

|             |                             |
|-------------|-----------------------------|
| 氏 名         | さ さ き あ か ね<br>佐 々 木 あ か ね  |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (理 学)                   |
| 学 位 記 番 号   | 理 博 第 3166 号                |
| 学位授与の日付     | 平 成 19 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 | 理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻       |
| 学 位 論 文 題 目 | カタクウレイボヤの発生における DNA メチル化の役割 |

|        |                      |             |             |
|--------|----------------------|-------------|-------------|
| 論文調査委員 | (主 査)<br>教 授 佐 藤 矩 行 | 教 授 今 福 道 夫 | 助教授 久 保 田 洋 |
|--------|----------------------|-------------|-------------|

### 論 文 内 容 の 要 旨

DNA のメチル化は DNA になされる唯一の共有結合的化學修飾であり、遺伝子発現調節に影響を与える重要なエピジェネティック因子の 1 つである。シトシンがメチル化されたゲノム領域ではクロマチンが凝縮して遺伝子の発現が抑制され、細胞分裂を経てもこの修飾は受け継がれる。したがって、DNA メチル化は長期的な遺伝子抑制記憶装置として働くとされ、近年、発生におけるその役割が指摘されている。そこで本論文では、ゲノム解読に伴ってゲノムワイドな研究環境が整いつつあるカタクウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) を用いて、発生における DNA のメチル化の役割について解析を行った。

まず、論文の第1部では、DNA のメチル化パターンの創出と維持に関わる酵素 DNA シトシンメチルトランスフェラーゼ (Dnmt) を *in silico* で探索し、その発現パターンを調べた。その結果、カタクウレイボヤではメチル化パターンの創出に関わる *Dnmt3a* 及び *Dnmt3b* と、メチル化パターンの維持に関わる *Dnmt1* に相当する遺伝子の存在が確認された。これらの遺伝子は発生の全体を通して発現しており、ホヤの発生において DNA メチル化パターンを積極的に調節する機構の存在が支持された。

次に、論文の第2部では DNA メチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR) を用いて、1 個の細胞である受精卵から多細胞体制が構築される初期発生において DNA メチル化の阻害を試み、形態形成に及ぼす影響を観察した。また、観察された形態形成異常がどのような遺伝子発現の変化に起因するのかをマイクロアレイを用いて調べた。その結果、DNA メチル化阻害に伴って発現の上昇を示す遺伝子が 89 個、発現の低下を示すものが 168 個明らかになった。さらに論文の第3部では、生物としての体制が大きく変化する時期である変態期において DNA メチル化の阻害を試み、発現の上昇を示す遺伝子を 118 個、発現の低下を示す遺伝子を 235 個同定した。これらの多くは機能未知の遺伝子であるが、中には、発生に役割をもつ遺伝子も数多く含まれていた。

このように、本論文はカタクウレイボヤの発生における遺伝子発現制御に DNA のメチル化が関わっている可能性を初めて示したものである。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

動物の発生の分子メカニズムを理解するためには、発生を司る個々の遺伝子の発現と制御を解析するだけでなく、発生に関わる数多くの遺伝子の発現がグローバルにまたゲノムワイドにどのように制御されているかを理解する必要がある。グローバルな遺伝子発現制御として DNA のメチル化とヒストンのアセチル化が知られているが、これらの機構は哺乳類の発生におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御と関連して研究が進んでいるものの、哺乳類以外の動物ではその機構の存在すらまだあまりよくわかっていない。本論文では、2002年にゲノムが解読された発生全体にわたって遺伝子発現制御がよく調べられているカタクウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) を使って、その発生における DNA メチル化の役割を調べている。

論文は 3 部から成り、第 1 部では DNA のメチル化とその維持に関わる DNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子をホヤゲ

ノムから *in silico* で解析し、このホヤには哺乳類がもつ3つの遺伝子にほぼ相同の遺伝子が存在し、発生全般にわたって発現していることを示した。また第2部と第3部では、DNAメチル化阻害剤としてよく使われる5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR) が、初期発生（第2部）および幼生の変態期（第3部）における遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかを、このホヤの約18,000遺伝子をカバーするプローブを搭載したマイクロアレイを使って調べた。その結果、初期発生において発現の上昇を示す遺伝子が89個、発現の低下を示すものが168個、また変態中において発現の上昇を示すものが118個、低下を示すものが235個確認された。これらの多くは機能未知の遺伝子であるが、中には、発生に役割をもつ遺伝子も数多く含まれており、申請者はDNAメチル化と関連してそれらの役割を推論している。

これまでの研究から、カタユレイボヤのゲノム中で遺伝子が存在する領域はメチル化されている一方で、遺伝子をあまり含まない領域はメチル化されていないことがわかっていたが、本論文は、まずメチル化機構の創出と維持に関わる遺伝子が存在し、発現していることを初めて示した点で評価される。また論文の第2部と第3部では、DNAメチル化阻害剤を使って実際に数多くの遺伝子の発現が変化することを示したもので、これも原索動物胚では初めての結果である。今後さらに研究すべき課題が多く残されているが、原索動物の発生における遺伝子発現とDNAメチル化との問題について一つの突破口を開いたものとして本論文は評価されよう。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。