

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 向後 泰司

哺乳類の体は様々な形態や機能を有した細胞から構成されている。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、などに関与している。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も関連性があるとされている。かつて、CpG islandは通常の組織においてはメチル化されない領域であると認識されていた。本論文はCpG islandのメチル化状態に焦点を絞り、ゲノムワイドにDNAメチル化情報を解析したもので、以下の3章から構成されている。

第1章では、幹細胞、体細胞および生殖細胞などのゲノムワイドDNAメチル化解析により、細胞種特異的なDNAメチル化模様が発見された。幹細胞株(ES細胞、EG細胞、TS細胞それぞれの未分化および分化)、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Restriction landmark genomic scanning (RLGS)法により約1,500領域が解析され、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。この結果を基に、細胞の分化はDNA脱メチル化とメチル化の両方向の変化を伴うことが示された。また、C57BL/6マウス由来ゲノムDNAのRLGSスポットに関して言うと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も示された。

第2章では第1章で発見されたT-DMRのDNAメチル化情報を基にして、精子特異的非メチル化領域が解析され、新規遺伝子Ant4が発見された。Ant4遺伝子は染色体3qBに位置し6つのエクソンからなる。その5上流領域から第1エクソンにかけてCpG islandが存在しているが、興味深いことに、この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バイサルファイトシーケンス解析により示された。対照的に、精子においてこれらの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。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メチル化状態の解析を行ったところ、精粗細胞、精母細胞および精子細胞において非メチル化状態であることが判明した。また、リポーター解析によりAnt4遺伝子発現はDNAメチル化による遺伝子調節機構下にあることも明らかにされた。

第3章では、第1章のDNAメチル化情報を基に、Spesp1遺伝子が精子特異的非メチル化領域を持つことが発見された。Spesp1遺伝子は2つのエクソンからなり、染色体9D上に存在する。Spesp1遺伝子座にも遺伝子の転写開始点近傍に518塩基長のCpG islandが存在した。このCpG islandは、精子、腎臓、脳、EG細胞のDNAメチル化感受性リアルタイム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 細胞のバイサルファイトシーケ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。

本研究では、T-DMR を有する CpG island が多数発見された。特に興味深いことは、発現が厳しく抑制された体細胞では、CpG island の全ての CpG がメチル化されている様な生殖細胞特異的遺伝子、Ant4 および Spesp1、が発見されたことである。これらの結果は CpG island の新しいクラスが存在すること、また DNA メチル化が生殖細胞の分化に大きく関わっていることを示している。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、生殖機能評価などの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(獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。