

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 服部 奈緒子

初期胚の分化多能性は初期胚特有の遺伝子発現(群)により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、分化多能性の発揮・維持に重要な転写因子である。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・発生時期特異的な発現制御機構は解明されていない。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」を意味し、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考えられている。本研究は、Oct-4 遺伝子発現のエピジェネティック機構について研究したもので、以下の 2 章より構成されている。

第1章では、Oct-4 遺伝子が、はたしてエピジェネティック制御を受けているのか否かを解析している。マウス Oct-4 遺伝子は胚性幹細胞(ES 細胞)では発現しているが、栄養膜細胞由来の栄養膜幹細胞(TS 細胞)、NIH/3T3 細胞および肝臓では発現していない。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。したがって、Oct-4 遺伝子発現は DNA メチル化によって制御されていることが明らかになった。この発見は、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) の添加実験からも確認された。すなわち、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。クロマチン免疫沈降法を用いて ES 細胞および TS 細胞のヒストンアセチル化状態を解析した結果、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。

一方、NIH/3T3 細胞では 5-aza-dC あるいは TSA 単独処理では発現抑制は解除されず、両者の併用処理によってのみ Oct-4 発現が誘導された。この結果は、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ことを支持し、ヒストン修飾は細胞の種類によって多段階であり、抑制の程度は異なることが推測された。

第2章では、Oct-4 遺伝子領域のヒストン修飾について、ES 細胞の分化誘導系および TS 細胞、NIH/3T3 細胞におけるヒストン修飾を解析している。ヒストンメチル化修飾は、ヒストン H3 の 4 番目のリシン(H3K4)のメチル化と 9 番目のリシン(H3K9)および 27 番目のリシン(H3K27)に起こることが知られている。H3K4 メチル化は遺伝子発現の活性化に働き、ヒストン脱アセチル化と H3K9 および H3K27 のメチル化は不活性化に関与しているとされている。レ

チノイン酸(RA)存在下で分化を誘導し Oct-4 の発現抑制が観察された状態では、ヒストンが脱アセチル化かつ H3K4 が低メチル化状態になっていることが明らかになった。しかし、興味深いことに、H3K9 および H3K27 のメチル化状態は低く、分化前後で変化しないことが明らかになった。一方、NIH/3T3 細胞では、Oct-4 遺伝子の H3K27 は高メチル化状態であり、他の細胞(分化処理後の ES 細胞、TS 細胞)と大きく異なっていることが発見された。

これらの結果は、細胞の種類によりクロマチン側の制御機構が異なることを意味する。また、これらの細胞ではいずれも DNA は高メチル化となるので、様々なクロマチン修飾の変化はゲノムワイドの DNA メチル化を指標として捕らえることが可能であることを示唆している。

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。本研究成果は、Oct-4 遺伝子領域の解析を通じて細胞の分化多能性へのエピジェネティック制御系の関与を明らかにしたもので基礎生物学として重要であるばかりでなく、発生生殖学や再生医療を目指した応用研究にも重要な知見となった。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。