

長鎖ノンコーディング RNA による  
マウス胚性遺伝子活性化機構

濱崎 伸彦

## 目次

要旨	3
緒言	6
第一章	19
序論	19
結果	21
考察	47
第二章	53
序論	53
結果	56
考察	64
総括	69
材料と方法	78
謝辞	85
引用文献	95

# 要旨

## 序論

マウスでは受精後に生殖細胞が持っていたエピジェネティックなゲノム情報、すなわち DNA メチル化状態を一新することで、全ての細胞に分化する能力(全能性)を獲得する。この受精後に起きる DNA メチル化の大規模な再編成は、配列非特異的に行われると考えられていたが、ゲノムワイドな解析から遺伝子領域の近傍では配列特異的に DNA 脱メチル化が起きていることが明らかとなった。また、最近になって長鎖ノンコーディング RNA (long noncoding RNA, lncRNA)が配列特異的なエピジェネティック変換を引き起こすことが報告されるようになり、本研究では、マウス初期胚における配列特異的な DNA 脱メチル化に lncRNA が関与しているかどうかを検証した。

## 結果

### 第一章

ここでは、lncRNA のうち、我々の研究グループによって明らかにされた promoter-associated noncoding RNA (pancRNA)と呼ばれる、両方向性の遺伝子プロモーター領域から遺伝子とは反対方向に転写される lncRNA に着目した。pancRNA はいくつかの遺伝子座において、プロモーター領域を配列特異的に DNA 脱メチル化し、パートナー遺伝子を活性化する。そこで本章では、受精後の遺伝子発現(胚性遺伝子活性化, zygotic gene activation (ZGA))の際に pancRNA が配列特異的に遺伝子活性化に寄与している可能性について検証した。

受精前後のマウス初期発生胚を用いて、RNA-seq 解析を行い、ZGA において pancRNA 群が 1,000 以上の遺伝子座から転写されていることを明らかにした。

そのうち発現量の多い3つの *pancRNA*(*pancI17d*, *pancMospd3*, *pancTbc1d22a*)について、機能を解析したところ、マウス初期発生においても、*pancRNA* が配列特異的な脱メチル化を引き起こし、パートナーとなる直下の遺伝子の *zygotic* な遺伝子発現を引き起こすことが明らかとなった。

## 第二章

第一章の解析において、インターロイキンファミリーの一つである *I17d* 遺伝子をパートナーとする *pancRNA*(*pancI17d*)を siRNA 法でノックダウンすると胚盤胞形成不全を引き起こすことが示された。胚盤胞形成期はマウス初期発生において、初めての細胞系列分岐が起こる重要なステージであり、この細胞系列分岐によって多能性を持つ内部細胞塊と胎盤系列細胞の栄養芽層が生み出される。従って、その制御機構の解明は発生学上、極めて重要な課題である。第二章では *pancI17d* ノックダウンによる細胞系列分岐への影響を解析した。

*pancI17d* ノックダウンにより、桑実胚期に異所性の細胞死が亢進することが示された。*pancI17d* ノックダウン胚の RNA-seq 解析からは細胞死関連遺伝子に加え、栄養芽層分化と多能性細胞分化関連遺伝子発現にも異常をきたしていることが示された。さらに、内部細胞塊の培養および ES 細胞におけるノックダウン実験から、*pancI17d* は細胞増殖を促進することが分かった。以上から、*pancI17d* は *I17d* 遺伝子を活性化することで、初期発生における細胞生存・細胞増殖・細胞運命決定に寄与していることが示された。

## 総括



本研究により、両方向性の遺伝子プロモーター領域から遺伝子とは反対方向に転写される lncRNA(pancRNA)が配列特異的な DNA 脱メチル化を引き起こし、受精後に *Il17d* 遺伝子などが zygotic な発現を開始して全能性の獲得に寄与していることが示された。

## 緒言

多細胞生物を構成する細胞は体細胞と生殖細胞に大別される。体細胞が個体の生存のために高度に分化し、様々な生理的機能を果たし、一代限りでその役割を終えるのに対し、生殖細胞は有性生殖の始まり以来、絶えることなく連綿とその遺伝情報を次世代に伝えてきた。そのため、生殖細胞は接合の度に自身の細胞状態を一新し、細胞の中でも最も可塑性に富む全能性細胞に生まれ変わる。

### 哺乳類受精胚の持つ全能性

哺乳類では、生殖細胞が分化を経て成熟すると雄性配偶子である精子と、雌性配偶子である卵細胞となり、精子と卵細胞の細胞融合を受精と呼ぶ。受精により、受精胚は自律的個体形成能（全能性）を得る。例えば、受精直後のマウス初期胚は多能性細胞である胚盤胞の内部細胞塊や、内部細胞塊由来の細胞株である胚性幹細胞（ES 細胞）と比べても、分化能が極めて高い。全能性細胞の最大の特徴は、1 細胞から完全な個体を自律的に形成できることである。これは厳密な全能性の定義とされ、ES 細胞や内部細胞塊などの多能性細胞を 1 細胞から培養しても決して完全な個体に至ることはない。1 細胞から完全な個体を形成することができるのは、マウス初期発生胚でも受精後の 1、2、4 細胞期胚の割球だけである。こうした全能性を規定する分子についての理解はほとんど進んでいない。マウス初期胚が受精により全能性を獲得するとき、生殖細胞を規定していた細胞状態を再構築（ゲノムリプログラミング）する必要がある。ゲノムリプログラミングの分子実体はエピジェネティック修飾の大規模な再構成で

あり、エピジェネティック修飾とは「DNA 塩基配列の変化を伴わない、細胞分裂を経ても娘細胞に継承される化学修飾」のことを指す。その分子実体として、DNA が巻き付くヒストンの N 末端に施される種々の化学修飾と、DNA のシトシンの 5 位のメチル化 (DNA メチル化) が挙げられる。

### エピジェネティック制御におけるヒストン修飾

ヒストンタンパク質の場合、H2A、H2B、H3、H4 の 4 種類のサブユニットから成り、それぞれが 2 分子ずつ結合したヒストン八量体を形成している。真核生物では DNA がヒストン八量体に巻き付くことでヌクレオソームという約 146 bp の鎖長の基本単位を構成している。ヒストンの N 末端はヌクレオソームの外側にひものように伸びており、これをヒストンテイルと呼ぶ。このテイル部分に様々な化学修飾が施されることでクロマチン構造がダイナミックに変化して遺伝子発現に影響を与えることが知られている(Bannister and Kouzarides, 2011; Zhou et al., 2010)。こうしたヒストン修飾の例として、ヒストンのアセチル化、メチル化、ユビキチン化、SUMO 化、リン酸化などがある。ヒストンのアセチル化は、ヒストンテイルのリシンが対象であり、ヒストンの電荷を負に傾けることで、負の電荷を持つ DNA が解離しやすくなり、いわゆるオープンクロマチン状態を形成することで、転写活性が亢進する。ヒストンのメチル化はその修飾の位置により、転写活性に及ぼす影響が異なる。例えば、ヒストン H3 の 27 番目のリシンのメチル化はヘテロクロマチン化を誘起することが知られている (Margueron et al., 2009; Trojer and Reinberg, 2007)。反対にヒストン H3 の 4 番目のリシンのメチル化は転写活性を促進するとされる(Bernstein et al., 2005)。このよ

うにそれぞれのヒストン修飾の及ぼす影響の総和が、そのヌクレオソームの転写活性を決定しているとも言える(Fig. GI-1)。マウスにおける受精後のゲノムリプログラミングが起こる際には、ヒストン修飾の大規模な再編成が行われている。例として、精子ゲノムは通常のヒストンではなく、プロタミンという特殊な DNA 結合蛋白質に非常に強く結合した状態で、卵に進入する(Braun, 2001)。このプロタミンにより、精子ゲノムでは転写活性が強力に抑制されているが、卵への進入後、卵由来のアセチル化修飾ヒストンに急速に置き換わることで新規転写を許容する状態に移行する (Kim et al., 2005; Santos et al., 2005)。

#### エピジェネティック制御における DNA メチル化

もう一つの主要なエピジェネティック修飾である DNA メチル化は主に CG 連続配列 (CpG 配列) で起こる、シトシンのピリミジン環 5 位の炭素原子に対するメチル基付与のことであり、体細胞では CpG 配列の 70-80%がメチル化されている(Lister et al., 2009)。DNA メチル化は主に 2 通りの方法で遺伝子発現に影響を与える。一つ目は DNA メチル化が蓄積することで、methyl-CpG-binding domain protein (MBD)や、methyl-CpG-binding domain protein 2 (MeCP2)が DNA メチル化に結合し、ヒストン脱アセチル化酵素やクロマチンリモデリング酵素をリクルートすることで、不活性化型のクロマチン環境を構築し、遺伝子発現を抑制する(Harikrishnan et al., 2005; Kouzarides et al., 2000; Nan et al., 1998)。二つめは転写因子結合配列周辺の DNA メチル化が転写因子結合を阻害することで遺伝子発現が変化する(M Comb, 1990; Namihira et al., 2009; Prendergast et al., 1991; Takizawa et al., 2001)。一般的に転写因子は転写を活性化するものが多いため、

DNA メチル化、特にプロモーター領域の DNA メチル化は転写活性と強い負の相関を示す(Kass et al., 1997; Miranda and Jones, 2007)。DNA メチル化は DNA メチル基転移酵素である DNMT1、DNMT3a、DNMT3b によって付与される(Bestor et al., 1988; Okano et al., 1998; Van den Wyngaert et al., 1998)。そのうち DNMT1 は細胞分裂後の鋳型鎖のヘミメチル化シトシンを認識し、メチル化されていない新生鎖の DNA にメチル基を付与することで、細胞分裂の際の DNA メチル化維持機構のコンポーネントとして機能する(Li et al., 1992; Robert et al., 2002)。一方で、DNMT3A と DNMT3B は非メチル化シトシンにメチル基を付与する新規メチル基付与酵素として機能する(Okano et al., 1999)。これら DNMT ノックアウトマウスはいずれも胚性致死もしくは出生前後に致死となることから、哺乳類において、DNA メチル化の正確な制御は発生において重要であることが確かめられている(Li et al., 1992; Okano et al., 1999)。

## DNA 脱メチル化に至る分子機序

一方で、細胞ごとに可塑的な遺伝子発現制御が実現されるためには DNA 脱メチル化も起こるはずである。Ten-eleven translocation (TET)タンパク質はアフリカ眠り病の原因寄生虫である *Trypanosoma brucei* の DNA 酸化酵素である *J-binding protein 1* (JBP1) と JBP2 のホモログとして同定され(Iyer et al., 2008; Iyer et al., 2009)、マウスにおいてメチル化シトシンを水酸化する活性があることが報告された(Kriaucionis and Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009)。その後、TET によりメチル化シトシンは水酸化され、ヒドロキシメチル化シトシンとなることが報告された。ヒドロキシメチル化シトシンは細胞分裂の際に DNMT1 による DNA メチ

ル化維持の対象とならず、従ってヒドロキシル化されたシトシンは細胞分裂を重ねるごとに希釈され、非メチル化シトシンの割合が増えうる(Hashimoto et al., 2012; Valinluck and Sowers, 2007)。また、TET はヒドロキシメチル化シトシンをさらに酸化することによりフォルミル化シトシン、そしてカルボキシル化シトシンに代謝する機能を持つことが報告された(Ito et al., 2011)。これらフォルミル化シトシンとカルボキシル化シトシンは thymine DNA glycosylase (TDG)により選択的に除去され、poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)などを含む塩基除去修復機構により、非メチル化シトシンが挿入されることで、メチル化シトシンを除去して脱メチル化を実行する(He et al., 2011; Maiti and Drohat, 2011; Zhang et al., 2012)。このように、細胞分裂依存的・非依存的な DNA 脱メチル化のことをそれぞれ受動的・能動的 DNA 脱メチル化とよぶが、TET タンパク質はこの両方の DNA 脱メチル化機構に機能する。

### 哺乳類初期胚における受精後の大規模な DNA メチル化再編

受精後のゲノムリプログラミングの際には父方ゲノムで大規模な DNA メチル化の消去が起こる(Fig. GI-2A)。この DNA メチル化の消去は能動的脱メチル化機構によるものだと考えられてきたが、近年、これは TET ファミリーの TET3 によって DNA メチル化の水酸化が起こり、変換後のヒドロキシメチル化シトシンは卵割とともに受動的に希釈された結果であることが明らかになり、受動的な DNA 脱メチル化が主なものだと考えられるようになってきた(Fig. GI-2B)(Inoue and Zhang, 2011)。一方でこの受動的な DNA メチル化では説明できない DNA メチル化レベルの減少が複数遺伝子座で報告されている。そして塩基

除去修復系因子である PARP の阻害剤を加えた際には遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が維持されることから、遺伝子周辺領域では能動的な DNA 脱メチル化機構が存在すると考えられている(Gu et al., 2011; Hajkova et al., 2010; Wossidlo et al., 2010)。しかし、配列特異的な能動的 DNA 脱メチル化の機構の詳細はわかっていない(Fig. GI-3A)。

### 胚性遺伝子活性化機構

マウスでは受精後、ゲノムリプログラミングが起こり、大規模な母性転写産物の分解と胚性遺伝子活性化 (ZGA; zygotic gene activation)が起こることで、母性転写産物への依存状態から脱却し、胚自身の転写産物を利用するようになる。受精の際に転写阻害剤である  $\alpha$ -amanitin を作用させると受精胚の発生は早い段階で停止してしまうことから、ZGA は、胚が全能性を獲得しあらゆる細胞種を生み出すために必要不可欠な過程とされている(Bolton et al., 1984; Flach et al., 1982)。ZGA は受精後 1 細胞期に先行して起こる少数の遺伝子活性化 (マイナー ZGA) と 2 細胞期に起こる多数の遺伝子活性化 (メジャー ZGA) に大別される (Aoki et al., 1997; Latham et al., 1991)。ZGA において、全ての遺伝子が一律に、もしくはランダムに活性化されるわけではなく、決まった遺伝子が何らかの制御を受けて、再現性良く活性化されることから(Hamatani et al., 2004)、遺伝子座ごとに転写のオン・オフを規定する機構の存在が想定されているが、その機構はいまだ明らかにされていない。近年、細胞内の RNA 情報を網羅的に得られる RNA-seq 技術が開発・改善が重ねられ、1 万個を超える卵細胞を用いたトランスクリプトーム解析が実施された(Park et al., 2013)。その中で、ZGA では多くのコ

ーディング mRNA に加え、非常に多くの、転写されても翻訳されないノンコーディング RNA が発現上昇することが明らかになってきた。

### 長鎖ノンコーディング RNA による転写制御

ヒトにおいてタンパク質をコードする遺伝子がゲノムに占める割合は 1.5%程度しかなく、残りのほとんどの領域は意味が無いとされてきた(Lander et al., 2001)。しかし、2005 年以降、FANTOM project や ENCODE project により、哺乳類ゲノムの 6 割から 7 割の領域から RNA が転写されていることがわかり(Carninci et al., 2005; ENCODE Project Consortium et al., 2012)、長鎖ノンコーディング RNA (long non-coding RNA, lncRNA)が想定をはるかに超える量存在していることが明らかとなった。これまでに siRNA、miRNA、piRNA など、20-30 塩基の小分子のノンコーディング RNA が RNA の転写後制御に機能することがよく研究されてきた。しかし、先に述べたノンコーディング RNA のなかには 200 塩基を超える長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA)が多く含まれていたことから、lncRNA の持つ未知の機能について、解析が進められてきた。lncRNA の中でも最も解析が進んでいるものの一つに、哺乳類の X 染色体不活性化に関わる 17 kb の lncRNA の *Xist* が挙げられる。哺乳類オスでは X 染色体が 1 本であるのに対し、メスでは 2 本存在することから X 染色体からの転写量を雌雄間で同じにするために、X 染色体不活性化が量的補償機構として備わっている。*Xist* はメスの 2 本ある X 染色体のうち、片方の X 染色体からのみ転写され、その X 染色体を *Xist* RNA で覆い(クロモゾーム・ペインティングと呼ばれる)、X 染色体を不活性化状態に導く。この際に *Xist* はクロマチン修飾因子である polycomb



repressive complex 2 (PRC2)を呼び込み、抑制型ヒストン修飾である H3K27me3 を X 染色体全体に付与し、ヘテロクロマチン化を誘導し、片方の X 染色体を不活性化する(Borsani et al., 1991; Brockdorff et al., 1992; Brown et al., 1992; Zhao et al., 2008)。 *Xist* の他にも、エピジェネティック修飾変化を誘導し、遺伝子発現に影響を与える lncRNA の例として、*HOTAIR* と呼ばれる *Hox* 遺伝子クラスターから転写される lncRNA がある(Fig.GI-1)。この *HOTAIR* は、染色体を超えて数百以上の遺伝子座のクロマチン修飾に作用し、遺伝子発現を抑制することが報告されている (Gupta et al., 2010; Rinn et al., 2007; Tsai et al., 2010)。その機構として、*Xist* と同様に PRC2 と結合し、対象遺伝子座に呼び寄せることで、クロマチン状態を抑制状態に向かわせることが示されている。反対に遺伝子を活性化させる lncRNA も複数同定されている。*HOTTIP* と呼ばれる長鎖ノンコーディング RNA は *HoxA* 遺伝子上流から転写され、WDR5/MLL 複合体をリクルートすることで、*HoxA* 遺伝子座に活性化型ヒストン修飾である H3K4me3 を付与し、*HoxA* 遺伝子群を活性化させる。また、ゲノムワイドな解析から、エンハンサー領域に RNA ポリメラーゼ II が結合しており、このエンハンサーから両方向性に転写が進み、そこから lncRNA が作られていることがわかった。このエンハンサー領域で発現するノンコーディング RNA は enhancer RNAs (eRNAs) とよばれ、エンハンサーの中でも、活性が高いエンハンサー領域でよく発現していることから eRNAs はエンハンサーの活性の指標としても使われる(Kim et al., 2010; Wang et al., 2011)。eRNAs を転写しているエンハンサー領域では、eRNAs を介して標的遺伝子プロモーター領域と高次構造上近接することが明らかにされている(Fig. GI-1)(Li et al., 2013; Melo et al., 2013)。これらの lncRNA は、その効果が複数遺伝

子座に及ぶことから、その配列特異性は高くないと予想された。一方で、受精後に全能性細胞型の遺伝子発現パターンを再現するためには、個別の遺伝子ごとに制御が行われていることが予想される。ZGA において、豊富に存在する lncRNA が、ZGA の遺伝子発現調節に機能していることが考えられる。特に、遺伝子近傍で高い配列特異性をもって機能しうるノンコーディング RNA 群がその役割を担っていることが期待される。

### **配列特異的遺伝子活性化能を持つ長鎖ノンコーディング RNA としての pancRNA**

2004 年に両方向性の遺伝子プロモーター領域から、遺伝子とは反対方向、すなわちアンチセンス方向に転写される lncRNA (pancRNA; promoter-associated non-coding RNA) が同定された(Imamura et al., 2004)。この pancRNA は 3'末端に polyA 配列を持ち、センス方向にコードされるパートナー遺伝子を配列特異的に活性化できる (Fig. GI-3B) (Imamura et al., 2004; Tomikawa et al., 2011; Uesaka et al., 2014)。この pancRNA の機能性が報告されているのはマウス大脳皮質など、終末分化細胞においてのみであったが、この pancRNA がダイナミックなエピジェネティック変化の起こる ZGA において発現し、配列特異的な遺伝子活性化能を持つ可能性が考えられる。

以上を背景に、本研究では ZGA における配列特異的な胚性遺伝子の活性化に lncRNA が関わっているのか、特に配列特異性の高い pancRNA の特性に着目し、解明を試みた。第一章では pancRNA に焦点を当て、pancRNA による配列特異的な胚性遺伝子活性化機構が存在することを示した。第二章では、第一章で同定

された機能的 pancRNA のマウス初期発生における生理的意義を全能性細胞である初期胚と多能性細胞である ES 細胞を用いて詳細に解析を行った。

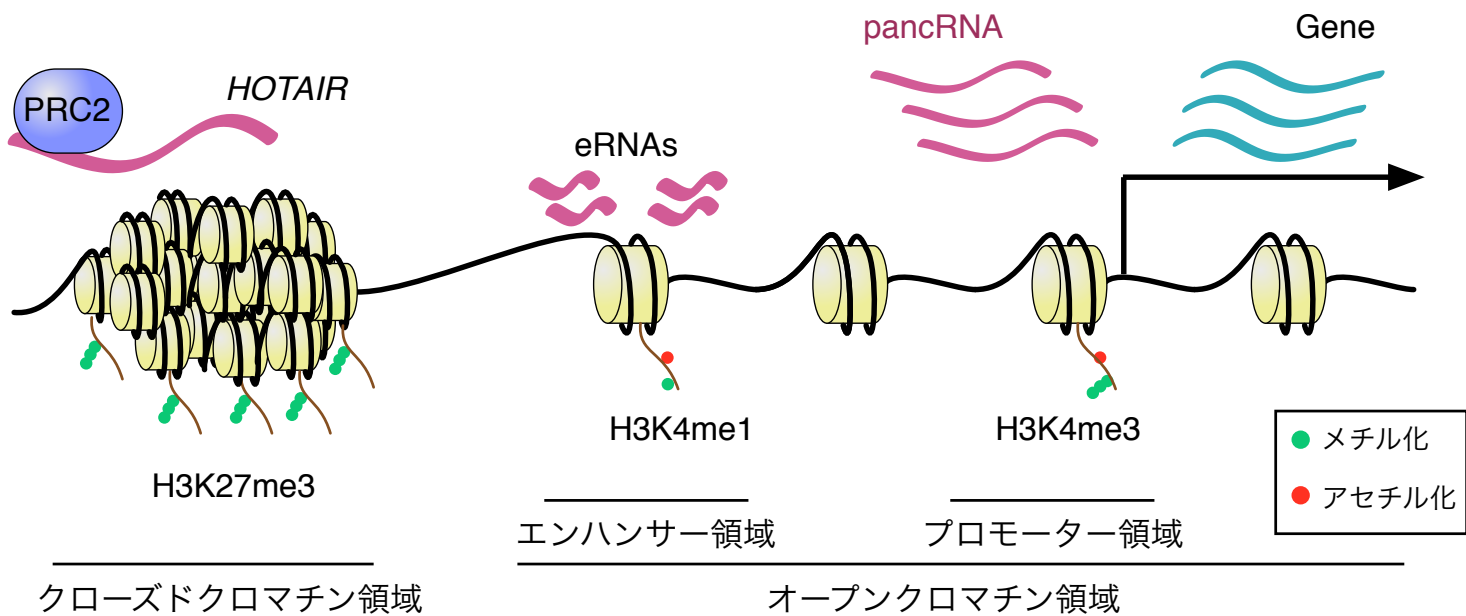
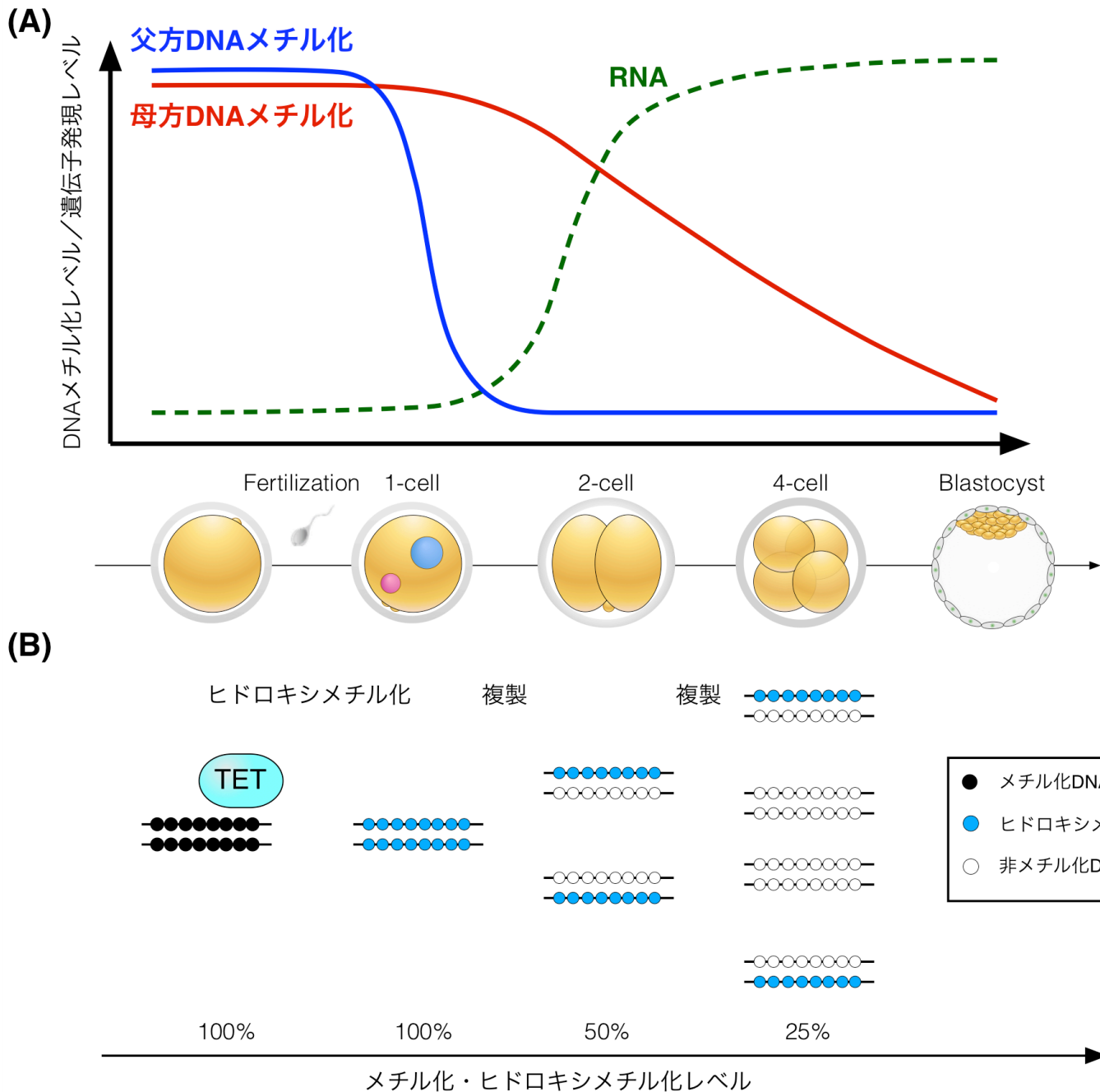


Fig. GI-1. 長鎖ノンコーディング RNA とエピゲノム

ゲノム上のアノテーションごとの長鎖ノンコーディング RNA とヒストン修飾。クローズドクロマチン領域には H3K27me3 が集積し、不活性化状態のエピゲノム環境を形成する。長鎖ノンコーディング RNA である HOTAIR は PRC2 をリクルートすることで、H3K27me3 を付与する。エンハンサー領域では H3K4me1 が集積し、eRNAs が転写されている。プロモーター領域では H3K4me3 が集積し、遺伝子とは反対方向に pancrRNA が転写されている。



## GI-2 マウス初期発生胚における転写とエピゲノムダイナミクス

(A) マウス初期発生胚におけるDNAメチル化と胚性遺伝子発現レベルの模式図。受精後、父方母方ゲノムがDNA脱メチル化されるのに伴い、2細胞期から胚自身の転写が開始する。

(B) TETタンパク質による受動的DNA脱メチル化の模式図。TETタンパク質により触媒されたヒドロキシメチル化は複製を減るごとに希釈され、メチル化レベルが減少する。

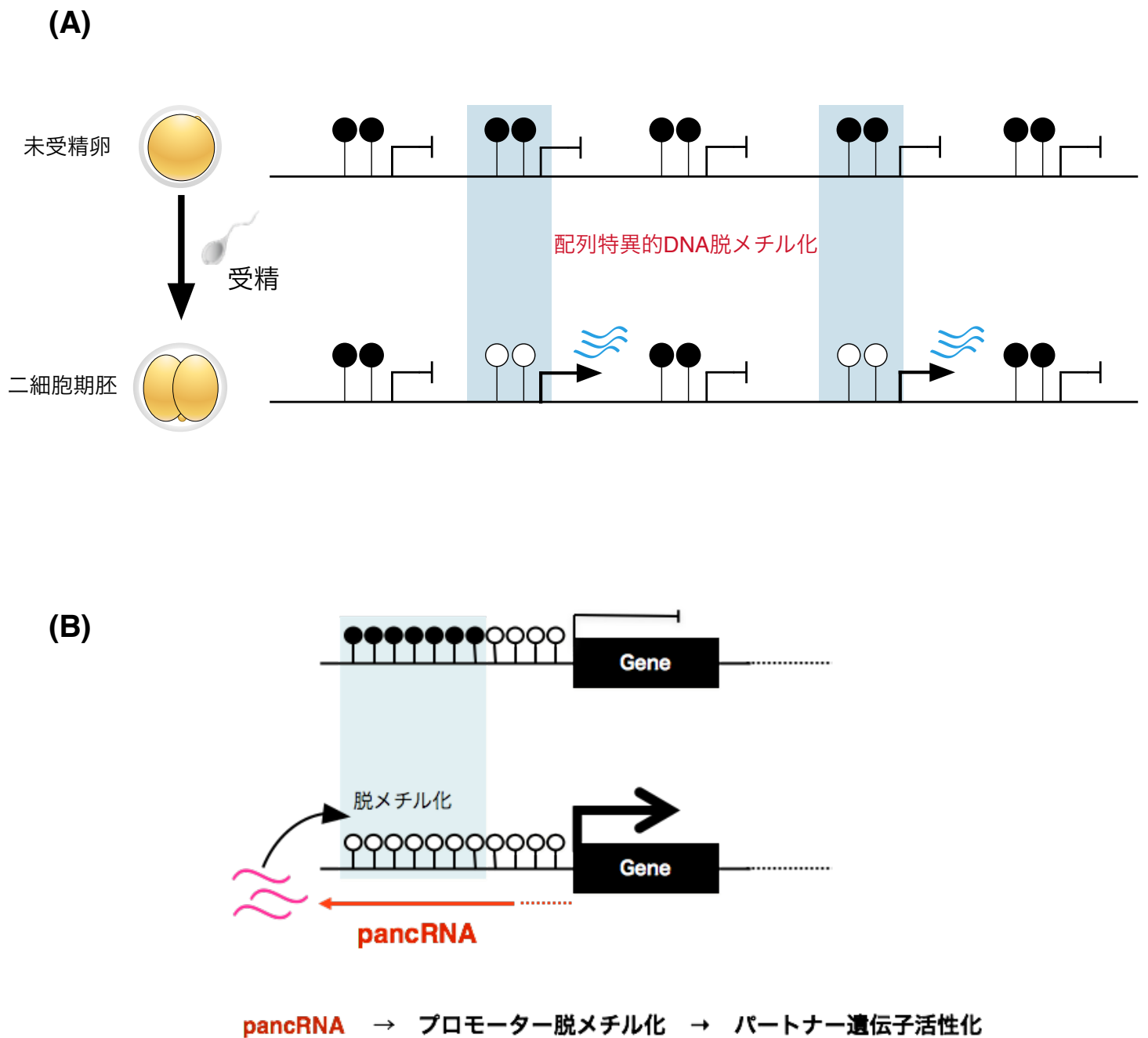


Fig. GI-3. pancRNAによる配列特異的遺伝子活性化機構

(A) 受精後のプロモーター領域の配列特異的 DNA 脱メチル化。プロモーター領域に DNA メチル化が集積すると遺伝子発現が抑えられる。ゲノム全体では DNA 脱メチル化される傾向にあるが、プロモーター領域に限っては、再現性良く、決まった遺伝子座の DNA メチル化が除去される。この配列特異的な機構の詳細は明らかになっていない。(B)プロモーターから遺伝子とは反対方向に転写される pancRNA (promoter-associated noncoding RNA)は、自身の転写領域の DNA 脱メチル化を誘導し、遺伝子活性化を起こすとされる。

# 第一章

## 序論

ZGA が起こる受精 1 細胞期から 2 細胞期胚におけるクロマチン環境の劇的な変化の例として、DNA の脱メチル化がよく知られているエピジェネティックな変化の一つであり (Fig. GI-2)、ゲノムプログラミングの主徴の一つに数えられる。これまでに父方由来のゲノムは受精後 2 細胞期までにゲノム全体に渡って脱メチル化されると考えられてきた (Farthing et al., 2008; Mayer et al., 2000; Oswald et al., 2000)。しかし、近年のシーケンサー技術の革新により、脱メチル化の主なターゲット領域はいわゆる遺伝子外領域の long interspersed nuclear elements (LINE) などのリピート配列であることが明らかにされてきており、実際に、遺伝子発現調節に関わるプロモーター領域の DNA メチル化パターンは、こうした遺伝子外領域の DNA 脱メチル化現象とは異なり、遺伝子ごとに特徴的な挙動を示すことが報告された (Borgel et al., 2010; Smallwood et al., 2011; Smith et al., 2012)。このことから、遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化は遺伝子ごとに精緻に制御されていることが推察された。従って、どのように遺伝子ごとに DNA メチル化を制御し、遺伝子発現パターンの調和を達成しているかを調べるのが重要な研究課題となった。

長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) はそのような配列特異的なエピジェネティック変換を可能とする機能分子の一つとして、解析が進められており、機能を持つ lncRNA に関する報告が近年増えてきた。そうした lncRNA の例として、両方向性の遺伝子プロモーター領域から遺伝子とは反対方向、すなわちアンチセンス方向に転写される pancRNA がある。Vim や Sphk1 など、いくつかの遺伝

子座においては、pancRNA は遺伝子活性化の際にプロモーター領域を配列特異的にDNA脱メチル化することが報告されている (Imamura et al., 2004; Tomikawa et al., 2011)。ごく最近になって、我々を含む複数の研究グループによって、pancRNA が数千の遺伝子プロモーター領域から遺伝子とは反対方向に向かって転写されること、そして、ES細胞からの分化や、組織間において、同じ遺伝子座から転写されるパートナー遺伝子と同調的な発現挙動を示すことが報告されたことから、pancRNA は lncRNA の一つのサブクラスを構成し、パートナー遺伝子を配列特異的に活性化することが示唆された (Sigova et al., 2013; Uesaka et al., 2014)。これらのことから、ZGA の際に pancRNA が多点的に転写され、発生に必要な遺伝子の特異的活性化に寄与している可能性が示唆された。このことを検証するためには、細胞内の RNA を網羅的に解析できる RNA-seq 解析をマウス初期発生胚で行うことがポイントとなるが、RNA-seq 解析のために必要なマウス胚を多量に集めることは困難を極めた。

本章では、少量サンプルからでも方向性を保ったまま、精度よく細胞内 RNA 情報を得られる RNA-seq ライブラリ作製法を用いて、ZGA における pancRNA 群が 1,000 以上の遺伝子座から転写されていること、また、そのうち発現量上位 3 つの pancRNA の機能解析の結果から、pancRNA が胚性遺伝子活性化メカニズムの中でマウス初期発生においてパートナー遺伝子を活性化する役割を担っていることを明らかにした。



## 結果

### ディレクショナル RNA-seq によるマウス初期胚における pancRNA の同定

pancRNAs が受精前後のマウス初期胚において転写されているのかを調べるために、それぞれ 100 個ずつのマウス未受精卵と受精 2 細胞期胚を用いて、RNA の方向性情報を保ったまま解析できるディレクショナル RNA-seq を行った。この RNA-seq により、得られた総リード数は未受精卵と受精 2 細胞期胚でそれぞれ約 1 億 1100 万リード、約 4 億 2000 万リードとなった。これらの RNA-seq リードをマウスリファレンスゲノム(mm10)にマッピングした。RNA-seq データの再現性を調べるために、それぞれ 4 つのバイオロジカルレプリケート間の相関係数を計算したところ、 $r > 0.99$  と非常に高い値を示したことから(Fig.1-1)、再現性が高い RNA-seq データであることが明らかになった。これらの RNA-seq データにおいて、cDNA 合成の際に生じうる 5'もしくは 3'バイアスが見られるかを検討するために、遺伝子にマッピングされたリードが遺伝子のどの部分にマッピングされたかを調べた。その結果を Fig.1-2 に示した。我々の RNA-seq データは、10,000 の卵/胚を使用した Park たちの RNA-seq データ(Park et al., 2013)と同程度、もしくはより少ない 5'-3'バイアスを示した。同様に心臓 total RNA 5  $\mu$ g を使用した RNA-seq データ(Uesaka et al., 2014)とも比肩する 5'-3'バイアスの少なさを示した。次に我々のディレクショナル RNA-seq の RNA 方向性情報がどの程度正しいかを調べるために、RefSeq 遺伝子モデルを基に、マップされたリードの方向性情報が RefSeq 遺伝子モデルとどの程度一致しているかを解析したところ、未受精卵 RNA-seq データでは 99.1%、2 細胞期胚では 96.9%のリードが RefSeq 遺伝子モデルの方向性情報と同じ方向性を示したことから、我々のディ

レクショナル RNA-seq データは高い精度で pancRNA を同定できることが示唆された。これらのディレクショナル RNA-seq データを用いて、未受精卵と受精 2 細胞期胚における pancRNA を網羅的に探索したところ、未受精卵では 618 個、2 細胞期胚では 1,129 個の遺伝子座で pancRNA が同定された (Fig. 1-3A)。このことから全能性を獲得する発生段階にあるマウス初期胚において千以上の遺伝子座で pancRNA が転写されていることが明らかになった。

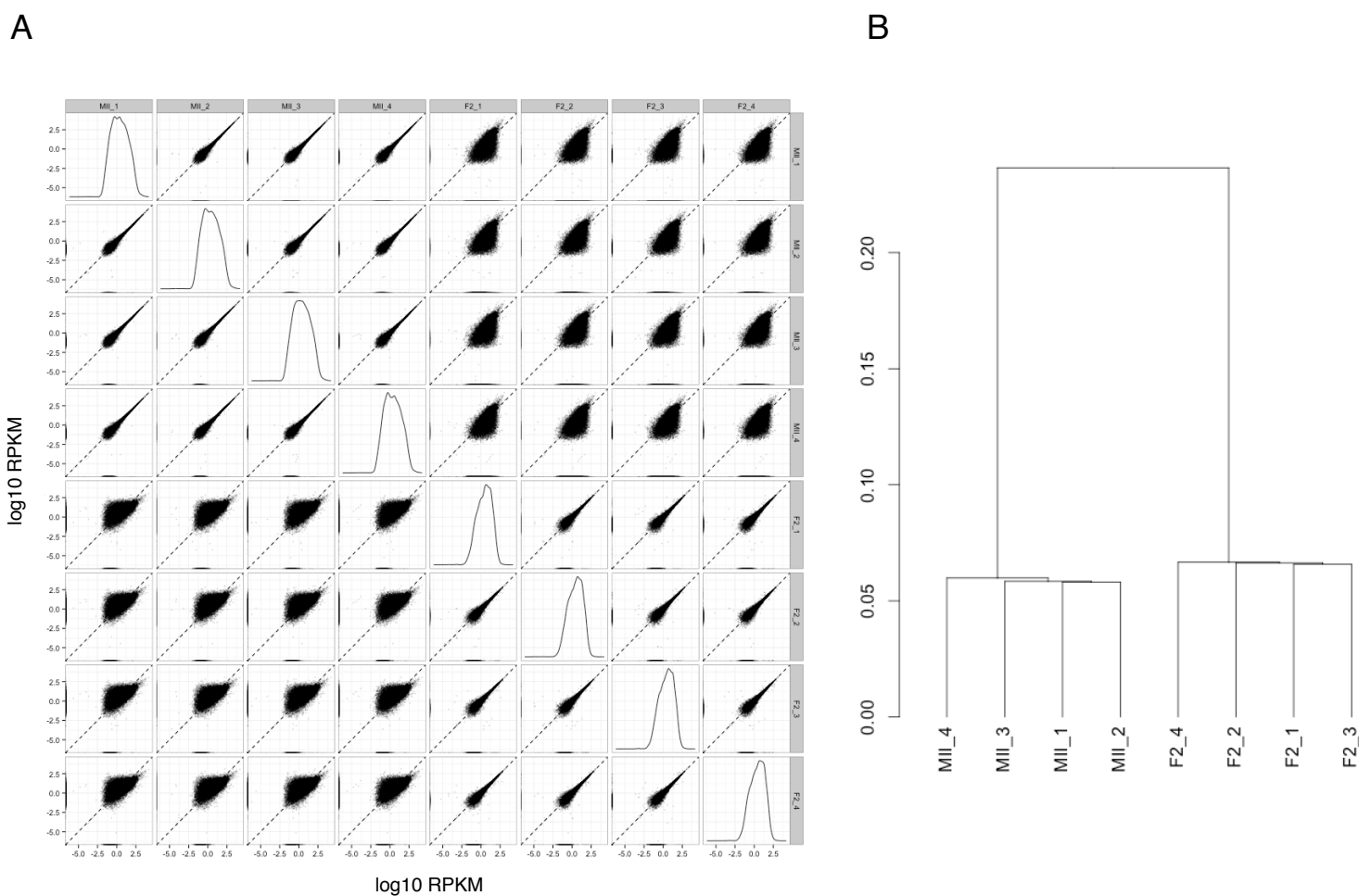


Fig. 1-1. directional RNA-seq の評価

(A) 全てのサンプルにおける遺伝子発現量の散布図。未受精卵と受精 2 細胞期胚の RNA-seq データはそれぞれ 4 つのレプリケートからなる (MII\_1 から MII\_4 と F2\_1 から F2\_4)。 (B) RNA-seq サンプルにおける遺伝子発現量に基づいた階層クラスタリング。 Jensen-Shannon 距離をクラスタリングに用いた。

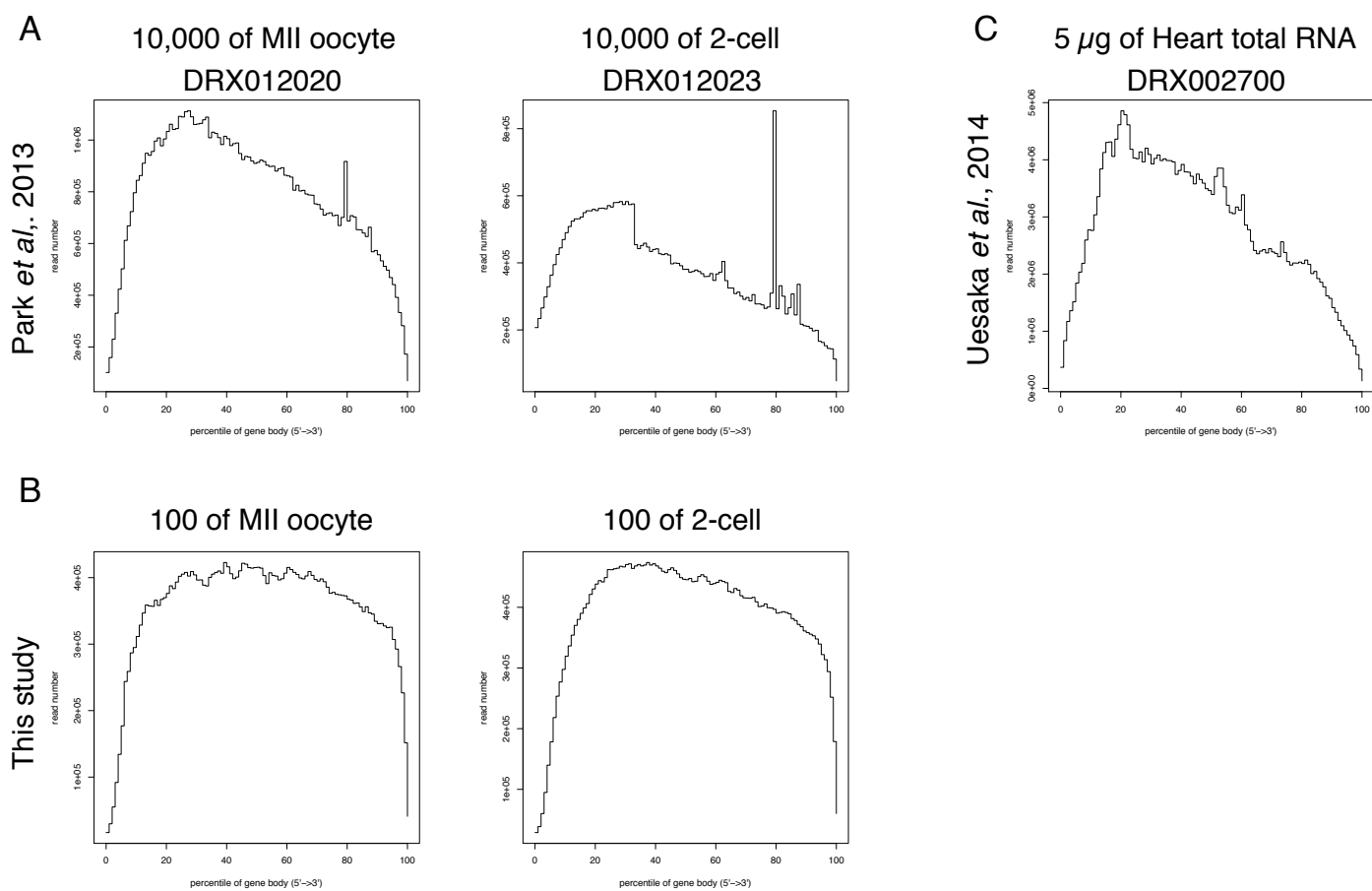


Fig. 1-2. マップされたRNA-seqリードのマッピングバイアス解析。RefSeq 遺伝子モデルにおいてRNA-seqリードがマップされた相対的位置を表す密度プロット。

(A) 未受精卵と受精2細胞期胚の比較には Park et al., 2014 のデータを用いた。(B) 本研究で作成したRNA-seqデータ。(C) Uesaka et al., 2014 の5  $\mu$ gの心臓 total RNAからのRNA-seqデータ

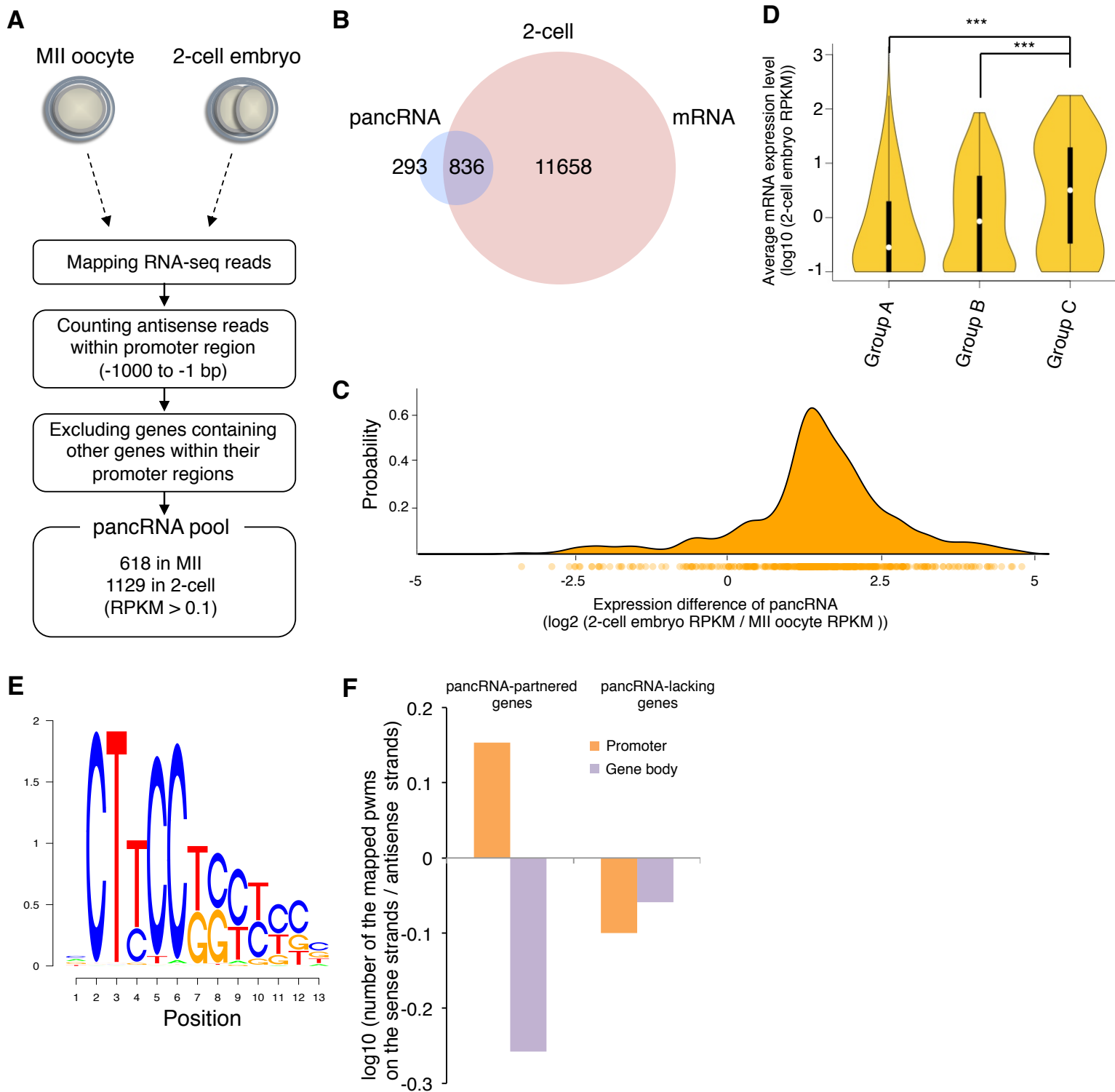


Fig. 1-3. RNA-seq による pancRNA の検出と特徴抽出

(A) pancRNA データセットのスクリーニング。100 ずつの未受精卵と受精二細胞期胚から 4 セットずつレプリケートを作成し、統計的解析に供した。(B) 二細胞期における pancRNA と mRNA の総数。(C) 受精後二倍以上発現上昇した pancRNA パートナー遺伝子(B)における 526 遺伝子を対象とした発現量変化の密度分布図。(D) 二細胞期における pancRNA をもつ遺伝子と持たない遺伝子の発現レベルのバイオリンプロット。グループ A、B、C はそれぞれ pancRNA をもたない遺伝子群(11658)、pancRNA 発現量下位 100 遺伝子群、pancRNA 発現量上位 100 遺伝子群を表す。バイオリンプロットの幅は密度を表し、白丸は遺伝子の発現量の平均値を表す。バイオリンプロット内部には箱ひげ図も示した。アスタリスクはサンプル間での統計的有意性を示す (\*\*\*,  $p < 0.001$ )。 (E) pancRNA パートナー遺伝子のプロモーター領域で見られる頻出配列モチーフ。(F) (E)において検出されたモチーフに 90%以上一致する領域(-500 から-1 bp)のプロモーター領域と遺伝子領域(+1 から+500 bp)におけるストランドごとの出現頻度。pancRNA パートナー遺伝子座では TSS が CT-rich モチーフの転換点になっているように見える。

## pancRNA とパートナー遺伝子の同調的な遺伝子発現ダイナミクス

pancRNAs がパートナー遺伝子の発現上昇を誘導する現象が初期胚においても同様にみられるかを検証するために、受精前後での pancRNA とそのパートナー遺伝子の発現挙動を調べた。2 細胞期胚で同定された 1,129 種類の pancRNA のうち 836 種類の pancRNA が遺伝子と共発現していることがわかった (Fig. 1-3B)。さらに pancRNA がパートナー遺伝子と同調的に発現変化するかを調べたところ、pancRNA が受精後に発現上昇する場合、大半のパートナー遺伝子も pancRNA の発現変化に同調して発現上昇することを見出した (Fig. 1-3C)。こうした遺伝子群の中で特徴的な遺伝子群が発現上昇しているかを調べるためにジーンオントロジー解析を行ったところ、細胞死関連の遺伝子が pancRNA とともに発現上昇していることが明らかになった (Table 1, 2)。次に pancRNA を発現することが遺伝子発現量に影響を及ぼしているかを調べるために、pancRNA を発現していない遺伝子群 (グループ A)、pancRNA を発現するがその発現量は低い遺伝子群 (グループ B; pancRNA 発現量下位 100 遺伝子)、そして pancRNA を強く発現する遺伝子群 (グループ C; pancRNA 発現量上位 100 遺伝子) の平均遺伝子発現量を比較した (Fig. 1-3D)。その結果、グループ C の遺伝子群の平均発現量はグループ A と B と比較して 3 倍以上有意に高いことが判明した。このことは pancRNA がパートナー遺伝子の発現量を上昇させている可能性を支持する。これまでの報告では、pancRNA による遺伝子発現上昇はプロモーター領域の DNA 脱メチル化を介することがラット体細胞株を用いた実験から示されており、マウス初期胚でも同様の傾向が見られるかを検証した。具体的には初期胚の網羅的 DNA メチル化情報 (Wang et al., 2014) を解析し、pancRNA を発現している遺

伝子座のプロモーター領域と pancRNA を持たない遺伝子座のプロモーター領域の平均 DNA メチル化レベルを比較した (Fig. 1-4)。その結果、pancRNA を持つ遺伝子は pancRNA を持たない遺伝子と比較して、有意に DNA メチル化レベルが低いことが明らかになった。このことは pancRNA が DNA 脱メチル化を介して遺伝子活性化に寄与するというこれまでの報告と一致する。これらの結果から、マウス初期胚における ZGA の際に pancRNA がパートナー遺伝子の発現上昇に関与している可能性が示唆された。

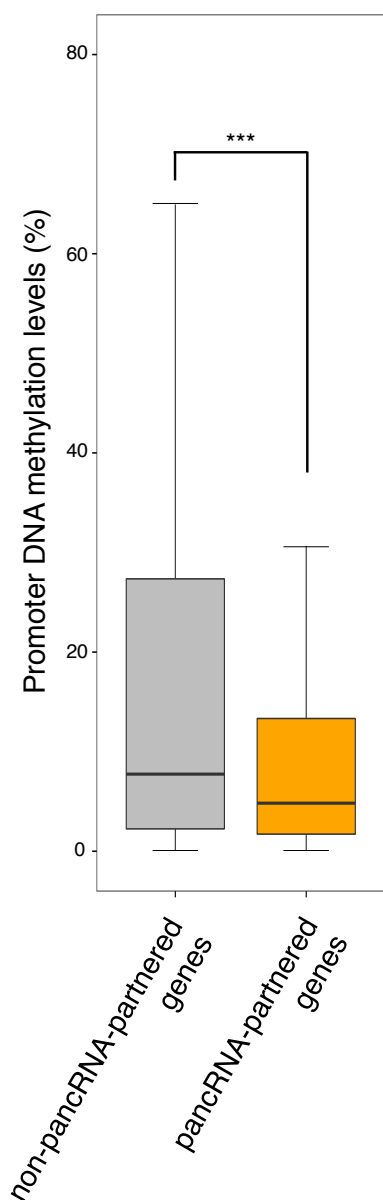


Fig. 1-4. pancRNA を持つ遺伝子座と持たない遺伝子座のプロモーター領域の平均 DNA メチル化率

## 同定された **pancRNA** とそのパートナー遺伝子の特徴

**pancRNA** を持つ遺伝子と **pancRNA** を持たない遺伝子を区別する特徴的な DNA 配列を探索するために、受精後発現上昇する **pancRNA** を持つ遺伝子のプロモーター領域の DNA 配列をもとに新規モチーフ探索解析を行ったところ、図 1-3E にあるような CT リッチ配列がプロモーター領域のセンス鎖に多く存在していることが示された(Fig. 1-3F, 1-5)。この CT リッチ配列の由来を調べるために CpG アイランドと呼ばれる領域に着目した。これは哺乳類ゲノム中で島のように点在する CpG 配列が非常に高い密度で存在する領域のことである(Bird et al., 1985)。この CpG アイランドは遺伝子のプロモーター領域に多く見られ(Bird, 1986; Gardiner-Garden and Frommer, 1987)、**pancRNA** を持つ遺伝子はプロモーター領域に CpG アイランドを持つことが多いことがこれまでに示されてきた(Uesaka et al., 2014)。実際に本研究で同定された **pancRNA** を持つ遺伝子群のプロモーター領域においても CpG アイランドが高頻度に見られた (Fig. 1-6A)。そこでこの CT リッチ配列の局在頻度が CpG アイランドの有無と関係があるかを調べるために、CpG アイランド型遺伝子プロモーター領域における CT リッチ配列の出現頻度を解析したところ、Fig. 1-6B に示すように、非 CpG アイランド型遺伝子のプロモーター領域に比べ、CpG アイランド型遺伝子のプロモーター領域において CT リッチ配列が有意に多く出現することが示された。これらの結果から、CT リッチ配列は CpG アイランドと密接に関係している可能性が示唆された。重要なことに、この CT リッチ配列の分布を、**pancRNA** を持つ遺伝子群と持たない遺伝子群でそれぞれ解析したところ、この二群で CT リッチ配列の分布が明らかに異なることが示された (Fig. 1-6C)。上述したように **pancRNA** を持

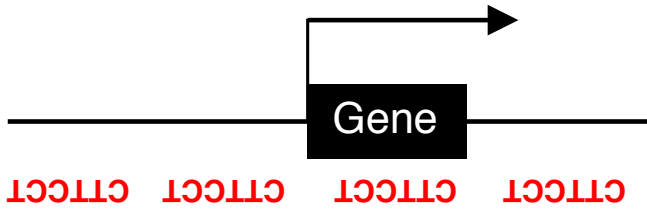
たない遺伝子群では CT リッチ配列はプロモーター領域・遺伝子領域の両方において、遺伝子から見てアンチセンス鎖に偏在しているのに対し、pancRNA を持つ遺伝子群ではプロモーター領域ではセンス鎖、遺伝子領域ではアンチセンス鎖に偏在していることから(Fig. 1-5)、pancRNA を持つ遺伝子群では遺伝子転写開始点を境に鏡像構造のゲノム構造を形成していることが示唆された。

マウス初期胚はエピゲノム解析に供するための十分なサンプルを確保することが難しいため、こうした pancRNA パートナー遺伝子の配列上の特徴がエピゲノム環境にどのような影響を与えているかを詳細に調べるために、マウス ENCODE プロジェクト(Mouse ENCODE Consortium et al., 2012; Yue et al., 2014) の大脳皮質組織トランスクリプトームデータを用いて、pancRNA を発現し、遺伝子発現レベルが高い遺伝子座 (pancRNA 型) と pancRNA を持たずに遺伝子発現レベルが高い遺伝子座 (非 pancRNA 型) を抽出し、H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac、RNA ポリメラーゼ 2、CCCTC-binding factor (CTCF) に対する抗体を用いた ChIP-seq データを解析し、転写開始点近傍(TSS)の状態を調べた(Fig. 1-7)。まず、エンハンサー領域の指標の一つとされる H3K4me1 は非 pancRNA 型、pancRNA 型のどちらも全遺伝子平均のシグナル値に比べて同程度高いが、pancRNA 型のほうが TSS から離れた領域でも高いシグナルが維持されていた (Fig. 1-7B)。次に活性化状態のプロモーターの指標とされる H3K4me3 は、非 pancRNA 型、pancRNA 型のどちらも全遺伝子平均のシグナル値に比べて同程度高いが、pancRNA 型のほうが TSS の上流領域において非 pancRNA 型より高い平均シグナル値を示した (Fig. 1-7C)。これはどちらも活性化プロモーター状態となっていることを示しており、pancRNA 型では上流領域がさらに高活性化状態



になっていることを表している。次にオープンクロマチン領域の指標の一つとされる、H3K27ac は、非 pancRNA 型、pancRNA 型のどちらも全遺伝子平均のシグナル値に比べて高いが、pancRNA 型は非 pancRNA 型に比べてさらに平均シグナル値が高い (Fig. 1-7D)。これは pancRNA 型のプロモーターがより活性が高い状態にあることを示すのかもしれない。一方で、RNA ポリメラーゼ II の局在を調べたところ、非 pancRNA 型、pancRNA 型のどちらも全遺伝子平均のシグナル値に比べて同様に高く、非 pancRNA 型と pancRNA 型に目立った差は見つからなかった (Fig. 1-7E)。興味深いことに、CT リッチ配列を結合モチーフとし、ゲノム立体構造形成に機能する CTCF の局在を調べたところ、pancRNA 型は全遺伝子平均と差がなかったが、非 pancRNA 型は転写開始点の 100-150 bp 上流で高い平均シグナル値を示した (Fig. 1-7F)。これらの結果を総合すると、pancRNA 型と非 pancRNA 型はどちらもプロモーター活性が高い傾向にあるが、pancRNA 型ではエピジェネティックに活性が高い状態が TSS から上流領域にも及んでいることが示唆された。これは非 pancRNA 型と pancRNA 型において顕著な差が認められた CTCF の集積により何らかの影響がもたらされた可能性が考えられる。以上のことから、pancRNA パートナー遺伝子は DNA 配列・エピゲノムのいずれの観点からも pancRNA を持たない遺伝子とは異なる特徴を有することが明らかになった。

pancRNA-lacking genes



pancRNA-partnered genes

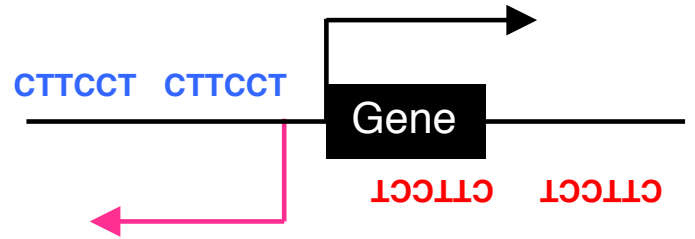


Fig. 1-5. pancRNA パートナー遺伝子と pancRNA を持たない遺伝子座における CT リッチモチーフ局在の模式図。

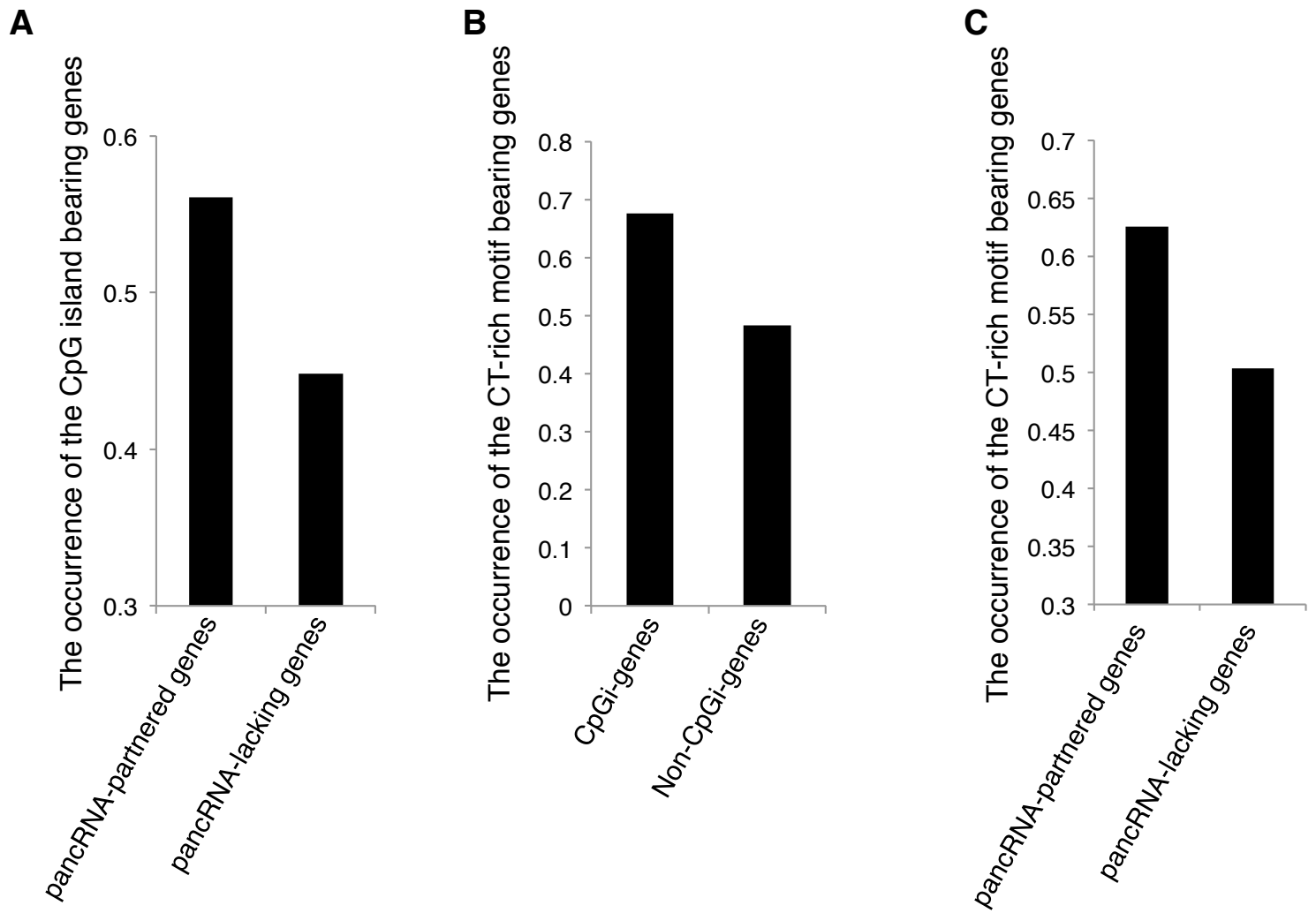


Fig. 1-6. *pancRNA* パートナー遺伝子と *pancRNA* を持たない遺伝子座における CpG island (CpGi)と CT リッチモチーフ。

(A) それぞれの遺伝子群の中の CpGi を持つ遺伝子が占める割合。(B) CpGi を持つ遺伝子の中の CT リッチモチーフをもつ遺伝子の占める割合。(C) *pancRNA* パートナー遺伝子と *pancRNA* を持たない遺伝子座における CT リッチモチーフを持つ遺伝子の占める割合。

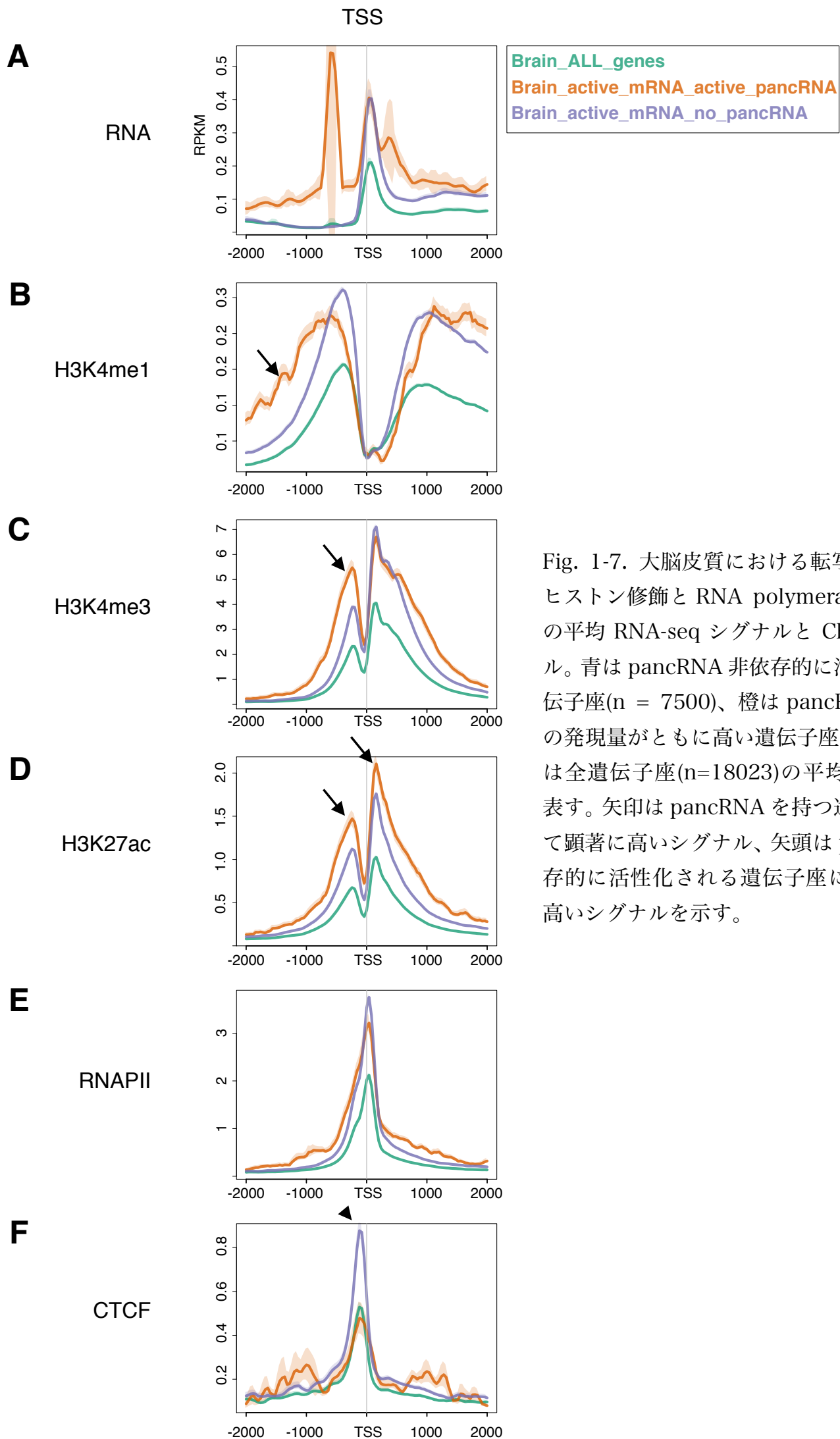


Fig. 1-7. 大脳皮質における転写開始点近傍のヒストン修飾と RNA polymerase II と CTCF の平均 RNA-seq シグナルと ChIP-seq シグナル。青は pancRNA 非依存的に活性化される遺伝子座(n = 7500)、橙は pancRNA と mRNA の発現量がともに高い遺伝子座(n = 413)、緑は全遺伝子座(n=18023)の平均シグナル値を表す。矢印は pancRNA を持つ遺伝子座において顕著に高いシグナル、矢頭は pancRNA 非依存的に活性化される遺伝子座において顕著に高いシグナルを示す。

## pancRNA の遺伝子活性化能

ZGA の際に pancRNA がパートナー遺伝子の発現上昇に機能的に関与している可能性を検証するために、さらなる解析を進める pancRNA 候補を選定することにした。選定基準として、受精に伴い、発現上昇すること、そしてより後期の発生段階に位置し、多能性を獲得した ES 細胞においても高い発現を示すものを条件とした。この条件により、10 の pancRNA 候補に絞られ (Table 3)、その中でも特に発現量上位 3 つの遺伝子 (*Interleukin 17d (Il17d)*、*motile sperm domain containing 3 (Mospd3)* and *TBC1 domain family member 22a (Tbc1d22a)*) の pancRNA (*pancIl17d*, *pancMospd3*, *pancTbc1d22a*) について機能解析を行うこととした。

まずこれら 3 つの pancRNA とパートナー遺伝子の初期発生における発現動態を解析するために、未受精卵、精子、受精 1 細胞期胚、2 細胞期胚、4 細胞期胚を用いて RT-qPCR で発現量を定量化した (Fig. 1-8A, B)。機能解析の対象とした 3 つの pancRNA はいずれも確かに 2 細胞期胚で発現上昇しており、*Mospd3* と *Tbc1d22a* の発現は pancRNA の発現と同様に 2 細胞期において上昇していることがわかった。一方で、*Il17d* は pancRNA の発現が 2 細胞期に見られるにも関わらず、2 細胞期での発現は見られず、4 細胞期になって発現が見られた。すなわち、pancRNA はパートナー遺伝子と同時期、もしくは先行して発現することが示された。次にこれらの遺伝子座において、初期発生過程においてメチル化レベルが変わる領域をマウス初期発生胚の網羅的 DNA 化情報を基に選定し (Fig. 1-9)、プロモーター領域の DNA メチル化状態をバイサルファイトシーケンシングにより解析した (Fig. 1-8C)。*Il17d* プロモーター領域を見てみると、未受精卵、精子、1 細胞期胚で比較的高メチル化状態であるが、2 細胞期に到達するとその

DNA メチル化がほとんど消去されていることがわかった。この DNA 脱メチル化現象と *panc117d* の発現がおきるのはどちらも 2 細胞期であることから、DNA 脱メチル化と *panc117d* 発現動態はよく一致していた。同様に *Mospd3* や *Tbc1d22a* 遺伝子座における DNA メチル化レベルは 1 細胞期胚で比較的高いが、2 細胞期では低い。これらの遺伝子座においても *pancRNA* 発現と DNA 脱メチル化が同時期に観察された。こうした *pancRNA* 発現と DNA 脱メチル化時期の一致は *pancRNA* が DNA 脱メチル化を介して遺伝子活性化を促進している可能性を示唆する。この可能性を検証するために、*pancRNA* に対する siRNA を設計し、*pancRNA* をノックダウンすることでその配列特異的な影響を調べた。マウス初期胚では核酸を直接核内に注入することが可能なため、この手法を用いて受精 1 細胞期胚に siRNA を核内注入することとした。siRNA 注入 2 細胞期胚を用いて RT-qPCR により *pancRNA* とそのパートナー遺伝子の発現量を定量化したところ、*pancRNA* に対する siRNA を注入した 2 細胞期胚では有意に *pancRNA* の存在レベルが低下しており (Fig. 1-10)、確かに対象の 3 つの *pancRNA* をそれぞれノックダウンすることに成功していたことがわかった。次にそれぞれのパートナー遺伝子の発現が *pancRNA* ノックダウンにより影響をうけるか調べたところ、*pancRNA* ノックダウンにより、2 細胞期、4 細胞期ともにパートナー遺伝子の発現量が有意に減少していた (Fig. 1-10A)。このことから *pancRNA* は受精後の遺伝子活性化を促進していることが示された。この *pancRNA* ノックダウンによる遺伝子活性化の阻害は DNA メチル化状態の変化を介しているかどうかについても、*pancRNA* ノックダウン胚における DNA メチル化状態をバイサルファイトシーケンシングにより解析した。その結果、本来ならこれらの *pancRNA* が発

現する 2 細胞期で減少するはずの DNA メチル化レベルが、pancRNA ノックダウン胚ではあまり減少せず、高いメチル化レベルを保っていることがわかった (Fig. 1-10B)。この結果は pancRNA による DNA 脱メチル化が、siRNA による ノックダウンで阻害されたと考えられた。*Ili7d* 遺伝子座においては、さらに pancRNA 過剰発現ベクターと siRNA を同時にマイクロインジェクションすることで、pancRNA ノックダウンによる DNA 脱メチル化の阻害をレスキューできることを確認した (Fig. 1-10B)。これらの実験結果から ZGA の際に pancRNA がプロモーター領域の DNA 脱メチル化を介してパートナー遺伝子の活性化を実現していることが示された。

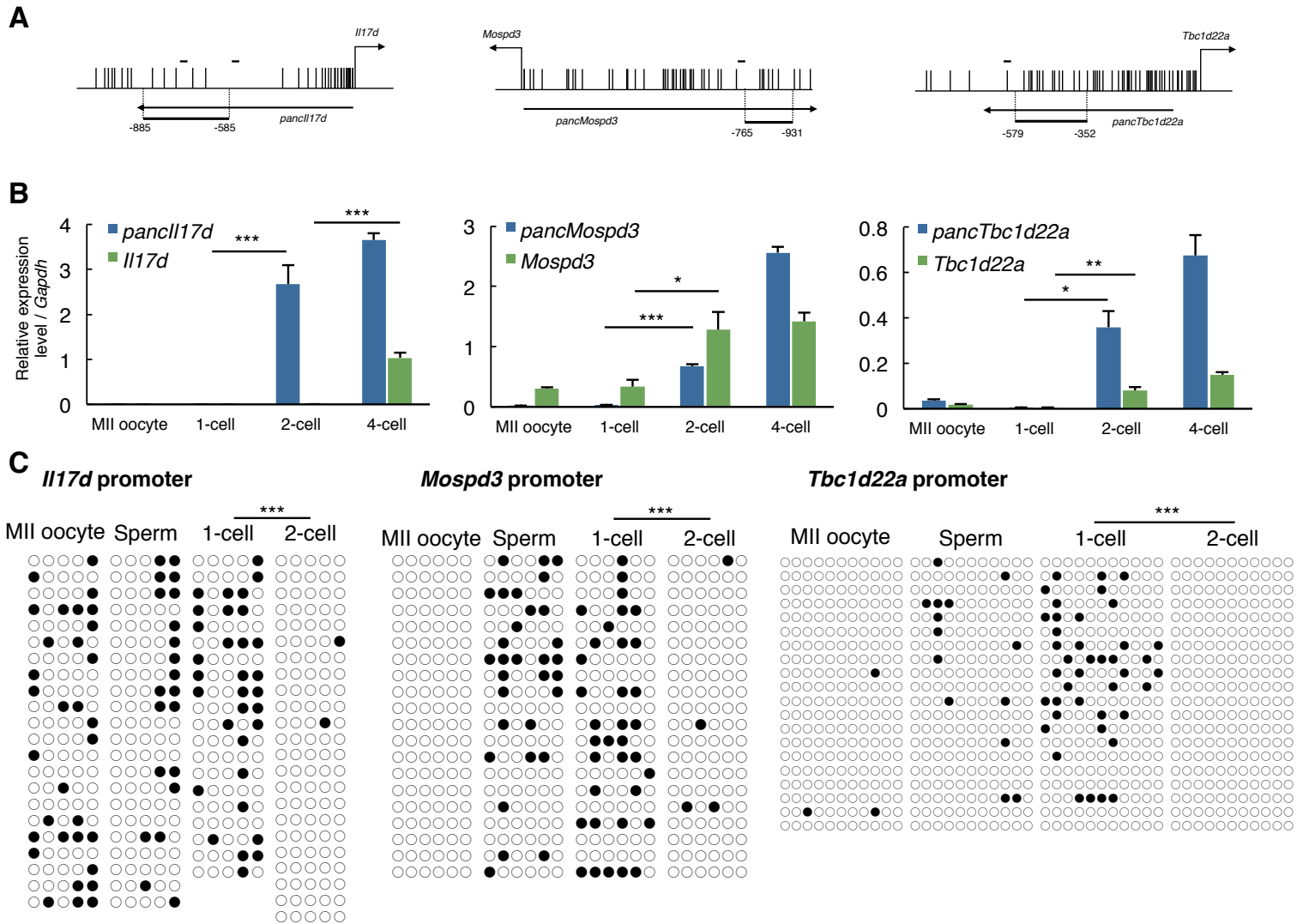


Fig. 1-8. マウス初期発生における pancRNA ノックダウンによる影響

(A) マウス *Il17d*、*Mospd3*、*Tbc1d22a* 遺伝子座。縦線はそれぞれの CpG 配列の相対的位置を表し、太い横線はバイサルファイトシーケンシングにより、DNA メチル化を解析した領域を表す。上部に描かれた細い横線は本論文で使用した siRNA がターゲットとする領域の相対的位置を表す。(B) qPCR による各遺伝子座における pancRNA と mRNA 発現レベルの測定。測定の対象としたサンプルは未受精卵、受精一細胞期胚、二細胞期胚、四細胞期胚である。(C) 各遺伝子座における DNA メチル化解析。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .



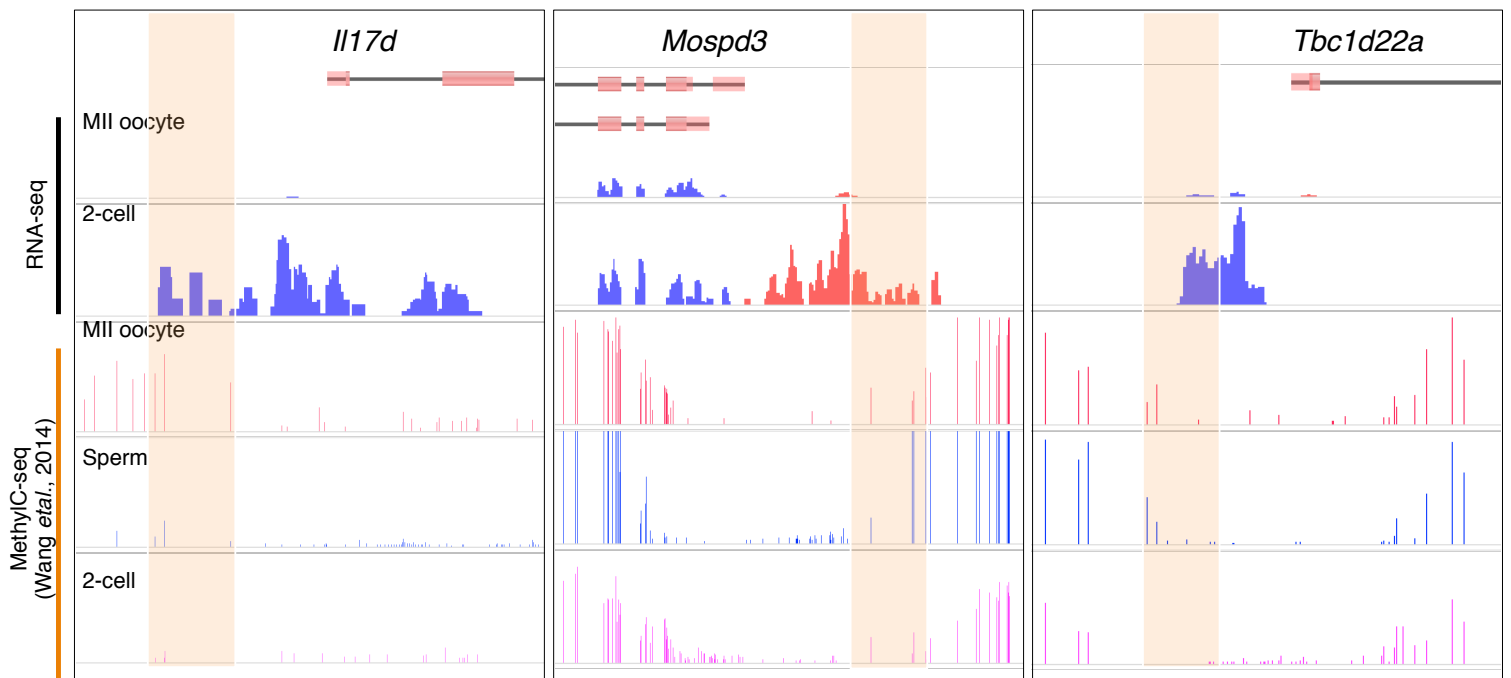
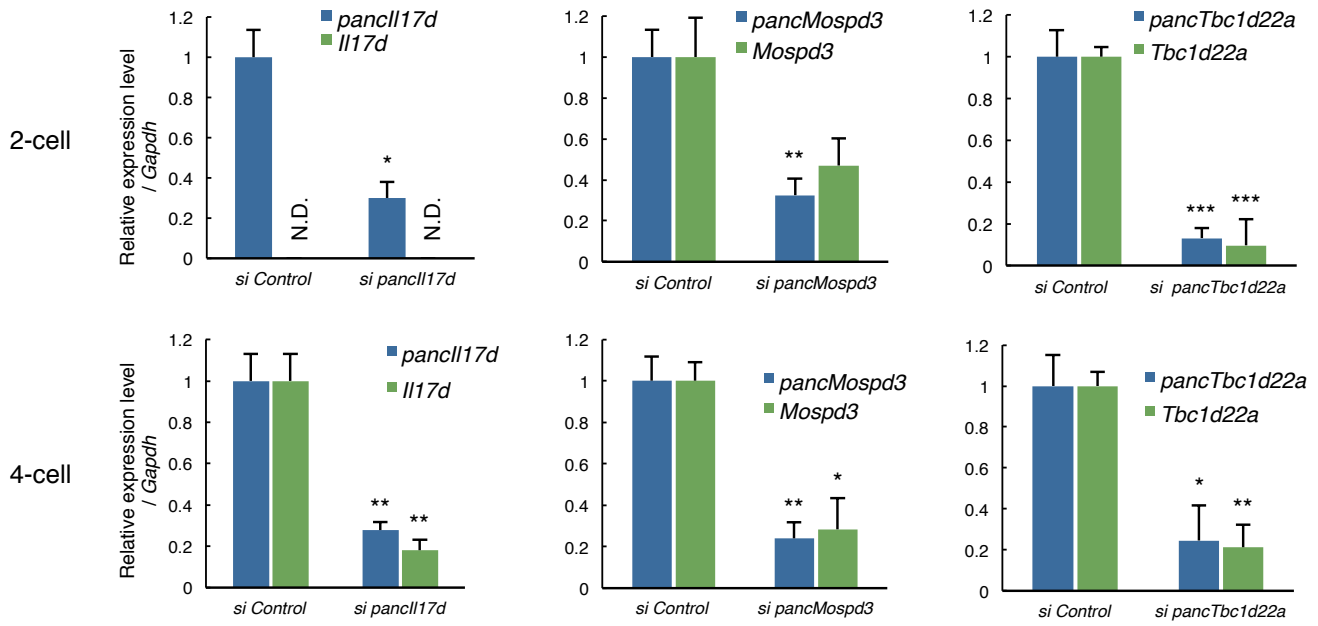
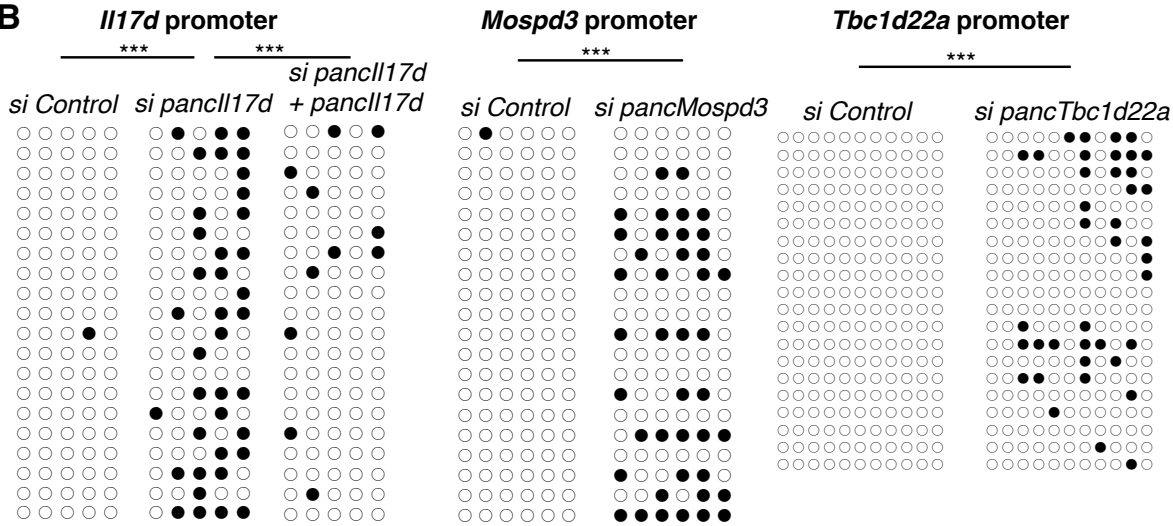


Fig. 1-9. *III17d*、*Mospd3*、*Tbc1d22a* 遺伝子座における MethyC-seq データ (Wang et al., 2014) と本研究の RNA-seq データ。橙の影の領域は本研究においてバイサルファイトシーケンシングによって DNA メチル化状態を解析した領域を表す。

**A**



**B**



**C**

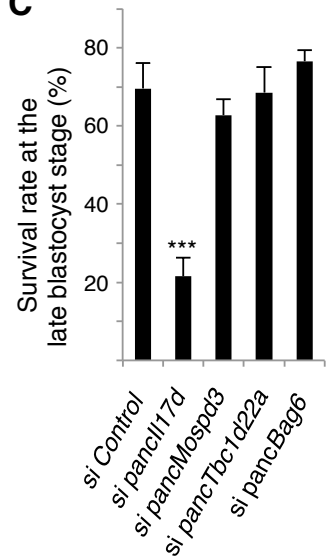


Fig. 1-10. マウス初期発生における pancRNA ノックダウンによる遺伝子発現と DNA メチル化と正常発生に与える影響の検討

(A) コントロール胚と pancRNA ノックダウン胚における mRNA と pancRNA の発現レベル

(B) コントロール胚と pancRNA ノックダウン胚における DNA メチル化。 (C) pancRNA ノックダウンによる胚盤胞形成率への影響。解析に供した胚の数は si Control、si *panc117d*、

si *pancMospd3*、si *pancTbc1d22a* のそれぞれで 261、251、78、70 である。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$

## pancRNA ノックダウンによるマウス初期胚における機能解析

マウス初期発生における pancRNA の機能を解析するために、pancRNA ノックダウン個体の胚発生能を検定することにした。上記 3 つの pancRNA に加えて、先のジーンオンロジー解析により示された細胞死関連遺伝子群の pancRNA の中から、最も発現量の高い pancRNA、*pancBag6* も加えて、pancRNA ノックダウンを行い、胚発生能を検定した (Fig. 1-10C)。まず、*in vitro* 条件下での胚盤胞発生率を計測したところ、コントロール胚では  $69.6 \pm 6.4\%$  の胚が正常に胚盤胞期まで到達したのに対し、*pancI17d* をノックダウンした場合には、 $21.5 \pm 4.7\%$  の胚しか胚盤胞期に到達することができなかった。一方、*pancMospd3* ノックダウン胚では  $64.8 \pm 4.0\%$ 、*pancTbc1d22* ノックダウン胚では  $68.6 \pm 6.6\%$ 、*pancBag6* ノックダウン胚では  $76.6 \pm 2.9\%$  の胚が正常に胚盤胞期まで到達し、有意差は得られなかった。ノックダウン効果の特異性を検定するために、別の部分に対する siRNA を用いて *pancI17d* をノックダウンしたところ、同じような発生阻害が観察されたことから (Fig. 1-11)、siRNA によるオフターゲット効果の可能性は低いと考えられた。また、*pancMospd3* ノックダウンに関しては、胚盤胞形成率には影響を与えなかったものの、*pancMospd3* ノックダウン胚を *in vitro* 条件下で更に観察を続けると、胚盤胞が透明帯を破るハッチング現象が起りづらくなっていることがわかった (Fig. 1-12A, B)。ハッチングは胚盤胞が子宮に着床するために必須の過程であり、ハッチング障害を呈した *pancMospd3* ノックダウン胚は *in vivo* では後期の胚発生に進めない可能性が高いことが予想された。すなわち、*pancMospd3* は胚発生のハッチング過程において重要な役割を担っていることが示唆された。次に胚盤胞の内部細胞塊由来の多能性細胞である ES 細胞において

pancRNA ノックダウン効果を調べてみると、*pancI17d*、*pancMospd3*、*pancBag6* ノックダウンのいずれの場合にも、継代 3 日後の生存細胞数がコントロール ES 細胞と比較して、有意に減少していることが明らかになった(Fig.1-13)。このことから、機能解析に用いた 4 種の pancRNA の中で、3 種の pancRNA が発生のいずれかの段階において、生物学的役割を担っていることが明らかとなった。

これら 4 つの pancRNA について各々のパートナー遺伝子と発現量に正の相関関係が初期胚・ES 細胞以外の他の組織でも当てはまるのかを調べるために、マウス ENCODE プロジェクト(Mouse ENCODE Consortium et al., 2012; Yue et al., 2014)と呼ばれる網羅的マウス組織トランスクリプトームデータから 17 の組織における RNA 発現量を抽出し、解析を行った (Fig. 1-14)。4 つの pancRNA とそのパートナー遺伝子の組織ごとの発現量における相関係数を計算したところ、*I17d* 遺伝子座では  $r=0.68$  ( $p\text{-value} = 0.00292$ )、*Mospd3* 遺伝子座では  $r=0.68$  ( $p\text{-value} = 0.002776$ )、*Tbc1d22a* 遺伝子座では  $r=0.92$  ( $p\text{-value} = 1.325e-07$ )、*Bag6* 遺伝子座では  $r=0.86$  ( $p\text{-value} = 9.37e-06$ ) と、平均  $r=0.78$  の正の相関係数が得られた。このことから、pancRNA とパートナー遺伝子の mRNA の発現量には正の相関関係が他の組織でも維持されていることが明らかになった。このことは体組織細胞においても pancRNA が遺伝子活性化に働いている可能性を示唆している。

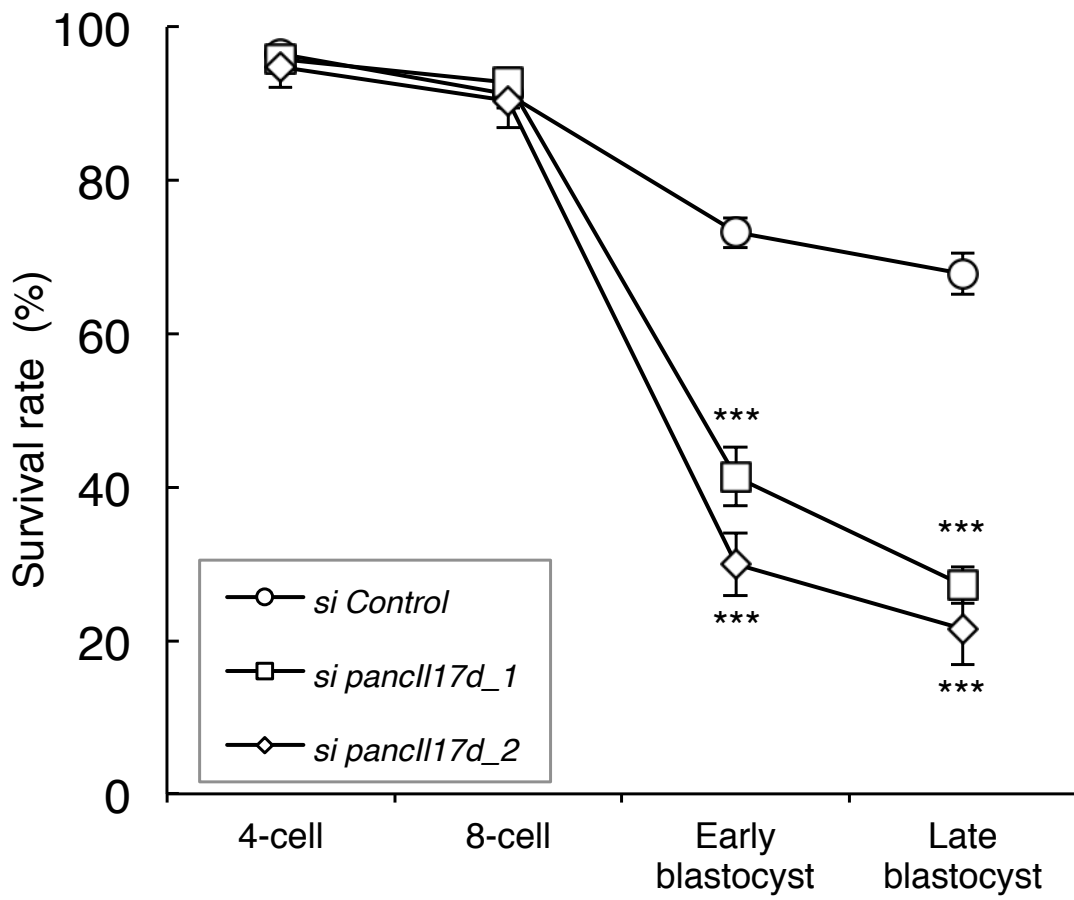
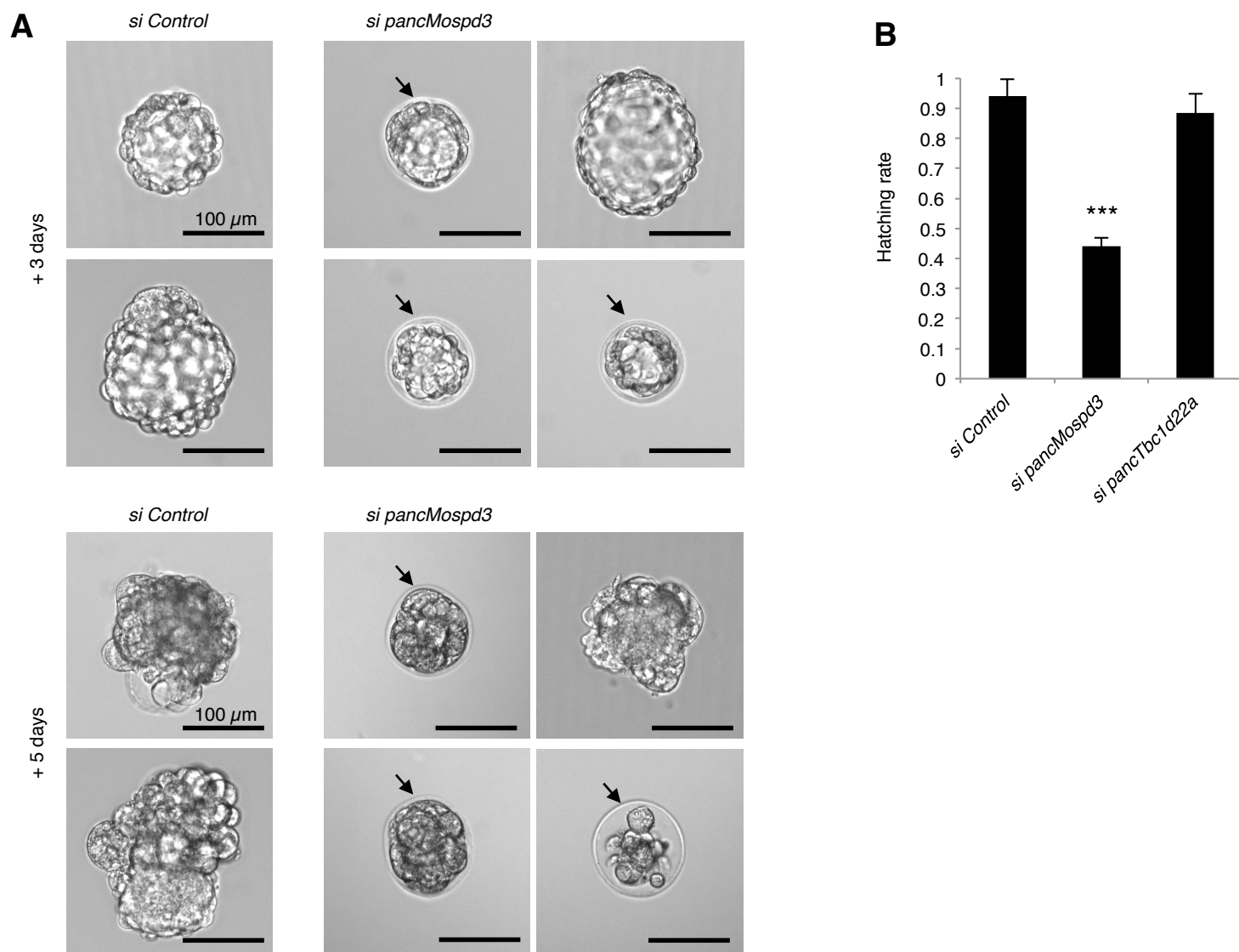


Fig. 1-11. 各発生段階における *panc117d* ノックダウン胚の生存率。\*\*\*,  $p < 0.001$



**Fig. 1-12.** *pancMospd3* ノックダウンによる初期発生における影響

(A) アウトグロース開始から 3 日もしくは 5 日後の胚の形態。矢頭は残存している透明帯を表す。(B) アウトグロース 5 日後における透明帯からのハッチング率。

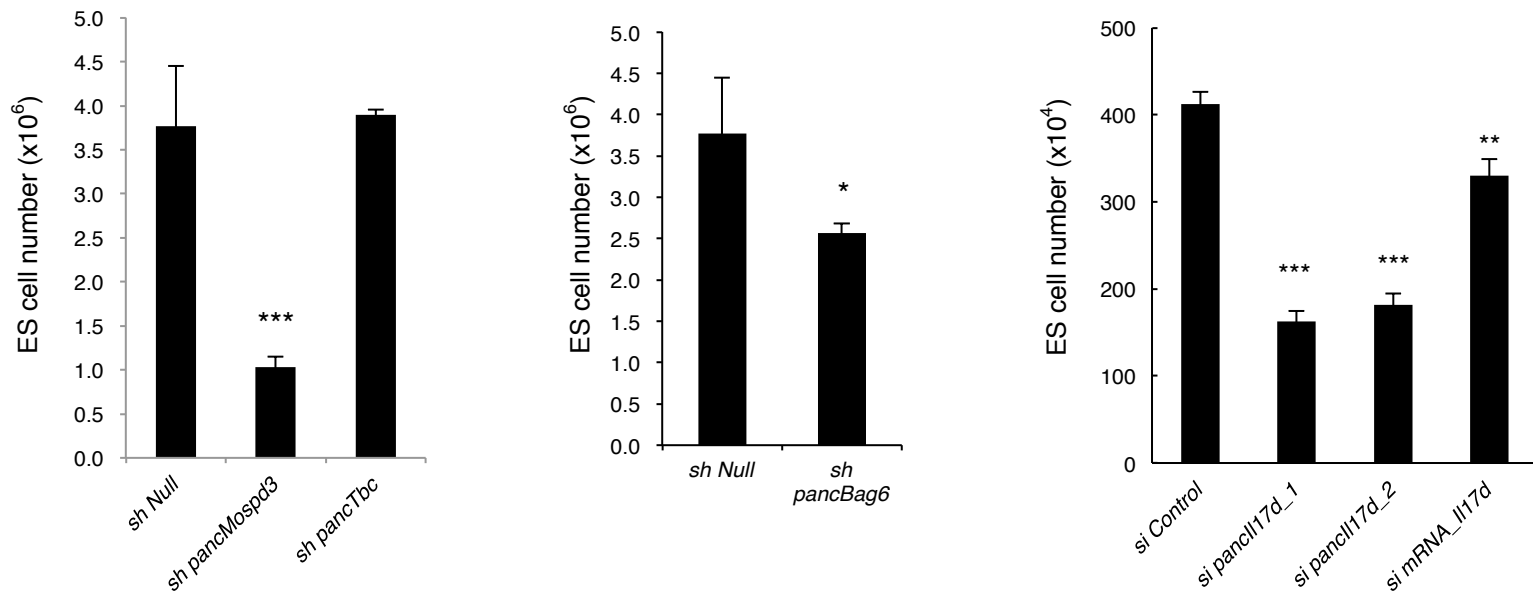


Fig. 1-13. *pancBag6* ノックダウンによる ES 細胞の生細胞数カウント

*pancRNA* ノックダウン ES 細胞における生存細胞数。細胞数カウントは 100,000 細胞を継代してから 3 日後に行った。

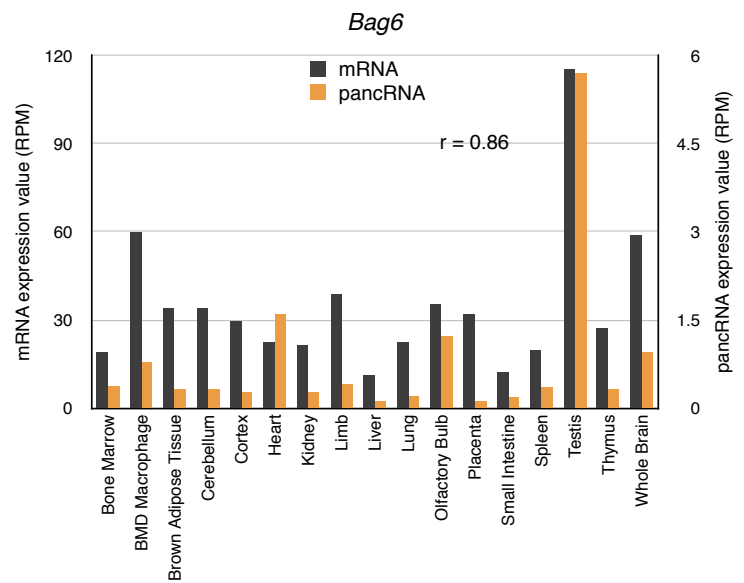
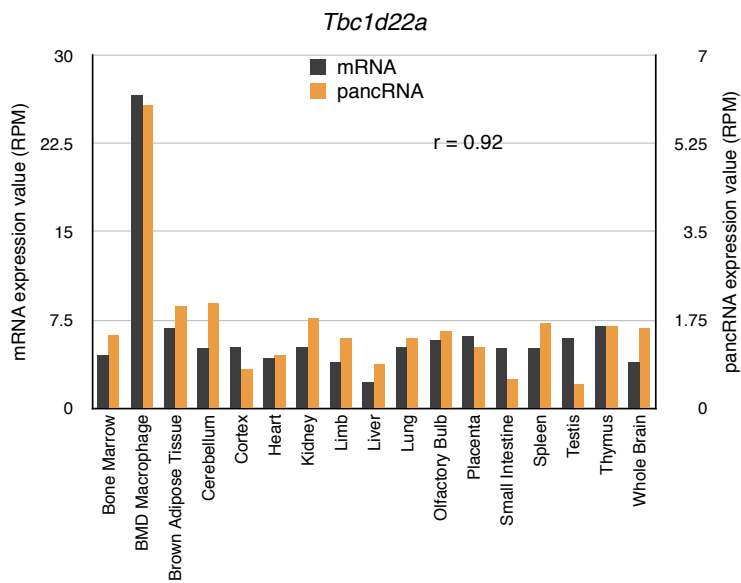
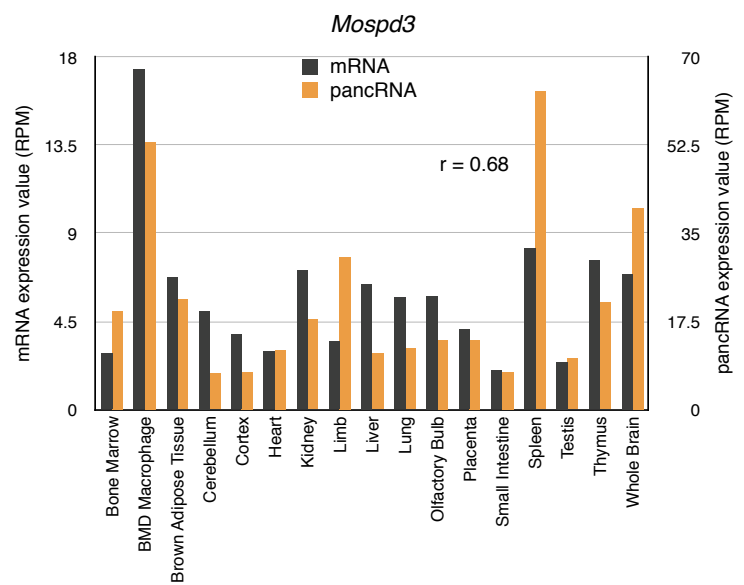
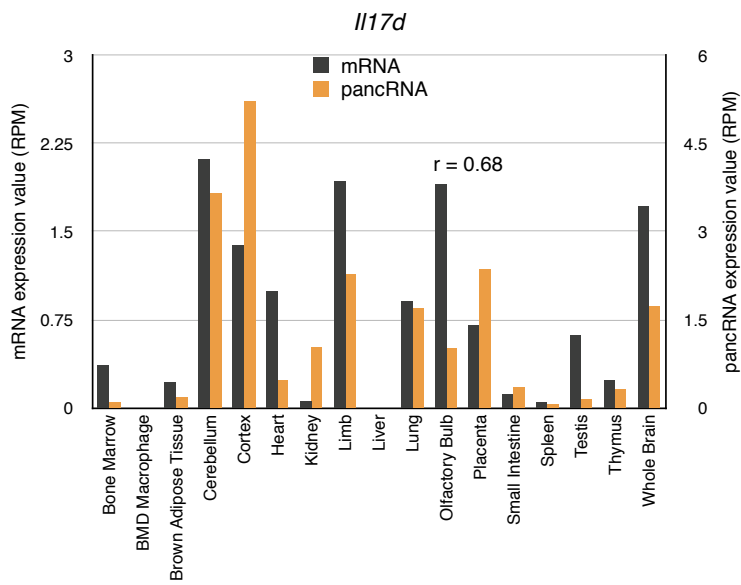


Fig. 1-14. 生体組織における pancRNA と mRNA の相関関係

成体組織における pancRNA と mRNA の発現量。mRNA の発現量を左軸に、pancRNA の発現量を右軸に示し、Pearson 相関係数を r で示す。



## pancRNA を介した DNA 脱メチル化に必要な関連因子の同定

マウス初期胚において DNA 脱メチル化に関わる因子群として、これまでに塩基除去修復系に含まれる PARP などが同定されてきた(Hajkova et al., 2010)。そこでこの塩基除去修復系が pancRNA を介した DNA 脱メチル化の経路に含まれているのではないかと考え、PARP の阻害剤である 3-aminobenzamide (ABA)を初期胚に使用し、DNA メチル化状態を調べることで明らかにすることを試みた。その結果、ABA を培地中に添加することで、2 細胞期に *Ilf17d* プロモーター領域で起こるはずであった DNA 脱メチル化が阻害された (Fig. 1-15A)。すなわち、PARP を含む塩基除去修復系が pancRNA による DNA 脱メチル化に必要であることが示された。このときの *pancIlf17d* とパートナー遺伝子である *Ilf17d* の発現量を RT-qPCR によって定量したところ、*Ilf17d* の発現量が有意に低下していた (Fig. 1-16)。このことは *Ilf17d* がメチル化によって制御されており、*pancIlf17d* による DNA 脱メチル化が必要であることが示唆された。一方で、*pancIlf17d* の発現量は ABA による塩基除去修復系の阻害を行っても、変化しなかった (Fig. 1-16)。

緒言に述べたように、DNA メチル化を除去する過程に ten-eleven translocation (TET) と呼ばれる酵素による水酸化が塩基除去修復系による能動的脱メチル化に重要な役割を果たすことが報告されている (Kohli and Zhang, 2013; Teperek-Tkacz et al., 2011)。TET ファミリー遺伝子は 3 つ見つかっており、そのうち特に *Tet3* 遺伝子が初期胚に豊富に存在している (Table 5)。そこでこの TET 遺伝子が pancRNA による DNA 脱メチル化に関わっているのではないかと考え、初期胚に豊富に存在する *Tet3* と、初期胚での発現が殆ど無い *Tet2* をそれぞれノックダウンすることでそれぞれの DNA 脱メチル化への影響を調べた (Fig1-15B)。

その結果、*Tet2* をノックダウンした場合には DNA 脱メチル化の阻害は起こらなかったが、*Tet3* をノックダウンした場合には 2 細胞期の DNA 脱メチル化が阻害された。このことから、TET3 が pancRNA による DNA 脱メチル化に関わっていることが示唆された。

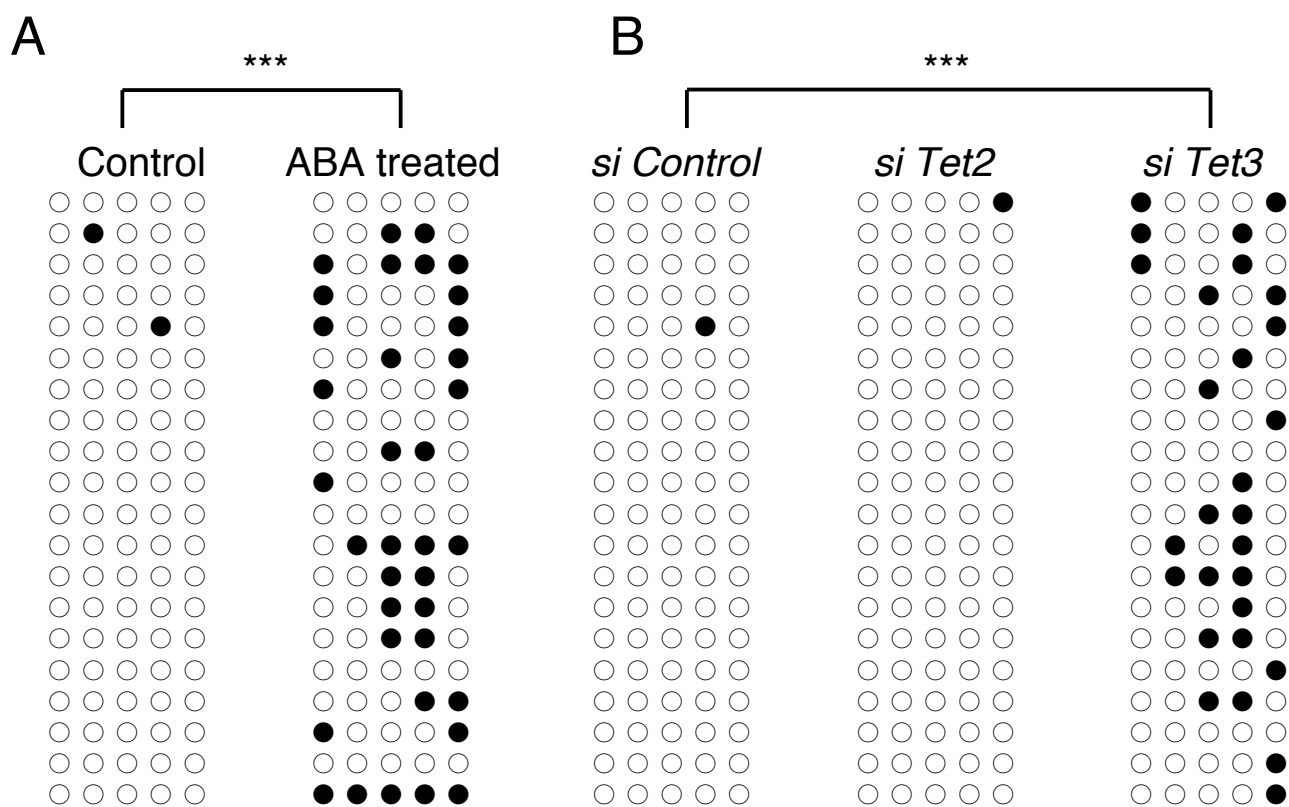


Fig. 1-15. マウス初期発生における pancRNA を介したエピジェネティック変化と遺伝子活性化 (A) ABA 処理胚の DNA メチル化状態。(B) *Tet2*、*Tet3* ノックダウン胚の DNA メチル化状態。\*\*\*,  $p < 0.001$ .

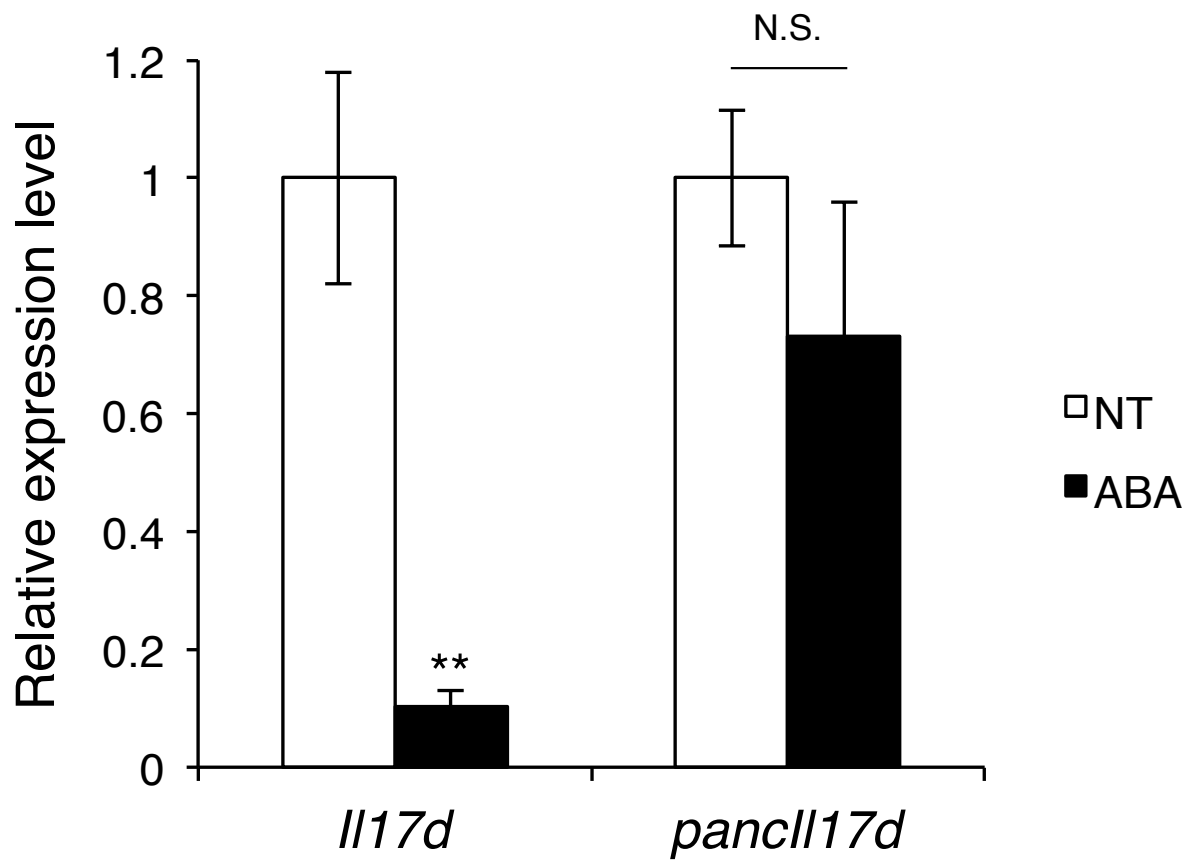


Fig. 1-16. ABA 処理胚における *Il17d* と *pancIl17d* の発現量

## 考察

受精後、ZGA において遺伝子活性化の配列特異性を生み出す因子については未解明の部分が多い。本研究では、そうした特異的遺伝子活性化に関わる候補分子の一つとして、受精に伴い発現する *pancRNA* を 1,000 個以上同定することに成功した。そこで発現量の多い上位 3 つの *pancRNA* (*pancI17d*, *pancMospd3*, *pancTbc1d22a*) に着目し、機能解析を行い、これらの *pancRNA* が確かに配列特異的 DNA 脱メチル化を介してパートナー遺伝子の活性化に関わることを明らかにした。これらの 3 つの *pancRNA* に加えて、ジーンオントロジー解析により抽出された細胞死関連遺伝子の *pancRNA* (*pancBag6*) についてマウス初期胚における機能を解析したところ、胚盤胞形成には *pancI17d* が、胚盤胞形成後のハッチングには *pancMospd3* が、そして ES 細胞形成能についても *pancI17d*, *pancMospd3*, *pancBag6* の 3 つの *pancRNA* が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

### **pancRNA による遺伝子活性化の配列特異性**

これまでに遺伝子発現を制御する長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) はいくつか報告されてきた (Fatica and Bozzoni, 2014)。例えば、*HOTAIR* はゲノム上の様々な遺伝子座に PRC2 複合体とともにトランス因子としてヒストン修飾に作用し、遺伝子発現を抑制する (Chu et al., 2011)。一方で、*HOTTIP* と呼ばれる *Hox* 遺伝子群の 5' 側から転写される lncRNA はシス因子として MLL 複合体とともにヒストン修飾に作用し、実際に複数の *HoxA* 遺伝子群を活性化させる。今回同定された *pancRNA* はシス因子として DNA メチル化に作用し、単一のパートナー

遺伝子を活性化させていると考えられる。その理由として、1) *pancRNA* をノックダウンした際には DNA 脱メチル化の阻害とともにパートナー遺伝子の発現が低下したこと、2) *Il17d* の遺伝子座において、*pancIl17d* の発現が *Il17d* 遺伝子の発現に先行する現象が観察されたこと、そして第二章で示すように 3) *pancIl17d* ノックダウン胚にリコンビナント蛋白質を添加することでレスキューができたことが挙げられる。1) に関して、ラット体細胞株においては、*pancRNA* のノックダウンをした場合でも他の遺伝子座の DNA メチル化状態と遺伝子発現に影響を与えないことが示されている(Tomikawa et al., 2011)。加えて、siRNA インジェクション時に *pancRNA* 強制発現ベクターを加えると、コントロールと同程度まで DNA メチル化レベルが減少することから、*pancRNA* ノックダウンによる DNA メチル化レベルの上昇は、siRNA が直接 DNA に作用した二次的な影響を反映したものではないことが支持される。2) に関して、もし *pancRNA* が遺伝子発現を正に制御する因子として機能しているのであれば、*pancRNA* の発現が mRNA の発現に先行することが想定されるが、*Il17d* 遺伝子座での *pancIl17d* 発現の先行という観察結果は実にこの予想とよく合致する。他の遺伝子座でも *pancRNA* と mRNA 発現の時系列をより詳しく解析すれば *pancRNA* 発現の先行が観察されるかもしれない。3) に関しては第二章で詳述するが、*pancIl17d* ノックダウンの影響である胚盤胞期での胚性致死をパートナー遺伝子の産物であるリコンビナント IL17D の添加によりレスキューできたことから、仮に *pancIl17d* に隠されたトランス因子としての機能があったとしても、初期発生においては限られた効果しかないことが予想される。従って、これらの結果を総合すると、*pancRNA* はこれまで報告されてきた lncRNA と異なり、シス因

子として DNA メチル化に機能しパートナー遺伝子の活性化を行う、新規の長鎖ノンコーディング RNA 群を構成していることが強く支持される。

### pancRNA による遺伝子活性化の予想される分子機序

pancRNA がシス因子として DNA メチル化に機能する際、どのような分子機序により配列特異的に遺伝子活性化を達成しているのだろうか。一つの可能性として、pancRNA が DNA メチル化制御関連因子と結合し、それらをプロモーター領域にリクルートすることで、配列特異的に DNA 脱メチル化に適したエピゲノム環境に整えていることが考えられる。実際に DNA 脱メチル化経路に含まれる塩基除去修復関連因子である PARP の阻害剤を加えた場合や、*Tet3* ノックダウンにより、pancRNA による DNA 脱メチル化が阻害された。しかし、実際に pancRNA がこうした PARP や *Tet3* と直接結合し、プロモーター領域にリクルートしているかはまだわからない。今後、pancRNA に対する RNA 免疫沈降解析が進めば、より pancRNA-蛋白質複合体の詳細が明らかになることが期待される。

本研究において、アンチセンス pancRNA を細胞株で強制発現させた場合、DNA 脱メチル化を介して、遺伝子活性化へとつながることが分かった。興味深いことに、遺伝子と同じ方向に転写されるセンス pancRNA を導入しても DNA 脱メチル化と遺伝子活性化は起こらない(Tomikawa et al., 2011)。すなわち、pancRNA の遺伝子活性化機構には転写された RNA の方向性情報を読み取る、もしくは転写された RNA の配列情報の違いを認識する分子機構が備わっていることが推察される。哺乳類ゲノムの多くの CpG アイランドにおいて、R ループと呼ばれる DNA-RNA-DNA の三重鎖構造をとることが示され、この R ループを持

つ CpG アイランドは新規 DNA メチル化付与酵素である Dnmt3b から CpG アイランドを守り、低メチル化状態に保つ(Ginno et al., 2012)。興味深いことに、この DNA メチル化阻害は、R ループ構造上において RNA 転写が起こるときに限られる。特に、転写される鋳型鎖が C リッチのときにのみ、この R ループ構造は DNMT3b による新規 DNA メチル化阻害能を持つ。今回、受精時に高発現する *pancRNA* は CpG アイランド型のプロモーターから転写され、鋳型鎖に CT リッチモチーフを多く持つことを報告した (Fig. 1-6)。従って、マウス初期発生胚において、ゲノム中に R ループ構造が存在するかはまだ検討されていないが、CpG アイランドから転写された *pancRNA* が C リッチな自身の鋳型鎖と結合し、R ループ構造をとり、DNMT 活性を対象配列上で特異的に阻害している可能性も十分に考えられる。しかしながら、マウス初期胚においては DNMT 活性がそもそも低いことから、初期胚で形成された R ループは DNMT3b 阻害だけではなく、DNA 脱メチル化に関わる他の因子を誘導することで受精後配列特異的 DNA 脱メチル化を実現している可能性もある。

*pancRNA* 自身の発現を制御する上流因子についてはまだ未解明であるが、*panc117d* の発現量は ABA による塩基除去修復系の阻害を行っても、変化しなかった (Fig. 1-16) ことから、*panc117d* 自身の発現は当該領域の DNA メチル化には影響を受けないことが示唆された。従って *pancRNA* の発現は別の領域が担っている可能性、もしくは DNA メチル化が存在していても *pancRNA* を発現させられる、いわゆるパイオニアファクターと呼ばれる因子が *pancRNA* を駆動している可能性が考えられる。今後、*pancRNA* を駆動するプロモーター領域の同定、転写活性化に関わる転写因子の同定が進めば、*pancRNA* を生み出すメカニ

ズムが明らかになっていくと考えられる。

本研究により、マウス初期胚における新規長鎖ノンコーディング RNA、  
pancRNA を介した配列特異的エピジェネティックリプログラミング・遺伝子活  
性化機構の普遍性を示し、当該分野におけるブレイクスルーを提供できたと考  
えている。



## 第二章

### 序論

*pancIl17d* のパートナー遺伝子である *Il17d* 遺伝子は、*Il17a*, *Il17b*, *Il17c*, *Il17d*, *Il17e*, *Il17f* からなる *Interleukin17* 遺伝子ファミリーに属している。1993 年に *Il17a* がマウス T 細胞ハイブリドーマからクローニングされ(Rouvier et al., 1993)、相同性を基にファミリー遺伝子を探索した結果、*Il17b*, *Il17c*, *Il17d*, *Il17e*, *Il17f* が同定された。*Interleukin17* 遺伝子ファミリーと配列上相同なサイトカイン群は存在せず、独立したサイトカインファミリーを形成している。その中でも最も研究が進んでいる IL17A は、活性化 T 細胞から転写され、上皮細胞、血管内皮細胞、マクロファージなどにおいて IL6 や tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) といった炎症関連因子の産生を誘導し、自己免疫疾患に関わることが明らかになっている。同様に IL17B、IL17C、IL17E、IL17E も炎症性因子の誘導を促進し、自己免疫疾患に関わる因子であることが報告されている(Iwakura et al., 2011; Kolls and Lindén, 2004)。しかしながら IL17D は他の *Interleukin17* 遺伝子ファミリーとは異なり、サイトカインとして結合するレセプターが未だ明らかになっていない。加えて、IL17D は活性化 T 細胞では発現しておらず、免疫細胞以外の広範な組織で発現していることが報告されており、*Interleukin17* 遺伝子ファミリーの中でもその生理的役割については不明な点が多い(Iwakura et al., 2011)。これまでに IL17D に関しては、202 アミノ残基から成ること、他のファミリー遺伝子と同様に 4 つの保存されたシステイン残基を持つこと、最も相同な配列を持つ *Il17b* でさえ、相同性が 27% しかないこと、脳を初めとして多くの非免疫系組織で発現していること、ヒト培養内皮細胞においてリコンビナント IL17D を添加した場

合、IL6 と IL8 の産生が促進されることが報告されている(Iwakura et al., 2011)。このことから *Il17d* は他のサイトカイン産生を促進するという主要な機能を保ちつつ、非免疫系組織でサイトカイン産生促進を介して何かしらの役割を果たしていることが推察される。

マウス初期発生において、胚盤胞形成期は全能性状態から初めて細胞系列分化が起こる非常に重要な発生段階である。8細胞期の後のコンパクトという強力な細胞接着により、外側—内側という細胞極性が初めて生まれ、内側は多能性を兼ね備えた内部細胞塊となり胚本体の元となる。一方、外側の細胞は胎盤系列の細胞へと分化する。内部細胞塊を Leukemia inhibitor factor (LIF) を含む適切な培地で培養すると多能性細胞株である ES 細胞が樹立できる。この ES 細胞は内部細胞塊と同様に、三胚葉全てへの分化能を持ち合わせる。一方、桑実胚期に外側に位置する細胞群は栄養芽層に分化し、将来胎盤系列細胞を構成する。この外側の細胞群を、FGF4 を含む適切な培地で培養すると、胎盤系列細胞株である Trophoblast stem cell (TS 細胞) を樹立することができる(Tanaka et al., 1998)。この TS 細胞からは、胎盤を構成する細胞である、栄養膜巨細胞、海綿状栄養膜細胞、および迷路部栄養膜細胞に分化誘導させることが可能である。内部細胞塊と栄養芽層は遺伝子発現プロファイルが異なり、内部細胞塊では *Oct3/4* や *Nanog* といった多能性関連遺伝子が高発現するのに対し、栄養芽層では *Cdx2* が高発現している。これらはいずれも細胞系列決定において重要な転写因子であり、一定の条件で細胞株において強制発現させるとそれぞれの細胞系列への分化を誘導することができる。例えば ES 細胞において *Cdx2* 強制発現を行うと、TS 細胞を誘導することができる(Niwa et al., 2005)。一方で、体細胞に

*Oct3/4* を含む多能性関連遺伝子を強制発現させることで、分化細胞から多能性細胞を誘導することができる(Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007)。桑実胚期までは *Oct3/4* と *Cdx2* は共局在しているが、胚盤胞を形成する時期になると *Oct3/4* と *Cdx2* は排他的な局在を示す。*Oct3/4* は内部細胞塊に、*Cdx2* は栄養芽層にのみ発現するようになる。こうした初期発生における *Oct3/4* と *Cdx2* の排他的局在は、この2つの転写因子間の相互抑制によって実現されている。例えば、*Cdx2* ノックアウトマウス胚盤胞では栄養芽層にも *Oct3/4* の発現が見られるようになり(Strumpf et al., 2005; Wu et al., 2010)、*Oct3/4* ノックアウトマウス胚盤胞では、内部細胞塊に *Cdx2* 陽性細胞が見られるようになる(Frum et al., 2013)。従って、胚盤胞形成期における正確な遺伝子発現制御が多能性獲得につながっており、その制御機構の解明は発生学上、極めて重要な課題である。

前章では、*pancIl17d* ノックダウン胚はパートナー遺伝子である *Il17d* の発現低下を招き、胚盤胞形成期において胚性異常をきたし、胚盤胞形成不全を引き起こしてしまうことを明らかにした。そこで本章では、*pancIl17d* ノックダウンによる胚盤胞形成不全の分子的背景についてさらに解析を進め、*pancIl17d-Il17d* ペアが初期発生、特に多能性獲得・維持に及ぼす影響を明らかにすることを目的に実験を行った。

## 結果

### *pancIl17d* ノックダウン胚における胚性致死の原因検証

第一章において、*pancIl17d* ノックダウン胚は 8 細胞期から胚盤胞期の間で胚性致死となることを示した (Fig. 1-11)。この *pancIl17d* ノックダウン胚の胚性致死がアポトーシスによって引き起こされているのではないかと考え、アポトーシスを検出する TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) 染色を胚盤胞期の直前の発生段階に位置する桑実胚期の胚を用いて行った (Fig. 2-1A)。コントロール桑実胚では、Brison らが報告したように、少数の細胞でしかアポトーシスが見られなかった (Brison and Schultz, 1997)。一方、*pancIl17d* ノックダウン胚では多数の細胞で TUNEL シグナルが観察されたことから、*pancIl17d* ノックダウン胚ではアポトーシスが異常亢進しており、これにより胚性致死に至ったことが示唆された。この *pancIl17d* ノックダウンによる胚性致死が本当にパートナー遺伝子である *Il17d* 遺伝子に影響を与えた結果によるものなのかを調べるために、*Il17d* 遺伝子の産物であるリコンビナント IL17D タンパク質によるレスキュー実験を行った (Fig. 2-1B)。リコンビナント IL17D タンパク質を 100 ng/ml の濃度で 4 細胞期から添加すると、*pancIl17d* ノックダウン効果は桑実胚期まで継続しているにもかかわらず (Fig. 2-1C)、胚盤胞発生率がノックダウン胚と比較して格段に改善され、コントロール胚と同等レベルまで上昇した (Fig. 2-1D)。このことから、確かに *pancIl17d* はパートナー遺伝子である *Il17d* 遺伝子を活性化させることで、初期発生において重要な役割を担っていることが示唆された。

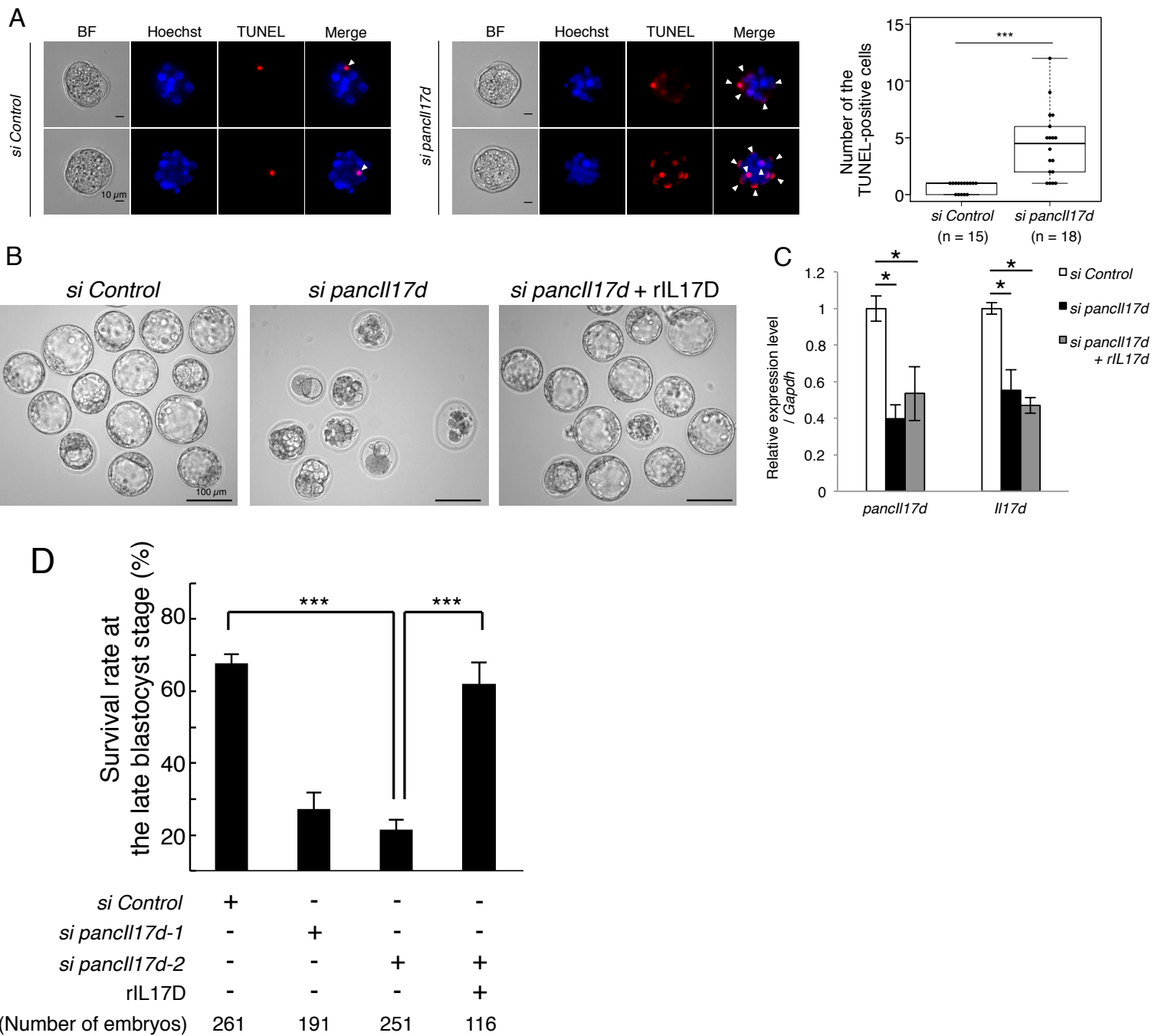


Fig. 2-1. *panc117d* ノックダウンによる発生障害とリコンビナント IL17D の添加によるレスキュー実験

(A) TUNEL 法による桑実胚でのアポトーシス検出。矢頭は TUNEL 陽性細胞を示す。 *panc117d* ノックダウンにより TUNEL 陽性細胞が増加した。(B) 後期胚盤胞の形態。(C) 桑実胚期の *panc117d* ノックダウン胚での *panc117d* mRNA と *il17d* mRNA の遺伝子発現レベル。(D) 4.5 日齢における生存率。2 つの異なる siRNA を使用した。 \*\*\*,  $p < 0.001$ .

## トランスクリプトーム解析による *pancI17d* ノックダウン胚の分子的背景の解析

この *pancI17d* の発生における役割を更に詳細に調べるために、*pancI17d* ノックダウン桑実胚のトランスクリプトーム解析を行った (Fig. 2-2A)。このトランスクリプトーム解析から、*pancI17d* ノックダウンにより 357 個の発現上昇する遺伝子と、137 個の減少する遺伝子を同定した。これらの発現上昇・減少遺伝子群に特定の傾向が見られるかを調べるために、ジーンオンロジー解析をそれぞれの遺伝子群に対して行った。*pancI17d* ノックダウンにより発現上昇する遺伝子群のなかにはアポトーシスなど、細胞死関連の遺伝子が多く含まれていたことがわかった (Table 5)。このことは *pancI17d* ノックダウンにより細胞死が亢進する現象と合致する。一方で、*pancI17d* ノックダウンにより発現減少する遺伝子群に目を向けると、興味深いことに胚発生や胎盤形成に関連する遺伝子が多く含まれていた。実際に発現減少した遺伝子の上位 3 つの遺伝子を見ると、そのどれもが発生に重要な役割を担うことが既に報告されている転写因子であった (Fig. 2-2B)。特に上位 2、3 番目に *Nanog* と *Cdx2* という転写因子はそれぞれ多能性関連転写因子ネットワークにおける中核因子と胎盤細胞系列のマスター転写因子であった (Chambers et al., 2003; Strumpf et al., 2005)。したがってこれら 2 つの細胞系譜のキー転写因子の発現が減少することにより、胚盤胞期における多能性獲得と胎盤系列への分化能の獲得に多大な影響を及ぼすことが想定される。この結果を確かめるために、*pancI17d* ノックダウン胚盤胞期胚の CDX2 を免疫染色したところ、コントロール胚では胚盤胞期胚の外側の細胞が CDX2 陽性となるのだが、*pancI17d* ノックダウン胚盤胞期胚の外側の細胞にお

いては CDX2 陰性細胞が複数存在することがわかった (Fig. 2-2C)。このことは *panc117d* ノックダウン胚では胎盤系列への分化能が低下してしまっていることを示唆するものである。同様に *Nanog* の発現量も低下していることから多能性細胞への分化にも影響が及んでいる可能性がある。

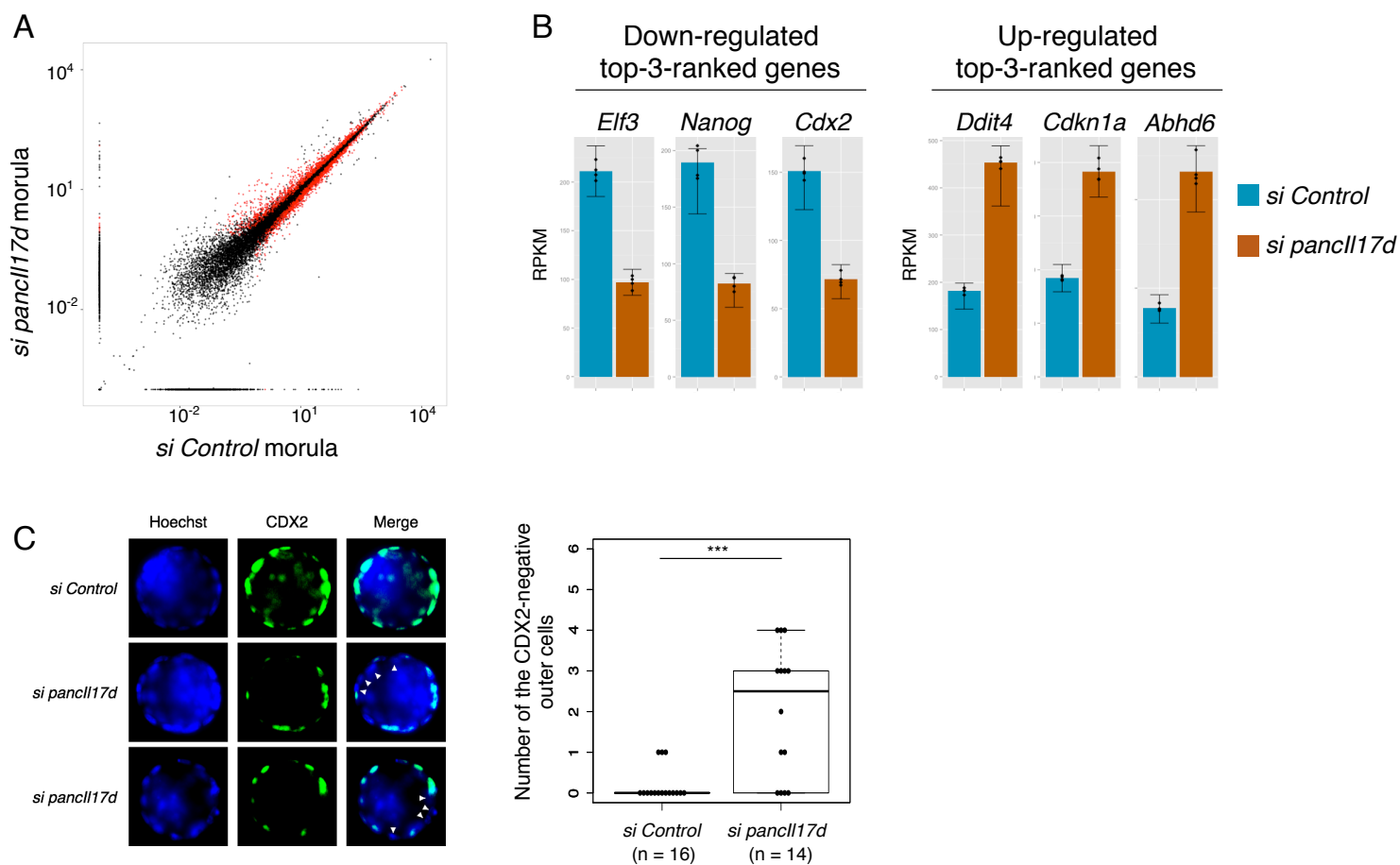


Fig. 2-2. (A) *panc117d* ノックダウン胚とコントロール胚における RefSeq genes の遺伝子発現量の散布図。赤点はサンプル間で有意に発現量が変化した遺伝子を表す。(B) ノックダウン桑実胚期における発現上昇・抑制された遺伝子の上位 3 遺伝子の発現量。青はコントロール胚の、赤は *panc117d* ノックダウン胚の RPKM 値を表す。(C) *panc117d* ノックダウン胚とコントロール胚における CDX2 タンパク質の免疫染色と CDX2 陽性細胞のカウント結果。

## *pancIl17d* ノックダウン胚におけるコロニー形成能と多能性の検証

前項において *pancIl17d* ノックダウン胚の多能性が減衰している可能性が示唆された。そこで *pancIl17d* ノックダウン胚の持つ多能性を評価するために、*in vitro* 胚盤胞アウトグロース法により、コロニー形成能を評価した。胚盤胞アウトグロース法では、胚盤胞を ES 細胞培地中に数日から 10 日程度静置することで、胚盤胞由来のコロニーを形成させることが出来る。形成されたコロニーは継代することで ES 細胞化することも可能である。今回は *pancIl17d* ノックダウン胚のコロニー形成能を調べた。コントロール胚からは平均して約 70% の胚からコロニーが形成された。一方で *pancIl17d* ノックダウン胚ではわずか 20% 程度の胚しかコロニーを形成しなかった (Fig. 2-3A)。また、たとえ形成された場合でも、その大きさはコントロール胚由来のコロニーと比較して有意に小さかった (Fig. 2-3B, C)。興味深いことに、こうした *pancIl17d* ノックダウン胚の表現型は、リコンビナント IL17D を培地に添加することで、コントロールと同程度まで回復することができた (Fig. 2-3A, B, C)。以上の結果は、*pancIl17d* はパートナー遺伝子である *Il17d* を特異的に活性化することで、マウス初期胚の多能性獲得に寄与している可能性を示唆している。

*pancIl17d* が多能性獲得だけではなく、多能性維持においても機能しているかどうかを調べるために、多能性細胞である ES 細胞で *pancIl17d* もしくは *Il17d* 遺伝子のノックダウンを行い、その機能を解析した。生細胞数の減少が、初期胚発生の場合と同様に、アポトーシスによる細胞死によるものかを調べるために、TUNEL 染色を行い、TUNEL 陽性細胞数を計測した (Fig. 2-3D)。その結果、コントロールと比較して *pancIl17d* と *Il17d* のノックダウン群で有意に TUNEL



シグナルが多く見られたことから、*pancIl17d* もしくは *Il17d* のノックダウンにより、アポトーシスによる細胞死が亢進していることが明らかになった。さらに、生細胞数の減少が細胞増殖の抑制によってもたらされている可能性も検討するために、EdU 染色法で細胞増殖活性を測定した (Fig. 2-3E)。コントロールと比較して *pancIl17d* と *Il17d* のノックダウン群では有意に EdU 陽性細胞が少なかった。すなわち、*pancIl17d* と *Il17d* のノックダウン群により細胞増殖活性の抑制が誘導されていることが明らかになった。これらの結果から、*pancIl17d-Il17d* ペアは ES 細胞において細胞増殖と細胞生存の両方に重要であることが示された。

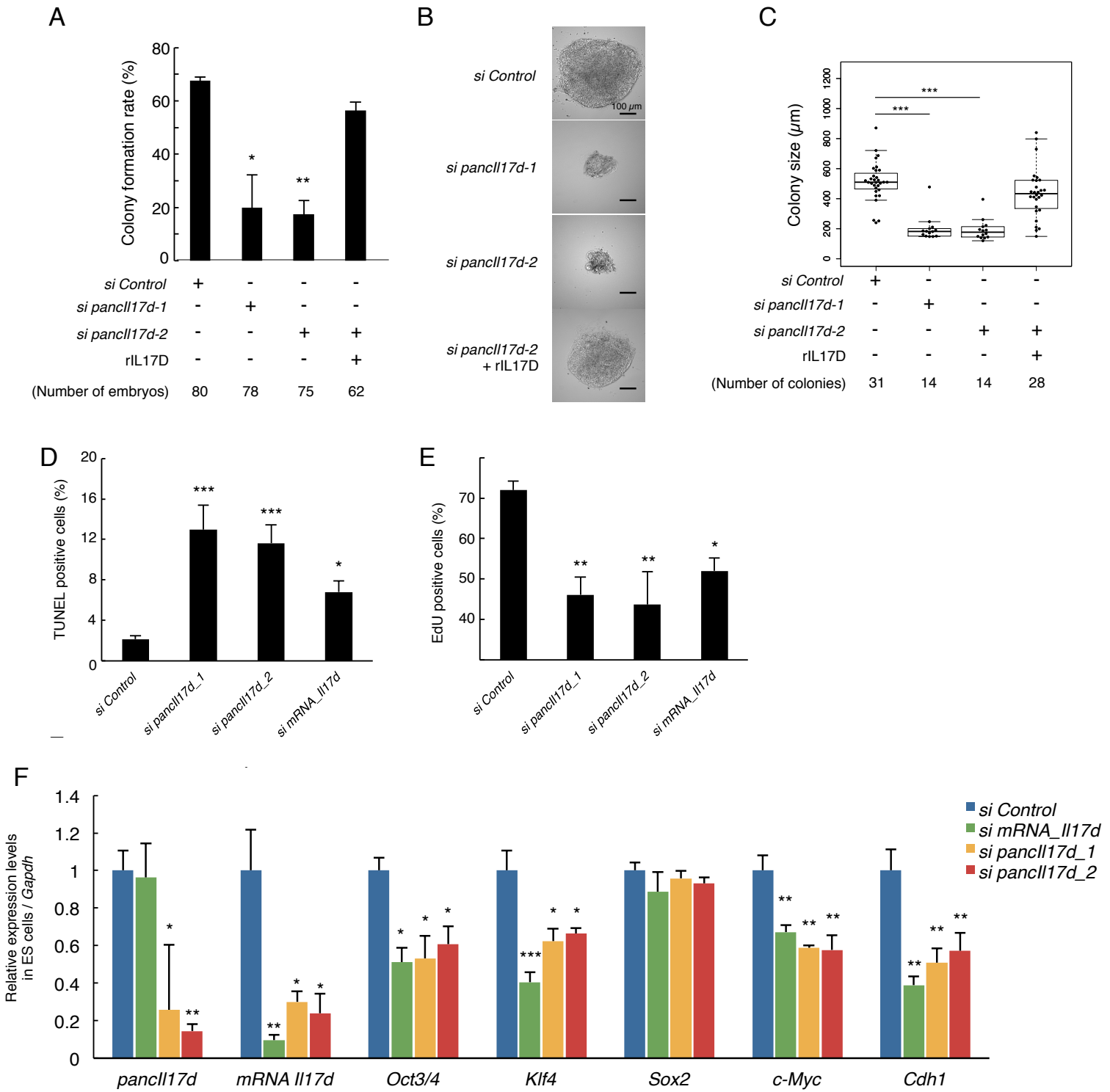


Fig. 2-3. *panc117d* ノックダウンによる ES 細胞への影響

(A) *panc117d* ノックダウン胚とコントロール胚からのアウトグロースコロニー形成率。(B) 形成されたコロニー。(C) コロニーの直径。(D) TUNEL 陽性細胞の割合。(E) EdU 陽性細胞の割合。(F) qPCR による *panc117d* と *117d* と多能性マーカー遺伝子群の発現量の定量。 *Gapdh* を比較コントロールとして用い、コントロール胚の発現量を 1 とした。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$

*pancI17d* と *I17d* のノックダウン群における多能性を評価するために、多能性関連遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Cdh1*) の発現レベルを RT-qPCR で解析したところ、*pancI17d* と *I17d* のノックダウン群において、*Sox2* では有意な差は認められなかったが、*Oct3/4*, *Klf4*, *c-Myc* そして *Cdh1* 遺伝子発現量は *pancI17d* と *I17d* のノックダウン群で有意に減少していることが明らかになった (Fig. 2-3F)。この結果は ES 細胞において *pancI17d* と *I17d* のノックダウン群では多能性が低下していることが示唆された。そのため、ES 細胞の分化能を評価するために、ノックダウン ES 細胞から Embryoid body (EB) 形成を行い、三胚葉分化を誘導した (Fig. 2-4A)。ノックダウン群由来の EB はコントロール群と比較して有意にサイズが小さかった (Fig. 2-4B, C, D)。このことは生細胞数が減少するという ES 細胞におけるノックダウンの効果と一致する。また、各種胚葉分化マーカー遺伝子 (*Otx1*, *Gata6*, *T*) の発現レベルを RT-qPCR で調べたところ、外胚葉分化マーカーである *Otx1* と内胚葉マーカーである *Gata6* の発現がノックダウン群で上昇することを見出した (Fig. 2-4E)。このことは *pancI17d* ノックダウンにより、分化能に影響が出たことを示唆する。したがって、これらの結果を総合すると、*pancI17d* は *I17d* 遺伝子を活性化することで、初期発生における細胞生存・細胞増殖・細胞運命決定に重要な役割を果たしていることが示された (Fig. 2-5)。

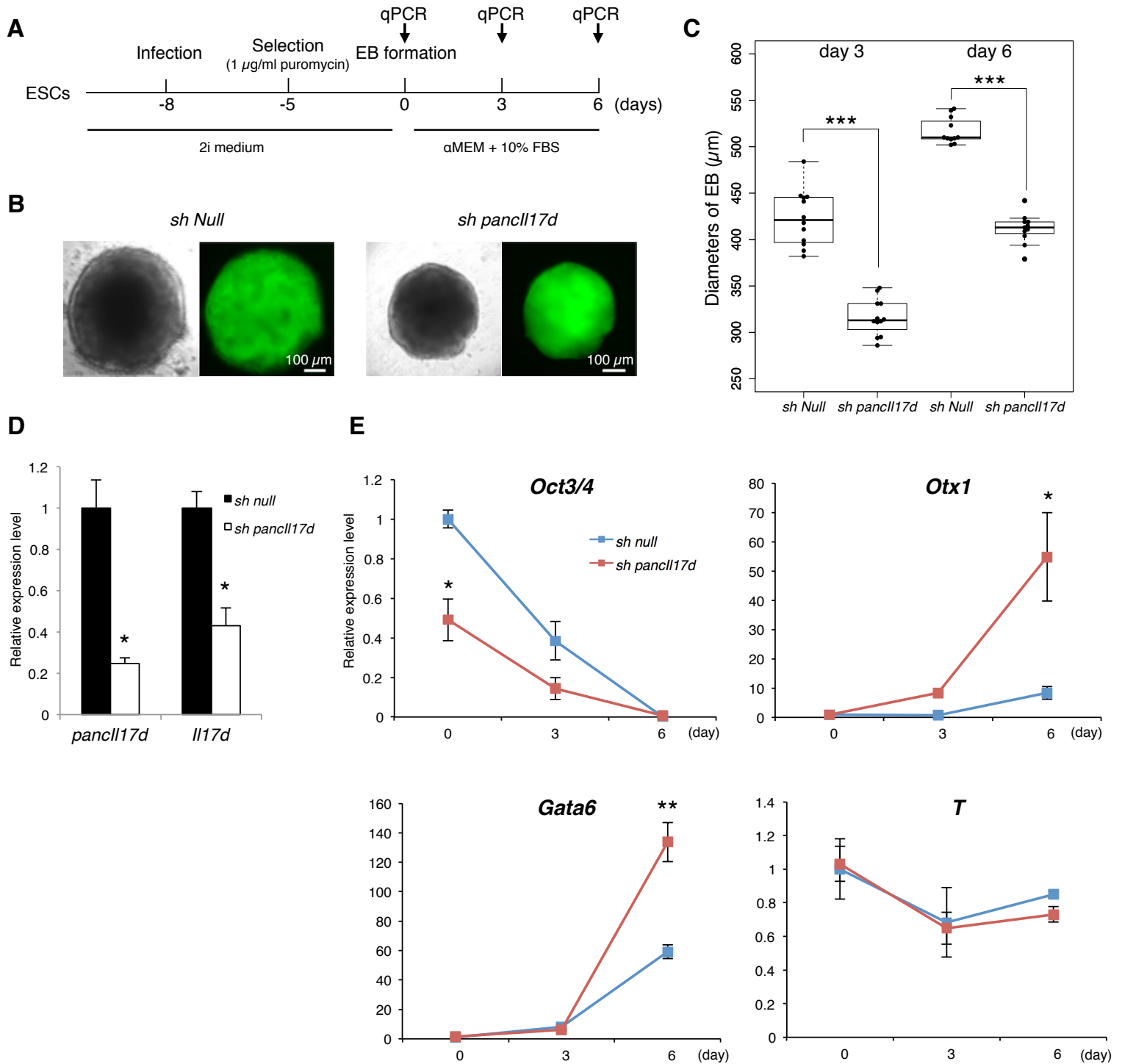


Fig. 2-4. *pancl17d* ノックダウン ES 細胞における EB 形成への影響 (A) shRNA による *pancl17d* ノックダウン。横線は shRNA を導入した日を day0 とした際の時系列を表している。shRNA ベクター導入後、5 日間 puromycin による細胞選抜を行い、EB 形成実験に供した。(B) コントロールと *pancl17d* ノックダウン ES 細胞由来の EB の形態。(C) EB の直径。(D) ノックダウン効率の検討。(E) RT-qPCR による各マーカー遺伝子の経時的発現変化。

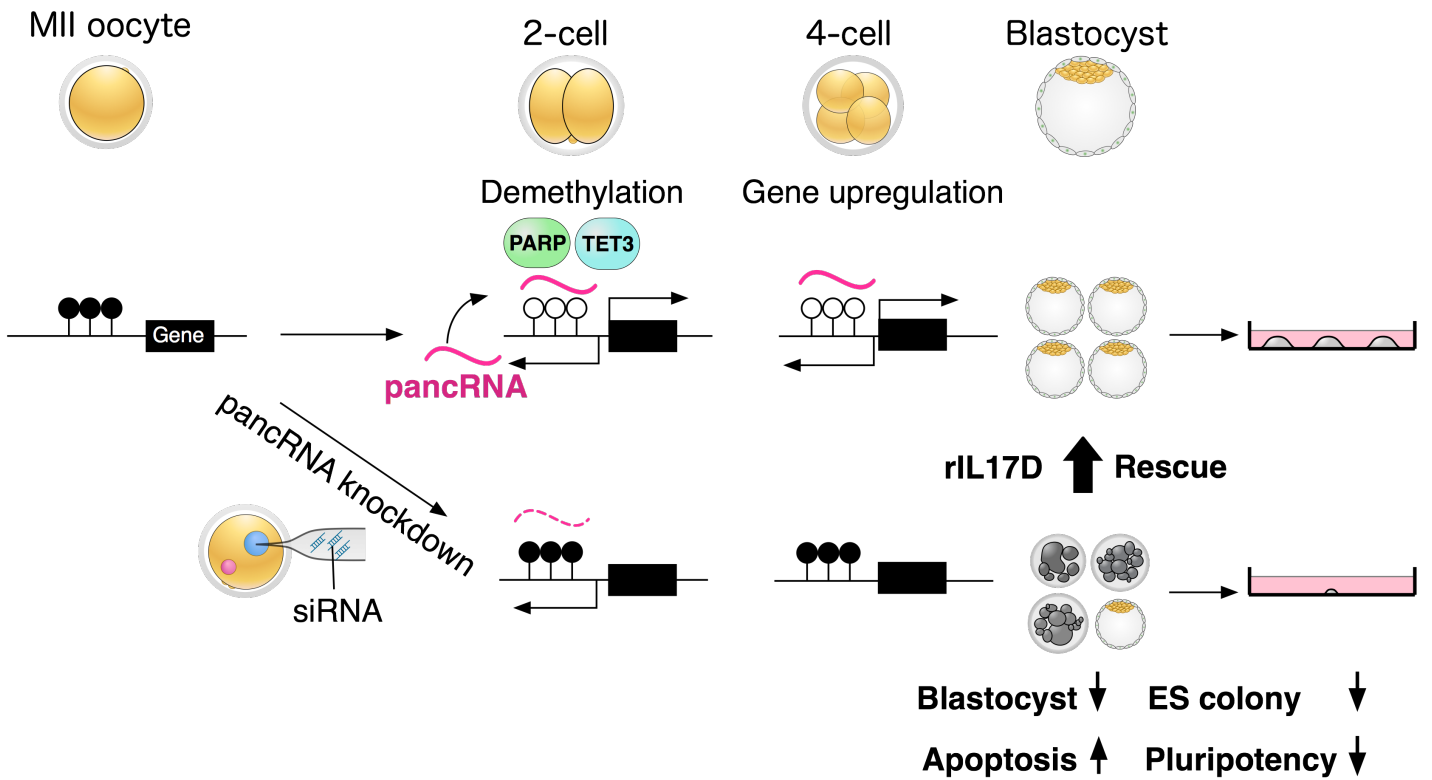


Fig. 2-5 マウス初期発生における pancRNA による遺伝子活性化

マウス初期発生に二細胞期では pancRNA は TET3 と PARP と協調的に働き、遺伝子活性化に寄与する。pancRNA がノックダウンされるとプロモーター領域の脱メチル化が阻害され、正常発生に支障をきたす。*panc117d* ノックダウン胚では異常アポトーシス誘導と増殖抑制、多能性の減衰が起こる。

## 考察

本章では、*pancIl17d* が *Il17d* の発現上昇を介してマウス初期胚と ES 細胞において細胞増殖・細胞運命決定に重要な役割を担っていることを明らかにした。全能性・多能性を有するマウス初期発生胚においてこれまでに他のインターロイキン 17 ファミリー遺伝子が影響を与えるという報告はされておらず、インターロイキン 17 ファミリー遺伝子の中でも特異な存在である *Il17d* が胚盤胞形成における重要な役割を担っていることが考えられた。

### マウス初期発生における *Il17d* の生理学的機能

上述したように、*pancIl17d* ノックダウンにより、胚盤胞形成不全が引き起こされ、細胞の生存・増殖能が低下し、胚性幹細胞の持つ多分化能が減少したことが示唆された。リコンビナント IL17D の添加によりノックダウン胚の胚盤胞形成不全が回避されたことから、IL17D タンパク質が一連の現象を説明しうると思われる。受容体は現在まで不明であるが、成体の線維芽細胞で IL17D は細胞外因子として NF- $\kappa$ B 依存的に IL6 と IL8 の産生を促進することが報告されている(Starnes et al., 2002)。この IL6 は IL6 遺伝子ファミリーを形成し、その中にはマウス ES 細胞において多分化能維持と細胞増殖に重要な因子として知られる *Lif* 遺伝子が含まれる。IL6 は細胞膜上の IL6 受容体と結合し、gp130 受容体とヘテロ二量体を形成することで、gp130 の細胞内ドメインが Janus kinase (JAK)を活性化し、Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)のチロシン 705 をリン酸化し STAT3 とホモあるいは STAT1 とヘテロ二量体を形成する。これら二量体は核内に移行し、ES 細胞においては細胞の生存、分化、そ

して多能性関連遺伝子の遺伝子の活性化を行うことが知られている(Nakashima and Taga, 2002; P et al., 1998)。マウス着床前胚に IL6 を添加すると、細胞数増加・胚盤胞形成率の上昇が見られていることから、胚盤胞形成期においても IL6 が機能していることが推測される(Desai, 1999)。これらの文献的事実と考えあわせると、IL17D は IL6 の産生促進を介し、JAK-STAT 経路を介して胚盤胞形成と多能性獲得・維持に寄与している可能性が考えられる。しかし、IL6 や下流シグナル伝達因子である gp130 のノックアウトマウスは胚盤胞期で致死ではないことから(Betz et al., 1998; Romani et al., 1996)、*Il17d* は *Il6* 以外の遺伝子発現にも影響を与えている可能性が示唆される。今後は IL17 の主要な下流因子としてマウス初期発生に機能している分子を同定し、*pancIl17d- Il17d* 遺伝子ペアが細胞内シグナル伝達にどのように貢献しているのか、詳細に解析する必要がある。

### 初期発生における *pancRNA* クラスの貢献

本章で見てきたように、*pancIl17d* は着床前マウス初期発生において重要な機能を持つ長鎖ノンコーディング RNA(lncRNA)である。*pancIl17d* 以外にもマウス初期発生において重要な lncRNA があることが予想される。実際にいくつかの lncRNA は着床後のマウス初期発生において機能することが示されている(Fatica and Bozzoni, 2014)。例えば、*Fendrr* と呼ばれる *Foxfl* 遺伝子座のプロモーター領域からアンチセンス方向に転写される *pancRNA* 様の lncRNA のノックアウトマウスは胚性 14 日目に心臓形成不全で胚性致死に至る。前章においても、*pancIl17d* の他に、*pancMospd3* のノックダウンは胚盤胞形成後にハッチング障害を誘導すること、*pancBag6* のノックダウンは ES 細胞において生細胞数の減少を誘導す

ることを発見した。興味深いことに、受精後に発現上昇する pancRNA 群には細胞死関連遺伝子が多く含まれていた (Table 1, 2)。この中には *Bag6* を始めとして、*Fadd*、*Map3k7*、*Pdcd2* など、細胞死制御を介してマウス初期発生において重要な役割を担っている遺伝子 (Fabian et al., 2005; Jadrnich et al., 2006; Mu et al., 2010; Yeh et al., 1998) が含まれていた。このことから、無視できない数の pancRNA が正常初期発生に寄与していることが考えられる。ただし、ここで新たな疑問が浮かび上がってくる。なぜ pancRNA という遺伝子制御システムが発生に組み込まれたのだろうか。pancRNA がシス遺伝子活性化因子だとするならば、pancRNA を介してパートナー遺伝子を活性化することと、直接遺伝子を活性化することは同じ結果に至るはずである。可能性の一つとして、pancRNA が遺伝子発現制御の役者として新たに組み込まれることで、制御に関わる因子が増えることで遺伝子ネットワークの複雑さが増すということが考えられる。それにより、取りうる遺伝子ネットワークのパターンが増大し、多様な発生段階を創りあげることが可能になった可能性がある。近年、pancRNA を含む lncRNA は *Hox* 遺伝子群のように発生に重要な因子によって頻繁に制御されることが示された (Necsulea et al., 2014)。このことから、pancRNA が多種多様な因子と協働しながら、複雑かつ協調的に遺伝子ネットワークを制御し、発生を進める原動力の一つとなっている可能性が支持される。

本章において、長鎖ノンコーディング RNA による精緻な遺伝子発現制御が正常な胚発生を支えていることを明らかにした。



## 総括

第一章では、pancRNA による胚性遺伝子活性化機構が確かに存在することを発見し、また、その配列上・エピゲノム上の特徴を抽出し、全能性獲得に必要な遺伝子活性化の分子機構として TET タンパク質と塩基除去修復系構成因子である PARP が pancRNA を介した DNA 脱メチル化に関わっていることを明らかにした。第二章では初期胚において機能的な pancRNA の中でも特に劇的な表現型を示した *panc117d* をマウス初期発生において生理的な機能をもつ長鎖ノンコーディング RNA の代表として詳細な解析を進めたところ、*panc117d* ノックダウン胚では多能性獲得・維持に支障をきたすことを明らかにした。第一章と第二章を合わせることで、pancRNA による胚性遺伝子活性化機構はマウス初期発生において必要不可欠であることが示された。

### 初期発生から終末分化細胞まで多様な生命現象における長鎖ノンコーディング RNA としての pancRNA の果たす役割

これまでに分化細胞株であるラット NRK 細胞と PC12 細胞において pancRNA が細胞分裂非依存的に DNA 脱メチル化を配列特異的に誘導し、パートナー遺伝子を活性化することが示されてきた(Imamura et al., 2004; Tomikawa et al., 2011)。マウス組織とチンパンジー組織においては、CpG アイランドに由来する多くの組織特異的 pancRNA が同定され、パートナー遺伝子活性化能を示すことも報告されている(Uesaka et al., 2014)。こうした知見に加えて、本論文では第一章と第二章を通して、多能性細胞である ES 細胞だけではなく、発生段階のごく初期の全能性細胞であるマウス初期胚においても pancRNA が同様に遺伝子を活性化さ

せる働きを有していたことを明らかにした。これらの事実が示すことは、pancRNA による遺伝子活性化機構というのは発生段階、細胞の分化能、生物種といった細胞のコンテキストに依存した様式をとっているのではなく、哺乳類細胞において普遍的な機構として活用されていることを示唆している。

ノンコーディング RNA は大きく分けて、30 nt 以下の短鎖ノンコーディング RNA と長鎖ノンコーディング RNA に分類される。短鎖ノンコーディング RNA には miRNA、siRNA、piRNA が属し、これら短鎖ノンコーディング RNA による遺伝子制御は遺伝子発現を抑制する。短鎖ノンコーディング RNA による遺伝子抑制機構は線虫で発見され(Fire et al., 1998)、現在、原始的な多細胞生物であるカイメンからヒトに至るまで同等の制御機構があることが示されている(Elbashir et al., 2001; Grimson et al., 2008)。2014 年 7 月時点の miRBase 21 (<http://www.mirbase.org/index.shtml>) によると、ヒトでは 2588、マウスで 1915、ショウジョウバエで 466、線虫で 434、シロイヌナズナで 427 の成熟 miRNA が同定されている(Kozomara and Griffiths-Jones, 2010)。一方で、現在までに長鎖ノンコーディング RNA のカタログの一つである GENCODE long noncoding RNAs version 7 には、14,880 種類の長鎖ノンコーディング RNA が登録されており、miRNA と同等、もしくは、それ以上の数が存在することが報告されている(Derrien et al., 2012)。しかし、実際に機能が解析された長鎖ノンコーディング RNA はごく少数に限られている。これまでの数少ない機能解析の例から、長鎖ノンコーディング RNA はいくつかの属性を考慮する必要があると考えられる。すなわち、遺伝子発現制御に関わるかどうか、関わるとするなら遺伝子発現を活性化するか抑制するか、効果の波及範囲が単一遺伝子座か複数遺伝子座なの

か、エピジェネティックな制御に関わるとして、ヒストン修飾になのか DNA メチル化に影響を与えるのか、といったことを考慮する必要がある。本研究において pancRNA は単一遺伝子座を対象に遺伝子発現を活性化し、DNA 脱メチル化を誘導することを示してきた。少なくとも数千種類の遺伝子座で pancRNA が転写されていることが示されていることから(Tomikawa et al., 2011; Uesaka et al., 2014)、15,000 種同定されている長鎖ノンコーディング RNA の中で pancRNA が占める割合は相当大きいと考えられる。長鎖ノンコーディング RNA の全体像の解明は始まったばかりであることから、今後、pancRNA を含む長鎖ノンコーディング RNA による遺伝子発現制御機構の一般法則が見つかる可能性もある。そして、pancRNA という長鎖ノンコーディング RNA がどの生物種まで採用されているかを調べることで、miRNA などの短鎖ノンコーディング RNA と比較して、pancRNA がどれほどの普遍性を持つのかを明らかにすることができるだろう。

### **pancRNA による遺伝子活性化機構**

pancRNA による遺伝子活性化機構の詳細な分子機構はまだ明らかになっていない。どのように pancRNA が進化の過程で獲得され、どのように pancRNA は遺伝子を活性化し、どのように pancRNA は発現制御されるのか、といった疑問に答えていくことが今後の pancRNA による制御機構の重要性をさらに深化されていくはずである。本論文の第一章において、どのように pancRNA が転写されるのかを解く上で重要な知見がいくつも得られた。pancRNA を持つ遺伝子はゲノム配列上に特徴的な配列 (CT リッチモチーフ) をもち、その CT リッチモチーフは転写開始点を境目として点対称な配置をとっていることが示された (Fig.

1-3, 5)。これらのことは pancRNA を発現する遺伝子はゲノムに CT リッチモチーフのような特徴的な配列が目印としてマークされ、pancRNA を発現できる遺伝子座は配列上、対称構造をとっていることを示唆する。このことから、pancRNA は両方向性のプロモーターから CT リッチモチーフもしくはそれに類する配列を認識する転写因子によって生み出されているという仮説を考えている。この仮説はマウス・チンパンジー大脳細胞において CpG アイランド型の両方向性プロモーターから多くの pancRNA が生み出されているという知見とよく合致する(Uesaka et al., 2014)。従って、CT リッチモチーフに結合する因子を明らかにし、その機能解析を加えていけば、pancRNA を生み出す分子メカニズムに迫ることが可能であろう。また、第一章ではゲノム配列だけではなく、pancRNA 発現遺伝子座のエピジェネティックな修飾に着目することで、遺伝子転写開始点上流領域に特徴的な転写活性化型のエピゲノム修飾が強く施されていることを同定した (Fig. 1-7)。本来アクティブな遺伝子の転写開始点直下に見られる H3K4me3 が pancRNA 発現遺伝子座では上流領域にも集積していることは、pancRNA 発現遺伝子座においてゲノム配列だけではなく、エピゲノムレベルでも転写開始点を中心とした対称構造が取られている可能性を示唆した。この配列レベルでもエピゲノムレベルでも同定した対称構造について、さらに検討を加えていくことで、pancRNA 自身の制御や pancRNA による遺伝子活性化機構を明らかにする事ができるかもしれない。ここで非常に大事なことは、pancRNA 発現遺伝子座では遺伝子転写開始点のすぐ上流に CTCF タンパク質が集積しない傾向があることである (Fig. 1-7F)。CTCF タンパク質はコヒーシと協働し、ゲノムの立体構造を決定する因子である(Phillips and Corces, 2009)。CTCF は数百

kb 単位の大きなループ構造の境目に結合しており、ゲノムをドメインに区切る役割があるとされる。実際に CTCF が結合する領域はクロズドクロマチンとオープンなクロマチンを分ける領域となることが示されている(Cuddapah et al., 2009)。また、エキソンに結合する CTCF は RNA ポリメラーゼ II の進行速度を低くし、エキソン上での RNA ポリメラーゼ II の一時停止を誘導する(Shukla et al., 2011)。ヒトの線維芽細胞における CTCF 結合領域を同定した研究によると、ゲノムの 1%程度しかない遺伝子プロモーター領域に CTCF 結合領域のおよそ 20%が集中していることから、プロモーター領域というのは CTCF の主要なターゲットの一つと考えられている(Kim et al., 2007)。pancRNA 非依存型の活性化遺伝子座では転写開始点に CTCF 結合がみられることから、こうした遺伝子座の転写開始点は CTCF を介した立体構造を形成することで遺伝子活性化を実現している可能性が高い。そうした高次構造を介した遺伝子活性化は転写開始点と遠位エンハンサー領域との相互作用によって説明される(Blackwood, 1998; Hatzis and Talianidis, 2002; Pennacchio et al., 2013; Smallwood and Ren, 2013)。従って、pancRNA 非依存的な遺伝子活性化には多くの場合、エンハンサーによる遺伝子活性化機構が備わっていることが考えられる。一方で、pancRNA 発現遺伝子座では CTCF の結合が見られないことから、pancRNA 発現遺伝子座の転写開始点は特定の領域と高次構造上の近接を経ずに遺伝子活性化を実現していることも想定できる。

高次構造形成能以外にも CTCF には別の機能が備わっている。CTCF がゲノム上に結合した領域では、RNA ポリメラーゼ II の進行速度が遅くなることから、CTCF には RNA ポリメラーゼ II の進行を阻害する働きが示されている(Shukla

et al., 2011)。pancRNA 非依存的な遺伝子座では CTCF によって RNA ポリメラーゼ II がセンス方向へのみ進行するように関を設けているのかもしれない。得られた知見から推測される pancRNA 依存型と非依存型両方の遺伝子活性化機構の模式図を Fig. GD-1 にまとめた。今後、pancRNA 依存的遺伝子活性化と非依存的な活性化の両方を包括して分子機序を明らかにすることで、ゲノム・エピゲノム・高次構造変換による遺伝子発現制御の本質に迫ることが可能となるはずである。

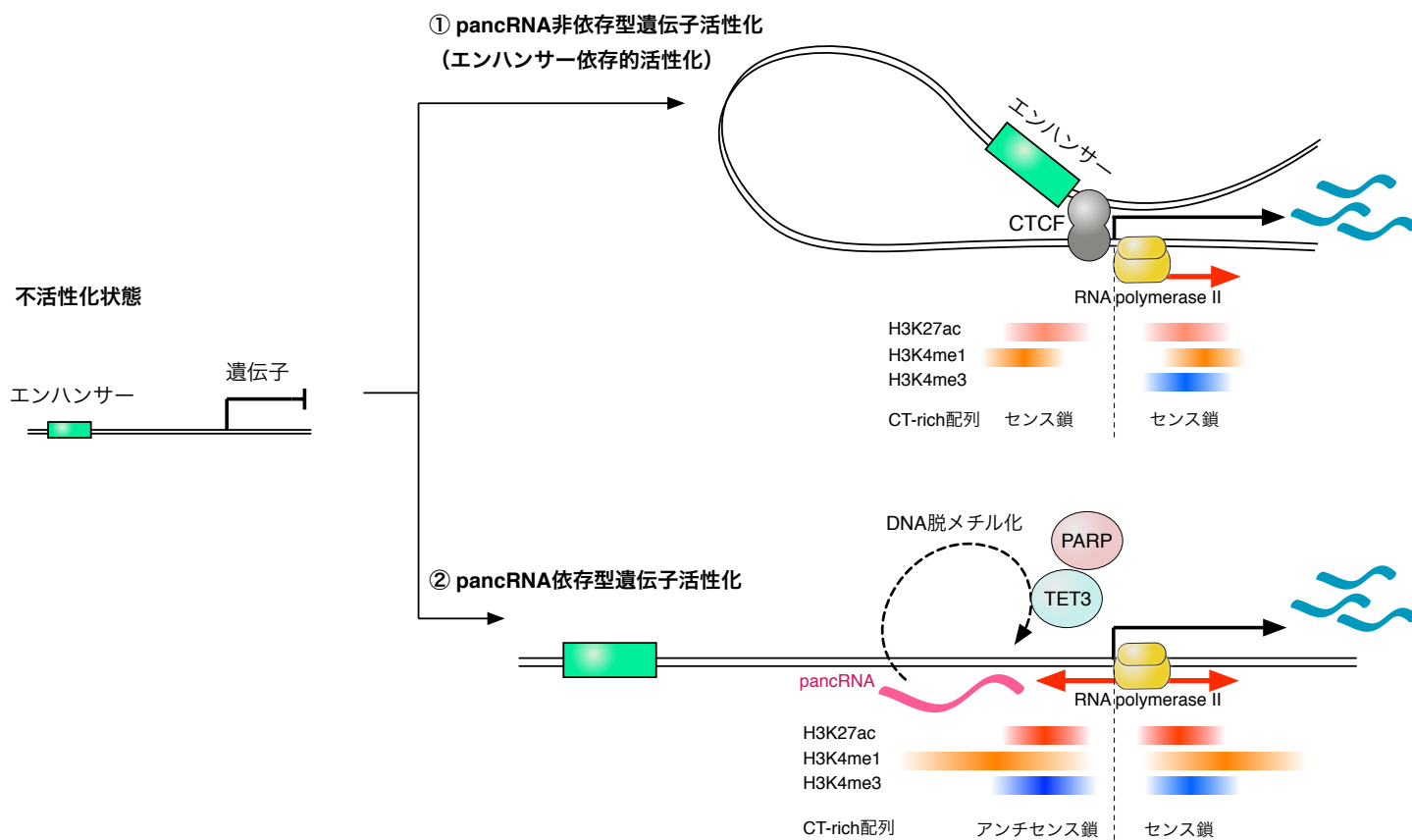


Fig. GD-1 想定される pancRNA 型遺伝子活性化と pancRNA 非依存的な遺伝子活性化機構の模式図

① pancRNA 非依存的な遺伝子活性化の場合、遺伝子転写開始点に結合する CTCF を介した高次構造を取ることでエンハンサーと物理的に近接し、遺伝子活性化がおこる。CTCF は RNAPII の進行方向を遺伝子方向のみに制限する。② pancRNA 依存的な遺伝子活性化の場合は、CTCF が転写開始点に結合しないので、エンハンサー領域との高次構造は取らないと考えられる。また CTCF による転写の方向性制限がかからず、pancRNA が転写されることでパートナー遺伝子のプロモーター領域を TET3 や PARP と協調的に働くことで DNA 脱メチル化を誘導し、配列特異的に遺伝子を活性化する。こうした遺伝子の特徴として転写開始点を中心として、ゲノム配列とエピゲノム修飾が対称構造となっていることが明らかになった。

## 全能性獲得に向けたゲノムリプログラミングにおける長鎖ノンコーディング RNA の存在意義

細胞に多能性・全能性を付与することについて、様々な方法を以ってアプローチされてきた歴史があり、ゲノムリプログラミングの意義に迫ろうとする多くの努力がなされてきた。古くはイモリのレンズ再生研究から、アフリカツメガエルの核移植実験、そして転写因子導入による induced pluripotent cells (iPS 細胞)の作製が科学史における代表的な例である(Agata et al., 1993; Gurdon, 1962; Takahashi and Yamanaka, 2006; 江口, 1980)。しかしながら、刻まれた細胞運命をどのようにリセットしているのか、特に細胞核の中で何が起きているのか、詳細は未だ不明である。本研究において、長鎖ノンコーディング RNA がゲノムリプログラミングの中で重要なファクターとして確固たる役割を持っていることを示すことができたが、ゲノムリプログラミングにおいて長鎖ノンコーディング RNA が遺伝子制御を行う意義とは何であろうか？世代を引き継ぐ中、何度も繰り返される全能性獲得のサイクルにおいて、受精の度に全能性型遺伝子ネットワークはその都度正確に再現される必要がある。この精確な遺伝子発現パターンの再現はタンパク質だけでは達成が難しいと考えられる。なぜならタンパク質の配列特異性は低く、認識配列は長いものでも数十塩基程度にとどまることから、タンパク質だけでは遺伝子ごとの精確な発現を再現できないのではないだろうか。長鎖ノンコーディング RNA が持ち合わせる特筆すべき性質として、その配列長の長さゆえの持ちうる情報量の多さが挙げられる。短鎖ノンコーディング RNA が 30 塩基以下で構成されるのに対し、長鎖ノンコーディング RNA が DNA 配列認識に使用できる塩基数は数百を超える。この長鎖ノンコー

ディング RNA の持つ高度な配列特異性を制御様式の中に組み込めば、遺伝子座ごとに適切かつ、正確な制御が達成され、全能性型遺伝子発現パターンの再現性が上昇するはずである。それに加えて、長鎖ノンコーディング RNA はタンパク質とも容易に相互作用し、様々な生理活性を生み出す。実際に、長鎖ノンコーディング RNA を足場として機能するタンパク質や長鎖ノンコーディング RNA によって繋がれるタンパク質の同定報告は増加の一途を辿っている (Batista and Chang, 2013; Fatica and Bozzoni, 2014)。タンパク質だけの制御様式に比べて、長鎖ノンコーディング RNA とタンパク質の双方による制御様式をとることで、取りうる遺伝子発現ネットワークの数が格段に増えることから、長鎖ノンコーディング RNA は発生における遺伝子ネットワークの柔軟性と正確性の両方を高め、全能性獲得を支持する因子として機能しているのであろう。胚性遺伝子活性化における pancRNA の模式図を Fig. GD-2 にまとめた。

本研究により、多数の長鎖ノンコーディング RNA を用いた配列特異的な胚性遺伝子活性化機構により、全能性獲得に寄与し、発生を支持していることが示された。



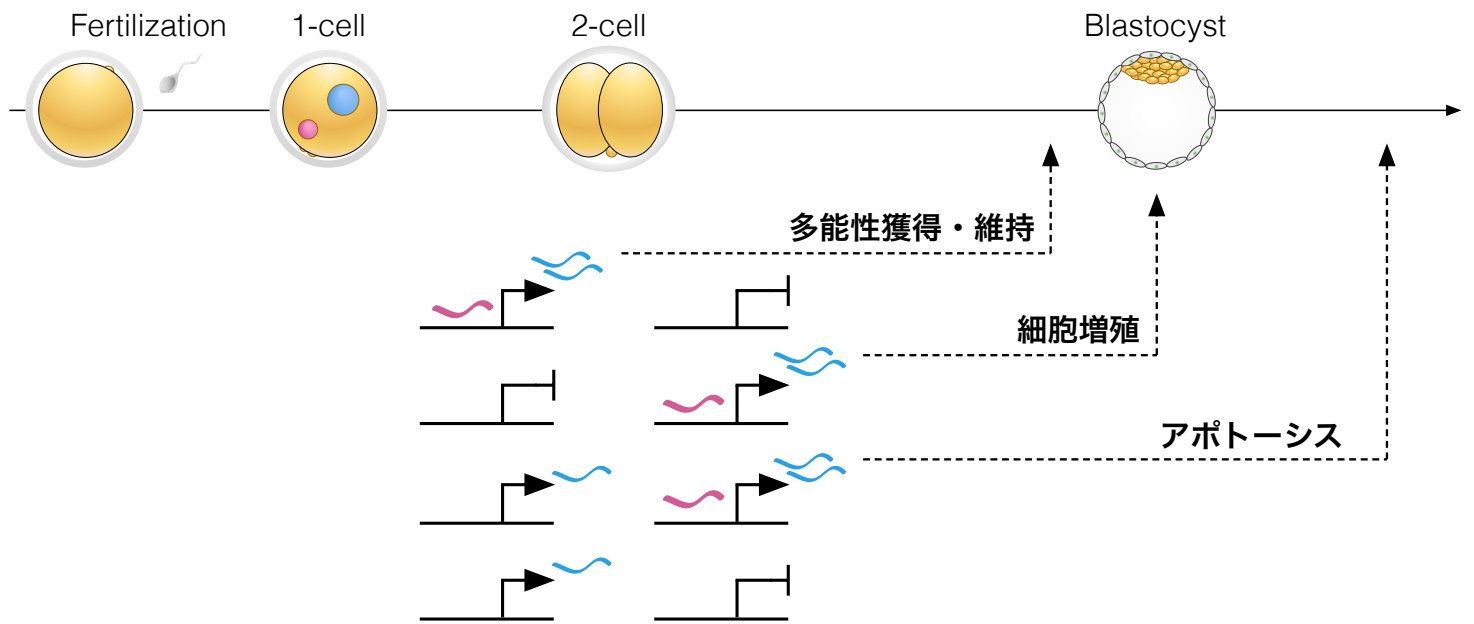


Fig. GD-2 pancRNAを介した胚性遺伝子活性化機構の模式図

pancRNA を介した遺伝子活性化は配列特異的な遺伝子活性化を可能にし、パートナー遺伝子の機能に従って、発生に影響を及ぼす。胚性遺伝子活性化機構には pancRNA を介さない遺伝子活性化機構も存在しており、この pancRNA 非依存的な遺伝子活性化機構も合わせて包括的に解析を進めることが全能性獲得の分子基盤を解明する上で肝要となるはずである。

## 材料と方法

### 実験動物

本研究では B6C3F1 系統の 8 週齢オス、もしくはメス個体を日本エスエルシー株式会社より購入し、12 時間明条件、12 時間暗条件（8：00-20:00 照明点灯）で飼育し、使用した。

### 卵と精子の採取

卵採取の際は 8 週齢メス個体に 5 IU の Pregnant Mare Serum Gonadotropin (Asuka)を腹腔内注射後、48 時間後に human chorionic gonadotropin (hCG, Asuka)を 5 IU 腹腔内注射することで過排卵を誘導し、hCG 投与から 17 時間後に輸卵管から卵を得た。受精卵を得る際は hCG 投与後、8 週齢オスマウスと自然交配させ、hCG 投与から 17 時間後に輸卵管から卵を得た。得られた卵を M2 medium (Sigma)に移した後、0.03%ヒアルロニダーゼ溶液中で 37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で 5 分インキュベートすることで、卵に癒着している卵丘細胞を除去し、M16 medium (Sigma)に移し、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で発生を進めた。精子は 8 週齢オスの精巣上体から得た。

### 胚盤胞アウトグロース

胚培養後、4 日目の胚盤胞を ES 細胞用培地（後述）が入った 0.1%ゼラチンコートディッシュ上に移し、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で 10 日間静止した。形成された ES 細胞様コロニーは免疫染色に供した。

## ES 細胞培養

ES 細胞培養には 2i 培地 (N2/Neurobasal 培地中に B27 (Invitrogen), 2-mercaptoethanol (Wako), GlutaMAX-I (Gibco), bovine serum albumin Fraction V (Sigma), LIF (Millipore), PD0325901 (Sigma) and CHIR99021 (Axon)を使用した (Ying et al., 2008)。ES 細胞は、0.1%ゼラチンコートディッシュ上で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養し、コンフルエントにならないように 2-3 日おきにトリプシン処理を行い、継代を行った。

## 初期胚におけるノックダウンと過剰発現

hCG 投与から 21-26 時間後の受精 1 細胞期胚の雄性前核に 5-10  $\mu$ l の核酸 (2  $\mu$ M siRNA/5 ng/  $\mu$ l plasmid DNA)をマイクロインジェクション、もしくは hCG 投与から 14 時間後、細胞質に核酸(50  $\mu$ M siRNA/5 ng/ $\mu$ l plasmid DNA)をマイクロインジェクションすることで、過剰発現・ノックダウンを行った。使用した siRNA の配列は Table 7 に記載した。ノックダウン実験のネガティブコントロールとして、MISSION siRNA Universal Negative Control (Sigma)を用いた。リコンビナント IL17D によるノックダウン胚のレスキューにおいては、*pancIl17d* ノックダウン胚が 4 細胞期胚にまで発生した時から、M16 培地にリコンビナント IL17D を 100 ng/ml の濃度で添加した。

## ES 細胞におけるノックダウン

一過的なノックダウンには Neon Transfection System (Invitrogen)を用いて、終濃度 100 nM siRNA を用いて電気穿孔法を行った。トランスフェクションから

24 時間後に RNA 回収、TUNEL 染色、EdU ラベルアッセイを行った。ノックダウン細胞株の樹立にはレンチウイルス法を用いた。GFP 遺伝子と puromycin 耐性遺伝子を持った pLLX-shRNA 発現ベクターを Polyethylenimine Max により Human Embryonic Kidney cell にトランスフェクションさせ、レンチウイルスを作成し、ES 細胞に感染させた。感染後 2 日目から 3 日間、1 $\mu$ g/ml puromycin 処理を行い、感染細胞のみを選択的に残した。

## RT-qPCR

初期発生における mRNA と pancRNA の定量を行うために、精子、未受精卵、受精 1 細胞期胚 (hCG 投与から 30 時間後)、2 細胞期胚 (hCG 投与から 44 時間後)、4 細胞期胚 (hCG 投与から 54 時間後) から total RNA を採取した。total RNA 採取には Dynabeads mRNA DIRECT Micro Kit (Invitrogen)を用い、得られた total RNA を DNase I (Invitrogen)処理を行うことでゲノム DNA を除去した後、逆転写反応を Superscript III (Invitrogen)を用いて行った。ES 細胞からの total RNA 採取には TRIzol (Invitrogen)を用い、逆転写反応に 3  $\mu$ g の total RNA を使用した。得られた cDNA は KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPA Biosystems)を用いて RT-qPCR に供された。使用したプライマーは Table 6 に記載した。

## バイサルファイトシーケンシング

バイサルファイト変換には MethylCode kit (Invitrogen)を用いた。ゲノム DNA は 20-50 の卵/胚を lysis solution (0.1% SDS、1 mg/ml proteinase K)に移し、37°C で 60 分間インキュベートした後、98°C で 15 分間インキュベートすることで得た。

バイサルファイト変換済み DNA を AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Life Technologies) もしくは TaKaRa EpiTaq HS (TaKaRa)によって PCR 増幅し、pGEM-T easy vector (Promega)に TA cloning し、シーケンシングを行い、DNA メチル化状態を解析した。PCR 増幅に使用したプライマーは Table 6 に記載した。

### ディレクショナル RNA-seq ライブラリ作成

ディレクショナル RNA-seq ライブラリ作成にはそれぞれ 100 個の未受精卵、受精 2 細胞期胚、コントロール桑実胚及び *panc117d* ノックダウン桑実胚を用いた。Total RNA 採取と polyA+ RNA 精製には Dynabeads mRNA DIRECT Micro Kit (Invitrogen)を用いた。各サンプル 4 つのレプリケートを用意し、NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB)を用いて、ディレクショナル RNA-seq ライブラリ作成を行った。PCR 増幅は 15 サイクルである。シーケンシングは Illumina HiSeq 2000 を使用し、Single read 50 nt の条件で行われた。

### データ解析

ディレクショナル RNA-seq によって得られたリードと公共データの ES 細胞 RNA-seq リード(SRA:SRR315596)は FASTX tool kit (Patel and Jain, 2012)を用いて、アダプター配列の除去の後、低クオリティ (quality value < 20) なものと短いリード長 (< 20 nt) のものを除外した。このリードは TopHat2/Bowtie2 (Kim et al., 2013)を用いて mm10 にマッピングされ、Cufflinks and Cuffdiff (Trapnell et al., 2012)によって RPKM 値の定量と統計的処理が為された。pancRNA はプロモーター領域 (転写開始点から上流-1000 bp から-1 bp) のアンチセンス鎖にマッピ

ングされたリードをカウントし、RPKM 値を計算した。プロモーター領域に他の RefSeq gene がオーバーラップしている場合、そうした遺伝子座では pancRNA の RPKM 値の計算からは除外した。遺伝子発現量に基づいた階層的クラスタリングには cummeRbund package (Goff et al., 2012)を使用した。モチーフ探索には未受精卵と比較して 2 細胞期に 10 倍以上発現が上昇する pancRNA をもつ遺伝子のプロモーター領域 (-200bp から-1 bp) を対象に、Bioconductor の rGADEM package(Droit et al.)を用いて行われた。得られたモチーフの局在を調べるために、モチーフの position weight matrix が 90%以上一致する領域を Biostrings package に含まれる matchPWM package (Pages et al., 2013)を用いて同定した。機能解析を行う pancRNA の候補の選定には、未受精卵における RPKM が 0.5 以下、かつ 2 細胞期胚における RPKM が 1 以上、かつ ES 細胞における RPKM が 1 以上という条件のもと得られた pancRNA リスト (Table 3) から、上位 3 つの pancRNA(*pancI17d*, *pancMospd3*, *pancTbc1d22a*)について機能解析を行った。ENCODE プロジェクトのトランスクリプトームデータと CHIP-seq データ(Mouse ENCODE Consortium et al., 2012; Yue et al., 2014) は <http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/mm9/encodeDCC> より取得し、解析に用いた。

## 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は以下の手順で行われた。

細胞に 4% PFA をかけ、室温で 20 分おき、固定し、PBS で 2 回洗浄した後、透過処理とブロッキング処理のために blocking buffer (0.1% Triton X-100、3% FBS)

に置換し、室温で1時間おいた後、blocking buffer で500倍希釈した一次抗体溶液に置換し、4°Cで一晩静置した。PBSで3回洗浄した後、blocking buffer で500倍希釈した二次抗体・Hoechst 33258 (Nacalai Tesque) 溶液に置換し、室温・暗所で1時間静置し、PBSで3回洗浄した後、Leica AF6000 蛍光顕微鏡により撮影した。使用した一次抗体は anti-CDX2 (MU392A-UC, BioGenex) and anti-OCT3/4 (MAB345, Millipore), goat anti-SOX2 (sc-17320, Santa Cruz) and rat anti-E-cadherin (ab11512, Abcam)である。使用した二次抗体は CF488A donkey anti-mouse IgG, CF647 donkey anti-goat IgG and CF555 donkey anti-rat IgG (Biotium)である。

## **TUNEL 染色**

TUNEL 染色には TMR Red using an In Situ Cell Death Detection Kit (Roche)を用いた。細胞を4% PFA で固定し、浸透化溶液(クエン酸ナトリウム0.1%、0.1% Triton X-100)にて浸透化を氷上・2分間行い、PBSで2回洗浄した後、TUNEL 反応液に置換し、暗所、37°Cで60分間インキュベートし、PBSで2回洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察・撮影を行った。

## **EdU アッセイ**

EdU アッセイには Click-iT EdU Imaging Kits (Invitrogen)を用いた。ES細胞にEdUを添加し、4時間後に4% PFAにて固定し、0.1% Triton X-100を用いて透化処理を行い、1x Click-iT reaction buffer and Hoechst 33258にて染色を行った。

## **統計解析**

本論文におけるエラーバーは全て S.E.M で示されている。二群間比較には Student's *t*-test が、三群間以上の比較には Tukey's multiple comparison test が、DNA メチル化解析では Mann-Whitney U test を用いた。



## 謝辞

私を産み、育て、惜しみない支援をしてくれ、博士課程にまで進学させてくれた親に感謝します。

本研究を遂行するにあたり、研究に時間を割き、ずいぶんと家庭に迷惑をかけ、遊び盛りの娘とも十分に遊ぶ時間をとれないことがあっても、それでも、どんなときでも支え続けてくれ、家に帰ると笑顔で癒してくれた、愛する妻と娘に心から感謝します。

今村拓也先生

今村先生には公私ともに並々ならぬ温かいサポートをいただきました。生意気な学生だったと自身でも思うのですが、今村先生はそんな私を見捨てることなく、博士課程まで辛抱強く指導し、育ててくださいました。今村先生から学んだしっかりとした土台に基づいた論理構築法は本論文を始め、多くの文章に活かされており、ここまで育てていただき、ありがとうございます。

木村敦先生

木村先生には人生において初めての分子生物学をご指南して頂きました。分子生物学の基本的な手技の奥深さ、時間を守ることの大切さ、専門性を深めるにあたり、その分野を愛する重要性を学びました。短い期間でしたが、今でも変わりなく、木村研究室の仲間として受け入れてくださったこと、非常にありがたく思っております。

中島欽一先生

中島研究室での日々の生活や飲み会において、好奇心を基にした純粋な研究の楽しさ、人とのつながりを大切にすることを初めとして、研究生活を続けるにあたり、非常に貴重な経験をさせていただきました。途中から参加した学生を、初日から、仲間だと優しく受け止めていただいたことをここに感謝いたします。

阿形清和先生

阿形研での経験は現在の私の基となっています。阿形教授からは目の前の疑問に答えていくだけではなく、大局を見据え、広く訴求する命題に向かうこと、

そして、数ある命題の中で、何が本当に重要で、全力を注ぐべきなのか、思考を止めないことを学びました。阿形研究室で学んだことを糧とし、高みを目指し続け、邁進していきたいと思えます。

阿形研究室、中島研究室、木村研究室の皆様を始め、お世話になりました全ての方々にこの場をお借りして、お礼を申し上げさせていただきます。

Table 1 Ontology list for genes associated with upregulated pancRNAs

<b>Annotation Cluster 1</b>	Enrichment Score: 2.6
Term	PValue
modification-dependent macromolecule catabolic process	0.001
modification-dependent protein catabolic process	0.001
<b>Annotation Cluster 2</b>	Enrichment Score: 2.1
Term	PValue
death	0.006
apoptosis	0.008
<b>Annotation Cluster 3</b>	Enrichment Score: 2.0
Term	PValue
positive regulation of apoptosis	0.010
positive regulation of programmed cell death	0.010

Table 2 List for the apoptosis related genes overrepresented in our directional RNA-seq data

id	symbol	MII_panc	2-cell_panc	MII_mRNA	2-cell_mRNA
NM_009259	Spn	0	0.116622	0	4.42415
NM_172688	Map3k7	0	0.128523	8.88E-05	1.23035
NM_026689	Mul1	0.0180188	0.173743	0.44118	15.1955
NM_008705	Nme2	0	0.242765	0.0475807	3.27022
NM_001081151	Gan	0	0.271325	0.506487	6.35707
NM_175178	Aifm3	0	0.195164	0.0392724	0.410096
NM_010175	Fadd	0	0.304646	0.461228	4.19602
NM_026531	Aen	0	0.168983	5.80762	14.5552
NM_009877	Cdkn2a	0	0.140423	0.285059	0.655236
NM_008799	Pdcd2	0	0.128523	0.159088	62.5508
NM_011768	Zfx	0.0180188	0.233245	0.0788803	3.42821
NM_134011	Tbrg4	0	0.354627	0.360811	10.6435
NM_133794	Qars	0	0.135663	7.43821	75.9892
NM_009402	Pglyrp1	0	0.111862	1.62642	37.0827
NM_153787	Bclaf1	0	0.128523	3.23347	29.87
NM_174989	Ticam1	0	0.140423	0.743836	4.79399
NM_011614	Tnfsf12	0.207216	0.706874	0.218226	11.4443
NM_057171	Bag6	0.0360376	0.775895	7.31219	21.3974
NM_011279	Rnf7	0	0.114242	3.39517	72.3986
NM_026201	Ccar1	0.0180188	0.135663	30.2832	81.0503
NM_001039521	Rrn3	0.00900939	0.218964	7.35068	110.592
NM_021985	Tnfrsf18	0	0.138043	0	0.113259
NM_010545	Cd74	0	0.116622	0.069686	6.74764
NM_011221	Purb	0.0180188	0.142803	0.00926218	33.11
NM_010188	Fcgr3	0	0.223724	0.214102	132.68
NM_007931	Endog	0	0.164223	0.315661	8.21651
NM_011262	Dpf2	0	0.185644	3.47661	22.3472
NM_001164108	Ripk3	0	0.154703	0	0.148869
NM_026519	Emc4	0.0270282	0.235625	0	52.0935
NM_011615	Dedd	0	0.195164	5.09681	19.7238

Table 3 Candidate pancRNAs selected from directional RNA-seq data for functional assays

Ranking	id	symbol	MII_pancRNA	MII_mRNA	2-cell_pancRNA	2-cell_mRNA	ES_pancRNA	ES_mRNA
1	NM_145837	II17d	0.00	0.07	1.04	0.31	17.75	9.95
2	NM_030037	Mospd3	0.10	1.39	4.11	4.33	11.09	23.86
3	NM_145476	Tbc1d22a	0.16	1.59	3.46	3.25	4.60	10.49
4	NM_001033466	Zbtb2	0.03	10.35	1.79	5.75	3.10	6.90
5	NM_025699	3230401D17Rik	0.00	1.45	2.28	18.83	1.72	24.98
6	NM_172618	Btbd9	0.04	0.29	1.68	1.40	1.49	6.77
7	NM_026533	Rps13	0.00	0.00	1.05	0.58	1.49	401.49
8	NM_010756	Mafg	0.05	49.67	5.52	49.34	1.49	32.29
9	NM_011690	Vars	0.04	0.01	1.14	1.98	1.09	55.35
10	NM_026574	Ino80	0.00	43.77	1.08	25.44	1.03	15.07

Table 4 Expression levels of Tet family genes in our directional RNA-seq data

ID	Gene	strand	chr	Start	End	MII (RPKM)	2-cell (RPKM)
NM_027384	Tet1	-	10	62804569	62880014	0.20	1.64
NM_001040400	Tet2	-	3	133463676	133544390	0.64	1.00
NM_183138	Tet3	-	6	83362373	83441678	1123.39	11.79

Table 5 List for the 2-fold altered genes by the *panc117d* knockdown.

**Downregulated genes in panc117d-knockdown embryos**

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 1.5	
Term	PValue	Fold Enrichment
protein amino acid N-linked glycosylation	0.013	16.810
glycosylation	0.027	6.157

Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 1.1	
Term	PValue	Fold Enrichment
cell adhesion	0.045	2.247
biological adhesion	0.045	2.243

Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 1.0	
Term	PValue	Fold Enrichment
placenta development	0.024	6.441
in utero embryonic development	0.041	3.148

**Upregulated genes in panc117d-knockdown embryos**

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 1.9	
Term	PValue	Fold Enrichment
lung development	0.001	5.074
respiratory tube development	0.001	4.984

Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 1.8	
Term	PValue	Fold Enrichment
regulation of cell migration	0.010	4.592
regulation of cell motion	0.018	3.948

Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 1.6	
Term	PValue	Fold Enrichment
apoptosis	0.015	2.120
programmed cell death	0.017	2.084

Table 6 List of the primers used in this study

Bisulfite <i>Il17d</i> forward	TTAAGTTGTAAGGTTTGAAGGGAT
Bisulfite <i>Il17d</i> reverse	ACTTACTCACTTACTTATTC
Bisulfite <i>Il17d</i> TSS forward	TAGTTGAATAAGAGGTATGGAG
Bisulfite <i>Il17d</i> TSS reverse	CTCACCAATATCCCCAACATCA
Bisulfite <i>Mospd3</i> forward	AGTGGGAAGAATGTAGTTTTTATTGTT
Bisulfite <i>Mospd3</i> reverse	TCTTACCCACAATTTCACTTAAAAAA
Bisulfite <i>Tbc1d22a</i> forward	ATGTATTTTATAATTAAGTATATTTTATTG
Bisulfite <i>Tbc1d22a</i> reverse	CTATAATATAATCCAAACCTCATC
qPCR <i>pancMospd3</i> forward	CTGCGGGAACCAACATCAC
qPCR <i>pancMospd3</i> reverse	CTTGGGCAGAAATCCACCTCT
qPCR <i>Mospd3</i> forward	TGATCTCCCCCTGTCTCTTT
qPCR <i>Mospd3</i> reverse	AGTTCCCGTGGGGTTGTAGA
qPCR <i>pancIl17d</i> forward	GGAAAAACAGCCTCCTTCTAGCC
qPCR <i>pancIl17d</i> reverse	TCTCCTTCTTGCGACCACTTC
qPCR <i>Il17d</i> forward	TCACACACATCCCGTTTCC
qPCR <i>Il17d</i> reverse	CCGGAGCACTCATTATCACC
qPCR <i>pancTbc1d22a</i> forward	TCGTGTCTCCGTGCCTATTC
qPCR <i>pancTbc1d22a</i> reverse	TTCTCCCGCTGTAGTGTGGT
qPCR <i>Tbc1d22a</i> forward	TTGTGCTGCTTTCCCTCGTGA
qPCR <i>Tbc1d22a</i> reverse	AGGCAGAGAGGGGATGCTAT
qPCR <i>Oct3/4</i> forward	GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTT
qPCR <i>Oct3/4</i> reverse	CTCGAACCACATCCTTCTCT
qPCR <i>Sox2</i> forward	CACAGATGCAACCGATGCA
qPCR <i>Sox2</i> reverse	GGTGCCCTGCTGCGAGTA
qPCR <i>c-Myc</i> forward	ACGACAGCAGCTCGCCCAAATC
qPCR <i>c-Myc</i> reverse	TGGAGCACTTGCGGTTGTTGCT
qPCR <i>Klf4</i> forward	ACCTGGCGAGTCTGACATGGCT
qPCR <i>Klf4</i> reverse	AGGATGAAGCTGACGCCGAGGT
qPCR <i>Cdh1</i> forward	CGACCGGAAGTGACTCGAAA
qPCR <i>Cdh1</i> reverse	AACCACTGCCCTCGTAATCG
qPCR <i>Otx1</i> forward	TGCCATGGACCTCCTGCACC
qPCR <i>Otx1</i> reverse	GTTCCATTCCCGCTCTGCTG



qPCR <i>T</i> forward	GCTTCAAGGAGCTAACTAACGAG
qPCR <i>T</i> reverse	CCAGCAAGAAAGAGTACATGGC
qPCR <i>Gata6</i> forward	TCATTACCTGTGCAATGCATGCGG
qPCR <i>Gata6</i> reverse	ACGCCATAAGGTAGTGGTTGTGGT

Table 7 List of siRNAs and shRNAs used in this study

<i>si panc117d_1</i>	GCUCAAAUGAAGGACUCUA
<i>si panc117d_2</i>	GCAUUUACGCUUUGAGAAU
<i>si pancMospd3</i>	UAAAUCUUUCCAGAAAAUCCA
<i>si pancTbc1d22a</i>	UUAACAUUUCCGUUAUAAGAU
<i>si Tet2</i>	GGAUGUAAGUUUGCCAGAAGC
<i>si Tet3</i>	GCUCCAACGAGAAGCUAUUUG
<i>si Il17d</i>	CCGAACACUACAUCACCAUTT
<i>sh pancMospd3 Fw</i>	TGAAACTCTGGGAATTCAAAATTTCAAGAGAATTTTGAATTCCTCCAGAGTTTCTTTTTTGGAAAC
<i>sh pancMospd3 Rv</i>	TCGAGTTCCAAAAAAGAACTCTGGGAATTCAAAATTTCTCTTGAAATTTTGAATTCCTCCAGAGTTTCA
<i>sh pancTbc1d22a Fw</i>	TGGAAATGTTAATTATAAGTTTTTCAAGAGAAAACCTTATAATTAACATTTCTTTTTTTGGAAAC
<i>sh pancTbc1d22 Rv</i>	TCGAGTTCCAAAAAAGGAAATGTTAATTATAAGTTTTCTCTTGAAAACTTATAATTAACATTTCCA
<i>sh pancBag6 Fw</i>	TGTAATTTCTCGAGAAAAATTTTCAAGAGAAAATTTTCTCGAGGAAATTTACTTTTTTTGGAAAC
<i>sh pancBag6 Rv</i>	TCGAGTTCCAAAAAAGTAATTTCTCGAGAAAAATTTCTCTTGAAAAATTTTCTCGAGGAAATTACA

## 引用文献

- Agata, K., Kobayashi, H., Itoh, Y., Mochii, M., Sawada, K. and Eguchi, G.** (1993). Genetic characterization of the multipotent dedifferentiated state of pigmented epithelial cells in vitro. *Development* **118**, 1025–1030.
- Aoki, F., Worrad, D. M. and Schultz, R. M.** (1997). Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* **181**, 296–307.
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T.** (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* **21**, 381–395.
- Batista, P. J. and Chang, H. Y.** (2013). Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell* **152**, 1298–1307.
- Bernstein, B. E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D. K., Huebert, D. J., McMahon, S., Karlsson, E. K., Kulbokas, E. J., Gingeras, T. R., et al.** (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**, 169–181.
- Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. and Ingram, V.** (1988). Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **203**, 971–983.
- Betz, U. A. K., Bloch, W., van den Broek, M., Yoshida, K., Taga, T., Kishimoto, T., Addicks, K., Rajewsky, K. and Muller, W.** (1998). Postnatally Induced Inactivation of gp130 in Mice Results in Neurological, Cardiac, Hematopoietic, Immunological, Hepatic, and Pulmonary Defects. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 1955–1965.
- Bird, A. P.** (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209–213.

- Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O. J. and Macleod, D.** (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* **40**, 91–99.
- Blackwood, E. M.** (1998). Going the Distance: A Current View of Enhancer Action. *Science* **281**, 60–63.
- Bolton, V. N., Oades, P. J. and Johnson, M. H.** (1984). The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol* **79**, 139–163.
- Borgel, J., Guibert, S., Li, Y., Chiba, H., Schübeler, D., Sasaki, H., Forné, T. and Weber, M.** (2010). Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nature Genetics* **42**, 1093–1100.
- Borsani, G., Tonlorenzi, R., Simmler, M. C., Dandolo, L., Arnaud, D., Capra, V., Grompe, M., Pizzuti, A., Muzny, D., Lawrence, C., et al.** (1991). Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature* **351**, 325–329.
- Braun, R. E.** (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature Genetics* **28**, 10–12.
- Brison, D. R. and Schultz, R. M.** (1997). Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol. Reprod.* **56**, 1088–1096.
- Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G. F., McCabe, V. M., Norris, D. P., Cooper, P. J., Swift, S. and Rastan, S.** (1992). The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell* **71**, 515–526.
- Brown, C. J., Hendrich, B. D., Rupert, J. L., Lafrenière, R. G., Xing, Y., Lawrence, J. and Willard, H. F.** (1992). The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* **71**, 527–542.

- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., et al.** (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* **309**, 1559–1563.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. and Smith, A.** (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643–655.
- Chu, C., Qu, K., Zhong, F. L., Artandi, S. E. and Chang, H. Y.** (2011). Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions. *Molecular Cell* **44**, 667–678.
- Cuddapah, S., Jothi, R., Schones, D. E., Roh, T.-Y., Cui, K. and Zhao, K.** (2009). Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Research* **19**, 24–32.
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D. G., et al.** (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research* **22**, 1775–1789.
- Desai, N.** (1999). Evaluation of the effect of interleukin-6 and human extracellular matrix on embryonic development. *Hum Reprod* **14**, 1588–1592.
- Droit, A., Gottardo, R., Robertson, G. and Li, L.** *rGADEM: de novo motif discovery. R package version 2.12.0.*
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T.** (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells : Article : Nature. *Nature* **411**, 494–498.
- ENCODE Project Consortium, Bernstein, B. E., Birney, E., Dunham, I., Green, E. D., Gunter, C. and Snyder, M.** (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57–74.
- Fabian, D., Koppel, J. and Maddox-Hyttel, P.** (2005). Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology* **64**, 221–231.

- Farthing, C. R., Ficz, G., Ng, R. K., Chan, C.-F., Andrews, S., Dean, W., Hemberger, M. and Reik, W.** (2008). Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet.* **4**, e1000116.
- Fatica, A. and Bozzoni, I.** (2014). Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 7–21.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811.
- Flach, G., Johnson, M. H., Braude, P. R., Taylor, R. A. and Bolton, V. N.** (1982). The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J.* **1**, 681–686.
- Frum, T., Halbisen, M. A., Wang, C., Amiri, H., Robson, P. and Ralston, A.** (2013). Oct4 Cell-Autonomously Promotes Primitive Endoderm Development in the Mouse Blastocyst. *Dev. Cell* **25**, 610–622.
- Gardiner-Garden, M. and Frommer, M.** (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* **196**, 261–282.
- Ginno, P. A., Lott, P. L., Christensen, H. C., Korf, I. and Chédin, F.** (2012). R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters. *Molecular Cell* **45**, 814–825.
- Goff, L. A., Trapnell, C. and Kelley, D.** (2012). CummeRbund: visualization and exploration of Cufflinks high-throughput sequencing data.
- Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B. J., Chiang, H. R., King, N., Degnan, B. M., Rokhsar, D. S. and Bartel, D. P.** (2008). Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* **455**, 1193–1197.

- Gu, T.-P., Guo, F., Yang, H., Wu, H.-P., Xu, G.-F., Liu, W., Xie, Z.-G., Shi, L., He, X., Jin, S.-G., et al.** (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* **477**, 606–610.
- Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., Tsai, M.-C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L., et al.** (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* **464**, 1071–1076.
- Gurdon, J. B.** (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* **10**, 622–640.
- Hajkova, P., Jeffries, S. J., Lee, C., Miller, N., Jackson, S. P. and Surani, M. A.** (2010). Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science* **329**, 78–82.
- Hamatani, T., Carter, M. G., Sharov, A. A. and Ko, M. S. H.** (2004). Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev. Cell* **6**, 117–131.
- Harikrishnan, K. N., Chow, M. Z., Baker, E. K., Pal, S., Bassal, S., Brasacchio, D., Wang, L., Craig, J. M., Jones, P. L., Sif, S., et al.** (2005). Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nature Genetics* **37**, 254–264.
- Hashimoto, H., Liu, Y., Upadhyay, A. K., Chang, Y., Howerton, S. B., Vertino, P. M., Zhang, X. and Cheng, X.** (2012). Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Research* **40**, 4841–4849.
- Hatzis, P. and Talianidis, I.** (2002). Dynamics of Enhancer-Promoter Communication during Differentiation-Induced Gene Activation. *Molecular Cell* **10**, 1467–1477.
- He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., et al.** (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **333**, 1303–1307.

- Imamura, T., Yamamoto, S., Ohgane, J., Hattori, N., Tanaka, S. and Shiota, K.** (2004). Non-coding RNA directed DNA demethylation of Sphk1 CpG island. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 593–600.
- Inoue, A. and Zhang, Y.** (2011). Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science* **334**, 194.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C. and Zhang, Y.** (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* **333**, 1300–1303.
- Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. and Nakae, S.** (2011). Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* **34**, 149–162.
- Iyer, L. M., Anantharaman, V., Wolf, M. Y. and Aravind, L.** (2008). Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *Int. J. Parasitol.* **38**, 1–31.
- Iyer, L. M., Tahiliani, M., Rao, A. and Aravind, L.** (2009). Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle* **8**, 1698–1710.
- Jadrich, J. L., O'Connor, M. B. and Coucouvanis, E.** (2006). The TGF beta activated kinase TAK1 regulates vascular development in vivo. *Development* **133**, 1529–1541.
- Kass, S. U., Pruss, D. and Wolffe, A. P.** (1997). How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet.* **13**, 444–449.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R. and Salzberg, S. L.** (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**, R36.
- Kim, T. H., Abdullaev, Z. K., Smith, A. D., Ching, K. A., Loukinov, D. I., Green, R. D., Zhang, M. Q., Lobanenko, V. V. and Ren, B.** (2007). Analysis of the Vertebrate Insulator Protein CTCF-Binding Sites in the Human Genome. *Cell* **128**, 1231–1245.



- Kim, T. H., Barrera, L. O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M. A., Richmond, T. A., Wu, Y., Green, R. D. and Ren, B.** (2005). A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* **436**, 876–880.
- Kim, T.-K., Hemberg, M., Gray, J. M., Costa, A. M., Bear, D. M., Wu, J., Harmin, D. A., Laptewicz, M., Barbara-Haley, K., Kuersten, S., et al.** (2010). Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* **465**, 182–187.
- Kohli, R. M. and Zhang, Y.** (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* **502**, 472–479.
- Kolls, J. K. and Lindén, A.** (2004). Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity* **21**, 467–476.
- Kouzarides, T., Fuks, F., Burgers, W. A., Brehm, A. and Hughes-Davies, L.** (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genetics* **24**, 88–91.
- Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S.** (2010). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research* **39**, D152–D157.
- Kriaucionis, S. and Heintz, N.** (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* **324**, 929–930.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921.
- Latham, K. E., Garrels, J. I., Chang, C. and Solter, D.** (1991). Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development* **112**, 921–932.
- Li, E., Bestor, T. H. and Jaenisch, R.** (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**, 915–926.

- Li, W., Notani, D., Ma, Q., Tanasa, B., Nunez, E., Chen, A. Y., Merkurjev, D., Zhang, J., Ohgi, K., Song, X., et al.** (2013). Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature* **498**, 516–520.
- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., et al.** (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* **462**, 315–322.
- M Comb, H. M. G.** (1990). CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Research* **18**, 3975.
- Maiti, A. and Drohat, A. C.** (2011). Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 35334–35338.
- Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M. L., Son, J., Drury, W. J., Voigt, P., Martin, S. R., Taylor, W. R., De Marco, V., et al.** (2009). Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* **461**, 762–767.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. and Haaf, T.** (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**, 501–502.
- Melo, C. A., Drost, J., Wijchers, P. J., van de Werken, H., de Wit, E., Oude Vrielink, J. A. F., Elkon, R., Melo, S. A., Léveillé, N., Kalluri, R., et al.** (2013). eRNAs are required for p53-dependent enhancer activity and gene transcription. *Molecular Cell* **49**, 524–535.
- Miranda, T. B. and Jones, P. A.** (2007). DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J. Cell. Physiol.* **213**, 384–390.
- Mouse ENCODE Consortium, Stamatoyannopoulos, J. A., Snyder, M., Hardison, R., Ren, B., Gingeras, T., Gilbert, D. M., Groudine, M., Bender, M., Kaul, R., et al.** (2012). An encyclopedia of mouse DNA elements (Mouse ENCODE). *Genome Biol.* **13**, 418.

- Mu, W., Munroe, R. J., Barker, A. K. and Schimenti, J. C.** (2010). PDCD2 is essential for inner cell mass development and embryonic stem cell maintenance. *Dev. Biol.* **347**, 279–288.
- Nakashima, K. and Taga, T.** (2002). Mechanisms underlying cytokine-mediated cell-fate regulation in the nervous system. *Mol. Neurobiol.* **25**, 233–244.
- Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Sanosaka, T., Deneen, B., Taga, T. and Nakashima, K.** (2009). Committed Neuronal Precursors Confer Astrocytic Potential on Residual Neural Precursor Cells. *Dev. Cell* **16**, 245–255.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. and Bird, A.** (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386–389.
- Necsulea, A., Soumillon, M., Warnefors, M., Liechti, A., Daish, T., Zeller, U., Baker, J. C., Grützner, F. and Kaessmann, H.** (2014). The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. *Nature* **505**, 635–640.
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R. and Rossant, J.** (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophectoderm Differentiation. *Cell* **123**, 917–929.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. and Li, E.** (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247–257.
- Okano, M., Xie, S. and Li, E.** (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature Genetics* **19**, 219–220.
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W. and Walter, J.** (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr. Biol.* **10**, 475–478.
- P, H., I, B., G, M.-N., F, S. and L, G.** (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway1. *biochemj.org*.

- Pages, H., Aboyoun, P., Gentleman, R. and DebRoy, S.** (2013). *Biostrings: String objects representing biological sequences, and matching algorithms. R package version 2.32.0.*
- Park, S.-J., Komata, M., Inoue, F., Yamada, K., Nakai, K., Ohsugi, M. and Shirahige, K.** (2013). Inferring the choreography of parental genomes during fertilization from ultralarge-scale whole-transcriptome analysis. *Genes & Development* **27**, 2736–2748.
- Patel, R. K. and Jain, M.** (2012). NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS ONE* **7**, e30619.
- Pennacchio, L. A., Bickmore, W., Dean, A., Nobrega, M. A. and Bejerano, G.** (2013). Enhancers: five essential questions. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 288–295.
- Phillips, J. E. and Corces, V. G.** (2009). CTCF: master weaver of the genome. *Cell* **137**, 1194–1211.
- Prendergast, G. C., Lawe, D. and Ziff, E. B.** (1991). Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* **65**, 395–407.
- Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Brugmann, S. A., Goodnough, L. H., Helms, J. A., Farnham, P. J., Segal, E., et al.** (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* **129**, 1311–1323.
- Robert, M.-F., Morin, S., Beaulieu, N., Gauthier, F., Chute, I. C., Barsalou, A. and MacLeod, A. R.** (2002). DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nature Genetics* **33**, 61–65.
- Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Toniatti, C., Puccetti, P., Bistoni, F. and Poli, V.** (1996). Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J. Exp. Med.* **183**, 1345–1355.

- Rouvier, E., Luciani, M. F., Mattéi, M. G., Denizot, F. and Golstein, P.** (1993). CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J. Immunol.* **150**, 5445–5456.
- Santos, F., Peters, A. H., Otte, A. P., Reik, W. and Dean, W.** (2005). Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev. Biol.* **280**, 225–236.
- Shukla, S., Kavak, E., Gregory, M., Imashimizu, M., Shutinoski, B., Kashlev, M., Oberdoerffer, P., Sandberg, R. and Oberdoerffer, S.** (2011). CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* **479**, 74–79.
- Sigova, A. A., Mullen, A. C., Molinie, B., Gupta, S., Orlando, D. A., Guenther, M. G., Almada, A. E., Lin, C., Sharp, P. A., Giallourakis, C. C., et al.** (2013). Divergent transcription of long noncoding RNA/mRNA gene pairs in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 2876–2881.
- Smallwood, A. and Ren, B.** (2013). Genome organization and long-range regulation of gene expression by enhancers. *Current Opinion in Cell Biology* **25**, 387–394.
- Smallwood, S. A., Tomizawa, S.-I., Krueger, F., Ruf, N., Carli, N., Segonds-Pichon, A., Sato, S., Hata, K., Andrews, S. R. and Kelsey, G.** (2011). Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nature Genetics* **43**, 811–814.
- Smith, Z. D., Chan, M. M., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A. and Meissner, A.** (2012). A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* **484**, 339–344.
- Starnes, T., Broxmeyer, H. E., Robertson, M. J. and Hromas, R.** (2002). Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *J. Immunol.* **169**, 642–646.
- Strumpf, D., Mao, C.-A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F. and Rossant, J.** (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and

differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* **132**, 2093–2102.

**Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., et al.** (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930–935.

**Takahashi, K. and Yamanaka, S.** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676.

**Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S.** (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872.

**Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M. and Taga, T.** (2001). DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev. Cell* **1**, 749–758.

**Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A. K., Nagy, A. and Rossant, J.** (1998). Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* **282**, 2072–2075.

**Teperek-Tkacz, M., Pasque, V., Gentsch, G. and Ferguson-Smith, A. C.** (2011). Epigenetic reprogramming: is deamination key to active DNA demethylation? *Reproduction* **142**, 621–632.

**Tomikawa, J., Shimokawa, H., Uesaka, M., Yamamoto, N., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K.-I. and Imamura, T.** (2011). Single-stranded noncoding RNAs mediate local epigenetic alterations at gene promoters in rat cell lines. *J. Biol. Chem.* **286**, 34788–34799.

**Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L. and Pachter, L.** (2012). Differential gene and

transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* **7**, 562–578.

**Trojer, P. and Reinberg, D.** (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Molecular Cell* **28**, 1–13.

**Tsai, M.-C., Manor, O., Wan, Y., Mosammamaparast, N., Wang, J. K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E. and Chang, H. Y.** (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* **329**, 689–693.

**Uesaka, M., Nishimura, O., Go, Y., Nakashima, K., Agata, K. and Imamura, T.** (2014). Bidirectional promoters are the major source of gene activation-associated non-coding RNAs in mammals. *BMC Genomics* **15**, 35.

**Valinluck, V. and Sowers, L. C.** (2007). Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res.* **67**, 946–950.

**Van den Wyngaert, I., Sprengel, J., Kass, S. U. and Luyten, W. H.** (1998). Cloning and analysis of a novel human putative DNA methyltransferase. *FEBS Lett.* **426**, 283–289.

**Wang, D., Garcia-Bassets, I., Benner, C., Li, W., Su, X., Zhou, Y., Qiu, J., Liu, W., Kaikkonen, M. U., Ohgi, K. A., et al.** (2011). Reprogramming transcription by distinct classes of enhancers functionally defined by eRNA. *Nature* **474**, 390–394.

**Wang, L., Zhang, J., Duan, J., Gao, X., Zhu, W., Lu, X., Yang, L., Zhang, J., Li, G., Ci, W., et al.** (2014). Programming and Inheritance of Parental DNA Methylation in Mammals. *Cell* **157**, 979–991.

**Wossidlo, M., Arand, J., Sebastiano, V., Lepikhov, K., Boiani, M., Reinhardt, R., Schöler, H. and Walter, J.** (2010). Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. *EMBO J.* **29**, 1877–1888.

**Wu, G., Gentile, L., Fuchikami, T., Sutter, J., Psathaki, K., Esteves, T. C., Araúzo-Bravo, M. J., Ortmeier, C., Verberk, G., Abe, K., et al.** (2010).

Initiation of trophectoderm lineage specification in mouse embryos is independent of Cdx2. *Development* **137**, 4159–4169.

**Yeh, W.-C., la Pompa, de, J. L., McCurrach, M. E., Shu, H.-B., Elia, A. J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W. and Mitchell, K.** (1998). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* **279**, 1954–1958.

**Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P. and Smith, A.** (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519–523.

**Yue, F., Cheng, Y., Breschi, A., Vierstra, J., Wu, W., Ryba, T., Sandstrom, R., Ma, Z., Davis, C., Pope, B. D., et al.** (2014). A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* **515**, 355–364.

**Zhang, L., Lu, X., Lu, J., Liang, H., Dai, Q., Xu, G.-L., Luo, C., Jiang, H. and He, C.** (2012). Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA. *Nature Publishing Group* **8**, 328–330.

**Zhao, J., Sun, B. K., Erwin, J. A., Song, J.-J. and Lee, J. T.** (2008). Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science* **322**, 750–756.

**Zhou, V. W., Goren, A. and Bernstein, B. E.** (2010). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 7–18.

江口, 吾. (1980). *水晶体の再生*. 岩波書店.