

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02154

研究課題名（和文）DNAのヒドロキシメチルシトシン解析手法の開発とヘミ修飾の生物学的意義

研究課題名（英文）Development of analytical method for DNA hydroxymethylcytosine and biological significance of hemi-modification of cytosine.

研究代表者

幸田 尚（Kohda, Takashi）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：60211893

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：シトシンのメチル化修飾は哺乳類のエピジェネティック制御に重要である。本研究ではその詳細な制御機構を明らかにするための技術開発を行なった。これまで我々が開発してきたメチルシトシン（mC）とヒドロキシメチルシトシン（hmC）および非修飾のシトシン（C）を同一分子上で同定することのできる解析手法を見直して、その解析精度を向上させるとともにCpG以外のコンテキストのシトシン修飾についても解析を可能とした。また、両鎖のシトシンの修飾状態をmC、hmC、Cのいずれであるかを解析することが可能となるよう、解析手法の拡張を目指し開発を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって改良を行なったシトシン修飾の解析技術は、mC、hmC、Cをゲノムワイドに同時に解析できる手法であり、解析精度を向上させ、安定的に解析を可能とすることで、さまざまなエピゲノム解析に応用することで細胞の分化やがん化、mCの脱メチル化機構の解析などに適用が可能となるだけでなく、liquid biopsyなどのがんの診断などの分野においても貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cytosine methylation modification is crucial for epigenetic regulation in mammals. In this study, we developed techniques to analyze cytosine modification states to elucidate the detailed regulatory mechanisms. We reviewed and enhanced the analytical method we previously developed, which can identify methylcytosine (mC), hydroxymethylcytosine (hmC), and non-modified cytosine (C) on the same DNA molecule simultaneously, improving its analytical accuracy and enabling the analysis of cytosine modifications in contexts other than CpG. Additionally, we aimed to extend the analytical method to analyze the modification state of cytosines on both DNA strands, whether they are mC, hmC, or C.

研究分野：Epigenetics

キーワード：ヒドロキシメチルシトシン メチルシトシン エピゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

哺乳類において、シトシンのメチル化修飾はエピジェネティックな制御で重要な位置を占めている。本研究の核心的な問いは、細胞の分化やがん化といった生物学的な過程におけるシトシン修飾変換の詳細な制御機構を明らかにするとともに、それぞれの修飾が転写制御における意味を明らかにすることである。よく知られるように哺乳類においてシトシンのメチル化は DNMT1 による維持メチル化と DNMT3A、3B による *de novo* メチル化、脱メチル化は、DNA 複製を経て DNMT1 による維持メチル化が働かない場合に新生鎖がメチル化されないことによる受動的脱メチル化の機構と、メチルシトシン (mC) の TET タンパク質群による酸化によって生成するヒドロキシメチルシトシン (hmC) を経由したいわゆる能動的な脱メチル化の経路が知られており、その消長は複雑である。そこでシトシンのメチル化と脱メチル化の機構を解析し、また脱メチル化の中間体も含めてそれぞれの修飾シトシンの生物学的な機能を研究するためには mC のみならず hmC も含めた精密な解析技術が必要であると考えられる。

シトシン修飾の 1 塩基解像度の解析には長い間 mC の解析法である bisulfite 法が用いられてきたが、図に示すように、この方法は mC と hmC を区別することができない。そこで hmC の解析法として TAB-seq が開発された。TAB-seq は hmC のみを検出する手法であるが、非修飾のシトシン (C) と mC を区別することができないため、bisulfite-seq と組み合わせる必要がある。また、bisulfite 反応は DNA の分解が起こるため、これらの手法は微量の DNA の解析には向かないという問題もある。最近、APOBEC3A などの酵素を用いることで bisulfite-seq と同等の情報を得る EM-seq 法が提案され<sup>1</sup>、また同様に TAB-seq 法と同等の情報を得ることのできる ACE-seq 法も開発された<sup>2</sup>。これらは極微量のサンプルの解析に使えるという意味では重要な進歩であるが、mC と hmC の同時解析のための改良は行われていない。

一方我々は、シトシン修飾の解析においては、mC だけを単独で解析するだけでなく hmC との同時解析が重要であると考え、またそれぞれの DNA 分子上での修飾状態を同時に解析することによって、その分布を細胞集団における平均値としてではなく個々の DNA 上の修飾状態の分布として解析することで修飾状態の変化の分子的な機構の解明につながると考えている。そこで、我々は新しい識別原理に基づく mC、hmC、C の状態を 1 塩基解像度で解析する手法を考案し、Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Assay (EnIGMA) 法と命名して実用化してきた。EnIGMA 法はこれまでに報告されたどの手法においても不可能であった mC と hmC の同一分子上での同時解析を可能とした画期的な解析技術であり、その検出精度も TAB-seq や oxBS-seq と比較しても十分に高い (mC、hmC いずれに対しても 95% 以上) ことを示した<sup>3</sup>。

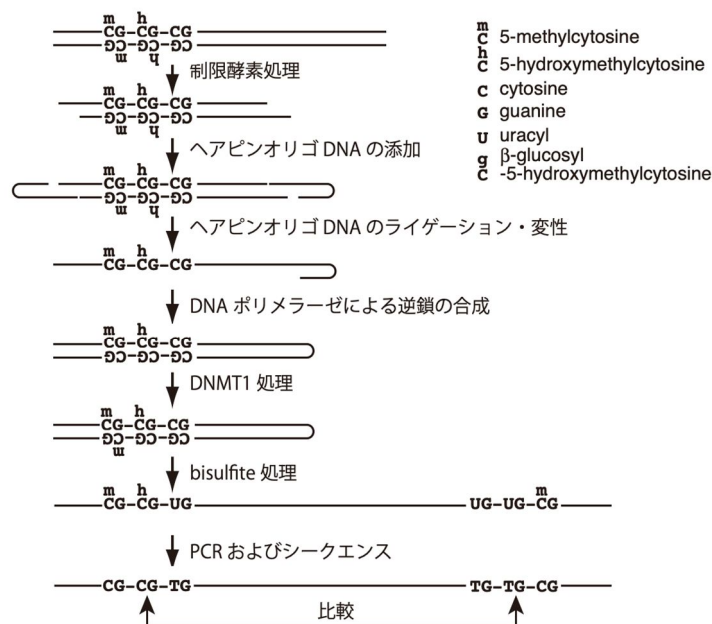


図 1 EnIGMA 法の概略

この手法は図 1 に示すように DNMT1 がヘミメチルシトシンの逆鎖はメチル化するが、ヘミヒドロキシメチルシトシンや非修飾の CpG はメチル化しないという特異性を用いた手法である。我々はこの技術を次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドの解析に応用することにも成功したが、実際に解析に用いてみると hmC のゲノム中での存在比は mC と比較してかなり低いため、解析精度のさらなる向上が必要であると考えた。

また、mC、hmC および C はそれぞれ転写制御に対して独自の意味を持つエピゲノム修飾状態であると考えられる。しかし CpG がメチル化されている場合はほとんど両鎖がメチル化されていると考え、bisulfite 法による mC の解析においても片側のストランドのみ解析をすれば十

分と考える研究者が少なくない。しかしながら DNA は 2 本鎖であり、図 2 に示すように、CpG の修飾状態は両鎖がメチル化、ヒドロキシメチル化あるいは非修飾の状態だけではなく、片鎖のみが修飾された「ヘミ修飾」分子が考えられる。これらの「ヘミ修飾」状態は脱メチル化の中間段階として存在することが考えられるだけでなく、独自の生物学的な機能を担っている可能性も考えられる。しかし、既存のシトシン修飾解析手法の多くはストランドごとに解析を行うため、ヘミ修飾状態についての解析は行えない。我々はシトシン修飾の解析においてはこれらのヘミ

修飾状態も解析できることの価値にも目を向ける必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はこれまで申請者が開発してきた mC、hmC、C の同時解析技術の改良を行い、存在比率が低い hmC についてもゲノムワイドの解析に耐えるよう解析精度のさらなる向上を目指すことである。また、新たに 2 本鎖の DNA の修飾を同時に両鎖とも解析してヘミ修飾状態も含めて



図2 シトシン修飾における両鎖の修飾と「ヘミ修飾」

mC、hmC、C の全ての修飾状態を解析できるよう EnIGMA 法を抜本的に改良することである。EnIGMA 法の利点は既存のシトシン修飾の解析法では得られなかった DNA 分子上の修飾状態をそのまま mC、hmC、C について取得するという点にある。前述のように、最近見出された hmC の解析法については TAB-seq をはじめとしていくつかの手法が提案されているが、既存の手法はいずれも hmC のみや mC のみを解析する手法であり、3 つの修飾状態を解析しようとすると複数の手法での解析結果を組み合わせるしかなかった。このため、得られる結果は元の DNA 分子そのものの修飾状態ではなく、全体としての平均的な修飾状態でしかない。これに対して EnIGMA 法は他の手法と比較して同程度の解析精度を持ち、かつ直接同一分子上の mC、hmC、C を同時に同定できる唯一の手法であり、hmC も含めたシトシン修飾の解析を行う研究者が求めている手法であると考えられる。これまでの EnIGMA 法 (ver. 1) の解析精度が 95%程度であったものを EnIGMA ver. 2 としてさらに高め、99%以上とすることができればその独自性、優位性は明らかである。また、DNA の両鎖のシトシン修飾を解析する手法としては mC を同定する hairpin-bisulfite 法が以前から提案され使われてきたが、hmC を含めた解析を行うものはまだ報告されていない。本研究では EnIGMA ver. 3 としてこの課題に挑戦することとした。hmC を含めたヘミ修飾の解析から得られる情報は、DNA の脱メチル化の詳細な機構解明や新しい転写制御の機構の発見につながるものと期待される。

## 3. 研究の方法

EnIGMA ver. 2 の開発にあたっては、EnIGMA ver. 1 の開発で用いたものと同様の合成基質を準備し、新たに考案したプロトコールによってシトシンの修飾状態を同定し、その効率を測定することで同定が可能であるかを検証するとともに、解析効率の測定を行った。具体的にはマウス H19 DMR の配列に含まれる 60 bp 中に 8 個の CpG を含む配列を用い、すべての CpG のシトシンが mC、hmC、C あるいはこの 3 つの修飾状態がすべて含まれる合成 DNA を作成し、解析のためのモデル基質とする。これらを用いて EnIGMA ver. 2 の原理が期待通り働くかどうかを明らかにするとともに、解析の精度をオリジナルの EnIGMA 法と比較し、個々の酵素反応の最適化を行った。基本的にはシトシンがウラシル (U) に変換され PCR 増幅後にチミン (T) になるかを判定に用いる部分は EnIGMA ver. 1 と同様であるため、反応の効率を定量するためには RFLP 解析と必要に応じて次世代シーケンサーを用いたシーケンスによるものを評価の指標とした。個々の酵素反応のステップとしては、EnIGMA ver. 1 においては DNMT1 酵素がヘミメチル CpG の非修飾シトシンをメチル化するがヘミヒドロキシメチル CpG や両鎖非修飾のシトシンはメチル化しないという特異性に依存している。しかし酵素活性が高い場合はヘミメチル CpG を十分にメチル化するが同時に非特異的なメチル化の活性も上昇する傾向にあるため、基質と酵素の量比を適切に保つ必要があることや、DNMT1 酵素は失活しやすく、-80 度で凍結保存する必要があるが、凍結融解のたびに 30%程度失活してしまうという問題もある。また市販の DNMT1 酵素で十分高い酵素活性を持っているものが極めて少なく、同一メーカーの製品であってもロット間の活性の違いが大きいことも、EnIGMA 法の普及に大きな足かせとなってきた。いくつかの生物種の DNMT1 を試すなど、様々な検討を継続的に行ってきたが、この点を抜本的に解決するには至っていない。本研究開始後に Füllgrabe らは DNMT1 の代わりにより基質特異性が高い DNMT5 を用いることで EnIGMA ver. 1 とほぼ同様の手法で高精度の解析を可能とするプロトコールを発表した。一方、我々は DNMT1 酵素にかえて EM-seq 法で用いられる酵素を組み合わせることで、同一分子上の mC、hmC、C を同時に高精度で同定するプロトコールとして EnIGMA ver. 2 の開発を行った。

さらに、EnIGMA ver. 2 では片鎖のみの解析であったところを両鎖の解析を行うために解析すべきゲノム DNA をヘアピン型のアダプターで連結した後に更に逆鎖の合成を行うことで解析を行う戦略を考案し、EnIGMA ver. 3 として解析法の開発を行った。

## 4. 研究成果

本研究では、新たに考案した酵素反応の組み合わせによって 1 塩基解像度で mC、hmC、C 3 つの修飾状態を同時に同定することが可能であることを、モデル基質を用いた実験で実証した。また、用いる酵素の入手の容易さや安定性も含めてプロトコールの調整を行うとともに、解析精度の向上を図るべく、反応条件の最適化を行った。また、マウスのゲノム DNA を用いてゲノムワ

イドの解析を行うためのライブラリ調製を行うためのプロトコルの確立も行った。これらによって、EnIGMA ver. 1 より安定した解析技術として EnIGMA ver. 2 を確立する目処を立てることに成功し、現在投稿準備中である。EnIGMA ver. 2 は技術的に EnIGMA ver. 1 より操作が容易で安定しているだけでなく、CpG 以外のすべてのコンテキストでシトシンの修飾状態を解析できるという利点が挙げられる。一方で、EnIGMA ver. 2 のデメリットも存在する。これまで 1 塩基解像度での mC の解析法として最も一般的に用いられてきた手法は bisulfite 法であるが、この手法では C を U に変換するが mC は変換しないため、元の配列と比較して C が T としてシーケンスされた場合は非修飾のシトシンであったと判定する。しかしながら、解析すべき DNA 分子の bisulfite 反応での変換前の配列がわかっている場合は問題がないが、ヒトのゲノムなど、リファレンスの配列との間に多型が存在する可能性がある場合、C から T への変異が存在していた場合は実際には SNP であるにも関わらず非修飾のシトシンであると誤判定されてしまう。そのため、多型情報などが取得されていないゲノムサンプルの解析にあたってはあらかじめストレートな配列決定も行う必要があり、解析した配列が diploid において上述の SNP がヘテロに存在する場合はどちらのアレルに由来したのかといった情報が得られなければ厳密な意味での修飾状態の決定ができないという問題が存在していた。Hairpin-bisulfite 法や EnIGMA ver. 1 においては bisulfite 反応後のシーケンスであっても両方のストランドの情報が保存されているため、変換前の配列を復元できるため、bisulfite 反応におけるこのような問題を生じないという利点があったが、EnIGMA ver. 2 の場合は 2 回のデアミネーション反応を行う関係から、元の配列を復元することができないというデメリットが生じてしまう。そこで本研究では EnIGMA ver. 2 を更に両鎖同時解析を可能とするように拡張し EnIGMA ver.3 として確立することにより、あまり考慮されてこなかった「ヘミ修飾」も含め、シトシン修飾の生物学的意味を明らかにすることを目指した。EnIGMA ver.3 では最初に両鎖の DNA を連結して反応を行い解析することで両鎖の同時解析を可能とするための技術開発を行なった。これにより原理的には両鎖の mC、hmC、C の同時解析を可能とするだけでなく、反応前の元の配列を復元することも可能となると期待される。しかしながら、EnIGMA ver.3 では ver.1、ver.2 と比較してより長いヘアピン状の DNA を変性、PCR 増幅することが必要であり、十分な解析精度を得るためには更なる条件検討が必要であることが明らかとなった。

#### <引用文献>

1. Vaisvila, R. *et al.* Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at single-base resolution from picograms of DNA. *Genome Res.* **31**, 1280–1289 (2021).
2. Schutsky, E. K. *et al.* Nondestructive, base-resolution sequencing of 5-hydroxymethylcytosine using a DNA deaminase. *Nat Biotechnol* (2018) doi:10.1038/nbt.4204.
3. Kawasaki, Y. *et al.* A Novel method for the simultaneous identification of methylcytosine and hydroxymethylcytosine at a single base resolution. *Nucleic Acids Res* gkw994 (2016) doi:10.1093/nar/gkw994.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 幸田 尚
2. 発表標題 ヒドロキシメチルシトシンとメチルシトシン同時解析法の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	志浦 寛相  (Shiura Hirosuke)  (10451907)	山梨大学・大学院総合研究部・助教    (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------