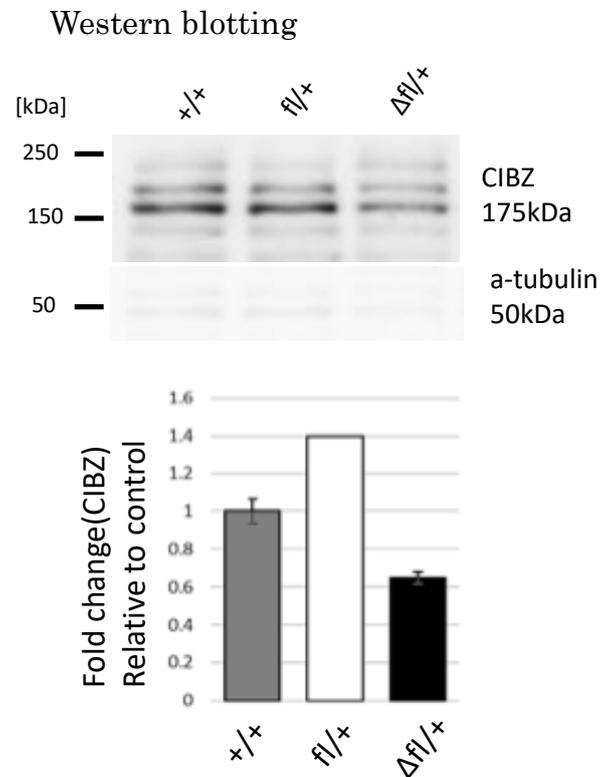


図 12 野生型(+/+) 及び CIBZ の flox/+, $\Delta flox/+$ ES 細胞を樹立した

図 12 野生型(+/+) 及び CIBZ の flox/+、 Δ flox/+ ES 細胞を樹立した

(A) CIBZ の flox/+ マウスと CAG Cre マウスとの交配により、妊娠したマウスの胚盤胞を摘出し、ES 細胞用培地 (-3i) を用いて feeder 細胞上で培養することにより、+/+ 及び CIBZ の flox/+、 Δ flox/+ の ES 細胞を樹立した。摘出した胚盤胞と樹立した ES 細胞を倒立顕微鏡で観察した写真を示す。スケールバーは、25 μ m を表す。

(B) と (C) +/+ 及び CIBZ の flox/+、 Δ flox/+ の ES 細胞を回収し、CIBZ の発現量を解析した。(B) は、qRT-PCR の結果を示す。グラフは独立した 3 回の実験からの平均と標準偏差で表した。*GAPDH* を内部標準として用いた。(C) の上図は、Western blotting の結果であり、下図はその結果を定量化しグラフとして表した。グラフは独立した 3 回の実験からの平均と標準偏差で表した。 α -tubulin を内部標準として用いた。

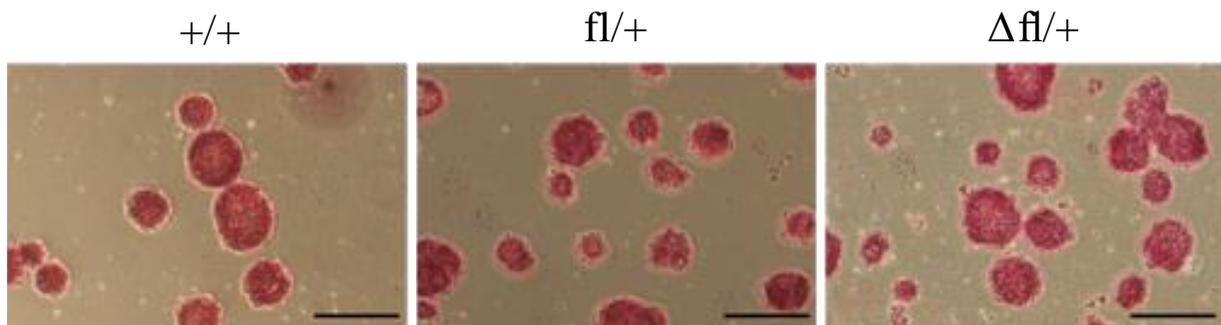
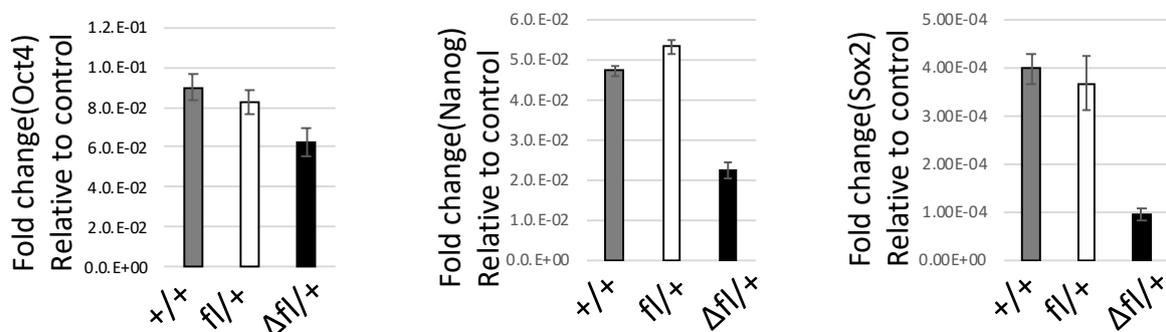


図 13 アルカリフォスファターゼ染色による ES 細胞株の未分化性の検証
+/+ 及び CIBZ の fl/+, Δfl/+ の ES 細胞 を Alkaline Phosphatase Staining Kit を用いて、アルカリフォスファターゼの活性を調べた。スケールバーは、0.2 mm を表す。

A qRT-PCR



B

Western blotting

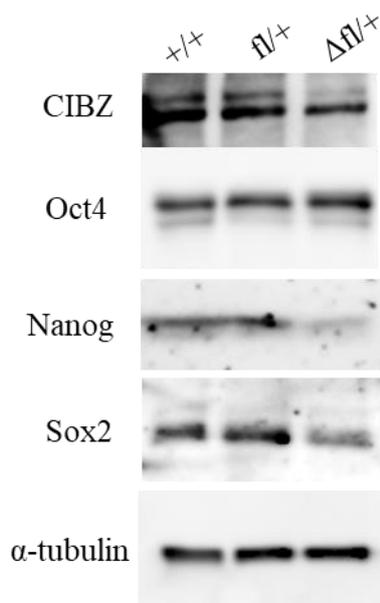


図 14 樹立した ES 細胞株の未分化マーカーの発現解析

(A) と (B) +/+ 及び CIBZ の flox/+、Δflox/+ の ES 細胞を回収し、未分化マーカーの発現量を解析した。

(A) は、qRT-PCR の結果を示した。グラフは独立した 3 回の実験からの平均と標準偏差で表した。GAPDH を内部標準として用いた。

(B) は、Western blotting の結果を示した。α-tubulin を内部標準として用いた。

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、素晴らしい研究環境と多くの貴重なご助言を賜りました石田靖雅准教授に厚く御礼申し上げます。普段のセミナー等で、貴重な助言をいただきました岡千緒助教、金井賢一助教、にも深く御礼申し上げます。審査及びアドバイスをして頂いた別所康全教授と伊東広教授に感謝申し上げます。また、研究を進めるにあたり直接手厚いご指導をいただきました松田永照助教への感謝は筆舌に尽くし難いほどです。心から御礼申し上げます。

また、同じ研究室の同期、先輩、後輩のおかげで充実した学生生活を過ごすことができました。この場を借りて御礼申し上げます。

最後に、大学院進学への意思を理解し、常に励まし、支えてくれた両親に感謝を捧げます。

7. 参考文献

- Alexopoulou, L., Pasparakis, M., and Kollias, G. (1998). Complementation of lymphotoxin alpha knockout mice with tumor necrosis factor-expressing transgenes rectifies defective splenic structure and function. *J. Exp. Med.* 188(4), 745-754.
- Bestor, T.H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet* 9, 2395-2402.
- Cheng, M.K., and Disteché, C.M. (2004). Silence of the fathers: early X inactivation. *Bioessays.* 26(8),821-824.
- Chen, R.Z., Akbarian, S., Tudor, M., and Jaenisch, R. (2001). Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat. Genet.* 27, 327–331.
- Chuang, L.S., Ian, H., Koh, T., Ng, H., Xu, G., and Li, B. (1997). Human DNA-(Cytosine-5) Methyltransferase-PCNA Complex as a Target for p21WAF1. *Science* 277, 1996-2000.
- Clouaire, T., and Stancheva, I. (2008). Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1509-1522.
- Cross, S., Meehan, R., Nan, X., and Bird, A. (1997). A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat. Genet.* 13, 256–259.
- Delaval K.,and Feil R. (2004). Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14(2):188-195.
- Eden, A., Gaudet F, Waghmare, A., and Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300, 455.
- Evans M.J., and Kaufman M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292,154-156.
- Filion, G.J., Zhenilo, S., Salozhin, S., Yamada, D., Prokhortchouk, E., and Defossez, P.A. (2006). A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol. Cell. Biol.* 26(1),169-181.

Guy, J., Hendrich, B., Holmes, M., Martin, J.E., and Bird, A. (2001). A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat. Genet.* 27, 322–326.

Hendrich, B., and Bird, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6538–6547.

Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V.A., and Bird, A. (2001). Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes. Dev.* 15, 710–723.

Hoess, R., Abremski, K., and Sternberg, N. (1984). The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 49,761-768.

Inoue, A., Jiang, L., Lu, F., Suzuki, T., and Zhang, Y. (2017). Maternal H3K27me3 controls DNA methylation-independent imprinting. *Nature* 547,419-424.

Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.*31, 89–97.

Kotoku, T., Kosaka, K., Nishio, M., Ishida, Y., Kawaichi, M., and Matsuda, E.(2016).CIBZ Regulates Mesodermal and Cardiac Differentiation of by Suppressing T and Mesp1 Expression in Mouse Embryonic Stem Cells. *Sci Rep.* 23, 6, 34188.

Kurosawa, H. (2007). Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J. Biosci. Bioeng.* 103(5), 389-398.

Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., and Bird, A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69(6), 905-914.

Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69(6), 915-926.

Martín C. I., Hansen, J., Leaford, D., Pollard, S., and Hendrich B.D. (2009). The Methyl-CpG Binding Proteins Mecp2, Mbd2 and Kaiso Are Dispensable for Mouse Embryogenesis, but Play a Redundant Function in Neural Differentiation. *PLoS ONE* 4, 1, e4315.

Mann, J. R. (2002). Deriving and propagating mouse embryonic stem cell lines for studying genomic imprinting. *Methods Mol. Biol.* 181, 21–39.

Matsuda, E., Shigeoka, T., Iida, R., Yamanaka, S., Kawaichi, M., and Ishida, Y. (2004). Expression profiling with arrays of randomly disrupted genes in mouse embryonic stem cells leads to in vivo functional analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4170-4174.

Millar, C.B., Guy, J., Sansom, O.J., Selfridge, J., MacDougall, E., Hendrich, B., Keightley, P.D., Bishop, S.M., Clarke, A.R., and Bird, A. (2002). Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science* 297(5580),403-405.

Mouse Genome Sequencing Consortium and Lander, E.S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562.

Nan, X., Meehan, R.R., and Bird, A. (1993). Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res.* 21(21), 4886-4892.

Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389.

Nishii, T., Oikawa, Y., Ishida, I., Kawaichi, M., and Matsuda, E. (2012). CtBP-interacting BTB Zinc Finger Protein (CIBZ) Promotes Proliferation and G1/S Transition in Embryonic Stem Cells via Nanog. *J. Biol. Chem.* 287, 124117-12424.

Oikawa, Y., Matsuda, E., Nishii, T., Ishida, Y., and Kawaichi, M. (2008). Down-regulation of CIBZ, a novel substrate of caspase-3, induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 283,14242-14247.

Oikawa, Y., Omori, R., Nishii, T., Ishida, Y., Kawaichi, M., and Matsuda, E. (2011). The methyl-CpG-binding protein CIBZ suppresses myogenic differentiation by directly inhibiting

myogenin expression. *Cell Res.* 21, 1578-1590.

Okano M, Xie S., and Li E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* 19,219-220.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257.

Ono, R., Nakamura, K., Inoue, K., Naruse, M., Usami, T., Wakisaka-Saito, N., Hino, T., Suzuki-Migishima, R., Ogonuki, N., Miki, H., Kohda, T., Ogura, A., Yokoyama, M., Kaneko-Ishino, T., and Ishino, F. (2006). Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat Genet.* 38(1), 101-106.

Perez-Garcia, V., Fineberg, E., Wilson, R., Murray, A., and Hemberger, M. (2018). Placentation defects are highly prevalent in embryonic lethal mouse mutants. *Nature* 555, 463-468.

Prokhortchouk, A., Sansom, O., Selfridge, J., Caballero, I.M., Salozhin, S., Aithozhina, D., Cerchietti, L., Meng, F.G., Augenlicht, L.H., Mariadason, J.M., Hendrich, B., Melnick, A., Prokhortchouk, E., Clarke, A., and Bird, A. (2006). Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer. *Mol. Cell. Biol.* 26, 199–208.

Sasai N., Matsuda E., Sarashina E., Ishida Y., and Kawaichi M. (2005). Identification of a novel BTB-zinc finger transcriptional repressor, CIBZ, that interacts with CtBP corepressor. *Genes Cells.* 10, 871-885.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4), 663-676.

Ushijima, T. (2005). Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat. Rev. Can.* 5, 223-231.

Virginia, E.P., and Richard, R.B. (2005). *Mouse Phenotypes: A Handbook of Mutation Analysis*, Virginia, E.P., and Richard, R.B., ed. (New York: CSHL Press), pp.121

Voss, A.K., Thomas, T., Petrou, P., Anastassiadis, K., Schöler, H., and Gruss P. (2000). Taube nuss is a novel gene essential for the survival of pluripotent cells of early mouse embryos. *Development* 127(24), 5449-5461.

Zhao, X., Ueba, T., Christie, B.R., Barkho, B., McConnell, M.J., Nakashima, K., Lein, E.S., Eadie, B.D., Willhoite, A.R., Muotri, A.R., Summers, R.G., Chun, J., Lee, K.F., and Gage, F.H. (2003). Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(11), 6777-6782.

太田汐海 (2020). 転写因子 CIBZ の胚発生における発現と局在の解析. 修士論文

西尾美紀 (2017). ES 細胞の神経への分化およびマウスの初期胚発生における BTB ジンクフィンガータンパク質 CIBZ の機能解析. 修士論文

松浦卓矢 (2020). 転写因子 CIBZ のヘテロ接合体マウスにおける胎生致死の原因解明. 修士論文

向出史行 (2016). BTB-zinc finger 転写因子 CIBZ 欠損マウスの作製. 修士論文