



Title	Relationship between DNA methylation states and transcription of individual isoforms encoded by the Protocadherin- α gene cluster
Author(s)	川口, 将史
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48952
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 かわ 川 ぐち 口 まさ 将 ふみ 史

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 2 1 8 0 2 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 20 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科情報伝達医学専攻

学 位 論 文 名 Relationship between DNA methylation states and transcription of individual isoforms encoded by the *Protocadherin- α* gene cluster (プロトカドヘリン α 遺伝子クラスターにおける各アイソフォームの差次的発現パターンと DNA メチル化の関係性)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 八 木 健

(副査)

教 授 近 藤 寿 人 教 授 岡 村 康 司

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

莫大な数の神経細胞からなる脳を構築・維持するためには、神経細胞に多様性を賦与するメカニズムが必要である。プロトカドヘリン α (*Pcdh- α*) は脊椎動物において多様化したクラスター型遺伝子群であり、多様化アイソフォームをコードする可変エクソンと、全てのアイソフォームに共通して用いられる定常エクソンからなる。単一神経細胞レベルでの発現解析から、個々のプルキンエ細胞では *Pcdh- α* 1 から α 12 の可変エクソンが異なる組み合わせで発現することが明らかになっている。一方、同じ遺伝子クラスター内にある *Pcdh- α* C1 と α C2 可変エクソンは、全てのプルキンエ細胞で発現することが明らかになっている。しかし、このような発現制御機構の分子基盤は未だに不明である。各 *Pcdh- α* 可変エクソン上流のプロモーター領域には CpG を含む共通配列があり、DNA メチル化を伴うエピジェネティックな発現制御機構が示唆される。そこで本論文では、*Pcdh- α* 遺伝子クラスターの発現選択と DNA メチル化の関係性を検討した。

【方法ならびに成績】

Pcdh- α 可変エクソンを差次的に発現する培養細胞株 C1300 と M3 について DNA メチル化状態を解析した。可変エクソンの 3' 領域は *Pcdh- α* 1 から α 12 の全てで強くメチル化されていたが、プロモーター領域と 5' 領域では、可変エクソンごとに異なるメチル化パターンが見られた。プロモーター領域と 5' 領域が強くメチル化されている *Pcdh- α* 可変エクソンは発現レベルが低く抑えられていたのに対し、メチル化レベルの低いものは高い発現を示した。一方、プロモーター領域がメチル化・脱メチル化の混在したモザイクパターンを示す *Pcdh- α* 可変エクソンは、発現する場合としない場合の両方を含んでいた。

DNA 脱メチル化剤 5-アザシチジン (5aC) で処理した C1300 細胞株では、5aC の濃度に伴い各 *Pcdh- α* 可変エクソンのプロモーター領域において脱メチル化が進行し、全ての可変エクソンが発現した。この脱メチル化処理を施した C1300 細胞集団から個々の細胞をサブクローン化した結果、それぞれに異なる組み合わせの *Pcdh- α* 可変エクソンを発現していた。各 *Pcdh- α* 可変エクソンのプロモーター領域は、個々のサブクローンに特有のモザイクなメチル化パターンを示し、サブクローンごとに差次的な *Pcdh- α* 可変エクソンの発現パターンと一致した。モザイクパターン

と発現増加の関連性を明らかにすることはできなかったが、少なくとも全ての *Pcdh-α* プロモーター領域に含まれる共通配列中の CpG では、メチル化と発現増加に相関性が見られなかった。

C1300 細胞株を用いたレポーター遺伝子アッセイにおいて、C1300 中で発現が抑制されている *Pcdh-α* プロモーター領域でも、DNA メチル化を受けていない場合は転写活性を示した。一方、転写活性が確認されている *Pcdh-α* プロモーター領域でも、メチル化を受けると活性が抑制された。

マウス大脳皮質組織における各 *Pcdh-α* プロモーター領域のメチル化パターンを解析した結果、神経細胞ごとに差次的に発現している *Pcdh-α 1* から *α 12* の可変エクソンでは、多様でモザイクなメチル化パターンが認められた。このモザイクパターンは、小脳組織から単離した 500 個のプルキンエ細胞でも確認された。一方、全ての神経細胞で強く発現している *Pcdh-α C1* と *α C2* のプロモーター領域とエクソン 5' 領域は、*in vivo* で強く脱メチル化されていた。

【総括】

Pcdh-α 遺伝子クラスターにおいて、各アイソフォームの発現と関係性を示す DNA メチル化パターンは、各可変エクソンのプロモーター領域と 5' 領域に限定されていた。完全にメチル化を受けた *Pcdh-α* プロモーター領域では転写活性が認められないが、モザイクパターンの場合は活性を示す場合と示さない場合のいずれもあった。このような傾向は、培養細胞株にとどまらず、5aC によってメチル化パターンが変化したサブクローンや、生体脳におけるプルキンエ細胞集団でも観察された。

近年、海馬で発現する BDNF 遺伝子や Glucocorticoid 受容体遺伝子において、プロモーター領域内の特定の CpG におけるメチル化状態が、発現を制御する可能性が示唆されている。*Pcdh-α* プロモーター領域で見られたモザイクなメチル化パターンにも、このような特定の CpG に対応する発現制御が存在するかどうかを解明することが、今後の重要な課題である。

論文審査の結果の要旨

申請者は、脳神経系において個々の神経細胞で差次的発現を示す多様化膜分子群、プロトカドヘリン α (*Pcdh-α*) の遺伝子制御機構に興味を持ち研究を行った。*Pcdh-α* アイソフォームを差次的発現に発現する 2 種類の培養細胞株を用いて、遺伝子発現とゲノム DNA メチル化状態の解析を行った。

その結果、各アイソフォームの遺伝子発現が各プロモーター領域における DNA メチル化状態と関連していることを明らかにした。また、この関連は 3' エクソン領域での DNA メチル化状態では見られないことを明らかにした。更に、培養細胞株への DNA 脱メチル化剤処理により、発現抑制されていたアイソフォームの発現が顕著に増加することを明らかにした。これらの結果は、*Pcdh-α* アイソフォームの発現制御に各プロモーター領域の DNA メチル化状態が強く関わっていることを示唆していた。申請者は、更に生体マウス脳を用いて *Pcdh-α* アイソフォームの遺伝子発現とゲノム DNA メチル化状態との関連性を調べた。その結果、多くの神経細胞で高頻度に発現する *Pcdh-α* (C1、C2) アイソフォームのプロモーター及び 5' エクソン領域ではほぼ全ての CG 配列が脱メチル化されていた。一方、神経細胞ごとに差次的発現が認められた *Pcdh-α* アイソフォームでは、メチル化と脱メチル化が混ざった種々のモザイクなパターンを示すことが明らかとなった。この種々のモザイクなパターンが混在する状況は、プルキンエ細胞のみ集めた解析でも認められ、各アイソフォームの差次的発現との関連性について興味深い結果であった。このような DNA メチル化のモザイクパターンの生理的意義については今後の課題であるが、申請者の研究は *Pcdh-α* アイソフォームの発現制御とゲノム DNA メチル化との関連性を新しい観点より多角的に示した点で意義の高い成果であると言える。

以上、申請者の研究は、学位の授与に十分に値するものと考ええる。