

機関番号：83902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21810039

研究課題名（和文）カタユウレイボヤメチル化DNA結合タンパク質MBD2/3と相互作用する因子の同定

研究課題名（英文）Methylated DNA binding protein MBD2/3 and its interacting proteins in *Ciona intestinalis*

研究代表者

鈴木 美穂 (SUZUKI MIHO)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・研究員

研究者番号：80548470

研究成果の概要（和文）：カタユウレイボヤのMBD2/3 遺伝子は、初期発生胚において特に高いレベルで発現していた。初期発生におけるMBD2/3 遺伝子の機能を阻害すると強い初期発生異常がみられ、DNAメチル化とメチル化DNA結合タンパク質による遺伝子発現制御が初期胚発生に必須であることが示唆された。次に、カタユウレイボヤ全ゲノム上でMBD2/3 が結合している領域を同定した。MBD2/3 はgene bodyメチル化領域に局在し、100 以上の遺伝子の発現制御を行っている可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：MBD2/3 is highly expressed in early developmental stages of *Ciona intestinalis*. A knock down experiment depleting MBD2/3 protein in embryos caused severe developmental defects. The result indicated an important role of DNA methylation and methylated DNA binding protein in regulation of gene expression. Genome-wide distribution of MBD2/3 was limited to methylated gene body region. MBD2/3 possibly regulates expression of those more than 100 gene targets.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎ゲノム科学

キーワード：メチル化 CpG 結合タンパク質、*Ciona intestinalis*、メチル化 DNA 結合タンパク質、DNA メチル化

1. 研究開始当初の背景

多くの真核生物ゲノム DNA にはメチル化修飾があり、ゲノムの安定化や細胞分化、遺伝子の発現制御において重要な役割を担っていることが知られている。遺伝子のプロモーターに付加されたメチル化は転写因子の結合を直接阻害するが、メチル化 DNA 結合タンパク質を介して転写抑制をすることも報告されている。哺乳類にはメチル化 DNA

結合タンパク質 (MBD) ファミリーに属するタンパク質が複数あり、そのうちのひとつ MeCP2 は RETT 症候群の原因遺伝子として知られている。しかし、MBD タンパク質のノックアウトマウスはすべて non-essential であり、MBD が結合するターゲット遺伝子や遺伝子発現に及ぼす影響についてもほとんどわかっていない。MBD ファミリーに属する複数のタンパク質によるリダンダンシ

一がある可能性も検討されているが、明らかな結論は得られていない。

私は上記の問題について、これまでに研究されていない角度からアプローチしようと考えた。これまでの DNA メチル化と遺伝子発現に関する知見は、プロモーター領域における遺伝子抑制に限られていた。ところが近年、遺伝子内部 (gene body 領域) にも高いレベルの DNA メチル化があることがわかってきた。Gene body メチル化は遺伝子の抑制ではなく発現と関連しており、その機能やメカニズムは明らかになっていない。MBD が遺伝子のプロモーターではなく gene body 領域で機能している可能性は十分考えられる。また、MBD が gene body 領域で遺伝子発現に関わる役割を担っていれば、それはまだ明らかになっていない gene body メチル化の機能とも関連するかもしれない。

脊椎動物のゲノムは CpG アイランド以外のほぼ全域がメチル化されており“グローバルメチル化”と呼ばれている。これに対して、無脊椎動物のほとんどが“モザイクメチル化”と呼ばれるメチル化パターンを持つ。モザイク状にメチル化されているのは、主に gene body 領域である。このようなモザイクメチル化ゲノムを持つ無脊椎動物における DNA メチル化の必要性や機能についてはこれまであまり研究が行われておらず、哺乳類のメチル化パターンが進化してきた過程を明らかにする意味でも非常に興味深い。無脊椎動物カタユレイボヤのゲノムはモザイク状の DNA メチル化パターンをもち、メチル化は gene body 領域のみに限られる。トランスポゾンや遺伝子間領域、プロモーターには DNA メチル化はみられない。また、哺乳類で 5 種類ある MBD ファミリーのホモログが、カタユレイボヤでは哺乳類の祖先系である MBD2/3 ひとつのみである。カタユレイボヤは MBD と gene body メチル化の関係が最もシンプルに解析できる系である。

2. 研究の目的

本研究の一つめの目的は、モザイク状の DNA メチル化パターンをもつ無脊椎動物で、MBD がいつ、どこで機能を果たしているのかを明らかにすることである。

二つめの目的は、MBD がターゲットとして結合するゲノム上の領域が、遺伝子の発現を抑制するプロモーターなのか、それともメチル化された遺伝子内領域であるかを確かめることである。

最後に、未だ明らかにされていない、gene body 領域のメチル化の機能を、MBD の機能や相互作用する因子から推定することを目的とした。

3. 研究の方法

無脊椎動物カタユレイボヤをモデル生物として利用した。

- (1) カタユレイボヤゲノムの DNA メチル化レベルの測定
はじめに、メチル化シトシンに対する抗体を用いて、カタユレイボヤの様々な発生ステージや成体組織における、DNA メチル化修飾のレベルを測定した。
- (2) MBD2/3 の発現解析
次に、MBD2/3 が機能している細胞を特定するために、遺伝子の発現量を様々な発生ステージ・成体組織で測定した。未受精卵、8 細胞、16 細胞、32 細胞、64 細胞、4 時間胚、9.5 時間胚、12 時間胚、成体筋肉、卵巣、成体心臓、成体内臓 から RNA を抽出し、MBD2/3 の転写産物を RT-qPCR で測定した。
- (3) MBD2/3 タンパク質の細胞内局在の解析
カタユレイボヤの遺伝子 EF1a の強力なプロモーターを用いて MBD2/3 と GFP を融合したタンパク質を発現させるコンストラクトを作製し、カタユレイボヤ胚にエレクトロポレーションで導入した。胚を飼育し、GFP のシグナルを蛍光顕微鏡で観察することによって、MBD2/3 タンパク質の局在部位を明らかにした。
- (4) モルフォリノオリゴによるノックダウン
次に、特に高い発現を示した初期発生胚において MBD2/3 の機能を阻害してその機能をしらべた。特異的モルフォリノオリゴをカタユレイボヤの卵に顕微注入し、mRNA からタンパク質への翻訳を阻害する実験を行った。
- (5) 抗体作製
MBD2/3 のタンパク質のなかで、抗体作製に適した領域を推測し、His タグ融合リコンビナントタンパク質を大腸菌で発現させた。リコンビナントタンパク質を精製後、ウサギ 2 羽に免疫を行い、ポリクロナル抗体を作製した。抗体はアフィニティ精製し、ウェスタンブロット、免疫沈降に用いた。
- (6) クロマチン免疫沈降実験
カタユレイボヤ受精後 6 時間胚と作製した MBD2/3 抗体を用いて、クロマチン免疫沈降実験を行い、MBD2/3 が結合している領域の DNA 断片を回収した。qPCR と高速シーケンスで、結合領域を同定した。

4. 研究成果

(1) カタユウレイボヤゲノムの DNA メチル化レベルの測定

未受精卵、2細胞、4細胞、8細胞、16細胞、32細胞、64細胞、4時間胚、9.5時間胚、12時間胚、成体筋肉、卵巣、精子、成体心臓、成体内臓、成体表皮 からゲノム DNA を抽出し、DNA メチル化レベルを測定した。未受精卵から初期発生においては常に高いレベルのメチル化が維持されていた。哺乳類に見られるような、初期発生ステージにおける全ゲノム脱メチル化は起こっていなかった。成体組織では、筋肉、表皮で DNA メチル化がほかの組織の約 50% と低くなっていた、パイサルファイトシーケンスで EF1a 遺伝子の gene body 領域を調べたところ、筋肉と表皮での脱メチル化は、細胞、メチル化シトシンサイトともにランダムに起こっていた。分化をし、細胞分裂が活発でなくなっている細胞では、DNA メチル化を維持する必要がないのかもしれない。反対に、DNA メチル化は活発に分裂をしている細胞で機能をしている可能性がある。

(2) MBD2/3 の発現解析

MBD2/3 の転写産物は未受精卵に母性因子として最も大量に蓄えられていた。成体組織と比較しても、活発に細胞分裂を繰り返す初期発生胚では高いレベルで転写産物量が維持されていた。

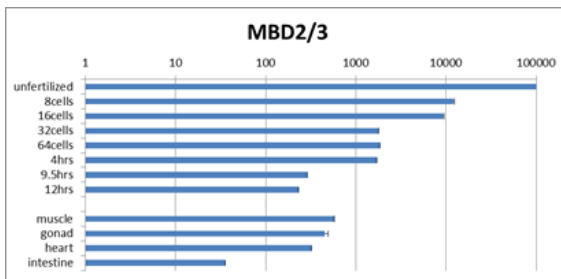


図 1、MBD2/3 の発現量

(3) MBD2/3 タンパク質の細胞内局在

MBD2/3 と GFP の融合タンパク質は、DAPI シグナルで示される核に局在した。MBD2/3 は DNA 結合タンパク質と考えられるので、MBD2/3 の核への局在は推測通りであった。

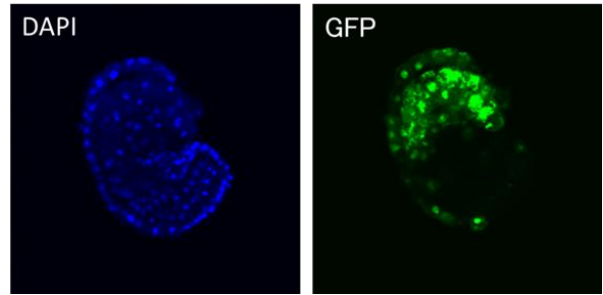


図 2、MBD2/3 タンパク質の局在

(4) モルフォリノオリゴによるノックダウン

MBD2/3 特異的モルフォリノオリゴをカタユウレイボヤの卵に顕微注入し、人工授精させて発生を観察したところ、強い発生異常が見られた。DNA メチル化とメチル化 DNA 結合タンパク質による遺伝子発現制御が初期胚発生に必須であることが示唆された。

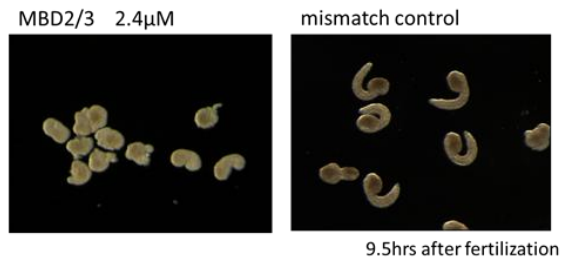


図 3、モルフォリノオリゴを用いた MBD2/3 遺伝子の阻害

(5) 抗体作製

作製したポリクロナル抗体を用いて、カタユウレイボヤ胚の細胞抽出液を用いてウェスタンブロットを行った。MBD2/3 の発現量は抗体で検出できる限界量未満であった。FLAG タグを融合した MBD2/3 タンパク質をカタユウレイボヤ胚で過剰発現させ、この細胞抽出液を用いてポリクロナル抗体で免疫沈降実験を行ったところ、リコンビナントタンパク質を効率よく沈降させることができた。

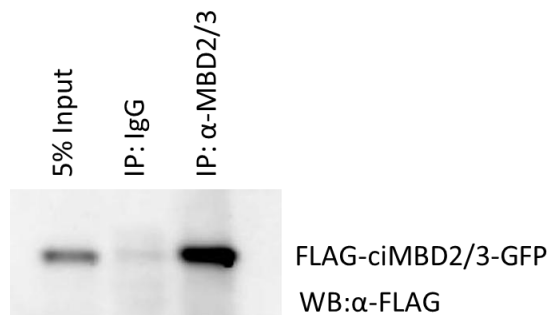


図 4、ポリクロナル抗体による免疫沈降実験

(6) クロマチン免疫沈降実験

MBD2/3 抗体を用いて、カタユウレイボヤ受精後 6 時間胚のゲノム上で MBD2/3 が結合している領域の DNA 断片を回収した。qPCR で既知のメチル化領域について MBD2/3 の結合を調べたところ、gene body メチル化領域に結合していることがわかった。回収した DNA の配列を高速シーケンシングで決定し、ゲノムにマッピングしたところ、MBD2/3 の結合はメチル化されている gene body 領域に特異的なピークとして検出された。ターゲットとなっている遺伝子は 100 以上あり、MBD2/3 が発現を制御していると予想される。現在ターゲット遺伝子の発現と MBD2/3 の結合との関連について引き続き研究を行っている。

クロマチン免疫沈降サンプルを用いた LC-MS 解析についても解析を行っており、MBD2/3 が結合している領域に結合しているほかのタンパク質について解析中である。

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

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)

Yasunori Sasakura・Miho M. Suzuki・Akiko Hozumi・Kazuo Inaba・Nori Satoh
Maternal factor-mediated epigenetic gene silencing in the ascidian *Ciona intestinalis*, *Molecular Genetics and Genomics*, 査読有, vol.283, 2010, pp. 99-110

[学会発表] (計 2 件)

- ① 鈴木美穂、次世代シーケンサーの概要と可能性、シンポジウム「次世代シーケンサーと DNA 塩基配列情報の農業研究への展開」2010 年 2 月 26 日、茨城大学農学部
- ② 鈴木美穂、gene body methylation - 無脊椎動物からのアプローチ、第一回東海エピジェネティクスミーティング、2010 年 8 月 20 日、名古屋大学医学部

[その他]

ホームページ等

<http://www.inst-hsc.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 美穂 (SUZUKI MIHO)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・研究員

研究者番号：80548470