

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Zfp296 negatively regulates H3K9 methylation in embryonic development as a component of heterochromatin   |
| Author(s)    | 松浦, 巧   |
| Citation     | 大阪大学, 2018, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/69273">https://hdl.handle.net/11094/69273</a>   |
| rights       |   |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 松浦 巧

|         | (職)        | 氏 名    |
|---------|------------|--------|
| 論文審査担当者 | 主 査 大阪大学教授 | 岡村 康司  |
|         | 副 査 大阪大学教授 | 野々村 祝夫 |
|         | 副 査 大阪大学教授 | 川口 裕之  |

## 論文審査の結果の要旨

C2H2型Znフィンガー (C2H2-ZF) タンパク質は、真核生物における最大の転写因子ファミリーであるが、その中にはエピジェネティック制御に関わるものも報告されている。Zfp296は、哺乳類を通じて進化的に保存されているC2H2-ZFタンパク質であり、発ガンや幹細胞維持に関与するとの報告があるものの、その分子機能は未知であった。本研究は、Zfp296の生体内での役割を遺伝子欠損モデルにより詳細に検討したものであり、Zfp296が生殖細胞の発生や胎仔成長に重要な役割を持つ遺伝子であるということを見出した。更に、Zfp296が細胞核のヘテロクロマチンに存在し、複数のエピジェネティック制御因子と相互作用し得ることおよび、H3K9メチル化を抑制することを明らかにした。以上は、Zfp296遺伝子の機能を明らかにする上で重要な知見であると共に、Zfp296が関与する生命現象の理解とH3K9メチル化を中心とするエピジェネティック制御の解明に寄与するところ大である。従って、本研究内容は博士（医学）の学位授与に値するものと認める。

論文内容の要旨  
Synopsis of Thesis

|  |  |
|--|--|
| 氏名<br>Name   | 松浦 巧   |
| 論文題名<br>Title  | Zfp296 negatively regulates H3K9 methylation in embryonic development as a component of heterochromatin (Zfp296は胎生期においてヘテロクロマチン構成因子としてヒストンH3K9メチル化を抑制する) |
| 論文内容の要旨  |  |
| <p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>染色体のペリセントロメア領域は、サテライトDNAと呼ばれる反復配列を主体とし、ヘテロクロマチンに凝縮している。ヘテロクロマチンは、転写の不活性化だけではなく、染色体の正確な分配にも関係し、ゲノムを安定に保持・伝播する上で重要な構造であり、全ゲノム解析の進歩によって予想以上に可塑的に形成・制御されていることが明らかになってきた。ヒストンH3K9メチル化は、ヘテロクロマチンに特徴的なエピジェネティック修飾であり、発生段階や病的状態において特定のタンパク質複合体によって制御されていると考えられているが、そのメカニズムには不明な点が多い。一方、C2H2型Znフィンガー (C2H2-ZF) タンパク質のZfp296は、もともと白血病モデルマウスにおいて癌遺伝子の候補として発見され、白血病や脳腫瘍、前立腺癌の発症・進行に関係があるとされてきた。また、Zfp296は、ES細胞やiPS細胞で発現が高く、分化とともに発現が失われるという特徴が知られ、山中因子と共にZfp296を発現させることでiPS初期化を促進するとの報告があり、幹細胞の多能性維持に関係していると考えられてきた。しかし、これらのメカニズムは不明である。そこで、本研究では、生体内におけるZfp296の役割を明らかにするため、Zfp296ノックアウト (KO) マウスを作製し、その表現型の解析を進めた。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>Zfp296には5個のC2H2-ZFドメインがあり、その全てが第3エクソンにコードされている。そこで、第3エクソンに対する改変コンストラクトを設計し、相同組換えによるノックイン法によって導入し、Zfp296遺伝子のC2H2-ZFドメインを全て欠損させたKOマウスを作出した。Zfp296 KOマウスの成体は、体格や外貌に異常はなく健康であったが、雌雄ともに生殖腺の形成不全がみられ、不妊傾向を示した。組織解析の結果、これは胎生期の始原生殖細胞の分化異常に起因することが分かった。一方、Zfp296ヘテロKOマウス同士の交配で、Zfp296 KOマウスの出生が相対的に少なく、遺伝子型分離比がメンデルの法則から外れていることが分かった。そして、その原因として、Zfp296 KOマウスの胎生期に胎生致死や成長遅延がみられることを確認した。また、この胎生時期にZfp296は、細胞内においてヘテロクロマチンに局在することを確認した。次に、GST-Zfp296を用いたプルダウン実験および質量分析ショットガン解析によりZfp296結合タンパク質を検出した。その結果、Zfp296は、ヘテロクロマチンやNuRD複合体を形成する複数のエピジェネティック制御因子 (HP1やDnmt1、Dnmt3b、ATRX、Mbd3、Mta1、Mta2、Gatad2ab) と結合することが分かった。そこで、ヘテロクロマチンに特徴的なエピジェネティック修飾であるH3K9メチル化について更なる解析を進めたところ、Zfp296の過剰発現が、培養細胞においてヒストンメチル酵素のSuv39h1によるH3K9メチル化を抑制することを見出した。この事実と一致し、Zfp296 KOマウスでは、H3K9メチル化レベルが胎生時期依存的に全身的に高く、特にクロマチン免疫沈降解析により構成的ヘテロクロマチンの主体となるサテライトDNA配列のH3K9メチル化レベルが高いことが示された。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>本研究では、Zfp296が、ヘテロクロマチン構成因子としてH3K9メチル化を抑制することを新たに見出し、生殖細胞の発生や胎仔成長において重要な役割を担うことを明らかにした。さらに他の報告と照らし合わせると、このZfp296によるエピジェネティック制御は、胎仔発生に限らず、悪性腫瘍の発症・進展や体細胞リプログラミングにおいても同様に重要であると考えられ、このメカニズムの更なる研究は、基礎研究のみならず癌治療や再生医療などを見据えた医学研究においても鍵となるエピジェネティクスの一端の解明につながる可能性がある。</p> |  |