

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 入学

氏名 坂本 英樹

指導教官 塩田 邦郎

論文題目 Studies on genome-wide DNA methylation profiles of cellular differentiation in mouse
(マウスの細胞分化におけるゲノムワイド DNA メチル化プロファイルに関する研究)

序論

哺乳類の個体は形態・機能の異なる多様な細胞から構成されている。これら細胞の形質は細胞分裂を経ても安定であることから、細胞には世代を超えて細胞固有の情報を伝える機構が存在する。これらの細胞は一部の例外を除いて同じ遺伝子のセットを持っていることが、近年のクローン動物研究により証明されている。したがってこの細胞固有の情報は、塩基配列情報以外の機構で伝えられる、エピジェネティックな情報である。

哺乳類ゲノムにみられる DNA メチル化 (CG 連続配列 (CpG) におけるシトシンメチル化) は組織特異的な遺伝子発現、細胞分化、腫瘍形成など種々の現象に関与している。DNA メチル化は周辺の遺伝子のサイレンシングやクロマチン構造の凝縮を生じさせる。DNA メチル化情報は細胞分裂後のゲノムに正確にコピーされることから、エピジェネティクスの主要な機構であることが知られている。約半数の遺伝子はその上流に CpG アイランドと呼ばれる CpG の密集する領域をもつが、近年、組織・細胞特異的にメチル化状態の異なる領域 (Tissue-dependently and differentially methylated regions: T-DMR) が CpG アイランドのみならず CpG アイランドを持たない遺伝子上流領域でも見出されている。これらの T-DMR を中心としたゲノム全域の DNA メチル化情報 (ゲノムワイド DNA メチル化プロファイル、以下「メチル化プロファイル」) が、細胞のエピジェネティック情報の記憶・伝達の主体である。

従来、各種の細胞分化でゲノム DNA のメチル化シトシン総量が低下することが見出されている。また DNA メチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) が各種細胞で分化を誘導することからも、脱メチル化が細胞分化に重要であるとされてきた。これに対し近年、細胞分化にあたり脱メチル化される座位のみならずメチル化される座位も多数あることが明らかになっている。したがって細胞分化に伴う DNA メチル化変化はこれまで考えられていたよりも複雑で、分化のどのステージでいかなる座位がメチル化状態を変化させるのか、といった点は明らかでない。第 1 章では、脂肪細胞の *in vitro* 分化系を用いてメチル化プロファイルの細胞分化プロセスにおける変化を解析した。

個体を構成する細胞は、各細胞系列への決定を経た段階的なプロセスによって生じるが、組織・細胞の由来・類似性とメチル化プロファイルの関係について、体系的な解析は行われていない。また、これらメチル化プロファイルを構成する T-DMR がゲノム全域の視点からどのようなゲノム領域に分布しているのかも明らかでない。第 2 章ではマウス組織・幹細胞におけるメチル化プロファイルの比較を行うとともに、メチル化プロファイル中の T-DMR のゲノム情報上の特徴を解析した。

第 1 章 前駆脂肪細胞の分化過程におけるゲノムワイド DNA メチル化プロファイル解析

本章では細胞分化のモデルとしてマウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞の脂肪分化過程について解析した。まず 3T3-L1 細胞の脂肪分化過程において 5-aza-dC 処理を行ったところ、脂肪細胞への分化が抑制された。このことから少なくとも DNA メチル化が脂肪細胞分化に重要であることが示された。

これまで Restriction landmark genomic scanning (RLGS)法にて T-DMR が多数報告されており、T-DMR を中心とした 500 以上の NotI 座位 (GCGGCCGC 連続 8 塩基) の周辺配列情報がデータベースとして整備されている。このうち 159 の NotI 座位について、定量的リアルタイム PCR 法及び Pyrosequence 法にて脂肪分化の 4 時点 (Growing、Confluent、Postconfluent、Mature adipocyte) でメチル化状態を解析した。分化に伴いメチル化状態が変化する 13 座位が同定された。これらのメチル化状態変化は分化初期から後期にかけて幅広く見られ、その変化パターンとして、分化前後で一方向に変化するもの (メチル化または脱メチル化) に加え、分化後に再び分化前のメチル化状態に戻るもの (一過的メチル化または一過的脱メチル化) が見出された。

さらに、RLGS 法によりゲノム上の約 1,100 箇所の NotI 座位のメチル化状態を同じ 4 時点で解析した。32 の NotI 座位でメチル化状態の変化が検出され、これらの変化パターンにも一方向の変化と一過的な変化が見られた。脂肪細胞分化において、ゲノムワイドに多数の座位のメチル化状態が多様なパターンで変化することが示された。

本章の結果から、分化に伴いゲノム上の多数の領域でメチル化状態が変化するが示された。各々の座位の変化パターンは様々であり、その一部には一過的な変化も見られた。エピジェネティック情報の一過性の変化は、細胞の分化が従来考えられていたよりも遙か

に柔軟な（融通のきく）システムであることを示唆している。

第2章 幹細胞、生殖細胞及び体細胞におけるゲノムワイド DNA メチル化プロファイル解析

本章では、マウスの 14 種の組織・細胞を対象に、メチル化プロファイルの比較解析を行った。ここでは、ゲノム上に散在する 213 の NotI 座位におけるメチル化状態情報のセットを各組織・細胞のメチル化プロファイルと定義した。NotI 座位は Virtual image-RLGS を用い無作為に選出し、定量的リアルタイム PCR 法によりメチル化状態を解析した。メチル化プロファイル間の類似性の比較にあたっては、近年マイクロアレイ解析に用いられてきている階層的クラスタリング法を用いた。各メチル化プロファイル間の距離については、個々の NotI 座位のメチル化率（%）を構成要素とするベクトル間の距離とし、ユークリッド距離で算出した。

階層的クラスタリングにより、発生系譜上で近い組織間（精巣と精子、前駆白色脂肪細胞と白色脂肪細胞、前駆褐色脂肪細胞と褐色脂肪細胞）、また同等の多分化能を持つ幹細胞間（未分化胚性幹細胞と未分化胚性始原生殖細胞）のメチル化プロファイルがそれぞれ近接したクラスターを構成した。この結果から、メチル化プロファイル間の距離は発生系譜上の近さ、または形質上の類似性を反映していることが明らかになった。

また、生殖細胞（精巣と精子）幹細胞（未分化胚性幹細胞と未分化胚性始原生殖細胞）に特異的に脱メチル化される座位がクラスターを形成しており、特に生殖細胞特異的脱メチル化座位には Long terminal repeat（LTR）型トランスポゾン配列が多く含まれていた。特定のメチル化状態の傾向とゲノム領域・塩基配列における特徴に何らかの相関があることが示唆された。

さらに T-DMR のゲノム上の特徴を調べるため、各組織・細胞のメチル化プロファイルから T-DMR を抽出した。各組織・細胞間で 50%以上メチル化状態に差がある座位を T-DMR とし、46 の T-DMR を同定した。これらについてゲノム上における三つの属性、 遺伝子・ mRNA に対する相対的な位置（5'上流、遺伝子内部、非遺伝子領域） CpG アイランドか否か 反復配列か固有配列（非反復配列）か、を UCSC ゲノムデータベースを用い解析した。この結果、T-DMR は(i)遺伝子の 5'上流のみならず遺伝子内部や非遺伝子領域にも多く存在すること、(ii)CpG アイランド・非 CpG アイランドの両方に存在すること、(iii)反復配列にも固有配列にも見られること、が示された。T-DMR は従来多く知られていた遺伝子の 5'上流に加え、ゲノム上の多様な領域に存在することが明らかになった。

これまで報告されている T-DMR には、非 CpG アイランド上にあるものとともに、CpG アイランドであっても辺縁部で CpG が少ない領域に存在するものが知られている。そこで 213 の NotI 座位周辺の 500bp の CpG 密度・GC 含量を解析した。46 の T-DMR は周辺 CpG 密度が低い領域（100bp あたり 10CpG 以下）に偏在していた。T-DMR が周辺の CpG の密度という塩基配列上の共通した性質を持つことが見出された。

本章の結果から、メチル化プロファイルが由来・形質の不明な細胞の評価に応用できる可能性が示された。またメチル化プロファイルを構成する T-DMR を見出す上で、CpG 密度という塩基配列上の特徴が有用であることが示唆された。

総合討論

本研究により、細胞分化における DNA メチル化プロファイルの性質について、個別の座位のレベルとプロファイル全体のレベルの双方で明らかになった。第 1 章では、DNA メチル化プロファイルを構成する多数の座位が、細胞分化の過程で多様なパターンでメチル化状態を変化させることが明らかになった。一方第 2 章では、DNA メチル化プロファイル間の距離は発生系譜上の近さ・形質の類似度を反映していることが示された。すなわち、細胞分化は DNA メチル化プロファイル遷移のプロセスであると換言することができ、DNA メチル化プロファイルはこのプロセスで動的な変化を伴いつつ、細胞の由来・形質を反映したプロファイルに収束していくと言える。

以上、本研究では細胞分化におけるゲノムワイド DNA メチル化プロファイルに関する重要な知見を得た。