

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06899

研究課題名(和文) ハダカデバネズミの女王化抑制と老化耐性をもたらすエピゲノム修飾の解明

研究課題名(英文) Epigenetic landscape in eusocial and non-aging naked mole rats

研究代表者

藤 英博 (Toh, Hidehiro)

九州大学・生体防御医学研究所・特任講師

研究者番号：10353468

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)：ハダカデバネズミは「老化・がん化への耐性」と「分業制階級社会の形成」という際立った特徴を示す。本研究では、このハダカデバネズミの特性に対して、エピジェネティクス機構であるDNAメチル化修飾が寄与している可能性を探った。そのために、ハダカデバネズミの下位の雌が持つ子宮・卵巣・卵管の各ゲノム上における全てのシトシン塩基のDNAメチル化状態(メチローム)を全ゲノムバイサルファイト解析法により解読して、各組織のメチローム地図を作成した。また、ハダカデバネズミとマウス間でメチローム地図を比較した。これにより、研究が進んでいないハダカデバネズミのエピジェネティクスの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The naked mole rats (*Heterocephalus glaber*) are exceptionally long-lived, cancer-resistant rodents, and have a eusocial colony structure. In this study, we focused on DNA methylation, an epigenetic mechanism, and investigated whether DNA methylation has contributed to the evolution of the naked mole rat's extraordinary traits. Using amplification-free whole-genome bisulfite sequencing, we constructed the base-resolution methylome maps of naked mole rat's uterus, ovary, and oviduct. Moreover, we compared the uterus methylomes of naked mole rats and laboratory mouse. Thus, our results provide a basis for understanding the mechanisms and significance of DNA methylation in naked mole rat's cells.

研究分野：ゲノムインフォマティクス

キーワード：ハダカデバネズミ エピジェネティクス DNAメチル化 メチローム 全ゲノムバイサルファイト解析
真社会性 女王化

1. 研究開始当初の背景

ヒトの平均寿命が世界的に延びている昨今、健康に生活する期間、つまり“健康寿命”を延ばす抗老化・抗加齢医学の研究が進められている。現在、これらの学術分野から注目されている生物がハダカデバネズミである。ハダカデバネズミは東アフリカに生息し、地中の巣穴で集団生活する体長約10センチのネズミである(図1)。



図1：ハダカデバネズミ

ハダカデバネズミは同等のサイズである実験用マウスの10倍も生きる(平均寿命28年の長寿命)。また、腫瘍の形成が極めて少なく(がん化耐性)、心臓病・動脈硬化・アルツハイマー病といった症状も示さない。ハダカデバネズミは哺乳動物で唯一、加齢により死亡率が上昇する法則に逆らっている(老化耐性)、と報告されている(Ruby et al. eLife, 2018)。

そのため、がんも含めたヒトの老化関連疾患の研究分野においてハダカデバネズミの研究が進められており、その全ゲノム配列も2011年に公開された。しかし、ゲノムレベルの解析も含めて分子生物学的な研究による知見が極めて数少ないため、ハダカデバネズミの老化・がん化を抑えている細胞内の分子機構は不明な点が多い。

ハダカデバネズミは上記の「老化・がん化への耐性」に加えて、哺乳類では極めて珍しく、真社会性と呼ばれる「分業制の階級社会」を形成する特徴をもつ。1つの巣内で繁殖を行うのは1匹の女王と数匹の王のみで、他の個体は雌雄共に不妊化して兵士・労働者として巣内の仕事に従事する。ただし、女王から引き離された下位の雌個体は数ヶ月後に自動的に女王化(排卵)することから、兵士・労働者の雌は性的な成熟を可逆的に抑制している。女王化の抑制および抑制解除時の機構は不明である。不妊化が可逆的であることから、エピジェネティクスが関与する可能性に研究代表者は着目した。

「エピジェネティクス」は、DNA配列自体の変化ではなく、化学修飾の付加や除去によるDNA構造の変化により、必要に応じて遺伝子の発現を厳密に制御する機構である。1つの生体内で同じゲノム配列を持つ各組織の細胞がそれぞれ特有の機能を発揮するのは、各細胞のエピジェネティクスが異なるためである。DNAのシトシン塩基のメチル化(DNA

メチル化)は、遺伝子の発現を抑えるエピジェネティクス修飾で、シトシン-グアニンの順(CpG)で並んだシトシン塩基にメチル基が付加される。ゲノム上の全てのDNAメチル化状態をまとめて「メチローム」という。近年、次世代シーケンサーを用いて様々な生物が持つ様々な細胞のメチロームを調べる研究が精力的に行われている。

生体を構成する各細胞が正しく機能するためにエピジェネティクスが重要なため、エピジェネティクスの異常は様々な疾患の発症につながる。ヒトとマウスでは、細胞の老化・がん化はメチロームのレベルやパターンの変化と密接に関連している。一方、老化・がん化しないハダカデバネズミの細胞におけるエピジェネティクスについての知見は見当たらない。

2. 研究の目的

上述の通り、ハダカデバネズミは「老化・がん化への耐性」と「分業制の階級社会の形成」という2つの際立った特徴を示す。ハダカデバネズミが持つこの特性に寄与する分子機構の候補として、エピジェネティクス機構のDNAメチル化修飾に研究代表者は着目した。

本研究における第1の目的は、雌の性的成熟の抑制にDNAメチル化が関わる可能性を探ることである。第2の目的は、老化・がん化しないように進化したハダカデバネズミのメチロームにおける、マウスのメチロームとの類似点と相違点を明らかにすることである。そのために、本研究ではハダカデバネズミの下位の雌が持つ子宮・卵巣・卵管の各組織におけるメチロームを、全ゲノムバイサルファイト解析法により解読した。

3. 研究の方法

(1) ゲノムDNAの抽出

シーケンシングのライブラリを作成するために、ハダカデバネズミの下位の雌が持つ子宮・卵巣・卵管の各組織からゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAは連携研究者の三浦准教授から提供いただいた。

(2) 全ゲノムバイサルファイト解析

子宮・卵巣・卵管の各組織のゲノム上における全てのシトシン塩基のメチル化状態を解読するために、最も高精度なメチローム解析法である全ゲノムバイサルファイト解析(WGBS)を行った。この方法はメチル化シトシンと非メチル化シトシンとを見分けられる「バイサルファイト法」と「次世代シーケンサー」を組み合わせた手法である。

具体的には、採取したゲノムDNAをバイサ

ルファイト処理して作成したライブラリを、イルミナ社の次世代シーケンサーHiSeqにより読み取った。ライブラリ作成にはPCR増幅の偏りを避けられるPBAT法を使った(Miura et al. Nucleic Acids Res, 2012)。

(3) メチローム地図の作成

次世代シーケンサーで読み取った数億個のリード配列(1個のリード配列は100塩基長)を、DNAメチル化解析用のソフトを用いてハダカデバネズミのゲノム配列に貼り付けた(マッピング)。その結果、各リード配列がゲノム上のどの領域に由来するかを特定でき、各シトシン塩基に貼り付いたメチル化シトシンと非メチル化シトシンの数の割合から、ゲノム上の各シトシン塩基のメチル化率を算出して、メチローム地図を完成させた。組織ごとに上記(1)~(3)の工程を繰り返して、子宮・卵巣・卵管の各組織のメチローム地図を作成した。

4. 研究成果

PBAT法によりバイサルファイト処理したライブラリを次世代シーケンサーにより読み取った結果、ハダカデバネズミの子宮・卵巣・卵管のゲノムDNAに由来した計27億個の上質なリード配列を得た(表1)。これにより、高い信頼性と網羅性を持つDNAメチル化の基盤データを取得できた。

表1: シーケンシングの結果

	子宮	卵巣	卵管
リード数(百万個)	987	982	687
CpGメチル化率(%)	73.2	66.4	72.2

それらの塩基配列群を用いて情報解析を行い、ハダカデバネズミの子宮・卵巣・卵管の各メチローム地図を作成した。これにより、研究が進んでいないハダカデバネズミのエピジェネティクス的一端を明らかにした。

公開されているハダカデバネズミの全ゲノム配列は、30対ある染色体が600個以上の塩基配列ファイルに断片化した状態で、かつ、上質な遺伝子アノテーション情報も不足していた。そのため、データ解析に時間を要したが、2017年秋にEnsemblからハダカデバネズミの遺伝子アノテーション情報が公開されたため、現在はその情報を利用してメチロームのデータ解析を進めている。

老化・がん化しないように進化したハダカデバネズミのメチロームと、マウスのメチロームとの類似点と相違点を明らかにするために、ハダカデバネズミとマウスとの間で子

宮のメチローム地図を比較した。マウスのメチロームデータは公的データベースから入手した(GEO no. GSM1051166)。

CpGアイランドと呼ばれるCpGが密集した領域のDNAメチル化率を調べた結果、マウスと比べてハダカデバネズミの遺伝子領域と非遺伝子領域は高いDNAメチル化率を示した(図2)。この結果は、子宮という同じ組織のゲノム上において、遺伝子の転写開始点付近ではない領域でDNAメチル化の様式が両種間で異なることを示唆している。

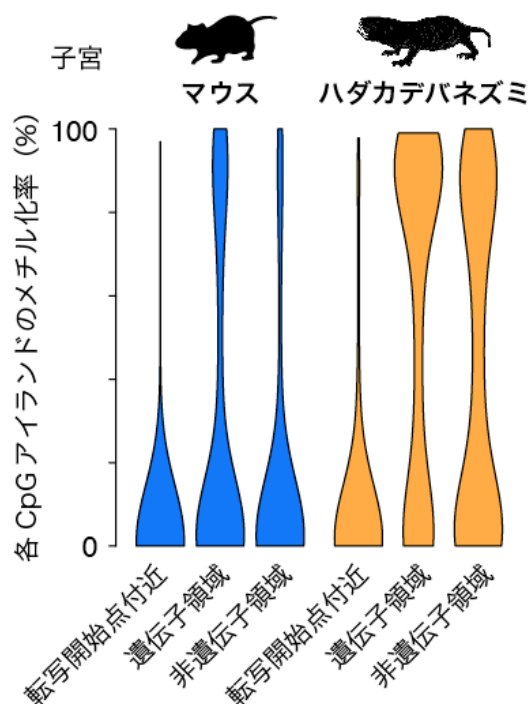


図2: マウスとハダカデバネズミ間の比較

現時点でハダカデバネズミとマウス間でメチロームを比較できる同じ組織は子宮のみである。マウスのメチロームとの類似点と相違点をさらに明らかにするために、ハダカデバネズミの複数種の組織のサンプルを追加で入手して解析を進めている。

また、雌の性的成熟の抑制にDNAメチル化が関わる可能性を探るためには、比較対象として妊性を回復した雌個体のデータも必要なため、そのサンプルを得られる機会を待っている状況である。

本研究により得られた全ての塩基配列ファイルと算出した各組織のDNAメチル化率のデータは公的データベース上で公開して、基盤データとして国内外の研究者に提供する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

〔学会発表〕（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/epigenome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤 英博 (TOH, Hidehiro)

九州大学・生体防御医学研究所・特任講師

研究者番号：10353468

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

三浦 恭子 (MIURA, Kyoko)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：80583062

(4) 研究協力者

森田 英利 (MORITA, Hidetoshi)

岡山大学・環境生命科学研究科・教授

研究者番号：70257294