

氏名	つむらあきこ 津村明子
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第566号
学位授与の日付	平成17年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	胚性幹細胞におけるDNAメチル化の役割

論文調査委員 (主査) 教授 下遠野邦忠 教授 川寄敏祐 教授 伊藤信行

論文内容の要旨

ゲノムDNAのCpG配列におけるシトシン5位へのメチル化修飾は、細胞分裂を通して次世代の細胞へと伝達しうる遺伝子発現制御機構、すなわちエピジェネティクス分子機構のひとつであり、細胞分化能の調節や組織特異的遺伝子発現の維持などに重要な役割を果たすと考えられている。哺乳類では、3つの活性型DNAメチル化酵素、Dnmt1, Dnmt3aおよびDnmt3bが同定されており、これらの分子が哺乳類初期発生において必須の役割を果たすことがわかっている。マウスの胚性幹細胞(ES細胞)におけるDnmt1の欠損はゲノムの低メチル化をおこすがその生存には問題がない。しかし、この細胞を分化させると増殖阻害をひきおこすことが報告されている。これらの報告から、これまで未分化ES細胞の生存・増殖にDNAメチル化は必須でないと示唆されてきた。しかしDnmt1-/-ES細胞においては、残存するDnmt3a, Dnmt3bが細胞の生存に関して補完的に機能している可能性があるため、これに対する明確な答えは未だ得られていない。よって著者は、ES細胞におけるDNAメチル化の役割を解明することを目的とした研究を行い、以下の知見を得た。

ES細胞の生存にDNAメチル化が必須であるかどうかを明らかとするため、Dnmt1, Dnmt3aおよびDnmt3bすべてを欠いたES細胞(TKO細胞)の作製を試みた。ジーンターゲットングの結果、我々はTKO細胞の作製に成功し、このような細胞が生存可能であることがわかった。樹立したTKO細胞について、まずゲノムのDNAメチル化レベルをサザンプロット法とbisulfite sequencing法により調べた。サザンプロット法により、ゲノム中に高度に反復して存在する配列をプローブに用いてゲノムのDNAメチル化レベルを検討したところ、細胞ゲノムのDNAメチル化レベルは検出限界以下まで低下していることがわかった。またbisulfite sequencing法による解析から、TKO細胞ゲノム中のメチルCpGの割合は最大でも0.6%未満であり、野生型細胞(78%)、Dnmt1-/-細胞(17%)と比べても遙かに低下していることがわかった。同様にbisulfite sequencing法による解析から、TKO細胞の特定の遺伝子配列あるいは反復配列におけるDNAメチル化レベルも極めて低くなっていることが示された。以上の結果からTKO細胞はゲノム全体に亘ってメチル化がほぼ消失した状態にあると考えられた。

DNAメチル化の低下による効果を調べるため、メチルCpG結合タンパク質のメチルCpG結合ドメインとGreen Fluorescent Proteinとの融合タンパク質の局在を検討したところ、TKO細胞では野生型細胞と異なり融合タンパクが核質全体に散在することがわかった。またノーザンプロット法により、TKO細胞ではDnmt1-/-ES細胞と同様にレトロエレメントの転写が上昇していることがわかった。

次にTKO細胞が未分化ES細胞の性質を維持しているかどうかを検討した。TKO細胞は未分化ES細胞に特徴的に見られるアルカリフォスファターゼ活性を維持していた。RT-PCRによる解析の結果、TKO細胞は調べた4つの代表的な未分化マーカー遺伝子すべてを発現していた。TKO細胞と野生型ES細胞との共培養実験からTKO細胞の増殖能は野生型細胞とほぼ同程度であることがわかった。よってTKO細胞はゲノムのメチル化をほぼ消失しているにも関わらず、未分化ES細胞の性質を保持しており、ES細胞の生存にDNAメチル化が必須ではないことが強く示唆された。

ヒストン N 末アミノ酸への種々の化学修飾は DNA メチル化同様、エピジェネティクス分子機構のひとつであり、これらの修飾と DNA メチル化との相関関係が示唆されている。DNA メチル化をほぼ消失した TKO 細胞においてヒストン化学修飾がどのような影響を受けるかを解析するため、ウェスタンブロット法により TKO 細胞におけるヒストンのアセチル化およびメチル化の量的変化を検討し、さらに細胞免疫染色法により、メチル化ヒストンの核内局在パターンの変化を調べた。ウェスタンブロット法を用いた解析の結果、TKO 細胞のアセチル化およびメチル化ヒストンの量は野生型 ES 細胞と同程度であった。また、細胞免疫染色の結果、ヒストン H3 の 4 番目および 9 番目のリジン残基のメチル化の局在も TKO 細胞と野生型細胞の間で大きな変化はみとめられなかった。よって ES 細胞において DNA メチル化を失っても全体的なアセチル化ヒストンの量およびメチル化ヒストンの量と核内局在は維持されることが示唆された。

以上、著者は DNA メチル化をほぼ消失した ES 細胞は生存可能であり、未分化細胞としての性質およびクロマチンの高次修飾構造を維持していることを示した。本研究は、ES 細胞の生存と DNA メチル化との関連についてこれまで議論されてきた問題に明確な結論を導きうる新たな知見であると考えられる。また今回作製に成功した TKO 細胞は DNA メチル化機構を含む様々なエピジェネティクス分子機構の解析のみならず、幹細胞研究における多くの解析に有用な研究材料として利用が期待される。

論文審査の結果の要旨

ゲノム DNA の CpG 配列におけるシトシン 5 位へのメチル化修飾は、細胞分裂を通して次世代の細胞へと伝達しうる遺伝子発現制御機構、すなわちエピジェネティクス分子機構のひとつであり、細胞分化能の調節や組織特異的遺伝子発現の維持などに重要な役割を果たすと考えられている。哺乳類では、3つの活性型 DNA メチル化酵素、Dnmt1, Dnmt3a および Dnmt3b が同定されており、これらの分子が哺乳類初期発生において必須の役割を果たすことがわかっている。Dnmt1 のノックアウトやノックダウン細胞についてのいくつかの報告から、これまで未分化 ES 細胞の生存・増殖に DNA メチル化は必須でないと示唆されてきた。しかし Dnmt1^{-/-} ES 細胞においては、残存する Dnmt3a, Dnmt3b が細胞の生存に関して補完的に機能している可能性があるため、これに対する明確な答えは未だ得られていない。本論文は、ES 細胞における DNA メチル化の生物学的意義を解明することを目的とした研究であり、得られた成果は以下の通りである。

ES 細胞の生存に DNA メチル化が必須であるかどうかを明らかとするため、Dnmt1, Dnmt3a および Dnmt3b すべてを欠いた ES 細胞 (TKO 細胞) の作製を試みた。その結果、TKO 細胞の作製に成功し、このような細胞が生存可能であることがわかった。樹立した TKO 細胞について、特定領域およびゲノム全体の DNA メチル化レベルを調べた結果、複数の遺伝子領域および反復配列において DNA メチル化レベルの著しい低下がみとめられ、またゲノム全体のメチル CpG の割合は最大でも 0.6% 未満であることがわかった。よって TKO 細胞はゲノム全体に亘ってメチル化がほぼ消失した状態にあると考えられ、ES 細胞の生存に DNA メチル化が必須ではないことが明らかとなった。

次に、DNA メチル化の低下による影響を調べた結果、TKO 細胞ではメチル CpG 結合タンパク質のメチル CpG 結合ドメインを介した DNA への結合が妨げられていることが示された。また TKO 細胞ではレトロエレメントの転写が上昇していることがわかった。

次に TKO 細胞が未分化 ES 細胞の性質を維持しているかどうかをアルカリフォスファターゼ発現、未分化マーカー遺伝子の発現および増殖能について検討した結果、TKO 細胞はゲノムのメチル化をほぼ消失しているにも関わらず、これらの未分化 ES 細胞の性質を保持していることが示された。

さらに DNA メチル化同様、エピジェネティクス分子機構のひとつであり、DNA メチル化との相関関係が示唆されているヒストン化学修飾が、TKO 細胞においてどのように影響を受けるかを解析した。その結果、TKO 細胞におけるヒストン N 末端の多くのアミノ酸残基におけるアセチル化およびメチル化の量、さらにメチル化ヒストンの核内局在パターンは野生型細胞と比べて顕著な差がみとめられないことがわかった。よって ES 細胞において DNA メチル化を失っても全体的なアセチル化ヒストン、メチル化ヒストンの量および高次クロマチン構造は維持されることが示唆された。

以上の研究により DNA メチル化をほぼ完全に消失した ES 細胞は生存可能であり、未分化 ES 細胞としての性質およびクロマチンの高次修飾構造を維持していることが示された。これは、ES 細胞の生存に DNA メチル化が必須ではないこと

を遺伝学的に明らかにした新たな知見であるとともに、本研究において作製に成功した TKO 細胞は様々なエピジェネティクス分子機構の解析および、幹細胞研究における多くの解析に有用な研究材料として利用され得る点で評価に値すると思われる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成17年2月28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。