

## 論文の内容の要旨

論文題目      マウス 1 細胞期胚における遺伝子発現制御機構の解明

氏      名      山本 龍馬

### 【序論】

新たな生命が誕生する過程において、生殖細胞として最終分化を遂げた卵母細胞と精子は受精を経て分化全能性を有した 1 細胞期胚になる。マウスにおいて、最初の転写は 1 細胞期中期に行われる。1 細胞期の遺伝子発現は新たに誕生した生命の中で起こる遺伝子発現プログラムの始まりであり、次世代個体を形成する上で重要な過程である。しかしながら、この時期に発現する遺伝子はほとんど特定されておらず、遺伝子発現の制御機構はほとんど解明されていない。この原因として、1 細胞期は転写活性が低いために合成される mRNA 量が少ないこと、そして受精前に多量に蓄積された卵母細胞由来の母性 mRNA が受精後も存在しており、これが 1 細胞期に合成された少量の mRNA をマスクしてしまうことが挙げられる。母性 mRNA は、活発な転写活性を示す成長期卵において 10 日以上かけて合成され、以降の卵成長および受精後の初期胚発生に働く。一方で、1 細胞期胚由来の mRNA は、転写活性が低い受精後わずか数時間の間に合成されたものであり、両者を比較したとき母性 mRNA の方が圧倒的にその量が多いと考えられる。そのため、これまでに行われたマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析では、受精前後における発現量の差を検出することができず、1 細胞期胚で転写される遺伝子を同定することが困難であった。

本研究では、マイクロアレイよりも検出精度が高い次世代シーケンス (RNA-Seq) より得られたトランスクリプトームデータを基に、1 細胞期に転写される遺伝子を網羅的に特定する。そして、作成した遺伝子セットを基に、1 細胞期の遺伝子発現制御機構の解明を試みた。

### 【結果と考察】

#### 1. 1 細胞期に転写される遺伝子の同定

初めに、1 細胞期に転写される遺伝子を同定することを試みた。まず、1 細胞期に転写される遺伝子を、①母性 mRNA として転写されており且つ 1 細胞期胚でも転写される遺伝子、②母性 mRNA として転写されておらず 1 細胞期胚から転写され始める遺伝子の 2 種類に大別した。上述の通り、1 細胞期胚の転写活性は低いため、1 細胞期に作られる転写産物は大量の母性 mRNA

にマスクされてしまう。そのため、①に属する遺伝子の同定は困難であると考え、初めに②に該当する遺伝子の同定を試みた。具体的には、第二減数分裂中期に達した未受精卵（MII 期卵）および1細胞期胚を用いた RNA-Seq データから、MII 期卵でほとんど発現しておらず1細胞期胚で RPKM が 30 倍以上増加している遺伝子を選択し、23 個の候補遺伝子を得た。そして、RT-PCR を行うことで、得られた 23 遺伝子はすべて MII 期と比較して1細胞期で顕著な発現の増加が見られた（図1、例として3 遺伝子を示す）。

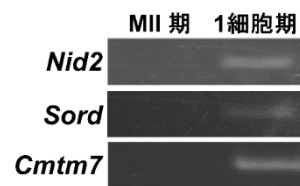


図1. RT-PCRによる候補遺伝子の発現解析

次に、RNA-Seq により遺伝子上のどの領域が読み取られているかを Genome studio を用いて確認したところ、1細胞期において、23 遺伝子はすべてエキソン領域だけでなくイントロン領域も一様に読まれていることが確認された（図2、例として *Sord* について示す）。これは、1細胞期につくられる転写産物がスプライシングを受けていない可能性を示唆している。

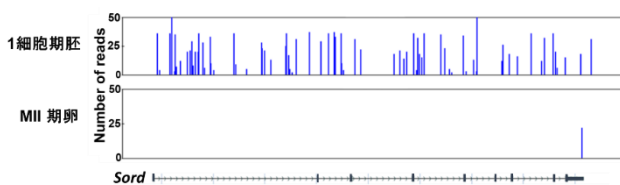


図2. 1細胞期に転写される遺伝子の発現状況

そこで、1細胞期において、どの程度の遺伝子がイントロン領域も読まれているかを確認するために、MII 期卵、1細胞期胚そして RNA ポリメラー

ゼ II の阻害剤である 5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosyl-benzimidazole (DRB) 処理により転写阻害を行った1細胞期胚において、全遺伝子におけるイントロンの RPKM 値の分布を比較した（図3）。その結果、MII 期卵ではイントロンの RPKM 値がほぼ 0 に近い値に遺伝子が集中していたのに対し、1細胞期胚ではそのピークが大きく正方向にシフトしていた。さらに、転写阻害を行った1細胞期胚では MII 期卵と同じ分布を示していた。したがって、1細胞期に転写

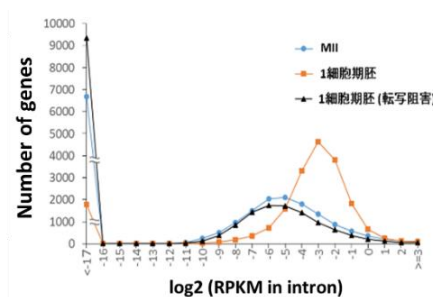


図3. 全遺伝子におけるイントロンの RPKM 値の分布

される遺伝子の多くは、その転写産物にイントロンを含むことが明らかとなった。そこで、1細胞期ではスプライシング機構が働いていないことを明らかにするために、ショウジョウバエ *ftz* 遺伝子の pre-mRNA を成長期卵、1細胞期胚そして2細胞期胚の核にそれぞれ顕微注入した。その結果、成長期卵および2細胞期胚では成熟 mRNA の位置に明瞭なバンドが現れたのに対し（図4下、レーン2, 4）、1細胞期胚ではほとんど現れなかった（図4下、レーン3）。よって、1細胞期胚ではスプライシング機構が十分に働かないことが明らかとなった。これにより、同定が困難であった①に属する遺伝子であっても、イントロンの発現量に注目することで母性 mRNA と1細胞期由来の転写産物を区別することが可能となった。そこで、1細胞期に転写される遺伝子を網羅的に同定するために、1細胞期胚においてイントロン上のリード数が

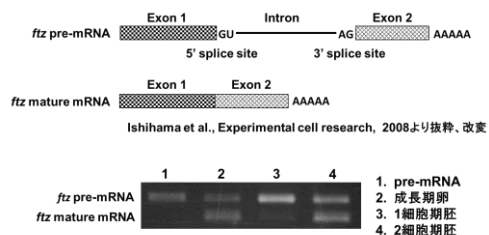


図4. 1細胞期胚におけるスプライシング活性の確認

10 リード以上存在し、かつ MII 期と比較して 1 細胞期でイントロンの RPKM 値が 3 倍以上増加している遺伝子を選択した。さらに、その中で MII 期と比較して DRB 処理により転写阻害を行った 1 細胞期胚ではイントロンの RPKM 値が 3 倍以上増加していない遺伝子を選択した結果、1 細胞期で転写される遺伝子として 4575 特定することができた。

## 2. 1 細胞期胚における遺伝子発現パターンの解析

細胞の遺伝子発現パターンは、細胞の種類・性質によって異なる。そして、個々の細胞で高発現している遺伝子は、その細胞の特徴となる性質の形成に大きく貢献している。したがって、本研究で同定した 1 細胞期に活発に転写される遺伝子集団を用いることで 1 細胞期胚の遺伝子発現パターンを特徴づけることができると考えた。そこで、1 細胞期胚で転写されている 4575 遺伝子から、特に高レベルに転写されている遺伝子集団として、1 細胞期胚においてイントロンの RPKM 値が高い上位 2000 遺伝子を選択した。そして、MII 期卵、1 細胞期胚以降の着床前

初期胚、そして複数の組織細胞のトランスクリプトームデータより同様にエキソンの RPKM 値が高い上位 2000 遺伝子を選択し、それぞれの遺伝子発現パターンを比較した。その結果、遺伝子発現パターンは大きく 3 つのクラスターに分類され、1 細胞期胚は独立して 1 つのクラスターを形成していた (図 5)。この結果より、1 細胞期胚における遺伝子発現パターンは、非常にユニークであると考えられる。即ち、他の種類の細胞では発現していない、もしくは発現量が低い遺伝子の多くが高発現していると考えられる。

これを確かめるために、1 細胞期胚を含む着床前初期胚間、または 1 細胞期胚および複数の組織細胞間において特異的に高発現している遺伝子の割合を比較した (図 6A)。その結果、1 細胞期胚を除く着床前初期胚および組織細胞では、特異的に高発現している遺伝子はすべて 30% 未満であった。一方で、1 細胞期胚では、その割合はおよそ 50% を占めていた。さらに、解析に用いた 80% 以上の細胞種で共通して高発現しているハウスキーピング遺伝子のリストを作成し、各細胞種におけるこれらの遺伝子の割合を比較した (図 6B)。

その結果、80% 以上の遺伝子が、2 細胞期胚以降の着床前初期胚および組織細胞において共通して発現していたのに対し、1 細胞期胚ではおよそ 30% のみであった。以上の結果をまとめると、1 細胞期胚では他の細胞では発現していない遺伝子の多くが高発現しており、他の種類の細胞では高発現しているハウスキーピング遺伝子の割合が低く、その結果ユニークな遺伝子発現パターンを形成していることが明らかとなった。

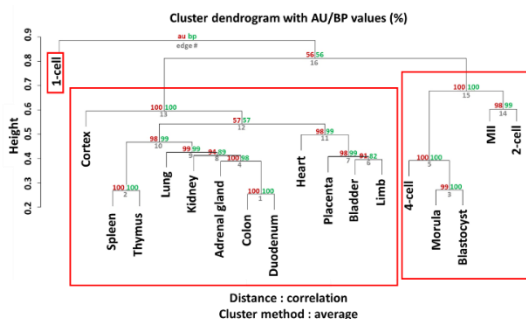


図5. 卵、着床前初期胚そして組織細胞における遺伝子発現パターンの分類

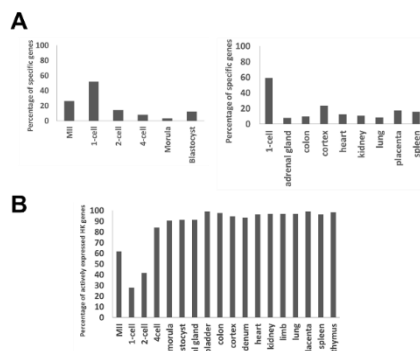


図6. (A) 1細胞期胚と受精前後または組織細胞間における特異的遺伝子の割合 (B) 80%以上の細胞種で高発現しているハウスキーピング遺伝子の割合

### 3. 1 細胞期に転写される遺伝子における転写制御領域の解析

1 細胞期に転写される遺伝子は、特異的に高発現している遺伝子の割合が他の種類の細胞より多く存在しており、その結果ユニークな遺伝子発現パターンを示していることが明らかとなった。そこで、プロモーター解析により、1 細胞期胚におけるユニークな遺伝子発現パターンを形成するために、特徴的な転写制御機構が働いているか確認を行った。はじめに、既知のプロモーターエレメントによる制御機構の特徴を見出すために、受精前後において、コアプロモーターエレメント (Inr, TATA-box) および近位プロモーターエレメント (CAAT-box, GC-box) をプロモーター領域に持つ遺伝子の割合を比較した。その結果、何れのエレメントにおいても、1 細胞期胚にのみ見られる目立った特徴は確認できず、他の細胞種と同じ割合で存在していた。

次に、1 細胞期胚に特徴的な新規プロモーターエレメントを探索するために、6 bp で作成可能な全パターンの配列を作成し k-mer 解析を行った。その結果、1 細胞期胚を含むすべての細胞種で共通して、G/C リッチなエレメントをプロモーターに持つ遺伝子が多く存在していた。さらに、1 細胞期胚では特異的に高発現している遺伝子が多く存在し、また他の種類の細胞では高発現しているハウスキーピング遺伝子の割合が低いことから、主に High-CpG Promoter (HCP) よりも Low-CpG Promoter (LCP) による制御機構が働いていると考えられる。そこで、受精前後において HCP および LCP を TSS 周辺領域にもつ遺伝子の割合を比較した。しかし、1 細胞期における HCP および LCP の割合は、他の細胞種と同様であった。以上の結果、1 細胞期胚において特徴的なエレメントは存在しない可能性が示された。

#### **【結論】**

本研究により、1 細胞期につくられた転写産物はスプライシングを受けないことが明らかとなり、イントロンの発現量に注目することで母性 mRNA と 1 細胞期由来の転写産物を区別することが可能となった。したがって、今まで特定することが困難であった 1 細胞期に転写される遺伝子を 4575 同定することに成功した。そして、1 細胞期胚の特徴として、特異的遺伝子が多く高発現しており、また他の種類の細胞では高発現しているハウスキーピング遺伝子の割合が低く、1 細胞期胚の遺伝子発現パターンは非常にユニークであることが明らかとなった。一方で、転写制御については 1 細胞期胚における特徴的なエレメントは存在しない可能性が示され、ゲノムワイドなクロマチン構造の違いなどが 1 細胞期の特異的な転写を引き起こす原因となっていることが考えられる。以上、本研究により、1 細胞期胚の遺伝子発現制御機構を解明するための重要な知見を得ることができたと考えられる。