

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510284

研究課題名(和文) 部位選択的DNA脱メチル化誘導による新規細胞機能変化法の検討

研究課題名(英文) Studies on cell conversion methods by site-specific DNA demethylation

研究代表者

窪崎 敦隆 (KUBOSAKI, Atsutaka)

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・主任研究官

研究者番号：30425673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒドロキシメチルシトシン(hmC)は、DNAを構成するシトシン修飾の一つであり、近年DNAの脱メチル修飾の過程で重要な働きをしていると考えられている。そこでメチル化シトシンヒドロキシラーゼTET1をHEK293T細胞に過剰発現させ、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計でヒドロキシメチル化デオキシシチジン量の増大を確認した。さらに、独自に開発したMoCEV法を用いて観察した結果、HEK293T細胞内に導入したhmCは細胞増殖を経ると、CpGの部位でメチルシトシンへと変化することを明らかにした。これらの結果は、TET1を活用した部位特異的DNA脱メチル化誘導を考える上で重要な知見となった。

研究成果の概要(英文)：Hydroxymethylcytosine (hmC), one of several reported cytosine modifications, was recently thought to play an important role in DNA demethylation. To obtain the fundamental knowledge of hmC, methylcytosine dioxygenase was overexpressed in HEK293T cells and 5-hydroxymethyl deoxycytidines were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I also used an original episomal vector-based method called MoCEV to monitor the fate of hmC beyond DNA replication in HEK293T cells. The MoCEV system containing fully hydroxymethylated-cytosine fragments revealed a significant modification towards methylcytosine after several rounds of DNA replication. Since the unmodified MoCEV did not undergo any DNA methylation during cell division, the results strongly suggest that somatic cells undergo hmC to methylcytosine specifically at the CpG sites during cell division. These data may help to induce site-specific DNA demethylation for cell conversion.

研究分野：システムゲノム科学

キーワード：エピゲノム制御 ゲノム 発現制御 DNA脱メチル化

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は共同研究者と共に細胞機能を変換することを目的に、単球特異的転写因子をヒト繊維芽細胞に発現させることで細胞機能の変換を試みてきた。作製した細胞を詳細に解析してみたところ、単球では DNA のメチル化修飾を受けていないプロモーター領域が、繊維芽細胞のメチル化修飾状態を維持しており、そのことによって、一部の単球特異的遺伝子の発現が妨げられていることが明らかとなった。これらの知見から、任意の遺伝子の発現を誘導し細胞の機能を変換するには、その遺伝子の発現制御領域の DNA の脱メチル化を誘導し、転写因子が結合出来るようにする必要があったと考えた。このアイデアに基づいて、任意の場所に対する人工的な脱メチル化誘導法に資する知見を得る必要があった。

2. 研究の目的

研究開始当初、メチル化シトシンヒドロキシラーゼである TET1 によるメチルシトシンのヒドロキシメチルシトシンへの変換が DNA 脱メチル化にとって重要であるという報告があった。この情報から、研究代表者は、TET1 の活性を用いれば部位選択的な DNA 脱メチル化が達成出来るのではないかと発案した。この考えを確認する目的で、本研究では、ヒドロキシメチルシトシンを経た DNA 脱メチル化の可能性について検討した。具体的には、まず、TET1 を培養細胞である HEK293T 細胞に過剰発現させ、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計によりヒドロキシメチルシトシンの量が変化するかを検討した。ヒドロキシメチルシトシン量の増大が観察出来れば、少なくともメチルシトシン量を減らすことは出来たと考えられた。さらに、ヒドロキシメチルシトシンが細胞増殖を経ると、どのような修飾状態になるかを観察する為に、研究代表者が独自に開発した MoCEV (modified cytosine in episomal vector) 法を活用した。哺乳動物細胞発現用エピソーマルベクターを改変した解析手法である MoCEV 法は、任意のシトシン修飾を含む DNA 配列を細胞内に導入することができ、細胞増殖後もその変化を追跡出来る特徴があり、本研究の目的に合致すると考えた。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子導入： ヒト TET1 遺伝子の産物を HEK293T 細胞で産生させる為に、全長ヒト TET1 遺伝子を pFN21A HaloTag Flexi ベクターに組み込んだ発現ベクター、pFN21AE2295 クローン (Kazusa DNA Research Institute) をプロメガ社より入手した。トランスフェクション試薬 TransIT-2020 Transfection Reagent は Takara Bio 社から入手した。遺伝子導入方法は、トランスフェクション試薬の使用説明書に従った。

(2) 修飾シトシン量測定： 試料 DNA を酵素処理によって nucleoside まで分解し、試料中に含まれるシトシン、メチル修飾シトシン、ヒドロキシメチル修飾シトシンの比率を明らかにする測定方法である。分析に用いた液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) は、AB SCIEX 社の API3200 Qtrap LC/MS/MS システムを選んだ。酵素分解後産物の標準品として用いた、2'-Deoxy-5-hydroxymethyl cytidine、2'-Deoxy-5-methylcytidine、2'-Deoxycytidine は、東京化成より入手した。ゲノム DNA 精製キット NucleoSpin Tissue と DNA Clean & Concentrator-5 は、Takara Bio 社および ZYMO Research 社より入手し、精製手技は各キットの使用説明書に従った。DNA Degradase Plus は ZYMO Research 社より入手した。

(3) MoCEV 法： エピソーマルベクター pEBMulti-Hyg は、和光純薬工業株式会社より、In-Fusion HD cloning kit は Takara Bio 社より入手した。pEBMulti-Hyg にレポーター遺伝子としての Venus を導入し、その発現調整配列である CAG プロモーターを欠損させた pEBMulti-Hyg/Venus+/Promoterless を作製した (図 1)。SPI1 制限酵素切断後、必要に応じてヒドロキシメチルシトシンを取り込ませた CAG プロモーター配列の DNA 断片を In-Fusion 法で組み込み、その反応物を直接培養細胞に導入した。

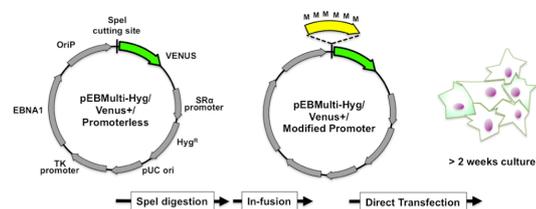


図1 MoCEV法の概略図

4. 研究成果

(1) 本研究ではメチル化シトシンヒドロキシラーゼであるヒト TET1 遺伝子の活性に着目した。ヒドロキシメチル修飾シトシンをほとんど含まない培養細胞である HEK293T 細胞にヒト TET1 遺伝子を導入し、遺伝子産物の産生を TET1 の機能的活性によるヒドロキシメチルシトシンの増大で判断することを試みた。遺伝子導入試薬 TransIT-2020 Transfection Reagent の使用説明書に従い、 1×10^6 個の HEK293T 細胞を 1 晩培養後、 $2.5 \mu\text{g}$ の TET1 遺伝子を組み込んだ pFN21A HaloTag Flexi ベクターを細胞に導入した。遺伝子導入後 72 時間培養した細胞を TET1 遺伝子一過性発現 HEK293T 細胞 (HEK293T + TET1 細胞) として回収した。回収された細胞は、修飾シトシン量測定を行うまで冷凍保存された。

(2) DNA 中に含まれる各修飾シトシン量を LC/MS/MS によって測定することを試みた。ま

ず、2'-Deoxy-5-hydroxymethyl cytidine、2'-Deoxy-5-methylcytidine、2'-Deoxy-cytidine を酵素分解後産物の標準品とし、API3200 Qtrap LC/MS/MS システムで分析してみたところ、十分な検出感度が得られることが確認できた。次に、ゲノム DNA 中の各修飾シトシン量を測定する為に、HEK293T 細胞および HEK293T + TET1 細胞から NucleoSpin Tissue および DNA Clean & Concentrator-5 を用いてゲノム DNA を精製し、十分量の試料を得た。準備出来た純度の高いゲノム DNA を DNA Degradase Plus で処理し、nucleoside まで分解した。酵素処理が十分であったことは、アガロースゲル電気泳動で確認できた。酵素処理後の試料を LC/MS/MS システムで解析した結果、全ての試料からシトシン、メチル修飾シトシンが検出出来た。一方、HEK293T 細胞から回収されたゲノム DNA からは検出出来なかったヒドロキシメチルシトシンが、HEK293T + TET1 細胞から回収されたゲノム DNA で検出することが出来た。このことは、微量にしか存在しないヒドロキシメチル修飾シトシンを検出出来るだけの高感度測定方法が確立できたこと、HEK293T 細胞への TET1 遺伝子導入および活性を持った遺伝子産物が産生されたことを示している。以上のことから、ヒト TET1 遺伝子の活性を利用した部位特異的な DNA の脱メチル化誘導に資するシステムと修飾シトシン量を測定出来る有効な分析法が準備出来たと判断した。

(3) ヒドロキシメチルシトシンが細胞増殖を経ると、どのような修飾状態になるかを観察する為に、研究代表者が独自に開発した哺乳動物細胞発現用エピソーマルベクターを活用した解析手法 MoCEV 法を用いた。まず、強い発現誘導能を持つ CAG プロモーターの全シトシンを増幅時にヒドロキシメチルシトシンに置き換えた PCR 産物を作成した(図 2)。

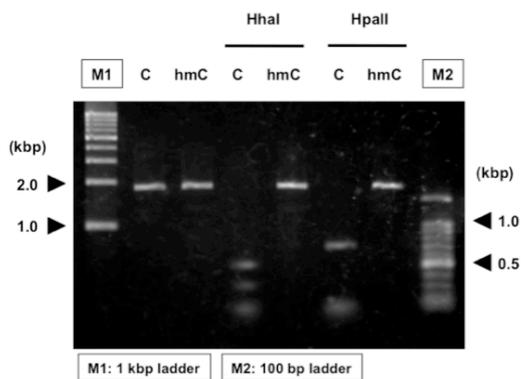


図2 ヒドロキシメチルシトシンPCR産物の作成

MoCEV 法により PCR 産物を HEK293T 細胞へ導入し、細胞増殖を経た後、ゲノム DNA を回収した。バイサルファイトシーケンス法により、バイサルファイト処理に対する反応性の違いから、シトシンの修飾の状態を観察した(図 3)。

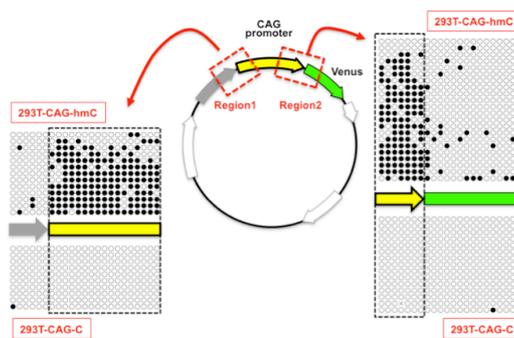


図3 細胞増殖後のヒドロキシメチルシトシンの状態確認

その結果、シトシンのみの PCR 産物の時とは異なり、ヒドロキシメチルシトシンに置き換えた PCR 産物を導入した時には、バイサルファイト処理に対する抵抗性を示すことが分かった。さらに詳細な解析をした結果、DNA の複製に伴って non-CpG 部位のシトシンは修飾を持たないシトシンに、CpG 部位のシトシンはバイサルファイト処理に対する抵抗性を示す修飾シトシンに変化することが明らかになった(図 4)。これらバイサルファイト処理に対する抵抗性を示す修飾シトシンの種類を制限酵素による切断試験によって確認したところ、ヒドロキシメチルシトシンではなく、メチルシトシンであることが明らかとなった。



図4 細胞増殖後のゲノムDNAを用いたバイサルファイトシーケンス結果の例

この観察結果は、これまで信じられてきたメチルシトシンがヒドロキシメチルシトシンへと変換された後、DNA 複製の過程で修飾を失いシトシンへと変化するという DNA 脱メチル化のプロセスとは異なり、ヒドロキシメチルシトシンからメチルシトシンへと変換されることがあることを示す結果となった。

(図5)。以上の結果から、TET1 の活性によってヒドロキシメチルシトシンを誘導し、部位特異的にDNAの脱メチル化を誘導する方法を考える上で重要な知見を得ることが出来た。

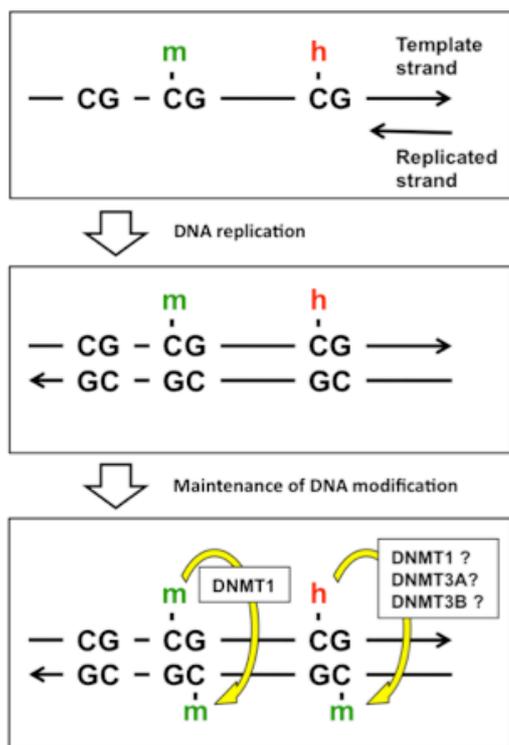


図5 細胞増殖に伴うシトシン修飾変化のモデル

研究代表者は、これらの研究成果を筆頭著者の論文にまとめ、英文国際誌にて発表し、さらに国内学会および国際学会において報告した。その結果、広く生命学者から反響があり、現段階で Nature Reviews Molecular Cell Biology 誌や PLOS Genetics 誌などの掲載論文に引用された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計1件)

- ① Kubosaki Atsutaka, Tomaru Yasunobu, Furuhata Erina, Suzuki Takahiro, Shin W. Jay, Simon Christophe, Ando Yoshinori, Hasegawa Ryota, Hayashizaki Yoshihide, Suzuki Harukazu, CpG site-specific alteration of hydroxymethylcytosine to methylcytosine beyond DNA replication, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有、426 巻、2012、141-147
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.08.053.

〔学会発表〕 (計2件)

- ① Suzuki Harukazu, Kubosaki Atsutaka, Hayashizaki Yoshihide: MoCEV; the

modified cytosine monitoring system based on episomal vector during replication. Keystone Symposia, New Mexico, 20th-25th March, 2013.

- ② Kubosaki Atsutaka, Tomaru Yasunobu, Furuhata Erina, Suzuki Takahiro, Shin W. Jay, Simon Christophe, Ando Yoshinori, Hasegawa Ryota, Hayashizaki Yoshihide, Suzuki Harukazu: Modified cytosine monitoring system based on episomal vector during replication. MBSJ2012, Fukuoka, 11th-14th December, 2012.

〔その他〕

アウトリーチ活動情報

- ① 窪崎敦隆、長谷川由紀、De Hoon, M.; 出張ラボツアー：潜入！生命科学研究の最前線、サイエンスアゴラ 2012、東京、2012年11月11日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪崎 敦隆 (KUBOSAKI, Atsutaka)
国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・主任研究官
研究者番号：30425673

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし

(4) 研究協力者

外丸 靖浩 (Tomaru, Yasunobu)
降旗 絵里奈 (Furuhata, Erina)
鈴木 貴紘 (Suzuki, Takahiro)
ジェイ シン (Shin, Jay)
シモン クリstoff (Simon, Christophe)
安藤 吉成 (Ando, Yoshinori)
長谷川 遼太 (Hasegawa, Ryota)
林崎 良英 (Hayashizaki, Yoshihide)
鈴木 治和 (Suzuki, Harukazu)
吉成 知也 (Yoshinari, Tomoya)