

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18456

研究課題名(和文)ゲノムのヒドロキシメチルシトシン修飾の調節と機能解析

研究課題名(英文)Establishment of two independent methods to analyze 5hmC at single base resolution

研究代表者

高橋 沙央里 (Takahashi, Saori)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・研究員

研究者番号：80748856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムのDNAメチル化はクロマチン構造の変化などを介して遺伝子発現の抑制に寄与する。これまでに、5mCはTETタンパク質により5hmCを経て脱メチル化することが報告された。そのため、5hmCを検出する技術は脱メチル化過程を解析する上で重要である。5hmC解析技術はこれまでに複数の報告があるが、どれも一長一短であった。そこで申請者は本研究で2種類の新たな5hmC解析技術の開発を行った。1つ目は酵素反応を利用したもので、もう一つは化学的酸化反応を利用した方法である。これらの方法はいずれも操作が簡便で再現性がよく、有用性が高いと考えている。

研究成果の概要(英文)：Cytosine methylation in genome contributes to gene silencing through changing chromatin state. At present, hydroxymethylcytosine (5hmC) produced from methylcytosine (5mC) by TET oxigenase is thought to be an possible intermediate for demethylation. Hence, a technique to analyze 5hmC at single base resolution in genome contributes to understanding of demethyltion processes. However, the reported techniques to analyze 5hmC harbor some disadvantages. In this period, I have successfully established two independent method to analyze 5hmC at single resolution, as I planned. One is enzymatical method and the other is chemical one. From my research, highly reproducible results are able to be obtained by these two easy methods. Thus, this project could contribute to the advance of functional understanding of 5hmC.

研究分野：エピゲノム

キーワード：DNAメチル化 DNA脱メチル化 ヒドロキシメチルシトシン ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティック修飾の一つである DNA メチル化 (5-メチルシトシン: 5mC) は、遺伝子発現の制御に関与する。これまでに、CpG のシトシン塩基にメチル基を導入する酵素は DNMT、脱メチル化に関与する酵素は TET であることが知られている。近年、TET による脱メチル化には 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) を経由したルートが存在することが明らかになった。そのため、5hmC の所在および機能を解析することは脱メチル化のメカニズム解明に必須であると考えられる。そのため、数年前から 5hmC の 1 塩基レベルの検出方法が複数グループより報告されていたが、再現性や DNA 分解の問題など、それぞれ一長一短があった。そのため、申請者はより安定に再現性よく 5hmC を検出する方法を確立し、それを利用した 5hmC を介した脱メチル化研究を行う必要があると考え、本研究計画に取り組んだ。

2. 研究の目的

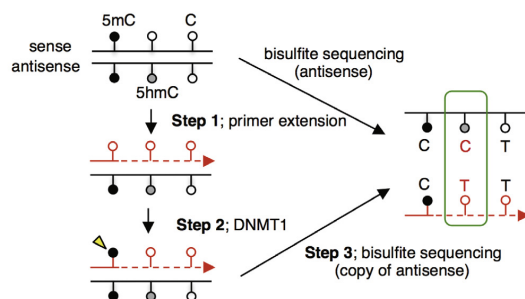
本研究計画では、安定に 1 塩基レベルで 5hmC を検出する方法を確立することを目指した。具体的には、既報の問題点として挙げられる、反応系の安定性および DNA 分解を抑える方法の開発を試みた。

また、新たに確立した 5hmC 検出法を用いてマウス ES 細胞で脱メチル化する領域の 5hmC 変化を解析し、解析法の妥当性の検討と新しい脱メチル化メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

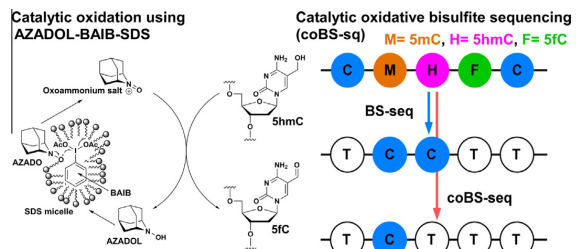
これまでに安定に DNA メチル化(5mC)を 1 塩基レベルで検出する方法としてバイサルファイト法が確立されていた。しかし、バイサルファイト法では 5hmC も 5mC と同一塩基として検出されるために区別ができない。そのため本研究では既報とは異なる 5hmC 検出法: (1)酵素 (DNMT1) を用いた 5hmC 検出法、および(2)化学反応を用いた 5hmC 検出法、の 2 種類の解析方法の確立を行った。

(1)は DNMT1 を用いた方法であるが、DNMT1 はヘミメチル化 DNA のみにメチル基を導入し、ヘミヒドロキシメチル化 DNA には導入しないという性質を持つ (図 1)。これを利用して、細胞内 DNA に人工的にメチル化 DNA をヘミメチル化し、5mC と 5hmC を区別する試みを行った。



<図 1: DNMT1 を用いた 5hmC 検出法>

(2)は化学反応を用いる方法で、これまでも他グループから酸化反応を利用した 5hmC 検出法が方向されていた。これは、5mC は酸化剤による酸化を受けにくいことに対し、5hmC は酸化され 5fC となりやすいという性質の差を利用する。5mC はシークエンスで「C」と認識されるのに対し、5fC は「T」と認識されるため、5mC と 5hmC の区別が可能である (図 2)。この原理に基づく 5hmC 検出法はこれまでも報告があったが、報告されている酸化剤では DNA 分解が激しく微量サンプルには利用できないため、申請者はよりマイルドな酸化条件による 5hmC 検出法を目指した。



<図 2: 酸化剤を利用した 5hmC 検出法>

4. 研究成果

①新たな 5hmC 検出法の確立

申請者は上記(1)および(2)の 2 種類の 5hmC 検出法を確立した。(1)で使用される酵素 DNMT1 は所属研究室で作製したタンパク質を用いたが、既報で 5hmC 検出に利用されている TET タンパク質と比べて安定に存在することができるため、実験間のばらつきが少なく 5hmC の検出が可能だった。また、本手法の原理をさらに発展させた 5hmC 解析法が所属研究室 (大阪大学) と共同研究を行っている研究室 (東京医科歯科大学・幸田尚先生) で開発されており、DNMT1 を用いた 5hmC 検出は有用性が高いと考えられる (Kawasaki et al., 2016)。

また、申請者は酸化剤を用いた 5hmC 検出法を試みた (東京大学・福沢世傑先生との共同研究)。本研究に利用した酸化剤は AZADOL/BAIB であるが、酸化剤にミセルを形成させることで強力な酸化作用を抑制することができる。既に酸化剤を利用した方法: oxBS-seq が別グループより報告されているが、本手法はマイルドな酸化反応であるため DNA 分解が抑えられることが期待された。その結果、非常に操作が簡便で再現性がよく DNA 分解が少ない酸化条件を決定することができ、微量サンプルの DNA から解析可能になることが期待できる 5hmC 検出法が確立できた。

これらの手法については(1)は 2015 年 FEBS Open Bio 誌に、(2)は 2016 年 Bioorg Med Chem 誌に報告している。

②確立した 5hmC 検出法を利用したマウス

ES 細胞での 5hmC 検出と脱メチル化制御機構の解析

また、手法(2)を用いて ES 細胞の培養条件を変えることで DNA メチル化が変化することが知られている特定の遺伝子のプロモーター領域の 5hmC の検出を行った。その結果、予想通り脱メチル化の過程の細胞では 5hmC を検出することができた。

この解析では脱メチル化の経時変化を追跡できたため、いつどこ CpG が 5hmC を多く含有するかの詳細を調べることができた(投稿準備中)。今後はさらに、5hmC が多く存在する時間および場所にどのようなヒストン修飾が多く共局在するのかを ChIP-qPCR などを用いて調べることで、5hmC を経由する脱メチル化の分子メカニズムの一つを明らかにしていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Kobayashi S, Hosoi Y, Shiura H, Yamagata K, Takahashi S, Fujihara Y, Kohda T, Okabe M, Ishino F. Live imaging of X chromosome reactivation dynamics in early mouse development can discriminate naïve from primed pluripotent stem cells. *Development* 143(16): 2958-64 (2016) doi: 10.1242/dev.136739. (査読あり)

2. Fukuzawa S, Takahashi S, Tachibana K, Tajima S, Suetake I. Simple and accurate single base resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine by catalytic oxidative bisulfite sequencing using micelle incarcerated oxidants. *Bioorg Med Chem* 24(18): 4254-62 (2016) doi: 10.1016/j.bmc.2016.07.016. (査読あり)

3. Takahashi S, Suetake I, Engelhardt J, Tajima S. A novel method to analyze 5-hydroxymethylcytosine in CpG sequences using maintenance DNA methyltransferase, DNMT1. *FEBS Open Bio* 5: 741-7 (2015) doi: 10.1016/j.fob.2015.09.003. (査読あり)

4. Garvilles RG, Hasegawa T, Kimura H, Sharif J, Muto M, Koseki H, Takahashi S, Suetake I, Tajima S. Dual Functions of the RFTS Domain of Dnmt1 in Replication-Coupled DNA Methylation and in Protection of the Genome from Aberrant Methylation. *PLoS One* 10(9): e0137509 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0137509. (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

1. (発表者名) 高橋沙央里、末武勲
(発表標題) DNA 脱メチル化制御機構の解析
(学会名等) 第 16 回日本蛋白質科学会
(発表年月日) 2016 年 6 月 9 日
(発表場所) 福岡国際会議場 (福岡県)

2. (発表者名) 高橋沙央里、末武勲、Jan Engelhardt、田嶋正二
(発表標題) 組換え DNMT1 を利用した 1 塩基解像度での 5hmC の新規解析方法の開発とゲノムへの応用
(学会名等) 第 38 回日本分子生物学会
(発表年月日) 2015 年 12 月 2 日
(発表場所) 神戸国際展示場 (兵庫県)

3. (発表者名) Saori Takahashi, Isao Suetake, Jan Engelhardt, Takashi Kohda and Shoji Tajima
(発表標題) Development of a method for a single base resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine with recombinant DNMT1
(学会名等) The 40th Naito Conference
(発表年月日) 2015 年 9 月 17 日
(発表場所) シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ (北海道)

4. (発表者名) Isao Suetake, Jan Engelhardt, Saori Takahashi, Hironobu Kimura and Shoji Tajima
(発表標題) Relative positioning of 5-hydroxymethylcytosine to 5-methylcytosine at promoters correlates with gene expression level
(学会名等) The 3rd Awaji International Workshop on “Electron Spin Science & Technology Biological and Materials Science Oriented Applications”
(発表年月日) 2015 年 6 月 14 日
(発表場所) 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県)

5. (発表者名) 高橋沙央里、末武勲、Jan Engelhardt、田嶋正二
(発表標題) 組換え DNMT1 を用いた簡便なヒドロキシメチルシトシン一塩基解像度の検出方法
(学会名等) 第 9 回日本エピジェネティクス研究会
(発表年月日) 2015 年 5 月 25 日
(発表場所) 学術総合センター (東京都)

6. (発表者名) Jan Engelhardt, Saori Takahashi, Hironobu Kimura, Tatsuhiro Tomoto, Yuichi Mishima, Masahiro Shirakawa, Takashi Kohda, Norie Tooi, Toru Kawakami, Kazuhiro Aiba, Norio Nakatsuji, Peter F. Stadler, Shoji Tajima and Isao Suetake
(発表標題) The relative positioning of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at promoters correlates with gene expression
(学会名等) Keystone Symposia, DNA methylation and Epigenomics
(発表年月日) 2015 年 4 月 1 日

(発表場所) Keystone, Colorado USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 沙央里 (TAKAHASHI, Saori)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞シ
ステム形成研究センター・研究員

研究者番号：80748856

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()