

# 論文の内容の要旨

平成 22 年度博士課程 進学

氏名 高杉 征樹

指導教員 塩田 邦郎

論文題目 核内ミトコンドリア遺伝子の組織および性依存的な DNA メチル化制御

## 緒言

哺乳類ゲノム上には可変的な DNA メチル化修飾を受ける領域が広範に存在しており、様々な細胞機能の調節に関わっている。これまで細胞の分化や癌化など、遺伝子発現パターンの変化が全ての常染色体に及ぶような場合において、DNA のメチル化パターンもゲノム全体に渡って書き換えられている事が明らかにされている。一方で、ミトコンドリア機能と性差という、いずれも薬理作用や疾患との関わりの深い重要な問題を DNA 機能と関連づけて理解する試みにおいては、それぞれ mtDNA や性染色体といった特定の一部の DNA 領域が注目を集め、常染色体上の可変的 DNA メチル化修飾による制御はほとんど調べられてこなかった。同一個体中の異なる細胞種・組織は mtDNA や性染色体を含めて基本的に同じ配列の DNA を有していながら、ミトコンドリア機能には組織および性依存性が認められており、それらの制御には、大部分の核内ミトコンドリア遺伝子をコードしている常染色体の可変的 DNA メチル化修飾に関わっている可能性が考えられる。

そこで本論文第一章では、まずマウスの肝臓、脳、心筋の比較から核内ミ

トコンドリア遺伝子の組織依存的 DNA メチル化修飾の網羅的同定と、同定された T-DMRs (Tissue-dependent and differentially methylated regions) のプロファイリングを行った。第二章では核内ミトコンドリア遺伝子である *Hsd3b5* と *Cyp17a1* を含む 6 つの遺伝子について性依存的 DNA メチル化修飾状態を詳細に調べ、さらにそれらの性依存的 DNA メチル化修飾状態の形成メカニズムについても解析を行った。

## 第一章 核内ミトコンドリア遺伝子の組織依存的 DNA メチル化修飾の解析

ミトコンドリアに含まれる mtDNA はその傷害の受けやすさから、疾患発症機序解明の観点から注目を浴びてきたが、一方で近年ではミトコンドリアを構成するタンパクの大部分が核内 DNA にコードされている事が明らかにされてきた。mtDNA と異なり、核内 DNA はエピジェネティック制御下にある。ミトコンドリア機能は組織・細胞種により異なっており、その基本的な代謝機能の高低の他、肝臓では特に高い解毒機能を有するなどの差異が認められている。核内ミトコンドリア遺伝子情報のエピジェネティック制御に基づく組織依存的な利用がミトコンドリア機能の組織依存性を支えている可能性が考えられる。しかしながらこの可能性のゲノムワイドなエピジェネティック解析による検討はこれまでなされてこなかった。

そこで、マウスの肝臓、脳、心筋の DNA メチル化プロファイルを用いた D-REAM 法により解析し、核内ミトコンドリア遺伝子の転写開始点近傍の T-DMR の網羅的同定を行った所、899 個の核内ミトコンドリア遺伝子中 636 遺伝子に T-DMR が存在する事が明らかにされた。転写開始点下流領域の T-DMR における低メチル状態は遺伝子発現と相関しており、これらの T-DMR が核内ミトコンドリア遺伝子の発現制御に関わっている事が示唆された。

## 第二章 性依存的 DNA メチル化修飾とその形成メカニズムの解析

細胞機能や薬理作用、疾患の発症率には性差が存在しており、応用上の観点からもその分子生物学的な理解を進める事は重要である。これまでは主に性染色体や性ホルモンの働きによる性差の説明が試みられてきた。一方で最近では、性染色体以外でも非常に多くの遺伝子の発現が性依存的である事が明らかにされている。

肝臓では、薬物代謝に関わる酵素群の発現に性差が生じている事が良く知られている。肝臓のこうした性差の形成には、性依存的な成長ホルモンの分泌パターンが重要であるが、成長ホルモンの作用が DNA メチル化修飾を性依存的に制御

している可能性は調べられてこなかった。

そこで、性依存的メチル化状態のスクリーニング解析から明らかにされた、核内ミトコンドリア遺伝子である *Hsd3b5* と *Cyp17a1* を含む 6 つの遺伝子の性依存的メチル化状態について、それらが成長ホルモンによる制御を受けている可能性を調べた。解析した DNA 領域において、性差は 16 週齢時点では認められたが、成長ホルモンの分泌パターンに性差が確立し始める 4 週齢時点では認められず、その後主に一方の性で徐々に低メチル化が進んで行く事でメチル化状態の性差が形成される事が明らかにされた。雄マウスに成長ホルモンを持続的に投与し、血中成長ホルモン濃度の変動パターンを雌に近づけさせると、本来雄で優勢な低メチル化変化は抑制され、逆に本来雌で優勢な低メチル化変化は促進された。性依存的、および性非依存的な進行性の低メチル化変化が、*de novo* DNA メチル化酵素の発現低下に引き続き起こっており、かつそれらの領域におけるメチル化状態は肝臓の再生を通じて元のレベルに維持されていないことから、進行的な低メチル化は *de novo* DNA メチル化酵素の発現低下の寄与を受け、低メチル化の起こる領域の一部が成長ホルモンにより制御されており、その事が肝臓における性依存的な DNA メチル化状態の形成に重要である事が示唆された。

## 総合討論

本研究より、核内ミトコンドリア遺伝子の DNA メチル化修飾は組織や性、年齢といった要素に依存した制御を受けている事が明らかにされた。さらに本研究は、核内ミトコンドリア遺伝子を含め、DNA メチル化修飾の性差が *de novo* DNA メチル化酵素の発現低下に伴う DNA メチル化修飾維持能力の低下を受けて徐々に形成されていく可能性を示唆した。

ヒトの年齢依存的な多くの疾患において、ミトコンドリア機能の異常が報告されている。加齢に伴い DNA に変異が蓄積していく事以外に、本研究で明らかにされたメチル化可変領域の制御の変化や差異が、疾患の発症リスクに影響を与えている可能性も考えられる。可変的な DNA メチル化制御を受け得る領域は大多数の核内ミトコンドリア遺伝子に存在しており、それらは成長ホルモンのような外的刺激に影響され得るものであるので、特定の環境物質に晒されなどした場合に望ましくない結果をもたらすようなメチル化変化が惹起される事も十分考えられる。本研究で明らかにされた核内ミトコンドリア遺伝子の可変的な DNA メチル化修飾領域、及びそのメチル化制御メカニズムは、ミトコンドリアが関係する疾患を含めた多くの生命現象を理解する上で重要な役割を果たす事が期待される。