

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 熊谷 勝義

遺伝子領域には細胞の種類によって DNA のメチル化状態が異なる、DNA メチル化可変領域（組織・細胞種依存的メチル化可変領域、tissue-dependent and differentially methylated region: T-DMR と略）が存在する。DNA メチル化やヒストン修飾系には、それぞれに対応する酵素（DNA メチル転移酵素、ヒストンアセチル化酵素等）が存在しており、DNA 脱メチル化に関してもゲノム修復系酵素の関連した研究が盛んに行われている。しかし、これらの研究はゲノム全域の制御系としては成立するが、領域特異的に限定されたメチル化あるいは脱メチル化の制御系としては無理がある。

T-DMR のメチル化制御に関して、Sphk1 遺伝子領域の研究で、非コード・アンチセンス RNA が T-DMR のメチル化を誘導することが報告されている。その場合、アンチセンス RNA は配列特異性が期待できるので、T-DMR 制御系としては魅力的である。なるほど、外来ゲノムや転移因子などにより配列特異的な DNA メチル化が誘導されてもおかしくない。しかし、細胞特異的な DNA メチル化プロファイルを形成するためには、領域特異的なメチル化と脱メチル化が必要となる。しかし、脱メチル化を誘導するアンチセンス RNA に関する報告は無い。

本論文は内在性非コード・アンチセンス RNA (ASncRNA) による遺伝子領域 T-DMR の脱 DNA メチル化制御に関するもので、内在性 ASncRNA の探索、ASncRNA によるエピジェネティック制御、および ASncRNA を標的とした誘導型 shRNA コンストラクト導入による個体レベルの研究による以下の三章から構成されている。

第一章では、胚性幹細胞である ES 細胞の多分化能維持や細胞分化および個体形成に重要な遺伝子群に注目し内在性 ASncRNA が探索された。まず、ES 細胞で特異的に低 DNA メチル化状態にある遺伝子領域情報を基に、Sox2 遺伝子および Nanog 遺伝子領域が探索され、それぞれの遺伝子領域に ASncRNA が発見された。これらの ASncRNA はセンス mRNA の発現が高い ES 細胞で発現しており、13.5 日胚では発現が低いこと、またそれぞれに複数の終止コドンが見られることなどが確認された。過去に報告されていた Sphk1 遺伝子領域の ASncRNA は、Sphk1 遺伝子（センス RNA）が発現している細胞では、発現が抑制されており、一連の研究から DNA メチル化を誘導しているとされている。ところが、Sox2 遺伝子および Nanog 遺伝子領域の ASncRNA は逆の発現様式を示していることになるため、これらの ASncRNA は、脱メチル化を誘導している可能性が考えられた。本章ではさらに ES 細胞と分化系としての神経前駆細胞塊の比較から、さらに 6 遺伝子 (Gli3, Foxj2, Yy1, Rfx1, Dlx4, Sal14) の遺伝子領域にも、発現パターンから推測して脱メチル化の誘導に促進的に作用する可能性がある ASncRNA が発見された。

第二章では、上記の ASncRNA のうち、Sa114 遺伝子領域の ASncRNA に焦点をあて研究が進められた。Sa114 は ES 細胞の多分化能維持および増殖に関与する転写因子である。まず、Sa114 mRNA を発現する ES 細胞と抑制された栄養膜幹 (TS) 細胞との比較解析が行われ、ASncRNA は ES 細胞で高発現していることが示された。また、ES 細胞では Sa114 遺伝子の 5' 上流およびイントロン 1 に存在する T-DMR は低メチル化で、逆に TS 細胞では高メチル化であることも明らかになった。並行して、ASncRNA の全長解析が試みられた。その結果、Sa114 遺伝子領域の ASncRNA はデータベース登録データよりさらに長く、T-DMR をカバーしていること、終止コドンの出現頻度が高くタンパク質をコードしていないこと、さらに、poly (A) が付加されて無いことも示された。さて、ASncRNA が脱メチル化に関与するとすれば、発現を抑制することで高メチル化を誘導できるはずである。なるほど、ES 細胞における RNAi による内在性 ASncRNA のノックダウンは Sa114 遺伝子領域での特異的高メチル化を誘導した。したがって、発見された ASncRNA は、配列特異的に作用し脱メチル化を誘導するか、あるいは低メチル化を維持していると考えられた。

第三章は、Sa114 ASncRNA を標的とした誘導型 shRNA コンストラクトの導入によるトランスジェニック (Tg) マウスモデルの作製である。まず、マウス初期胚培養下で、内在性 Sa114 ASncRNA のノックダウン (Sa114 ASncRNA KD) により、胚盤胞期胚への発生遅延など、先に報告されている Sa114 null 型欠損胚に類似した異常が観察された。さらに、誘導型の内在性 Sa114 ASncRNA KD Tg マウス 8 系統の樹立に成功した。Sa114 ASncRNA KD Tg マウスでは、顕著な形態異常が観察された。また、Tg マウス由来 ES 細胞では同 ASncRNA のノックダウンによりメチル化が亢進することも示された。

本研究の結果は、様々な遺伝子の T-DMR 領域には脱メチル化を誘導あるいは維持している ASncRNA が存在しており、発生制御や細胞の分化の基盤になっていることを示している。また、これらの ASncRNA の発現を促進・抑制することで、エピジェネティック異常の病態モデル動物の樹立が可能なが示されている。

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、病態モデル作成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。