

## 論文内容の要旨

応用動物科学専攻

平成20年度博士課程 進学

村本 玄紀

指導教員 塩田邦郎

### 論文題目

ゲノム転移因子と胚性幹細胞エピゲノム構築に関する研究

### 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、またはこの現象を研究する学問分野」として定義される。近年、特にヒト、マウスのゲノム配列が解読されて以降、精力的に研究が進められ、「エピジェネティクス」に関わる様々な分子機構が明らかにされてきた。エピジェネティックな分子機構のなかで、DNAメチル化およびヒストン修飾は、ゲノムの複製時において、複製に共役して修飾情報を娘細胞へと伝える機構があることから、最も根本的なエピジェネティック情報であると言える。DNAのメチル化修飾とは、哺乳類ゲノムにおいては、主にシトシンとグアニンが並び合った配列（CpGと配列と呼ばれる）のシトシン塩基の5位にメチル基が付加される化学修飾である。一方ヒストン修飾とは、クロマチンを構成するコアヒストンH2A、H2B、H3、H4が翻訳後修飾を受ける現象である。多くのヒストン修飾は、ヒストンテールと呼ばれるヒストンのN端におこる。これまでにアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化など様々な修飾が知られている。

DNAメチル化プロファイルとは、ゲノム全体に存在するT-DMRのメチル化状態の組み合わせのことである (Shiota, 2004)。各T-DMRのメチル化状態は細胞・組織の種類に依存して異なっていることから、それらを組み合わせたDNAメチル化プロファイルは細胞・組織に固有である。

ES細胞は、胚盤胞の内部細胞塊より樹立された培養細胞である ( )。ES細胞は分化多能性を有し、胎仔を構成する全ての種類の細胞へ分化する能力を有する。分化多能性には様々なクロマチン修飾因子や、転写因子が関わるということが明らかになっている。例えば、DNAメチル基転移酵素 (DNMT) を欠損したES細胞は、分化する能力を持たない。

哺乳類ゲノムの特徴として、反復配列が約半分をしめていることが挙げられる。哺乳類ゲノム中の反復配列として最もゲノム中に多いものはトランスポゾンである。哺乳類ゲノム中のほとんどの転移因子はメチル化修飾がなされている。転移因子はDNAメチル化修飾により転写が阻害されることから、生体中においてもDNAメチル化修飾はこれらの因子の転写制御に関わると考えられている。このことから、DNAのメチル化は、転移因子というゲノム中の「寄生因子」に対する防御システムであるという考えが提唱されている。

本研究は、ES細胞特異的なT-DMR焦点を当て、T-DMRとトランスポゾンの関係を明らかにすることを目的とする。第一章において、遺伝子プロモーター領域のT-DMRについて、周囲のトランスポゾンの分布を解析した。第二章においては、第一章の結果をもとに染色体全域を対象にして、T-DMRとトランスポゾンの関係を明らかにした。

## 第一章

遺伝子プロモーター領域に焦点を当て、ES細胞で低メチル化状態にあるT-DMRを有する遺伝子 (ES hypo遺伝子) 周辺のゲノム配列を解析した。本章における研究では、反復配列のな

かでもSINE配列にのみ認められる傾向として、ES hypo遺伝子周辺領域において密度が高いことを明らかにした。ECATに着目した解析からも、ECAT遺伝子のなかでES細胞において低メチル化状態にあるT-DMRを持つものはSINE配列密度の高い領域に存在することを示した。さらに、ES細胞に必須な転写因子の標的遺伝子に対する解析から、周囲のSINE配列密度が比較的高い標的遺伝子のなかでもES低メチル化T-DMRを有する遺伝子の周囲は有意にSINE配列密度が高かった。ES hypo遺伝子周囲のSINE配列は、遺伝子の転写因子を中心とする分布を示した。このことは、SINE配列が積極的にES hypo遺伝子の周辺に増えていったことを示唆している。以上の結果より、周囲のSINE配列密度が高いことはES hypo遺伝子に認められる特有の性質であることが示唆された。

## 第二章

染色体全領域におけるES細胞特異的メチル化修飾と反復配列の関係を明らかにすることを目的に、第6、8、18染色体全域を対象としたD-REAM解析を行った。その結果、同定したES細胞特異的低メチル化T-DMR (ES hypo T-DMR) には、周囲のSINE配列密度が高く、LINE配列密度が低い傾向が認められた。ES hypo T-DMRの約6割がSINE配列密度の高い上位2割の領域に存在し、約8割がSINE配列密度の高い上位4割の領域に存在した。このES hypo T-DMRと周辺領域のSINE密度の関係は遺伝子領域・非遺伝子領域ともに認められたことから、ES hypo T-DMRは遺伝子領域・遺伝子間領域を問わず、SINE配列が豊富なゲノム領域（ドメイン）に集中していることが明らかになった。SINE配列密度の高いドメインに着目した解析から、ES hypo T-DMRのなかでもSINE配列密度の高いドメインに存在するものほど転写に関連するクロマチン関連因子がよく結合し、転写が活性な領域にみられるヒストン修飾が認められ、さらに分化後には転写の不活性な核内領域である核膜との相互作用頻度が上昇する傾向を示した。以上より、ES細胞特異的な低メチル化は、SINE配列密度の高いドメイン中のゲノム領域を主な標的とする

エピジェネティック制御機構であることが明らかになり、さらに、SINE配列密度の高いドメインにおいてクロマチン関連因子の結合・ヒストン修飾・核内における位置という他の機構とともにES細胞特異的なエピジェノム形成に関わることが示唆された。

## 総合討論

哺乳類ゲノムには、細胞・組織特異的にメチル化される領域 (T-DMR) が多数存在する。一方で、ゲノムの半数は、どの細胞組織においてもメチル化修飾をうけるトランスポゾンによって占められている。T-DMR とトランスポゾンがどのように染色体上で存在しているのかは、ゲノム全体のエピジェネティック制御を理解するために重要である。本研究では、第一章における遺伝子プロモーター領域に存在する ES 細胞特異的 T-DMR に焦点を当てた解析から、ES 細胞特異的低メチル化 T-DMR(ES hypo T-DMR)をプロモーターに有する遺伝子周辺領域においては、トランスポゾンの SINE 配列が有意に多く存在することを明らかにした。SINE 配列の占める割合は少なくとも転写開始点前後 300 kb に渡り高い傾向にあった。さらに第二章において染色体全域を対象にした解析により、ES hypo T-DMR は遺伝子領域、遺伝子間領域に関わらず SINE 配列密度が高いゲノム領域に存在することが明らかになった。SINE 配列が占める割合が高い上位 4 割のゲノム領域に、8 割の ES hypo T-DMR が存在した。他の種類のトランスポゾンである LINE 配列や LTR 配列には ES hypo T-DMR 周辺に多く存在する傾向はなかった。これらの結果から、染色体全域に存在する ES hypo T-DMR の特徴として、SINE 配列が多いゲノム領域に偏って存在することを明らかにした。