

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 坂本 英樹

哺乳類ゲノムにみられる DNA 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エピジェネティクス系の主要な要因である。近年、組織・細胞特異的にメチル化状態の異なる領域 (T-DMR) が、CpG の貧富にかかわらず、様々な遺伝子上流領域でも見出されている。CpG アイランドはメチル化されないとする従来の説と異なり、T-DMR を有する CpG アイランドも存在するのである。哺乳類のゲノム DNA には、きわめて多くの T-DMR が存在し、T-DMR のメチル化あるいは非メチル化の組み合わせによる、DNA メチル化プロファイルが形成されていること、DNA メチル化プロファイルは細胞の種類に特有であることなどが明らかになっている。本論文は、細胞の分化過程のエピジェネティック変化について T-DMR の DNA メチル化を中心に研究したもので、2 章より構成されている。

第 1 章ではマウス前駆脂肪細胞 (3T3-L1) 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が行われた。まず、他種の細胞で Restriction landmark genomic scanning (RLGS) 法により明らかにされている 159 の T-DMR の NotI 座位について、定量的リアルタイム PCR 法及び Pyrosequencing 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。その結果、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、分化前後でメチル化または脱メチル化という一方向に変化するパターンに加え、一過的メチル化 (または脱メチル化) のパターンも見出された。そこで、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解析した結果、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。分化における DNA メチル化状態が多様なパターンを示すことがはじめて明らかになったのである。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遥かに柔軟であることを示している。

第 2 章では T-DMR の DNA メチル化情報に基づく細胞系譜の決定が試みられ、また、CpG アイランドを中心にした T-DMR の特徴に関する解析が行われた。まず、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が行われた。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をユークリッド距離で算出した階層的クラスタリング法を用い、細胞のエピジェネティクス情報の類似性を判定することで、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することを証明した。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おり、細胞系譜の研究に DNA メチル化情報が有効であ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 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、領域の CpG の密度と T-DMR の有無に関連があることも見出された。

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、DNA メチル化阻害剤処理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。しかし、細胞の種類に特有の T-DMR の DNA メチル化プロファイル形成を考えると、細胞分化に伴う DNA メチル化変化は、従来考えられていたよりも複雑である。本研究で明らかになったように、最終的な細胞種特異的な DNA メチル化プロファイルが形成される過程で、ダイナミックな変化が起きている。また、T-DMR を有する CpG アイランドは、メチル化領域を有さない CpG アイランドとは構造上、区別できる可能性が示された。

以上、DNA メチル化プロファイル形成機構の理解が進み細胞分化のエピジェネティック分子機構が明らかになってきた。DNA メチル化の特徴も明らかになってきたことも重要な知見である。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。