

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14478

研究課題名(和文) 組換えDNMT1を用いたヒドロキシメチルシトシンの一塩基解像度の検出方法の開発

研究課題名(英文) Development of a method to determine hydroxymethylcytosine in DNA at single base resolution utilizing recombinant DNMT1

研究代表者

田嶋 正二 (TAJIMA, Shoji)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：50132931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムのメチル化修飾は高等真核生物の発生・分化に重要な役割を担っており、その樹立と維持機構は比較的解明が進んでいるが、消去機構は長年謎であった。最近、メチルシトシンが酸素添加酵素TETにより酸化されたヒドロキシメチルシトシンが脱メチル化の中間体であることが報告された。一塩基レベルの解像度でゲノム内のヒドロキシメチルシトシンの存在位置を解析する技術は重要であるが、既報にはまだ難点がある。本研究では、DNAメチル基転移酵素DNMT1を利用して一塩基レベルでヒドロキシメチルシトシンを解析する新規な方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Genomic DNA methylation modification plays crucial role in development. Major players of the establishment of DNA methylation and replication-coupled maintenance DNA methylation have been identified. Recently, active DNA demethylation step has been reported to be catalyzed initially by TET family oxidases to produce hydroxymethylcytosine. Although several techniques to identify the position of hydroxymethylcytosine in genome have been reported, they possess disadvantages. In the present study, we have developed a new technique to determine hydroxymethylcytosine at single base resolution utilizing recombinant DNA methyltransferase DNMT1.

研究分野：DNAメチル化の生化学

キーワード：DNAヒドロキシメチル化修飾 DNAメチル化 DNAメチル基転移酵素

1. 研究開始当初の背景

ゲノムのメチル化模様は、長期間安定に遺伝情報の発現を抑制する“エピジェネティック”な印として、高等生物で広く利用されている。DNAメチル化模様の樹立と維持については責任酵素が同定されており、解析は進んでいる。一方、一旦樹立された細胞系譜に依存して維持されているDNAメチル化模様は、細胞が分化するときに特定の遺伝子で脱メチル化されることが報告されている。この“能動的”な“脱メチル化”の機構については長い間不明であったが、最近、メチルシトシンが酸素添加酵素 TET により酸化されたヒドロキシメチルシトシンが脱メチル化の中間体であることが報告されるに至り、ヒドロキシメチルシトシンの解析技術はDNAメチル化模様の制御を理解する上で必須な技術となってきた。

ゲノムのヒドロキシメチルシトシンを定量する方法には、市販のヒドロキシメチルシトシン認識抗体と T4 フェージ由来のグルコシルトランスフェラーゼを用いてヒドロキシメチルシトシンをグルコシル化する方法が報告されている。一方、ゲノムのヒドロキシメチルシトシンを一塩基レベルの解像度で解析する主要な2つの技術には、メチルシトシンを酸素添加酵素 TET により酸化する方法 (TAB 法) と、ヒドロキシメチルシトシンを酸化触媒により酸化する方法 (ox 法) がある。いずれも、酸化後にバイサルファイト法により塩基配列を決定し、酸化反応前のメチル化修飾を受けたシトシンの位置と比較することにより同定する。しかし、TAB 法は組換え TET の触媒効率に難があり、また ox 法では DNA の損傷を制御することが難しいなど、いずれの方法にも問題がある。一塩基レベルで解析する技術は、生体内における脱メチル化機構とそれに果たすヒドロキシメチルシトシンの機能を解析するうえで欠かせない技術であり、安定で、使いやすい技術を開発することは急務である。

我々はこれまでの研究により、DNMT1 がヘミヒドロキシメチルシトシンをほとんどメチル化できないことを見出している。この DNMT1 の持つ性質と、メチルシトシンを解析するバイサルファイト法を組み合わせることで、DNMT1 を用いてヒドロキシメチルシトシンを一塩基解像度で解析できるのではないかと考えるに至った。さらに、DNA を前もってバイサルファイトで処理しておくことにより、ヒドロキシメチルシトシンの位置をメチルシトシンと同一鎖上で解析できると考えた。

2. 研究の目的

維持型メチル基転移酵素である DNMT1 は、ヘミメチル DNA を選択的にメチル化してフルメチル DNA に変換するが、ヘミヒドロキシメチル DNA を娘鎖に写し取り維持することはできない。すなわち、鋳型 DNA 上のメチルシトシンは複製鎖に DNMT1 によって保持されるの

に対して、ヒドロキシメチルシトシン修飾は複製鎖では非メチル状態となる。本研究計画では、DNMT1 がヒドロキシメチル化修飾を消去してメチル化修飾だけを新生鎖に写し取るという、DNAメチル基転移素 DNMT1 のもつ特徴的な性質を利用して、メチル化修飾を受けている部位と、ヒドロキシメチル化修飾を受けている部位を一塩基解像度で分別、同定する技術を開発する。さらに進めて、解析する (ゲノム) DNA を前もってバイサルファイト処理をすることにより、DNMT1 処理をした新生鎖のメチルシトシンとヒドロキシメチルシトシンを同一 DNA 鎖上で同定する方法の開発を目指す。

3. 研究の方法

ヒト DNMT1 の組換え体を昆虫細胞で発現させ、これを高純度で精製し、ヘミメチル DNA とヘミヒドロキシメチル DNA を区別して維持メチル化するための酵素標品とした。

ヘミメチルシトシンとヘミヒドロキシメチルシトシンを組込んだ 100 塩基対のモデル DNA を合成して、組換え DNAメチル基転移酵素がヘミメチルシトシンとヘミヒドロキシメチルシトシンを区別して維持メチル化する条件を検討した。具体的には、モデル DNA をメチル基受容体として、組換え DNMT1 の量、塩の種類と濃度、温度、反応時間によって、メチル基受容基質内のヘミメチル CpG とヘミヒドロキシメチル CpG の維持メチル化がどのように影響を受けるのかについて解析した。同時にバイサルファイト反応後の DNA の至適な回収条件についても評価した。

ゲノム DNA 内でヒドロキシメチル化されていることが報告されている、*Morc1* 遺伝子のプロモーター領域にプライマーを設定して、プライマー伸長法で DNA 合成をおこない、それを DNMT1 でメチル化し、その産物のメチルシトシンの位置を同定した。配列を親鎖のメチル化修飾位置と比較することにより、ヒドロキシメチルシトシンの位置を同定した。また、バイサルファイト処理したゲノムからライブラリーを作製し、次世代シーケンサーにより解析した。

4. 研究成果

DNMT1 と DNA の濃度比、塩の種類と濃度、温度、反応時間、DNA の回収方法について、モデル DNA を用いて条件検討をおこない、解析条件を決めた。この条件を用いて、これまでヒドロキシメチルシトシンが胚性幹細胞ゲノムで蓄積していることが報告されている *Morc1* 遺伝子プロモーター領域を例にとり解析をおこない、DNMT1 を用いる方法によりヒドロキシメチルシトシンの一塩基レベルでの解析が可能であることを示した。これにより、従来法とは異なる、ヒドロキシメチルシトシンを一塩基レベルで解析する技術を開発した (業績)。

さらに、解析対象のゲノム DNA を前もってバイサルファイト処理を行う方法を、*Morc1* 遺伝子プロモーターを例にとり検討した。その結果、以下に示すような問題点が明らかとなった。すなわち、前もってバイサルファイト処理をすると、ゲノムの特定の領域でのプライマーのアニールの正確性が損なわれる結果となった。これは、DNA をあらかじめバイサルファイト処理することにより、C が U (T) に変換され、伸長反応のためにアニールさせたプライマーの配列特異性が低下したためであると考えられる。プライマーのアニリング条件を様々変化させ、各種の DNA ポリメラーゼと転写伸長反応を試みたが、改善されなかった。

ゲノムワイドな解析のためのライブラリーの作製にはプライマーのアニリングの正確性は特に必要ないので、ゲノムワイドな解析を試みたところ、別な問題点が明らかとなった。すなわち、次世代シーケンサーに供する DNA 断片の増幅に用いる DNA ポリメラーゼは、鋳型が AT に富む配列のとき伸長反応が十分ではなく、ゲノム領域のリード数を増やすことが困難であった。ゲノムワイドな解析のライブラリー作製については、ライブラリー鋳型の作製を改善すれば、問題点は解決可能であると考えている。

解析方法の開発の条件検討の過程で DNMT1 の興味深い性質を発見した。すなわち、DNMT1 は、ある CpG がヘミヒドロキシメチル化状態にあっても、周りの CpG メチル化密度が高い場合には、ヘミヒドロキシメチル CpG 部位の相補鎖をメチル化してしまう傾向がある。これは、CpG アイランドが密にメチル化されている場合は、たとえ一部が TET によりヒドロキシメチル化されていたとしても、脱メチル化には向かわず、メチル化が維持されることを意味している。技術的な視点を離れると、これは、生体内における DNA メチル化状態の維持機構を理解するうえで非常に興味深い性質であり、今後検証に値する知見である（業績）

結論として、ヒト組換え DNMT1 を用いた方法は、元の鎖のバイサルファイトシーケンシングの結果と対比させることによって、ヒドロキシメチルシトシンの一塩基レベルでの解析方法の一つとして利用価値のある技術であることを示した。しかし、メチルシトシンとヒドロキシメチルシトシンを同一鎖上で同定するために考案した、前もってバイサルファイト処理を行う方法は、さらに条件検討を行う必要があることが明らかとなった。

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2件)

Saori Takahashi, Isao Suetake, Jan Engelhardt, Shoji Tajima. A novel method to

analyze 5-hydroxymethylcytosine in the CpG sequence using maintenance DNA methyltransferase DNMT1. *FEBS Open Bio* 5, 741-747, 2015.

Doi: 10.1016/j.fob.2015.09.003 査読有

Seketsu Fukuzawa, Kazuo Tachibana, Shoji Tajima, Isao Suetake. Selective oxidation of 5-hydroxymethylcytosine with micelle incarcerated oxidants to determine it at single base resolution. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25(24), 5667-5671, 2015.

Doi: 10.1016/j.bmcl.2015.11.017. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

高橋 沙央里他、組換え DNMT1 を用いた簡便なヒドロキシメチルシトシン 1 塩基解像度での検出方法、日本エピジェネティクス研究会第9回年会 2015年5月25、26日、学術総合センター—ツ橋講堂(東京都、千代田区)

Saori Takahashi et al., Development of a method for a single base resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine with recombinant DNMT1. The 40th Naito Conference on "Epigenetics—From Histone Code to Therapeutic Strategy" September 15-18, 2015, Chatraise Gateaux Kingdom Sapporo, Hokkaido (北海道、札幌市)

高橋 沙央里他、マウス ES 細胞における組換え DNMT1 を利用した簡易的な 1 塩基解像度での 5hmC の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会年会、2015 年 12 月 1~4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

福澤 世傑他、ミセル包含酸化剤を用いた一塩基レベルでの 5-ヒドロキシメチルシトシン検出法、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会年会、2015 年 12 月 1~4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

福澤 世傑他、5-ヒドロキシメチルシトシンの一塩基レベルでの検出法の開発、日本化学会 第 96 春季年会、2016 年 3 月 24 日~27 日、同志社大学 京田辺キャンパス(京都府、京田辺市)

福澤 世傑他、ミセル包含酸化剤を用いた一塩基レベルでの 5-ヒドロキシメチルシトシン検出法、日本エピジェネティクス研究会、2016 年 5 月 19 日 20 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府、豊中市)

〔図書〕(計1件)

Shoji Tajima, Hironobu Kimura, Isao Suetake. Establishment and maintenance of DNA methylation pp 489-516. *In* DNA

replication, recombination, and repair,
edited by Fumio Hanaoka and Kaoru Sugasawa,
eBook, 2016, Springer Japan,
DOI: 10.1007/978-4-431-55873-6

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田嶋 正二 (TAJIMA Shoji)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：50132931

(2)研究分担者

木村 博信 (KIMURA Hironobu)
大阪大学・蛋白質研究所・助教
研究者番号：60378891

未武 勲 (SUETAKE Isao)
大阪大学・蛋白質研究所・准教授
研究者番号：80304054

(3)連携研究者

伊藤 隆司 (ITO Takashi)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：90201326