

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	鍵和田 沙紋
論文題目	Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. (ゲノムインプリントの消去における受動的脱メチル化の寄与)		
(論文内容の要旨)			
生殖細胞は、精子及び卵子に最終分化し、ゲノム及びエピゲノム情報を次世代へ伝達する役割を持つ。始原生殖細胞（Primordial Germ Cells: PGCs）は、精子及び卵子の共通の前駆細胞で、次世代へ伝達するエピゲノム情報を構築するために親由来の情報を消去する。この現象はエピジェネティック・リプログラミングと呼ばれ、ゲノムワイドなDNA脱メチル化を含み、これに伴い、ゲノムインプリントの消去が起これと考えられている。 DNA脱メチル化経路には能動的経路と受動的経路が知られる。能動的経路とは、脱メチル化酵素によってメチル基が剥される経路である。近年の研究では、AIDやAPOBEC1、TET1/2/3が塩基除去修復経路(Base Excision Repair: BER)を介して脱メチル化を引き起こすことが示されている。一方、受動的経路とは、DNAメチル化維持酵素であるDNMT1の機能を阻害することで、DNA複製に伴いメチル基が希釈されていく経路である。メチル基はDNMT3A/3Bによってシトシンに付与され、DNA複製の際はUHRF1によって複製中心へ誘導されたDNMT1が、娘鎖をメチル化することで維持されている。PGC特異的に起こるDNA脱メチル化に、どちらの経路が優位に関与し、どのような分子機構で行われるのかという疑問点は大きな課題の一つである。 そこで、ゲノムインプリントの消去が起こるステージにおいて、PGCsの遺伝子発現をマイクロアレイ解析により評価した。その結果、<i>Tet1</i>以外の能動的経路に関与する遺伝子の発現は認められず、DNA新規メチル化に関与する<i>Dnmt3a/3b</i>遺伝子及びDNAメチル化維持に関与する<i>Uhrf1</i>遺伝子の発現が著しく抑制されていた。 PGCsにおけるUHRF1の発現抑制はタンパク質レベルでも確認され、さらにDNMT1の複製中心への集積は著しく阻害されていた。これは、ゲノムワイドなDNA脱メチル化が起きている<i>Uhrf1</i>ノックアウトES細胞の表現型と類似していた。 また、同ステージにおけるPGCsの細胞周期解析を行うと、体細胞と比較してS期の占める割合が多く、PGCsの倍加時間は12.6時間であった。これにより受動的経路のみで脱メチル化が起きたとしても、ゲノムDNAのメチル化程度は24時間で約1/4に希釈され得ることが分かった。 次にバイサルファイト・シークエンス法を用い、6つのインプリント遺伝子の脱メチル化状態を詳細に観察すると、各遺伝子座において一定の速度で脱メチル化が起きることが示唆された。これらは細胞周期解析から予想された、受動的経路のみであっても説明し得る速度を超えることはなかった。 一方、PGCsで起こるDNA脱メチル化は、能動的経路を介しているという報告がなされた。この論文では、ヒストンシャペロンNAP1の核内移動と共にヒストンH1が消失し、BER複合体が接近しやすくなることで能動的脱メチル化が起これ、このようなクロマチンの変化に伴ってH3K27me3の量が変動すると主張していた。しかし、クロマチンの変化を追試すると、H1の消失やNAP1の核内移行は再現されず、H3K27me3の変動は細胞周期に相関することが分かった。また、最近、TET1はPGCsのDNA脱メチル化に関与しないという報告が			

なされている。
以上より、PGCsにおいてクロマチンの変化は起こらず、ゲノムインプリントの消去にはDNAメチル化機構の抑制による受動的脱メチル化の寄与が大きいことが示唆され、PGCsのDNA脱メチル化の分子機構解明に重要な知見を加えた。
（論文審査の結果の要旨）
哺乳類の発生は、半数体間で相補的な発現を示すインプリント遺伝子群の機能によって保証されている。これら遺伝子の発現は半数体間で異なるDNAメチル化を示す領域（Differentially methylated region: DMR）により制御されており、精子・卵子の前駆細胞である始原生殖細胞（Primordial Germ Cells: PGCs）においてはDMRが一旦消去され、その後の発生過程で父母に特異的なDMRが再付与される。インプリント消去の機構としては、クロマチンの構造変化を伴う能動的脱メチル化などが提案されているが、その実態は未解明である。
本研究の結果、PGCsにおいてDNAメチル化維持酵素DNMT1を複製中心へ誘導するUHRF1の発現が抑制されDNMT1が複製中心に集積しないことにより、娘鎖へのメチル化が抑制されている可能性が示された。またインプリント遺伝子のDMR脱メチル化の速度は細胞分裂に伴う受動的脱メチル化速度を超えることはなく、この過程で能動的脱メチル化機構に伴うとされるクロマチンの構造変化は観測されなかった。以上の結果は、インプリントの消去が主にメチル化機構の抑制による受動的脱メチル化によることを示唆している。
本研究はPGCsの脱メチル化機構解明に貢献があり、他細胞系譜におけるメチル化制御機構の解明やインプリント異常による疾患の原因究明に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成25年1月30日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。