

## 論文審査の結果の要旨

氏名 影山 俊一郎

本論文は、減数分裂期中の成長卵および受精後の着床前初期発生時における遺伝子発現調節機構について調べたものである。全体は4章からなり、以下のような内容となっている。

第1章では、受精卵で新生される mRNA のみを単離、同定し、受精卵での遺伝子発現制御について考察した。受精卵での遺伝子発現制御機構を解明するためには、まず実際に受精卵で発現している遺伝子やその制御領域を明らかにすることが必須である。しかし、受精卵には大量の生殖細胞由来 mRNA が蓄積されており、これが受精卵で新しく転写される遺伝子の解析を困難なものとしていた。そこで本論文ではまず、新生される RNA のみを単離するための方法を開発した。具体的には次のような方法である。①受精後の初期胚に BrUTP を導入し、②合成途中の mRNA に取り込ませることにより新生 mRNA を BrU で標識する。③初期胚から全 RNA を回収後、④抗 BrU 抗体を用いた免疫沈降法によって新生された mRNA のみを単離する。そして次に、この手法を用いて受精卵で転写されている遺伝子のプロファイルを得ることを試みた。すなわち上記で開発された手法を用いて受精卵で新生される mRNA を単離し、マイクロアレイを用いて同定した。その結果、それまでに報告されていた遺伝子に加え、新たに 54 の遺伝子の発現が確認できた。さらにここで同定された遺伝子の発現制御領域について解析した結果、Pax, Ets ファミリーに属する転写因子の結合配列が多く確認され、これらの転写因子の関与が示唆された。

第2章では、マウス転写因子を網羅した DNA chip を用いたマイクロアレイを行い、成長卵と着床前初期胚を対象として解析を行った。その結果、卵あるいは胚の発生各段階において特異的に発現する転写因子が明らかとなり、さらに転写因子群の変化を比較した結果、生殖細胞から1細胞期にかけてよりむしろ1細胞期から2細胞期にかけての変化が顕著であった。また各転写因子の持つ機能・構造に着目した解析および *ingenuity pathways analysis* によるシグナル経路の解析を行った。その結果、癌化に関与する遺伝子が受精後に大きく増加していた、なかでも Ets ファミリーに属する転写因子群の大幅な増加が引き起こされるという興味深い知見

が得られた。特に Ets ファミリー転写因子は先の実験により受精卵で発現する遺伝子の発現制御領域に多く見られた転写因子でありこの時期の遺伝子発現に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

第1章および2章の結果より、受精卵で Ets ファミリー転写因子群が増加し、さらに実際に受精卵で発現する遺伝子が Ets ファミリーにより制御されていることが示唆された。そこで第3章では、Ets ファミリー転写因子のうち1細胞期胚から2細胞期胚にかけて強く発現していた、Etsrp71、Spic、Elf3 を RNAi により抑制しその働きを検証した。その結果それぞれの遺伝子の抑制により2細胞期以降の発生が阻害され、受精卵での遺伝子発現への関与が確認された。また、これら3つの遺伝子を同時に抑制した結果さらに顕著な阻害効果が確認されこれらの遺伝子が相補的に、あるいは別経路で働いていることが示唆された。

第4章では、成長卵から初期胚にかけての DNA メチル化、ヒストン修飾の変化について調べた。その結果、2細胞期における DNA メチル化の低下など、受精卵由来の転写の活性化に従っていくつかの修飾がゲノムレベルで大きく変化すること等が確認できた。そしてこれらの修飾の変化はそれぞれ異なった時期に起こることが明らかとなった。この結果より、卵形成、初期発生にかけての遺伝子発現制御機構の切り替えはそれぞれ異なったエピジェネティック因子の変化によって引き起こされていることが示唆された。

以上のように、本論文は、これまでまったく明らかにされていなかった減数分裂中の成長卵から受精を経た後の初期発生時における遺伝子発現調節機構の解明に大きく寄与するものであると考えられる。

なお、本論文第1章は、永田昌男、青木不学との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。