

論文内容の要旨

応用動物科学専攻
平成 16 年度博士課程 進学
池上 浩太
指導教員 塩田 邦郎

論文題目 ヒストン修飾による DNA メチル化プロファイルの形成

【緒言】

ほ乳類のゲノム中には、組織特異的に DNA がメチル化される領域 (T-DMR) が遺伝子領域に多数存在する。ゲノム全体に存在する T-DMR の DNA メチル化状態のパターンを、DNA メチル化プロファイルと呼ぶ。DNA メチル化プロファイルの形成機構を解明する為の鍵は、個々の T-DMR が、どのように、それぞれ異なる DNA メチル化状態となるか明らかにすることである。DNA のメチル化を触媒する DNA メチル転移酵素には、標的 DNA の配列特異性が存在しないため、特異的な T-DMR にメチル化を誘導する仕組みに、DNA の *in vivo* での環境、すなわち、クロマチンの構造が関与していると考えられる。

クロマチン構造はヒストンの修飾状態により変化する。ヒストン H3 のアミノ末端から 9 番目と 27 番目のリジン残基 (H3-K9、H3-K27) のメチル化は、転写が抑制されたゲノム領域に見られる。H3-K9 と K27 メチル転移酵素として G9a (Ehmt2) と GLP (Ehmt1) が同定されている。G9a と GLP はユークロマチン領域に局在するが、これまでに標的ゲノム座位としてそれぞれ数個の遺伝子が同定されているのみである。

本研究では、ヒストンの修飾が DNA メチル化プロファイルの形成に関与するとの仮

説を立てた。仮説が正しければ、ヒストン修飾酵素の欠損細胞では、特異的なゲノム座位の DNA が低メチル化状態となると考えられる。

【第一章:G9a 欠損 ES 細胞のゲノムワイド DNA メチル化解析】

本章では、G9a 欠損が DNA メチル化プロファイルの形成に与える影響を解析した。Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法を用いて、約 2,000 箇所のゲノム座位における G9a 欠損 ES 細胞の DNA メチル化状態を解析した結果、野生型 ES 細胞の RLGS 像に存在しない、35 個のスポットが、G9a 欠損 ES 細胞の RLGS 像に出現し、35 箇所のゲノム座位が、G9a 欠損により低メチル化状態となったことが示された。*In silico* の Virtual image RLGS ソフトウェアを用いて、その中から 10 箇所の G9a 標的ゲノム座位を同定した。これらのゲノム座位では、G9a 遺伝子を欠損細胞に再導入した株において、DNA メチル化レベルが回復していることが確認された。G9a は H3-K9/K27 メチル転移酵素なので、標的座位では G9a の欠損により H3-K9 もしくは K27 が低メチル化状態となるはずである。クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を用いて、G9a 欠損 ES 細胞の H3-K9 と K27 のメチル化状態を解析し、全 10 箇所において H3-K9 あるいは K27 が低メチル化状態となることを確認した。これらの G9a 標的座位では、欠損下でも数%から 50%程度の DNA メチル化は残るが、低メチル化状態となる領域は数千塩基対を超える範囲にも及ぶことが示された。

本章によって、多数の G9a 標的座位を明らかにすることができた。ゲノム中の遺伝子の総数に基づくと、少なくとも 240 の G9a 標的遺伝子が存在すると見積もることができる。DNA メチル転移酵素の欠損 ES 細胞を用いた RLGS 解析では 247 座位が低メチル化状態となることが知られている。一方、G9a 欠損により低メチル化状態となったのは 35 のゲノム座位だった。従って、G9a が特異的なゲノム座位の DNA メチル化の維持に関与することが明らかとなった。

【第二章:GLP 欠損 ES 細胞のゲノムワイド DNA メチル化解析】

G9a の欠損よりも、DNA メチル転移酵素の欠損で低メチル化状態となるゲノム座位の方が、7 倍程度多かったことを考えると、G9a 以外のヒストンメチル転移酵素も DNA メチル化プロファイルの形成に寄与していると考えられる。G9a と同様にユークロマチン領域に存在する H3-K9/K27 メチル転移酵素として GLP が同定されている。GLP は G9a と優先的にヘテロ二量体を構成するとの報告がある。GLP の欠損は、G9a の欠損と同じゲノム座位の DNA メチル化に影響を与えているのだろうか、それとも異なるゲノム座位の DNA メチル化に影響を与えるのか？

RLGS 法を用いて GLP 欠損 ES 細胞の DNA メチル化状態をゲノムワイドに解析したところ、46 箇所では GLP 欠損により低メチル化状態となることが示された。G9a 欠損では 35 箇所だったので(第一章)、GLP の欠損では、G9a 欠損よりも多数の座位で低メチル化を引き起こすことが示された。GLP 欠損および G9a 欠損により低メチル化状態となるゲノム座位を比較すると、両方で共通のものが 16 座位、GLP 単独で 30 座位、G9a 単独で 17 座位だった。従って、ゲノム上には GLP と G9a が協調して作用する領域と、お互いに独立して作用する領域が存在することが示された。さらに、DNA メチル化状態の変化を、タイリングアレイを用いて解析すると、GLP 欠損だけで低メチル化状態となる領域は、G9a のそれに比べて範囲が広いことが示された。第一章で記したように、G9a 標的座位では G9a 欠損下でも完全に脱メチル化されなかった。同様に、GLP 標的座位でも GLP 欠損により完全な脱メチル化は観察されなかった。これらの酵素の単独欠損下における部分的脱メチル化は、それぞれが相補的に作用している結果かも知れない。そこで、GLP と G9a の各単独欠損で共通して低メチル化状態となるゲノム座位に注目して G9a・GLP 両欠損 ES 細胞の DNA メチル化レベルを解析した結果、GLP あるいは G9a 単独欠損 ES 細胞と差がなかった。従って、G9a と GLP のヘテロ二量体においても相乗的な DNA メチル化が起こらないことが示唆された。

本章は、DNA メチル化を指標として、GLP の標的ゲノム座位をゲノムワイドに探索することで、GLP が G9a よりも多くの領域を標的とし、さらに G9a または GLP が単独で作用する領域が多数存在することを明らかにした。

【第三章:G9a/GLP 欠損 ESd 細胞・胚様体のゲノムワイド DNA メチル化解析】

DNA メチル化領域が凝縮型のクロマチン中に見られるヒストン修飾を誘導することが報告されている。一方、第一章、第二章で示したように、これらのヒストン修飾は DNA メチル化状態に影響を与える。このことから、DNA メチル化とヒストン修飾の相互依存によって細胞の安定なエピジェネティック状態が保たれていると考えられる。従って、ヒストン修飾状態が変化しなければ、DNA メチル化プロファイルは変化し得ないと考えられる。しかし、細胞の分化過程では DNA メチル化プロファイルが変化し、これにより細胞種固有の DNA メチル化プロファイルが形成される。事実、ES 細胞と、これを分化させることで得られる分化 ES 細胞および胚様体は異なる DNA メチル化プロファイルを持つ。では、G9a と GLP の標的座位は ES 細胞の分化に伴って変化するのか、それとも一定なのだろうか？

最初に野生型について、ES 細胞、分化 ES (ESd) 細胞、胚様体の DNA メチル化状態を RLGS 法によりゲノムワイドに解析し、分化過程において新たに DNA メチル化される領域

が存在することを確認した。次に G9a 欠損 ES 細胞からも ESd 細胞および胚様体を作製し、野生型 ES 細胞で見られた新規のメチル化に対する G9a 欠損の影響を RLGS 法により解析した。その結果、通常 ESd 細胞への分化過程で新規のメチル化が生じる 45 箇所のゲノム座位の内、2 箇所では G9a 欠損下の分化過程で新規メチル化が生じなかった。さらに、胚様体への分化過程では 42 箇所通常新規メチル化が生じるが、G9a 欠損下では 6 箇所において起こらなかった。このことは G9a の標的座位が分化に伴い変化し、DNA メチル化領域の新たな形成に関与することを示唆した。タイリングアレイにより、RLGS 法での解析対象である NotI 部位以外のゲノム領域について同様の解析を行なった。その結果、イントロン内や遺伝子間の特定の領域においても、分化に伴い、新規の G9a と GLP 標的座位が生じることが示された。これらの新たな G9a と GLP の標的領域の範囲は数 100 塩基対の限局された領域であった。

本章の結果により、G9a と GLP の標的座位が分化に伴い変化することが分かった。G9a と GLP が分化に伴い新たに DNA メチル化を誘導することは、DNA メチル化プロファイルの変化に寄与していることを意味する。

【総括】

本研究では、細胞種に固有の DNA メチル化プロファイルの形成にヒストン修飾が関与するとの仮説を立てた。この仮説の検証には、ヒストン修飾酵素の標的座位を多数明らかにする必要があった。しかし、ヒストン修飾の解析は、DNA メチル化解析に比べて方法論的に定量性・正確性で劣る。本研究では、DNA メチル化を指標とし G9a と GLP の標的領域をゲノムワイドに探索した。第一章、第二章では G9a および GLP 欠損 ES 細胞の DNA メチル化解析により標的遺伝子座を多数同定した。このことにより、G9a と GLP が特異的な遺伝子領域の DNA メチル化状態の維持に関与することを明らかにすることができた。これらの領域では G9a と GLP が H3-K9 と K27 のメチル化を触媒していたことから、クロマチン構造の変化により DNA メチル化が誘導されると考えられる。第三章では、G9a と GLP の標的座位は分化に伴い変化し、細胞の種類によって異なることを明らかにした。これらのことより、ヒストン修飾が細胞の種類に固有の DNA メチル化プロファイルの形成と維持に関与していることが示唆された。