

氏 名 小林 久人

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 957 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 Comprehensive characterization of differentially
methylated regions associated with mouse
imprinted genes

論文審査委員 主 査 教授 相賀 裕美子
助教授 池尾 一穂
助教授 小出 剛
教授 角谷 徹仁
教授 石野 史敏（東京医科歯科大学）

論文内容の要旨

Imprinted genes in mammals show monoallelic expression dependent on parental origin and are often associated with differentially methylated regions (DMRs). A number of DMRs have been identified around or within the imprinted mouse genes, and the parent-of-origin dependent DNA methylation at the DMRs serves as the epigenetic mark to distinguish the parental alleles. There are two classes of DMR: germline DMRs acquire gamete-specific methylation in either spermatogenesis or oogenesis and maintain the allelic methylation differences throughout development; secondary DMRs establish differential methylation patterns after fertilization. Targeted disruption of some germline DMRs showed that they dictate the allelic expression of nearby imprinted genes and the establishment of the allelic methylation of secondary DMRs. However, how the imprinting machinery recognizes germline DMRs is unknown.

To elucidate the structural characteristics of the DMRs, I wanted to obtain their nucleotide sequences. However, I realized that the precise extents of most DMRs are unknown. The lack of accurate information on the extents of the DMRs is a barrier to the studies on their structural features. As a step toward elucidating the sequence features of the germline DMRs, I have determined the extents and boundaries of 15 germline mouse DMRs (including 12 maternally methylated and 3 paternally methylated ones) in 12.5-dpc embryos and sperm by bisulfite sequencing. The results showed that the average size of the DMRs is 2.7 kb and that their average G+C content is 54.2%. I also found that the DMRs have several different methylation patterns at the boundaries.

Next, oligonucleotide content analyses of the determined DMR sequences revealed that the DMRs show a content value intermediate between that of the whole genome and CpG islands for most oligonucleotides. I also found that, although the DMRs are generally CpG rich, the paternally methylated DMRs contain less CpGs than the maternally methylated DMRs. One possible explanation for this sexual dimorphism is that the paternally methylated DMRs are more mutable than the maternally methylated DMRs. However, it is also possible that the differential CpG content is one of the features recognized by the *de novo* methylation machinery in the germline. Some oligonucleotides such as TpGpC+GpCpA, GpCpApA+TpTpGpC and TpGpCpA were overrepresented in the DMRs, but their biological significance is currently unknown.

Furthermore, using the germline DMR sequences, I also carried out SOM (self-organizing map) analyses and found that many germline DMRs have features distinct from typical mouse sequences. For example, some DMRs such as the *Meg1/Grb10* and *U2af1-rs1* DMRs had prokaryote-like sequence features. These results provide a basis to identify the structural characteristics specific to the germline DMRs.

論文の審査結果の要旨

哺乳類の受精卵が正常発生するには、母由来の核と父由来の核の融合が必須である。その原因として、父由来か母由来かによって片方のアリルだけが発現する遺伝子（インプリンティング遺伝子）が存在しておりそれらに発現の過不足があると異常がおこることが示されている。その遺伝子の近傍にはアリル間でDNAメチル化状態が異なる領域（DMR）が存在しインプリンティングの制御にはこのDNAメチル化が中心的な役割を果たす。しかしどのような機構でそれらの遺伝子が選ばれてDMRとしてマークされるかその機構は不明である。可能性として、DMRには何らかの共通の性質があり、それらが認識されて、メチル化されるという考え方がある。小林君はその可能性を検討するために、現在までにわかっているDMRの配列の比較を試みた。しかしその際、比較対象となるDMRの範囲を明確に規定する必要があるが、そのような詳細な報告はこれまでなかった。そこでまず、バイサルファイト法を用いて各インプリント遺伝子のDMRの決定を行なった。その際、膨大な量のサンプルを効率よく解析するために、独自の方法を開発しDMR同定ハイスループット法を確立し、マウス配偶子形成過程で確立されるDMRを15個（母由来でメチル化されるDMRが12、父由来でメチル化されるDMRが3）確定した。さらに、本解析により同定されたDMRを2つの方法で解析した。まず、確定したDMR内における2～4塩基配列の出現頻度を算出した。その結果、多くの配列の頻度がDMRにおいてCpGアイランドとゲノム全体の中間的な値を示し、また父由来にメチル化されるDMRは母由来にメチル化されるDMRよりもCpG頻度が低いことを明らかにした。また、CpG以外にもいくつかの配列の出現頻度は父由来でメチル化されるDMRと母由来でメチル化されるDMRの間で有意に異なっており、これらの配列が配偶子形成過程において新規メチル化機構により認識されDMRの特徴である可能性を示した。さらに、それらの配列をSOM (self-organizing map) 解析により検討した結果、多くのDMRが典型的なマウスゲノムとは異なり、一部は原核生物的な特徴をもつことが示された。DMRの由来としてトランスポゾンの可能性が示唆されてきたが今回の結果はさらにその可能性を支持している。

以上のように、小林君は、独自に改良した方法を用いて効率的にDMRの配列を決定し、その比較を可能にした。さらに今回用いた解析法のうちSOM解析により、DMRがマウスのゲノムとは異なった性質を有することを示した。これまで全く特徴付けられていなかったDMRと呼ばれる構造に共通の性質があることを初めて示したことは高く評価でき、小林君の論文は遺伝学専攻の博士論文としての条件を満たしていると審査員全員が認めた。