

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 阿部 徹也

哺乳類の発生や細胞分化の分子基盤として、DNA メチル化を中心としたエピジェネティクス情報が明らかになりつつある。これまでに、ゲノムには DNA メチル化により不活性化される領域が多数存在していること、それらのメチル化状態は細胞の種類により異なり、メチル化と非メチル化領域の組み合わせは膨大であることが報告されている。本論文は、細胞特異的な DNA メチル化プロフィールが形成される機構に焦点を当て解析したのもので、以下の 2 章より構成されている。

第 1 章では DNA メチル基転移酵素 (Dnmt) を欠損した胚性幹細胞 (ES 細胞) における DNA メチル化状況について、ゲノムワイドに解析している。酵素活性が確認された Dnmt には、維持型酵素とされる Dnmt1 に加え、新規にメチル基を導入する Dnmt3a および Dnmt3b が知られている。Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法は、一度に約 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、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ゲノムワイドに行うことができる。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 法で解析することにより Dnmt1 欠損 ES 細胞で 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。また、Dnmt3a/3b 両欠損 ES 細胞でも上記の 236 遺伝子座が脱メチル化されていた。つまり、Dnmt1 と Dnmt3a/3b はまったく同じゲノム領域を標的にしていることになる。興味深いことに、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 脱メチル化は、Dnmt3a/3b 両欠損に比べて Dnmt1 欠損でより著明であった。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 に比べてより重要な役割を有することが明らかになった。

第 2 章では、第 1 章で検出された遺伝子座に注目し、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が解析された。まず Dnmt の標的として、第 1 章の結果をもとに transforming growth factor beta-induced (Tgfb β) 遺伝子が同定された。同遺伝子は、DNA 脱メチル化に伴い発現が誘導された。クロマチン免疫沈降法によるヒストン H3 リジン 4 (H3K4) ジメチル化、トリメチル化の解析が行われ、Tgfb β 遺伝子領域では Dnmt3a/3b 両欠損 ES 細胞においても H3K4 メチル化は亢進していることが明らかになった。siRNA により、mixed-lineage leukemia (MLL)、BC035291、ecotropic viral integration site 1 (Evi1)、retinoblastoma protein interacting zinc finger protein (Riz) の発現をそれぞれ阻害すると、Tgfb β の遺伝子発現も減少することが示された。従って、DNA 脱メチル化によって H3K4 メチル化活性が増加する経路が存在すること、また、H3K4 メチル化が、DNA 脱メチル化に伴う Tgfb β 遺伝子発現に関与していることが示された。さらに遺伝子発現抑制シグナルである 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解析すると、Dnmt3a/3b 両欠損による Tgfb β 遺伝子

領域の修飾状態は、野性型 ES 細胞に比べ H3K9、H3K27 が高メチル化、H3、H4 が低アセチル化状態になることが明らかになった。したがって、これらのヒストン修飾は Dnmt3a/3b 両欠損により引き起こされた Tgfb1 遺伝子領域の脱メチル化状態を、再度 DNA メチル化するためのシグナルとなっている可能性が考えられた。

本研究によって DNA メチル化の標的領域が明らかにされた。また DNA 脱メチル化領域ではヒストン修飾が変化していること、発現誘導には H3K4 メチル化が関与していることが明らかになった。さらに、脱メチル化領域を再メチル化するためのヒストン修飾機構の存在が示唆され、細胞特異的な DNA メチル化模様形成の機構解明への重要な糸口の発見となった。本研究成果は基礎生物学として重要であるばかりでなく、ゲノム機能の制御を目指した応用分野でも重要な知見である。よって、審査委員一同は、本論分が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。