

学位論文の要約

三 重 大 学

| | | | |
|-----|------------------------------|-----|-------|
| 所 属 | 三重大学大学院生物資源学研究科 生物圏生命科学専攻 | 氏 名 | 生野 彰宏 |
|-----|------------------------------|-----|-------|

学位論文の題名

葉酸欠乏によるDNA損傷ならびに椎間板変性症におけるDNAメチル化に関する研究

(Studies on DNA methylation in DNA damage induced by folate deficiency and in intervertebral disc degeneration)

学位論文の要約

真核細胞のゲノム上に見られるDNAのメチル化はCpG配列のシトシンが二本鎖共に受ける化学修飾で、哺乳動物において個体発生や細胞分化、遺伝子発現の制御などに関わる重要なエピジェネティック修飾である。高頻度にDNAメチル化を受けた遺伝子のプロモーター領域は凝縮したヘテロクロマチン構造となり、転写が抑制状態にある。DNAのメチル化異常は、遺伝子発現のON/OFFと直結することから、がんなどの生活習慣病や様々な疾患に関連することが示されている。本研究では、ゲノムDNAのメチル化について、メチル基の供給不足によって生じるDNAの低メチル化とDNA損傷に関する細胞レベルでの研究、およびヒトの疾患の進行とゲノムDNAのメチル化状態に関する個体レベルでの研究を行い、生命現象におけるDNAのメチル化の役割の一端を明らかにすることを試みた。

まず、細胞レベルの研究として、栄養素葉酸の欠乏に伴って誘導されるゲノムDNAの低メチル化とDNA損傷について検討した。細胞分裂において、個々の細胞の遺伝子発現のON/OFF状態を維持するために、DNA複製時に親鎖のCpG配列のメチル化状態に基づいて、新しく合成された娘鎖DNAのCpG配列に、維持メチル化酵素によってメチル基が付加される。このメチル基の供給源はS-アデノシルメチオニン(SAM)であり、さらにその供給源として葉酸が重要な役割を果たす。したがって、葉酸が欠乏すると、SAMの供給不足となり、DNA複製依存的にゲノムDNAの低メチル化やDNA損傷が起こる。本研究では、DNAのメチル化がヘテロクロマチン領域で高度に見られることに着目し、ヘテロクロマチン領域で顕著な影響を受けると考えた。ヘテロクロマチン領域がS期後期に複製されることに注目し、S期の進行に伴う、免疫蛍光染色法を用いたDNA損傷の解析、分子コーミング法による複製フォーク進行速度の解析、Bisulfite sequencing法によるDNAメチル化状態の解析を行った。その結果、葉酸欠乏処理によりS期依存的なDNA損傷マーカー γ -H2A.Xの核内蛍光強度の増加、および複製フォーク進行速度の低下が確認された。またS期を前期・中期・後期に分類した細胞数の割合は、前期が減少し、中-後期が増加する傾向がみられた。これらの結果は、S期中-後期にかけて複製依存的DNA損傷を生じることを示唆している。続いて、S期各段階でのDNA損傷を解析したところ、葉酸欠乏処理ではS期全段階で損傷の増加が確認されたが、中-後期の細胞においてより強い増加傾向がみられた。また同条件でHuman LINE1プロモーター配列において約10%のメチル化の減少がみられた。以上の結果から葉酸欠乏処理によって、複製依存的なDNAの低メチル化に伴いDNA損傷が生じる新たな可能性を示すことができた。

さらに、そのDNA損傷メカニズムについても研究を進めた。DNAの維持メチル化では、DNA複製直後に二本鎖のうちの片鎖のみがメチル化状態にあるヘミメチル化DNAが一時的に生じ、これに直ちにメチル基が転移されるが、葉酸欠乏時にはヘミメチル化状態が長時間残り、これがDNA損傷の原因となると考えられる。本研究では維持メチル化酵素遺伝子の発現をノックダウンすることにより、DNAの低メチル化を誘導し、その際にヘミメチル化状態のDNAが存在することをHairpin-bisulfite sequencing法により明らかにした。これにより、DNAの低メチル化によって誘導されるDNA損傷メカニズムの解明に貢献した。

次に、DNAのメチル化に関する個体レベルでの研究として、疾患に関連するDNAメチル化部位(DML)を新たに同定することを試みた。椎間板変性は椎間板ヘルニアなどの他の脊椎疾患の原因となるため、腰痛との高い関連性が知られ、そのメカニズムの解明による治療や対策が強く望まれている。椎間板変性では遺伝子発現レベルの多数の報告があるが、発症の原因については不明な点が多い。そこ

で本研究では椎間板変性およびその進行に関連する DML を同定することを目的とし、Infinium Human Methylation EPIC を用いたゲノムワイドな DNA メチル化解析によって、椎間板変性初期群と変性群を比較解析した。得られたメチル化情報を元にクラスタリング解析を行ったところ、初期群のメチル化には強い相同性が確認され、変性によりメチル化に変化を生じることが示された。また DML 解析により 220 の DML を同定し、187 の遺伝子でメチル化の変化が確認された。さらに年齢や性別に注目して有意差を指標に数種の DML を解析したところ、同一群内での相関はほぼ確認されず、本研究によって椎間板変性特異的なメチル化変化を捉えたといえる。同定された 187 遺伝子には、椎間板変性関連遺伝子として報告のあるものは少ないが、関連するシグナル伝達経路に属するものが含まれていた。さらに、GO 解析によって複数の細胞接着関連グループと関係することが確認された。これらの結果は、細胞間接着や細胞外マトリクスを介した全体的なシグナル伝達の異常が椎間板変性に関連する可能性を示唆している。