

| | | | |
|---------|---|--------|-------|
| 氏名（本籍） | 池田 理恵子（茨城県） | | |
| 学位の種類 | 博 士（理学） | | |
| 学位記番号 | 博 乙 第2670号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成25年11月30日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 | | |
| 審査研究科 | 生命環境科学研究科 | | |
| 学位論文題目 | Role of Germ Cell-Specific Epigenetic Modifications in Gene Expression in the Mouse （マウス生殖細胞における特徴的なエピジェネティック修飾の遺伝子発現への関わり） | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 理学博士 | 漆原 秀子 |
| 副査 | 筑波大学教授（連携大学院） | 理学博士 | 阿部 訓也 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 博士（医学） | 千葉 智樹 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 理学博士 | 沼田 治 |

論 文 の 要 旨

生殖細胞は次世代に遺伝情報を受け渡す重要な役割をもつ。この役割を果たすために生殖細胞だけで発現し機能する遺伝子が多数存在するが、それらの発現制御機構に関しては未だ不明な点が多い。一方、雄性生殖細胞特異的遺伝子の一部はがん化した体細胞（がん細胞）で発現することが知られており、「がん精巣抗原」遺伝子と呼ばれている。しかし、なぜ生殖細胞とがん細胞で共通して発現するのか、その意義やメカニズムは明らかにされていない。本研究では、生殖細胞に特有の発現制御機構を解明することを目的として、細胞に特有な遺伝子発現パターンを規定することが知られているゲノム修飾パターン（エピゲノム）の解析を行った。

様々な発生ステージから得られたマウス生殖細胞ゲノムの DNA メチル化パターンを解析したところ、体細胞や胚性幹細胞には認められず、生殖系列細胞に特有な低メチル化状態にある DNA 配列が検出された。これらの配列は性染色体である X 染色体に多く、かつ比較的広い領域（平均 120 kb、最大 9 Mb）にクラスター状に存在しており、雄性生殖細胞の X 染色体上では同様の特徴を持つ領域が 16 ヶ所で見いだされた。そこで、そのような領域を **Large Hypomethylated Domain (LoD)** と名付け、さらなる解析を行った。一般に哺乳類ゲノムの大部分は高度にメチル化されており、その中に 300-3000bp 程度の CpG アイランド (CGI) と呼ばれる小さな低メチル化領域が点在することが知られているが、LoD のような広い範囲で連続して低メチル化状態にある領域は本研究によって初めて同定されたものである。LoD と CGI は、そのサイズのみでなく、CGI がプロモーターなどの発現制御領域に局限する傾向があるのに対し、LoD は遺伝子座全体、さらに遺伝子間領域も含む広い領域の全域にわたって低メチル化状態にある点でも異なっていた。また、LoD は領域のほぼ全てが分節的重複を示し、局所的に同様な配列が繰り返して存在する特徴があることもわかった。

LoD には生殖細胞特有に発現する遺伝子群が集中して存在し、その中には「がん精巣抗原」遺伝子も複数含まれていた。通常、DNA の高メチル化は遺伝子発現を抑制することが知られており、LoD 領域に見られる DNA の低メチル化がこの領域に含まれる遺伝子の発現に必要

であることが示唆された。逆に、体細胞では LoD 領域は高メチル化されており、がん精巢抗原遺伝子等の発現も認められない。さらに、LoD ではヒストン修飾も特殊で、通常は抑制性と考えられるヒストン H3K9 のジメチル化修飾が集中していたが、それにもかかわらず、生殖細胞では遺伝子発現が認められた。体細胞ゲノムではヒストン H3K9 ジメチル修飾と DNA メチル化は同じ領域に共通して存在することが多く、そこに含まれる遺伝子の発現は抑制されている。このような LoD の独特なエピゲノム状態が生殖細胞やがん細胞に特有な遺伝子発現の基盤になっている可能性が示唆された。

最近、生殖細胞ゲノムの DNA メチル化解析がいくつかのグループによっても報告されたが、本研究で述べられている LoD は検出されていない。その理由として、それらの解析ではプロモーター周辺の CGI など発現制御領域に限定した解析が行われていたこと、次世代シーケンサーによる全ゲノムバイサルファイトシーケンス法を用いた解析の場合には短い出力配列を LoD のような重複したゲノム領域にマップするのが技術的に困難で、解析対象からはずされている可能性が高いことなどが考えられる。

本研究で発見された LoD は、生殖細胞とがん細胞に共通したエピゲノムの形成メカニズム、がん細胞において生殖細胞特有の遺伝子が発現する生物学的意義等について解明するための、重要な手がかりになると期待される。

審 査 の 要 旨

本研究では、生物学的に重要であるにもかかわらず、技術的な問題のため解析が進んでいなかったマウス生殖細胞を対象としたエピゲノム解析を行っている。著者はまずごく微量の材料からの DNA メチル化解析技術を確立し、これを胚体から単離した生殖細胞のエピゲノム解析に適用して各種細胞との比較解析を行った。その結果、LoD と名付けられた生殖細胞特異的な低メチル化領域を世界で初めて見出すことに成功した。LoD はそれまで全く知られていなかったエピゲノム領域であり、低メチル化に加え、高頻度のヒストン H3K9 ジメチル化を有しているにも関わらず生殖細胞とがん細胞での遺伝子発現を妨げないという特徴がある。今後、生殖細胞とがん細胞に共通なエピゲノム形成機構の解明などへと進展することが大いに期待できる。

本研究で使用した手法はすでに発表された技術を基にしているが、さらなる微量化のための実験ステップの見直しや条件検討等の技術的改良、および2値化法を用いて、低メチル化-高メチル化領域の判別を客観的に行うためのデータ解析法の考案など、著者独自のアイデアに基づくアプローチによって為されたもので、その独創性は高く評価される。

平成25年9月30日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。