

学位審査結果報告書

学位申請者氏名 Chirada Dusadeemeelap

学位論文題目 Inhibition of TET-mediated DNA demethylation suppresses osteoblast differentiation.

審査委員 (主査氏名) 竹内 弘 (署名) 竹内 弘

(副査氏名) 小野 堅太郎 (署名) 小野 堅太郎

(副査氏名) 有吉 渉 (署名) 有吉 渉

学位審査結果の要旨

DNA のメチル化は、クロマチン構造の制御や遺伝子発現の調節を介して、発生や疾患において重要な役割を持つとされる。10·eleven translocation (TET) 酵素ファミリーは、5・メチルシトシン (5mC) を 5・ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) に酸化して 5mC の水酸化とその後の脱メチル化を触媒する。TET の遺伝子欠失マウスを用いた研究から TET の様々な機能が明らかとなっているものの、TET には酵素活性を介するものと酵素活性を介さない機能の存在が報告されていることから、TET 機能の詳細な分子メカニズムは明らかとなっていない。これまでが存在しなかったため、TET の詳細な機能解明は進んでいない。そこで申請者の Dusadeemeelap 氏らは本研究において、新規のシトシン選択的 TET 酵素阻害剤である Bobcat339 (BC339)を用い、骨芽細胞分化における TET を介した DNA のヒドロキシメチル化の役割を検討した。

C2C12 細胞を BC339 で処理すると、細胞生存に影響を与えることなく、細胞内の 5mC が増加し、逆に 5hmC は減少した。BC339 は、BMP が誘導する骨芽細胞分化マーカーの発現を抑制した。メチル化 DNA 免疫沈降とバイサルファイトシーケンス実験から、BC339 で TET を阻害すると、骨芽細胞分化に必須の転写因子 Sp7 のプロモーターにある CpG リッチ領域で 5mC が増加することが示された。プロモーターの 5mC は転写抑制と関連しており、Sp7 のプロモーター活性を示すルシフェラーゼ活性は試験管内 DNA メチル化処理または BC339 によって抑制された。クロマチン免疫沈降法により TET が Sp7 のプロモーター領域に局在することが確認された。さらに、SP7 を強制的に過剰発現させたところ、BC339 による骨芽細胞分化抑制効果が解除された。

本研究により、TET は Sp7 プロモーターを含むゲノム領域の DNA を脱メチル化し、骨芽細胞分化を制御することが明らかとなった。

本研究内容について申請者の Dusadeemeelap 氏に対し、実験の手技の詳細や結果の解釈、用いた統計解析方法等について主査と 2 名の副査による諮問を行い、概ね適切な回答を得た。本研究成果は、生命活動において普遍的な役割を担う DNA メチル化の制御機構の詳細の一端および骨芽細胞分化の新たな調節機構を明らかとするもので、広く生命科学研究および骨代謝関連疾患の新たな治療戦略開発に寄与することが期待されることから、審査委員会では本論文を学位論文として価値あるものと判断した。