

Title	マウスde novo型DNAメチルトランスフェラーゼDnmt3aとDnmt3bのDNAメチル化特性に関する研究
Author(s)	竹島, 秀幸
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46446
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	たけしま ひでゆき 竹島秀幸
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 20043 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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	マウス <i>de novo</i> 型 DNA メチルトランスフェラーゼ Dnmt3a と Dnmt3b の DNA メチル化特性に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 田嶋 正二 (副査) 教授 滝澤 温彦 教授 原口 徳子

論文内容の要旨

In mammalian genomic DNA, cytosine residues located in CpG dinucleotide are often methylated. This modification contributes to development, cellular differentiation, genomic imprinting and inactivation of X chromosome. Methylation of cytosine residues is catalyzed by DNA methyltransferase (Dnmt). *De novo* type DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are responsible for creating DNA methylation patterns during embryogenesis and in germ cells. Although their *in vitro* DNA methylation properties are similar, Dnmt3a and Dnmt3b methylate different genomic DNA regions *in vivo*. In this study, I have examined the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b towards nucleosomes reconstituted from recombinant histones and DNAs, and compared it to that of the corresponding naked DNAs. Dnmt3a showed higher DNA methylation activity than Dnmt3b towards naked DNA and the naked part of nucleosomal DNA. On the other hand, Dnmt3a scarcely methylated the DNA within the nucleosome core region, while Dnmt3b significantly did, although the activity was low. I propose that the preferential DNA methylation activity of Dnmt3a towards the naked part of nucleosomal DNA and the significant methylation activity of Dnmt3b towards the nucleosome core region contribute to their distinct methylation of genomic DNA *in vivo*.

哺乳類では染色体 DNA 中の CpG 配列のシトシンは高頻度でメチル化修飾を受けており、この修飾は発生・細胞分化、遺伝子刷込み、X 染色体不活性化の原因の一つとなっている。DNA のメチル化修飾は、DNA メチルトランスフェラーゼ (Dnmt) により触媒される。*De novo* 型の Dnmt である Dnmt3a と Dnmt3b は胚発生過程および生殖細胞の成熟過程における DNA メチル化模様の形成に寄与している。裸の DNA を用いた試験管内での解析では Dnmt3a も Dnmt3b も主に CpG 配列をメチル化し、メチル化標的配列に大きな差は認められないが、生体内では両酵素はゲノムの異なる領域をメチル化することが遺伝学的に示されている。両酵素の生体内における DNA メチル化標的の違いは、Dnmt3a と Dnmt3b が生体内ではメチル化するゲノム領域を何らかの機構により識別していることを意味している。生体内で DNA は多くの場合裸の状態が存在しているわけではなく、一般的にヒストンとの複合体であるヌクレオソームを基本単位とするクロマチンとして存在する。私は、ヌクレオソームをメチル基受容基質として Dnmt3a

と Dnmt3b の DNA メチル化活性を解析することによって、両酵素が異なるゲノム領域をメチル化する機構の一端が解明できるのではないかと期待した。大腸菌により発現させた翻訳後修飾の無いヒストンを精製し、これと PCR により調製した DNA を用いて再構成したヌクレオソームをメチル基受容基質として用いた結果、Dnmt3a は、ヌクレオソームに巻きついた DNA をほとんどメチル化できないが、ヌクレオソームに含まれるリンカー部分の DNA (裸の DNA) を効率よくメチル化することがわかった。それに対して、Dnmt3b は Dnmt3a と比較するとヒストン・オクタマーに巻きついた DNA でもある程度メチル化することが明らかとなった。Dnmt3a がヌクレオソームのコア領域の DNA をメチル化できないという性質は、Dnmt3a が体細胞に普遍的に発現しているにもかかわらず、ゲノムのメチル化模様の異常を誘起しないことの分子基盤の一つであると考えられる。すなわち、Dnmt3a がゲノムをメチル化するには、クロマチン構造変換に関わる因子が裸の状態の DNA を露出させることが必須となることを示唆する。これに対して Dnmt3b は、発現さえすればゲノムのメチル化模様形成に寄与すると予想される。これまでに報告されている実験事実と今回明らかにした Dnmt3a と Dnmt3b のヌクレオソームに対する DNA メチル化活性の特性から、Dnmt3b は厳密な発現調節のもとで高発現することにより、ゲノムワイドなメチル化模様を形成し、そして、Dnmt3a はクロマチン・リモデリング因子等によるクロマチン構造変換に依存して、特定のゲノム領域のメチル化模様を形成することを提案したい。

論文審査の結果の要旨

哺乳類では染色体 DNA 中の CpG 配列のシトシン塩基は高頻度でメチル化修飾を受けており、この修飾は発生・細胞分化、遺伝子刷込み、X 染色体不活性化の原因の一つとなっている。ゲノムのメチル化模様は 2 つの DNA メチルトランスフェラーゼ、Dnmt3a と Dnmt3b により形成されるが、これまでの遺伝学的解析から、両酵素が生体内で異なるゲノム領域をメチル化することが示されている。竹島秀行君はゲノム DNA のメチル化模様を創生する責任酵素である Dnmt3a と Dnmt3b の組換え酵素を精製して、人工的に再構成したヌクレオソームを基質として用い、両酵素によるメチル化模様形成機構に関する生化学的な研究を行った。その結果、両酵素が裸の DNA を基質とした場合とは異なり、ヌクレオソーム DNA をメチル化する活性に違いがあることを見出した。これにより、この違いが生体内で両酵素が異なるゲノム領域をメチル化することの分子基盤の一つであることを提唱した。よって本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。