

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06894

研究課題名(和文) 配列依存性的アレルト異的ヒドロキシメチル化の普遍性の検証

研究課題名(英文) Is sequence-dependent allele-specific hydroxymethylation ubiquitous in the mammalian genome?

研究代表者

山田 洋一 (yamada, yoichi)

金沢大学・電子情報学系・准教授

研究者番号：30377402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では独自に開発した手法を用いて、配列依存性的アレルト異的ヒドロキシメチル化がマウスゲノム上でどの程度普遍的に存在するかを調べることを目的とした。

互いに亜種関係にあり多くの多型を有するJF1マウスとB6マウスを相互に掛け合わせたJF1/B6マウスとB6/JF1マウスの脳由来ゲノムを用いて、既知の配列依存性的アレルト異的メチル化領域10個が配列依存性的アレルト異的ヒドロキシメチル化を受けているかを独自に構築した方法とパイサルファイトシーケンス法により調べた。結果として、このうち一つが配列依存性的アレルト異的ヒドロキシメチル化を受けていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：研究成果の概要(英文)：The research representative previously reported sequence-dependent allele-specific methylation. This enabled us to interpret the mechanisms for differences of various disease susceptibility caused by the sequence polymorphisms. On the other hand, genomic hydroxymethylation plays an important role in the demethylation process. Furthermore, it is suggested that genomic hydroxymethylation is also involved in regulation of gene expression. In this study, we examined whether 10 sequence-dependent allele-specific methylated regions in mice are subject to a sequence-dependent allele-specific hydroxymethylation. As a result, it was shown that one of the ten was subject to a sequence-dependent allele-specific hydroxymethylation.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：ヒドロキシメチル化

1. 研究開始当初の背景

哺乳類細胞中に存在する CpG メチラーゼと呼ばれる酵素は、ゲノム上の殆どの CpG 配列のシトシン塩基にメチル基を付加(メチル化)する。この例外は、ヒトの約半数の遺伝子転写制御領域(プロモータ)に存在する CpG 配列に富んだ CpG island (CGI)である。CGI 上の CpG ジヌクレオチド配列は通常、すべての発生段階及び成体組織においてメチル化から免れている。しかしながら、由来する親の性別に依存して一方のアレルのみが発現するインプリント遺伝子の近傍と X 染色体上に存在する CGI はこの例外であり、アレル特異的なメチル化を受けている。

また近年 Tet 酵素によるシトシン塩基に付加されたメチル基のヒドロキシル化(ヒドロキシメチル化)がゲノムからの脱メチル化過程や遺伝子発現調節に関わっていることが示唆されており、大きな注目を集めているがその詳細は未だ不明である。

メチル化は、個々の遺伝子の発生段階・各組織特異的な機能発現制御、ゲノム刷り込み現象、雌における X 染色体不活化、そしてゲノムに侵入したウイルスの不活性化による生体防御など、哺乳類の生命維持に不可欠である。しかしながらこれまで、何故特定の DNA 配列上にはメチル基が付加され、他の領域には付加されないのかというメチル基付加の有無とその配列依存性間の詳細については殆どわかっていなかった。

一方、研究代表者は、ゲノム配列情報に基づいたメチル化解析技術である HpaII-McrBC PCR (HM-PCR) 法を独自に考案し、ヒト 21 番及び 11 番染色体上の CGI のアレル別のメチル化状態を網羅的に調べ、配列に依存したアレル特異的なメチル化を世界に先駆けて同定した(Yamada et al., Genome Res., 2004)。これは図 1 に示すように、アレル特異的なメチル基付加の有無がアレル間のごくわずかな配列の違いに依存し

ていることを示しており、そのメカニズムの解明からメチル基付加の有無と DNA 配列特徴間の関連性が明らかになることが期待されている。図 1 では、白丸が非メチル化 CpG を黒丸がメチル化 mCpG をそれぞれ示しており、アレル A-B 間の配列の違いに依存してプロモータ領域にメチル基が付加され、結果として配列差異に依存したアレル特異的な遺伝子発現がもたらされるというものである。

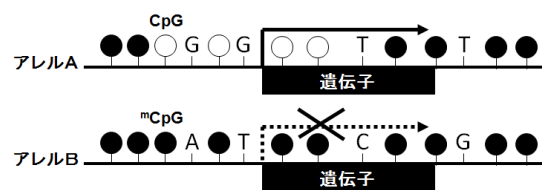


図 1: 配列依存的アレル特異的なメチル化

また研究代表者が配列依存的アレル特異的なメチル化を報告した後、海外の複数の研究グループにより、配列依存的アレル特異的なメチル化が、ヒト及びマウスゲノム上において普遍的に存在することが報告された(Kerkel et al., Nat. Genet., 2008; Schilling et al., Genome Res., 2009; Wei et al., Cell, 2012)。またこれらの一部が、図 1 におけるアレル A のホモでは両アレルともメチル化されず、アレル B のホモでは両アレルともメチル化されることや、これが同様に配列依存的な遺伝子発現にも寄与していることが示され、現在、多型配列が引き起こす各種疾患感受性差異のメカニズムを、配列依存的アレル特異的なメチル化により引き起こされる遺伝子発現差異を通して理解できるのではないかと期待されている。また実際に、FTO (fat mass and obesity associated) Type 2 糖尿病・肥満では、疾患感受性ハプロタイプ特異的なメチル化が既に報告されている(Christopher et al., PLoS One, 2010)。

2. 研究の目的

研究代表者は、ヒト配列依存的アレル特異的メチル化のみならずマウス配列依存的アレル特異的ヒドロキシメチル化を世界に先駆けて同定し、疾患感受性の有無を規定する多型の作用機序をそれらに対するメチル化およびヒドロキシメチル化の有無が導く遺伝子発現差異を通して理解できることを示してきた。しかしながら、配列依存的アレル特異的メチル化はヒトおよびマウスにおいて普遍的に存在することが明らかになっている一方で、配列依存的アレル特異的ヒドロキシメチル化は、どの程度マウスゲノム上に存在するかはわかっていない。

そこで本研究では独自に開発した手法を用いて、配列依存的アレル特異的ヒドロキシメチル化がマウスゲノム上でどの程度普遍的に存在するかを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

アレルを区別するために、互いに亜種関係にあり多くの多型を有する JF1 マウスと B6 マウスを相互に掛け合わせた JF1/B6 マウスと B6/JF1 マウスの脳由来ゲノムを抽出した。

既知の配列依存的アレル特異的メチル化領域 10 個の DNA 配列をデータベースより取得し、JF1 と B6 間の多型データベース (<http://molossinus.lab.nig.ac.jp/msmdb/>) を用いて、上記の 10 個の配列依存的アレル特異的メチル化領域の周辺部位に JF1 と B6 マウス間の多型を同定し、この多型と制限酵素である MspI 認識サイトを 2 個以上アンプリコン内に含むプライマー対を設計した。

次に、JF1/B6 および B6/JF1 マウスの脳由来ゲノムを T4-BGT 酵素処理し、これらの MspI 消化をそれぞれ別々に行った。その後、この切断済みゲノムを鋳型として、上記のプライマー対を用いて PCR 増幅を行い、増幅産物をダイレクトシーケンス法により配列

決定した。

またこれとは別に、バイサルファイトシーケンス法により、JF1/B6 および B6/JF1 マウスの脳由来ゲノムにおける上記の既知の配列依存的アレル特異的メチル化領域 7 個のメチル化状態を調べた。

4. 研究成果

結果として、上記の既知の配列依存的アレル特異的メチル化領域 10 個のうち一つが配列依存的アレル特異的ヒドロキシメチル化を受けていることがわかった。しかしながら、既知の配列依存的アレル特異的メチル化領域 3 個については、バイサルファイトシーケンス法による検証が終了しておらず、引き続き確認を行っている。また以上の結果から、配列依存的アレル特異的ヒドロキシメチル化領域は、ゲノム上にそれ程多く存在しないと思われた。

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hiroki Miyahara, Osamu Hirose, Kenji Satou, Yoichi Yamada,
Factors to preserve CpG-rich sequences in methylated CpG islands,
BMC Genomics, 査読有, Vol.16:144,2015.
doi:10.1186/s12864-015-1286-x

〔学会発表〕(計 1 件)

Ayana Tsuji, Yoichi Yamada,
Improvement of MIMGO: a gene set analysis to identify differentially expressed gene sets in a gene expression dataset,
第 5 回生命医薬情報学連合大会(IIBMP 2016),
P028, September 29-October 1, 2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://gie.ec.t.kanazawa-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 洋一 (YAMADA, Yoichi)

金沢大学・理工研究域電子情報学系・准教授

研究者番号：30377402