

氏 名 富澤 信一

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1250 号

学位授与の日付 平成 21 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 DNA methylation analysis of gametic imprints in the
mouse and search for factors involved in imprint
establishment.

論文審査委員 主 査 教授 城石 俊彦
教授 小林 武彦
助教 隅山 健太
助教 西嶋 仁
教授 石野 史敏(東京医科歯科大学)

論文内容の要旨

Genomic imprinting is an epigenetic phenomenon crucial for normal mammalian development. Genes subject to imprinting (imprinted genes) are associated with differentially methylated regions (DMRs) that are methylated on either the maternal or the paternal chromosome. In mice, at least fifteen DMRs acquire such differential DNA methylation in the parental germline, and the established methylation imprints are then transmitted to the zygote and maintained throughout development. Acquisition of DNA methylation of these DMRs depends on a protein complex containing DNA methyltransferase family proteins, Dnmt3a and Dnmt3L. However, the mechanism by which specific sequences are targeted for methylation remains poorly understood.

Previously in our laboratory, the extents along DNA of the allelic differential methylation of the fifteen DMRs in 12.5-days-post-coitum (12.5-dpc) embryos were determined by bisulphite sequencing. To explore the origin of the differential methylation, I have carried out a comprehensive DNA methylation analysis of the same DMRs in sperm and oocytes. I found that the extents of the differential methylation differ significantly between the gametes and 12.5-dpc embryos, suggesting that dynamic changes occur after fertilization. Both expansion and contraction of the differential methylation were observed.

Small interfering RNAs (siRNAs) and piwi-interacting RNAs (piRNAs) were previously shown to act as guides to induce local heterochromatin or DNA methylation. To test whether the small RNAs in prospermatogonia and oocytes are involved in *de novo* DNA methylation of the DMRs, I examined whether these small RNAs are mapped within the DMRs determined in this study. Not many of them were mapped in the DMRs, suggesting small RNA-independent targeting of the *de novo* DNA methylation machinery.

Another factor possibly involved in the targeted methylation is a protein(s) that interacts with the DNA methyltransferase complex. By yeast two-hybrid screening, I identified Glis1 (a Krüppel-like zinc finger protein), Baf60a (a component of the SWI/SNF chromatin remodeling complex) and Rai1 (a PHD-containing transcription factor) as candidate proteins which potentially interact with Dnmt3L. Further studies are needed to explore the possibility of the involvement of these proteins in targeted methylation. These data will provide a basis for understanding the mechanism of imprint establishment.

論文の審査結果の要旨

ゲノムインプリンティングは、哺乳類の発生に重要なエピジェネティックな現象である。インプリントを受ける遺伝子の近傍には、父親、母親由来のゲノム間で DNA メチル化状態が異なる領域(DMR)が存在する。マウスでは少なくとも 15 個の DMR が雌雄それぞれの生殖細胞においてメチル化を獲得し、このメチル化状態は受精後も発生段階を通して維持される。これまでの研究で、12.5 日胚を用いて 15 個の DMR の正確な範囲が決められている。DMR は Dnmt3a と Dnmt3L から構成される DNA メチル化酵素複合体によりメチル化されるが、どのような仕組で雌雄の生殖細胞において異なる配列が認識され、メチル化の標的とされるのかという点については依然説明されていない。

富澤君は、まず生殖細胞における DMR の範囲を正確に決定するために、精子と卵子を用いて大規模な DNA メチル化解析を実施した。その結果、生殖細胞と 12.5 日胚の DMR の範囲は大きく異なり、受精後 DMR の範囲は拡大、縮小、あるいは二つの DMR が融合することにより大きく変化することが明らかとなった。

次に DMR を標的とするメチル化の確立に働く因子の探索を行った。植物や酵母では small RNA が DNA のヘテロクロマチン化あるいは DNA メチル化を誘導すること、哺乳類では生殖細胞の small RNA に結合する Mili や Miwi2 タンパク質がレトロトランスポソンの DNA メチル化に関与することが分かってきた。そこで、雌雄各々の生殖細胞で発現する small RNA が DMR を標的としたメチル化の確立に関与する可能性を検討した。先に明らかにした生殖細胞における DMR の配列情報を用い、その領域の配列に一致する small RNA の有無を解析した結果、DMR に雌雄特異的にマップされる small RNA は少なく、DMR のメチル化は small RNA 非依存的な機構で獲得される可能性が示唆された。

最後に、DMR へのメチル化に未知のタンパク質が関与している可能性を調べるため、酵母ツーハイブリッド法により DNA メチル化酵素複合体と相互作用するタンパク質の探索を行った。この結果、Glis1、Baf60a、Rai1 の三つのタンパク質を Dnmt3L と相互作用する候補として同定した。

以上の成果は、生殖細胞における DMR の範囲を確定することにより、ゲノムインプリンティング研究に重要な基盤情報を与えるものである。さらに、生殖細胞の DMR のメチル化の確立に関与するタンパク質の候補を明らかにしたことは、ゲノムインプリンティング確立の分子機構を研究する上で大きな発見である。以上の成果を総合的に判断して、本論文は今後のこの分野の研究発展に大きく貢献するものと考えられる。