

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 12 年度博士課程 入学

氏 名 高 應 圭

指導教官名 塩田 邦郎

論文題目 **Studies on epigenetic control of DNA methyltransferase expression**
(DNA メチル転移酵素発現のエピジェネティクス制御に関する研究)

緒言

ほ乳類のゲノム DNA では、シトシンとグアニンが並んだ配列 (CpG 配列) のシトシンがメチル化修飾を受けることが知られている。一般に、ゲノム DNA のある領域がメチル化されると、近傍に位置する遺伝子の転写が抑制される。また、DNA メチル化はゲノミックインプリンティングや X 染色体の不活性化、クロマチン構造の変化などの中心的機構でもある。DNA メチル化の異常はガン細胞やクローン個体で見つかっており、これらにおける異常の根幹である可能性が示唆されている。

発生過程で組織・時期特異的なゲノム DNA メチル化パターンが形成されることで、組織・時期特異的な遺伝子発現パターンが規定されると考えられる。一方、個々の遺伝子座に関する研究からは、必ずしもすべての遺伝子座がゲノム全体のメチル化量と同様の挙動を示すわけでは無いことも判明しているが、いずれにしても、形成されたゲノム DNA メチル化パターンはクロマチン構造と密接に関係し、その結果遺伝子発現様式が細胞分裂を繰り返しても失われることなく継承される。DNA メチル化パターンの変化を担う酵素として、これまでに 5 種類の DNA メチル化酵素 (Dnmt1、2、3a、3b、3l) が同定されている。このうち、Dnmt1 と Dnmt3b それぞれの欠損マウスは胚性致死を起こし、胚発生に DNA メチル化が必須であることが示されている。

Dnmt1 には、第一エクソンの使い分けにより作り出される 3 種類のアイソフォームが存在する。それらは、卵母細胞特異的に発現する Dnmt1o、pachytene 期精母細胞特異的な Dnmt1p、そして体細胞に広く見られる Dnmt1s である。本論文では、これらの Dnmt1 アイソフォームの発現もまた DNA メチル化によって制御されている可能性を検証するため、各アイソフォーム転写開始点上流域の DNA メチル化状態を、卵子・精子形成過程および着床前初期胚発生過程で解析した。

第 1 章

Dnmt1s と 1p の転写開始点はごく近傍に存在するが、それらを含む約 600 塩基長の領域は、CpG 配列の出現頻度がゲノムの他の領域に比べて非常に高い、いわゆる CpG アイランドと呼ばれる領域を形成している。この領域の CpG 配列は、C57BL/6 (B6) 系統マウスの肝臓、腎臓、精子、卵子および初期胚

において常に脱メチル化状態にあった。一方、Dnmt1o 上流域には CpG アイランドは存在しないが、卵子において特異的に脱メチル化状態にあるいくつかの CpG 配列の存在が確認された。これらに注目し初期発生の各ステージにおけるメチル化状態を詳細に解析した結果、これらの CpG 配列を含む領域は、発生過程でも変化する領域、すなわち T-DMR (tissue-dependently, differentially methylated region) であることが明らかとなった。ここで注目すべき点は、Dnmt1o T-DMR は、Dnmt1o の発現が認められる 1 細胞期胚、2 細胞期胚、および桑実胚では低メチル化状態にある一方で、その他の時期および ES 細胞を含む体細胞系列や精子では高メチル化状態にあること、さらに、解析した初期胚の各ステージで互いに異なるメチル化パターンを呈したことである。これは、Dnmt1o 遺伝子の発現がその上流域のメチル化によって制御されていること、および、そのメチル化パターンは初期胚の各ステージでは能動的なメチル化・脱メチル化により形成されていることを示唆しており興味深い。

マウス初期胚では、Dnmt1 タンパク質は細胞質中に存在し、8 細胞期にのみ一時的に核に移行する。一方、Dnmt3a と 3b の細胞内局在を免疫染色で見ると、Dnmt3a、3b 共に、あるいはそのどちらかが初期胚では常に核内に存在していた。また、Dnmt 欠損 ES 細胞を用いた解析では、Dnmt1、3a、3b それぞれの欠損 ES 細胞において異なるパターンで Dnmt1o T-DMR の低メチル化が認められた。さらに、Dnmt3a、3b の両方を欠損した ES 細胞ではこの領域のほぼ完全な脱メチル化が観察された。これらの結果から、Dnmt1、3a、3b のそれぞれが Dnmt1o T-DMR のメチル化の維持に働き、また、Dnmt3a、3b はこの領域の de novo メチル化においても協調的に働いていることが明らかになった。

第 2 章

前章の研究の過程で、卵子と初期胚においては、Dnmt1o T-DMR 中の CpG 配列以外 (non-CpG) のシトシンにもメチル化修飾が施されるという、予期せぬ発見があった。本章では、この non-CpG のメチル化について述べる。

まず初期胚の各ステージにおける non-CpG と CpG 配列のメチル化状態を比較すると、non-CpG のメチル化の変動が CpG 配列のメチル化の変化に常に先立って起こることが明らかになった。すなわち、初期胚のあるステージで non-CpG のメチル化が増加すると、次のステージで CpG 配列のメチル化が増加し、逆に non-CpG のメチル化が減少すると、次のステージで CpG 配列のメチル化が減少していた。これは、CpG 配列の de novo メチル化が non-CpG のメチル化状態に依存している可能性を示唆し、非常に興味深い。non-CpG のメチル化にはまた、生じやすい領域のあることも見出された。すなわち、Dnmt1o T-DMR を CpG 配列出現頻度の低い領域と高い領域に便宜上区分すると、前者では non-CpG のメチル化が高頻度で起こっているのに対し、後者ではほとんど見られない。Non-CpG のなかでも近年転写抑制に機能し得るとの報告がある CC(A/T)GG 配列のメチル化も同様で、CpG 配列の少ない領域でより高頻度のメチル化が見られた。このような non-CpG のメチル化を担う Dnmt が何かを明らかにするため、前章同様に各 Dnmt 欠損 ES 細胞における non-CpG のメチル化を解析したところ、Dnmt3a 欠損 ES 細胞を除く Dnmt 欠損 ES 細胞では CpA および CpT 配列のメチル化が依然として生じやすい傾向にあることが判明した。このことから、Dnmt1o T-DMR の non-CpG メチル化では、Dnmt3a が中心的役割を担っていることが示唆される。

本章ではまた、第 1 章で解析した B6 系統マウスにおける Dnmt1o T-DMR のメチル化パターンと他の系統マウス (ICR, Balb/c, C3H, DBA/2) におけるそれとの比較を行った。おもしろいことに、B6 系統マウスの CpG メチル化状態は着床前の各ステージ間で大きく変化するのに対し、ICR 系統マウスではその変化は限られていた。また、CC(A/T)GG 配列を含む non-CpG 配列のメチル化パターンにも系統間で差

が見られた。これらは、Dnmt1o T-DMR のメチル化状態と遺伝子発現が、遺伝的背景依存的な機構により制御されていることを示している。一方、CC(A/T)GG 配列のメチル化が CpG 配列の少ない領域において優先的に起こる点は各系統で共通であり、CC(A/T)GG 配列のメチル化制御に遺伝的背景によらない普遍的な分子機構が存在する可能性が推測される。

第3章

本章では、マイクロダイセクション法と微量 DNA メチル化解析法を駆使し、精子形成過程および卵形成過程にある生殖細胞における Dnmt1o T-DMR および Dnmt1s/1p 上流域のメチル化を解析した。成熟卵母細胞では Dnmt1o T-DMR は脱メチル化状態にあるが、発達段階にある卵母細胞（卵祖細胞、第1次卵母細胞、第2次卵母細胞）ではその一部がメチル化されていた。これとは対照的に、精子の Dnmt1o T-DMR 中の CpG 配列はほぼ完全にメチル化されている一方で、精子形成時期の精母細胞では脱メチル化状態にある CpG 配列が存在し、各ステージ特異的なメチル化パターンを呈した。また、精祖細胞と卵祖細胞におけるメチル化パターンはほぼ同一であった。

本章ではまた、前章で述べた non-CpG のメチル化頻度が、精子形成過程の精母細胞において一時的に上昇することを発見した。第1次および第2次卵母細胞では逆に non-CpG メチル化の頻度は低い。すなわち、精子・卵子形成過程では CpG 配列のメチル化と non-CpG のメチル化パターンに負の相関が認められた。また、ここでも non-CpG のメチル化は CpG 配列の少ない領域において優先的に起こっていた。これらのことから、non-CpG のメチル化は、CpG 配列の欠損またはメチル化 CpG の欠乏によって誘起される可能性が示唆された。

総括

本研究により、Dnmt1s/1p 転写開始点近傍には T-DMR が存在しないが、Dnmt1o は上流域に存在する T-DMR のメチル化によってその発現が制御される可能性が強く示唆された。特に、Dnmt1o T-DMR の卵母細胞や初期胚におけるメチル化は発生ステージ依存的であり、また、遺伝的背景依存的でもある。興味深いことに、Dnmt1o T-DMR では CpG 配列以外のシトシンにもメチル化が起こることを発見した。Non-CpG のメチル化もまた発生過程においてダイナミックに変動し、初期発生過程では CpG 配列のメチル化の変化に先立って変化していた。non-CpG のメチル化が CpG 配列の出現頻度が低い領域において優先的に起こっていることや、生殖細胞においては CpG がより低メチル化状態にある時期に起こっていることなどから、CpG 配列の欠損またはメチル化 CpG の欠乏によって non-CpG のメチル化が誘起される可能性が示唆された。Dnmt 欠損 ES 細胞を用いた解析により、このような Dnmt1o T-DMR のメチル化パターンの形成では Dnmt3a と 3b が協調的に働き、non-CpG のメチル化では特に Dnmt3a が中心的役割を担っていることが明らかになった。以上、DNA メチル化に中心的役割を果たす酵素の遺伝子自身が DNA メチル化によるエピジェネティック制御を受けていることが明らかになった。