Osaka University Knowledge Archive

Title	DNA Methylation and Terminal Differentiation of Skeletal Muscle Cells
Author(s)	高木, 秀和
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39910
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏　　名	髙　木　秀　和（たかぎ ひでかず）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　12340　号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生理学専攻
学　位　論　文　名	DNA Methylation and Terminal Differentiation of Skeletal Muscle Cells （DNAのメチル化と骨格筋細胞の終末分化）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　長谷　俊治 （副査） 教　授　小川　英行　　助教授　田嶋　正二

論　文　内　容　の　要　旨

MeTase cDNAを導入して得られた多数の株について筋管形成能を調べたところ，予想に反して，70%以上の株で筋管形成がむしろ促進された。筋管形成の促進は，MeTase cDNAに依存して，またその活性の発現に依存して認められたことから，この分化形質に対するMeTaseの効果は，MeTaseの活性の発現が直接の原因と考えられた。筋管形成促進株では骨格筋分化マーカーであるミオシンとクレアチンキナーゼが分化誘導後速やかにかつ大量に発現していた。MeTase cDNAを導入した株では染色体ＤＮＡのメチル化レベルは増加していたが，筋管形成促進株と非促進株の間では差が認められなかった。単離した株の染色体ＤＮＡのメチル化量を別な方法，即ちメチル化される余地を測定することで見積もったところ，やはり同様の結果が得られた。このことより筋管形成の促進は染色体ＤＮＡのメチル化の量的な違いが原因ではなく，メチル化を受けた遺伝子の質的な違いが原因と考えられた。

いったん獲得した筋管形成の促進あるいは非促進の形質は，単離株でMeTase活性が高く維持されているにも関わらず，長期継代後も変化しないことから，筋管形成促進する形質は遺伝子導入直後の一過性の高いMeTase活性が原因であることが予想された。遺伝子導入直後には非常に高い*de novo*のMeTase活性を観察した。MeTase cDNAを別種の発現ベクターに繋ぎ細胞に導入し筋管形成促進株の出現頻度を比較したところ，MeTase活性に依存した比率で筋管形成促進株が得られた。以上より，筋管形成促進の形質は遺伝子導入直後の一過性の高いMeTaseの活性，特に*de novo*メチル化活性に依存して獲得されるものと考えられた。

次に筋管形成促進に関わり，ＤＮＡのメチル化の標的となった遺伝子の探索を行った。骨格筋分化に重要な役割を果たすいくつかの遺伝子の筋管形成促進株での発現について調べた。筋管形成促進株では細胞増殖期から対照株では見られないMyoDの高い発現が見られた。このとき他の筋分化因子であるmyogeninやldには特に特徴的な変化は認められなかった。筋管形成促進の形質はMyoDが早い段階で大量発現していることが原因であると考えられる。*myoD*転写活性を単離した核で直接測定したところ，筋管形成促進株では転写活性が対照株に対して約3倍高かった。増殖期におけるMyoDの大量発現は*myoD*の転写活性の亢進によるものと考えられた。また，この*myoD*の転写活性の促進は細胞増殖依存的なものであった。単離株の染色体ＤＮＡのメチル化感受性酵素*Hp*allによる切断をサザンブロットにより調べたところ，筋管形成促進株ではいずれの株でも*myoD*のエクソン1からエクソン2に存在する6個の*Hp*all sitesが強くメチル化されていた。この部分のメチル化状態とMyoDの発現量との間には強い正の相関関係があった。この領域の全てのCpGのメチル化状態をsodium bisulfite法により決定した。その結果，筋管形成

促進株に特異的にメチル化されていた2つの領域，即ち転写開始点上流-14から+129に存在する5個のCpG配列と-187から+348 に存在する12個のうち5個のCpG配列を同定した。また逆に筋管形成非促進株で特徴的にメチル化されている領域，-655から-672に存在する5個のCpG配列も認められた。*myoD*の発現調節にはこれらの領域のメチル化状態が直接的あるいは間接的に影響しているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

細胞の分化にＤＮＡのメチル化が重要な役割を担っていることが知られている。髙木秀和君は培養筋芽細胞にＤＮＡメチルトランスフェラーゼを強制発現させたところ，終末分が促進されることをみいだした。これは骨格筋分化に中心的な役割を果たすMyoD遺伝子の発現が上昇していたためであること，さらにMyoD遺伝子の特定の領域がメチル化されていることを明らかにした。本論文では遺伝子のメチル化が転写活性を促進するという従来の知見とは反する重要な知見を得ており，博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。