

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510202

研究課題名（和文）

ヒストン修飾による 5'-end トランスクリプトームと DNA メチル化の変化

研究課題名（英文）

5'-end transcriptome and DNA methylation in cells treated with histone deacetylase inhibitor.

研究代表者

橋本 真一 (HASHIMOTO SHINICHI)

金沢大学・医学系・特任教授

研究者番号：00313099

研究成果の概要（和文）：

DNA のメチル化、ヒストン修飾などのエピジェネティックな作用が、転写開始点およびその発現量にどのような影響をおよぼすか検討した報告は非常に少なくその詳細は明らかでない。そこで次世代シーケンサーを利用しゲノムワイドなDNAメチル化測定法を確立すると共に5'-end 測定法を用いてエピジェネティックな作用が発現様式にどのような影響を与えるかを検討した。脱アセチル化阻害剤（TSA）処理した大腸癌細胞株、HT-29からmRNAを単離し、5'-end法を用いて検討した。SOLiDシステムを用いて5'-end tagをシーケンスし、約2,000万個のtagを得た。未処理細胞と比較してTSA処理細胞は、2,426個の遺伝子に変化しており、この変化は発現している全遺伝子の16%に相当した。次にこれらの遺伝子変化にDNAメチル化が関与しているかどうかを、開発したメチル解析法（MSDS法）で検討したところ、数遺伝子領域を除いてはTSAによるメチル化の変化は観察されなかった。

研究成果の概要（英文）：

Here, we performed the high-resolution study of 5'-end transcriptome and DNA methylation state of genome in a human colon cancer cell line, HT-29 treated with a HDACi, trichostatin A (TSA) by using next-generation sequencer. More than 20 million 25 base 5'-end tags were obtained from two libraries and matched to the human genome. The expression of 2,426 genes, which corresponded to 16% of all expressed genes in a single cell type, differed significantly between the control and TSA-treated cells. Next, when we analyzed the functional relationship between their differential expression and the DNA methylation of associated genes by using newly developed MSDS, change of gene expression by TSA did not correlate with genome-wide of DNA methylation status, suggesting that demethylation limited sites may be specifically regulated by TSA leading to be change of particular genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ゲノム科学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：遺伝子発現、DNA メチル化、脱アセチル化阻害剤、次世代 DNA シーケンサー、エピジェネティクス、トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

現在まで SAGE 法を用いヒト血液細胞、ヒト癌細胞など転写産物を 100 万タグ以上解析し、これらをデータベース化し公開した (<http://bloodsage.gi.k.u-tokyo.ac.jp/>)。一方、SAGE 法は特定できる遺伝子が限られると共に、5' 端の情報はわからないままであり、データから得た遺伝子の機能を明らかにする上で問題となることが明らかになった。それらの問題を克服し、さらに詳細な解析を行う為、5' SAGE 法を開発した (Nature Biotech. 22:1146, 2004: <http://5sage.gi.k.u-tokyo.ac.jp/>)。5' SAGE 法とは、オリゴキャップ法と SAGE 法の技術を利用することで mRNA 転写開始点を含んだ遺伝子発現情報を観察でき、さらに SAGE 法の特徴である絶対的な定量性をもって測定することができることを特徴とする。また転写開始点を同定することで遺伝子のプロモーター、mRNA の splicing form、miRNA 前駆体を含んだ noncoding-RNA の同定が可能となる。実際にこの方法を用いて我々は種々のゲノム解析を行った。メダカゲノムプロジェクトではゲノム中の遺伝子発現領域の特定ならびに発現量について 5' SAGE 法を用いて明らかにした (Nature 447:714, 2007)。さらにハエ、カイコ、ヒメツリガネゴケ等のゲノム解析においてもこの方法を利用している。一方、エピジェネティックな変化と転写開始点を含んだ遺伝子発現の関係を明らかにする目的で脱メチル化剤 (5-Aza-2'-deoxycytidine ; 5Aza) で大腸癌細胞株, HT-29 を処理しその細胞から mRNA を単離し、5' SAGE 法により解析した。約 7 万転写産物ずつを解析した結果、未処理の細胞に比べて 5Aza 処理群では生体防御、細胞増殖などに関与する遺伝子が増加し、さらにイントロン及びエクソン領域からの発現など転写開始点の多様性の増加も観察された。しかしながら約 7 万 (DNA アレイの感度と同等) では既に報告されている重要な細胞周期関連などの遺伝子が観察されず、さらにゲノムワイドな詳細な検討が出来なかった。そこで次に次世代シーケンサーに適応した 5' -end (5' SAGE) 法を開発を行った (PLoS ONE 2009)。続いて preliminary な実験として未処理 HT29、5Aza 処理細胞株のシーケンスを行った。SOLiD システムを用いて約 4,000 万個の 5' end tag をシーケンスし、その中でゲノムにヒットしたより正確と考え

られる配列約 2,000 万個の 5' end tag を得た。下には control と 5Aza の発現を従来の 5' SAGE 法により解析したものと次世代シーケンサー (5' -end SOLiD) で解析したものの scatter plot を示した。この図からも明らかな通りこれらの解析能力は 100-1,000 違うことが明らかになった。この感度により一分子を測定することも可能になった。

2. 研究の目的

最近、種々の遺伝子の発現にエピジェネティックな作用が関与していることが明らかになってきた。特に癌の発生や進展に DNA のメチル化やヒストンの脱アセチル化などのエピジェネティックな異常が関与していると考えられている。しかしながら DNA のメチル化、ヒストン修飾などのエピジェネティックな作用が、転写開始点およびその発現量にどのような影響をおよぼすか検討した報告は非常に少なく、特に特定の遺伝子についてだけ解析され、ゲノム全体ではその詳細は明らかでない。そこで大規模並列処理配列決定法による次世代シーケンサーを利用しゲノムワイドなメチル化測定法を確立すると共にすでに開発が終了している 5' -end 測定法を用いてエピジェネティックな作用が発現様式およびその時の DNA メチル化にどのような影響を与えるかを検討した。

3. 研究の方法

a) 5' -end 大規模並列処理配列決定法による包括的遺伝子発現検索と転写開始点の同定
この方法により転写開始点及び発現量について検討しエピジェネティック作用との関連性を検討した。脱アセチル化阻害剤 (TSA, 500ng/ml) 処理大腸癌 (HT-29) について検討した。

b) 5' end 大規模並列処理配列決定法による包括的遺伝子発現検索法の確認
得られた遺伝子をもとにして各細胞で定量的 PCR を行った。

d) DNA メチル化検索測定法の開発
TSA 処理細胞から QIAamp DNA mini kits を使用して DNA を精製した。精製された DNA をメチル化に感受性を持つ制限酵素 (BssHII、EagI、SacII の 3 種類または HpaII などの CG 感受性酵素) で切断した。その切断端に MmeI サイトを含んだリンカー (読み出し側) を接続し MmeI で切断することによって『リンカ

一十目的の Tag』という形にする。MmeI の切断端を平滑にしてその末端に平滑リンカー（読み込み側）を接続した。続いて PCR の効率を上げるために、電気泳動で目的のサイズを回収した。PCR を使用し、目的の Tag の純度を上げた後、次世代シーケンサーにかけて Tag 情報を得た。次世代超高速 DNA シーケンサーは主に SOLiD4 (アプライドバイオシステムズ) システムを使用した。Tag に存在する制限酵素部位のシトシンは非メチル化であると仮定されるため、サンプル間の Tag 数の差を調べ、メチル化状態を解析した。出来たサンプルは TA クローニングし、通常のサンガー法にて配列の確認を行った。

4. 研究成果

1) 脱アセチル化阻害剤処理した大腸癌細胞株による包括的遺伝子発現検索と転写開始点の同定

癌の発生や進展に DNA のメチル化やヒストンの脱アセチル化などのエピジェネティックな異常が関与していることから、これらのエピジェネティックな作用が、その発現量にどのような影響を及ぼすかを脱アセチル化阻害剤 (TSA) 処理した大腸癌細胞株 HT-29 から mRNA を単離し、5' end-SOLiD 法を用いて検討した。SOLiD システムを用いて約 3,600 万個の 5' end tag をシーケンスし、その中でゲノムにヒットしたより正確と考えられる配列約 2,000 万個の 5' end tag を得た。未処理細胞と比較して TSA 処理細胞は、2,426 個の遺伝子が増加しており、これは発現している全遺伝子の 16% に相当した。一方、遺伝子発現の変化に伴う TSS の変化は観察されなかった。次にこれらの遺伝子変化に DNA メチル化が関与しているかどうかを、次世代シーケンサーを用いたメチル化解析法を開発し検討した。

2) ゲノムワイド DNA メチル化検索測定法の開発

現在の DNA メチル化検索測定法は多くの研究者により幾つかの方法が開発されている。メチル化 DNA 抗体でメチル化部位を免疫沈降し、プロモーター (CpG) 領域を搭載した DNA アレイにて測定するもの、メチル化特異的酵素を利用してその断片をシーケンスならびに DNA アレイにて観察するものがあるが、これらの方法は特定の領域を観察するには適しているがゲノムレベルの解析には不向きである。また、特定のゲノム領域をバイサルファイト処理しシーケンスする方法が全ての領域のメチル化を明らかに出来る方法としては優れているが、ヒトやマウスのゲノム領域を解析する上では時間もコストもかかり現状では適していない。そこで我々は次世代シーケンサーを使用することにより簡便にかつゲノムレベルでのメチル化領

域を網羅的に測定する方法を確立した。この方法により通常多くの研究者が測定している遺伝子プロモーター領域以外のゲノム中のメチル化変化も出来る。

開発した MSDS 法は DNA メチル化感受性酵素 3 種類を合わせて使用した。この方法の精度を確認する目的で、HT29, HCT116 大腸癌細胞株を用いバイサルファイト法で求めたメチル化状態と MSDS 法の tag 数を比較したところ、両方で相関が確認された。遺伝子周囲のメチル化は、転写開始点からの距離が離れるほど高メチル化状態であった。さらに、発現の高い遺伝子は発現の低い遺伝子に比べ転写開始点周囲が低メチル化状態であり従来の報告と一致していた。2 つのサンプルのメチル化を比較したところ、CpG island やその周囲、さらにイントロン領域に多数のメチル化が異なる部位が発見され、この領域の意義を調べるため、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、この領域はエンハンサー活性に関与していることが明らかになった。また上記の 6 塩基酵素を使用するより感度をあげる為、CCGG の 4 塩基を認識する制限酵素 (HpaII) ならびに非感受性制限酵素 (MspI) についても同様な検討を行った。その結果、6 塩基認識よりさらに詳細なメチル化が観測出来ることが明らかとなった。一方、MSDS 法により TSA 処理細胞について遺伝子発現と DNA メチル化の関連性について調べたところ、数遺伝子領域を除いては TSA によるメチル化の変化は観察されなかった。このことから TSA による大規模な遺伝子発現変化は DNA メチル化の変化によって起こっていないことが明らかになった。今後、TSA の DNA メチル化に対する影響を HpaII 等の酵素を用い詳細に検討するだけでなく miRNA についても解析する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

① Ogoshi, K., Hashimoto, S., Nakai, K., Qu, W., Oshima, K., Tokunaga, K., Sugano, S., Hattori, M., Morishita, S., and Matsushima, K. Genome wide profiling of DNA methylation in human cancer cells. *Genomics*, 査読有, 98:280-287. 2011

② Yamashita, R., Sathira, N.P., Kanai, A., Tanimoto, K., Arauchi, T., Tanaka, Y., Hashimoto, S., Sugano, S., Nakai, K., and Suzuki, Y. Genome-wide characterization of transcriptional start sites in humans by integrative transcriptome analysis. *Genome Res*, 査読有, 21, 775-789. 2011

③ Hodo, Y., Hashimoto, S., Honda, M., Yamashita, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Kaneko, S., and Matsushima, K. Comprehensive gene expression analysis of

5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. Genomics, 査読有, 95, 217-223. 2010

④ Tsuchihara, K., Suzuki, Y., Wakaguri, H., Irie, T., Hashimoto, S., Matsushima, K., Mizushima-Sugano, J., Yamashita, R., Nakai, K., Bentley, D., Esumi, H., and Sugano, S. Genome-wide high-resolution transcriptional start sites mapping of cells under hypoxia condition. Nucleic Acids Res, 査読有, 37, 2249-2263. 2009

⑤ Sasaki, S., Mello, C.C., Shimada, A., Nakatani, Y., Hashimoto, S., Ogawa, M., Matsushima, K., Gu, S.G., Kasahara, M., Ahsan, B., Sasaki, A., Saito, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Kohara, Y., Takeda, H., Fire, A., and Morishita, S. Chromatin-associated periodicity in genetic variation downstream of transcriptional start sites. Science, 査読有, 323, 401-404. 2009

⑥ Qu, W., Hashimoto, S., and Morishita, S. Efficient frequency-based de novo short-read clustering for error trimming in next-generation sequencing, 査読有, Genome Res 19, 1309-1315. 2009

⑦ Hashimoto, S., Qu, W., Ahsan, B., Ogoshi, K., Sasaki, A., Nakatani, Y., Lee, Y., Ogawa, M., Ametani, A., Suzuki, Y., Sugano, S., Lee, C.C., Nutter, R.C., Morishita, S., and Matsushima, K. High-resolution analysis of the 5'-end transcriptome using a next generation DNA sequencer, 査読有, PLoS One 4, e4108. 2009

[学会発表] (計2件)

① 橋本ら, MiR-449 induced by HDACi in colon cancer cell lines mediated cell death. 第70回日本癌学会学術集会 2011年10月4日名古屋国際会議場 (名古屋市)

② 橋本ら, Gene expression and DNA methylation profiling in a cancer cell line treated with TSA using second generation sequencer, 第68回日本癌学会学術集会 2009年10月2日パシフィコ横浜 (横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 真一 (HASHIMOTO SHINICHI)

金沢大学・医学系・特任教授

研究者番号：00313099