

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：富川順子
指導教官：塩田邦郎

論文題目：

栄養膜幹細胞の分化に伴う遺伝子発現のエピジェネティック制御に関する研究

緒言

個体は多様に分化した約200種類の細胞から構成されており、それらの細胞では、共通のゲノムDNAからそれぞれの細胞種に特異的な遺伝子セットが選択的に発現あるいは抑制されている。こうした細胞種特異的な発現遺伝子セットは個体発生過程における細胞分化を経て確立され、細胞分裂後もその娘細胞へと忠実に継承される。そこには細胞分裂を経ても伝達される遺伝子発現調節機構、すなわちエピジェネティック制御機構が関与している。

エピジェネティック機構のひとつであるDNAメチル化はDNAを直接化学修飾する唯一の機構であり、哺乳類では主に5'-CG-3'配列(CpG)のシトシン残基に起こる。一般に、DNAメチル化は転写因子の結合を阻害するか、あるいはクロマチンの凝縮を誘起することで近傍に位置する遺伝子の発現抑制に関与する。近年、哺乳類細胞を用いたCpGアイランドを対象としたゲノムワイドな解析から、細胞種特異的にメチル化されるCpG配列が多数存在することが明らかになった。CpGアイランドが主に遺伝子のプロモーター領域に分布していることを考え合わせると、発生過程において形成されたDNAメチル化パターンがクロマチン構造と密接に関連し合いながら発現遺伝子セットを決定し、細胞の分化形質の規定に関わっている可能性が考えられる。したがって、分化に伴ったエピジェネティック制御を受ける遺伝子のゲノム構造等の解析は、細胞の分化に携わる分子機構を理解するための一助となると思われる。

こうした分化に伴ったエピジェネティック変化を解析する材料として、本研究では栄養膜幹細胞(TS細胞)を用いた。栄養膜細胞は哺乳類の発生過程において最初に分化する細胞系列であり、胚盤胞の外層を構成する栄養外胚葉として出現する。その後、胎盤の形成にのみ寄与し、胚体側のいずれの体細胞あるいは生殖細胞へも分化することはない。マウス胚盤胞から樹立されたTS細胞はこの栄養膜細胞の性質をよく保持しており、培養下においてその分化を再現することも可能である。したがって、TS細胞は哺乳類の栄養膜細胞系列の分化における遺伝子発現の解析に非常に有用なツール

であるといえる。

以上を背景に、本研究では DNA メチル化をはじめとするエピジェネティック修飾が TS 細胞の分化に伴いどのように変化しているのか、いくつかの遺伝子座を対象に解析を試みた。

第 1 章

Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (Ddah1)、Ddah2 および Cytochrome P450 1a1 (Cyp1a1) の 3 種類の遺伝子は、それぞれ TS 細胞の分化状態に依存した発現パターンを示す遺伝子である。Ddah1 は未分化条件 TS 細胞において特異的に発現し、Ddah2 は Ddah1 と対照的に分化に伴った著しい発現増加を示した。Cyp1a1 は分化状態に関わらず、TS 細胞においてはほとんど発現していないが、benzo(a)pyrene (BaP) への暴露により発現が活性化された。しかし、BaP による発現誘導は分化した TS 細胞においてのみ認められ、細胞の分化に伴って Cyp1a1 の発現誘導性が大きく変化することが明らかになった。こうした分化状態依存的な発現パターンを示す遺伝子群の発現制御に DNA メチル化、ヒストンアセチル化を含むエピジェネティック機構が関与する可能性を検討するため、細胞を DNA メチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (AzaC) およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 Trichostatin A (TSA) で処理したところ、それぞれの遺伝子で発現抑制の解除が観察された (表 1)。

Gene		Non-treat	AzaC	TSA	AzaC+TSA
Ddah1	diff	-	-	+	+
Ddah2	undiff	±	++	++	+++
Cyp1a1	undiff	-	-	++	++
	diff	-	++	+++	+++

表 1 AzaC および TSA 処理による遺伝子発現の変化

このことから、種々の遺伝子座における DNA メチル化およびクロマチン構造は TS 細胞の分化状態依存的に遺伝子の発現制御に関与している可能性が示唆された。

第 2 章

第 1 節では Ddah2 遺伝子に焦点をあて、遺伝子上流域のメチル化状態の解析を行った。その結果、Ddah2 遺伝子上流域には、TS 細胞の分化に伴いメチル化状態の変化するメチル化可変領域 (Tissue- and stage-dependent differentially methylated region: T-DMR) が存在し、Ddah2 の発現と T-DMR のメチル化とが負の相関関係を示すことが明らかになった。さらに、T-DMR では DNA メチル化と同調したヒストン H3、H4 の脱アセチル化、ヒストン H3 の 4 番目のリジン (H3K4) のメチル化および H3K9 の脱

メチル化が観察され、DNA メチル化および種々のヒストン修飾をといたエピジェネティックな分子機構が、栄養膜細胞における分化依存的な Ddah2 遺伝子の発現を制御している可能性を強く示唆した。

第2節では、第1節において発見された Ddah2 T-DMR でみられる急激な脱メチル化反応に注目し、能動的脱メチル化機構の関与について検討した。Aphidicolin 処理によって DNA 合成を阻害した条件においても、分化に伴って未処理条件と同程度の脱メチル化が観察されたことから、分化に伴って誘導された DNA 脱メチル化は、DNA 複製に非依存的な反応によるものである可能性が示唆された。

第3章

本章では、Ddah1 遺伝子に焦点をあて、遺伝子上流域のメチル化状態およびヒストン修飾状態を解析した。その結果、Ddah1 遺伝子上流域は TS 細胞の分化状態に関わりなく常に低メチル化状態であることが明らかになった。H3K4 および H3K9 のメチル化状態にも変化はなく、唯一、ヒストンのアセチル化状態に分化に伴った低下がみとめられた。この Ddah1 プロモーターにおけるヒストンのアセチル化状態と Ddah1 の発現とは正の相関関係がみとめられることや、第1章での AzaC および TSA による発現誘導実験の結果から、Ddah1 遺伝子の発現は、DNA メチル化に依存しない、ヒストンのアセチル化状態に基づいたクロマチン構造の変化により制御されている可能性が示唆された。

第4章

本章では Cyp1a1 遺伝子に焦点をあて、第1章でみられた、TS 細胞における分化状態依存的な BaP による Cyp1a1 の発現誘導に対するエピジェネティック制御機構の関与について検討した。Cyp1a1 遺伝子上流域のメチル化状態を解析したところ、TS 細胞の分化に伴ってメチル化状態の変化する T-DMR が発見された。しかし、Cyp1a1 T-DMR のメチル化と Cyp1a1 の誘導的発現との間には正の相関性があり、BaP による活性化が可能な分化後の方がより抑制された状態であることが明らかになった。さらに、Cyp1a1 T-DMR におけるヒストンの修飾状態を解析したところ、TS 細胞の分化に伴い、H3K4 メチル化の低下および H3K9 メチル化の亢進がみられた。また、未分化、分化状態を通じて H3、H4 はともに低アセチル化状態であったことから、Cyp1a1 T-DMR における DNA メチル化および一連のヒストン修飾は、TS 細胞の分化に伴ってともに発現抑制型の修飾状態へと移行することが明らかになった。これは BaP に対する反応から考えると相反した傾向にあり、未分化状態の TS 細胞において特異的に Cyp1a1 の発現を抑える機構の存在が示唆された。Cyp1a1 の発現は Arylhydrocarbon receptor (AhR) および AhR nuclear translocator (Arnt) を介して活性化される。そこで TS 細胞でのこれら

の発現状態を解析したところ、Arnt が分化状態に関わらず一様に発現しているのに対し、AhR は2つのタイプが異なる発現パターンを示した。一方は Arnt と同様に低レベルながら一様に発現しており、もう一方の発現は分化に伴って増加していた。両者は同じタンパクコード領域を有することから、TS 細胞内では分化に伴い機能的 AhR 量が増加すると考えられる。したがって、増加した AhR により外来因子に対する感受性が増し、Cyp1a1 の発現誘導に影響した可能性が考えられた。

総括

TS 細胞の分化に伴い、ゲノム上の遺伝子領域でクロマチン構造が大きく変化していることが示唆された。その変化は遺伝子ごとに多様性があるものの、こうした局所的なエピジェネティック修飾の変化が多くのゲノム領域において起こることによって細胞種固有のクロマチン構造を構築し、細胞種特異的な発現遺伝子決定の基盤として細胞の分化方向の規定に影響しているものと考えられる。

一般に、より未分化な細胞ほどゲノム全体でのメチル化量は低く、分化の進行とともにメチル化量は増加すると考えられてきた。しかし、本研究から、各遺伝子領域において細胞の分化に伴って起こる DNA メチル化の変化は決して一様なものではなく、正負両方向性のものであることが示された。すなわち、細胞の分化能は単純にゲノム全体のメチル化量に依存したものではなく、遺伝子領域ごとにより複雑な制御が行われていると考えられる。Ddah2 T-DMR の形成において能動的脱メチル化機構の関与が示唆されたこともこれを支持する。

本研究ではさらに、DNA メチル化とヒストンメチル化の間には関連性がみとめられた。Ddah2 および Cyp1a1 において、AzaC 処理によりメチル化状態が緩和されるのに伴って遺伝子発現が活性化されたことは、DNA メチル化のヒストンメチル化に対する優位性を示唆していると考えられる。傾向として、メチル化されたゲノム領域ではヒストンの脱アセチル化、H3K9 のメチル化が誘起され、H3K4 のメチル化は阻害されていた。以上のことから、DNA メチル化はヒストン修飾パターンを形成する標識として機能している可能性が示唆された。したがって、DNA メチル化が種々のヒストン修飾に影響することによってクロマチン構造の変化を誘起し、さらにこれらの変化が種々の遺伝子発現に影響している可能性が考えられた。