

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 前田 千晶

哺乳類の個体を構成する細胞は、種類や分化段階に応じて発現する遺伝子と発現しない遺伝子を使い分けている。エピジェネティクス系は、ゲノム DNA から、必要なあるいは不要な情報を選択し、記憶する仕組みである。ヒトやマウスでは、雄の細胞は XY 染色体を持つのにに対し、雌の細胞は 2 本の X 染色体をもつ。性染色体からの遺伝子発現は雌雄によって差が生じるが、染色体の違いとゲノム情報の使い分け、雌雄の表現型の確立については多くの部分が未知である。本論文では、発生と雌雄差における DNA メチル化について研究したもので、以下の 3 章より構成されている。

第 1 章では、ヒストン *H1foo* 遺伝子の卵特異的非メチル化領域に焦点をあてたもので、生殖細胞の発生と性差のエピジェネティクス研究である。哺乳類では、その生殖細胞形成において、雌雄によって異なるヒストン H1 を使い分けている。ヒストン H1foo は、雌の生殖細胞に特異的なヒストンサブタイプであり、卵核胞期から受精後の 2 細胞期までの限られた時期にのみ発現する。しかし、*H1foo* を発現していない胚性生殖細胞 (EG 細胞) に DNA メチル化阻害剤である 5-アザデオキシシチジンを添加したところ発現が上昇した。さらに、成体マウスの未受精卵、精子、および脳や肝臓を含む体細胞で *H1foo* 遺伝子上流域の DNA メチル化状態を調べた結果、未受精卵でのみ低メチル化状態にある、組織特異的メチル化可変領域 (Tissue-dependent and differentially methylated region: T-DMR) が見つかった。胎仔においては、生殖細胞、体細胞のいずれにも *H1foo* の発現は見られず、体細胞では胎生 9.5 日からすでに雌雄ともに T-DMR の高メチル化が見られた。これに対し、胎生 9.5 日から胎生 15.5 日において雌雄の生殖細胞はともに低メチル化状態にあった。さらに、胎生 18.5 日において雄の生殖細胞でのみ T-DMR が高度にメチル化され、精子と同等の高メチル化状態を示した。これらのことから、*H1foo* 遺伝子領域においては生殖細胞系列と体細胞系列では DNA メチル化による強固な遺伝子抑制状態が形成される時期が異なることがわかった。さらに、雌の生殖細胞では、発生段階のどの時期においても *H1foo* T-DMR は低メチル化状態を示し、受精→生殖細胞発生→受精の繰り返しの生命現象で常に非メチル化状態で維持されていることが明らかになった。

D-REAM 法は、メチル化感受性制限酵素の認識部位のメチル化状況をタイリングアレイのシグナルに反映させることができる。第 2 章では脳における雌雄差を明らかにすることを目的とし、DNA メチル化プロフィールが D-REAM 法により解析された。マウスの約 3 万遺伝子のプロモーター領域をタイリングしたアレイを用いて解析を行い、成体マウス脳で雌雄間で異なったメチル化状態にある T-DMR 情報を得た。X 染色体上には X 染色体不活性化の影響下の領域が多数検出されたが、それ以外にも、領域によってメチル化傾向に差が検出された。X 染色体にも T-DMR が存在すること、しかも、雌雄間で異なった DNA メチル化状態にあることが発見された。X 染色体と Y 染色体のゲノム構成の違いに加えて、少なくとも X 染色体のエピジェネティクス状況が雌雄間で異なった領域が存在するのである。

第3章は *MeCP2* 遺伝子欠損マウスの脳の DNA メチル化解析である。Rett 症候群は、約 1 万 5 千人に 1 人に発症する神経発達疾患で、患者の約 9 割は X 染色体上の *MeCP2* 遺伝子に変異を持つ。男児の患者は出生前後に死亡する割合が高いのに対し、変異をヘテロにもつ女児は発症が遅く、出生前後は見かけ上正常である。*MeCP2* 欠損マウスの雄は生後約 2ヶ月で発症し死に至るのに対し、雌は症状が軽く多くは寿命を全うする。神経症状発症後の *MeCP2* 欠損雄マウスおよび野生型雄マウスの脳を用いて D-REAM 解析を行い、ゲノムワイドな DNA メチル化情報を取得した。興味深いことに、成体の *MeCP2* 欠損マウス脳は、多くの遺伝子領域で正常胎仔の脳(胎生 14.5 日齢)と共通したエピジェネティクス状況にあることが示唆された。両者に共通する T-DMR には、高メチル化領域、あるいは、低メチル化領域が複数同定されたのである。これらの領域を 6 個体の欠損雄マウス脳およびコントロールで解析した結果、個体差が存在することが分かった。これらの結果は、雌雄の *MeCP2* 欠損マウスの病態・発症時期が個体により異なっていることと符合する。*MeCP2* 欠損アレルをヘテロにもつ雌マウスでは、これらの領域にメチル化異常は検出されなかった。したがって、*MeCP2* 欠損マウスは DNA メチル化が異常を呈すること、さらに、胎仔型に留まっていることが明らかになった。最後に、分裂停止後の神経細胞とその他の細胞をセルソーターを用いて分画し、メチル化解析を行った結果、同定された領域についていずれもメチル化の差が検出されたことから、DNA メチル化異常は少なくとも神経細胞に由来することが示された。また、胎仔脳 T-DMR をもつ遺伝子と *MeCP2* 欠損 T-DMR をもつ遺伝子を全体として比較すると、CpG アイランドの有無や Gene Ontology 解析において高い共通性が見いだされた。以上のことから、*MeCP2* 欠損動物では、成体脳のエピゲノムは胎仔型に近いことが示唆される。この発見は、Rett 症候群の病態成立の新たな視点となる。

以上、本論文では発生過程における DNA メチル化変化の雌雄差が浮き彫りとなり、疾患における雌雄差などを考える上でも重要な知見が得られた。これらの発見は雌雄の遺伝子制御の基礎として重要であるばかりでなく、疾患のメカニズムを知る上で貴重で、応用研究にも新た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。