

審査の結果の要旨

氏名 黒田 友紀子

本研究は DNA 中のメチルシトシン(mC)が脱メチル化される過程で生じるヒドロキシメチルシトシン(hmC) を同一分子上の塩基単位で同定する新しい検出法 (EnIGMA: Enzyme-assisted Genome Modification Assay) を開発し、さらにビタミン C 欠乏マウス精子のメチル化解析を行っており、下記の結果を得ている。

1. hmC の新しい検出法 EnIGMA の方法を確立した。hmC は mC の検出法である bisulfite 反応では mC と鑑別不可能であった。EnIGMA はメチル CpG (mCpG) の反対側の CpG のみをメチル化する酵素である DNMT1 の性質を応用した方法である。DNA 断片にヘアピン型のリンカーをライゲーションして逆鎖を非修飾塩基で合成した状態で DNMT1 反応を行う。DNMT1 反応により mCpG の逆鎖 CpG はメチル化され、ヒドロキシメチル CpG (hmCpG) や非修飾 CpG の逆鎖はメチル化されない。反応後に bisulfite 反応をおこない PCR で増幅して逆鎖と比較すると mCpG, hmCpG, CpG の判定が可能である。EnIGMA では 1 回のシーケンスで mC, hmC, C を同時に検出可能であり、同一分子上の塩基単位で定量することができた。
2. 様々な修飾状態の合成 DNA を用いて EnIGMA における DNMT1 の至適な反応条件を決定した。CpG 修飾がそれぞれ全て mC, hmC, C である 3 種類の合成 DNA について KCl 濃度を 0-100mM で検討したところ、KCl 50mM で最も正確に mC, hmC, C を判定することができ、93%以上の精度であった。EnIGMA の精度に最も影響する DNMT1 反応の至適条件を決定した。
3. マウス大脳ゲノムを用いて実際に EnIGMA 解析を行った。ES 細胞で hmC が豊富である 2 領域 (*Arhgap27*, *Nhlrc1*) について EnIGMA 解析と従来からの hmC 検出法である glucMS-qPCR による比較検討により整合性を確認した。*Arhgap27* で mC が 17-38%、hmC が 3.5-25%、*Nhlrc1* では mC が 0-37%、hmC が 0-12% であり、glucMS-qPCR でも同様の結果であった。ゲノムでの解析を行うとともに従来法との整合性を確認することができた。
4. ビタミン C 欠乏マウス精子における hmC の変動を解析した。欠乏期間が 8 週間、16 週間のいずれでも dot blot により hmC 総量はビタミン C を投与されているコントロール群と比較して半分程度に減少を認めた。個体内でビタミン C 欠乏により TET 活性が低下して hmC の減少がおこったと考えられた。
5. ビタミン C 欠乏マウス精子とコントロールで hMeDIP-seq を施行した。コントロール

より hmC が豊富な領域であるピークを検出して 2 領域(*Ptpn14*, *Smtnl2*)で EnIGMA, glucMS-qPCR を行い hmC が豊富に存在する領域を同定したが 2 群間で hmC の変化は認めなかった。hMeDIP-seq より検出した DhMR (differentially hydroxymethylated region)について EnIGMA で解析したが同様に hmC の変化は認めなかった。hmC の少ない精子では hMeDIP-seq による DhMR の検出はできなかった。

以上、本論文は塩基単位の同一分子上で mC, hmC, C を同時に検出する新しい手法である EnIGMA を開発するとともにマウス精子のメチル化解析をおこなったものである。93%以上の精度で判定することができ、これまでの塩基単位での hmC の検出方法と同等の精度で解析できた。1 回のシーケンスで同時検出できる唯一の方法であり、分子ごとの修飾状態を評価することができる有用な検出方法であり、学位の授与に価するものと考えられる。