

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 富川 順子

哺乳類の個体を構成する約 200 種類の細胞は、ゲノム DNA の塩基配列は共通しているにも関わらず、細胞の種類に特徴的な遺伝子群の発現が抑制されている。発現が許される(あるいは抑制される)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。DNA メチル化は正常細胞で見られる唯一の化学修飾である。また、DNA メチル化とクロマチン構造変化は関連しており、遺伝子の発現が抑制される方向に働くことが多い。DNA メチル化は哺乳類では主に 5'-CG-3' 配列 (CpG) のシトシン残基に起こる。クロマチン構造はヒストンの修飾により制御されている。

哺乳類胚の発生において最初に分化する細胞系列は、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栄養膜幹細胞 (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、哺乳類の発生のエピジェネティクスを研究する最も興味深い細胞の一つである。本研究では TS 細胞の分化に伴うエピジェネティック制御を研究したもので、以下の4章よりなる。

第1章では、3種類の遺伝子 [Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (Ddah1)、Ddah2 および Cytochrome P450 1a1 (Cyp1a1)]が、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ことを示している。すなわち、Ddah1 は未分化の TS 細胞に特異的に発現し、逆に、Ddah2 は分化に伴い発現は増加した。一方、Cyp1a1 は分化状態に関わらずほとんど発現していないが、benzo(a)pyrene (BaP) への暴露により分化した TS 細胞においてのみ発現が誘導された。TS 細胞を DNA メチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (AzaC)あるいは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、それぞれの遺伝子は発現抑制の解除が観察された。しかし、抑制解除の程度は大きく異なり、エピジェネティック制御機構が、遺伝子領域に必ずしも同一でないことが示唆された。

第2章では、Ddah2 遺伝子上流域のメチル化状態が解析された。その結果、Ddah2 遺伝子上流域にはメチル化可変領域 (Tissue- and stage-dependent differentially methylated region: T-DMR) が存在すること、分化に伴い T-DMR は脱メチル化することが明らかになり、Ddah2 遺伝子発現制御に DNA メチル化が関与していることが示唆された。しかも、Ddah2 遺伝子の T-DMR のメチル化低下と同調して、ヒストン H3、H4 のアセチル化、ヒストン H3 の4番目のリジン (H3K4) のメチル化および H3K9 の脱メチル化が起きていることが明らかになった。さらに興味深いことに、Ddah2 T-DMR でみられる脱メチル化は急激で(分化開始後 48 時間以内に起こる)に注目し、Aphidicolin 処理による DNA 合成阻害時での解析を行い、能動的脱メチル化機構の関与が示唆された。

第3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が解析された。Ddah1 遺伝子上流域は TS 細胞の分化状態に関わりなく常に非メチル化状態であること、H3K4 および H3K9 のメチル化状態にも変化はないことが明らかになった。ところが、ヒストンのアセチル化状態は分化に伴い明らかに低下していることが明らかになった。Ddah1 遺伝子発現は、DNA メチル化に依存せず、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ことが明らかになった。

第4章では Cyp1a1 遺伝子上流域のメチル化状態が解析された。その結果、TS 細胞の分化に伴ってメチル化状態の変化する T-DMR が発見されたが、BaP による Cyp1a1 の発現誘導が見られる分化後の TS 細胞では、Cyp1a1 T-DMR のメチル化は亢進していた。またこの時、H3K4 メチル化は低下し、H3K9 メチル化は亢進していた。しかも、分化状態を通じてヒストンは H3、H4 ともに低アセチル化状態であった。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クロマチン凝縮の方向に変化するが、Cyp1a1 遺伝子発現の誘導はエピジェネティック系による直接の影響を受けないのである。さて、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。TS 細胞では、Arnt は分化状態に関わらず低い一定の発現を示した。興味深いことに、AhR の2つのタイプ (AhRI および AhRII) のうち、AhRII は低レベルながら一様に発現しており、AhRI 発現は分化に伴って増加していることが明らかになった。したがって、AhRI がエピジェネティック系で制御されている可能性が示唆された。

本研究から、TS 細胞の分化に伴い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された。また、エピジェネティクス変化の生物学的意義は遺伝子領域において異なり、正負両方向性の場合も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結論できる。さらに、能動的脱メチル化が Ddah2 T-DMR で起きていることが示唆されたことは DNA メチル化制御機能の基礎として重要な知見である。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。