

Title	Genomic organization and promoter analysis of the Dnmt3b gene.
Author(s)	石田, 智咲
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/45351">http://hdl.handle.net/11094/45351</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名	石田 智 咲
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 18098 号
学位授与年月日	平成 15 年 9 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科先端応用医学専攻
学位論文名	Genomic organization and promoter analysis of the <i>Dnmt3b</i> gene. ( <i>Dnmt3b</i> 遺伝子の遺伝子構造とプロモーターの解析)
論文審査委員	(主査) 教授 金田 安史 (副査) 教授 花岡 文雄 教授 濱田 博司

#### 論文内容の要旨

##### 【目的】

DNA のメチル化は今日までに唯一見いだされたゲノム DNA の修飾である。これまでの研究により、DNA のメチル化は、X 染色体の不活性化やゲノムインプリンティング、さらには発生分化に伴った遺伝子発現制御に深く関わっていることが指摘されてきた。しかし、ゲノム DNA のメチル化がどのように調節されているのか、また DNA メチル化がどのような機能を果たしているかについては未だに不明な点が多い。そこで、DNA メチル化酵素の中で、マウスの初期発生でゲノムが *de novo* DNA メチル化を受ける時期に一過性に高発現し、自らのメチル化活性により転写調節されている可能性が高い *DNA methyltransferase 3b* (*Dnmt3b*) 遺伝子に着目し、*Dnmt3b* 遺伝子座における DNA メチル化と転写調節機構を明らかにすることを研究目的とした。

##### 【方法ならびに成績】

ES 細胞の分化に伴う *Dnmt3b* 遺伝子の発現変動を解析するために、*Dnmt3b* 遺伝子を含む BAC クローンを単離し、その全塩基配列を決定すると共に、遺伝子のゲノム構造を明らかにした。*Dnmt3b* 遺伝子は少なくとも 24 個のエクソンからなり、その長さが 38 kb にも及ぶことが示された。さらに、隣接した遺伝子の検索とノーザンハイブリダイゼーション法を用いた遺伝子発現の解析から、*Dnmt3b* 遺伝子は、恒常的に発現する 2 つの遺伝子に挟まれて、ES 細胞の分化に伴って一旦活性化された後、著しく抑制されることを見いだした。そこで、ES 細胞分化に伴った *Dnmt3b* 遺伝子の転写調節領域を明らかにするために、転写調節の候補領域をレポーター遺伝子に繋ぎ、一過性の遺伝子導入によって解析した。これにより、*Dnmt3b* 遺伝子のプロモーターは、転写開始点から -97 bp の領域に存在することが示された。またこのプロモーターは *Dnmt3b* 遺伝子が発現していない NIH/3T3 細胞でも活性を示したことから、*Dnmt3b* 遺伝子の発現が、DNA メチル化を含めたクロマチン構造により調節されている可能性が高いと考えられた。

そこで本研究では、*Dnmt3b* 遺伝子全体を含む約 50 kb の広いゲノム領域で ES 細胞の分化に伴うメチル化パターンの変化をメチル化感受性制限酵素を用いたサザンハイブリダイゼーション法により詳細に解析した。プロモーター領域を含む CpG island は、発現の有無に関係なく低メチル化状態を維持しているが、その外側では分化に伴って領

域ごとに異なる速さでメチル化されることが示された。これらの結果より、*Dnmt3b* 遺伝子の発現調節には、DNA メチル化を含めたクロマチン構造の関与が強く示唆され、今後、DNA メチル化阻害剤である 5-アザ-2' デオキシシチジンを用いて、*Dnmt3b* 遺伝子が DNA のメチル化によって転写調節されている可能性を検討する必要があると考えられる。さらに、DNA メチル化酵素による認識特異性の有無を様々な DNA メチル化酵素欠損株を用いて解析した。その結果、*Dnmt3b* 遺伝子のほとんどの DNA メチル化は *Dnmt3a*、*Dnmt3b* のどちらによっても機能代償しうることが示されたが、例外的に *Dnmt3a* でしかメチル化できない特異的な領域を見出した。これにより、一遺伝子座における発生分化に伴ったメチル化模様の創生が、極めて複雑に行われていることが示唆された。

#### [総括]

以上の結果は、*Dnmt3b* 遺伝子の発現が、DNA メチル化を含めたクロマチン構造によって調節されていることを強く示唆するデータであり、今後、この遺伝子が DNA メチル化によって転写調節されているかを DNA メチル化阻害剤を用いて明らかにしていきたいと考えている。さらに本研究では、一つの遺伝子座内でも DNA メチル化を受ける部位によって、①メチル化を受ける速度が違うこと、②DNA メチル化酵素の標的特異性が異なることを見出した。これらの結果により、様々な分野で関心が高まっている DNA のメチル化の調節が以前に考えられていたよりも複雑であることが明らかとなり、今後、DNA メチル化の調節機構を解明する重要な手がかりを得たと考えている。

#### 論文審査の結果の要旨

DNA メチル化は、今日までに唯一見出されたゲノム DNA の修飾である。真核生物で見られるシトシン 5 位のメチル化は、X 染色体の不活性化やゲノムインプリンティング、さらには発生分化に伴った遺伝子発現抑制と深く関わっていると古くから指摘されてきた。しかし、DNA メチル化の発生分化に伴ったエピジェネティックな遺伝子発現調節に果たす役割は未だ不明なままである。そこで、本研究では、哺乳類の発生初期の胚盤胞期以降から活発に起こる *de novo* DNA メチル化の調節機構とその機能を解明するために、DNA メチル化酵素のなかで特にこの時期に一過性に高発現する *Dnmt3b* 遺伝子の転写調節機構の解明に焦点を当てて、DNA メチル化と転写抑制の関係について解析した。まずはじめに、この遺伝子を含む 175 kb もの長い BAC クローンを単離して、*Dnmt3b* 遺伝子の転写開始点を含めたおよそ 40 kb の範囲に及ぶゲノム構造を明らかにした。また、決定したマウス *Dnmt3b* 遺伝子のゲノム構造をヒト *DNMT3B* 遺伝子と比較することにより、相同性の高い領域を見だし、一過性の遺伝子導入法を用いて未分化特異的エンハンサーとサイレンサーを示す領域を明らかにした。さらに、この未分化 ES 細胞特異的エンハンサーが *Dnmt3b* 遺伝子を発現していない体細胞で DNA メチル化を受けることを明らかにした。また、様々な DNA メチル化酵素欠損マウスを用いて、この領域のメチル化が *Dnmt3b* 遺伝子自身のメチル化活性によって担われることが示された。これらの結果より、*Dnmt3b* 遺伝子はプロモーターだけでなく、エンハンサー領域の DNA メチル化を含むクロマチン構造変化により精巧に転写調節を受けている可能性が示唆された。この研究は、これまで明らかにされてこなかった DNA メチル化と転写調節機構の解明に迫るものであり、学位に値すると考える。