

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 12108 号
------	---------------

氏 名 奥 寄 雄 也

### 論 文 題 目

ニワトリ細胞の遺伝子発現制御に関する研究

(A Study on the Regulation of Gene Expression in Chicken Cells)

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学	教授	飯島 信司
委員	名古屋大学	教授	北島 健
委員	名古屋大学	教授	本多 裕之
委員	名古屋大学	准教授	西島 謙一

## 論文審査の結果の要旨

奥寄雄也君提出の論文「ニワトリ細胞の遺伝子発現制御に関する研究」では、ニワトリ細胞を用いた物質生産において重要である遺伝子発現の制御機構の解明を目指し、ウイルスの感染による遺伝子の発現、および細胞の分化と遺伝子の発現制御について遺伝子工学的手法を用いて解析した。

序論では、これらの研究の背景となるニワトリとヒトの関わりや産業上の有用性についてまとめた。

第1章では、ニワトリの自然免疫に関わる因子であるIFITMに着目した。近年、トリインフルエンザウイルスが変異してヒトへの感染力が強まった新型インフルエンザウイルスが出現し、世界的に大流行する危険性が指摘されている。したがって、インフルエンザウイルスの感染を防御すること、効率的ワクチン生産法を確立する事はきわめて重要と考えられる。

IFITMファミリータンパク質は、抗ウイルス活性を示す膜タンパク質である。奥寄君は、IFITMファミリー遺伝子の中で機能が未知であるIFITM10に焦点をあて、その発現特性と機能を解析した。同君は、まずニワトリIFITM10遺伝子をクローニングした。さらに、成鳥の各臓器におけるIFITM10の発現量を定量PCRで解析し、ほぼすべての臓器で発現が確認されるもののその絶対量は他のIFITM遺伝子に比べると低い事を示した。また、生殖幹細胞であるPGCsでは、血中循環期において発現が最も高く、発生が進むにつれて低下していくことを明らかにした。一方、ニワトリ線維芽細胞株DF-1にIFITM10を発現させた細胞株を作製し、この細胞に対してVSV-Gシュードタイプレンチウイルスベクターを感染させたところ、ウイルスの感染効率が30%程度低下した。この結果は、IFITM10が他のIFITM遺伝子と同様にウイルスに対する感染阻害能力を持つ可能性を示唆するものである。

第2章では、分子生物学のみならず動物細胞を用いた物質生産においてもトピックの一つである遺伝子発現のエピジェネティック制御に注目し、このうちゲノムDNAの脱メチル化に関与するTETファミリー遺伝子について解析した。遺伝子DNAはシトシン残基のメチル化により発現が抑制されるが、このメチル化はDNAメチルトランスフェラーゼにより触媒される。一方、TETによるDNAの脱メチル化が発見されたのは最近のことである。TETタンパク質はメチルシトシン(5mC)を5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)、5-ホルミルシトシン(5fC)、5-カルボキシメチルシトシン(5caC)へと変換する酵素活性を持つ。TETタンパク質により生じたこれらシトシンの誘導体は、細胞分裂による希釈などにより未修飾シトシンへと変換される。

奥寄君は、クローニングした3種のTETタンパク質の酵素活性を測定し、いずれのTETタンパク質も5mCを5hmCに変換する触媒活性を持つことを確認した。また、赤血球では発生にしたがってTET1のみが特異的に増加することを明らかにした。血球のヘモグロビンはそれぞれ2分子の $\alpha$ -グロビンと $\beta$ -グロビタンパク質から構成されるが、このうち $\beta$ -グロビン遺伝子 $\rho$ および $\beta A$ は、胚発生においてDNAのメチル化により発現制御を受ける。そこで、これらの遺伝子のプロモーター近接領域の5mCおよび5hmCを解析した。その結果、5日胚で観察された $\beta A$ プロモーター上のシトシンメチル化が8日胚では消失し、その際一過的な5hmCの増加が観察された。これは、TET1が $\beta A$ プロモーター上の5mCを能動的に消去することを示唆する。また、ニワトリ赤血球前駆細胞T2ECsを用いた実験でもこの結果が支持された。さらにTET1をノックダウンしたところ、分化に伴う $\beta A$ 遺伝子の発現上昇が阻害された。これらの結果から、TET1が $\beta$ -グロビン遺伝子プロモーター上のDNAメチル化状態を制御しその発現を調節していると推定した。

結言では第1章、第2章の実験結果をまとめ、本論文の総括を行った。

以上のように本論文では、ウイルスの感染および細胞分化という生体内外の刺激に対するニワトリ細胞の遺伝子発現制御メカニズムの一端を解明した。これらの結果は、ニワトリやほ乳類細胞を用いた物質生産やインフルエンザ予防という観点からも重要であり、工学の発展に寄与するのみならず他の産業への波及効果も大きい。よって本論文提出者奥寄雄也君は博士(工学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと判定した。