The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Differential DNA methylation by Dnmt3b regulates stochastic expression of clustered Protocadherin genes in single neurons
Author(s)	豊田, 峻輔
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60032
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

【79】

氏　　名	豊　田　峻　輔（とよだ しゅんすけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理学）
学　位　記　番　号	第　２６２６０　号
学位授与年月日	平成25年３月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学　位　論　文　名	Differential DNA methylation by Dnmt3b regulates stochastic expression of clustered Protocadherin genes in single neurons （Dnmt3b 依存的な DNA メチル化は単一神経細胞におけるプロトカドヘリン遺伝子群の確率的な発現を制御する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　八木　　健 （副査） 教　授　山本　亘彦　　教　授　仲野　　徹　　教　授　濵田　博司

論　文　内　容　の　要　旨

The mammalian brain contains enormous numbers of neurons that have distinct circuit specificities. *Protocadherin* (*Pcdh*)-α, *Pcdh*-β and *Pcdh*-γ gene clusters encode diversified transmembrane proteins that are expressed stochastically and combinatorially in individual neurons. Each *Pcdh* gene has its own promoter, the methylation of which correlates with each gene's expression in several cell lines. Here I studied the *in vivo* mechanisms and found that the *Pcdh* promoters are differentially methylated by the *de novo* DNA methyltransferase Dnmt3b, during early embryogenesis. To determine this methylation's role in neurons, I produced chimeric mice from Dnmt3b-knockout (KO) induced pluripotent stem cells (iPSCs), which survived to adulthood. However, Dnmt3b-KO Purkinje cells showed impaired dendritic self-avoidance and arborization. To evaluate expression of each *Pcdh* isoform in single cells, I developed a high-throughput expression analysis by using a microfluidic real-time PCR system. Individual Dnmt3b-KO Purkinje cells expressed increased numbers of the *Pcdh* isoforms at the single neuron level, although the total expression level within the cluster was maintained. These results indicate that the Dnmt3b-mediated DNA methylation at early embryonic stages regulates both the probability of expression for the stochastically expressed *Pcdh* isoforms in single differentiated neurons and the self-avoidance of dendrites. They also suggest a potential mechanism for cell lineage-based specification of neuronal identity.

論文審査の結果の要旨

個々の神経細胞はそれぞれ異なる回路特性を持っているが、神経細胞に個性を与える分子メカニズムは未だ明らかになっていない。申請者は、個々の神経細胞ごとに異なる分子種を確率的に発現しているクラスター型プロトカドヘリン(cPcdh)分子群に注目し、プロモーター領域のDNAメチル化と発現制御機構との関係を解析した。その結果、マウス胎生初期にメチル基転移酵素Dnmt3bが各cPcdh遺伝子のプロモーター領域をメチル化していることを明らかにした。また、Dnmt3b欠損マウスは胎生致死となるため、Dnmt3b欠損iPS細胞を樹立し、キメラマウス作製による解析を行った。その結果、単一神経細胞レベルでのcPcdh遺伝子の確率的な発現制御の異常が認められた。また、プルキンエ細胞の樹状突起の異常が明らかとなった。これらの結果より、発生初期のDnmt3b依存的なDNAメチル化は個々の神経細胞におけるcPcdh分子種の確率的な発現を制御し、樹状突起の自己忌避性に必須であることを明らかにした。これらの結果は、神経回路形成において新たなエピジェネティックのメカニズムを提唱するものであり学位に値するものと考える。