

博士論文

論文題目 エピジェネティック性差に関する基礎研究

氏名 伊藤 修平

目次

	ページ
緒言	2
第 1 章 肝臓における DNA メチル化の性差	10
第 2 章 栄養膜細胞における <i>Ogt</i> 遺伝子発現性差	40
第 3 章 栄養膜細胞における OGT の標的ゲノム領域の解析	63
総合討論	79
引用文献	84
論文要旨	101
謝辞	105

緒言

性差形成概論(性ステロイドの影響)

ほ乳類のメスは2本のX染色体を有し(XX)、オスはX染色体とY染色体を1本ずつ有する(XY)。性決定は、オスの細胞にのみ存在するY染色体上の遺伝子 *Sry* (Sex-determining region Y) 遺伝子が司る。*Sry* は発生中に一時的に発現し、オス性腺の原器形成をスタートさせる。*Sry* はイントロンを含まない遺伝子で、アイソフォームは存在せず、着床後の性腺発生期初期の数時間と限られた時間のみ発現しており、その前後はDNAメチル化を主体としたエピジェネティクス系により個体の生涯に渡り厳しく抑制されている(Nishino et al., 2004)。メスは *Sry* 遺伝子を持たないため、メスの性腺が形成される。成熟過程ではそれぞれの生殖器から分泌される性ステロイドが様々な組織に作用し、全身性の変容をもたらす。性ステロイドの影響は性成熟期を境に、オスではテストステロンを主体としてアンドロゲンにより、メスではエストラジオールを含むエストロジェンによって、全身のそれぞれの性特有の変化、二次性徴をもたらす。性ステロイドの影響は、中枢神経にも及び、視床下部ホルモンに支配された下垂体ホルモンの分泌パターンにも影響を及ぼす(ギャノン生理学 原書 22 版)。ラットでは生後 30 日頃から成長ホルモンの分泌パターンに性差が現れる(Edén, 1979, Veldhuis and Pincus, 1998)。成長ホルモンによる性依存的遺伝子発現制御を仲介するのは JAK2-STAT5 系である(Clodfelter et al., 2006, Holloway et al., 2007)。STAT5 はオスの肝臓では成長ホルモンにより活性化されるが、メスでは成長ホルモンの連続的な刺激により逆に脱感作される。*Stat5b* 遺伝子欠損マウスでは 75-82% の遺伝子の性差が消える。このことから成長ホルモンの分泌パターンの違いが、肝臓における STAT5 依存的な発現の性差を生み出すことが示されている(Clodfelter et al., 2006)。以上のように *Sry* を起点として生じる性ホルモンによる性差が存在することは間違いない。しかし、脳では性ステロイド非依存的に、常染色体上の遺伝子発現が雌雄マウス間で異なることも報告されている(Büdefeld et al., 2008)。従って、性ステロイド非依存的な性差が存在することもまた疑いはない。

性染色体と X 染色体不活化による量的補正

性染色体により生じる性差がある。*Sry* 遺伝子のように Y 染色体上の遺伝子だけでなく、メスはオスよりも 1 本多く X 染色体を持つことから、X 染色体上の遺伝子も性差形成に関与する。メスにおいて 2 本の X 染色体のうち 1 本は不活性化されることで、X 染色体上の遺伝子発現の量的補正がなされている。X 染色体の不活性化は、*Xist* 遺伝子の転写産物である非コード RNA が、それを発現する X 染色体のクロマチンを覆うように結合し、不活性化に関与するタンパク質複合体をリクルートすることにより生じる(Hoki et al., 2009, Brockdorff, 2013)。

X, Y 染色体は常染色体から進化したもので、X 染色体は祖先の遺伝子を残し、Y 染色体は徐々に失っていった。そして X 染色体不活化は Y 染色体から相同遺伝子が失われた X 染色体上の遺伝子になされていった制御と考えられている。Y 染色体上に相同遺伝子を有する X 染色体上の遺伝子は X 染色体不活化を回避しやすい。これは Y 染色体上の遺伝子の機能が X 染色体上の遺伝子と異なってもその傾向は残っているようだ (Jegalian and Page, 1998)。また、相同遺伝子がない X 染色体上の遺伝子も、X 染色体不活化を免れる遺伝子が存在する。これらの遺伝子は、X 染色体からの発現量が雌雄で同等にならないことから性差を生じさせる原因となりうる。

胎盤は妊娠期にのみ存在する組織である。母体と胎仔の栄養交換だけでなく、胎盤性ラクトジェンの分泌や妊娠の維持といった重要な働きを有する。胎盤を形成する栄養膜細胞は栄養外胚葉として最も早期に分化し始める細胞である。栄養膜細胞の X 染色体不活性化は特徴的である (Hemberger, 2002)。ほ乳類のメスの体細胞において、受精後のメスの胚では 4 細胞から 8 細胞期にかけて、全ての割球で父親由来の X 染色体が特異的に不活性化される。胚盤胞期になると、内部細胞塊の細胞の X 染色体は 2 本とも活性化されている。X 染色体不活性化は、胚盤胞期の内部細胞塊に由来するエピブラスト系列の細胞が各組織に分化する過程で再び開始される。この際は、ランダムに X 染色体が不活性化される。一方、栄養膜細胞では 4-8 細胞期から認められる刷り込み型の X 染色体不活性化が維持される。父親由来の X 染色体に GFP が組み込まれたマウスを用いた実験から栄養膜巨細胞では X 染色体不活化を免れる場合があることが示唆されてきた (Hadjantonakis et al., 2001)。また、*Rnf12* や *Huwe1* などの遺伝子についても、栄養膜細胞のなかでは、栄養膜巨細胞特異的に不活性化されている X 染色体からの発現が確認されている (Corbel et al., 2013)。これらの事から考えて、栄養膜巨細胞は X 染色体不活化を逃れる遺伝子が多いと考えられる。マウスやラットにおける、胎盤の栄養膜巨細胞は通常の $2n$ の細胞に比べると数百倍の DNA を有している。つまり、栄養膜巨細胞は細胞分裂をすることなく、核相を多倍化させるに際して、クロマチンを制御しきれなくなっていると考えられる。

エピジェネティクス

エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列の変化では説明できない、有糸分裂及び/または減数分裂後も継承される遺伝子機能の変化に関する学問”と定義されている (Riggs et al., 1996)。ほ乳類の体は 200 種の細胞によって構成されている。それらの細胞は一部の例外を除き、同一な DNA 配列情報を有している。エピジェネティック制御は細胞の役割に応じた DNA 配列情報利用を司る。すなわち、発現している遺伝子は抑制されている遺伝子とエピジェネティック状況が異なる (Ernst et al., 2011, Heintzman et al., 2007)。

エピジェネティック修飾には DNA メチル化やヒストン修飾がある。ほ乳類における DNA メチル化は主に CpG 配列 (5' -CG-3') のシトシンのピリミジン環の 5 位炭素原子に起こる。ゲノムの多くの部分を占める繰り返し配列を主体とした非遺伝子領域は高度にメ

チル化されており、ヘテロクロマチン形成に密接に関係している。DNAメチル化は遺伝子領域でも見られ、プロモーター領域がメチル化されると多くの場合、遺伝子の不活性化を起こす。コアヒストン (H3, H4, H2A, H2B) は主にN端尾部の特定部位のアミノ酸が様々な修飾され、ヌクレオソーム・クロマチンレベルの変化を起こす。コアヒストンのN端尾部のアセチル化、メチル化、ユビキチン化、SUMO化、ADPリボシル化、クロトニル化、O-GlcNAc化など、新たな化学修飾が発見されてきており、既に130を超えるヒストン修飾が明らかになってきた(Tan et al., 2011)。またゲノムワイドな解析から、ヒストンH3の4番目のリジンのトリメチル化(H3K4m3)は転写が活性化されているプロモーターに、H3K27m3は転写が不活性化されているプロモーターで見られる(Bernstein et al., 2006)など、遺伝子発現と明確な相関が認められる修飾もあるが、ADPリボシル化やO-GlcNAc化などは、未だに役割が解明されていない。エピジェネティック修飾は遺伝子発現の制御以外にもDNAの複製、修復、トランスポゾンの転移の抑制など様々な制御に関与している(Klose and Bird, 2006, Kakutani et al., 1996, Miura et al., 2001, Kato et al., 2003, Singer et al., 2001)。

エピジェネティック修飾を司る酵素

DNAメチル基転移酵素(DNMT:DNA methyltransferase)にはDNMT1、DNMT3A、DNMT3Bがある。DNMT1は「維持メチル化酵素」として知られている。DNMT1はヘミメチル化DNAをメチル化する。すなわち、DNMT1は、S期におけるDNA複製の際、DNAメチル化パターンを維持するために娘鎖DNAをメチル化するのである。一方で、DNMT3AとDNMT3Bは主にメチル化されていないDNAをメチル化するため、de novoメチル化酵素と呼ばれている(Okano et al., 1999)。

DNA脱メチル化を担う酵素にはTET (Ten-eleven translocation)ファミリーが挙げられる。TETタンパクには、TET1、TET2、TET3があり、5メチルシトシン(5mC)を5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)、5-フォルミルシトシン、カルボキシルシトシンに変換させる(Tahiliani et al., 2009, Xu et al., 2011)。この一連の流れはDNAの脱メチル化機構の一つであると考えられている(Ponnaluri et al., 2013, Franchini et al., 2012)。TET1はES細胞特異的に発現していると考えられているが、TET2、TET3は様々な組織で発現が認められている。

ヒストン修飾もまた、ヒストン修飾酵素によって制御されている。例えば、ヒストンO-GlcNAc修飾はOGT(O-GlcNAc transferase)により付加されOGA(O-GlcNAcase)により除去される。

エピジェネティクス系内の相互作用(DNAメチル化⇄ヒストン修飾)

エピジェネティック修飾は相互作用する。例えば、DNMT1の阻害剤である5-aza-dC処理による遺伝子の活性化は、ヒストンH3の9番目のリジンのトリメチル化(H3K9m3)の低下及びヒストンH3のアセチル化(AcH3)の上昇を伴う(Lim et al., 2010)。DNAメチル化を認識して結合するMBD(Methyl-CpG binding)タンパクはヒストン脱アセチル化酵素やヒストンメチル基転移酵素と複合体を構成してクロマチンの調整を行う。また、X染色体上の遺伝子にコードされているMeCP2はHDAC1(histone deacetylase 1)と相互作用している(Jones et al., 1998)。さらに、MeCP2の結合はH3K9のメチル化と相関することが示されている(Fuks et al., 2003b)。MBD1はSuv39h1と相互作用し、核内で共局在する(Fujita et al., 2003)。そしてH3K9のメチル化を誘導する。またDNA複製の際は、MBD1が、H3K9のメチル化酵素などと相互作用するCAF1とコンプレックスを構成することも知られている(Sarraf and Stancheva, 2004)。DNMT1とDNMT3BはHDAC1, HDAC2を含むNurD複合体と相互作用する(Cai et al., 2013)。さらに、TET2とTET3はヒストンのO-GlcNAc修飾を行うOGTやヒストンH3K4のメチル化を行うSET1/COMPASS複合体と相互作用する(Deplus et al., 2013)。このようにDNAメチル化は修飾酵素や、メチルCpG結合タンパクがヒストン修飾酵素と相互作用し、ヒストン修飾にまで影響することが知られている。

逆に、ヒストン修飾がDNAメチル化に影響することも知られている。ヒストンアセチル化を誘導するTSA(トリコスタチンA)処理により、いくつかの遺伝子領域が脱メチル化することが示されている(Selker, 1998)。しかし全ての領域が変化するわけではない。ヒトの大腸がん細胞において、TSA処理では高度にメチル化されている2つのCpGアイランドのメチル化状態に変化を与えなかった(Cameron et al., 1999)。TSA処理は子宮内膜細胞におけるDNMT3BのmRNA及びタンパク量を低下させ、末梢血由来のJurkat細胞におけるDNMT1のmRNA及びタンパク量を低下させる(Xiong et al., 2005, Januchowski et al., 2007)。ヒストンメチル基転移酵素であるG9aはクロマチンの緩んだ領域に局在し、DNAメチル化を特定の領域に誘導する(Ikegami et al., 2007)。in vivoにおいて、HP1 α はDNMT1やDNMT3aではなくDNMT3Bと相互作用する(Lehnertz et al., 2003)。HP1はまた直接MeCP2と結合することが示されている(Agarwal et al., 2007)。ヒストンメチル基転移酵素MLLのSETドメインを欠損させると、*Hoxd4*遺伝子領域のH3K4m1が減少するとともに、DNAメチル化率が上昇することが知られている(Terranova et al., 2006)。またHDAC1, HDAC2は直接DNMT1と相互作用する(Fuks et al., 2003a, Robertson et al., 2000, Rountree et al., 2000)。またPGC7はH3K9m2に結合し、メチル化DNAからヒドロキシメチル化DNAへの転換を阻害する(Nakamura et al., 2012)。これらの結果は、ヒストン修飾がDNAメチル化修飾に影響することを示している。

Zygote に HDAC 阻害剤処理を行うと、ヒストン H3 のアルギニン 2 番、8 番、17 番のシトルリン化が増える。逆にヒストンのシトルリン化酵素である PADI4 阻害剤処理を行うと、ヒストン H3K9, H3K18, H4K5 のアセチル化は上昇する (Kan et al., 2012)。また PADI4 は HP1 α の H3K9m3 への結合を弱め H3R8 のシトルリン化を行う (Sharma et al., 2012)。このようにヒストン修飾同士もまた影響し合うという報告がある。

エピジェネティクス系が影響を受ける環境要因

エピジェネティクス関連因子の発現量やエピジェネティック修飾は、細胞外シグナルや栄養条件あるいは薬物、環境汚染物質により変化し得る。グルコースは代謝の中心的な役割を果たす。グルコースは UDP-GlcNAc を合成する他に、グリコーゲンの合成、核酸の材料、ATP 合成の材料となる。また、グルコースは糖原性アミノ酸や脂肪酸からも合成される。胎盤における、*ADIPOQ* 遺伝子のプロモーター領域は母親の血糖値が高いほど、低メチル化状態であることが示されている (Bouchard et al., 2012)。また、母親の食糧不足に由来する低体重児への影響には性差が認められ、DNA メチル化の変化を伴う (Ferreira et al., 2011, Filiberto et al., 2011)。ラットを用いた実験から、葉酸・ビタミン B12・DHA 不足が胎盤の DNA メチル化パターンに影響することが知られている (Kulkarni et al., 2011)。このようにエピジェネティック修飾は栄養をはじめとする環境によって変化する。つまり、エピジェネティック修飾は DNA メチル化やヒストン修飾といったエピジェネティック修飾間での相互作用だけでなく、環境要因の影響を受け、複雑な制御系を築いている。例示した通り、栄養とエピジェネティクスに関しては、妊娠期における母親の栄養状態が胎仔に与える影響についての研究が盛んに行われており、胎盤の重要性が示されている。

エピジェネティック制御因子 OGT

X 染色体上には、*Ogt*, *Jarid1c*, *Utx* などの多数のエピジェネティック制御因子をコードする遺伝子が存在する。*Jarid1c* や *Utx* 遺伝子のように Y 染色体上に、*Jarid1d*, *Uty* という相同遺伝子が存在する遺伝子もあれば、*Ogt* のように Y 染色体上に相同遺伝子を有さない遺伝子もある。本研究では第 2、3 章で OGT の解析を行っている。

OGT は細胞質/核タンパクのセリン/スレオニン残基の O-GlcNAc 化を触媒する酵素である。セリン/スレオニン残基はリン酸化されるターゲットでもあるため、リン酸化との関与も示唆されている。細胞に取り込まれたグルコースの 2-5% はヘキソサミン合成経路に入り、N-アセチルグルコサミンの供与体である UDP-GlcNAc となる。そして OGT が UDP-GlcNAc を基質としてタンパク質に O-GlcNAc 修飾をする。このように O-GlcNAc 修飾を司る OGT は細胞内の栄養センサーとして働いていると考えられている。

全長の OGT は N 末端側に 13.5 個の TPRs (tetratricopeptide repeats) を、C 末端側にグリコシルトランスフェラーゼ活性部位を有する。Ogt 遺伝子から産生される OGT には 3 つのアイソフォームがあり、それぞれ ncOGT, mtOGT, sOGT と呼ばれる (Hanover et al., 2003, Lazarus et al., 2006)。これらは TPRs の長さがそれぞれ 13.5, 9.5, 3.5 個であるという違いがある。O-GlcNAc 修飾はヒストン及び、細胞増殖 (Slawson et al., 2005, Sakabe and Hart, 2010)、転写 (Butkinaree et al., 2010)、ストレス応答 (Zachara et al., 2004, Guinez et al., 2008)、グルコース応答 (Yang et al., 2008, Whelan et al., 2010) に関わるタンパク質に見られる。ncOGT が核内に局在していることから、主に ncOGT がヒストンの O-GlcNAc 付加を触媒していると考えられている。そのため、ncOGT 発現量の性差が、雌雄のエピジェネティック修飾に性差を生じさせる。ヒストンの O-GlcNAc 化は近年発見され、新たなエピジェネティクス制御系として注目されている (Hanover et al., 2012)。これまでに、ヒストン H2A (Thr101), H2B (Ser36 と Ser112), H3 (Ser10 と Thr32), H4 (Ser47) (Sakabe et al., 2010, Fujiki et al., 2011, Fong et al., 2012) の GlcNAc 化が報告され、細胞周期やユビキチン化との関連が示されている。また、神経前駆細胞ではオレキシン (*Hcrt*) 遺伝子領域に O-GlcNAc 修飾が多く、一方、オレキシン神経細胞では GlcNAc 修飾は消失している。O-GlcNAc 化を阻害すると、オレキシン神経細胞への分化効率が高くなることが明らかになった。OGT は非発現状態の *Hcrt* 遺伝子領域に結合が認められ、発現状態では OGT の結合が認められなくなり、OGA がリクルートされる (Hayakawa et al., 2013)。このことから OGT による O-GlcNAc 化は遺伝子発現の抑制にも関与することが示されている。

O-GlcNAcase (OGA)

O-GlcNAc を除去するのは OGA である。OGA は常染色体上の遺伝子である *Mgea5* にコードされている。OGA は 2 つのドメインを有するタンパク質で、N 末端側にグリコシドヒドロラーゼドメイン、C 末端側にアセチル基転移活性ドメインを持つ。C 末端側のアセチル基転移活性はヒストンアセチル化酵素である GCN5 の構造に似ており、*in vitro* においてヒストンアセチル化活性があることが示されている (Toleman et al., 2004)。また、OGA の結合領域には p300 などのヒストンアセチル化酵素も共局在する (Hayakawa et al., 2013) ことから、OGA はヒストンのアセチル化と密接な関係を持つと考えて良い。一方で、この領域には CoA 結合部位が欠如しており、他の役割を果たしているとも考えられている。ヒトにおいては、OGA は Long タイプと short タイプがあり、short タイプは脂肪滴の表面に多いと考えられている (Keembiyehetty et al., 2011)。

OGT, OGA, O-GlcNAc と疾患

OGT, OGA, O-GlcNAc 修飾は慢性疾患との関連が示唆されている (Bond et al., *annu rev nutrition* 33.13.1-25)。例えば、糖尿病患者の細胞は UDP-GlcNAc レベルが高く、O-GlcNAc 修飾量も多い (Sayeski and Kudlow, 1996, Wang et al., 1998)。また癌化や癌の

進行と O-GlcNAc レベルには相関が見られる。OGT や OGA の発現変化や、O-GlcNAc レベルの低下は、癌の転移及び、予後との相関性や (Jin et al., 2013, Krześlak et al., 2012)、アルツハイマー病や糖尿病との関連についても報告されている (Dias and Hart, 2007)。このように種々の疾患との関与は疑う余地がない。

疾病のリスクと性差

疾病の発症リスクに明確な性差が認められる疾患も多い。例として、男性で発症リスクの高い虚血性心疾患、喘息、クローン病、女性で発症リスクの高いアルツハイマー病、バセドー病などが挙げられる (Kaminsky et al., 2006)。さらにこれらの疾患に関連して、高血圧になるリスクは性差が認められるだけでなく、母親の栄養状態が影響することが知られている (Bachmann et al., 1991, Reckelhoff, 2001, Benz and Amann, 2010)。高血圧に関しては胎盤の異常との関わりも示唆されている (Thornburg et al., 2010)。このように疾患のリスクとは外部環境の変化に対する反応性の性差と考えることもできる。

遺伝子発現に見られる性差

これまで性差の解析は主に性依存的な遺伝子発現解析が行われてきた。肝臓・脳・脂肪組織について、性染色体のみならず、常染色体についても、大部分は差が 2 倍以下であるが、数千以上の遺伝子発現に性差があるという報告がある (Yang et al., 2006)。このことは、雌雄の組織で遺伝子の使い分けが行われているということの意味する。

エピジェネティック修飾に見られる性差

性差は遺伝子発現だけでなく、エピジェネティック修飾にも存在する。肝臓において、性依存的 DNA メチル化可変領域 (S-DMR) はオス特異的に発現を示す *Cyp2d9*, *Slp* 及びメス特異的に発現を示す *Cyp2a4* 遺伝子に見られる (Yokomori et al., 1995a, Yokomori et al., 1995b)。また *Zfp809* などの遺伝子にも DNA メチル化に関しても報告があり、さらにこれら S-DMR は成長ホルモンや老化によって変化する (Takasugi et al., 2013)。しかし、エピジェネティック制御は遺伝子発現制御だけを行うわけではない。発現に関与しない領域に存在する S-DMR も、遺伝子発現制御以外の意義を有すると考えられる。

本研究の目的

本研究では、ゲノムの使い分けを制御する機構に雌雄差が存在するか否かを明らかにするために、雌雄の組織・細胞のエピジェネティック修飾及び、エピジェネティック修飾酵素について解析した。

第 1 章では、肝臓において、DNA メチル化状態に性差が認められる領域を探索し、その領域の DNA メチル化状態が性ステロイド依存的に変化するのか検証した。第 2 章では、

X 染色体上のエピジェネティック制御因子、OGT の発現量及び発現制御機構について解析した。第 3 章では OGT の標的領域を探索した。

第 1 章

肝臓における DNA メチル化の性差

序論

マウス、ラット、ヒトの肝臓は、性ホルモンの代謝能に違いがあり、ホルモン代謝を行うチトクロームなどの遺伝子の発現に性差がある(Wauthier et al., 2010, Wauthier and Waxman, 2008, Zhang et al., 2011)。そして性差発現をする遺伝子は、性染色体のみならず常染色体に散在する。

雌雄の性ホルモンは異なる作用を示す。テストステロンは下垂体細胞の成長ホルモン(GH)産生とその下流にあるIGF-1産生の両方を増大させるが、エストロゲンは、IGF-1のGH産生下垂体細胞へのネガティブフィードバックを阻害することによりGHを増大させる(Meinhardt and Ho, 2006)。そしてマウス肝臓ではこの下垂体-性腺軸が性差発現に重要な働きを示し、オスの肝臓では、転写因子であるSTAT5bが下垂体から放出される周期的なGHのパルス刺激により活性化されるのに対し、メスの肝臓では、GHの連続的な刺激により逆にSTAT5bは脱感作され、その結果STAT5bによって制御される遺伝子が性差発現をする(Clodfelter et al., 2006, Holloway et al., 2007)。肝臓の性差発現におけるGH-STAT5系の重要性は、*Stat5b* 遺伝子欠損マウスで75-82%の遺伝子発現量の性差が消えること(Clodfelter et al., 2006)、一部の遺伝子は、下垂体摘除により遺伝子発現に認められる性差が消失し、さらにGHの投与で性差が再生されることにより裏付けられる(Wauthier et al., 2010)。

性差は肝疾患の発症と増悪化の違いとしても現れ、ヒトでは男性の方が肝癌の発症頻度が高く、高濃度の血中テストステロンと肝癌のリスクに相関が認められ(Yu and Chen, 1993)、肝癌発症モデルマウスであるヒトC型肝炎ウイルス(HCV)のキャプシドタンパク質であるcore抗原を恒常的に発現するトランスジェニック(Core Tg)マウスは、オスのみが肝癌を発症し(Moriya et al., 1998)、C型肝炎による肝癌の発症が男性および閉経後の女性で頻度が増すことと関連することが示唆される。

性ホルモン代謝に関わるチトクローム(*Cyp2d9*, *Cyp2a4*)や補体(*Slp*)遺伝子は、肝臓における代表的な性差発現遺伝子であるが、これらの遺伝子のプロモーター領域には、性によってDNAメチル化状況が異なる領域、S-DMR(Sex-dependent differentially methylated region)が存在する(Yokomori et al., 1995a, Yokomori et al., 1995b)。またこれら遺伝子以外にも、GH依存的にDNAメチル化状態の変化するS-DMRの存在も報告されている(Takasugi et al., 2013)。そして、これら遺伝子のS-DMRのDNAメチル化状態と発現量は逆相関することから、DNAメチル化はこれらの遺伝子の性差発現の制御に重要な役割を果たすと考えられる。

ゲノム上には多数の細胞・組織特異的DNAメチル化可変領域、T-DMR(Tissue-dependent differentially methylated region)が存在し(Shiota et al., 2002, Yagi et al., 2008)、T-DMRのメチル化状態は分化・発生時期特異的に変化し(Hattori

et al., 2004, Hattori et al., 2007, Nishino et al., 2004, Sakamoto et al., 2008)、また環境因子 (年齢、化学物質) によっても変化する (Iwatani et al., 2006, Arai et al., 2011, Takasugi et al., 2013)。これらの T-DMR のメチル化状況の組み合わせは、DNA メチル化プロファイルと呼ばれ、細胞種・組織特有のものである。

DNA メチル化は、DNA 中の CpG (5' -シトシン-グアニン-3') 配列のシトシンで起こり、ヒストン修飾と並ぶ主要なエピジェネティック制御機構である。ほ乳類では、3 種類の DNMT (DNA methyltransferase) DNMT1、DNMT3A、DNMT3B により新規の DNA メチル化と維持がなされ、3 種類の TET (Ten-eleven translocation) TET1, TET2, TET3 と遺伝子修復機構が主要な脱メチル化機構を担う (Tahiliani et al., 2009, Hoivik et al., 2013, Xu et al., 2011, Franchini et al., 2012)。

T-DMR の DNA メチル化は、ヒストン修飾によっても制御され、ヒストン修飾、non-coding RNA などとの協調作用により、遺伝子発現制御のみならず、クロマチン構造の制御、ゲノム修復、トランスポゾンの制御による遺伝情報の安定化、転写開始点、エクソンの選択的な利用にまで関与する (Klose and Bird, 2006, Kakutani et al., 1996, Miura et al., 2001, Kato et al., 2003, Singer et al., 2001)

本章では、肝臓における新規 S-DMR のゲノムワイド探索と、それら S-DMR の DNA メチル化の性ステロイド制御、およびその分子機構について解析した。

略語

T-DMR (Tissue-dependent differentially methylated region)

S-DMR (Sex-dependent differentially methylated region)

DNMT (DNA methyltransferase)

TET (Ten-eleven translocation) : DNA 脱メチル化に関与する酵素

GH Growth hormone

ORX Orchidectomy: 精巣摘除

TP Testosterone propionate

OVX Ovariectomy: 卵巣摘除

EB Estradiol benzoate

材料と方法

肝臓のサンプリング

マウスは C57BL6N 近交系マウスを日本チャールズリバーより購入し、12 時間の明期と 12 時間の暗期の照明サイクルで、食事制限を設けずに飼育した。成体は 13-14 週を、胎児組織は妊娠 14.5 日の個体を用いた。各組織は、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、取り出した後、PBS(-)で洗浄後、使用時まで-80°Cで保存した。DNA・RNA・タンパク抽出前に、乳鉢ですりつぶして実験に使用した。本論文で行われた全ての動物実験は東京大学動物実験マニュアルに定められた指針を遵守して行なった。

精巣除去マウス、卵巣除去マウス及び、性ステロイド投与マウスの作製

(Xu and Zhang, 2006, Meydan et al., 2010, Casas and Chang, 1970)

生後 10 週のマウスをジエチルエーテル麻酔下で開腹した後、3 個体のオスマウスの両側の精巣を除去し閉腹した。また別に 3 個体のオスマウスの精巣除去を行い、皮下にプロピオン酸テストステロン(WAKO, cat. 57-85-2)をつめたシリコンチューブ(2 cm)を入れ、閉腹した。3 個体のメスマウスを両側の卵巣を除去し閉腹した。また別の 3 個体のメスマウスは卵巣除去後、安息香酸エストラジオール(SIGMA, cat. E8515)をつめたシリコンチューブ(0.5 cm)を皮下に埋め込み閉腹した。手術 4 週後に、組織を回収した。

ゲノム DNA 抽出

パウダー状にした肝臓の粉末を NucleoSpin Tissue(TAKARA)を用いて、プロトコルに従ってゲノム DNA を抽出した。濃度は NANO DROP1000(LMS)を用いて測定した。

T-DMR profiling with restriction tag-mediated amplification (D-REAM)

D-REAM は先行研究(Yagi et al., 2008)と同様に行なった。まず、5 μ g の肝臓ゲノム DNA を HpyCH4IV(認識配列:5' -ACGT-3') (New England BioLabs)で 16 時間消化した。酵素で消化した DNA は PCI (Phenol: Chloroform: Isoamylalcohol=25:24:1)で抽出し、クロロホルム抽出した後、エタノール沈澱で回収し TE に溶解した。50 ng の DNA を T4 DNA Ligase (New England BioLabs)を用いて R-アダプターと結合させた。dNTP 存在下、クレノウ断片で 16°C30 分, 70°C10 分間処理した後 Taq I で 65°C 1 時間以上処理した。Microspin S-300 HR カラム(GE Healthcare UK Ltd.)を用いて精製した後 T4 DNA Ligase を用いて N-アダプターと結合させた。Wizard SV Gel and PCR Clean-up System(Promega)をもちいて DNA を精製した後 Biotaq HS(Bioline)と R18, N18 プライマーを用いて PCR にかけた。PCR では初めに変性を 95 °C7 分で行い、その後[94 °C-30 秒, 62 °C-30 秒, 72 °C-30 秒]を 1 サイクルとし 20 サイクルの増幅反応を繰り返した。増幅された DNA は QIAquick PCR purification kit(QUIAGEN)で精製した後マイクロアレイ分析に用いた。

マイクロアレイの分析はAffymetrix社のGeneChip Systemを用いた。全ての手順はAffymetrix chromatin immunoprecipitation assay protocolに従った。サンプルDNAはGeneChip WT Double-Stranded DNA Terminal Labeling Kit(Affymetrix)を用いて断片化とビオチン標識化し、Affymetrix GeneChip mouse promoter 1.0R assaysにハイブリダイゼーションさせた。このGeneChipをGeneChip Fluidics Station 450を用い染色・洗浄した。GeneChip 3000 7G Scannerを用いプローブのシグナル強度を測定し“sequencing.CEL”ファイルを得た。このデータをModel-based Analysis of Tiling-arrays (MAT) (Johnson et al., 2006)によってデータを処理しUCSC ゲノムブラウザ上に表示した。

Bisulfite 反応(Frommer et al., 1992)

EZ DNA Methylation-Direct Kit(Zymo Research)を用いて5 µgのゲノムDNAを、Bisulfite処理した。手順はプロトコルに従った。

combined bisulfite restriction analysis(COBRA 法)

Bisulfite 反応済みのゲノムを用いてPCRをかけた。変性95 °C10分間の後、[94 °C-1分, 55 °C~60°C-30秒, 72 °C-1分]を1サイクルとし43サイクルかけて最後に72 °Cで10分間伸長させた。プライマーおよび除冷の条件は以下の表に記載。PCR産物の一部をHpyCh IV4(NBI)またはTaq1(TAKARA)により消化した後、MultiNA(Shimazu)泳動装置を用いて解析した。メチル化率は酵素処理したサンプルについて全てのバンドの中で消化されたバンドがどれだけの割合を占めるのかを指標に決定した。

使用した primer は以下に示す。

使用したプライマーは以下の通り、

mCyp2d9_bis_L	AAGGGAGTAGTATGTTTCAAAGAT
mCyp2d9_bis_R	CAATAAACAAATAATTACAAAAA
adam2_bis_F	ATGAGAGTGAAATTTGGTTGGATTT
adam2_bis_R	ACTATAAAATCCCCTACTCCCAAC
mAdam2_bis2_L	AAAAAATTATAAAAAAAATCCAACC
mAdam2_bis2_R	ATATGAGATAAAAGGGAAATTATG
mAdam2_bis3_L	CCCTTTTATCTCATATATTTAACTCT
mAdam2_bis3_R	GTTTTTTTGTGTAGTTTTGGTTGT
mAdam2_bis4_L	AAATAAAAAAAGTTAGGATAGGTG
mAdam2_bis4_R	AACAACAACAACAATAAAAAAACC
mAdam2_bis5_L	TTTTTTTTTTTTTAGTTTGATGG
mAdam2_bis5_R	ACCCTTCTATTCACAAATACTAAA

```

mCyp2d9_bis_R    CAATAAACAAATAATTACAAAAA
uggt2_bis_F      GTGGTTAATTTAGGGTTATTGATTT
uggt2_bis_R      CATTACACAATTACACACTTTATCTCTT
nudt7_bis_F      TTGTATGTAATGTGGGTTTGGTGT
nudt7_bis_R      CATCAAATACAACCTTTCCTCCTCTAA
rnpc3_bis_F      GATTTTTGATAATGTTTGGTTGTGG
rnpc3_bis_R      CAACAACCTTTAAACTATAATCTATCCTA
sarnp_bis_F      TTTGTAAATGAAGGTGTTTAGAAAAAGTT
sarnp_bis_R      CCCACTAATTTTTAATCTCTTTCACC
snx29_bis_F      AGTTTTGGGGTTGATTTGATTTT
snx29_bis_R      AACTCCCAACATAACAACCTCTTT
Mettl20_bis_F    TTGAGGGGTTAGTGAAAAATTTAGT
Mettl20_bis_R    TCCTCAAATCAAACCTATAAACCTA
ak144002_bis_F   AATGTGTGGAGGGATTTTGTAGTT
ak144002_bis_R   CCAACCCAAACATCTATTTATATTCTATT
ak149394_bis_F   GGAGAGTTGGAGAGTAGATATGGTTG
ak149394_bis_R   CCATATATCCCACTAAAAACCTCTAAA

```

Bisulfite Sequence

Bisulfite 反応済みのサンプルで PCR をかけた後 2 %のアガロースゲルで泳動してバンドを切り出した。Promega の Gel extraction kit を用いてゲノムを精製し、T4 Ligase を用いて PGEMT-easy vector につなげた。プラスミドは XL1-Blue コンピテント細胞に形質転換して LB プレートにまいた。37°C で 16 時間インキュベートした後 4°C の冷蔵庫に 6 時間以上入れた。そしてコロニーをピックアップして Phi129 (NEB, Cat. M0269) を用いて増幅させた (Maruyama et al., 2009)。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit で sequencing 反応をさせた後、Applied Biosystems 3130x ジェネティックアナライザによって配列を決定した。データは QUMA (Kumaki et al., 2008) を用いて解析した。

DNMT 及び TET 遺伝子発現解析

肝臓の粉末は -80°C から取り出して、1 mL の TRIZOL Reagent (Life technologies, cat. 1556-018) (Wilfinger et al., 1997, Louveau et al., 1991) を加えた。室温で 5 分静置したのち 200 μL のクロロホルムを加えて転倒混和した。遠心 (12,000 g 15 分 4°C) の後、上清を 500 μL の新しいチューブに移してイソプロピルアルコールを 500 μL 加えた。室温で 15 分静置したのち遠心 (12,000 g 10 分 4°C) して、上清を除去し 75 % エタノールを 500 μL 入れて転倒混和をした。遠心 (12,000 g 5 分 4°C) した後、上清を除き、乾燥させ、20 μL の DEPC 処理水を加えて濃度測定をした。RT-PCR を行うまでは -80°C で保存した。得られた Total RNA に DNase (Takara) 処理を施して DNA を分解した後 oligo (dT)₂₀ をプライマーとして、Superscript III (invitrogen) を用いて逆転写反応により cDNA を合成した。5 μL の cDNA, 5 μL の 1 μM primer Mix, 10 μL の Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Cat. QPS-201) を加えて Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムにより解析した。PCR は、 95°C の変性 1 分と、 95°C 15 秒と 60°C 1 分の 40 サイクルの反応条件で行なった。

DNMT1_F	CATCAGCAAGATTGTTGTTGAGTTCC
DNMT1_R	CTGGGCGTGCCGTAAGAGG
DNMT3A_F	CCAGACGGGCAGCTATTTAC
DNMT3A_R	AGACTCTCCAGAGGCCTGGT
DNMT3B_F	TGATGGGAATGGCTCTGATATTCT
DNMT3B_R	CATTGCTATGTCGGGTTCGGA
TET2_F	GATCCAGGAGGAGCAGTGAG
TET2_R	TGGGAGAAGGTGGTGCTATC
TET3_F	TCCGGATTGAGAAGGTCATC
TET3_R	CCAGGCCAGGATCAAGATAA
Actb_F	TACAATGAGCTGCGTGTGG
Actb_R	GCTGGGGTGTTGAAGGT

RT-qPCR (Biomark)

microfluidic dynamic arrays (Fluidigm) を用いて解析した (Spurgeon et al., 2008)。RNA は NucleoSpin RNA (TAKARA) により、プロトコル通り抽出し、PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa) を用いて、cDNA 合成を行なった。12.5 μ g の RNA 相当の cDNA を TaqMan PreAmp Mastermix (Applied Biosystems) により増幅させた。その後、TE (pH8.0) で 5 倍希釈した。BioMark 48 \times 48 arrays はプロトコル通り行なった (Dye は EvaGreen DNA Binding Dye を使用した)。IFC コントローラーを用いてサンプルをチップに入れた後 PCR を以下のプログラムで行なった。

50 °C 2 分

95 °C 10 分

40 cycle (95 °C 15 秒, 60 °C 60 秒)

データは BioMark Realtime PCR Analysis software を用いて automatic global threshold setting で解析した。プライマーは以下の通りである。

mEphx2_rt_L	GGTTACCATCCTGGTCCACA
mEphx2_rt_R	ATTTGGATTGCATGGGACTG
mCyp7b1_rt_L	ACCAGAGAACAATTGGACAGC
mCyp7b1_rt_R	CATATCCTCCTGCACTTCTCG
mCyp2a4_rt_L	TCAAGGAAGCTCTGGTGGAC
mCyp2a4_rt_R	CCGCTGCTGAAGGCTATG
mC6_rt_L	CTCCCATCCCTAGTGTGCAG
mC6_rt_R	TCCTCCAGTGAAAGAGTTGTCA
mCux2_rt_L	TCGCAGCAGACCATAGAGC
mCux2_rt_R	CCCTCCACCAGCATTCA
mAdam2_rt_L	TGGGAGCTGAATTCCAAGAG
mAdam2_rt_R	TCCCACACATCCGGTCAT
mGulo_rt_L	AGAGGGACAGCTGCTACATGA
mGulo_rt_R	CCTGCCTCCAAACTTCTCA
mEphx2_rt_L	GATCCCTGCTCTGGCCCAGGC
mEphx2_rt_R	TCTTCTATTTTCAGGAGGAGA
mAK147121_rt_L	ACCTACCCCAAGACCAACG
mAK147121_rt_R	CGGGGAAGGTCAACCAGT
mUggt2_1_rt_L	GTGACCGCCCACTTGACT
mUggt2_1_rt_R	CACAACTGCCAAACTTTTCA
mUggt2_2_rt_L	TTCAGGAGAATCTCAGCAGGT
mUggt2_2_rt_R	AATCATGTTGTTGGGAAGATCC
mUggt2_3_rt_L	ATGCATTGAAGCACATGGAA

mUggt2_3_rt_R	GGAAAGCTGCCAAAATTCCT
mUggt2_4_rt_L	TTCAGGAGAATCTCAGCAGGT
mUggt2_4_rt_R	AATCATGTTGTTGGGAAGATCC
mSarnp_rt_L	TGGTTTGAATGTCTCTCCATC
mSarnp_rt_R	TGAACTTGTCACAATCCCAAA
m0rmd12_rt_L	CCTGGAGACCACAGGTGTAAG
m0rmd12_rt_R	AGCCCTGATTGAGCTTGTTTC
mSnx29_1_rt_L	AGAGCATTGATGACGACGTG
mSnx29_1_rt_R	GTTCCCATCCAGTGCCTGT
mSnx29_2_rt_L	GGCAGGAGCTGATTGACCT
mSnx29_2_rt_R	TGATCTTCAGATGTTTGGCTCA
mRundc2a_rt_L	TGCTGTCTCCATTCTCATCAA
mRundc2a_rt_R	GCTCCCTTTTACATCGGGTA
Actb_taq_F	GGATGCAGAAGGAGATTACTGC
Actb_taq_R	CCACCGATCCACACAGAGTA

DNase assay

DNase I Digestion of Isolated Nuclei for Genome-Wide Mapping of DNase Hypersensitivity Sites in Chromatin(Ling and Waxman, 2013)の方法に準じて行なった。バッファの組成を以下に示す。

- BufferA

15 mM Tris-HCl (pH8.0)

15 mM NaCl

60 mM KCl

1 mM EDTA

0.5 mM EGTA

0.5 mM Spermidine (使用直前に追加)

0.3 mM Spermine (使用直前に追加)

- 10×Digestion buffer

60 mM CaCl₂

750 mM NaCl

- Stop buffer

50 mM Tris (pH8.0)

100 mM NaCl

0.1 % SDS

100 mM EDTA

20 µg/mL RNaseA(使用直前に追加)

0.5 mM Spermidine(使用直前に追加)

0.3 mM Spermine(使用直前に追加)

10×Digestion buffer を BufferA で希釈して 1×digestion buffer にして、Spermine、Spermidine、RNaseA を加えた。Stop buffer は 37°C へその他は氷上でしっかり冷やした。肝臓 4 mg を 1.5 mL チューブへ入れて、500 µL の Lysis solution (ActiveMotif, Cat. 53008) を加えた。ホモジナイザーですりつぶして遠心 (2,300g 10分 4°C)。上清を除き 500 µL の 1×Digestion buffer を加えて転倒混和 3 回。遠心 (2,300g 10分 4°C) 後、850 µL の 1×Digestion buffer を加え 2 本に分注。37 °C で 5 分間温めた後、片方のチューブに 20 U の RQ1 RNase-Free DNase (Promega; M6101) を加えた。37 °C で 10 分反応させて 450 µL の stop buffer を加えた。氷上で 10 分静置した後 10 mg/ml の ProteinaseK を 10 µL 加え 55 °C 16 時間。Phenol Chloroform Isoamylalcohol (25:24:1) 800 µL を入れ 100 回転倒混和して、遠心 (2,300 g 10分 4°C) 後、上清 600 µL を 1.5 mL チューブに移して 60 µL の 3M NaOAc を加えた。さらに 600 µL のイソプロパノールを加えて、遠心 (20,000 g 30分 4 °C)。上清を除き、1 mL の 70 %エタノールを加えて遠心 (20,000 g 5分 室温)。上清を除いて風乾。20 µL の TE に溶かして濃度測定をした。1 µg/uL に希釈した後、5 µL のサンプル、5 µL の 1 µM primer Mix, 10 µL の Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Cat. QPS-201) を加えて Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムにより解析した。PCR は、95°C の変性 1 分と、95 °C 15 秒と 60 °C 1 分の 40 サイクルの反応条件で行なった。

データは ΔCt 値 = Ct 値 (DNase 消化サンプル) - Ct 値 (DNase 未消化サンプル) を示している。

Rho 遺伝子をコントロール (高度にクロマチンが凝集している領域) として用いており、*Rho* 遺伝子の Ct 値を用いてデータを補正した。

使用したプライマーは以下の通り。

Rho_DHS_F	AGGTCACCTTATAAGGGTCTGGGGG
Rho_DHS_R	AGTTGATGGGAAGCCCAGCACGAT
Gapdh_DHS_F	CAGCTCCCCTCCCCTATCAGTTCG
Gapdh_DHS_R	ACCAGGGAGGGCTGCAGTCCGTATT
Adam2_DHS_F	CAGGAGGAAAAGAAGGTTTTGA
Adam2_DHS_R	CCTCTCCCATGTCAACCTTT
Snx29-DHS_F	TTTTGGGGCTGATTTGATTC
Snx29-DHS_R	TTACAGCATGGAGAGCATCG
Uggt2_DHS_F	CCAACCCAGGGGTTATTGAT
Uggt2_DHS_R	CGGTATTTTCCTAGAACGGAAATG

細胞総タンパク抽出

10 mg 程度の肝臓に 200 μ L の RIPA buffer (Santa Cruz, Cat. SC-24948) (Ngoka, 2008) を加えて、21G の針で破碎した。氷上で 60 分静置した後、遠心(10,000g 10 分 4 $^{\circ}$ C)し、上清を新しいチューブへ移した (Schneider et al., 2011)。濃度測定は BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo, Cat. 23227) (Wiechelman et al., 1988) により行なった。

サンプル 10 μ L に対して試薬 A:試薬 B =50:1 で混ぜて 190 μ L ずつ入れた。

37 $^{\circ}$ C で 30 分反応させた後、iMark マイクロプレートリーダー (BIORAD) で 570 nm の波長を解析した。

Western blotting

細胞総タンパク 8 μ g/8 μ L に 2 μ L の Lane Marker Non-Reducing Sample Buffer, ImmunoPure を加えて 100 $^{\circ}$ C で 4 分インキュベートした。

電気泳動用の Gel はアクリルアミドゲルの濃度が 5 % になるように MiniPROTEAN[®]system Glass plates (BIO-RAD, cat.no. 1653308) と 15well のコームを用いて作製した。

・ 5 %アクリルアミドゲル(1 枚)

-分離ゲル(lower gel)-

2.9 mL 超純水

0.833 mL 30 % Acrylamide/Bis solution 37.5:1(2.6%) (BIO-RAD, cat.no. 161-0158)

1.25 ml 1.5 M Tris-HCl (pH8.8)

50 μ l 10 % SDS

25 μ l 10 % APS (Bio-rad cat.no. 161-0700)

2.5 μ l N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylenediamine (BIO-RAD, cat.no. 161-0800)

-濃縮ゲル(upper gel)-

1.2 mL 超純水

400 μ l 30 % Acrylamide/Bis solution 37.5:1(2.6 %)

625 μ l 0.5M Tris-HCl (pH6.8)

25 μ l 10 % SDS

12.5 μ l 10 % APS

1 μ l 1 N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylenediamine

作製後 well を超純水とアスピレーターを用いて三回洗浄し、Mini-PROTEAN[®]Tetra system の泳動槽にセットした。running buffer(25 mM Tris, 192 mM Glycine (Wako, cat.no. 077-00735)、0.1 % SDS)を加え、その後サンプルとマーカー(WIDE-VIEW Prestained Protein Size Marker III (Wako, cat.no. 230-02461)をアブライし、200 V で 30 分泳動を行った。泳動中にタンパク質を転写する分離ゲルのサイズに合わせて切断した Immobilon-P transfer membranes (Immobilon cat.no. IPVH304F0)をメタノール(Wako, cat.no. 131-01826)に 30 秒浸した後蒸留水に 2 分浸し、ろ紙(Filter paper chromatography) (Advantec

600×600 mm cat. no. 526) 4枚と共に Transfer buffer (47 mM Tris, 40 mM Glycine, 0.00037 % Glycine, 20 %メタノール(Wako, cat. no. 131-01826))に浸す事によって平衡化を行った。泳動終了後、ゲルの分離ゲルと濃縮ゲルを切り離し、分離ゲルを 15 V で 45 分転写を行った。Membrane は、5%スキムミルク/TBS-0.1%Tween-20 (20 mM Tris-HCl pH7.6, 137 mM Sodium chloride(Wako, cat. no. 191-01665), 0.1 % Tween-20 (Polyoxyethylene (20) Sorbitan monolaurate) (Wako cat. no. 167-11515))を用いて 90 分間室温で振盪することによってブロッキング反応を行った後に、1次抗体を 1/1,000 量加えて 90 分室温で振盪した。

anti-ACTB (1:1,000, Sigma Aldrich Japan; clone AC-15);

anti-DNMT1(1:1,000, Active Motif, Cat. 39204)

anti-DNMT3A(1:1,000, Active Motif, Cat. 39206)

anti-DNMT3B(1:1,000, Active Motif, Cat. 39207)

anti-TET2(1:1,000, Active Motif, Cat. 61389)

anti-TET3(1:1,000, Abiocode, Cat. R1092-2a)

振盪後、抗体溶液を除去して TBS-0.1%Tween-20 で 3 回洗浄し、TBS-0.1%Tween-20 を加えて 1/5,000 量の HRP-conjugated goat polyclonal anti-mouse IgG (Jackson Immuno Research; catalog no. 115-036-062)、または HRP-conjugated chicken polyclonal anti-rabbit IgG (Abcam; catalog no. ab6829)を加えて二次抗体反応を 90 分、室温で振盪する事によって行った。振盪後、抗体溶液を除去して TBS-0.1%Tween-20 で 3 回洗浄した。

発光試薬には SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo cat. no. 34080)を用いた。同 kit 内の stable peroxide solution(cat. no. 1856135)と Luminol/Enhancer solution(cat. no. 1856136)を 1:1 の割合で混合し、同混合液を TBS-0.1%Tween-20 を除去した membrane の上に水平な場所で均一になるようにアプライし、Genegnome system high resolution system 100(Syngene)を用いて蛍光を検出した。

Chromatin Immuno Precipitation (ChIP) 解析

～クロマチン調整～

本研究ではChIP IT Express Enzymatic(ActiveMotif, Cat. 53009)を使用した(Solomon et al., 1988, Caretti et al., 2003)。クロマチン調整にあたり肝臓は30 mg 分用いた。

2.5 μL の100 mM PMSF(phenylmethane sulfonyl fluoride), Protease inhibitor cocktail を加えた500 μL のLysis solutionをチューブにいれて、プラスチックのホモジナイザーですりつぶして氷上に30分静置した。遠心(2,400 g 10分 4 $^{\circ}\text{C}$)後、上清を除いて500 μL のDigestion bufferを加える。10秒間超音波破碎をした後、37 $^{\circ}\text{C}$ で5分温めた。

Enzyme shearing cocktailを24.2 μL 加えて、37 $^{\circ}\text{C}$ で10分反応させた。

10 μL の0.5M EDTAを加えて氷上10分静置して、遠心(18,000 g 10分 4 $^{\circ}\text{C}$)後、上清をProtein LoBind チューブ(Eppendorf Cat. 95292)に移した。クロマチン溶液は-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

～Input 精製～

クロマチン溶液を50 μL 取り出し、150 μL の滅菌MQ及び10 μL の5M NaClを加えて65 $^{\circ}\text{C}$ 16時間反応させた。1 μL のRNaseAを加えて37 $^{\circ}\text{C}$ で30分、10 μL のProtease Kを加えて42 $^{\circ}\text{C}$ 1時間以上反応させた。その後は、Chromatin IP DNA purification kit(Active Motif Cat. 58002)を用いてDNAを精製した。1 mLのBinding bufferと5 μL の3M Sodium Acetateを加えて懸濁した後、カラムに移して遠心(20,000 g 1分 室温)してflow throughを捨てた。750 μL のwash bufferを加えて遠心(20,000 g 1分 室温)し、flow throughを捨てた。遠心(20,000g 2分 室温)後、カラムを新しいチューブに移した。50 μL のDNA purification bufferを加え遠心(20,000g 1分 室温)した後、濃度を測定した。

～ChIP～

1 μg 分のDNA相当のクロマチン溶液と1 μL のProtease inhibitor cocktail、10 μL のChIP buffer 1と3 μg の抗体を加え、超純水で100 μL にメスアップし、Mixを作製した。

25 μL のProtein G Magnetic beads(Active Motif)をマグネットスタンドに乗せ、溶液を除いた後、上記Mixを加えて4 $^{\circ}\text{C}$ で16時間反応させた。

抗体は抗TET2抗体(SantaCruz, Cat. sc-136926)

抗Androgen Receptor抗体(Abcam, Cat. ab74272)

Mouse normal IgG(Abcam, cat. ab18413)

を用いた。

マグネットスタンドに乗せ、800 μL のChIP buffer1で2回洗浄、800 μL のTEで2回洗浄、100 μL のTEで1回洗浄後、Elution buffer(10 mM Tris-HCl(pH8.0), 300 mM NaCl, 5 mM EDTA(pH8.0), 0.5% SDS)を100 μL 入れて、65 $^{\circ}\text{C}$ で16時間以上反応させた。1 μL のRNaseAを加えて37 $^{\circ}\text{C}$ で30分、10 μL のProtease Kを加えて42 $^{\circ}\text{C}$ 1時間以上反応させた。その後

は、Chromatin IP DNA purification kit (Active Motif Cat. 58002)を用いてDNAを精製、50 μ LのDNA purification bufferに溶出した。

5 μ Lのサンプル, 5 μ Lの1 μ M primer Mix, 10 μ LのThunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Cat. QPS-201)を加えてApplied Biosystems 7500リアルタイムPCRシステムにより解析した。PCRは、95 $^{\circ}$ Cの変性1分と、95 $^{\circ}$ C15秒と60 $^{\circ}$ C1分の40サイクルの反応条件で行なった。用いたプライマーは以下の通り。

Gapdh-ChIP_F	GTGCGTGACATTTCAAAAA
Gapdh-ChIP_R	AGCTACGTGCACCCGTAAAG
Adam2_ChIP_F	AAAAGGACAAACCACATCCAA
Adam2_ChIP_R	TGAAAGAGGATCCAGCCAGA

結果

性差 DMR の同定と分類

D-REAM (T-DMR profiling with restriction tag-mediated amplification)法を用い、雌雄の肝臓の DNA メチル化プロファイルを比較し、雌に対し雄で低メチル化状態(10%以上の差)である新規 S-DMR を、常染色体上に 10 カ所同定した(図 1-1A)。これら S-DMR の DNA メチル化の雌雄差は、雌雄の脳、ES 細胞では認められなかった。S-DMR は、そのメチル化のパターンから、雌雄ともに脳や ES 細胞に対し肝臓で低メチル化になる領域と (*Uggt2* や *Sarnp*)、雄のみ肝臓で低メチル化になる領域 (*Adam2* や *Rnpc3*) があるが、いずれも雄においては組織間でメチル化の異なる領域 (T-DMR) であり、S-DMR は雌雄でメチル化が異なる T-DMR であるといえる。

D-REAM で同定した既知の性差発現遺伝子 *Cyp2d9* の S-DMR は、公表されている肝臓での STAT5b の ChIP-Seq データにおいて STAT5 結合が認められる領域と重なる(図 1-1B)。新たに同定した S-DMR のうち、*Scp2*, *Snx29*, *Ak144002* 近傍に位置するものは STAT5 の結合シグナルと重なり、これらの S-DMR には STAT5 の結合が示唆される。その一方で、*Adam2* や *Uggt2* 近傍の S-DMR 周辺には STAT5 の結合シグナルは認められない。すなわち、S-DMR は STAT5 により発現が制御される遺伝子近傍の STAT5b 結合領域に限らず存在する。

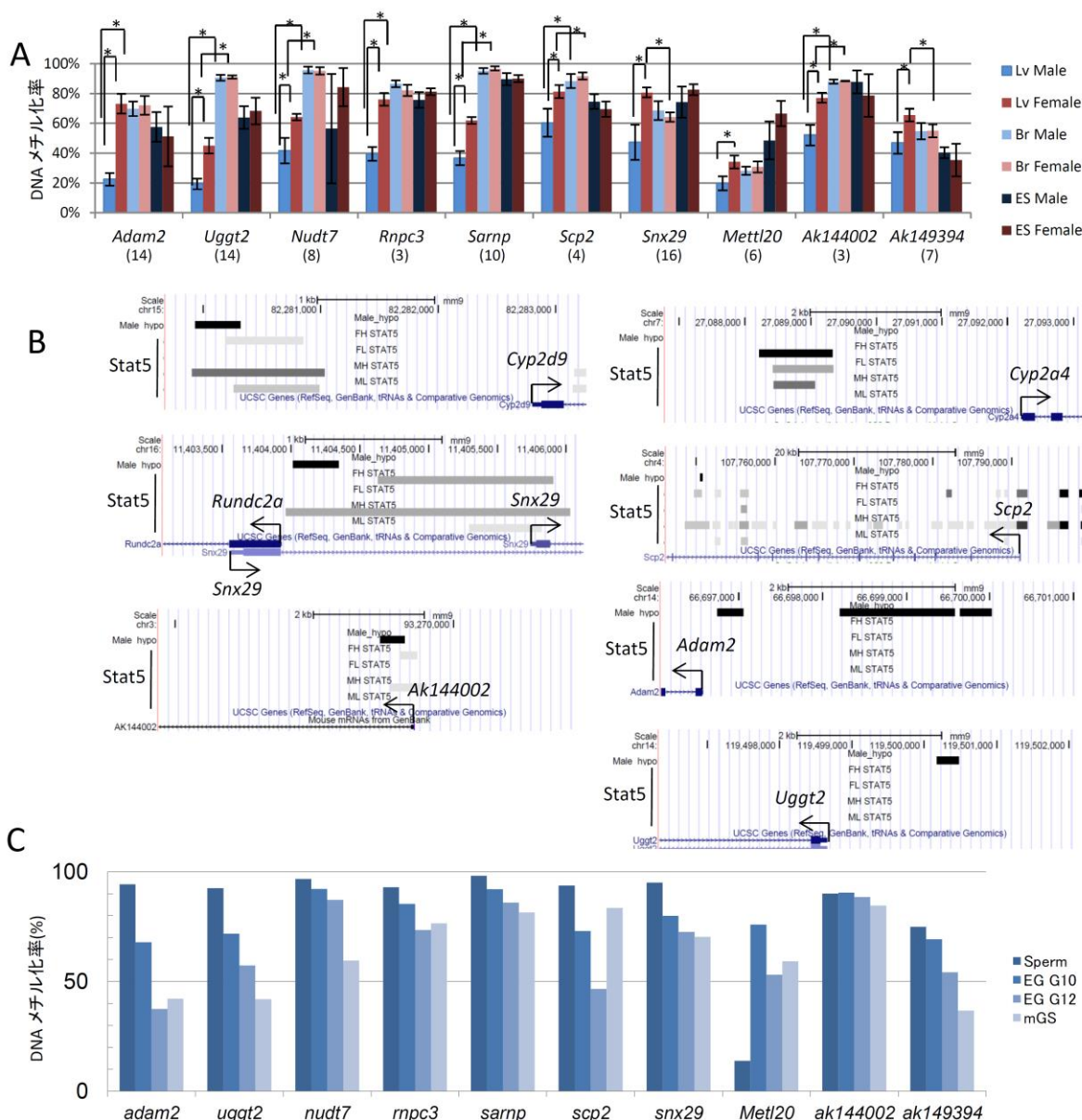


図1-1 肝臓における新規S-DMRの同定

- A. COBRA解析によるDNAメチル化解析の結果。縦軸はDNAメチル化率を示す。Lvは肝臓。Brは脳、ESはES細胞を示す。括弧内は染色体番号を示す。※はP値<0.05を示す(Studentのt検定)。
- B. S-DMR近傍のSTAT5結合領域。Male hypoはD-REAMIにより得られたオスで低メチル化状態である領域を示す。STAT5はFH STAT5, FL STAT5, MH STAT5, ML STAT5においてバンドが認められる領域がSTAT5結合領域である。下段にはrefseqのデータを記載した。
- C. Adam2のS-DMRにおける生殖系細胞のDNAメチル化状態
EG G10はオス、EG G12はメスの胚性生殖細胞、mGSは多能性生殖細胞

雄低メチル化 S-DMR の DNA メチル化状態はテストステロンの制御下にある

S-DMR のメチル化に与える性ステロイド(テストステロン及びエストロゲン)の影響を、精巣摘除、卵巣摘除およびそれらのマウスに性ステロイドを投与した個体の肝臓ゲノムを用いて解析した。なお精巣摘除とテストステロンの効果は精嚢腺重量を指標に、卵巣摘除とエストロゲン投与の効果は子宮重量を指標にして確認した(図 1-2A, B)。本研究で新たに同定した S-DMR のうち検討を加えた 5 カ所全てにおいて、精巣摘除個体でメチル化が亢進し、テストステロン負荷によりメチル化は減弱した(図 1-2C)。一方、この領域は卵巣摘除、及び卵巣摘除後にエストロゲンを投与した個体においてもコントロールのメスマウス同様、高いメチル化率を維持した。つまり、これらの S-DMR の DNA メチル化制御はテストステロン依存的であり、エストロゲン非依存的であることを示している。また S-DMR のメチル化変動は STAT5 の結合が認められるもの (*Snx29*)、認められないもの (*Adam2*, *Uggt2*)いずれでも観察され、代表的な性差遺伝子 *Cyp2d9* の S-DMR でも他の S-DMR と同様のメチル化変動を示した(図 1-2C)。

C 型肝炎肝癌病態モデルマウスである Core Tg マウス(Moriya et al., 1998) のオスは、月齢に応じ、肝組織像が変化する。このマウス病態の、2 ヶ月齢、6 ヶ月齢(脂肪肝)、16 ヶ月齢(長期脂肪肝)個体の肝臓 DNA における S-DMR の DNA メチル化状態を解析した(図 1-2D)。Core Tg マウスのオスは 8w において C57BL6 のメチル化率とほぼ同等のメチル化率を示し、また、*Snx29* 遺伝子を除く、解析した全ての S-DMR の DNA メチル化率は変化せず、低メチル化状態を維持していた。これまでに一部の老化に伴い発現が変化する性差遺伝子近傍の S-DMR では、発現の変化に相応する DNA メチル化変動が報告されているが、今回新たに同定した S-DMR の DNA メチル化は老化、脂肪肝などの環境変化に対し安定した情報であることが分かった。

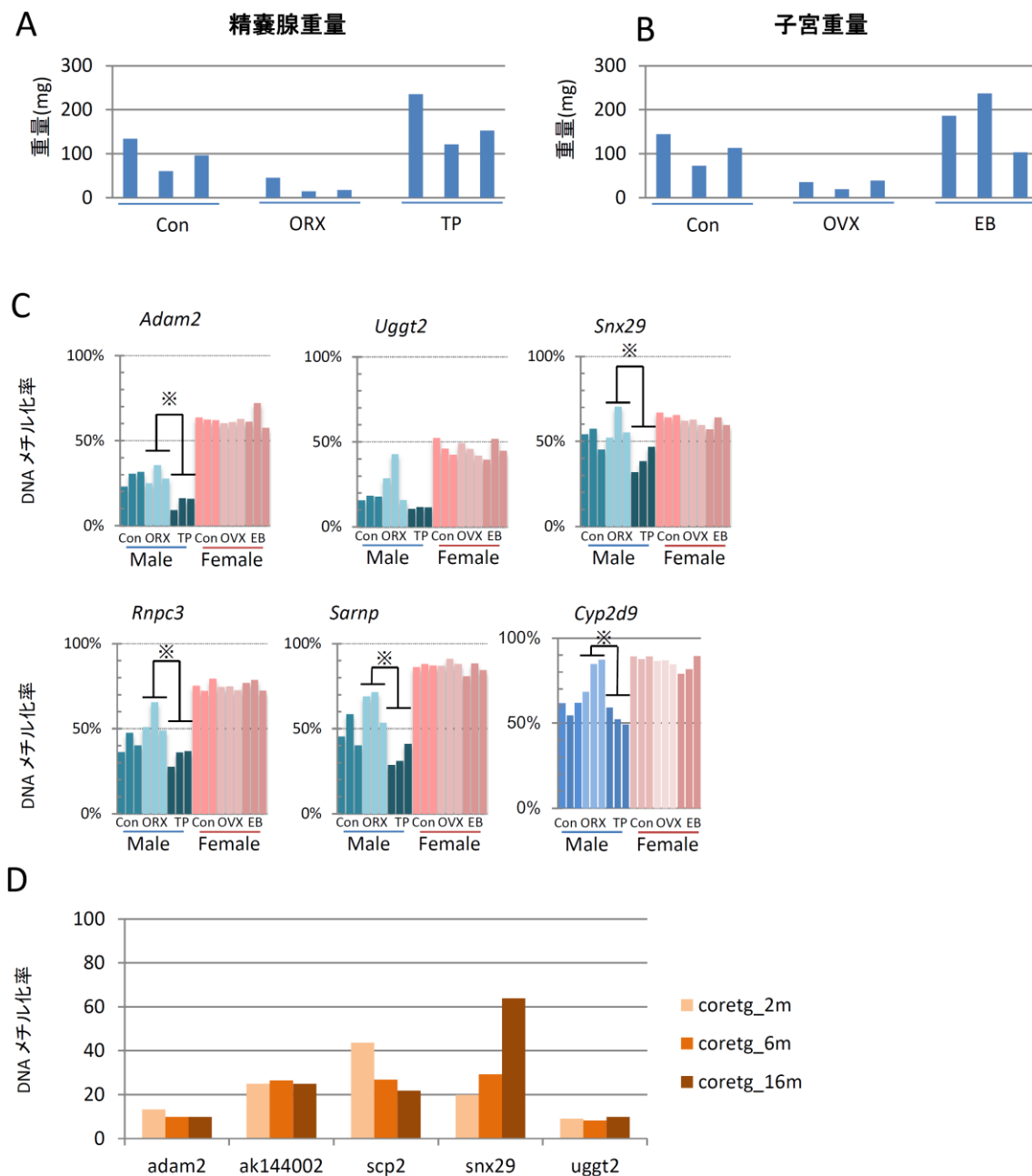
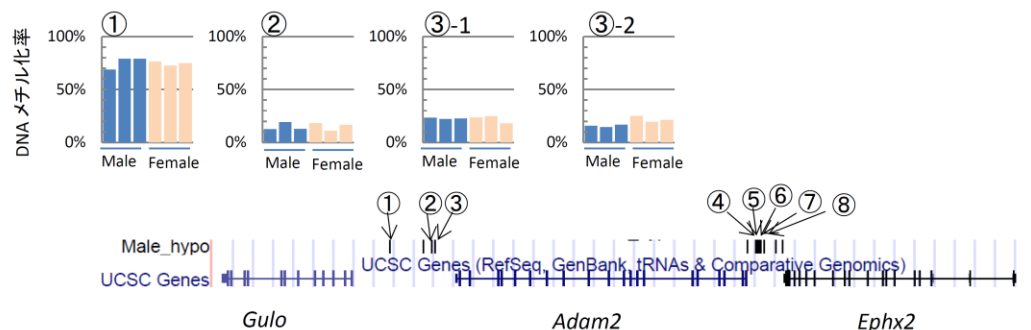


図1-2 本研究で同定したS-DMRはテストステロン依存的に低メチル化状態となる
 A 精巣摘除マウス及び精巣摘除後テストステロンを投与したマウスの精囊腺重量(n=3)
 B 卵巣摘除マウス及び卵巣摘除後エストロゲン投与したマウスの子宮重量(n=3)
 C S-DMRにおける性ステロイドの影響を解析(COBRA)
 Con: コントロール, ORX: 精巣摘除, TP: 精巣摘除後テストステロン投与
 OVX: 卵巣摘除, EB: 卵巣摘除後エストロゲン投与
 ※はP値<0.05を示す(Studentのt検定)
 D オスCore TgマウスのDNAメチル化解析(COBRA)
 2ヶ月齢(2m), 6ヶ月齢(6m), 16ヶ月齢(16m)の個体を解析した。

S-DMR の局所性

Adam2 の近傍には、肝臓で強発現している *Ephx2*、*Gu1o* が位置し、*Adam2* S-DMR の DNA メチル化が周辺の遺伝子発現やエピジェネティック変動に関連するのかを調べるために、これら遺伝子の転写開始点近傍まで解析範囲を広げた (図 1-3A)。*Adam2* の S-DMR 周辺の DNA メチル化状態は、雌雄ともに高メチル化状態であり (図 1-3A)、また *Gu1o*、2 周辺領域のメチル化状況には性差がなかった。すなわち、S-DMR は狭い範囲に限定されていることが示唆された。そこで S-DMR の範囲を確認するために、*Adam2*、*Uggt2* 及び *Snx29* の S-DMR に関して Bisulfite sequencing 行った (図 1-3B)。その結果、驚いたことに *Adam2* と *Uggt2* に関しては、COBRA で解析した CpG のみに性差が認められ、*Snx29* の S-DMR の場合も 40bp 以内にある 2 カ所の CpG に変動の範囲が限られていた。これらの結果は、ゲノムの狭い範囲に局限する S-DMR が存在することを示している。

A



B

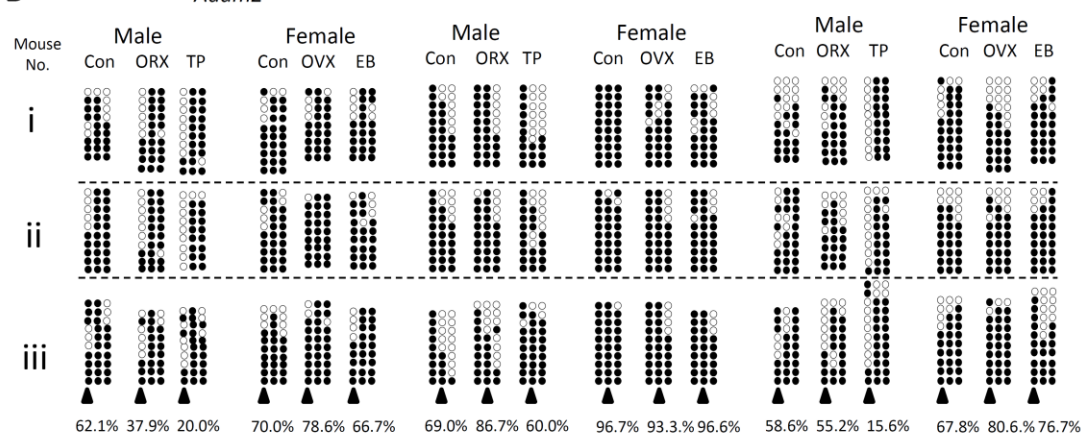


図1-3 S-DMRは局所的に存在する

A *Adam2*遺伝子の周辺領域のDNAメチル化解析(COBRA)

B Bisulfite sequencingによる*Adam2*, *Ugg2*, *Snx29*のDNAメチル化解析。▲はCOBRAで解析したCpGの位置
○が非メチル化CpG、●がメチル化CpGを表す。▲で指されたCpGのメチル化率を下部に表記した。
各条件、3個体のマウスの肝臓のDNAを解析した。

Con: コントロール, ORX: 精巣摘除, TP: 精巣摘除後テストステロン投与
OVX: 卵巣摘除, EB: 卵巣摘除後エストロゲン投与

S-DMR は近傍遺伝子の性差発現を必ずしも伴わない

S-DMR の DNA メチル化と近傍遺伝子発現との関連を調べるため、まず STAT5 結合領域と重なる S-DMR を持つ *Snx29* と、その近傍遺伝子 (*Rundc2a*) の発現を qRT-PCR で解析した。すでに知られている STAT5 依存性の性差発現遺伝子 (*Cyp2d9*, *C6*, *Cyp7b1*) の発現は、精巣摘除によって低下し、テストステロンの負荷により上昇する (図 1-4)。しかし、*Snx29*、*Rundc2a* 両遺伝子とも雌雄で発現差はなく、精巣摘除によって低下し、テストステロンの負荷でも発現変動を認めなかった。また S-DMR が高メチル化にある脳で、高い発現を認めた。*Adam2* については、Spermatid、卵巣で高い発現を、脳で微弱な発現を認めたが、肝臓では雌雄いずれも発現を認めなかった。*Adam2* の上流、下流に位置する *Ephx2*, *Gulo* 共に肝臓で高い発現を認めたが、雌雄で発現量に有意な差は無かった。さらに *Adam2* が強く発現している卵巣、Spermatid では、*Ephx2*, *Gulo* の微弱な発現を認めた。また *Uggt2* 近傍の S-DMR は T-DMR でもあるが、S-DMR の DNA メチル化状態と性差・組織特異的発現状態との関連を認めなかった。これらの結果は *Adam2*、*Snx29*、*Uggt2* 近傍の S-DMR の DNA メチル化と近傍遺伝子の発現には関連が無いことを示している。

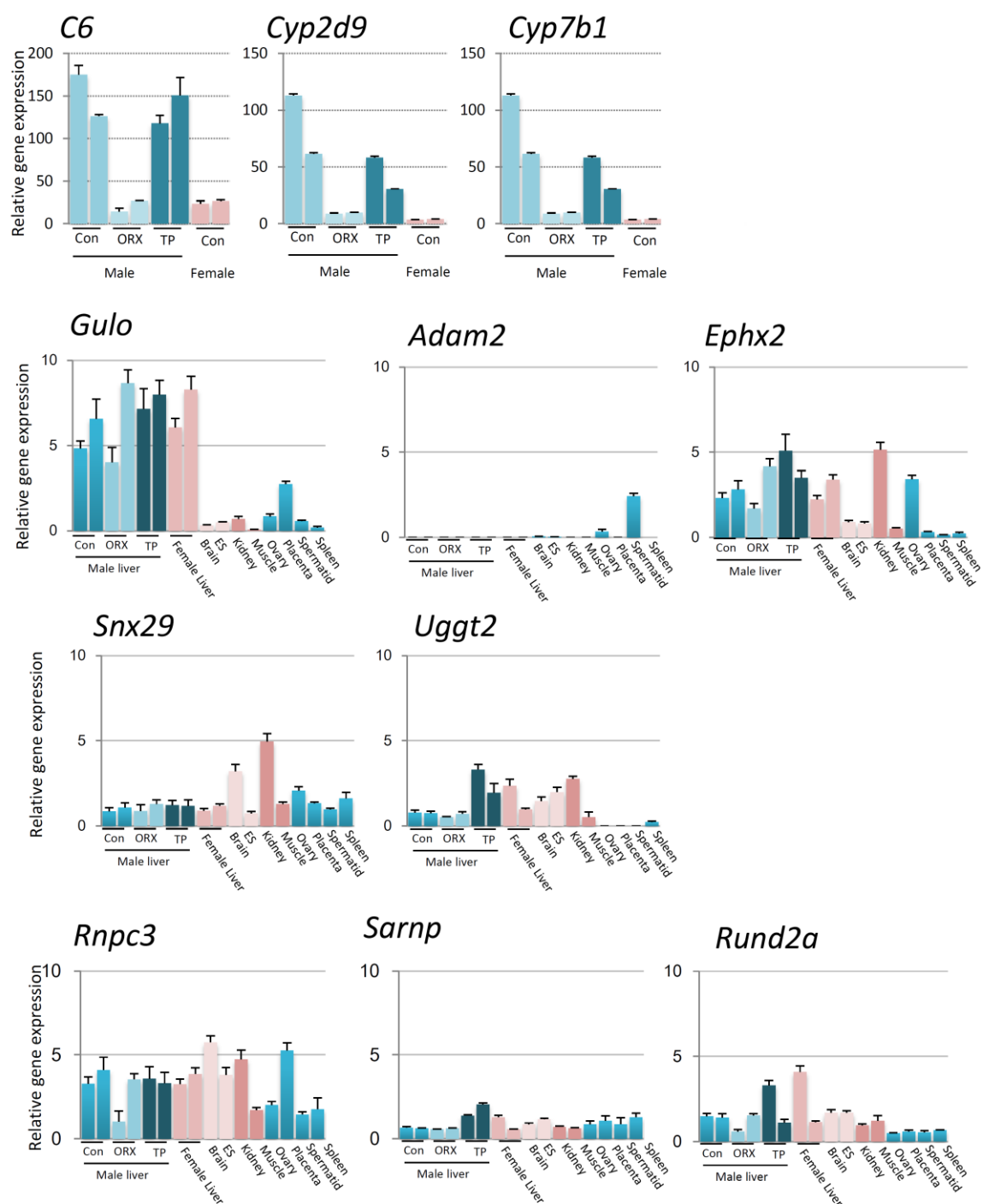


図1-4 S-DMRを有する遺伝子の発現解析
縦軸は*Actb*遺伝子の値で割った相対値を示す。肝臓はそれぞれの条件について2個体ずつ解析を行なった。

S-DMR のヌクレオソーム構造とメチル化制御分子機構

S-DMR 周辺のヌクレアーゼ (DNase1) 感受性の違いを解析した (Thurman et al., 2012, Natarajan et al., 2012)。クロマチン構造が緩んでいるという報告のある *Gapdh* のプロモーター領域が DNase1 に対する高い感受性を示すことが確認された条件において、有意ではないものの、*Adam2* 及び *Snx29* において、無処置のオス及び精巣摘除後 Testosterone propionate を投与したオスで高い値を示す傾向が認められた (図 1-5)。このことは、*Adam2* 及び *Snx29* のクロマチンが高メチル化により、より強固な構造になっていることを示唆している。

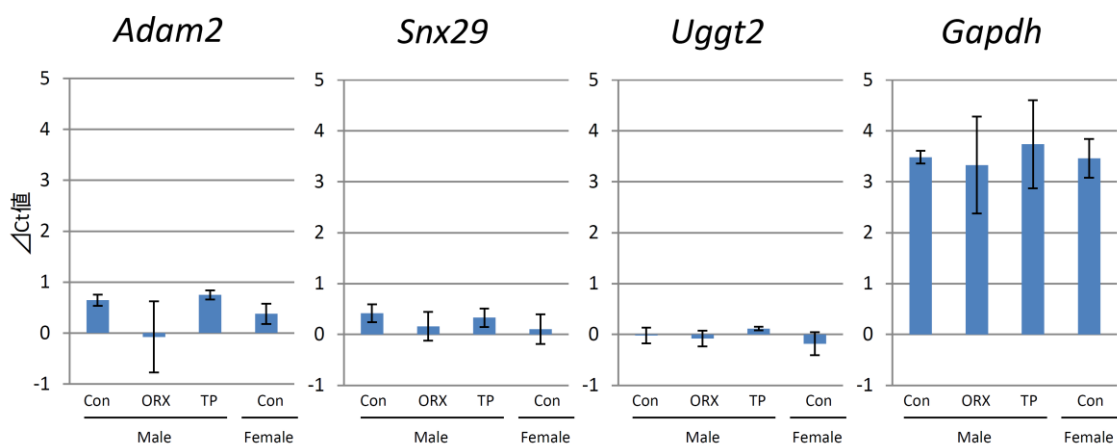


図1-5 DNase1アッセイ

各サンプルについてqPCRを行い

ΔCt値(DNase1処理サンプルのCt値-DNase1非処理サンプルのCt値)を縦軸に表示した(n=3)。

ΔCt値が高いほどクロマチンが弛緩していることを意味する。

Studentのt検定の結果、各遺伝子について、サンプル間に有意差は認められなかった。

STAT5 の結合を認めない S-DMR に結合する因子の探索を行った。Testosterone 依存的な DNA メチル化が起きていることから Androgen receptor の S-DMR への結合量を ChIP 解析により調べた。*Adam2* S-DMR への Androgen receptor の結合は、雌雄及び精巣摘除、精巣摘除+テストステロン投与群で差が認められなかった(図 1-6)。同様に TET2 の結合にも性差、および精巣摘除、テストステロン負荷による変化を認めなかった。

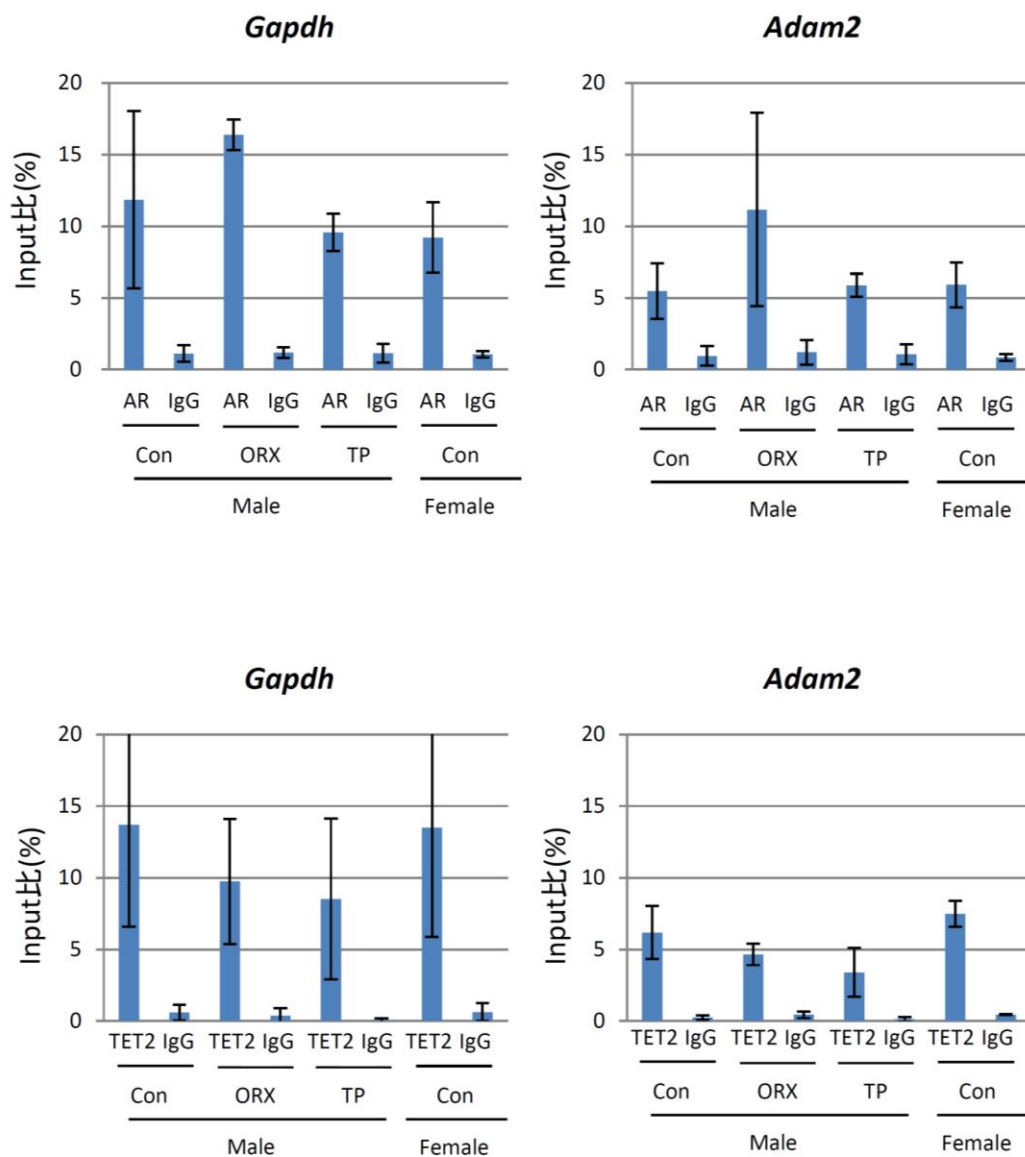


図1-6 Androgen receptor(AR)抗体及びTET2抗体を用いたChIP解析
*Gapdh*及び*Adam2*のInput比で棒グラフで示した。エラーバーはS.D. (n=3)

DNAメチル基転移酵素群(DNMTs)及びDNAの脱メチル化に關与する *Tet* 遺伝子群 (TETs)が、S-DMRの形成に關与しているのかを解析するため、これら遺伝子の発現を解析した(図1-7)。雌雄における遺伝子発現量を比較したところ、*Dnmt3a*及び*Tet3*には性差が認められなかったものの、DNAメチル基転移酵素である*Dnmt1*、*Dnmt3b*及びDNA脱メチル化に關与する*Tet2*はメスにおいて高い発現量を示した。さらに、qRT-PCRの結果、オスの*Tet2*の発現が精巢摘除により無処置のメス並みの量に上昇していることを明らかにした(図1-7)。興味深いことにTET2は精巢摘除により、タンパク量が低下していた(図1-8 A, B)。これらの結果はS-DMRを含むエピゲノムの性差形成に*Dnmt1*、*Dnmt3b*、*Tet2*のようなエピジェネティック制御因子が關与していることを示唆している。

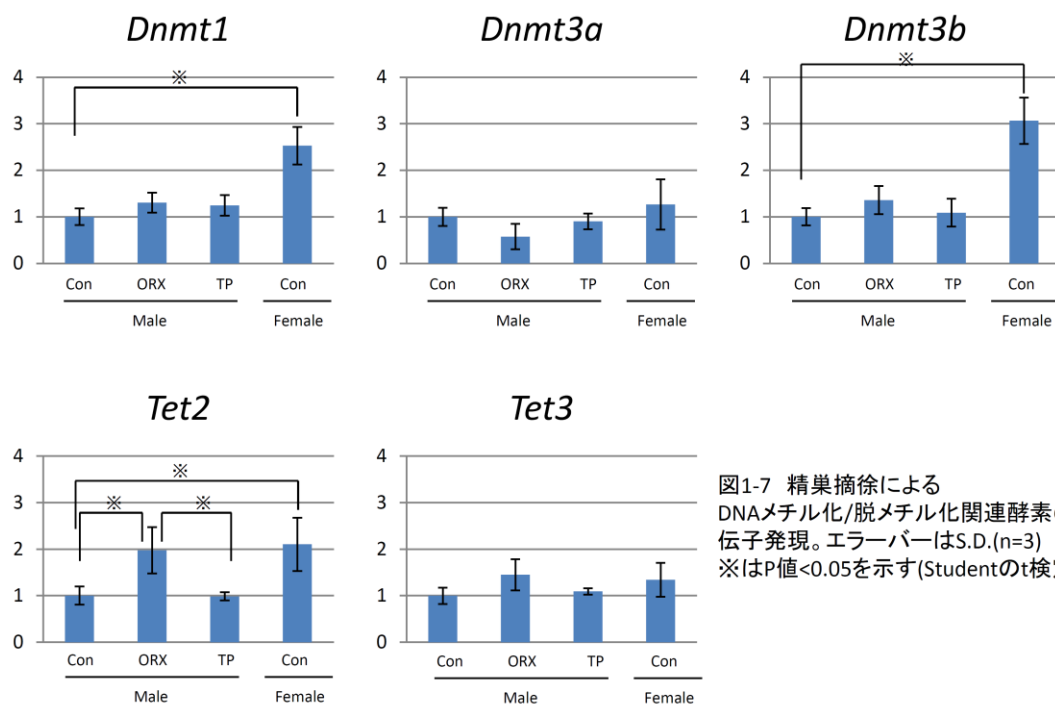


図1-7 精巢摘除によるDNAメチル化/脱メチル化關連酵素の遺伝子発現。エラーバーはS.D.(n=3) ※はP値<0.05を示す(Studentのt検定)。

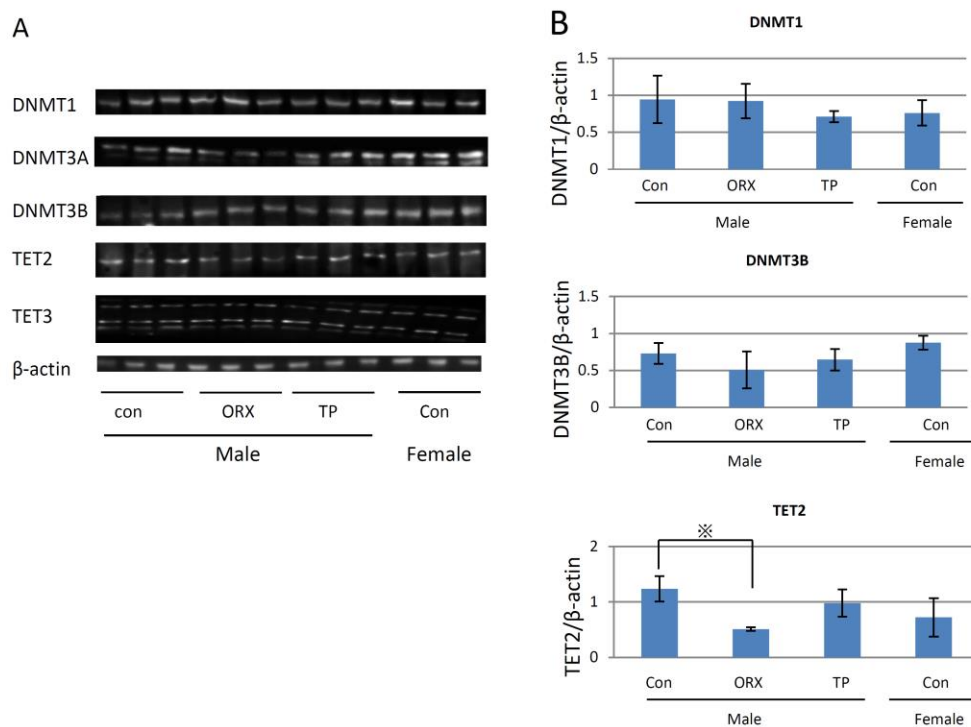


図1-8 ウェスタンブロットによる定量

A western blot によるDNMTs及びTETsのタンパク解析

B Image JによるWestern blot像の定量。 mRNAの発現量に差の認められた3遺伝子について解析。

(縦軸はSample/ β -actin)。エラーバーはS.D. (n=3)

※はP値<0.05を示す(Studentのt検定)。

考察

本研究では、マウス肝臓特異的にオスの方がメスよりも低メチル化状態である常染色体上の S-DMR を新たに 10 カ所同定した。同定した S-DMR はオスでは、全て肝臓特異的に低メチル化を示す T-DMR であった。一部の S-DMR はメスでも他組織に対し肝臓で低メチル化であり、オスでその低メチル化度合いが亢進しているものもあった。しかし、多くはメスでは組織間で差を認めないことから、雌雄の DNA メチル化プロファイルが異なることは明確である。

これまで、メスのマウスでは明確な性周期が存在し、エストロゲンによりメチル化状態が変化する遺伝子が報告されている (Singh and Prasad, 2008, Nugent et al., 2011)。一方、新生仔のメスマウスにテストステロンを投与することで、成熟後、*Hnf6* など一部の遺伝子の転写開始点近傍のメチル化の亢進と発現量の低下が起こる (Ramirez et al., 2013)。本研究で同定した S-DMR の DNA メチル化率は、生後 10 週のマウスに精巣摘除及びテストステロンの投与により変動した。このことは、性差の決定に重要な新生仔期のみならず、成熟マウスにおいても性ステロイドが DNA メチル化状態を変化させ得ることを示している。

新たに同定された S-DMR はエストロゲン非依存的、テストステロン依存的に脱メチル化されていた。このことは、テストステロンが本研究で同定した S-DMR の形成に関与していることを示している。テストステロンは GH の分泌パターンを制御しており、GH-STAT5 系は性依存的な遺伝子発現の制御に関与している。STAT5 の制御下にある代表的な遺伝子である *Cyp2d9* の S-DMR もまた、テストステロン依存的に DNA 脱メチル化していた。さらに、テストステロン依存的な S-DMR は、*Cyp2d9* や本研究で同定した *Snx29* のように、GH-STAT5 依存的と考えられる遺伝子の近傍だけでなく、*Adam2* の S-DMR のように、GH-STAT5 非依存的と考えられる遺伝子近傍にも存在した。このことは、テストステロン依存的な DNA 脱メチル化には、GH-STAT5 経路、GH-STAT5 非経路の 2 通りの機序があることを示唆している。本研究では GH-STAT5 非依存的な遺伝子である *Adam2* は Androgen receptor により制御されていることを疑った。しかし、ChIP 解析の結果から、Androgen receptor の制御下ではないようだ。それでは、これらの変化はどのようにもたらされているのだろうか。DNMTs 及び TETs の遺伝子発現解析から TET2 による影響が考えられた。TET2 のタンパク量は精巣摘除により低下していた。TET タンパクは TET1 が ES 細胞特異的に高発現であり、TET2, TET3 は様々な組織で発現しているが、*Tet3* の発現は肝臓では低い方である (Ito et al., 2011)。よって TET2 タンパク量の変化は肝臓における S-DMR の DNA メチル化を制御する一つの要因になりうるだろう。

げっ歯類では老齢動物は若齢動物に比べてテストステロン分泌量が低い (Smith et al., 2005)。また、肥満により血中テストステロン濃度は変化する (Vigueras-Villaseñor et al., 2011, Bakos et al., 2011, Fernandez et al., 2011)。Core Tg マウスでは3ヶ月齢には脂肪肝を発症する。肝臓において *Snx29* の DNA メチル化率が月齢依存的に上昇したのは、加齢または脂質代謝異常に伴うテストステロン量の変化が関連するのかもしれない。しかし、この *Snx29* の S-DMR を除き、S-DMR は Core Tg マウスにおいて月齢依存的な DNA メチル化状態の変化を認めなかった。すなわち、S-DMR のメチル化状態はテストステロンに高い感受性を示すにも関わらず安定した情報である。

DNA メチル化は発現が抑制されている遺伝子のプロモーター領域または発現している遺伝子の gene body に認められる (Chatterjee and Vinson, 2012)。これまでマウスの肝臓で発見されてきた S-DMR については、どれも発現との相関に焦点をあてて解析が進められてきた (Takasugi et al., 2013, Yokomori et al., 1995a, Yokomori et al., 1995b)。本研究で発見した S-DMR には、これまでの研究で見つかった領域と異なり、プロモーター領域が低メチル化状態であるオスの肝臓で発現が認められない遺伝子も含まれた。DNA メチル化はメチル化 DNA 結合タンパクの標的となる。さらに、種々のヒストン修飾酵素をリクルートし、結果としてクロマチンの凝縮をもたらす。本実験のデータからは有意ではないものの *Adam2* 及び *Snx29* 領域の S-DMR において DNA メチル化率と相関する形でクロマチン構造が凝縮するという傾向が示唆された。DNase が結合する領域は細胞種特異的な転写因子が結合するなど、クロマチンが緩むことによる制御は重要である。 (Thurman et al., 2012)。発現の有無や多寡に関わらずとも、DNA メチル化はクロマチンの構造には影響を与えている可能性はある。

さらに、DNA メチル化はトランスポゾンを含む反復配列に多く見られる。DNA メチル化はトランスポゾンの発現及び転移の制御も行っていると考えられている (Kakutani et al., 1996, Miura et al., 2001, Kato et al., 2003, Singer et al., 2001)。*ADAM2* はヒトにおいて8番染色体の ADAM 遺伝子クラスターの端に存在する。一方マウスでは、8番染色体の *Adam* 遺伝子クラスター上に *Adam2* は存在せず、14番染色体に独立して存在している。つまり *Adam2* は進化の過程でげっ歯類では転移した遺伝子である。興味あることに、マウスにおいて *Adam2* が転移したゲノム領域は、ヒトゲノムにおいてはレトロトランスポゾンが転位し、高メチル化されることにより、下流の *Gulo* の機能喪失、肝臓でのビタミンC合成能の喪失につながっている。*Adam2* S-DMR のメチル化状況と発現との関連は認められないが、その一方で、多能性生殖 (mGS) 細胞や雌由来の EG 細胞で精子よりも低メチル化状態である (図 1-1C) ことを考慮すると、生殖細胞系列でこの領域が脱メチル化している可能性がある。ゲノム進化とエピゲノム情報には相関がある (Hayakawa et al., 2012)。*Adam2* 領域のクロマチン構造がオスで緩んでいる傾向があることも鑑みると、脱メチル化と転位・転

座、そしてその領域のゲノム機能の獲得・喪失等、ゲノム進化に関連する情報を与えている可能性がある(図1-9)。

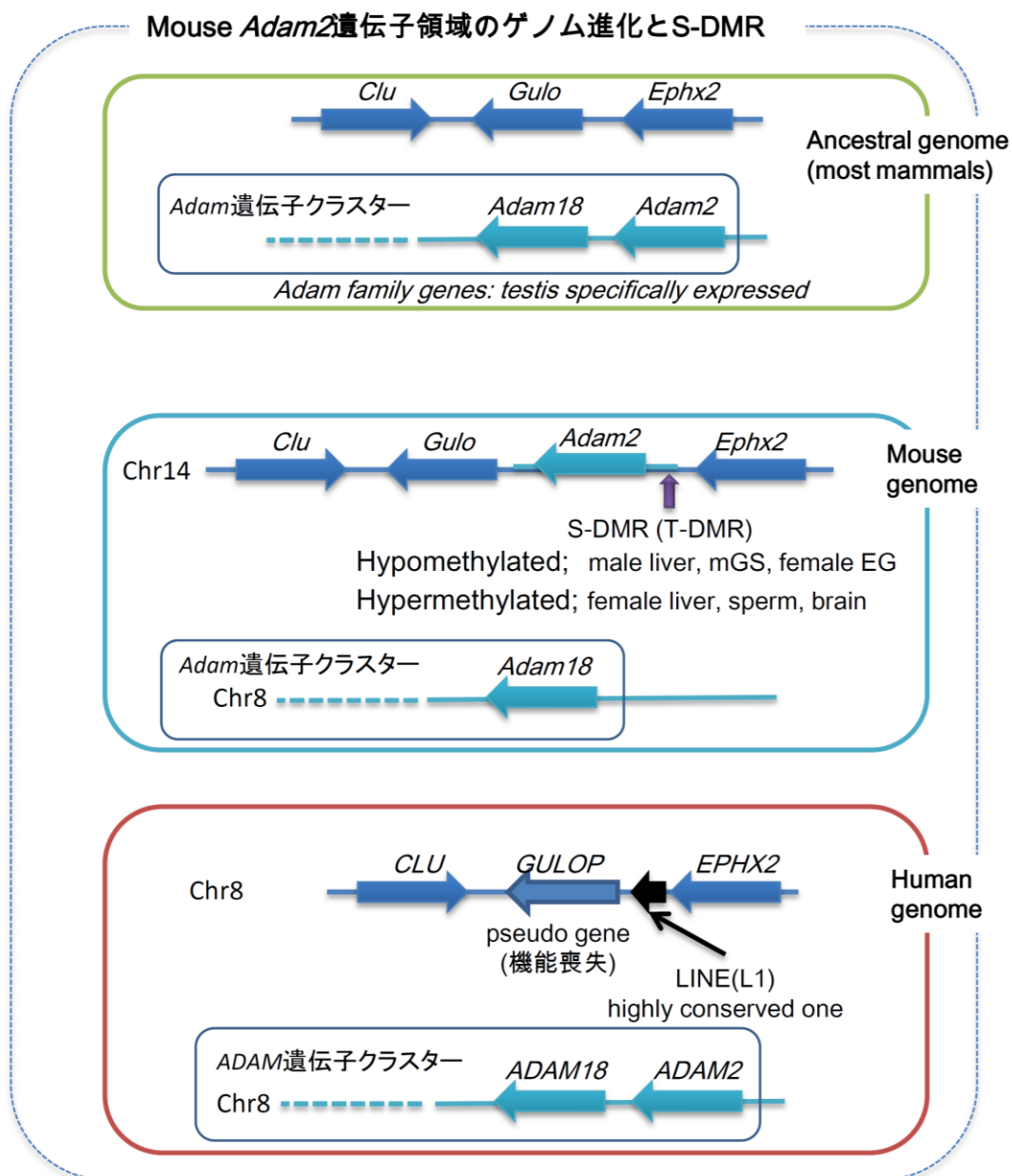


図1-9 マウス及びヒトのAdam2遺伝子周辺領域

phylo-epigenomic analysisにより生殖細胞系列のepigenomeとgenome進化、組織特異的S-DMR (T-DMR)との関連性を解き明かす系口

本研究から肝臓特異的な S-DMR が存在することが明らかとなった。さらに、複数の S-DMR における DNA メチル化状態は、テストステロン依存的に変化することが明らかになった。肝臓において、テストステロン依存的な DNA メチル化状態の変化が成熟マウスでも存在するという新たな知見は、性ステロイドの分泌異常に伴う疾病の機序解明を理解する上で重要な役割を果たすことが期待される。

第2章

栄養膜細胞における *ogt* 遺伝子発現性差

序論

エピジェネティック制御因子の中には OGT, KDM5 (JARID1C), MeCP2 など X 染色体上にコードされているものもある。ほ乳類ではメスの細胞核は 2 本の X 染色体を含み、オスの細胞核は X 染色体と Y 染色体を各 1 本ずつ含んでいるため、染色体構成上には性差があることになる。染色体構成上の性差は、発生途上にメスの 2 本の X 染色体のうち 1 つの染色体全域にわたり不活性化される、いわゆる X 染色体不活性化が起こることで、X 染色体に存在する遺伝子発現をシャットダウンし、解消されると考えられている (Lyon, 1989)。

X 染色体不活性化は胎盤を除く体細胞組織では、父母由来の X 染色体のどちらかがランダムに起こるのに対して、胎盤では父親由来の X 染色体が選択的に不活性化されることが知られている (Hemberger, 2002)。X 染色体の不活性化は、*Xist* 遺伝子の転写産物である非コード RNA が、それを発現する X 染色体のクロマチンを覆い様々なタンパク質をリクルートし複合体を形成することで、染色体の凝集による形態的な変化を含む染色体全域の不活性化が達成される。

この X 染色体の不活性化は遺伝子発現の量的な補正を行う機構の 1 つである。しかし、全ての X 染色体上の遺伝子が不活性化されるわけではない。例えば、*Kdm5* や *Utx* などは X 染色体の不活性化を免れている (Xu et al., 2008, Greenfield et al., 1998)。X 染色体不活性化を免れうる遺伝子群は、細胞や組織の雌雄差として反映されても発生と発達過程で生存に不利に陥らない場合に限られ、性機能獲得の進化淘汰圧に耐えてきたはずである。

エピジェネティクス制御系を司る遺伝子群は、真核生物のゲノムを長期的に支配することで多細胞生物を生み出した進化上の重要因子である。エピジェネティック因子の不適切な発現の増減は大幅なゲノム機能の変調を来し、例えば、インプリント遺伝子原因の難病である Silver-Russell Syndrome (Price et al., 1999) や Beckwith-Wiedemann Syndrome、Angelman Syndrome (Denomme and Mann, 2013) のように様々な多臓器の機能不全や形態形成異常を伴う重篤な疾病の原因となる。したがって、エピジェネティック因子の遺伝子が X 染色体に存在する場合には、メス細胞核内では X 染色体不活性化が起きることが重要となる。もし、不活性化を免れたとすれば、メス細胞では、オス細胞の 2 倍の遺伝子発現から表現型に影響しないで打ち消され、あるいは補正することが必要になることが考えられる。

興味深いことに、OGT の発現はヒト及びマウス胎盤ではメスの方が多いことが報告されている (Howerton et al., 2013)。OGT は細胞質/核タンパクのセリン/スレオニン残基の O-GlcNAc 化を触媒する酵素である。細胞に取り込まれたグルコースの 2-5 % はヘキソサミン合成経路に入り、N-アセチルグルコサミンの供与体である UDP-GlcNAc となる。UDP-GlcNAc が供与体となり、様々なタンパクが OGT により O-GlcNAc 修飾されることになる。脱 O-GlcNAc 化は OGA によりなされる (3 章でさらに記す)。O-GlcNAc 修飾は、細胞増殖

(Slawson et al., 2005, Sakabe and Hart, 2010)、転写(Butkinaree et al., 2010)、ストレス応答(Zachara et al., 2004, Guinez et al., 2008)、グルコース応答(Yang et al., 2008, Whelan et al., 2010)等、多岐に渡るタンパク質に見られる。近年、コアヒストンの O-GlcNAc 化が発見され、新たなエピジェネティクス制御系として注目されている(Hanover et al., 2012)。これまでに、ヒストン H2A (Thr101), H2B (Ser36 と Ser112), H3 (Ser10 と Thr32), H4 (Ser47) (Sakabe et al., 2010, Fujiki et al., 2011, Fong et al., 2012) の O-GlcNAc 化が報告され、細胞周期やユビキチン化との関連が示されている。

Ogt は個体発生に必要であり、*Ogt* の遺伝子欠損は胎生致死となる(Shafi et al., 2000)。*Ogt* の発現量は、胎仔の視床下部にも影響を与え、統合失調症や自閉症の発症率の性差を生み出している可能性が示唆されている。

X 染色体が不活性化を免れると量的調整が破綻する。*Ogt* の発現に性差が見られるのは胎盤に限られ、調べられた他の臓器では差がない。*Ogt* の発現量の違いは *Ogt* が X 染色体の不活性化を免れているためと推測されている(Howerton et al., 2013)。そうすると胎盤以外ではなぜ発現量が倍にならないのかという新たな疑問が生じる。

エクソンの使い分けによる真核生物のゲノム制御ではスプライシングは重要で、スプライシング異常が様々な疾病の原因となっている(Scheper et al., 2007)。*Fgfr2* は上皮系細胞と間葉系の細胞でエクソンの使い分けが起きる。転写因子をコードする *Foxp1* 遺伝子では、ES 細胞と分化した幹細胞ではエクソン(ヒトでは Exon18a/18b、マウスでは 16a/16b)の使い分けが起き、その結果、FOXP1 の標的遺伝子群が ES 細胞と分化後の細胞で異なるという現象が報告されている(Gabut et al., 2011, Cell, 147, 132)。エクソンの使い分けが正しくないと、ES 細胞では分化多能性を保てなくなり、体細胞では心筋への分化が阻害される(Zhang et al., 2010)。酸素への親和性が異なった胎児から成体におけるグロビン遺伝子の使い分けもエピジェネティック制御下にある(Stanworth et al., 1995)。第一エクソンの使い分けは DNA メチル化で制御されていることが、*Sphk1* 遺伝子で報告されている(Imamura et al., 2001)。さらにヒストン H3K36 のメチル化がエクソンの使い分けのエピジェネティックマークである可能性が示唆されている(Pradeepa et al., 2012)。エピジェネティクス系の変化によるエクソンの使い分けが生じ、転写制御と遺伝子産物の多様性が生じているのである。

OGT は他の糖鎖付加酵素と異なり、X 染色体上の *Ogt* 遺伝子にのみコードされており、Y 染色体上に相同遺伝子はないことは重要な点である。*Ogt* 遺伝子は、進化上比較的新しく、遺伝子ファミリーは形成されていないのである。しかし、O-GlcNAc 修飾を受けるタンパクの種類は約 1,000 を超え、さらに、コア・ヒストンが修飾を受ける。O-GlcNAc 修飾によるタンパクの多様性とゲノム広範な標的領域を考えると、OGT 遺伝子制御の理解は今後の生物学の理解にとっても不可欠となる。UCSC のデータベースでは *Ogt* 遺伝子は 22 個のエクソンからなる。OGT が発生や発育に不可欠であっても発現量が多い細胞では低機能のアイ

ソフォームが発現していると仮定すれば、遺伝子の量的調整が無い胎盤の発生や機能に支障が出ないことは納得できる。

OGTには3つのアイソフォームがあり、それぞれncOGT, mtOGT, sOGTと呼ばれる(Hanover et al., 2003, Lazarus et al., 2006)。ncOGTが核内にも存在していることから、主にncOGTがヒストンを含む核タンパク質のO-GlcNAc付加を制御していると考えられる。sOGTはドミナントネガティブに作用する可能性が示されており(Kreppel and Hart, 1999)、これらのアイソフォームの注意深い解析が必要である。

栄養膜幹細胞(TS:Trophoblast stem細胞)は田中らによって1998年に樹立が報告された(Tanaka et al., 1998)。TS細胞は培養下で分化能を保った状態で自己複製を繰り返し、培養条件を変更することで、栄養膜巨細胞(Trophoblast giant cell)を含む様々な細胞に分化する(Tanaka et al., 1998)。TS細胞は様々な栄養膜細胞系列に分化する能力を有しているが、他の体細胞へは分化しない。一方、ES細胞は栄養膜細胞系列には分化しないが他の体細胞へ分化する能力がある。受精卵が発生し最も早期に分化する内部細胞塊と栄養膜細胞系列の分子メカニズムの解析にES細胞とTS細胞が用いられてきた(Hattori et al., 2004, Hattori et al., 2007, Nakanishi et al., 2012)。これらの幹細胞を用いることで、例えば初期発生の要因子である*Oct4*, *Nanog*, *Ddah2*などの遺伝子のエピジェネティック制御が明らかにされてきた。これらを考え合わせるとTS細胞は雌雄差を示す*Ogt*遺伝子発現のメカニズム解析に威力を発揮することが期待される。しかし*Ogt*遺伝子の発現制御に関する報告はない。

*Ogt*は細胞・組織依存的に発現量が異なる(Shafi et al., 2000)。しかし、細胞・組織特異的な発現制御機構は明らかになっていない。また、*Ogt*遺伝子がエピジェネティック制御下にあるのかどうかさえ解明されていない。

第2章ではTS細胞を用いて、組織特異的な発現機構、分化に伴う制御スイッチ、エクソン使い分けによるアイソフォームの発現と*Ogt*遺伝子の転写因子とエピジェネティック修飾を中心に解析し、胎盤で*Ogt*遺伝子発現に性差を示す機構解明を試みた。

材料と方法

マウス及び組織採取

マウスは C57BL6N 近交系マウスを日本チャールズリバーより購入し、12 時間の明期と 12 時間の暗期の照明サイクルで、食事制限を設けずに飼育した。成体は 13-14 週を、胎児組織は妊娠 14.5 日の個体を用いた。各組織は、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、取り出した後、PBS(-)で洗浄後、使用時まで-80℃で保存した。DNA・RNA・タンパク抽出前に、乳鉢ですりつぶして実験に使用した。本論文で行われた全ての動物実験は東京大学動物実験マニュアルに定められた指針を遵守して行なった。

Feeder 細胞調整

妊娠 15.5 日目のマウス胎児の頭部および臓器を取り除き、PBS(-)による洗浄、細切後、遠心して上清を取り除いた。0.05 %トリプシン(GIBCO)を加えて 30 分間回転した。さらにトリプシンを加えて回転振盪した後フィルターでろ過し、10 %FBS(JRH)、100 μM 2-mercaptoethanol、50 U/ml penicillin、50 μg/ml streptomycin(GIBCO)を添加した DMEM(pH7.2, GIBCO)に懸濁し 15 cm dish で培養した。このようにして単離された MEF 細胞(primary mouse embryonic fibroblast)に対して 1 mg/ml マイトマイシン C(Sigma)を培地に加え 37℃で 2 時間処理したものを Feeder 細胞とした。

ES 細胞調整

本研究では 129S4/SvJae 系統マウスより樹立された J1 ES 株を ATCC より購入(Cat. SCRC-1010)して 37 °C、5 %CO₂条件下で培養した。培地は 1~2 日置きに交換した。Feeder 細胞と分離するため、PBS(-)で 2 回洗浄後、0.05 %トリプシン(Invitrogen, Cat. 25200)/1 mM EDTA/ PBS(-)で 37℃3 分処理した。次に、ES メディウムを加えて、新しい dish に撒きなおして 37 °C20~30 分培養した。その上清をさらに新しい dish にまいて 37℃20~30 分培養した。その上清をとり ES 細胞はゼラチンコートした培養 dish に播種した。

ES 細胞の分化は LIF 非添加の ES メディウムに置換して 6 日間培養することで行なった。

ES メディウムの組成は以下のとおり

DMEM (pH7.2, GIBCO)

15 %FBS (BIOWEST)

100 μM 2-mercaptoethanol

100 μM MEM Non-Essential Amino Acid(GIBCO)

100 μM 2-mercaptoethanol

50 U/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin(GIBCO)

1 mM Sodium Pyruvate (GIBCO)

2 mM L-glutamin e(GIBCO)

1,000 U leukemia inhibitory factor(LIF) (Millipore, cat. ESG1107)

TS 細胞培養

TS 細胞の培養は Isolation and manipulation of mouse trophoblast stem cells(Himeno et al., 2008)を参考にした

TS メディウムは以下の通り、

RPMI-1640(SIGMA, cat.no. R8758)

20 % FBS(CCB, cat.no. 171012)

2 mM L-glutamine(Wako, cat.no. 073-05391)

1 mM sodium pyruvate(Wako, cat.no.190-14881)

100 mM 2-mercaptoethanol(Wako, cat.no.198-15781)

以上の割合で作製した medium に、直前に

25 ng/mL FGF-4(Wako, cat.no.062-04341)

10 ng/mL Activin A(R&D systems, cat. 338-AC005)

1 µg/mL Heparin(Sigma, cat.no.H3149-10KU)

を加えたものを利用した

TS 細胞を培養する前日、まず 1.2×10^6 の数の MEF を 10cm dish にまいた。TS 細胞は MEF の上に $3 \times 10^5/10\text{cm dish}$ の密度でまいた。まいた細胞は 2 日後にメディウムを交換し、4 日後に継代をした。Feeder 細胞と分離するため、まず 0.05 %トリプシンで 37°C 3 分処理した後メディウムを加えて新しい dish に撒きなおして 37°C 15 分培養した。その上清をさらに新しい dish にまいて培養した。細胞は回収する前に 2 度以上 MEF 非存在下で継代し、回収した。分化 TS 細胞は 6 日間 FGF4, ActivinA, Heparin を除いて培養した。その際、 1×10^5 細胞を 10cm dish にまいた。

RT-PCR、RT-qPCR

RT-PCRは第1章のDNMT及びTETの発現解析と同じ方法で $1 \times 10^{5-6}$ 細胞または組織を用いてcDNAを合成した。PCRはcDNA 1 μ Lを用いてGoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, CatM8296)によるPCR反応を行い、各遺伝子のcDNAを増幅した。反応は94°Cで5分間変性した後、[94°C-30秒, 60°C-30秒, 72°C-30秒]を1サイクルとし増幅反応を繰り返しさらに72°Cで5分間の伸長反応を行った。

RT-qPCRはApplied Biosystems 7500リアルタイムPCRシステムにより解析した。プロトコルは第1章と同じように行なった。

使用したプライマー及びサイクル数は以下のとおり

Hoxa9_RT_F	CCACGCTTGACACTCACACT	(30 サイクル)
Hoxa9_RT_R	GTTCCAGCGTCTGGTGT	
Sox9_RT_F	GACTCCCCACATTCTCCTC	(30 サイクル)
Sox9_RT_R	CCCTCTCGCTTCAGATCAAC	
H1f_RT_F	GGAAAGAACTGAAGCCACAGC	(30 サイクル)
H1f_RT_R	CGATCTGGTTCTCCTTCAGC	
Tef_RT_F	GAGTCTGCCAGCTCTCCAC	(30 サイクル)
Tef_RT_R	GGTCTCCCTCTCCTTTTCCA	
Atf2_RT_F	GGAAAGTGTGGGTTTCAGTCC	(28 サイクル)
Atf2_RT_R	ATGGCAGTTACAGGGCAATC	
Ogt_RT_12F	TCAGTAGTGGCGGCAGTAGA	(23 サイクル, 分化 TS は 25 サイクル)
Ogt_RT_12R	TTCTCGATGTGCCAACTCAG	
Ogt_RT_2122F	CTGCAGATGTGGGAGCATT	(23 サイクル, 分化 TS は 25 サイクル)
Ogt_RT_2122R	ATCATCCGTCTGCAACACAG	
Actb_F	TACAATGAGCTGCGTGTGG	(18 サイクル)
Actb_R	GCTGGGGTGTGAAGGT	

Bisulfite sequencing

第1章と同じ方法で行なった。使用したプライマーは以下の通り、

Ogt_bis1_F	AAGGTATTTGTAGTTTTTAATGATTTTG
Ogt_bis1_R	AAACTCTTAATAAACATCTACCTCTCA
Ogt_bis2_F	AGGTTTGATTGGTAAATTTTGG
Ogt_bis2_R	CCTTTACCTTCTCCTAAACCACA
Ogt_bis3_F	GTGGTTTAGGAGGTAAAGGAGTTTG
Ogt_bis3_R	AACTTCTCAACCAACAAATTAACA

免疫染色

免疫染色のための細胞は4 well dishにまいた。dishをPBS(-)で2回洗浄後、4%PFA/PBS(-)を用いて室温で20分固定した。dishをPBS(-)で5分間2回洗浄後、0.2% TritonX100 / PBS(-)を入れて室温で30分静置した。5%BSA/PBS(-)+0.1% Tween20 を入れ4℃ 24時間ブロッキングを行なった。1次抗体(1 µg/uL) / 5%BSA + PBS(-) + 0.1% Tween20 を入れて16時間4℃で反応させた。PBS(-) + 0.05% Tween20 を用いて室温で10分ずつ3回洗浄し、2次抗体(1:1,000) / 5%BSA + PBS(-) + 0.1% Tween20 を入れ、室温で60分反応させた。PBS(-) + 0.05% Tween20 を用いて室温で10分ずつ3回洗浄し、1 µg/ml DAPI (DOJINDO) / PBS(-) を加え、20分室温で染色した。PBS(-)で5分2回洗浄した。観察は、蛍光顕微鏡はBZ-8000(Keyence)を用いた。また共焦点顕微鏡は CellVoyager CV1000(Yokogawa)を用いた。1次抗体と2次抗体の組み合わせは以下の通り、

1次抗体	メーカー	製品番号	2次抗体	メーカー	製品番号
抗 OGT 抗体	Abcam	ab50273	Alex Flour 488	goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen A11008

転写因子の結合解析(In silico での転写因子結合配列解析)

・TRAP(Transcription factor affinity prediction)による解析(Thomas-Chollier et al., 2011)

Ogt 遺伝子の転写開始点上流-2,000bp~+1bp までの配列を解析した。

MatrixはTransfac 2010、Backgroundはmouse promoter、Multiple test collectionはBenjamin-Hochbergを用いた。

・Transfac の Match public version 1.0

(<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/match/bin/match.cgi>)による解析(Kel et al., 2003)

Ogt 遺伝子の転写開始点上流-2,000bp~+1bp までの配列を解析した。

Group of matricesはvertebrateを使用した。その他は初期設定に準じた。

レポーターアッセイ

(de Wet et al., 1985, Matthews et al., 1977) (Sherf et al., 1996)

肝臓のゲノムDNA 10 ng を以下のプライマーで PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TAKARA Cat. R010A) により増幅させた。

OGT_longP_repF GCCGCCGGTACCTATTGGAACCTCTTGAGGGC

OGT_shortP_repF GCCGCCGGTACCGGTCACAATTCAGGATCAGG

OGT_repR GCCGCCCCATGGCTCGACCGAAACAACACAAG

98 °C 10 秒, 60 °C 5 秒, 72 °C 60 秒を 1 サイクルとして、30 サイクル反応させた。2 % アガロースゲルで電気泳動し、バンドを切り出した。ゲル中の DNA は Gel&PCR purification kit (Promega) を使用し精製した。精製した DNA 及び 3 µg の PGL3-Basic vector (Promega) は Kpn1, Nco1 (Takara) で消化した。アガロースゲルで電気泳動し、先と同様にゲルからバンドを切り出し、DNA を精製した。Vector と Insert は 1.25 U の T4 DNA ligase (Promega) を用いて 4 °C で反応させた。作製した vector は XL-1 blue competent cell へ形質転換させ、増幅させた。配列は BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit でシーケンス反応をさせた後、Applied Biosystems 3130x ジェネティックアナライザによって配列を決定した。配列の正しかった vector は、SCS110 competent cell へ形質転換させ増幅させた。6 well にまいた、分化培養 5 日目の TS 細胞に 0.5 µg の作製した vector または空の vector、コントロールとして 0.00625 µg の PGL-4 control vector を 2 µL (1:200) の Lipofectamin 2000 (Invitrogen) で同時導入した。24 時間後の細胞は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) により回収してサンプルを調整し、Berthold Technologies 社のルミノメーター (Lumat LB9507) で解析した。

OGA 抗体 (OGA-E2) の作製

抗原は OGA の N 末付近にあたる

RFLCGVVEGFYGRPWVMEQRKELFRRLQKWELNTYLYAPKDDYKHRMFWRMYSVEEAEQLMTLISAAREYEIEFIYAIS
PGLDITFSNPKEVSTLKRKLDQVSQFGCRSFALLFDDIDHNMCADKEVFSSFAHAQVSITNEIYQYLGPETFLFCPT
YCGTFCYPNVSQSPYLRTVGEKLLPGIEVLWTGPKVVSKEIPVESIEEVSKI IKRAPVIWDNIHANDYDQKRLFLGPYKG
RSTELIPRLKGVLTNPCEFEANYVAIHTLATWYKSNMNGVRKDVVM である。ウサギに対し、2 週間ごとに
合計 4 回免疫を行なった。アジュバンドについて初回免疫は Freund's complete adjuvant
を 2 回目以降は Freund's incomplete adjuvant を用いた。第 4 回免疫の 2 週間後に全採血
を行なった。ウサギ血清は MabTrap Kit (GE healthcare, Cat. 17-1128-01) を用いて精製し
た。抗原の投与及び血清の採取の過程は GenoStaff に依頼した。MabTrap Kit の過程で得ら
れた各段階でのタンパク濃度は Nanodrop1000 (LMS) を用いて A280 を測定した。抗体が OGA
を認識することは Western blot により確認した。手順は 1 章と同様に行なった。ES 細胞に
Lipofectamine2000 で 3xFlag-fused Mgea5 vector (Hayakawa et al., 2013) を導入して 48
時間後の細胞の細胞総タンパク 50 µg を 6.7cm の well に泳動した。転写されたメンブレン

は16等分し、そのうちの8レーンをそれぞれ、1 血清(1:500)、2 Flow through (1:500)、3 Wash 2 (1:500)、4 Wash 3 (1:500)、5 Elution2 (1:500)、6 Elution3 (1:500)、7 抗Flag抗体(1:1,000, Sigma, Cat. F1804)、8 市販のOGA抗体(1:1,000, Proteintech, 14711-1-AP)を1次抗体に用いた。括弧内は希釈した割合を示す。二次抗体は7のメンブレンのみ HRP-conjugated goat polyclonal anti-mouse IgG (1:5,000)を用いて、その他は HRP-conjugated chicken polyclonal anti-rabbit IgG (1:5,000)を用いて検出した。括弧内は全量に対する希釈割合を示す。そして Elution2 のフラクションを新規 OGA 抗体(OGA-E2 抗体)とした。

1 μg 分の TS 細胞の DNA 相当のクロマチン溶液と 1 μL の Protease inhibitor cocktail、10 μL の ChIP buffer 1 と 5 μg の作製した OGA-E2 抗体または Mouse normal IgG を加え、超純水で 100 μL にメスアップし、Mix を作製した。25 μL の Protein G Magnetic beads (Active Motif) をマグネットスタンドに乗せ、溶液を除いた後、上記 Mix を加えて 4 $^{\circ}\text{C}$ で 16 時間反応させた。マグネットスタンドに乗せ、800 μL の ChIP buffer1 で 2 回洗浄、800 μL の TE で 2 回洗浄、100 μL の TE で 1 回洗浄後、10 μL の ImmunoPure Lane Marker Non-Reducing Sample Buffer と 10 μL の超純水を加えて 100 $^{\circ}\text{C}$ で 4 分 boil した。その後、1 章と同様の手順で Western blot を行い、作製した OGA-E2 抗体が OGA を認識し、OGA-E2 抗体が OGA を沈降させていることを確認した。

ChIP 解析

1 章と同様の手順で行なった。クロマチン調整には 1×10^7 の細胞、分化 TS 細胞のみ 10 cm dish 4/3-2 枚分を用いた。抗体は 5 μg の OGA-E2、5 μg の Rabbit normal IgG (Abcam, Cat. ab27478)、3 μg の抗 H3 pan-acetylation (Millipore, Cat. 06-599)、3 μg の Mouse Normal IgG を用いた。

ChIP した DNA は 50 μL 精製後、1 μL を用いて GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, CatM8296) による PCR 反応を行い、各遺伝子の cDNA を増幅した。反応は 94 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間変性した後、[94 $^{\circ}\text{C}$ -30 秒, 60 $^{\circ}\text{C}$ -30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ -30 秒] を 1 サイクルとし 31 サイクル増幅反応を繰り返しさらに 72 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間の伸長反応を行った。用いたプライマーは以下の通り。

Ogt_chip_pro_F GTCATGTTTGTCGCAATGGA

Ogt_chip_pro_R GGAGGTAGCGCGTAACAAGA

Ogt_chip_dis_F TCCTGGACCAATTCCTTGAA

Ogt_chip_dis_R GGGGTTCCCTCATCTGAAAG

結果

胎盤と TS 細胞における *Ogt* 遺伝子発現

アミノ酸配列および UCSC のデータベースより、*Ogt* 遺伝子産物には第一エクソンの使い分けによる、サイズが異なる 3 種類が存在すると考えられる。エクソン 1~22 からなる核局在型(*ncOgt*)、エクソン 3~22 からなるミトコンドリア存在型(*mtOgt*)、および、エクソン 5~22 からなる短型(*sOgt*)である(図 2-1A)。まず全タイプの転写産物に共通するプライマー(e22 プライマー)を設計し、マウスの胎盤(妊娠 14.5 日)と様々な組織、および TS 細胞と ES 細胞における *Ogt* の遺伝子発現を RT-PCR によって調べた。その結果、*Ogt* の発現は調べたどの臓器でも見られたが、胎盤、卵巣および脳(胎仔・成熟個体)は発現が比較的高い臓器であることが明らかになった(図 2-1B)。また TS 細胞でも発現は高く、分化に伴い低下し ES 細胞と同等になった(図 2-1B)。

胎盤の *Ogt* の発現がオスに対し、メスで高いことが報告されている。胎盤での発現量を e22 プライマーを用いて RT-PCR で比較すると、メスの胎盤で高いことが示された(図 2-1C)。ところが TS 細胞は、未分化状態では雌雄間に差が認められなかった。

ES 細胞は本実験で用いた培養条件下での分化誘導では *Ogt* の発現に分化前後で差が検出できなかったが、分化細胞を主体とする脳などの臓器によっては ES 細胞よりも高かった(図 2-1B)。胎盤も幹細胞が主な構成細胞ではないことを考慮すると、分化 TS 細胞における *Ogt* の発現を調べる必要がある。TS 細胞を 6 日間分化させて RT-PCR で解析するとメス胚由来 TS 細胞における *Ogt* の発現がオス由来 TS 細胞よりも高いことが明らかになった(図 2-1C)

胎盤でメスでの発現が高いことと同様に、TS 細胞も分化後には雌雄差を生じ、メス TS 細胞由来の細胞での発現が高いことが判明した。

胎盤と TS 細胞における *Ogt* の発現が *ncOgt* であることを調べるためにエクソン 1-エクソン 2 を検出する(e/1/2 プライマー)を設計した。胎盤では明らかにメス由来胎盤で発現が高く、RT-PCR でも qPCR でもメスでの発現が有意に高いことが示された(図 2-1D、E)。また、TS 細胞でも同様で、分化後には明らかにメス由来 TS 細胞で発現が高かった。qPCR でも同様に分化後の TS 細胞ではメスの方がオスよりも発現が高いことが確認された(図 2-1F)。分化誘導後の TS 細胞で見られた雌雄差は DBF1 由来の TS 細胞株でも認められた(図 2-1D)。また、*ncOgt* の発現の雌雄差はタンパクレベルでも認められた(図 2-1G)。一方で、TS 細胞において *sOgt* および *mtOgt* は *ncOgt* と共に検出されなかった(図 2-1H)。従って、TS 細胞の分化に伴う発現に雌雄差が存在していることが明らかになった。

これらの結果より、胎盤における *Ogt* 発現量の雌雄差を産む機序を解明するために TS 細胞の分化誘導系を利用できることが明らかになった。また、TS 細胞では、分化に伴い *Ogt* 遺伝子の発現が低下することを考えると、雌雄差を生じることとは別の多段階メカニズムを考える必要がある。また、ここでは、*sOgt* と *mtOgt* の発現は極僅かである。従っ

て現時点では mtOGT の発現はスプライシングバリエーションの関係では説明できない。ncOGT の発現量の性差がタンパクレベルでも認められることにともなう量的補正については第3章で記す。

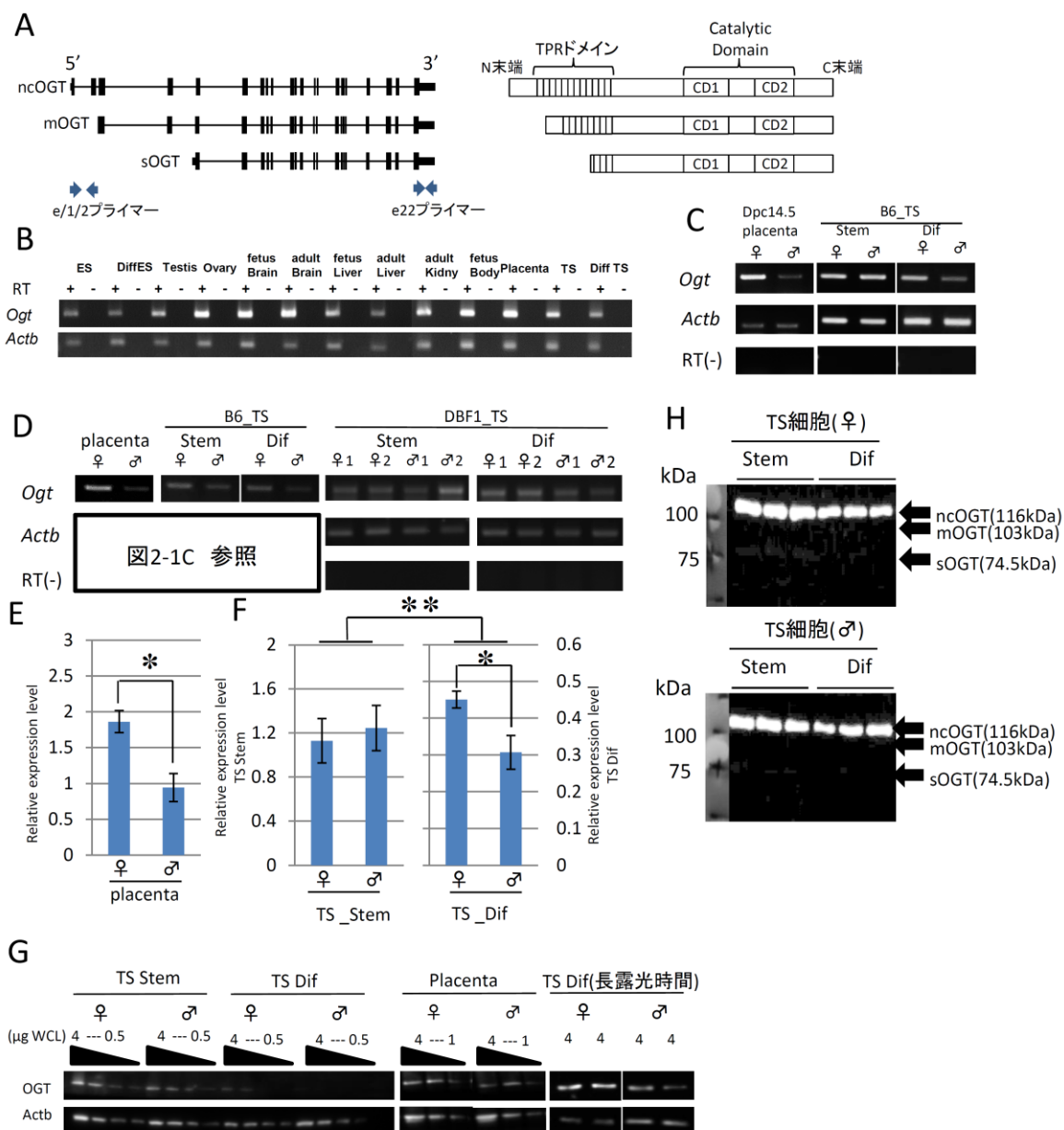


図2-1 *Ogt*遺伝子発現量は組織特異的であり、胎盤及びTS細胞において性特異的である。
 A. *Ogt*遺伝子のアイソタイプ及び設計したprimer領域。左に*Ogt*のエクソン・イントロン構造、右にはOGTタンパクの構造を示した。
 B. オスの各組織における*Ogt*遺伝子発現解析(RT-PCR: e/21/22プライマー)
 C. 雌雄の胎盤及びB6由来TS細胞における*Ogt*遺伝子発現解析(RT-PCR: e/21/22プライマー)
 D. 雌雄の胎盤・胎仔肝臓・胎仔脳・B6及びDBF1由来の雌雄のTS細胞の*Ogt*遺伝子発現解析(RT-PCR: e/1/2プライマー)
 E. 雌雄胎盤におけるnc*Ogt*遺伝子発現(qRT-PCR: e/1/2プライマー)(n=2)
 F. 雌雄B6由来TS細胞におけるnc*Ogt*遺伝子発現(qRT-PCR: e/1/2プライマー) (n=3)
 *はp<0.05, **はp<0.001 (Studentのt検定)
 G ウェスタンブロットによるOGTの発現量解析。未分化TS細胞、分化TS細胞及び胎盤の細胞総タンパク(WCL)を用いた。
 H 雌雄TS細胞のウェスタンブロットによるOGTの発現解析。ncOGT(117kDa),mOGT(103kDa),sOGT(74.5kDa)を解析した。

TS細胞を、OGT抗体を用いて免疫染色したところ、シグナルは未分化TS細胞が強く、分化TS細胞の方が弱かった。また、分化TS細胞においてはメスの方がオスよりもシグナルが強く、RT-PCR及びwestern blotと同様の傾向を示した(図2-2A)。オスのTS細胞を用いて免疫染色を行なったところ、未分化状態では核に強いシグナルが認められたのに対して、分化TS細胞は核のシグナルは弱く、細胞質の方がシグナルが強いことが明らかとなった(図2-2B)。核におけるシグナルの強さは未分化TS細胞の方が強いが、分化後の細胞にもシグナルがあった(図2-2C, D)。核の面積を考慮すると、分化TS細胞における核1個あたりのOGT蓄積量は未分化TSと比して同等もしくは多い(直線上の輝度の合計は、未分化:分化=1.2:1)と言える。

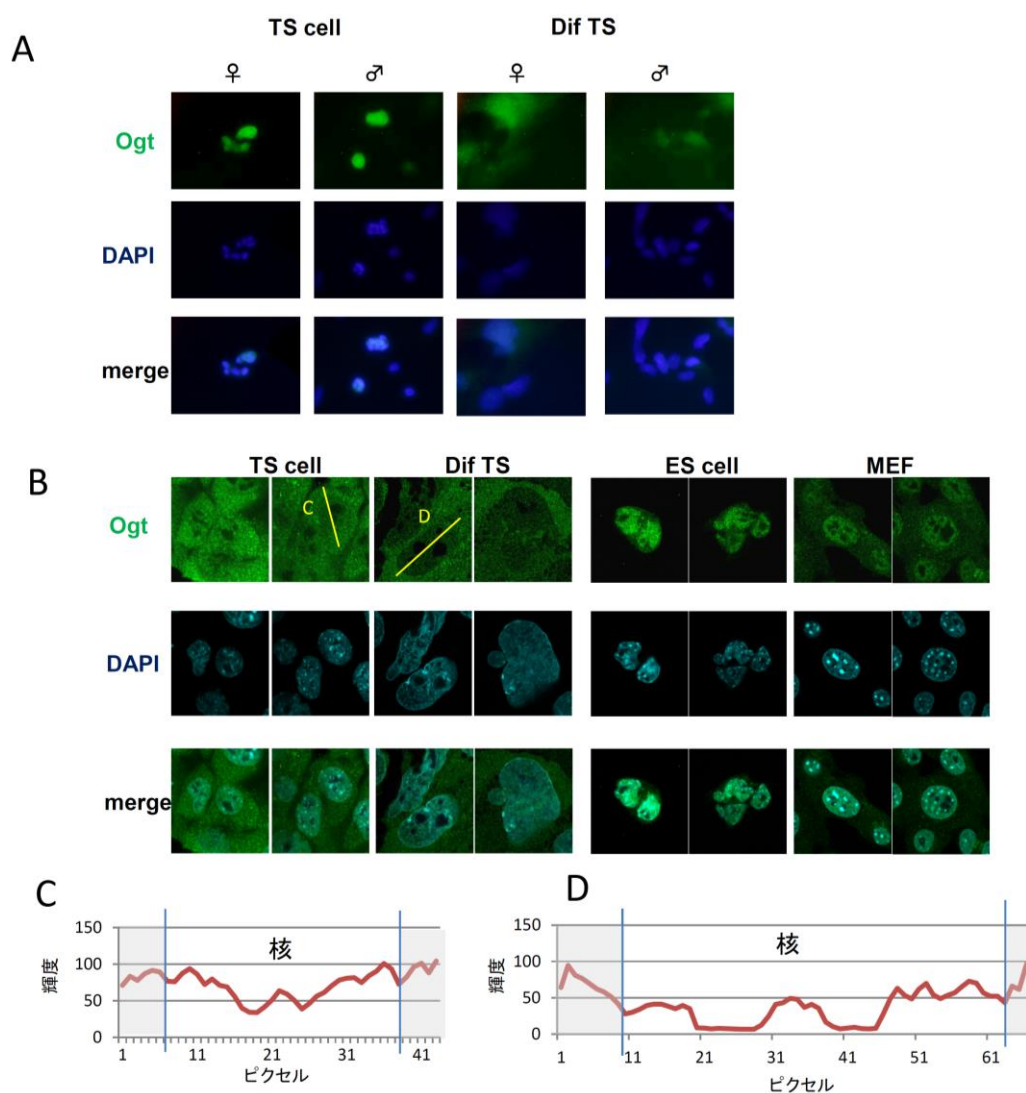


図2-2 ウェスタンブロットによるタンパク定量及び免疫染色によるOGTの局在解析

A 免疫染色によるOGTの発現解析。

B 共焦点顕微鏡を用いたOGTの局在解析

C, D ImageJを用いた図2-2CにおけるD及びE直線上の輝度の解析。縦軸は輝度、横軸はピクセル数を示す。

胎盤及び分化 TS 細胞において共通してメスの方が低メチル化状態である領域がある

Ogt の転写開始点近傍(-745~+39bp)の DNA メチル化状態を解析した(図 2-3)ところ、オスの胎盤でややメチル化している細胞が存在したものの、雌雄の胎盤及び TS 細胞でほぼ非メチル化状態であった。そこで、さらに上流を解析した結果、雌雄の胎盤においてメチル化される領域(-2,487bp~-745bp)を発見した。胎盤では、-745bp から-1,544bp の間に存在する 7つの CpG 配列を含む領域(S-DMR)はメスにおいて、オスよりも低メチル化状態であった。さらに上流は高度にメチル化されていた。このように、*ncOgt* のプロモーター領域は転写開始点近傍が非メチル化状態であり、上流に行くにつれメチル化されていることが分かる。

CpG 頻度の高い領域である CpG アイランドは、不活性化されている X 染色体ではメチル化されている。一方、X 染色体不活性化を免れている遺伝子の CpG アイランドはメチル化されていない。また、メスにおいて X 染色体不活性化によりメチル化される遺伝子は 50% がメチル化され、残りの 50% が非メチル化状態である。

ncOgt 遺伝子の転写開始点近傍は CpG 頻度が高い(TSS 近傍 500bp;CG 含量 44%, CpG 数 29)にも関わらず、雌雄の胎盤においてメチル化されていない。また上流には雌雄ともにほぼ 100%メチル化されている領域もある。このことは *ncOgt* 遺伝子の発現が X 染色体不活性化を免れていることを示唆している。また S-DMR はメスの方が低メチル化状態であることから、DNA メチル化も *ncOgt* の発現量の雌雄差形成に関与していることが示唆された。

上流へ向かうほどメチル化されるという傾向は TS 細胞でも認められた。よって未分化 TS 細胞でも *Ogt* は X 染色体不活性化を免れているだろう。しかし、未分化 TS 細胞における S-DMR はメスの方がメチル化されていた。X 染色体不活性化を免れているにも関わらず、雌雄の発現量に性差が認められないのは、DNA メチル化により、メスの *Ogt* 発現がオスよりも抑制されていると考えれば納得できる。*Ogt* の S-DMR におけるオスの TS 細胞の DNA メチル化率は分化に伴い低下する。一方でメスの TS 細胞は未分化/分化 TS 細胞でメチル化率が殆ど変わらない。以上、*ncOgt* 遺伝子の 5' 上流には非メチル化領域(~-745bp)とメチル化領域(S-DMR;-745~-1,544bp)が存在し、S-DMR の DNA メチル化が *Ogt* 遺伝子発現の抑制を行っていることが示唆された。

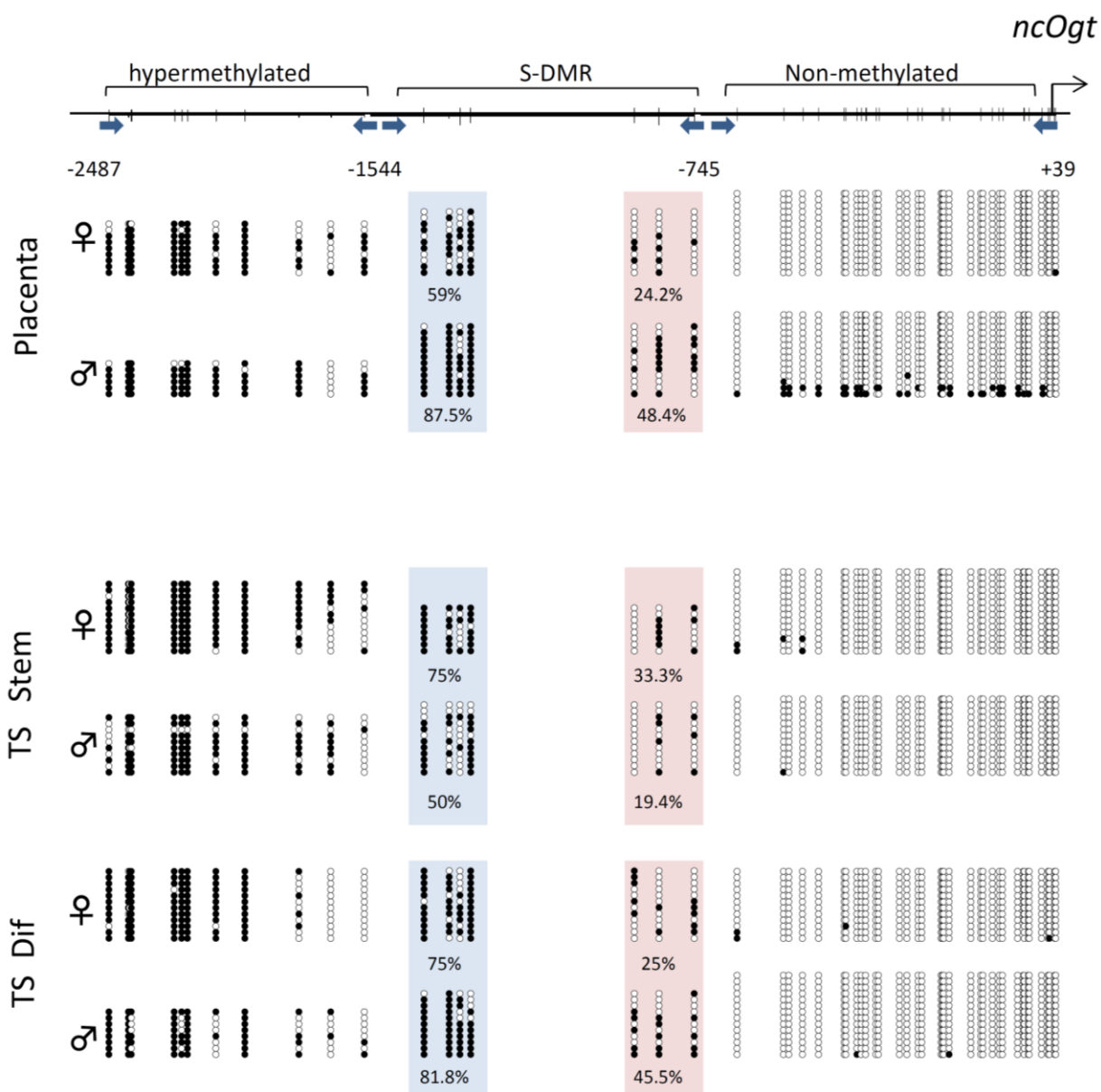


図2-3 バイサルファイトシーケンシングによるDNAメチル化解析
 雌雄の胎盤及び未分化TS細胞(Stem)、分化TS細胞(Dif)のDNAメチル化率を解析した。
*ncOgt*の上流-2487bpまでのDNAメチル化を解析した。○は非メチル化CpG、●はメチル化CpGを示す。
 プライマーは3セット用いており、各プライマーを用いて得られたデータについて、各サブクローンは横一
 列に並べている。また青枠内のメチル化率。赤枠内のメチル化率をそれぞれ計算している。

未分化/分化 TS 細胞において転写因子の発現パターンが異なる

Ogt の転写開始点上流 2,000bp までに結合する転写因子について 2 つのデータベースを用いて探索をした。TRAP 及び Transfac の Match による解析を行なったところ、複数の転写因子が両データベースで共通して候補として挙げられた(表 2-1, 表 2-2)。それらの転写因子の遺伝子発現を解析したところ、転写開始点上流約 100bp に結合する可能性がある *Atf2*(CREBP1) や上流約 500bp に結合候補配列が存在する *Sox9* の発現量が未分化 TS 細胞で高いことが明らかとなった(図 2-4)。さらに、転写因子の結合候補配列が集中していた上流 100bp に結合候補配列を有する *Hlf* についても解析したところ、*Hlf* は分化 TS 細胞の方が未分化 TS 細胞よりも発現が高いことも明らかとなった。また、*Hlf* は分化 TS 細胞及び胎盤で、メスの方がオスよりも発現量が高かった。これらの転写因子の結合サイトはいずれも DNA 非メチル化領域に集中していることは、注目すべきことである。

表2-1 TransfacのMatch解析による*Ogt*のプロモーター領域(-2kb~+1bp)の転写因子結合予測

matrix identifier	position (strand)	Core match	Matrix match	sequence	
PAX6_01	1677 (+)	0.778	0.801	agaagTTAGcttgactggta	Pax-6
EVI1_04	1305 (+)	1	0.841	tcaaatgaaAAGATa	Evi-1
HNF1_C	1289 (+)	0.817	0.847	gGCCAAtcaatccag	HNF-1
CDPCR1_01	1287 (-)	0.929	0.926	ccaaTCAATa	CDP CR1
MEIS1A/HOXA9_01	972 (-)	1	0.98	tcttaaacTGTCa	MEIS1A/H OXA9
OCT1_Q6	667 (+)	1	0.892	tgacatGCAAActcc	1-Oct
SOX9_B1	473 (-)	1	0.995	ccccATTGTttga	SOX-9
CEBP_C	132 (+)	1	0.952	tgtttgtcGCAATggacc	C/EBP
VBP_01	103 (+)	1	0.993	gTTACGtaag	VBP
HLF_01	103 (+)	1	0.962	GTTACgtaag	HLF
CREBP1_01	102 (+)	1	1	TTACGtaa	CRE-BP1
CREBP1_01	102 (-)	1	1	ttaCGTAA	CRE-BP1

表2-2 TRAPによる*Ogt*のプロモーター領域(-2kb~+1bp)の転写因子結合予測

Rank	P-value		
1	0.000212	0.191108 M00420	MEIS1AHOXA9_01
2	0.00071	0.22718 M01383	NKX3A_02
3	0.000996	0.22718 M01378	HOXA11_01
4	0.001075	0.22718 M01352	NKX29_01
5	0.001259	0.22718 M00040	CREBP1_01
6	0.001686	0.253415 M01329	HOXC11_01
7	0.003461	0.397768 M01361	HOXC10_01
8	0.003528	0.397768 M00538	HTF_01
9	0.004312	0.416263 M00228	VBP_01
10	0.005754	0.416263 M01272	SOX2_Q6
11	0.00646	0.416263 M01125	OCT4_01
12	0.006655	0.416263 M01434	HOXD11_01
13	0.007494	0.416263 M00421	MEIS1BHOXA9_02
14	0.010028	0.416263 M00485	NKX22_01
15	0.010374	0.416263 M01355	ALX3_01
16	0.010524	0.416263 M01415	SHOX2_01
17	0.01088	0.416263 M00410	SOX9_B1
18	0.011602	0.416263 M00251	XBP1_01
19	0.011617	0.416263 M01380	HOXD12_01
20	0.011691	0.416263 M01323	OTP_01

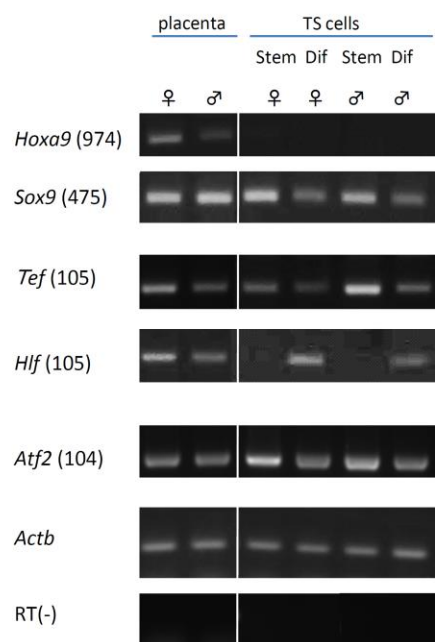


図2-4 RT-PCRによる転写因子の発現解析
 雌雄の胎盤及び未分化TS細胞(Stem)、分化TS細胞(Dif)を解析した。
 解析した遺伝子名、括弧内には*ncOgt*の転写開始点から各転写因子の候補配列までの距離を示している。

ncOgt の転写は非メチル化領域(-745~+20bp)だけでも起こる

ncOgt の転写開始点上流域の転写活性を、分化 TS 細胞を用いたレポーターアッセイにより解析した。非 DNA メチル化領域(-737~+20) (Short)を組み込んだベクター及び性依存的 DNA メチル化可変領域を含む DNA 断片(-1771~+20) (Long)のプロモーター活性を調べた(図 2-4A)。すると、Short でも十分にプロモーター活性を有していることが明らかとなった(図 2-4B)。つまり、転写の ON-OFF の制御は非メチル化領域(-737~+20)でも十分可能であることを示している。*Hlf* の発現は分化 TS 細胞においてメスのほうがオスよりも高かった。

HLF は転写の ON-OFF を制御する非メチル化領域(-737~+20)に結合モチーフを持つ。そのため、プロモーター活性はメスのほうが高いことが期待された。しかし、本実験では解析に用いた TS 細胞の雌雄による違いは認められなかった。このことから、HLF は分化 TS 細胞においては *Ogt* 遺伝子発現量を規定する律速因子ではないと考えられる。

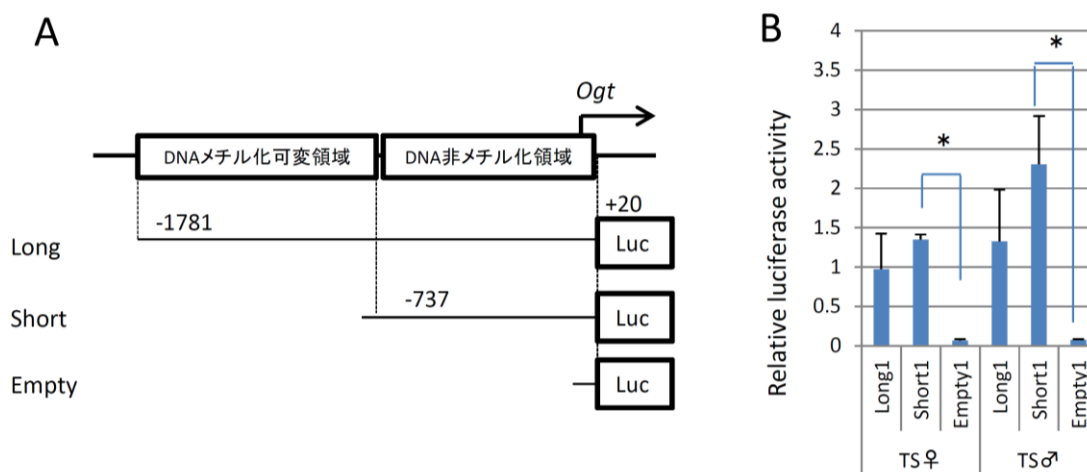


図2-5 レポーターアッセイによる*Ogt*遺伝子のプロモーター活性の解析

A 作成したvectorに組み込まれている領域。

B 分化TS細胞にAで記した3つのvectorを用いて解析を行なった。

レポーターアッセイの結果(n=3)。値はホタルルシフェラーゼ/ウミシイタケルシフェラーゼの値。

エラーバーはS.D.。*は有意差あり(p<0.05)(Studentのt検定)

*Ogt*のプロモーター領域に OGA が結合する

OGA のノックアウトマウス由来の MEF において、OGT の発現が低下することが示されている (Yang et al., 2012)。そこで、OGA が直接 OGT の発現を制御している可能性を検証するため、新たに抗 OGA 抗体を作製し、ChIP 解析を行うことにした。Western blot の結果、作製した抗体が OGA を特異的に認識すること (図 2-6A、B)、ChIP 解析において OGA を沈降できることを示した (図 2-6C)。この抗体を用いて OGT のプロモーター領域及び、雌雄でメチル化状態の異なった領域 (図 2-6D) について ChIP 解析をした結果、未分化 TS 細胞において、OGA が OGT の非 DNA メチル化プロモーター領域に結合していることが明らかとなった (図 2-6E)。一方、OGA は上流の DNA メチル化可変領域には結合していないことも示された。このことから OGT が OGA の制御下にあることが示唆された。しかし、分化 TS 細胞では共に OGA の結合が認められず、分化 TS 細胞において認められた OGT の発現量の性差が OGA によって生じるわけではなさそうである。OGA は HAT 活性を有するタンパク質である。また OGA は p300 などのヒストンアセチル化酵素と相互作用する。そこで、ヒストン H3 のアセチル化状況を解析した (図 2-6F)。しかし、この領域のヒストン H3 のアセチル化状態は雌雄の分化・未分化 TS 細胞に違いはなく、全てのサンプルで同程度アセチル化されていた。

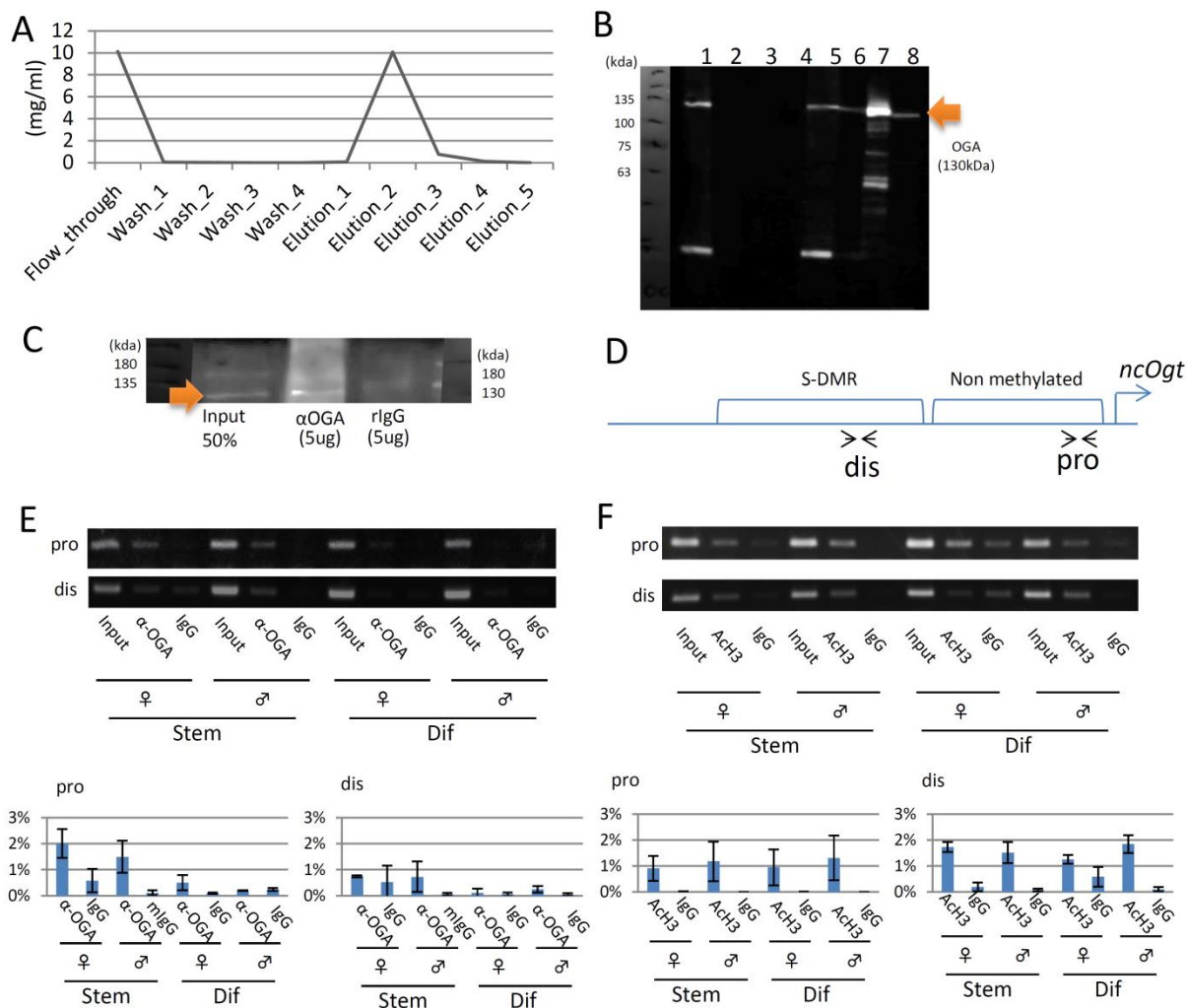


図2-6 OGAがOGTのプロモーター領域に結合する

A 抗体を精製した際の各分画の濃度。

B FLAG-OGA強制発現ES細胞の細胞総蛋白に対して1血清、2 Flow through、3 Wash 2、4 Wash 3、

5 Elution2、6 Elution3、7 抗Flag抗体、8 市販のOGA抗体を用いて解析(詳細は材料・方法に記載)

C 作成したOGA抗体を用いたChIPの確認。クロマチン溶液をOGA抗体でIPした産物を用いた

Western blotの結果。InputはDNA0.5ug相当のクロマチン溶液をWestern blotに用いた。αOGA、rlgGは

それぞれ1ug相当のクロマチンを5ugの抗体を用いてIPを行い、全量をWestern blotに用いた。

D ChIPアッセイに用いたprimerの解析対象領域。proはDNA非メチル化領域に、disはメチル化可変領域に設計した。

E OGA抗体を用いたChIPアッセイの結果。Inputは5%(1ng/uL)。グラフはImageJにより定量したもの。

(エラーバーはS.E., n=3)

F ACh3抗体を用いたChIPアッセイの結果。Inputは5%(1ng/uL)。グラフはImageJにより定量したもの。

(エラーバーはS.E., n=3)

考察

本章では、マウス胎盤における OGT の発現がメスで高いとする、先の報告を確かめた。次に、分子レベルでの解析を容易にするために TS 細胞を用い *Ogt* の発現量を調べたが、未分化 TS 細胞では性差が全く認められなかった。胎盤を構成する細胞は栄養膜幹細胞より分化した細胞だと考えられる。確かに、TS 細胞を分化させると胎盤と同様に、メスのほうがオスよりも *Ogt* の発現量が高かった。これより、TS 細胞の分化誘導系は、胎盤における *Ogt* の発現雌雄差を生じさせるメカニズム解析に利用できることが明らかになった。

OGT には3つのアイソフォームがある。これらはどのプロモーターを使用して転写を開始するかによって決定すると考えられる。ncOGT は全てのエクソンをコードするのに対して、エクソン3~22 からなるミトコンドリア存在型 (*mtOgt*)、および、エクソン5~22 からなる短い型 (*sOgt*) が存在する。RT-PCR 及び Western blot の結果から、TS 細胞において *Ogt* 遺伝子については、nc*Ogt* が主体となっており、mtOGT や sOGT があまり検出されないこと、性差は ncOGT に見られることが示された。免疫染色の結果から OGT は核だけでなく、細胞質にも局在していた。このことは核局在型の ncOGT は細胞質にも存在することを示唆している。

Jarid1c のように X 染色体不活化を免れる遺伝子には Y 染色体上に相同遺伝子 (*Jarid1c* に対して *Jarid1d*) がコードされている (Xu et al., 2008) ことがあるが、*Ogt* には相同遺伝子はない。タンパク質の O-GlcNAc 修飾は細胞の代謝をはじめとする様々な生命現象に関与しているため、同一組織では OGT により雌雄で同様の O-GlcNAc 修飾がなされることが予想される。本研究から胎盤及び分化 TS 細胞に *Ogt* 遺伝子の発現に性差が存在することが示された。

X 染色体不活化は体細胞組織ではランダムに行われるが、栄養膜細胞は父親由来の X 染色体が選択的に不活化される。また TS 細胞では CpG island は不活性化 X 染色体でメチル化されていると考えられている (Senner et al., 2012)。*Ogt* の非メチル化領域 (-745~+39bp) は CpG 配列が豊富な領域である。さらに上流の DNA メチル化されている領域のサブクローンも 50 %がメチル化、50 %が非メチル化というように分かれてもいなかった。CpG 配列が豊富な *Ogt* のプロモーター領域が DNA 非メチル化状態であることから、*Ogt* 遺伝子領域は X 染色体不活性化を免れていると考えられる。このことは、C57BL/6J 及び CAST/EiJ マウスの F1 個体由来の TS 細胞でも示されている (Calabrese et al., 2012)。TS 細胞に見られた DNA メチル化の傾向は胎盤でも分化 TS 細胞でも同様であった。さらにレポーターアッセイの結果、分化 TS 細胞におけるプロモーター領域の転写活性に性差は無かった。よって、分化 TS 細胞で見られる性差を生む原因は、メスで X 染色体が2本存在し、しかも X 染色体不活性化を免れることに起因すると考えてよい。

Ogt 遺伝子の転写開始点近傍 (-745~+39bp)は細胞・組織問わず非メチル化であるのに対して、上流 (-1,544~-745bp)は性依存的にメチル化されていた。この S-DMR は第1章の S-DMR とは異なり、多数の CpG が単位となっている。胎盤では、非メチル化領域にはヒストン H3 の4番目のリジン K4 のトリメチル化(H3K4m3)が認められることが示されている。またレポーターアッセイの結果から、非メチル化領域は *Ogt* 遺伝子発現制御を担っていると考えられる。転写開始点近傍は非メチル化状態で上流に行くほどメチル化されるといふ *Ogt* 遺伝子の DNA メチル化状況は、TS 細胞における *Ddah2* 遺伝子でも認められる (Tomikawa et al., 2006)。*Ddah2* 遺伝子では、DNA メチル化可変領域における DNA メチル化が発現抑制を行っている。*Ogt* 遺伝子においても、量的調節は S-DMR における DNA メチル化でなされる可能性が考えられる。未分化 TS 細胞では、雌雄の *Ogt* 遺伝子の発現量に性差が無いことから DNA メチル化による量的調整が発揮されていると考えれば納得できる。胎盤及び分化 TS 細胞ではメスゲノムがより低メチル化状態であった。すなわち、量的調節が緩和され、メスで *Ogt* の発現が高いことになる。

転写因子の結果から、TS 細胞では ATF2 や SOX9 発現が高く、分化に伴い減少することが明らかになった。一方、他の転写因子 HLF は分化 TS 細胞で発現が高いことも分かった。ただし、レポーターアッセイの結果から HLF は分化 TS 細胞における *Ogt* 遺伝子発現の律速因子ではないことが示された。したがって、TS 細胞の分化に伴う *Ogt* の発現の低下は、ATF2 や SOX9 の減少に起因すると考えられる。さらに、同じ TS 細胞の未分化-分化間で DNA メチル化パターンを比較すると、未分化の方が低メチル化状態であることが分かる。このことも未分化 TS 細胞の方が分化 TS 細胞よりも発現が高い要因だろう。

本研究では OGA が *Ogt* のプロモーター領域に結合していることを示した。OGA は、発現している状態の *Hcrt* プロモーターに結合している (Hayakawa et al., 2013)。また、ヒストンアセチル化酵素をリクルートしてアセチル化していることが示されている。このことから、OGA が *Ogt* に結合しているということは *Ogt* の発現を活性化していると考えられる。未分化 TS 細胞においてもヒストンはアセチル化されていた。MEF において OGA のノックアウトにより OGT の発現が低下することが示されている (Yang et al., 2012)。よって、OGA が *Ogt* の発現量の調整を行っていることが示唆された。

第2章の結果から、*ncOgt* は図 2-7 のように発現が制御されていると考えられる。未分化 TS 細胞はメスの方がオスよりも高メチル化であるため、メスの方が2倍の X 染色体を有するにも関わらず同等の発現量を示す。分化に伴い *ncOgt* の発現量が低下するのは分化に伴う転写因子の減少によると考えられる。分化 TS 細胞において雌雄差が認められるのは、メスが2倍の X 染色体を有する上に、メスの方が低メチル化状態であり、発現を促進しているためだと考えられる。雌雄胎盤の *ncOgt* 遺伝子プロモーターの DNA メチル化パターンは雌雄分化 TS 細胞のものと同様であることから、胎盤に認められる *ncOgt* 遺伝子の雌

雄差は分化 TS 細胞と同様に、X 染色体の本数および DNA メチル化によって生じていると考えられる。以上を勘案し、TS 細胞における *Ogt* の発現調節モデルを図 2-7 に示した。

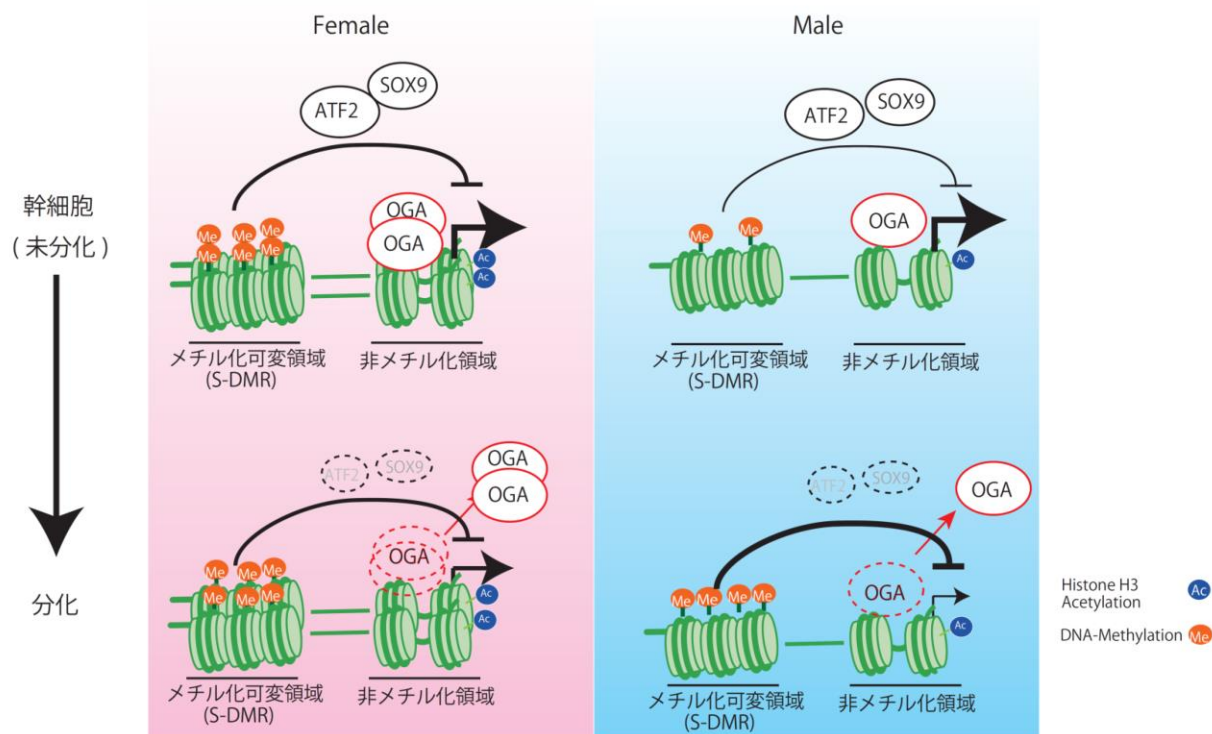


図2-7 雌雄の未分化/分化TS細胞における*Ogt*の発現制御モデル

X染色体上の遺伝子である*Ogt*はメスでは2本の染色体を有し、TS細胞においてX染色体不活化を免れている。未分化/分化TS細胞の違いはOGAのプロモーター領域の結合及び存在する転写因子によって決定される。

*Ogt*遺伝子は非メチル化領域(転写開始点付近より上流-745bpまで)とメチル化可変領域(S-DMR; -745bpより上流)から構成されている。非メチル化領域には転写因子(SOX9, TEF, HLF, ATF2)の結合部位が存在している。OGAはヒストンアセチル化活性ドメインを有する。幹細胞(未分化)では、OGAが雌雄共に非メチル化領域に結合し、発現を促進している。また、S-DMRのDNAメチル化はメスで高いことが、(クロマチンを縮めることにより) *Ogt*発現に抑制的に作用している可能性がある。その結果、量的緩和となり、雌雄間で差が無い状態となる。分化に伴いOGAは除かれ、非メチル化領域の転写因子の切り替えが起こる。また、オスのS-DMRのDNAメチル化が亢進し、オスでの*Ogt*発現がメスより低下する。

第3章

栄養膜細胞における OGT 標的ゲノム領域の解析

序論

多くのエピジェネティック制御因子のノックアウトマウスは胎生致死である。例えば GLP ノックアウトマウスは胎生 10 日で死亡し、*G9a* ノックアウトマウスでは胎生 9.5 日から 12.5 日で死亡する (Tachibana et al., 2002, Tachibana et al., 2005)。OGT も同様にノックアウトマウスは胎生致死である (Shafi et al., 2000)。OGT のノックダウンや強制発現に関する報告からも、複数の遺伝子発現は OGT の制御下にあることが示されており (Li et al., 2012, Caldwell et al., 2010)、エピジェネティック制御因子としての OGT のゲノムワイドへの影響は無視できない。

X 染色体不活性化を免れる遺伝子は Y 染色体上の遺伝子が機能を補完していると考えられる。例えば、JARID1C は H3K4 の脱メチル化を行い (Iwase et al., 2007)、UTX は H3K27 の脱メチル化を行う (Agger et al., 2007)。脳では X 染色体上の遺伝子 *Jarid1c* 遺伝子の発現量がオスよりメスの方が多いことが示されている。ただし、*Jarid1c* 遺伝子には Y 染色体上に相同遺伝子である *Jarid1d* がコードされている。同様に X 染色体上には *Utx* があり、Y 染色体上には *Uty* がある。脳やリンパ芽球様細胞、ES 細胞では、*Utx* 遺伝子が X 染色体不活性化を免れ、メスの方がオスよりも高発現である (Johnston et al., 2008, Berletch et al., 2013)。メスの ES 細胞では UTX がメスで発現の高い *Rhox6* や *Rhox9* 遺伝子領域に結合することが示されている (Berletch et al., 2013)。このことから、性依存的な発現を示すエピジェネティック制御因子は標的領域のエピジェネティック状況や発現にまで影響を与えうると考えられる。

Ogt 遺伝子は Y 染色体上に相同遺伝子を持たないことから、厳密に発現制御が行われていることが分かる。しかし、第 2 章の結果より、胎盤及び分化 TS 細胞において *Ogt* の発現量はメスの方が多いことが明らかとなった。OGT の発現量の性差が細胞全体に影響するかどうか、特定の遺伝子領域の O-GlcNAc 修飾に性差をもたらすだろうか、に関しては全く分からない。胎盤においては PRDX1 や ANXA1 といった常染色体上の遺伝子にコードされているタンパク質の O-GlcNAc 修飾レベルに性差があることが示されている (Howerton et al., 2013)。また細胞全体としても O-GlcNAc 抗体 (CTD110.6) を用いた解析結果では性差が認められる。分化 TS 細胞においても O-GlcNAc 修飾には性差が認められるのだろうか。特定のゲノム領域の O-GlcNAc 修飾に性差はあるのだろうか。

OGT はこれまで、SET1 などとの相互作用の報告し、H3K4m3 などのヒストン修飾に関与することが示されている (Deplus et al., 2013)。また TET2 や TET3 と結合することでクロマチン領域にリクルートされると考えられている (Chen et al., 2013)。

このことから OGT は O-GlcNAc 修飾のみならず、他のヒストン修飾や DNA メチル化にまで影響を与えることが予想される。よって OGT の結合する領域は O-GlcNAc 修飾以外にもエピジェネティックな変化をもたらす得ると言える。しかし TS 細胞における OGT の結合領域の報告はない。

OGA (O-GlcNAcase) は常染色体上の *Mgea5* 遺伝子にコードされている。OGA も OGT 同様、相同遺伝子を持たない。よって O-GlcNAc 修飾は OGT と OGA の 2 つの酵素のみにより制御されていることになる。OGA は short type (OGA-S) と long type (OGA-L) があり、OGA-L は核と細胞質に、OGA-S は脂肪滴の表面に存在する (Keembiyehetty et al., 2011)。また、OGA-S は核にいるという報告もある (Comtesse et al., 2001)。OGA はどちらのアイソフォームも O-GlcNAcase 活性を有しており、OGA-L はさらに HAT (histone acetyltransferase) ドメインを有している。

第3章では OGT 量の性差が特定の遺伝子領域への結合量に性差をもたらすのか？ その場合どのような遺伝子があるのか？ 分化 TS 細胞でも O-GlcNAc 修飾タンパク量に性差は認められるのだろうか、という疑問を解決するため、ChIP-sequencing 解析および、O-GlcNAc 抗体を用いた Western blot および免疫染色を行なった。解析の結果、OGA をコードする *Mgea5* 遺伝子も OGT の標的になっていること、更に、TS 細胞では分化後、メスでは *Mgea5* の発現が亢進していることが明らかになった。OGT 発現と OGA 発現が共にメス分化 TS 細胞では高いのである。量的緩和(調節)機構として興味深い。

材料と方法

TS 細胞は第2章と同様に調整した。

ChIP 解析

1章と同様の手順で行なった。

抗体は3 μ g の抗 OGT 抗体 (Abcam Cat. ab50273)、3 μ g の Rabbit normal IgG (Abcam, Cat. ab27478) 3 μ g の抗 O-GlcNAc 抗体 (RL2)、3 μ g の Mouse Normal IgG を用いた。ChIP した DNA は 50 μ L 精製後、1 μ L を用いて GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, CatM8296) による PCR 反応を行い、各遺伝子の cDNA を増幅した。反応は 94 $^{\circ}$ C で 5 分間変性した後、[94 $^{\circ}$ C-30 秒, 60 $^{\circ}$ C-30 秒, 72 $^{\circ}$ C-30 秒] を 1 サイクルとし 30 サイクル増幅反応を繰り返しさらに 72 $^{\circ}$ C で 5 分間の伸長反応を行った。用いたプライマーは以下の通り。

AK036949_chip_F	GAGAATCTCAGAGCCCCACA
AK036949_chip_R	GTGTGGACTCACTCGCCTTC
Nrbf2_chip_F	CACCAGGATGCCTATAGCAGA
Nrbf2_chip_R	CCTGAACAGATTTGAGGTTTGAA
Tollip_chip_F	TGGCCAAGGCAACTCATTTA
Tollip_chip_R	GGACTGCTATGTTTCCACCT
unrelated_chip_F	AAGGGGCTCTGCTTAAA
unrelated_chip_R	AGAGCTCCATGGCAGGTAGA
Hnrnpa2b1_chip_F	CTCGCCATGCCATTTTAAAT
Hnrnpa2b1_chip_R	CGGAGGTCTTTCTCATCTCG
Esrp2_chip_F	CCTCGACCCTATTTCTGACC
Esrp2_chip_R	CAGAGCCACCTTACCTTCCA
Mgea5_chip_F	GAGGATGGTGCAGAAGGAGA
Mgea5_chip_R	GCTCCCGATGGGTATCTTC
Ak045535_ChIP_F	AGAAAATGCTGCCAGAAAA
Ak045535_ChIP_R	AATCCAGGCCAAGGAAGAGT
Pnkd_chip_F	GGGTCTCTGGGAGGAGTAG
Pnkd_chip_R	CCGTCGGGAATTGTAGTTTG
Zwint_chip-F	TTGCTAGGTAAGAACAGCACACA
Zwint_chip-R	GAGCTGGTCTCTTCAGGGTCT
Ak030770_chip_F	AGGCTAGAAGCACAGAGCTGA
Ak030770_chip_R	GAGTCAGAGGAGGCATCGTG
Upf2_chip_F	TGATGAGCTGGACTCCTTCC
Upf2_chip_R	AGTAAGAGGGACGTGGGACA

ChIP-sequencing (ChIP-seq)

End-Repair は End-It DNA End-Repair Kit (Epicenter Cat. ER0720) を用いた。50 μg の ChIP した DNA に 5 μL の 10 \times T4 DNA ligase buffer with ATP (NEB)、2 μL の dNTPs (10 mM)、1 μL の T4 DNA polymerase (NEB)、1 μL の Klenow DNA polymerase (NEB) を加え、超純水で 50 μL にメスアップした。室温で 45 分反応させた後、MinElute PCR purification Kit (Qiagen) で精製した。溶出には 50 $^{\circ}\text{C}$ に温めた 32 μL の Buffer EB を用いた。dA tailing は End-Repair 産物に 5 μL の 10 \times Klenow buffer (NEB)、10 μL の dATP (1 mM)、3 μL の Klenow (3'-5' exo-) (NEB) を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間反応させた。MinElute PCR purification Kit (Qiagen) で精製した。溶出には 50 $^{\circ}\text{C}$ に温めた 10 μL の Buffer EB を用いた。Adaptor Ligation は、dA-tailing をした DNA に 5 μL の 2 \times Quick ligase Buffer (NEB)、10 μL の Adapter oligo mix (200nM)、3 μL の Quick DNA ligase (NEB) を加えて室温で 15 分反応させた。QIAquick PCR purification Kit (Qiagen) で精製した。溶出には 50 $^{\circ}\text{C}$ に温めた 24 μL の Buffer EB を用いた。Adaptor ligation 産物に 25 μL の 2 \times Phusion DNA polymerase buffer (finzymes)、1 μL の PCR primer 1.1 (10 μM)、1 μL の PCR primer 1.2 (10 μM) を加えて PCR 反応を行った。プログラムは 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 分の後、95 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒、65 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒を 1 サイクルとして 18 サイクル、72 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分の後、4 $^{\circ}\text{C}$ でホールドした。DNA は AmpureXP によって精製した。溶出には 20 μL の TE を用いた。

Sequencing 操作から Peak calling までは Albert Einstein College of Medicine に依頼した。Illumina HiSeq 2500 により、配列を決定した。得られたデータは bowtie - 0.12.7 により、Mapping を行い、Peak Finder には MACS - 1.4.2 (Zhang et al., 2008) を用いた。得られたピークを使用し、Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) により、ピークの分布を解析した (Giardine et al., 2005)。また得られたデータは UCSC ゲノムブラウザに表示した。オントロジー解析には DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) により Biological process を抽出した (Dennis et al., 2003)。

免疫染色

免疫染色は第2章と同じプロトコルで行なった。1次抗体と2次抗体の組み合わせは以下の通り、

1次抗体	メーカー	製品番号	2次抗体	メーカー	製品番号
O-GlcNAc (RL2)	Abcam	ab2739	Alexa Fluor 488 rabbit anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen	A11001

Western blot

第2章と同じプロトコルで行なった。TS 細胞の細胞総タンパク 1 μg , 2 μg , 4 μg を用いて行なった。1次抗体は抗 OGA 抗体 (Proteintech, 14711-1-AP) を 1:1,000 の希釈で用いた。2次抗体は HRP-conjugated chicken polyclonal anti-rabbit IgG (Abcam; catalog no. ab6829) を 1:5,000 の希釈で用いた。

RT-PCR, RT-qPCR

プロトコルは第2章と同様に行なった。

プライマーは、

Mgea5_RT_F GCTTGCCTCCTGTCTTCACT

Mgea5_RT_R AGACCTCAACCACCAACCAC

を使用した。

結果

未分化/分化 TS 細胞に見られる OGT の標的領域の特徴

OGT の制御下にある遺伝子群を探索するため、未分化/分化 TS 細胞における OGT 結合領域を ChIP-sequencing により網羅的に解析した。驚いたことに、第2章の結果より核一個当たりの OGT 量は未分化/分化 TS 細胞間ではそれほど変化が無いことが示されているにも関わらず、OGT の結合領域は未分化 TS 細胞よりも分化 TS 細胞で 10 倍以上多く認められた(図 3-1A)。次に、結合領域数の多い分化 TS 細胞について、遺伝子領域、遺伝子の上流 10kb、遺伝子の下流 10kb の 3 つの群に含まれる OGT の結合領域数を調べた。その結果、少なくとも遺伝子の上流 10kb の方が下流 10kb より OGT の結合領域の数が多いことが明らかとなった(図 3-1B)。さらに、OGT の結合領域は CpG island を転写開始点近傍に持つ遺伝子に有意に多いことが明らかとなった(図 3-1C; Fisher の正確確率検定, $p < 0.001$)。次に、転写開始点前後 10kb に存在する OGT の結合領域について、転写開始点から OGT の結合領域までの距離を調べた。その結果、OGT の結合領域は転写開始点付近に集中していることが明らかとなった(図 3-1D)。転写開始点近傍に OGT の結合領域があるという傾向は、未分化の TS 細胞にも認められた。

未分化 TS 細胞の OGT 結合領域は転写開始点の前後 2.5 kbp に 723 領域検出されたのに対し、分化 TS 細胞では上下 1kb 内に限っても 29,452 領域検出された(図 3-1E)。分化 TS 細胞での OGT の結合領域はメスの方が多数同定された。また、未分化 TS 細胞では、検出領域数は少ないが、結合していることは ChIP-PCR により確認された(図 3-2)。

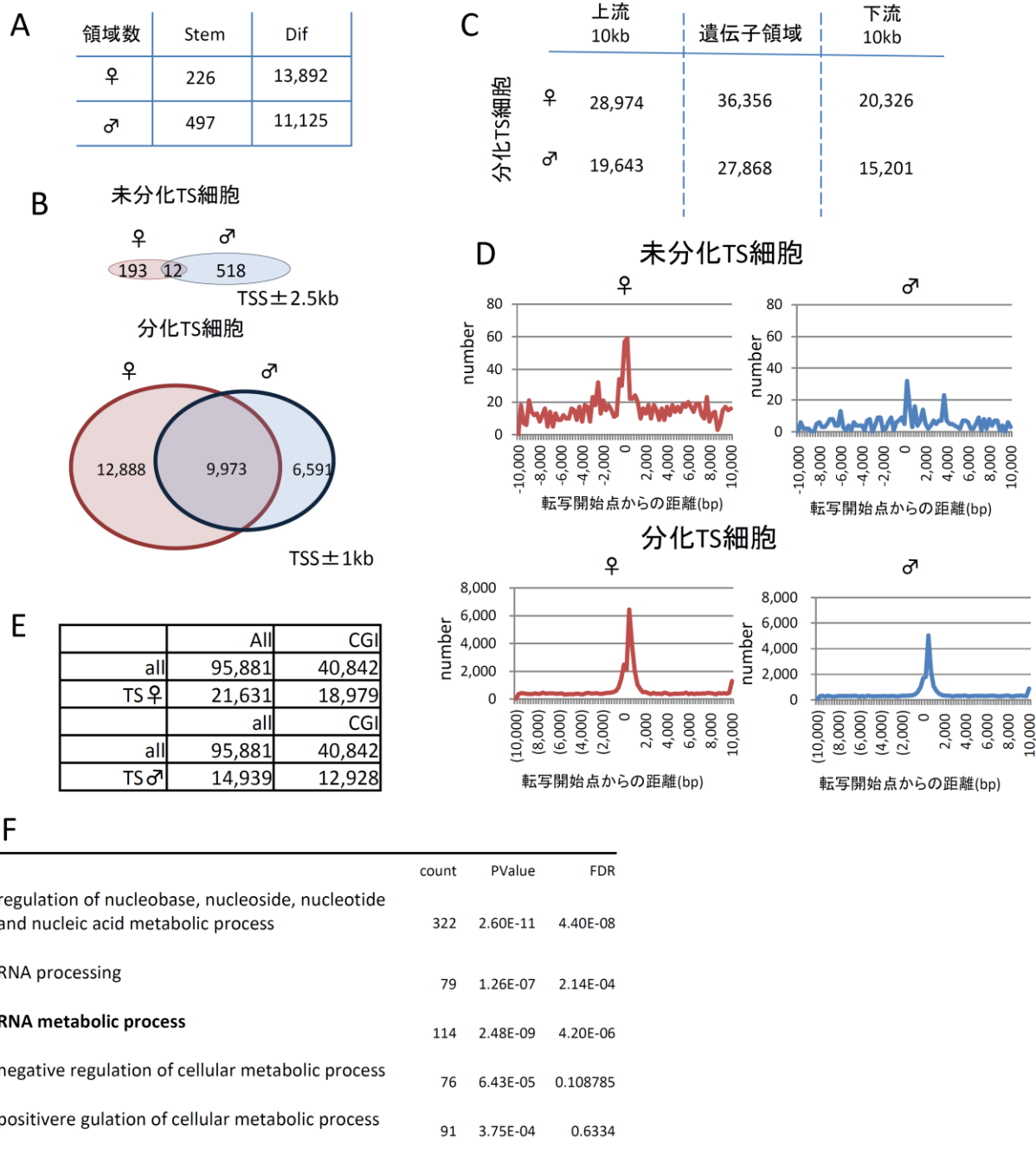


図 3-1 ChIP-seqによる、TS細胞におけるOGTの標的領域の探索

A 雌雄の未分化/分化TS細胞におけるOGTの標的領域数。

B 転写開始点近傍のOGT結合領域のEnsemble transcript(EnsT) ID数。未分化TS細胞は上流下流2.5kbずつ、分化TS細胞は1kbずつ計数。

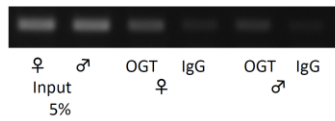
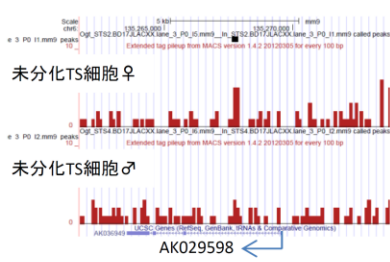
C 分化TS細胞におけるEnsT ID数。それぞれの転写産物のGene body及びその上流下流を10kbずつ計数。

D 転写開始点からOGTの結合領域までの距離(上流下流それぞれ10kb)

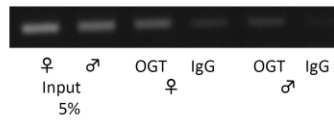
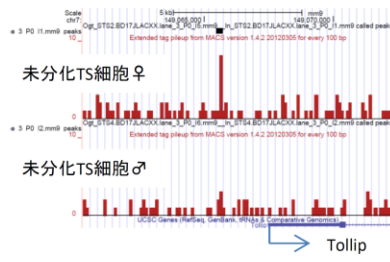
E 転写開始点近傍にCpG islandを有するEnsT ID数及びOGTの結合するEnsT ID数。

F DAVIDによるGene Ontology解析

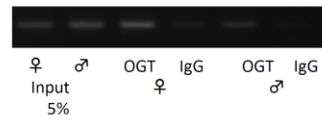
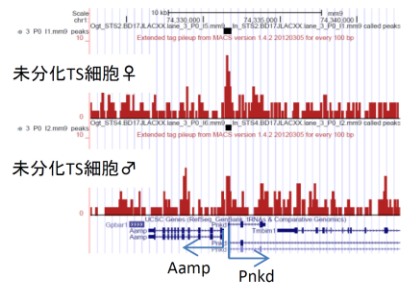
AK029598



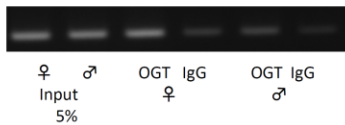
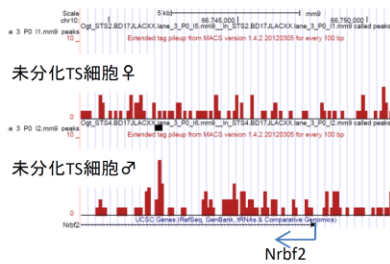
Tollip



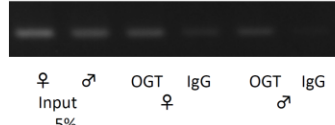
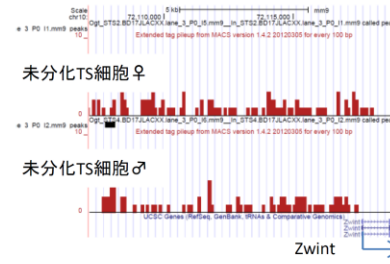
Pnkd



Nrbf2



Zwint



Unrelated_region

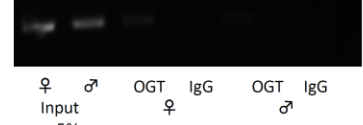
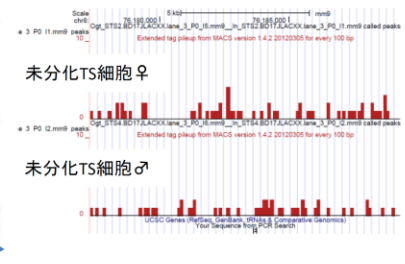


図 3-2 ChIP-seq で得られた未分化TS細胞におけるOGTの結合をChIP-PCRにより確認
OGTのChIP-seqで得られたデータをUCSCゲノムブラウザ上に表示した。10kbの領域を表示している。上から未分化TS細胞のメス、未分化TS細胞オスのデータ、ChIP-PCRによる解析データが並んでいる。赤いシグナル上(wigファイル)の黒いバンドが有意に結合していると計算された領域であり、この領域をChIP-PCRにより解析した。

分化 TS 細胞において性依存的な OGT の結合を示す領域が存在した

分化 TS 細胞についてはメスでは 22,861 遺伝子、オスでは 16,564 遺伝子の転写開始点近傍(転写開始点から±1kb)に OGT 結合領域が存在した。これらのうち、9,973 個の領域がオスとメスで重複していた。それらの遺伝子についてオントロジー解析を行なった結果、OGT の標的遺伝子には *Esrp2* や *Hnrnpa2b1* などの RNA metabolic process 関連の遺伝子が濃縮されている事が明らかとなった(図 3-1F)。

雌雄の分化 TS 細胞を用いて、雌雄で共に OGT が結合する領域について ChIP-PCR 解析を行なった。結果、*Esrp2* や *Hnrnpa2b1* 遺伝子領域について、OGT はメスの方がオスより多く結合していた(図 3-3)。逆にオスの方がより多く結合する領域もあるのではないかと考え、雄の分化 TS 細胞にのみ OGT の結合領域の存在した遺伝子に関して ChIP-PCR を行った。すると *Ak030770* や *Upf2* は、オスの分化 TS 細胞の方が結合していることが明らかとなった(図 3-3)。また OGT の結合領域の認められない AK045535 に関しては、雌雄の分化 TS 細胞共に OGT の結合が認められなかった。このことから、OGT の結合量は領域依存的に性差が見られることが明らかとなった。

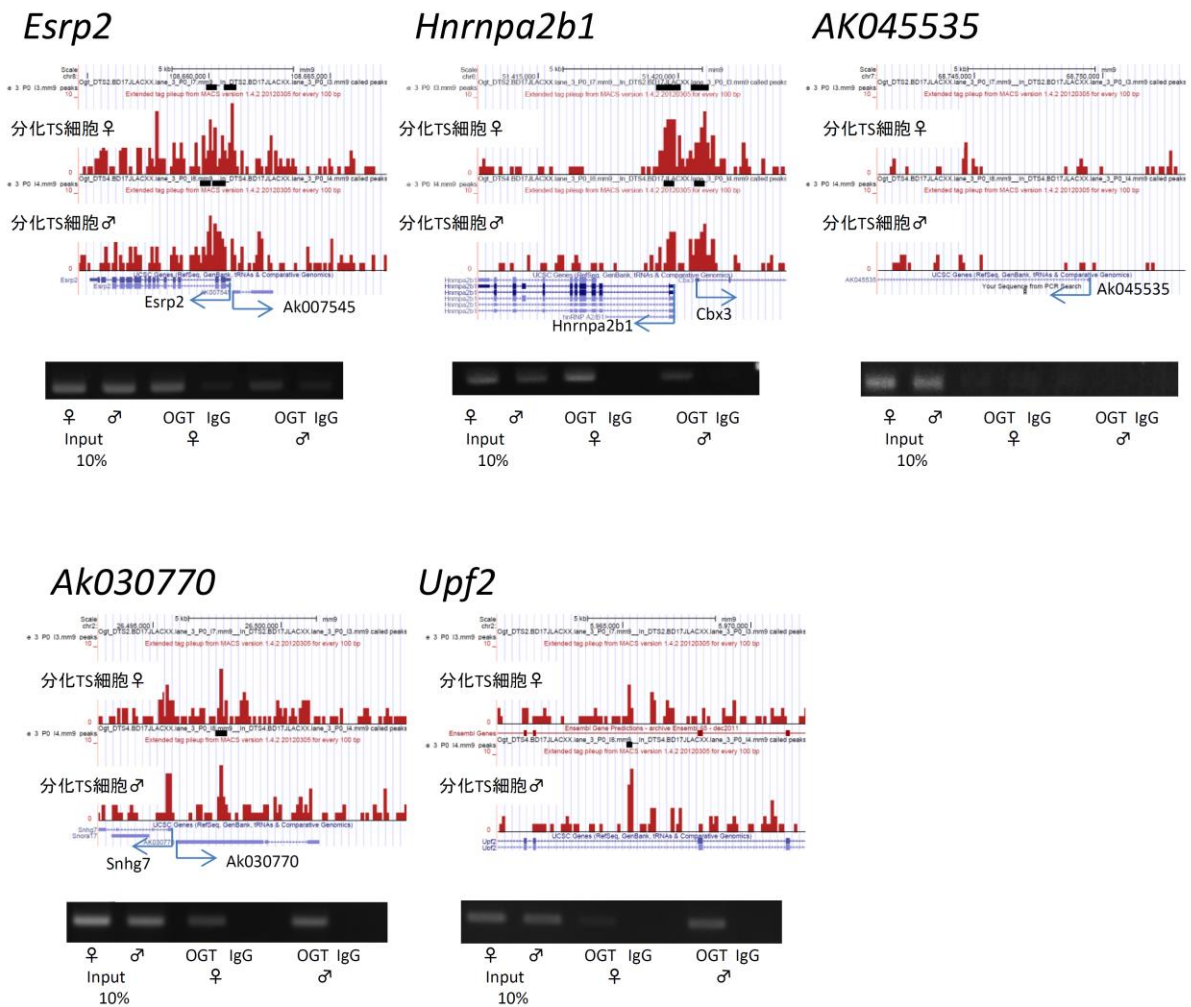


図 3-3 ChIP-seqで得られた分化TS細胞におけるOGTの結合をChIP-PCRにより確認
 雌雄の分化TS細胞において、共に結合している領域(*Esrp2*, *Hnrnpa2b1*)
 およびオスでのみシグナルの認められる領域(*Ak030770*, *Upf2*)及び非結合領域(*AK045535*)を解析した。
 上から分化TS細胞のメス、分化TS細胞オスのデータ、ChIP-PCRによる解析データが並んでいる。
 各シグナル上の黒いバンドが有意に結合していると計算された領域であり、この領域をChIP-PCRにより解析した。

***Mgea5*は分化TS細胞においてメスの方がオスよりも高発現である**

興味深いことに、*Mgea5* (*Oga*) 遺伝子にも OGT の結合領域が存在した (図 3-4A)。*Mgea5* は OGA (O-GlcNAcase) をコードする遺伝子であり、OGA は OGT が付加する O-GlcNAc 修飾を除去する唯一の酵素である。この領域は分化 TS 細胞では結合が認められたが、未分化 TS 細胞では結合が認められなかった。さらに分化 TS 細胞では、メスの方がオスより多く OGT が結合していた。

それでは、*Mgea5* の発現量にも分化 TS 細胞においても性差が認められるのだろうか。RT-PCR による解析の結果、未分化 TS 細胞は発現量に性差が認められないのに対して、分化 TS 細胞及び胎盤において、メスの方がオスよりも発現が高いことが明らかとなった (図 3-4B)。この傾向は、RT-qPCR でも確認された (図 3-4C)。一方タンパクレベルでは未分化 TS 細胞の方が分化 TS 細胞よりも高かった (図 3-4D)。また分化 TS 細胞ではメスの方が高かった。

Mgea5 遺伝子座について、RL2 抗体を用いて ChIP により O-GlcNAc 修飾タンパク量を調べたところ、メスの分化 TS 細胞はオスの分化 TS 細胞に比べて、OGT 結合領域の O-GlcNAc 修飾タンパク量が多いことが明らかとなった (図 3-4E)。またメスの TS 細胞は分化に伴い O-GlcNAc 修飾タンパク量が高くなることが明らかになった。

さらにヒストン H3 のアセチル化状態を調べた結果、メスの分化 TS 細胞の方がオスの分化 TS 細胞よりも高アセチル化状態であった (図 3-4F)。また未分化 TS 細胞の方が、分化 TS 細胞よりも高アセチル化状態であった。未分化 TS 細胞では O-GlcNAc 修飾とアセチル化には相関が認められなかったが、分化 TS 細胞では O-GlcNAc 修飾とヒストンアセチル化に正の相関が認められた。

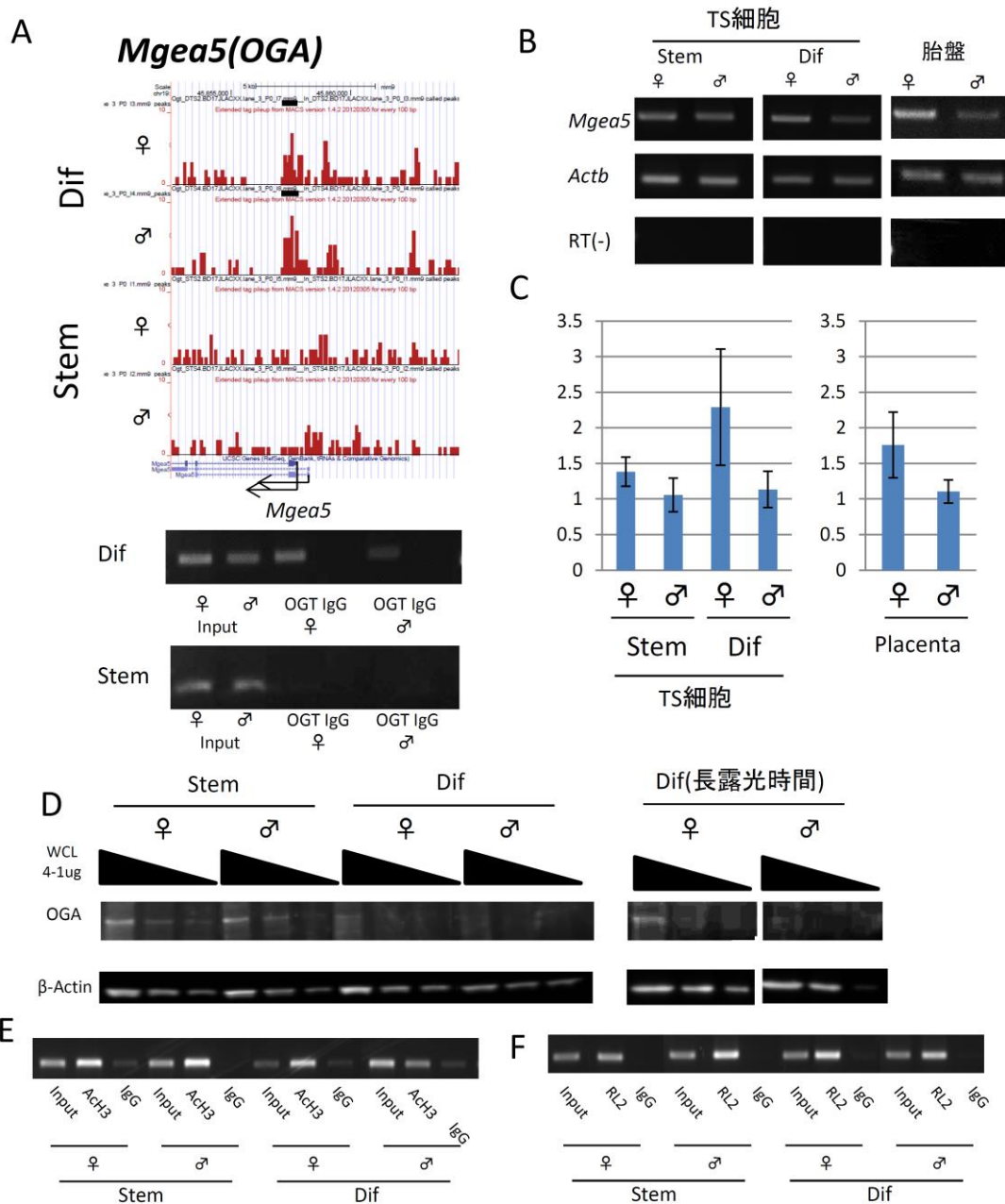


図 3-4 OGAをコードする*Mgea5*遺伝子領域の解析

A CHIP-PCRの結果 *Mgea5*遺伝子領域に対するOGTの結合解析

上から分化TS細胞のメス、分化TS細胞オス、未分化TS細胞のメス、未分化TS細胞オスのデータ、CHIP-PCRによる解析データが並んでいる。各シグナル上の黒いバンドが有意に結合していると計算された領域であり、この領域をCHIP-PCRにより解析した。

B RT-PCRによる*Mgea5*遺伝子発現解析

C qRT-PCRによる*Mgea5*遺伝子発現解析

D ウェスタンブロットによる、TS細胞におけるOGAの発現解析

E 抗ACh3抗体を用いたChIP解析

F 抗O-GlcNAc抗体(RL2)を用いたChIP解析

細胞全体として O-GlcNAc 修飾に顕著な性差はない

OGT の発現量がメスで高い一方で、OGA もメスで高いため、O-GlcNAc 修飾自体には全体として差が生じないように平衡が保たれていると考えられる。実際に、細胞レベルのタンパクの O-GlcNAc 修飾を Western blot および免疫染色により解析すると、分化 TS 細胞における O-GlcNAc 修飾レベルに関して、顕著な性差が認められなかった(図 3-5)。しかし、未分化 TS 細胞の方が分化 TS 細胞よりも O-GlcNAc レベルが高かった(図 3-5)。

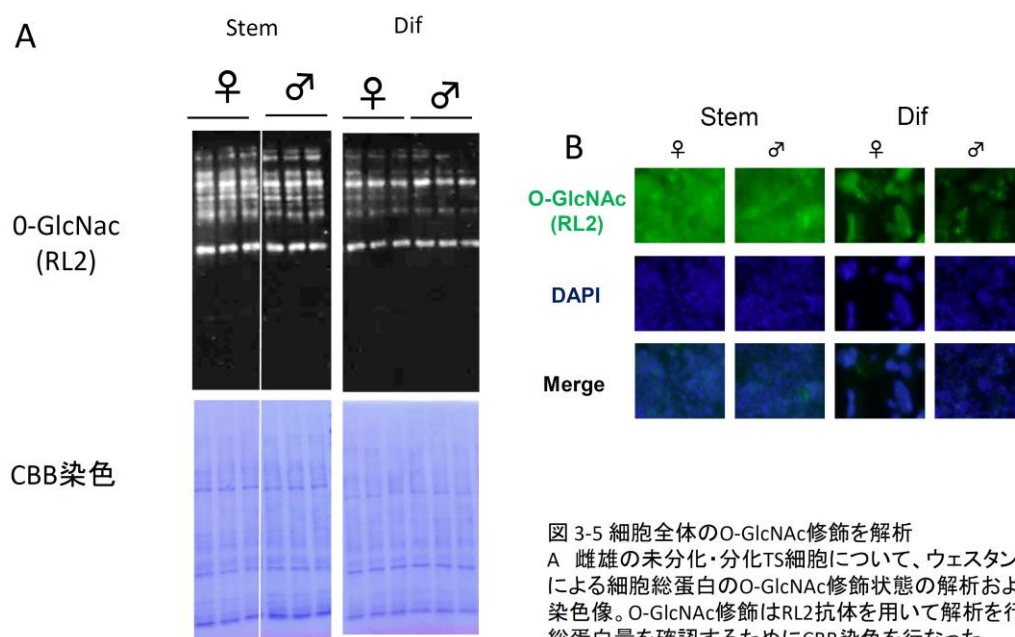


図 3-5 細胞全体の O-GlcNAc 修飾を解析

A 雌雄の未分化・分化 TS 細胞について、ウェスタンブロットによる細胞総蛋白の O-GlcNAc 修飾状態の解析および CBB 染色像。O-GlcNAc 修飾は RL2 抗体を用いて解析を行なった。総蛋白量を確認するために CBB 染色を行なった。
B 免疫染色による O-GlcNAc 修飾の解析。核は DAPI を用いて染色した。

考察

本研究では OGT の標的領域を複数同定した。分化 TS 細胞において、メスの方がオスよりも多数の結合領域が同定された。また、OGT の結合領域はメスの方が多く結合している領域とオスの方が多く結合している領域が存在した。このように同じ OGT の結合領域でも雌雄で結合量が違うということが明らかになった。

メスの方が多く結合する領域の一つに *Mgea5* (*Oga*) のプロモーター領域が同定された。さらに *Mgea5* の発現量はメスの方が高かった。またタンパク量もメスの方が多かった。OGT は唯一の O-GlcNAc 修飾付加タンパクであり、OGA は唯一の O-GlcNAc 除去タンパクである。OGT の発現量が OGA の発現量に影響を与えることを示唆する報告が二つある。一つ目は OGT の欠損で OGA の発現が低下すること (Kazemi et al., 2010)。二つ目は、OGT を shRNA でノックダウンすると OGA の発現が低下することである (Yang et al., 2012)。OGT が *Mgea5* 遺伝子領域に結合するという事実を鑑みると、OGT の発現量の性差は OGA の発現量を調整することで細胞レベルの O-GlcNAc 修飾量を調整しようとしているのだろう。

分化 TS 細胞も栄養膜巨細胞同様、多核細胞である。本研究で雌雄の分化 TS 細胞における OGT 及び OGA の遺伝子発現パターンが雌雄の胎盤と同じであった。このことから本研究で、分化 TS 細胞を用いて明らかにした OGT の発現量の性差による OGT の標的領域への影響は栄養膜巨細胞においても見られる変化であろう。

ES 細胞における OGT の結合領域は、転写開始点付近にあり、CpG island を有する遺伝子が多い (Vella et al., 2013)。TS 細胞でも同様だった。OGT の結合領域は細胞・組織問わず、転写開始点近傍にあることになる。

OGT はこれまで、SET1 などとの相互作用し、H3K4m3 などのヒストン修飾に関与することが示されている (Deplus et al., 2013)。また TET2 や TET3 と結合することでクロマチン領域にリクルートされると考えられている (Chen et al., 2013)。このことから OGT は O-GlcNAc 修飾のみならず、他のヒストン修飾や DNA メチル化にまで影響を与えることが予想される。*Mgea5* 遺伝子領域の O-GlcNAc 修飾量は分化 TS 細胞においてメスの方が多かった。このことから OGT による発現性差を生じさせる要因の一つに *Mgea5* 遺伝子領域のヒストン O-GlcNAc 修飾が関与していることが考えられた。しかし、上述したように OGT の影響は他のヒストン修飾や DNA メチル化状態にも寄与しているのかもしれない。OGA は一方で、OGA 自身にヒストンアセチル化活性を有するドメインを持つ。さらに OGA とヒストンアセチル化酵素の相互作用があるという報告もある (Hayakawa et al., 2013)。OGT は O-GlcNAc 化を司る唯一の酵素であり、OGA は O-GlcNAc 修飾を外す唯一の酵素である。また他のヒストンアセチル化酵素と相互作用することも示唆されている。このように OGA はヒストンアセチル化との関係が報告されている。

このように、OGTはDNAメチル化やヒストンH3K4のメチル化と、OGAはヒストンのアセチル化との関係が報告されている、このことは、仮にOGTおよびOGAがO-GlcNAc修飾量の平衡に保とうとしても、O-GlcNAc修飾以外のエピジェネティック修飾には性差を生じさせる可能性を示唆している。

また、OGTとOGAの量が雌雄で異なることは、外的要因に対する反応に性差を生じさせることにつながるものが容易に予想される。OGTは栄養依存的に働く因子の一つである。OGTの発現の性差は栄養状態が極端に変化することを起因とする疾患のリスクの性差をもたらしているのではないだろうか。本研究ではTS細胞における細胞全体のO-GlcNAc修飾に顕著な差異が認められなかったが、例えば、胎盤の遺伝子発現は栄養状態により変化することが知られており、さらにその変化には性差があるという報告がある(Gabory et al., 2012, Mao et al., 2010)。胎盤の重量や出生時の重量は心血管及び代謝関連の疾病のリスクに相関している。このことは、多くの動物実験及びヒトの研究で明らかにされつつあり、子宮内における胎仔期の栄養制限が将来の慢性病になるようにプログラミングしている(Barker et al., 1993)。

分化TS細胞におけるOGAの発現がOGTと同様メスで高いため、O-GlcNAc修飾は雌雄を狭める方向に作用して同程度になっている。しかし、OGTは*Mgea5*遺伝子領域に結合しており、その領域のO-GlcNAc修飾はメスの方が高いということから、特定の遺伝子領域ではOGTの結合、O-GlcNAc修飾量に性差があると考えられる。

総合討論

エピジェネティック制御に性差が存在する

各組織の雌雄差は、生理学的な違いおよび遺伝子発現の違いを中心に記述されてきた。そして、Y染色体上の遺伝子 *Sry* の有無によって決定される雌性、雄性生殖器の形成による性ステロイドの違いが、遺伝子発現に見られる性差を形成させていると考えられてきた。

本研究から肝臓において、性ステロイドがエピジェネティック制御因子をコードする常染色体上の遺伝子発現量を制御していることが明らかとなった。このことは、性ステロイドがエピジェネティック制御因子量に性差を生じさせている可能性を示している。また、X染色体上には *Ogt* や *Utx*, *Jarid1c*, *Mecp2* など様々なエピジェネティック制御因子をコードする遺伝子があるため、これらエピジェネティック制御因子の発現量の性差はゲノムワイドなエピジェネティック修飾の性差をもたらすと考えられた。本研究では栄養膜細胞において *Ogt* の遺伝子発現に性差が認められることを明らかにした。

OGT の ChIP-PCR 解析から、エピジェネティック制御因子である OGT 量の性差はターゲット領域への結合量にも影響を与えることが明らかとなった。OGT の結合領域の O-GlcNAc 修飾量にも性差が見られたことから、エピジェネティック制御因子である OGT 量の性差が結合領域のエピジェネティック修飾に性差を与えることに疑う余地はない。OGT はヒストンの H3K4 のメチル化酵素と相互作用がある。さらに H3K4m3 とヒストンアセチル化の関連も示されている (Hazzalin and Mahadevan, 2005, Crump et al., 2011)。 *Mgea5* 領域に認められた O-GlcNAc 修飾量の性差は、分化 TS 細胞においてヒストンアセチル化レベルと正の相関を示した。このことは O-GlcNAc 修飾とヒストンアセチル化に相関関係があることを示唆している。また *Mgea5* 遺伝子は分化 TS 細胞および胎盤において性依存的な遺伝子発現を示した。このように、エピジェネティック制御因子量の性差は、標的領域のエピジェネティック修飾量および、標的領域近傍の遺伝子発現量に性差を与えうるのである。ただし、エピジェネティック修飾の性差は必ずしも発現と相関しない。肝臓で同定された S-DMR 近傍の遺伝子は、発現量に性差が認められないものが多数であった。遺伝子発現と相関しないエピジェネティック修飾の性差は、局所的なクロマチン構造の変化、トランスポゾンの転移などに影響を与えると考えられる。

組織依存的なエピジェネティック性差

肝臓は発現量に性差を示す遺伝子数が脳よりも多く、また性差を示す遺伝子も組織特異的である (Yang et al., 2006)。第1章の結果から、エピジェネティック修飾の性差も、組織特異的であることが示された。本研究で同定した S-DMR における DNA メチル化状態は肝臓でのみ異なり、脳や ES 細胞では DNA メチル化率に性差は認められなかった。

テストステロンは血中を巡り、全身に影響を与える。しかし、本研究で同定した S-DMR について、テストステロンの影響を受けるのはオスの肝臓だけであった。この結果は非常に驚くべきことである。特定遺伝子座に着目すると、全身性に影響を与えうる性ステロイドが組織依存的な変化をもたらしているのである。このことは、性ステロイドのゲノムへの影響に組織特異性があることを示している。

また、性依存的なエピジェネティック制御因子量の違いは組織特異的な違いがあった。DNMT や TET2 の発現は肝臓で性差が認められるが、胎盤では性差がない。*Ogt* の発現の性差は胎盤でのみ認められ、脳や肝臓では性差はない。また脳における X 染色体上の遺伝子である *Jarid1c* の発現量は、メスの方がオスよりも多く、この性差は肝臓では認められない (Xu et al., 2008)。さらに脳では *Utx* の遺伝子発現量の性差も報告されている (Xu et al., 2002)。このように X 染色体には、多数のエピジェネティック制御因子がコードされており、性依存的な発現パターンを有する。*Jarid1c* や *Utx* には相同遺伝子である *Jarid1d* 及び *Uty* が存在 Y 染色体上に存在する。しかし、相同遺伝子は同じ役割を有するわけではない。例えば、*Utx* はヒストン H3K27 のジメチル化活性を有するが、*Uty* には H3K27 ジメチル化活性がないことが *in vitro* の実験で調べられている (Shpargel et al., 2012)。このように脳において *Utx* もまた性差を生じさせる原因となると考えられる。これらのように、組織特異的なエピジェネティック制御因子量の性差が組織特異的なエピジェネティック修飾の性差を形成していると考えられた。

ゲノム全体でのバランス維持

分化 TS 細胞及び胎盤の解析から、エピジェネティック制御因子をコードする遺伝子発現は付加/除去酵素でバランスをとっていた。OGT/OGA のように、OGT は DNA 脱メチル化に関与する TET タンパク質やヒストンメチル化酵素と、OGA はヒストンアセチル化酵素とそれぞれ相互作用することが示されている。また、この他にもエピジェネティック因子の相互作用は多数報告されている。よって、仮に1つのエピジェネティック修飾量がゲノム全体で一定に保たれても、個々の領域のエピジェネティック修飾に性差を生じさせることが考えられる。

エピジェネティック修飾に影響を与える性ステロイドと疾患

第1章より、オスにおける S-DMR の DNA 低メチル化状態はテストステロンによって維持されていたことが明らかになった。また、精巣除去によりオス肝臓において TET2 のタンパク量が低下していた。本研究ではエストロゲンによるエピジェネティックな変化は示していないがエストロゲン依存的なエピジェネティック制御の報告がある (Singh et al., *Biogerontology*, 2008, 9(6):455)。このように性ステロイドがエピジェネティック制御に影響を与えることは間違いない。ヒトにおいて、老化に伴い女性はエストロゲンの減少、男性ではテストステロンの減少が見られ、更年期障害となる。更年期障害の症状は、自律神経失調症様の症状、脈が速くなる（頻脈）、動悸がする、血圧が激しく上下する、腹痛、微熱などがある。このように、性ステロイドの血中濃度の低下は全身に影響する。

肝臓において、テストステロン依存的に DNA メチル化が変化することを踏まえると、更年期障害も各組織におけるエピジェネティックな変化を伴っていることが予想される。更年期障害の治療に性ステロイドが用いられる。この治療法は、性ステロイドの量によって変化してしまうエピジェネティックな変化を元に戻すことで効果を得ているのかもしれない。逆に男性における前立腺がんでは、テストステロンの分泌を低下させるようなホルモン治療を行う。乳がんの治療にはエストロゲンを合成する酵素の阻害剤が用いられる。これら性ステロイドの合成阻害剤を用いた治療もまた、全身のエピジェネティック状態を変化させる要因となっているだろう。

エピジェネティック修飾に影響を与える栄養と疾患

エピジェネティック修飾の基質や補酵素は、栄養因子を由来とする。O-GlcNAc 修飾の基質はグルコースから合成される。グルコースはデンプン等の糖類からばかりでなく、糖源性アミノ酸やグリセロールからも糖新生によって補充される。DNA メチル化の基質になる SAM(S-アデノシルメチオニン)の合成に必要なビタミン B12 や葉酸も食餌から得られる。ヒストンアセチル化の基質となる Acetyl CoA はグルコースや脂肪酸から合成される。

栄養因子の多寡は異常なエピジェネティック修飾をもたらす。例えば、ビタミン B12、葉酸の摂取不足が異常な脱 DNA メチル化修飾をもたらし、さらにラットの肝臓の発症リスクを上昇させるという報告がある (Brunaud et al., 2003)。また、栄養の多寡が胎盤の遺伝子発現に影響を与えることも示されている (Gallou-Kabani et al., 2010)。

胎盤において HFD(High fat diet)を与えた時も CD(control diet)を与えた時も OGT の発現量の性差は維持されている。しかし、HFD および CD を与えたときに変化する胎盤の遺伝子発現プロファイルには性差がある。よって、この性差が生じている原因は本研究から OGT である可能性が考えられた。周産期の栄養状態は子孫の将来の疾患のリスクにも、性依存的に影響を与えるという報告が多数ある (Brunaud et al., 2003)。胎仔と胎盤には密接な関係がある事から考えて、周産期の栄養状態は性依存的な影響を胎盤に与え、胎仔の将来の疾患のリスクにまで影響を与えるのだろう。

総括

性差は外部、内部生殖器以外にも、組織重量、体重という形で認められる。また疾患のリスクにも認められている。本研究では、性ステロイドがエピジェネティック修飾を変えるということだけでなく、X染色体上の遺伝子の性差、及びその影響が見えてきた(図4-1)。エピジェネティック修飾は、DNAメチル化-ヒストン修飾、ヒストン修飾-ヒストン修飾間で相互作用しており、性ステロイドや OGT 量による性差の影響も多岐に渡ることが推察される。また本研究より、エピジェネティック修飾とその制御系には組織特異的な性差があることが示された。このことは、例えば細胞数(組織の大きさ)の規定、疾患のリスクなどの性差を研究するうえで重要な知見となる。

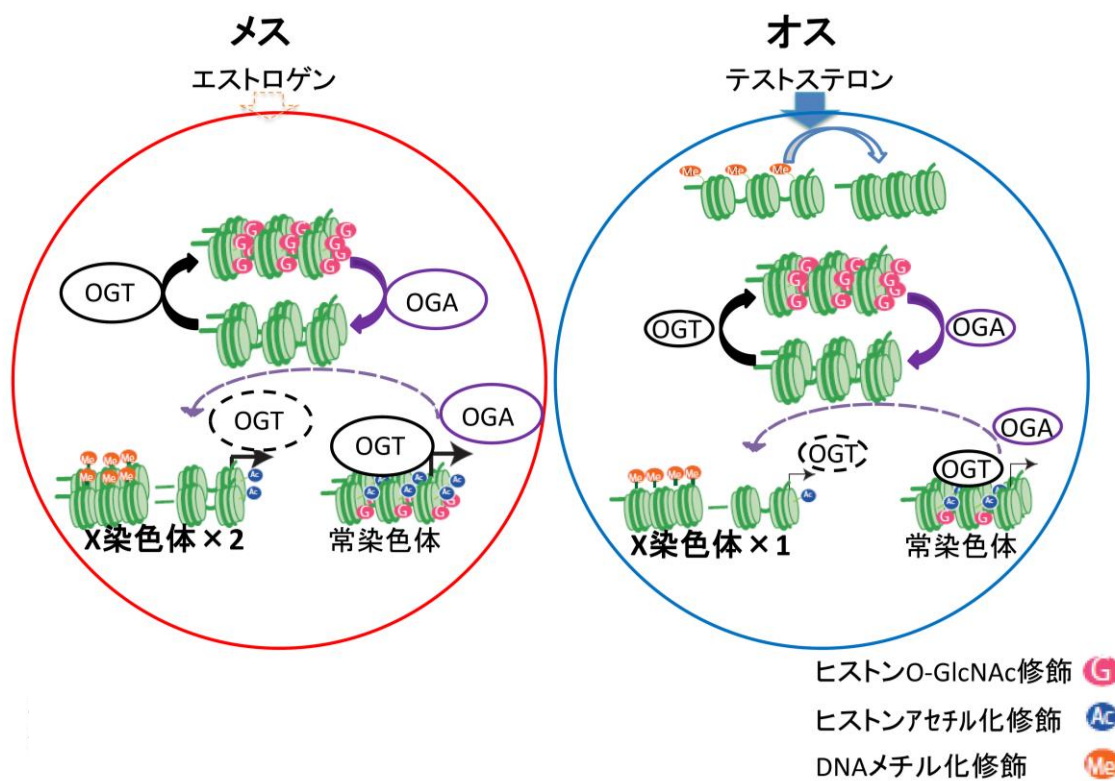


図 4-1 性依存的なエピジェネティック制御

性ステロイド及びX染色体不活性化を免れるエピジェネティック制御因子 OGT が雌雄で異なるエピジェネティック修飾状態を生じさせる。OGT の発現量の性差は、*Oga* 遺伝子領域への結合量、エピジェネティック修飾及び OGA の発現にも性差を生じさせた。その結果、細胞全体での O-GlcNAc 修飾に顕著な性差は認められなかった。

引用文献

- AGARWAL, N., HARDT, T., BRERO, A., NOWAK, D., ROTHBAUER, U., BECKER, A., LEONHARDT, H. & CARDOSO, M. C. 2007. MeCP2 interacts with HP1 and modulates its heterochromatin association during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res*, 35, 5402-8.
- AGGER, K., CLOOS, P. A., CHRISTENSEN, J., PASINI, D., ROSE, S., RAPPSILBER, J., ISSAEVA, I., CANAANI, E., SALCINI, A. E. & HELIN, K. 2007. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature*, 449, 731-4.
- ARAI, Y., OHGANE, J., YAGI, S., ITO, R., IWASAKI, Y., SAITO, K., AKUTSU, K., TAKATORI, S., ISHII, R., HAYASHI, R., IZUMI, S., SUGINO, N., KONDO, F., HORIE, M., NAKAZAWA, H., MAKINO, T. & SHIOTA, K. 2011. Epigenetic assessment of environmental chemicals detected in maternal peripheral and cord blood samples. *J Reprod Dev*, 57, 507-17.
- BACHMANN, J., FELDMER, M., GANTEN, U., STOCK, G. & GANTEN, D. 1991. Sexual dimorphism of blood pressure: possible role of the renin-angiotensin system. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40, 511-5.
- BAKOS, H. W., MITCHELL, M., SETCHELL, B. P. & LANE, M. 2011. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl*, 34, 402-10.
- BARKER, D. J., HALES, C. N., FALL, C. H., OSMOND, C., PHIPPS, K. & CLARK, P. M. 1993. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*, 36, 62-7.
- BENZ, K. & AMANN, K. 2010. Maternal nutrition, low nephron number and arterial hypertension in later life. *Biochim Biophys Acta*, 1802, 1309-17.
- BERLETCH, J. B., DENG, X., NGUYEN, D. K. & DISTECHE, C. M. 2013. Female bias in Rhox6 and 9 regulation by the histone demethylase KDM6A. *PLoS Genet*, 9, e1003489.
- BERNSTEIN, B. E., MIKKELSEN, T. S., XIE, X., KAMAL, M., HUEBERT, D. J., CUFF, J., FRY, B., MEISSNER, A., WERNIG, M., PLATH, K., JAENISCH, R., WAGSCHAL, A., FEIL, R., SCHREIBER, S. L. & LANDER, E. S. 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125, 315-26.
- BOUCHARD, L., HIVERT, M. F., GUAY, S. P., ST-PIERRE, J., PERRON, P. & BRISSON, D. 2012. Placental adiponectin gene DNA methylation levels are associated with mothers' blood glucose concentration. *Diabetes*, 61, 1272-80.
- BROCKDORFF, N. 2013. Noncoding RNA and Polycomb recruitment. *RNA*, 19, 429-42.

- BRUNAUD, L., ALBERTO, J. M., AYAV, A., GÉRARD, P., NAMOUR, F., ANTUNES, L., BRAUN, M., BRONOWICKI, J. P., BRESLER, L. & GUÉANT, J. L. 2003. Effects of vitamin B12 and folate deficiencies on DNA methylation and carcinogenesis in rat liver. *Clin Chem Lab Med*, 41, 1012-9.
- BUTKINAREE, C., PARK, K. & HART, G. W. 2010. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta*, 1800, 96-106.
- BÜDEFELD, T., GRGUREVIC, N., TOBET, S. A. & MAJDIC, G. 2008. Sex differences in brain developing in the presence or absence of gonads. *Dev Neurobiol*, 68, 981-95.
- CAI, Y., GEUTJES, E. J., DE LINT, K., ROEPMAN, P., BRUURS, L., YU, L. R., WANG, W., VAN BLIJSWIJK, J., MOHAMMAD, H., DE RINK, I., BERNARDS, R. & BAYLIN, S. B. 2013. The NuRD complex cooperates with DNMTs to maintain silencing of key colorectal tumor suppressor genes. *Oncogene*.
- CALABRESE, J. M., SUN, W., SONG, L., MUGFORD, J. W., WILLIAMS, L., YEE, D., STARMER, J., MIECZKOWSKI, P., CRAWFORD, G. E. & MAGNUSON, T. 2012. Site-specific silencing of regulatory elements as a mechanism of X inactivation. *Cell*, 151, 951-63.
- CALDWELL, S. A., JACKSON, S. R., SHAHRIARI, K. S., LYNCH, T. P., SETHI, G., WALKER, S., VOSELLER, K. & REGINATO, M. J. 2010. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene*, 29, 2831-42.
- CAMERON, E. E., BACHMAN, K. E., MYÖHÄNEN, S., HERMAN, J. G. & BAYLIN, S. B. 1999. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet*, 21, 103-7.
- CARETTI, G., SALSI, V., VECCHI, C., IMBRIANO, C. & MANTOVANI, R. 2003. Dynamic recruitment of NF-Y and histone acetyltransferases on cell-cycle promoters. *J Biol Chem*, 278, 30435-40.
- CASAS, J. H. & CHANG, M. C. 1970. Effects of subcutaneous implantation or intrauterine insertion of silastic tube containing steroids on the fertility of rats. *Biol Reprod*, 2, 315-25.
- CHATTERJEE, R. & VINSON, C. 2012. CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. *Biochim Biophys Acta*, 1819, 763-70.
- CHEN, Q., CHEN, Y., BIAN, C., FUJIKI, R. & YU, X. 2013. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature*, 493, 561-4.

- CLODFELTER, K. H., HOLLOWAY, M. G., HODOR, P., PARK, S. H., RAY, W. J. & WAXMAN, D. J. 2006. Sex-dependent liver gene expression is extensive and largely dependent upon signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b): STAT5b-dependent activation of male genes and repression of female genes revealed by microarray analysis. *Mol Endocrinol*, 20, 1333-51.
- COMTESSE, N., MALDENER, E. & MEESE, E. 2001. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 283, 634-40.
- CORBEL, C., DIABANGOUAYA, P., GENDREL, A. V., CHOW, J. C. & HEARD, E. 2013. Unusual chromatin status and organization of the inactive X chromosome in murine trophoblast giant cells. *Development*, 140, 861-72.
- CRUMP, N. T., HAZZALIN, C. A., BOWERS, E. M., ALANI, R. M., COLE, P. A. & MAHADEVAN, L. C. 2011. Dynamic acetylation of all lysine-4 trimethylated histone H3 is evolutionarily conserved and mediated by p300/CBP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 7814-9.
- DE WET, J. R., WOOD, K. V., HELINSKI, D. R. & DELUCA, M. 1985. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 7870-3.
- DENNIS, G., SHERMAN, B. T., HOSACK, D. A., YANG, J., GAO, W., LANE, H. C. & LEMPICKI, R. A. 2003. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*, 4, P3.
- DENOMME, M. M. & MANN, M. R. 2013. Maternal control of genomic imprint maintenance. *Reprod Biomed Online*, 27, 629-36.
- DEPLUS, R., DELATTE, B., SCHWINN, M. K., DEFRANCE, M., MÉNDEZ, J., MURPHY, N., DAWSON, M. A., VOLKMAR, M., PUTMANS, P., CALONNE, E., SHIH, A. H., LEVINE, R. L., BERNARD, O., MERCHER, T., SOLARY, E., URH, M., DANIELS, D. L. & FUKS, F. 2013. TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *EMBO J*, 32, 645-55.
- DIAS, W. B. & HART, G. W. 2007. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol Biosyst*, 3, 766-72.
- EDÉN, S. 1979. Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 105, 555-60.
- ERNST, J., KHERADPOUR, P., MIKKELSEN, T. S., SHORESH, N., WARD, L. D., EPSTEIN, C. B., ZHANG, X., WANG, L., ISSNER, R., COYNE, M., KU, M., DURHAM, T., KELLIS, M. & BERNSTEIN, B. E. 2011. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*, 473, 43-9.

- FERNANDEZ, C. D., BELLENTANI, F. F., FERNANDES, G. S., PEROBELLI, J. E., FAVARETO, A. P., NASCIMENTO, A. F., CICOONA, A. C. & KEMPINAS, W. D. 2011. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol*, 9, 32.
- FERREIRA, J. C., CHOUFANI, S., GRAFODATSKAYA, D., BUTCHER, D. T., ZHAO, C., CHITAYAT, D., SHUMAN, C., KINGDOM, J., KEATING, S. & WEKSBERG, R. 2011. WNT2 promoter methylation in human placenta is associated with low birthweight percentile in the neonate. *Epigenetics*, 6, 440-9.
- FILIBERTO, A. C., MACCANI, M. A., KOESTLER, D., WILHELM-BENARTZI, C., AVISSAR-WHITING, M., BANISTER, C. E., GAGNE, L. A. & MARSIT, C. J. 2011. Birthweight is associated with DNA promoter methylation of the glucocorticoid receptor in human placenta. *Epigenetics*, 6, 566-72.
- FONG, J. J., NGUYEN, B. L., BRIDGER, R., MEDRANO, E. E., WELLS, L., PAN, S. & SIFERS, R. N. 2012. β -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a novel regulator of mitosis-specific phosphorylations on histone H3. *J Biol Chem*, 287, 12195-203.
- FRANCHINI, D. M., SCHMITZ, K. M. & PETERSEN-MAHRT, S. K. 2012. 5-Methylcytosine DNA demethylation: more than losing a methyl group. *Annu Rev Genet*, 46, 419-41.
- FROMMER, M., MCDONALD, L. E., MILLAR, D. S., COLLIS, C. M., WATT, F., GRIGG, G. W., MOLLOY, P. L. & PAUL, C. L. 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1827-31.
- FUJIKI, R., HASHIBA, W., SEKINE, H., YOKOYAMA, A., CHIKANISHI, T., ITO, S., IMAI, Y., KIM, J., HE, H. H., IGARASHI, K., KANNO, J., OHTAKE, F., KITAGAWA, H., ROEDER, R. G., BROWN, M. & KATO, S. 2011. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature*, 480, 557-60.
- FUJITA, N., WATANABE, S., ICHIMURA, T., TSURUZOE, S., SHINKAI, Y., TACHIBANA, M., CHIBA, T. & NAKAO, M. 2003. Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem*, 278, 24132-8.
- FUKS, F., HURD, P. J., DEPLUS, R. & KOUZARIDES, T. 2003a. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, 31, 2305-12.
- FUKS, F., HURD, P. J., WOLF, D., NAN, X., BIRD, A. P. & KOUZARIDES, T. 2003b. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem*, 278, 4035-40.
- GABORY, A., FERRY, L., FAJARDY, I., JOUINEAU, L., GOTHIE, J. D., VIGÉ, A., FLEUR, C.,

- MAYEUR, S., GALLOU-KABANI, C., GROSS, M. S., ATTIG, L., VAMBERGUE, A., LESAGE, J., REUSENS, B., VIEAU, D., REMACLE, C., JAIS, J. P. & JUNIEN, C. 2012. Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta. *PLoS One*, 7, e47986.
- GALLOU-KABANI, C., GABORY, A., TOST, J., KARIMI, M., MAYEUR, S., LESAGE, J., BOUDADI, E., GROSS, M. S., TAURELLE, J., VIGÉ, A., BRETON, C., REUSENS, B., REMACLE, C., VIEAU, D., EKSTRÖM, T. J., JAIS, J. P. & JUNIEN, C. 2010. Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. *PLoS One*, 5, e14398.
- GIARDINE, B., RIEMER, C., HARDISON, R. C., BURHANS, R., ELNITSKI, L., SHAH, P., ZHANG, Y., BLANKENBERG, D., ALBERT, I., TAYLOR, J., MILLER, W., KENT, W. J. & NEKRUTENKO, A. 2005. Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res*, 15, 1451-5.
- GREENFIELD, A., CARREL, L., PENNISI, D., PHILIPPE, C., QUADERI, N., SIGGERS, P., STEINER, K., TAM, P. P., MONACO, A. P., WILLARD, H. F. & KOOPMAN, P. 1998. The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans. *Hum Mol Genet*, 7, 737-42.
- GUINEZ, C., MIR, A. M., DEHENNAUT, V., CACAN, R., HARDUIN-LEPERS, A., MICHALSKI, J. C. & LEFEBVRE, T. 2008. Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation. *FASEB J*, 22, 2901-11.
- HADJANTONAKIS, A. K., COX, L. L., TAM, P. P. & NAGY, A. 2001. An X-linked GFP transgene reveals unexpected paternal X-chromosome activity in trophoblastic giant cells of the mouse placenta. *Genesis*, 29, 133-40.
- HANOVER, J. A., KRAUSE, M. W. & LOVE, D. C. 2012. Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 312-21.
- HANOVER, J. A., YU, S., LUBAS, W. B., SHIN, S. H., RAGANO-CARACCIOLA, M., KOCHRAN, J. & LOVE, D. C. 2003. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch Biochem Biophys*, 409, 287-97.
- HATTORI, N., IMAO, Y., NISHINO, K., OHGANE, J., YAGI, S., TANAKA, S. & SHIOTA, K. 2007. Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. *Genes Cells*, 12, 387-96.
- HATTORI, N., NISHINO, K., KO, Y. G., OHGANE, J., TANAKA, S. & SHIOTA, K. 2004. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem*, 279, 17063-9.

- HAYAKAWA, K., HIROSAWA, M., TABEL, Y., ARAI, D., TANAKA, S., MURAKAMI, N., YAGI, S. & SHIOTA, K. 2013. Epigenetic switching by the metabolism-sensing factors in the generation of orexin neurons from mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 288, 17099-110.
- HAYAKAWA, K., NAKANISHI, M. O., OHGANE, J., TANAKA, S., HIROSAWA, M., SOARES, M. J., YAGI, S. & SHIOTA, K. 2012. Bridging sequence diversity and tissue-specific expression by DNA methylation in genes of the mouse prolactin superfamily. *Mamm Genome*, 23, 336-45.
- HAZZALIN, C. A. & MAHADEVAN, L. C. 2005. Dynamic acetylation of all lysine 4-methylated histone H3 in the mouse nucleus: analysis at *c-fos* and *c-jun*. *PLoS Biol*, 3, e393.
- HEINTZMAN, N. D., STUART, R. K., HON, G., FU, Y., CHING, C. W., HAWKINS, R. D., BARRERA, L. O., VAN CALCAR, S., QU, C., CHING, K. A., WANG, W., WENG, Z., GREEN, R. D., CRAWFORD, G. E. & REN, B. 2007. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet*, 39, 311-8.
- HEMBERGER, M. 2002. The role of the X chromosome in mammalian extra embryonic development. *Cytogenet Genome Res*, 99, 210-7.
- HIMENO, E., TANAKA, S. & KUNATH, T. 2008. Isolation and manipulation of mouse trophoblast stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, Chapter 1, Unit 1E.4.
- HOIVIK, E. A., WITSOE, S. L., BERGHEIM, I. R., XU, Y., JAKOBSSON, I., TENGHOLM, A., DOSKELAND, S. O. & BAKKE, M. 2013. DNA methylation of alternative promoters directs tissue specific expression of Epac2 isoforms. *PLoS One*, 8, e67925.
- HOKI, Y., KIMURA, N., KANBAYASHI, M., AMAKAWA, Y., OHHATA, T., SASAKI, H. & SADO, T. 2009. A proximal conserved repeat in the Xist gene is essential as a genomic element for X-inactivation in mouse. *Development*, 136, 139-46.
- HOLLOWAY, M. G., CUI, Y., LAZ, E. V., HOSUI, A., HENNIGHAUSEN, L. & WAXMAN, D. J. 2007. Loss of sexually dimorphic liver gene expression upon hepatocyte-specific deletion of Stat5a-Stat5b locus. *Endocrinology*, 148, 1977-86.
- HOWERTON, C. L., MORGAN, C. P., FISCHER, D. B. & BALE, T. L. 2013. O-GlcNAc transferase (OGT) as a placental biomarker of maternal stress and reprogramming of CNS gene transcription in development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 5169-74.
- IKEGAMI, K., IWATANI, M., SUZUKI, M., TACHIBANA, M., SHINKAI, Y., TANAKA, S., GREALLY, J. M., YAGI, S., HATTORI, N. & SHIOTA, K. 2007. Genome-wide and locus-specific DNA hypomethylation in G9a deficient mouse embryonic stem cells. *Genes Cells*, 12, 1-11.

- IMAMURA, T., OHGANE, J., ITO, S., OGAWA, T., HATTORI, N., TANAKA, S. & SHIOTA, K. 2001. CpG island of rat sphingosine kinase-1 gene: tissue-dependent DNA methylation status and multiple alternative first exons. *Genomics*, 76, 117-25.
- ITO, S., SHEN, L., DAI, Q., WU, S. C., COLLINS, L. B., SWENBERG, J. A., HE, C. & ZHANG, Y. 2011. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 333, 1300-3.
- IWASE, S., LAN, F., BAYLISS, P., DE LA TORRE-UBIETA, L., HUARTE, M., QI, H. H., WHETSTINE, J. R., BONNI, A., ROBERTS, T. M. & SHI, Y. 2007. The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell*, 128, 1077-88.
- IWATANI, M., IKEGAMI, K., KREMENSKA, Y., HATTORI, N., TANAKA, S., YAGI, S. & SHIOTA, K. 2006. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells*, 24, 2549-56.
- JANUCHOWSKI, R., DABROWSKI, M., OFORI, H. & JAGODZINSKI, P. P. 2007. Trichostatin A down-regulate DNA methyltransferase 1 in Jurkat T cells. *Cancer Lett*, 246, 313-7.
- JEGALIAN, K. & PAGE, D. C. 1998. A proposed path by which genes common to mammalian X and Y chromosomes evolve to become X inactivated. *Nature*, 394, 776-80.
- JIN, F. Z., YU, C., ZHAO, D. Z., WU, M. J. & YANG, Z. 2013. A correlation between altered O-GlcNAcylation, migration and with changes in E-cadherin levels in ovarian cancer cells. *Exp Cell Res*, 319, 1482-90.
- JOHNSTON, C. M., LOVELL, F. L., LEONGAMORNERT, D. A., STRANGER, B. E., DERMITZAKIS, E. T. & ROSS, M. T. 2008. Large-scale population study of human cell lines indicates that dosage compensation is virtually complete. *PLoS Genet*, 4, e9.
- JONES, P. L., VEENSTRA, G. J., WADE, P. A., VERMAAK, D., KASS, S. U., LANDSBERGER, N., STROUBOULIS, J. & WOLFFE, A. P. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, 19, 187-91.
- KAKUTANI, T., JEDDELOH, J. A., FLOWERS, S. K., MUNAKATA, K. & RICHARDS, E. J. 1996. Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 12406-11.
- KAMINSKY, Z., WANG, S. C. & PETRONIS, A. 2006. Complex disease, gender and epigenetics. *Ann Med*, 38, 530-44.
- KAN, R., JIN, M., SUBRAMANIAN, V., CAUSEY, C. P., THOMPSON, P. R. & COONROD, S.

- A. 2012. Potential role for PADI-mediated histone citrullination in preimplantation development. *BMC Dev Biol*, 12, 19.
- KATO, M., MIURA, A., BENDER, J., JACOBSEN, S. E. & KAKUTANI, T. 2003. Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposons in Arabidopsis. *Curr Biol*, 13, 421-6.
- KAZEMI, Z., CHANG, H., HASERODT, S., MCKEN, C. & ZACHARA, N. E. 2010. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3beta-dependent manner. *J Biol Chem*, 285, 39096-107.
- KEEMBIYEHETTY, C. N., KRZESLAK, A., LOVE, D. C. & HANOVER, J. A. 2011. A lipid-droplet-targeted O-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome. *J Cell Sci*, 124, 2851-60.
- KEL, A. E., GÖSSLING, E., REUTER, I., CHEREMUSHKIN, E., KEL-MARGOULIS, O. V. & WINGENDER, E. 2003. MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 31, 3576-9.
- KLOSE, R. J. & BIRD, A. P. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*, 31, 89-97.
- KREPPPEL, L. K. & HART, G. W. 1999. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem*, 274, 32015-22.
- KRZEŚLAK, A., FORMA, E., BERNACIAK, M., ROMANOWICZ, H. & BRYŚ, M. 2012. Gene expression of O-GlcNAc cycling enzymes in human breast cancers. *Clin Exp Med*, 12, 61-5.
- KULKARNI, A., DANGAT, K., KALE, A., SABLE, P., CHAVAN-GAUTAM, P. & JOSHI, S. 2011. Effects of altered maternal folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid on placental global DNA methylation patterns in Wistar rats. *PLoS One*, 6, e17706.
- KUMAKI, Y., ODA, M. & OKANO, M. 2008. QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Res*, 36, W170-5.
- LAZARUS, B. D., LOVE, D. C. & HANOVER, J. A. 2006. Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. *Glycobiology*, 16, 415-21.
- LEHNERTZ, B., UEDA, Y., DERIJCK, A. A., BRAUNSCHWEIG, U., PEREZ-BURGOS, L., KUBICEK, S., CHEN, T., LI, E., JENUWEIN, T. & PETERS, A. H. 2003. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol*, 13, 1192-200.
- LI, M. D., RUAN, H. B., SINGH, J. P., ZHAO, L., ZHAO, T., AZARHOUSH, S., WU, J., EVANS, R. M. & YANG, X. 2012. O-GlcNAc transferase is involved in glucocorticoid receptor-mediated transrepression. *J Biol Chem*, 287, 12904-12.

- LIM, H. W., IWATANI, M., HATTORI, N., TANAKA, S., YAGI, S. & SHIOTA, K. 2010. Resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in genic regions compared to non-genic repetitive sequences. *J Reprod Dev*, 56, 86-93.
- LING, G. & WAXMAN, D. J. 2013. DNase I digestion of isolated nuclei for genome-wide mapping of DNase hypersensitivity sites in chromatin. *Methods Mol Biol*, 977, 21-33.
- LOUVEAU, I., CHAUDHURI, S. & ETHERTON, T. D. 1991. An improved method for isolating RNA from porcine adipose tissue. *Anal Biochem*, 196, 308-10.
- LYON, M. F. 1989. X-chromosome inactivation as a system of gene dosage compensation to regulate gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 36, 119-30.
- MAO, J., ZHANG, X., SIELI, P. T., FALDUTO, M. T., TORRES, K. E. & ROSENFELD, C. S. 2010. Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 5557-62.
- MARUYAMA, F., NOZAWA, T., AIKAWA, C., SAKURAI, A. & NAKAGAWA, I. 2009. Cost effective DNA sequencing and template preparation from bacterial colonies and plasmids. *J Biosci Bioeng*, 107, 471-3.
- MATTHEWS, J. C., HORI, K. & CORMIER, M. J. 1977. Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase. *Biochemistry*, 16, 85-91.
- MEINHARDT, U. J. & HO, K. K. 2006. Modulation of growth hormone action by sex steroids. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 65, 413-22.
- MEYDAN, S., KUS, I., TAS, U., OGETURK, M., SANCAKDAR, E., DABAK, D. O., ZARARSIZ, I. & SARSILMAZ, M. 2010. Effects of testosterone on orchietomy-induced oxidative damage in the rat hippocampus. *J Chem Neuroanat*, 40, 281-5.
- MIURA, A., YONEBAYASHI, S., WATANABE, K., TOYAMA, T., SHIMADA, H. & KAKUTANI, T. 2001. Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature*, 411, 212-4.
- MORIYA, K., FUJIE, H., SHINTANI, Y., YOTSUYANAGI, H., TSUTSUMI, T., ISHIBASHI, K., MATSUURA, Y., KIMURA, S., MIYAMURA, T. & KOIKE, K. 1998. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med*, 4, 1065-7.
- NAKAMURA, T., LIU, Y. J., NAKASHIMA, H., UMEHARA, H., INOUE, K., MATOBA, S., TACHIBANA, M., OGURA, A., SHINKAI, Y. & NAKANO, T. 2012. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature*, 486, 415-9.
- NAKANISHI, M. O., HAYAKAWA, K., NAKABAYASHI, K., HATA, K., SHIOTA, K. &

- TANAKA, S. 2012. Trophoblast-specific DNA methylation occurs after the segregation of the trophectoderm and inner cell mass in the mouse periimplantation embryo. *Epigenetics*, 7, 173-82.
- NATARAJAN, A., YARDIMCI, G. G., SHEFFIELD, N. C., CRAWFORD, G. E. & OHLER, U. 2012. Predicting cell-type-specific gene expression from regions of open chromatin. *Genome Res*, 22, 1711-22.
- NGOKA, L. C. 2008. Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers. *Proteome Sci*, 6, 30.
- NISHINO, K., HATTORI, N., TANAKA, S. & SHIOTA, K. 2004. DNA methylation-mediated control of Sry gene expression in mouse gonadal development. *J Biol Chem*, 279, 22306-13.
- NUGENT, B. M., SCHWARZ, J. M. & MCCARTHY, M. M. 2011. Hormonally mediated epigenetic changes to steroid receptors in the developing brain: implications for sexual differentiation. *Horm Behav*, 59, 338-44.
- OKANO, M., BELL, D. W., HABER, D. A. & LI, E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99, 247-57.
- PONNALURI, V. K., MACIEJEWSKI, J. P. & MUKHERJI, M. 2013. A mechanistic overview of TET-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Biochem Biophys Res Commun*, 436, 115-20.
- PRADEEPA, M. M., SUTHERLAND, H. G., ULE, J., GRIMES, G. R. & BICKMORE, W. A. 2012. Psp1/Ledgf p52 binds methylated histone H3K36 and splicing factors and contributes to the regulation of alternative splicing. *PLoS Genet*, 8, e1002717.
- PRICE, S. M., STANHOPE, R., GARRETT, C., PREECE, M. A. & TREMBATH, R. C. 1999. The spectrum of Silver-Russell syndrome: a clinical and molecular genetic study and new diagnostic criteria. *J Med Genet*, 36, 837-42.
- RAMIREZ, M. C., ZUBELDÍA-BRENNER, L., WARGON, V., ORNSTEIN, A. M. & BECU-VILLALOBOS, D. 2013. Expression and methylation status of female-predominant GH-dependent liver genes are modified by neonatal androgenization in female mice. *Mol Cell Endocrinol*, 382, 825-834.
- RECKELHOFF, J. F. 2001. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*, 37, 1199-208.
- ROBERTSON, K. D., AIT-SI-ALI, S., YOKOCHI, T., WADE, P. A., JONES, P. L. & WOLFFE, A. P. 2000. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*, 25, 338-42.

- ROUNTREE, M. R., BACHMAN, K. E. & BAYLIN, S. B. 2000. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*, 25, 269-77.
- SAKABE, K. & HART, G. W. 2010. O-GlcNAc transferase regulates mitotic chromatin dynamics. *J Biol Chem*, 285, 34460-8.
- SAKABE, K., WANG, Z. & HART, G. W. 2010. Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 19915-20.
- SAKAMOTO, H., KOGO, Y., OHGANE, J., HATTORI, N., YAGI, S., TANAKA, S. & SHIOTA, K. 2008. Sequential changes in genome-wide DNA methylation status during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 366, 360-6.
- SARRAF, S. A. & STANCHEVA, I. 2004. Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell*, 15, 595-605.
- SAYESKI, P. P. & KUDLOW, J. E. 1996. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription. *J Biol Chem*, 271, 15237-43.
- SCHEPER, G. C., VAN DER KNAAP, M. S. & PROUD, C. G. 2007. Translation matters: protein synthesis defects in inherited disease. *Nat Rev Genet*, 8, 711-23.
- SCHNEIDER, A., MEHMOOD, T., PANNETIER, S. & HANAUER, A. 2011. Altered ERK/MAPK signaling in the hippocampus of the *mrsk2_KO* mouse model of Coffin-Lowry syndrome. *J Neurochem*, 119, 447-59.
- SELKER, E. U. 1998. Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 9430-5.
- SENNER, C. E., KRUEGER, F., OXLEY, D., ANDREWS, S. & HEMBERGER, M. 2012. DNA Methylation Profiles Define Stem Cell Identity and Reveal a Tight Embryonic-Extraembryonic Lineage Boundary. *Stem Cells*.
- SHAFI, R., IYER, S. P., ELLIES, L. G., O'DONNELL, N., MAREK, K. W., CHUI, D., HART, G. W. & MARTH, J. D. 2000. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5735-9.
- SHARMA, P., AZEBI, S., ENGLAND, P., CHRISTENSEN, T., MØLLER-LARSEN, A., PETERSEN, T., BATSCHÉ, E. & MUCHARDT, C. 2012. Citrullination of Histone H3 Interferes with HP1-Mediated Transcriptional Repression. *PLoS Genet*, 8, e1002934.
- SHIOTA, K., KOGO, Y., OHGANE, J., IMAMURA, T., URANO, A., NISHINO, K., TANAKA, S. & HATTORI, N. 2002. Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem,

- germ and somatic cells in mice. *Genes Cells*, 7, 961-9.
- SHPARGEL, K. B., SENGOKU, T., YOKOYAMA, S. & MAGNUSON, T. 2012. UTX and UTY demonstrate histone demethylase-independent function in mouse embryonic development. *PLoS Genet*, 8, e1002964.
- SINGER, T., YORDAN, C. & MARTIENSSEN, R. A. 2001. Robertson's Mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene Decrease in DNA Methylation (DDM1). *Genes Dev*, 15, 591-602.
- SINGH, K. & PRASAD, S. 2008. Age- and sex-related analysis of methylation of 5'-upstream sequences of Fmr-1 gene in mouse brain and modulation by sex steroid hormones. *Biogerontology*, 9, 455-65.
- SLAWSON, C., ZACHARA, N. E., VOSSELLER, K., CHEUNG, W. D., LANE, M. D. & HART, G. W. 2005. Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem*, 280, 32944-56.
- SMITH, R. G., BETANCOURT, L. & SUN, Y. 2005. Molecular endocrinology and physiology of the aging central nervous system. *Endocr Rev*, 26, 203-50.
- SOLOMON, M. J., LARSEN, P. L. & VARSHAVSKY, A. 1988. Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell*, 53, 937-47.
- SPURGEON, S. L., JONES, R. C. & RAMAKRISHNAN, R. 2008. High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS One*, 3, e1662.
- STANWORTH, S. J., ROBERTS, N. A., SHARPE, J. A., SLOANE-STANLEY, J. A. & WOOD, W. G. 1995. Established epigenetic modifications determine the expression of developmentally regulated globin genes in somatic cell hybrids. *Mol Cell Biol*, 15, 3969-78.
- TACHIBANA, M., SUGIMOTO, K., NOZAKI, M., UEDA, J., OHTA, T., OHKI, M., FUKUDA, M., TAKEDA, N., NIIDA, H., KATO, H. & SHINKAI, Y. 2002. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev*, 16, 1779-91.
- TACHIBANA, M., UEDA, J., FUKUDA, M., TAKEDA, N., OHTA, T., IWANARI, H., SAKIHAMA, T., KODAMA, T., HAMAKUBO, T. & SHINKAI, Y. 2005. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev*, 19, 815-26.
- TAHILIANI, M., KOH, K. P., SHEN, Y., PASTOR, W. A., BANDUKWALA, H., BRUDNO, Y., AGARWAL, S., IYER, L. M., LIU, D. R., ARAVIND, L. & RAO, A. 2009. Conversion

- of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324, 930-5.
- TAKASUGI, M., HAYAKAWA, K., ARAI, D. & SHIOTA, K. 2013. Age- and sex-dependent DNA hypomethylation controlled by growth hormone in mouse liver. *Mech Ageing Dev*, 134, 331-7.
- TAN, M., LUO, H., LEE, S., JIN, F., YANG, J. S., MONTELLIER, E., BUCHOU, T., CHENG, Z., ROUSSEAU, S., RAJAGOPAL, N., LU, Z., YE, Z., ZHU, Q., WYSOCKA, J., YE, Y., KHOCHBIN, S., REN, B. & ZHAO, Y. 2011. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*, 146, 1016-28.
- TANAKA, S., KUNATH, T., HADJANTONAKIS, A. K., NAGY, A. & ROSSANT, J. 1998. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*, 282, 2072-5.
- TERRANOVA, R., AGHERBI, H., BONED, A., MERESSE, S. & DJABALI, M. 2006. Histone and DNA methylation defects at Hox genes in mice expressing a SET domain-truncated form of Mll. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 6629-34.
- THOMAS-CHOLLIER, M., HUFTON, A., HEINIG, M., O'KEEFFE, S., MASRI, N. E., ROIDER, H. G., MANKE, T. & VINGRON, M. 2011. Transcription factor binding predictions using TRAP for the analysis of ChIP-seq data and regulatory SNPs. *Nat Protoc*, 6, 1860-9.
- THORNBURG, K. L., O'TIERNEY, P. F. & LOUEY, S. 2010. Review: The placenta is a programming agent for cardiovascular disease. *Placenta*, 31 Suppl, S54-9.
- THURMAN, R. E., RYNES, E., HUMBERT, R., VIERSTRA, J., MAURANO, M. T., HAUGEN, E., SHEFFIELD, N. C., STERGACHIS, A. B., WANG, H., VERNOT, B., GARG, K., JOHN, S., SANDSTROM, R., BATES, D., BOATMAN, L., CANFIELD, T. K., DIEGEL, M., DUNN, D., EBERSOL, A. K., FRUM, T., GISTE, E., JOHNSON, A. K., JOHNSON, E. M., KUTYAVIN, T., LAJOIE, B., LEE, B. K., LEE, K., LONDON, D., LOTAKIS, D., NEPH, S., NERI, F., NGUYEN, E. D., QU, H., REYNOLDS, A. P., ROACH, V., SAFI, A., SANCHEZ, M. E., SANYAL, A., SHAFER, A., SIMON, J. M., SONG, L., VONG, S., WEAVER, M., YAN, Y., ZHANG, Z., LENHARD, B., TEWARI, M., DORSCHNER, M. O., HANSEN, R. S., NAVAS, P. A., STAMATOYANNOPOULOS, G., IYER, V. R., LIEB, J. D., SUNYAEV, S. R., AKEY, J. M., SABO, P. J., KAUL, R., FUREY, T. S., DEKKER, J., CRAWFORD, G. E. & STAMATOYANNOPOULOS, J. A. 2012. The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature*, 489, 75-82.
- TOLEMAN, C., PATERSON, A. J., WHISENHUNT, T. R. & KUDLOW, J. E. 2004. Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional

- protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *J Biol Chem*, 279, 53665-73.
- TOMIKAWA, J., FUKATSU, K., TANAKA, S. & SHIOTA, K. 2006. DNA methylation-dependent epigenetic regulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene in trophoblast cell lineage. *J Biol Chem*, 281, 12163-9.
- VELDHUIS, J. D. & PINCUS, S. M. 1998. Orderliness of hormone release patterns: a complementary measure to conventional pulsatile and circadian analyses. *Eur J Endocrinol*, 138, 358-62.
- VELLA, P., SCELFO, A., JAMMULA, S., CHIACCHIERA, F., WILLIAMS, K., CUOMO, A., ROBERTO, A., CHRISTENSEN, J., BONALDI, T., HELIN, K. & PASINI, D. 2013. Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells. *Mol Cell*, 49, 645-56.
- VIGUERAS-VILLASEÑOR, R. M., ROJAS-CASTAÑEDA, J. C., CHÁVEZ-SALDAÑA, M., GUTIÉRREZ-PÉREZ, O., GARCÍA-CRUZ, M. E., CUEVAS-ALPUCHE, O., REYES-ROMERO, M. M. & ZAMBRANO, E. 2011. Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem*, 113, 214-20.
- WANG, J., LIU, R., HAWKINS, M., BARZILAI, N. & ROSSETTI, L. 1998. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*, 393, 684-8.
- WAUTHIER, V., SUGATHAN, A., MEYER, R. D., DOMBKOWSKI, A. A. & WAXMAN, D. J. 2010. Intrinsic sex differences in the early growth hormone responsiveness of sex-specific genes in mouse liver. *Mol Endocrinol*, 24, 667-78.
- WAUTHIER, V. & WAXMAN, D. J. 2008. Sex-specific early growth hormone response genes in rat liver. *Mol Endocrinol*, 22, 1962-74.
- WHELAN, S. A., DIAS, W. B., THIRUNEELAKANTAPILLAI, L., LANE, M. D. & HART, G. W. 2010. Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 285, 5204-11.
- WIECHELMAN, K. J., BRAUN, R. D. & FITZPATRICK, J. D. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, 175, 231-7.
- WILFINGER, W. W., MACKEY, K. & CHOMCZYNSKI, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22, 474-6, 478-81.
- XIONG, Y., DOWDY, S. C., PODRATZ, K. C., JIN, F., ATTEWELL, J. R., EBERHARDT, N. L. & JIANG, S. W. 2005. Histone deacetylase inhibitors decrease DNA

- methyltransferase-3B messenger RNA stability and down-regulate de novo DNA methyltransferase activity in human endometrial cells. *Cancer Res*, 65, 2684-9.
- XU, J., BURGOYNE, P. S. & ARNOLD, A. P. 2002. Sex differences in sex chromosome gene expression in mouse brain. *Hum Mol Genet*, 11, 1409-19.
- XU, J., DENG, X. & DISTECHE, C. M. 2008. Sex-specific expression of the X-linked histone demethylase gene *Jarid1c* in brain. *PLoS One*, 3, e2553.
- XU, X. & ZHANG, Z. 2006. Effects of estradiol benzoate on learning-memory behavior and synaptic structure in ovariectomized mice. *Life Sci*, 79, 1553-60.
- XU, Y., WU, F., TAN, L., KONG, L., XIONG, L., DENG, J., BARBERA, A. J., ZHENG, L., ZHANG, H., HUANG, S., MIN, J., NICHOLSON, T., CHEN, T., XU, G., SHI, Y., ZHANG, K. & SHI, Y. G. 2011. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell*, 42, 451-64.
- YAGI, S., HIRABAYASHI, K., SATO, S., LI, W., TAKAHASHI, Y., HIRAKAWA, T., WU, G., HATTORI, N., OHGANE, J., TANAKA, S., LIU, X. S. & SHIOTA, K. 2008. DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression. *Genome Res*, 18, 1969-78.
- YANG, X., ONGUSAHA, P. P., MILES, P. D., HAVSTAD, J. C., ZHANG, F., SO, W. V., KUDLOW, J. E., MICHELL, R. H., OLEFSKY, J. M., FIELD, S. J. & EVANS, R. M. 2008. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*, 451, 964-9.
- YANG, X., SCHADT, E. E., WANG, S., WANG, H., ARNOLD, A. P., INGRAM-DRAKE, L., DRAKE, T. A. & LUSIS, A. J. 2006. Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res*, 16, 995-1004.
- YANG, Y. R., SONG, M., LEE, H., JEON, Y., CHOI, E. J., JANG, H. J., MOON, H. Y., BYUN, H. Y., KIM, E. K., KIM, D. H., LEE, M. N., KOH, A., GHIM, J., CHOI, J. H., LEE-KWON, W., KIM, K. T., RYU, S. H. & SUH, P. G. 2012. O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell*, 11, 439-48.
- YOKOMORI, N., KOBAYASHI, R., MOORE, R., SUEYOSHI, T. & NEGISHI, M. 1995a. A DNA methylation site in the male-specific P450 (Cyp 2d-9) promoter and binding of the heteromeric transcription factor GABP. *Mol Cell Biol*, 15, 5355-62.
- YOKOMORI, N., MOORE, R. & NEGISHI, M. 1995b. Sexually dimorphic DNA demethylation in the promoter of the *Slp* (sex-limited protein) gene in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1302-6.
- YU, M. W. & CHEN, C. J. 1993. Elevated serum testosterone levels and risk of

- hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 53, 790-4.
- ZACHARA, N. E., O'DONNELL, N., CHEUNG, W. D., MERCER, J. J., MARTH, J. D. & HART, G. W. 2004. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem*, 279, 30133-42.
- ZHANG, Y., KLEIN, K., SUGATHAN, A., NASSERY, N., DOMBKOWSKI, A., ZANGER, U. M. & WAXMAN, D. J. 2011. Transcriptional profiling of human liver identifies sex-biased genes associated with polygenic dyslipidemia and coronary artery disease. *PLoS One*, 6, e23506.
- ZHANG, Y., LI, S., YUAN, L., TIAN, Y., WEIDENFELD, J., YANG, J., LIU, F., CHOKAS, A. L. & MORRISEY, E. E. 2010. Foxp1 coordinates cardiomyocyte proliferation through both cell-autonomous and nonautonomous mechanisms. *Genes Dev*, 24, 1746-57.
- ZHANG, Y., LIU, T., MEYER, C. A., EECKHOUTE, J., JOHNSON, D. S., BERNSTEIN, B. E., NUSBAUM, C., MYERS, R. M., BROWN, M., LI, W. & LIU, X. S. 2008. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol*, 9, R137.
- RIGGS, AD., MARTIENSSEN, RA., RUSSO, VE., 1996. Epigenetic mechanisms of gene regulation. New York, Cold Spring harbor Lab Press, 1-4)
- SHERF, BA., NAVARRO, SL., HANNAH, RR., WOOD, KV., 1996, Promega Notes 57, 2-9
- ギャノン生理学 原書 22 版

論文の内容の要旨

獣医学 専攻
平成 22 年度 博士課程 入学
氏 名 伊藤 修平
指導教員名 塩田 邦郎

論文題目 エピジェネティック性差に関する基礎研究

[緒言]

ほ乳類の細胞は、メスがX染色体を2本、オスがX染色体とY染色体を1本ずつ有する。発生において、Y染色体上の *Sry* 遺伝子は一時的に覚醒し、オスの性腺を形成させる。一方、メスには *Sry* 遺伝子がないため、雌の性腺を形成する。成熟過程では、生殖器から分泌される性ステロイドが各組織に作用し全身性の変容をもたらす。性ステロイドの影響として、性成熟期を境に、オスではアンドロゲン、メスではエストロジェンが、全身に性特有の変化を引き起こす。さらに、性ステロイドの影響は下垂体ホルモンの分泌パターンにまで影響を及ぼす。以上は“ゲノムの構成に起因した限られた遺伝子の発現により個体レベルでの差を説明できる”とする概念である。しかし、性染色体の雌雄差は、性腺発生を介する以外に影響しないのか、個体発生後の雌雄差は全て性ステロイドにより形成されるのか、性ステロイドはゲノム自体に影響するのか、についての疑問を持つことの妨げにはならない。

雌雄差は有るが性ステロイドの影響を免れている遺伝子や、性ステロイドの存在下で成長ホルモンが影響する常染色体上の遺伝子も報告されている。また、X染色体にはエピジェネティクス制御系で最近注目を浴びている O-GlcNAc 転移酵素 (*Ogt*; O-GlcNAc transferase) 遺伝子が存在する。興味深いことに、胎盤では *Ogt* はメスの方がオスより発現が高い。

本論文ではゲノム機能の性差に焦点を当てる。エピジェネティクス制御系は DNA メチル化とヒストン修飾の組み合わせによる、細胞世代を超えた遺伝子制御系である。但し、遺伝子

制御とは遺伝子安定性、ゲノム複製、修復等を含むゲノム全体の活動を意味し、単に遺伝子発現のみを意味するのではない。本論文はエピジェネティクス修飾と、その制御系に性差が存在するか否かを研究したもので、三章より成る。

第一章では、肝臓において、DNA メチル化状態に性差が認められる領域を探索し、その領域の DNA メチル化状態が性ステロイド依存的に変化するのか検証した。第二章では、X 染色体上のエピジェネティック制御因子、OGT の発現量及び発現制御機構について解析した。第三章では OGT の標的領域を探索した。

[第一章]

—肝臓における DNA メチル化の性差と性ステロイドの影響—

雌雄のマウス肝臓ゲノムを用いて、ゲノムワイド DNA メチル化解析を行った。そして新たに、オスの方が低メチル化状態である、性に依存した DNA メチル化可変領域 (S-DMR: Sex-dependent differentially methylated region) を 10 箇所同定した。それら S-DMR は ES 細胞や脳では DNA メチル化状態に雌雄差がなく、肝臓特異的であった。通常、細胞間で異なる DNA メチル化は CpG 配列の集団が段位となっているが、これらの S-DMR は 1 CpG 単位であった。

先の報告で発見された肝臓の S-DMR は、成長ホルモン-STAT5 の制御に依存していた。ところが、STAT5 結合領域が存在しない遺伝子領域にも S-DMR が存在した。精巣除去、卵巣除去およびそれらのマウスに testosterone propionate, estradiol benzoate を投与したマウスの肝臓を解析した結果、本研究で同定した S-DMR の中で、*Adam2*, *Uggt2*, *Snx29*, *Rnpc3* 及び *Sarnp* 遺伝子の S-DMR は、テストステロン依存的にメチル化率が低下していた。つまり、性ステロイド依存的・成長ホルモン非依存的に DNA メチル化状態が変化するゲノム領域が存在することになる。

DNA メチル化酵素 DNMT1, DNMT3A, DNMT3B、及び DNA 脱メチル化を担う酵素 TET2, TET3 の発現を解析した結果、肝臓における *Dnmt1*, *Dnmt3b* 及び *Tet2* の遺伝子発現はメスの方がオスよりも高かった。さらに、オスにおいて *Tet2* の発現は、精巣除去することでメスにおける発現レベルまで上昇した。また、精巣除去による影響は *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Tet3* では認められなかった。タンパク量を調べた結果、興味深いことに、TET2 は精巣除去により低下した。S-DMR の形成にこれらの DNA メチル化/脱メチル化制御因子の発現が関与している可能性が考えられる。

以上の結果から、雌雄間で DNA メチル化状態に差がある領域が存在し、さらにテストステロン依存的に DNA メチル化率が変化することが明らかになった。

[第二章]

—栄養膜細胞における OGT の発現量の性差—

ヒストンを含むタンパクの O-GlcNAc 修飾は OGT により付加され、OGA (O-GlcNAcase) により除去される。OGT によるヒストン修飾自体も興味深いことだが、OGA もヒストンアセチル化活性のあるドメインを有しており、O-GlcNAc 修飾とアセチル化との新たな制御機構として魅力的である。

本章ではまず、マウス胎盤における OGT の発現がメスで高いとする、先の報告を確かめた。次に、分子レベルでの解析を容易にするためにマウス栄養膜幹 (TS : trophoblast stem) 細胞を用い *Ogt* の発現量を調べてみたが、性差が全く認められなかった。しかし、TS 細胞を分化させると OGT の発現量が低下するものの、メスの方がオスよりも高かった。

次に、マウス胎盤組織と TS 細胞を用いて X 染色体上の *Ogt* 遺伝子領域の DNA メチル化状況解析した。その結果、転写開始点近傍 (-745~+39bp) は細胞・組織問わず非メチル化であるのに対して、上流 (-1,544~-745bp) は細胞・組織依存的にメチル化され性差に関与することが疑われた。X 染色体不活化は体細胞組織ではランダムに行われるが、栄養膜細胞は父親由来の X 染色体が選択的に不活化される。また TS 細胞では CpG island は不活性化 X 染色体でメチル化されていると考えられている。*Ogt* の非メチル化領域 (-745~+39bp) は CpG 配列が豊富な領域である。CpG 配列が豊富な *Ogt* のプロモーター領域が DNA 非メチル化状態であることから、*Ogt* 遺伝子領域は X 染色体不活性化を免れていると考えられる。レポーターアッセイの結果、分化 TS 細胞におけるプロモーター領域の転写活性に雌雄差は無かった。よって、分化 TS 細胞で見られる雌雄差を生む原因は、メスで X 染色体が 2 本存在し、しかも X 染色体不活性化を免れることに起因すると考えてよい。次に、転写因子の解析を行ったところ、TS 細胞では ATF2 や SOX9 発現が高く、分化に伴い減少することが明らかになった。一方、他の転写因子 HLF は分化 TS 細胞で発現が高いことも分かった。したがって、TS 細胞の分化に伴う *Ogt* の発現の低下は、ATF2 や SOX9 から HLF に切り替わることによる。

Ogt 遺伝子上流 (-1,544~-745bp) の未分化 TS 細胞の DNA メチル化は、メスの方がオスよりも高メチル化状態であったため、S-DMR と考えられる。この S-DMR は多数の CpG が単位となっており、遺伝子発現の制御に関与することが推定される。その場合、未分化 TS 細胞では、雌雄の *Ogt* 遺伝子の発現量に性差が無いことから DNA メチル化による量的調整が発揮されていると考えれば納得できる。胎盤及び分化 TS 細胞ではメスゲノムがより低メチル化状態であった。すなわち、量的調節が緩和され、メスで *Ogt* の発現が高いことになる。

[第三章]

—栄養膜細胞における OGT の結合領域の探索—

次に TS 細胞における OGT の標的遺伝子領域をゲノムワイドに解析した。その結果、転写開始点近傍に OGT が結合する遺伝子座が集中していた。分化 TS 細胞についてはメスでは 22,861 個、オスでは 16,564 個の転写開始点近傍 (± 1 kb) に OGT の結合領域があり、そのうち 9,973 個は雌雄で共通していた。一方、未分化 TS 細胞では雌雄合わせて 723 個の転写開始点近傍 (± 2.5 kb) にしか OGT の結合領域が存在しなかった。

雌雄の分化 TS 細胞で共に OGT が結合する領域について ChIP-PCR 解析を行なった結果、複数の OGT 結合領域において、OGT はメスの方がオスよりも多く結合していた。興味深いことに、*Mgea5* (*Oga*) 遺伝子にも、メスの方がオスよりも OGT が多く結合していた。*Mgea5* は OGA をコードする遺伝子である。分化 TS 細胞において *Mgea5* の発現は *Ogt* と同様、メスで高くオスで低かつ

た。この傾向はマウス胎盤にも認められた。以上の結果は *Mgea5* が OGT の制御下にあることを示唆している。

分化 TS 細胞において、メスの方がオスよりも OGT, OGA の両方の発現が高いことは、細胞全体の O-GlcNAc 修飾量には性差を小さくする工夫だと考えることも可能である。細胞総タンパクの O-GlcNAc 修飾を western blot 及び免疫染色により解析した結果はこの解釈を支持し、分化 TS 細胞における O-GlcNAc 修飾レベルに顕著な雌雄差は無かった。このことから、OGT だけでなく OGA の発現もメスで多いことにより、雌雄の分化 TS 細胞および胎盤における細胞レベルでの O-GlcNAc 修飾を同程度に維持していることが示唆された。

[総括]

“ゲノムの構成に起因した限られた遺伝子の発現により個体レベルでの差を説明できる”という従来の考えは *Sry* 遺伝子の有無を起点として、性ステロイドが全身に性差を生じさせることに由来する概念である。本研究から、テストステロンが S-DMR における DNA メチル化修飾に影響を与えることを示した。この結果は、これまで言われてきた性差の概念が、エピジェネティックな性差を伴う事を示唆する。

ゲノム構成に着目すると、Y 染色体だけでなく、X 染色体上の遺伝子の発現も性差を生じさせる要因となる。本研究から栄養膜細胞における X 染色体上の *Ogt* 遺伝子の発現制御機構、及び OGT の発現量の性差が影響を与える標的遺伝子領域を示した。つまり、X 染色体の本数というゲノム構成の雌雄差が、エピジェネティック制御系の性差をもたらすことを示した。また、胎盤では *Ogt* の発現に性差が認められたが、肝臓では性差がない。S-DMR における DNA メチル化の雌雄差が肝臓特異的だったことを鑑みると、メスにおける組織特異的な 2 本の X 染色体の利用法が、組織特異的なエピジェネティックな雌雄差を生じさせる要因となることが考えられた。さらに、OGT については栄養センサーとして働くことが報告されている。また近年、代謝系を反映したエピジェネティクス状況の変化誘導が報告されており、胎盤における OGT の発現量の性差が代謝系を反映するエピジェネティクス状況の変化に性差をもたらすことが考えられる。この場合、成長ホルモンや性ステロイドが遠因となり、代謝系が DNA メチル化の性依存的な変化をもたらすことになる。

本研究より、エピジェネティック修飾とその制御系には組織特異的な性差があることが示された。このことは、細胞数(組織の大きさ)の規定などの性差を研究するうえで重要な知見となる。

謝辞

本研究の遂行及び論文の執筆において丁寧なご指導ご鞭撻をいただきました細胞生化学研究室 塩田邦郎教授に深く感謝致します。

研究の進行に当たり、主に第一章に関してご助言を頂いた細胞生化学研究室八木慎太郎特任教授、主に第二・三章に関してご助言を頂いた田中智准教授、早川晃司特任助教に深く感謝致します。

実験を行う上での的確なご指導を頂いた細胞生化学研究室 広澤瑞子特任准教授に深く感謝いたします。

貴重な ES 細胞株をご提供頂いた京都大学 末盛博文准教授、山梨大学 若山照彦教授、理化学研究所バイオリソースセンター 小倉淳郎室長に深く感謝致します。

日々の生活を有意義に過ごさせて頂いた、研究室の先輩、後輩の皆様に深く感謝致します。

最後に、これまで長期にわたる学生生活を支えてくださいました、父、母、そして家族に深く感謝致します。

博士論文審査委員会後の修正箇所

全体に渡り誤字脱字の訂正

μ や u を μ に変更。

Min を分に統一

Sec を秒に統一

RT を室温に統一

作成(書類文章の時に使用)⇒作製(品物、機械、図面などの時)に訂正

雄⇒オス、雌⇒メスに統一

蛋白をタンパク質に統一

表現形を表現型に変更

有意差検定について

Fig1-1, 1-2, 1-5, 1-7, 1-8 に t 検定結果を追加

これに伴い p24 に記述を追加

(10%以上の差)

Material & Method について

OGA の血清採取に関してジェノスタッフに依頼した箇所の記載を行なった。

新型 sequencer による sequencing は Albert Einstein に依頼したという記載を追加した。

P3

訂正前

父親由来の X 染色体に GFP の組み込み実験から栄養膜巨細胞では X 染色体不活化を免れることが示唆されてきた (Hadjantonakis et al., 2001)

訂正後

父親由来の X 染色体に GFP が組み込まれたマウスを用いた実験から栄養膜巨細胞では X 染色体不活化を免れる場合があることが示された (Hadjantonakis et al., 2001)

P83 の Fig4-1

まとめの図を変更

P42 グロビン遺伝子の使い分けに関して引用文献を追加。

P43 以下の文章を削除

また、ES 細胞と共培養して胚盤胞様の細胞塊を形成させ移植すると胎盤組織に発生する。
すなはち

緒言の最終段落の訂正

変更前

本研究の意義

遺伝子発現に認められる性差はこれまで多くの研究から同定されている。しかし、エピジェネティック修飾に認められる性差は一部の領域でのみ認められているに過ぎない。さらに、性依存的なエピジェネティック修飾の形成機序は不明である。

本論文はエピジェネティック修飾と、その制御系に性差が存在するか否かを研究したもので、三章より成る。

第1章では、肝臓において、DNAメチル化状態に性差が認められる領域を探索し、その領域のDNAメチル化状態が性ステロイド依存的に変化するのか検証した。第2章では、X染色体上のエピジェネティック制御因子、OGTの発現量及び発現制御機構について解析した。第3章ではOGTの標的領域を探索した。

変更後

本研究の目的

本研究では、ゲノムの使い分けを制御する機構に雌雄差が存在するか否かを明らかにするために、雌雄の組織・細胞のエピジェネティック修飾及び、エピジェネティック修飾酵素について解析した。

第1章では、肝臓において、DNAメチル化状態に性差が認められる領域を探索し、その領域のDNAメチル化状態が性ステロイド依存的に変化するのか検証した。第2章では、X染色体上のエピジェネティック制御因子、OGTの発現量及び発現制御機構について解析した。第3章ではOGTの標的領域を探索した。

P79

肝臓で同定されたS-DMR近傍の遺伝子発現量には性差が認められないものが多かった。

肝臓で同定されたS-DMR近傍の遺伝子は、発現量に性差が認められないものが多数であった。