

氏名	濱田 良真
授与した学位	博士
専攻分野の名称	理学
学位授与番号	博甲第5344号
学位授与の日付	平成28年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 地球生命物質科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Epigenetic regulation via methylation on histone H3K27 is involved in leg regeneration patterning and photoperiodic responses of the circadian clock in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i> (フタホシコオロギの脚再生及び概日時計におけるヒストン H3K27 のメチル化を介したエピジェネティック制御)
論文審査委員	教授 富岡憲治 教授 上田 均 准教授 中越英樹 准教授 吉井大志

### 学位論文内容の要旨

エピジェネティクスとは、“DNAの塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現の変化が細胞世代を超えて継承される現象”である。エピジェネティック制御は、発生・再生、ガン化、老化、全能性幹細胞の性質、概日時計機構など広範な生命現象への関与が明らかになってきている。エピジェネティックな制御はRNAやDNA、ヒストンテールの化学修飾により起こるが、各修飾がどのように生命現象に寄与しているかは未解明の部分がある。一般に、ヒストンH3の27番目のリジン残基(H3K27)がメチル化されるとクロマチンの構造が凝縮し、遺伝子発現が抑制され、脱メチル化されると逆にクロマチン構造が弛緩し遺伝子発現は活性化される。昆虫においてヒストンH3K27をメチル化する因子はEnhancer of zeste (E(z))で、脱メチル化因子はUbiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome (Utx)であることが知られている。本研究では、フタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)をモデル生物として脚再生と概日リズムを対象として、H3K27のメチル化修飾による遺伝子発現制御機構の解析を行った。

まず、脚再生におけるエピジェネティック制御の役割を解明するため、RNA干渉法(RNAi)や抗体染色、*in situ* hybridizationにより、E(z)とUtxの機能を解析した。3齢幼虫の脚を脛節で切断し、*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>*、*Gb'Utx<sup>RNAi</sup>*処理した実験群と*EGFP<sup>RNAi</sup>*もしくは*DsRed2<sup>RNAi</sup>*処理した対照群で再生脚をヒストンH3K27トリメチル化抗体で染色したところ、対照群に比較して、*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>*個体ではメチル化レベルが減少し、逆に*Gb'Utx<sup>RNAi</sup>*個体ではメチル化レベルが亢進していた。再生脚の形態を詳細に観察した結果、対照群では、未切断脚と同様の形態的特徴を有する脛節、脛節棘、附節(第1、2、3)、附節棘、爪が再生した。一方、*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>*処理群では、第2附節の欠損、附節への過剰棘の形成、過剰脚節の挿入などの形態異常が観察された。*Gb'Utx<sup>RNAi</sup>*処理群では第1、第2附節の融合と棘の欠損が観察された。これらの表現型について脚パターン形成遺伝子の発現パターンの詳細な解析から、*Gb'E(z)*は*Gb'dachshund (Gb'dac)*の第1附節遠位側の発現を抑制し、*Gb'Utx*は*Gb'Egfr*の附節中位の発現を活性化していることが明らかとなった。*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>*処理群は、脱抑制による*Gb'dac*の発現拡大、*Gb'Utx<sup>RNAi</sup>*処理群は、*Gb'Egfr*の発現抑制により再生脚の形態異常が誘導されていることが明らかとなった。

次に、概日リズムのエピジェネティック制御の関与を*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>*により解析した。明期12時間:暗期12時間(LD12:12)では、正常個体群、対照(*DsRed2<sup>RNAi</sup>*)個体群、*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>*処理群のいずれも類似した夜行性の活動リズムを示したが、恒暗条件下(DD)では*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>*処理群は対照群と比べて自由継続周期が有意に長くなることがわかった。次に、光周期をLD20:4に移行し、さらに10日後にDDに移行する条件で歩行活動を記録したところ、対照群では4時間の暗期に活動が集中し、この活動パターンはDDに移行後も長期にわたって継続した。一方、*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>*処理群の大部分はLD20:4への移行後も活動相は短縮せず、DD下でも同様の活動パターンが対照群より長い周期で継続した。LD12:12からLD20:4への移行に伴い、時計遺伝子の概日発現パターンも変化した。しかし、*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>*処理群ではこの変化が抑制されることが明らかとなった。従って、*Gb'E(z)*は光周期依存的に時計遺伝子の概日の発現パターンを制御することで、概日リズムの光周期依存的変調を制御していることが示唆された。

以上の結果から、H3K27のメチル化修飾は、脚再生及び概日リズムの光周期反応を制御していることが明らかとなった。脚再生及び概日リズムの光周期反応は、制御部位も関与する遺伝子も異なるが、それぞれ脚切断及び光周期により、部位および時期特異的にE(z)を含むエピジェネティックな遺伝子発現制御が誘導され、脚再生パターン遺伝子や概日時計遺伝子などそれぞれの現象に特異的な遺伝子が発現調節されると考えられた。

## 論文審査結果の要旨

本研究では、フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) を用い、脚再生と概日リズムのエピジェネティック制御を解明するため、H3K27 のメチル化修飾による遺伝子発現制御機構の解析を行った。

脚再生については、RNA 干渉法 (RNAi) や抗体染色、*in situ* hybridization により、エピジェネティック制御にかかわる *E(z)* と *Utx* の機能を解析した。まず、3 齢幼虫期に脛節で切断した後の再生脚をヒストン H3K27 トリメチル化抗体で染色し、*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>*、*Gb'Utx<sup>RNAi</sup>* 処理した実験群と対照群で H3K27 のメチル化レベルを比較したところ、対照群に比較して、*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>* 個体では減少し、逆に *Gb'Utx<sup>RNAi</sup>* 個体では亢進することを示した。再生脚形態の詳細な観察により、対照群では、未切断脚と同様の形態的特徴を有する脛節、脛節棘、附節(第 1、2、3)、附節棘、爪が再生するが、*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>* 処理群では、第 2 附節の欠損、附節への過剰棘の形成、過剰脚節の挿入などの形態異常が、また *Gb'Utx<sup>RNAi</sup>* 処理群では第 1、第 2 附節の融合と棘の欠損などの形態異常が生ずることを明らかにした。これらの表現型異常個体での脚パターン形成遺伝子の発現パターンの詳細な解析により、*Gb'E(z)* は *Gb'dachshund (Gb'dac)* の第 1 附節遠位側の発現を抑制し、*Gb'Utx* は *Gb'Egfr* の附節中位の発現を活性化していることを明らかにした。以上の結果に基づき、*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>* 処理は、脱抑制による *Gb'dac* の発現拡大、*Gb'Utx<sup>RNAi</sup>* 処理は、*Gb'Egfr* の発現抑制により再生脚の形態異常を誘導することを提唱した。

次いで、概日リズムの光周期による変調機構へのエピジェネティック制御の関与を *Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>* により解析した。12 時間明：12 時間暗(LD12:12)の条件下では、対照(*DsRed2<sup>RNAi</sup>*) 個体群、*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>* 処理群のいずれも類似した夜行性の活動リズムを示したが、恒暗条件下 (DD) の自由継続周期が *Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>* 処理群で有意に延長することを示した。LD20:4 を 10 日間経験した後に DD に移行する条件では、対照群では活動期が暗期に対応して短縮し、この活動パターンが DD に移行後も長期にわたって継続するが、*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>* 処理群の大多数は LD20:4 への移行後も活動相は短縮せず、DD 下でも同様の活動パターンが対照群より長い周期で継続することを明らかにした。さらに、LD12:12 から LD20:4 への移行に伴い、対照群では時計遺伝子の概日発現パターンが変化するが、*Gb'E(z)<sup>RNAi</sup>* 処理群ではこの変化が抑制されることを明らかにした。これらの結果に基づき、*Gb'E(z)* は光周期依存的に時計遺伝子の概日発現パターンを制御することで、概日リズムの光周期依存的変調を制御しているとの仮説を提唱した。

以上の結果に基づき、本論文では、脚再生及び概日リズムの光周期反応は、それぞれ制御部位も関与する遺伝子も異なるが、H3K27 のメチル化修飾が共通のエピジェネティック制御系として関与することを提唱した。本論文は、器官再生機構および概日時計機構についての理解を大きく進展させるものであり、博士論文に相応しいと認められた。また、発表および質疑応答の状況からも、申請者は博士の学位に値するものと判断する。