

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名       リム フィ ウェン      

エピジェネティクスは、遺伝子配列の変化無しに次世代細胞に伝達しうる遺伝子機能を研究する学問領域で、哺乳類を含む多細胞生物の発生の基礎になっている。エピジェネティクス系は、主に DNA やヒストン修飾により制御されており、その破綻はがんを含む慢性疾患の原因になっていることが明らかになりつつある。様々な慢性疾患は、遺伝子の機能に焦点を当てた研究が行われてきたが、さらに広範囲にわたる研究により、エピジェネティクス系の異常ががんや精神遅滞、発育異常などの病気を引き起こしうるということが分かってきたのである。エピジェネティック異常の治療薬は、医療分野において大きな可能性をもたらすことを示している。

哺乳類(マウス、ヒト)では5種類のDNAメチル基転移酵素(Dnmt)の存在が報告されている。単独で酵素活性を持つのは Dnmt1、Dnmt3a および Dnmt3b である。5-aza-2'-deoxycytidine (5azadC)はDnmt1阻害剤で、がんの治療薬としても利用されはじめた。その背景には5azadCはゲノム全体のDNAメチル化状況に影響を与えると考えられていることにある。ところが、先に、各Dnmt欠損細胞の遺伝子領域と非ゲノム繰り返し領域のDNAメチル化状況を解析した実験から、遺伝子領域と非遺伝子領域とは各Dnmtの関与が異なっていることが判明している。そうすると、5azadCのDNAメチル化への影響も異なって不思議は無い。しかし、従来5azadCの効果は繰り返し領域を主体に研究されており、遺伝子領域と区別して解析した例は少ない。本論文は、5azadCのDNAメチル化に与える影響が、遺伝子領域と繰り返し配列を主体とする非遺伝子領域では異なるのか否かを調べたものである。

第1章では、NIH/3T3細胞を用いて6遺伝子領域(*Oct-4*, *Sall3*, *Per1*, *Clu*, *Dpep1*, *Igf2r*)と2非遺伝子領域(マイナーサテライト、内在性Cタイプウイルス)に対する5azadCの影響を調べている。様々な濃度(0.001~5 $\mu$ M)の5azadCでNIH/3T3細胞を72時間あるいは96時間培養した場合には、非遺伝子領域はいずれも濃度依存的に脱メチル化された。特に1と5 $\mu$ Mの高濃度では強く脱メチル化されていた。したがって、従来の報告にあるように、5azadCは脱メチル化を促進することが確認された。ところが、遺伝子領域でのメチル化レベルは0.1 $\mu$ Mの時のみ低下したが、濃度を増しても脱メチル化は亢進せず、むしろ非処置細胞と殆ど変わらないレベルに留まることが明らかになった。この遺伝子領域の5azadCへの抵抗性は、CpG配列が豊富な遺伝子領域および少ない遺伝子領域でも同じ傾向が見られた。このことから、遺伝子領域では反復配列と異なり5azadCに対して抵抗性を示すことが初めて明らかになった。

多くの場合、エピジェネティクス制御下にある遺伝子発現は5azadCとヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤で活性化される。このことから、がん治療の目的でDNA脱メチル化阻害剤とHDAC阻害剤の組み合わせが提唱されている。上記のように、低濃度(0.1 $\mu$ M)の5azadCによっては遺伝子領域が部分的に脱メチル化される。その際、当該遺伝子は発現が誘導されることが観察された。ところが、5azadCによってヒストンH3のアセチル化は亢進せず、低下することが明らかになった。一方、ヒストンH3K4のメチル化が起こり遺伝子発現の亢進と矛盾しないことが明らかに

なった。さらに面白いことに、遺伝子発現抑制型のヒストン H3K9 のメチル化亢進が見られた。

第2章では *Tgfb1* 遺伝子領域に焦点を絞り、5azadC が与える影響が解析された。*Tgfb1* 遺伝子は角膜の発生に不可欠な分泌タンパク質をコードし、CpG 配列の豊富な、いわゆる CpG アイランドを有する。また、*Tgfb1* の変異はがんの発生を伴い、がん治療のエピジェネティクスターゲットとしての報告もある。第1章と同様に、NIH/3T3 細胞において、5azadC 濃度が  $0.1 \mu\text{M}$  の時と比較して  $1 \mu\text{M}$  の時にはこの領域での脱メチル化に対する抵抗性が見られた。また、5azadC によって H3K4 メチル化の増加に伴い遺伝子発現が亢進しており、H3K9 メチル化の増加が引き起こされた。

ヒストン H3K9 メチル基転移酵素である G9a の欠損細胞では、*Tgfb1* 遺伝子領域の DNA メチル化レベルが減少しており、5azadC による抵抗性も低下していた。一方、同じくヒストン H3K9 メチル基転移酵素である Suv39h の欠損細胞では、DNA メチル化レベルに影響を与えることは無かった。以上を考え合わせると、5azadC に誘導される脱メチル化抵抗性には、G9a によるヒストン H3K9 のメチル化が関与することが示唆された。

以上、本論文では様々なゲノム領域を対象に研究し、5azadC 処理は非遺伝子領域では容易に脱メチル化を誘導できるが、遺伝子領域では脱メチル化が起きにくいことを明らかにした。5azadC に対する抵抗性には G9a の関与が示唆され、また、部分的な脱メチル化による遺伝子発現の増加には H3K4 メチル化が伴うことも明らかにした。これらの発見は遺伝子制御の基礎として重要であるばかりでなく、制がん剤としての DNA 脱メチル化剤開発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。