

平成21年5月20日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2008

課題番号：19209011

研究課題名（和文） エピゲノム解析基盤の確立と遺伝医学への応用

研究課題名（英文） ESTABLISHMENT OF EPIGENOMIC ANALYSIS TECHNOLOGY AND ITS APPLICATION TO MEDICAL GENETICS

研究代表者

佐々木 裕之（SASAKI HIROYUKI）

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授

研究者番号：30183825

研究成果の概要：エピゲノムは細胞のエピジェネティックな修飾の総体であり、発生・分化・がん等において重要な働きをする。網羅的・体系的なエピゲノム解析基盤を確立する目的で研究を行い、①独自のメチル化 DNA 濃縮ツールを開発し、②マウスの細胞を用いて網羅的解析技術を確立し、③この方法をヒト培養細胞や健常者・各種疾患由来の細胞に応用した。これにより、④様々なクロマチン因子の相互作用や標的配列を同定することに成功し、⑤ヒト・チンパンジー間の DNA メチル化の差を同定し、エピジェネティクスの制御機構や多様性・進化との関わりを研究する基盤を確立した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	19,500,000	5,850,000	25,350,000
2008年度	17,800,000	5,340,000	23,140,000
年度			
年度			
年度			
総計	37,300,000	11,190,000	48,490,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：エピジェネティクス、エピゲノム、DNA メチル化、クロマチン、マイクロアレイ、遺伝学、癌、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスは遺伝情報発現を調節する重要な機構であり、その分子の実体は DNA メチル化、ヒストン等の細胞核内タンパク質の翻訳後修飾、およびそれらに基づくクロマチンの高次構造形成などが担う。特定の細胞が持つこれらエピジェネティックな修飾の総体はエピゲノムと呼ばれる。従来、発生・分化・がん等においてエピゲノム全体の变化を知ることは非常に困難であったが、研

究開始当初においてヒト・マウスなどのゲノムタイリングアレイが市場に投入され、これをクロマチン免疫沈降（ChIP）と組み合わせることで、網羅的なエピゲノム解析が可能となった。代表者の佐々木と分担者の中尾はそれまでそれぞれ DNA メチル化酵素（DNMT）、メチル化 DNA 結合ドメイン（MBD）蛋白質の研究等で実績を上げていた。そこで、これまでの互いの成果を生かしつつ協力してエピゲノム解析基盤を確立することを目指して

本研究課題を提案するに至った。エピゲノム解析技術を確立することはこれからの遺伝医学の重要な基盤研究に位置づけられる。

2. 研究の目的

以下の具体的な目的を持って研究を行った。

(1) 中尾が単離したメチル化 DNA 結合蛋白質 MBD1 を用いた独自のメチル化 DNA 濃縮法を開発する。通常、高価な抗 5-メチルシトシン抗体を大量に用いてマイクロアレイに適用するメチル化 DNA を集めるが、これを安価で効率のよいアフィニティー精製法と置き換える。

(2) モデル系として DNMT 変異マウスなどを用い、上記システムを用いたエピゲノム解析法の有用性を確認する。

(3) この方法をヒトがん細胞や健康者・各種患者由来の細胞に応用し、DNA メチル化に異常のある遺伝子の同定を試みる。

(4) メチル化 DNA 結合蛋白質、クロマチン再構成因子、インスレーター結合蛋白質等と相互作用する因子を同定し、網羅的解析技術を用いてそれらのゲノム上の局在を明らかにし、遺伝子発現制御機構の詳細を解明する。

(5) エピジェネティックな変化が多様性・進化に寄与する可能性を探るため、ヒトの集団内で DNA メチル化の多様性の頻度、程度などを検討するほか、チンパンジーとのメチル化比較を行い、塩基配列は高度に保存されているがメチル化状態が大きく異なる領域がないか調べる。

3. 研究の方法

(1) メチル化 DNA の濃縮：ヒト・マウスゲノムのメチル化された DNA 領域を濃縮して集めるため、抗 5-メチルシトシン抗体を用いた免疫沈降、または MBD1 を用いたアフィニティー精製を行った。アフィニティー精製には MBD1 のメチル化 DNA 結合ドメインを GST 蛋白質と融合して大腸菌で発現させ、これを精製して用いた。濃縮率はメチル化の程度が既知の配列について定量 PCR を実施することで確認した。

(2) ChIP：それぞれのクロマチン蛋白質に特異的な抗体を用いて標準的な方法で行った。

(3) マイクロアレイ解析：主に Affymetrix 社製のシステムを用いた。目的によって適宜ゲノムタイリングアレイまたはプロモーターアレイを使い分けた。

(4) 蛋白質相互作用の解析：酵母ツーハイブリッド法、免役沈降法、タグ付き蛋白質のプルダウン法と、ゲル電気泳動、ウエスタンブロットティング、質量分析などを用いて相互作用する蛋白質の同定や複合体の解析を行った。

(5) 核内局在の解析とクロマチンループの解析：クロマチン蛋白質や特定のヒストン修飾の核内局在を調べるため、特異的な抗体を用いて免疫染色による解析を行った。手順は定法に従った。また、クロマチンループ形成を調べるため 3C (クロマチン・コンフォメーション・キャプチャー) 法による解析を行った。

4. 研究成果

研究の目的 (2.) に記載した 5 つの研究項目に分けて述べる。

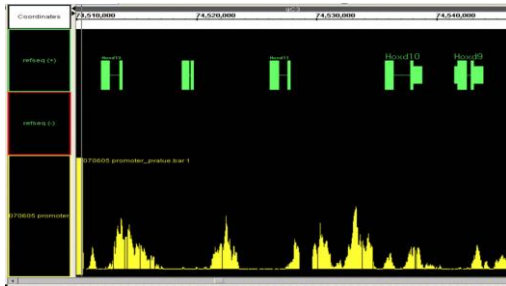
(1) MBD1 融合蛋白質を用いた独自のメチル化 DNA 濃縮法の開発

我々が作成した融合蛋白質が市販の抗 5-メチルシトシン抗体とほぼ同等の濃縮効率 (シグナル：ノイズ比) を示すことを定量 PCR 法で確かめた。また、濃縮・精製したメチル化 DNA 断片を用いて再現性の高いマイクロアレイデータを得た。融合蛋白質は大腸菌を用いて大量に精製でき、また用いる蛋白質質量も抗体と比べて微量で済むため、安価で高効率のメチル化 DNA 濃縮ツールを開発することができた。

(2) マウスをモデル系としたエピゲノム解析法の確立と確認

まず、野生型雄マウスの精巣から様々な発生段階の生殖細胞 (精原細胞、精母細胞、円形精子細胞、精子) を調整し、プロモーターアレイを用いた網羅的メチル化解析を行った。この実験は主に抗 5-メチルシトシン抗体を用い (得られた結果の一部を図に示す)、一部の実験で上記のアフィニティー精製法を用いた。その結果、マウスの精子形成過程でメチル化パターンがダイナミックに変化すること、とくにパキテン期精母細胞で大規模な脱メチル化が生じることを見つけた。また、DNA メチル化に異常のある変異体を用いた解析では、DNMT を過剰発現する精子幹細胞がメチル化異常と配偶子形成障害を示すことを報告した。一方、DNMT ノックアウトマウスの精巣細胞を解析する予定であったが、変異マウスの頻度が低いこと、得られる細胞数が限られること、などによりサンプル収集に手間取り、調整したサンプルは今後解析することになった。よって、一部計画を変更せざるを得なかったが、全体としてマウスをモデル系としてエ

ピゲノム解析法を確立するという目的を十分に達成した。



(3) ヒトがん細胞や健常者・各種患者由来の細胞への応用

上述したDNAメチル化の網羅的解析のほか、ChIP法によるヒストン修飾や各種クロマチン蛋白質の網羅的局在解析技術を確立し、これを培養ヒトがん細胞に適用し、次項で述べる各種クロマチン蛋白質の標的配列同定や作用機序の解明を行った。また、健常者・ICF症候群（DNMT3Bの変異による劣性遺伝病）患者・Rett症候群（MBD蛋白質のひとつであるMeCP2の変異によるX連鎖遺伝病）患者（一卵性双生児例）の血液サンプルを得、上記メチル化DNA濃縮法によりメチル化DNA画分を調整した。症例はいずれも稀なものでサンプルの収集に時間を要したが、現在プロモーターアレイを用いた網羅的メチル化解析を行っており、データの詳細を解析中である。この解析により、症状と直結するDNMT3BやMeCP2の標的遺伝子を明らかにできると期待している。

(4) 各種クロマチン蛋白質の標的配列同定や作用機序の解明

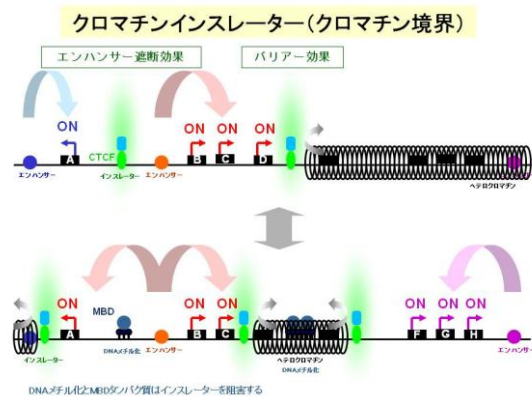
①MBD1とポリコームタンパク質群の協働性：遺伝子の転写抑制には、DNAメチル化を認識するMBD蛋白質を介する経路と、ヒストンH3の27番目リジン（H3K27）のメチル化を認識するポリコームタンパク質群を介する経路が知られている。しかしこの2つの経路の関連性は不明であった。MBD1と結合する因子を探索し、ポリコームタンパク質群（Ring1b、hPc2）と相互作用することを見出した。よって、2つの経路の因子が異なる足場に結合しつつ直接相互作用することで、HOXA遺伝子群の転写抑制やヘテロクロマチン形成に協働することが示唆された。

②Sp1-MCAF1複合体によるテロメラーゼ遺伝子制御：テロメラーゼはテロメア長を維持することで細胞分裂を保障している。テロメラーゼサブユニットの遺伝子群はSp1によって発現調節される。今回、ヒトがん細胞で高発現するMCAF1がSP1に依存したテロメラーゼ活性の維持に関与することを見出した。MCAF1は組織型が異なる種々のがんで過剰発現しているため、これがが

んに共通した増殖促進機構である可能性がある。MCAF1はMBD1-MCAF1-SETDB1複合体では転写抑制に、Sp1-MCAF1複合体では転写活性化に働く。

③細胞周期とポリコームタンパク質群の局在：ポリコーム群タンパク質はPRC1とPRC2の2つの複合体を形成し、PRC2はH3K27のメチル化を、PRC1はメチル化されたH3K27の認識を行う。抑制性のクロマチンを形成するPRC2およびPRC1の核内局在について細胞周期を同調した培養細胞で解析を行ったところ、PRC結合性のクロマチンがG1期に再構築され、これがS期への移行に必要なことを見出した。この事実はG1期の細胞刺激によってクロマチンが変換できる可能性を示唆する。

④クロマチンインスレーターによる遺伝子クラスター制御：コヒーシ複合体は細胞分裂時の姉妹染色分体の接着に関わるが、分裂間期の遺伝子制御に関与している可能性も示唆されていた。ヒトゲノム上のインスレーター結合蛋白質CTCFおよびコヒーシ蛋白質RAD21の集積部位を網羅的解析法で調べ、それらの多くが共局在することを見出した。これにより、CTCFとコヒーシ複合体の協働によるクロマチン境界の形成という新たなモデルを提唱した。さらに、高脂血に関わるアポリポ蛋白質APO遺伝子クラスターのインスレーターの同定、クロマチンループ解析、CTCFとRAD21の選択的ノックダウンにより、APO遺伝子群の制御にインスレーターが必要であることを示した。インスレーターの形成はDNAメチル化とMBDの結合で阻害されるなどエピゲノム状態と密接に関係しており（モデルを図に示した）、今後さらなる検討を要する。



(5) DNAメチル化の個人差とヒトの進化

DNAメチル化の個人差の手がかりを得るため、20-30代の健常者血液サンプルを全プロモーターアレイおよび21番、22番染色体のタイリングアレイを用いて網羅的に解析した。しかし、調べた範囲において明確な個体

差は検出できなかつた。この結果は、少なくとも若い世代においてはマイクロアレイで検出できるほどの大きなメチル化の差異は稀であることを示す。また、ゲノム配列の違いがわずか1.2%であるヒトとチンパンジーの間にどの程度DNAメチル化の差があるのか探るため、兩種それぞれ4個体ずつのDNAについてヒト21番、22番染色体のタイリングアレイを用いて比較した。その結果、全体的には非常に似たパターンであった。このことはヒトのアレイをチンプに適用できること（すなわち、塩基配列の違いによるハイブリ漏れはほとんどないこと）、およびメチル化のパターンは兩種で非常に似ていることを示す。しかし、詳細な比較によりメチル化の違いがあると思われる候補領域を約200カ所見出し、これからランダムに選んだ9カ所を調べたところ、5カ所で明らかなメチル化の違いを確認した（バイサルファイト法による）。今後はこの解析を拡大し、遺伝子発現への影響等を調べる予定である。

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23件）

1. S. Takashima, M. Takehashi, J. Lee, S. Chuma, M. Okano, K. Hata, I. Suetake, N. Nakatsuji, H. Miyoshi, S. Tajima, Y. Tanaka, S. Toyokuni, H. Sasaki, M. Kanatsu-Shinohara, and T. Shinohara. Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenesis defects. **Biol. Reprod.** (in press). 2009. 査読有。
2. T. Mishiro, K. Ishihara, S. Hino, S. Tsutsumi, H. Aburatani, K. Shirahige, Y. Kinoshita, and M. Nakao. Architectural roles of multiple chromatin insulators at the human apolipoprotein gene cluster. **EMBO J.** (in press). 2009. 査読有。
3. L. Liu, K. Ishihara, T. Ichimura, N. Fujita, S. Hino, S. Tomita, S. Watanabe, N. Saitoh, T. Ito, and M. Nakao. MCAF1/AM is involved in Spl-mediated maintenance of cancer-associated telomerase activity. **J. Biol. Chem.** 284: 5165-5174, 2009. 査読有。
4. S. Watanabe, Y. Ueda, S. Akaboshi, Y. Hino, Y. Sekita, and M. Nakao. HMG2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. **Am. J. Pathol.** 174: 854-868, 2009. 査読有。
5. H. Sasaki and Y. Matsui. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. **Nat. Rev. Genet.** 9: 129-140, 2008. 査読有。
6. S. Kuramochi-Miyagawa, T. Watanabe, K. Gotoh, Y. Totoki, A. Toyoda, M. Ikawa, N. Asada, K. Kojima, Y. Yamaguchi, T. Ijiri, K. Hata, E. Li, Y. Matsuda, T. Kimura, M. Okabe, Y. Sakaki, H. Sasaki, and T. Nakano. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. **Genes Dev.** 22: 908-917, 2008. 査読有。
7. R. Hirasawa, H. Chiba, M. Kaneda, S. Tajima, E. Li, R. Jaenisch, and H. Sasaki. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. **Genes Dev.** 22: 1607-1616, 2008. 査読有。
8. T. Aoto, N. Saitoh, Y. Sakamoto, S. Watanabe, and M. Nakao. Polycomb group protein-associated chromatin is reproduced in post-mitotic G1 phase and required for S phase progression. **J. Biol. Chem.** 283: 18905-18915, 2008. 査読有。
9. K. S. Wendt, K. Yoshida, T. Itoh, M. Bando, B. Koch, E. Schirghuber, S. Tsutsumi, G. Nagae, K. Ishihara, T. Mishiro, K. Yahata, F. Imamoto, H. Aburatani, M. Nakao, N. Imamoto, K. Maeshima, K. Shirahige, and J. M. Peters. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. **Nature** 451: 796-803, 2008. 査読有。
10. 富澤信一, 佐々木裕之. 細胞のエピジェネティクス. 遺伝子医学MOOK (別冊 進み続ける細胞移植治療の実践-再生医療の実現に向けた科学・技術と周辺要素の理解): 145-148, 2008. 査読なし。
11. 古海弘康, 佐々木裕之. エピジェネティクス-疾患を見つめる新たな視点. **BIO Clinica** 23: 155-159, 2008. 査読なし。
12. 古海弘康, 佐々木裕之. 遺伝か環境か?

- エピジェネティクスの視点から. **医学のあゆみ** (臨床ゲノム研究-成果と課題) 225: 949-953, 2008. 査読なし。
13. 平澤竜太郎, 佐々木裕之. ゲノムインプリンティング. **生体の科学** (増大特集 現代医学・生物学の仮説・学説 2008) 59: 402-403, 2008. 査読なし。
14. Y. Kato, M. Kaneda, K. Hata, K. Kumaki, M. Hisano, Y. Kohara, M. Okano, E. Li, M. Nozaki, and H. Sasaki. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. **Hum. Mol. Genet.** 16: 2272-2280, 2007. 査読有。
15. H. Kobayashi, A. Sato, E. Otsu, H. Hiura, C. Tomatsu, T. Utsunomiya, H. Sasaki, N. Yaegashi, and T. Arima. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. **Hum. Mol. Genet.** 16: 2542-2551, 2007. 査読有。
16. Y. Sakamoto, S. Watanabe, T. Ichimura, M. Kawasuji, H. Koseki, H. Baba, and M. Nakao. Overlapping roles of the methylated DNA binding protein MBD1 and polycomb group proteins in transcriptional repression of HoxA genes and heterochromatin foci formation. **J. Biol. Chem.** 282: 16391-16400, 2007. 査読有。
17. Y. Ueda, S. Watanabe, S. Tei, N. Saitoh, J. Kuratsu, and M. Nakao. The high mobility group protein HMGA1 inhibits retinoblastoma protein-mediated cellular G0 arrest. **Cancer Sci.** 98: 1893-1901, 2007. 査読有。
18. S. Kobayakawa, K. Miike, M. Nakao, and K. Abe. Dynamic changes in the epigenomic state and nuclear organization of differentiating mouse embryonic stem cells. **Genes Cells** 12: 447-460, 2007. 査読有。
19. 佐々木裕之, 富澤信一. エピジェネティクスの話: 三毛猫の模様からがん治療まで. **ファルマシア** 43: 310-314, 2007. 査読なし。
20. 佐々木裕之, 熊木健治, 小林久人, 加藤讓, 平澤竜太郎. バイサルファイト法によるDNAメチル化解析の落とし穴(クローズアップ実験法). **実験医学** 25: 2191-2196, 2007. 査読なし。
21. 日野信次朗, 渡邊すぎ子, 中尾光善. DNAメチル化を介したエピジェネティック制御機構. **実験医学増刊号** 25: 118-123, 2007. 査読なし。
22. 丁秀鎮, 坂本快郎, 赤星慎一, 三代剛, 渡邊すぎ子, 斉藤典子, 中尾光善. 老化および発癌のエピジェネティクス. **日本高齢消化器病学会誌** 8: 28-37, 2007. 査読なし。
23. 市村隆也, 中尾光善, 伊藤隆明. 老化のエピジェネティクス. **The Lung** 15: 72-75, 2007. 査読なし。
- [学会発表] (計 12 件、招待講演のみ記載)
- ① H. Sasaki. The epigenome and small RNA repertoire in mammalian germ cells. International Symposium Decoding Epigenetic Code, 2008/12/15-16, Tokyo.
- ② 佐々木裕之. 哺乳類の生殖系列におけるゲノムインプリンティングのプログラム機構. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(シンポジウム), 2008/12/9-12, 神戸.
- ③ 中尾光善. クロマチン因子による遺伝子・細胞制御機構. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(シンポジウム), 2008/12/11, 神戸.
- ④ M. Nakao. Epigenetic regulation and deregulation in cancer. Northeastern Asian Symposium on Cancer Epigenetics., 2008/11/7, Jeju, Korea.
- ⑤ 中尾光善. Active involvement of chromatin factors in cancer epigenome. 第65回日本癌学会総会(International Session), 2008/10/29, 名古屋.
- ⑥ 佐々木裕之. 生殖細胞の発生・リプログラミングとエピジェネティクス. 日本人類遺伝学会第53回大会(シンポジウム), 2008/9/29, 横浜.
- ⑦ 中尾光善. エピジェネティクス機構による細胞制御と病態. 日本人類遺伝学会第53回大会(シンポジウム), 2008/9/29 横浜.
- ⑧ H. Sasaki. Gametogenesis and imprinting in mice. EMBO Workshop on Genomic

Imprinting, 2008 /9/21-24, Singapore.

⑨M. Nakao, Epigenetic gene and cell regulation by chromatin factors, The 21th Naito Conference on Nuclear dynamics and RNA [I], 2008/6/27, Hokuto.

⑩中尾光善. 細胞異型の成立を探る：がんのエピジェネティクスと核内構造. 第46回日本臨床細胞学会秋季大会（特別講演），2007/12/1, 仙台.

⑪佐々木裕之. エピジェネティクスから見た遺伝学. 第14回日本遺伝子診療学会大会, 2007/7/27-28, 松山.

⑫H. Sasaki. Epigenomics in reproduction and development. The Asian Network of Epigenomics: Epigenomics: Technology, Products, and Obstacles, 2007/6/14, Suita.

[図書] (計 2 件)

① 中尾光善. 東京医学社. エピジェネティクスと疾患. 小児内科増刊号(小児疾患診療のための病態生理1, 第4版). (2008) 1574頁 (30-35) .

② 日野信次朗, 中尾光善. 南山堂, DNAメチル化と転写制御機構. 転写制御とエピジェネティクス (The Frontiers in Medical Sciences, 加藤茂明編) (2008) 237頁 (91-98) .

[その他]

ホームページ

<http://www.nig.ac.jp/labs/HumGen/index.html>

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 裕之 (SASAKI HIROYUKI)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授
研究者番号：30183825

(2) 研究分担者

中尾 光善 (NAKAO MITSUYOSHI)

熊本大学・発生医学研究所・教授
研究者番号：00217663