

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中西 もも

---

ほ乳類のゲノムには、細胞種・組織間でDNAメチル化状態の異なる領域(T-DMR)が多数存在し、それらのメチル化状態の集約であるDNAメチル化プロファイルは細胞種に固有である。これはつまり、細胞が分化する際にはDNAメチル化プロファイルの刷新が起こることを意味する。

ほ乳類の胚発生では、最初の細胞分化によって栄養膜細胞系譜と胚体細胞系譜が分岐する。本研究では、この細胞分化においても栄養膜細胞特異的なDNAメチル化プロファイルが形成されるとの仮説をたて、それを検証すべく、マウス胚組織や栄養膜幹(TS)細胞、胚性幹(ES)細胞などを用いた解析が行われた。

第1章では、栄養膜細胞系譜と胚体細胞系譜との間のT-DMRの同定と、胚盤胞におけるメチル化状態の解析が行われた。ほ乳類の胚発生における最初の細胞分化により、胚盤胞期に栄養膜細胞系譜である栄養外胚葉(TE)と胚体細胞系譜である内部細胞塊(ICM)が生じる。TEおよびICMから樹立された幹細胞株であるTS細胞、ES細胞はそれぞれ元となる組織の分化能、および遺伝子発現パターンをよく反映する。そこでまず、両細胞株間のT-DMRを探索し、これをもとにin vivoにおいても栄養膜-胚体細胞系譜間でT-DMRである領域(T-E T-DMR)を同定した。これらマウスで同定されたT-E T-DMRに相同なヒトゲノム領域においても、ヒト胎盤絨毛組織とヒトES細胞の間でメチル化に違いが見られた。つまり、T-E T-DMRにおける細胞系譜特異的なメチル化パターンは、種を超えて保存されているのである。しかし、マウス3.5日胚盤胞では、TE、ICMのいずれにおいてもT-E T-DMRはほとんどメチル化されておらず、両組織の間に差は見られなかった。この結果から、栄養膜細胞-胚体細胞系譜間の分化において、細胞系譜特異的なメチル化パターンの確立は形態的な分化に遅れて起きることが明らかになった。

第2章では、T-E T-DMRにおけるDNAメチル化パターンの形成を担うDNAメチル化酵素(Dnmt)の検討がなされた。各種Dnmt欠損胚の解析、および、すべての活性型Dnmtを欠損するTS細胞(TKO TS細胞)にDnmtを再導入した場合のメチル化変化を解析したところ、DNAメチル化状態に変化をもたらすDnmtは領域ごとに異なっていた。一方、TKO TS細胞にいずれのDnmtを導入した場合でも、本来TS細胞で低メチル化状態にあるゲノム領域ではメチル化の亢進は見られず、領域特異的なメチル化制御機構の存在が示された。

第2章の結果から、「TS細胞のゲノム上には、メチル化する・しないの目印となるエピジェネティックマークが存在する」という仮説が立てられた。そこで第3章では、ヒストン修飾に着目し、クロマチン免疫沈降法によりT-E T-DMRにおける種々のヒストン修飾状態が調べられた。得られたヒストン修飾レベルの相対値と、TKO TS細胞にDnmtを導入した際のDNA再メチル化率をプロットすると、H3K9me、H3K9me2、H3K36me2修飾レベルと、Dnmt3aによって誘導されるメチル化率との間に正の相関があることがわかった。また、TKO TS細胞においてH3K9のメチル化を担う酵素G9aをノックダウンすると、Dnmt3aによるメチル化が阻害された。これらの結果から、1) H3K9me、H3K9me2、H3K36me2修飾を認識する因子がT-E T-DMRにDnmt3aをリクルートする、あるいは、2) これら

のヒストンメチル化修飾を担う酵素が Dnmt3a と複合体を形成しており、結果として同じゲノム領域にヒストンのメチル化と DNA のメチル化が高いレベルで見出される、という 2 つの可能性が考えられた。

従来、胚盤胞期のゲノムワイドな DNA メチル化レベルは ICM において TE よりも高いとされてきた。しかし本研究は、T-E T-DMR における細胞系譜特異的なメチル化の変化はゲノムワイドな DNA メチル化レベルの変化するパターンとは異なるという新たな事実を示した。また、特に Dnmt3a を介した栄養膜細胞特異的な DNA メチル化パターンの形成には、H3K9 および H3K36 のメチル化、もしくはその修飾酵素が重要な働きを持つことが示された。これらの発見はほ乳類胚発生における細胞分化のエピジェネティック制御機構に新たな知見をもたらすものである。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。