

## 論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 14 年度博士課程 進学

氏名 服部奈緒子

指導教官 塩田邦郎

**論文題目 Epigenetics of Pluripotency:  
DNA Methylation Controls Mouse *Oct-4* Gene Expression  
(分化多能性のエピジェネティクス:  
DNA メチル化によるマウス *Oct-4* 遺伝子の発現制御)**

### 序論

初期胚を構成する細胞は、様々な種類の細胞や組織に分化することのできる能力「分化多能性」を保有している。*In vitro* において、多能性を有する株化幹細胞である embryonic stem cell (ES 細胞) および embryonic germ cell (EG 細胞) が樹立された。これらの細胞の分化多能性は Oct-4 などのマスター因子によって特徴づけられている。Oct-4 は未受精卵、初期胚、始原生殖細胞、ES 細胞および EG 細胞で発現しており、全能性や多能性を有する細胞種において特異的な発現を示す。この様な発現パターンやノックアウトマウスの研究から、Oct-4 は細胞の多分化能の確立および維持に重要であると考えられている。現在までに、Oct-4 遺伝子の発現を制御している転写因子は数多く知られているが、Oct-4 遺伝子の細胞種および時期特異的な発現を規定している機構は未だ解明されていない。

エピジェネティクスとは「DNA の塩基配列の変化を伴わずに有糸分裂や減数分裂後も継承される遺伝子機能の変化を研究する学問領域」のことであり、その主要な分子機構として DNA メチル化およびヒストン修飾が知られている。DNA のメチル化は、哺乳類の細胞において主に CpG 配列のシトシン残基に起こり、細胞種および組織特異的な遺

伝子発現制御、細胞分化、腫瘍形成など様々な生命現象に関与している。一方、コアヒストンタンパク質 N 末端のヒストンテイルは、アセチル化やメチル化などの修飾を受け、クロマチンの構造変換を介した遺伝子発現制御を担っている。最近、ゲノム DNA 上には非常に多くの DNA メチル化可変領域が存在し、細胞によって特有の DNA メチル化プロファイルを形成していることが明らかとなった。また、DNA メチル化とヒストン修飾の相互作用の研究は、エピジェネティクス分野において、近年最も興味深いもののひとつである。

本研究では、*Oct-4* 遺伝子の発現がエピジェネティック機構によって制御されているのではないかという仮説のもと、*Oct-4* 遺伝子上流域の DNA メチル化およびヒストン修飾の状態を解析した。

## 第 1 章

マウス *Oct-4* 遺伝子は、胚盤胞期胚内部細胞塊由来の ES 細胞では発現しているが、栄養膜細胞由来の trophoblast stem cell (TS 細胞)、繊維芽細胞系である NIH/3T3 細胞および成体肝臓では発現していない。*Oct-4* 遺伝子発現へのエピジェネティック制御の関与を調べるために、DNA メチル基転移酵素の阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) およびヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である trichostatin A (TSA) の添加実験を行った。TS 細胞では、5-aza-dC または TSA 単独処理によって *Oct-4* 発現が誘導された。一方、NIH/3T3 細胞ではそれらの単独処理では発現は検出されず、混合処理によって微量の *Oct-4* 発現が誘導された。これらの結果から、*Oct-4* 遺伝子の発現はエピジェネティック機構によって制御されている可能性が示され、また、そのエピジェネティック制御の組合せは細胞の種類によって異なることが推測された。

ES 細胞、TS 細胞および成体肝臓における *Oct-4* 遺伝子上流域の DNA メチル化状態を解析した結果、ES 細胞では低メチル化状態、TS 細胞と肝臓では高メチル化状態であった。さらにレポーターアッセイから、*Oct-4* 遺伝子上流域の転写活性化能は *in vitro* CpG メチル化によって抑制されることがわかった。次に DNA メチル基転移酵素 1 の変異マウス胚を用いて *Oct-4* 発現を解析したところ、胎盤において異所的な発現が検出され、このとき *Oct-4* 遺伝子上流域の DNA は脱メチル化されていることが明らかとなった。これらの結果から、*Oct-4* 遺伝子発現は *in vitro*、*in vivo* において DNA メチル化によって制御されていることが示された。

TSA 添加実験から、TS 細胞における *Oct-4* 遺伝子発現制御へのヒストンアセチル化の関与が示唆されたので、クロマチン免疫沈降法を用いてヒストンアセチル化状態を解析した。その結果、*Oct-4* 遺伝子上流域のヒストンは、ES 細胞において高度にアセチル化

されており、一方 TS 細胞においてはアセチル化されていないことが示された。このことから、TS 細胞における *Oct-4* 遺伝子の発現抑制は、DNA メチル化とヒストン脱アセチル化の相互作用によるクロマチン凝縮が原因であることがわかった。

本章から、*Oct-4* 遺伝子の細胞種および時期特異的な発現は、DNA メチル化とクロマチン構造の変化というエピジェネティック機構によって制御されていることが明らかとなった。また、*Oct-4* 遺伝子の発現制御には細胞の種類によって異なるヒストン修飾の組合せが関与していることが示唆された。

## 第 2 章

ヒストン修飾にはアセチル化やメチル化などが知られており、遺伝子発現のエピジェネティック制御機構として機能している。ヒストンアセチル化とヒストン H3-リシン (K) 4 のメチル化は遺伝子発現の活性化に関与し、ヒストン脱アセチル化と H3-K9 および K27 のメチル化は不活性化に関与している。第 1 章の結果から、*Oct-4* 遺伝子の発現制御には細胞の種類によって異なるエピジェネティック機構の組合せが関与していると考えられた。そこで本章では、ES 細胞を培養下で分化誘導させた場合の *Oct-4* 遺伝子領域における DNA メチル化と上記のヒストン修飾状態の変化を解析した。

*Oct-4* の発現は体細胞では抑制されている。しかし興味深いことに、ES 細胞の培養系から leukemia inhibitory factor とフィーダー細胞を除去するのみで分化を誘導させた場合、ES 細胞における *Oct-4* の発現は抑制されることなく維持されることが明らかとなった。一方、レチノイン酸 (RA) を添加した場合、ES 細胞の分化誘導に伴い *Oct-4* の発現抑制が観察された。すなわち、RA 処理による一定方向への分化誘導時のみで、*Oct-4* の発現が抑制されるのである。RA で 48 時間あるいは 72 時間処理した ES 細胞から RA を除去し、さらに 72 時間培養したところ、48 時間 RA 処理においては *Oct-4* の発現が回復するが、72 時間処理では回復が観察されなかった。このことから、72 時間 RA 処理によって *Oct-4* の発現抑制は不可逆的となり、*Oct-4* 遺伝子領域のクロマチンを凝縮させるエピジェネティック状態が確立したと考えられた。

24 時間から 72 時間 RA 処理した ES 細胞、および RA 未処理で同期間培養した ES 細胞における DNA メチル化状態を解析したところ、RA 処理の場合のみで処理時間に伴ったメチル化状態の上昇がみられた。クロマチン免疫沈降法を用いて *Oct-4* 遺伝子領域におけるヒストン修飾の状態を解析したところ、RA 処理においてのみ、ヒストン脱アセチル化および H3-K4 脱メチル化が検出された。特に RA 処理 72 時間の ES 細胞では、完全なヒストン脱アセチル化および H3-K4 脱メチル化が観察された。一方、予想に反して、未処理 ES 細胞と同様に RA 処理 ES 細胞においても H3-K9 および K27 のメチル化状態の変化

は見られず、これらのヒストン修飾は RA 処理による *Oct-4* 発現の抑制に関与していないことが示された。この結果は、H3-K9・K27 メチル化酵素である G9a の欠損 ES 細胞においても、RA 添加による *Oct-4* 発現の抑制が観察されたことから支持された。このことから、RA 処理によって *Oct-4* 遺伝子上流域の DNA メチル化、ヒストン脱アセチル化、H3-K4 脱メチル化が誘導された結果、クロマチンが凝縮し、*Oct-4* の発現が抑制されたことが明らかとなった。

興味深いことに、NIH/3T3 細胞のみで *Oct-4* 遺伝子上流域の H3-K27 の高メチル化状態が観察された。ヒストン脱アセチル化および H3-K4 脱メチル化は TS 細胞と NIH/3T3 細胞においても観察されたが、H3-K9 のメチル化は検出されなかった。

このことから、*Oct-4* 遺伝子発現制御において、RA 処理 ES 細胞と TS 細胞では、DNA メチル化、ヒストン脱アセチル化、H3-K4 脱メチル化というエピジェネティック機構が関与しており、NIH/3T3 細胞ではさらに H3-K27 のメチル化が関与していることが示された。本章から、*Oct-4* 遺伝子上流域におけるヒストン修飾状態の組合せは細胞の種類によって異なっていることが明らかとなった。

## 総括

本研究から、マウス *Oct-4* 遺伝子の発現が、DNA メチル化とヒストン修飾からなるエピジェネティック機構によって制御されていることがはじめて明らかとなった。さらに、そのエピジェネティック機構の組合せが細胞の種類によって異なっているという極めて興味深い結果が得られた。つまり、未分化 ES 細胞では DNA は低メチル化状態であり、*Oct-4* 遺伝子領域は弛緩したクロマチン構造を有するが、RA により分化の方向付けが成されると、DNA 高メチル化と抑制的なヒストン修飾によりクロマチンは凝縮し、*Oct-4* の発現は完全に阻止されるのである。同様に、分化した体細胞でも *Oct-4* 遺伝子は不活性化されており、DNA も高メチル化状態であるが、ヒストン修飾状態がさらに変化して行くのである。

従来、ヒストン修飾による遺伝子発現制御機構は、ヒストンアセチル化や H3-K4 メチル化によって生じたクロマチン構造の弛緩が遺伝子の活性化を誘導し、逆にヒストン脱アセチル化や H3-K9・K27 メチル化によるクロマチン構造の凝縮が遺伝子を不活性化すると考えられてきた。しかし、マウス *Oct-4* 遺伝子の発現抑制は、胚発生の最初に生じた分化細胞と後期で生じた分化細胞、RA により誘導された分化細胞において、それぞれ異なる組み合わせのヒストン修飾と、共通の DNA メチル化というエピジェネティック機構によって制御されているのである。本研究は、細胞の分化多能性へのエピジェネティックの関与を明らかにしたばかりでなく、細胞の分化に新しい概念を与えるものである。