

## 審査結果の要旨

氏名 林 浩志

ゲノムの一次配列情報を変更することなく、個体発生や細胞分化の過程において、遺伝子発現を制御する現象をエピジェネティクスという。そのなかでも、DNA のメチル化は、同じゲノム配列を持ちながら異なる形質を持つ仕組みとして最もよく知られている現象である。真核生物においては、主にゲノム DNA のシトシン塩基の 5 位に起こる。通常、転写がオンになっている遺伝子のプロモーター領域はメチル化されていないが、メチル化 CpG がこの領域に蓄積すると、その遺伝子はサイレンシングされる。また、プロモーター領域の約半分は、特に CpG 密度が高くなっており、CpG アイランドと定義づけられている。こうしたプロモーター領域のメチル化制御は、ゲノムのインプリンティング、X 染色体の不活化、細胞分化に関わっている。癌においては DNA のメチル化異常が起きており、ゲノム全体的には低メチル化状態になっている。これが染色体不安定性やマイクロサテライト不安定性を引き起こす。一方、様々な癌抑制遺伝子のプロモーター領域が、局所的に抗メチル化状態になっており、発現が不活性化されている。

癌化に重要なメチル化状態の変化がゲノムのどの部分に存在するかを調べることは非常に重要であり、近年、さまざまな網羅的解析法が開発されている。その多くが、メチル化感受性制限酵素を用いてメチル化の相違を見出す方法であり、癌特異的なメチル化領域が数多く報告されている。しかし、このようなメチル化感受性制限酵素を用いる方法は、解析領域が酵素サイト近傍に限定されることや、酵素サイトの多型や変異などによりプロファイルが変化するという解決すべき問題がある。

本研究では、抗メチルシトシン抗体を用いた免疫沈降法と、ゲノム配列を連続的に合成したオリゴヌクレオチドプローブを搭載したゲノムタイリングアレイを組み合わせた、新規 DNA メチル化解析法の確立を行った。具体的には、細胞株から抽出した DNA から、抗メチルシトシン抗体を用いた免疫沈降により、メチル化 DNA を濃縮した。次に、得られた DNA ランダムに増幅し、末端標識を行ったあと、ゲノムの 1%を詳細に解析することをめざした ENCODE (Encyclopedia of DNA elements) 計画で定められた領域のタ

タイリングアレイ上でハイブリダイゼーションを行った。順位和検定により、全ゲノムコントロールに比べて抗体で得られた DNA でシグナル強度が高い領域をメチル化候補サイトとした。

まず、論文の前半では、実験に用いる抗メチルシトシン抗体を選択し、条件を設定した。次に、濃縮した DNA を増幅させる手法を検討し、通常用いられているランダム PCR 法に比べてより低バイアスな *in vitro* 転写法を選択して系を確立した。

後半では、解析で得られたメチル化候補サイトの検証を行った。False Discovery Rate (FDR)解析と Bisulfite シーケンスにより、統計学的、あるいは実験的に有意なメチル化候補サイトを決定した。実験データの解釈を明確にしたあと、メチル化候補サイトの特徴について考察を行った。さらに、ChIP (クロマチン免疫沈降) -chip 解析によるアセチル化ヒストンとの比較を行い、転写が活性化されていると考えられる非メチル化領域にアセチル化ヒストンが結合し、転写が抑制されているメチル化領域には結合しないという一般的な現象が認められ、当該メチル化解析法の妥当性が示された。

これまでの DNA メチル化の網羅的解析法は、メチル化感受性制限酵素を用いることにより、解析範囲が制限酵素サイト近傍に限定されるという問題があった。また、マイクロアレイを用いたメチル化解析法もあるが、解像度の低い BAC アレイや、CpG アイランドに限定されたアレイを利用したものがほとんどであった。

本研究では、これまで報告されていない免疫沈降とタイリングアレイを組み合わせた新規の手法により、メチル化解析を行った。その結果、遺伝子領域内におけるメチル化状態の変化を検出することができた。また、解析結果を FDR 解析や Bisulfite シーケンスによって検証を行うことにより、解析データの解釈を明確にした。そして、このツールにより、DNA のメチル化修飾は遺伝子上流や 5'非翻訳領域と同様に、エキソンや 3'非翻訳領域にも起こっている現象であることがわかった。これらのことから、本論文による新規のメチル化解析法は、ゲノム全体の DNA のメチル化状態を高解像度でマッピングするツールとして非常に有用であると考えられた。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。