

## 論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 19 年度博士課程 入学

氏名 早川 晃司

指導教員 塩田 邦郎

### 論文題目 遺伝子ファミリーを基にした組織・細胞特異的 DNA メチル化プロファイル に関する研究

#### 緒言

高等生物が有する遺伝子の多くは遺伝子重複の過程を経て形成されたファミリー遺伝子である。同じファミリーに属する遺伝子の中で発現パターンが異なるものが多く存在する。これは遺伝子ファミリーに属する遺伝子それぞれが進化の過程で異なった制御機構を獲得したことを示している。

エピジェネティック機構のひとつである DNA メチル化はゲノムに起こる唯一の化学修飾である。これまでに、多くの遺伝子が組織特異的にメチル化されうる領域(T-DMR)を持ち、それらが組織・細胞種に依存した遺伝子発現に寄与していることが明らかとなっている。

従来の遺伝子ファミリーを対象とした研究は遺伝子配列情報を利用した解析が主で、種差の規定や進化時間予測のためのものである。遺伝子ファミリーを主役にした解析に T-DMR 情報を組み合わせることで、ファミリー遺伝子の使い分け機構だけでなく、発現制御の進化的側面にもアプローチできると考えられる。本研究では T-DMR を遺伝子ファミリー単位で探索し、同一ファミリーに属する遺伝子間における T-DMR メチル化パターンの差異と、それに寄与する要因を解析した。遺伝子ファミリーはゲノム上の一部でクラスターを形成するものと、ゲノム上に散在するもの(非クラスター)とに大別される。第一章ではクラスターを形成するプロラクチン遺伝子ファミリーの DNA メチル化解析を行った。第二章ではクラスターおよび非クラスター遺伝子ファミリーそれぞれの

T-DMR メチル化パターンの特徴を解析した。また第三章ではファミリー遺伝子の一つである卵子特異的リンカーヒストン H1foo が DNA メチル化プロファイルに与える影響を解析した。

## 第一章 プロラクチン(*Prl*)遺伝子ファミリーの DNA メチル化解析

マウスでは、*Prl*の重複によって派生したと考えられる *Prl* 様遺伝子が存在し、それらは 13 番染色体上で約 1 Mb の *Prl*ファミリー遺伝子クラスターを形成している。*Prl*は主に下垂体で発現するのに対し、*Prl*様遺伝子は主に胎盤で発現している。そこで DNA メチル化解析法 D-REAM およびバイサルファイト法を用い、胎生 14.5 日胎盤および成体脳と肝臓における *Prl*ファミリー遺伝子の転写開始点近傍の DNA メチル化状態を比較した。

その結果全ての *Prl*ファミリー遺伝子に T-DMR が見出され、さらにそれらは、脳と肝臓に比べ胎盤でのみ低メチル化のもの(A 群)と、脳、肝臓、胎盤の順で低メチル化のもの(B 群)とに分類できることが分かった。祖先型遺伝子 *Prl*のみ 3 組織すべてで高メチル化状態であった。A 群はセントロメアからテロメア方向に、B 群は逆方向にコードされる遺伝子であった。また同じ群の遺伝子は cDNA 配列をもとに作成した系統樹で互いに近い位置関係にあった。以上の結果より、*Prl*ファミリー遺伝子の DNA メチル化パターンは、ゲノム上でのコードされる方向に相関が見られた。このことより、*Prl* 遺伝子ファミリーにおいて、遺伝子間の異なった DNA メチル化パターンはコードされる方向が逆向きになるように重複が起こった際に獲得されたことが考えられた。

## 第二章 遺伝子ファミリーにおける T-DMR メチル化パターンの特徴

第一章で解析した *Prl*ファミリー遺伝子はゲノム上でクラスターを形成し、CpG 頻度の低い、げっ歯類でのみ認められる遺伝子群である。第二章では、*Prl* 遺伝子ファミリーとはゲノム上での分布様式、CpG 頻度、種特異性の点で異なる遺伝子ファミリーの T-DMR メチル化パターンの探索を行った。*Rhox*(クラスター、CpG 頻度高、ヒトとマウス共通)、リンカーヒストン H1(一部クラスター、CpG 頻度高、哺乳動物共通)、シアル酸転移酵素(*St*)(非クラスター、CpG 頻度高、哺乳動物共通)の 3 つの遺伝子ファミリーの DNA メチル化状態を D-REAM 法を用いて解析した。

D-REAM の結果、いずれの遺伝子ファミリーも T-DMR を有していることが明らかとなり、さらに、それぞれの遺伝子ファミリーにおける DNA メチル化パターンは、*Rhox* で 3 群、*H1* は 4 群、*St* は 4 群に分類することができた。ゲノム上の位置とメチル化パターンの関係は、*Rhox* ではメチル化パターンによって 3 区画に分かれ、*H1* においてはクラスター内に位置する遺伝子は同様のメチル化パターンを示した。また、メチル化パターンと cDNA 配列の相同性を比較した結果、3 つすべての遺伝子ファミリーにおいて同じメチル化パターンを示す遺伝子は互いに高い相同性を示すことが明らかとなった。以上の結果より、同じファミリーに属する遺伝子間の異なる T-DMR メチル化パターンの獲得には重複後のゲノム上の位置およびエクソンの配列が関連していることが示唆され

た。

### 第三章 卵特異的リンカーヒストン H1foo の DNA メチル化プロファイル形成への関与

すべての細胞種でいずれかの H1 ファミリー遺伝子が発現している。卵子特異的 H1foo は T-DMR を有し、そのメチル化により卵子以外での発現が抑制されている。第二章の解析より、他の H1 ファミリー遺伝子も T-DMR を有することが明らかとなった。T-DMR のメチル化による厳しい発現抑制は、発現組織以外での発現が不利であるために獲得された制御機構であるとも考えられる。そこで第三章では、H1foo の発現が DNA メチル化によって不活性化されている ES 細胞における H1foo 強制発現の影響を解析した。クロマチン構造と DNA メチル化状態は相互に影響しあっている。このことから、クロマチンモデリング因子の H1foo が ES 細胞の DNA メチル化状態に与える影響に注目し解析を行った。

189 領域の DNA メチル化状態をバイサルファイト法で解析した結果、コントロールの ES 細胞 (Control-ES) と比べ H1foo 発現 ES 細胞 (H1foo-ES) で低メチル化領域が 5 ヶ所、高メチル化領域を 3 ヶ所同定した。さらに卵子特異的遺伝子群においては *Nobox*、*Sohlh2* と *Zp2* に H1foo-ES において低メチル化領域が存在した。これら 11 領域のメチル化状態は卵子のメチル化状態と同様であった。クロマチン免疫沈降法により、これらの領域に H1foo が結合していることも明らかになった。また、ES 細胞を胚様体 (EB) に分化させたところ、Control-ES では分化誘導 10 日後に卵黄嚢様の構造が形成されたが、H1foo-ES では形成されなかった。さらに EB 間で上記と同じ 189 領域のメチル化状態の比較を行った。その結果、Control-ES 由来 EB では Oct4-Nanog 標的遺伝子群の 30 遺伝子においてメチル化が亢進するのに対し、H1foo-ES 由来 EB では低メチル化のままであった。以上の結果より、卵子特異的リンカーヒストン H1foo の発現により非発現細胞である ES 細胞の DNA メチル化状態が変化する領域が存在することが明らかとなった。さらに、H1foo 発現下では EB への分化が抑制された。また、H1foo 発現 ES 細胞のメチル化状態は卵子のメチル化パターンと近かったことから、H1foo は卵子特有の DNA メチル化プロファイル形成に関与することが示唆された。

### 総括

本研究は遺伝子ファミリー単位で T-DMR の探索を行い、T-DMR パターンの特徴を明らかにした。同じファミリーに属する遺伝子間においても T-DMR のメチル化パターンが異なっていたことから、ファミリー遺伝子の使い分けへの DNA メチル化の関与が示唆された。さらにファミリー遺伝子間の異なった T-DMR メチル化パターンの獲得には重複後のコードされる方向とゲノム上の位置が関係していることが考えられた。同一ファミリーに属する遺伝子において同じメチル化パターンのものは cDNA 配列の高い相同性を示した。このことから、進化の過程でファミリー遺伝子それぞれ

れの異なった機能と DNA メチル化パターンは同調して獲得されてきたと考えられる。第三章の解析から、本来メチル化により発現抑制されているファミリー遺伝子を非発現細胞に導入したところ、その細胞の性質は損なわれた。このことから、T-DMR によるファミリー遺伝子の使い分けは細胞・組織の性質の形成に関与していることが示唆された。

これまで、遺伝子ファミリーにおける組織特異的な発現パターンを決定する制御機構の進化的な成り立ちを、シス配列情報を用いて解析する試みがなされてきた。しかし、各遺伝子のシス配列の組み合わせが複雑なため理解が困難であった。本研究は遺伝子ファミリーを主役にした解析に DNA メチル化情報を組み合わせることで、制御の進化的側面に貢献できることを示した。さらに、同一ファミリーに属する遺伝子間の使い分け機構という点で進化学分野のみならず、分子生物学分野にも寄与できることも示した。大多数の遺伝子はいずれかの遺伝子ファミリーの一員であることから、遺伝子ファミリー単位での DNA メチル化解析は様々な生命現象や疾患の広い理解につながる可能性を見出した。