Osaka University Knowledge Archive

Title	Characterization of maintenance-type DNA methyltransferase using site-specific antibodies
Author(s)	侍, 立衡
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42503
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	侍　　立　衡（じ　りっ　こう）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　15983　号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	Characterization of maintenance-type DNA methyltransferase using site-specific antibodies （部位特異的抗体を用いた維持型DNAメチルトランスフェラーゼの研究）
論文審査委員	（主査） 教　授　田嶋　正二 （副査） 教　授　吉川　和明　　教　授　永井　克也

論文内容の要旨

脊椎動物の染色体DNAのCpG配列のシトシンの5位は多くの場合メチル化されている。この修飾は、染色体DNAが生理的な条件下で受ける唯一の化学修飾である。DNAメチル化は組織特異的な遺伝子の発現、癌化、哺乳類のゲノムの刷り込み、X染色体の不活性化などの生理現象に関わっており、重要な修飾である。DNAメチル化はDNAメチルトランスフェラーゼ（Dnmt1）によって触媒されており、その活性には、全くメチル化されていない部位にメチル基を導入する *de novo* 型メチル化活性と2本鎖DNAのうち1本がすでにメチル化されたヘミメチル化部位にメチル基を導入する維持メチル化活性との2種類がある。*De novo* 型メチル化活性はDnmt3により触媒され、初期胚でのメチル化模様の形成に関与する。維持メチル化活性はDnmt1により触媒され、細胞特異的なメチル化模様の維持に関わっている。Dnmt1を潰したマウスは初期胚で致死となること、またアフリカツメガエル（ツメガエル）の卵にanti-sense Dnmt1 mRNAを微量注入すると遺伝子発現の時期が乱れ、異常胚発生をすることから、Dnmt1は胚発生過程で重要な役割を果たしていると考えられる。

Dnmt1の蛋白質量と活性は、培養細胞で細胞周期のS期に高く、その他の期には低いこと、S期には核に局在し、複製点に局在することが報告されている。例外的に、細胞周期が停止しているにもかかわらず、マウス及びツメガエル卵母細胞、神経細胞ではDnmt1は大量に発現しており、興味深いことに、この時Dnmt1は殆どないし多くが核外に存在する。

マウスDnmt1では選択的スプライシングの違いにより、体細胞型、N末端側が118アミノ酸だけ体細胞型より短い卵母細胞型と精巣型が存在する。精巣型Dnmt1は、当初、パキテン期の細胞だけに特徴的に発現するとされたが、最近、神経細胞や分化した骨格筋細胞でもその転写産物が検出された。

Dnmt1はこのように生体内で複雑に調節されており、私はその調節機構を詳細に調べるには、Dnmt1を特異的に認識する抗体が有効であると考えた。そこで、ツメガエルDnmt1（xDnmt1）にたいするモノクローナル抗体（MoAb）を作成し、その抗体の特性を調べた後、それを用いてxDnmt1の性質を調べた。さらに、マウス体細胞型Dnmt1（mDnmt1）を特異的に認識するポリクローナル抗体を作成し、マウス組織での発現様式を調べた。

抗xDnmt1モノクローナル抗体の作製とそれを用いたxDnmt1の性質の解析

xDnmt1のN末端部分（1-142アミノ酸）をマウスに免疫して、4クローン（4A8, 3C6, 5C9と5A8）のMoAbを

得た。これらの抗体のエピトープマッピングを行ったところ、4A8 と 3C6 はそれぞれN末端の115－126と 1 －32アミノ酸部分を認識し、他のクローンは二つ以上のエピトープを認識した。なかでも、4A8 は、エピトープ部分のペプチドを添加することにより免疫沈降後の樹脂から xDnmt1 を溶出できるため、xDnmt1 を精製する上で有用な抗体であることがわかった。抗体によりアフイニテイー精製した xDnmt1 は mDnmt1 とほぼ同等のメチル化活性を持つことを示した。ツメガエル培養細胞を MoAb で間接蛍光抗体法により免疫染色すると、xDnmt1 は間期には核内に局在し、M期でも相当量存在し染色体から排除されていた。このM期の xDnmt1 の高発現とその染色質排除挙動は予想外であり、DNA のメチル化時期と細胞周期を考える上で興味深い。

マウス組織での mDnmt1 の発現と局在

体細胞型 mDnmt1 に特異的な抗体で、体組織について間接蛍光抗体法により免疫染色したところ、小腸及び脾臓の胚中心の細胞と、小腸及び精巣でさかんに分裂している幹細胞の核が、強く染色された。それ以外の細胞増殖が停止している細胞では、殆ど発現が認められなかった。さらに、小腸に関しては、生化学的にも体細胞型 mDnmt1 が発現していることを示した。以上の結果は、一部の例外を除いて、殆どの体組織においても Dnmt1 は培養細胞と同様に体細胞型 Dnmt1 を発現しており、細胞周期に依存して制御されることを示している。

論文審査の結果の要旨

侍立衡君は、染色体 DNA のメチル化状態がどの様に調節されているのかを明らかにする目的で、メチル化模様を複製時に維持する活性を担う DNA メチルトランスフェラーゼ（Dnmt1）の部位特異的な抗体を作製し、これを用いて、細胞、生体内組織における Dnmt1 の発現量、局在を明らかにした。これらの結果は、細胞増殖過程における Dnmt1 の振舞とその意義を明らかにした点で、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。