

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06123

研究課題名(和文) DNAメチル化による転写終結位置制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of Transcription Termination Control Mechanisms by DNA Methylation

研究代表者

菊池 裕 (Kikuchi, Yutaka)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・教授

研究者番号：20286438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化は転写開始・伸長を制御しているが、転写終結位置における機能は不明なままである。私達は、Dnmt3a欠損ゼブラフィッシュ変異体、Dnmt3a欠損マウス細胞(胎児線維芽細胞MEF・神経細胞)を用い、Dnmt3aの直接の標的であるゲノム領域と転写産物の解析を行った。その結果、Dnmt3a欠損マウス神経細胞において、転写終結位置が低メチル化しているタンパク質コード遺伝子では、有意に読み越し転写が起こっている事を世界で初めて報告する事に成功した。更に、Dnmt3a欠損ゼブラフィッシュ変異体においては、特定の遺伝子のエキソンと下流のゲノム領域とのキメラ転写産物が産出されている事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における学術的意義は、転写を正常に終結させるためには、転写終結位置におけるDNAメチル化が重要である事を示した事である。DNAメチル化は、転写開始や伸長の制御に必要である事が示されてきたが、転写終結位置における機能を明らかにしたのは、私達の研究が世界で初めてである。更に、私達が見出した転写終結異常は、多くのがん細胞において観察されている現象である。そのため、がん細胞におけるDNAメチル異常が、転写終結にも関与している可能性があり、がん治療のターゲットになる事が示唆される。このような意味において、私達の研究成果は、大きな社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation controls transcription initiation and elongation, but the function at transcription termination sites remains unclear. Using Dnmt3a-deficient zebrafish mutants and Dnmt3a-deficient mouse cells (embryonic fibroblasts MEF and neurons), we analyzed the genome regions directly targeted by Dnmt3a and the transcripts produced. As a result, we successfully reported for the first time that in Dnmt3a-deficient mouse neurons, significantly elevated levels of read-through transcription occur in low-methylated protein-coding gene transcription termination sites. Furthermore, in Dnmt3a-deficient zebrafish mutants, we discovered the production of chimeric transcripts between exons of specific genes and downstream genomic regions.

研究分野：Genome Biology

キーワード：DNAメチル化 転写終結 Dnmt3a

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物ゲノムの DNA メチル化は、主に遺伝子発現制御を介して、発生における細胞分化・初期化・癌化等への関与が報告されている。このようなメチル化修飾は、シトシン塩基とグアニン塩基の順に並んだ CpG 配列上のシトシン塩基で起こり、DNA メチル基転移酵素 (DNA methyltransferase; Dnmt) により触媒される事が知られている。哺乳類の体細胞では、主に Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b が機能しており、DNA 複製に伴うメチル化パターンの維持に働く Dnmt1 と、新規メチル化パターンの形成に働く Dnmt3a, Dnmt3b に分類する事が出来る。この DNA メチル化の機能に関しては、主に RNA polymerase II (RNA pol II) による転写開始の制御を中心に解析が行われてきた。更に近年の解析により、Gene Body におけるメチル化は、転写伸長やスプライシング制御に関与している事が明らかにされている。一方、3'-UTR の転写終結領域にも CpG 配列の出現頻度が高い領域が存在しているが、3'-UTR 領域における DNA メチル化の機能に関しては未だ報告が無く、役割は不明なままであった。

モデル動物のゼブラフィッシュは、哺乳類 Dnmt3a の相同遺伝子を 2 種類 (*dnmt3aa*, *dnmt3ab*) 有する事、発生過程においてゲノム DNA のメチル化が大きく変化しない事が報告されている。そのため、各 Dnmt3a 相同遺伝子産物の標的領域がマウスより少ないと予想されることから、母性胚性ノックアウト変異体 (*MZdnmt3aa*^{-/-}) を作製し、Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) 解析を行うことにより、Dnmt3aa の直接の標的領域を解明出来ると考えた。*MZdnmt3aa*^{-/-} 変異体の WGBS 解析を行った結果、野生体 (WT) と比較してメチル化が減少した転写終結点 (Transcription Termination Site: TTS) が 40 ヶ所同定された。この DNA 低メチル化領域の遺伝子発現を詳細に解析した結果、読み通り転写が起こっている事に気が付いた。更に私達は、*Dnmt3a* ノックアウトマウス神経細胞株における 3'-UTR 領域の DNA 低メチル化と読み通り転写との関連性を、データ解析により調べた結果、正の相関関係を見出す事に成功した。

2. 研究の目的

DNA メチル化は転写開始・伸長を制御している事は報告されているが、転写終結位置における機能は不明なままである。私達は、*Dnmt3a* ノックアウト変異体 (マウス線維芽細胞 (MEF)・マウス神経細胞株・ゼブラフィッシュ) を用いて直接の標的であるゲノム領域の解析を行った結果、タンパク質コード遺伝子 (PCG) の TTS が低メチル化しており、転写終結異常 (読み通り転写) が起こっている可能性を世界で初めて見出す事に成功した。しかし、未だ DNA 低メチル化により読み通り転写が起こる機構や、ヒストン修飾との関連性に関しては全く明らかにされていない。そこで本研究課題では、脊椎動物に共通した、転写終結位置の制御における DNA メチル化の機能解明を研究目的としている。

3. 研究の方法

Dnmt3a ノックアウト体での TSS の低メチル化と読み通り転写との相関関係を証明するため、以下の実験・解析を行なった。

Dnmt1, *Dnmt3a* ノックアウト線維芽細胞 (MEF)、以下に示す 4 種のマウス *Dnmt1*, *Dnmt3a* ノックアウト神経細胞株の WGBS と RNA-seq データを用いて、TSS の低メチル化と転写終結異常との関係性の解析を行なった。

4 種のマウス神経細胞株: mature olfactory sensory neurons (mOSNs), agouti-related peptide (protein)-producing neurons (AgRPNs), mature GABAergic inhibitory neurons (mGINs), mature parvalbumin-positive cortical interneurons (mPCIs)

MZdnmt3aa^{-/-} 変異体を用いて、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq データ解析を行う。WGBS 解析結果より、変異体の 3'-UTR において低メチル化している PCG の発現解析を行い、TTS を超えて転写されている mRNA を定量的に明らかにする。

RNA-seq データ解析により、読み通り転写が確認された PCG (代表的な遺伝子 4 ~ 5 種類) に関しては、ノーザンブロット解析や qPCR 解析により TTS を超えた転写産物の確認実験を行なった。

4. 研究成果

マウス *Dnmt1*, *Dnmt3a* ノックアウト MEF 及び神経細胞株において、WGBS 及び Methylated DNA ImmunoPrecipitation (MeDIP) と網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) のデータセットを用いて、転写終結異常 (読み通り転写) に関して詳細なデータ解析を行った。TTS に重なる低メチル化が転写終結に及ぼす影響を調べるため、4 種類の *Dnmt1*^{-/-}, *Dnmt3a*^{-/-} 神経細胞株および 2 種類の *Dnmt3a*^{-/-}, *Dnmt3b*^{-/-} MEF で得られた RNA-seq データの解析を行なった。その結果、*Dnmt3a*^{-/-} mGIN を除いて、*Dnmt1*^{-/-}, *Dnmt3a*^{-/-} 神経細胞株では、低メチル化 TTS の下流でリード数の増加が検出された (図 1)¹⁾。逆に、*Dnmt3a*^{-/-} MEF では、WT MEF と比較して、メチル化度の低い TTS の下流のリードカウント数が有意に減少していることが検出されたが、*Dnmt3b*^{-/-} MEF では観察されなかった (図 2)¹⁾。*Dnmt*^{-/-} ノックアウト細胞を用いて得られた結果を総合すると、TTS の低メ

チル化は転写終結にプラスとマイナスの両方の影響を及ぼすことが示された。以上の結果より、TTS の低メチル化が転写終結異常の原因であるという我々の仮説を支持する結果が得られた。

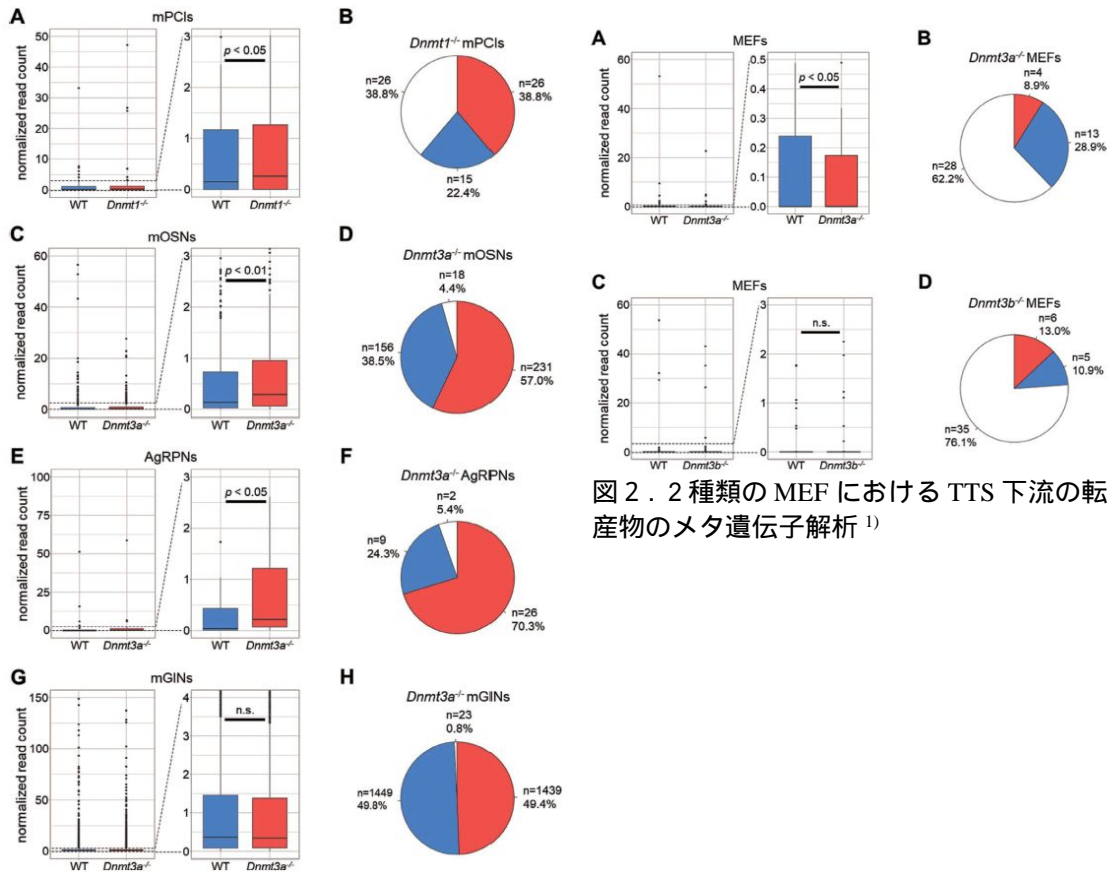


図 2 . 2 種類の MEF における TTS 下流の転写産物のメタ遺伝子解析¹⁾

図 1 . 4 種類の変異神経細胞における TTS 下流の転写産物のメタ遺伝子解析¹⁾

また、*Dnmt1*^{-/-} mPCI では TTS の下流でリード数が増加しており、TTS のメチル化レベルが転写終結異常と関連していることが示唆された。更に、NADH:ユビキノン酸化還元酵素コアサブユニット S7 (*Ndufs7*) 遺伝子を、*Dnmt1*^{-/-} mPCI において TTS 下流のリードカウント数が増加した例として図 3 に示す¹⁾。

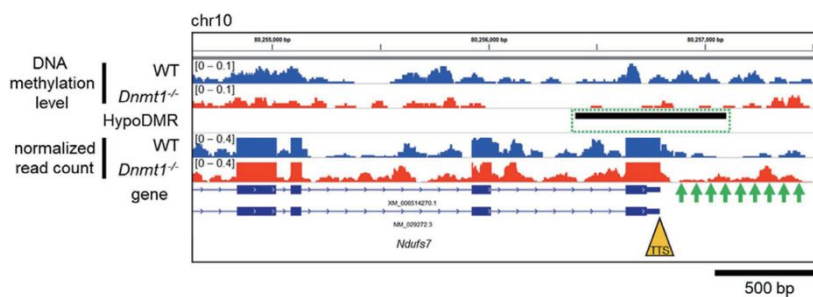


図 3 . *Dnmt1*^{-/-} mPCI の *Ndufs7* 遺伝子における転写終結異常¹⁾

続いて、*Dnmt1*^{-/-} mPCI、*Dnmt3a*^{-/-} mOSN、AgRPN において、低メチル化 TTS の下流にある転写産物の含量を解析したところ、WT 細胞と比較して、*Dnmt3a*^{-/-} mOSN (約 7.4%) と AgRPN (約 42.3%) ではキメラ転写産物の頻度が有意に増加していたが、*Dnmt1*^{-/-} mPCI では認められなかった¹⁾。*Dnmt3a*^{-/-} mOSN における TTS 下流のキメラ転写産物数の増加の例として、*Creatine kinase, brain (Ckb)* 遺伝子を図 4 に示す¹⁾。WT ニューロンのもものと比較して、*Dnmt3a*^{-/-} mOSN では下流の遺伝子や遺伝子間 DNA と異常に融合する事により、キメラ転写産物を形成していた (図 4)¹⁾。まとめると、*Dnmt3a*^{-/-} mOSN と AgRPN で検出されたキメラ転写産物の増加は、これらの変異体における転写終結異常の発生と、特定の遺伝子座におけるメチル化度の低い TTS でリードスルー転写が起こることを明らかに示している。

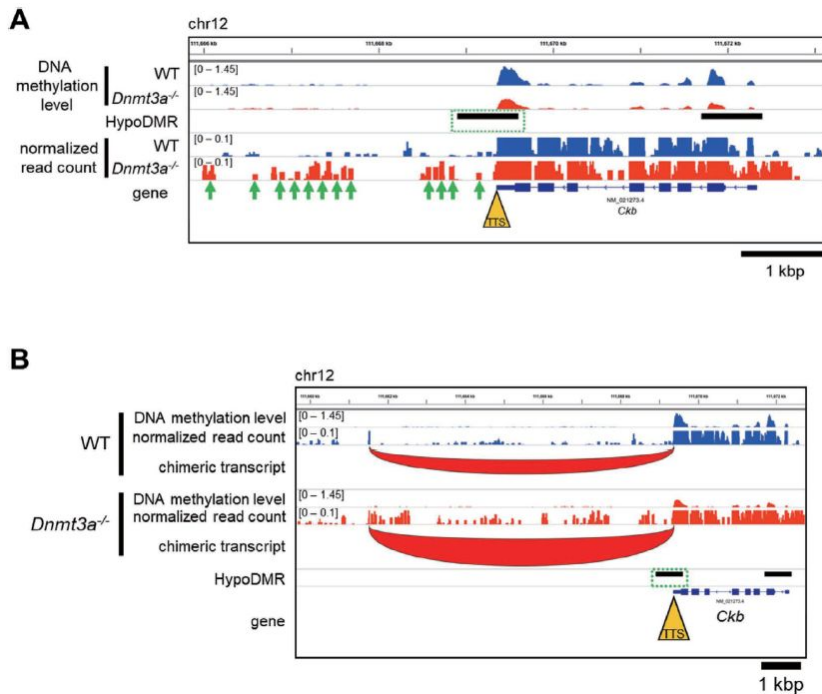


図4. *Dnmt3a*^{-/-} mOSN の *Ckb* 遺伝子における転写終結異常¹⁾

今回のバイオインフォマティクス解析で得られた知見と先行研究で得られた知見に基づき、我々は、DNAメチル化に加えて、分化・増殖・ストレス状態にある細胞特異的因子が、転写終結の制御に重要な役割を果たすというモデルを提案する(図5)¹⁾。これは、TTSの低メチル化が、*Dnmt*や細胞の種類に依存して、転写終結を正にも負にも制御する可能性があることを示す結果が得られたためである。キメラRNAに関しては、TTS領域のメチル化が正常であれば、リードスルーによって生成される長い転写産物が生成されにくいいため、キメラRNAの生成が抑制されるという仮説が成り立つ。

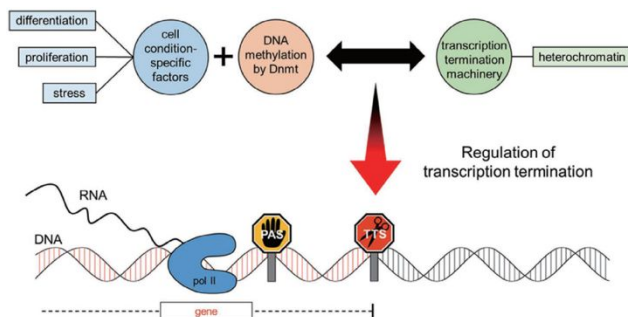


図5. 転写終結の提案モデル¹⁾

Dnmt3a ノックアウトゼブラフィッシュにおける WGBS と網羅的遺伝子発現解析 RNA-seq のデータを用いて、受精後2日胚での転写終結異常(読み通り転写)に関して詳細なデータ解析を行った。その結果、胚全体を用いて解析を行ったため、有意な読み通り転写の変化を確認する事は出来なかった。しかし、RT-qPCRにより、転写産物を詳細に解析した結果、特定のゲノム領域において転写終結異常(読み通り転写)が起こっている事を明らかにした。更に、*Dnmt3a* ノックアウトゼブラフィッシュでは、特定の遺伝子のエクソンと下流のゲノム領域とのキメラ転写産物が産出されている事を見出した。

更に私達は、*Dnmt3a* ノックアウトゼブラフィッシュの発生異常を調べるため、1-2細胞期・原腸陥入期・5体節期・受精後1日・受精後2日胚において発現に差がある転写産物を、マイクロアレイを用いて解析を行った。その結果、5つ初期発生段階において、有意な発現変化を示す遺伝子(1-2細胞期:18666遺伝子・原腸陥入期:4140遺伝子・5体節期:7581遺伝子・受精後1日胚:7876遺伝子・受精後2日胚:4804遺伝子)を明らかにする事に成功した。

<参考文献>

1) Shirai, M. et al., *Genes Genet. Syst.*, 97: 139-152, 2022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Masaki Shirai, Takuya Nara, Haruko Takahashi, Kazuya Takayama, Yuan Chen, Yudai Hirose, Masashi Fujii, Akinori Awazu, Nobuyoshi Shimoda, and Yutaka Kikuchi	4. 巻 97
2. 論文標題 Identification of aberrant transcription termination at specific gene loci with DNA hypomethylated transcription termination sites caused by DNA methyltransferase deficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 139-152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.21-00092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mohamed Nabil Bakr, Haruko Takahashi, Yutaka Kikuchi	4. 巻 10
2. 論文標題 Analysis of Melanoma Gene Expression Signatures at the Single-Cell Level Uncovers 45-Gene Signature Related to Prognosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10071478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masaki Shirai, Kazuya Takayama, Haruko Takahashi, Yudai Hirose, Masashi Fujii, Akinori Awazu, Nobuyoshi Shimoda, Yutaka Kikuchi	4. 巻 44
2. 論文標題 Methylome data derived from maternal-zygotic DNA methyltransferase 3aa ^{-/-} zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 108514
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dib.2022.108514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Haruko Takahashi, Daisuke Kawahara, Yutaka Kikuchi	4. 巻 14
2. 論文標題 Understanding Breast Cancers through Spatial and High-Resolution Visualization Using Imaging Technologies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4080
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14174080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Daisuke Kawahara, Ikuno Nishibuchi, Masashi Kawamura, Takahito Yoshida, Iemasa Koh, Katsuyuki Tomono, Masaki Sekine, Haruko Takahashi, Yutaka Kikuchi, Yoshiki Kudo, Yasushi Nagata	4. 巻 12
2. 論文標題 Radionic Analysis for Pretreatment Prediction of Recurrence Post-Radiotherapy in Cervical Squamous Cell Carcinoma Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 2346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics12102346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mohamed Nabil Bakr, Haruko Takahashi, Yutaka Kikuchi	4. 巻 33
2. 論文標題 CHRNA1 and its correlated-myogenesis/cell cycle genes are prognosis-related markers of metastatic melanoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2023.101425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masaki Shirai, Nobuyoshi Shimoda, Haruko Takahashi, Kazuya Takayama, Yutaka Kikuchi	4. 巻 47
2. 論文標題 Microarray transcriptome datasets of maternal-zygotic DNA methyltransferase 3aa -/- zebrafish during early developmental stages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 108967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2023.108967	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 白井均樹、菊池裕	4. 巻 11
2. 論文標題 転写終結の制御機構と疾病に与える影響	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 37-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋治子、菊池裕
2. 発表標題 マウス胎児期における運動器の筋 腱接合部形成過程の統合的解析
3. 学会等名 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuya Nara, Haruko Takahashi, Yutaka Kikuchi
2. 発表標題 Correlation between nuclear membrane-less organelle positioning in the nucleus and chromatin rheology.
3. 学会等名 日本バイオインフォマティクス学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuya Nara, Haruko Takahashi, Yutaka Kikuchi
2. 発表標題 Correlation between Nuclear Membrane-less Organelle Positioning and Chromatin Rheology
3. 学会等名 The International Conference on Bioinformatics (InCoB2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奈良拓也, 合田佑希, 高橋治子, 菊池裕
2. 発表標題 テンソル分解法を用いた広範の癌種で共通に認められる染色体の立体構造異常の探索
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Masaki Shirai, Takuya Nara, Haruko Takahashi, Kazuya Takayama, Yuan Chen, Yudai Hirose, Masashi Fujii, Akinori Awazu, Nobuyoshi Shimoda, Yutaka Kikuchi
2. 発表標題	Identification of aberrant transcription termination at specific gene loci with DNA hypomethylated transcription termination sites caused by DNA methyltransferase deficiency
3. 学会等名	日本分子生物学会年会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Takuya Nara, Haruko Takahashi, Yutaka Kikuchi
2. 発表標題	Mechanisms of nuclear stress granule positioning in the nucleus via rheological properties of chromatin
3. 学会等名	日本生物物理学会年会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Takuya Nara, Masaki Shirai, Haruko Takahashi and Yutaka Kikuchi
2. 発表標題	The association between epigenetic marks on 3' -untranslated region and transcriptional termination defects in mammals.
3. 学会等名	日本バイオインフォマティクス学会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Yasuhisa Yamamoto, Hisanori Yoshimura, Haruko Takahashi, Daisuke Kawahara and Yutaka Kikuchi
2. 発表標題	次元削減手法を用いた画像・遺伝子統合解析によるがん診断基盤の構築
3. 学会等名	日本バイオインフォマティクス学会年会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 高橋 治子, 李 欣瑜, 雲山 一慧, かく若麟, 池田 皓, 徐 銘聡, 永樂 元次, 菊池 裕
2. 発表標題 Engineering-assisted muscle-tendon assemble organoids (assembloids) for analysis of musculotendinous junction formation mechanism
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奈良拓也, 白井均樹, 高橋治子, 菊池 裕
2. 発表標題 哺乳類における機能的な読み通し転写と関連する3'末端非翻訳領域のエピジェネティックな状態
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 泰久, 好村 尚記, 高橋 治子, 河原 大輔, 菊池 裕
2. 発表標題 医療画像および遺伝子発現データの統合解析によるがん診断基盤の構築
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 治子 (Takahashi Haruko) (70775767)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・助教 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------