

## 廣末 晃之 氏の学位論文審査の要旨

### 論文題目

CTCFはリプログラムされた体細胞のINK4/ARF遺伝子座の高次エピゲノムの特性に關与する  
(CTCF mediates distinct higher-order epigenetic signatures of the INK4/ARF locus in reprogrammed somatic cells)

ヒト9番染色体に位置するINK4/ARF遺伝子座は3つの細胞周期制御因子(p15/ARF/p16)をコードし、細胞老化及びリプログラミングにおいて重要な役割を果たしている。一方、CCCTC-binding factor (CTCF)はzinc-fingerモチーフを持つタンパク質であり、転写調節、クロマチン境界形成、クロマチンループ形成などの多様な機能をもつ。本研究は、ヒトの老化線維芽細胞およびiPS細胞を用いて、CTCFによるINK4/ARF遺伝子座の高次クロマチン制御機構を明らかにすることを目的とした。

クロマチン免疫沈降-DNAチップ/シーケンスの解析から、INK4/ARF遺伝子座に少なくとも3つのCTCF集積部位を見出し、これらをIC1, IC2, IC3と名付けた。正常線維芽細胞(IMR90)をRasによって老化誘導した細胞では、元のIMR90細胞と比較して、CTCFの発現とIC1/IC3への結合量が低下しており、p15/p16の発現は増加していた。一方、ヒトiPS細胞では、CTCFの高い発現とIC部位への結合増加を認め、p15/ARF/p16の発現は抑制されていた。iPS細胞及びIMR90細胞においてCTCFをノックダウンするとp15/p16の発現が誘導されることから、この遺伝子座の転写抑制にはCTCFのIC部位への結合が重要であることが示唆された。さらにChromosome Conformation Capture (3C) アッセイを用いて、同遺伝子座の3次元なクロマチン構造を解析した。IMR90細胞においては3つのIC部位とp16プロモーターが近傍に存在しており、その近接性はCTCFのノックダウンによって低下した。CTCFの発現が低い老化細胞でもこの近接性は低下していた。よって正常線維芽細胞ではCTCF依存性にコンパクトな抑制性のクロマチンが形成されるのに対し、CTCFの結合が少ない老化細胞ではクロマチン構造が緩くなってINK4/ARF遺伝子座が脱抑制されている可能性が示唆された。iPS細胞のクロマチン構造は、予想に反して、正常と老化線維芽細胞の中間状態にありながら、遺伝子座は強い抑制状態にあることが明らかになった。

審査では、CTCFのIC部位への結合を制御する機構、中間型クロマチン構造をもつiPS細胞で遺伝子座の抑制が維持される機構、iPS細胞と癌細胞のクロマチン制御の類似性、iPS細胞に大量に存在するCTCFの機能と標的、IC部位の重要性を直接証明する方法、単一細胞レベルでの検証法、ヒストンのメチル化やポリコームタンパク質及び核内構造との関連、等について多くの質疑応答がなされ、申請者からは概ね適切な回答が得られた。

本研究は、ヒト線維芽細胞が老化あるいはiPS化された状態を比較することによって、CTCFがINK4/ARF遺伝子座の高次クロマチン構造と転写を制御するというエピジェネティックな機構を明らかにしたものである。また本研究で用いた解析法および高次クロマチン構造は、細胞状態を識別する新しいアプローチとしての応用が期待できる。よって学位の授与に値すると判断した。

審査委員長 腎臓発生学担当教授

西村下 隆一