

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 今 村 拓 也

哺乳類のゲノムDNAにはCpG配列が局所的に多く存在する領域が存在し、CpGアイランドと呼ばれている。CpGアイランドは通常、遺伝子の5'上流あるいはそれらの近傍に認められ、転写調節領域として機能する他にDNA複製開始点としての機能もあることが示されている。DNAのメチル化は遺伝子の不活性化の分子機構として注目されている。本論文は、組織特異的なメチル化可変領域を持つCpGアイランドのゲノムスキャンニングによるメチル化領域を中心に解析したもので、特に脳特異的な非メチル部位を含むCpGアイランドがスフィンゴシンキナーゼ1遺伝子発現を調節していること、および同CpGアイランドからアンチセンスRNAが発現していることが記されている。4章より構成され、要約すると以下ようになる。

第一章ではラット（胎児、成熟、老齢）の脳を含む様々な組織由来のゲノムDNAのメチル化状況を、メチル化感受性酵素Not Iを用いたRestriction Landmark Genomic Scanning法 (RLGS) により解析している。その結果、合計1051座位がRLGSスポットとして検出された。興味深いことに、雌雄間でメチル化状態の違うスポットが1個、成体脳にあり心臓にないスポットが6個、胎児脳と成体脳間でメチル化状態の違うスポット群が6個、老化にしたがった変化のあるスポットが複数検出された。合計44座位（全スポットの4.2%）においてメチル化状況が異なっていることが明らかにされた。RLGSスポットからDNAをクローニングした結果、メチル化の変化があった部位はCpGアイランドとしての特徴を備えていた。これらの結果は、組織特異的にメチル化されるCpGアイランドが存在することを示している。

第二章では第一章で明らかになったRLGSスポットの一つが、ラットスフィンゴシンキナーゼ (rSPHK1) 遺伝子の5'上流と転写開始部位をカバーするかたちで存在することを見出している。塩基配列の決定から、rSPHK1CpGアイランドは約3.7kbに及んでおり、少なくとも6つのエクソン1が同領域に存在し、SPHK1のサブタイプ群 (SPHK1a-f) がコードされていることが明らかにされた。これらのサブタイプmRNA発現は時期特異的、且つ組織特異的なパターンを示していた。また、同CpGアイランドのメチル化状況を解析した結果、組織特異的メチル化可変領域 (T-DMR, 200bp) は同CpGアイランドの5'末端に位置していることも明らかになった。T-DMRは脳では低メチル化状態であるのに対し、心臓では高メチル化状態にあった。これらより、rSPHK1遺伝子のCpGアイランドは複数のエクソン使い分け機構を制御していることが示された。

第三章では、第二章で発見されたT-DMRとrSPHK1遺伝子情報を基にヒトSPHK1 (hSPHK1) 遺伝子のゲノムクローニングが試みられ、hSPHK1遺伝子の5'末端にも約4.1kbのCpGアイランドが存

在することが明らかにされた。しかも、ラットゲノムDNAで発見されたT-DMRに高い相同性を有する領域がhSPHK1のCpGアイランドにも存在していた。即ち、SPHK1遺伝子のT-DMRは進化の淘汰圧に抗してきたことが推測され、その機能の重要性が示唆された。

第四章ではT-DMRを含むCpGアイランドからアンチセンスRNAが発現することを発見し、センスRNAの発現とT-DMRのメチル化との関係が研究されている。一般にプロモーターには方向性があると考えられているのに対し、CpGアイランドがプロモーターとして機能する場合、遺伝子の反対方向にも転写活性があることがin vitro実験で示されている。本章では、in vivoで、SPHK1CpGアイランドからアンチセンスRNAが転写されていることが発見された。このアンチセンスRNAの発現は、腎で最も高く、心臓、胎盤、脾、肺でも検出された。CpGアイランドが低メチル化状態にある脳での発現は少なかった。ラット腎繊維芽細胞株NRK細胞を用いて、RNA-FISH法でセンス・アンチセンスRNAの発現を解析したところ、センスRNAを発現している細胞ではアンチセンスRNAは検出されず、アンチセンスRNAを発現している細胞ではセンスRNAは発現しないことが観察され、つまり両者が同時に発現している像は認められなかった。発生途上のラット組織やNRK細胞の解析から、アンチセンスRNAの発現とT-DMRのメチル化成立と関係が考察されている。これらの結果より、CpGアイランドはアンチセンスRNAの発現とも関連していることが示唆された。

以上、組織特異的にメチル化状況の異なる領域(T-DMR)を含むCpGアイランドが存在すること、脳特異的に低メチル化状態にあるT-DMRを有するCpGアイランドがSPHK1遺伝子の5'末端に存在すること、そのCpGアイランドは複数のmRNA(SPHK1a-f、アンチセンスRNA)の転写開始領域として機能していること、T-DMRのメチル化はSPHK1遺伝子の発現制御に関わっていることが明らかされた。これらの発見はDNAメチル化による脳発生のエピジェネテックス機構として重要で、獣医学領域に貢献しているところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。