

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 23 年博士課程入学  
氏名 伊藤 亮  
指導教員 白髭 克彦

論文題目 メチル化 DNA 水酸化酵素 TET によるエピゲノム制御機構の解析

### 第一章 序論

ヒトをはじめとする多細胞生物では時期・空間特異的に様々な遺伝子が発現しており、この遺伝子発現調節機構の一つとしてエピゲノム制御による転写調節が知られている。エピゲノム制御は DNA 配列に依存せず、クロマチン構造を変化させることで転写に影響を与え、ヒストンタンパク質の翻訳後修飾や DNA のシトシン残基のメチル化などが知られている。

ヒストン修飾によるエピゲノム制御では、ヒストンのテイル領域がアセチル化、リン酸化、ユビキチン化などの翻訳後修飾を受けることでクロマチン構造が変化し、転写が調節され则认为られている。一方、大腸菌をはじめ様々な生物においてゲノム中のシトシン塩基がメチル化されている。特に動植物においては、CG 配列の多くがメチル化されており、さらにプロモーター DNA のメチル化は遺伝子発現を抑制することが知られている。このような DNA のメチル化は DNA メチル基転移酵素により厳密に制御されており、一般的に動物細胞では、一度受けたメチル化修飾は除去されることがなく安定であると考えられていた。しかしながら最近になって、メチルシトシンを水酸化する酵素 Ten-eleven translocation (TET) が同定された。TET はメチルシトシンの水酸化反応を促すことで脱メチル化反応を引き起こすと考えられている。

また、エピゲノム制御による遺伝子発現調節は細胞の表現型決定に大きな影響を与えることが知られている。例えば、5-アザシチジンによる間葉系幹細胞の DNA メチル化環境の攪乱は、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞への分化がもたらされることが古くから知られている。しかしながら、TET によるメチルシトシン水酸化反応と細胞分化の関係性は未だ不明なままである。

エピゲノム制御機構には様々な因子が複合的、協調的に機能していることが知られている。本研究では、TET を題材とし、その機能解析を行うことで新規エピゲノム制御機構を明らかにすることを目的とした。中でも、TET ファミリーの内、複合体構成因子の明らかにされていない TET3 に着目し、生化学的手法を用いて新規エピゲノム制御機構の解明を目指した。また、TET によるエピゲノム制御機構と生命現象の相関を明確にするため、培養細胞の分化系を用いて解析を行った。

## 第二章 メチル化シトシン水酸化酵素 TET3 複合体の同定と機能解析

TET3 は受精時のエピジェネティックなリプログラミングや神経、目の発生に重要であることが報告されている。しかしながら、多くのエピゲノム制御因子がそうであるように複合体形成を有無やその構成因子は明らかにされていない。本研究では生化学的手法を用いて複合体を精製し、構成因子の同定を行った。その結果、TET3 の主要な相互作用因子として O 結合型 N-アセチルグルコサミン転移酵素 (O-GlcNAc transferase, OGT) を同定した。OGT はヒストンを GlcNAc 修飾することが報告されており、プロモーター近傍のヒストン GlcNAc 修飾は遺伝子発現を促進する可能性が示唆されている。

そこで、TET3 と OGT の結合様式を詳細に解析した。その結果、TET3 と OGT の相互作用には TET3 の C 末端領域に存在する H ドメインが重要な役割を担うことが明らかとなった。さらに、TET ファミリー内における OGT 結合の保存性を解析し、TET2、TET3 が特に強い OGT 結合性を示した。

OGT は多様なタンパク質を基質として GlcNAc 化し、その機能を調節することが知られている。その知見を元に、TET3 も OGT により GlcNAc 化され、メチルシトシン水酸化活性が調節されている可能性を予想した。抗 GlcNAc 抗体を用いた解析、及び質量分析を行った結果、TET3 は OGT により GlcNAc 修飾を受けることが明らかとなった。しかしながら、その GlcNAc 修飾が与えるメチル化 DNA 水酸化活性への影響は検出されなかった。

また、最近になって、TET2、TET3 が OGT と相互作用し、さらに TET2 は OGT のク

ロマチンリクルートを促進することが明らかにされた<sup>1)</sup>。本研究では、同様に TET3 も OGT の局在を制御する機能を持つことを示した。詳細な解析の結果、TET3 は OGT タンパク質を安定化し、タンパク質レベルで発現量を亢進することを新たに見出した。

### 第三章 軟骨細胞分化における TET ファミリー遺伝子の機能解析

細胞の表現型決定とエピゲノム制御は密接な関わりを持つことが知られおり、特に DNA のメチル化環境と細胞分化の関わりはよく研究されている。しかしながら、最近になって提唱されている TET によるメチルシトシン水酸化反応と細胞分化の関係は未だ不明なままである。そこで、培養細胞の分化系をモデルとして TET の新規生理作用の解明を試みた。

TET によるエピゲノム制御化にある細胞では TET の発現が亢進していることが予想された。そこで、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞分化における TET ファミリー遺伝子の発現量を解析した。その結果、脂肪細胞、軟骨細胞では分化に伴い TET1、及び TET2 の発現が顕著に上昇することが明らかとなった。また、軟骨細胞に含まれるゲノム DNA のメチルシトシン、水酸化メチルシトシンの含有量を解析した結果、分化に伴い、メチルシトシンは減少し、水酸化メチルシトシンは顕著に増加することが示された。また、分化に伴い発現が上昇する X 型コラーゲン遺伝子のプロモーターでは、メチルシトシンが水酸化されていることが示唆された。

次に、メチルシトシン水酸化が軟骨細胞分化に与える影響を検証した。TET3 の触媒領域を発現し異所的にメチルシトシンを水酸化させる培養細胞系を構築し、解析に用いた。しかしながら、人為的にメチルシトシンを水酸化させた細胞でも軟骨細胞分化に影響は見られなかった。

また、TET1 がメチルシトシン水酸化以外のメカニズムで機能している可能性を予想し、検証した。TET1 に対する shRNA を発現する細胞株を作製し、軟骨分化刺激を与えた。その結果、アルシアンブルー染色では明確な違いは見られなかったが、II 型コラーゲンや X 型コラーゲンなどの分化マーカーとなる遺伝子の発現が上昇することを見出した。

### 第四章 総合討論

本研究では、メチルシトシン水酸化酵素 TET3 の主要な相互作用因子として OGT を同定した。さらに、TET2、TET3 と OGT の相互作用が特に強く保存されていることを明らかにした。TET ファミリーはそれぞれが特徴的な生理作用を有しており、本研究で示唆され

た TET-OGT 相互作用の選択性はそのような生理作用の多様性に寄与している可能性が考えられた。

また、最近、TET-OGT の相互作用に関する報告がなされた<sup>1)</sup>。本研究で得られた TET3 が OGT のクロマチン局在を制御するという知見はこれまでの報告と合致するものであった。しかしながら、TET が OGT をクロマチンへとリクルートする具体的なメカニズムに関しては未だ明らかにされていなかった。本研究では、TET3 が OGT タンパク質の安定化をもたらすことを明らかにし、その結果 OGT のクロマチン局在を亢進することを新たに見出した<sup>2)</sup>。

一方、軟骨細胞分化に伴い TET1、及び TET2 の発現が上昇し、メチルシトシンの水酸化が亢進することを示した。これらの結果は分化に伴う脱メチル化に水酸化反応が関わることを強く示唆するものである。しかしながら、人為的にメチルシトシンを水酸化した細胞株を用いても軟骨細胞分化の進行に差は見られなかった。これらの結果は、メチルシトシンの水酸化自体は軟骨細胞分化の引き金になりえないことを示している。すなわち、軟骨細胞分化における脱メチル化反応には、TET によるメチルシトシン水酸化とともに、他の因子の介在が必要であることが予想される。

さらに本研究では、TET1 が軟骨細胞分化に対し抑制的に機能していることを明らかにした。これまで、TET1 による転写調節は、脱メチル化を介した活性化機構とヒストン脱アセチル化複合体を介した不活性化機構が報告されている。今回の結果から、軟骨細胞においては、TET1 がそのようなエピゲノム制御複合体を介して転写抑制的に機能している可能性が示唆された。

以上、本研究では TET3 による新規エピゲノム制御機構の分子基盤の一端を明らかにし、さらに、TET1 によるエピゲノム制御の新たな生理作用の可能性を示唆した。

#### (参考文献)

- 1) Chen Q, Chen Y, Bian C, Fujiki R, Yu X. (2013) *Nature*, 493, 561-4
- 2) Ito R, Katsura S, Shimada H, Tsuchiya H, Hada M, Okumura T, Sugawara A, Yokoyama A. (2014) *Genes to Cells*, in press