

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 伊藤 亮

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るエピゲノム制御は、ヒストン修飾や DNA メチル化などが知られている。特に動植物においては、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通して脱メチル化反応を触媒すると考えられている。

エピゲノム制御機構において、様々な因子が複合体を形成し機能することが知られているが、TET に関してはあまり解析されておらず、不明な点が多い。本論文では、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試みている。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、間葉系培養細胞の分化系を用いて解析を行っている。

生化学的手法を用いて TET3 複合体を精製し、構成因子の同定を行っている。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いる。そこで、TET3 と OGT の結合様式を詳細に解析した結果、TET3 と OGT の相互作用には TET3 の C 末端領域に存在する H ドメインが重要であることを明らかにしている。また、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 結合性を持つことを示している。

さらに本論文では、TET3 が OGT の局在を制御する機能を持つことを示している。詳細に解析を進め、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ている。OGT タンパク質の増加は、OGT の局在にも影響を与えることを示し、TET3-OGT 複合体のエピゲノム制御に関わる一連の作用機序を新たに提唱している。

また、本論文では、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ている。TET による制御下にある細胞では、TET の発現が亢進していること予想し、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変動を解析している。

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を明らかにした。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ている。

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ている。その解析を行うため、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ている。しかしながら、人為的なメチルシトシンの水酸化は軟骨細胞分化に影響が無いことを示している。

本論文では、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、検証を行っている。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解析した結果、II 型コラーゲンや X 型コラーゲンなどの分化マーカーの発現が上昇することを見出している。

最近、TET-OGT の相互作用に関する報告がいくつかなされている。本論文で明らかにされている 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。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が、本論文では 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ている。

また、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ている。さらに本論文では、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ている。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。それらの報告と照らし合わせ、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を提唱している。

本論文は、生化学的手法を用い、DNA メチル化環境に大きな影響を与える TET タンパク質複合体の同定に成功した。さらに、これまで不明であった TET-OGT 複合体のエピゲノム制御機構に新たな分子基盤を提唱するものであった。また、間葉系幹細胞分化、特に軟骨細胞分化において TET タンパク質が機能する可能性が見出された。本研究は TET のこれまで明らかにされなかった作用機序、生理作用を示唆するものであり、新たな転写制御機構の理解に繋がるものであると期待される。以上より、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。