

(論文内容の要旨)

ゲノムの遺伝情報には、塩基配列だけではなく、エピジェネティックな情報が存在し、その1つがDNAのメチル化である。多くの真核生物では、塩基配列5'-CpG-3'の一部のシトシンが二本鎖DNAについて対称的にメチル化される。メチル化の主な役割は遺伝子発現の制御であり、メチル化は様々な生命現象に関与している。ゲノム上のメチル化パターンは複製ごとに正確に維持される必要があり、高等真核生物では、DNMT1 (DNA Methyltransferase 1) によりその維持が行われる。メチル化は癌細胞の悪性化に関与しており、癌細胞での異常なメチル化の形成機構は強い興味を集めているが、このような機構を知るためにはまず、正常なメチル化状態の維持機構を調べるのが重要である。DNMT1の複製フォーカスへの局在や、DNMT1と複製因子PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)の相互作用より、DNMT1と複製反応は密接に関連していると推測されるが、その詳細については不明である。本研究では、この機構を直接的に解析するために、生化学的な解析に優れたSV40 (Simian Virus 40)試験管内複製系を採用することにした。

制限酵素 *Cla* Iを用いて、メチル化状態の維持の有無を判別できることが示された。*Cla* Iを用いて、SV40試験管内複製系でメチル化されたDNAを鋳型としたとき、メチル化状態はほとんど維持されず、この結果は、薄層クロマトグラフィーによる解析でも同様に再現された。SV40試験管内複製系にリコンビナントDNMT1とメチル基供与体SAM (S-Adenosyl Methionine)を加えたところ、これらの因子依存的にメチル化状態が維持された。以上より、SV40試験管内複製系を応用して、複製反応とメチル化状態の維持が同時に再現される試験管内の系が確立された。

メチル化されたDNAを鋳型としてDNMT1とSAMを加えたSV40試験管内複製系で、ChIP (Chromatin Immunoprecipitation)を行ったところ、DNMT1の複製中もしくは複製完了後のDNA(以下、複製DNAとする)への特異的相互作用が見られた。さらに、この相互作用はメチル化の無いDNAを鋳型としてSAMを加えないときも見られ、メチル化反応非依存的なDNMT1の複製DNAへの作用が示された。この結果は、ピオチン-dUTPを取り込ませた複製DNAを単離して解析したときも同様に再現された。SV40試験管内複製系でDNMT1と複製装置の相互作用を解析したところ、両者の複製依存的な相互作用が見られ、さらに、DNMT1変異体を用いた解析より、DNMT1中のRF (Replication Foci-targeting sequence)が複製装置との相互作用に重要であることが示唆された。DNMT1と複製依存的に相互作用する因子を質量分析で網羅的に解析したところ、複製因子としてRPA (Replication Protein A)が検出され、さらに、*In vitro*での解析により、DNMT1とRPAの直接的な相互作用が示された。SV40試験管内複製系で複製効率を測定したところ、DNMT1が複製効率に正の影響を与えることが示唆された。

以上より、DNMT1と複製装置が分子的に相互作用して、協調して機能することが示唆された。本研究で確立された実験系は、複製反応とメチル化状態の維持の関連を直接的に解析する上で、有効であると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

分化した細胞の機能は、その細胞種に特有な遺伝子セットの発現によってもたらされる。組織細胞が増殖する場合、その遺伝子セットの発現パターンを維持する必要がある、その少なくとも一部は、エピジェネティクスによって成し遂げられる。DNAのメチル化はエピジェネティクスの一機構であり、DNA複製の前後でDNAのメチル化がいかに維持されているかを知ることが、分化状態が細胞増殖にわたっていかに維持されるかを理解する上で重要である。また、維持機構の不調は細胞の分化の異常をもたらし、細胞の癌化と関連するため、その理解は細胞の癌化機構の理解にもつながる。しかし、これまでにDNAの複製(ジェネティクスの維持)とDNAのメチル化状態の維持(エピジェネティクスの維持)がいかなる分子機構で行われているのかを明らかにする研究は、それを試験管内で再現する系が存在しなかったために限られていた。本論文は、すでに確立されているSV40試験管内複製系に、DNA維持メチル化反応に中心的な役割を果たすDNA methyltransferase 1 (DNMT1)のリコンビナント蛋白質を加えることで、DNA複製とDNA維持メチル化反応が同時に行われる新たな新規試験管内反応を構築し、次に、本法を用いて、両反応のカップリング機構を生化学的に明らかにしようとした研究である。

第1章では、序論として、研究の背景、目的が述べられている。特に、従来、さまざまな状況証拠から、DNA複製とDNA維持メチル化反応が生体内で共役して行われていると思われていた一方で、それを詳細に解析する有用な試験管内反応系が知られていないことが指摘されている。第2章では、実験材料と実験方法について述べられている。第3章では、まず、DNAが両鎖ともメチル化されたフルメチル化状態、片鎖のみのヘミメチル化状態、両鎖ともメチル化されていないヌルメチル化状態のどれにあるのかを解析するために、制限酵素 Cla I を用いた方法が開発され、次に、本法を用いて、通常のSV40試験管内複製系では維持メチル化反応がおこらないこと、それにリコンビナント DNMT1 と S-adenosyl methionine を添加することで維持反応が起こることを明らかにしている。第4章では、DNMT1がメチル化反応の有無にかかわらず複製DNAと結合していることを示した後、それが、DNMT1のPCNA結合領域の変異体でも見られたことからおそらくPCNA非依存的であり、このリクルートに関わるDNMT1と相互作用する因子として、新たにRPAを挙げている。さらに、SV40試験管内複製系にリコンビナントDNMT1を添加すると、ある濃度ではDNA複製効率が上昇することから、DNA複製とDNA維持メチル化反応のあいだの機能的な相互作用が示唆されている。

以上を要約すると、本研究は、DNMT1の複製DNAへの作用機構について新しい研究手法を提供し、それを用いた詳細な生化学的実験により、DNA複製反応とDNA維持メチル化反応の分子機構の一端を明らかにしたものであり、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値のあるものと認められる。また、平成20年7月9日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。