

平成 19 年度修士論文

受精前後における転写調節機構の解析

曾根原 弘樹

66529

東京大学 大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻 資源生物制御学分野

指導教員 東京大学大学院准教授 青木不学

受精前後における転写調節機構の解析

学生証番号 66529

資源生物制御学分野 曾根原弘樹

指導教員 青木不学

序論

体を構成する分化した細胞は通常、未分化な状態に戻ることはない。生殖細胞は唯一の例外であり、受精を経て生じた初期胚は全能性を有し、あらゆる種類の細胞へと分化できる。受精前後に起こるこのリプログラミング機構を明らかにするために、本研究では受精前の遺伝子発現抑制と受精後の再活性化に注目した(図 1)。マウス卵巣内において成長期卵(growing oocyte: GO)は活発に遺伝子発現を行っているが完全に成長した卵である fully grown oocyte(FGO)になると遺伝子発現を停止する。しかし、この受精前における遺伝子発現抑制状態は受精後に解除され 1 細胞期後期から胚性遺伝子が発現し始める(zygotic gene activation: ZGA)。本研究では受精前に発現抑制される遺伝子と受精後の再活性化により発現する遺伝子のプロモーター領域を解析することによりリプログラミング機構を明らかにすることを目的とした。まず、受精前に発現抑制される *zp3* のプロモーター領域におけるヒストン修飾を DNA microinjection chromatin immunoprecipitation 法(DM-ChIP 法)により解析した。DM-ChIP 法は DNA コピー数の不足により卵への適用が困難な ChIP 法を DNA のマイクロインジェクションによりコピー数を補うことで可能とする手法である。次に未だ実際にどのような遺伝子によって構成されるか明らかとなっていない ZGA 遺伝子の探索を行った。

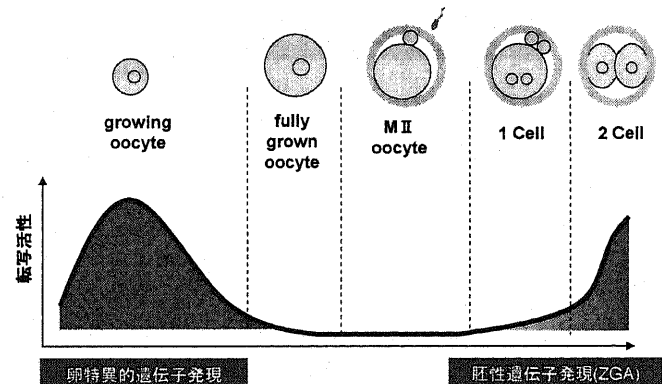


図 1 卵成長期から発生過程までの概略とその期間における遺伝子発現

結果と考察

zp3 と *hsp70* のプロモーター領域におけるヒストン修飾の解析

zp3 は卵特異的遺伝子であり GO では盛んに転写されるが、FGO では発現しないことが知られている。一方、*hsp70* は GO でも FGO でも発現は抑制されている。既往の研究により、卵の成長に伴い、本来転写活性を上昇させるヒストン修飾であるアセチル化(Ac)が総体的に増加することが免疫染色法によって明らかとなっているが、遺伝子領域特異的な変化に関しては解明されていない。そこで GO と FGO における *zp3*、*hsp70* プロモーター領域の H4Ac レベルを DM-ChIP 法により解析した。GO と FGO の核内に *zp3* と *hsp70* プロモーターDNA をそれぞれインジェクション後、ChIP を行ったところ、*zp3*、*hsp70* 両プロモーター領域で H4Ac の上昇が観察された(図 2)。この結果から、転写が抑制されている FGO のプロモーター領域においても H4Ac が増加していることが示唆された。

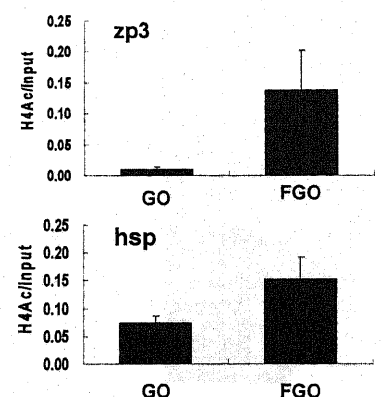


図 2 *zp3*、*hsp70* プロモーター領域における H4Ac レベルの解析

zp3 と hsp70 プロモーター領域における H4 結合量の解析

近年、発現が抑制された遺伝子のプロモーター領域においてヒストン密度が上昇していることが報告されている。そこで zp3、hsp70 プロモーター領域における H4 結合量を DM-ChIP 法により解析した。その結果、zp3 プロモーター領域では FGO において GO より H4 との結合量が増加していたが、hsp70 プロモーター領域では増加が見られなかった(図 3)。これにより GO で発現していた遺伝子が FGO で抑制される際にプロモーター領域においてヒストン密度が増加し転写因子が結合しにくい状態が作られることが示唆された。

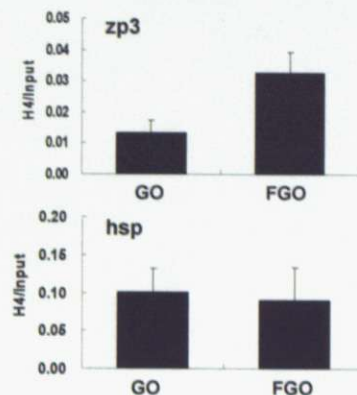


図 3 zp3、hsp70 プロモーター領域における H4 結合量の解析

ZGA 遺伝子の探索

受精後の遺伝子発現再活性化は 1 細胞期後期から開始するが、実際にどのような遺伝子が発現するのかは明らかではない。そこで 1 細胞期後期から発現する ZGA 遺伝子の探索を行った。候補遺伝子に対して RT-PCR を行った結果、urml を新たに ZGA 遺伝子として明らかにした。RNA polymerase II の阻害剤 α -amanitin 存在下で培養したところ MII 卵と同程度まで発現が低下したことから 1 細胞期で検出された mRNA は受精後の発現に由来することが明らかとなった(図 4)。

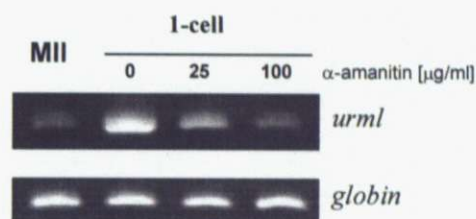


図 4 RNA polymerase II 阻害剤による urml の発現阻害

urml のプロモーター解析

ブラスト解析の結果、urml は 13 番染色体上にバリエーションを持つことが分かった。そこで mRNA をシーケンスし転写されているバリエーションを決定した。発現していたバリエーションを*で示した(図 5)。

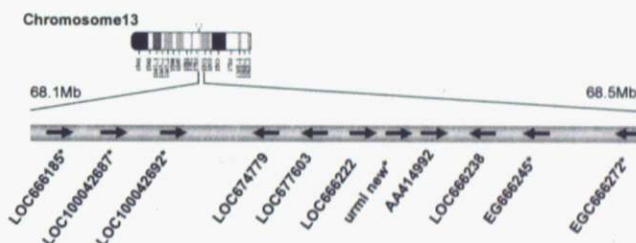


図 5 urml バリエーションの配置

また、転写開始点上流の保存された領域を含む 650 bp をプロモーターとして EGFP に結合したプラスミドを作製し、1 細胞期胚の核内にインジェクションしたところ蛍光を呈した(図 6)。この結果から、urml 転写開始点上流領域は受精後の再活性化時にプロモーターとして機能することが示唆された。

まとめ

本研究から、受精前の遺伝子発現抑制時にプロモーター領域においてヒストンアセチル化レベルの上昇が見られるが、同時にヒストン密度が増加することによって転写を抑制する可能性が示された。また受精後に起こる遺伝子発現再活性化時に発現する遺伝子の 1 つを特定し、転写開始点上流 650 bp がプロモーターとなり得ることを示した。今後、受精前後における遺伝子発現パターンの変化とそれらを構成する遺伝子の調節機構に関する知見を深めることができれば、完全に分化した細胞である卵が全能性を有する胚へとリプログラムされるメカニズムを明らかにできると期待される。

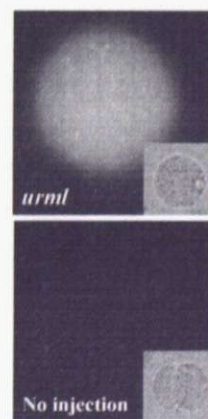


図 6 urml-650 bp のプロモーター活性

目次

要旨	1
緒言	4
材料と方法	8
結果	18
考察	24
謝辞	29
参考文献	30
図表	34

要旨

哺乳類の成長期卵(growing oocyte: GO)は卵巣内において活発に転写を行いながら成長し、完全に成長した fully grown oocyte(FGO)に至るまで体積を増大させる。しかし、FGO となった卵細胞は転写が停止し遺伝子発現が抑制された状態となる。その後、FGO はホルモン刺激を受け減数分裂を再開し未受精卵となり、さらに精子との受精を経て初期胚発生が進行していく。このとき胚性遺伝子発現(ZGA)が開始し、転写が再び行われるようになる。また、卵成長時における遺伝子発現パターンと胚性遺伝子発現パターンは大きく異なり、このことから受精前後において遺伝子発現のリプログラミングが起こっていると考えられている。しかしながらこのリプログラミングの機構は未だ解明されていない。本研究ではこのリプログラミングの機構にヒストン修飾によるクロマチン構造の変化が関与していると考え、遺伝子プロモーター領域におけるクロマチン構造の変化を明らかにすることを目的とした。

ゲノム上の領域特異的なヒストン修飾やクロマチン構造を解析する手法として Chromatin immunoprecipitation 法(ChIP 法)が広く用いられているが、この手法は理想的には 10^7 以上の細胞数を必要とし、多くの細胞を集めることが困難な卵細胞や初期胚に ChIP 法を適用することは実用的ではない。そこで、本研究では卵細胞または初期胚の核内に ChIP 法で解析したい領域を含む DNA をマイクロインジェクションし、核内でクロマチン構造を構成することにより ChIP 法に必要な DNA コピー数を補う DNA microinjection chromatin immunoprecipitation 法(DM-ChIP 法)を適用することで卵細胞または初期胚における領域特異的なクロマチン構造の解析を行うことを考えた。

まず、卵成長過程において H3K9me2 に代表される抑制的修飾、H4Ac に代表

される活性化修飾がともに増加していくという、免疫染色法によって明らかとなった現象に注目し、卵成長過程におけるクロマチン構造の変化を解析することを目的とした。特に卵成長過程は遺伝子発現が抑制されていく時期にも関わらず活性化修飾である H4Ac も増加していく矛盾点に注目し、解析を行うことを考えた。そして卵成長期に盛んに発現する代表的遺伝子として透明帯タンパク質 *zp3* に着目し、卵成長期に発現しない遺伝子である *hsp70* との比較から、それぞれのプロモーター領域に起こるクロマチン構造の変化を DM-ChIP 法により明らかにすることを試みた。まず、*zp3* および *hsp70* のプロモーター領域をクローニングし、それらが時期特異的調節を行うことを示すために、それぞれのプロモーターの下流に EGFP を結合させたプラスミドを調製し、GO と FGO の核内にインジェクションした。その結果、GO は *zp3* プロモーターを持つプラスミドをインジェクションした場合のみ蛍光を呈し *hsp70* プロモーターでは蛍光を呈さなかったことから、インジェクションした外来性 *zp3* プロモーターは内在性のものと同様の時期特異的発現を示すことが明らかとなった。一方 FGO の核内にインジェクションした場合は *zp3* プロモーター、*hsp70* プロモーターともに蛍光を呈さず、遺伝子発現が見られない FGO の転写活性を反映していた。続いて *zp3* プロモーター領域の DNA 断片を調製し、FGO の核内にインジェクション後 0 h、1 h、3 h に抗 H3、H4 抗体を用いて ChIP を行った。その結果、インジェクションした DNA 断片は 1 時間以内にヒストンと結合しクロマチン構造を形成することが示唆された。DM-ChIP 法を用いて GO と FGO における *zp3* プロモーターと *hsp70* プロモーターのクロマチン構造の違いを解析した。その結果、*zp3* プロモーター、*hsp70* プロモーター領域ともに FGO において GO と比較して高い H4Ac 修飾が検出された。一方、抗 H4 抗体を用いた DM-ChIP の結果により成長期卵から FGO にかけて *zp3* プロモーター領域の H4 密度が上昇していることが

観察された。これらの結果から GO が FGO に至る間に、卵特異的遺伝子 *zp3* はそのプロモーター領域で活性化修飾である H4Ac を増加させるが、同時にヒストン密度も上昇しクロマチン構造を密な状態にすることで FGO における転写抑制状態を作り出していることが示唆された。

次に FGO におけるこの転写抑制的クロマチン構造が受精後の胚性遺伝子発現の際にどのような変化を示すか明らかにしようと考えた。しかしながら、受精後 1 細胞期で発現を開始する胚性遺伝子に関する知見は少なく、胚性遺伝子特異的プロモーターについても未知である。そこで本研究ではマイクロアレイによって得られた候補遺伝子群から RT-PCR により新たに *urml* を 1 細胞期から強く発現する胚性遺伝子として同定した。また *urml* は 13 番染色体上に 10 のバリエーションを持つことが分かり、cDNA をシーケンスした結果から転写されるバリエーションを決定した。さらに各バリエーションの転写開始点上流を対象として転写因子結合領域を予測し、バリエーション間で高度に保存されている領域を発見した。その領域を含む転写開始点上流 650bp をプロモーターとして EGFP に結合したプラスミドを作製し、1 細胞期胚の核内にインジェクションしたところ蛍光を呈した。このことから *urml* 転写開始点上流 650bp は受精後の遺伝子発現再活性化の際にプロモーターとして機能することが示唆された。

緒言

高等生物の体は高度に組織化された膨大な数の細胞から成り立っており、ヒトの場合約 200 種の最終分化した細胞から構成されている。最終分化した細胞は同一なゲノムを保持しているが、通常未分化な状態に戻ることや異なる種類の細胞に変化することはない。生殖細胞は唯一の例外であり、精子と卵が受精して生じた初期胚は体を構成するあらゆる種類の細胞に分化する全能性を有している。近年、遺伝子の配列変化を伴わない後世的修飾（エピジェネティック修飾）が遺伝子発現の調節に対して重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。発生の過程でエピジェネティック修飾が細胞の分化を決定していき、最終分化した細胞からなる個体が生じる。卵が受精を経て再び未分化状態になるのはこのエピジェネティック修飾が初期化されるからであり、すなわち受精を経てリプログラミングが起こるからだと考えられる。

マウスの卵形成は始原生殖細胞から始まり、卵原細胞へと分化が進む。増殖した卵原細胞は減数分裂を開始し、第一減数分裂前期のディプロテン期で細胞周期を停止した状態で成長していく。この過程にある卵を成長期卵(growing oocyte: GO)と呼ぶ。GO は卵特異的遺伝子を活発に転写、蓄積しながら体積を増大させる。しかし完全に成長した卵である fully grown oocyte(FGO)に近づくにつれて転写活性が低下し FGO では転写活性は全く見られなくなる(Moore *et al.*, 1974; Worrad *et al.*, 1994)。FGO はホルモン刺激により減数分裂を再開し、卵核胞の崩壊(germinal vesicle break down; GVBD)を経て第一極体を放出し、第二減数分裂の中期で再び細胞周期を停止する。この状態の卵が未受精卵(MII 卵)であり、受精を経て初期胚となる。受精後の初期胚はしばらくの間遺伝子発現を行わないが、マウスでは 1 細胞期後期から新たに胚性遺伝子発現(zygotic gene activation;

ZGA)が開始し、2細胞期S期を経て転写が強く活性化される(Schults, 1993; Aoki *et al.*, 1997)。このように受精前には遺伝子の発現抑制が起こり、受精後にはZGAによる遺伝子発現の再活性化が起こる(Fig. 1)。遺伝子発現のリプログラミングを解明するためにはこの発現抑制と再活性化の両者を理解する必要があると考えられるが、その機構はほとんど明らかになっていない(Zeng and Schultz, 2004; Ko, M.S. *et al.*, 2000; Sharov, *et al.*, 2003)。

本研究ではこの受精前後における遺伝子発現抑制と再活性化にエピジェネティック修飾の変化が関与していると考え、卵または初期胚におけるエピジェネティック修飾と転写調節の関係を明らかにすることを目的とした。エピジェネティック修飾として代表的なものは、クロマチンを構成するヒストンに対するアセチル化やメチル化などの修飾であり、それによりクロマチンの高次構造が変化することが知られている。現在、ゲノム上の特定の領域におけるヒストン修飾を評価する手法としてクロマチン免疫沈降法(Chromatin Immunoprecipitation 法; ChIP 法)が広く用いられているが、理想的には 10^7 以上の細胞数が必要であり、多くの細胞数を集めるのが困難な卵や初期胚に ChIP 法を適用することは実用的ではない(Luo, R.X., *et al.*, 1998; Braustein, *et al.*, 1996)。近年 ChIP 法の検出感度向上のために改良が試みられているが未だ卵や初期胚に適用するには十分ではない(O'Neill, *et al.*, 2006; Dahl, *et al.*, 2007)。本研究室では卵または初期胚の核内に、解析したい DNA 領域を含むプラスミド DNA を大量にインジェクションし、クロマチン構造を取らせることで ChIP 法に必要な DNA コピー数を補う手法(Plasmid microinjection-Chromatin immunoprecipitation 法; PM-ChIP 法)を考案した(Fig. 2)。これによりわずか数個の卵または初期胚で ChIP 法を行うことが可能となった。既往の研究から、butyrate や trichostatinA などのヒストン脱アセチル酵素阻害剤によりインジェクションしたプラスミド DNA のクロマチン構造を変化

させることで遺伝子発現を変化させた研究も報告されている(Wiekowski, Depamphilis., 1993)。つまり、初期胚にインジェクションしたプラスミド DNA からの遺伝子発現の変化はクロマチン構造に由来すると考えられる。加えて培養細胞にトランスフェクションしたプラスミド DNA に結合したヒストンが内因性クロマチンを構成するヒストンと同様の修飾を受けることも報告されている(Zhang, Cedar., 2002)。すなわち核内にインジェクションしたプラスミド DNA はヒストンと結合してクロマチン構造を取り、内因性クロマチンを構成するヒストンと同様の修飾を受けると考えられる。しかしながら、例えばマウスゲノム由来のプロモーター領域をプラスミドに組み込んだ場合、インジェクションしたプラスミド DNA のうち ChIP 法で検出したい領域はプラスミド全体のごく一部であり、その他大部分を占めるバックボーンの配列に結合したヒストンにも修飾が付加されることによって、検出したい領域にある修飾の検出がマスクされてしまう可能性がある。この問題点を解消するために本研究では、修飾を検出したい DNA 領域のみを断片化して卵または初期胚の核内にインジェクションし、ChIP 法の検出に必要な DNA コピー数を補う DNA microinjection Chromatin immunoprecipitation 法(DM-ChIP 法)の確立を目指した。そしてこの DM-ChIP 法を用いて受精前後における遺伝子発現抑制と再活性化へのヒストン修飾の関与を明らかにしようと考えた。

そこでまず、受精前の遺伝子発現抑制時におけるヒストン修飾の変化を調べることにした。ところで、これまでの報告によって、GO が成長し FGO に近づくにつれて転写活性が低下するが、同時に転写活性を増加させるヒストン修飾であるアセチル化が増加していくことが免疫染色法により明らかとなっている。この矛盾点を説明する機構は2種類考えられる。1つはアセチル化が卵成長の過程で遺伝子調節領域、非遺伝子領域の区別なく増加していくが、未知のメカニ

ズムにより FGO では転写が抑制されるというものである。2 つ目は卵成長の過程でアセチル化は非遺伝子領域のみで増加し、遺伝子領域には入らないことで FGO における転写を抑制しているというものである。このような FGO における転写抑制機構を明らかにするためには免疫染色法による総体的なヒストン修飾の検出では不十分であり DM-ChIP 法を用いた領域特異的なクロマチン構造の評価が不可欠であると考えられる。そこで本研究では GO 特異的遺伝子であるマウス透明帯タンパク質 *zp3* と GO で発現が抑制されている *hsp70* に注目し、それぞれの遺伝子のプロモーター領域について DM-ChIP 法を用いてヒストン修飾を解析することにした。

次に受精後における遺伝子発現の再活性化時にも、GO が FGO となる過程で観察されたヒストン修飾の変化が起こるのかを明らかにしようと考えた。しかし、受精後の遺伝子発現である ZGA については 1 細胞期後期から開始することが知られているが、実際にどのような遺伝子が ZGA 遺伝子であるかについての知見はほとんど得られていない。1 細胞期後期から発現することが知られている唯一の機能的遺伝子は *eIF-1a* のみであり、そのため卵特異的遺伝子とは対照的に ZGA 特異的プロモーターやそのモチーフも特定されていない(Davis, *et al.*, 1996)。そこで本研究ではまず ZGA 候補遺伝子の中から探索を行い、新たに *urml* を ZGA 遺伝子として同定した。さらにプロモーター解析を行い ZGA 特異的プロモーターに関する知見を得た。

材料と方法

成長期卵の採取

生後 12 日齢の BDF1 マウス雌から卵巣を回収し、20mM HEPES を含む KSOM 培地(Lawitts and Biggers, 1993)中で 30G の針(TERUMO Co., LTD., Tokyo, Japan)を用いて卵巣を破壊した。その後、ピペッティングにより成長期卵の周囲にある卵丘細胞を除去した。

Fully grown oocyte の採取

3 週齢 BDF1 マウス雌に過排卵処理として 5IU の pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG; Teikokuzouki Co, LTD., Tokyo, Japna)を腹腔内投与した。PMSG 投与後 48 時間後に頸椎脱臼にて屠殺し、卵巣を 20mM HEPES を含む KSOM 培地に移した。その後 30G の針を用いて卵巣を破壊し、ピペッティングにて周囲の卵丘細胞を除去した。

In vitro fertilization (IVF)

3 週齢 BDF1 マウス雌に過排卵処理として 5IU の PMSG を腹腔内投与し、48 時間後に 5IU の human chorionic gonadotropin(hCG; Teikokuzouki Co, LTD.)を腹腔内投与した。hCG 投与後、15-16 時間後に頸椎脱臼にて屠殺し、卵管膨大部より採取した卵子を HTF medium(Quinn P and Begley AJ, 1984)に移し体外受精に用いた。精子は ICR マウスリタイヤ(SLC)の精巣上体尾部から採取し、HTF 中で 2-3 時間培養したものを体外受精に用いた。媒精 3 時間後、受精卵は KSOM 培地に移して培養を継続した。培養はすべて 5% CO₂、95% air、37.5°C の条件下で行った。

RNA 抽出

ISOGEN (Nippon Gene Co. Toyama, Japan)をチューブに 400 μ l 入れ、卵または初期胚を入れた後、-80 $^{\circ}$ Cで一時的保存した。室温に戻しそれぞれのサンプルに external control として 50 pg/ μ l α -globin mRNA をそれぞれ 0.5 μ l ずつ添加し、100 μ l のクロロホルムを加えた後、ボルテックスミキサーで攪拌した。4 $^{\circ}$ Cで5分間放置した後、12,000 rpm、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心し RNA の含まれる水層(上層)の 240 μ l を新しいチューブに移した。共沈剤である 20 μ g/ml glycogen (Invitrogen Co., Faraday Avenue Carlsbad, CA, USA)をそれぞれのチューブに加え攪拌した後、イソプロパノールをそれぞれ 400 μ l ずつ加え1分間攪拌した。その後4 $^{\circ}$ Cで30分間放置した後、15,000 rpm 4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心し、RNA の沈殿を得た。沈殿したペレットを 70%エタノール 500 μ l で洗浄し、再び 15,000 rpm、4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心した。エタノールを除去し、吸引式乾燥機で15分間乾燥した後、DEPC 水 28.5 μ l を加えた。室温で30分放置し RNA を溶解した。

1 st strand cDNA synthesis

Total RNA 27 μ l に 2 μ l の 10 mM dNTP (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)、2 μ l の Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)を加え、全量 31 μ l とした。この混合液を 70 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートして RNA の高次構造を破壊した。続いて、10 \times Reaction Buffer (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 4 μ l、RNasin (Promega, Co., Woods Hollow Road, Madison, USA) 0.5 μ l、ReverseScriptIV (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka Japan) 0.5 μ l、DEPC 水 4 μ l を順に入れ、よく混合した。42 $^{\circ}$ C1 時間、51 $^{\circ}$ C30 分、95 $^{\circ}$ C5 分反応させた後、4 $^{\circ}$ Cに保った。RNaseH (TaKaRa, Shiga, Japan)を 0.5 μ l (2 units)加え、37 度で 40 分間インキュベートすることで DNA と相補鎖を作る RNA を除去した。

cDNA の精製

RT-PCR 産物に 1/10 量の 3M NaOAc、2.5 倍量の 100%エタノールを加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌した。その後 30 分間、室温で放置し、12,000 rpm、4°C、15 分間遠心し、cDNA の沈殿を得た。100%エタノールを除去し、70%エタノール 500 μ l を加えてチューブを洗い、再度 12,000 rpm、4°C、5 分間遠心した。遠心後 70%エタノールを除き、7 分間真空乾燥した。乾燥後、滅菌蒸留水に cDNA を溶かした。

Polymerase chain reaction (PCR)

合成した cDNA を鋳型として PCR により各遺伝子の発現を解析した。2.5 μ l の 10 \times buffer、0.3 μ l の 250 mM MgCl₂、1.25 μ l の 10 μ M 各プライマー、0.75 μ l の 10 mM dNTPs、1.25 units の Ex TaqTMR-PCR version (TaKaRa, Shiga, Japan)を加えて全量が 25 μ l になるように滅菌蒸留水を加え PCR 反応液を作製した。各プライマーの配列および PCR 条件は以下に示す。

Rabbit α -globin

Sense: 5'-GTGGGACAGGAGCTTGAAAT-3'

Antisense: 5'-GCAGCCACGGTGGCGAGTAT-3'

94°C、1 分 → (94°C、30 秒 → 58°C、30 秒 → 72°C、30 秒) \times 25

zp3

Sense: 5'-GAGCTTTTCGGCATTTC AAG-3'

Antisense: 5'-AGCTTATCGGGGATCTGGTT-3'

94°C、1 分 → (94°C、30 秒 → 58°C、30 秒 → 72°C、30 秒) \times 30

hsp70

Sense: 5'-TGCTGATCCAGGTGTACGAG-3'

Antisense: 5'-CGTTGGTGATGGTGATCTTG-3'

94°C、1 分 → (94°C、30 秒 → 60°C、30 秒 → 72°C、30 秒) × 35

c-mos

Sense: 5'-CTCCGGAGATCCTGAAAGGA-3'

Antisense: 5'-CAGTGTCTTTCCAGTCAGGG-3'

94°C、1 分 → (94°C、30 秒 → 58°C、30 秒 → 72°C、30 秒) × 35

cyclin A2

Sense: 5'-GAGGTGGGAGAAGAATATAA-3'

Antisense: 5'-ACTAGGTGCTDDATTCTCAG-3'

94°C、1 分 → (94°C、30 秒 → 56°C、30 秒 → 72°C、30 秒) × 35

eIF-1A

Sense: 5'-AAGAAGTCTGAAGGCCTATG-3'

Antisense: 5'-CAGAGAACTTGGAAGGTAGC-3'

94°C、1 分 → (94°C、30 秒 → 60°C、30 秒 → 72°C、30 秒) × 35

urml

Sense: 5'-CACTCTCCTTTGGCTCCTTG-3'

Antisense: 5'-CAACTTTTCCCACGCATTTT-3'

94°C、1 分 → (94°C、30 秒 → 60°C、30 秒 → 72°C、30 秒) × 40

zp3 プロモーター、hsp70 プロモーターを含む DNA 断片の調製

pEGFP-N1-plasmid DNAs (Clontech BD Biosciences)の持つ EGFP 配列上流に *zp3* プロモーターをクローニングした pEGFP-zp3-plasmid と、EGFP 配列上流に *hsp70* プロモーターをクローニングした pEGFP-hsp70-plasmid を鋳型として、*zp3* プロモーターと *hsp70* プロモーターを含む DNA 断片を PCR により作製した。PCR 条件と用いたプライマーを以下に示す。

zp3 プロモーター

Sense: 5'-GATCCTGGTGTGGTGACATA-3'

Antisense: 5'-CTGGGCTCAGAATGAGAGGC-3'

94°C、1 分 → (94°C、30 秒 → 60°C、30 秒 → 72°C、30 秒) × 35

hsp70 プロモーター

Sense: 5'-AGCTGAATGAGCTCCAGGAA-3'

Antisense: 5'-GTAGCTGTCAGCGTCTGGTG-3'

94°C、1 分 → (94°C、30 秒 → 60°C、30 秒 → 72°C、30 秒) × 30

増幅した DNA 断片は phenol-chloroform 法により精製した後、濃度を測定し 50 ng/μl に調製した。

卵への DNA インジェクションと融解

生後 12 日齢の BFF1 マウス雌から採取した成長期卵と 3 週齢の BDF1 マウス雌から採取した FGO の核内に DNA 断片をマイクロインジェクションし ChIP 法に使用した。また pEGFP-zp3-plasmid と pEGFP-hsp-plasmid をインジェクション

し、24 時間後に蛍光を観察した。

マイクロインジェクションは Inverted microscope (ECLIPSE TE300, Nikon Corporation, Tokyo, Japan)と micromanipulator (Narishige Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用い、borosilicate glass capillaries (GC100 Tf-10, Harvard Apparatus Ltd., Kent, UK)中に DNA 溶液を入れ、microinjector (IM300, Narishige Co., Ltd.)により N₂ の圧力で押し出して核内に約 5 pl 注入した。インジェクション後の卵は KSOM 培地で再び培養した。

その後、DNA 断片をインジェクションした卵に対して、KSOM 培地に 37% formaldehyde を終濃度 1%になるように添加し、37°C、15 分間固定した。固定後卵を PBS で洗浄し、シリコナイズチューブ中の 0.1% Triton-X-100(Sigma chemical Co.)/lysis buffer 30 µl 中に溶かした。続いて-80°Cで凍結した後溶融させ、超音波処理を行い免疫沈降に用いるサンプルとした。

クロマチン免疫沈降法(ChIP 法)

ChIP 法には Chromatin Immunoprecipitation Assay Kit (Upstate biotechnology Co., LTD., NY, USA)を用い、Luo や Braunstein らの方法(Luo, *et al.*, 1998; Braunstein, *et al.*, 1996)に基づいて行った。超音波処理後のサンプルに ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH8.1, 167 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)を 270 µl 加えて 10 倍希釈した。次に 10 µl の protein A agarose beads 懸濁液(600 µg sonicated salmon sperm DNA, 1.5 mg BSA, 4.5 mg recombinant protein A agarose/1.5 ml buffer; 10 mM tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.05% sodium azide)を加え、4°Cで 1 時間転倒攪拌した。この操作によりビーズへの非特異的吸着物質を取り除いた。1000 rpm、60 秒、4°Cで遠心して上清を新しいチューブに移し、抗 H3 抗体(Upstate)、抗 H4 抗体(Abcam)、または抗

H4 アセチル化抗体(Upstate) 5 μ g を入れ、4°C で 6 時間転倒攪拌した。またこの時、抗体処理前画分の 10% をサンプリングし、Input として 4°C でスタンダードとして保存した。抗体処理後 Input 以外の各サンプルに 20 μ l の protein A agarose を加え、4°C で 1 時間転倒攪拌し抗体に結合したクロマチンをビーズに吸着させた。次に protein A agarose を以下に示す 4 段階を経て洗浄した。(1) Low Salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl)、(2) High Salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 500 mM NaCl)、(3) LiCl buffer (0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.1)、(4) TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) \times 2 回。洗浄の後 50 μ l の Elution buffer (10 mM DTT, 1% SDS, 0.1 M NaHCO₃) を加え、常温、15 分間でビーズに吸着したクロマチンを溶出させた。遠心後上清を回収し、再び 50 μ l の Elution buffer を加えてもう一度繰り返した。得られたサンプル 100 μ l に対して 5 μ l の 5 M NaCl を加え、65°C、4 時間インキュベートしてタンパク質・DNA 複合体の脱架橋を行った。同時に input に対しても同様の脱架橋反応を行った。次に 2 μ l の 0.5 M EDTA、4 μ l の 1 M Tris-HCl, pH 6.5、1 μ l の 6 mg/ml Proteinase K (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を加え、45°C で 1 時間インキュベートしてタンパク質を分解した。その後、phenol-chloroform 法により DNA を抽出し 10 μ l の精製水に溶かし、リアルタイム PCR に用いた。

リアルタイム PCR

免疫沈降によって得られた DNA に関して、Smart Cycler System (Cepheid, Sunnyvale, USA. And TaKaRa, Shiga, Japan) を用いたリアルタイム PCR 法により定量を行った。同時に各サンプルに対する Input 内の DNA もリアルタイム PCR に

より定量し、免疫沈降によって得られた数値を割ることで各サンプル間の総 DNA 量を補正した。DNA サンプルに二本鎖 DNA 染色剤である 3×SYBR® Green I を 2.5 µl (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA)用い、2.5 µl の 10×buffer、0.3 µl の 250 mM MgCl₂、1.25 µl ずつの各プライマー、0.75 µl の 10 mM dNTPs、1.25 units の Ex Taq™R-PCR Version (TaKaRa)を加え全量が 25 µl になるように DDW を加え PCR 反応液を作製した。増幅した PCR 産物を確認のため 2%のアガロースゲルを用いて TBE (tris-borate EDTA)中で電気泳動しエチジウムブロマイドで染色した。リアルタイム PCR に用いた各プライマーの配列および PCR 条件を以下に示す。

hsp70 promoter

Sense:5'-TGCTGATCCAGGTGTACGAG-3'

Anti:5'-CGTTGGTGATGGTGATCTTG-3'

95°C、30 秒 →(95°C、15 秒 →60°C、15 秒 →72°C、20 秒 →85°C、6 秒 (optics on))×40

zp3 promoter

Sense:5'-AACCCAACAACAGCAAAACC-3'

Anti:5'-TGGAGCCCATTATCAACACA-3'

95°C、30 秒 →(95°C、15 秒 →59°C、15 秒 →72°C、20 秒 →85°C、6 秒 (optics on))×35

α-amanitin による胚性遺伝子発現の阻害

RNA polymerase II の阻害剤であるα-amanitin (Sigma)を 25 µg/ml と 100 µg/ml

の濃度になるように添加した KSOM 培地中に IVF 後 6 時間の初期胚を移し、8 時間培養した。対象として α -amanitin を含まない培地中で培養した胚を用い、サンプリング後 RT-PCR により初期胚特異的遺伝子の解析を行った。

urml cDNA のシーケンス

RT-PCR によって増幅した *urml* cDNA を TOPO TA Cloning Kit dual promoter(invitrogen, CA, USA)にクローニングし TOP10 cell にトランスフォーメーション後、アンピシリン+の LB 寒天培地で培養し、コロニーをランダムに選択した。その後、各コロニーを LB 液体培地で培養し、プラスミド抽出後 BigDye™ Terminator v3.0 kit (Applied Biosystems, CA, USA)を用いたシーケンスを行い、配列を決定した。

urml 転写開始点上流の転写因子結合領域の検索

urml バリアントの転写開始点 3kbp を対象として転写因子結合予測ソフト Transfac (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/match/bin/match.cgi>)を用いて既知の転写因子結合領域があるかを解析した。

urml 転写開始点上流 650 bp を EGFP に結合させたプラスミドの作製

urml 転写開始点上流 650 bp を BDF1 ゲノムから増幅させ、pGlow-TOPO vector (Invitrogen, CA, USA)の EGFP 上流にプロモーターとして結合させたプラスミドを TA クローニングにより作製した。増幅に用いた条件を以下に示す。

Sense: 5'-TATTAATGTCAAATGTCTACATTGCTGAAGG-3'

Anti: 5'-CCGCTCCAGCTTCTTCCAATGTCCTTATATAGTCTC-3'

94℃、30 秒 →(94℃、30 秒 →60℃、30 秒 →72℃、45 秒)×35

プラスミドを大腸菌(Top 10)にトランスフォーメーションし、Kanamycin+の LB 培地で 24 時間培養し、コロニーをランダムに選択した。BigDye™ Terminator v3.0 を用いシーケンスを行い、インサートを確認した。

結果

zp3、hsp70 の GO、MII 卵、2 Cell における発現解析

DM-ChIP 法を用いて受精前における転写抑制機構を明らかにするために、DM-ChIP 法に用いるプロモーター領域として *zp3* と *hsp70* に着目した。まず、GO で発現することが知られている *zp3* が実際に GO 特異的に発現しているか、またコントロールとして用いる *hsp70* が GO において発現が抑制されているかを確認しようと考えた。そこで、12 日齢マウスから採取した GO と 3 週齢マウスから採取した MII 卵、そして受精後 28 h の 2 Cell をサンプリングし、RT-PCR によって発現を解析した。その結果、*zp3* は GO で強く発現しているが MII 卵では発現の抑制とともに分解が進み、2 Cell では検出されなかった。一方、*hsp70* は 2 Cell において発現が顕著であるが GO では抑制されていた(Fig. 3)。これらの結果から、*zp3* を GO で発現する遺伝子として、*hsp70* を GO で発現が抑制されている遺伝子として DM-ChIP 法に用い、プロモーター領域におけるヒストン修飾の変化を解析することにした。

外因性 zp3 プロモーターの時期特異的活性の解析

zp3 のプロモーター領域を DM-ChIP 法に用いるにあたって、まずインジェクションにより核内に導入した外因性の *zp3* プロモーターが内在性のものと同様の時期特異的活性を示すかを明らかにしようと考えた。そこで、*zp3* プロモーターの下流に EGFP を結合したプラスミド(pEGFP-*zp3*)を作製し、GO と FGO の核内にインジェクションし、蛍光を観察した。また、*hsp70* プロモーターの下流に EGFP を結合したプラスミド(pEGFP-*hsp*)も作製し、同様に GO と FGO の核内に導入し、蛍光を観察した。インジェクションの 24 h 後に蛍光を観察したところ、

GO は pEGFP-zp3 をインジェクションした場合のみ強い蛍光を呈し、pEGFP-hsp をインジェクションした場合は非処理の GO と差はなかった。一方、FGO にプラスミドをインジェクションした場合、pEGFP-zp3 をインジェクションした FGO でも pEGFP-hsp をインジェクションした FGO でも 24h 後に蛍光は観察されなかった(Fig.4)。このことから、外因性の zp3 プロモーターは内在性のものと同様の GO 特異的活性を示し、FGO においては転写が抑制されることが明らかとなった。また、外因性 hsp70 プロモーターは GO あるいは FGO のいずれにおいても活性を持たなかった。

FGO における zp3 プロモーターのクロマチン形成

FGO の核内に zp3 プロモーターDNA 断片をインジェクション後、0 h、1 h、3 h で固定し、抗 H3、H4 抗体を用いて ChIP を行った。またコントロールとして細胞質に DNA をインジェクション後 1h で固定したサンプルも ChIP に用いた。その結果、核内にインジェクションした DNA と H3、H4 の結合量はインジェクション後 1 h でプラトーに達することが明らかとなった(Fig. 5)。このときインジェクションした DNA はヒストンと結合しクロマチン構造を形成していると考えられる。この結果をふまえて、インジェクション後 1 h で固定し、ChIP に用いることにした。

GO と FGO での zp3 プロモーター領域と hsp70 プロモーター領域における

H4Ac の解析

GO と FGO における領域特異的な H4Ac 状態を解析するために、zp3 プロモーター領域と hsp70 プロモーター領域の DNA 断片をそれぞれ GO と FGO の核内にインジェクションし、1 h 後に固定し抗 H4Ac 抗体を用いて ChIP を行った。

その結果、*zp3* プロモーター領域においても *hsp70* プロモーター領域においても FGO は GO よりも高い H4Ac レベルを示した(Fig.6)。また、H4Ac レベルの増加は *zp3* プロモーター領域において、より顕著であった。これらの結果から、免疫染色法によって観察された FGO における総体的な H4Ac レベルの増加は、遺伝子のプロモーター領域での変化を反映していることが明らかとなった。これは同時に、未知の機構によって FGO における遺伝子発現が、プロモーター領域のヒストンが高アセチル化状態にあるにも関わらず、抑制されていることを示唆する結果となった。

GO と FGO での *zp3* プロモーター領域と *hsp70* プロモーター領域における H4 密度の解析

近年、ゲノムワイドなヒストン密度の解析により、ゲノム上のプロモーター領域においてヒストンが低密度な状態にあり、他の領域よりも転写因子が結合しやすい状況にあることが明らかとなっている(Sekinger, *et al.*, 2005)。また、遺伝子の発現が活性化した際にそのプロモーター領域においてヒストンが低密度になることも報告されている(Jamai, *et al.*, 2007; Lee, *et al.*, 2004)。そこで、GO における活性化状態から FGO の不活性化状態へと発現レベルが変化する *zp3* と、GO においても FGO においても発現が抑制されている *hsp70* の両遺伝子のプロモーター領域におけるヒストンとの結合量を解析しようと考えた。GO と FGO の核内に *zp3* プロモーターDNA と *hsp70* プロモーターDNA をそれぞれインジェクション後、1 h で ChIP を行い、抗 H4 抗体を用いて両プロモーター領域における H4 との結合量を解析した。その結果、*zp3* プロモーター領域においては FGO は GO よりも高い H4 結合量を示したが、*hsp70* プロモーター領域においては GO、FGO 間で H4 結合量に変化は見られなかった(Fig. 7)。これにより、FGO におけ

る転写抑制状態はプロモーター領域にヒストンが高密度で蓄積されることで生じている可能性が示された。GO において高活性を持つ *zp3* プロモーター領域は FGO と比較してヒストンが低密度であり、GO においても抑制されている *hsp70* プロモーター領域は FGO と同等のヒストン密度を保持していると考えられる。

新規 ZGA 遺伝子の探索

受精前の遺伝子発現抑制に関わるメカニズムと受精後に起こる遺伝子発現の再活性化との関係を明らかにしようと考えた。しかし、受精後の再活性化によって起こる ZGA が実際にどのような遺伝子によって構成されているかについてはほとんど明らかになっていない。そこで、本研究室で行われたマイクロアレイの結果から ZGA 候補遺伝子を選び、探索を行った(Kageyama, Aoki, 未発表データ)。このマイクロアレイは、受精後 1 細胞期後期までに BrUTP を取り込ませた mRNA を抗 BrUTP 抗体を用いた免疫沈降によって濃縮した画分と、BrUTP 非処理の画分をそれぞれマイクロアレイにかけ、各遺伝子についてこの 2 つの画分間での検出量の違いを調べたものである。ある遺伝子が ZGA 遺伝子である場合、mRNA は BrUTP を取り込んでおり、抗 BrUTP 抗体で免疫沈降させた画分で、より多く存在すると考えられる。BrUTP 非処理画分に比べて BrUTP 処理画分での割合が高い遺伝子をリストアップし、ZGA 候補遺伝子とした。これら候補遺伝子に対して、MII 卵と受精後 14 h の 1 細胞期胚を用いて RT-PCR を行った。その結果、現在 1 細胞期から発現することが知られている唯一の機能遺伝子である *eIF-1A* と同様に、*urml* が受精後に発現することが明らかとなった(Fig. 8-A)。また卵成長期でも発現する *cyclin A2* は MII 卵と 1 細胞期胚の両方で検出された。続いて、RNA ポリメラーゼ II の阻害剤である α -amanitin を受精後 6 h で培地に添加し、受精後 14 h でサンプリングして RT-PCR を行った。その結果、体細胞

で遺伝子発現を停止させる濃度である 25 $\mu\text{g/ml}$ では *urml* の発現が完全には阻害されなかったが、100 $\mu\text{g/ml}$ では MII と同程度まで発現が低下した(Fig. 8-B)。これらのことから、*urml* は 1 細胞期後期から発現する ZGA 遺伝子であることが明らかとなった。

urml バリエントの発現解析

ブラスト検索の結果、*urml* は 13 番染色体上に極めて相同性の高い 10 のバリエントを持つことが分かった(Fig. 9)。近年報告された 2 細胞期特異的遺伝子 *zscan4* も多数のバリエントを持ち、発生の段階で異なるバリエントから転写が起こることが明らかとなっている(Falco, *et al.*, 2007)。そこで、*urml* についてもどのバリエントから転写が起こっているかを明らかにしようと考え、RT-PCR によって得られた cDNA をクローニングしてシーケンスを行った。その結果、5 種類のバリエントが転写されていることが明らかとなった。また、LOC666222 と AA414992 の間の領域からまだ遺伝子としてアノテーションされていない *urml* バリエントが発現していることも明らかとなった。

urml 転写開始点上流の転写因子結合領域の予測

新規 *urml* バリエントを含む 11 のバリエントについて、転写開始点上流 1.5k bp を対象として転写因子結合領域予測ソフト Transfac を用いた解析を行った。その結果、-600bp に存在する PolyA downstream element 結合領域が各バリエント間で高度に保存されていることが明らかとなった。

urml 転写開始点上流領域の 1 Cell での遺伝子発現調節

urml 転写開始点上流 650 bp を EGFP 上流にプロモーターとして結合させたプ

ラスミドを作製し、受精後 6 時間の 1 細胞期胚の核内にインジェクションした。
24 時間後に蛍光を観察したところ、インジェクションしなかったものと比べて
EGFP による蛍光が観察された(Fig. 10)。このことから *urml* 転写開始点上流 650
bp は ZGA においてプロモーターとして機能する可能性が示された。

考察

完全に分化した細胞である卵が受精を経て全能性を有する胚へとリプログラムされる機構は未だ解明されていない。本研究では受精前後における遺伝子発現の変化に着目し、受精前の遺伝子発現抑制と受精後の再活性化機構を調べることでリプログラムのメカニズムを明らかにしようと考えた。そこで、受精前に発現が抑制される遺伝子と受精後の再活性化により発現する遺伝子についてプロモーター領域の解析を行った。

まず、受精前の遺伝子発現抑制過程に注目し、DM-ChIP 法を用いたプロモーター領域のヒストン修飾解析を行った。DM-ChIP 法を行うに当たって確認しなければならない点は2つあり、1点目は細胞外からインジェクションしたプロモーターが内在性のものと同様の発現調節を行うことであり、2点目はインジェクションした DNA がヒストンと結合しクロマチン構造を形成することである。本研究では卵特異的遺伝子である *zp3* と卵成長期においては発現が抑制されている *hsp70* のプロモーター領域に EGFP を結合させたプラスミドを作製し、それぞれ GO の核内に導入した。その結果、*zp3* プラスミドを導入した卵では発現が見られ、一方 *hsp70* プラスミドを導入した卵では発現が見られなかった(Fig. 4)。このことから、インジェクションした *zp3*、*hsp70* の両プロモーターは内在性のものと同様の調節を行うことが示唆された。また、培養細胞にトランスフェクションしたプラスミドがヒストンと結合してクロマチン構造を形成し、内因性クロマチンを構成するヒストンと同様の修飾を受けることを示唆する報告もあることから、インジェクションにより核内に導入したプロモーター領域も内因性のものと同様の修飾を受けていると考えられる(Zhang, Cedar, 2002)。実際に本研究においても、FGO の核内に *zp3* プロモーター領域の DNA 断片をインジェクシ

ョンし、ヒストンへの取り込みを観察したところ、インジェクション後核内でヒストンとの結合が観察された。また、インジェクションした DNA とヒストンとの結合量は 1 時間でプラトーに達していた(Fig. 5)。In vitro において DNA 断片とヒストンが数分で結合することも報告されており、1 時間という時間はクロマチン構造形成に十分な時間であると考えられる(You, *et al.*, 2007)。1 時間から 3 時間にかけてヒストンと DNA の結合量がやや減少したが、その理由としてはインジェクションした DNA の細胞質への拡散や DNA 末端からのエキソヌクレアーゼ活性による分解などが考えられる。

DM-ChIP 法により GO から FGO にかけて遺伝子のプロモーター領域で H4Ac の増加が観察された(Fig. 6)。H4Ac は転写活性化に働くヒストン修飾であり、FGO は転写活性を持たないことから、矛盾した現象に思える。しかしながら、FGO においてゲノムは凝集した状態にあることが免疫染色から観察されている。アセチル化による転写の活性化はヒストンと DNA との静電氣的結合を中和して弛緩させた状態にすることで転写因子が DNA に結合しやすくなるために起こる。この点を考えると、プロモーター領域のアセチル化が上昇し DNA とヒストンの結合力は減少しているものの、FGO では何らかの要因によって転写因子がプロモーター領域に結合できない状態が作られていると考えられる。ヒストン密度の増加はプロモーター領域への転写因子の結合を阻害する働きがあることが報告されており、受精前における遺伝子発現抑制と関係がある可能性がある。(Jamai, *et al.*, 2007; Lee, *et al.*, 2004; Segal, *et al.*, 2006)。本研究で明らかとなった zp3 プロモーター領域における H4 との結合量の増加は転写因子のプロモーター領域への結合を妨げ、遺伝子発現を抑制していると考えられる(Fig. 7)。hsp70 プロモーター領域で H4 との結合量に増加が見られなかったのは、hsp70 の発現が GO においても FGO と同様に抑制された状態であり、すでにヒストン密度が高

い状態にあったためだと考えられる。今後多くの遺伝子のプロモーター領域を用いて DM-ChIP 法を用いた領域特異的ヒストン修飾の解析を行えばプロモーター領域における高ヒストン密度が FGO の転写抑制状態を作り出す中心的機構であるかどうかを明らかにすることができるだろう。

次に、受精後に起こる遺伝子発現の再活性化機構を明らかにするために、未だ知見の少ない 1 細胞期後期から発現が開始する胚性遺伝子の探索を試みた。受精後の再活性化は 1 細胞期後期から開始することが知られているが、このときに実際に発現が上昇する機能的遺伝子としては *eIF-1A* が報告されているのみである(Aoki, *et al.*, 1997; Davis, *et al.*, 1996)。今後、ZGA を生み出すプロモーターやそのモチーフを特定するためには多くの ZGA 遺伝子を同定する必要があると考えられる。本研究ではマイクロアレイの結果をもとに探索を行い、新たに *urml* を ZGA 遺伝子として特定した。*urml* はがん遺伝子である *myc* を高発現するトランスジェニックマウスで発現が上昇することが知られており、細胞分裂や脱分化に関係した機能を持つ可能性がある(Kim, *et al.*, 2001)。ZGA が正常に起こることが初期発生に重要であるとの報告もあることから、今後 RNAi を用いたノックダウンの実験などにより *urml* の機能を明らかにしたいと考えている(Vassena, *et al.*, 2007)。

相同性検索の結果、*urml* は 13 番染色体上に 10 のバリエントを持つことが分かった(Fig. 9)。近年、2 細胞期胚で発現が確認された遺伝子 *zscan4* も *urml* と同様に 9 のバリエントを 7 番染色体上に持つことが報告されており、初期胚で発現する遺伝子が多コピー存在するという共通点が興味深い(Falco, *et al.*, 2007)。この理由として初期胚では逆転写酵素の活性が体細胞の 1000 倍以上あり、mRNA が逆転写によりゲノム上に挿入されやすいことが考えられる(Evsikov, *et al.*, 2004)。しかしながら、これだけでは遺伝子が同染色体上にクラスター状に多コ

ピー存在することは説明できず、何らかの要因により初期胚で発現する遺伝子は不等組み換えなどによりコピー数を増やしやすいう状態にあると考えられる。*urml* バリエントは相同性が高く、ORF も維持されている。このことは初期胚において何らかの重要な機能を担っていることを示唆している。

また、受精後に RNA polymerase II の阻害剤である α -amanitin を添加した培地で培養した 1 細胞期胚は *urml* の発現上昇が観察されず、1 細胞期後期に検出された *urml* の mRNA は受精後の遺伝子発現再活性化に起因することが明らかとなった(Fig. 8-A)。このとき胚性遺伝子発現を十分に阻害するためには α -amanitin の濃度を体細胞での遺伝子発現を阻害する濃度よりも高い濃度にする必要があった(Fig. 8-B)。この初期胚の α -amanitin に対する低感受性は既往の研究においても報告されており、受精後に起こる遺伝子発現の再活性化は通常の体細胞で起きている転写機構とは異なったメカニズムで起こるのかもしれない(Hamatani, *et al.*, 2004)。 α -amanitin への感受性は RNA polymerase I, II, III の各酵素によっても異なることが知られているので、ZGA に RNA polymerase II 以外の酵素が関与している可能性もある(Schultz LD, *et al.*, 1976)。しかしながら、単に体細胞と初期胚における α -amanitin の透過性に起因している可能性もあり、今後検討する必要があると考えられる。

ZGA 特異的プロモーター領域を決定するために、*urml* の転写開始点上流 650bp を EGFP に結合させたプラスミドを 1 細胞期胚の核内にインジェクションしたところ蛍光を呈した(Fig. 10)。これによりこの領域中には受精後の遺伝子発現再活性化に必要なプロモーターが含まれていることが示唆された。今後、更に上流領域の ZGA への影響や点変異導入による ZGA モチーフの同定、DM-ChIP 法による ZGA 特異的プロモーターのヒストン修飾の変化等を解析したいと考えている。

受精前の遺伝子発現抑制と受精後の再活性化によって生じる遺伝子発現のリプログラミング機構を解明するためには、遺伝子レベルでの解析が不可欠であり、本研究はその第一歩であると考えられる。今後この研究をさらに進展させることにより、完全に分化した細胞である卵が全能性を有する胚へとリプログラミングされる、我々の生活環の中心を担う機構を解明できると考える。

謝辞

本論文を終えるにあたり、研究活動及び論文の作製を終始親身に御助言・御指導頂きました東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 資源生物制御学分野 青木不学 准教授に深く感謝致します。また、研究を進める上で様々な御助言を頂きました同大学大学院同分野の 永田昌男 教授に心より感謝致します。

実験の進行におきまして多大なる技術的指導・専門的知識および様々な御助力を頂きました同大学大学院同分野の諸先輩方に感謝致します。

そして、研究の楽しさや厳しさを共に味わい、互いに協力し合いながら研究室で多くの時間を共有した井上梓君、菊田真吾君、平坂聡君、湯川将之君に感謝します。

また充実した大学院生活を共に歩んでくれた先端生命科学専攻の同期生・後輩の皆様に深く感謝致します。

最後に、これまで私をあたたく応援してくださり、素晴らしい環境を提供し続けてくれた家族に感謝致します。

参考文献

- Aoki F, Worrad MD, Schultz RM. 1997. Regulation of transcriptional activity during the first and second cellcycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 181: 296-307.
- Braustein M, Sobel ER, Allis DC, Turner MB, Broach RJ. 1996. Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol Cell Biol* 16: 4349-4356
- Dahl JA, Collas P. 2007. Q²ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of developmentally regulated genes in human carcinoma cells. *Stem Cells* 25: 1037-1046.
- Davis W, DeSousa PA, Schultz RM. 1996. Transient expression of translation initiation factor eIF-4C during the 2-Cell stage of the preimplantation mouse embryo: identification by mRNA differential display and the role of DNA replication in zygotic gene activation. *Dev Biol* 174: 190-201.
- Evsikov AV, DeVries WN, Peaston AE, Radford EE, Fancher KS, Chen FH, Blake JA, Bult CJ, Latham KE, Solter D, Knowles BB. 2004. Systems biology of the 2-cell mouse embryo. *Cytogenet Genome Res* 105: 240-250.
- Falco G, Lee SL, Stanghellini I, Bassey UC, Hamatani T, Ko MS. 2007. Zscan4: a novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells. *Dev Biol* 307: 539-550.
- Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. 2004. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell* 6: 117-131.
- Jamai A, Imoberdorf M. R. and Strubin M. 2007. Continulus histone H2B and

- transcription-dependent histone H3 exchange in yeast cells outside of replication. *Mol Cell* 25: 345-355.
- Kim S, Zeller K, Dang CV, Sandgren EP, Lee LA. 2001. A strategy to identify differentially expressed genes using representational analysis and cDNA arrays. *Analytical Biochem* 288: 141-148.
- Ko MS, Kitchen JR, Wang X, Threat TA, Hasegawa A, Sun T, Grahovac MJ, Kargul GJ, Lim MK, Cui Y, Sano Y, Tanaka T, Liang Y, Mason S, Paonessa PD, Sauls AD, DePalma GE, Sharara R, Rowe LB, Eppig J, Morrell C, Doi H. 2000. Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development. *Development* 127: 1737-1749.
- Lawitts JA, Biggers JD. 1993. Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol* 225: 153-164.
- Lee K. C., Shibata Y, Rao B, Strahl D. B. and Lieb D. J. 2004. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat Gen* 36: 900-906
- Luo RX, Postigo AA, Dean DC. 1998. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92: 463-473.
- Moore GPM, Moore SL, Peters H, Faber M. 1974. RNA synthesis in the mouse oocyte. *J Cell Biol* 60: 416-422
- O'Neill LP, VerMilyea MD, Turner BM. 2006. Epigenetic characterization of the early embryo with a chromatin immunoprecipitation protocol applicable to small cell populations. *Nat Gen* 38: 835-842.
- Schultz LD, Hall MN. 1976. Transcription in yeast: α -amanitin sensitivity and other properties which distinguish between RNA polymerase I and III. *Proc Natl Acad Sci* 73: 1029-1033.

- Schults RM. 1993. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays* 8: 245-254.
- Sharov AA, Piao Y, Matoba R, Dudekula DB, Qian Y, VanBuren V, Falco G, Martin PR, Stagg CA, Bassey UC, Wang Y, Carter MG, Hamatani T, Aiba K, Akutsu H, Sharova L, Tanaka TS, Kimber WL, Yoshikawa T, Jaradat SA, Pantano S, Nagaraja R, Boheler KR, Taub D, Hodes RJ, Longo DL, Schlessinger D, Keller J, Klotz E, Kelsoe G, Umezawa A, Vescovi AL, Rossant J, Kunath T, Hogan BL, Curci A, D'Urso M, Kelso J, Hide W, Ko MS. 2003. Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos. *PLoS Biol* 1: E74. Epub 2003 Dec 2002.
- Sekinger A. E., Moqtaderi Z and Struhl K. 2005. Intrinsic histone-DNA interactions and low nucleosome density are important for preferential accessibility of promoter regions in yeast. *Mol Cell* 18: 735-748.
- Segal E, Mittendorf YM, Chen L, Thastrom A, Field Y, Moore IK, Wang JZ, Widom J. 2006. A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* 442: 772-779
- Vassena R, Han Z, Gao S, Latham KE. 2007. Deficiency in recapitulation of stage-specific embryonic gene transcription in two-cell stage cloned mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 74 1548-1556
- Worrad DM, Ram PT, Schultz RM. 1994. Regulation of gene expression in the mouse oocyte and early preimplantation embryo: developmental changes in Sp1 and TATA box-binding protein, TBP. *Development* 120: 2347-2357
- Wiekowski M, Miranda M, DePamphilis ML. 1993. Requirements for promoter activity in mouse oocytes and embryos distinguish paternal pronuclei from maternal and zygotic nuclei. *Dev Biol* 159: 366-378

- You Z, Bailis JM, Johnson SA, Dilworth SM, Hunter T. 2007. Rapid activation of ATM on DNA flanking double-strand breaks. *Nature Cell Biol* 9: 1311-1323.
- Zhang J, Xu F, Hashimshony T, Keshet I, Cedar H. 2002. Establishment of transcriptional competence in early and late S phase. *Nature* 420: 198-202.
- Zeng F, Baldwin DA, Schultz RM. 2004. Transcript profiling during preimplantation development. *Dev Biol* 272: 483-496.

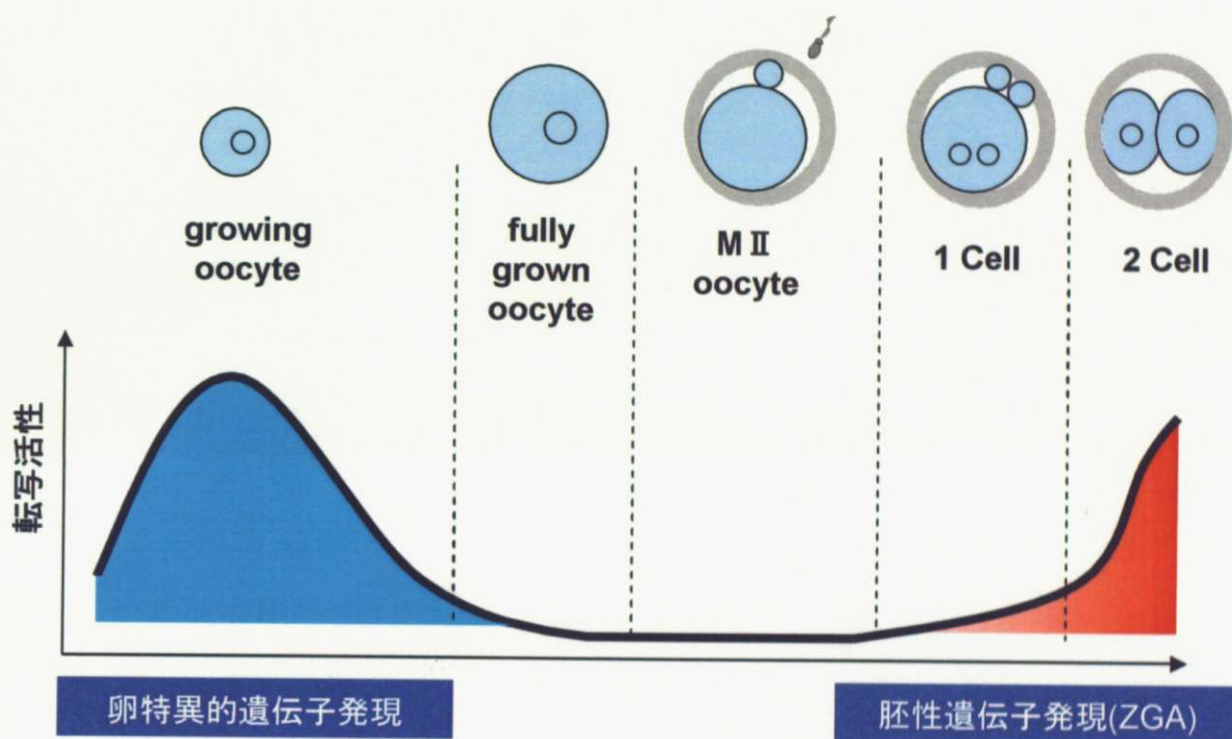


Fig. 1 受精前後における遺伝子発現パターンの変化

growing oocyteは活発に遺伝子発現を行い成長するが、fully grown oocyteになると遺伝子発現は停止する。受精後1細胞期後期から遺伝子発現の再活性化が起こり、胚性遺伝子が発現する。受精前後において遺伝子発現パターンは大きく変化する。

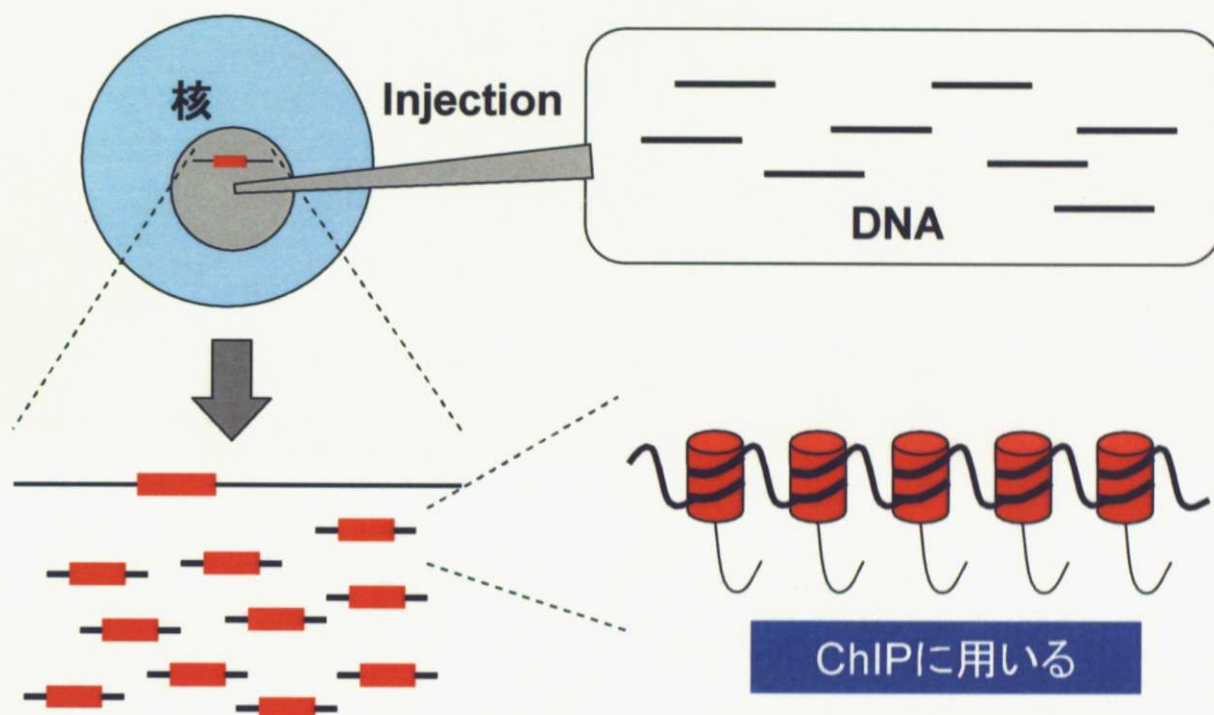


Fig.2 DM-ChIP法の概略

ヒストン修飾を検出したい領域のDNA断片を卵または初期胚の核内にインジェクションし、クロマチン構造を形成させた後、ChIPに用いる。DM-ChIP法により数個の卵でヒストン修飾の検出が可能となる。

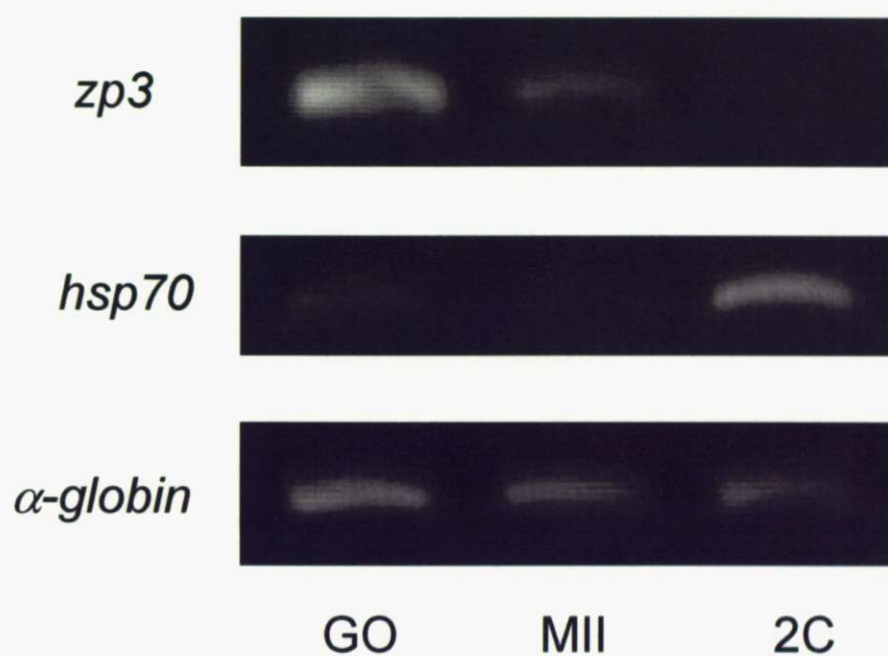


Fig.3 *zp3*、*hsp70*のgrowing oocyteとMII oocyte、および2細胞期胚における発現

生後12日齢マウスの卵巣から採取したgrowing oocyte (GO)、3週齢マウスから採取したMII oocyte(MII)、受精後28時間の2細胞期胚(2C)を用い、RT-PCRにより*zp3*、*hsp70*の発現を解析した。

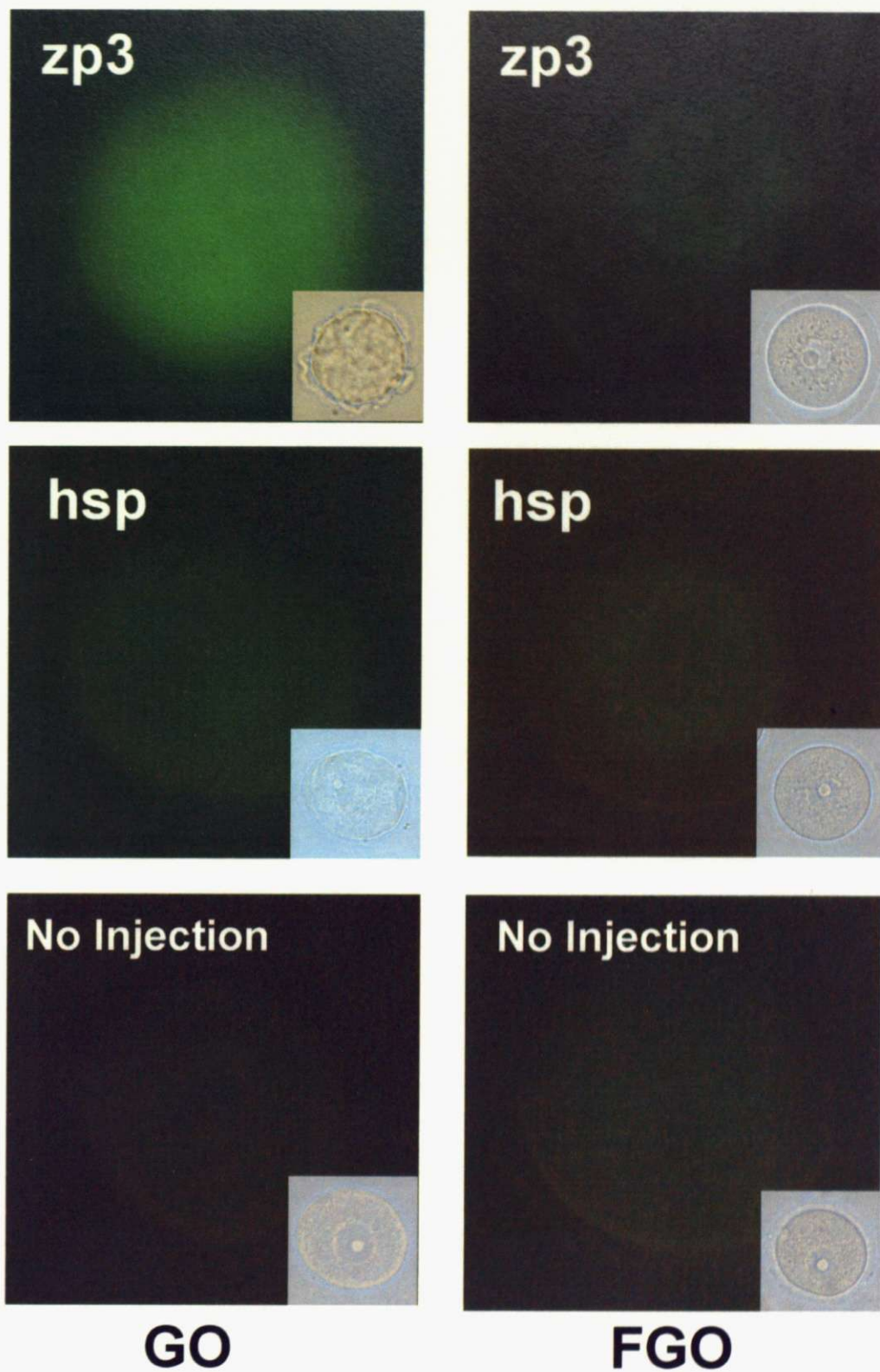


Fig. 4 *zp3*プロモーターと*hsp*プロモーターのGOとFGOにおける転写活性の比較

GOとFGOの核内に*zp3*あるいは*hsp70*のプロモーター領域をEGFPの上流に結合したプラスミドをそれぞれインジェクションし、24時間後に蛍光を観察した。

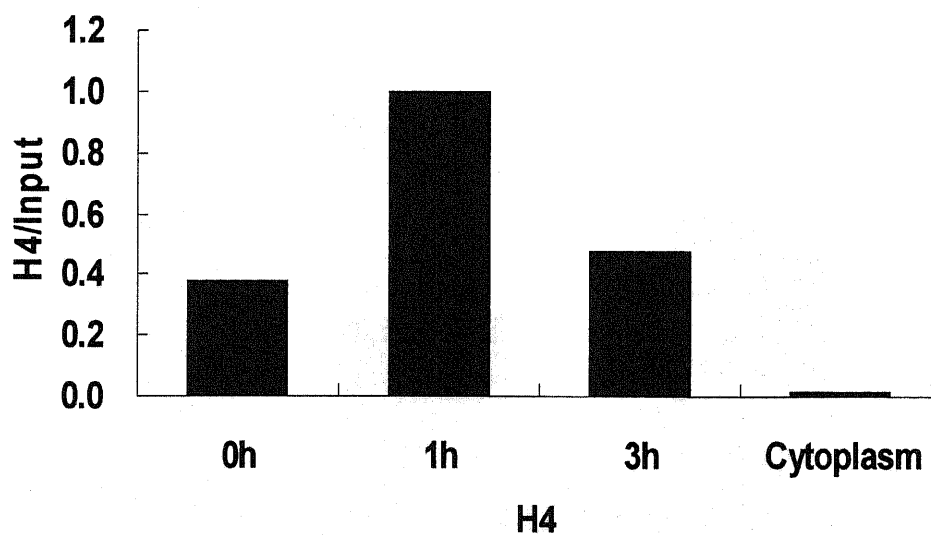
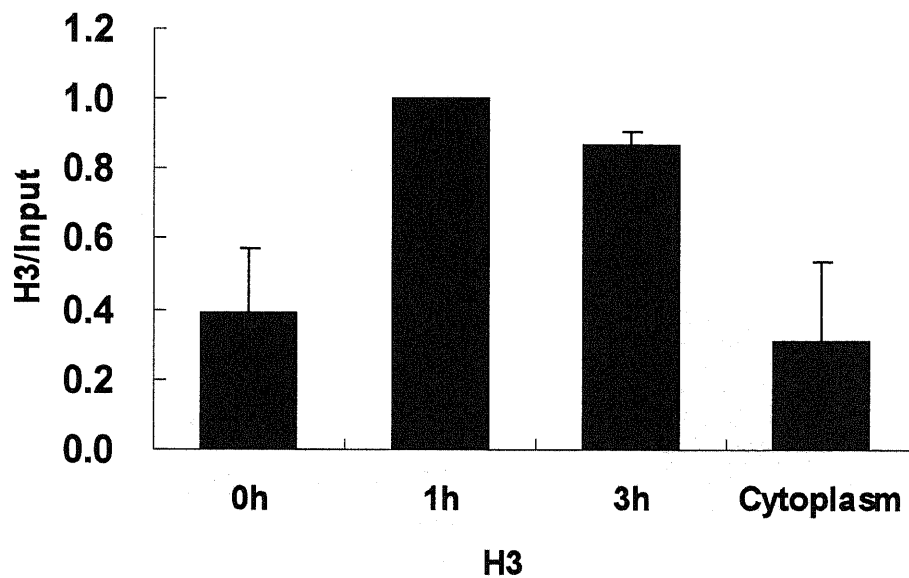


Fig. 5 FGOにおけるzp3プロモーターインジェクション後のクロマチン形成経時変化

zp3プロモーター領域のDNA断片をFGOの核内にインジェクション後、0 h、1 h、3 hで抗H3抗体または抗H4抗体を用いてChIPを行いリアルタイムPCRによって定量した。コントロールとして細胞質にDNAをインジェクション後1 hで同様にChIPを行った。実験はH3に関してそれぞれ3回、H4に関して2回行った。エラーバーは標準誤差を示す。

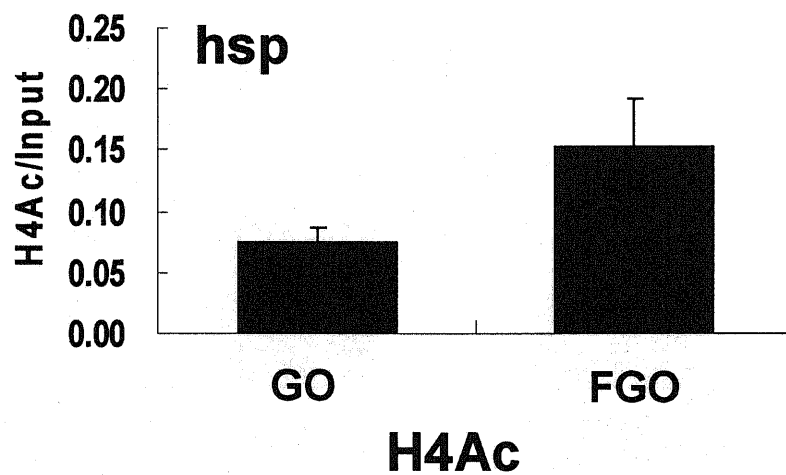
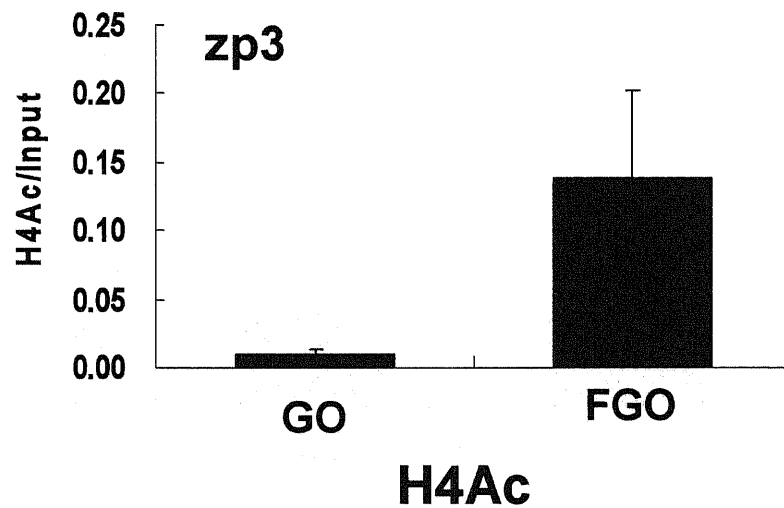


Fig.6 GOとFGOにおけるzp3プロモーターとhsp70プロモーターのH4Ac修飾の変化

GOとFGOの核内にzp3プロモーターDNAとhsp70プロモーターDNAをそれぞれインジェクション後、1hで抗H4Ac抗体を用いてChIPを行いリアルタイムPCRで定量することで修飾レベルを解析した。実験はそれぞれ3回ずつ行った。エラーバーは標準誤差を示す。

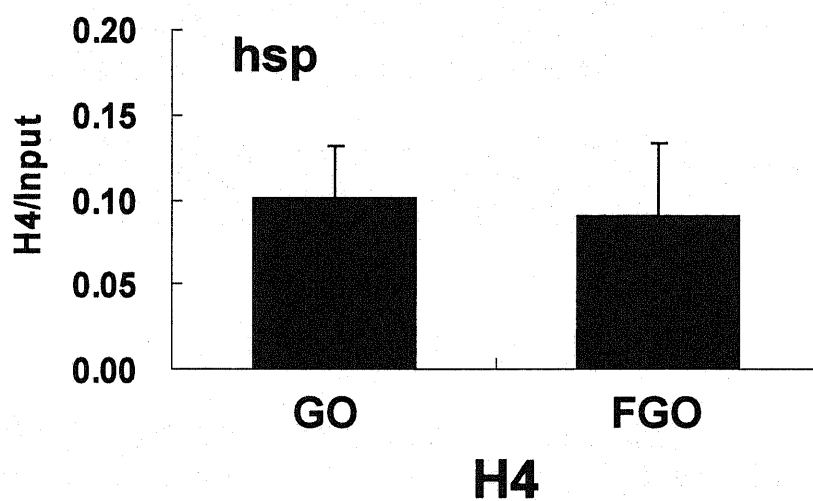
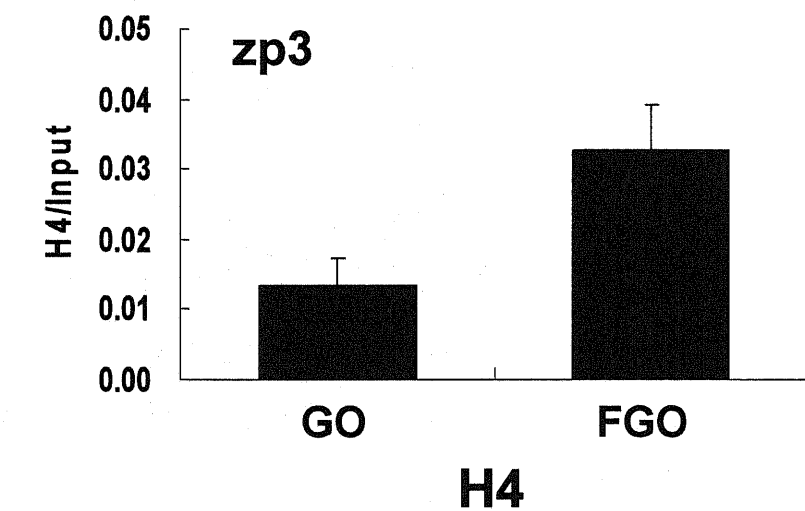


Fig.7 GOとFGOにおけるzp3プロモーターとhsp70プロモーターのH4との結合量の変化

GOとFGOの核内にzp3プロモーターDNAとhsp70プロモーターDNAをそれぞれインジェクション後、1hで抗H4抗体を用いてChIPを行いリアルタイムPCRで定量することでH4との結合量を解析した。実験はそれぞれ3回ずつ行った。エラーバーは標準誤差を示す。

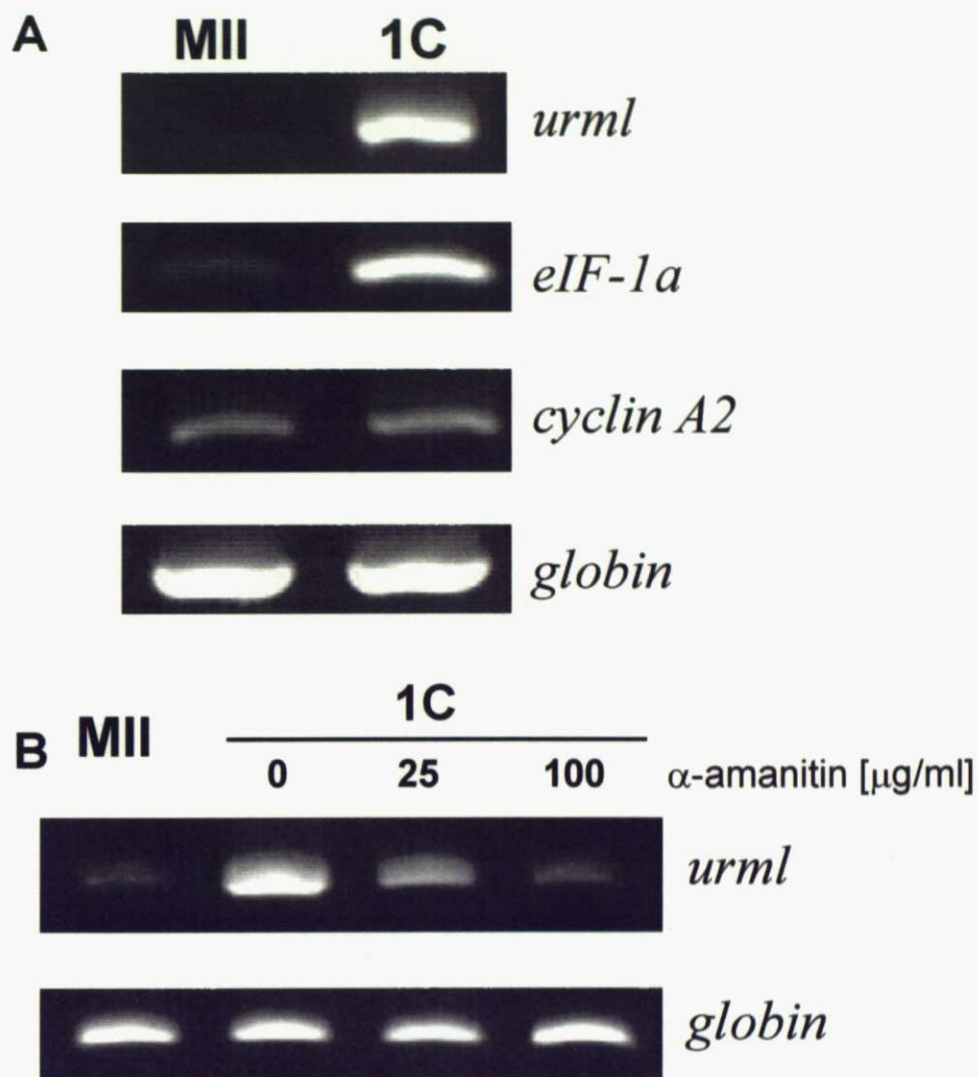


Fig.8 RT-PCRによる*urml*の検出

3週齢マウスから採取したMII oocyteと受精後14時間の1細胞期胚(1C)を用いRT-PCRによって*urml*、*eIF-1a*、*cyclin A2*の発現を解析した。また外部標準として加えたrabbit α -*globin*を検出した。

(A)MII卵と1細胞期における*urml*、*eIF-1a*、*cyclin A2*発現量の比較

(B)RNA polymeraseIIの阻害剤による*urml*の発現阻害

α -amanitinを受精後6時間で添加し、さらに8時間培養したときの*urml*発現量を解析した。25 $\mu\text{g/ml}$ では*urml*の発現が完全には阻害されなかったが100 $\mu\text{g/ml}$ でMIIと同程度まで阻害された。

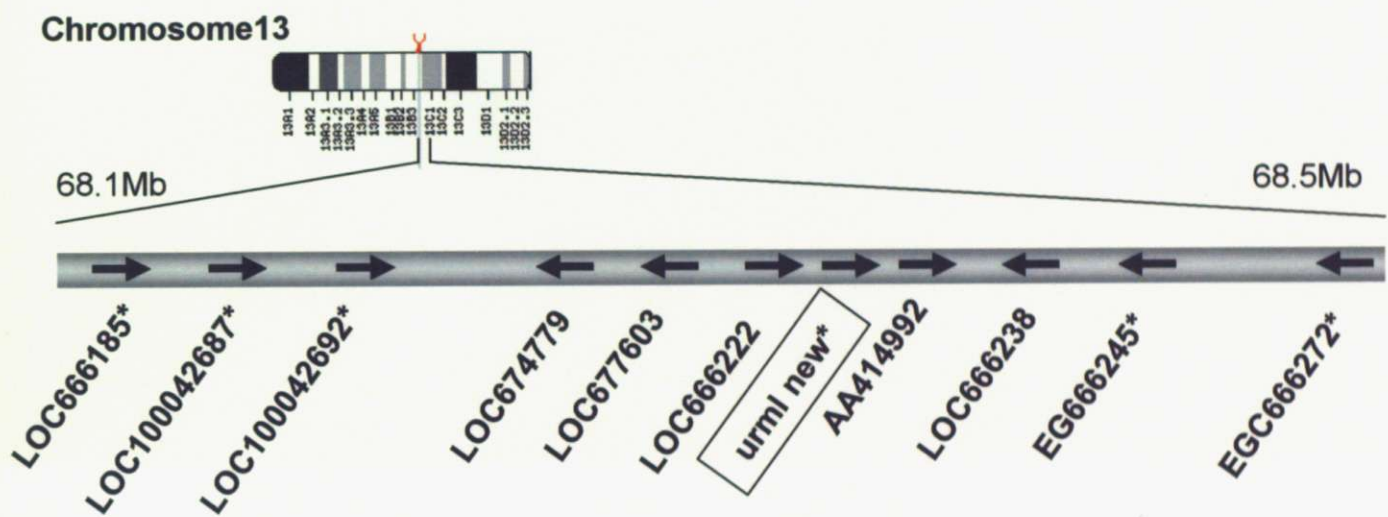


Fig. 9 *urml*バリエントの染色体上の配置

マウス13番染色体上の既知の*urml*バリエントの配置と1細胞期胚から得られたmRNAをシークエンスした結果特定された新規のバリエントの位置(*urml new*)を示す。*はシークエンスの結果と最も一致したバリエントを示す。

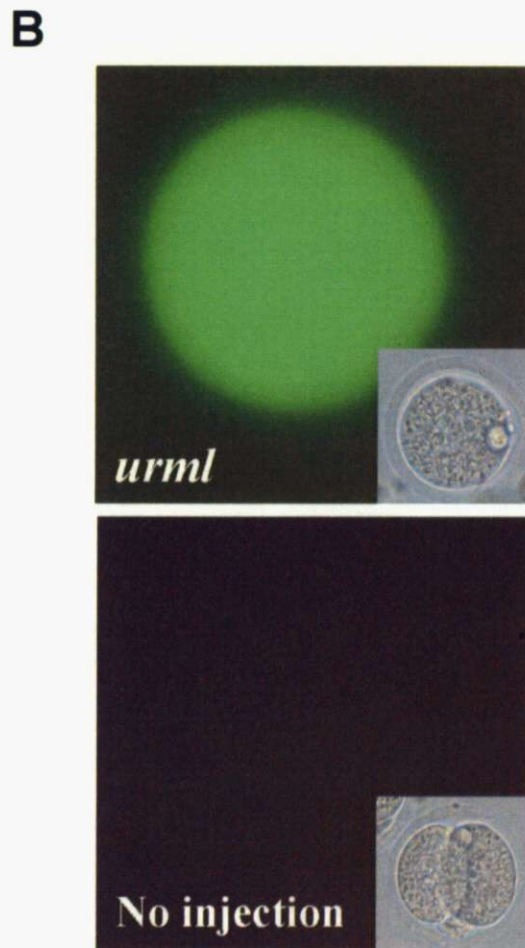
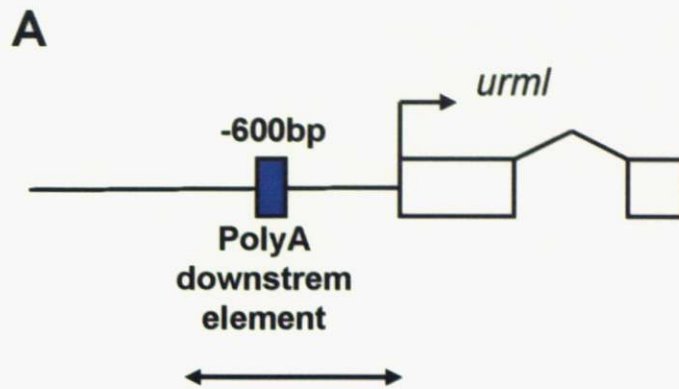


Fig. 10 *urml*プロモーター-EGFPプラスミド
の1細胞期へのインジェクション

(A) *urml*上流の転写因子結合領域の解析 (B) *urml*転写開始点上流650bpをEGFPにプロモーター領域として結合したプラスミドを作製し、受精後6時間の1細胞期前核にインジェクション後24時間で蛍光を観察した。