

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 12 年度博士課程入学

氏名 向後 泰司

指導教員 塩田 邦郎

論文題目 マウスのゲノムワイド DNA メチル化に関する研究

緒言

我々の体は様々な形態や機能を有した細胞群から構成されるが、元をたどれば、それら全ての細胞は全能性を有するただ一つの受精卵に由来する。細胞分裂、分化を繰り返しながら、最終的に様々な形態や機能を有する約 200 種類の細胞へ分化する。それらの細胞では同一の遺伝情報(ゲノム)を持ちながら、細胞の種類により異なる形質が維持されている。

DNA メチル化は組織特異的遺伝子発現、X 染色体不活性化、ゲノムインプリンティング、トランスポゾンの不活性化、転写抑制を含む、哺乳動物の主要なエピジェネティック修飾の一つである。哺乳類の細胞において DNA メチル化の標的となるのは主に 5'-CG-3'配列(以下、CpG 配列と記す)のシトシン残基で、クロマチン構造の変化や転写抑制と関係している。CpG island は GC 含量が高くかつ CpG 配列が高頻度に存在する領域である。CpG island はハウスキーピング遺伝子の転写開始点に高頻度に位置し、組織特異的遺伝子と関連性があるとされている。従来 CpG island は通常の組織において非メチル化領域と認識されていた。しかし、今村らによって *Sphk1* 近傍に細胞・組織に特異的にメチル化される領域(T-DMR)を有する CpG island が存在することが発見されている。さらに大鐘らによってクローンマウスの異常が T-DMR 中に見出されている。

そこで本論文では CpG island のメチル化状態に焦点を絞り、restriction landmark genomic

scanning (RLGS)法によりゲノムワイドに DNA メチル化情報を解析した。また、その結果明らかになった精子特異的 T-DMR について、解析を試みた。

結果

第1章 幹細胞、体細胞および生殖細胞の DNA メチル化模様に関する研究

幹細胞株 (ES 細胞、EG 細胞、TS 細胞:未分化、分化)、組織 (脳、腎臓、胎盤) および精子のゲノム DNA の CpG island に焦点を当てた DNA のメチル化状態の解析を行った。RLGS によって視覚化された 1,500 領域のうち、247 領域 (16%) の細胞および組織によってメチル化状態が異なる領域 T-DMR が発見された。これらの領域は ES 細胞、EG 細胞、TS 細胞それぞれの幹細胞特異的領域、胎盤、脳、腎臓それぞれの組織特異的領域が含まれる。さらに、細胞の分化は、脱メチル化、*de novo* メチル化からなる両方向の変化を必要とすることが示された。また、C57BL/6 マウス由来ゲノム DNA の RLGS スポットにおいては精子が比較された細胞・組織中で最も低メチル化であることが示された。これは、以前の研究の精子のゲノム DNA は高メチル化であると考えられていた事と反する。胎盤においても以前の報告と異なり、高メチル化であることが示された。

第2章 精子特異的非メチル化領域 *Ant4* の解析

第1章で記述した RLGS の 247 T-DMR のうち、精子特異的非メチル化領域 No.225 の同定を試みた。その領域は染色体 3qB に位置し、6つのエクソンからなり、320個のアミノ酸をコードする *Ant4* 遺伝子座に位置する事が判明した。*Ant4* 遺伝子座は、544bp の長さで CpG island を有しており (-233~+311)、その CpG island は *Ant4* 遺伝子の 5' 上流領域から第1エクソンに位置していた。精子、腎臓、肝臓、脳のバイサルファイトシーケンス解析により CpG island 中のすべての CpG が腎臓、肝臓、脳で高度にメチル化されていることが示された。対照的に、精子において CpG island とその上流域の CpG は全体的にメチル化されていないことが明らかになった。さらにレーザーマイクロダ イセクション法により精巣を構成する各種の細胞を単離し、DNA のメチル化状態の解析を行った。それにより、精粗細胞、精母細胞および精子細胞においても CpG island は全体的にメチル化されないことが判明した。また、*in situ* ハイブリダイゼーション解析によって全ての精母細胞において *Ant4* mRNA の強い発現が検出された。ルシフェラーゼリポーター解析により *Ant4* 遺伝子発現は DNA メチル化を介する遺伝子調節機構下にあること、脱メチル化と遺伝子発現および生殖細胞分

化が相関していることが示された。前述したように、CpG island は一部の例外を除いてメチル化されない領域としてみなされていた。しかし最近の研究で、一部の CpG がメチル化された CpG island が発見されていた。興味深いことに、本研究によって明らかになった CpG island は全ての CpG がメチル化されていた。

第3章 精子特異的非メチル化領域 *Spesp1* の解析

第1章で記述した精子特異的非メチル化領域 No.32 の同定を試みた。その領域は染色体 9D 上で2つのエクソンからなり、399個のアミノ酸をコードする *Spesp1* 遺伝子座に位置することが判明した。*Spesp1* 遺伝子座の CpG island はその遺伝子の転写開始点近傍に 518bp の長さで位置していた (-318bp~+200bp)。精子、腎臓、脳、EG細胞のリアルタイム PCR 解析および精子、精巣、腎臓、脳、心臓、肝臓、脾臓、胃、皮膚、骨格筋、結腸、小腸、子宮、胎盤、卵巣、TS細胞、ES細胞、EG細胞、mGS細胞のパイロシーケンシング解析によって、精子および精巣において低メチル化、mGS細胞で中程度のメチル化、他の組織・細胞では高メチル化であることが示された。さらに、精子、精巣、腎臓、脳、mGS細胞、3T3細胞のパイロセクエンシング解析により、精巣および精子の CpG island 全域で非メチル化、mGS細胞で中程度のメチル化状態、その他の細胞・組織で全域にわたってメチル化されていることが示された。*Spesp1*mRNA の RT-PCR 解析およびルシフェラーゼリポーター解析により、*Spesp1* 遺伝子は DNA メチル化を介する発現調節機構下にあることも明らかになった。以上、*Ant4* と同様に *Spesp1* においても、発現しない組織で全ての CpG がメチル化されていた。これらの結果は CpG island の新しいクラス存在を示している。

総括

進化の過程を経て現存する生物の CpG 配列は生存に必要な部位のみが残ったと考えられている。いくつかの例外を除き CpG island はメチル化されないとみなされ、CpG island を転写調節領域に持つ遺伝子は DNA メチル化による制御を受けていないと考えられていた。これに反して、本研究ではメチル化される T-DMR を有する CpG island が多数発見された。さらに CpG island の全ての CpG がメチル化されている例も発見された。以上、CpG island における DNA メチル化パターンの形成が体の様々な細胞の発生、分化、遺伝子制御の基礎となるエピジェネティック事象のひとつであることが明らかになった。