

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 9 月 16 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450472

研究課題名(和文) エピゲノム改変を基点としたブタ有用形質発現とヒト生活習慣病病態の総合理解

研究課題名(英文) Understanding favorable trait of domestic animal and chronic disease of human based on epigenome engineering

研究代表者

大鐘 潤 (Ohgane, Jun)

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：50313078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋、脂肪細胞分化および個体の成長に重要なホルモンの産生組織である脳下垂体でのアリルごとのDNAメチル化状態に着目したDNAメチル化解析法を確立し、組織または培養細胞中での特定細胞の存在非を推定できるようになった。さらに、組織特異的なエピジェネティック制御に関係する長鎖非コードRNAの探索法を確立した。これらによりエピゲノム改変によるブタでの有用形質発現およびヒト生活習慣病研究のための基盤構築を行った。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation analysis based on allelic methylation status has been established in the present project, and this enabled us to estimate ratios of particular cell types in tissues containing multiple cell types and heterogenous cultured cell populations. Moreover, a screening method to identify long non-coding RNAs related to epigenetic regulation of nearby genes has been established. Therefore, basic technology to perform epigenome engineering established in this project.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス エピゲノム改変 非コード(nc)RNA 食肉形質 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

ブタ等の家畜で筋肉内に脂肪が蓄えられれば食肉形質としての「霜降り肉」として高く評価されるが、ヒトに当てはめると代謝異常や肥満などの生活習慣病とも捉えられる。食肉形質と生活習慣病態は、脂肪・骨格筋細胞分化や代謝系を制御するエピジェネティックな遺伝子発現として考えられる。ブタは体格・生理学的類似性からヒト疾患のモデル動物として優れており、その食肉形質とヒトの生活習慣病態に関係する発現調節機構も共通点が多いと予想される。食肉としてはブタの脂肪・骨格筋組織の形質として霜降り(脂肪交雑)が高評価・追求されるのに対して、これらはヒトの主要代謝組織でもあるが同じ形質はヒトでは肥満や慢性代謝異常に直結する忌避されるべき問題となる。したがって、前述の形質発現の調節機構についても共通点が多いと予想される。そこで、ブタにおいて遺伝子特異的なエピジェネティック制御に関わる非コード RNA を利用して、脂肪・骨格筋分化やエネルギー代謝を司る遺伝子のエピゲノム改変の分子基盤を確立することにより、食肉の有用形質発現技術に結びつけると共に、ヒトの生活習慣病病態の理解につながる基礎研究の基盤を構築できると考えられた。

2. 研究の目的

ブタの脂肪・骨格筋関連細胞や個体の成長に重要なホルモンの産生組織である脳下垂体について、アレルごとの DNA メチル化状態に着目したウルトラディープ DNA メチル化解析により、細胞分化やエネルギー代謝に関係し、DNA メチル化制御を受けるものを同定する。これを基に申請者が独自に発見した内在性アンチセンス非コード(ASncRNA)を用いて、ブタの食肉形質発現とヒトの生活習慣病態の理解につながるエピゲノム改変の分子基盤を確立する。

3. 研究の方法

成体雄ブタの脂肪組織、骨格筋、心臓、肝臓、胎仔線維芽細胞から、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿によってゲノム DNA を精製した。また、同一組織から Trizol によって total RNA を抽出した。

DNA メチル化解析については、HindIII 処理により断片化したゲノム DNA をバイサルファイト処理し、脂肪および骨格筋の分化や機能維持に重要な 143 遺伝子 181 領域のバイサルファイト PCR を行った。同一組織の各 PCR 産物を混合して、組織ごとに異なるタグを持つアダプターを付加して、MiSeq によるアンプリコンシーケンス用ライブラリーを作製した。MiSeq によるシーケンス後に Bismark(v0.9.0)を用いてマッピングを行った。各 PCR 産物で 100 リード以上検出されたものについてアレルごとのメチル化状態に着目して、本研究で確立した解析法もとにメチル化状態を決定した(Arai et al., 2016)。

4. 研究成果

(1) 本研究では、最初に遺伝子領域の DNA メチル化状態を高感度に解析するために、バイサルファイト PCR と次世代シーケンサー MiSeq による PCR アンプリコンシーケンスを組み合わせ、ウルトラディープバイサルファイトシーケンス法によるアレルごとの DNA メチル化状態に着目した解析法を確立した。この方法を用いて、脂肪および骨格筋の分化や機能維持に重要な 143 遺伝子 181 領域を抽出し、脂肪組織において他の組織とメチル化状態の異なる領域を同定した(図1)。さらにアレルごとのメチル化状態に着目した解析から、脂肪組織内の脂肪細胞の割合や骨格筋内で特定の遺伝子を発現する細胞の割合を推定することができるようになった。

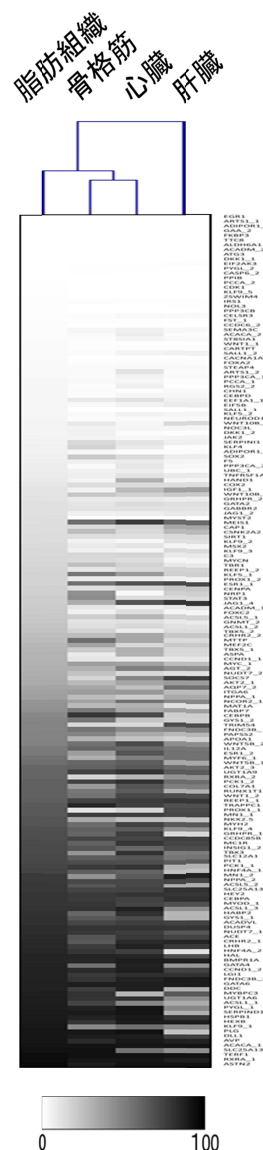


図1 脂肪組織・骨格筋・心臓・肝臓の4組織間でのDNAメチル化率の比較  
脂肪組織・骨格筋・心臓・肝臓の4組織からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて100リード以上の解析結果が得られた143

伝子 181 領域について DNA メチル化率をヒートマップで表し、階層的クラスタリングを行った。

(2) *Mstn* 遺伝子がコードするミオスタチンタンパク質は、最終分化後の骨格筋細胞から分泌され、負のフィードバックとして筋前駆細胞である筋芽細胞の増殖を抑制する。*Mstn* の DNA メチル化解析では、*Mstn* プロモーター領域は骨格筋のみで低メチル化状態であり (図 2) *Mstn* は DNA メチル化によって骨格筋以外の組織では発現が抑制されていることが示唆された。

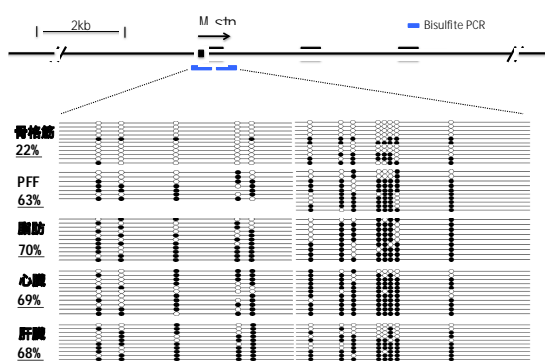


図 2 *Mstn* プロモーター領域の DNA メチル化状態

*Mstn* 遺伝子の転写開始点近傍について、バイサルファイト PCR を行い、バイサルファイト配列解析ツール Quantification tool for Methylation Analysis (QUAMA) で CpG メチル化状態の判定を行った。メチル化されている CpG 数を全 CpG 数で割り出し、各サンプルの全 CpG についてのメチル化率を算出した。PFF: 胎仔線維芽細胞。白丸は非メチル CpG、黒丸はメチル CpG を示す。

*Mstn* 遺伝子座の非コード RNA 発現解析では、*Mstn* 上流にブタデータベースに登録されている EST についての解析を行い (図 3) 翻訳領域を持たない遺伝子間長鎖非コード RNA (lincRNA) であることを確認し、発現パターンを決定した。この lincRNA は *Mstn* が特異的に発現している骨格筋のみで検出されず、骨格筋以外の組織・細胞では検出された。lincRNA の存在する組織・細胞と *Mstn* プロモーター領域が高メチル化状態である組織・細胞が一致したため、lincRNA は *Mstn* プロモーター領域の DNA メチル化に関与していることが示唆された。*Mstn* 遺伝子の発現は骨格筋への分化を抑制することから、同定した lincRNA の強制発現によって *Mstn* 遺伝子の発現を抑制できる可能性が示唆され、筋分化促進を誘導するための研究基盤を構築することができた。

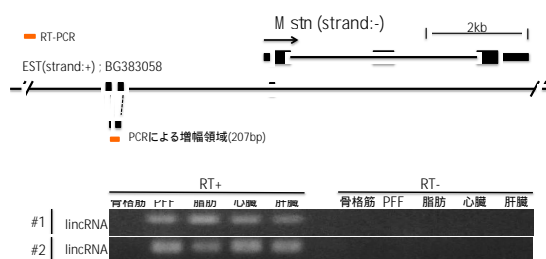


図 3 *Mstn* 転写開始点上流の lincRNA の同定および発現解析

RT-PCR 法により *Mstn* 遺伝子上流に登録されている EST についての発現解析を行った。雄ブタ二個体 (#1、#2) の組織より抽出した total RNA から cDNA を合成し、lincRNA は 40 サイクル、GAPDH は 25 サイクルの条件で PCR を行った。この解析から、登録された EST は、*Mstn* 遺伝子の発現と逆相関する lincRNA であることが示された。

#### 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 4 件)

Arai Y, Fukukawa H, Atozi T, Matsumoto S, Hanazono Y, Nagashima H, Ohgane J. Ultra-Deep Bisulfite Sequencing to Detect Specific DNA Methylation Patterns of Minor Cell Types in Heterogeneous Cell Populations: An Example of the Pituitary Tissue. PLoS One. 査読有 Vol.11, 2016, e0146498.

doi:10.1371/journal.pone.0146498.

Arai Y, Hayakawa K, Arai D, 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, Hirose M, Shiota K, Ohgane J. Putative Epimutagens in Maternal Peripheral and Cord Blood Samples Identified Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. Biomed Res Int. 査読有 Vol.2015,2015, 876047. doi: 10.1155/2015/876047.

Arai D, Hayakawa K, Ohgane J, Hirose M, Nakao Y, Tanaka S, Shiota K. An epigenetic regulatory element of the Nodal gene in the mouse and human genomes. Mech Dev. 査読有 Vol.136, 2015, pp.143-154. doi: 10.1016/j.mod.2014.12.003.

Arai Y, Ohgane J, Fujishiro SH, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H. DNA methylation profiles provide a viable

index for porcine pluripotent stem cells. Genesis. 査読有 Vol.51, 2013, pp.763-776.  
doi: 10.1002/dvg.22423.

〔学会発表〕(計16件)

齋藤経、新井良和、阿閉貴紀、竹内健太、長嶋比呂志、大鐘潤：次世代シークエンサーによるブタ精巣でのウルトラディープDNAメチル化解析 第108回日本繁殖生物学会2015年9月 宮崎

新井良和、松本翔馬、阿閉貴紀、東大、内田奈緒美、坂本望、牧野智宏、長嶋比呂志、大鐘潤 次世代シークエンサーによる組織全体を用いたDNAメチル化解析の新たな視点 第8回日本エピジェネティクス研究会 2014年5月 東京

新井良和、松本翔馬、阿閉貴紀、東大、内田奈緒美、坂本望、牧野智宏、長嶋比呂志、大鐘潤 脳下垂体のホルモン産生細胞や前駆細胞で発現する遺伝子に注目した次世代シークエンサーでのDNAメチル化解析による新たな試み 第29回日本下垂体研究会学術集会 2014年8月 東京

新井良和、松本翔馬、阿閉貴紀、東大、内田奈緒美、坂本望、牧野智宏、長嶋比呂志、大鐘潤 脳下垂体の一部の細胞で発現する遺伝子における次世代シークエンサーを用いたDNAメチル化可変領域検出のブタでの試み 第107回日本繁殖生物学会 2014年8月 北海道

Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H: Evaluation of porcine induced pluripotent stem cells based on the DNA methylation profile of mouse embryonic stem cell-specific hypomethylated loci. 第36回日本分子生物学会 2013年12月 兵庫

内田奈緒美、東大、坂本望、牧野智宏、新井良和、長嶋比呂志、大鐘潤「脂肪細胞分化に関わる遺伝子の発現制御」第106回日本繁殖生物学会 2013年9月 東京

坂本望、東大、内田奈緒美、牧野智宏、新井良和、長嶋比呂志、大鐘潤「ブタ *Hnf1a*、*Hnf4a* の肝臓特異的発現にはDNAメチル化とアンチセンス非コードRNAが関与する」第106回日本繁殖生物学会 2013年9月 東京

東大、内田奈緒美、坂本望、牧野智宏、新井良和、長嶋比呂志、大鐘潤「骨格筋分化抑制遺伝子 *Mstn* のDNAメチル化による発現制御」第106回日本繁殖生物学会 2013年9月 東京

(他8件)

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://gyoseki1.mind.meiji.ac.jp/mjuhp/KgApp?kyoinId=ymdygmoyggy>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大鐘 潤 (OHGANE, Jun)

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：50313078

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし