

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

Function and regulation of minor zygotic gene activation in mouse embryos (受精後における最初期の遺伝子発現の機能および制御機構の解明)

氏名 阿部 健一郎

### 序論

生命は受精卵というたった一つの細胞から始まり、遺伝子発現プログラムに従って各発生段階で細胞ごとに適切な遺伝子発現を行うことで細胞分裂・分化を進行させていく。哺乳類においては生命誕生後ごく初期の遺伝子発現は **zygotic gene activation (ZGA)** と呼ばれており、マウスにおいては1細胞期のDNA複製期頃から2細胞期のDNA複製期前の間に **minor ZGA** が起こり、続いて2細胞期のDNA複製期を経ると **minor ZGA** とは異なる遺伝子発現パターンを持つ **major ZGA** へと切り替わる。従って遺伝子発現プログラムのスタート、すなわち生命誕生後最初期の遺伝子発現は **minor ZGA** により生じることから、この現象は胚発生において非常に重要なものであると考えられる。しかしながら **minor ZGA** の生物学的な重要性はこれまでに証明されておらず、またこの時期に転写される遺伝子あるいは非遺伝子領域や転写制御機構は殆ど明らかにされていない。そこで本研究は可逆的な転写阻害剤である **5,6-dichloro-1-β-ribofuranosyl-benzimidazole (DRB)** を用いて **minor ZGA** を阻害し、その生物学的な役割を明らかにするとともに、次世代シーケンサー (**RNA-seq**) を用いたトランスクリプトーム解析により、この時期に転写される領域とその制御機構の解明を試みた。

## 結果・考察

### 1. minor ZGA の機能解析

#### minor ZGA の阻害の胚発生に与える影響

minor ZGA の生物学的な役割を明らかにするために、可逆的な転写阻害剤である DRB により minor ZGA のみを抑制し、その際の胚発生に与える影響を検証した。1 細胞期の G1 期から 2 細胞期の DNA 複製期前までの間(16 時間)、DRB 存在下で培養し、DRB を除去した後の発生を観察した。するとコントロールの DMSO 未処理群では 90%以上が受精後 96 時間で胚盤胞に到達したのに対し、DRB 処理群では 60%以上の胚が 2 細胞期で発生が停止しており、胚盤胞に到達した胚はほとんど見られなかった(図 1)。しかし一方で長時間に渡って DRB を作用させたことにより、転写阻害以外の何らかの副作用によって細胞傷害が起こり、胚発生に悪影響が生じた可能性もある。そこで minor ZGA 阻害時と同等の時間(16 時間)、2 細胞期中頃から 4 細胞期にかけて(major ZGA の時期に相当)DRB 処理により転写を阻害し、DRB 除去後の胚発生を観察した。

すると受精後 96 時間では、2 細胞期で胚発生が停止した胚はほとんど見られず、約 30%も胚盤胞に到達しており、その他の胚も minor ZGA 阻害時と比べて発生が進行していた。この結果より、適切な時期に minor ZGA が起こることがその後の発生に必須であり、さらに一時的な阻害時に見られる影響は major ZGA よりもむしろ minor ZGA の方が大きいことが示された。

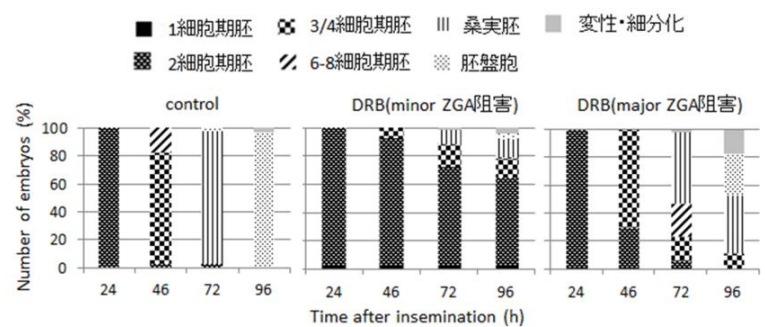


図1. DRBによる胚発生への影響

#### minor ZGA の阻害が及ぼす major ZGA への影響

着床前の初期発生過程では遺伝子発現パターンがダイナミックに変化していく。これは各ステージの遺伝子発現が適切に行われることで、次のステージの遺伝子発現が然るべきタイミングで適切に生じているものと考えられる。従って minor ZGA は後に続く major ZGA を正常に引き越す役割があると予測される。すなわち minor ZGA の抑制により胚発生が阻害された原因の一つとして、minor ZGA を DRB 処理で抑制することにより、その後 DRB を取り除いても適切な時期に minor ZGA が起こらず

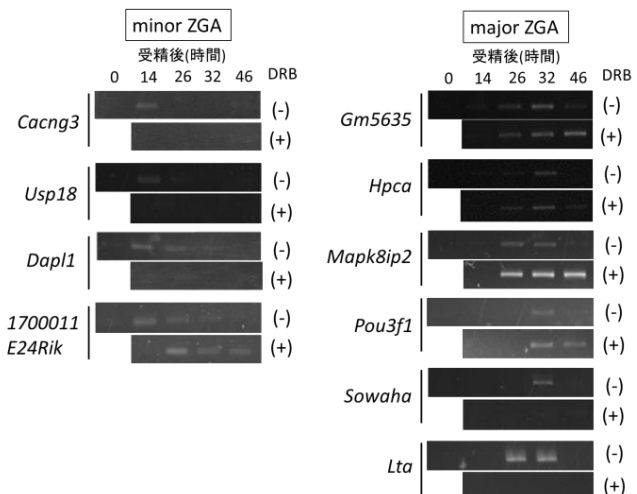


図2. minor ZGA の阻害による遺伝子発現パターンへの影響

に、major ZGA に異常が生じたことが考えられる。この仮説を検証するために、RT-PCR により DRB 処理後の胚における minor ZGA および major ZGA 遺伝子の発現を調べた。minor ZGA 遺伝子として 1 細胞期胚(受精後 14 時間)で高発現し、かつ未受精卵(受精後 0 時間)と 2 細胞期胚(受精後 32 時間)、4 細胞期胚(受精後 46 時間)では低い発現量を示すものを選択し、major ZGA 遺伝子としては 2 細胞期胚で高発現しており、かつ未受精卵、1 細胞期胚、4 細胞期胚で発現量が低いものを調べた。すなわち、それぞれ minor および major ZGA の時期でのみ活発な転

写が起こっている遺伝子を対象とした。その結果、DRB 処理後の胚では minor ZGA 遺伝子の多く(4 個中 3 個)が DRB 除去後も発現が見られることはなかった。その一方で、major ZGA 遺伝子は 6 個中 4 個が DRB 処理後の 2 細胞期胚(受精後 26, 32 時間)においてもコントロール群と同様に発現が見られたものの、*Lta*, *Sowaha* の 2 つの遺伝子は発現が見られなかった。(図 2)。すなわちこの結果は、一旦抑制された minor ZGA が遅れて発現することはなく、これにより一部の major ZGA 遺伝子の発現が起こらなかったことを示唆している。以上より、minor ZGA は時期特異的に発現しており、major ZGA を引き起こす役割があることが明らかになった。

## 2. minor ZGA における転写制御機構

### 1 細胞期胚におけるトランスクリプトーム解析

minor ZGA は初期発生に重要な役割を果たすことを示したが、その制御機構は不明である。そこで RNA-seq により minor ZGA で転写される領域を網羅的に解析し、それらの領域の特徴から転写制御機構を明らかにすることを試みた。まず RNA-seq により読まれた領域をゲノムブラウザ上で概観したところ、1 細胞期胚では未受精卵と比較して非遺伝子領域が顕著に転写されている傾向が見られた(図 3A)。そこで、未受精卵および他のステージの胚において発現が見られた非遺伝子領域の数を比較したところ、受精前と比較して受精直後の 1 細胞期胚ではその数が大幅に増加するが、発生を経る過程で徐々に減少していくことが明らかになった(図 3B)。従って minor ZGA では数多くの非遺伝子領域を転写するという、特殊な転写制御機構が働いていることが示された。

これまでの研究から minor ZGA は 2 細胞期の DNA 複製期を経ることで凝集したクロマチン構造へと変化し、major ZGA へと切り替わることが知られている。すなわち、1 細胞期から 2 細胞期の G1 期までは緩んだクロマチン構造を形成しているためにゲノム上の多数の領域が転写されるが、2 細胞期の DNA 複製期以降は凝集したクロマチン構造へと変化することにより非遺伝子領域の転写が抑制されるものと考えられる。この仮説を検証するために、DNA 複製阻害剤である Aphidicolin により 2 細胞期の DNA 複製を阻害し、非遺伝子領域の転写に対する影響を RNA-seq により解析した。すると 2 細胞期胚で 1 細胞期胚と同程度に非遺伝子領域が活発に転写されるようになった(図 3C)。この結果により、非遺伝子領域における転写は 2 細胞期の DNA 複製期の際に生じるクロマチンの凝集によって抑制されることが示唆された。

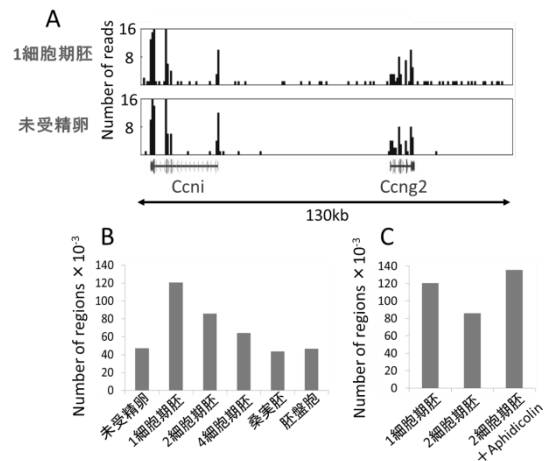


図3. (A) 非遺伝子領域における発現状況 (B) 発生過程において発現が見られた非遺伝子領域の数 (C) Aphidicolin処理による非遺伝子領域の転写に対する影響

## minor ZGA における非遺伝子領域の転写制御機構

1細胞期胚において転写される非遺伝子領域の転写制御機構を明らかにするために、発現が見られた領域の周囲の塩基配列を解析した。これまでに当研究室において、1細胞期胚ではコアプロモーター配列が無くともグアニンやシトシンを多く含んでいればプロモーターとして機能することを示唆する結果が得られている。そこでGやCが豊富に含まれている非遺伝子領域(G/C含量が60%以上)の上流および下流において転写が見られるかどうかを調べた。まず転写されており、なおかつ上流・下流にG/C-rich領域を持つ非遺伝子領域の数をカウントした。次にそれらの数を図3で求めた非遺伝子領域の数で割ることにより、転写されている非遺伝子領域の中で周囲にG/C-rich領域を持つものの割合を求めた。すると1細胞期胚において最も高い30%近くを示し、発生を経る過程でその割合は徐々に減少していくことが明らかになった(図4)。この結果より、minor ZGAではゲノム上の至る所に存在するG/C-rich領域がプロモーターとして機能することにより、非遺伝子領域が活発に転写されていることが示唆された。

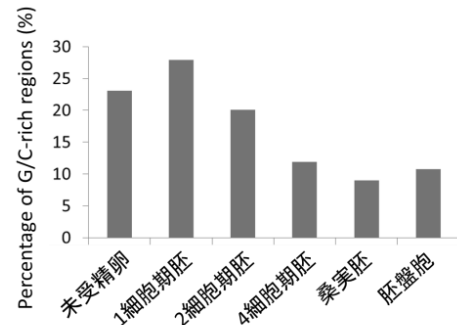


図4. 周囲1 kbにG/C-rich領域を持つ転写されている非遺伝子領域の割合

また minor ZGA においては通常の細胞では活性を持たない領域がプロモーターとして機能することから、本来は必須となる転写因子が十分に結合せずに不安定な転写機構が働いているために、転写開始点が正確に定まっていない可能性が考えられた。この仮説を検証するために、RNA-seqのデータを用いて転写されている遺伝子領域の1 kb当たりの発現量に対する上流1 kbにおける発現量を算出した。すると1細胞期胚では遺伝子領域に対しておよそ120%の発現量が見られ、他のステージの細胞と比較して高い割合で遺伝子上流領域が転写されていることが明らかになった(図5)。この結果により、minor ZGAにおいては転写開始点が厳密に定められていない、不完全な転写制御機構が働いていることが示唆された。

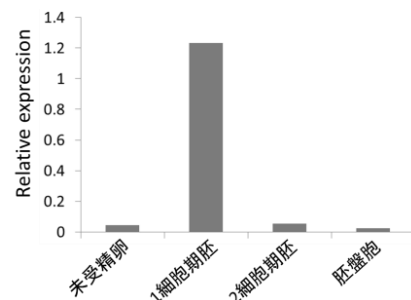


図5. 遺伝子領域に対する転写開始点上流1 kbの発現量

## 結論

本研究により minor ZGA は major ZGA の発現を引き起こすことにより初期発生における遺伝子発現プログラムを適切に保つという、胚発生に必須の役割を持つことが明らかにされた。また RNA-seq を用いた解析により、minor ZGA では厳密な転写制御機構が働いておらず、非遺伝子の様々な領域が転写されていることが示された。さらにこの転写は、緩んだクロマチン構造が形成されているために、本来は機能しないG/Cを豊富に含む領域がプロモーターとして働くことにより引き起こされることが示唆された。

minor ZGA は胚発生過程における最初期の遺伝子発現であることから非常に興味深い現象であるにも関わらず、その生物学的な重要性を示す知見は全く得られておらず、その制御機構についても多くの謎が残されていた。本研究は minor ZGA の生物学的な役割とその制御機構の特殊性を明らかにした最初の報告であり、生命誕生後の遺伝子発現プログラムの調節機構を解明していく上で有用な知見となるものと考えられる。