

氏 名 加藤 謙

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 955 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Establishment of Paternal Methylation Imprints in  
Normal and Dnmt-Deficient Male Germ Cells

論文審査委員 主 査 教授 城石 俊彦  
教授 角谷 徹仁  
助教授 深川 竜郎  
教授 相賀 裕美子  
助教授 野崎 正美（大阪大学）

## 論文内容の要旨

ゲノムインプリンティングは、生殖細胞特異的なエピジェネティックな現象であり、それによっていくつかの遺伝子では父母由来の対立遺伝子のどちらか一方のみが親由来に依存して発現する。このような遺伝子はインプリント遺伝子と呼ばれ、胎児の発生や胎盤形成、母性行動など様々な生命現象に関与している。

DNA シトシン塩基のメチル化は、遺伝子発現制御やゲノムの安定性に重要な役割を果たしている。DNA メチル化を担う酵素 (Dnmt) としては、既にメチル化されている DNA の複製時に新たに合成される DNA 配列のメチル化を担う維持メチル化酵素である Dnmt1 と、メチル化されていない DNA 配列の新規メチル化を担う Dnmt3a や Dnmt3b の 2 種類が知られている。インプリント遺伝子の発現は differentially methylated region (DMR) と呼ばれる対立遺伝子間で DNA メチル化状態に差がある領域によって制御されることが知られている。これまでに、Dnmt1 ノックアウトマウスにおける DMR のメチル化解析やインプリント遺伝子の発現解析の結果等から DNA メチル化がゲノムインプリンティングの分子の実体であると考えられている。

DMR の対立遺伝子特異的な DNA メチル化は親の配偶子形成過程で確立し、受精後、体細胞では発生過程を通じて安定に維持される。一方、始原生殖細胞では DMR のメチル化は脱メチル化によっていったん消去され、その個体の性に応じて配偶子形成過程で再び確立される。これまでの研究から、雌の生殖細胞での DMR のメチル化は出生後の第一次卵母細胞で確立されることが知られている。また、Dnmt3 関連遺伝子である Dnmt3L が雌の生殖細胞における DMR のメチル化に必須であることが示されており、さらに生殖細胞特異的 Dnmt3a, Dnmt3b ノックアウトマウスの解析から、Dnmt3a が雌の生殖細胞での DMR のメチル化に必須であることが報告されている。それに対し、雄の生殖細胞での DMR のメチル化は胎生期の前精原細胞で始まることが知られているが、その詳細な時期についての解析結果は複数のグループからの報告が一致しておらず、関与する DNA メチル化酵素遺伝子も未だに明らかになっていなかった。

本論文では、マウス雄生殖細胞における DMR のメチル化確立機構を解明することを目的として、以下の研究を行った。1) 野生型雄マウスの各発生段階での生殖細胞における全ての DMR のメチル化確立過程を詳細に解析した。この実験では、メチル化解析を行うにあたり、父母由来の対立遺伝子を区別するため C57BL/6 雌と JF1 雄を交配させて得られた F1 個体を用いた。2) 生殖細胞特異的な Dnmt3a, Dnmt3b および Dnmt3L ノックアウトマウスを用いて、どの DNA メチル化酵素遺伝子が雄生殖細胞での DMR のメチル化に関わるか解析した。

これらの研究から以下の結果が得られた。1) F1 マウスの胎児期と出生直後の前精原細胞におけるメチル化解析により、雄の生殖細胞における全ての DMR のメチル化は出生時までに確立することが明らかとなった。また精子形成過程の雄の生殖細胞を用いた DMR のメチル化解析の結果、gonocyte で確立した DMR のメチル化は精子形成過程において安定に維持されることがわかった。このことは、これまで特定の DMR の結果でのみ言及されてきた雄の生殖細胞における DMR のメチル化確立時期について総合的な結果に基づいて結論を下したものである。2) 生殖細胞特異的な Dnmt3a, Dnmt3b と Dnmt3L 変異体を

用いた DMR のメチル化解析により、DMR のメチル化には Dnmt3a と Dnmt3L が主要な役割を果たすことが明らかとなった。しかし、これら Dnmt 変異体での DMR のメチル化レベルは DMR 間で異なっており、一部の DMR では Dnmt3b の関与が示された。このことから Dnmt3a と Dnmt3L で説明されている雌生殖細胞での DMR のメチル化機構とは異なり、雄の生殖細胞における DMR のメチル化には複数の DNA メチル化酵素遺伝子が関与することが示された。

以上の研究結果は、これまで詳細が不明であった雄の生殖細胞における DNA メチル化の時期を総合的な見地から明らかにし、また、雌の生殖細胞と異なり複数の DNA メチル化酵素の関与を示した点で高い学術的価値を持っている。今後の雄生殖細胞におけるゲノムインプリンティング研究にとって重要な基盤情報を提示したものである。

## 論文の審査結果の要旨

本博士論文では、ゲノムインプリンティングの分子基盤と考えられている DMR のメチル化確立機構を解明することを目的として研究を行った。特に、雄の生殖細胞での DMR のメチル化は胎生期の前精原細胞で始まることが知られているが、その詳細な時期についての詳細は不明であり、関与する DNA メチル化酵素遺伝子も未だに明らかになっていなかった。そこで、雄性生殖細胞に焦点を絞り、以下の実験を行った。

1) 野生型雄マウスの生殖細胞の各発生段階における 3 種類の DMR のメチル化確立過程を詳細に解析した。2) 生殖細胞特異的な Dnmt3a, Dnmt3b および Dnmt3L ノックアウトマウスを用いて、どの DNA メチル化酵素遺伝子が雄の生殖細胞での DMR のメチル化に関わるかを解析した。

これらの実験から以下の結果が得られた。1) F1 マウスの胎児期と出生直後の前精原細胞におけるメチル化解析により、雄の生殖細胞における全ての DMR のメチル化は出生時までに確立することが明らかとなった。また精子形成過程の雄の生殖細胞を用いた DMR のメチル化解析の結果、前精原細胞で確立した DMR のメチル化は、精子形成過程において安定に維持されることがわかった。このことは、これまで特定の DMR の結果でのみ言及されてきた雄の生殖細胞における DMR のメチル化確立時期について総合的な解析結果に基づいて結論を下したものである。2) 生殖細胞特異的な Dnmt3a, Dnmt3b と Dnmt3L 変異体を用いて現在知られている 3 種類全ての DMR のメチル化解析により、DMR のメチル化には Dnmt3a と Dnmt3L が主要な役割を果たすことが明らかとなった。しかし、これら Dnmt 変異体での DMR のメチル化レベルは DMR 間で異なっており、一部の DMR では Dnmt3b の関与が示された。このことから Dnmt3a と Dnmt3L のみで説明されている雌の生殖細胞での DMR のメチル化機構とは異なり、雄の生殖細胞においては、複数の DNA メチル化酵素遺伝子が働いていることが示された。

以上の研究結果は、これまで詳細が不明であった雄の生殖細胞における DNA メチル化の時期を総合的な見地から明らかにし、また、雌の生殖細胞と異なり複数の DNA メチル化酵素の関与を示した点で高い学術的価値を持っている。今後の雄生殖細胞におけるゲノムインプリンティング研究にとって重要な基盤情報を提示したものとして評価でき、博士論文として十分な内容であると判断した。