

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 Sharif Jafar (シャリフ ジャファル)

エピジェネティクスとは、DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現調節のメカニズムである。エピジェネティクスの原因となる DNA メチル化やヒストン修飾などのクロマチンへの後天的な修飾は、世代を超えて継承され、あるいは、環境変化に対応して流動的に変化する。エピジェネティクスは、受精や個体の発生、細胞分化などの多様な生命現象や疾患における、遺伝子発現の調節に深く関係している。エピジェネティクス分子機序の一つである DNA メチル化において、Dnmt 酵素群 (DNA methyl transferase: Dnmt1, Dnmt3a/3b) の役割が知られているが、その詳細なメカニズムは未解明である。本研究では、ES 細胞 (Embryonic stem cell) と生殖細胞に特異的に発現している Np95 (Nuclear protein 95、別名 Uhrf1) と Ecat8 (Embryonic stem cell associated transcript 8、別名 2410004F06Rik) に注目し、哺乳類の発生過程におけるエピジェネティクスにおいてこれらのタンパク質が担う役割を明らかにしたものである。

第一章は、本研究の目的や主な結果、考察を簡潔に記した要約である。

第二章においては、エピジェネティクスの定義や主な分子メカニズム、ゲノムインプリンティング (父親由来か母親由来かによって遺伝子発現に差異が認められる現象) やゲノム内在性のレトロトランスポゾン抑制における DNA メチル化の役割などを含め、本研究の背景を説明している。

第三章では、本研究に用いた試薬類や DNA/ RNA 抽出法、mRNA の発現の定量法、DNA メチル化解析 (バイサルファイト) 法、多型マウスを用いたゲノムインプリンティング解析法、マウスの生殖細胞精製法、生殖細胞特異的な small RNA (piRNA: Piwi-interacting RNA) の同定法、用いたプライマー配列などの具体的な実験方法を述べている。

第四章においては、哺乳類のエピジェネティクスにおける *Np95* の機能について述べている。本研究では、SET and RING finger-associated (SRA) ドメインを持つタンパク質 *Np95* の機能を解析するために、*Np95* 欠損型 ES 細胞およびマウスを作製している。*Np95* 欠損型 ES 細胞においては、DNA 修復機構の異常やセントロメア反復配列の転写活性化などが既に報告されており、また近年、植物において SRA ドメインを持つタンパク質 VIM1 が DNA メチル化に関与することが報告されていることから、哺乳類のエピジェネティクスにおいても、*Np95* が何らかの重要な役割を持つことが予想されている。本研究では、*Np95* 欠損型マウスは胎生致死であることを発見し、胎児の発生に *Np95* が不可欠であることを示している。また、DNA メチル化における *Np95* の機能解析を行うため、メチル化 DNA 感受性の制限酵素 (*HhaI*, *HpaII*) を用いてゲノム DNA を消化処理することにより、*Np95* 欠損型 ES 細胞や胎児において、ゲノム全体的に深刻な DNA 脱メチル化が起きていることを明らかにした。さらに、哺乳類のゲノムの約 40% を占めているゲノム内在性のレトロト

ランスポゾン (IAP, LINE, SINE など) は通常 DNA メチル化によって発現が抑制されているが、*Np95* 欠損型胎児においてはこれらのレトロトランスポゾンがすべて脱抑制 (活性化) されており、これが *Np95* の欠損によって生じる DNA 脱メチル化の影響であると結論づけている。さらに、DNA メチル化がゲノムインプリンティングに深く関係していることが知られているが、B6XJF1 多型の胎児を用いた解析により、*Np95* 欠損型胎児ではゲノムインプリンティング機構が崩壊していることを見出した。そこで、DNA メチル化とこれらの現象を直接結び付けるために、バイサルファイト DNA メチル化解析法を用いて、*Np95* 欠損型 ES 細胞や胎児における DNA メチル化状態を解析し、その結果、全てのレトロトランスポゾン領域やインプリンティング遺伝子座での DNA 脱メチル化が起きていることを明らかにした。さらに、様々な Dnmt 酵素欠損細胞 (*Dnmt1* 欠損, *Dnmt3a/3b*-ダブルノックアウト, *Dnmt1/3a/3b*-トリプルノックアウト) を用いた免疫染色解析により、細胞周期の S 期に Dnmt1 タンパク質が *Np95* と共局在すること、また、免疫沈降解析により、Dnmt1 が *Np95* タンパク複合体に存在することを示している。

第五章では、*Ecat8* 欠損型マウスを用いて、哺乳類のエピジェネティクスにおける *Ecat8* の機能を解析している。*Ecat8* 欠損型マウスにおいて、雌のマウスは正常であるが、雄のマウスには精巣の発生の異常が認められ、雄だけが不妊であることを明らかにしている。さらに、生殖細胞を用いたバイサルファイト DNA メチル化解析により、*Ecat8* 欠損型の雄マウスではレトロトランスポゾン領域において DNA 脱メチル化が認められるという結果を得ている。一方、インプリンティング遺伝子においては、DNA メチル化の獲得 (母型) や DNA 脱メチル化 (父型) のいずれも正常であった。興味深いことに、*Ecat8* 欠損型雄マウスでは、生殖細胞特異的な small RNA の一種である piRNA の発現が著しく抑制されていた。これらの結果より、*Ecat8* が雄の精巣の形成や生殖細胞の発生・分化やレトロトランスポゾン領域における DNA メチル化にも関与し、さらに生殖細胞での piRNA の発現にも何らかの役割を果たしている可能性がある」と結論づけている。

第六章においては、本研究の結果を総合的に考察し、将来の展望を述べている。

以上、本論文は、*Np95* と *Ecat8* が哺乳類の発生に重要な役割を果たしており、さらに、DNA メチル化などのエピジェネティックな制御機構にも深く関わっていることを明らかにしたものである。

これらの成果は、基礎生物学・基礎医学のみならず化学生命工学分野の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格であると認められる。