

学 位 論 文 要 旨

博士課程 ①・乙	第74号	氏 名	高澤 建
[論文題名]			
<p>DNA hypermethylation enhanced telomerase reverse transcriptase expression in human induced pluripotent stem cells</p> <p>ヒト iPS 細胞におけるテロメラーゼ逆転写酵素 (<i>TERT</i>) の遺伝子発現は DNA の高メチル化によって促進される</p> <p style="text-align: right;">(Human Cell, 31(1):78-86, 2018)</p>			
[要 旨]			
<p>ヒト体細胞から人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) へのリプログラミングにおいて、<i>OCT-4</i> や <i>NANOG</i>、<i>SALL4</i>、<i>TERT</i> などの幹細胞マーカー遺伝子の発現が誘導される。<i>OCT-4</i> や <i>NANOG</i>、<i>SALL4</i> 遺伝子は、DNA メチル化による遺伝子の発現制御が報告されている。これらの遺伝子のプロモーター領域は、体細胞においては高メチル化され、発現が抑制されているが、iPS 細胞へのリプログラミングにおいて、低メチル化状態に移行し、発現が誘導される。しかし、テロメラーゼ逆転写酵素 (<i>TERT</i>) 遺伝子における、DNA メチル化によるエピジェネティック制御は未だ明らかではない。そこで本研究では、<i>TERT</i> 遺伝子の発現制御機構について、DNA メチル化によるエピジェネティック制御に着目し、解析を行った。</p> <p>はじめに、ヒト iPS 細胞とその親細胞であるヒト体細胞を用いて、<i>TERT</i> 遺伝子上流領域の DNA メチル化状態を詳細に解析した。その結果、遠位プロモーター領域において体細胞と iPS 細胞間で明らかに DNA メチル化状態の異なる DNA メチル化可変領域 (<i>TERT</i>-DMR) を同定した。<i>TERT</i>-DMR は、<i>TERT</i> 発現のない体細胞で低メチル化を示し、<i>TERT</i> 発現を示す iPS 細胞では有意に高メチル化を示した。次に、<i>TERT</i>-DMR のメチル化が、発現制御に関与しているかを調べるために、DNA メチル化酵素阻害剤の添加実験、及び、<i>TERT</i>-DMR のみをメチル化したプロモーター配列用いた DNA メチル化プロモーターアッセイを行った。その結果、DNA メチル化酵素阻害剤の添加実験では、<i>TERT</i>-DMR の脱メチル化に伴い、<i>TERT</i> 遺伝子の発現は有意に減少し、また、DNA メチル化プロモーターアッセイでは、<i>TERT</i>-DMR の高メチル化に伴い転写活性は有意に上昇した。一方で、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法によりヒストン修飾を解析した結果、体細胞でヘテロクロマチン化しており、iPS 細胞では活性型を示すヒストン修飾が検出された。これらの結果から、<i>TERT</i>-DMR の高メチル化が <i>TERT</i> 遺伝子発現に促進的に働くことが示唆された。</p> <p>一般的にプロモーター領域における DNA のメチル化は、転写活性化因子の結合阻害を引き起こし、結果的に発現抑制に関与することが知られている。しかし <i>TERT</i> 遺</p>			

伝子では、*TERT*-DMR の高メチル化が遺伝子発現に促進的に働いていることから、以下の3つの仮説を立て、検証した。一つ目は、非メチル化 *TERT*-DMR には転写抑制因子が結合し、iPS 細胞では *TERT*-DMR の高メチル化により、転写抑制因子の結合を阻害するという仮説である。仮説の検証にあたり、メチル化、非メチル化 *TERT*-DMR 断片を用いたゲルシフトアッセイを行ったが、特異的に結合する因子は検出されなかった。つまり *TERT*-DMR への転写抑制因子結合による発現制御は否定された。二つ目に、*TERT*-DMR のメチル化状態がゲノムの高次構造を変化させることで発現を制御する、という仮説を立て、*TERT*-DMR と相互作用するゲノム領域の探索を、Chromosome conformation capture (3C) 法と、これを一部改変した S3C 法により詳細に行ったが、*TERT*-DMR と相互作用するゲノム領域は認められなかった。つまり *TERT*-DMR を介したゲノム高次構造の変化も否定された。三つ目に着目したのが、核膜との相互作用である。核膜は転写活性の低い遺伝子領域と結合し、遺伝子発現を制御することが報告されている。そこで、体細胞では非メチル化 *TERT*-DMR が核膜と結合して *TERT* 遺伝子発現を抑制するが、iPS 細胞では *TERT*-DMR の高メチル化が核膜との結合を阻害し、発現促進に働くと仮説を立て、核膜構成分子である Lamin B1 と *TERT*-DMR の結合を ChIP 法で解析した。その結果、*TERT*-DMR が Lamin B1 と結合している結果が得られた。さらに興味深いことに、予想に反して Lamin B1 は iPS 細胞の高度にメチル化された *TERT*-DMR に特異的に結合していることが明らかになった。つまり高メチル化 *TERT*-DMR は抑制性の因子の結合を阻害するのではなく、積極的に核膜と結合し、発現を促進していることが示唆された。

以上の結果から、本研究ではヒト *TERT* 遺伝子におけるエピジェネティック制御を基板とした発現制御の分子メカニズムを初めて明らかにした。ヒト iPS 細胞のリプログラミングにおいて、*TERT* 遺伝子上流の *TERT*-DMR は高度にメチル化され、メチル化された *TERT*-DMR は核膜構成分子である Lamin B1 と相互作用して、ヒストン修飾を活性型に移行させ、*TERT* 遺伝子発現を促進させるのである。本研究の成果は、*TERT*-DMR の DNA メチル化状態を検査することで、急性骨髄性白血病などの *TERT* 高発現性腫瘍の診断や予後評価に有用であると考えられる。

また、本研究における DNA メチル化が遺伝子発現制御に対して促進的に働くという発見は、エピジェネティック制御の新たな機能的側面を示すものであり、さらに核膜と遺伝子領域の結合が遺伝子発現に対し、促進的に働くという発見と併せて、遺伝子発現制御な新たな機構の存在をも明らかにした。

備考 論文要旨は、和文にあつては2,000字程度、英文にあつては1,200語程度とする。