

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 伊藤 修平

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。エピジェネティクス制御に関わることで最近注目を浴びている O-GlcNAc 転移酵素 (O-GlcNAc transferase : OGT) の遺伝子(Ogt)は X 染色体上に存在する。興味深いことに、メス胎仔の胎盤ではオスより Ogt の発現が高いことが報告されている。その場合、Sry 遺伝子発現に起因するメカニズム以外に、Ogt の発現による性差が生じても不思議は無い。同様に、性腺発生以前に存在するゲノム利用の性差を考えると、ステロイドの守備範囲にも様々な段階が考えられる。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ことを発見したもので、三章より構成されている。

第一章では、マウス肝臓を用いて DNA メチル化状態の性差領域が探索され、オスの方が低メチル化状態である DNA メチル化可変領域 (Sex-dependent differentially methylated region: S-DMR) が 10 箇所同定された。性腺除去と性ステロイドの投与実験から、5つの遺伝子領域 (Adam2, Ugg2, Snx29, Rnpc3 及び Sarnp) に位置する S-DMR のメチル化状態は、テストステロン依存性であることが明らかにされた。DNA メチル化と脱メチル化を担う酵素遺伝子群の中で、Dnmt1、Dnmt3b および Tet2 の発現がメスの方で高く、性ホルモン依存的 S-DMR の形成にこれらの DNA メチル化/脱メチル化制御因子が関与していることが示唆された。

第二章は、Ogt 遺伝子の発現量および発現制御機構に関する研究である。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、O-GlcNAcase (OGA)により除去される。OGA はヒストンアセチル化活性のあるドメインも有しており、O-GlcNAc 修飾とアセチル化を制御する因子として重要である。まず、既報どおりマウス胎盤における Ogt の発現がメスで高いことが確かめられた。次に、マウス栄養膜幹 (TS : trophoblast stem) 細胞を分化させると OGT の発現量に性差が生じ、メス TS 細胞でオスに比べて高いことを明らかにした。また、Ogt 遺伝子領域の転写開始点近傍 (-745~+39bp)の DNA は細胞・組織問わず非メチル化であるのに対して、さらに上流 (-1,544~-745bp)は細胞・組織依存的にメチル化され、胎盤では性差を示すことが明らかになった。そして、非メチル化領域はプロモーター機能を有し、転写因子 (群) に雌雄差は無いことが示された。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、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 遺伝子上流(-1,544~-745bp)の未分化 TS 細胞における 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。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。一方、胎盤および分化 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。

第三章では、ChIP-seq 法により、TS 細胞において OGT の標的となるゲノム領域の探索が行われた。転写開始点近傍に OGT が結合する遺伝子座が集中しており、分化 TS 細胞ではメスで 22,861 個、オスでは 16,564 個の転写開始点近傍(±1kb)に OGT の結合領域が同定され、そのうち 9,973 個が雌雄で共通していた。興味深いことに、Mgea5 遺伝子にも、メスにおいてオスよりも 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った。以上の結果は、OGT 標的領域に性差があること、Mgea5 が OGT の制御下にあることを明らかにした。分化 TS 細胞において、メスの方がオスよりも OGT、OGA の発現が共に高いことは、細胞全体の O-GlcNAc 修飾量の性差を小さくする工夫だと考えることも可能である。

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、および OGT の発現量の性差が影響を与える標的遺伝子領域が示された。OGT は栄養センサーとして働くことが報告されている。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。これらの発見は遺伝子制御の基礎として重要であるばかりでなく、代謝系がゲノム利用に性差を与えるとする新たな視点も提供している。よって、審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。