

京都大学	博士（医学）	氏名	森田 雄介
論文題目	Genome-wide profiling of nardilysin target genes reveals its role in epigenetic regulation and cell cycle progression (ナルディライジン標的遺伝子のゲノムワイド解析による、そのエピジェネティック制御と細胞周期調節における役割の解明)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>クロマチンを構成するヒストンは、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などの翻訳後修飾を受け、エピジェネティックな転写調節メカニズムに重要な役割を果たす。例えばモノ、ジ、トリメチル化修飾を受けたヒストン H3 リジン 4 (H3K4me1, -me2, -me3) は、凝集度が低いユークロマチン形成と遺伝子転写活性化に関わり、プロモーター/エンハンサー領域に局在する。一方で、トリメチル化されたヒストン H3 リジン 9 (H3K9me3) は凝集度の高いヘテロクロマチン形成と転写抑制に関係する。クロマチン状態は、多くの転写因子、ヒストン修飾酵素、クロマチンリモデリング複合体が共調することで制御されている。</p> <p>ナルディライジン (N-arginine dibasic convertase, Nrdc) は M16 ファミリーに属するメタロエンドペプチダーゼで、細胞表面では heparin-binding epidermal growth factor などの膜タンパク質の細胞外ドメインシェディングを活性化する。一方、核内で Nrdc は H3K4me2 と特異的に結合し、遺伝子プロモーターやエンハンサー上で転写制御に関与し、β 細胞機能や体温恒常性の維持に役割を果たす。しかしゲノムワイドな Nrdc の結合領域や転写調節における普遍的役割はよく分かっていない。本研究では不死化したマウス線維芽細胞 (iMEF) を用い、クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) と RNA シーケンス (RNA-seq) を組み合わせてゲノムワイドな網羅的解析を行った。</p> <p>野生型 iMEF で抗 Nrdc 抗体による ChIP-seq を行った結果、4053 の Nrdc 結合領域と 2587 の Nrdc 結合プロモーター (遺伝子転写開始地点 \pm 5kb に Nrdc 結合領域が存在) を同定した。その特徴を検討すると、Nrdc は転写が活性化しているプロモーター領域に多く局在し、かつ H3K4me2 や H3K9ac を含むアクティブヒストンマークと有意な共局在を認めた。</p> <p>次にゲノムワイドなヒストン修飾や転写制御における Nrdc の役割を検討するため、野生型、Nrdc 欠損 (Nrdc^{-/-})、Nrdc 再導入 (Nrdc^{-/-}WT) iMEF を用い、ヒストン修飾 (H3K4me2、H3K9ac) の ChIP-seq 解析を行った。その結果、Nrdc 非存在下でゲノムワイドな H3K4me2 レベルが上昇している一方で、H3K9ac は低下していた。これらの細胞で RNA-seq 及び ChIP-seq との統合的な解析を行い、448 の Nrdc 直接標的遺伝子 (Nrdc がプロモーターに結合し、かつ Nrdc 依存性に発現変動) を同定した。遺伝子オントロジー解析の結果、細胞周期に関連する遺伝子が有意に多く含まれ、かつ Nrdc 非存在下で H3K9ac レベルと一致して転写レベルが低下することが分かり、また ChIP-qPCR と RT-PCR でもその変化が確認された。興味深いことに、プロテアーゼ活性を消失した Nrdc 変異体の再導入細胞では、細胞周期関連遺伝子の転写レベルがレスキューされるが、H3K9ac レベルはレスキューされなかった。</p> <p>最後に、これらの細胞を用いた細胞増殖・細胞周期評価実験 (WST-8 アッセイ、BrdU パルスチェイスアッセイ、細胞飢餓/血清添加アッセイ) を行った結果、Nrdc 非存在下で細胞</p>			

増殖が抑制され、かつ複数 (G1/S 期、G2/M 期) の細胞周期進行が遅延することがわかった。

以上のことから、Nrdc はエピジェネティックなヒストン修飾と転写制御を介して、細胞増殖や細胞周期を調節していることが明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

近年、エピジェネティックな転写調節に関わる多くの分子群が明らかにされてきた。Nrdc は転写コレギュレーターとして体温恒常性や β 細胞機能維持に寄与するが、その機構の多くは不明であり、申請者は不死化したマウス線維芽細胞を用い ChIP-seq と RNA-seq による Nrdc のゲノムワイドな転写制御機構の解析を行った。

まず Nrdc 結合領域は転写活性化したプロモーターに多く局在した。野生型、Nrdc 欠損、Nrdc 再導入細胞の統合解析により 448 の Nrdc 直接標的遺伝子を同定し、細胞周期関連遺伝子が集積することを示した。細胞周期関連遺伝子の多くが Nrdc 欠損で発現減少し、Nrdc 再導入細胞でレスキューされた。また発現の変化と一致して Nrdc 存在下で H3K9ac が上昇し、細胞増殖や複数の細胞周期進行が促進することを示した。これらの結果から Nrdc は適切なエピジェネティックな状態を保持し、細胞周期調節に重要な役割を果たすと結論付けた。

以上の研究では、初めて Nrdc のゲノムワイド解析を行い複数の実験により結論を支持していることから、エピジェネティクス研究領域に貢献・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 30 年 1 月 23 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。