

## 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 5月31日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710181

研究課題名（和文）内在性非コードRNAを考慮した機能性RNAによるエピゲノム改変最適化の試み

研究課題名（英文） Optimization of epigenomic modification with regulatory RNAs considering the presence of endogenous non-coding RNAs

研究代表者

大鐘 潤 (OHGANE JUN)

明治大学・農学部・講師

研究者番号：50313078

研究成果の概要（和文）：

近年、内在性、外来など様々な機能性の非コード(nc)RNA が標的遺伝子のエピジェネティック制御に関与する事が報告され始めた。内在性 ncRNA は細胞種特異的発現を示すものも多く、機能性 ncRNA の細胞への導入によるエピジェネティック改変(発現制御)の効率化には、内在性 ncRNA の標的遺伝子同定と発現状態との総理解が必須である。昨年度の解析から、ES 細胞で ncRNA 生成に関わる酵素の欠損により、DNA メチル化状態が変化する遺伝子を多数同定した。ES 細胞の多能性維持に重要な Sa114 遺伝子は、プロモーター領域に長い一本鎖アンチセンス ncRNA (ASncRNA) が存在し、この ASncRNA により Dicer 非依存的に DNA メチル化制御を受けることが判明した。そこで今年度は、Sa114 遺伝子のプロモーター領域に存在する ASncRNA に注目し、機能解析を行った。マウス繊維芽細胞では、Sa114 はプロモーター領域が高メチル化で発現が見られないが、Sa114 ASncRNA を一過的に強制発現させることで、プロモーター領域の脱メチル化を誘導できた。一方、内在性 Sa114 ASncRNA の機能を解析するために、ES 細胞で ASncRNA を標的とする shRNA を導入することでノックダウンしたところ、本来低メチル化の Sa114 プロモーターがメチル化され、Sa114 遺伝子の発現も減少し、ES 細胞の自己再生にも影響を与えることが確認された。本研究により、内在性 Sa114 ASncRNA は、オーバーラップする標的領域の低メチル化状態を維持し、遺伝子の活性化に重要であることが示された。また、卵特異的ヒストンや環境中に残存する化学物質とエピジェネティクス制御についても Sa114 遺伝子を中心に明らかにした。本研究により、ncRNA により DNA メチル化状態が維持される遺伝子を多数同定できたことから、今後は内在性 ncRNA の強制発現やノックダウンにより標的遺伝子の DNA メチル化状態の改変（エピゲノム改変）を基盤として、有用細胞や病態モデル動物を作製するための新技術の確立につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Recent accumulating evidences have indicated that various non-coding RNAs (ncRNAs) are involved in region-specific epigenetic regulations. Since many endogenous ncRNAs show tissue/cell-type-dependent expression patterns, it is important to reveal the relationships between tissue/cell-type-dependent expression and epigenetic regulations. Our data indicated that many genes had ncRNAs within promoter regions of tissue/cell-type-specific

genes whose DNA methylation status changed by deficiency of ncRNA-related enzymes. The Sall4 gene, which is crucial for stemness of embryonic stem (ES) cells, had an endogenous antisense ncRNA (ASncRNA) overlapping with the promoter region of the protein-coding Sall4 gene. The Sall4 ASncRNA regulated DNA methylation status of the Sall4 promoter independent of double-strand RNA synthesis by Dicer. An ectopic overexpression of the ASncRNA in fibroblast cells resulted DNA demethylation of the Sall4 promoter region. The Sall4 ASncRNA was proven indispensable for maintenance of unmethylated and activated status in ES cells by shRNA knockdown of the endogenous ASncRNA. Our data also indicated that oocyte-specific histone and environmental chemicals were involved in epigenetic regulations. In conclusion, we could identify many ASncRNAs that regulate DNA methylation status in a target-specific manner, and these ASncRNAs are thought as useful for epigenome modification to establish epigenome-related disease model animals and cells.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：遺伝子発現制御

#### 1. 研究開始当初の背景

近年、内在性、外来など様々な機能性の非コード(nc)RNAが標的遺伝子のエピジェネティック制御に関与する事が報告され始めた。内在性ncRNAは細胞種特異的発現を示すものも多く、機能性ncRNAの細胞への導入によるエピジェネティック改変(発現制御)の効率化には、内在性ncRNAの標的遺伝子同定と発現状態との総合理解が必須であると考えられた。

#### 2. 研究の目的

本研究では、転写調節領域に存在する内在性ncRNA生成・分解因子の欠損細胞を用

いて、DNAメチル化変化を指標として標的遺伝子を全ゲノム的に同定し、内在性ncRNA発現パターンとエピジェネティック制御との関係を明らかにする。また、幹細胞多能性維持因子について、内在性ncRNAの発現パターンを解析し、Dicer非依存性のncRNAによるDNAメチル化制御が存在することを同定した。この情報を基に内在性ncRNAの挙動を考慮に入れつつ、機能性ncRNAの細胞導入によるエピジェネティック改変の最適化を試みる。

#### 3. 研究の方法

Dicer欠損ES細胞と野生型ES細胞の比

較により、DNA メチル化状態の変化を指標として内在性 ncRNA の標的遺伝子を同定する。具体的には、ES 細胞特異的 DNA メチル化状態を示す遺伝子パネルを用いて DNA メチル化解析を行い、内在性 ncRNA 量の変化によって DNA メチル化状態の変化する遺伝子を同定する。

同定された内在性 ncRNA の標的遺伝子の細胞種特異的 DNA メチル化パターンの有無について、これまでに解析した様々な細胞・組織の DNA メチル化プロファイルと比較し、内在性 ncRNA の細胞種特異的 DNA メチル化への寄与を検討する。

予備検討より明らかになった Dicer 非依存的に DNA メチル化状態が制御されている新規 ncRNA を持つ Sa114 遺伝子については、内在性 ncRNA とその標的遺伝子 mRNA 発現との相関を検討する。これらの遺伝子の細胞種特異的 DNA メチル化パターン、および内在性 ncRNA の細胞種特異的発現パターンを明らかにし、機能性 ncRNA 導入によるエピゲノム改変のための DNA メチル化、ncRNA 発現データの包括的な解析を行う。

#### 4. 研究成果

本研究では、転写調節領域に存在する内在性 ncRNA 生成因子の欠損細胞を用いて、DNA メチル化変化を指標として標的遺伝子を同定し、内在性 ncRNA 発現パターンとエピジェネティック制御との関係を明らかにすることを試みた。Dicer 欠損 ES 細胞については、解析した遺伝子のうち 10 遺伝子で、メチル化状態の変化が確認できた。Dicer 欠損細胞では、対照に比べて高メチル化(5 遺伝子)、低メチル化(5 遺伝子)の双方が検出され、このうちの多くは Dicer 欠損による遺伝子発現変化と DNA メチル化状況の変化が相関していた。これにより、

Dicer を介して生成する短い二本鎖 ncRNA により DNA メチル化状態が制御される標的遺伝子を同定した。

一方で、興味深いことに、Sa114 遺伝子のプロモーター領域に存在するアンチセンス ncRNA (ASncRNA)は、Dicer に依存せず、Sa114 プロモーターの DNA メチル化制御に関係していることが示唆された。そこで、Sa114 遺伝子のプロモーターASncRNA に注目して機能解析を行った。マウス繊維芽細胞では、Sa114 はプロモーター領域が高メチル化で発現が見られないが、Sa114 ASncRNA を一過的に強制発現させることで、プロモーター領域の脱メチル化を誘導できた。一方、内在性 Sa114 ASncRNA の機能を解析するために、ES 細胞で ASncRNA を標的とする shRNA を導入することでノックダウンしたところ、本来低メチル化の Sa114 プロモーターがメチル化され、Sa114 遺伝子の発現も減少し、ES 細胞の自己再生にも影響を与えることが確認された。本研究により、内在性 Sa114 ASncRNA は、オーバーラップする標的領域の低メチル化状態を維持し、遺伝子の活性化に重要であることが示された。また、卵特異的ヒストンや環境中に残存する化学物質とエピジェネティクス制御についても Sa114 遺伝子を中心に明らかにした。本研究により、ncRNA により DNA メチル化状態が維持される遺伝子を多数同定できたことから、今後は内在性 ncRNA の強制発現やノックダウンにより標的遺伝子の DNA メチル化状態の改変(エピゲノム改変)を基盤として、有用細胞や病態モデル動物を作製するための新技術の確立につながると考えられる。

#### 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3件)

1. Arai Y, Ohgane J, Yagi S, Ito R, Iwasaki Y, Saito K, Akutsu K, Takatori S, Ishii R, Hayashi R, Izumi S, Sugino N, Kondo F, Horie M, Nakazawa H, Makino T, Shiota K. Epigenetic assessment of environmental chemicals detected in maternal peripheral and cord blood samples. J Reprod Dev. 2011 57:507-517.
2. Muramoto H, Yagi S, Hirabayashi K, Sato S, Ohgane J, Tanaka S, Shiota K. Enrichment of short interspersed transposable elements to embryonic stem cell-specific hypomethylated gene regions. Genes Cells. 2010 15:855-865.
3. Sato S, Yagi S, Arai Y, Hirabayashi K, Hattori N, Iwatani M, Okita K, Ohgane J, Tanaka S, Wakayama T, Yamanaka S, Shiota K. Genome-wide DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) residing in mouse pluripotent stem cells. Genes Cells. 2010 15:607-618.

[学会発表] (計5件)

1. 大鐘 潤、新井 良和、塩田 邦郎。ヘテロクロマチン形成を指標とした環境・人体に残存する低レベル化学物質のエピ変異原性評価に向けて。第6回環境エピゲノミクス研究会。2011年11月20日。東京
2. 早川 晃司、大鐘 潤、田中 智、塩田 邦郎、八木 慎太郎。卵特異的ヒストン H1foo はDNAメチル化プロファイル形成に関与する。第104回日本繁殖生物学会、2011年9

月15日 盛岡

3. 山下 翠、新井 良和、伊藤 修平、大鐘 潤、広沢-高森 瑞子、田中 智、八木 慎太郎、塩田 邦郎。GSK3がマウスES細胞のヘテロクロマチン構造に与える影響。第104回日本繁殖生物学会、2011年9月16日 盛岡
4. Ohgane J, Kumagai K, Takamatsu T, Yagi S, Tanaka S, Shiota K. Epigenetic regulation of the Sall genes in embryonic and trophoblast stem cells and involvement of non-coding RNA. Experimental Biology 2010年4月26日 Anaheim, CA, USA
5. Muramoto H, Yagi S, Hirabayashi K, Sato S, Ohgane J, Tanaka S, Shiota K. Enrichment of short interspersed transposable elements (SINEs) in hypomethylated genic regions in embryonic stem cells. Experimental Biology 2010年4月26日 Anaheim, CA, USA

[その他]

ホームページ等

<http://rwdb2.mind.meiji.ac.jp/Profiles/32/0003193/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大鐘 潤 (OHGANE, JUN)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教  
平成23年度より

明治大学・農学部・専任講師

研究者番号：50313078