

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号 : 17102

研究種目 : 新学術領域研究・研究課題提案型

研究期間 : 2009~2011

課題番号 : 21200037

研究課題名 (和文)

マウスにおけるエピゲノム種内多型の同定および遺伝的多型や表現型多様性との関係性

研究課題名 (英文)

Epigenomic variation and its relationship with genetic and phenotypic variations in the mouse

研究代表者

一柳健司 (ICHIYANAGI KENJI)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号 : 70401560

研究成果の概要 (和文) :

生物は同一種であっても個体ごとに表現型が異なる。この性質は個体集団内に表現型の分離を稀に引き起こし、種分化の原動力となる。これまで個体差の問題は主に集団内の遺伝的多様性を通して説明されており、エピジェネティックな多様性との関係はほとんど研究されていなかった。そこで、本研究では大規模シーケンサーを用いて同一種に属するが亜種が異なるマウスについてゲノムワイドに DNA メチル化状態を比較した。まず本研究を進めるにあたって、MBD タンパク質を利用して効率的にメチル化 DNA 領域を回収する方法を開発した。この方法は現在用いられているメチル化 DNA 濃縮法の中で最も濃縮率が良く、大規模シーケンサーを用いて解析する (MBD-seq) 際の必要リード数、シーケンシングコストを低下させることに成功した。この技術を (株) 医学生物学研究所に移転し、現在、同社より市販化されている。肝臓と精子 DNA について MBD-seq 法で解析し、二系統間でメチル化レベルが異なる領域をそれぞれ約 1500 カ所、約 5000 カ所同定した。興味深いことに、肝臓においてメチル化レベルが異なっていた領域の約半分は精子でもメチル化レベルが異なっていた。また、いくつかの領域について F1 雑種の解析を行い、メチル化レベルの差は主にシス配列によって制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) :

Phenotypic variations within a population of a species can lead to speciation. Besides genetic variations, variations of epigenetic regulation, such as DNA methylation and histone post-translational modifications, among the individuals could be a source of such phenotypic variation. In this study, we first established a method to collect methylated genomic DNA regions, then utilized a next generation sequencer to compare DNA methylation between mouse strains of the identical species but different subspecies, which identified about 1500 and 4000 regions showing difference in DNA methylation levels between the strains in liver and sperm, respectively. Interestingly, about half of the regions identified in liver showed methylation difference in sperm as well. Together with a F1 hybrid analysis, the results suggest that majority of intraspecific epigenetic variations are due to cis-sequences of these regions.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム多様性、ゲノム機能・発現、エピゲノム多様性

1. 研究開始当初の背景

表現型の多様性（個体差）は生物一般に見られる現象であるが、その生成機序はよく分かっていない。表現型を規定する最も大きな要因は遺伝的な性質（ゲノム情報）だと考えられ、これまで遺伝的な多様性と表現型との関係性について、種内・種間を問わず精力的に研究されてきた。エピジェネティック制御とはこのような遺伝情報を運用する遺伝子発現制御の一つであり、遺伝情報の変化なしに表現型の変化を引き起こすことが知られている。例えば、A^uアレルをもつマウスでは、同じ遺伝的背景であっても個体ごとに毛色の濃淡が異なり、各個体の毛色は *Agouti* 遺伝子上流領域の DNA メチル化レベルによって指令されていることが知られている。しかし、エピジェネティックな個体差と表現型との関係やゲノム変化とエピゲノム変化の関係については、網羅的・包括的な研究がほとんどなく、エピジェネティックな多様性がどの程度表現型の多様性に寄与しているのかは不明であった。

2. 研究の目的

そこで、本研究ではマウスをモデルとして、主要なエピジェネティック情報の一つである DNA メチル化情報について、同じ種ではあるが遺伝的に少し離れている系統（亜種）間で比較解析を行った。真にエピジェネティックな変化と表現型・遺伝子発現の変化を解析するのであれば、純系マウスの個体間で比較する方が良いかもしれない。しかし、本研究では進化・種分化の過程でゲノムやエピゲノムが動的に変化していることを考慮し、地理的隔離によって別亜種になったマウス二群での比較を行うことで、ゲノム変化とエピゲノム変化の関係性についても解析することを目指した。

3. 研究の方法

解析対象として、標準的なマウス系統である C57BL6/J（以下、B6 と略。 *Mus musculus domesticus* 由来）と国立遺伝学研究所で樹立された MSM/Ms (*Mus musculus molossinus*) を選んだ。これら二系統は毛色、体の大きさ、エネルギー代謝活性、がん発症率、行動など

多くの形質が異なっている。両者は別亜種に属するが交配は可能であり、雑種におけるシス・トランス検定が可能である。研究開始当初、B6 は既に全ゲノム配列が決定されており、MSM は解析途中であった（H24 年 5 月現在、ゲノムの大部分が解読されている）。

domesticus 亜種と *molossinus* 亜種は約 100～200 万年前に分岐したと考えられており、後述のゲノム配列比較から、B6 と MSM 系統間の SNP 頻度は 100bp 中に 0.7 カ所程度であることが明らかにされている。

(1) ゲノム配列比較

研究開始時点で両系統間の SNP が約 1000 万カ所同定されていたので、本研究では挿入・欠失について解析した。MSM ゲノム配列の解読がキャピラリーシーケンサーを用いたショットガンシーケンシング（平均断片長 400～500bp）で行われていたため、このリード配列を B6 ゲノム配列に対して BLAST 検索し、挿入や欠失を伴うリードを同定した。また、一つのリードが B6 ゲノム上で 2 つの場所（同じ染色体で同じ向き）に部分的にマップされるものを同定し、その情報から B6 特異的に存在する配列を同定した。同定できた配列に対して RepeatMasker を適用して、トランスポゾン同定した。

(2) 抗メチルシトシン抗体を用いた DNA メチル化解析

研究開始当時、網羅的なエピゲノム解析はゲノムタイリングアレイを用いて解析されていた。DNA メチル化解析には抗メチルシトシン抗体を用いてメチル化 DNA 領域を濃縮して、ゲノムタイリングアレイで解析する MeDIP-chip 法が主流であったため、本研究でも両系統のマウスの肝臓 DNA を調製し、抗体でメチル化 DNA 断片を回収、蛍光ラベル後、アフィメトリクス社のマウスゲノムタイリングアレイ（染色体 3、7、18 番をカバー）にハイブリダイゼーションした。各プローブの蛍光強度を測定し、TAS ソフトウェア（アフィメトリクス）と自作スクリプトを用いてメチル化解析を行った。さらにアレイ解析の結果をバイサルファイト PCR 法によって検証した。

(3) MBD-seq 法の開発

後述するが、抗体を用いた方法は濃縮効率が悪く、信用性の高いデータを得ることができなかった。そこでヒト MBD1 タンパク質のメチル化 DNA 結合ドメイン (MBD) を用いる方

法を開発した。この研究はリコンビナント MBD を発現するプラスミドの構築から行った。MBD を用いてメチル化 DNA の回収方法を確立した後、イルミナ社の大規模シーケンサー (GAII) で回収断片を網羅的に解析する方法の開発を行った (MBD-seq 法)。

(4) MBD-seq 法による DNA メチル化状態のゲノムワイド比較解析

前項で確立した MBD-seq 法を用いて、肝臓 DNA のメチル化状態を両系統間で比較した。さらに、精子 DNA についても同様の解析を行い、系統間比較と肝臓エピゲノムとの比較を行った。サンプルは各系統、各組織ごとにそれぞれ 2 個体のゲノム DNA を用いてシーケンシングライブラリーを作成した。また、コントロールとして、肝臓ゲノム DNA を MBD で処理することなくそのままライブラリーにした。それぞれのライブラリーごとに GAII のフローセル 1 レーンを使ってシーケンシングした (コントロール DNA については 2 レーン)。メチル化 DNA 領域にはトランスポゾン配列が濃縮されているので、シーケンシングはトランスポゾン配列であってもある程度のマッピングが可能となるように、75bp の両端読みで行った。各サンプルについて、3000 万~4000 万リード程度の配列情報を取得し、B6 ゲノム配列上にマッピングした。マッピングには Bowtie を使い、B6 サンプルの場合は 1 カ所のミスマッチまで、MSM サンプルの場合には 2 カ所のミスマッチまで許してユニークにマップされるものをシーケンシングタグとして回収した。コントロールのシーケンシングタグデータを元に MACS を用いてメチル化 DNA 断片のピーク領域を同定した。各系統、各組織について、biological duplicate 間で共通して現れるピークをメチル化領域と判定した。系統間の比較解析にはどちらかの系統でのみピークとして同定される領域を選び出し、さらにその中から対照系統のシーケンシングタグが 10 以下しかない領域を亜種間メチル化差異領域 (subspecies differentially methylated regions, S-DMRs) とした。同定された領域についてバイサルファイト法による検証を行った。

(5) F1 雑種を用いたシス・トランス解析
研究期間中に研究室の引っ越しがあり (国立遺伝学研究所から九州大学)、MSM マウスを純化して九州大学の飼育施設に導入するのに時間がかかり、1 年以上実験できない状態が続いたが、最終年度の秋に MSM を純化することができたので、B6 と MSM の F1 雑種を作成した。前項で得られた興味深い領域について F1 個体での DNA メチル化状態をバイサルファイト PCR 法にてアレルごとに分けて解析した。

4. 研究成果

(1) MSM ゲノムのショットガンリードの解析から、挿入・欠失配列 (以下 InDel と略) を同定した。短い InDel は除き、100bp 以上の長さを持つ InDel を 22,362 カ所同定した。配列長は 200bp 程度から 10kb 以内のものが多かったが、最も長いものは 56.8kb であった。全 InDel 配列の総長は 38Mb あり、ゲノム配列変化に大きく寄与していることが明らかとなった。全ての InDel 配列を RepeatMasker で解析したところ、全体の約 3 分の 2 (14,368 カ所) はレトロトランスポゾンの挿入によるものであった。このような InDel に寄与したレトロトランスポゾンは L1、B1、B2、IAP、MERVK、MERVL、ETn など、これまでに遺伝学的に転移活性が確認されているレトロトランスポゾンのファミリーがほとんどであり、亜種分岐の後、それぞれの系統で転移したと考えられる。特に L1 はレトロトランスポゾン挿入多型の約半分を占めていた。これらのレトロトランスポゾンの挿入多型だけで 33Mb にもなり (全ゲノム長の 1%以上)、レトロトランスポゾンがゲノム進化に重要な役割を演じていることを明らかにした。

(2) 市販の抗メチルシトシン抗体を用いて肝臓ゲノム DNA からメチル化領域を濃縮した。メチル化されていること又はされていないことが分かっている領域について、回収率を定量 PCR で調べたところ、メチル化領域は非メチル化領域よりも数倍から 10 倍程度濃縮できていた。回収 DNA をアフィメトリクス社のキットでラベルして、ゲノムタイリングアレイにて解析し (全ゲノム DNA をコントロールとして用いた)、3、7、18 番染色体のメチル化データを取得した。蛍光強度を TAS ソフトウェアでノーマライズし、さらにその値を正規化した後、MSM と B6 で値が有意に異なる領域を 546 カ所同定した。しかしながら、これらの領域のメチル化レベルをバイサルファイト PCR 法にて解析したところ、どれも二系統間で差は見られなかった。つまり、MeDIP-chip 法では信頼のおけるデータを取得することができなかった。当時、アフィメトリクスのアレイを用いて MeDIP-chip 法でヒトやマウスのメチル化解析を行っていたグループは国内外に多数あったが、どこでもあまりうまく解析できなかったことを考え合わせると MeDIP-chip 法は DNA メチル化解析には向かないようである。原因は (1) 抗体による濃縮がさほど高くない、(2) ゲノムタイリングアレイのプロブデザインが機械的で GC 含量や Tm 値なども異なり、各蛍光強度の補正も正確にできるものではなかつ

たこと等が考えられる。

(3) 前項での結果を踏まえ、研究方法を再検討することにした。そこで、メチル化 DNA 濃縮方法を抗体から MBD に変更し、さらにマイクロアレイではなく、当時所属機関に導入されたばかりの大規模シーケンサー (イルミナ社) を解析に用いることを考えた。

MBD を用いた濃縮方法はキットとして市販されていたが、濃縮効率は抗体とさほど変わらなかったことから、まずは独自で MBD を作出することにした。ヒト MBD1 の cDNA 配列をもつプラスミドを熊本大・中尾教授より分与頂き、pET32c にリクローニングした。このコンストラクトはチオレドキシンの C 末端側にヒト MBD1 の MBD (アミノ酸 1~75 番領域) が融合された遺伝子を発現するもので、ヘキサヒスチジンタグ配列も含まれる。これを大腸菌 Rosetta (DE3) に導入して IPTG で発現誘導したところ、融合タンパク質を可溶化状態で得ることができた。ニッケルカラムによる精製を行い、高純度の融合タンパク質を得た。この方法では大腸菌培地 1L あたり約 20mg のタンパク質を精製できた。

次にメチル化 DNA の回収法の検討を行った。始めは高い濃縮効率を達成できなかったが、検討を重ねた結果、最終的には非常に高い濃縮効率を達成できた。つまり、トリス緩衝液、塩化ナトリウム、酵母 tRNA、および Triton 存在下でゲノム DNA と融合タンパク質を 4°C で 3 時間混和し、続いて Dynabeads-TALON (インビトロジェン社) を加えて、強力磁石で回収することで、(2) 項で用いたコントロール・メチル化領域を 700~1000 倍濃縮することができた。この技術を株式会社・医学生物学的研究所 (MBL) に移転し、現在は「MethylHunter MBD1-based methylated DNA enrichment kit」として市販されている。

確立した方法を用いて B6 肝臓のゲノム DNA を濃縮し、イルミナ・シーケンサー用のライブラリーを調製した。イルミナ・シーケンサーではライブラリーの DNA 断片の長さによって、シーケンシングの質や量に影響を与えるので、断片長は 200bp 程度が良いとされていた。しかし、断片長を制限することによって回収されている断片の集団が変化する可能性が考えられたので、平均断片長が 200, 300, 400, および 500 bp に分けてライブラリーを作成し、それぞれ GAI1 のフローセル 1 レーンずつシーケンシングした。断片長が短い方がリード数は多く、クオリティスコアも高かったが、ユニークにマップされるリードの割合は長い断片のライブラリーの方が高かった。マップされた領域の CpG 密度を調べたところ、平均断片長が 200bp のライブラリーでは 1.9~5.6% (最頻値 3.0%)、平均断片長が 300, 400, 500bp のライブラリーにおいて

は、1.7~5.0% (最頻値 2.5%)、1.5~4.4% (最頻値 2.1%) および 1.4~4.4% (最頻値 2.0%) であった。従って、断片長が短いほど CpG 密度の高い領域が回収できていた。短断片長ライブラリーではペリセントロメリックサテライト DNA (高度にメチル化されたタンデムリピート配列) の含有率が高かったが、総リード数が多いため、ユニークにマッピングできるリード数も多かった。一般的に CpG 密度の高い領域ほど DNA メチル化レベルの変化に対応して遺伝子発現等のゲノム機能の影響が大きくなるため、本研究では短断片長ライブラリーで亜種間比較を行うことにした。

(4) 成体雄の肝臓 DNA について、B6 系統 2 個体、MSM 系統 2 個体から、MBD 濃縮ライブラリーを作成し (平均断片長 200bp)、イルミナ GAI1 にて各 1 レーンずつシーケンシングし (75 bp paired-end)、各サンプルから得られたマッピングピークを比較して、B6 特異的にメチル化されている S-DMR を 879 カ所と MSM 特異的にメチル化されている S-DMR を 607 カ所同定した。これらの領域は biological duplicate 間で共通するピークであって、対照系統ではほとんどマッピングされない領域で且つピーク領域の長さが 300bp 以上、領域内の CpG 密度が 3% 以上の領域である。このような S-DMR は各染色体上に散在しており、プロモーター領域、エキソン、イントロン、遺伝子間領域など、様々な領域に見られた。興味深いことに、117 遺伝子の転写開始点付近に S-DMR が同定された。

次に精子 DNMA について同様の解析を行い、B6 特異的にメチル化されている S-DMR を 3354 カ所、MSM 特異的にメチル化されている S-DMR を 1654 カ所同定した。精子でより多くの S-DMR が同定できている理由は、精子ではペリセントロメリックサテライトが低メチル化しているため、全体的にユニークにマップされるリードが多いことによる。肝臓のデータと比較したところ、肝臓での S-DMRのうち約半分 (717 カ所) は精子でも S-DMR になっていた。一方、残り半分は精子ではメチル化レベルの差は無く、受精後に形成される S-DMR であった。

これらの S-DMR 候補領域のいくつかの領域について、バイサルファイト PCR 法にて解析したところ、約半分程度の領域は本当に S-DMR になっていたが、残りではメチル化レベルの差異は検出されなかった。従って、さらに多くのバイサルファイト PCR データを集め、より擬陽性が少ない閾値を設定する必要がある、今後の急務に課題である。一方、確実に S-DMR であった領域の中には Acn1 遺伝子のプロモーター (B6 で高メチル化) や Trim7 のプロモーター (MSM で高メチル化) が含まれていた。(1) のゲノム配列解析データを参

照したところ、興味深いことに、Acrn1 の転写開始点上流領域には B2 と呼ばれるレトロトランスポゾンが B6 特異的に挿入されていた。この B2 はメチル化されておらず、それよりも転写開始点側は低メチル化、上流側は高メチル化していた。一方、MSM では転写開始点周辺のより広い領域が低メチル化していた。これらのことは挿入された B2 配列が DNA メチル化の区画化に寄与している可能性を示唆している。メチル化の差異は精子でも確認された。一方、Trim7 プロモーターは肝臓だけで MSM 特異的にメチル化されており、精子では両系統ともにメチル化されていなかった。

発現量解析を行ったところ、Acrn1 (毛色に関わる遺伝子) は B6 で低発現、MSM で高発現しており、MSM ではプロモーター近傍の低メチル化領域が広がっていることと合致した。Trim7 (グリコーゲン合成に関わる遺伝子) は発現量の差は見られなかった。しかしながら、この結果は通常食を与えた時のもので、絶食状態あるいは高栄養食を与えた時の Trim7 の発現状態は変わるのかもしれない。一般的にプロモーターがメチル化されると発現のインダクションがかからなくなるので、B6 では MSM に比べて栄養状態の変化に対する応答性が弱い可能性が考えられる。この点は今後の研究課題の一つである。

(5) 上記の二領域について、F1 雑種の肝臓でメチル化を調べたところ、それぞれアレル特異的にメチル化されていた。すなわち、Acrn1 上流領域は MSM アレルだけがメチル化されており、Trim7 では B6 アレルだけがメチル化されていた。従って、B2 の挿入等、ゲノム配列情報の変化によって DNA メチル化パターンが変化していると考えられる。特に Trim7 のように生殖細胞では差がないにも関わらず、発生過程の間に B6 アレルだけが特異的にメチル化されるメカニズムは非常に興味深い。

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 1 件)

(1) 一柳健司, 佐々木裕之 (2009) 「ゲノムワイドな DNA メチル化解析」分子細胞治療 8, 372-376

[学会発表] (計 2 件)

(1) Ichiyangi, T., Toh, H., Ohkawa, Y., Sasaki, H., and Ichiyangi K. (2011) "Epigenetic differences between mouse subspecies in somatic and germ cells." Gordon Research Conference,

USA, MA

(2) 一柳朋子、藤英博、大川恭行、佐々木裕之、一柳健司 (2011) 「マウス亜種間における体細胞および生殖細胞での DNA メチル化の違い」第 34 回日本分子生物学会、横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○技術移転 (計 1 件)

名称: メチル化 DNA 結合タンパク質を用いたメチル化 DNA 濃縮法
移転先: 株式会社・医学生物学研究所
移転年: 2010 年

○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

http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/e_pigenome/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一柳 健司 (ICHIYANAGI KENJI)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号: 70401560

(2) 研究分担者

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし