

Title	DNA methylation A Search for Possible Regulatory Proteins
Author(s)	末武, 勲
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39915">https://hdl.handle.net/11094/39915</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	末武 勲
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 12339 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 A Search for Possible Regulatory Proteins (DNAのメチル化の調節)
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 米崎 哲朗 助教授 田嶋 正二

### 論文内容の要旨

脊椎動物における染色体DNAのメチル化は、古くから知られている化学修飾であり、この修飾は染色体DNAにとって生理的条件下では唯一のものである。DNAのメチル化は哺乳類における遺伝子刷り込み現象、X染色体の不活化、組織特異的な遺伝子の発現、免疫グロブリンの遺伝子の組み換えなどに関与するとされ、近年それを支持する事実が次々と報告されている。

メチル基は、塩基のシトシン(C)、グアニン(G)と並んだCG配列のCの5位にS-アデノシルメチオニンより導入される。通常、遺伝子がメチル化されると転写は阻害され、逆に組織特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域は発現している組織で低メチル化状態にある。転写因子の中にはその結合モチーフにCG配列を含みメチル化により結合が直接阻害されている場合もあるが、多くの場合メチル化DNA結合タンパク質が転写因子のプロモーターへの結合を直接阻害する、あるいは、その結合により誘導されるクロマチンの構造の形成を介して転写を阻害していると考えられている。

私は、この組織特異的な染色体DNAのメチル化様式の形成が生理的に機能するためには、このメチル化状態が何らかの形で調節されなければならない、そのためにはメチル基と塩基配列を同時に認識するメチル化DNA結合タンパク質が存在するはずであると予想した。また、メチル化状態を決定する一つの因子であるDNAメチルトランスフェラーゼも他の因子により厳密に調節を受けているはずであると考えた。そこでDNAのメチル化状態の調節機構を解明するための第一歩として、塩基配列特異的にメチル化DNAを認識するタンパク質とDNAメチルトランスフェラーゼと相互作用するタンパク質の同定を試みた。

塩基配列特異的にメチル化状態を認識するタンパク質を同定する目的で、これまでメチル化状態が遺伝子の発現に影響を与えると予想される配列を合成して、それにメチル化特異的に結合するタンパク質を探索した。その結果、癌遺伝子産物であるc-Mycが結合するモチーフの中心に存在するCGのCをメチル化したときに特異的に結合するタンパク質MMBP-1, MMBP-2, MMBP-3という三種類のメチル化DNA結合タンパク質をマウス筋芽細胞株C2C12の核に見いだすことができた。c-Mycは、細胞の増殖分化に深く関与しているDNA結合タンパク質で、転写因子として機能している。c-Mycは、E-box配列(CANNTG)のNNの部分でCGのとき結合して、このCGがメチル化を受けると結合できなくなる。今回私が見いだした3種のタンパク質は、メチル化状態だけでなく塩基配列特異的にDNAに結合することがわかり、これまでのメチル化DNA結合タンパク質の様に単にDNAのメチル

化状態だけを識別して結合するものとは異なる事がわかった。MMBP-1 および MMBP-3 は、結合モチーフの二本鎖DNAのうち、特定の一方がメチル化されたとき結合でき、MMBP-2 は、いずれの鎖だけをメチル化しても結合することができた。MMBP-1 と MMBP-3 の特性は、DNAの複製直後に片側だけがメチル化された状態ができることを考えると興味深い。これら3種のタンパク質の結合活性は、MMBP-1 は繊維芽細胞系の培養細胞だけに見いだされ、MMBP-2 は、調べたすべての株細胞に認められ、さらに、MMBP-3 は増殖している細胞には認められるが、増殖が停止するとその結合活性が低下した。これら3種のタンパク質は、単に非特異的にメチル化したDNAに結合しているのではないことが予想される。特にMMBP-3 についてはc-Mycの結合部位のメチル化状態を介して、細胞分化に重要な役割をはたしていると考えている。

DNAにメチル基を導入する酵素として、一旦形成されたメチル化状態を維持する型のDNAメチルトランスフェラーゼ (MeTase) が存在する。MeTaseは胚発生、細胞周期に依存してその存在場所と活性が変化することが知られている。しかしながら、どの様にしてMeTaseがその位置・発現情報が調節を受けているのかについては何もわかっていない。私はMeTaseと相互作用をしているタンパク質性の因子が存在して、これがMeTaseの調節に関与しているのではないかと考え、二価の化学修飾剤を用いてMeTaseの近傍にあるタンパク質を探索することを試みた。架橋後、抗MeTase抗体で免疫沈降したとき、共沈してくる見かけ上約33kDのタンパク質を見いだした。この33kDのタンパク質を大量培養した赤芽球細胞より調製し、アミノ酸配列を決定しhistone H1であることを明らかにした。histone H1は、メチル化されたCを多く含んでいるヘテロクロマチンのリンカー部分に存在することが知られており、またMeTaseもヘテロクロマチンのリンカー部分にその大部分が結合して存在するとの報告があることから、ここで化学架橋剤により検出されたhistone H1とMeTaseの相互作用は、特異的なものであり、両者の会合がヘテロクロマチンの構造の維持に重要な役割を担っていることが考えられる。

このようなメチル化DNA結合タンパク質の解析や、histone H1とMeTaseと相互作用することの意義の解析を通して、今後メチル化状態の調節を介したさまざまな生命現象を分子レベルで理解していきたいと考える。

#### 論文審査の結果の要旨

組織特異的な遺伝子の発現に染色体DNAのメチル化は重要な役割を果たしている。末武勲君はこの染色体DNAのメチル化状態の調節機構を明らかにするために、塩基配列特異的にメチル化DNAを認識するタンパク質を探索して、新たに3種類のメチル化DNA結合タンパク質を同定した。また、DNAメチルトランスフェラーゼが核内でヒストンH1と相互作用していることを明らかにした。本論文はDNAのメチル化の調節について重要な新しい知見をつけ加えるものであり、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。