

論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻

平成18年度博士課程 入学

氏 名 佐藤 晋也

指導教員名 塩田 邦郎

論文題目 **Bioinformatic Analysis of Epigenome**
(バイオインフォマティクスによるエピゲノム解析)

序論

エピジェネティクスとは「塩基配列の変化を伴わず、細胞世代を超えて継承される遺伝子機能の変化」を研究する学問である。哺乳類のからだを構成する細胞は、同一のゲノムを利用しながら、それぞれが特徴的な遺伝子群を発現する。遺伝子発現のプロフィールは細胞世代を超えて継承され、分化の過程で変化しうる。エピジェネティック系は主に DNA メチル化とヒストン修飾により制御されている。DNA メチル化は安定で、DNA メチル基転移酵素によって親鎖 DNA から娘鎖 DNA に継承される。DNA のメチル化は多くの場合遺伝子発現を抑制する。DNA メチル化は転写因子による短期間の遺伝子発現制御と異なり、持続的な遺伝子制御と考えられている。ヒストン修飾は比較的安定なものから短時間で変化するものまで報告されている。ヒストン修飾は約 60 種類存在するが、DNA メチル化は唯一のゲノム修飾である。DNA メチル化に依存したヒストン修飾機構が存在する。したがって、DNA メチル化情報はヒストン修飾を含むエピジェネティック変化を知るための重要な情報となる。ゲノム上には組織・細胞によってメチル化状態が異なる領域(T-DMR)をプロモーター領域などにもつ遺伝子が多数発見されている。

ゲノム全域におけるエピジェネティック状態の総体はエピゲノムと呼ばれる。本研究はゲノム広域のT-DMR情報を取得・解析する方法の開発を目的とした。第1章では、遺伝子領域におけるT-DMRを網羅的に取得する系 (D-REAM: T-DMR profiling with restriction-tag mediated amplification) を開発し、これを用いて肝臓と脳の比較で得られる肝臓低メチル化T-DMRを得た。得られたT-DMR情報を遺伝子データベース、発現データ

ベースを初めとする種類のデータベースと比較・照合することで、プロファイリングを行った。第2章では、ES細胞と成体臓器の脳、肝臓、腎臓とを比較することで、ES低メチル化T-DMR、ES高メチル化T-DMRを同定し、得られたT-DMR情報のプロファイリングを行った。さらに得られたT-DMR情報をもとに、近年作出されたiPS細胞ならびにその前駆細胞におけるメチル化状態を解析し、ES細胞との類似性、相違性を検証した。

第1章 網羅的 T-DMR 解析系の確立

DNA メチル化感受性酵素と DNA タイリングアレイを組み合わせ、ゲノム広域のメチル化状態を知ることができる。制限酵素 HpyCH4IV を用い、マウスプロモーター領域における約 17 万の認識配列におけるメチル化情報をアレイシグナルとして取得できる D-REAM を開発した。

D-REAM で得られたシグナルを MAT(Model-based Analysis of Tiling-array)を用いて肝臓と脳のメチル化プロファイルと比較した。脳と比較して低メチル化状況にある T-DMR シグナル(T-DMRtag)は約 4,000 検出され、この T-DMRtag をプロモーター領域に持つ遺伝子約 2,000 が同定された。オントロジー解析の結果、これらの遺伝子群は肝臓で特異的に働く代謝ネットワーク上にある遺伝子、肝臓で働くと考えられる代謝関連のオントロジーを持つ遺伝子が濃縮された。この濃縮は転写開始点近傍に CpG アイランドを持たない遺伝子群においてより顕著であった。さらに配列解析の結果、CpG アイランドを転写開始点近傍に持たない遺伝子群においては、肝臓で機能する *Hnf1*, *Hnf4a* などの転写因子の認識配列を持つ遺伝子が有意に含まれた。

CpG アイランドを転写開始点近傍に持つ遺伝子群については、T-DMR は転写開始点の下流に多く存在し、下流に持つ遺伝子がより遺伝子発現と相関した。

得られた T-DMR におけるメチル化状態を腎臓、脾臓にて解析したところ、*Hnf1* の標的遺伝子にある T-DMR の一部は腎臓でも低メチル化状態にあり、一部は肝臓特異的に低メチル化状態にあった。

すなわち、低メチル化 T-DMR を有する遺伝子は転写因子とそれらの標的遺伝子より構成されていることがわかった。つまりエピゲノムは細胞・組織に特異的で、それらの機能を規定し、維持するための礎となっていることが明らかとなった。

第2章 多能性幹細胞のメチル化プロファイル解析.

D-REAM と MAT を用い、マウスの胚性肝細胞(ES 細胞) と成体脳、肝臓、腎臓を比較することで、T-DMRtag を取得した。3組織と比較することで得られる、ES 細胞で特異的に低メチル化状態にある T-DMRtag は約 2,000 検出され、これらをプロモーター領域に含む遺伝子が約 1,000 検出された。その結果、ES 細胞を特徴付ける遺伝子群は、CpG アイランドを転写開始点近傍に持つものを多く含んでいることが明らかとなった。これら T-DMR のメチル化状態は遺伝子の発現と相関し、その相関は T-DMR を転写開始点の下流に持つも

のについてより顕著であった。また、興味深いことに ES 細胞の多能性に関わる転写因子 *Pou5f1*, *Nanog* を中心とする転写制御ネットワーク上の転写因子，ならびにその標的遺伝子が含まれていることが判明した。

一方，ES 細胞で高メチル化状態にある T-DMRtag を持つ遺伝子群は ES 細胞では発現が抑制傾向にあり，ヒストン H3K27 トリメチル化修飾状況と相関していた。これらの遺伝子群は脳，肝臓，腎臓において，特異的に機能する遺伝子が含まれ，また肝臓で特異的に機能する転写因子 *Hnf4a*，ならびにその標的遺伝子が含まれた。このように，ES 細胞では細胞・組織特異的な機能がエピジェネティクス系で抑制されていることが明らかになった。

ES 細胞で得られた T-DMR を基に，iPS 細胞ならびに前駆細胞と ES 細胞とのメチル化プロファイルと比較したところ，ES 細胞で機能する遺伝子群については iPS 細胞でも同様に低メチル化であり，その一部は前駆細胞でも低メチル化であった。同様に ES 細胞で高メチル化状態にある遺伝子群も iPS 細胞では同様な高メチル化であった。このように，ES 細胞と iPS 細胞は基本的には近似した DNA メチル化プロファイルを示すことが証明された。

一方，肝細胞由来の iPS 細胞で，肝臓で重要な機能を担う *Hnf4a*，ならびにその標的遺伝子が低メチル化状態にあるものなども存在した。これらの T-DMR については前駆細胞においても低メチル化状態にあり，前駆細胞のプロファイルを継承している可能性が示唆された。以上の結果から，第 1 章で観察された低メチル化 T-DMR と細胞で機能する遺伝子群との関連は ES 細胞においても得られた。さらに高メチル化 T-DMR が他の組織で機能する転写制御系に広範に現れることが明らかとなった。

総合討論

本研究では広域ゲノムの DNA メチル化解析法 D-REAM を開発した。T-DMR メチル化情報をもとにメチル化上納のプロファイリングを行い，低メチル化 T-DMR は，その細胞で機能する遺伝子に現れ，逆に高メチル化 T-DMR は他の細胞で機能し，その細胞では機能しない遺伝子に現れることを明らかにした。すなわち，DNA メチル化プロファイルは，機能すべき遺伝子における低メチル化と，機能すべきでない遺伝子における高メチル化の組み合わせの分子基盤になっているのである。また，メチル化プロファイルは細胞固有のものであり，細胞の同定や評価などに利用できると考えられる。以上，エピゲノムが細胞の機能に広範密接に関与する，重要な情報であることが示された。