

論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻

平成15年度博士課程 進学

氏 名 阿部 徹也

指導教諭 塩田 邦郎

論文題目 DNAメチル基転移酵素欠損ES細胞におけるエピジェネティック修飾と遺伝子発現
の変化

DNAの配列変化を伴わずに細胞世代を越えて伝達される遺伝子の発現制御はエピジェネティック機構とよばれ、DNAメチル化やヒストン修飾がエピジェネティック機構の主役となる。DNAメチル化はDNAメチル基転移酵素(Dnmt)によって行われる。ほ乳類では、Dnmt1がDNA複製においてメチル化パターンを維持する維持型メチル基転移酵素、Dnmt3a/3bが非メチル化DNAを新たにメチル化する新規型メチル基転移酵素であると考えられてきた。一方ヒストン修飾は、各ヒストンタンパクのアミノ末端側にある特定のアミノ酸残基がメチル化、アセチル化やリン酸化といった様々な化学修飾を受けることが知られている。DNAメチル化とヒストン修飾が遺伝子発現調節にどのように関わるかについてこれまでに多数の研究がなされている。しかし、DNAメチル化とヒストン修飾は相互に影響を与え合うのか、あるいは遺伝子の発現制御機構におけるDNAメチル化とヒストン修飾のヒエラルキーは存在するのか、といった問題については未解決である。本研究ではDnmt欠損ES細胞やヒストン修飾酵素欠損ES細胞を用いた、遺伝子領域におけるDNAメチル化機構と遺伝子発現調節に与えるDNAメチル化とヒストン修飾との相互作用の解明を行った。

第1章 DNA メチル基転移酵素欠損によるゲノムワイド DNA メチル化の変化

Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法は、一度にゲノムワイドの約 1,500 遺伝子座の DNA メチル化状態を解析することが可能であり、Not I をランドマーク酵素とすることで、遺伝子の転写調節領域に存在する CpG アイランドの解析を行うことが可能である。野性型、Dnmt1 欠損、Dnmt3a 欠損、Dnmt3b 欠損、Dnmt3a/3b 両欠損の各 ES 細胞のゲノム DNA を RLGS 法で解析したところ、Dnmt1 欠損 ES 細胞では野性型に比べて 236 遺伝子座が脱メチル化されていることが明らかになった。ここで新たに発見された 236 の遺伝子領域の存在は、ゲノムには通常メチル化されている CpG アイランドが多数存在することを示唆している。興味深いことに、これらの 236 遺伝子座は Dnmt3a/3b 両欠損 ES 細胞でも脱メチル化されており、Dnmt3a/3b もまた遺伝子領域では DNA メチル化の維持に関わっていることが本研究ではじめて明らかにされた。しかも、これらの遺伝子領域における脱メチル化は Dnmt1 欠損 ES 細胞では不完全であったのに対し、Dnmt3a/3b 両欠損 ES 細胞ではほぼ完全に脱メチル化されていた。一方、反復配列における DNA 脱メチル化の度合いは、Dnmt3a/3b 両欠損に比べて Dnmt1 欠損でより進行していた。これまで Dnmt は *in vitro* の酵素活性に基づいて維持型、新規型メチル化酵素と分類されてきたが、以上の結果をふまえると細胞内での Dnmt の作用についてはこの分類は妥当ではない。本研究により、Dnmt1 は反復配列の DNA メチル化により重要であるのに対して、遺伝子領域の DNA メチル化には Dnmt3a/3b が Dnmt1 に比べてよりも重要な役割を有することが明らかになった。

第2章 遺伝子発現制御における DNA メチル化とヒストン修飾の相互関係

Dnmt 欠損により脱メチル化されることが明らかになった 236 遺伝子座のうち、特に遺伝子上流に位置する領域について DNA メチル化状態と遺伝子発現との関連を調べた。その中で transforming growth factor beta-induced (Tgfb β) は DNA 脱メチル化に伴い発現が誘導される領域として同定された。DNA メチル化阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine で野性型 ES 細胞を処理することによっても発現が誘導されたことから、Tgfb β は DNA メチル化により遺伝子発現が制御されていることが示された。Dnmt3a/3b 両欠損による DNA 脱メチル化によって Tgfb β の発現が誘導されたとき、ヒストン修飾はどのように変化するかを調べるため、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法によるヒストン H3 リジン 4 (H3K4) ジメチル化、トリメチル化の解析を行った。その結果、Tgfb β 遺伝子領域では Dnmt3a/3b 両欠損 ES 細胞においては H3K4 メチル化が亢進していることが明らかになった。H3K4 のメチル化は遺伝子発現の活発化と関連していることが知られており、本結果により、DNA 脱メチル化は H3K4 メチル化を誘起し、遺伝子発現を促進する経路の

存在が推察された。さて、ほ乳類において H3K4 メチル化に関わる酵素は複数明らかにされているが、それぞれどの酵素がどのような遺伝子領域で機能するかといった体系的な知見はこれまでに得られていない。そこで、ドメイン構造を元にして予測したヒストンメチル化酵素活性を有する可能性のある複数の遺伝子を Dnmt3/3b 両欠損 ES 細胞においてノックダウンし、それぞれの Tgfbi の遺伝子発現への影響を調べた。Small interfering RNA (siRNA) によるノックダウンを行うと、mixed-lineage leukemia (MLL)、BC035291、ecotropic viral integration site 1 (Evi1)、retinoblastoma protein interacting zinc finger protein (Riz) の siRNA の導入によって Tgfbi の遺伝子発現の減少が誘導された。したがって、Tgfbi 遺伝子の発現解析により、DNA 脱メチル化によって H3K4 メチル化活性が増加する経路の存在が示唆された。逆に、B lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp1) /PR domain containing protein (Prdm1) によるノックダウンでは Tgfbi の発現増加がみられ、DNA メチル化によるヒストン H3K4 メチル化系はさらに複雑であることも示された。

次に、H3 リジン 9 (H3K9) ジメチル化、トリメチル化、H3 リジン 27 (H3K27) ジメチル化、H3 アセチル化について ChIP 法により解析すると、Dnmt3a/3b 両欠損による Tgfbi 遺伝子領域の修飾状態の変化は、野性型 ES 細胞に比べ H3K9、H3K27 は高メチル化、H3、H4 は低アセチル化状態になることが明らかになった。これまで H3 アセチル化は遺伝子発現をしているクロマチンの弛緩した領域で、H3K9、H3K27 のメチル化は遺伝子発現の抑制されたクロマチンの凝集した領域で主に観察されており、Dnmt3a/3b 両欠損 ES 細胞の Tgfbi 遺伝子領域の結果はこれと異なる。Dnmt 欠損による DNA 脱メチル化によって引き起こされたことから、これらのヒストン修飾の変化は DNA メチル化を介して遺伝子発現を制御する、より上位のシグナルとして機能しており、Dnmt3a/3b 両欠損 ES 細胞において Tgfbi 遺伝子領域の DNA メチル化を回復させようとしているのかもしれない。H3K9、H3K27 メチル化酵素である G9a の欠損 ES 細胞を解析したところ、Tgfbi 遺伝子領域において H3K9 脱メチル化のみが誘導されることを ChIP 法により確認した。しかしこのとき、G9a 欠損 ES 細胞では野性型と同様に DNA 高メチル化状態が維持されていたことから、H3K9 脱メチル化単独では DNA 脱メチル化のシグナルとはならないことが示された。そこでさらに、野性型と G9a 欠損 ES 細胞の両方をヒストン脱アセチル化阻害剤である Trichostatin A (TSA) によって処理してヒストンアセチル化を誘導したところ、野性型 ES 細胞では Tgfbi 遺伝子領域の DNA 高メチル化状態が維持されていたのに対し、G9a 欠損 ES 細胞では DNA 脱メチル化が誘導されることが明らかになった。これらのことから、少なくとも H3K9 メチル化や H3 アセチル化といった単独のヒストン修飾の変化だけでは不十分ではあるものの、これら複数のヒストン修飾状態の変化の組み合わせが、DNA メチル化 / 脱メチル化を誘導していることが示唆された。

以上の結果から、少なくとも特定の遺伝子領域における遺伝子発現のエピジェネティック制御では、H3K9、H3K27 メチル化と H3 アセチル化によるシグナルが上位にあり、DNA メチル化を介して H3K4 メチル化を変えることによって遺伝子発現を調節するモデルが導き出された。

本研究によって、遺伝子発現のエピジェネティック制御においては、DNA メチル化とヒストン修飾が複数の酵素活性によって複雑かつ特異的な制御を受けること、また DNA メチル化とヒストン修飾は互いに影響を与え合い、協調して機能することが明らかになった。