

( 続紙 1 )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                     |    |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----|--------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 博士（農学）                              | 氏名 | 本多 慎之介 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 哺乳類受精卵における内在性レトロウイルス由来キメラmRNAに関する研究 |    |        |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                     |    |        |
| <p>哺乳類の個体の生命は卵子と精子が受精して受精卵となることから始まる。哺乳類の受精卵は、最初は1個の細胞の状態（1細胞期胚）から細胞分裂を繰り返していくが、マウスの場合2細胞期胚までは各細胞から胎盤と胎児を含むすべての組織を形成し得る、すなわち各細胞（割球）は全能性を有している。その後発生が進むにつれて細胞の運命決定が行われ、細胞は全能性を失い、胎児あるいは胎盤へ分化する細胞系列の形成という最初の細胞分化が起こる。マウス受精卵の細胞運命決定にはヒストンタンパク質の特定のアルギニン残基のメチル化修飾が関わることが示唆されている。本研究では、アルギニンメチル化酵素である<i>Prmt6</i>が、マウス受精卵においてレトロウイルス由来のゲノム構成要素である内在性レトロウイルス（endogenous retrovirus, ERV）配列と結合したキメラmRNAとして転写され、翻訳開始コドンが非キメラ型のmRNAより上流に移行することでキメラタンパク質が発現することを新たに発見し、このキメラタンパク質のマウス受精卵における機能解明を目的とした。</p> <p>第一章では、本研究の学術的背景および検証すべき仮説を提示している。まず、哺乳類の受精卵形成以降の初期胚発生について概説し、桑実胚期以降に起こる胎盤へ寄与する栄養膜細胞（TE）と主に胎児に寄与する内部細胞塊（ICM）への分化について、さらにICMからの胚盤葉上層と原始内胚葉への分化について、その分子機構とともに説明している。また、マウスにおいて1～2細胞期胚の割球が持つ全能性、全能性喪失についての桑実胚期以降のTE/ICM運命決定による従来提唱されてきた機構、対して、より早期（4細胞期胚）でのTE/ICM運命決定の存在を示唆する最近の知見と、その早期の細胞運命決定に対するヒストンアルギニンのメチル化修飾の関与について述べている。次に、哺乳類ゲノムの構成要素としてのERV、特にマウスのMERVLとその受精卵での発現および全能性との関連について述べ、「MERVLキメラ転写産物が受精卵の細胞分化に寄与している」という本研究で検証する仮説を提示している。</p> <p>第二章では、報告されているマウス2細胞期胚でのMERVLキメラ転写産物およびヒストン修飾関連遺伝子のリストの照合から、両条件を満たす8つの遺伝子を同定し、その中から、公開されているRNAシーケンシング（RNA-seq）データの再解析により、胚性ゲノムの活性化時期に発現が顕著に増加する4つの遺伝子を抽出した。この4つの遺伝子の内、Type Iアルギニンメチル化酵素である<i>Prmt6</i>に着目し、MERVL配列の一つであるMT2B2とのキメラ型の転写産物（MT2B2 driven <i>Prmt6</i>、<i>Prmt6</i><sup>MT2B2</sup>）と従来知られていた非キメラ型の転写産物（Canonical <i>Prmt6</i>、<i>Prmt6</i><sup>CAN</sup>）それぞれのマウス受精卵における発現動態を調べ、2細胞期後期胚では前者が、胚盤胞では後者が優勢に発現することを明らかにした。また、<i>Prmt6</i><sup>CAN</sup>由来の通常のタンパク質（PRMT6<sup>CAN</sup>）よりも翻訳開始点が5'側に延長した<i>Prmt6</i><sup>MT2B2</sup>由来のより長いタンパク質（PRMT6<sup>MT2B2</sup>）がマウスの1細胞期から胚盤胞期にかけて発現し、胚盤胞期ではPRMT6<sup>CAN</sup>も発現するようになること、両タンパク質が異なる酵素活性や基質特異性を持つことを、培養細胞を用いた過剰発現実験を併用して明らかにした。次に、マウス受精卵への両タンパク質の発現制御ツールの導入実験により、PRMT6<sup>MT2B2</sup>の発現は細胞増殖、胚盤葉上層や原始内胚葉への分化を促進する等の結果が得られ、マウス受精卵で発現するキメラタンパク質が細胞分化を制御している可能性が示唆された。</p> |                                     |    |        |

第三章では、第二章において、マウス受精卵では*Prmt6*がMT2B2配列を利用したキメラ転写産物として発現していることが明らかとなり胚盤胞の細胞分化に関連していることが示唆されたことを受け、他の有胎盤哺乳類（ヒト、ヤギ、ブタ、ウシ）での*PRMT6*のキメラ型転写の動態を、公開されているRNA-seqデータの再解析によって、またウシにおいては逆転写PCRを併用して調べた。その結果、これら4動物種における*PRMT6*は、ERV由来のトランスポゾンではないが、やはりトランスポゾン由来配列とのキメラ型転写となっており、使用されている配列はDNAトランスポゾン由来であることが明らかとなった。

第四章では、第二章や先行研究で受精卵の細胞分化への影響が示唆されたType I PRMTファミリー遺伝子における冗長性や相互作用を調べた。その結果、複数あるいは特定のファミリー遺伝子を抑制した場合に別のファミリー遺伝子の発現が補完される現象が見られ、互いの発現制御に関するType I PRMTファミリー遺伝子間の複雑な相互作用が存在することが明らかとなり、これらの遺伝子の機能阻害実験において表現型への影響が軽微であることや、ファミリー遺伝子の機能の共通性を支持する結果となった。

第五章では、生殖機能の低下につながる肥満と卵母細胞でのERV発現の関係、産業動物を含め種を超えて共通する胚性ゲノムの活性化とERV発現の関係、体細胞核移植技術の効率とERV発現の関係を取りあげて述べ、第四章までの一連の研究によって明らかとなった、受精卵においてERVキメラ転写産物がキメラタンパク質として翻訳され特異的機能を発揮するという新しい知見が得られたことを総括し、本成果は、哺乳類ゲノムにおいてジャンクDNAの一種といわれていたERVの生物学的機能の一端を明らかにするとともに、動物生産や生殖医療に貢献することが期待されると結んでいる。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

哺乳類の初期胚発生機構の解明は、家畜等の資源動物やヒトにおける生殖補助技術の発展や安全性の確保に結び付くため重要な研究課題である。進化の過程で宿主ゲノムに挿入され転移・増幅された内在性レトロウイルス (ERV) 由来配列は、哺乳類では受精卵の最初の遺伝子発現である胚性ゲノムの活性化時に高発現することが知られているが、その生物学的機能はほとんど解明されていない。本研究では ERV キメラ転写産物がキメラタンパク質として翻訳され、受精卵の細胞分化に対して特異的機能を発揮するという新たな発生制御機構を明らかにした。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. 公開されている RNA-seq データを再解析することで、アルギニンメチル化酵素である *Prmt6* が実験動物、産業動物、ヒトを含む動物種を超えて、受精卵において胚性ゲノムの活性化時期にトランスポゾンとのキメラ転写産物となって発現していることを明らかにした。
2. 哺乳類の初期胚発生時に ERV 配列と宿主遺伝子のキメラ転写産物が発現することは知られていたが、マウス受精卵においてキメラ型 *Prmt6* は ERV 由来配列から翻訳が開始されるため、非キメラ型よりも長いタンパク質に翻訳されることを明らかにし、このキメラ型 *Prmt6* の発現が、マウス受精卵の細胞分化における運命決定を制御することを示唆する知見を得た。
3. 互いの発現制御に関する PRMT ファミリー遺伝子間の複雑な相互作用が存在することを明らかとした。

以上のように、本論文は、正常な発生過程にある細胞では世界初の報告となる、ERV 配列とのキメラタンパク質の存在を明らかにするとともに、その哺乳類の初期胚発生における特異的機能を示し、最初期の初期胚発生における ERV 配列の流用 (cooption) の新たな具体例を提示するものであり、生殖生物学、発生工学、応用動物科学、進化生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和 6 年 4 月 1 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から 3 ヶ月以内)