

学 位 論 文

マウス卵減数分裂に関与する因子の同定と その制御機構・機能の解明

鈴木 元

要旨

減数分裂は配偶子形成の為に行われる特徴的な細胞分裂機構であり、体細胞分裂とは異なる特徴的な性質を数多く有している。またその機構においては染色体の組換えがおこることで生物に遺伝的多様性がもたらされるなど、生命にとって非常に重要な意義を持った現象であることから、これまでに多くの研究が報告されてきた。しかしながらその一方で未だに詳細が明らかとされていない点も数多く残されている。そこで、本研究では減数分裂が起こる時期の転写活性を持たない卵細胞内に安定的に蓄積された母性 mRNA の中から減数分裂に関与する新たな因子を同定し、その発現制御機構および機能についての解析を行うことを目的として研究を行った。

第1章では減数分裂に関与するタンパク質をコードした母性mRNAが持つと予想される遺伝子発現における特徴に着目し、本研究室において行われた成熟卵及び1細胞期胚におけるRNA-sequenceデータを用いた候補遺伝子の絞り込みを行った。卵形成期に行われ受精後ただちに終了する減数分裂に関与する因子をコードする母性 mRNA は (1)体細胞分裂が開始される1細胞期に速やかに分解される (2)卵特異的に発現する の2つの特徴を有していることが予想された。そこでこの基準に沿って候補遺伝子の絞り込みを行った結果、最終的に卵特異的に発現する4つの遺伝子を得ることができた。さらにそのうちの2つ、*Fbxw13*と*Fbxw18*はアミノ酸配列のよく似た13個の遺伝子とともに第9染色体上にクラスターを形成している遺伝子であった。そこでこのクラスターに属する全15遺伝子の組織、卵及び初期胚におけるmRNA発現パターンを解析した結果、全ての遺伝子が卵において高発現し、そのmRNAは受精後速や

かに分解されていることが明らかとなった。そこで、このクラスターに属する遺伝子を本研究の解析対象とすることとした。

第 2 章においては *Fbxw* クラスターが卵において発現する機構を明らかにするために、クラスターに属する遺伝子のひとつである *Fbxw12* について、成長期卵および 2 細胞期胚において reporter gene assay を行った。その結果、*Fbxw12* 遺伝子の転写開始点上流 1 Kb の領域は成長期卵でのみ転写活性を持つことが明らかとなった。さらに *Fbxw* クラスター遺伝子の発現に働く配列を特定するため、クラスターに属する全遺伝子の転写開始点上流配列における転写因子結合配列予測を行った結果、クラスターに属するすべての遺伝子が *Aml-1*、*Hsf-1/-2* と *Pbx-1* の結合配列もしくはその 2 塩基以内の変異を含む配列を共通して持つことが明らかとなり、さらにその変異導入実験より *Hsf-1/-2*、*Pbx-1* 結合配列が *Fbxw12* の卵における転写活性に重要であることを明らかとした。また転写因子強制発現実験の結果、*Fbxw12* の卵における転写には *Hsf-2* と *Pbx-1* が重要であることが示唆された。

最後の第 3 章では *Fbxw* クラスター遺伝子が持つ機能について解析を行った。相同性の高いアミノ酸配列を持つ *Fbxw* クラスター全遺伝子を標的とする siRNA を設計し、成長期卵に顕微注入した後に 12 日間体外で培養することで、卵形成期における *Fbxw* クラスター遺伝子の同時発現抑制を行った。その結果 *Fbxw* クラスター遺伝子の発現を抑制した卵において卵核胞崩壊は正常に起こり、その後の紡錘体形成にも異常が見られなかったものの、それに引き続いておこる第一極体の放出が見られないことが明らかになった。そこでこの原因を明らかにするために減数分裂の進行に重要な MPF の活性制御に着目して解析を行った。その結果、*Fbxw* クラスター遺伝子の発現を抑制した卵においては、第一減数分裂進行時における MPF 活性の上昇は正常に

起こるものの、第一極体放出に必要な MPF 活性の低下が起こらないことが明らかとなった。これらの結果より *Fbxw* クラスター遺伝子の発現を抑制した卵母細胞中では *Cyclin B* の分解による MPF 不活性化が起こらず、MPF 活性制御異常が生じている可能性が示された。

以上の結果より、本研究では卵特異的に発現、機能する遺伝子の探索を目的として新しい着想による候補遺伝子の探索を行い、複数の卵特異的因子を同定することに成功した。また得られた候補遺伝子のうち今回解析の対象とした *Fbxw* 遺伝子について、その発現制御機構と減数分裂における機能を示唆する結果を得ることができた。本研究は減数分裂で機能する遺伝子探索の新たなモデルケースであると同時に、これまで卵特異的クラスターであることが示唆されながらその実体が長年に渡り明らかにされてこなかった *Fbxw* クラスター遺伝子について新たな知見を与えた研究である。

緒言

生殖とは自らの遺伝子を次世代へ引き継ぐための行為であり、様々な生物においてその種の保存のために必要不可欠な生命現象である。この生殖には無性・有性の2つの異なる方法が存在し、そのうち有性生殖は雌雄の異なる性を持つ個体において形成される生殖細胞である配偶子が接合することで行われる。この配偶子形成の際に行われる細胞分裂機構が減数分裂である。

減数分裂は他の細胞が行う体細胞分裂と比較して数多くの特徴を持つことが知られている。例えば、繊維芽細胞における体細胞分裂は約 20 時間程度で周期が終了するが (Schiff et al., 1980)、マウス卵での減数分裂は、受精後 12.5 日頃の胎児卵巣中で開始された後、出生後約 4 週を経て性的に成熟し、卵母細胞が受精し 1 細胞期胚となるまで、細胞周期の停止と再開を繰り返しながら長期間をかけて完遂される。またこの間、減数分裂期の卵細胞内には DNA 複製により倍加された相同染色体が存在し、これが対合することで体細胞分裂では見られない二価染色体が形成される。さらにこの時に染色体間で組換え・交叉が起こることで新たな遺伝子の組み合わせを持つ染色体が構成され、結果として生物に遺伝的多様性が生じる (Clift et al., 2013)。このように特徴的な細胞分裂様式である減数分裂では体細胞分裂と異なる制御機構についての研究が活発に行われており、数多くの結果が報告されている。例えば、そのうちの 1 つに、MPF 活性の制御機構が挙げられる。体細胞における分裂期 (M 期) への移行制御に重要な因子に M-phase Promoting Factor (MPF) があり、この MPF により様々な M 期の調整因子がリン酸化を受けることで M 期が進行してゆく。その後、分裂

が終了した細胞中では MPF を構成する因子のうち CYCLIN B が分解されることで M 期が終了し、G1 期へ移行する。一方で減数分裂が長期間に渡って起こるマウス卵においては、第一減数分裂前期で停止した状態の卵母細胞中へ gap junction を介して結合した顆粒膜/卵丘細胞から cyclic Adenosine 3',5'-monophosphate; cAMP が供給されることによって MPF が不活性状態となり、細胞周期が停止した状態が維持されていることが知られている (Adhikari et al, 2014)。また、ホルモン刺激により再開された第一減数分裂が終了し第一極体が放出された後の卵では、c-MOS とその下流に存在する MAP kinase 経路の働きによって CYCLIN B の分解抑制が起こり、その結果再び細胞周期が停止することが知られている (Sagata et al., 1989, 1997、Hashimoto 1994)。

このようにマウス卵での減数分裂においてその制御機構が明らかとなっている現象がある一方で、未だにその詳細が明らかにされていないものも数多く存在している。例えば、MPF の構成因子である CYCLIN B の翻訳をその mRNA 3'末端への結合を介した機構により制御している Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein (CPEB) は、ubiquitin proteasome pathway により時期特異的に分解を受けることが知られている (Flemr 2010)。しかしながら、この分解に関わる因子は未だ同定されていない。この他にも、染色体と紡錘体の正常な形成を保証し、染色体分裂を制御する spindle Assembly checkpoint (SAC) のマウス卵減数分裂における詳細な分子メカニズムや体細胞分裂では知られている MPF 活性制御への関与など、マウス卵における減数分裂の制御機構には未解明の点が数多く存在している。これらの解明は生殖という生命創造の理解に欠くことの出来ない重要な知見であり、その解明が待たれている。

ある現象の詳細な機構の解明を試みる場合、まず初めに行われるのはその現象に関与する可能性を持った因子の同定である。その際、例えば体細胞を用いた研究を行う場合、研究対象とした現象に関与していることが既に知られている因子と相互作用する新たな因子を酵母 two hybrid 法や LC MS/MS などにより同定する手法がよく用いられる。しかしながら、卵を用いた研究では 1 匹当たりのマウスから採取可能な卵の数が限られるため、実験に使用することができる RNA やタンパク質の量にも大きな制限があり、このような実験手法を用いた解析が困難である。そこで、本研究では減数分裂調節機構における特定の現象に着目してその調節に関わる因子の探索を行うのではなく、減数分裂に関与する可能性を持った遺伝子を網羅的に探索し、得られた候補遺伝子の中から実際に減数分裂に関与する因子を特定してその機能解析を行う方法を考えた。マウス卵における減数分裂は、胎児卵巣中の卵で始まり受精直後の 1 細胞期に終了する。さらに減数分裂が終了した 1 細胞期胚ではその数時間後に体細胞分裂が開始されることから、減数分裂機構特異的に機能する因子は体細胞分裂開始時までにはその発現が抑制される必要があると考えられる。これらのことから、マウス卵における減数分裂機構に関与する因子は卵において高発現し、受精後は速やかに分解されることが予想される。そこで、本研究では卵および 1 細胞期胚におけるトランスクリプトーム解析の結果を用いてこの条件に合致する遺伝子を探索することで減数分裂に関与する因子を同定し、その機能と発現調節機構を明らかにすることを試みた。

第一章

減数分裂特異的に発現する遺伝子の探索

緒言

マウス卵における減数分裂は受精後 12.5 日の雌マウス胎児卵巣中で開始され、受精直後まで継続する (Clift 2013)。この時期の卵及び初期胚が行う転写に着目すると、出生後のマウス卵巣中に存在する成長期卵は卵成長のために活発な遺伝子発現を行っているものの成長を終えた卵では転写は停止し、以後、受精後数時間を経た 1 細胞期中期頃まで遺伝子発現を行っていないことが明らかとなっている (Moore 1974)。このことから、この転写静止期に行われる減数分裂の再開と停止、またこれに伴って起こる極体放出等の細胞周期の制御は、卵成長中に蓄積された母性 mRNA から翻訳されたタンパク質によってなされているものと考えられる (Stern 1972, Bermseok 2000, Piccioni 2005, Meijer 2007)。実際に、これまでの研究により、この時期の卵に母性 mRNA として蓄積され、減数分裂に特有の機能を有している遺伝子が数多く報告されている。例えば c-MOS は第一減数分裂を終了した卵中で MAP kinase 経路を活性化させることで MPF を活性化し、卵を第二減数分裂中期で再停止させる働きを持つタンパク質リン酸化酵素であるが、この mRNA は卵細胞質中に蓄積されており、減数分裂再開後にタンパク質への翻訳が始まることが知られている (Paules 1989)。他にも卵母細胞に特徴的な核小体様構造の構成因子である *Npm2* (Vitale 2007)、また卵において Ras シグナル経路への関与が示唆されている *Oog1* (Minami 2003) など、多くの遺伝子が報告されている。

卵成長中安定な状態で維持されているこれらの遺伝子の mRNA も、卵形成の進行及び受精に伴い、その後に転写される胚性遺伝子との置換に向けて減少を始める。

卵に蓄積された RNA の分解は第一減数分裂の再開時に始まり、2 細胞期中期頃にかけて主に起こるといわれており、ある研究では減数分裂再開後 1 細胞後期までに約 30%、さらに受精後 2 細胞期までに約 70%の RNA が減少すると報告されている (Piko 1982, Bachvarova 1985)。つまり、卵成長中に蓄積された RNA 全体で見ると約 7 割の因子が受精後の 1 細胞期胚でも存在し、さらにそのうち 3 割が 2 細胞期にも存在するという、非常に緩やかな分解が起きていることがわかる。しかしながら個別の遺伝子に着目した解析の結果から、その減少傾向はすべての遺伝子において一様ではないことが明らかにされている。例えば先に述べた減数分裂に関与する *c-Mos* の mRNA は、ハウスキーピング遺伝子の 1 つである *Hprt* や 1 細胞期胚で機能する *Cyclin A2* の mRNA と比較すると、受精後に非常に早い速度で分解されることが明らかとなっている (Zohreh 2005)。この事実は、卵内に蓄積された mRNA はそれぞれがコードする因子の機能が要求される時期に応じて、異なる機構による分解を受けている可能性を示している。

この事実を鑑みると、本研究において対象とする減数分裂は卵形成時に行われ受精後直ちに終了する現象であるため、この機構に関与する因子は卵において発現した後に急激な分解を受け、受精後の 1 細胞期胚における発現は減少しているのではないかと考えられる。そこで本研究では、卵および初期胚におけるトランスクリプトーム解析結果を用いて、減数分裂に関与する因子を網羅的に同定することを考えた。すなわち、当研究室において行った卵及び 1 細胞期胚における RNA-sequence (RNA-seq) 解析の結果を用い、減数分裂が行われる卵において高発現し受精後は速やかに分解される母性 mRNA を探索し、さらに、データベース検索と逆転写 PCR によって卵特異的な発現を示すものを選択することで、減数分裂に関与する因子の

同定を試みた。

結果

解析候補遺伝子の探索

本研究ではまず初めに、マウス卵において減数分裂に関与する新たな因子の同定を試みた。減数分裂は配偶子形成時にのみ行われる特殊な細胞分裂であるため、卵での減数分裂に関与する因子もその遺伝子発現において特徴的な性質を持つことが予想される。そこで、候補遺伝子が持つ特徴として以下2つを仮定した。1つ目は、1) 減数分裂機構に関与する因子は受精前の卵において高発現し受精後速やかに分解されることである。受精前、成長を終えた成長卵 (FGO) は転写を停止し、この状態が受精後の1細胞期胚中期頃まで継続することが知られている (Moore et al., 1974)。そのため、受精前後の時期に起こる現象は卵細胞中に安定的に蓄積された母性 mRNA から翻訳された因子によって引き起こされることが知られている (Bermseok et al., 2000, Piccioni et al., 2005, Meijer et al., 2007, Stern et al., 1972)。これらの因子をコードする母性 mRNA は減数分裂の再開および受精を契機として緩やかに分解され始めるが、受精後に全体量として1細胞後期でその約70%、2細胞後期でも約30%が残存していることが報告されている (Piko et al., 1982, Bachvarova et al., 1985)。一方で、転写活性を持たない成長卵において起こる減数分裂に関与する因子をコードする母性 mRNA も受精前は卵細胞中に蓄積されていると考えられるが、減数分裂は受精後直ちに終了するため、他の母性 mRNA と比べて、受精後、より速やかに分解されるのではないかと考えた (図 I -1)。なぜならば、もし、このような因子が受精後も

多く残存していれば、受精後速やかに開始される体細胞分裂周期に悪影響を及ぼすことが想定されるからである。次に2つ目の特徴として2) 卵での減数分裂で働く因子は他の細胞では発現せず、卵特異的に発現しているのではないかと考えた。これは減数分裂が生殖細胞形成時にのみ起こる特殊な分裂様式であるためである。そこで、これらの特徴に合致する遺伝子を網羅的に探索するため、当研究室で行った RNA-sequence (RNA-seq) による成熟卵 (MII) および1細胞期胚 (1-cell) におけるトランスクリプトーム解析結果を用いて候補遺伝子の探索を行った (図 I -2 A)。まず初めに MII における RNA-seq の結果与えられた 18,921 個の遺伝子のうち発現量の指標となる Read per kilobase of exon model per million mapped read ; Rpkm が極端に低い遺伝子 (MII Rpkm <1.0) を除去した 13,722 個の遺伝子について、受精後の 1-cell における発現量が MII の 1/3 以下となる ($Rpkm_{1-cell/M2} \leq 0.3$) ものを選択した結果、344 遺伝子に絞り込むことができた (表 1)。次にこれらの遺伝子のうち卵特異的に発現するものを選択するため、UCSC Genome Bioinformatics に掲載された体組織における各遺伝子の Micro Array データを参照し、卵を含む卵巣で特異的に発現していると思われる 50 の候補遺伝子を得た (表 2)。得られた 50 個の遺伝子の中には *Zp* ファミリー-遺伝子や *Gdf9* といった、卵特異的に発現し機能を有していることが既に明らかとされている遺伝子が含まれていたため、これら 4 遺伝子を除いた 46 遺伝子について表 2 に記載したプライマーを設計し、卵・初期胚、各体組織 (脳、胸腺、肺、心臓、肝臓、腎臓、卵巣、精巣) および ES 細胞 (CGR8) における発現解析を RT-PCR により行った (図 I -2 B)。その結果 *Astacin-like metalloendopeptidase (Ast1)*、*NLR family, pyrin domain containing 2 (Nlrp2)*、*F-box*

and WD domain protein 13 (Fbxw13) そして *Fbxw18* の 4 つの卵特異的発現を示す遺伝子を同定することに成功した (図 I -3 A)。さらに、得られた 4 因子の受精前後における発現を Real-time PCR により詳細に解析した結果、4 遺伝子はいずれも受精によりその発現量が半分以下に減少し、2 細胞期胚ではほとんど発現がみられないことが明らかとなった (図 I -3 B)。

Fbxw クラスタ遺伝子の発現解析

減数分裂関連候補遺伝子の探索を行った結果得られた 4 つの因子のうち *Fbxw13* と *Fbxw18* は同じ遺伝子 family に属する遺伝子であり、またそのコード領域配列は塩基配列では 73%、アミノ酸配列でも 71%の相同性を有していた (データ非掲載)。さらに文献を検索した結果、*Fbxw* ファミリー遺伝子に属する 25 個の遺伝子のうち *Fbxw12-28* (17、20 を除く) までの 15 個の遺伝子が第 9 染色体上においてクラスターを形成しており (Paillisson et al., 2005)、これらの遺伝子がコードするアミノ酸配列は 60-80%の配列相同性を有していることが報告されているものの (Chesnaye et al., 2008)、クラスターに含まれる遺伝子の発現や機能は未知であった。そこで、*Fbxw* クラスタに属する他の遺伝子について、その発現解析を行った。表 3 に記載したプライマーを用いて体組織及び細胞株における発現を RT-PCR により解析した結果、クラスターに含まれない *Fbxw* 遺伝子は多くの組織、細胞株において発現し、その発現パターンも様々であったのに対して、クラスター遺伝子はその一部が精巣での発現も見られたものの、大部分が卵巣特異的に発現していることが明らかとなった (図 I -4 A、B)。さらに受精前後の卵・初期胚におけるクラスター遺伝子の発現を解析した結果、全ての遺伝子が卵において高発現し受精後は速やかに分解されるという、同一の発現パターンを示すことが明らかとなった (図 I -5)。以上の結果より *Fbxw* クラスタに属する

遺伝子は全て同一の遺伝子発現傾向を示すことから、同一の機構によってその発現が制御されていることが考えられた。また前述のようにクラスターを形成する遺伝子は相同性の高い配列を持つことから、これらの遺伝子は相補的機能を持つことが考えられた。そこで、本研究においてこれら *Fbxw* クラスター遺伝子を一括して解析対象として研究を行うこととした。

考察

本章ではマウス卵における減数分裂に関与する因子の同定を目的として RNA-seq による解析結果を用いた候補遺伝子の網羅的な探索及び逆転写 PCR による卵特異的発現を示す遺伝子の同定を行い、4 つの候補遺伝子を得た。

これまでも減数分裂を含め、卵において機能する遺伝子を同定する試みは数多く行われており、例えば Differential Display (DD 法) や Subtraction 法などにより、卵において高発現する遺伝子を探索する試みが行われてきた。Minami らは未受精卵と 2 細胞期胚をサンプルとした DD 法を用い、卵母細胞特異的発現遺伝子である *Oogenesis1* を同定している (Minami et al., 2003)。一方 Zeng らは成長卵と 8 細胞期胚を使用した subtraction によって *Zp1*、*Zp2* や *Gdf9* など 50 個の卵特異的遺伝子を同定することに成功している (Zheng et al., 2003)。一方で、DNA Microarray による卵及び初期胚でのトランスクリプトーム解析結果の比較による網羅的探索も行われている。Ko らは成熟卵及び着床前初期胚の cDNA から 3'末端 expressed sequence tag (EST) データベースを作製・解析した結果、解析を行った全遺伝子の 2.99%に当たる 291 個の卵特異的発現を示す遺伝子が存在し、そのうち 268 個が未知の遺伝子であったと報告している (Ko et al., 2000)。また同様に DNA micro array を用いた卵及び初期胚における発現解析が、複数の研究グループから報告されている (Hamatani et al., Wang, Zeng et al., 2004)。このように、これまでに複数の方法を用いた解析が行われてきたが、従来使用されてきた方法には問題点も存在する。例えば、先に述べた DD 法や Subtraction 法で

は卵における発現量が低い遺伝子は見落としてしまう可能性があり、得られた結果に擬陽性が多いことも指摘されている (Miele et al., 1998)。また DNA Microarray においても誤った結果が得られることが多く、またアレイチップに固定可能な遺伝子の数に限りがあるため、解析可能な遺伝子の数も限られてしまう。そこで、本研究では、より信頼性が高く、またデータベースに登録された全ての遺伝子を検出可能なトランスクリプトーム解析法である RNA シークエンス解析 (RNA-seq) の結果を用いることとした。

RNA-seq では細胞における各遺伝子の発現量が明らかとなるため、この値を用いて様々な条件設定を行うことで、目的とする遺伝子をより絞り込んで探索を行うことが可能である。そこで本研究では、今までに無い新たな着想による条件設定を行った。すなわち、母性 mRNA の分解時期と速度に着目した絞り込みである。今回はその絞り込みのために受精直後の 1 細胞期胚におけるトランスクリプトーム解析結果を使用した。この時期、受精前から 1 細胞期中期までは転写が停止した状態が継続しており、また 1 細胞期胚における転写活性も高くはないため (Aoki et al., 1997)、卵成長以降の卵と 1 細胞期胚におけるトランスクリプトームには新たな転写による劇的な変化は生じない。このため、1 細胞期胚におけるトランスクリプトームを利用した研究はあまり報告が無い。しかしながら逆に mRNA の分解という視点で考えると、卵と 1 細胞期胚におけるトランスクリプトーム解析結果の比較により明らかとなる遺伝子発現の差は、ほとんどが分解による変化であるといえる。今回着目した減数分裂は受精後直ちに終了する現象であり、またその直後に異なる機構による体細胞分裂が起こることから、1 細胞期胚において減数分裂特異的因子の存在は発生の阻害につながる可能性がある。つまり、減数分裂機構に働く因子は受精後に急速な分解を受けている可能

性があるため、1 細胞期胚におけるトランスクリプトーム解析結果を用いて受精後急速に mRNA が分解される遺伝子に着目し、探索を行った。1 細胞期における発現量が成熟卵の 1/3 以下という値を設定して解析を行った結果、50 個の候補遺伝子を得ることが出来た (図 I -2 A)。そのなかには *Zp1*、*Zp2*、*Zp3* 及び *Gdf9* といった、卵特異的に発現し機能を持つことが既に報告されている遺伝子が含まれていたことから、本研究に用いた候補遺伝子探索法の正当性が伺える。しかしながら今回設定した数値は科学的根拠に基づいて設定されたものではない。今後は異なる様々な数値を組み合わせた条件において再検索を行うことで新たな候補遺伝子を得、解析を行うことで、減数分裂機構に関与する因子をより多く同定することが出来るのではないかと考える。

探索の結果、最終的に得られた 4 つの候補遺伝子のうち *Fbxw13* と *Fbxw18* は同じ *Fbxw* クラスターに属していたが、このクラスターに属する他の 13 遺伝子は、RNA-seq データを用いた絞り込みの結果、解析候補とはならなかった。しかしながらこのクラスターに属する全遺伝子の受精前後における発現を RNA-seq により見てみると、解析データが得られなかった *Fbxw23*、*Fbxw25*、*Fbxw27*、*Fbxw28* を除く全ての遺伝子において受精によりその Rpkm 値は減少しており、平均すると約半分に減少していた (データ非掲載)。また、本研究では成熟卵と 1 細胞期胚における Rpkm をそのまま計算に用いているが、この Rpkm が表す値は各細胞における全 RNA 量に対する目的遺伝子から転写された RNA 量の割合であるため (Mortazavi et al., 2008)、全ての細胞において同程度に発現している遺伝子であっても基となる細胞の総 RNA 量によりその Rpkm 値は変化する。今回解析に用いた細胞で見ると、成熟卵は多くの RNA を細胞中に蓄積しているため、受精後の 1 細胞期胚よりも RNA 量が多い (Piko et al., 1982, Bachvarova et al.,

1985)。このため、たとえ同じ発現量であっても、1細胞期胚のRNA-seqにより得られたRpkm値は成熟卵における値よりも見かけ上大きくなる。つまり、今回計算により得られたRNAの減少率は実際のRNA量変化よりも小さくなっている可能性が考えられ、*Fbxw* クラスタに属する遺伝子より転写されるRNAは、受精後により大幅な減少を受けていると考えられる。

Fbxw クラスタはこれまでに、Digital DD法を用いた解析の結果、第9染色体上に存在する卵特異的クラスタ遺伝子として同定されており、クラスタに属する全15遺伝子のうち*Fbxw21*と*Fbxw22*については卵巣でのみ発現することがRT-PCRにより示されている(Paillisson et al., 2005)。また*Fbxw15*についても、卵特異的に発現しており、出生24時間後の雌マウス卵巣中で既に発現が見られることが報告されている(Chesnaye et al., 2008)。しかしながらそれ以外の*Fbxw* クラスタ遺伝子の各組織における発現は解析されておらず、また今回解析対象とした卵形成時及び受精時における発現は、全遺伝子とも明らかにされていない。そこで、本研究においてこの解析を行った結果、ほぼ全てのクラスタ遺伝子が卵巣特異的に発現していることが明らかとなった(図I-4 B)。*Fbxw12*と*Fbxw18*については精巣中での発現が見られたものの、精巣では減数分裂を随時行い、生殖細胞である精細胞を形成しているため、これらの遺伝子が精巣においても減数分裂機構へ関与している可能性がある。卵及び着床前初期胚における発現解析の結果、これらの遺伝子は全て受精前の卵において高発現し、受精後は速やかに分解されるという共通した傾向を示すことが明らかとなった(図I-5)。この結果より、これまでその全てが未知であった遺伝子クラスタの詳細な発現パターンが明らかとなり、その制御機構解明に向けての足

がかりとなる結果が得られた。

今回の探索ではこの *Fbxw* 遺伝子の他に2つの卵特異的発現を示す遺伝子を同定することが出来た。*Ast1* は卵巣や未受精卵において発現することが知られているメタロプロテアーゼであるが (Quesada et al., 2004)、その卵細胞内における機能については未だ明らかにされていない。また *Nlrp2* について、Peng らは成長卵における発現抑制実験を行っており、その結果発現抑制卵は減数分裂を正常に再開して受精し、2細胞期に停止することを報告している (Peng et al., 2012)。しかしながら、減数分裂期における機能を解析するためには、RNAi による mRNA の分解とその後のタンパク質減少にかかる時間を考慮すると、成長卵よりも早い段階から発現抑制を行う必要がある。そのため、Peng らの実験結果からは *Nlrp2* のこの時期の減数分裂への関与を判断することは出来ない。以上より今回解析を行わなかったこれらの遺伝子も、マウス卵における減数分裂へ関与する可能性を持つ興味深い研究対象であり、今後の解析によってその詳細な機能が明らかとされることが期待される。

図 I -1

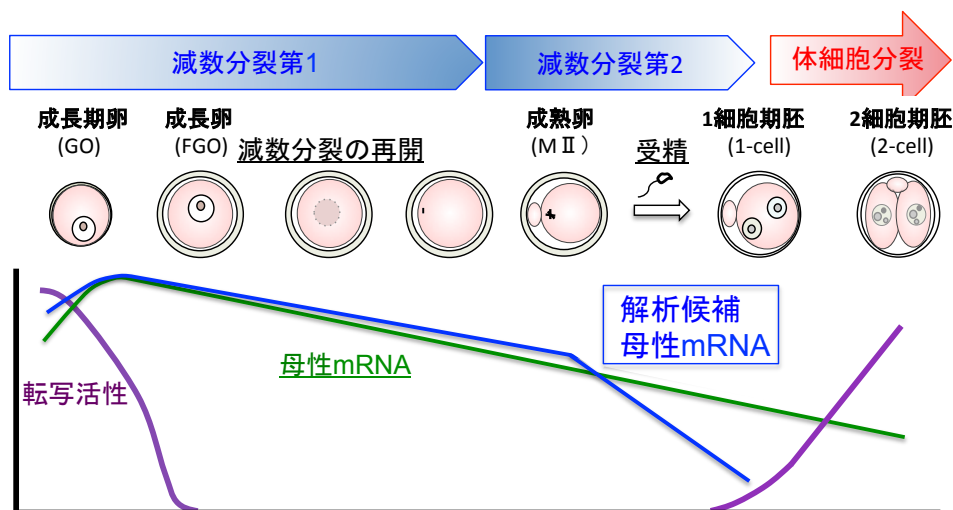


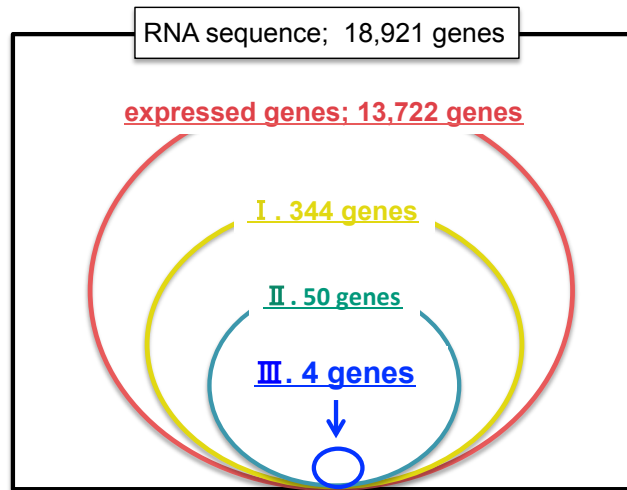
図 I -1. 卵及び初期胚における細胞周期と因子の概略図

出生したマウス卵巣中に存在する成長期卵は第一減数分裂前期で細胞周期を停止した状態のまま活発な転写を行いながら成長し、成長卵へと変化する。この成長卵はホルモン刺激により減数分裂を再開すると卵核崩壊、染色体凝集に続いて第一極体を放出して第一減数分裂を終了し、第二減数分裂へ入り成熟卵となる。この状態で再び細胞周期を停止した卵は受精を契機として減数分裂を再開し、第二極体を放出して1細胞期胚となる事で減数分裂を終了する。

この時期、成長を終えた成長卵から受精後の1細胞期胚中期頃までは転写を停止した状態にあるため、細胞周期の調節は卵内に蓄積されたmRNA(母性mRNA)から翻訳されるタンパク質によって行われている。母性mRNAは減数分裂再開および受精を契機として分解が始まり、その残存量は緩やかに減少し、全体としては1細胞後期までに約30%、そして2細胞後期までに約70%の母性mRNAが分解される。しかし、受精後直ちに終了する減数分裂に働くタンパク質をコードする母性mRNAは1細胞期胚において急激に分解される必要があるものと考えられる。そこで、本研究ではこの受精後の急速な分解に着目し、RNA sequenceデータを用いて減数分裂で特異的に機能する遺伝子の網羅的探索を試みた。

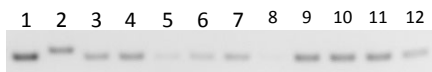
☒ I-2

A.

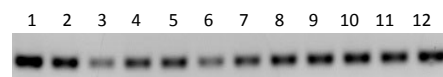


B.

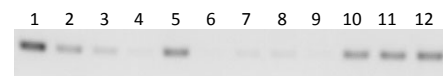
◦ *Tpa*



◦ *Rdx*



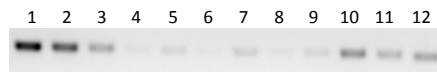
◦ *Bub1b*



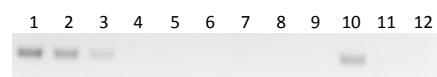
◦ *LOC546161 (Fbxw18)*



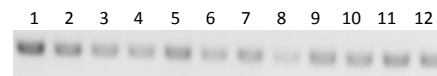
◦ *Tle*



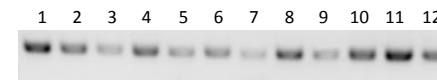
◦ *E330017A01Rik*



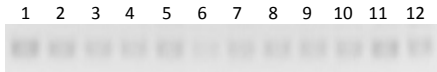
◦ *Polrd2*



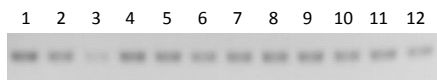
◦ *Amfr*



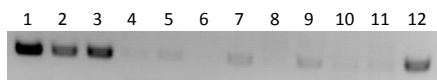
◦ *Upf1*



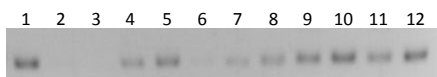
◦ *March6*



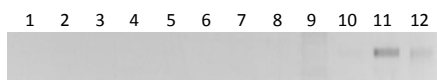
◦ *Zfp296*



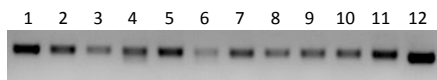
◦ *Sf3b5*



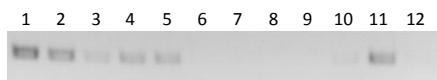
◦ *Fgf8*



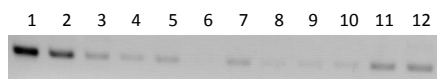
◦ *Mknk1*



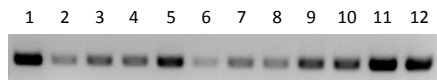
◦ *Slc7a11*



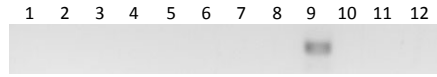
◦ *Arrdc2*



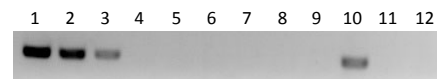
◦ *Tmem39b*



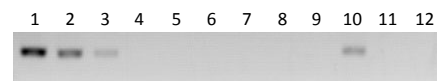
◦ *Slc5a10*



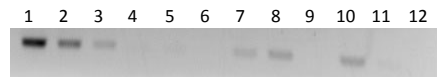
◦ *Ast1*



◦ *Nlrp2*



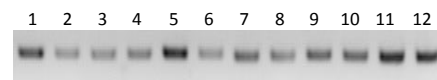
◦ *Tpra*



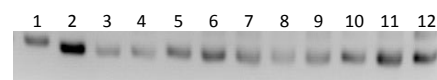
◦ *Fbxw13*



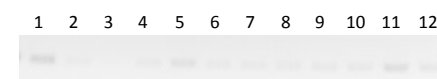
◦ *Prr14*



◦ *Smc3*



◦ *Rp9*



◦ *Cenpm*

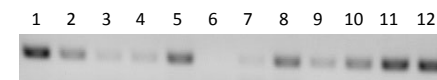
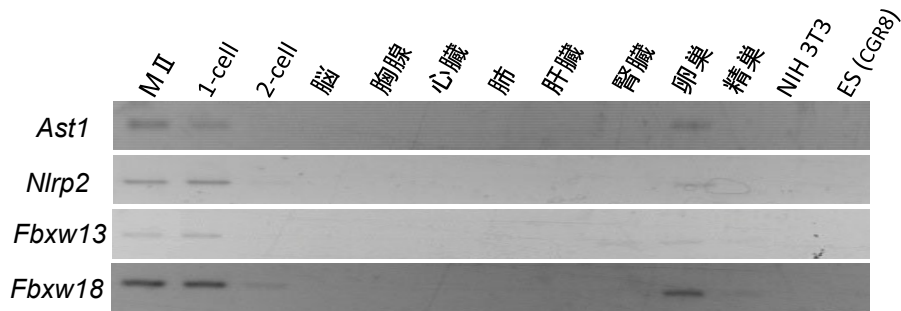


図 I -2. 解析候補遺伝子の探索

本研究での解析対象となる候補遺伝子を網羅的に探索した。A) 成熟卵 (M II) におけるRNA sequenceデータに含まれる全18,921遺伝子のうち発現量が低い遺伝子 (M II Rpkm < 0.1) を除いた13,722遺伝子 (expressed genes) について、(I)受精後にRNAが急速に分解される遺伝子 (1-cell Rpkm / M II Rpkm \leq 0.3) を選択し、その中で(II)UCSC genome informaticsの発現データより卵巣特異的発現を示す遺伝子50個の候補遺伝子を得た。さらに(III) 卵・初期胚、組織及び細胞株における発現解析をRT-PCRにより行い、卵特異的発現を示す4個の遺伝子を得た。B) (II)の結果得られた50個の遺伝子のうち既に卵特異的発現・機能を示すことが明らかにされている4遺伝子と、PCRの非特異的増幅により解析を行う事が出来なかった1遺伝子を除いた45遺伝子について卵、初期胚、組織及び細胞株における発現をRT-PCRにより解析した結果を示す。図中の番号は以下のサンプルより採取したcDNAを鋳型としたPCR反応産物である [1:成熟卵 2:1細胞期胚 3:2細胞期胚 4:脳 5:胸腺 6:肺 7:心臓 8:肝臓 9:腎臓 10:卵巣 11:精巣 12:ES細胞 (CGR8)]。コントロールとして*Gapdh*を使用した。独立した2回の実験を行い、同様の結果を得た。

図 I -3

A.



B.

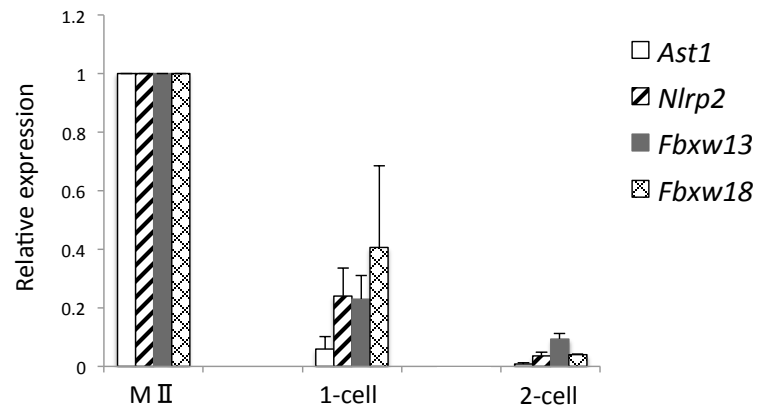
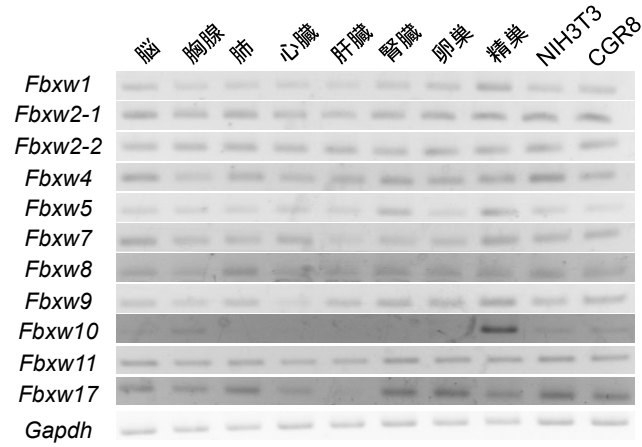


図 I -3. 候補遺伝子の発現解析

網羅的解析の結果得られた4つの卵特異的発現を示す遺伝子の組織、細胞株及び受精前後における発現解析結果。A) RT-PCRによる卵、初期胚、組織及び細胞株における各遺伝子の発現解析結果。B) 受精前後の卵・初期胚における各遺伝子発現量の変化をリアルタイムPCRにより解析した。バーは標準偏差を表す。それぞれ3回の独立した実験を行い、各回ともに同様の結果を得た。

図 I -4

A.



B.

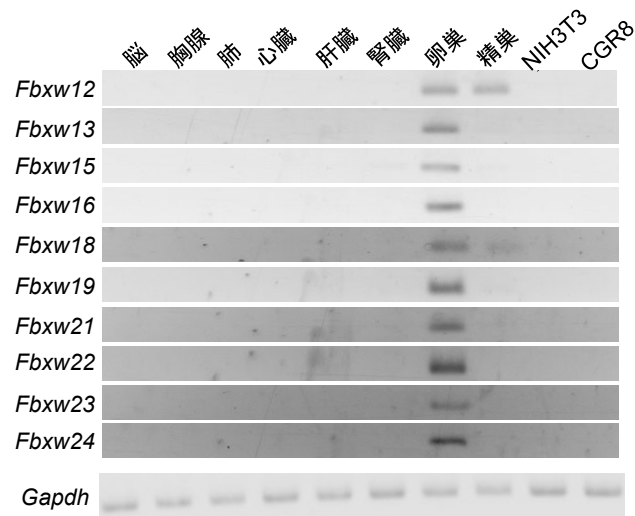


図 I -4. *Fbxw*遺伝子の組織における発現解析

*Fbxw*遺伝子の組織及び細胞株における発現を、RT-PCRにより解析した。A) クラスターに含まれない*Fbxw*遺伝子、B) クラスターにふくまれる*Fbxw*遺伝子の組織、細胞株における発現解析。各実験とも3回の独立した解析を行い、各回ともに同様の結果が得られた。

図 I -5

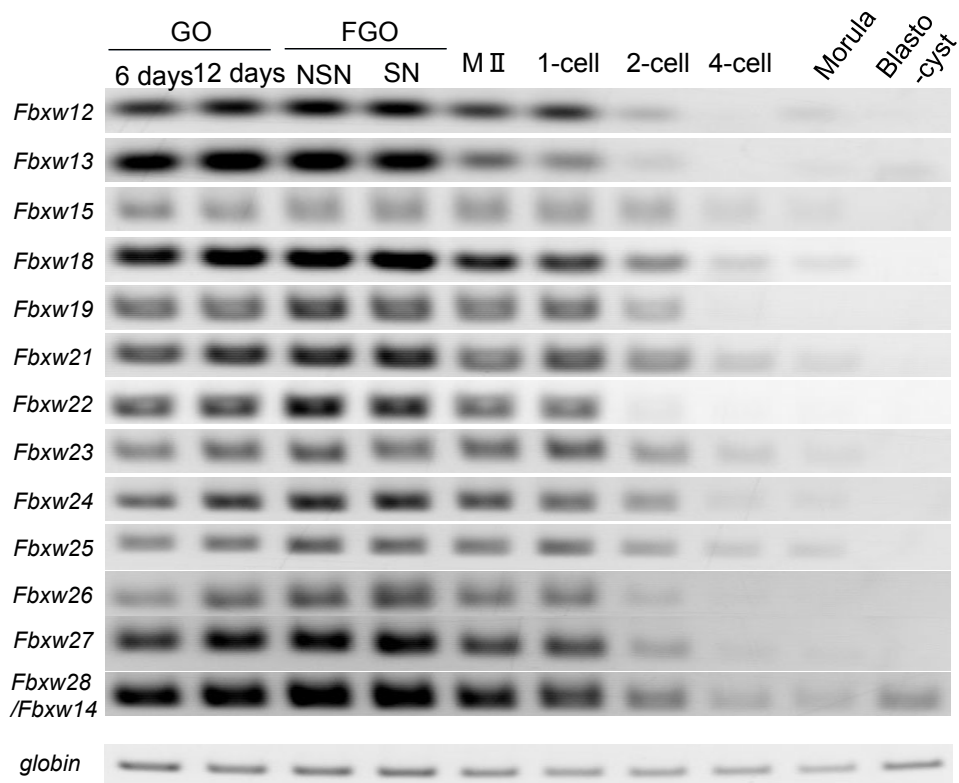


図 I -5. *Fbxw*遺伝子の卵及び初期胚における発現解析

卵形成及び着床前初期胚発生期における*Fbxw*遺伝子の発現変化を、RT-PCRにより解析した。GOは出生後6日及び2日齢のマウスより採取したものを、FGOは異なる核構造を持つ卵についてそれぞれ解析を行った。*Fbxw14*及び*Fbxw28*についてはそれぞれを識別可能なprimerの設計が困難であったため、両方を検出するprimerを用いて解析を行った。3回の独立した解析を行い、同様の結果が得られた。

表 1-1 受精後に急激な母性mRNA分解を受ける遺伝子一覧

	accession No.	Gene symbol	Rpkm		1 cell/M II
			M II	1-cell	
1	NM_175329.	Nur77 downstream gene 2.	0.34	6.93	0.049062049
2	NM_020575.	membrane-associated ring finger (C3HC4) 7.	4.85	77.86	0.062291292
3	NM_020021.	Moloney sarcoma oncogene.	5.89	93.93	0.062706271
4	NM_007749.	cytochrome c oxidase, subunit VIIc.	0.73	11.38	0.064147627
5	NM_009235.	SRY-box 15.	0.22	3.14	0.070063694
6	NM_144900.	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase alpha 1 subunit.	4.47	57.98	0.07709555
7	NM_010798.	macrophage migration inhibitory factor.	0.45	5.7	0.078947368
8	NM_007966.	even skipped homeotic gene 1 homolog.	0.49	5.32	0.092105263
9	NM_009263.	secreted phosphoprotein 1.	0.47	5.05	0.093069307
10	NM_009580.	zona pellucida glycoprotein 1.	20.25	203.39	0.099562417
11	NM_021338.	ribosomal protein L35a.	0.75	7.18	0.104456825
12	NM_007854.	solute carrier family 29 (nucleoside,	0.16	1.51	0.105960265
13	NM_019738.	p8 protein.	0.25	2.28	0.109649123
14	NM_032008.	sarcolemma associated protein.	1.65	14.77	0.111712932
15	NM_145421.	hypothetical protein LOC216169.	1.38	12.26	0.112561175
16	NM_027015.	ribosomal protein S27.	0.96	8.51	0.112808461
17	NM_018853.	ribosomal protein, large, P1.	3.61	31.7	0.113880126
18	NM_009903.	claudin 4.	0.68	5.59	0.121645796
19	NM_025582.	hypothetical protein LOC66469.	0.2	1.64	0.12195122
20	NM_026610.	NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex 4.	1.29	10.52	0.122623574
21	NM_009773.	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog..	26.7	215.06	0.1241514
22	NM_133815.	lamin B receptor.	5.44	43.78	0.124257652
23	NM_009095.	ribosomal protein S5.	8.97	72.17	0.124289871
24	NM_011774.	solute carrier family 30 (zinc transporter)..	1.25	9.76	0.12807377
25	NM_025529.	nudix-type motif 8.	0.53	4.12	0.128640777
26	NM_175011.	hypothetical protein LOC224247.	32.23	247.53	0.13020644
27	NM_027259.	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide.	2.98	22.82	0.130587204
28	NM_019968.	ADP-ribosylation factor-like 10.	0.33	2.52	0.130952381
29	NM_172397.	LIM domain containing 2.	0.63	4.75	0.132631579
30	NM_026553.	Yip1p-interacting factor.	0.46	3.45	0.133333333
31	NM_016804.	metaxin 2.	0.72	5.39	0.133580705
32	NM_00111300.	similar to ribosomal protein S26.	0.18	1.31	0.13740458
33	NM_026684.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta.	1.41	10.24	0.137695313
34	NM_172539.	astacin-like metalloendopeptidase.	9.1	65.79	0.138318893
35	NM_026982.	hypothetical protein LOC69186.	0.18	1.29	0.139534884
36	NM_019833.	hypothetical protein LOC56279.	2.11	15.01	0.140572951
37	NM_026533.	ribosomal protein S13.	1.93	13.37	0.144353029
38	NM_025523.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex.	1.42	9.78	0.145194274
39	NM_028933.NM_026501.	hypothetical protein LOC67998 isoform 2.	1.83	12.55	0.145816733
40	NM_025397.	mediator of RNA polymerase II transcription..	1.39	9.42	0.147558386
41	NM_013909.	F-box and leucine-rich repeat protein 6.	6.38	43.18	0.14775359
42	NM_026432.	transmembrane protein 66.	5.91	39.58	0.149317837
43	NM_009532.	X-ray repair complementing defective repair in.	3.64	24.27	0.149979398
44	NM_199305.	transmembrane protein 39b.	2.88	19.03	0.151339989
45	NM_021519.	endothelial differentiation-related factor 1.	1.74	11.35	0.153303965
46	NM_025890.	hypothetical protein LOC66991.	6.77	43.96	0.15400364
47	NM_133788.	isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase.	3.8	24.47	0.155292195
48	NM_009093.	ribosomal protein S29.	5.6	35.9	0.155988858
49	NM_001033275.	glycosyltransferase 8 domain containing 3.	2.01	12.69	0.158392435
50	NM_011776.	zona pellucida glycoprotein 3.	28.26	177.5	0.159211268

表 1-2

	accession No.	Gene symbol	Rpkm		1 cell/M II
			M II	1-cell	
51	NM_025352.	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III.	6.77	42.52	0.159219191
52	NM_015740.	biogenesis of lysosome-related organelles.	1.98	12.38	0.15993538
53	NM_026308.	ribonuclease P 21kDa subunit.	2.18	13.46	0.161961367
54	NM_025338.	aurora kinase A interacting protein 1.	3.4	20.95	0.162291169
55	NM_010808.	matrix metalloproteinase 24.	0.23	1.41	0.163120567
56	NM_033320.	D-glucuronyl C5-epimerase.	8.15	49.81	0.163621763
57	NM_025348.	NADH-ubiquinone oxidoreductase B9 subunit.	1.91	11.6	0.164655172
58	NM_001005419.	2-aminoethanethiol (cysteamine) dioxygenase.	0.19	1.15	0.165217391
59	NM_153131.	netrin receptor Unc5h1.	1.4	8.42	0.166270784
60	NM_028661.	hypothetical protein LOC73833.	0.42	2.52	0.166666667
61	NM_025650.	ubiquinol-cytochrome c reductase subunit.	1.53	9.1	0.168131868
62	NM_025337.	aldo-keto reductase family 7, member A5.	3.54	20.92	0.169216061
63	NM_029565.	transmembrane protein 59.	4.58	26.99	0.169692479
64	NM_008872.	plasminogen activator, tissue preproprotein.	68.66	403.12	0.170321492
65	NM_198292.	testis expressed gene 2.	2.27	13.23	0.171579743
66	NM_007909.	ephrin A2.	0.33	1.92	0.171875
67	NM_026080.	mitochondrial ribosomal protein S24.	2.26	13.12	0.172256098
68	NM_183256.	hypothetical protein LOC66379.	3.25	18.82	0.172688629
69	NM_175036.	leptin receptor overlapping transcript.	2.22	12.78	0.17370892
70	NM_025983.	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1.	15.94	91.74	0.173751908
71	NM_025358.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha.	4.74	27.25	0.173944954
72	NM_027951.	tektin 4.	0.27	1.53	0.176470588
73	NM_025587.	ribosomal protein S21.	5.95	33.58	0.177188803
74	NM_009091.	ribosomal protein S15.	4.55	24.98	0.182145717
75	NM_009477.	uridine phosphorylase 1.	3.77	20.64	0.182655039
76	NM_145405.	ubiquitin-like 4.	1.6	8.75	0.182857143
77	NM_178269.NM_001080158.NM_025639.	centromere protein M isoform 2.	3.53	19.03	0.185496584
78	NM_178715.	transmembrane protein 30B.	1.54	8.3	0.185542169
79	NM_030083.	LSM domain containing 1.	0.96	5.15	0.186407767
80	NM_175102.	splicing factor 3b, subunit 5.	7.9	41.93	0.188409254
81	NM_025274.	developmental pluripotency associated 5A.	3.26	17.29	0.188548294
82	NM_133678.	SAC3 domain containing 1.	0.3	1.59	0.188679245
83	NM_024227.	mitochondrial ribosomal protein L28.	3.17	16.73	0.189479976
84	NM_008110.	growth differentiation factor 9.	154.12	811.15	0.190001849
85	NM_015816.	LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated.	1.85	9.69	0.190918473
86	NM_007790.	chondroitin sulfate proteoglycan 6.	5	26.05	0.19193858
87	NM_026156.	XPA binding protein 2.	1.05	5.46	0.192307692
88	NM_145589.	proline rich 14.	6.07	31.5	0.192698413
89	NM_010885.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha.	5.59	28.97	0.192958233
90	NM_008020.	FK506 binding protein 2.	1.55	7.99	0.193992491
91	NM_011906.	G protein-coupled receptor 175.	7.63	39.33	0.193999491
92	NM_009446.	tubulin, alpha 1a.	6.86	35.33	0.194169261
93	NM_011185.	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta.	5.87	30.22	0.194242224
94	NM_138597.	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1.	2.4	12.29	0.195280716
95	NM_178618.	hypothetical protein LOC69640.	6.22	31.59	0.196897752
96	NM_026147.	ribosomal protein S20.	3.18	16.15	0.196904025
97	NM_024462.NM_001038998.	coiled-coil domain containing 23 isoform b.	1.41	7.13	0.197755961
98	NM_025440.	mitochondrial ribosomal protein S16.	2.38	12.03	0.197838736
99	NM_025313.	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1.	1.99	10.01	0.198801199
100	NM_012021.	peroxiredoxin 5 precursor.	3.31	16.61	0.199277544

表 1-3

	accession No.	Gene symbol	Rpkm		
			M II	1-cell	1 cell/M II
151	NM_138721.	U7 snRNP-specific Sm-like protein LSM10.	10.8	47.59	0.226938432
152	NM_001033227.	solute carrier family 5 (sodium/glucose,	15.82	69.63	0.227200919
153	NM_009041.NM_001104616.NM_001104617.	radixin isoform a,	80.24	352.12	0.22787686
154	NM_011296.	ribosomal protein S18.	2.4	10.51	0.228353949
155	NM_175103.	BolA-2 protein.	2.25	9.85	0.228426396
156	NM_013847.	glycine C-acetyltransferase.	1.67	7.29	0.229080933
157	NM_028036.	transmembrane and coiled-coil domains 6,	1.3	5.67	0.229276896
158	NM_145409.	CTF18, chromosome transmission fidelity factor,	1.04	4.53	0.229580574
159	NM_007569.	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative,	0.68	2.96	0.22972973
160	NM_001010831.	trace amine-associated receptor 9,	0.23	1	0.23
161	NM_028636.	mannosidase, alpha, class 2C, member 1,	0.23	1	0.23
162	NM_146092.	TAF6-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated,	2.45	10.65	0.230046948
163	NM_012053.	ribosomal protein L8,	2.6	11.27	0.230700976
164	NM_010683.	laminin, gamma 1,	1.41	6.11	0.230769231
165	NM_008482.	laminin B1 subunit 1,	40.73	175.7	0.231815595
166	NM_172706.	hypothetical protein LOC231014,	1.6	6.9	0.231884058
167	NM_013822.	jagged 1,	30.69	131.98	0.232535233
168	NM_029557.	tRNA splicing endonuclease 54 homolog,	0.85	3.65	0.232876712
169	NM_011991.	COP9 (constitutive photomorphogenic), subunit 3,	6.24	26.79	0.232922732
170	NM_026398.	processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP,	3.83	16.44	0.23296837
171	NM_024181.	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10,	2.46	10.54	0.23396584
172	NM_024205.	JNK1-associated membrane protein,	2.55	10.9	0.233944954
173	NM_018758.	amyloid beta (A4) precursor protein-binding,,	0.37	1.58	0.234177215
174	NM_181391.	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain,	2.65	11.3	0.234513274
175	NM_025590.	acyl-CoA thioesterase 11,	3.34	14.19	0.235377026
176	NM_026125.	C1q domain containing 2,	1.79	7.58	0.236147757
177	NM_029841.	hypothetical protein LOC77034,	0.3	1.27	0.236220472
178	NM_022409.	zinc finger protein 296,	14.45	60.9	0.23727422
179	NM_010331.	GPI anchor attachment protein 1,	0.66	2.78	0.237410072
180	NM_145396.	transducin (beta)-like 3,	1.3	5.47	0.237659963
181	NM_001110242.	hypothetical protein LOC208501,	2.89	12.14	0.238056013
182	NM_007893.	E4F transcription factor 1,	1.11	4.66	0.238197425
183	NM_172508.	dermatan sulfate epimerase,	2.61	10.95	0.238356164
184	NM_025394.	translocase of outer mitochondrial membrane 7,	1.8	7.55	0.238410596
185	NM_025571.	mitochondria-associated granulocyte macrophage,	3.82	16.01	0.238600874
186	NM_001081293.	hypothetical protein LOC75137,	2.7	11.31	0.23872679
187	NM_001109658.NM_009734.	pre-acrosome localization protein 1 isoform 2,	1.24	5.19	0.238921002
188	NM_025521.	hypothetical protein LOC66374,	1.37	5.72	0.23951049
189	NM_012002.	COP9 signalosome subunit 6,	5.72	23.86	0.239731769
190	NM_133705.	pyrroline-5-carboxylate reductase family, member,	1.37	5.66	0.24204947
191	NM_001017429.	cytochrome c oxidase subunit XVII assembly,	7.75	31.99	0.242263207
192	NM_177598.	F-box and WD-40 domain protein 13,	8.25	33.97	0.242861348
193	NM_008064.	acid alpha-glucosidase,	2.72	11.13	0.244384546
194	NM_013895.	translocase of inner mitochondrial membrane 9,	1.65	6.75	0.244444444
195	NM_138311.	H1 histone family, member O, oocyte-specific,	170.19	695.52	0.244694617
196	NM_026748.	integrator complex subunit 1,	1.71	6.98	0.244985673
197	NM_008949.	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit,,	3.56	14.53	0.245010323
198	NM_025548.	tubulin folding cofactor B,	4.46	18.18	0.245324532
199	NM_175450.	WD repeat domain 18,	1.05	4.28	0.245327103
200	NM_025798.	histidine triad nucleotide binding protein 3,	0.6	2.44	0.245901639

表 1-4

	accession No.	Gene symbol	Rpkm		1 cell/M II
			M II	1-cell	
201	NM_026958.	hypothetical protein LOC380773.	1.25	5.08	0.246062992
202	NM_172562.	transcriptional adaptor 2 (ADA2 homolog,	1.95	7.92	0.246212121
203	NM_029887.NM_001110201.	Yip1 interacting factor homolog B isoform 1.	1.03	4.17	0.247002398
204	NM_133879.	GLI-Krüppel family member HKR3.	1.25	5.06	0.247035573
205	NM_028364.NM_133691.	poly-U binding splicing factor 60 isoform a.	9.23	37.29	0.247519442
206	NM_177771.	kelch-like 18.	4.73	19.03	0.248554913
207	NM_031843.	dipeptidylpeptidase 7.	0.49	1.97	0.248730964
208	NM_025400.	NAT9.	1.93	7.75	0.249032258
209	NM_001033433.	transmembrane protein 102.	0.72	2.89	0.249134948
210	NM_134255.	elongation of very long chain fatty acids-like.	10.82	43.32	0.24976916
211	NM_007662.	cadherin 15.	0.29	1.16	0.25
212	NM_008107.	growth differentiation factor 1.	0.46	1.83	0.25136612
213	NM_016957.	high mobility group nucleosomal binding domain.	1.48	5.88	0.25170068
214	NM_028038.	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28.	8.82	35.04	0.251712329
215	NM_001033157.	hypothetical protein LOC236366.	0.62	2.46	0.25203252
216	NM_011046.NM_001081454.	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme).	14.82	58.8	0.252040816
217	NM_026851.	mitochondrial ribosomal protein L52.	1.84	7.28	0.252747253
218	NM_001080967.	thymosin beta-like.	0.81	3.2	0.253125
219	NM_001122829.NM_030680.	regulator of nonsense transcripts 1 isoform a.	17.81	70.34	0.253198749
220	NM_134029.	5'-3'-nucleotidase, mitochondrial.	1.35	5.33	0.253263302
221	NM_019693.	HLA-B-associated transcript 1A.	3.18	12.54	0.253588517
222	NM_019966.	malonyl-CoA decarboxylase.	4.15	16.36	0.253667482
223	NM_024460.	hypothetical protein LOC67695.	2.38	9.35	0.254545455
224	NM_024277.NM_001033865.	ribosomal protein S27a.	1.23	4.83	0.254658385
225	NM_011787.	autocrine motility factor receptor.	19.37	76.06	0.254667368
226	NM_017406.	cAMP responsive element binding protein-like 1.	1.6	6.28	0.25477707
227	NM_028836.	chitinase, di-N-acetyl-.	0.8	3.14	0.25477707
228	NM_145985.	archain 1.	9.21	36.13	0.254912815
229	NM_001099331.	hypothetical protein LOC100043899.	2.33	9.09	0.256325633
230	NM_025577.	hypothetical protein LOC66462.	2.69	10.48	0.256679389
231	NM_010361.	glutathione S-transferase, theta 2.	0.79	3.07	0.25732899
232	NM_016666.	aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein.	4.32	16.74	0.258064516
233	NM_001081286.	FAT tumor suppressor homolog 1.	7.84	30.22	0.259430841
234	NM_175274.	tweety 3.	7.65	29.42	0.260027192
235	NM_020491.	C184L-22.	2.69	10.33	0.260406583
236	NM_009169.	split hand/foot deleted gene 1.	14.46	55.49	0.260587493
237	NM_007637.	chaperonin subunit 5 (epsilon).	25.63	98.3	0.260732452
238	NM_001033441.	expressed sequence AU045404.	14.5	55.51	0.261214196
239	NM_011032.	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide.	10.83	41.29	0.262291112
240	NM_010888.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6.	2.41	9.17	0.262813522
241	NM_175403.	hypothetical protein LOC109154.	1.57	5.97	0.262981575
242	NM_001080999.NM_001081000.NM_008307.	HpaII tiny fragments locus 9c isoform 2.	1.39	5.28	0.263257576
243	NM_010722.	lamin B2.	0.49	1.86	0.26344086
244	NM_183091.	I-kappa-B-related protein.	0.92	3.49	0.263610315
245	NM_025365.	prickle homolog 4.	2.22	8.42	0.263657957
246	NM_133250.	mutY homolog.	0.98	3.71	0.264150943
247	NM_010515.	insulin-like growth factor 2 receptor.	1.72	6.51	0.264208909
248	NM_178385.	tubulin-specific chaperone c.	1.64	6.2	0.264516129
249	NM_008911.	protoporphyrinogen oxidase.	1.06	4	0.265
250	NM_011528.	transaldolase 1.	2.49	9.39	0.265175719

表 1-5

	accession No.	Gene symbol	Rpkm		1 cell/M II
			M II	1-cell	
251	NM_008684,NM_001042752,	neogenin isoform 1,	3.27	12.32	0.265422078
252	NM_013497,	cAMP responsive element binding protein 3,	0.42	1.58	0.265822785
253	NM_007919,	elastase 2,	0.54	2.03	0.266009852
254	NM_008323,	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+), gamma,	2.02	7.58	0.266490765
255	NM_011775,	zona pellucida glycoprotein 2,	59.53	222.99	0.266962644
256	NM_026370,	MYST histone acetyltransferase 1,	14.51	54.01	0.268653953
257	NM_028659,	eukaryotic translation initiation factor 3,,	11.92	44.28	0.269196025
258	NM_013659,	semaphorin 4B precursor,	0.98	3.63	0.269972452
259	NM_018860,	ribosomal protein L41,	6.92	25.56	0.270735524
260	NM_025302,	mitochondrial ribosomal protein L2,	5.84	21.56	0.270871985
261	NM_018730,	ribosomal protein L36,	3.36	12.4	0.270967742
262	NM_030017,	retinol dehydrogenase 12,	2.01	7.41	0.271255061
263	NM_011206,	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type,	2.98	10.98	0.27140255
264	NM_001009951,	hypothetical protein LOC382010,	2.06	7.57	0.272126816
265	NM_001010836,	NFkB interacting protein 1,	0.69	2.53	0.272727273
266	NM_025344,	eukaryotic translation initiation factor 3,,	3.57	13.08	0.27293578
267	NM_026530,	MPN domain containing,	1.38	5.04	0.273809524
268	NM_008359,	interleukin 17 receptor,	1.33	4.85	0.274226804
269	NM_177690,	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 2,	11.53	42	0.27452381
270	NM_001001565,NM_001001566,	chondroitin polymerizing factor isoform b,	1.2	4.36	0.275229358
271	NM_023172,	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta,	3.36	12.19	0.275635767
272	NM_001037757,NM_026833,	hypothetical protein LOC68767,	0.96	3.48	0.275862069
273	NM_021540,	ring finger protein 130,	2.3	8.32	0.276442308
274	NM_021438,	FGF intracellular binding protein,	1.48	5.35	0.276635514
275	NM_019761,NM_001110159,	NTF2-related export protein 1,	5.64	20.38	0.276741904
276	NM_008799,	programmed cell death 2,	3.69	13.3	0.277443609
277	NM_008946,	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta,	8.15	29.37	0.277494042
278	NM_144870,	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8,	2.27	8.16	0.278186275
279	NM_027988,	NADPH oxidase organizer 1,	2	7.18	0.278551532
280	NM_009941,	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1,	16.18	58.05	0.278725237
281	NM_001033458,	hypothetical protein LOC381633,	2.15	7.7	0.279220779
282	NM_030093,	RIKEN cDNA 3300001G02,	1.02	3.65	0.279452055
283	NM_009092,	ribosomal protein S17,	1.02	3.64	0.28021978
284	NM_001029855,NM_0111190,	proteasome activator subunit 2 isoform 2,	0.55	1.96	0.280612245
285	NM_026403,	hypothetical protein LOC67842,	1.3	4.63	0.280777538
286	NM_009949,	carnitine palmitoyltransferase 2,	2.96	10.52	0.281368821
287	NM_010414,	huntingtin,	2.55	9.06	0.281456954
288	NM_201374,	hypothetical protein LOC384619,	2.66	9.43	0.282078473
289	NM_134060,	solute carrier family 35, member B3,	2.81	9.95	0.28241206
290	NM_153142,	solute carrier family 35, member E4,	1.96	6.94	0.282420749
291	NM_019830,	protein arginine N-methyltransferase 1,	2.52	8.92	0.282511211
292	NM_029272,	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7,	2.78	9.84	0.282520325
293	NM_176785,	Hermansky-Pudlak syndrome 6,	4.02	14.16	0.283898305
294	NM_172606,	membrane-associated ring finger (C3HC4) 6,	19.18	67.54	0.283979864
295	NM_133761,	MAD homolog 4 interacting transcription,	42.95	151.13	0.284192417
296	NM_026871,	histidine triad nucleotide binding protein 2,	1.05	3.69	0.284552846
297	NM_021461,	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase,	9.12	32.04	0.284644195
298	NM_008160,	glutathione peroxidase 1,	0.79	2.77	0.285198556
299	NM_026061,	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta,	5.53	19.36	0.285640496
300	NM_053254,	transducin-like enhancer protein 6,	108.07	378.28	0.28568785

表 1-6

	accession No.	Gene symbol	Rpkm		1 cell/M II
			M II	1-cell	
301	NM_177465,	uromodulin-like 1,	20.43	71.42	0.286054327
302	NM_001111288,	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2,	1.6	5.59	0.286225403
303	NM_019880,	mitochondrial carrier homolog 1,	2.6	9.08	0.286343612
304	NM_029660,	RNA binding motif protein, X-linked-like 2,	0.57	1.98	0.287878788
305	NM_001039522,	Leo1, Paf1/RNA polymerase II complex component,	3.58	12.43	0.288012872
306	NM_025604,	proteasome (prosome, macropain) assembly,	1.81	6.28	0.288216561
307	NM_153152,	hypothetical protein LOC224904,	1.33	4.6	0.289130435
308	NM_008968,	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase,	4.34	14.96	0.290106952
309	NM_010255,	guanidinoacetate methyltransferase,	0.34	1.17	0.290598291
310	NM_021538,	epsilon subunit of coatomer protein complex,	3.48	11.97	0.290726817
311	NM_027129,	hypothetical protein LOC69596,	0.69	2.37	0.291139241
312	NM_011990,	solute carrier family 7 (cationic amino acid),	8.28	28.42	0.291344124
313	NM_025461,	hypothetical protein LOC66272,	1.69	5.8	0.29137931
314	NM_023127,NM_001039368,	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K,	5.05	17.28	0.29224537
315	NM_027101,NM_027002,	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D,	38.39	131.34	0.292294807
316	NM_024220,	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex,	6.62	22.62	0.292661362
317	NM_026616,	AYP1 protein,	0.77	2.63	0.292775665
318	NM_016876,	eukaryotic translation initiation factor 3,,	9.26	31.59	0.293130738
319	NM_023178,	DNMT1 associated protein-1,	6.4	21.81	0.293443375
320	NM_008521,	leukotriene C4 synthase,	3.16	10.74	0.294227188
321	NM_011291,	ribosomal protein L7,	3.35	11.38	0.294376098
322	NM_198027,	alkB, alkylation repair homolog 6,	1.04	3.53	0.294617564
323	NM_009579,	solute carrier family 30 (zinc transporter),,	2.18	7.39	0.294993234
324	NM_021395,	hypoxia up-regulated 1,	7.84	26.55	0.295291902
325	NM_019822,	adhesion regulating molecule 1,	4.61	15.6	0.295512821
326	NM_170680,NM_145140,	ATP-binding cassette, sub-family C, member 10,	0.6	2.03	0.295566502
327	NM_025381,	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit F,	4.12	13.92	0.295977011
328	NM_027171,	hypothetical protein LOC69697,	13.94	47.09	0.296028881
329	NM_133765,	F-box protein 31,	2.97	10.03	0.296111665
330	NM_133819,	protein phosphatase 1, regulatory subunit 15B,	2.63	8.88	0.296171171
331	NM_152808,	solute carrier family 44, member 2,	15.56	52.49	0.296437417
332	NM_011480,	sterol regulatory element binding transcription,	5.01	16.9	0.296449704
333	NM_011369,	Shc SH2-domain binding protein 1,	4.93	16.59	0.297166968
334	NM_023516,	hypoxia-inducible protein 2,	1.26	4.24	0.297169811
335	NM_172681,	hypothetical protein LOC229473,	5.59	18.78	0.297657082
336	NM_001033794,	hypothetical protein LOC546161, (Fbxw18)	25.92	86.81	0.298583113
337	NM_183285,	potassium channel tetramerisation domain,	0.72	2.41	0.298755187
338	NM_145122,	peroxisome biogenesis factor 16,	2.42	8.09	0.299134734
339	NM_008945,	proteasome beta 4 subunit,	13.01	43.49	0.29914923
340	NM_023131,	Ras and a-factor-converting enzyme 1 homolog,	4.26	14.24	0.299157303
341	NM_025987,	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha,	5.75	19.21	0.299323269
342	NM_001030296,	proline rich 7 (synaptic),	3.21	10.71	0.299719888
343	NM_008617,	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial),	8.08	26.95	0.299814471
344	NM_025538,	spermatogenesis associated 11,	4.18	13.94	0.299856528

表 2 逆転写PCRにより遺伝子発現パターンの解析を行った候補遺伝子一覧

accession No.	Gene symbol		primer sequences	
			Forward	Reverse
NM_008110,	growth differentiation factor 9,		-	-
NM_011775,	zona pellucida glycoprotein 2,		-	-
NM_009580,	zona pellucida glycoprotein 1,		-	-
NM_011776,	zona pellucida glycoprotein 3,		-	-
NM_006872,	plasminogen activator, tissue preproprotein,	Tpa	ctgaggtcacagtccaagca	tcagccgctcagagaagaat
NM_053254,	transducin-like enhancer protein 6,	Tle	gcacagcaactctggcaatta	caagtggtctctgggtctc
NM_009041,NM_001104616,NM_001104617,	radixin isoform a,	Rdx	ccgaattcaactgccaaatt	acgtctctctgctgctctg
NM_175011,	hypothetical protein LOC224247,	E330017A01Rik	tgcccagaatggaagag	ttgtcagctggctctct
NM_009773,	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog,	Bub1b	ctccatcaaggcttcagc	ctctccatttccagcaca
NM_027101,NM_027002,	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D,	Polr2d	agccgttcaaaaacagaga	aatctgctgacctctcat
NM_001033794,	hypothetical protein LOC546161,	Fbxw18	ttgttcaacggatcctctc	gaagccgtctctgttttgc
NM_011787,	autocrine motility factor receptor,	Amfr	tgcatctgatggtcagctc	gagctttctcacgtcaca
NM_001122829,NM_030680,	regulator of nonsense transcripts 1 isoform a,	Upf1	aaacaagcgcgtagtgaa	tgctggctcatagacagac
NM_001033227,	solute carrier family 5 (sodium/glucose,	Slc5a10	atctgtccatgctcctgagc	accacgatctgttgaag
NM_172606,	membrane-associated ring finger (C3HC4) 6,	March6	tagttcaccgccgatttac	ttgctcatatgtccacc
NM_172539,	astacin-like metalloendopeptidase,	Astl	gttggctgttggagat	cgcataggaagaatggaa
NM_022409,	zinc finger protein 296,	Zfp296	cctcagctcttcagcaacc	gtaggcagctgtcaggag
NM_177690,	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 2,	Nlrp2	tcacagaaatgtgctgac	agaggcagctttcaca
NM_175102,	splicing factor 3b, subunit 5,	Sf3b5	ggagcatctgcagctcaagt	tgacattttctccatcag
NM_011906,	G protein-coupled receptor 175,	Tpra	tttggtagccctgtagg	gtccctggtagctcagta
NM_010205,	fibroblast growth factor 8,	Fgf8	ggaaaccagctgacactctc	gtctgtgacttttagcagga
NM_177598,	F-box and WD-40 domain protein 13,	Fbxw13	ttcaggagggttttgacc	acatgagattccaggctc
NM_021461,	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase,	Mknk1	actggctcacactcccaac	tcagctcgaagaagagctca
NM_145589,	proline rich 14,	Prr14	acctgcagatcctccagaa	ggagctgtgtgtttgtt
NM_001081286,	FAT tumor suppressor homolog 1,	Fat1	-	-
NM_011990,	solute carrier family 7 (cationic amino acid,	Slc7a11	cccagatagctatgctctct	cgctgaaccactgggttt
NM_007790,	chondroitin sulfate proteoglycan 6,	Smc3	caaggatgctgtgaaaga	ttgcccgtttatcagcttt
NM_027560,	arrestin domain containing 2,	Arrdc2	ctccctgtgacactcttc	gtgtgctttcagctcaat
NM_018739,	retinitis pigmentosa 9 homolog,	Rp9	tcagcaactggagctcttt	caacgccaactgcataac
NM_199305,	transmembrane protein 39b,	Tmem39b	cttggagcagcacaacaga	aggaagagctcacaggaca
NM_178269,NM_001080158,NM_025639,	centromere protein M isoform 2,	Cenpm	ctctgccctccaatggaac	cctgtgacaagaagcaca
NM_027476,	zinc finger, DHHC domain containing 24,	Zdhc24	gctgtggcttccataat	aacgacagagagccctgt
NM_025571,	mitochondria-associated granulocyte macrophage,	Pam16	atccaatctcttgccctca	tggctgtatccggagttc
NM_022885,	solute carrier family 30 (zinc transporter),	Slc30a5	ttggtttcatacggcttcc	tttggacagctcatttga
NM_008799,	programmed cell death 2,	Pdcd2	atagcccttgaaccagaca	gttcaacagctgagcatga
NM_001017983,	FAD-dependent oxidoreductase domain containing,	Foxrd2	caactcaccctgaaatctct	ggactgttccaaatggaga
NM_001030296,	proline rich 7 (synaptic),	Prr7	ctggaccgggctatacttc	tgtgtctctccgacaagg
NM_134060,	solute carrier family 35, member B3,	Slc35b3	gaaactgcacaatgcttcca	agggccagaacaaggagat
NM_011774,	solute carrier family 30 (zinc transporter),	Slc30a4	tgccctctctacttgcctt	tagcgatgaatccaagg
NM_025397,	mediator of RNA polymerase II transcription,,	Med11	gctcaatccgctaccctac	ttccagcatctccacag
NM_010414,	huntingtin,	huntingtin	tgattgtacagcagatgga	ccgagttctctcagctca
NM_172562,	transcriptional adaptor 2 (ADA2 homolog,,	tada2a	acttggcttggaaattgg	ccgagacagcatgagctca
NM_026125,	C1q domain containing 2,	Fam132a	gccagatgatgggtcctcta	togaagttctgtgcccctt
NM_001009951,	hypothetical protein LOC382010,	BC088983	gcagtgatcagcagcagcag	catcaacttccggtgttg
NM_016957,	high mobility group nucleosomal binding domain,	Hmgn2	gcgaggtgtctgctaaacc	cctgtctgttttgatct
NM_007966,	even skipper homeotic gene 1 homolog,	Evx1	attgcaaggctggagaaga	ctgtgctcatatgtagtg
NM_133879,	GLI-Kruppel family member HKR3,	Zbtb48	cacatggatccacgacag	caggactccacatgacct
NM_009263,	secreted phosphoprotein 1,	Spp1	tgaccaccagatcctatagc	ctccatgtctatcatatcg
NM_001033157,	hypothetical protein LOC236366,	5730507001Rik	atcgaggagatcagtgac	ccactatgatttaccatacc
NM_013497,	cAMP responsive element binding protein 3,	Ceb3	gagttctctgctctccag	agagtgaccctctctctc

第 2 章

Fbxw クラスター遺伝子の発現調節機構解析

緒言

卵成長終了後から 1 細胞期胚中期にかけての転写静止期において細胞内で起こる全ての細胞現象は、卵内に蓄積された母性 mRNA から翻訳される因子によって制御されていると考えられている。実際に、未受精の卵内は転写活性を持たないにも関わらず、他の転写活性を持つ時期の細胞と変わらない量の RNA を保持しており、また、翻訳に向けて poly (A) 鎖が付加された RNA が他の時期の細胞よりも多量に存在していることが報告されている (Piko et al., 1982, Bachvarova et al., 1985) ことから、この時期の卵細胞における母性 mRNA の重要性が伺える。これらの RNA は出生後におこる卵成長過程での活発な転写によって蓄積されたものであるが、この卵における転写機構については、これまでも多くの研究が行われてきた。例えば、卵特異的に発現し、機能することが知られている遺伝子に *Zona Pellucida glycoprotein (Zp)* がある。この、卵の最外殻である透明帯を構成するタンパク質をコードする遺伝子や卵胞形成時の顆粒膜細胞成長に関与する *Growth differentiation factor 9 (Gdf9)* の卵における転写には、TSS 上流約 200 bp に存在する転写制御配列である *E-box* が重要であることが示されている (Liang et al., 1997, Yang et al., 2006)。また、*Nucleoplasmin 2 (Npm2)* の転写に対する *NOBOX DNA binding elements (NBE)* の存在も報告されている (Tsunemoto et al., 2008)。一方で転写に関与する因子についての解析も行われており、*Factor In the Germline alpha (Figl α)* や *Spermatogenesis-and oogenesis-specific bHLH transcription factor2 (Soxhlh2)* など、その機能阻害が卵における転写を抑制する因子が数多く報告されている (Liang et al., 1997, Choi et al.,

2008)。しかしながらこれらの研究の結果、その存在が卵における転写に重要であることが判明したいくつかの DNA 配列もしくは転写因子のみで、この時期に発現する全ての遺伝子の転写を制御しているとは考えられず、更なる解析が必要である。

第一章での候補遺伝子探索の結果同定された *Fbxw* クラスタに属する遺伝子は大部分が卵巣特異的に発現しており、また卵において高発現した後は受精後の初期胚において速やかに分解されるという共通した転写における特徴を有していることが明らかとなった。これまで卵でのみ発現する遺伝子クラスターについての報告は無く、また当然のことながらその転写調節機構は謎に包まれている。そこで、本研究では *Fbxw* クラスタ遺伝子の卵における発現制御機構の解析を行うこととした。本章では他の生物種で保存されている *Fbxw12* をモデル遺伝子としてその転写開始点上流配列を含む Luciferase vector を作製し、卵及び初期胚における転写活性を解析した。さらにこの領域に含まれる様々な転写因子結合配列の中から *Fbxw* クラスタ遺伝子に共通して存在する配列を探索し、その転写への関与と必要な転写因子についての解析も行った

結果

Fbxw12 reporter gene assay

Fbxw クラスター遺伝子の卵における転写制御機構を明らかとするため、reporter gene assay を行った。*Fbxw* クラスターに含まれる遺伝子のうち *Fbxw12* の転写開始点 (Transcription Start Site: TSS) 上流 1,000 base pair (bp) 領域を組み込んだ pELuc test vector (*Fbxw12*-Luc) 及び、コントロールとして、我々が以前に受精後の初期胚で転写されることを報告している *Tktl1* 遺伝子の TSS 上流 227 bp 領域を持つ vector (*Tktl1*-Luc, Hamamoto et al., 2013) を、成長期卵 (Growing oocyte; GO)、2 細胞期胚 (2-cell) の核へ顕微注入し一定時間培養後に Luciferase 活性を測定した (図 II -1 A)。その結果、*Fbxw12* の上流配列を持つ *Fbxw12*-Luc は成長卵において高い転写活性を示した一方で、受精後の 2-cell ではほとんど活性を持たなかった (図 II -1B)。またコントロールとして使用した *Tktl1*-Luc は 2-cell でのみ転写活性を示した。この結果より、*Fbxw12* TSS 上流 1,000 bp の配列は卵で転写活性を持つ promoter として機能することが明らかとなった。

Fbxw12 TSS 上流における転写因子結合配列予測解析

Reporter gene assay の結果より、卵における *Fbxw12* の発現には TSS 上流 1000 bp が重要であることが明らかとなった。そこで次に、この 1000 bp の領域に含まれるどの配列がクラスター遺伝子の転写に必要なかを明らかにするため、クラスター遺伝子の TSS 上流に共通して存在する転写因子の探索を行った。クラスターに属する全

遺伝子の TSS 上流 1,000 bp 領域の配列情報を UCSC Genome Bioinformatics より取得し、転写因子結合配列予想プログラムである TF Search (Heinemeyer et al., 1998) を用いて配列の予測を行い、*Fbxw* クラスタに属する全遺伝子について得られた結果を比較した。その結果、*Fbxw* クラスタに属する遺伝子のうち *Fbxw19*、*Fbxw26* を除いた遺伝子が TSS 上流 267~308 bp に *HSF-1/HSF-2* 結合配列 (AGAAG) を持ち、*Fbxw19* は 322~318 bp に、そして *Fbxw26* は 294~290 に AGAAA の配列を有していることが明らかとなった。また *Fbxw19* を除く全遺伝子は TSS 上流 246-286 bp に *PBX-1* 結合配列 (ATCAATCAG) を持ち、*Fbxw19* も 291-299 bp に ATCAATGGG の配列を持つことが明らかとなった。さらに、*Fbxw24* を除く遺伝子は TSS 上流 89-39 bp の領域に *AML-1* 結合配列 (TGTGGT) を持ち、*Fbxw24* は TATGGT の配列を有していた (図 II-2 B)。以上より、*Fbxw* クラスタに属する遺伝子はすべて、TSS からほぼ同距離の位置に *HSF-1/2*、*PBX-1* そして *AML-1* 結合配列を共通して持つことが明らかとなった。一方で同様の解析をクラスタ外の *Fbxw* 遺伝子についても行った結果、*Fbxw* クラスタ遺伝子と同じ位置にこれらの転写因子結合配列を持つ遺伝子は存在しなかった (図 II-2 A)。この結果より、*Fbxw* クラスタに属する遺伝子が共通して持つ *HSF-1/2*、*PBX-1* そして *AML-1* 結合配列が *Fbxw* クラスタ遺伝子の卵での発現に重要なのではないかと考え、その関与を実験的に示すことを目的として再度 reporter gene assay を行った。

変異導入 *Fbxw12*-Luc vector を用いた reporter gene assay

Fbxw クラスタ遺伝子の上流配列に共通してみられた 3 つの転写因子結合配列について、各配列に変異を導入した Luciferase vector を作製し、それを用いた reporter

gene assay を行った。表 4 に記載した変異導入用 primer を用いて、以下に下線で示した変異を各結合配列へ導入した。この際、*Pbx-1* 及び *Aml-1* については過去の知見を参考に導入する塩基の変異を決定した (Lu et al., 1995, Iwatsuki et al., 2005) [*HSF-1/-2* (AGAAG → ATGGG)、*PBX-1* (ATCAATCAG → AGGAAGGAG)、*AML-1* (TGTGGT → TAGCCT)]。作製した各配列に対する変異を含む mutated *Fbxw12*-Luc vector を 12 日齢のマウスより採卵した GO に顕微注入し reporter gene assay を行った結果、*HSF-1/-2* 及び *PBX-1* 結合配列へ変異を導入した mutated *Fbxw12*-Luc において顕著な転写活性の低下が観察された (図 II-3 A、B)。一方で *AML-1* 結合配列に変異を導入した *Fbxw12*-Luc vector の転写活性においては、野生型 *Fbxw12*-Luc と比較し有為な差は認められなかった (図 II-3 C)。この結果より *Fbxw12* 遺伝子の TSS 上流 1,000 bp に含まれる転写因子結合配列のうち *Hsf-1/-2*、*Pbx-1* 結合配列が卵での転写に重要であることが明らかとなった。

***Fbxw* クラスタ発現に機能する転写因子解析**

Mutated-*Fbxw12*-Luc vector を用いた reporter gene assay の結果より、*Fbxw12* の発現に重要な転写因子結合配列が同定された。そこで次に、この配列に結合する転写因子のうち実際に *Fbxw* クラスタ遺伝子の発現に関与する因子の解明を試みた。*HSF-1/-2*、*PBX-1* 結合配列にはそれぞれ *HSF-1*、*HSF-2* そして *PBX-1* が結合する。そこで、まず初めに卵及び初期胚における発現解析を行った結果、これらの転写因子をコードする mRNA は *Fbxw* クラスタ遺伝子が発現している卵形成期に発現しており、また受精後の初期胚においても存在していることが明らかとなった (図 II-4)。

そこで次にこれらの転写因子に対する siRNA を設計し (表 5)、12 日齢のマウスより

採取した GO-顆粒膜細胞複合体中の GO へ顕微注入し、体外で 12 日間培養することで成長卵 (GV 卵) を得て、各転写因子の発現抑制効果及び *Fbxw* クラスター遺伝子の発現変化について逆転写 PCR により解析を行った。その結果、*Hsf-1* 及び *Hsf-2* は siRNA 処理によりその mRNA 発現が抑制されたものの、*Fbxw* クラスター遺伝子の発現は顕微注入無し、コントロール siRNA 注入群の卵における発現と差がみられなかった (図 II-5 A)。また *Pbx-1* については 2 つの *Pbx-1* transcription variant のうち、variant a において顕著な発現抑制効果がみられたものの variant b では発現が抑制されず、また *Fbxw* クラスター遺伝子の発現にも変化は見られなかった (図 II-5 B)。そこで方針を変更し、各転写因子の過剰発現卵における *Fbxw12-Luc* の転写活性を reporter gene assay により解析することとした。*Hsf-1*、*Hsf-2*、*Pbx-1* variant a、b のコード領域をクローニングし、*In Vitro Transcription* によって作成した mRNA を 12 日齢のマウスより採取した GO に顕微注入することで各転写因子を過剰発現し、その後、この卵の核へ *Fbxw12-Luc* を顕微注入して reporter gene assay を行った。その過程のうち *Pbx-1* のクローニングにおいて、transcription variant a のアミノ酸配列のうち 333-372 アミノ残基が欠損しているものの PBC、Homeodomain の 2 つの機能 domain は保存された、NCBI データベース未登録の配列を得たため、*Pbx-1* に関してはこの新たな配列 (variant a short form) を含めた 3 つの variant を個別に用いて解析を行った。その結果、*Hsf-1* 過剰発現卵では転写活性の変化は観察されなかったものの、*Hsf-2* 過剰発現卵では使用した mRNA の濃度依存的な *Fbxw12-Luc* 転写活性の上昇が見られた (図 II-6 A)。同様に *Pbx-1* についても解析を行った結果、*Pbx-1* variant a short form 強制発現卵では転写活性の変化は見られなかったものの、その他 2 つの variant を強制発現した卵では、顕微注入した mRNA の濃度依存的な転写活性の上昇が見られた (図 II-6

B)。以上の結果より *Hsf-2*、*Pbx-1* variant a、b が *Fbxw12* promoter の転写活性を上昇させることが明らかとなり、これらの因子が *Fbxw* クラスター遺伝子の卵における発現に関与している可能性が示された。

考察

本章では卵特異的発現を示す *Fbxw* クラスタに属する遺伝子のうち、他の生物が持つ *Fbxw* 遺伝子と最も相同性が高かった (データ非掲載) *Fbxw12* をモデル遺伝子とし、その TSS 上流配列を用いた reporter gene assay により卵での転写に必要な領域及びそのなかで転写活性に重要な配列の同定を行い、*Fbxw12* TSS 上流 1 Kb 領域とそこに含まれる *HSF-1/-2*、*PBX-1* 認識配列が卵での転写に重要であることを明らかとした。

Hsf (Heat Shock Factor) *-1/-2* は生物が通常の生育温度よりも高い温度にさらされるなど外界からのストレスを受けた場合、熱ショックに対する応答として細胞内で発現される *Heat Shock Protein (Hsp)* の転写を制御する転写因子であり、通常の体細胞中においては細胞質中に不活性な状態で存在している。ひとたび細胞がストレスを受けると核内へ移行し、3 量体を形成して活性型となって Heat Shock Element: HSE へ結合するが (Akerfelt et al., 2010)、現在では *Hsp* 以外の多くの遺伝子上流領域にも HSE が存在し、機能することが明らかとなっている (Guertin et al., 2010)。この HSE に結合する HSF タンパク質のなかで今回、*Hsf-2* の卵における転写調節への関与が示唆された (図 II-6 A)。これまでに *Hsf-2* についてはノックアウトマウスでの解析が行われ、脳の形態的变化に加えて減数分裂時の染色体不対合による雌マウスでの不妊が報告されている (Kallio et al., 2002)。しかしながら今回、*Fbxw* クラスタ遺伝子の発現を抑制した卵において染色体対合の異常は観察されなかったことから (第 3 章記述)、ノックアウトマ

ウスによって得られた知見は *Hsf-2* がその発現を制御する他の遺伝子によるものであると考えられる。これは *Hsf-2* が転写を制御する数多くの遺伝子の中には未だその標的遺伝子であることが知られていない減数分裂関連因子が存在している可能性、または減数分裂への関与が明らかにされていない遺伝子が存在する可能性を示しており、*Hsf-2* 遺伝子に着目した解析は非常に興味深い。

一方、今回その重要性が明らかとなった *HSF-1/-2* 結合配列へ結合する HSF 因子のうち *Hsf-1* については、その過剰発現下での reporter gene assay の結果、*Fbxw12* の転写活性に変化が見られなかった (図 II-6 A)。しかしながら *Hsf-1* についてもこれまでにノックアウトマウスが作製されており、ノックアウトされた雌マウスにおいては *Hsf-1* による転写制御を受ける遺伝子の 1 つである *Hsp90 α の発現抑制によって CDK1 タンパク質発現、ERK-1/-2 リン酸化レベルの低下による卵核胞崩壊遅延、部分的な第一減数分裂停止と異常な細胞質分裂が起こることが報告されている (Metchat et al., 2009)。また 2011 年に Masson らは野生型 *Hsf-1* を持つマウスとノックアウトマウスからそれぞれ採取した卵のマイクロアレイ解析結果の比較から *Hsf-1* の標的遺伝子には細胞周期調節に関与する因子が数多く存在していることを明らかにし、それらの遺伝子のうち減数分裂特異的構造であるシナプトネマ複合体の構成因子である *Syce1* やコヒーシン複合体のサブユニットである *Stag* などの発現が減少することで、*Hsf-1* ノックアウトマウスの胎児卵巣中での減数分裂の進行が遅延することを明らかにしている。さらに *Zp3-Cre* マウスとの交配により得られたコンディショナル・ノックアウトマウスを用いた解析から、出生後の *Hsf-1* 欠乏は染色体の構造異常を生じ、spindle assembly checkpoint によって減数分裂が第一減数分裂中期で停止すると報告し*

ている (Masson et al., 2011)。以上の報告は *Hsf-1*、*-2* とその結合配列である HSE の減数分裂機構との密接な関わりを示唆しており、今回明らかとなった *Fbxw* クラスター遺伝子の減数分裂への関与も、その新たな一面であろう。

一方で今回、*Fbxw12* の転写への関与が示唆されたもう 1 つの因子が *Pbx-1* (*pre B cell leukemia homeobox 1*) である。この遺伝子は TALE ホメオドメインをもつ転写調節因子をコードした遺伝子であり、小児白血病で初めて見いだされた (Hunger et al., 1991)。*Pbx-1* は卵で発現し、卵の体軸形成に働く *Hox* 遺伝子のコファクターとして初期胚発生に関与していることが示唆されているものの (Villaescusa et al., 2004)、減数分裂への関与についてはこれまでに報告が無く、また *Fbxw* 遺伝子との関連についても全く知られていない。今回、siRNA による *Hsf-1/-2* 及び *Pbx-1* 発現抑制実験を行ったが、卵における *Fbxw* クラスター遺伝子の発現に変化はみられなかった (図 II-5)。これは、各転写因子が、今回発現抑制に使用した 12 日齢以前の卵においても高発現しているため、siRNA によりその mRNA は分解されたもののタンパク質レベルでの抑制には至らなかったことが原因である可能性が考えられる。*Pbx-1* そして *Hsf-1*、*Hsf-2* についても、*Fbxw12* を含む *Fbxw* クラスター遺伝子の転写への関与をより強固に明らかとするためには、各遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスから採取した卵を用いた解析が必要であろう。

前章での発現解析の結果、*Fbxw* クラスター遺伝子は卵特異的に発現していることが明らかとなり、本章では reporter gene assay の結果 *Hsf-2* 及び *Pbx-1* が *Fbxw12* の転写に重要であることを明らかとした。しかしながら逆転写 PCR による発現解析の結果 *Hsf-2*、*Pbx-1* とともに受精後の初期胚においても発現が見られ

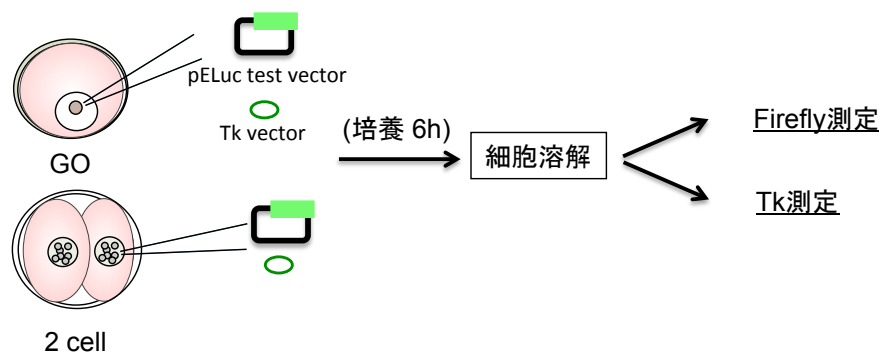
たことから、これらの転写因子が時期特異的発現を制御している訳ではない。では、どのような機構によってクラスター遺伝子は卵特異的に発現するのだろうか。考えられる制御機構が2つある。1つ目は、これらの因子が *Fbxw* クラスター遺伝子の発現を惹起する際には未知の相互作用因子が必要であり、その因子が卵特異的に発現している可能性である。例えば、卵特異的遺伝子である *Zp3* の場合、卵における発現には転写開始点上流 100 bp 付近への *Osp-1* と呼ばれる転写因子の結合が必要であり、またこの *Osp-1* が卵では発現するものの受精後の初期胚では発現しないことが明らかとされている (Schickler et al., 1992)。この *Osp-1* のような相互作用因子が *Fbxw* クラスター遺伝子転写の際にも存在するのか、そしてそれは *Hsf-2* と *Pbx-1* それぞれに存在するのか、もしくは単一の因子がこれらの転写因子を架橋しているのかを明らかにすることは、非常に興味深い研究である。

可能性の2つ目はエピジェネティックな調節機構が関与しているというものである。エピジェネティックな調節機構としては、クロマチンを構成する DNA やヒストンタンパク質へのメチル基、アセチル基の付加や除去、noncoding RNA による RNA 量の制御など数多くが知られている (Reik et al., 2007)。卵においても、卵成長時の細胞核ではヒストン H3、H4 に対するアセチル化修飾や H3K4、K9 のメチル化、さらに DNA のメチル化など、エピジェネティックな修飾の変化が数多く起こることが知られている (Kageyama et al., 2007)。また個々の遺伝子についても、*Oog1* の卵特異的発現には転写開始点上流 500~700 bp の領域に存在する CpG へのメチル化修飾が関与している可能性が示唆されるなど、発現の特異性と修飾の関係が明らかとされつつある (Ishida et al., 2013)。今回解析に用

いた *Fbxw12* の TSS 上流 1 Kb 領域内にも複数の CpG サイトが存在しているため、*Oog1* のような DNA メチル化を介した発現特異性制御機構が機能している可能性は考えられる。またヒストン修飾についても今後解析を行う必要があるだろう。

図 II -1

A.



B.

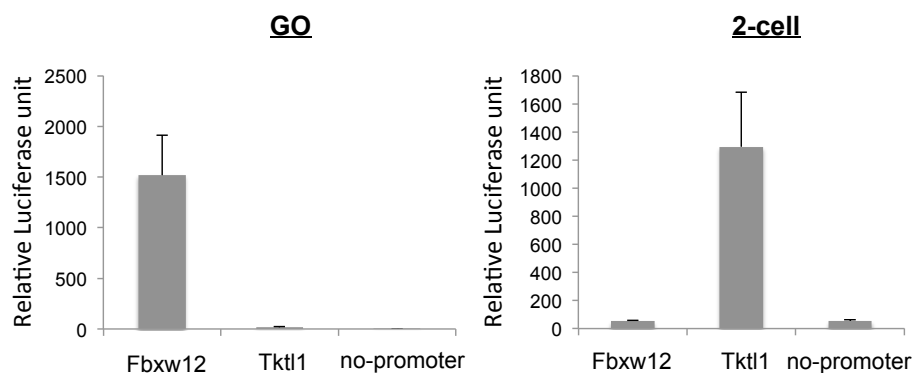
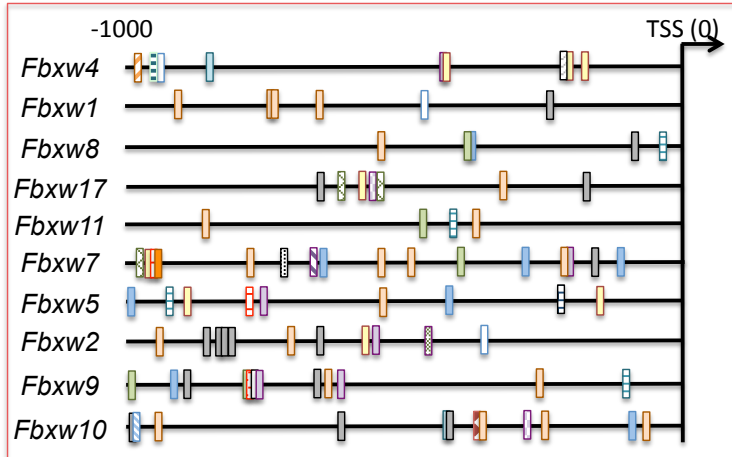


図 II -1. 成長期卵(GO)、2細胞期胚(2-cell)におけるreporter gene assay

reporter gene assayの方法及び結果。A) 方法概略図。B) *Fbxw12*転写開始点(TSS)上流1 k base pair (bp)、*Tktl1* TSS上流227 bpの配列をそれぞれpELuc test vectorに組み込み、標準となるチミジンキナーゼvector (Tk vector)と共に12日齢の雌マウスより採卵したGO及び受精後26時間後の2-cell中の一方の割球内の核へ顕微注射し6時間培養後に細胞を溶解、2つに分割し一方の溶解液でホタルルシフェラーゼの活性を、もう一方でチミジンキナーゼの活性を測定した。得られたホタルルシフェラーゼの値をチミジンキナーゼの測定値で補正し、転写活性を算出した。GO、2-cellとも、各回10個の卵を使用した解析を独立して5回行った。バーは標準誤差を示す。

図 II-2
A.



B.

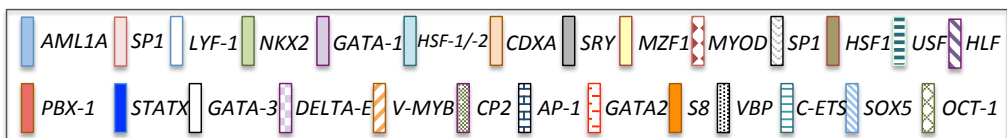
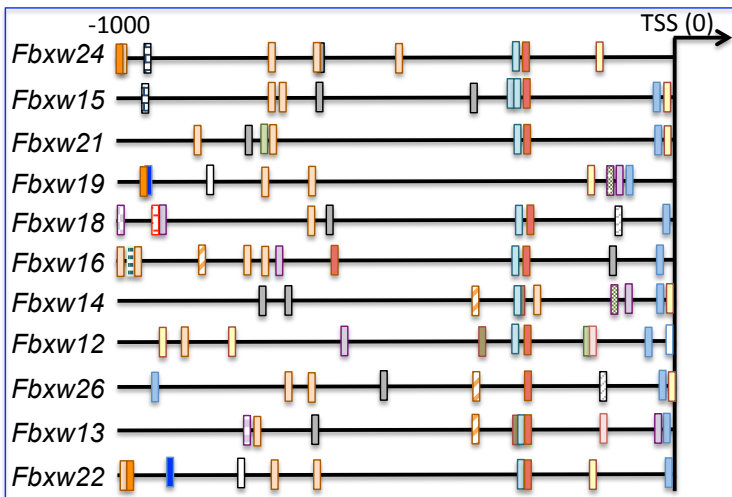


図 II-2. *Fbxw*遺伝子転写開始点上流領域における転写因子結合配列探索

UCSC genome informaticsより各*Fbxw*遺伝子の転写開始点 (TSS) 上流1 kbの配列を取得し、TF Searchを用いて各領域に存在する転写因子結合配列を予測、図示した。A) クラスターに含まれない*Fbxw*遺伝子 B) *Fbxw*クラスター遺伝子

図 II-3

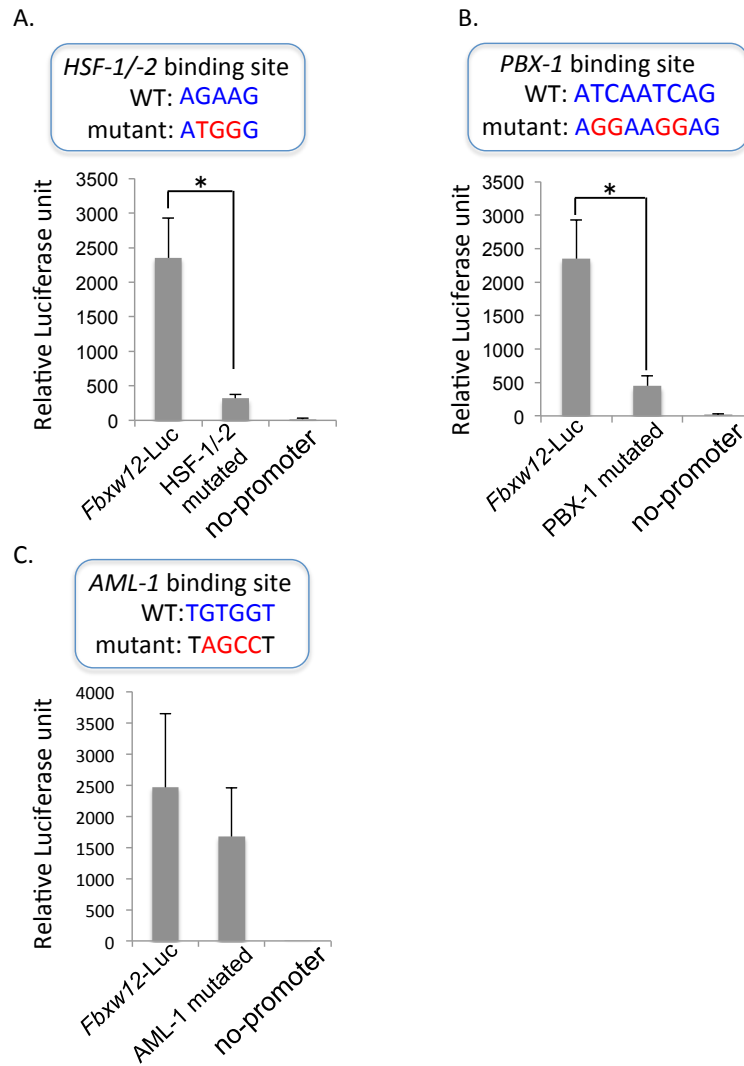


図 II-3. 変異導入promotee配列を用いたreporter gene assay

Fbxw12クラスター遺伝子のTSS上流1 Kb以内に共通して存在するHSF-1/-2、PBX-1そしてAML-1結合配列に変異を導入したLuciferase vectorを作製し、GOにおける転写活性を測定した。各実験とも10個の卵を測定に使用し、5回の独立した実験を行った。バーは標準誤差を示す。統計処理はpaired t-testによって行い、*は $p < 0.05$ を表す。

図 II-4

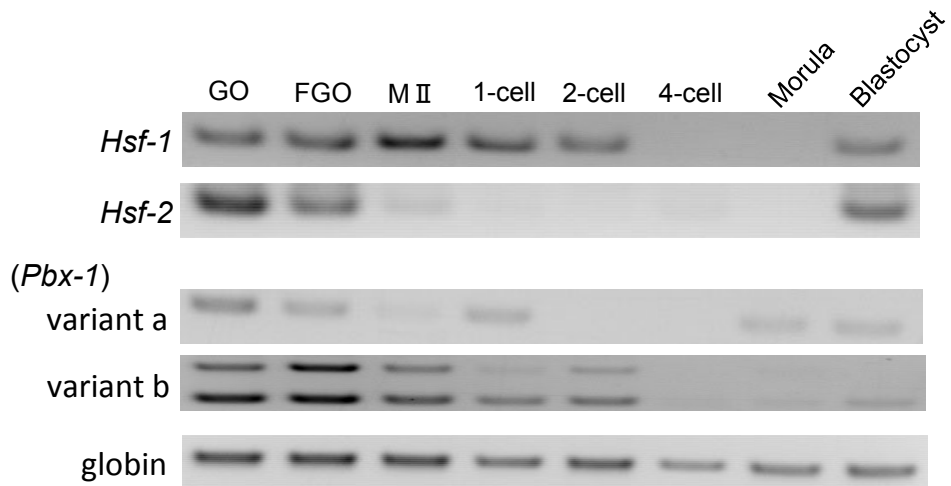
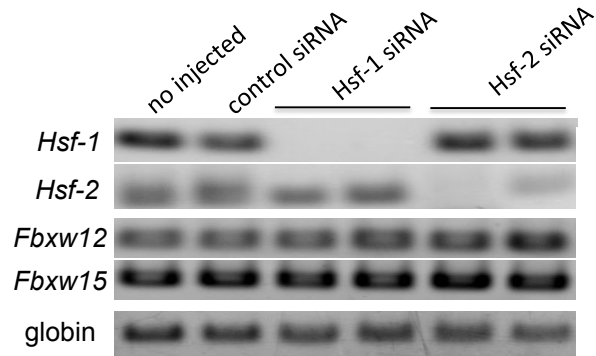


図 II-4. 転写因子発現解析

Fbxw クラスター遺伝子のTSS上流1Kb以内に共通して存在するHSF-1/-2、PBX-1結合配列に結合する転写因子の発現をRT-PCRにより解析した。実験には各時期50個の卵及び初期胚を使用し、独立した3回の実験を行い、全て同様の結果が得られた。

図 II-5

A.



B.

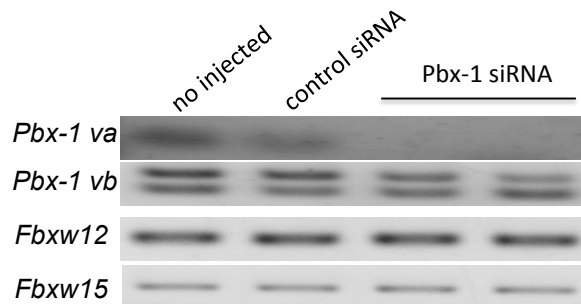
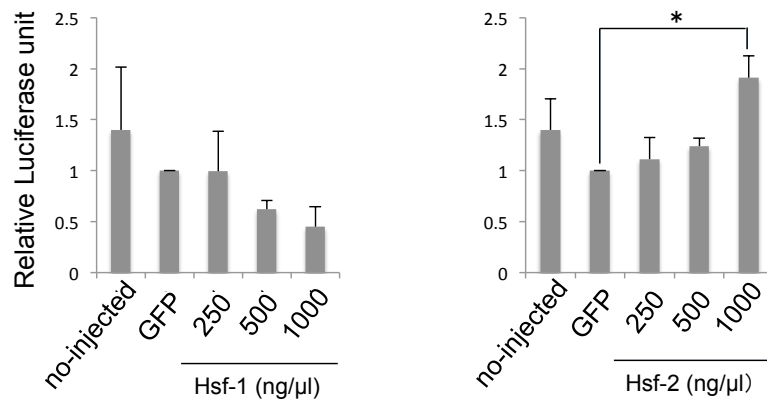


図 II-5. 転写因子の発現抑制が*Fbxw*遺伝子の発現に及ぼす影響

卵成長期における*Hsf-1*、*Hsf-2*そして*Pbx-1*の発現抑制を行い、クラスター遺伝子の発現に与える影響を解析した。標的となる遺伝子ごとに2種類のsiRNAを設計し、GOに顕微注入を行った。*Pbx-1*には2種類のvariant (va, vb)が存在するが、その共通配列部分に対するsiRNAを設計した。12日間の*in vitro growth*の後、*Fbxw*クラスター遺伝子である*Fbxw12*、*Fbxw15*の発現解析を行った。各解析には15個の卵を使用し、独立した3回の実験を行い、いずれにおいても同様の結果が得られた。

図 II-6

A.



B.

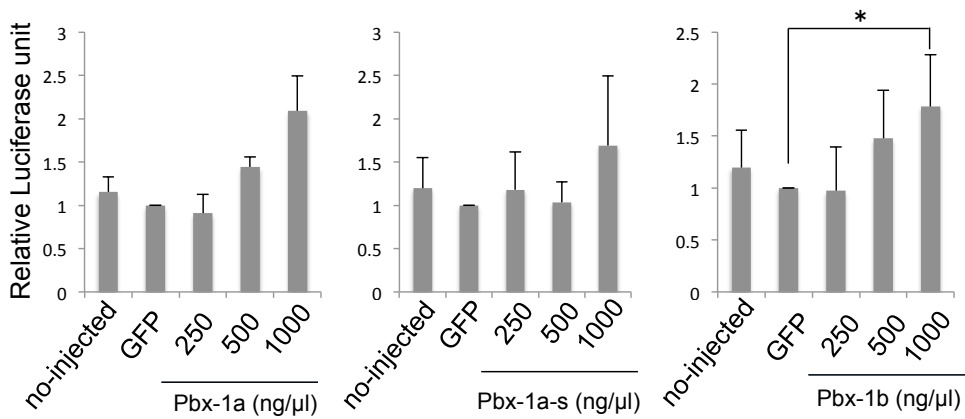


図 II-6. 転写因子過剰発現卵における転写活性解析

Flagタグを付加した*Hsf-1*、*Hsf-2*そして*Pbx-1 variant a (Pbx-1a)*、*variant a short (Pbx-1a-s)*、そして *variant b (Pbx-1b)* RNAを顕微注射し10時間培養する事で転写因子を発現させたGO卵の核へ *Fbxw12* TSS上流 1Kb配列を有するLuciferase vector、内部標準用のThymidine kinase vectorを顕微注射し、Luciferase活性を測定した。各解析には10個の卵を使用し、独立した3回の実験を行った。バーは標準誤差を示す。統計処理はpaired t-testにより行い、*は $p < 0.05$ を表す。

第 3 章

Fbxw クラスタ遺伝子の機能解析

緒言

Fbxw 遺伝子はその構造中に F-box 及び WD ドメインを持つ遺伝子である。F-box は今から 20 年前に *Cyclin F* で最初に見いだされたドメインであり (Bai et al., 1994)、この F-box を持つタンパク質は主に、タンパク質分解経路の1つユビキチン-プロテアソーム経路 (UPP) において特定のタンパク質の認識と分解に機能していることが知られている。UPP においては分解を受ける標的タンパク質に対してユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2) とユビキチンリガーゼ (E3) が結合することで標的タンパク質がポリユビキチン化され、分解が起こることが知られているが、このうち E3 として働くリガーゼは基質と特異的に結合することでポリユビキチン化される標的タンパク質の決定に関与する。この E3 リガーゼの数は標的となるタンパク質の多さに比例して非常に多く、哺乳類では約 1000 種類の E3 リガーゼが存在しているといわれており、その構成から HECT 型、U-box 型及び RING-finger 型の大きく 3 つに分類される (Berndsen et al., 2014)。このうち F-box ドメインを持つ遺伝子は RING-finger 型に属する Cullin 型 E3 に分類され、F-box ドメインを介して Suppressor of kinetochore protein1 (SKP1) と結合、さらに CULLIN や RING-BOX1 などと複合体を形成してタンパク質分解に関与することが知られている (Hindley et al., 2011)。実際に、*Fbxw* 遺伝子 family に属する遺伝子のうちクラスターに属さない遺伝子である *Fbxw7* は慢性骨髄性白血病におけるがん幹細胞中で c-MYC のユビキチン化を行うことで細胞周期を静止期に停止させ、抗がん剤に対する抵抗性を獲得させているほか (Takeishi et al., 2013)、*Fbxw5* についても細胞骨格である ACTIN の制御に関わる因子を G2 期に分解するこ

とで細胞周期の M 期への移行に働いていることが示されている (Werner et al., 2013)。

一方で、減数分裂時には UPP による様々な分解が起きていることが報告されている (Karabinova et al., 2011)。卵における減数分裂の再開と進行は MPF の活性により制御されていることが知られているが、この活性は CDK1 と CYCLIN B による複合体の形成、および CDK1 のリン酸化によって制御されている。第一減数分裂間期で細胞周期を停止した成長卵において CDK1 と CYCLIN B は複合体を形成し CDK1 の活性化に必要な Threonine 161 のリン酸化修飾も起きているものの、同時に活性を抑制する Threonine 14・Tyrosine 15 のリン酸化も起きているため、MPF としては不活性の状態にある (Solc 2010)。これが、成長卵が脳下垂体前葉から分泌される黄体形成ホルモンの刺激により減数分裂を再開する際には、CDC25 により CDK1 に付加された不活性化修飾が除去されることで MPF が活性化し、卵核胞崩壊と染色体の凝集が起こる。その後、第一極体が放出される前には E3 リガーゼである APC/C の働きにより CYCLIN B が分解されることで MPF が不活性され、この一時的な活性の減少が第一極体の放出に必要であることが知られている (Pesin et al., 2008)。またこの APC/C の活性制御に関わる SAC や *Cyclin B* の翻訳制御機構においても UPP が機能している可能性が示されているものの、その詳細な分子機構は未だ明らかにされていない。

そこで、減数分裂における *Fbxw* クラスター遺伝子の機能を明らかにするため、siRNA を用いた発現抑制実験を計画した。しかしながら *Fbxw* クラスター遺伝子は出生後の早い時期から卵において高発現しているため (Chesnaye et al., 2008)、減数分裂における機能を明らかにするためには可能な限り早い段階からその発現を抑制する必要がある。本研究では出生後 12 日のマウスより採取した成長期卵-顆粒膜細胞複

合体中の成長期卵に siRNA を顕微注入したのちに 12 日間、体外で培養を行う *in vitro* growth (IVG) 実験系を用い (Pesty et al., 2007, Inoue et al., 2010)、*Fbxw* クラスターに属する全遺伝子の同時発現抑制時に観察される減数分裂における変化とその原因について解析を行った。第 3 章ではこの発現抑制系を用いて *Fbxw* クラスター遺伝子全ての発現を抑制した卵における減数分裂の異常について解析を行うことで、*Fbxw* クラスター遺伝子の機能を明らかにすることを試みた。

結果

Fbxw クラスタ全遺伝子の発現抑制による卵成長への影響

Fbxw クラスタ遺伝子の機能解析にあたり、siRNA を用いてクラスタに属する全遺伝子の発現を同時に抑制する方法の確立を試みた。まず始めに、*Fbxw* クラスタ遺伝子のコーディング領域を比較した結果、クラスタに属する全 15 遺伝子のうち *Fbxw19*、23、25 を除く 12 遺伝子は F-box ドメインをコードする配列中に共通する 19 base の配列 (5'-ATGCCTACAGTTTGCTACA-3') を持ち、また *Fbxw19*、23、25 もこの 19 base のうち 1 塩基だけが異なる配列を有している (5'-ATGCCTACAGTTTGCTACA-3' もしくは 5'-ATGCCTACAATTTGCTACA-3') ことから、この配列に対する siRNA により *Fbxw* クラスタに属する遺伝子の発現を同時に抑制することが出来るのではないかと考えた。さらにこの配列を query として mouse refseq 遺伝子を対象とした BLAST 検索を行った結果、*Fbxw* クラスタ外の遺伝子が持つ相同な配列においては最少でも 5 塩基の mismatch が存在していたため、off-target 効果がおこる可能性も高くないと考えられた (Naito 2004)。そこでこの 19 塩基の配列に対する siRNA を設計し (表 3)、12 日齢のマウスより得た GO-顆粒膜細胞複合体中の GO へ顕微注入し、12 日間の IVG により GV 卵を得て、*Fbxw* クラスタ遺伝子の発現変化について逆転写 PCR による解析を行った。その結果、クラスタに属するすべての遺伝子において、siRNA-IVG による mRNA レベルでの発現抑制が観察された (図 III-1 A)。そこで、この実験系を用いて *Fbxw* クラスタ遺伝子の卵成長への影響を解析した。具体的には、siRNA-IVG により得られた *Fbxw* クラスタ遺伝子発現抑制卵、コントロール siRNA 注入卵及び siRNA 未処理卵それぞれの写真を

撮影し、画像解析ソフト Image J を用いてその面積を測定し比較を行った。その結果、各実験群の卵の面積に変化は見られなかった (図 III-1 B)。このことから *Fbxw* クラスタ一遺伝子は、少なくとも出生後 12 日齢以降の卵成長に必須では無いことが明らかとなった。

Fbxw クラスタ一遺伝子の減数分裂への関与

次に、*Fbxw* クラスタ一遺伝子の減数分裂への関与を明らかにするため、*Fbxw* クラスタ一遺伝子発現抑制卵へ減数分裂の再開を誘導しその後の変化を観察した。IVG の結果得られる FGO はその周囲に存在する卵丘細胞と複合体を形成しており、この中で卵は卵丘細胞から供給される cAMP の働きによって細胞周期が停止され、第一減数分裂前期にとどまった状態にある (Tay J 2000)。そこで IVG により得られた複合体から卵丘細胞を除去することで卵細胞への cAMP 供給を遮断して減数分裂の再開を誘導し、引き続いて起こる卵核胞崩壊と第一極体の放出について観察を行った。*Fbxw* クラスタ一遺伝子発現抑制卵、siRNA 未処理及びコントロール siRNA 処理卵における減数分裂の進行を観察した結果、いずれの実験群においても卵核胞崩壊は観察されたものの、*Fbxw* クラスタ一遺伝子発現抑制卵においてはその後の第一極体が放出されないことが明らかとなった (図 III-2 A、B)。また減数分裂再開誘導後 24 時間まで観察を継続したところ第一極体の放出は見られなかったことから (データ非掲載)、この現象は減数分裂の遅延ではなく停止であることが明らかとなった。以上の結果より、*Fbxw* クラスタ一遺伝子は第一減数分裂において何らかのかたちで第一極体放出に関与している可能性が示された。

Fbxw クラスター遺伝子発現抑制卵における減数分裂調節機構の解析

前述の実験により明らかとなった *Fbxw* クラスター遺伝子発現抑制卵における第一極体放出異常の原因を明らかとするため、*Fbxw* クラスター遺伝子発現抑制卵における減数分裂制御機構の変化について解析を行った。減数分裂が進行し第一極体が放出されるためには核膜消失に続いて染色体が凝集し、紡錘体が形成される必要がある。そこでまず始めにこの点に着目し、*Fbxw* クラスター遺伝子発現抑制卵における染色体と紡錘体の構造について免疫染色法により解析を行った。染色体の凝集を DAPI 染色により、紡錘体の形成を α -*tubulin* の染色により観察した結果、いずれの実験群においても染色体は正常に凝集し、紡錘体の形成にも差異は観察されなかった (図 III-3)。そこで次に、MPF 活性に着目した解析を行った。卵における減数分裂の再開と進行は MPF の活性により制御されており、MPF の活性化により GVBD が誘起され、染色体が凝集する。そして、その一時的な活性の減少が第一極体の放出に必要なことが知られている (Adhikari 2014)。そこでこれら減数分裂の進行に伴う MPF 活性の変化について、H1 kinase assay により解析した。その結果、減数分裂再開時の MPF 活性化はコントロール siRNA 処理卵、*Fbxw* クラスター遺伝子発現抑制卵ともに観察されたものの第一極体放出前に起こる一時的な不活性化は *Fbxw* クラスター遺伝子発現抑制卵において観察されず、さらに活性が上昇し続けていることが明らかとなった (図 III-4)。この結果より *Fbxw* クラスター遺伝子の発現が抑制された卵細胞中では第一極体の放出に必要な MPF 活性の不活化が起こらず、正常な減数分裂の進行に必要な MPF 活性の制御に異常が生じており、これが原因で第一極体が放出されなかったと考えられる。

考察

Fbxw クラスターについては、その存在自体は知られているものの、そこに属する遺伝子が持つ機能については全く未知の状態が続いていた。そのような中で昨年、クラスターに属する *Fbxw15* 遺伝子の機能について解析を行った論文が一報、報告された。*histone acetyltransferase binding to origin recognition complex* (HBO1) はエピジェネティックな変化を介して細胞周期の制御に関わる histone acetyltransferase family の一員であり、体細胞分裂において G1 期後期にヒストン H3 及び H4 をアセチル化することで DNA 複製に関与する因子である。細胞周期の進行には適切な時期に HBO1 が分解されることが必要であるが、その反応を担う因子がそれまでに明らかとなっていなかったため、筆者達は細胞周期の調節機構として頻繁に用いられる UPP に着目し、様々な F-box タンパク質を細胞に過剰発現し HBO1 の分解が見られる因子を探索した。その結果、*Fbxw* クラスターに属する FBXW15 が HBO1 に直接結合し、その分解に関与する能力を有していることを明らかにした (Zou et al., 2013)。また、この論文では同じクラスターに属する *Fbxw14* の強制発現では HBO1 の分解は見られず、同一クラスターに属する遺伝子が異なる機能を持つ可能性を示している。しかしながらこの研究にはいくつかの問題点が存在する。まず、使用している細胞における *Fbxw15* の発現量に問題がある。筆者らはマウス肺上皮細胞を実験試料として用いており、qRT-PCR により *Fbxw15* の発現が見られたと報告している。しかしながら本研究において行った発現解析の結果、肺組織では *Fbxw15* の発現は見られな

った。これを裏付けるかのように、筆者らが本論文で行った実験はほぼ全て、*Fbxw15* の過剰発現によって行われている。これでは行った実験から真に内在性を反映した結果が得られているか、疑わしい。さらに、強制発現以外に内在性 *Fbxw15* に対する shRNA を用いた解析も行っているものの、その shRNA の配列は論文中に明記されておらず、どのような shRNA を使用したのかが不明である。F-box を持つ遺伝子は数多く存在しているため、もしもこの領域に標的を設定した shRNA である場合、副作用についての検討を行う必要があり、この点についての考慮が不足している場合、他の F-box タンパク質の発現も抑制してしまいその結果を観察してしまう可能性もある。さらには、発現が非常に低い細胞を用いて行った発現抑制実験によって得られた結果が信頼するに足るものであるかは疑問である。以上より *Fbxw15* が持つ機能についての報告は信憑性が低く、依然として *Fbxw* クラスター遺伝子の機能については未解明の状態が続いているといえる。

そこで、本章では *Fbxw* クラスター遺伝子の減数分裂への関与とその機能を明らかにするため、クラスターに属する全遺伝子に共通した配列に対する siRNA を設計し、*in vitro* growth の実験系を用いて発現抑制実験を行った。その結果、卵成長期における *Fbxw* クラスター遺伝子発現抑制は卵減数分裂再開後の第一極体放出異常を生じることが明らかとなった。またその卵内では MPF 活性制御の異常が生じていることも明らかとなった。この時期に MPF 活性の制御を担う因子として *Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome* (APC/C) が知られている (Pesin et al., 2008)。

APC/C は体細胞及び減数分裂において機能するユビキチンライゲースで

あり、異なる相互作用因子と結合することで様々な因子を標的として分解することが知られている (Peter 2006, Pesin et al., 2008)。卵成長終了後の成長卵において APC/C は CDH1 と複合体を形成し、CYCLIN B を分解することで MPF 構成を阻害し、減数分裂の進行を抑制している。その後、卵核胞崩壊後に APC/C-CDH1 はその標的を CDC20 に変更し、これを分解することで CDC20 を活性サブユニットとして CYCLIN B 分解に働く APC/C-CDC20 の機能を抑制し、MPF の活性化を行う (Reis et al., 2007)。しかしながらこの時の細胞内では spindle assembly checkpoint (SAC) が機能し、MAD2 が APC/C-CDC20 の活性サブユニットである CDC20 に結合することで、紡錘体形成が正常に終了するまでの間、APC/C-CDC20 の働きは抑制されている (Homer et al., 2005)。その後、紡錘体の形成が完了すると SAC がオフとなり、APC/C-CDC20 が活性化されて CYCLIN B が分解される。このことから、Fbxw クラスタ発現抑制卵においては APC/C-CDH I の不活化や MAD2 の CDC20 からの解離など、APC/C-CDC20 を活性化するために必要な反応が起こらなかったことが原因である可能性が考えられる (図III-5)。F-box ドメインを持つ Fbxw クラスタ遺伝子がこれらの因子に直接結合して分解に関与しているのか、他の因子の分解を介した制御を行っているのか、はたまたユビキチン化とは全く異なる機能によってその制御を行っているかは現時点で全く不明である。今後、Fbxw クラスタ遺伝子の相互作用因子の探索などにより、詳細な解析が行われることが期待される。

また、クラスタ遺伝子の1つである *Fbxw15* は、出生後 24 時間の雌マウス卵巣中で既に発現が上昇していることが示唆されている (Chesnaye et al., 2008)。このことから、より早い時期の卵形成過程においても、*Fbxw* クラスタ遺伝子

が何らかの機能を有している可能性が考えられる。今回用いた *in vitro growth* の実験系ではこの時期の発現抑制は不可能であるため、例えば *Zp3* 遺伝子のプロモーターなどを使用したコンディショナルノックアウトの作製・解析を行うことで、*Fbxw* クラスタ遺伝子が卵形成過程全般にわたって担う機能の全容を明らかにすることが出来るであろう。

図 III-1

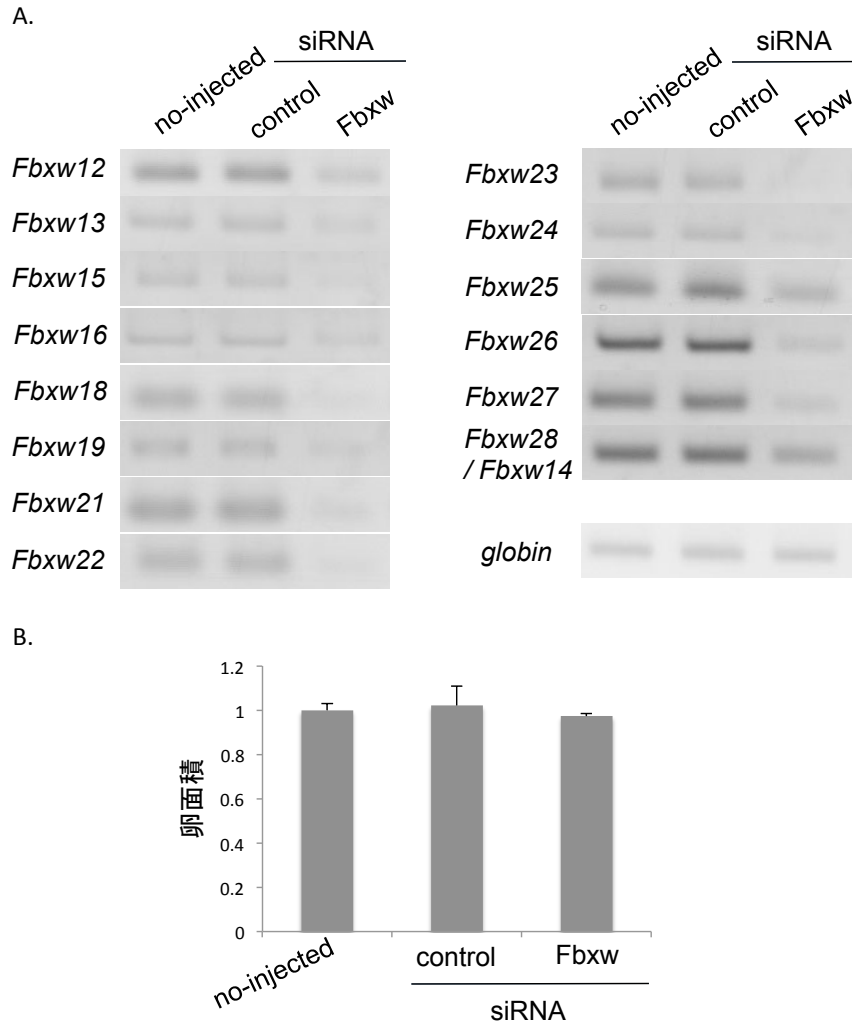


図 III-1. *Fbxw* クラスター遺伝子の発現抑制と卵成長

Fbxw クラスターに属する15遺伝子のコード領域配列を比較し、共通する19 bの配列を標的とする siRNA を作製した。この siRNA を成長期卵へ顕微注入した後 *in vitro* growth を行い、A) 得られた卵におけるクラスター遺伝子の発現を RT-PCR により解析した。B) *in vitro* growth により得られた *Fbxw* クラスター遺伝子発現抑制卵における卵成長について解析を行った。卵の写真撮影し、画像解析ソフト Image J により面積を測定し比較を行った。

図 III-2

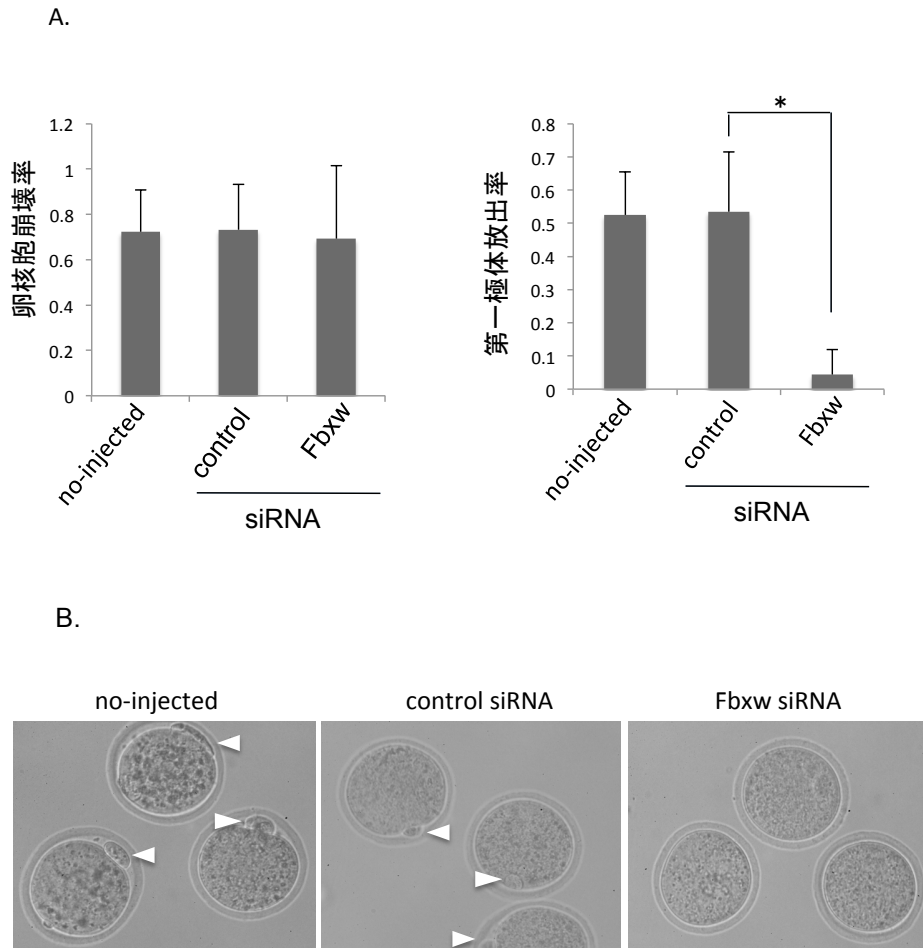


図 III-2. *Fbxw* クラスター遺伝子発現抑制卵における減数分裂の進行

Fbxw クラスター遺伝子の発現を抑制した卵に減数分裂の再開を誘導し、A) 18時間後に卵核胞崩壊及び第一極体放出率を観察した。B) 減数分裂再開後18時間の卵の写真を撮影した。矢頭は放出された第一極体を示す。6回の独立した解析を行い、各実験群とも200個以上の卵を解析に用いた。バーは標準偏差を示し、統計処理は χ^2 乗検定により行った。*は $p < 0.05$ を示す。

図 III-3

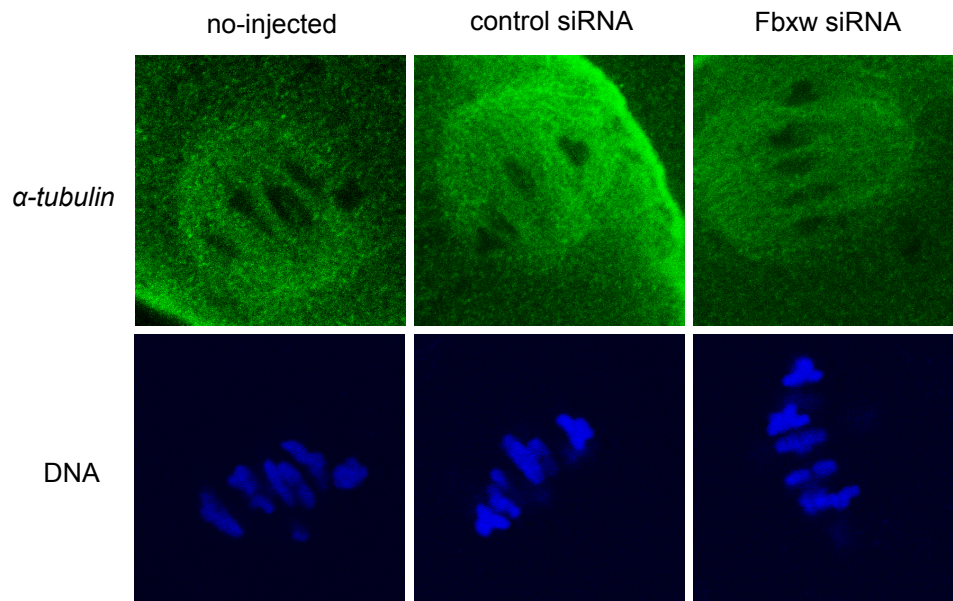


図 III-3. *Fbxw* クラスター遺伝子の発現抑制卵における染色体凝集、紡錘体形成

RNAiにより*Fbxw*クラスター遺伝子の発現を抑制した成長卵に減数分裂再開を誘導し、6時間後の卵における染色体と紡錘体の構造をDAPI染色および抗 α -tubulin抗体を用いた免疫染色により解析した。3回の独立した実験を行い、各群とも計30個以上の卵を解析に使用した。

図 III-4

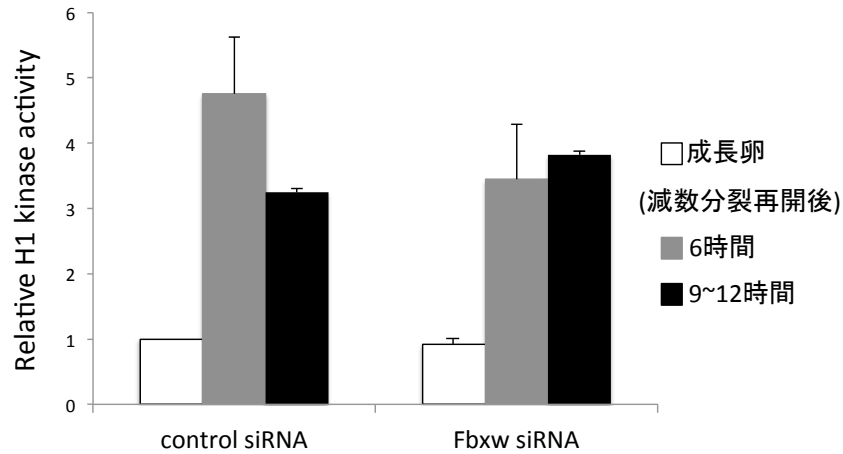


図 III-4. *Fbxw*クラスター遺伝子の発現卵におけるMPF kinase活性の変化

IVGにより*Fbxw*クラスター遺伝子の発現を抑制した成長卵と減数分裂再開を誘導して6時間後、及び9~12時間後の第一極体を放出する兆しが見られる/放出を終えた卵におけるMPFの活性を、H1 kinase assayにより解析した。得られた結果はcontrol siRNA処理群の成長卵における値に対する相対値で表した。1回の実験には15もしくは20個の卵を使用し、計3回の独立した実験を行った。

図 III-5

第一極体放出時

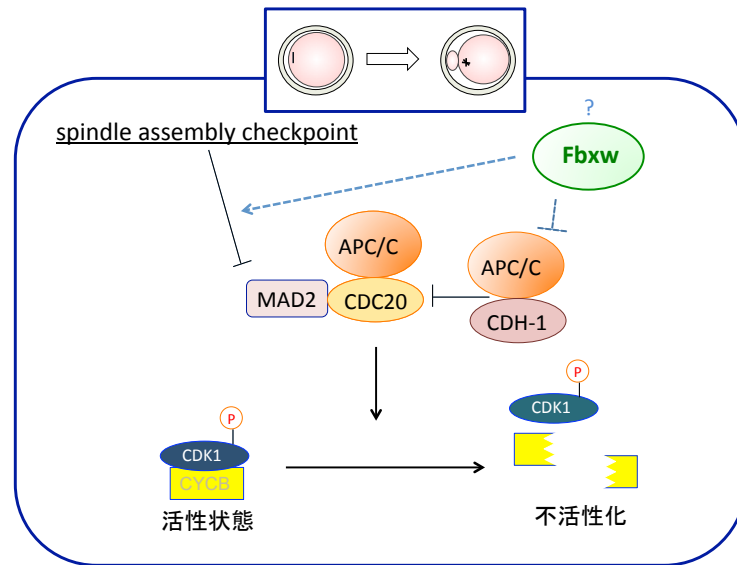


図 III-5. *Fbxw*クラスター遺伝子の減数分裂における機能予想図

*Fbxw*クラスター遺伝子の発現抑制によりMPFの不活性化が見られなくなったことから、*Fbxw*クラスター遺伝子はAPC/C-CDH Iの不活化やMAD2のCDC20からの解離など、APC/C-CDC20を活性化するために必要な反応に関与している可能性が考えられる。

総括

本研究ではマウス卵減数分裂に関与する因子を新たに探索、同定する目的で実験を行った。そのために採用した手法が RNA-seq による卵・初期胚におけるトランスクリプトーム解析結果を用いた探索法であり、今回は減数分裂がおこる卵、1細胞期胚において減数分裂に関与する因子がとり得る発現プロファイルを想定し、それに沿った解析基準を設定することで候補となる遺伝子の絞り込みを行った。この方法は、従来、一般的に行われてきた、細胞でのある変化に着目してそれに関与する因子の探索を行う研究とは逆に、大きな細胞現象に着目してそれに関係する可能性を持った因子を網羅的に探索した後に、それぞれのピースがはまる部分を明らかにする方法であり、各遺伝子の発現量が正確に与えられる RNA-seq を用いた絞り込みによって初めて可能となる方法である。その実験的な正当性は今回、絞り込みにより得られた候補遺伝子の中に卵特異的に発現、機能することが既に明らかとなっている遺伝子が多く含まれていたことから明らかである。

今回行った新規遺伝子探索方法の独自性の高い点としてもう1つ、“卵特異的”という特徴に加えて減数分裂機構に関与する因子が持つであろう遺伝子発現における特徴（“受精後の急激な mRNA 分解”）を組み合わせる絞り込みを行った点である。これまでに“卵特異的”という単独の選択基準を用いて因子の探索を行う研究は数多く行われている。しかしながら、その方法では探索の結果得られる解析候補が膨大な数にのぼり、かつ対象が持つ性質が漠然として

いるため、効果的な探索とはいえない。そこで、同定したい遺伝子が持つ複数の特徴に着目することで、より焦点を絞った検索が可能となる。またこの方法では異なる特徴に着目することで新たな検索を展開することが出来る。例えば、減数分裂に関わる母性 mRNA が受ける特徴的な制御として翻訳調節が存在する。これは、転写活性を持たないために転写を介した時期特異的発現制御を行うことが出来ない卵母細胞に蓄積された mRNA の中から、その時期に必要な因子を選択的に翻訳する機構であり、そのために用いられている機構が細胞質中での mRNA のポリアデニル化である (Bermseok et al., 2000, Piccioni et al., 2005, Meijer et al., 2007)。この翻訳制御に必要な配列として、Cytoplasmic Polyadenylation Element (CPE) が知られている。CPE はポリ A が伸長される mRNA の 3'UTR 領域内に存在する配列であり、ここに CPEB と呼ばれる RNA 結合タンパク質が結合することで、mRNA への細胞質ポリアデニル化機構が働き、ポリ A 鎖が伸長され翻訳が促進される (Vilalba et al., 2011)。このことから、卵において高発現し受精後に急激な分解を受ける母性 mRNA であり、さらに 3' UTR に CPE を持つ遺伝子を探索することで、今回の解析では得ることが出来なかった、減数分裂に関与する因子を新たに同定することが可能となるかも知れない。このように、本研究において採用した手法は卵及び初期胚における新規遺伝子の同定法として汎用性があり、今後の活用が期待される。

今回解析の対象とした *Fbxw* 遺伝子のクラスターは他の生物種では見られず、マウスゲノム上にのみ存在しており、なぜこのような遺伝子増幅がマウスでのみ起きたかは非常に興味深い問題である。マウス *Fbxw* クラスターに属する遺伝子の配列を他の生物が唯一持つ *Fbxw12* の配列と比較した結果、ほぼ全ての生物

種の *Fbxw12* においてマウス *Fbxw12* が最も高い相同性を示したことから (データ非掲載)、マウスに存在する *Fbxw* クラスタはこの *Fbxw12* が増幅されることで形成されたと考えられる。一般的に同一の機能を持つ遺伝子が増幅される場合、その遺伝子が持つ機能は生物の生存に必須であるもしくはその生存が有利となるものが多い。例えば、感覚のうち匂いに依存することが多いマウスにおいて、嗅覚受容体の数はヒトの約 1.5 倍以上存在することが報告されている (Young et al., 2002)。またある種のウイルス性感染症に対する抵抗性遺伝子も、ヒトでは 3 個の遺伝子がクラスタを形成しているのに対して、マウスでは 10 個の遺伝子が存在することが報告されている (Mashimo et al., 2003)。このことから、*Fbxw* クラスタ遺伝子が持つ機能はマウス個体の生存に重要な役割を担っていることが示唆される。また、発現量に着目して見てみると、*Fbxw* クラスタに属する遺伝子の GO における発現量は非常に高く、クラスタ外の遺伝子の平均 Rpkm が 19 であるのに対して、クラスタに属する全 15 遺伝子のうち RNA-seq による解析結果が得られた 11 遺伝子の平均値は約 145 となっている (データ非掲載)。この値は非常に高く、この事実からも *Fbxw* クラスタ遺伝子の発現とその機能の重要性が伺える。他の生物ではこの機能を担う他の遺伝子が存在するのか、またマウスにおいては何らかの理由により単一の遺伝子から大量に転写を行うことが不可能であるために遺伝子重複が起きたかを明らかにするためにも、他の生物における *Fbxw* 遺伝子の発現と機能解析が待たれる。

受精前後の卵及び初期胚には未だその詳細な分子機構が明らかにされていない、生命科学的に重要な現象が数多く存在している。本研究をプロトタイプとして様々な現象に関連する因子についての研究が行われ、生命の原点でありな

がら現代においても未知の領域が多い卵及び初期胚についての理解が深まるこ
とが期待される。

謝辞

本論文を完成するにあたり、大学院入学以来6年半に渡って研究についてご指導、ご助言頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科 青木不学 教授に心より感謝致します。要領が悪く、また決して素直な学生とは言い難い私がここまで来ることが出来たのは先生のおかげです。本当にありがとうございました。また、貴重なご助言を数多く頂きました鈴木 G 雅京 准教授に深謝致します。

本研究科入学してから今日まで、多くの先輩方から実験手法を教わり、日々のディスカッションによって科学的思考力を磨かれ、また後輩諸君への指導を通じて実に様々なことを体験し、学ばせてもらいました。研究者としての私を育ててくれた資源生物制御学分野全ての OB・OG そして後輩達に心より感謝いたします。どうもありがとうございました。

最後に、私の研究者という生き方に理解を示し、日々惜しみない支援と励ましを与え続けて下さいました父、母、そして家族と妻に、この場を借りて心より感謝申し上げます。ありがとうございました。

材料と方法

実験動物、材料と培地

本研究では東京大学動物実験実施マニュアルに従い、B6D2F1 (BDF1) 系統の雌マウス (SLC Japan Inc., Shizuoka, Japan) より卵及び初期胚を採取した。また使用した PCR プライマーは Life technologies Japan (Tokyo, Japan) またはグライナージャパン (Tokyo, Japan) に合成を依頼した。

卵及び初期胚の培地は、以下の様に用意した。KSOM-HEPES 培地を除く各培地は 35 mm のペトリディッシュにドロップを滴下してミネラルオイル (SIGMA-Aldrich, MO USA) で覆い、38°C、5% 二酸化炭素条件下で予め 1 晩インキュベートした。また KSOM-HEPES 培地はミネラルオイルを張らず、こと前のインキュベートも行わずにそのまま使用した。

卵の採取

成長期卵は 6 日もしくは 12 日齢の BDF1 雌マウスから採取した。マウスは頸椎脱臼法によって屠殺しその卵巣を摘出して KSOM-HEPES 培地 (Lawitts et al., 1993) 中においた。注射針を用いて卵巣の卵胞を破壊し、放出された成長期卵 (growing oocyte; GO) からガラスピペットを用いたピペッティングにより周囲の卵丘細胞を取り除くことで成長期卵を得た。成長卵は採卵 48 時間前に血清性性腺刺激ホルモン (ASKA pharmaceutical, Tokyo, Japan) 5 単位を腹腔内に注射した 8-12 週齢の雌マウスの卵巣から、0.2 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; SIGMA-Aldrich) を含む

KSOM-HEPES 培地中に成長期卵と同様の方法により採取した。

体外受精

体外受精に使用するマウスには予め過排卵処理を行った。すなわち、3 週齢の BDF1 雌マウスに 5 単位の血清性腺刺激ホルモンを腹腔内注射し、その 48 時間後にヒト絨毛性腺刺激ホルモン (ASKA pharmaceutical) を 5 単位、同様に腹腔内投与することで排卵を誘導した。この 16 時間後に頸椎脱臼法によってマウスを屠殺して開腹し、卵管膨大部から第 2 減数分裂中期 (metaphase II) にある成熟卵を 10 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA; SIGMA-Aldrich) を含む HTF 培地 (Quinn et al., 1984) に採取した。この卵に対して、ICR 雄マウス (SLC Japan Inc, Shizuoka, Japan) の精巣上体尾部から採取し、受精能を獲得させるために予め HTF 培地で 2 時間前培養した精子を加え、体外受精を行った。媒精 6 時間後に受精卵を KSOM 培地に移してガラスピペットを用いたピペッティングにより透明帯外に付着した精子や卵丘細胞を除去し、実体顕微鏡下で前核を 2 つ有するものだけを選択して単為発生卵や多精子受精卵をその後の解析から除いた。その後も KSOM 培地中で 37°C、5% 二酸化炭素条件下で培養を継続し、1 細胞期 (受精後 13 時間)、2 細胞期 (28 時間)、4 細胞期 (43 時間)、桑実胚期 (60 時間)、そして胚盤胞期 (96 時間) の各段階で初期胚を回収、その後の解析に用いた。

体細胞培養

NIH3T3 細胞の培養にはウシ胎児血清 (Fatal Bovine serum; FBS, SIGMA-Aldrich) と penicillin/streptomycin (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Sigma-Aldrich) を、マウス胚性幹細胞である CGR-8 細胞には

penicillin/streptomycin、非必須アミノ酸、2-mercaptethanol、ノックアウト血清リプレイスメントと白血病阻害因子（以上、全て Wako Pure Chemical Industries より購入）を添加した Glasgow minimum essential medium（Gibco-BRL）を用いた。細胞の培養は 37°C、5%二酸化炭素条件下で行い、コンフルエントに達した細胞は PBS (-)（Gibco-BRL）で洗浄した後に 0.25% trypsin-1 mM EDTA（Wako Pure Chemical Industries）で剥離し、遠心分離によって回収した。沈殿した細胞は新鮮な培地に懸濁して単一細胞としてから新しい培養皿に播種し、維持した。その際、CGR-8 細胞は、予め 1%ゼラチンで処理した培養皿へ播種した。

逆転写-PCR

逆転写 (RT) -PCR に用いた卵、初期胚は 0.1 mg/ml BSA を含むリン酸緩衝液 (Phosphate Buffered Saline; PBS, TAKARA Bio, Shiga, Japan) で洗浄後 400 μ l の ISOGEN（Nippon Gene Co., Toyama, Japan）に入れ、-80°Cにて一時保存した。脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、卵巣は 3 週齢の BDF1 系統の雌マウスより、精巣は雄マウスより採取し PBS で洗浄後、400 μ l の ISOGEN に入れて-80°Cにて一時保存した。細胞株である NIH3T3、ES 細胞は PBS で洗浄した後に ISOGEN を培養皿に添加することで回収し、同様に-80°Cで保存した。室温に戻し 100 μ l のクロロホルムを加え激しく混合した後に 4°Cで 5 分間放置し、15,000 rpm、4°C 条件下で 15 分間遠心を行うことで形成される RNA の含まれる水層（上層）200 μ l を新しいサンプルチューブに移した。共沈剤として 20 μ g/ml Ethachinmate（Nippon Gene Co.）を卵及び初期胚由来の RNA サンプルに 1 μ l ずつ加えしっかりと攪拌した後、イソプロパノールを 200 μ l 加え、激しく攪拌した。4°Cで

30 分間インキュベートした後、15,000 rpm、4°Cで 15 分間遠心し、RNA の沈殿を得た。この沈殿を 500 μ l の 70 %エタノールで洗い、再び 15,000 rpm、4 °Cで 5 分間遠心した。エタノールを除去し、デシケーターを用いて 7 分間吸引乾燥した後、10 μ l の RNase free water を加えよく攪拌した。得られた total RNA サンプルは 55°Cで 10 分間インキュベーションすることにより完全に溶解し、cDNA 作製に用いた。

cDNA 作製のための逆転写反応には Prime script RT-PCR kit (TAKARA Bio) を使い、手順は全て添付のプロトコールに従った。抽出した Total RNA 8 μ l に 1 μ l の 10 mM dNTP Mixture、oligo (dT) primer もしくは Random 6mer primer を加え、全量を 10 μ l とした。この混合液を 65 °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後に 8 μ l を取り、4 μ l 5 \times PrimeScript Buffer、0.5 μ l RNase Inhibitor (40 U/ μ l) 、PrimeScript RTase 0.5 μ l、DEPC 処理水 5 μ l を加え、よく混合した。42 °Cで 30 min、95 °Cで 5 分間反応させたのち温度を 12 °Cに下げ、軽く遠心して反応液をチューブの底に集め、4 °Cで保存した。

作製した cDNA を鋳型とし、表 3 に示す各遺伝子特異的プライマーを用いて半定量 PCR を行った。方法は、2.5 μ l の 10 \times PCR buffer と 2 μ l の dNTP mix (2.5mM each) 、0.125 μ l の ExTaq HS (TAKARA Bio)、1.25 μ l の遺伝子特異的プライマー (sense \cdot anti sense、10 μ M each) を加え、全量が 25 μ l となるように滅菌蒸留水で調製して PCR 反応液を作成した。PCR 反応は 【94 °C, 2 分 \rightarrow (94 °C, 20 秒 \rightarrow 58-60 °C, 30 秒 \rightarrow 72 °C, 20 秒) (括弧内を 25-36 cycle サイクル反復)】 のプログラムを、iCycler (BIO-RAD-Laboratories, CA, USA) を用いて行った。

反応を終了した PCR 産物には 10 \times loading dye (TAKARA Bio) を加え、2% ア

ガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、エチジウムブロマイド染色後に UV トランスイルミネーターで可視化した。

リアルタイム PCR を行う際には上記の方法により作製した cDNA 1 μ l を鋳型とし、12.5 μ l の SYBR premix Ex Taq (TAKARA BIO) と 10 μ M の各遺伝子特異的 primer を forward、reverse それぞれ 1 μ l ずつ添加した後に滅菌蒸留水を加えて全量が 25 μ l となるように混合液を作製した。これを Thermalcycler Dice Realtime system II (TAKARA BIO) にセットして反応・解析を行った。

免疫染色

免疫染色に用いた各段階の卵及び初期胚は3.7%のパラホルムアルデヒド (PFA、Wako Pure Chemical Industries) を含むPBS中で1時間固定した後に1 mg/ml BSAを含むPBS (PBS/BSA) で洗浄し、次に0.5% Triton X-100 (SIGMA-Aldrich) を含むPBS/BSA 中で15分間室温処理した。その後、PBS/BSA で100倍に希釈した抗 α -tubulin抗体 (T6074, Sigma-Aldrich) 溶液中に移し4°Cで1晩処理をおこなった。一次抗体処理を終えたサンプルは、PBS/BSA で洗浄し、続けて200倍に希釈したAlexa 488標識抗マウス IgG 二次抗体を室温で60分間反応させた。PBS/BSA で洗浄後、卵をVectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) に移して標本を作製した。この時、DNA 染色のために最終濃度3.3 μ g/ml の4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) をVectashieldに添加した。蛍光観察にはZeiss社の共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Oberkochen, Germany) を用いた。

Reporter gene assay 用 Luciferase vector の作製

Fbxw 遺伝子の卵における発現制御機構を明らかにするため、luciferase vector を用いた reporter gene assay を行った。*Fbxw* クラスターに属する遺伝子のうち *Fbxw12* をモデルとして選択しその転写開始点 (Transcriptional start site: TSS) 上流 1 Kilo base (Kb) の配列情報を UCSC genome bioinformatics より取得し、その情報を基に表 3 に記載したクローニング用 primer を設計した (表 4)。この primer を用いて BDF1 系統のマウス尾より採取・精製した genomic DNA を鋳型とし、TAKARA EX Taq HS を用いた増幅を上記の方法により行った。PCR 反応液は 1% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、1 Kb の位置に現れた PCR 産物のバンドをゲルごと切り出し Wizard SV Gel and PCR clean up system (Promega, WI, USA) を用いて PCR 産物を抽出した。Luciferase 遺伝子をコードするプラスミドである pEluc-test vector (TOYOBO, Osaka, Japan) は制限酵素 Xho I、EcoR V (Thermo Scientific, MA, USA) を用いてそのマルチクローニングサイトを切断することで線状化して使用した。具体的には 5 μ g の pELuc plasmid に 0.2 μ l ずつの核制限酵素、5 μ l の 10 \times Fastdigest buffer に滅菌蒸留水を加えて総量が 50 μ l となるように調製し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間処理をおこなった。ゲルから抽出した PCR 産物も同様に Xho I、EcoR V を用いて PCR により付加した末端を切断し、線状化した pELuc-test vector と Ligation high (TOYOBO) と共に混合し、16 $^{\circ}$ C で 1 時間処理することで PCR 産物を plasmid vector に組み込んだ。反応後の vector 1 μ l を 10 μ l の *E.coli* DH5 α コンピテントセル (TAKARA BIO) に添加し氷上で 30 分間静置することで plasmid vector を取込ませ、42 $^{\circ}$ C-45 秒間の熱処理の後に SOC 培地を加えて培養し、L-carbenicillin (Novagen, Darmstadt, Germany) を含む LB

寒天培地上に播種して 37°C で 1 晩培養を行った。培養後、寒天培地状に形成されたコロニーを鋳型としてコロニーPCR を行い目的とする *Fbxw12* 遺伝子 TSS 上流配列を含む pELuc-test vector を持つ *E.coli* を選別し、この大腸菌を L-carbenicillin を含む液体培地中で 1 晩震盪培養した。培養により得られた *E.coli* は遠心分離によって集菌した後に GeneElute Plasmid miniprep kit (SIGMA-Aldrich) を用いて plasmid を抽出し、BigDye Terminator Cycle sequencing kit (Applied Bio systems, CA, USA) を用いた PCR の後に Big Dye XTerminator purification kit (Applied Bio systems) を用いて PCR 産物を精製し、3130xL Genetic Analyzer (Applied Bio systems) により DNA 配列を解析し組み込んだ目的配列に変異が無いことを確認した。

作製された *Fbxw12* TSS 上流 1 Kb の配列を含む pELuc-test vector (*Fbxw12*-Luc) を鋳型として各転写因子結合配列に変異を持つ plasmid vector を作製する際には、PrimeSTAR Mutagenesis Basal kit (TAKARA BIO) を用いた inverse PCR を行った。25 μ l の PrimeSTAR Max mix に 1 μ l の 10 pg/ μ l *Fbxw12*-Luc、そして表 4 に記した各変異導入用 primer を 1 μ M に調製した溶液を 5 μ l ずつ加え、滅菌蒸留水を用いて全量が 50 μ l となるよう調製した。この反応液を【(98°C, 10 秒 \rightarrow 55°C, 10 秒 \rightarrow 72°C, 60 秒) (括弧内の反応を 36 回反復)】のプログラムで反応させ、得られた PCR 産物を 2%アガロースゲルによる電気泳動で分離し、目的の位置に現れたバンドを上述した方法によりゲル抽出することで、変異を含む *Fbxw12*-Luc を得た。この plasmid vector 溶液 1 μ l を用いて *E.coli* の形質転換及び plasmid vector の抽出、DNA sequencing をおこない、各転写因子結合配列に変異が導入されたことを確認した。作製された *Fbxw12*-Luc、転写因子結合配列に変異が導入された各 *Fbxw12*-Luc 及びコントロールとして使用した、初期胚特異的発現を示す *Tkt11* TSS 上流 227 b の配

列を含む pELuc-test vector (*Tktl1*-Luc、Hamamoto et al., 2013)、転写制御配列を持たない pELuc-test vector (no-promoter) は 400 ng/μl に、内部補正に使用する Thymidine kinase vector は 800 ng/μl となるよう滅菌蒸留水を用いて調製し、-20°C で保存した。

Reporter gene assay

Fbxw 遺伝子の転写活性を測定するための reporter gene assay は、12 日齢の雌マウスより採取した GO 及び受精後 26 時間の 2 細胞期胚 (2-cell) を用いて行った。作製した各種 pELuc-test vector と Renilla vector は同量ずつ混合し borosilicate glass capillaries (GC100 Tf-10, Harvard Apparatus Ltd., Kent, UK) に入れ、Inverted microscope (ECLIPSE TE300, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) に設置した micromanipulator (Narishige Co., Ltd., Tokyo, Japan) に接続した。キャピラリー中に入れた plasmid は microinjector (IM300, Narishige Co., Ltd., Tokyo, Japan) により窒素ガスの圧力で押し出すことで、GO の核もしくは 2-cell のうち一方の割球が持つ核へ顕微注入した。顕微注入を行った卵は 5% FBS と 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF; Sigma Aldrich) を含む α-MEM 培地 (Gibco-BRL, NY, USA) 中で、2-cell は KSOM 培地中で 6 時間培養した後に PBS/BSA 中で洗浄し、10 個の GO もしくは 2-cell を 25 μl の PBS/BSA 中にサンプリングし、-80°C で保存した。

GO 及び 2-cell 中で発現した Luciferase の活性は Emerald Luc Luciferase assay Reagent を、内部補正となる Renilla は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定を行った。

強制発現用転写因子のクローニング

転写因子過剰発現下での reporter gene assay に供するため、*Hsf-1*、*Hsf-2* 及び *Pbx-1* (variant a、variant b) のクローニングを行った。5 μ l の 10 \times Buffer for KOD - plus-と 2 mM dNTPs へ 2 μ l の 25 mM MgSO₄、1 μ l KOD -plus-、マウス成長卵より調整した cDNA に 1.5 μ l の表 4 に記した各 primer を 10 μ M に希釈して加えた後に滅菌蒸留水を用いて 50 μ l とるよう調整し、以下の反応で PCR を行った【94 $^{\circ}$ C - 2 分 \rightarrow (98 $^{\circ}$ C - 10 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C - 30 秒 \rightarrow 68 $^{\circ}$ C - 1 分 30 秒) (括弧内を 35 サイクル反復)】。得られた PCR 産物は上述の方法に従ってゲル抽出を行った後に、*Hsf-1*・*Hs-2* の PCR 産物及びこれらを組み込む pcDNA3.1 EGFP- PolyA vector (Yamagata 2005) は EcoR I により、*Pbx-1* については HindIII および EcoR I を用いて制限酵素処理を行った後にライゲーション、トランスフォーメーションを行った。さらに、得られたコロニーを用いたコロニーPCR 及び DNA シークエンシングを行い、各転写因子のコード領域が正しく組み込まれた plasmid を得た。

得られた各 plasmid vector を鋳型として *in vitro* transcription による cRNA 合成を行った。各 plasmid vector を Xho I 処理によって線状化し、これを鋳型として mMESSAGE mMACHINE T7 kit (Ambion, TX, USA) を用いて cRNA の転写を行った。その際の反応は kit に添付された説明書の指示に従って行った。得られた cRNA は説明書に記載されたプロトコールに従ってリチウムクロライド沈殿による精製を行った後、実験に使用する各濃度に調整して -80 $^{\circ}$ C に保存した。

転写因子強制発現下での reporter gene assay

前述の方法によって作製した *Hsf-1*、*Hsf-2* 及び *Pbx-1* 各 variant をコードする mRNA を用いて reporter gene assay を行った。250、500、あるいは 1000 ng/ μ l に調整した各 mRNA 及び 1000 ng/ μ l の GFP mRNA を 12 日齢の BDF1 雌マウスより採取した成長期卵細胞質に顕微注入した後に 10 時間、 α -MEM 培地中で培養することで転写因子を過剰発現させた。この成長期卵核質中へ *Fbxw12*-Luc を顕微注入しさらに 6 時間培養を行った後、上述した方法により Luciferase 活性を測定した。

卵形成期における各転写因子および *Fbxw* クラスター遺伝子の発現抑制

卵成長期における発現抑制を行うため、siRNA を用いた *in vitro* growth の実験系による発現抑制を行った。注射針を用いて 12 日齢の BDF1 系統雌マウス卵巣から卵胞 (顆粒膜細胞と成長期卵の複合体) を採取し、5% FBS、500 μ g/ml インスリン、0.1 IU/ml 血清性性腺刺激ホルモン、5 ng/ μ l セレニウム、そして 5 μ g/ μ l トランスフェリン (以上全て Sigma-Aldrich より購入) を含む Alpha + Glutamax 培地 (IVG-MEM 培地、Gibco-BRL) に移して約 1 時間培養した。その後、(1). 卵胞外殻に傷が無く、成長卵周囲に 1、2 層の顆粒膜細胞層を持つこと、(2). 円形で成長期卵が中央に位置していること、そして (3). 卵胞の直径が 100-130 μ m であることを基準として質の高い卵胞を選別し (Pesty et al., 2007, Inoue et al., 2010)、顕微注入を行った。実験に使用した *Fbxw* クラスター遺伝子、*Hsf-1*、*Hsf-2* 及び *Pbx-1* に対する siRNA およびコントロールとして使用した GFP に対する siRNA (配列は表 5 に記載) はそれぞれ RNase free water を用いて 10 μ M に調整し、reporter gene assay と同様の装置・方法によって卵胞中の成長期卵細胞質へ顕微注入した。インジェクション終了後の卵胞は IVG-MEM 培地で約 1 時間培養した後にインジェクション前の選抜と同様の

基準により再び質の高い卵胞のみを選び、50 μ l の IVG-MEM 培地ドロップに各 6~7 個ずつ移し、卵胞同士が接着しないようにドロップ中に静置して 12 日間培養を行った。この間、2 日おきに各ドロップの半量を新鮮な培地と交換した。培養を終えた時点での卵の内径を 2 カ所測定し、卵成長率の解析を行った。また、ガラスピペットを用いたピペッティングにより卵丘細胞を剥離した後に α -MEM 培地に移し、18 時間培養を行うことで減数分裂の再開を誘導し観察を行った。

H1 kinase assay

MPF の活性を調べるため、MPF の本体である CDK1 のタンパク質リン酸化酵素活性を調べた。基質として、CDK1 に比較的特異性の高いヒストン H1 を用いた。減数分裂再開を誘導後各時間における卵 15 個を 50 mM Tris-HCl、15 mM MgCl₂、5 mM EGTA1%、20 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (以上、全て SIGMA より購入) 及び 5 μ l/ml protein kinase inhibitor (Roche, Basel, Switzerland) 及び 1% NP-40 (Nacalai,Kyoto, Japan) を含む H1 kinase assay reaction buffer 13 μ l 中にサンプルを添加し、-80°C で凍結した。氷上で融解した後に基質となる 1 mg/ml histone H1 (SIGMA, P0300-1MG) を 2 μ l 及び 3.33 μ M [γ -³²P] ATP (10 mCi/ml, PerkinElmer, NEG002A) 1 μ l を添加し、30°C の温浴において 15 分間反応させた後に 8 μ l の 4 \times sample buffer (0.25 M Tris-HCl (pH6.7)、30% glycerol、0.15% bromophenol blue、4% Sodium dodecyl sulfate、10% β -mercaptoethanol) を加えて 3 分間煮沸することで kinase 反応を停止した。この反応液を 10% SDS 変性 acrylamide gel 中で分離した後に CBB 染色と脱色を行い、30 KDa 付近に H1 のバンドが存在することを確認した。

得られたゲルはゲルドライヤーを用いて乾燥させた後に Carestream Kodak BioMax XAR Film (Kodak, NY, USA) に 10 時間室温で感光させた後に現像し、³²P-ATP の取り込み量を可視化した。得られたフィルム中のバンドのピクセル数を画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health, USA) により測定し、グラフに表した。

表 3 逆転写PCRに使用したprimer配列一覧

primer名	配列	
	Forward	Reverse
<i>Fbxw1</i>	CCTGTTTGCAGTACAGAGACAG	GCAGCCATAAGATCCCACAC
<i>Fbxw2</i>	GTATCTGCCTGCAGCCAAGA	CATCTCCAAAGCCAAGCAAGG
<i>Fbxw4</i>	GGGACTACATACATGACATCTAGC	GGTCCATTGCTATCAGCCCA
<i>Fbxw5</i>	GCTATCGGATTGTGCACTGGA	CATCTGGTGTGGCAGGATCT
<i>Fbxw7</i>	CGCTAACAGGACACCAGTCA	TCACAGCGCTCTGATGCTTG
<i>Fbxw8</i>	CTGTGGCTATCTCTCCTTC	CATAGGCATGGATCAGGCCA
<i>Fbxw9</i>	GGTGACCATCTATGATCCCAG	CATGCACAGGAGATAGGAGTC
<i>Fbxw10</i>	GTGGCAGTACAGCTCAGACA	GACTTCGCCTACAGGAGTTTC
<i>Fbxw11</i>	GATTGTCAGTGGCGCCTATGA	ATGGGAGCTGCTGATGATCTG
<i>Fbxw12</i>	CGATGGCTCTATGGATGTGTATG	TGCTCACATCGTCACATAGGGT
<i>Fbxw15</i>	GATATCAAGCTGGAAGAGTTTGGG	CAAATGACAATGACATGAAGGGGG
<i>Fbxw16</i>	AGACTACAAGGAGCGTGCAGA	GGTGACAATGACATGAACAGGG
<i>Fbxw17</i>	GCAGCCAGACTGATGGTGATA	TGAGGAGTCATAGTGTCCGG
<i>Fbxw19</i>	TGGATGGGAGTCAGTGATAAGGAT	GGTGACAATGACATGAACAGGG
<i>Fbxw21</i>	GCAGAACTATGAGGAGAGACCA	GCCATCATTACATGAGACGATGAC
<i>Fbxw22</i>	ATGGAGGTCTATTTACCTAGTTTG	TCAAGAGCAGACGTTCAA
<i>Fbxw23</i>	GGTCTCCATCTGCAGACATTTTC	AAGCTGGACGGTGGCAGATA
<i>Fbxw24</i>	ATGGAGATCCATTTGTCTAG	TCAAGAGCAGATGTTCAAG
<i>Fbxw25</i>	CATGTCATCATCACCTGTAACAATG	CCATGACCATCTCTCATCAACTG
<i>Fbxw26</i>	GAACATGAGGGGAGACCAGAA	CAGGTGATGATGACATGAACAGG
<i>Fbxw27</i>	TGACTACCCTCCCTGAGATG	CAATCGGGTCATCCTGGTAATG
<i>Fbxw28-14</i>	GGAGTCAGTGATAAGGACGTGAT	CAGGTGACAATGACATGAACAGG
<i>Hsf-1</i>	GATCTGGCCGTGGGCC	GGTCCTTGGCTTTATGGGGT
<i>Hsf-2</i>	GAAGCAGAGTTCCAACGTGC	TTAACTATCTAAAAGGGCATATCACT
<i>Pbx-1a</i>	TCATGAGCGTGCAGTCACTC	GTAGGGGAGGTCACTGATGAA
<i>Pbx-1 b</i>	GCGAATCCGGTACAAGAAGAAC	CACTGTATCCTCCTGTCTGGC
<i>Gapdh</i>	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
<i>globin (Rabbit)</i>	GTGGGACAGGAGCTTGAAT	ATTTCAAGCTCCTGTCCCAC

表 4 plasmid vector 構築に使用したprimer配列一覧

◦ クローニング用primer

primer名		配列
<i>Fbxw12</i> 1Kb	Forward	AGCCTCGAGTTAGAACTTTATTGTAGAAAGGCAAG
<i>Fbxw12</i> 1Kb	Reverse	AGGATATCTGACTCTCCTTTCTCCTCC
FLAG <i>Aml-1</i>	Forward	GCAGGTACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGGAGGATCGGGAGGAGCTTCAGACAGCATTTTTGAGTC
<i>Aml-1</i>	Reverse	GCAGAATTCTCAGTAGGGCCGCCACA
FLAG <i>Hsf-1</i>	Forward	GTACAAGTAAGAATTATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGGAGGATCGGGAGGAGATCTGGCCGTGGGCC
<i>Hsf-1</i>	Reverse	CCATGGTGGCGAATTCTAGGAGACAGTGGGGTC
FLAG <i>Hsf-2</i>	Forward	GTACAAGTAAGAATTATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGGAGGATCGGGAGGAAAGCAGAGTTCCAACGTGCC
<i>Hsf2</i>	Reverse	CCATGGTGGCGAATTTAACTATCTAAAAGCGGCAT
FLAG <i>Pbx-1</i>	Forward	GCTAAGCTTATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGGAGGATCGGGAGGAGACGAGCAGCCGAGGC
<i>Pbx-1</i>	Reverse	GCTGGATCCTCACTGTATCCTCCTGTCT

◦ 変異導入inverse PCR用primer

primer名		配列
<i>Hsf-1 -2 mutantant</i>	Forward	TTTCTATGGGGTTCTGAGAAGTACATC
<i>Hsf-1 -2 mutant</i>	Reverse	AGAACCCCATAGAAAATCCCGAGTAAC
<i>Pbx-1mutant</i>	Forward	CATCAGGAAGGAGGGCTGCCCCAGATCAT
<i>Pbx-1 mutant</i>	Reverse	CCCTCCTCCTGATGTACTTCTCAGAAC
<i>Aml-1 mutant</i>	Forward	GACCTAGCCTTGCAATCCTGCTAAAT
<i>Aml-1 mutant</i>	Reverse	TGACAAGGCTAGGTCATGAGGCTTTGAC

表 5 発現抑制実験に使用したsiRNA配列 一覧

標的遺伝子	配列
Fbxw クラスター	AUGCCUACAGUUUGCUACA[dT][dT] UGUAGCAAACUGUAGGCAU[dT][dT]
Hsf-1	1 ACACCGAGUUCAGCAUCCUUGUUU AAACAAGGAUGCUGGAACUCGGUGU
	2 GCUCUGGACCCAUAAUCUCCGAUUAU AUAUCGGAGAUUAUGGGUCCAGAGC
Hsf-2	1 CCAAGAGCAGUGUUGUUAACAUGU ACAUGUUGAACAAACUCUCUUGG
	2 CCCUGUGACCAUGAUGGACUCCAUU AAUGGAGUCCAUCAUGGUCACAGGG
Pbx-1	variant UUGCUCUCGAAGGAGGUUC[dT][dT]
	a GAACCUCCUUCGAGAGCAA[dT][dT]
	variant AGUGGAGCAUCCGACUAC[dT][dT]
	b GUAGUCGGAUUGCUCACAGU[dT][dT]
GFP (コントロール)	AUGGUGAGCAAGGGCGAGG[dT][dT] CCUCGCCCUUGCUCACCAU[dT][dT]

参考文献

Adhikari D, Liu K. (2014) The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 382 480-487

Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 545-555

Aoki F, Worrall DM, Schultz RM. (1997) Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 181 296-307

Bachvarova R, De Leon V, Johnson A, Kaplan G, Paynton BV (1985) Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol*, 108 325-31

Bai C, Richman R, Elledge SJ (1994) Human cyclin F. *EMBO J* 15 6087-98

Bermseok O, Hwang SY, McLaughlin J, Solter D, Barbara B (2000) Timely translation during the mouse oocyte-embryo transition. *Development* 127 3795-3803

Berndsen CE, Wolberger C (2014) New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol* 21 301-7

Chesnaye EDL, Kerr B, Paredes A, Merchant-Larios H, Mendez JP, Ojeda SR (2008) Fbxw15/Fbxo12J is an F-box protein-encoding gene selectively expressed in oocytes of the mouse ovary. *Biol Reprod* 78 714-725

Choi Y, Yuan D, Rajkovic A (2008) Germ cell-specific transcriptional regulator *Sohlh2* is essential for early mouse folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Biol*

Reprod 79 1176-1182

Clift D, Schuh M. (2013) Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14 549-562

Flemr M, MA J, Schultz RM, Svoboda P. (2010) P-body loss is concomitant with formation of a messenger RNA storage domain in mouse oocytes. *Biol Reprod*, 82 1008-17

Guertin ML, Lis JT. (2010) Chromatin landscape dictates HSF binding to target DNA elements. *PLoS Genet* 9 e1001114

Hamamoto G, Suzuki T, Suzuki MG, Aoki F (2013) Regulation of Transketolase like 1 gene expression in the murine one-cell stage embryos. *PLOS one* 9 e82087

Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, (2004) Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell* 6 117-131

Hashimoto N, Watanabe N, Furuta Y, Tamemoto H, Sagata N, Yokoyama M, Okazaki K, Nagayoshi M, Takeda N, Ikawa Y. (1994) Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature* 370 68-71

Heinemeyer T, WIngender E, Reuter I, Hermjakob H, Kei AE, Kei OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA. (1998) Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* 26, 362-7.

Hindley CJ, McDowell GS, Wise H, Philpott A (2011) Regulation of cell fate determination by Skp1-Cullin1-F-box (SCF) E3 ubiquitin ligases. *Int J Dev Biol* 55 249-60

Homer H, McDougall A, Levasseur M, Murdoch AP, Herbert M. (2005) Mad2 is required for inhibiting securing and cyclin B degradation following spindle depolymerisation in meiosis I mouse oocytes. *Reproduction* 130 829-843

Hunger SP, Galili N, Carroll AJ, Crist WM, Link MP, Cleary ML. (1991) The t(1;19)(q23;p13) results in consistent fusion of E2A and PBX1 coding sequences in acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 15 687-93

Inoue A, Aoki F. (2010) Role of the nucleoplasmin s C-terminal domain in the formation of nucleolus-like bodies in mouse oocytes. *FASEB J* 24 485-94

Ishida M, Okazaki E, Tsukamoto S, Kimura K, Aizawa A, Kito S, Imai H, Minami N. (2013) The promoter of the oocyte-specific gene, Oog1, functions in both male and female meiotic germ cells in transgenic mice. *PLoS ONE* 8 e68686

Iwatsuki K, Tanaka K, Kaneko T, Kazama R, Okamoto S, Nakayama Y, Ito Y, Satake M, Takahashi S, Miyajima A, Watanabe T, Hara T. (2005) Runx1 promotes angiogenesis by downregulation of insulin-like growth factor-binding protein-3 *Oncogene* 24 1129-1137

Kageyama S, Liu H, Kaneko N, ooga M, Nagata M, Aoki F. (2007) Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction* 133 85-94

Kallio M, Chang Y, Manuel M, Alastalo TP, Rallu M, Gitton Y, Pirkkala L, Loones MT, Paslaru L, Larney S, Hiard S, Morange M, Sistonen L, Mezger V. (2002) Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J* 3 2591-601

Karabinova P, Kubelka M, Susor A. (2011) Proteasomal degradation of ubiquitinated proteins in oocyte meiosis and fertilization in mammals. *Cell Tissue Res* 346 1-9

Ko MSH, Kitchen JR, Wang X, Hasegawa A, Sun T, Ko MS, Kitchen JR, Wang X, Threat TA, Wang X, 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 implantation mouse development. *Development* 127 1737-1749

Lawitts, J.A., and Biggers, J.D. (1993). Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol* 225, 153-164.

Liang LF, Soyal SM, Dean J (1997) FIG α , a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development* 124 4939-4947

Lu Q, Knoepfler PS, Scheele J, Wright DD, Kamps MP. (1995) Both Pbx1 and E2A-Pbx1 bind the DNA motif ATCAATCAA cooperatively with the products of multiple murine Hox genes, some of which are themselves oncogenes. *Mol Cell Biol* 15 3786-3895

Masson LF, Razak Z, Kaigo M, Audouard C, Charry C, Cooke H, Westwood JT, Christians ES. (2011) Identification of heat shock factor 1 molecular and cellular targets during embryonic and adult female meiosis. *Mol Cell Biol* 31 3410-23

Mashimo T, Glaser P, Lucas M, Simon-CHazottes D, Ceccaldi PE, Montagutelli X, Despres P, Guenet JL. (2003) Structural and functional genomics and evolutionary relationships in the cluster of genes encoding murine 2', 5'-oligoadenylate synthetases. *Genetics* 537-552

Meijer HA, Bushell M, Hill K, Timothy WG, Willis AE, Jones P, Cornelia H de Moor (2007) A novel method for poly(A) fraction reveals a large population of mRNAs with a short poly(A) tail in mammalian cells. *Nuc Acid Res* 35 e132

Metchat A, Akerfelt M, Bierkamp C, Delsinne V, Sistonen L, Alexandre H, Christians ES. (2009) Mammalian heat shock factor1 is essential for oocyte meiosis and directly regulates Hsp90 α expression. *J Biol Chem* 3 9521-8

- Miele G, MacRae L, McBride D, Manson J, Clinton M. (1998) Elimination of false positive generated through PCR re-amplification of differential display cDNA. *Biotechniques* 25 138-44
- Minami N, Aizawa A, Ihara R, Miyamoto M, Ohashi A, Imai H (2003) Oogenesis Is a Novel Mouse Protein Expressed in Oocytes and Early Cleavage-Stage Embryos. *Biol Reprod* 69 1736-1742
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Scaeffler L, Wold B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq. *Nat Methods* 5 621-8
- Moore GP, Lintern-Moore S, Peters H, Faber M (1974) RNA synthesis in the mouse oocytes. *J Cell Biol* 16 2135-2142
- Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, Morishita S, Saigo K. (2004) siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nuc Acid Res* 32 W124-W129
- Paillisson A, Dade S, Callebaut I, Bontoux M, Dalbès-Tran R, Vaiman D, Monget P. (2005) Identification, characterization and metagenome analysis of oocyte-specific genes organized in clusters in the mouse genome. *BMC Genomics* 6 1-11
- Paules RS, Buccione R, Moschel RC, Vande Woude, Eppig JJ (1989) Mouse Mos protooncogene product is present and functions during oogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 5395-5399
- Peng H, Chang B, Lu C, Su J, Wu Y, Lv P, Wang Y, Liu J, Zhang B, Quan F, Guo Z, Zhang Y. (2012) *PLOS ONE* 7 e30344
- Pesin JA, Orr-Weaver TL. (2008) Regulation of APC/C activation in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24 475-99

Pesty, A., Miyara, F., Debey, P., Lefevre, B., and Poirot, C. (2007). Multiparameter assessment of mouse oogenesis during follicular growth in vitro. *Mol Hum Reprod* 13, 3-9.

Peter JM. (2006) The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Biol* 7 644-56

Piccioni F, Zappavigna V, Verrotti A (2005) Translational regulation during oogenesis and early development: the cap-poly(A) tail relationship. *C.R. Biologies* 328 863-881

Piko L, Clegg KB (1982) Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos. *Dev Biol* 89 362-378

Quesada V, Sanchez LM, Alvarez J, Lopez-Otin C. (2004) Identification and characterization of human and mouse Ovastacin. *Journal Biol Chem* 279 26627-26634

Quinn, P., and Begley, A.J. (1984). Effect of human seminal plasma and mouse accessory gland extracts on mouse fertilization in vitro. *Aust J Biol Sci* 37, 147-152.

Reik W. (2007) Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447 425-432

Reis A, Madgwick S, Chang HY, Nabti I, Levasseur M, Jones KT. (2007) Prometaphase APC^{cdh1} activity prevents non-disjunction in mammalian oocytes. *Nat Cell Biol* 9 1192-1198

Sagata N, Watanabe N, Godevasseur M, Ikawa Y. (1989) The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342 512-518

Sagata N (1997) What does Mos do in oocytes and somatic cells? *Bioessays* 19 13-21

Schiff PB, Horwitz SB. (1970). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 1561-1565

Schickler M, Lira SA, Kinloch RA, Wassarman PM. (1992) A mouse oocyte-specific protein that binds to a region of mZP3 promoter responsible for oocyte-specific mZP3 gene expression. *Mol Cell Biol* 12 120-127

Solc P, Schultz RM, Motlik J. (2010) Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. *Mol Hum Reprod* 16 654-664

Stern S, Rayyis A, Kennedy JF. (1972) Incorporation of amino acids during maturation in vitro by the mouse oocyte: effect of plomycine on protein synthesis. *Biool Reprod*, 7 341-346

Takeishi S, Matsumoto A, Onoyama I, Naka K, Hirao A, Nakayama K (2013) Ablation of Fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. *Cancer Cell* 23 347-361

Tay J, Hodgman R, Richter JD. (2000) The control of cyclin B1, RNA translation during mouse oocyte maturation. *Dev Biol* 221 1-9

Tsunemoto K, Anzai M, Matsuoka T, Tokoro M, Shin SW, Amano T, Mitani T, Kato H, Hosoi Y, Saeki K, Iritani A, Matsumoto K (2008) Cis-Acting Elements (E-box and NBE) in the Promoter Region of Three Maternal Genes (Histone H100, Nucleoplasmin 2, and Zygote Arrest 1) Are Required for Oocyte-Specific Gene Expression in the Mouse *Mol Reprod Dev* 75 1104-1108

Villaescusa JC, Verrotti AC, Ferretti E, Farookhi R, Blasi F. (2004) Expression of Hox cofactor genes during mouse ovarian follicular development and oocyte maturation. *Gene* 330 1-7

Villalba A, Coll O, Gebauer F. (2011) Cytoplasmic polyadenylation and translational control. *Curr Opin Genet Dev* 21 452-457

Vitale AM, Calvert ME, Mallavarapu M, Yurttas P, Perlin J, Herr J, Coonrod S (2007) Proteomic profiling of murine oocyte maturation. *Mor Reprod Dev* 74 608-16

Wang QT, Piotrowska K, Ciemerych MA, (2004) A genome-wide study of gene activity reveals development signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Dev Cell* 6 133-144

Werner A, Disanza A, Reifenger N, Habeck G, Becker J, Calabrese M, Urlaub H, Lorenz H, Schulman B, Scita G, Melchior F. (2013) SCF Fbxw5 mediates transient degradation of actin remodeler Esp8 to allow proper mitotic progression. *Nat Cell Biol* 15 179-189

Yamagata K, Yamazaki T, Yamashita M, Hara Y, Ogonuki N, Ogura A. Noninvasive visualization of molecular events in the mammalian zygote. *Genesis*. 2005; **43**: 71–79.

Yang C, Elvin J, Lin YN, Hadsell LA, Wang J, DeMayo FJ, Matzuk MM (2006) Regulation of Growth Differentiation Factor 9 expression in oocytes in Vivo: a key role of the E-box. *Biol Reprod* 74 999-1006

Young JM, Trask BJ. (2002) The sense of smell: genomics of vertebrate odorant receptors. *Hum Mol Genet*

Zeng F, Schultz RM. (2003) Gene expression in mouse oocytes and preimplantation embryos: Use of suppression subtractive hybridization to identify oocyte- and embryo-specific genes. *Biol Reprod* 68 31-39

Zheng F, Baldwin DA, Schultz RM (2004) Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev Biol* 272 483-496

Zohreh A, Kageyama S, Aoki F (2005) Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNA after fertilization. *Mol Reprod Dev* 72 281-290

Zou C, Chen Y, Smith RM, Snavely C, Li J, Coon TA, Chen BB, Zhao Y, Mallampalli RK. (2013) SCF^{Fbxw15} mediates histone acetyltransferase binding to origin recognition complex (HBO1) ubiquitin-proteosomal degradation to regulate cell proliferation. *J Biol Chem* 288 6306-6316