

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25503001

研究課題名(和文) マルチオーム解析で解き明かすアカパンカビにおけるDNAメチル化の機能的意義

研究課題名(英文) Multiomics analysis to reveal the functional meaning of DNA methylation in *Neurospora crassa*

研究代表者

三浦 史仁 (Miura, Fumihito)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：50447348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アカパンカビにおけるDNAメチル化の存在意義を調べるため、野生株およびDNAメチル化状態に変化が生じていることが知られている3種類の変異株の間で比較解析を行った。全ゲノムバイサルファイトシーケンシング(WGBS)とクロマチン免疫沈降シーケンシング(ChIP-Seq)によりDNAメチル化とヒストンの翻訳後修飾状態を比較した。その結果、DNAのメチル化とヒストンの翻訳後修飾の一部の新しい相関関係が確認された。このことはヒストン修飾に対するDNAメチル化の新しい機能を示唆していた。

研究成果の概要(英文)：To reveal the functional meanings of DNA methylation in *Neurospora crassa*, a series of comparative analyses was performed among wild type and three mutants with deficient or showing altered DNA methylation. By using whole-genome bisulfite sequencing (WGBS) and chromatin immunoprecipitation combined with massive parallel sequencing (ChIP-Seq), genome-wide states for DNA methylation and histone post-translational modification were compared. We observed some interesting relationships between histone modifications and DNA methylation, which indicates the existence of novel function of DNA methylation on histone modifications.

研究分野：Epigenetics

キーワード：Neurospora crassa DNA methylation Histone modification

## 1. 研究開始当初の背景

DNA のシトシンの 5 メチル化(以降 DNA メチル化)はヘテロクロマチン形成のマーカ―として知られている。シトシンのメチル化はゲノム刷り込みや X 染色体の不活化に関わることが早くから知られており、哺乳類では DNA メチル化が正常な発生のために必須である。また、がん細胞でメチル化の異常が見られることが知られるようになり、その仕組みについての研究は医学的にも重要性を増している

アカパンカビ (*Neurospora crassa*) は DNA メチル化研究のモデル系として古くから注目されている生物である。これはアカパンカビのゲノムサイズは 43 Mbp と小さく、また、高等真核生物に見られるクロマチン修飾のほとんどを持っているというエピゲノム研究に適した特性を有することもその原因の一つであろう。しかし、皮肉なことに、この生物における DNA のシトシンの 5-メチル化は、分子遺伝学的研究によりそのメチル化に至るまでの機構が明らかにされている一方で、DNA メチル化酵素である dim-2 の欠損が表現型にほとんど影響を及ぼさないなど、この生物における DNA メチル化の機能的意義はいまだ明らかにされていない。

これまでの研究でアカパンカビの DNA のメチル化は RIP 領域と呼ばれる過去にリピート領域であったゲノム領域に専ら導入されることが明らかになっている。RIP は Repeat-induced point mutation の略で、この生物が利己的遺伝子から自己のゲノムを保護する機能である。利己的遺伝子がゲノム中で複製すると相同性の高い DNA 配列が複数ゲノム中に存在することになる。RIP はこういったゲノム領域を見つけてはその両方に変異を加えるという方法で利己的遺伝子の増幅を防いだきたものと考えられている。ちなみに RIP が起こると CpA 配列中のシトシンが脱アミノ化されて TpA 配列へと変換される。このため RIP 領域は AT リッチになり、また TpA 出現頻度も他のゲノム領域に比べて高くなる。つまり、ゲノム配列情報から配列の特性によって RIP 領域を同定することが可能である。DNA メチル化はこのような RIP 領域に導入されることから、利己的遺伝子の転写を抑える機構の一つと考えることもできる。実際に薬剤を用いて DNA メチル化を消失させた場合には一部の RIP 領域からの転写量が増大したとする報告もある。しかし、この現象の一般性やメカニズムについては一切明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

アカパンカビの DNA メチル化は、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基がメチル化 (H3K9me3) された後、H3K9me3 に結合する活性のある HP-1 と DNA メチル基転移

酵素である dim-2 の複合体が当該領域にリクルートされることによって引き起こされることが知られている。この DNA メチル化とヒストン翻訳後化学修飾の密接な関係は、逆に DNA のメチル化がヒストン翻訳後修飾などに対して何らかの影響を持つことを疑わせる。そこで、野生株と既に DNA のメチル化状態が変化することが知られているいくつかの変異体との間でゲノム網羅的な比較エピゲノム解析と比較トランスクリプトーム解析を実施する。DNA メチル化とクロマチン・転写状態の関係を明らかにすることで、この生物の DNA のメチル化の存在意義にアプローチすることを試みる。

## 3. 研究の方法

### 材料

米国の Fungal Genetics Stock Center からアカパンカビの野生株および DNA メチル基転移酵素欠損株 (dim-2 株)、ヒストン脱アセチル化酵素複合体の構成タンパク質が欠損した 2 株 (cdp-2 株、hda-1 株) を入手し、Fries 完全培地で振とう培養した後菌体を回収した。

### WGBS

ビードピーターで破碎した菌体をラウリルサルコシルを含む溶解液で加熱インキュベーションしてライセートの抽出を行った。エタノール沈殿でバッファーを一度除いた後、得られたペレットを溶解し、プロテアーゼを加えてタンパクの分解を進めた。次いでフェノール抽出とリボヌクレアーゼ処理を行うことで除タンパクと RNA の除去を実施し、エタノール沈殿により DNA 標品を得た。

DNA メチル化状態の測定は、独自に開発してきた Post-Bisulfite Adaptor Tagging (PBAT) 法で調製された鋳型をイルミナ社 MiSeq システムにて配列決定することにより行った。得られた配列データは独自のマッピングプログラム BMap により行い、得られたマッピング情報も独自の解析ラインを用いて集計を行った。最終的にデータはゲノムブラウザで可視化した。

### ChIP-Seq

菌体ペレットを緩衝ホルマリン溶液に浸けクロスリンクを行った後、グリシン液でクエンチングを行った。この固定化済み菌体ペレットを液体窒素で冷却したクールミルを用いて破碎した後、Covaris C220 にて断片化を行った。このクロマチンライセートに対して 14 種類のヒストン翻訳後化学修飾に特異的な抗体が固相化されたマグネティックビーズを加えることでクロマチン免疫沈降を行った。ビーズ上に濃縮された DNA は溶出と脱クロスリンク操作の後、イルミナ社のキットに従って鋳型に変換し、イルミナ社 MiSeq を用いて配列決定を行った。得られた

配列データは Bowtie を用いてアカパンカビのゲノム配列上にマッピングし、集計を行った。

#### RNS-Seq

菌体ペレットを液体窒素で冷却したクーリングミルで破碎した後、トリゾルを用いて RNA 抽出を行った。DNaseI 処理の後、Ribo-Zero Magnetic Gold Kit により rRNA の除去を行った。NEBNext Ultra Directional RNA Library Preparation Kit により鋳型調製を行い、イルミナ社 MiSeq を用いて配列決定を行った。配列データの解析は Tophat/Cufflinks を用いて実施した。

## 4. 研究成果

### メチル化変異体間の比較メチローム解析

WGBS によるメチロームの比較は野生株と cdp-2 株および hda-1 株の 3 者で行った。ここで dim-2 株を解析対象から除外した理由はこの株では DNA のメチル化が完全に消失していることが知られているため、データを取得する意味が無いためである。

面白いことに同じ HDAC 複合体の構成因子である cdp-2 と hda-1 の変異体は DNA のメチル化パターンに違いがあることが判明した。このことは cdp-2 と hda-1 には異なる機能があることを意味しており、今後の解析に期待がもたれる。また、過去の野生株のメチローム解析から DNA のメチル化は RIP 領域と呼ばれるゲノム領域に集中していることがわかっており、このメチル化の程度は RIP 領域のサイズに依存していることが示されている。cdp-2 と hda-1 で野生株と異なるメチル化状態を示した領域はそのほとんどが小さな RIP 領域であり、特に 5kbp 以下の領域で顕著な傾向があることが明らかになった。

### 変異体間の比較 ChIP-Seq 解析

ChIP-Seq 解析では H3K9me3、H3K4ac、H3K9ac、H3K14ac、H3K18ac、H3K27ac、H3K36ac、H3K56ac、H3K79ac、H4K5ac、H4K12ac、H4K16ac の 12 種類の抗体を用いて解析を行った。

まず、過去に DNA メチル化との相関が示されている H3K9me3 と DNA メチル化の局在の比較を試みた。その結果、過去の報告通り、DNA メチル化が観察された領域はそのほとんどの領域で H3K9me3 の局在が観察された。この傾向は hda-1 変異体で特異的に DNA メチル化が消失したゲノム領域でも確認され、DNA メチル化と H3K9me3 の強い相関があらためて確認された。

その一方で、DNA のメチル化が局在しているにもかかわらず、H3K9me3 の局在が確認出来ないゲノム領域が 124 領域存在することも明らかになった。従来の DNA のメチル化モデ

ルに即して考えると、この領域は DNA のメチル化が導入された後に H3K9 のトリメチル化が除かれたことになる。あるいは H3K9me3 非依存的に DNA のメチル化が導入された領域である可能性もある。面白いのはこういった領域のほとんどが 2kbp 以下の小さい領域であるという点である。このことは DNA メチル化の確立機構と DNA メチル化あるいはヘテロクロマチンの維持機構が別々に存在する可能性も示唆している。

次に H3K9me3 と同じアミノ酸残基が対象となる翻訳後修飾である H3K9ac と DNA メチル化の関係を調べた。面白いことに過去に H3K9ac と DNA メチル化の逆相関が議論された例があるにもかかわらず、ゲノム規模では DNA のメチル化と H3K9ac の局在には大きな相関がないことが明らかになった。この結果は H3K9ac を脱アセチル化することにより H3K9 のトリメチル化が進行するきっかけになると考えられてきた既存のモデルに対して否定的なものであった。こういった H3K9ac と同様の局在を示すものをその他のデータと比較した結果、H4K16ac が同定されている。

### 転写とエピゲノムの関係

DNA メチル化はヘテロクロマチン形成と強い相関が他の生物で示されており、またアカパンカビにおいても DNA メチル化の阻害剤による DNA メチル化消失が DNA メチル化の局在するゲノム領域の転写活性化に寄与した報告がある。そこで、最後に RNA-Seq による mRNA 定量とエピゲノム変化の相関解析を行った。その結果、cdp-2 や hda-1 株では転写量が增大している RIP 領域が観察された。しかし、こういった領域で DNA のメチル化の局在量に変化が起こった領域は見いだされなかったため、DNA のメチル化が転写調節と直接関わっている可能性は低いものと結論づけられた。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

池田 秀也, 小松 慶太, 三浦 史仁, 伊藤隆司「ヒストン脱アセチル化複合体 HCHC 構成因子の欠損がもたらすアカパンカビのエピゲノム変化」, 平成 26 年 11 月、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(横浜市)

池田秀也、小松慶太、三浦史仁、伊藤隆司「アカパンカビのヒストン脱アセチル化複合体構成因子欠損がもたらすエピジェネテ

イクスの変化」, 平成 25 年 12 月、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド（神戸市）

小松慶太、三浦史仁、伊藤隆司「アカパンカビにおける DNA メチル化とヌクレオソーム構造の相関解析」, 平成 25 年 12 月、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド（神戸市）

池田秀也、小松慶太、三浦史仁、伊藤隆司「アカパンカビのヒストン脱アセチル化複合体構成因子欠損がもたらすエピジェネティクスの変化」, 平成 25 年 5 月、第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂（奈良市）

小松慶太、三浦史仁、伊藤隆司「アカパンカビで見いだされたヌクレオソーム配置と DNA メチル化の新たな関係」, 平成 25 年 5 月、第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂（奈良市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究室ホームページ

<https://biochem1.wp.med.kyushu-u.ac.jp/>

当該データのゲノムブラウザ

<http://itolab.med.kyushu-u.ac.jp/cgi-bin/DesktopTracks/bin/Browser>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三浦史仁 (MIURA, Fumihito)

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：5 0 4 4 7 3 4 8

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし

(4) 研究協力者 該当なし