

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 池上 浩太

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し、細胞の種類により異なった DNA メチル化模様(DNA メチル化プロファイル)が形成される。本論文は、ヒストン修飾酵素の欠損が DNA メチル化に与える影響をゲノムワイドに解析したもので、T-DMR の領域特異的な DNA メチル化機構を知ることを目的にしている。ヒストンメチル化酵素 G9a(Ehmt2)は、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)をメチル化する。また、GLP(Ehmt1)も同様に H3-K9、H3-K27 メチル化活性を有している。

第一章では、G9a 欠損マウス胚性幹細胞(ES 細胞)のゲノムワイド DNA メチル化解析が行われた。Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS)法を用いて、約 2,000 箇所の CpG 配列が豊富に存在する遺伝子領域に焦点をあて、DNA メチル化状態を解析した。その結果、G9a 欠損により 35 箇所のゲノム座位が低メチル化状態となることが分かった。クロマチン免疫沈降法により、これらの領域では H3-K9 あるいは K27 が脱メチル化されることが確認された。G9a 遺伝子を再導入した ES 細胞では DNA メチル化レベルが回復していたことから、G9a は特異的ゲノム領域の DNA メチル化に関与することが明らかとなった。全ゲノム中では約 240 領域で G9a 標的遺伝子が存在し DNA メチル化に影響を与えていることになる。この時、G9a 欠損による DNA 脱メチル化は領域により数%~50%程度のメチル化は残るが、脱メチル化領域は数キロ塩基対を超える範囲において起きていることも分かった。

第二章では、GLP 欠損および GLP/G9a 両欠損 ES 細胞のゲノムワイド DNA メチル化解析が行われた。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 欠損 ES 細胞でも RLGS を行い、脱メチル化領域を検出した。興味深いことに、GLP 欠損で脱メチル化された領域の総数(46)は、G9a 欠損により脱メチル化された領域総数(35)よりも多かった。したがって、GLP 単独で DNA メチル化を支持している領域が存在することになる。GLP 単独欠損と G9a 単独欠損により脱メチル化された領域を比較すると、両者で共通するものが 16 領域、GLP 単独で 30 領域、G9a 単独で 17 領域であった。したがって、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になる。DNA メチル化状況を、タイリングアレイで解析したところ、GLP 単独欠損により脱メチル化される領域は G9a のそれに比べて範囲が広いことも明らかになった。さて、GLP と G9a は細胞内でヘテロ二量体を形成することが報告されている。一章で記したように、G9a 欠損で見られる領域特異的な DNA 脱メチル化は完全ではなかった。同様に、GLP 単独欠損でも完全な脱メチル化は観察されなかった。これら酵素の単独欠損によ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しれない。そこで、GLP と G9a の各単独欠損で共通して脱メチル化される領域に注目して、GLP/G9 両欠損 ES 細胞で DNA メチル化レベルを調べたところ、GLP あるいは G9a 単独欠損 ES

細胞と差が無かった。したがって、DNA メチル化の程度は、G9a と GLP ヘテロ二量体でも大きくは変わらないと考えられる。

第三章では G9a 欠損あるいは GLP 欠損 ES 細胞のゲノムワイド DNA メチル化解析が行われた。DNA メチル化領域はクロマチン凝縮型のヒストン修飾を誘導することはすでに多くの報告があり、逆に、ヒストン修飾が DNA メチル化に影響を与えることは上記の第一章と第二章で明らかにした。DNA メチル化とヒストン修飾は互いに依存関係にあり、そのため、細胞特有の安定した DNA メチル化プロファイルが維持できると考えられる。したがって、ヒストン修飾が不変であれば、DNA メチル化情報は変化しようがない。ところが、分化前後では DNA メチル化プロファイルは大きく変化する。事実 ES 細胞分化前後で DNA メチル化プロファイルは異なるし、胚様体のそれも未分化状態とは大きく異なることが確認された。DNA メチル化情報とヒストン修飾に支えられたエピジェネティクス情報が、未分化型から分化型にエピジェネティクス相の転移が起きるのである。そこで、新たな疑問は、G9a と GLP の関与は分化の前後で変わるか否かである。野生型 ES 細胞と G9a 欠損 ES 細胞について、分化誘導前後と胚様体の DNA メチル化状態を解析した結果、G9a 欠損下では、野生型 ES 細胞の分化により新たにメチル化される 45 領域中で非メチル化状態のままの 2 領域が見つかった。さらに、胚様体への分化過程では 42 箇所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。したがって、G9a の関与するゲノム領域は、新たな領域で起きる DNA メチル化に関与し分化の一翼をなしていることが明らかになった。

以上、本研究では、ヒストンメチル化酵素 (G9a、GLP) の機能に焦点を当て、ヒストン修飾が T-DMR の領域特異的な DNA メチル化に影響を与えることを明らかにした。しかも、分化に伴う DNA メチル化プロファイル形成にもヒストン修飾が関与していることも重要な発見である。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。