

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高 應 圭

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。DNA のメチル化は転写因子の有無に関係なく遺伝子の不活性化を誘導することが知られており、発生や細胞の分化過程で DNA メチル化パターンが形成されることで、細胞特異的な遺伝子発現パターンが固定されると考えられる。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、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 メチル化を担う酵素として 5 種類の DNA メチル転移酵素 (Dnmt1、2、3a、3b、3l) が報告されている。Dnmt1 には、第 1 エクソンの異なった 3 種類のアイソフォームが存在する。それらは、卵母細胞に特異的な Dnmt1o、パキテン期精母細胞に特異的な Dnmt1p、そして体細胞に広く見られる Dnmt1s である。本論文はマウスの Dnmt1 アイソフォーム遺伝子の DNA メチル化によるエピジェネティック制御について研究したもので以下の 3 章から構成されている。

第 1 章では、マウス (C57BL/6 系統マウス) ゲノムを解析し、Dnmt1o 上流域には細胞・組織特異的にメチル化される領域 (T-DMR、tissue-dependently, differentially methylated region) が存在することを発見している。Dnmt1o の T-DMR は卵子では非メチル化状態にあり、体細胞では高度にメチル化されていた。初期発生の各ステージにおける T-DMR メチル化状態を解析した結果、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ていることが明らかになった。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。一方、Dnmt1s と Dnmt1p の 5' 上流域は細胞・発生時期を問わず、まったくメチル化されていなかった。免疫組織化学的手法による観察と各 Dnmt 欠損 ES 細胞株を用いた解析より、Dnmt3a あるいは Dnmt3b が Dnmt1 と協調的に Dnmt1o T-DMR のメチル化の維持に働くこと、このとき Dnmt3a と 3b はある程度互いに相補的に働いていることが明らかになった。

第 2 章では、卵子と初期胚において、Dnmt1o T-DMR では CpG 配列以外 (non-CpG) の配列でもシトシンがメチル化されていることが発見された。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。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。また、各 Dnmt 欠損 ES 細胞の解析で、non-CpG のメチル化では Dnmt3a が中心的役割を担っていることが示された。本章ではまた、C57BL/6 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 系マウスではその変化は限られていることも明らかにされた。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、Dnmt1o T-DMR のメチル化状態と遺伝子発現が、遺伝的背景により制御されていることを示唆している。

第3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おける Dnmt1o の T-DMR のメチル化状況が解析された。その結果、成熟卵母細胞では Dnmt1o T-DMR は非メチル化状態にあるが、卵祖細胞、第1次卵母細胞および第2次卵母細胞では部分的なメチル化があることが明らかになった。また、成熟精子では Dnmt1o T-DMR 中の CpG 配列はほぼ完全にメチル化されていたのに対し、精母細胞では脱メチル化状態にある CpG 配列が存在した。non-CpG のメチル化は精母細胞期に一時的に上昇し、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ことも発見している。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。

本研究により、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ていることが明らかにされた。Dnmt1o の T-DMR のメチル化は卵形成および初期発生の各時期にそれぞれ特異的なパターンを形成することも判明した。興味深いことに、Dnmt1o T-DMR では Non-CpG 配列のメチル化も高頻度に起こること、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ることも発見している。このように、DNA メチル化に中心的役割を果たす酵素自身が、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。これらの結果は、哺乳類の個体発生や生殖細胞形成機構に新たな概念を提供するもので、畜産領域や再生医療分野にも影響を与える発見である。以上、本論文は基礎獣医学、および、応用動物科学に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。