

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 佐藤 晋也

DNA メチル化はエピジェネティック制御系の主要機構であり、転写因子による短期間の遺伝子発現制御と異なり、細胞世代を越えた安定的な遺伝子機能の制御記憶装置として働く。これまで、Restriction Landmark Genome Scanning 法を主体に、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)が多数存在することが示唆されている。しかし、RLGS の方法論的限界から全 T-DMR の同定には至っておらず、さらなる迅速な方法の開発が望まれていた。様々な生物の全ゲノム配列が解読されたが、今後の生命科学の基盤として、ゲノム全域のエピジェネティクス状態の総体(すなわち、エピゲノム)に関する情報を整備しなければならない。本論文はエピゲノム研究を視野に、ゲノム全域の T-DMR の DNA メチル化情報を取得・解析する方法の開発を目的としている。

第 1 章では DNA メチル化情報を網羅的に取得する新たな解析法、T-DMR profiling with restriction-tag mediated amplification 法(D-REAM)を開発した。D-REAM は、任意の 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た方法である。D-REAM による肝臓と脳の比較から約 4000 の T-DMR シグナル(T-DMRtag)が得られ、これらは約 2000 遺伝子のプロモーター領域に同定された。オントロジー解析の結果、これらの遺伝子群に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や、肝臓で働くと考えられる代謝関連の遺伝子が含まれることが明らかになった。また、Hnf1 や Hnf4a などの肝臓特異的転写因子の遺伝子、さらにはそれらの標的遺伝子も含まれていた。転写因子遺伝子とそれらの標的遺伝子が T-DMR を有し、細胞・組織の特異的な機能の制御と維持の基礎となっていることが D-REAM の開発と利用で初めて明らかになったのである。T-DMR は転写開始点の上流以外に、下流にも多く存在していることも明らかになった。

第 2 章では、前章で完成した D-REAM と解析ツールを基に、多能性幹細胞のメチル化プロフィール解析が行われた。まず、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、ES 細胞で特異的に低メチル化状態にある T-DMRtag (ES hypo-T-DMRtag) 約 2000 が検出された。これらは約 1000 遺伝子のプロモーター領域に存在する。ES hypo-T-DMRtag を含む遺伝子群には、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。また、ES hypo-T-DMRtag は CpG アイランドを転写開始点近傍に持つものが多く、メチル化状態は遺伝子の発現と相関していた。その相関は、T-DMR が転写開始点の下流に存在する場合に、より顕著であった。

一方、ES 細胞で高メチル化状態にある T-DMR は、ヒストン H3K27 トリメチル化修飾状況と相関しており、それらの遺伝子発現は ES 細胞で抑制傾向にあった。その中には成体臓器の特異機能に関わる遺伝子が含まれており、ES 細胞ではこれらの遺伝子も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。

次に、ES 細胞で得られた T-DMR 情報を基に、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)ならびにその前駆細胞と ES 細胞とのメチル化プロフィールが比較された。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 細胞で高メチル化傾向にあった。このように、ES 細胞と iPS 細胞は近似した DNA メチル化プロフィールを示すことが世界で初めて証明された。さらに、肝細胞由来の iPS 細胞と胎児繊維芽細胞由来の iPS 細胞の DNA メチル化プロフィールも得られた。両 iPS 細胞の DNA メチル化プロフィールはごく近似しており、クラスター解析の結果、ES 細胞の DNA メチル化プロフィールとは異なったクラスターを形成した。一方で、肝臓由来 iPS 細胞では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など、胎児繊維芽細胞由来 iPS 細胞にはない特徴も浮き彫りにされた。これらの T-DMR 情報から、iPS 細胞には依然として前駆細胞のエピジェネティクス情報を持ち越しているゲノム領域が存在することが示唆された。

以上、本論文では、新たな DNA メチル化解析法 D-REAM を確立し、DNA メチル化プロフィールが、遺伝子発現制御の分子基盤になっていることを明らかにした。そして、DNA メチル化プロフィールが細胞種固有であることを利用して、ES 細胞や iPS 細胞などの同定や評価に利用できることを証明した。これらの発見は、細胞・組織のゲノムによる制御の基礎として重要であるばかりでなく、応用科学にも重要な視点を提供している。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。