

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 千田 将

エピジェネティクスとは「細胞世代を超えて、DNA の塩基配列を変えずに、継承される遺伝子機能について研究する学問分野」を意味する。DNA のメチル化は、遺伝子発現調節に重要な働きを持つと考えられている。近年、哺乳類動物種において体細胞核移植によるクローン動物が誕生した。クローン動物の発生率は極端に低く、また、生まれた動物においても様々な異常が見られるなど問題点が指摘されている。クローン動物のゲノム DNA の配列は、当然、核提供者である正常動物のそれと同一と考えられるので、種々の異常の原因は、遺伝子配列そのものではなく、遺伝情報を司るエピジェネティクス系の異常によると考えられる。なるほど、近年の報告では、クローンマウスの CpG アイランドのメチル化状況は、自然交配のマウスとは異なることが示されている。本研究は、クローンマウスのエピジェネティクス系の異常について、特に X 染色体不活性化と DNA メチル化異常を中心に解析した結果を論じたもので、3 章より構成されており、要約すれば以下ようになる。

哺乳類雌個体においては、母方 X 染色体が不活性化細胞と、父方 X 染色体が不活性化細胞の二種の細胞で組織が構築されることとなる。この二種の細胞の存在比は「X 染色体不活性化パターン」と呼ばれ、通常、1:1 に近い値となる。まず、第 1 章では、[C57BL/6 X C3H] F1 (B6C3F1) マウスにおいて X 染色体不活性化パターンを決定するに有用な一塩基多型 (SNP) を示す領域を得た。この SNP 情報を利用して、多数の B6C3F1 の遺伝的背景を持つ雌クローンマウスにおいて X 染色体不活性化パターンを決定した。興味深いことに、腎臓における解析で、C57BL/6 由来の X 染色体の不活性化比率が、80%を超えるクローン個体と、また、逆に C3H 由来の X 染色体の不活性化比率が 80%を超える個体が存在することが明らかになった。さらに、腸における解析においても、同様の傾向が見られ、雌クローンマウスの一部では非常に偏った X 染色体不活性化パターンを有することが明らかとなった。

さて、X 染色体上に enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子など標識遺伝子を持つトランスジェニックマウス (T-GFP-X 系統) を、核提供者として利用できれば、X 染色体不活性化パターンの決定機構を解明する上で有用である。しかし、一般に、トランスジェニック動物を作出した場合、しばしば予想外の発現抑制を受けることが知られている。従って、T-GFP-X 系統においても、同様の現象が起きるならば、活性 X 染色体 (Xa) 上のサイレンシングと X 染色体不活性化パターンの反映としての非発現を混同しない注意が求められる。第 2 章の研究では、本専攻応用遺伝学研究室で作出された T-GFP-X マウスにおいて、腎臓皮質の尿細管部の細胞特異的に、Xa 上でサイレンシングが起きることが分かった。一方、腎臓皮質の糸球体、心筋細胞、小脳のプルキンエ細胞などでは、EGFP の非発現が X 染色体の不活性化パターンを忠実に反映することが明らかとなった。また、Xa

上の細胞種特異的なサイレンシングが、DNAメチル化によって制御されていることも、サザンブロット解析、脱メチル化剤による解析から示唆された。また、不活性X染色体(Xi)上のトランスジーンのみチル化状態も重要な解析対象と考えた。なぜなら、内在性のX連鎖遺伝子と同じように、Xi上のEGFP遺伝子が高度にメチル化されるならば、そのメチル化状態を基にX染色体不活性化パターンを決定する、という利用法も考えられるからである。HaplIPCR法により解析したところ、Xi上のEGFP遺伝子は完全にメチル化されていることが分かった。本章の解析により、T-GFP-Xシステムの有用性が確認されるとともに、将来行なうべき解析法、解析対象とすべき組織、に対して有用な知見が得られた。

最後に、第3章では、成体(170~330日齢)、および老齢域(676~835日齢)のクローンマウスのゲノムメチル化解析が行なわれた。解析にあたっては、1,000以上のゲノム座位(その殆どがCpGアイランドである)のみチル化状態を一度に可視化できるRLGS法が用いられた。成体クローンマウスでは、4個体のうち2個体で、ある同一の座位が過度のメチル化状態にあった。ところが、老齢クローンマウス4個体では、全くメチル化異常座位は見い出されなかった。生後間もないクローンマウスの研究では、2個体の解析で、皮膚において計3つ、胎盤において計4つのメチル化異常座位が発見されたと報告されている。今回の解析では、成体クローン4個体で計2つ、老齢クローン4個体で0であったので、個体の成熟期を通して、また、老化の過程で、DNAメチル化異常が除外されるのではないかと考えられる。

以上より、本研究ではクローン動物では、X染色体不活性に異常があること、DNAメチル化に異常が見られること、DNAメチル化異常は老化に伴い減少することを立証し、哺乳類のエピジェネティクス研究領域に新たな概念を提供した。また、クローン動物が発癌や老化の有用な病態モデル動物となることも示した。これらの発見と概念の提示は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論分が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。