

## 論文の内容の要旨

獣医学 専攻  
平成 22 年度 博士課程 入学  
氏 名 伊藤 修平  
指導教員名 塩田 邦郎

論文題目 エピジェネティック性差に関する基礎研究

### [緒言]

ほ乳類の細胞は、メスがX染色体を2本、オスがX染色体とY染色体を1本ずつ有する。発生において、Y染色体上の *Sry* 遺伝子は一時的に覚醒し、オスの性腺を形成させる。一方、メスには *Sry* 遺伝子がないため、雌の性腺を形成する。成熟過程では、生殖器から分泌される性ステロイドが各組織に作用し全身性の変容をもたらす。性ステロイドの影響として、性成熟期を境に、オスではアンドロゲン、メスではエストロジェンが、全身に性特有の変化を引き起こす。さらに、性ステロイドの影響は下垂体ホルモンの分泌パターンにまで影響を及ぼす。以上は“ゲノムの構成に起因した限られた遺伝子の発現により個体レベルでの差を説明できる”とする概念である。しかし、性染色体の雌雄差は、性腺発生を介する以外に影響しないのか、個体発生後の雌雄差は全て性ステロイドにより形成されるのか、性ステロイドはゲノム自体に影響するのか、についての疑問を持つことの妨げにはならない。

雌雄差は有るが性ステロイドの影響を免れている遺伝子や、性ステロイドの存在下で成長ホルモンが影響する常染色体上の遺伝子も報告されている。また、X染色体にはエピジェネティクス制御系で最近注目を浴びている O-GlcNAc 転移酵素 (*Ogt*; O-GlcNAc transferase) 遺伝子が存在する。興味深いことに、胎盤では *Ogt* はメスの方がオスより発現が高い。

本論文ではゲノム機能の性差に焦点を当てる。エピジェネティクス制御系はDNAメチル化とヒストン修飾の組み合わせによる、細胞世代を超えた遺伝子制御系である。但し、遺伝子

制御とは遺伝子安定性、ゲノム複製、修復等を含むゲノム全体の活動を意味し、単に遺伝子発現のみを意味するのではない。本論文はエピジェネティクス修飾と、その制御系に性差が存在するか否かを研究したもので、三章より成る。

第一章では、肝臓において、DNA メチル化状態に性差が認められる領域を探索し、その領域の DNA メチル化状態が性ステロイド依存的に変化するのか検証した。第二章では、X 染色体上のエピジェネティック制御因子、OGT の発現量及び発現制御機構について解析した。第三章では OGT の標的領域を探索した。

#### [第一章]

##### —肝臓における DNA メチル化の性差と性ステロイドの影響—

雌雄のマウス肝臓ゲノムを用いて、ゲノムワイド DNA メチル化解析を行った。そして新たに、オスの方が低メチル化状態である、性に依存した DNA メチル化可変領域(S-DMR: Sex-dependent differentially methylated region)を 10 箇所同定した。それら S-DMR は ES 細胞や脳では DNA メチル化状態に雌雄差がなく、肝臓特異的であった。通常、細胞間で異なる DNA メチル化は CpG 配列の集団が段位となっているが、これらの S-DMR は 1 CpG 単位であった。

先の報告で発見された肝臓の S-DMR は、成長ホルモン-STAT5 の制御に依存していた。ところが、STAT5 結合領域が存在しない遺伝子領域にも S-DMR が存在した。精巣除去、卵巣除去およびそれらのマウスに testosterone propionate, estradiol benzoate を投与したマウスの肝臓を解析した結果、本研究で同定した S-DMR の中で、*Adam2*, *Uggt2*, *Snx29*, *Rnpc3* 及び *Sarnp* 遺伝子の S-DMR は、テストステロン依存的にメチル化率が低下していた。つまり、性ステロイド依存的・成長ホルモン非依存的に DNA メチル化状態が変化するゲノム領域が存在することになる。

DNA メチル化酵素 DNMT1, DNMT3A, DNMT3B、及び DNA 脱メチル化を担う酵素 TET2, TET3 の発現を解析した結果、肝臓における *Dnmt1*, *Dnmt3b* 及び *Tet2* の遺伝子発現はメスの方がオスよりも高かった。さらに、オスにおいて *Tet2* の発現は、精巣除去することでメスにおける発現レベルまで上昇した。また、精巣除去による影響は *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Tet3* では認められなかった。タンパク量を調べた結果、興味深いことに、TET2 は精巣除去により低下した。S-DMR の形成にこれらの DNA メチル化/脱メチル化制御因子の発現が関与している可能性が考えられる。

以上の結果から、雌雄間で DNA メチル化状態に差がある領域が存在し、さらにテストステロン依存的に DNA メチル化率が変化することが明らかになった。

#### [第二章]

##### —栄養膜細胞における OGT の発現量の性差—

ヒストンを含むタンパクの O-GlcNAc 修飾は OGT により付加され、OGA (O-GlcNAcase) により除去される。OGT によるヒストン修飾自体も興味深いことだが、OGA もヒストンアセチル化活性のあるドメインを有しており、O-GlcNAc 修飾とアセチル化との新たな制御機構として魅力的である。

本章ではまず、マウス胎盤における OGT の発現がメスで高いとする、先の報告を確かめた。次に、分子レベルでの解析を容易にするためにマウス栄養膜幹 (TS : trophoblast stem) 細胞を用い *Ogt* の発現量を調べてみたが、性差が全く認められなかった。しかし、TS 細胞を分化させると OGT の発現量が低下するものの、メスの方がオスよりも高かった。

次に、マウス胎盤組織と TS 細胞を用いて X 染色体上の *Ogt* 遺伝子領域の DNA メチル化状況解析した。その結果、転写開始点近傍 (-745~+39bp) は細胞・組織問わず非メチル化であるのに対して、上流 (-1,544~-745bp) は細胞・組織依存的にメチル化され性差に関与することが疑われた。X 染色体不活化は体細胞組織ではランダムに行われるが、栄養膜細胞は父親由来の X 染色体が選択的に不活化される。また TS 細胞では CpG island は不活性化 X 染色体でメチル化されていると考えられている。*Ogt* の非メチル化領域 (-745~+39bp) は CpG 配列が豊富な領域である。CpG 配列が豊富な *Ogt* のプロモーター領域が DNA 非メチル化状態であることから、*Ogt* 遺伝子領域は X 染色体不活性化を免れていると考えられる。レポーターアッセイの結果、分化 TS 細胞におけるプロモーター領域の転写活性に雌雄差は無かった。よって、分化 TS 細胞で見られる雌雄差を生む原因は、メスで X 染色体が 2 本存在し、しかも X 染色体不活性化を免れることに起因すると考えてよい。次に、転写因子の解析を行ったところ、TS 細胞では ATF2 や SOX9 発現が高く、分化に伴い減少することが明らかになった。一方、他の転写因子 HLF は分化 TS 細胞で発現が高いことも分かった。したがって、TS 細胞の分化に伴う *Ogt* の発現の低下は、ATF2 や SOX9 から HLF に切り替わることによる。

*Ogt* 遺伝子上流 (-1,544~-745bp) の未分化 TS 細胞の DNA メチル化は、メスの方がオスよりも高メチル化状態であったため、S-DMR と考えられる。この S-DMR は多数の CpG が単位となっており、遺伝子発現の制御に関与することが推定される。その場合、未分化 TS 細胞では、雌雄の *Ogt* 遺伝子の発現量に性差が無いことから DNA メチル化による量的調整が発揮されていると考えれば納得できる。胎盤及び分化 TS 細胞ではメスゲノムがより低メチル化状態であった。すなわち、量的調節が緩和され、メスで *Ogt* の発現が高いことになる。

### [第三章]

#### —栄養膜細胞における OGT の結合領域の探索—

次に TS 細胞における OGT の標的遺伝子領域をゲノムワイドに解析した。その結果、転写開始点近傍に OGT が結合する遺伝子座が集中していた。分化 TS 細胞についてはメスでは 22,861 個、オスでは 16,564 個の転写開始点近傍 ( $\pm 1$ kb) に OGT の結合領域があり、そのうち 9,973 個は雌雄で共通していた。一方、未分化 TS 細胞では雌雄合わせて 723 個の転写開始点近傍 ( $\pm 2.5$ kb) にしか OGT の結合領域が存在しなかった。

雌雄の分化 TS 細胞で共に OGT が結合する領域について ChIP-PCR 解析を行なった結果、複数の OGT 結合領域において、OGT はメスの方がオスよりも多く結合していた。興味深いことに、*Mgea5* (*Oga*) 遺伝子にも、メスの方がオスよりも OGT が多く結合していた。*Mgea5* は OGA をコードする遺伝子である。分化 TS 細胞において *Mgea5* の発現は *Ogt* と同様、メスで高くオスで低かつ

た。この傾向はマウス胎盤にも認められた。以上の結果は *Mgea5* が OGT の制御下にあることを示唆している。

分化 TS 細胞において、メスの方がオスよりも OGT, OGA の両方の発現が高いことは、細胞全体の O-GlcNAc 修飾量には性差を小さくする工夫だと考えることも可能である。細胞総タンパクの O-GlcNAc 修飾を western blot 及び免疫染色により解析した結果はこの解釈を支持し、分化 TS 細胞における O-GlcNAc 修飾レベルに顕著な雌雄差は無かった。このことから、OGT だけでなく OGA の発現もメスで多いことにより、雌雄の分化 TS 細胞および胎盤における細胞レベルでの O-GlcNAc 修飾を同程度に維持していることが示唆された。

#### [総括]

“ゲノムの構成に起因した限られた遺伝子の発現により個体レベルでの差を説明できる”という従来の考えは *Sry* 遺伝子の有無を起点として、性ステロイドが全身に性差を生じさせることに由来する概念である。本研究から、テストステロンが S-DMR における DNA メチル化修飾に影響を与えることを示した。この結果は、これまで言われてきた性差の概念が、エピジェネティックな性差を伴う事を示唆する。

ゲノム構成に着目すると、Y 染色体だけでなく、X 染色体上の遺伝子の発現も性差を生じさせる要因となる。本研究から栄養膜細胞における X 染色体上の *Ogt* 遺伝子の発現制御機構、及び OGT の発現量の性差が影響を与える標的遺伝子領域を示した。つまり、X 染色体の本数というゲノム構成の雌雄差が、エピジェネティック制御系の性差をもたらすことを示した。また、胎盤では *Ogt* の発現に性差が認められたが、肝臓では性差がない。S-DMR における DNA メチル化の雌雄差が肝臓特異的だったことを鑑みると、メスにおける組織特異的な 2 本の X 染色体の利用法が、組織特異的なエピジェネティックな雌雄差を生じさせる要因となることが考えられた。さらに、OGT については栄養センサーとして働くことが報告されている。また近年、代謝系を反映したエピジェネティクス状況の変化誘導が報告されており、胎盤における OGT の発現量の性差が代謝系を反映するエピジェネティクス状況の変化に性差をもたらすことが考えられる。この場合、成長ホルモンや性ステロイドが遠因となり、代謝系が DNA メチル化の性依存的な変化をもたらすことになる。

本研究より、エピジェネティック修飾とその制御系には組織特異的な性差があることが示された。このことは、細胞数(組織の大きさ)の規定などの性差を研究するうえで重要な知見となる。